ムラサキガイの接着物質 ——遺伝子とその発現

井上広滋*

波の打ち寄せる岩礁や防波堤、ここにしっかりと接着して流されることのないムラサキガイ。この水中での接着に関わるタンパク質の構造と合成のメカニズムが、遺伝子からのアプローチで次第に解明されつつある。それに伴って、接着タンパク質の配列が個体レベルでも少しずつ変異していることが明らかになり、この微妙な違いが、混乱しているムラサキガイの分類に一つのヒントを与えている。

ムラサキガイの付着

1. ムラサキガイの分類学

磯や防波堤などの潮間帯に生息する二枚貝ムラサキガイは、世界的に重要な食料資源で、世界各地で広く養殖されている。日本では、レストランなどで“ムール貝”という名称で時々見かけるものの、食用としてはあまり重要視されておらず、むしろフジツボなどととも、養殖施設、船舶、港湾施設、発電所の取水口などに大量に付着して機能を損なう付着汚損生物として扱われることが多い⁽¹⁾。

ムラサキガイには、アメリカ東海岸やヨーロッパ北部に生息する *Mytilus edulis*、地中海、アメリカ西海岸、アジア温帯域に生息する *M. galloprovincialis*、および北太平洋に主に生息する *M. trossulus* の3種が存在するとされる⁽²⁾。*M. galloprovincialis* はもともとは *M. edulis* と同一種で、地中海が大西洋から切り離されていた時期に隔離されて独立した集団であると考えられている。2種の分化の程度はまだ種のレベルに達していないとして、*M. galloprovincialis* を *M. edulis* の亜種 (*M. edulis galloprovincialis*) とみなす説もあるが、足糸タンパク質から見る限りは別種とするのが適当であるように思われるので、本稿では両種を別種として扱う。

さて、3種のムラサキガイを厳密に区別する

ことは、実際には非常に困難である。その理由は、これら3種が外見上よく似ているうえ、同種であっても生息場所によって形態が変異すること、複数種が共存する地域ではしばしば雑種が生じること、船舶などに付着してそれぞれの種が様々な地域に運ばれて分布が変動しやすいことなどである。区別が重要ではない場合には便宜的に、3種をまとめて *M. edulis* complex と呼ばれることも多い。ちなみに、日本のムラサキガイは、1920年代に外国船の往来により持ち込まれたものと考えられ⁽³⁾、図鑑などでは *M. edulis* として記載されている場合が多いが、アイソザイム分析の結果などから判断して、*M. galloprovincialis* であると考えられるようになってきている^(2~4)。なお、北海道にはそれ以前からムラサキガイが生息していたとされるが、これは最近の分類に従えば、*M. trossulus* であると考えられる⁽²⁾。

2. ムラサキガイの足と足糸

ムラサキガイ類の付着については、これまでに多くの研究者により研究されてきた。その理由は、これらの貝が世界各地の海岸において容易に採集できる身近な存在であることに加えて、この貝の付着が水中で行なわれ、しかも強い波に洗われても剥がれないほどの強度であるからである。今日、様々な接着剤が開発されているが、水中で不溶化して強い強度を実現できる接着剤は存在しない⁽⁵⁾。そのため、ムラサキガイの付着の研究には、アメリカでは生物・化学系のみならず歯科関係や海軍からも研究費が提供されているほどで

Gene Encoding Mussel Adhesive Proteins and Their Expression

* Koji INOUE, (株)海洋バイオテクノロジー研究所

図 1 ■ ムラサキイガイの付着 (土橋幸子, 原図)

図 2 ■ ムラサキイガイの足と足糸の構造の模式図

足糸は、錐型である足の裏側の中央部を縦に走る足溝と先端付近にある陥入部に、必要なタンパク質を注入することによって作られる。足における Mgfp 1, Mgfp 2 の合成部位、および足糸における両タンパク質の分布を示した。

