

生鉱物形成において新機能を持つ炭酸脱水酵素の精製および単離

当瀬 秀和 [東京大学大学院農学生命科学研究科/特別研究員]
(前 北海道大学大学院水産科学研究科/博士課程)

背景・目的

魚類の耳石は、聴覚・平衡器官として機能するが、1日に1本形成されるリング(日周輪)が形成されることから、水産学分野では仔稚魚の日齢査定に広く利用されている。しかし、その形成機構はいまだに不明な点が多く、その解析は経験則内に過ぎない。そのため、日周輪形成機構の解明が必要であると認識されているものの、それに挑む研究者は極端に少ない。本研究では、炭酸脱水酵素の耳石日周輪形成との関係を調べるための第一ステップとして、本酵素を単離する事を目的とする。耳石日周輪は概日リズムのメカニズムを知る形質としても重要である。

内容・方法

本研究では、前述した目的を達成するために、まず本酵素の構造を決定した。

- ・タンパクのcDNA塩基配列の解析:既知の炭酸脱水酵素遺伝子配列からプライマーを設計し、内耳小囊のmRNAからcDNAライブラリーを作成、クローニングすることにより本タンパク遺伝子の塩基配列を解析した。
- ・ウエスタンブロットおよび免疫組織化学:内耳小囊抽出液をSDS-PAGEにより分画後、既知炭酸脱水酵素抗体を用いてウエスタンブロットを行った。また、同様の抗体を用い免疫組織化学により本酵素存在部位を調べた。
- ・本酵素発現器官の解析:クローニングにより得た二種炭酸脱水酵素(結果参照)を分別するプライマーを設計した。数種器官からmRNAを抽出し、これを鋳型にして、上記プライマーを用いRT-PCRを行い、本酵素遺伝子発現器官を調べた。
- ・酵素活性測定:内耳小囊における本酵素の活性を調べた。
- ・本酵素タンパク質遺伝子の分子進化:本酵素cDNA配列を用いて分子系統樹を作成した。

結果・成果

- ・ウエスタンブロット:内耳小囊において、分子量約28および60kDaの炭酸脱水酵素様タンパク質が存在することがわかった。分子量60kDaの炭酸脱水酵素様タンパク質は、水平半規管、内リンパ液および耳石の不溶性有機基質にも存在した。耳石の水溶性有機基質では抗体に反応するタンパク質は見られなかった。
- ・免疫組織化学:本タンパク質は内耳小囊の体軸側に存在する感覚斑においては、局在を示さなかった。移行上皮においては、ミトコンドリアリッチセルおよび移行上皮細胞が存在して

いたが、炭酸脱水酵素の局在は後者において確認できた。体表側、背側および腹側には、扁平上皮から構成されるが、体表側の扁平上皮細胞においてパッチ状の免疫染色がみられた。

- ・酵素活性測定:赤血球および鰓に比べ低いものの、内耳小囊および内リンパ液でも炭酸脱水酵素活性が確認された。
- ・本酵素タンパク質の一次構造解析:1,759bpおよび2,437bpの長さを持つ二種類のcDNAの全長をクローニングすることに成功した。これら遺伝子のオープンリーディングフレームは共に780bpで、260アミノ酸残基、分子量28.61および28.34kDaの炭酸脱水酵素をコードする遺伝子配列であることが確認できた。一方、60kDaタンパク質遺伝子はスクリーニング出来なかった。
- ・本酵素タンパク質遺伝子の発現器官:二種炭酸脱水酵素がともに内耳組織で発現していることを確認できた。また、他の器官においては二種炭酸脱水酵素が異なって発現していることがわかった。
- ・本酵素タンパク質遺伝子の分子進化:本研究でクローニングした二つの炭酸脱水酵素は共に哺乳類アイソザイムⅡ型に酷似していることがわかった。さらに、これら二種は系統樹上では比較的離れた位置にあることがわかった。

以上6項目の結果から、本研究では耳石炭酸形成機構に関わる炭酸脱水酵素の性状と機能を明らかにした。内耳小囊細胞では28kDaまたは約60kDaの分子量を持つ複数のアイソフォームを持つ炭酸脱水酵素に触媒される $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ 平衡で重炭酸恒常性は保たれる。

28kDaの酵素タンパクは、2種類のアイソフォームを持つが、これらは細胞内在型のタンパク質である。2種類のアイソフォームは、それぞれ各器官によって発現を異にし、異なる機能および互いを補う機能を持つことが示唆された。一方、60kDaの炭酸脱水酵素様タンパク質は内リンパ液側に放出されて有機基質として耳石に取り込まれ、内リンパ液および耳石表面に於いても、 $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$ 平衡により炭酸源を確保する、“自己触媒”の機能を持つことが考えられた。

今後の展望

①28kDaの分子量を持つ二種アイソフォームの関係

二種の炭酸脱水酵素アイソフォームを培養細胞にて発現させ、酵素活性とその特徴(Kd、Km、Vmaxなど)を確認する。また、ノーザンおよびin situハイブリダイゼーションにより、局在器官および局在部位を、さらに、定量PCRによる日周変動性を調べる。

②60kDaの分子量を持つ炭酸脱水酵素様タンパクの構造決定

内耳の60kDa炭酸脱水酵素様タンパク質は非常に微量であることが予想できた。そのため、本研究ではcDNAクローニングによる構造決定という手段に変更したが、本タンパク質をスクリーニング出来なかった。今後は、微量なタンパク質同定の手段として有効である発現ライブラリーによるスクリーニングを行う。