

トノサマガエル(*Rana nigromaculata*)とダルマガエル(*Rana porosa brevipoda*)水晶体に 発現する構造タンパク質：クリスタリンの比較 - 27による両種の識別法 -

藤井 豊^{1,2,3} 木元 久⁴ 川内 一憲^{1,5} 長谷川 巖^{1,2,6}

はじめに

眼は外界からくる可視光を検出する器官である。ヒトのような動物の眼では、光は角膜、前房をとおり、レンズである水晶体に達する。その後硝子体を通過して網膜で結像し視覚として認知される。光の屈折の大部分は角膜が担当するが、水晶体は映像が網膜にうまく結像するよう微調整の役割を果たしている。網膜に到達する光量が減衰しないよう、角膜、水晶体および硝子体は無色透明でなければならない。水晶体は、60%が水で、残りの40%がごく限られた種類のタンパク質でできている非常に特殊な組織である。

水晶体のタンパク質は構造タンパク質として知られクリスタリンと呼ばれている。脊椎動物では、 α -クリスタリン、 β -クリスタリンおよび γ -クリスタリンが共通のクリスタリン(α -, β -, γ -ファミリー)として多量に発現している。脊椎動物での共通のクリスタリンの他に、脊椎および無脊椎動物では種に特異的なクリスタリンとして、アヒルの δ -クリスタリン、ニワトリの ϵ -クリスタリン、カメの ζ -クリスタリンおよびイカのS-クリスタリンなどが知られ、これらを種特異的なクリスタリンと呼んでいる(Wistow and Piatigorsky 1988)。このことから、Fujiiらは、種特異的なクリスタリンによって、生物種の分類が可能になると提唱している(Fujii et al. 2001)。また、共通のクリスタリンであっても、そのファミリーの構成タンパク質を詳しく同定すれば、さらに詳細な分類が可能になるものと考えられている。

日本を代表するカエルはトノサマガエル(*Rana*

nigromaculata)である。トノサマガエルはダルマガエル(*Rana porosa brevipoda*)とともにアカガエル科(*Ranidae*)に分類されている(前田・松井 1989)。これらのカエルには種特異的なクリスタリンとして δ -クリスタリンが多量に発現しており、水晶体タンパク質の約20%を占めている(Fujii et al. 1990)。トノサマガエルは、明るい背中線を有し、背中中の黒色斑紋は融合しているが、腹部は白く黒色斑紋はない。他方、ダルマガエルは、背中線を持たず、背中中の黒色斑文は独立して大きく、腹部には雲状あるいは点状の黒色斑紋がある。典型的な場合には、両種を識別することはさほど難しくはない。しかし、川内らの報告にあるように、福井県では両者の中間的な形質をもつ個体：高田型トノサマガエルがかなり生息している(藤井ら 2004, 川内ら 2003, 2006)。この中間種の同定には、ミトコンドリア遺伝子の解析が決定的な検証法となるが、この方法は高価であり、また、時間もかかる(藤井ら 2004)。今回、 δ -クリスタリンファミリーの構成タンパク質を比較するという迅速で安価な方法が両種の識別に有効であることを発見したので報告する。

調査地と方法

1) カエルの捕獲地点と計測(川内ら 2006)

トノサマガエルは、三方町黒田(K1: , 体長83mm, 体重59.3g)および三方町中山(N1: , 体長56mm, 体重16.9g), (N2: , 体長59mm, 体重18.8g), (N3: , 体長48mm, 体重11.2g), (N6: , 体長41mm, 体重5.9g)の5個体、高田型トノサマガエルは、織田町細野(A1: , 体長58mm, 体重14.2g)、福井市田ノ頭(C2:

1. 福井爬虫両生類研究会
2. 福井陸水生物研究会
3. 福井大学医学部生命情報医科学講座分子生命化学領域(吉田郡永平寺町松岡下合月23-3)
4. 福井県立大学生物資源学部生物資料学科応用微生物学研究室(吉田郡永平寺町松岡兼定島4-1-1)
5. あわら市御簾尾7-17
6. 越前市葛岡町2-6