ある。

ムラサキイガイの付着は、足糸 (byssus) と呼ばれるタンパク質性の糸を用いて行なわれる (図 1)。この足糸は、糸本体と基盤に接着する吸盤状の部分 (面盤) から構成され、その合成は足 (foot) と呼ばれる器官で行なわれる。ムラサキイガイの足はよく発達しており、付着場所を探索するセンサーとしての役割と足糸合成器官としての役割を併わせ持っている。足糸合成の様子は、採集したムラサキイガイを海水を満たした水槽に入れて放置しておくだけで容易に観察できる。始めにムラサキイガイは足の先で付着に適した表面を探索して足糸を張る場所を決定し、その場所を足先で掃除する。次いで、その場所に足先を固定し

て静止し、その間に足の裏側中央にある足溝 (ventral groove) とその先端にある陥入部 (distal depression) (図 2) に必要なタンパク質を分泌する。タンパク質の硬化が終了するまで待つて、足を離すと完成した足糸が残されるという手順である^(6,7)。

足糸タンパク質の構造

1. 接着タンパク質 (Mefp 1/ Mgfp 1) の構造と変異

足糸の主成分は、配列中にドーパ (3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン) が含まれるポリフェノール性の数種のタンパク質である^(7,8)。以下、これまでに明らかにされた足糸タンパク質について解説する。

足糸の成分のうち最も古くから研究されてきたのは、*M. edulis* の接着タンパク質 Mefp 1 (*M. edulis* foot protein 1) である。このタンパク質は、足糸全体の表面をコーティングしており、かつ面盤表面と接着する基盤の表面との間で接着剤とし

て働いていると考えられている (図 2)。Mefp 1 は、Waite らのグループの研究により、10 個のアミノ酸からなる“デカペプチドモチーフ (AKPSYP**P*TY*K)”，および 6 個のアミノ酸からなる“ヘキサペプチドモチーフ (AKPTY*K)”の 2 種類のモチーフが何度も繰り返される構造を持つタンパク質であることが、1980 年代前半にすでにわかっていた⁽⁷⁾ (配列中の P* および P** は、ヒドロキシプロリンおよびヒドロキシプロリン⁽⁹⁾を、Y* はドーパを各々示す)。しかし、このタンパク質は、分泌後分子間架橋をやって不溶化し、タンパク質分解酵素などに耐性となるため、全長の一次構造をタンパク質分析の手法で決定することはできなかった。

Mefp 1 の一次構造は、1990 年頃になってアメリカの Genex 社およびボストン大学の 2 つの独立したグループにより、遺伝子クローニングによって明らかにされた⁽¹⁰⁾。その結果、Mefp 1 の主要部分は 70 回以上のデカペプチドの繰り返しで、デカペプチドの間にヘキサペプチドが所々挿入されている構造であることがわかった。興味深いことに、両グループから発表された配列はほとんど同じであったが、繰り返し領域におけるデカペプチドおよびヘキサペプチドの数と順序が異なっていた。すなわち、Genex 社が示した配列はデカペプチド 72 回にヘキサペプチド 14 回であるのに対し、ボストン大学提出の配列はデカペプチド 71 回にヘキサペプチド 13 回で、しかもヘキサペプチドの挿入箇所が互いに異なっていたのである (図 3)。

一方、筆者らは日本産 *M. galloprovincialis* の接着タンパク質 (Mgfp 1) の cDNA をクローニングし、その一次構造を決定した⁽¹¹⁾。前述のように、*M. edulis* と *M. galloprovincialis* は非常に近縁なので、その配列はほとんど *M. edulis* と同じであろうと予想された。実際、配列は全般的によく似ていたが、いくつかの相違点も見いだされた。なかでも最大の相違点は、繰り返し領域の中にヘキサペプチドモチーフがまったく存在しなかったことである。繰り返し領域は、*M. edulis* と同じデカペプチドモチーフの繰り返しを 62 回含んでいるが、ヘキサペプチドモチーフは現われず、代わりに 14 アミノ酸からなる新たなモチーフ (テトラデカペプチドモチーフ) が途中で 1 回だけ現われた (図 3)。

