

発表番号 38 (0313)

アカフジツボ・キプリス幼生のセメント腺特異的発現遺伝子群の同定

助成研究者：岡野桂樹（秋田県立大学 生物資源科学部）

共同研究者：松本正吾（理研・分子昆虫学）

大西 敦（理研・分子昆虫学）

加戸隆介（北里大学・水産学部）

野方靖之（電中研・応用生物部）

フジツボは、永久付着の際、キプリス幼生のセメント腺からセメントを分泌し、幼生の体を、基盤に固定する。我々の目的は、この付着に必要なセメント物質を同定することである。本研究では、セメント遺伝子が、セメント腺に特異的に、かつ多量発現しているという仮定のもとに、セメント腺に特異的に発現する遺伝子群の網羅的解析を試みた。

変態終了直後2日以内のキプリス幼生からセメント腺（100個）を単離し、トータルRNAを抽出し、SMARTシステム（BD社）を用いて、完全長cDNAライブラリーを作製した。一方、セメント腺とカラパス殻からそれぞれトータルRNAを抽出し、SSH法（BD社）によりプローブを作製した。セメント腺全長cDNAライブラリーから、ランダムに576クローンを選択し、5'-one pass sequenceによるESTを作製した。各プラスミドはそれぞれのプローブを用いてデファレンシャルスクリーニングを行い、特異的発現遺伝子クローンを選択した。得られた配列情報と特異的発現パターンを元に、相同性、ORF、発現頻度、シグナルペプチド配列の有無の解析を行った。さらにデータベース検索により、セメント腺のSDS-PAGEで検出されたタンパク質から得られた部分アミノ酸配列を含むクローンを選択した。

その結果、1) セメント腺の全長cDNAライブラリーの約半数が、セメント腺に特異的に発現していた。2) シグナルペプチド配列を持つものが多く、相同性検索で、他の生物の既知遺伝子の認められないものが多かった。3) セメント腺の特異的発現タンパク質36k, 57k, 110kのうち、36k, 57kタンパク質をコードする遺伝子が発見された。

セメント腺の全長cDNAライブラリーは、ユニークな分泌タンパク質をコードする遺伝子を多く含む可能性が明らかとなりつつある。それらの遺伝子の、完全長配列をできるだけ多く決定し、組換えタンパク質を発現し、個々のタンパク質の構造、性質、および発現タンパク質間の相互作用を明らかにすることで、セメント固化、分泌機構の謎にせまっていきたいと考えている。

アカフジツボ・キプリス幼生のセメント腺特異的発現遺伝子群の同定

助成研究者名 岡野桂樹 (秋田県立大学 生物資源科学部)

共同研究者名 松本正吾 (理研・分子昆虫学)

大西 敦 (理研・分子昆虫学)

加戸隆介 (北里大学・水産学部)

野方靖之 (電中研・応用生物部)

フジツボなどの付着生物は、船底や発電所、工場の取水口などに一度固着すると除去に多大な労力と費用が必要となる。付着生物の防除に掛かる費用は一説には世界全体で1年間に10億ドルを超えると試算されている。Fig. 1は共同研究者である野方博士から贈与いただいた写真である。国内のある電力発電所のフジツボ除去作業の様子を写したものである。赤く見えるのは、我々が対象としているアカフジツボの殻である。アカフジツボはコスモポリタンのフジツボで、わが国を含め多くの国で、特に発電所などの取水口や船底に付着し、大きな被害をもたらす元凶とされている。Fig. 1は如実にアカフジツボ被害の実態、産業的な重要性を物語っている。

