

$\rho$ -Crystallin is Taxon-specific Crystallin in the Superfamily Ranoidea, and  $\zeta$ -Crystallin is Taxon-specific Crystallin in the Family Hylidae. : in addition, neither  $\rho$ -crystallin nor  $\zeta$ -crystallin was confirmed in the family Ceratophryidae, the family Bufonidae, and the family Dendrobatidae

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-02-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤井, 豊, 川内, 一憲, 川崎, 隆徳, 上田, 昌範, 水野, 克俊, 山田, 雅己, Fujii, Yutaka, Kawauchi, Kazunori, Kawasaki, Takanori, UEDA, Masanori, Mizuno, Katsutoshi, Yamada, Masami メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10098/00028586">http://hdl.handle.net/10098/00028586</a>

$\rho$ -クリスタリンはアカガエル上科(Ranoidea)の種特異的クリスタリン,そして, $\zeta$ -クリスタリンはアマガエル科(Hylidae)の種特異的クリスタリンである。

—また,ツノガエル科(Ceratophryidae),ヒキガエル科(Bufoidea),ヤドクガエル科(Dendrobatidae)には $\rho$ -クリスタリンも $\zeta$ -クリスタリンも確認されなかった—

<sup>%)</sup>藤井 豊<sup>\*&</sup>,川内 一憲<sup>\*</sup>,川崎 隆徳<sup>\*</sup>,上田 昌範<sup>&</sup>,水野 克俊<sup>§</sup>,山田 雅己<sup>§</sup>  
医学領域生命情報医科学講座分子生命化学分野,<sup>§</sup>医学領域生命情報医科学講座分子生体情報学分野

**$\rho$ -Crystallin is Taxon-specific Crystallin in the Superfamily Ranoidea, and  $\zeta$ -Crystallin is Taxon-specific Crystallin in the Family Hylidae.  
—in addition, neither  $\rho$ -crystallin nor  $\zeta$ -crystallin was confirmed in the family Ceratophryidae, the family Bufoidea, and the family Dendrobatidae—**

<sup>%)</sup>FUJII, Yutaka<sup>\*&</sup>, KAWAUCHI, Kazunori<sup>\*</sup>, KAWASAKI, Takanori<sup>\*</sup>, UEDA, Masanori<sup>&</sup>, MIZUNO, Katsutoshi<sup>§</sup>, YAMADA, Masami<sup>§</sup>

Department of Molecular Biology and Chemistry, Unit of Biochemistry and Bioinformatic Sciences, Division of Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui,<sup>§</sup> Department of Cell Biology and Biochemistry, Unit of Biochemistry and Bioinformatic Sciences, Division of Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui

#### 要旨:

アカガエル上科 (Ranoidea) に分類される,ヌマガエル科 (Dicroglossidae) のヌマガエル (*Fejervarya kawamurai*), アカガエル科 (Ranoidea) のトノサマガエル (*Pelophylax nigromaculatus*), ナゴヤダルマガエル (*Pelophylax porosus brevipodus*), ウシガエル (*Lithobates catesbeianus*), ヤマアカガエル (*Rana ornativentris*), ニホンアカガエル (*Rana japonica*), タゴガエル (*Rana tagoi tagoi*), ツチガエル (*Glandirana rugose*), およびアオガエル科 (Rhacophoridae) のモリアオガエル (*Rhacophorus arboreus*), シュレーゲルアオガエル (*Rhacophorus schlegelii*) の水晶体で $\rho$ -クリスタリタンパク質の発現が確認された。アマガエル上科 (Hylidae) に分類されるアマガエル科 (Hylidae) のニホンアマガエル (*Hyla japonica*) およびアカメアマガエル (*Agalychnis callidryas*) の水晶体において $\zeta$ -クリスタリタンパク質の発現が確認された。また, アマガエル上科における, ツノガエル科 (Ceratophryidae) のクランウエルツノガエル (*Ceratophrys cranwelli*), ヒキガエル科 (Bufoidea) のアズマヒキガエル (*Bufo japonicus formosus*), ナガレヒキガエル (*Bufo torrenticola*), テキサスヒキガエル (*Bufo speciosus*), およびヤドクガエル科 (Dendrobatidae) のコバルトヤドクガエル (*Dendrobates azureus*), キオビヤドクガエル (*Dendrobates leucomelas*) の水晶体にはいずれの種特異的クリスタリタンパク質も検出できなかった。