2. 繰り返し領域の長さの変異

さらに、繰り返し領域における変異を調べるために、繰り返し領域の全長を増幅するための PCR プライマーを作製し、アメリカ東海岸の *M. edulis*、日本の *M. galloprovincialis*、アラスカの *M. trossulus* について繰り返し領域の増幅を行なった。その結果、増幅されてくる断片の長さは同種であっても個体ごとに異なっており、ムラサキイガイ類の接着タンパク質の繰り返し領域

Mg	Me1	Me2
AKTNYPPVYK	AKTNYPPVYK	AKTNYPPVYK
PKMTYPPPTYK	PKMTYPPPTYK	PKMTYPPPTYK
PKPSYPPTYK	PKPSYPPTYK	PKPSYPPTYK
PKPSYPATYK	SKPTYK	SKPTYK
SKSSYPSSYK	PKITYPPPTYK	PKITYPPPTYK
PKKTYPPPTYK	AKPSYPSSYK	AKPSYPSSYK
PKLTYPPPTYK	PKKTYPPPTYK	PKKTYPPPTYK
PKPSYPPTYK	PKLTYPPPTYK	PKLTYPPPTYK
PKPSYPATYK	PKPSYPPTYK	PKPSYPPTYK
SKSSYPSSYK	SKPTYK	PKPSYPSSYK
TKKTYPPSSYK	PKITYPPPTYK	TKKTYPPSSYK
PKKTYPPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
PKVSYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
SKSSYPPIYK	PKKTYPPPTYK	AKPSYPPTYK
TKASYPSSYK	PKLTYPPPTYK	AKPTYK
PKKTYPPPTYK	PKPSYPPTYK	AKPTYPPPTYK
PKISYPPTYK	PKPSYPSSYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPTSYR	TKKTYPPPTYK	AKPTYK
AKPSYPPTYK	PKLTYPPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPPTYK	PKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPPTYK	PKKTYPPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPTYPPPTYK	PPLTYPPPTYK	AKPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPTYK
AKPSYPPSSYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
PKTTYPPSSYK	AKPTYK	AKPSYPPTYK
PKISYPPTYK	AKPTYPPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPIYK	AKPTYPPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYLPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPPTYK	AKLTYK	AKPTYK
AKPRYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPTYPPPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
AKLSYPPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPPTYK	VKPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPPTYK	AKPTYPPPTYK	AKPSYPPTYK
TKPSYPPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPTYK
AKPSYSSTYK	AKPSYPPTYK	AKPTYPPPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPSSYK
AKPSYPPTYK	AKPTYPPPTYK	SKSSYPSSYK
AKPSYPPTYK	AKPTYK	PKKTYPPPTYK
AKPSYPPTYK	VKPTYPPPTYK	PKLTYKPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	PKPSYPPSSYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	PKTTYPPPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	PKISYPPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPPTYK	AKPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPATYPPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
AKPSYPPTYK	AKPTYK	AKPSYK
AKPSYPPTYK	AKPTYK	AKPTYPPPTYK
PKPSYPPTYK	AKPTYK	AKPSYPPTYK
SKSSYPSSYK	AKPTYPPPTYK	AKPSYPPTYK
PKKTYPPPTYK	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
PKLTYPPPIYK	AKPAK	AKPSYPPTYK
PKPSYPPTYK	AKPTYPPPTYK	AKPSYPPTYK
	AKPTYPPPTYK	PKISYPPTYK
	AKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
	PKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
	PKLTYPPPTYK	AKPSYPPTYK
	PKPSYPPTYK	AKPSYPPTYK
	PKLTYPPPTYK	AKPSYPPTYK
	SKTSYPPPTYN	AKPSYPPTYK
	KKISYPPSSYK	AKPSYPPTYK
	AKTSYPPPAYK	AKPSYPPTYK

図 3 ■ 接着タンパク質の繰り返し領域のアミノ酸配列⁽¹³⁾
Mg は *M. galloprovincialis*, Me 1 および Me 2 は *M. edulis* の配列を示す。