フジツボはどのように付着するのであろうか。フジツボは2つのライフスタイルを持っている。遊泳型の幼生期と付着して生活する成体期である。(Fig. 2)。受精卵は親の外套腔内で発生が進み、甲殻類に特徴的なノープリウス幼生となると孵化し、プランクトン生活を開始する。ノープリウス幼生は6回の脱皮を行い、6回目の脱皮と同時にキプリス幼生(Fig. 2とFig. 3A)へと変態する。キプリス幼生は付着可能な状態となると、正にキプリス幼生の手というにふさわしい形をした付着器官の先端で付着場所を探る行動、すなわち探索行動を繰り返す。そして、適切な付着場所をみつけると接着剤を分泌し(Fig. 3B)体部を固定した後、付着生活に適した形態をした成体へと変態していく(加戸, 1991; Anderson, 1994)。

これまで、もっとも有力な付着防除法は有機スズ化合物の塗布であった。しかし、その毒性、および環境ホルモン作用から、2008年度までには、世界中での使用が完全に禁止される。新しい原理に基づく有効な付着防除法が待望されている。一方、逆の意味で考えると、フジツボ幼生接着剤はいわゆる合成接着剤が苦手な塩水環境で実に効果的に接着力を発揮する生分解性接着剤である。この成分が明らかになり、作用機作を解明できれば、塩水環境下で機能する新たな接着剤デザインが可能になるだろう。我々は新しい概念に基づいた付着防除法の開発と新規接着剤開発をめざし、本研究を行った。



Fig. 1. Barnacles cause serious problems in electric power station.