，体長63mm，体重24.6g)，鯖江市中野(D1: ，体長40mm，体重5.3g)の3個体，ダルマガエルは，三方町黒田(K2: ，体長55mm，体重16.2g)，(K3: ，体長63mm，体重23.9g)，(K24: ，体長49mm，体重8.7g)，(K25: ，体長44mm，体重7.8g)，(K26: ，体長41mm，体重6.0g)，(K29: ，体長41mm，体重5.7g)および三方町田井(T13: ，体長42mm，体重6.0g)の7個体をそれぞれ捕獲した。

2) 水晶体の摘出とクリスタリン溶液の調製

水晶体レンズは，角膜をメスで切開し眼球を軽く圧迫すると飛び出してくる。水晶体をピンセットで摘出し重量を測定した。摘出された水晶体は，その20倍量の20mMリン酸ナトリウム緩衝液，pH7.4，含0.01%アジ化ナトリウムを用いて，超音波ソニケーション処理されホモゲナイズされた。12,000gで10分間遠心してクリスタリンが溶けた上清を粗抽出画分として回収した。このときのタンパク質濃度は約10mg/mlである。

3) ゲル濾過による α -， β -， γ -および μ -クリスタリンファミリーの分離

ゲル濾過はBioAssist G3SWXLカラム (東ソー社)を用い，0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液，pH7.4，含0.01%アジ化ナトリウムを展開緩衝溶液として，流速0.5ml/minの条件で行った。粗抽出画分(10mg protein/ml)40 μ lをカラムに導入し，フラクションは20秒(0.17ml)ずつ集めた。タンパク質の溶出パターンは280nmの紫外線の吸収をモニターして求めた。

4) タンパク質濃度の測定

試料中のタンパク質濃度は色素結合法により求めた。50 μ l試料に250 μ l色素溶液(Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce社)を加え，室温で10分放置後，630nmの可視光の吸収を，405nmの吸収をサブトラクションレファレンスとして，マイクロプレートリーダーを用いて測定した。牛血清アルブミン10mg/ml溶液(Pierce社)を標準溶液として検量線を作成し，試料のクリスタリンタンパク質濃度を算出した。

5) 変性タンパク質の電気泳動解析

試料タンパク質の電気泳動はレムリーの

方法を用いた。この方法では，試料タンパク質は，通常それを構成している複数のサブユニットに解離変性した状態で分析される。ゲル濃度は12.5%アクリルアミド:ビスアクリルアミド(29.2:0.8)とした。0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下，12.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離泳動されたゲル中のタンパク質は，Coomassie Brilliant Blue R-250 (ナカライテスク社)で染色された。分子量スタンダードは，Low Molecular Weight Calibration Kit (phosphorylase b (97kDa), albumin (66kDa), ovalbumin (45kDa), carbonic anhydrase (30kDa), trypsin inhibitor (20.1kDa), γ -lactalbumin (14.4kDa), Amersham社)を用い，目的のタンパク質の分子量の算定に供した。

6) アミノ酸配列分析

試料タンパク質を12.5%ゲルSDS-PAGEにより分離した後，ゲル中のタンパク質をPVDF膜(BioRad社)に電気的に転写した。PVDF膜をCoomassie Brilliant Blue R-250で染めた後，目的のタンパク質バンドを切り出し，プロテインシーケンサー(Procise, アプライドバイオシステムズ社)で分析した。

結果と考察

トノサマガエル，高田型トノサマガエルおよびダルマガエル水晶体粗抽出画分のSDS-PAGEによる結果を図1に示した。36kDaの染色バンドは種特異的 μ -クリスタリンである。20-30kDaの範囲にある染