は、個体ごとに長さが異なることが示された。したがって、*M. edulis* において報告された2つの配列が異なっていたこととも矛盾しない。DNAの繰り返し配列は複製などの際にしばしば配列の“スリップ”を起こして、繰り返しの数が変動することが知られており、ムラサキガイ類の接着タンパク質の繰り返し領域の変異も類似のメカニズムで生じている可能性がある。生物の生存のために必須のタンパク質は異なる種の間においても保存性が高いのが一般的であるが、ムラサキガイの生存に必須のタンパク質である接着タンパク質の配列が個体間でも変異していることは興味深い。この変異はムラサキガイの生存や適応戦略上何らかの意味を持っているかも知れない。

3. デカペプチドを構成するアミノ酸の変異

次に、個々のアミノ酸に注目すると、デカペプチドを構成するアミノ酸には、しばしばアミノ酸の置換が認められる(図4)。たとえば、筆者らの単離した *Mgfp 1* についてみると、特に、始めのアラニン、3、7番目のプロリン、4番目のセリ

ン、8番目のスレオニンは、しばしば(多くの場合、性質の似たアミノ酸によって)置換されていた。一方、5、9番目のチロシン、2、10番目のリジンおよび6番目のプロリンは繰り返し間で非常によく保存されており、これらのアミノ酸残基が機能上重要であることが示唆される。この傾向は *Mefp 1* においても同様である(図3)。チロシンについては、ドーパ、さらにドーパキノンに変換された後、リジンとの間でキノン架橋を作ることにより、このタンパク質は不溶化すると考えられている^(5,7)。6番目のプロリンに関しては、翻訳後2個の水酸基が付加されてジヒドロキシプロリンに変換されることが最近明らかにされたものの⁽⁹⁾、具体的な機能はまだわかっていない。近年、*Mytilus* 属以外の数種のイガイ科の貝類について、接着タンパク質の繰り返しモチーフが報告された⁽¹²⁾。これらの種において、繰り返しモチーフは種ごとに異なっていたが、多くの場合、プロリン、チロシン、リジンは類似の順序で配置されており、これらのアミノ酸の機能はイガイ科において共通と考えられる。

図4 ■ *Mgfp 1* のデカペプチド配列における各アミノ酸の置換の頻度および各アミノ酸をコードしているコドンの使用頻度⁽¹¹⁾
各ポジションを表す四角の中の、左列はアミノ酸の、右列は対応するコドンの使用頻度をそれぞれ示す。

4. デカペプチドをコードするコドンの片寄り

一方, Mgfp1 において, 各アミノ酸をコードしているコドンに注目すると, ポジション毎にコドン使用頻度に特徴的な片寄りが見られる(図4). たとえば, 2 番目のリジンは AAA, AAG の2種類のコドンの両方が使用されているのに対し, 10 番目のリジンはほとんど AAA である. チロシンは2箇所とも TAT でコードされ, もう1つのコドン TAC はほとんど使われていない. プロリンには4つのコドンが存在するが, デカペプチドの6番目のプロリンは CCT が, 3, 7 番目は CCA が各々好んで使われている. 以上のようなコドン使用頻度の片寄りは, 核酸配列そのものにも何らかの機能が存在することを示唆している. 筆者らは, この片寄ったコドン使用が, *M. edulis* のヘキサペプチド配列や *M. galloprovincialis* のテトラデカペプチド配列が生じた原因ではないかと想像している⁽¹³⁾. 図5に, デカペプチドモチーフとそれをコードする最も代表的な塩基配列を示す. この塩基配列中には2箇所のよく似た配列 CCAAGTTAT および CCAACTTAT が存在する. これらの配列が複製時などに誤まって結合されるとヘキサペプチドモチーフやテトラデカペプチドモチーフが生じる(図5).