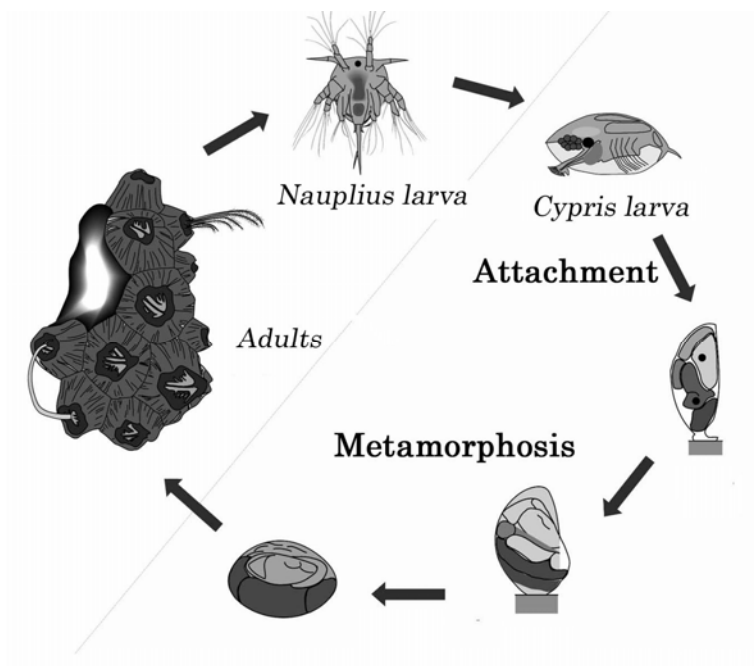


Fig. 2. Schematic diagram of the life cycle of barnacles

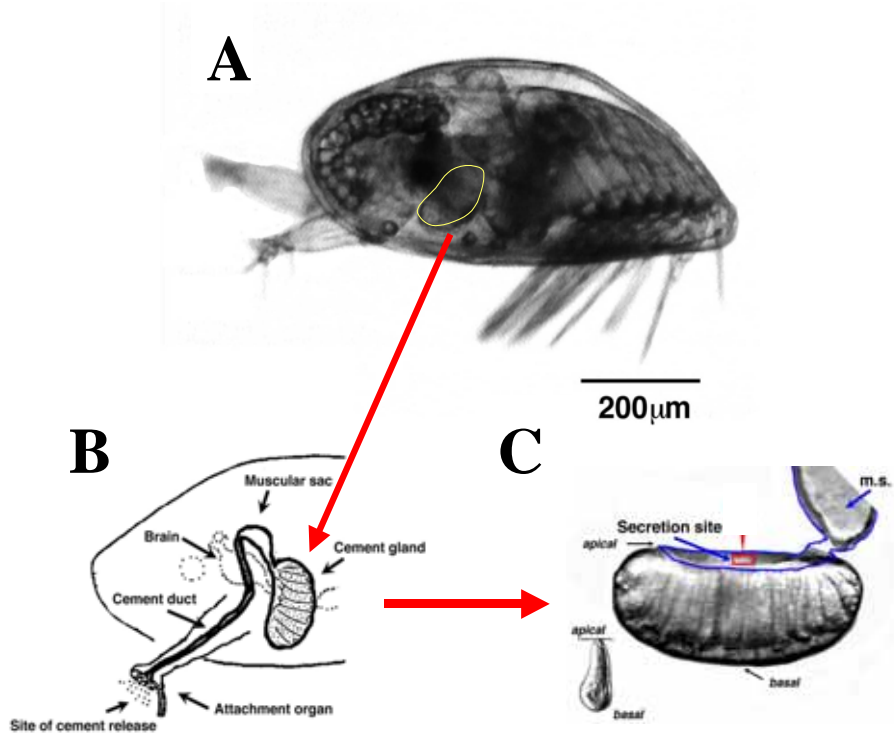


Fig. 3. Cement gland was manually isolated from *Megabalanus rosa* cypris larva. A: A cypris larva of *M. rosa*. B: Cement is synthesized, stored and exocytosed from the cement gland. The exocytosed cement passes through the cement duct and released at the tip of the attachment organ. C: An isolated cement gland and a cement secreting cell.

研究目的

本研究の目的は、アカフジツボのキプリス幼生 (Fig. 3A) が分泌する接着剤 (セメント) の構造を明らかにし、新たな付着防除法の開発、塩水環境で働く新規接着剤の分子デザインに役立てることである。セメントはキプリス幼生に特有のセメント腺 (Fig. 3 C) という器官で合成される構造タンパク質 (複数のタンパク質の混合物) で、セメント腺細胞の分泌顆粒に蓄えられていると考えられている (Walley, 1969; Walker, 1971)。言い換えると、セメント遺伝子は分泌顆粒が活発に合成される時期のセメント腺 (細胞) に特異的に発現し、分泌シグナルを有し、発現量が多いはずである。そこで、本研究では、アカフジツボキプリス幼生のセメント腺に特異的に発現する主要遺伝子を網羅的に探索することを試みた。

研究方法

実験材料 (アカフジツボキプリス幼生)

アカフジツボ幼生は、共同研究者である電力中央研究所野方博士グループ (千葉県我孫子市) から供与されたものを使用した。すなわち、宮城県志津川湾で採集した成体から孵化したノー

プリウス幼生を7-8日間、電力中央研究所で飼育し、当日1-3割程度キプリス幼生に変態しつつある状態で餌を洗浄し、宅急便で秋田県立大学に輸送した。状態が良い場合は、約20時間の運搬中に5-8割程度がキプリス幼生となる。到着後、0.2ミクロンの膜ろ過を行った自然海水でよく洗浄し、15で一晩飼育後(翌日にほぼ9割がキプリス幼生)、特に状態の良い完全なキプリス幼生を選び出し、セメント腺の単離実験を行った。したがって、RNA抽出用のセメント腺の単離は、ノープリウス-キプリス変態後2日以内のキプリス幼生から行った。ただし、タンパク質分析用には、そのままろ過自然海水中で飼育した完全に成熟したキプリス幼生(3日目以降)を用いた。

セメント腺と殻の解剖、トータルRNAの抽出

すでに記載されている方法(Okano et al., 1996.; Okano & Hunter 2000)に従った。すなわち、電解研磨したタングステン針を用い、実体顕微鏡下で、アカフジツボキプリス幼生から、セメント腺および殻を単離した。単離したセメント腺と殻は、別々に手早くピペットで、エッペンチューブへ移動した。セメント腺は合計100個(50個体分)、殻は合計50個(50個体分)を集積した後、注意深く単離用リンガー液を除き、NucleoSpin RNA kit(MACHEREY-NAGEL社)のRA1溶液300 μ lを加え、使用まで、-80のディープフリーザー中で保存した。トータルRNA抽出には、NucleoSpin RNA kit (MACHEREY-NAGEL社)を使用した。