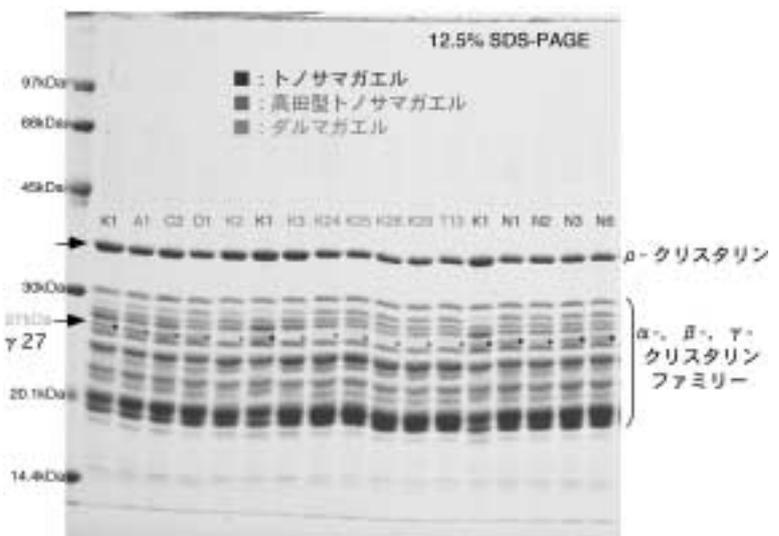


図1. 水晶体粗抽出画分の電気泳動とタンパク質染色

色バンドは、共通のクリスタリン: α -, β -, γ -クリスタリンファミリーのタンパク質バンド帯である。トノサマガエルと高田型トノサマガエルの染色パターンはほとんど同じである。しかし、ダルマガエルの染色パターンをみると、27kDaの付近にはバンドがみられない。即ち、トノサマガエルおよび高田型トノサマガエルには分子量27kDaのクリスタリンが発現しているが、ダルマガエルではこのクリスタリンは発現していないことを示している。従って、27kDaのクリスタリンを発現しているカエルがトノサマガエルであり、発現していないのがダルマガエルと判定される。このことから、高田型はトノサマガエルと同種であると結論された。この判定は、我々がすでに報告しているミトコンドリア遺伝子解析

(藤井ら 2004) による結果と一致する。

上述の27kDaクリスタリンの同定を行うため、トノサマガエル(K1)とダルマガエル(K3)の水晶体粗抽出画分をゲル濾過により分析した。その結果を図2に示した。ゲル濾過では、分子ふるいの効果により、分子量の大きいものほど早くカラムから流出してくる。ゲル濾過による流出順位は、 α -クリスタリンが最も早く、次いで β -クリスタリン、 ρ -クリスタリンそして最後に γ -クリスタリンの順となる。

α -クリスタリンは、SDS-PAGEでみると分子量20kDa前後の小さいサブユニットタンパク質に解離しているが、多数のサブユニット分子が複合体を形成し巨大な会合体の形態をとるためゲル濾過では一番早く流出してくることになる。 β -クリスタリンも

会合体を形成している。他方、 γ -クリスタリンと ρ -クリスタリンはそのような会合体を形成することはなく、それ自身一つのサブユニット即ち単量体としてふるまっているため、分子量が α -, β -クリスタリン会合体よりも小さくなり流出は遅れてくる。図2のトノサマガエル(K1)の結果を見ると、27kDaクリスタリンは γ -クリスタリン画分に検出された。ダルマガエル(K3)ではこの位置にバンドは検出されていない。そこで、この27kDaクリスタリンをPVDF膜に転写して、そのアミノ基末端からのアミノ酸配列をプロテインシーケンサーで分析した。その結果は、1残基目:グリシン(Gly, G), 2残基目:リジン(Lys, K), 3残基目:イソロイシン(Ile, I), 4残基目:イソロイシン(Ile, I), 5残基目:フェニルアラニン(Phe, F), 6残基目:チロシン(Tyr, Y), 7残基目:グルタミン酸(Glu, E), 8残基目:アスパラギン酸(Asp, D), 9残基目:リジン(Lys, K), 10残基目:アスパラギン(Asn, N), 11残基目:フェニルアラニン(Phe, F)と決定された。この11残基よりなるアミノ酸配列G-K-I-I-F-Y-E-D-K-N-Fを基に相同性検索を実施したところ、魚類の γ -クリスタリンと高い相同性が確認された。そこで、この27kDaタンパク質を γ -27と命名することにした。