**キーワード:** ヒキガエル, カエル, 水晶体, 種特異的クリスタリン,  $\rho$ -クリスタリン,  $\zeta$ -クリスタリン

#### Abstract:

Protein expression of  $\rho$ -crystallin was confirmed in the lens of frog classified as the superfamily Ranoidea as follows; Japanese rice frog (*Fejervarya kawamurai*) of the family Dicroglossidae, Black-spotted pond frog (*Pelophylax nigromaculatus*), Nagoya daruma pond frog (*Pelophylax porosus brevipodus*), American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*), Montane brown frog (*Rana ornativentris*), Japanese brown frog (*Rana japonica*), Tago's brown frog (*Rana tagoi tagoi*), Wrinkled frog (*Glandirana rugose*) of the family Ranidae, Forest green tree frog (*Rhacophorus arboreus*), Schlegel's green tree frog (*Rhacophorus schlegelii*) of the family Rhacophoridae. Protein expression of the  $\zeta$ -crystallin was confirmed in the lens of frog classified as the family Hylidae as follows; Japanese tree frog (*Hyla japonica*) and Red-eyed tree frog (*Agalychnis callidryas*). In addition, neither  $\rho$ -crystallin nor  $\zeta$ -crystallin was detected in the lens of toad and frog as follows; Cranwell's horned frog (*Ceratophrys cranwelli*) of the family Ceratophryidae, Eastern-Japanese common toad (*Bufo japonicus formosus*), Japanese stream toad (*Bufo torrenticola*), Texas toad (*Bufo speciosus*) of the family Bufoidea, Blue poison dart frog (*Dendrobates azureus*), Yellow-banded poison dart frog (*Dendrobates leucomelas*) of the family Dendrobatidae.

**KeyWords:** toad, frog, lens, taxon-specific crystallin,  $\rho$ -crystallin,  $\zeta$ -crystallin

\* 福井県両生爬虫類研究会 (Fukui Prefecture Research Laboratory of Amphibians and Reptiles)

& 福井大学発ベンチャー・有限会社福井ウルテック (Fukui Ultec Co., Ltd., Venture of University of Fukui)

<sup>%)</sup> コレスポンディングオーサー

(Received 30 November, 2020 ; accepted 16 February, 2021)

## まえがき

脊椎動物の眼の水晶体は水晶体嚢に包まれた極めて特異な組織で、水晶体前面にある一層の表皮細胞以外は、核を消失した繊維細胞となり、細胞内は極限られた種類の水溶性構造タンパク質で占められている<sup>(1)</sup>。<sup>(2)</sup> この主要な水溶性の水晶体構造タンパク質を特にクリスタリン(Crystallin)と呼んでいる。脊椎動物では、 $\alpha$ -、 $\beta$ -および $\gamma$ -クリスタリンが共通したクリスタリン(共通クリスタリン: Common Crystallin)として必ず発現している。 $\alpha$ -、 $\beta$ -および $\gamma$ -クリスタリンには、それぞれ数種のサブクラスタイプ(分子量 14 kDa ~ 32 kDa)が存在し、 $\alpha$ -クリスタリンと $\beta$ -クリスタリンは、それぞれの各サブクラスタイプ同志で高分子複合体を形成している。一方、 $\gamma$ -クリスタリンは、各 $\gamma$ -サブクラスクリスタリンがモノマーあるいはダイマー程度の低分子複合体として存在している。ゲルろ過では、 $\alpha$ -、 $\beta$ -および $\gamma$ -クリスタリンの順に流出してくる。脊椎動物の祖先は、カンブリア紀に生息していたナメクジウオに似た生物といわれている。恐らく水晶体を持つ眼もこの時期に出現しているものと考えられる。眼でも水晶体は最後に進化した組織である。そのため、新しく水晶体構造タンパク質クリスタリンとしての機能をもつタンパク質を無から創造するのではなく、既存のタンパク質を遺伝子重複により流用したと考えられている。すなわち脊椎動物では $\alpha$ -、 $\beta$ -および $\gamma$ -クリスタリンがまさにその産物と考えられている。

共通クリスタリン以外に生物種により異なる特異的なクリスタリンが発現している場合があり、このようなクリスタリンを種特異的クリスタリン(Taxon-specific Crystallin)と定義している<sup>(1)</sup>。<sup>(2)</sup>。特に、無脊椎動物では、脊椎動物のような共通クリスタリンはないので、生物種により異なるそれぞれ固有の種特異的クリスタリンが発現していると考えられている。種特異的クリスタリンも既存のタンパク質を流用したと考えられている。例えば、イカのS-クリスタリンは、グルタチオンSトランスフェラーゼから、アヒルの $\epsilon$ -クリスタリンは乳酸脱水素酵素LDHからそれぞれ遺伝子重複により流用されている。

両生綱(Amphibia)無尾目(Anura)に分類され

るカエル類(Toads & Frogs)の種特異的クリスタリンとして、Tomarevらによるアカガエル科(Ranidae)アカガエル属(*Rana*)ヨーロッパアカガエル(*Rana temporaria*)から最初の報告がある<sup>(3)</sup>。当初 $\epsilon$ -クリスタリンと命名されたがアヒルの種特異的クリスタリンとして既に報告されていたため、後に $\rho$ -クリスタリンと改称された経緯がある。その後、我々はアカガエル科(Ranidae)アメリカアカガエル属(*Lithobates*)に分類されるウシガエル(*Lithobates catesbeianus*)の $\rho$ -クリスタリンについて報告している<sup>(4)</sup>。 $\rho$ -クリスタリンは、白内障など糖尿病性合併症を引き起こすアルドース還元酵素の仲間から進化したと考えられている。ウシガエル水晶体には明らかに過剰の $\rho$ -クリスタリンが発現しているが、酵素活性はすでに失われているため白内障にならずにいられる。しかし、補酵素NADPHの結合能は維持されており紫外線から眼を保護している。また、アマガエル科(Hylidae)アマガエル属(*Hyla*)ニホンアマガエル(*Hyla japonica*)の $\zeta$ -クリスタリンの存在も報告した<sup>(5)</sup>。 $\zeta$ -クリスタリンは、ラクダとモルモットでも採用されており、キノ還元酵素活性をもつNADPH結合型クリスタリンである。