全長cDNAライブラリーの構築

キプリス幼生セメント腺の全長cDNAライブラリー構築のためには、Creator SMART cDNA library construction kit (DB Clontech)を使用した。しかし、出発のtotal RNAの濃度が低かったため、1stストランドcDNA合成には、Super SMART PCR cDNA synthesis kitの手法を応用した。すなわち、30 μ l(5-8ng/ μ l)のRNAサンプルを用いて、大容量の逆転写反応を行ったのち、得られたss cDNAをNucleospin Extraction kit(MACHEREY-NAGEL社)を用いて精製濃縮し、Creator SMART cDNA library construction kitのLD-PCR反応に供した。得られたds cDNAはproteinase K消化、精製、Sfi I消化後、ゲルろ過により、サイズ分画され、方向性を有した形でpDNR-LIB vectorのSfi IA, Sfi IB制限酵素部位にライゲーションされた。得られたリコンビナントプラスミドは、大腸菌DH5 (Takara electrocompetent cell DH5)にGene Pulser Xcell(B10-RAD)を使用してトランスフォームされた。得られたプラスミドライブラリーを、cg1f(Cement Gland #1 series Full length libraryの頭文字をとった)ライブラリーと名づけた。このライブラリーから、ランダムに576クローン(96穴プレートによるので96 \times 6、それぞれのプレートを順にcg1f#1~6と命名)を選択し、EST解析、サブトラクションプローブを用いた特異的発現解析に供した。

プラスミド抽出、シーケンス、データベース化：

cg1f#1~6の576クローンは、EST解析と特異性解析用のデファレンシャルスクリーニングの

ため、プラスミド抽出とそれに続くシーケンスされた。プラスミド抽出とインサート配列のシーケンスは、秋田県立大学生命科学支援センターに依頼して行われた。シーケンスプライマーにはインサートの5'末端側の配列を効果的に読むように設計されたものを使用した。

サブトラクション用プローブの作製:

キブリス幼生のセメント腺と殻のトータル RNA から、ds cDNA を合成するためには、Super SMART PCR cDNA synthesis kit (BD Clontech 社)を使用した。セメント腺と殻の ds cDNA を用いて、Suppression subtractive hybridization 法 (Diatchenko et al., 1996) により、セメント腺と殻のサブトラクションプローブを作製するためには、Clontech PCR-select cDNA subtraction kit を使用した。セメント腺、殻の非サブトラクションプローブを作製するためには、Clontech PCR-select cDNA subtraction kit のマニュアルに指示されているとおりに行った。ハイブリダイゼーションに必要な DIG 標識プローブは、PCR DIG probe synthesis kit (Roche Diagnostics 社) を使用して作製された。ハイブリダイゼーション終了後の 1st PCR 増幅産物 (それぞれのサブトラクテッド cDNA 対応する) をテンプレートとし、PCR 条件はライゲーション終了後の 2nd PCR と同一条件を使用した。

サザン法によるデイファレンシャル スクリーニング:

576(96 x 6 = cg1f#1A1 ~ cg1f#6H12)クローンからそれぞれ抽出されたプラスミドは、0.6N NaOH で変性した後、Hybond N+膜(Amersham Pharmacia Biotech) に4連でプロテイングされた。ついで、セメント腺 subtracted プローブ、セメント腺 unsubtracted プローブ、殻 subtracted プローブ、殻 unsubtracted プローブ (DB 社マニュアル、Fig. 5) とのハイブリダイゼーションを実行した。ハイブリダイゼーションは、プローブを 5 µg/ml の濃度で DIG Easy Hyb 溶液 (Roche Diagnostics 社) 中に溶解し、42 °C、オーバーナイトの条件で実行した。洗浄は 2 X SSC, 0.1% SDS、5 分間、室温で 2 回、ついで、0.1XSSC, 0.1%SDS、15 分間、68 °C で 2 回行った。ハイブリダイゼーションの検出は DIG Luminescent Detection kit (Roche Diagnostics) による発光定量により行った。発光の検出は LAS1000(Fuji film)で行い、データの定量化には Image Gauge software(ver 3.12, Fuji film)を使用した。