以上より、 γ -27はトノサマガエルとダ

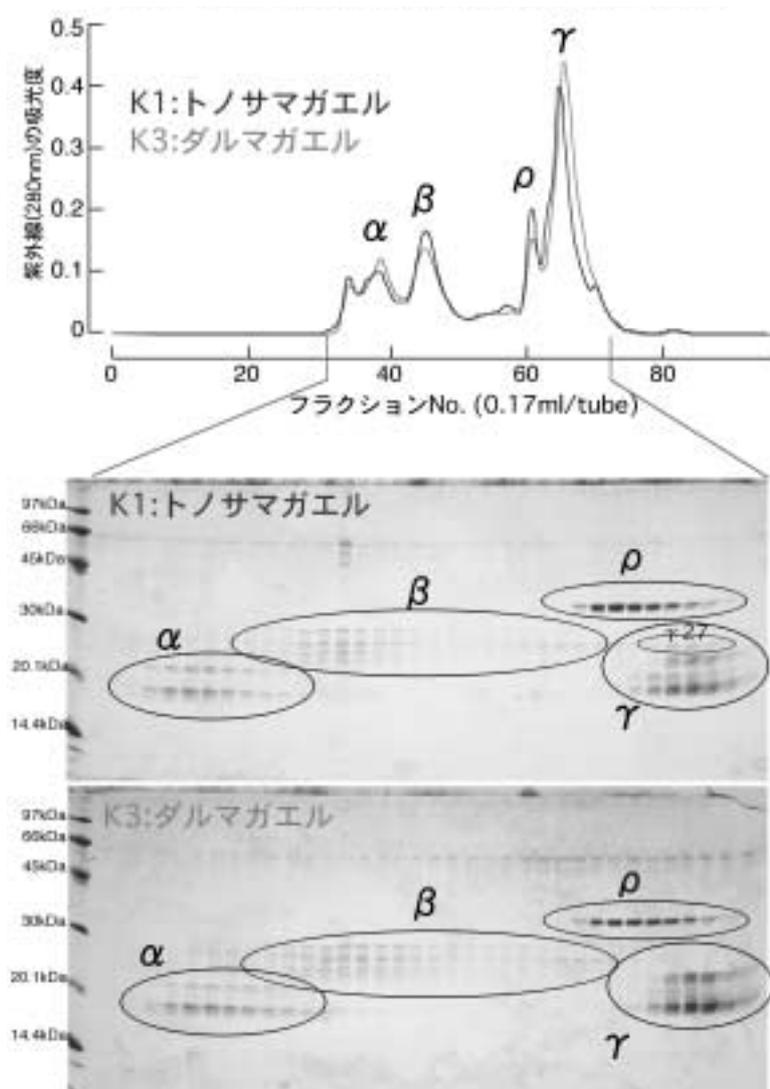


図2. BioAssist G3SWXLカラムによる水晶体粗抽出画分のゲル濾過とSDS-PAGEによるタンパク質染色

ルマガエルの識別に有効な指標となることが立証された。SDS-PAGEにより迅速で安価な判定方法が確立された。今後は、 α 27の抗体を調製し、抗原抗体反応を利用したより精度の高い判定法の開発が可能と思われる。日本に生息する無尾両生類は、現在5科8属34種5亜種に分類されている(前田・松井1989)。面白いことに、アマガエル科(*Hylidae*)のニホンアマガエル(*Hyla japonica*)では、 α -クリスタリンの代わりに β -クリスタリンが発現している(Fujii et al. 2001)。さらに、硬骨魚類では新しい種特異的クリスタリン(藤井ら、未発表)が発見されている。このように、今後も種を特定する新しいクリスタリンの発見が予想される、クリスタリンによる生物種の同定法は、これからの新しい生物分類学の一つの手法として確立される可能性を持っている。