今日カエル類は世界で50科を超え7,000種近い種が報告されている<sup>(6)</sup>。日本に生息しているカエル類は、外来種を含め無舌亜目(Aglossa)に分類されるピパ科(Pipidae)、カエル亜目(Neobatrachia)に分類されるアマガエル上科(Hyloidea)のヒキガエル科(Bufonidae)とアマガエル科(Hylidae)、アカガエル上科(Ranoidea)のヒメアマガエル科(Microhylidae)、ヌマガエル科(Dicroglossidae)、アカガエル科(Ranidae)およびアオガエル科(Rhacophoridae)の計7科で18属44種4亜種に分類されている(図1)。無舌亜目ピパ科ツメガエル属(*Xenopus*)のアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)が静岡県、千葉県、和歌山県などの溜池などで定着している。分類学上、カエル亜目に分類される他の6科とは系統的に極めて遠い関係である。さらに、アマガエル科とヒキガエル科はアマガエル上科に、他方ヒメアマガエル科、ヌマガエル科、アカガエル科およびアオガエル科はアカガエル上科にそれぞれ分類されており、両上科は系統的にかなり遠い関係である。

$\rho$ -クリスタリンはアカガエル上科 (Ranoidea) の種特異的クリスタリン,そして, $\zeta$ -クリスタリンはアマガエル科 (Hylidae) の種特異的クリスタリンである。

今回、ピパ科とヒメアマガエル科を除く、兵庫県産1科と福井県産4科の代表的なカエル類について種特異的クリスタリンの蛋白質化学的および免疫化学的な解析を行ったので報告する。また、幾つかの外国産のカエル類で行った蛋白質化学的解析データも合わせて報告する。

## 実験材料と実験方法

### 1. 実験材料

脊椎動物硬骨魚類に分類され古代魚として認知されているチョウザメ (*Acipenser sp*) は、カエル類の系統上の外分として用いた。また、本種頭部を養殖業者である株式会社フジキンから研究用として譲渡を受けた。福井県産アマガエル上科として、ヒキガエル科のアズマヒキガエル (*Bufo japonicas formosus*) とナガレヒキガエル (*Bufo torrenticola*),そしてアマガエル科のニホンアマガエル (*Hyla japonica*) を用いた。アカガエル上科として、兵庫県産ヌマガエル科のヌマガエル (*Fejervarya kawamurai*) と、以下福井県産の体系的な種であるアカガエル科アメリカアカガエル属のウシガエル (*Lithobates catesbeianus*), アカガエル科トノサマガエル属のトノサマガエル (*Pelophylax nigromaculatus*) とナゴヤダルマガエル (*Pelophylax porosus brevipodus*), アカガエル科アカガエル属のヤマアカガエル (*Rana ornativentris*), ニホンアカガエル (*Rana japonica*) とタゴガエル (*Rana tagoi tagoi*), アカガエル科ツチガエル属のツチガエル (*Glandirana rugose*) および、アオガエル科アオガエル属のモリアオガエル (*Rhacophorus arboreus*) の計5科8属12種のカエル類を用いた。アマガエル上科に分類されるツノガエル科 (Ceratophryidae) のクランウエルツノガエル (*Ceratophrys cranwelli*) とヒキガエル科のテキサスヒキガエル (*Bufo speciosus*), アマガエル科のアカメアマガエル (*Agalychnis callidryas*), ヤドクガエル科 (Dendrobatidae) のコバルトヤドクガエル (*Dendrobates azureus*) とキオビヤドクガエル (*Dendrobates leucomelas*) は名古屋市東山動植物園から死亡個体の提供を受けた (図1)。

### 2. 試薬類

Tris: トリスヒドロキシメチルアミノメタン (tris (hydroxymethyl) aminomethane), EDTA: エチレンジアミン四酢酸 (ethylene diamine tetraacetic acid), リン酸二水素ナトリウム・2水和物 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), リン酸水素二ナトリウム・12水和物 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), は和光純薬工業より特級品を購入した。グリセロール (glycerol), はナカライテスクより特級品を購入した。その他の試薬類は、全て最高等級の製品を使用した。

### 3. 水晶体の摘出とクリスタリンの可溶化

水晶体の摘出は、初めに眼球を摘出し、角膜を切除して水晶体を圧出することで取り出した<sup>(4), (5)</sup>。水晶体囊に残る毛様体筋等の附属組織はキムワイブ上で水晶体を転がして剥がし取った。余分な組織を取り除いた水晶体は、1.5 ml チューブに入れて重量を測定し、その9倍量の緩衝液 (100 mM Tris-HCl buffer, pH7.4, 2 mM EDTA, 20% glycerol) を加えて、氷上で冷しながら超音波ホモジナイザー (SONIFIER 250, Branson 社製) で水晶体を破碎した後、遠心分離 (4°C, 15,000 g