5. 非繰り返し領域の種間変異

M. edulis 接着タンパク質 Mefp1 の繰り返し

図 6 ■ PCR によるムラサキイガイ類の種判定
接着タンパク質遺伝子の非繰り返し領域の一部を増幅し, 増幅された断片の長さを比較した. M: マーカー (pUC 19/StyI), 1, 2: *M. edulis*, 3, 4: *M. trossulus*, 5, 6: *M. galloprovincialis*

領域の上流には, 94 アミノ酸残基の非繰り返し領域が存在する. *M. galloprovincialis* の Mgfp1 にも非繰り返し領域が存在する. その配列は前者のものとほとんど同じであるが, 途中の配列が18 アミノ酸欠失しているために76 アミノ酸残基である. 筆者らは, この部分の配列の長さの違いによってムラサキイガイ3種を区別できないかと考え, 当該部分を増幅するPCRプライマーを作製し, この欠失の有無が容易に検出できるようにした. この検出システムを用いて *M. edulis*,

図 5 ■ デカペプチドをコードする典型的な塩基配列と, ヘキサペプチド, テトラデカペプチド配列の形成過程の仮説⁽¹³⁾
デカペプチドをコードする塩基配列中に存在する2箇所の相同配列(下線A, B)が複製の際に両者の間を飛ばして結合されるとヘキサペプチド配列が, Bが隣接するデカペプチドのA'との間を飛ばして結合されるとテトラデカペプチド配列がそれぞれ生じる.

M. galloprovincialis について増幅を試みたところ、配列の長さの違いを検出することができた(図 6)。また、接着タンパク質の配列がまだわかっていない *M. trossulus* についても増幅を試みたところ、*M. edulis* と *M. galloprovincialis* の中間の長さの断片が増幅された。以上の結果は、形態からの同定が困難な 3 種のムラサキガイを PCR により区別できる可能性を示唆しており、現在、世界各地のムラサキガイを集めて、この方法が適用できるかどうかを調べている⁽¹⁴⁾。周知の通り、PCR を用いると、ごく微量の DNA から目的の配列を増幅できる。PCR による同定システムが確立できれば、ムラサキガイの成体はもちろんのこと、ごく小さな個体や幼生の同定まで可能になると思われる。

面盤タンパク質 (Mefp 2/Mgfp 2) の構造

1. 面盤タンパク質の構造

接着タンパク質 (Mefp 1/Mgfp 1) の発見の後、足糸成分の研究は一時停滞していたが、1992 年になって、システインを豊富に含む第 2 のタンパク質 (Mefp 2) が *M. edulis* において単離され、部分配列が報告された⁽¹⁵⁾。このタンパク質は面盤に集中して存在し、面盤マトリックス成分であると考えられている。筆者らは断片ペプチドの配列をもとに、*M. galloprovincialis* から cDNA クローニングを行なって、全一次配列を決定した⁽¹⁶⁾。

その結果、得られた Mgfp 2 の配列は、6 つのシステイン残基を特徴的な間隔で含む上皮性細胞増殖因子 (EGF) 様モチーフを 11 回繰り返す繰り返しタンパク質であることがわかった (図 7)。EGF ドメインは各システインが決まった相手とそれぞれジスルフィド結合を形成し、独特の 2 次構造を作ることが知られており⁽¹⁷⁾、Mgfp 2 においても類似の構造をとっている可能性が高い。繰り返しモチーフの繰り返し間の保存性は Mgfp 1 におけるデカペプチドモチーフほど高くはないが、システイン、グリシン、プロリンなどの位置は繰り返し間でよく保存されている (図 7)。

Mgfp 2 も、Mgfp 1 と同様、配列中にドーパを含んでいる。ドーパは cDNA 上ではチロシンとして存在しており、どのチロシンがドーパに変換されるかを cDNA 配列から知ることはできないが、Rzepecki らの断片ペプチド中に存在するドーパの位置⁽¹⁵⁾と cDNA 配列とを照合することにより、ドーパの位置を推察することは可能である。その結果、ドーパに変換されるチロシンは配列の両末端付近には存在するが、配列の中央付近には存在しないことがわかった (図 7)。分子の両末端は架橋化酵素 (カテコールオキシダーゼ) が接触できる分子の表面付近に位置し、Mgfp 1 と同様のメカニズムで分子間架橋を作っているのかも知れない。実際、N 末端付近には Mgfp 1 のデカペプチドに似た配列も存在する。

