

〈原著〉

ヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) フィブリノゲンB β 鎖遺伝子の同定

及川 雄二^{1,2)}、川口 克彦¹⁾、丹羽 和紀¹⁾

Isolation of the full-length cDNA of the fibrinogen B β chain in hagfish, *Eptatretus burgeri*

Yuji Oikawa^{1,2)}, Katsuhiko Kawaguchi¹⁾ and Kazuki Niwa¹⁾

Summary To identify of the nucleotide sequence of the fibrinogen (Fbg) B β chain of hagfish, we synthesized cDNA from mRNA in the liver of hagfish. We found that the full-length cDNA of the Fbg B β chain spanned 2816 bases including a poly(A) tail and encoded 480 amino acids. The same key residues of the polymerization site in human Fbg corresponded to those in hagfish Fbg. Therefore, the same kind of polymerization reaction is suggested in both hagfish and human Fbg.

Key words: Fibrinogen B β chain, Hagfish, Nucleotide sequence

I. はじめに

フィブリノゲン (Fbg) は血液凝固反応系の最終段階 (ゲル化) に直接関わる凝固因子であり、最も原始的な脊椎動物である円口類のヤツメウナギから存在することが報告されている¹⁾。また、ヤツメウナギFbgの構造はヒトFbgと同様にA α 、B β 、 γ の3種類のポリペプチド鎖が存在し、これらのポリペプチドがジスルフィド結合 (S-S結合) し、アミノ基末側をE領域、またカルボキシル基末側をD領域と呼ぶ球状構造を形成していることが明らかとなった²⁻⁶⁾。

しかし、円口類に分類される動物種はヤツメウナギ以外にヌタウナギ⁷⁾が存在し、これら2種の動物の系統的関係は現在でも論議されている。したがって、Fbgの進化上の起源を解明するためには、ヤツメウナギとヌタウナギのFbgの構造を比較することは極めて重要である。したがって、我々は、以前よりヌタウナギ (hagfish, *Eptatretus burgeri*) のFbg遺伝子の解析を行い、ヌタウナギFbg γ 鎖遺伝子の部分的な塩基配列を、既に報告した⁸⁾。今回、我々はFbn重合に重要なアミノ酸配列を含むFbg B β 鎖をコードする遺伝子配列を同定し、円口類のFbg

¹⁾東邦大学理学部生物学科血液生物学
〒274-8510 千葉県船橋市三山2-2-1

²⁾東邦大学医療センター大橋病院臨床検査部
受領日 平成22年7月 9日
受理日 平成22年7月19日

¹⁾Department of Biology, Faculty of Science Toho University,

Miyama 2-2-1, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

²⁾Department of Laboratory Medicine, Toho University
Ohashi Medical Center

とヒトFbgとの相違について、Fbgの機能との関係をふまえて考察する。

II. 方法

1. cDNAの合成

東京大学三崎臨海実験所から供与された3体のヌタウナギ (*Eptatretus burgeri*) から肝臓を抽出した。これらの肝臓からRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、RNAを精製した。精製したRNAを鋳型として、Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて逆転写反応⁹⁾を行い、cDNAを合成した。

2. PCR

1) ヌタウナギフィブリノゲンB β 鎖インナー領域

ヒト¹⁰⁾、ニワトリ¹¹⁾、ヤツメウナギ³⁾で同定されているFbg B β 鎖の塩基配列を比較して相同性の高い領域を選択し、プライマー[Forward primer (inner primer forward: CCAGGYGARTAYTGGC-TRGG) とReverse primer (inner primer reverse: CCAKGASCCCTTCCARTTCATC)]を合成し、PCRに使用した。PCRはSaikiらの方法¹²⁾に準じて行った。すなわち、1.5 mM MgSO₄の存在下で、0.1 μ gのcDNAに0.02 U/ml Taq DNA polymerase、0.2 mM dNTPsと0.3 μ MプライマーでPCRを行った。反応条件は、96℃ 20秒、54℃ 30秒、72℃ 90秒のサイクルを35サイクル行った。その後、PCR産物は1.5%アガロース電気泳