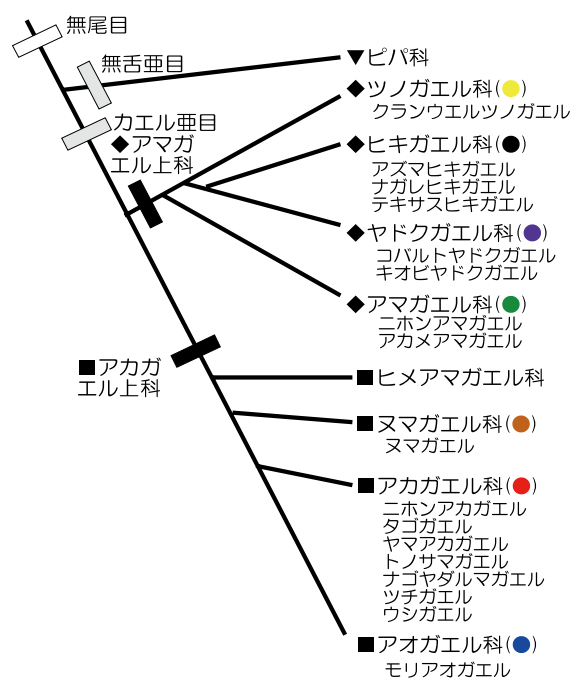


図1 本研究で扱った無尾目カエル類の系統関係 (日本産カエル大鑑<sup>(6)</sup>参照改変)

で15分間)により上清を水晶体クリスタリン粗抽出液として回収した。実験に用いるまで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。なお、タンパク質濃度は、波長280 nmの吸光度を基に、 $A_{280} 1.0 = 1 \text{ mg/ml}$ として求めた。また、ピパ科のコモリガエル (*Pipa pipa*) の死亡個体の提供を同上の東山動植物園より受けたが眼球が極めて小さく水晶体の摘出に失敗したため分析できなかった。

#### 4. 水晶体構造タンパク質クリスタリンの電気泳動法

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS; sodium dodecyl sulfate) 存在下におけるポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE; polyacrylamide gel electrophoresis) : SDS-PAGE を用いて水晶体構造タンパク質クリスタリンのサブユニット構造の分析を行った。SDS-PAGE は、アトー社製の *e-PAGE*L (10-20%, 18 wells), 電気泳動用バッファー (AE-1412; Tris-Glycine SDS buffer), サンプル調製用バッファー (AE-1430; 2 x concentrated) および電気泳動装置 (AE-6531) を用いて出来るだけ低温で行った。サンプルの調製は、クリスタリン試料: サンプル調製バッファーを1:1で混合し、 $100^{\circ}\text{C}$ で5分間加熱処理した。電気泳動後、タンパク質は、アトー社製 Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色液 (AE-1340) で行った。分子量マーカーは、ファルマシア製

(現 GE 社製) 低分子用マーカー・LMW Marker Kit (14.4 ~ 97 kDa) およびバイオラド社製プレジジョン Plus プロテイン™ デュアルカラースタンダードを使用した。

#### 5. 水晶体構造タンパク質クリスタリンのゲルろ過法

ファルマシア製 (現 GE 社製) の Superdex G-75 を分離用カラムとし、室温  $20^{\circ}\text{C}$ , 流速  $0.5 \text{ ml/min}$ ,  $50 \text{ mM}$  リン酸ナトリウム緩衝液, pH7.4,  $0.01\% \text{ Na}_3\text{N}$  を用いて行った。試料サンプル量は、 $600 \mu\text{l}$  をインジェクトした。モニターは、波長  $280 \text{ nm}$  での吸光度をそれぞれ測定した。流出画分は、1分間の連続フラクション ( $0.5 \text{ ml/tube}$ ) として回収した。

#### 6. クリスタリンの N 末端解析とウエスタンブロット

$12\%$  アクリルアミドゲル SDS-PAGE 後、ゲルタンパク質を Poly-Vinylidene Di-Fluoride (PVDF) メンブレンに転写後、CBB 染色した。 $\rho$ -クリスタリンまたは $\zeta$ -クリスタリンの N 末端アミノ酸配列の分析では、該当するタンパク質バンドを切り出し、プロサイズ (アプライドバイオシステムズ社製) にて自動エンドマン分解法により解析した。免疫染色の場合には、富士フィルム和光製イムノスターゼータを用いてウエスタンブロットティング法により  $\rho$ -クリスタリンの蛋白質バンド