DNASIS Pro によるグループ分けと ORF 検索

得られた配列情報は DNASIS Pro(Phred/Phrap option 付き、日立ソフト社)を用いて in-house データベース化、相同性検索、ORF 検索、相互の類似配列の検索、グループ化された。シグナルペプチドの検索のためには、WEB サイトを用いた (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。さらなる相同性検索を含めその他の解析には、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> と <http://ebi.ac.uk/> の両サイトを利用した。

研究結果

全長 cDNA ライブラリーの構築とランダムにその EST 解析

pDNR-LIB vector にクローニングされたセメント腺の全長 cDNA ライブラリーからランダムに 576 クローン (cg1f#1~#6) の 5'側 1 方向のシークエンス (5'-one pass sequence) を blastx 検索した結果、シークエンスの QV 値 50 以上の 460 クローンのうち、何らかのホモロジーが検出されたクローン数は 249、まったくホモロジーがヒットしなかったクローンは 211 であった。既知遺伝子とホモロジーの高い遺伝子のうち、セメント分泌に特に関係すると思われる遺伝子として、14-3-3 タンパク質、receptor for activated protein kinase C (G protein subunit) のホモロークがヒットした。またセメント腺の分化に関係する可能性のある遺伝子として、QM protein のホモロークが認められた。既知のクローンのうち、クローン数の多い、すなわち発現量の多い遺伝子は、タンパク質合成に関するタンパク質をコードする遺伝子群 (ribosomal proteins, elongation factor-1 など) であった。いくつかのエネルギー代謝に関与する遺伝子 (mitochondrial proteins など) も見出された。トータル RNA を取得した時期のセメント腺は細胞分裂とセメント腺細胞への分化がほぼ完了し、最終段階である分泌顆粒数の増加と分泌顆粒サイズの増大が急激に起こる時期、すなわち、細胞はセメントタンパク質の合成工場となっていると考えられる。そのため、タンパク質合成とエネルギー代謝に関する遺伝子の発現が高いことは充分理解できる。

サブトラクションプローブによる発現パターンの解析

発現パターンから上記 EST クローンを分類するため、セメント腺と殻の間でサブプレッション サブトラクティブハイブリダイゼーション法を用い、サブトラクションプローブを作成し、サザンハイブリダイゼーションによって、特異的発現遺伝子を探索した。Fig. 4 は、アカフジツボセメント腺 cDNA ライブラリーのプレート中の 96 クローン (cg1f#3) について、ドットプロット サザンハイブリダイゼーションした一例である。上段が SSH 法により、サブトラクトされたプローブ (左: 殻からセメント腺をサブトラクト、右: セメント腺から殻をサブトラクト) による結果、下段が非サブトラクトプローブ (左: 殻、右: セメント腺) による結果である。