図 7 ■ Mgfp 2 のアミノ酸配列⁽¹⁸⁾
EGF 様繰り返し領域のうち、繰り返し間で保存性の高いアミノ酸を罫線で示した。Y はドーパに変換されると推定されるチロシンを示す。

Mgfp2	コンセンサス	x	x	N	x	C	x	P	N	P	C	K	N	x	G	x	C	-	-	x	x	x	G	x	x	x	Y	x	C	x	C	x	x	G	Y	x	G	x	x	C	
Slit	(ショウジョウバエ)	946	M	I	D	A	C	Y	G	N	P	C	R	N	A	T	C	T	V	L	E	E	G	-	-	R	F	S	C	Q	C	A	P	G	Y	T	G	A	R	C	
Crumbs	(ショウジョウバエ)	267	P	D	N	F	C	L	N	D	P	C	M	G	H	G	T	C	S	S	S	P	E	G	-	-	-	Y	E	C	R	C	T	A	R	Y	S	G	K	T	C
Serrate	(ショウジョウバエ)	875	A	I	D	Q	C	R	G	Q	P	C	H	N	G	G	T	C	-	-	-	E	S	G	A	G	W	F	R	C	V	C	A	Q	G	F	S	G	P	D	C
Delta	(ショウジョウバエ)	417	Q	L	D	N	C	S	P	N	P	C	I	N	G	G	S	C	-	-	Q	P	S	G	-	-	-	K	C	I	C	P	S	G	F	T	G	T	R	C	
Notch	(ショウジョウバエ)	677	N	V	N	E	C	H	S	N	P	C	N	N	G	A	T	C	-	-	-	I	D	G	I	N	S	Y	K	C	Q	V	P	G	F	T	G	Q	H	C	
Xotch	(カエル)	753	N	N	N	E	C	E	S	N	P	C	M	N	G	G	T	C	-	K	D	M	T	G	-	-	A	Y	I	C	T	C	K	A	G	F	S	G	P	N	C
uEGF	(ウニ)	88	N	I	D	E	C	A	S	A	P	C	Q	N	G	G	V	C	-	-	-	I	D	G	V	N	G	Y	M	C	D	C	Q	P	G	Y	T	G	T	H	C
FactorX	(トリ)	86	D	G	D	Q	C	S	S	N	P	C	H	Y	G	G	Q	C	-	-	-	K	D	G	L	G	S	Y	T	C	S	C	L	D	G	Y	Q	G	K	N	C
ProteinZ	(ウシ)	48	G	G	S	P	C	A	S	Q	P	C	L	N	N	G	S	C	Q	D	S	I	R	G	-	-	-	Y	A	C	T	C	A	P	G	Y	E	G	P	N	C
Aglin	(ラット)	1479	E	K	S	P	C	Q	P	N	P	C	H	G	A	A	P	C	R	V	L	S	S	G	G	A	K	-	-	C	E	C	P	L	G	R	S	G	T	F	C
Versican	(ヒト)	2102	G	P	D	R	C	K	M	N	P	C	L	N	G	G	T	C	Y	P	T	E	T	-	-	-	S	Y	V	C	T	C	V	P	G	Y	S	G	D	Q	C

図 8 ■ Mgfp 2 の繰り返しモチーフと相同性のある代表的なタンパク質
 ×は保存性の低いアミノ酸を示す。Mgfp 2 との間で保存されているアミノ酸を囲んで示した。