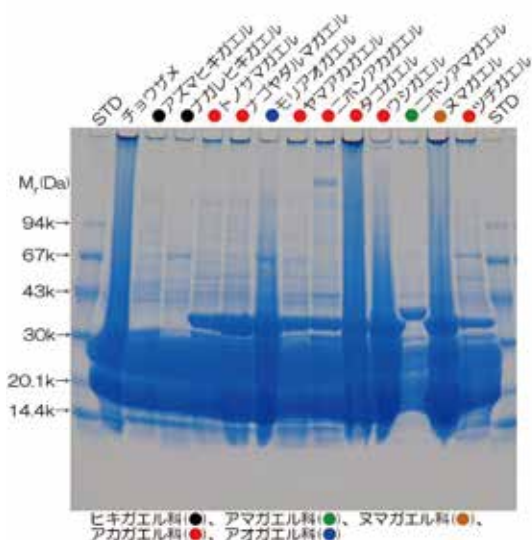


図2 カエル類水晶体粗抽出画分の10-20%アクリルアミドグラジエントゲル SDS-PAGE (CBB 染色)  
試料: サンプル調製バッファー=1:1, 10  $\mu\text{l}$ ずつ分析。

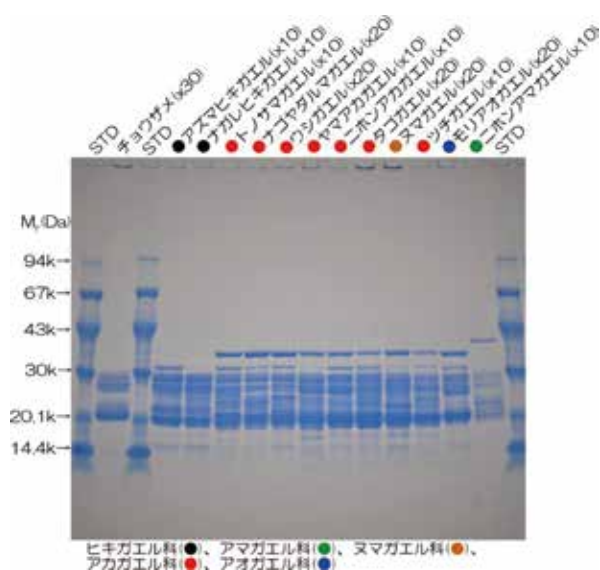


図3 カエル類水晶体粗抽出画分の10-20%アクリルアミドグラジエントゲル SDS-PAGE (CBB 染色)  
図2の各試料は(x10)-(x30)倍に希釈した。希釈試料: サンプル調製バッファー=1:1, 10  $\mu\text{l}$ ずつ分析。

$\rho$ -クリスタリンはアカガエル上科 (Ranoidea) の種特異的クリスタリン,そして, $\zeta$ -クリスタリンはアマガエル科 (Hylidae) の種特異的クリスタリンである。

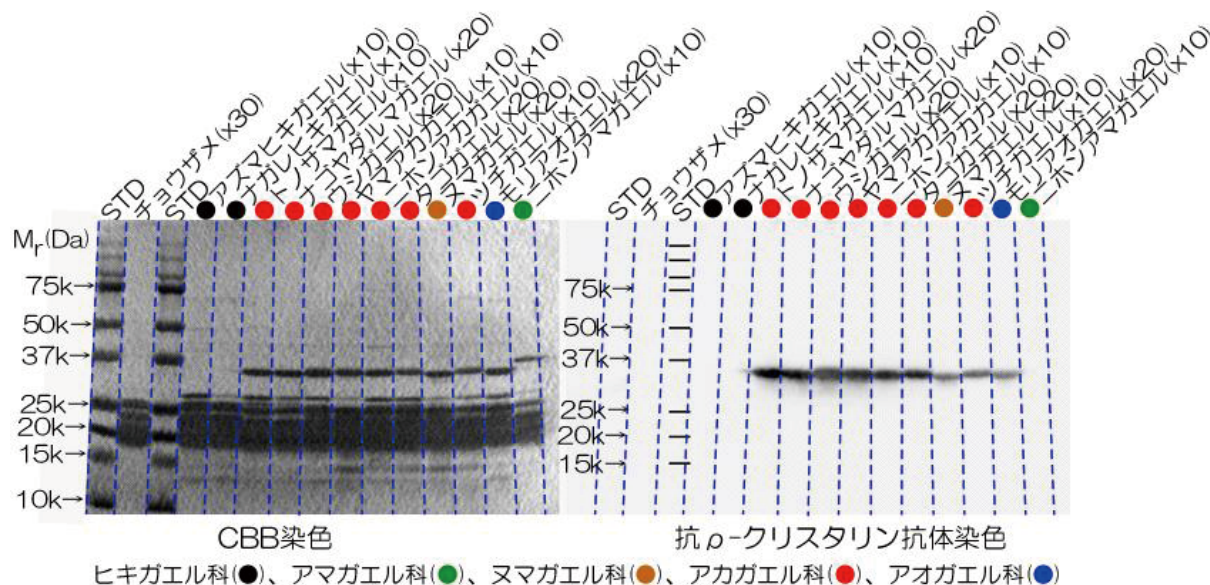


図4 カエル類水晶体粗抽出画分の12%アクリルアミドゲルSDS-PAGE (CBB染色と抗 $\rho$ -クリスタリン抗体染色)