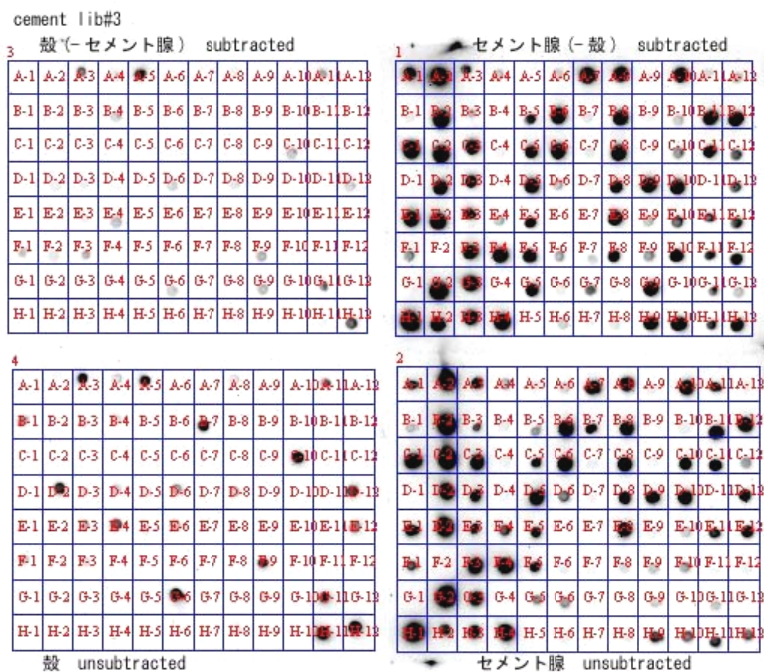


Fig. 4. An example of differential screening

(See details in the text)

Table 1. Summary of the differential screening

発現パターン	クローン数	割合
セメント腺で特異的に発現	305	53%
殻で特異的に発現	8	1%
セメント腺・殻の両者で発現	191	33%
セメント腺のほうスポットが濃い	116	20%
殻のほうスポットが濃い	19	3%
どちらも同じくらい	56	10%
セメント腺・殻の両者で発現せず	72	13%
Total	576	100%

これらから明らかなように、セメント腺の全長 cDNA ライブラリーの多くのクローンはセメント腺に特異的に発現している。576 クローンをスクリーニングした結果を Table 1 に示す。殻での発現が見られず、セメント腺でのみ発現が見られたクローンは 305 クローンで 53% に達した。このうち、既知の遺伝子とホモロジーが認められたクローンは 133 クローン、ホモロジーが検出できなかったクローンは 172 クローンであった。

以上をまとめると、セメント腺の全長 cDNA ライブラリーからランダムに選ばれた 576 クローンの実に約 30% (172/576) はセメント腺に特異的かつ未知の配列の遺伝子ということになる。この時期のセメント腺がセメント合成工場であるならば、これらの中、すなわち、発現量の多い未知セメント腺特異的遺伝子群の中にセメント遺伝子が見出される可能性が高い。そこで、さらに未知遺伝子群の性質を明らかにするために、2つの手法を採用した。

セメント腺特異的たんぱく質をコードすると推定されるクローンの同定

成熟したキプリス幼生からセメント腺を単離し、その発現タンパク質を SDS-PAGE で分析した。さらに他の組織（殻、胸肢）に発現するタンパク質と比較することで、セメント腺に特異的に発現するタンパク質の同定をめざした。その結果、セメント腺特異的な主要なバンドは 36k, 57k, 110k に見出された (Fig. 5)。