要 旨

トノサマガエル水晶体には27kDa- α 27クリスタリタンパク質(α 27)が発現している。 α 27はダルマガエル水晶体には発現していない。ダルマガエルの形質の特徴をもつ高田型トノサマガエルの水晶体には、 α 27のみならず他のクリスタリンもトノサマガエルと同じレベルで発現していた。このことから、高田型トノサマガエルはトノサマガエルと同種と結論された。

謝 辞

原稿の校正を担当して頂いた福井大学の岡本先生に感謝致します。

引用文献

- Fujii, Y., Watanabe, K., Hayashi, H., Urade, Y., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H. and Hayaishi, O. 1990. Purification and Characterization of α -Crystallin from Japanese Common Bullfrog Lens. *J. Biol. Chem.* 265, 9914-23.
- Fujii, Y., Kimoto, H., Ishikawa, K., Watanabe, K., Yokota, Y., Nakai, N. and Taketo, A. 2001. Taxon-specific α -Crystallin in Japanese Tree Frog (*Hyla Japonica*) Lens. *J. Biol. Chem.* 276, 28134-39.
- 藤井豊, 木元久, 川内一憲, 長谷川巖. 2004. トノサマガエル(*Rana nigromaculata*)とダルマガエル

ル(*Rana porosa brevipoda*)のミトコンドリア・シトクロムcオキシダーゼ・サブユニットI(COI)遺伝子の比較. 福井陸水生物会報

川内一憲, 藤井豊, 木元久, 長谷川巖. 2003. 福井県にみられるトノサマガエル種族の多様性. 福井大学医学部研究雑誌 4: 81-85.

川内一憲, 藤井豊, 木元久, 長谷川巖. 2006. 福井県における高田型トノサマガエルの出現頻度. *Ciconia* (福井県自然保護センター研究紀要) in press.

前田憲男, 松井正文. 1989. 日本カエル図鑑, 8-9pp., 84-87pp., 92-95pp. 文一総合出版, 東京.

Wistow, G.J. and Piatigorsky, J. 1988. Lens Crystallin: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu. Rev. Biochem.* 57:479-504.

キーワード

α 27, クリスタリン, 水晶体, ダルマガエル, トノサマガエル

Comparisation of Crystallin form Black-spotted pond frog (*Rana nigromaculata*)
and Daruma pond frog *Rana porosa brevipoda*.

Yutaka FUJII^{1,2,3} Hisashi KIMOTO⁴ Kazunori KAWAUCHI^{1,5} Iwao HASEGAWA^{1,2,6}

The 27kDa- α -crystallin protein (27) was observed in crystallin lens of Black-spotted pond frog (*Rana nigromaculata*), but not in Daruma pond frog (*Rana porosa brevipoda*). In the crystallin lens of Takada (tb) type (*R. nigromaculata*) having the morphological character which closely resembled *R. porosa brevipoda*, not only 27 but also other crystallin was observed as the same level as *R. nigromaculata*. From these results, we concluded that the Takada (tb) type is classified into the same species as *R. nigromaculata*.

1. Fukui Reptiles and Amphibians Research Academy
2. Fukui Rikusui-Biology. Research Academy
3. University of Fukui Faculty of Medical Sciences, 23-3 Shimoaizuki, Matsuoka, eiheiji-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1193 JAPAN
4. Fukui Prefectural University Faculty of Biotechnology, 4-1-1 Kenjojima, Matsuoka, eiheiji-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1195 JAPAN
5. Misnoo7-17, Awara city, Fukui 919-0747
6. Kuzuoka-cho 2-6, Etizen city, Fukui 915-0041