図2の各試料は(x10)-(x30)倍に希釈した。希釈試料：サンプル調製バッファー=1:1, 10  $\mu$ gずつ分析。

を化学発光法で検出した。抗- $\rho$ -クリスタリン抗体は、以前の研究でウシガエルの $\rho$ -クリスタリンを抗原としてウサギより調製した抗血清を用いた<sup>(4)</sup>。

## 結果

### 1. カエル類の水晶体粗抽出画分の SDS-PAGE

福井県産のカエル類の水晶体粗抽出画分をSDS-PAGEで分析した(図2)。どのサンプル試料もタンパク質量が過剰で一部テーリングを起こし、分離不十分な電気泳動パターンが得られた。しかし、14-32kDaの範囲にほと

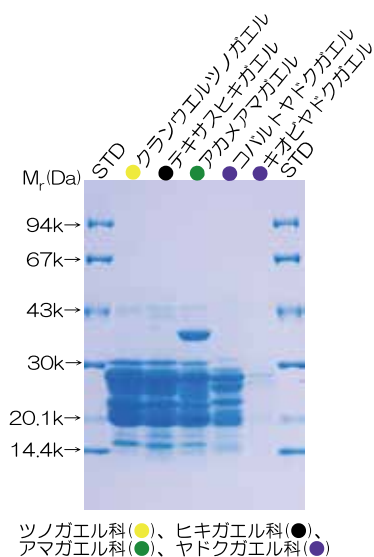


図5 アマガエル上科カエル類水晶体粗抽出画分の10-20%アクリルアミドグラジエントゲルSDS-PAGE (CBB染色)  
2008年3月24日のデータ

んどのタンパク質クリスタリンが検出された。これらのクリスタリンは、脊椎動物の共通クリスタリンである $\alpha$ -、 $\beta$ -、および $\gamma$ -クリスタリンのサブタイプクリスタリンのバンド帯を示している。このバンド帯に種特異的クリスタリンがある場合には、その識別は困難である。一方、32-43kDaの間に検出されるメジャーな太いタンパク質バンド(34-35kDa)がヌマガエル科(●)、アカガエル科(●)およびアオガエル科(●)のサンプル試料に見られる。これはちょうどウシガエルの $\rho$ -クリスタリンと同じ分子サイズの領域である。他方、アマガエル科(●)に見られるタンパク質バンド(37-38kDa)は $\zeta$ -クリスタリンである。しかし、ヒキガエル科(●)のアズマヒキガエルとナガレヒキガエルには $\rho$ -クリスタリンもしくは $\zeta$ -クリスタリンに相当するタンパク質バンドはまったく検出されていない。図2の結果を受け、タンパク質量を抑えて分離能を高めるため、全てのサンプル試料を10~30倍に希釈して再度SDS-PAGEを行った(図3)。脊椎動物において使われている共通クリスタリンのサブタイプクリスタリンの分子サイズは相互に極めて類似しているが、各サブタイプクリスタリンの組成には種による特徴が観察された。チョウザメは、共通クリスタリンサブタイプのバリエーションに乏しく、同様の傾向

はヒキガエル科やアマガエル科でも見られる。21-23 kDa および 27-29 kDa サイズのクリスタリンが主流で、24-26 kDa サイズのクリスタリンの割合は少ない。チョウザメ、アズマヒキガエルおよびナガレヒキガエルには、共通クリスタリン以外に種特異的クリスタリンと認識できるクリスタリンは同定できていない。少なくとも  $\rho$ -クリスタリンや  $\zeta$ -クリスタリンは存在しない。また、アカガエル上科のなかでは、アオガエル科の種特異的クリスタリンの分子量は、他の科の種特異的クリスタリンとは明らかに小さい。

## 2. 抗 $\rho$ -クリスタリン抗体を用いた免疫学的解析

図3のサンプル試料を用いて12%アクリルアミドゲル SDS-PAGE 後ウエスタンプロットを行った。CBB 染色によるタンパク質染色の結果を見ると、アカガエル科アメリカアカガエル属のウシガエル  $\rho$ -クリスタリンと同程度の移動度を示したクリスタリンは、アカガエル科アカガエル属のヤマアカガエル、ニホンアカガエルとタゴガエル、アカガエル科ツチガエルで認められた(図4)。一方、ウシガエル  $\rho$ -クリスタリンより移動度の大きい低分子型クリスタリンは、アカガエル科トノサマガエル属のトノサマガエルとナゴヤダルマガエル、ヌマガエル科のヌマガエル、およびアオガエル科モリアオガエルで観察された。同様の傾向は抗  $\rho$ -クリスタリン抗体による免疫染色の結果からも観察された。しかも、各サンプル試料で低分子化したバンドも全く観察されないことから、移動度の差は、タンパク質分解により引き起こされたものではないことが確認できた。ただし、免疫染色では染色強度に大きな相違が観察されている。ウシガエル  $\rho$ -クリスタリンと同じ染色強度を示したのは、アカガエル科トノサマガエル属のトノサマガエルとナゴヤダルマガエル、アカガエル科アカガエル属のヤマアカガエル、ニホンアカガエルとタゴガエルである。一方、染色強度が弱いものは、ヌマガエル科ヌマガエル、アカガエル科ツチガエル属ツチガエルとアオガエル科モリアオガエルである。チョウザメ、ヒキガエル科のアズマヒキガエルとナガレヒキガエル、およびアマガエル科ニホンアマガエルでは、 $\rho$ -クリスタリンの染色バンドは全く検出されなかった。