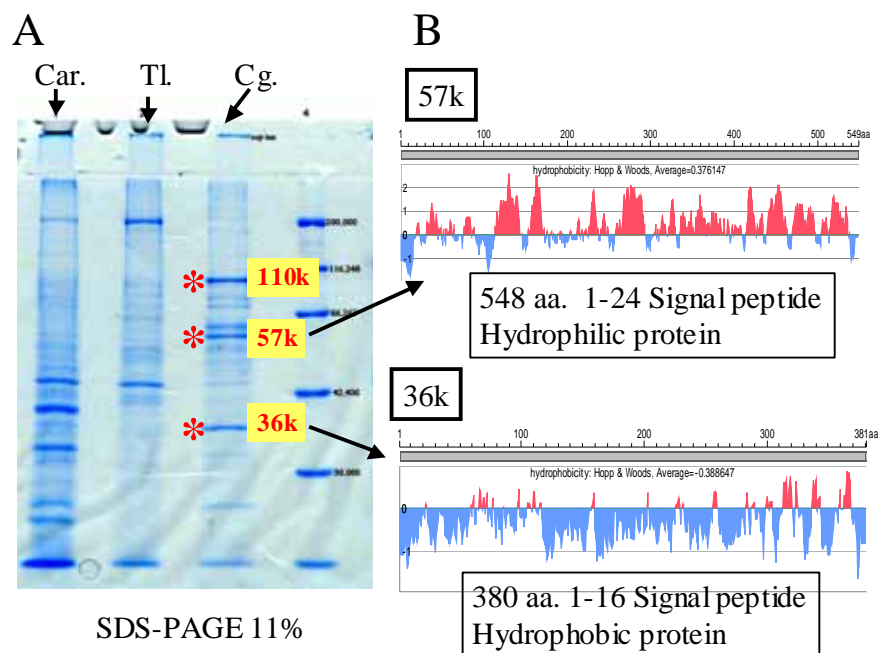


Fig. 5. Genes encoding two cement gland specific proteins, 57k and 36k were determined. A. SDS-PAGE (11%) profile comparison of cypris organs. Car: carapace. TL: Thoracic limb. Cg.: cement gland. B: Hydropathy profiles and some characteristics of 57k (top) and 36k (bottom) cement gland-specific proteins deduced from the sequence of the cDNA clones.

これらのタンパク質に関するアミノ酸配列情報を取得するため、理化学研究所の松本、大西両博士の助力を得て、リシルエンドペプチダーゼ、およびトリプシンで切断されたペプチドを精製後、そのN末端配列の決定をおこなった。その結果、36k タンパク質については、5個、57k タンパク質については1個、110k タンパク質については5個の部分配列を得ることができた。この取得配列を DNASIS-Pro プログラムによって作成された全長 cDNA ライブラリーデータベースに対し、インハウス検索したところ、36 k タンパク質をコードすると推定される5クローン、57k タンパク質をコードすると推定される4クローンが見出された。全長配列を決定したところ、両者はN末端にシグナルペプチド配列を有し、それぞれ 380, 570 のアミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子と推定された(Fig. 5)。これらは有力なセメントタンパク質候補と考えられる。110k タンパク質をコードすると推定されるクローンは未発見である。

未知クローンのバイオフィーマティックスを用いた解析

セメントタンパク質はセメントから分泌される構造タンパク質である。特別な構造を持つと考えられるため、他の組織には発現しないセメント腺特異的遺伝子である可能性が高い。さらにこの時期に盛んに翻訳されているため、ランダムに選んだクローン中の頻度が高いはずである。加えて分泌タンパク質であるため、ORF の N 末端部分にシグナルペプチド配列を有する可能性がきわめて高い。

以上の条件を持つクローンを、バイオフィーマティックスを利用して選択した結果、少なくとも8グループが該当した。酸性ペプチド、塩基性ペプチド、特有の繰り返し配列を有するタンパク質などさまざまなものであるが、比較的塩基性を示すタンパク質またはペプチドが多いことが現在までの特徴である。

考察

フジツボキプリス幼生のセメント腺には多数を占める 細胞と数の少ない 細胞という2種類の分泌細胞が存在することが知られている (Walker, 1971; Okano et al., 1998; 2000)。興味深いことに主要な細胞である 細胞は、組織化学的研究から塩基性の顆粒を多く含むとされる (Walker, 1971)。それと対応するかのよう、これまで、cDNA 塩基配列から推定されるセメント腺特異的主要タンパク質(ペプチド)の多くは塩基性を示す。一方、数の少ない 細胞は酸性の顆粒を含むとされるが、それに対応するかのよう、酸性を示すタンパク質(ペプチド)を示す配列も得られている。それぞれの分泌性タンパク質をコードする遺伝子がどちらの細胞に発現するのかを決定することは、現在もっとも重要な問題である。

今後の課題

セメント腺の全長 cDNA ライブラリーは、ユニークな分泌タンパク質をコードする遺伝子を多く含む可能性が明らかとなりつつある。それらの遺伝子の完全長を1つずつ決定し、組換え