2. EGF ファミリーにおける Mgfp 2 の位置

Mgfp 2 の他のタンパク質との相同性を調べるために、Mgfp 2 の繰り返しモチーフに対するホモロジー検索を行なったところ、分化誘導因子(notch, serrate など)、血液凝固因子(factor X, protein Z など)、細胞外マトリックスタンパク質(aggreacan, versican など)などの他の EGF 様タンパク質ファミリーのメンバーと比較的高い相同性が見いだされた(図 8)。相同性が高いのは、システインやグリシン、プロリンなど Mgfp 2 繰り返し間で保存されていたアミノ酸である。これらのアミノ酸は、EGF 様構造の維持に必要であると考えられており、Mgfp 2 が他の EGF 様タンパク質ファミリーと同様の 2 次構造をとるであろうことはこのことから支持される。EGF 様ドメインを持つタンパク質は一般に、細胞間相互作用に関与している⁽¹⁷⁾が、Mgfp 2 は、細胞を含まない生体外組織である足糸の構成成分であり、また合成される組織やタイミングから考えても(後述)、細胞間相互作用に関与しているとは考えにくい。このように、Mgfp 2 は EGF 様タンパク質ファミリーの一員でありながら細胞間相互作用に関与しない特異なタンパク質であり、EGF 様ドメインの進化を考察するうえでも興味深い。

足糸タンパク質遺伝子の発現

1. Mgfp 1, Mgfp 2 遺伝子の発現部位

以上のように、足糸タンパク質 Mgfp 1, Mgfp 2 は、各々特徴的な構造を持つタンパク質である

ことが明らかにされた。次に、両タンパク質の発現部位を特定するために、両タンパク質をコードする cDNA をプローブとして *M. galloprovincialis* の組織別 RNA ブロッキングを行なったところ、両遺伝子とも足で特異的に発現していることが明らかになった。さらに、足における発現部位を調べるために凍結切片を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーション法により mRNA の局在を調べたところ、Mgfp 1 遺伝子は、足の裏側の足溝に沿って足の根本から先端近くまで広がるアクセサリー腺と呼ばれる組織で、Mgfp 2 遺伝子は足の先端に近いフェノール腺と呼ばれる組織でそれぞれ発現されることが明らかになった⁽¹⁸⁾。前に述べたように、足溝は足糸の鋳型となる部分で、面盤は陥入部で形成される。足糸表面全体を覆う Mgfp 1 の遺伝子が足全体で、面盤を形成する Mgfp 2 が足の先端付近でそれぞれ発現されることは、足糸を構成する各々のタンパク質を合成する組織が足において合理的に配置されていることを示している(図 2)。また、Mgfp 2 遺伝子の発現が足のフェノール腺に限られることは、Mgfp 2 が EGF のような general な細胞増殖因子としての機能を有していないことを示唆している。

Mgfp 1, Mgfp 2 の発現時期

ムラサキイガイは多くの付着性の海産無脊椎動物と同様、幼生期の初期は浮遊生活を送り、ある時期に変態して着底生活に移行する。この変態・着底の過程は大規模な体の作り替えを伴う興味深

い現象であり、遺伝子レベルにおいても様々な変化が起こっているものと考えられる。この着底過程における足糸タンパク質遺伝子の発現を調べるために、*M. galloprovincialis* を人工受精させ、実験室内で飼育して発生段階ごとにサンプリングして RNA ブロットングを行なった結果、両遺伝子の発現は初期の幼生には検出されないが、足が分化する pediveliger 期にわずかではあるが発現が始まり、着底とともに発現量が飛躍的に増大することがわかった⁽¹⁹⁾。幼生は着底前からある程度足糸遺伝子の発現を開始して、来たるべき着底に備えているのかもしれない。また、初期の幼生において発現されないことから、Mgfp 2 は細胞増殖因子や分化誘導因子としての役割を持っておらず、専ら付着のために使われることが示唆される。

*

以上述べたように、これまでにムラサキガイの足糸を構成する 2 種類の主要なタンパク質のユニークな構造と、発現部位や発現時期が明らかにされた。しかしながら、まだ足糸成分すべてが明らかになったわけではなく、他にもまだいくつか単離されていない成分が存在する。また、これらの成分がどのようにして不溶化するのかについて未解明の部分が残っている。たとえば、不溶化の主要メカニズムであると考えられているドーパのキノン架橋を触媒するカテコールオキシダーゼについても研究はごくわずかなされている⁽⁷⁾。さらに、変態・着底の過程での遺伝子発現の制御のメカニズムなどの解明も今後に残された興味深い課題である。遺伝子発現制御を研究するために必要なムラサキガイ類の細胞培養法なども次第に確立されつつあり⁽²⁰⁾、今後の研究の発展が期待される。