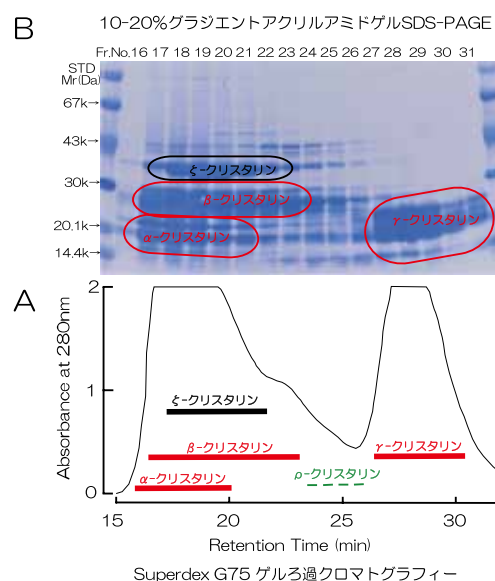


図6 アカメアマガエル水晶体粗抽出画分の Superdex G-75 ゲルろ過クロマトグラフィー(A)と SDS-PAGE(B)

(A)  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -クリスタリンの主要な流出位置は赤色実線で記した。 $\zeta$ -クリスタリンの主要な流出位置は黒色実線で記している。また、 $\rho$ -クリスタリンの予想流出位置は緑色破線で示した。  
(B)  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -クリスタリンの主要なエリアは赤色実線で囲んだ。 $\zeta$ -クリスタリンの主要なエリアは黒色実線で囲んでいる。ただし、 $\rho$ -クリスタリンは確認されていない。

## 3. アマガエル上科カエル類の SDS-PAGE

残念ながらサンプル自体は残っていなかったが、2008年に行ったアマガエル上科の4科のカエル水晶体の電気泳動の画像データが残っていた(図5)。アマガエル科アカメアマガエルの水晶体には種特異的クリスタリンが認められた。幸い、アカメアマガエル水晶体の Superdex G-75 のゲルろ過クロマトグラフィーと SDS-PAGE の結果もデータとして残っていた(図6)。 $\rho$ -クリスタリンは単量体タンパク質でゲルろ過では  $\gamma$ -クリスタリンの直前領域に流出してくるが、その領域には  $\rho$ -クリスタリンと認識できるバンドはない。一方、 $\zeta$ -クリスタリンは、2量体として存在しており、高分子量の領域に認められる。アカメアマガエルの種特異的クリスタリンの流出位置もこれに相当する領域であった。また、アカメアマガエルの  $\zeta$ -クリスタリンの N 末端アミノ酸はニホンアマガエルの  $\zeta$ -クリスタリンと同様にブロックされている。因みに、ウシガエルの  $\rho$ -クリスタリンの N 末端配列は、 $H_2N$ -

$\rho$ -クリスタリンはアカガエル上科 (Ranoidea) の種特異的クリスタリン,そして, $\zeta$ -クリスタリンはアマガエル科 (Hylidae) の種特異的クリスタリンである。

TLTKETR...であるが, シュレーゲルアオガエルの  $\rho$ -クリスタリンの N末端配列は,  $H_2N$ -TLTKDTR...となり, EとDの変異が観察されている (詳細データ省略)。

### 考察

ヌマガエル科のヌマガエル, アカガエル科のトノサマガエル, ナゴヤダルマガエル, ウシガエル, ヤマアカガエル, ニホンアカガエル, タゴガエルとツチガエル, およびアオガエル科のモリアオガエルと今回データを割愛したがシュレーゲルアオガエルにも  $\rho$ -クリスタリンの発現を確認している。このことから,  $\rho$ -クリスタリンは, ヌマガエル科, アカガエル科およびアオガエル科を含むアカガエル上科に共通の種特異的クリスタリンと考えられる。一方, ツノガエル科, ヒキガエル科, ヤドクガエル科およびアマガエル科を含むアマガエル上科のカエル類には発現していないことが確認された。従って,  $\rho$ -クリスタリンは, カエル亜目からアカガエル上科のカエルが進化して分岐したときに種特異的クリスタリンとして採用されたと思われる。ただし, まだヒメマガエル科での分析が行われていないので, 今後の課題としたい (図7)。

アマガエル科のニホンアマガエルとアカメアマガエルに  $\zeta$ -クリスタリンの発現を確認した。しかし, 他のアマガエル上科のツノガエル科, ヒキガエル科とヤドクガエル科の3科, およびアカガエル上科のヌマガエル科, アカガエル科とアオガエル科の3科には発現していないことが確認できた。これより,  $\zeta$ -クリスタリンはアマガエル科に特有な種特異的クリスタリンであると思われる。従って,  $\zeta$ -クリスタリンは, アマガエル上科からアマガエル科のカエルが進化したときに種特異的クリスタリンとして採用されたものと考えられる (図7)。