タンパク質を発現し、個々の構造、性質とタンパク質間の相互作用を明らかにすることで、セメント固化、分泌機構の謎にせまっていきたいと考えている。

文献等

- 1) Anderson, D.T. (1994). *Barnacles* Chapman & Hall, London, England.
- 2) Creator SMART cDNA library construction kit user manual (BD Biosciences)
- 3) Clontech PCR-select cDNA subtraction kit user manual (BD Biosciences)
- 4) Diatchenko, L. et al., (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 6025-6030.
- 5) 加戸隆介 (1991) 幼生の行動と付着 : フジツボ、海洋生物の付着機構 (梶原 武監修) 恒星社厚生閣 pp . 85 100 .
- 6) Okano, K., Shimizu, K., Satuito, C.G. and Fusetani, N. (1996). Visualization of cement exocytosis in the cypris cement gland of the barnacle *Megabalanus rosa*. *The Journal of Experimental Biology* **199**, 2131-2137.
- 7) Okano, K., Shimizu, K., Satuito, C.G. and Fusetani, N. (1998). Enzymatic isolation and culture of cement secreting cells from cypris larvae of the barnacle *Megabalanus rosa*. *Biofouling* **12**, 149-159.
- 8) Okano, K. and Hunter, E. (2000). Culture of bryozoans and barnacles: Application of larval cell culture to biofouling studies. In: *Aquatic Invertebrate cell culture*, (eds. Mothersill, C & Austin, B) pp 293-321. Springer-Praxis, Chichester, UK.
- 9) Super SMART PCR cDNA synthesis kit user manual (BD Biosciences)
- 1 0) Walker, G. (1971). A study of the cement apparatus of the cypris larva of the barnacle *Balanus balanoides*. *Marine Biology* **9**, 205-212.
- 1 1) Walley, L.J. (1969). Studies on the larval structure and metamorphosis of *Balanus balanoides* (L.). *Philosophical Transactions of the Royal Society, Series B*. **256**, 237-280.

Identification of genes expressed specifically in the cement gland of the cypris larvae of the barnacle *Megabalanus rosa*.

Keiju Okano (Lab. of Cell Biology, Akita Prefectural University)

Shougo Matsumoto (Lab. of Molecular Entomology, RIKEN)

Atsushi Oonishi (Lab. of Molecular Entomology, RIKEN)

Ryusuke Kado (Sch. of Fisheries Sciences, Kitasato University)

Yasuyuki Nogata (Abiko Res. Lab., Central Res. Inst. of Elect. Power Indust.)

The permanent attachment of the barnacle cyprids is initiated by the release of special adhesives, the so-called cement. The cement is stored in the large secretory granules found in the cells of the cypris cement glands. Although the cement has been thought to be composed of proteinaceous mixture, no group has ever been purified. No gene related to them has been cloned. To identify cement genes, we have characterized clones expressed specifically in the cement glands of the cypris larvae of the barnacle *Megabalanus rosa*.

Total RNA was extracted from 100 cement glands isolated from 0-2 days old *M. rosa* cypris larvae with NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel). A directional plasmid cDNA library was constructed using Creator SMART cDNA library construction kit (BD Biosciences) with SUPER SMART cDNA construction technology (BD) for preparing ds cDNA. SSH probes were constructed from the cement glands (tester) and carapace (driver) of the cypris larvae of *M. rosa* with PCR-select cDNA subtraction kit (BD).

5'-one pass sequencing and differential screening by SSH probes, of 576 randomly picked clones from the full-length cement gland cDNA library, revealed the unique nature of expressed genes in the cement glands: 1) About half of the clones were found to be cement gland-specific. 2) Some highly expressed, cement gland-specific clones have so far no homology to known genes with potential signal peptide sequence. 3) The two groups of clones, potentially encoding cement gland specific proteins, 36k and 57k respectively, were found.

Identification of cement genes and elucidation of cement hardening mechanism will be beneficial for the development of new adhesives working in salt water environment and anti-biofouling.