文献

- 1) 坂口 勇: “海産付着生物と水産増養殖”, 恒星社厚生閣, 1987, p. 100.
- 2) 桑原康裕: 北水試だより, 21, 14 (1993).
- 3) 梶原 武: “日本の海洋生物”, 東海大学出版会, 1985, p. 49.
- 4) N. P. Wilkins, K. Fujino & E. M. Gosling: *Biol. J.*

Linn. Soc., 20, 365 (1983).

- 5) J. H. Waite: *Int. J. Adhesion Adhesives*, 7, 9 (1987).
- 6) 坂口 勇: “海洋生物の付着機構”, 恒星社厚生閣, 1991, p. 76.
- 7) J. H. Waite: “Results and Problems in Cell Differentiation”, Springer-Verlag, Berlin, 1992, p. 27.
- 8) J. H. Waite & M. L. Tanzer: *Science*, 212, 1038 (1981).
- 9) S. W. Taylor, J. H. Waite, M. M. Ross, J. Shabanowitz & D. F. Hunt: *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 10803 (1994).
- 10) R. A. Laursen: “Results and Problems in Cell Differentiation”, Springer-Verlag, Berlin 1992, p. 54.
- 11) K. Inoue & S. Odo: *Biol. Bull.*, 186, 349 (1994).
- 12) L. M. Rzepecki, S. Chin, J. H. Waite & M. F. Lavin: *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1, 68 (1991).
- 13) K. Inoue, Y. Takeuchi, D. Miki & S. Odo: *J. Mar. Biotechnol.*, in press.
- 14) K. Inoue, J. H. Waite, M. Matsuoka, S. Odo & S. Hara-yama: *Biol. Bull.*, in press.
- 15) L. M. Rzepecki, K. M. Hansen & J. H. Waite: *Biol. Bull.*, 183, 123 (1992).
- 16) K. Inoue, Y. Takeuchi, D. Miki & S. Odo: *J. Biol. Chem.*, 270, 6698 (1995).
- 17) J. Massague: *J. Biol. Chem.*, 265, 21393 (1990).
- 18) 三木大輔, 井上広滋, 竹内康博, 王堂 哲: 第 3 回マリノバイオテクノロジー研究発表会講演要旨集, p. 103 (1994).
- 19) 竹内康博, 井上広滋, 三木大輔, 王堂 哲: 第 3 回マリノバイオテクノロジー研究発表会講演要旨集, p. 103 (1994).
- 20) Y. Takeuchi, S. Yamamoto & S. Odo: *J. Mar. Biotechnol.*, 2, 51 (1994).

お知らせ

生命誌研究館・写真展

「細胞一見えてきた形づくりと物運びの分子たち」

生物学の進歩により、細胞内の生体分子の振る舞いが「見える」ようになりました。タンパク質を中心とする生体分子たちが、細胞の骨組みを作り、形を変え、ものを運び、ダイナミックに働いている様子を、芸術作品とも呼べるような美しい写真で紹介します。岡田節人館長が音楽にのせて生き物を語るミュージック・トークも行ないます。

写真展: 10月10日(火)～1996年3月30日(土) 10:00～16:30
(日曜、月曜、年末年始は休館)

ミュージック・トーク「音楽の中の昆虫たち」

語り: 岡田節人 10月10日(火) 14:00～15:30 (事前申し込みは必要ありません。なお入場者多数の場合、入場を制限することがあります)

場所: 生命誌研究館

入場料: 無料 (写真展・ミュージックトーク・常設展示とも)

問合せ先: 生命誌研究館

〒569 大阪府高槻市紫町 1-1

Tel. 0726-81-9750 (代), Fax. 0726-81-9743