さて, ヒキガエル科のテキサスヒキガエル, アズマヒキガエルおよびナガレヒキガエルには,  $\rho$ -クリスタリンも  $\zeta$ -クリスタリンも共に発現していなかった。ところが, 田中幸枝氏の 2014 ~ 2017 年度の報告<sup>(7)</sup>によると, 水晶体 mRNA 分析を行った結果のなかに, 「サンプルはアカガエル科では 21 個体 (産地別トノサマガエル 13 個体, ナゴヤダルマガエル 3 個体, トウキョウダルマガエル 1 個体, ツチガエル 1 個体, ニホ

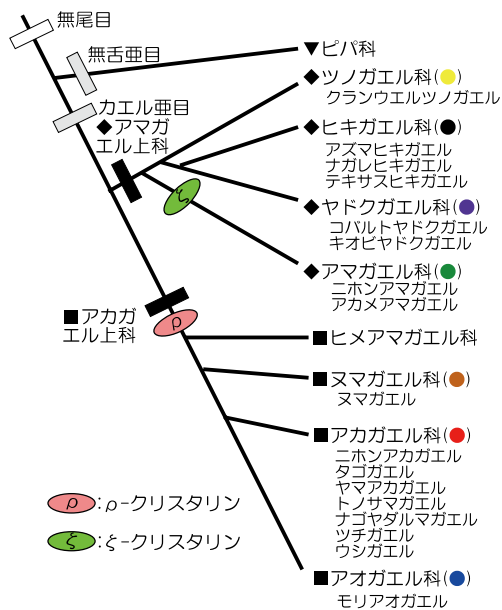


図7 種特異的クリスタリンの  $\rho$ -クリスタリンと  $\zeta$ -クリスタリンによるカエル類系統進化の概要

ンアカガエル 1 個体, ナガレタゴガエル 1 個体, タゴガエル 1 個体), アオガエル科では 3 個体 (モリアオガエル 1 個体, カジカガエル 1 個体, シュレーゲルアオガエル 1 個体), ヒキガエル科では 2 個体 (アズマヒキガエル 1 個体, ナガレヒキガエル 1 個体), アマガエル科では 1 個体 (アマガエル 1 個体) の合計 27 個体について解析した。その結果, アカガエル科 17 個体, ヒキガエル科 1 個体で発現している  $\rho$ クリスタリンのアミノ酸配列が完全に一致した (A 群)。またアカガエル科 1 個体とヒキガエル科 1 個体が一致し (B 群), A 群とは 15 アミノ酸の違いがあった。更にアカガエル科 1 個体とアオガエル科 1 個体が一致し (C 群), A 群とは 20 アミノ酸の違い, B 群とは 23 アミノ酸の違いがあった。A 群, B 群, C 群の蛋白の分子量と等電点は, それぞれ, 36,880, 7.60, 36,962, 7.61, 37,133, 7.61 であった。」とある。ヒキガエル科に限って要約すると「水晶体 mRNA の分析から分子量 36,880Da の  $\rho$ -クリスタリン (A 群) と分子量 36,962Da の  $\rho$ -クリスタリン (B 群) が, アズマヒキガエルとナガレヒキガエルのそれぞれどちらかか, あるいはどちらか一方から検出された。」となる。しかしながら, 今回のタンパク質化学的および免疫化学的な研究から, ヒキガエル科での  $\rho$ -クリスタリタン



パク質としての存在を確認することはできなかった。  
今後は、この相違点について、さらに検証していきたい。

#### 謝辞

チョウザメを提供していただいた株式会社フジキン、およびカエル個体を提供していただいた名古屋市東山動植物園にそれぞれ感謝いたします。

#### 参考文献

- (1) Wistow G. and Piatigorsky J. (1987) *Science* 236, 1554-1556
- (2) Wistow G. J. and Piatigorsky J. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57, 479-504
- (3) Tomarev S. I., Zinovieva R. D., Dolgilevich S. M., Luchin S. V., Krayev A. S., Skryabin K. G. and Gause G. G. Jr (1984) *FEBS Lett.* 171, 297-302
- (4) Fujii Y., Watanabe K., Hayashi H., Urade Y., Kuramitsu S., Kagamiyama H., Hayaishi O. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 9914-9923
- (5) Fujii Y., Kimoto H., Ishikawa K., Watanabe K., Yokota Y., Nakai N., Taketo A. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 28134-28139
- (6) Matsui M. and Maeda N. (2018) *Encyclopaedia of Japanese Frogs*, Bun-Ichi Sogo Shuppan Co. LTD (松井正文, 前田憲男 (2018) 日本産カエル大鑑, 文一総合出版)
- (7) 田中幸枝 (2014-2017) 基盤研究 (C) 一般, 課題番号 26505002, 研究成果報告書