動を行い、エチジウムブロマイド (EtBr) で可視化した。

2) ヌタウナギフィブリノゲンB β 鎖のRACE法

① 3'-RACE法

Frohmanらの方法¹³⁾に準じて、ヌタウナギ肝臓より抽出したRNAを鋳型として、5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche) を用いて、アダプター配列 (GACCACGCGTATCGATGTCGAC) が付加されたcDNAを合成した。そしてAnchor Primer (GACCACGCGTATCGATGTCGAC) と、インナー領域の塩基配列結果をもとに合成した遺伝子特異的な3'RACE Primer 1 (GTACAAC-CGCTGTCACTCTG) を用いてPCRを行った。さらに必要に応じて、PCR産物を鋳型として、Anchor Primerと複数の3'RACE Primerによるnested PCRを行った。反応条件は、いずれも96℃ 20秒、58℃ 30秒、72℃ 90秒のサイクルを35サイクルで行った。その後、PCR産物は1.5%アガロース電気泳動を行い、EtBrで可視化した。

② 5'-RACE法

3'-RACE法と同様に、ヌタウナギ肝臓より抽出したRNAを鋳型として、5'-RACE法のcDNAを5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche) を用いて合成した。すなわち、インナー領域の塩基配列結果をもとに合成したプライマーと5'RACE Primer 1 (GTACAACCGCTGTCACTCTG) を用いて逆転写反応を行いcDNA合成した。その後、High Pure PCR Product Purification Kitを用いて

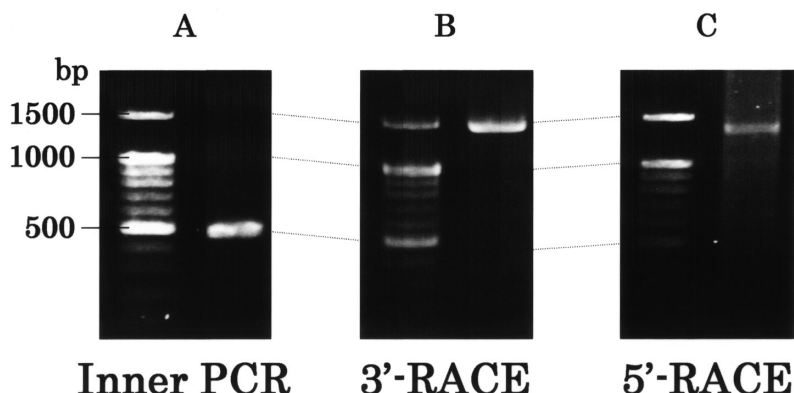


Fig. 1 Products of PCR or 3- / 5-rapid amplification of cDNA end.

cDNAの純度を高めた。この未知配列を含むcDNAの3'末端にアンカー配列を付加し、アダプター配列の付いたオリゴ (dT) プライマーと、遺伝子特異的な5'RACE Primer 2 (CAGAGT-GACAGCGGTTGTAC) を用いてnested PCRを行った。さらに、このPCR産物を鋳型としてAnchor Primer (3'RACE法同様の配列: GACCACGCGTATCGATGTCGAC) と複数の5'RACE Primerによるnested PCRを行った。反応条件は、いずれも96℃ 20秒、58℃ 30秒、72℃ 90秒のサイクルを35サイクルで行った。その後、PCR産物は1.5% アガロース電気泳動を行い、EtBrで可視化した。

3. 塩基配列分析

PCR産物を回収した後、direct sequence法¹⁴⁾を用いて、sequence 反応を行い、Genetic Analysis system CEQ8000 (Beckman Coulter) を用いて、塩基配列を同定した。

Ⅲ. 結果

1. cDNAの合成

3 個体のヌタウナギの肝臓 (約30 mg) から、約20~30 μ g のcDNAを合成した。

2. PCR

インナー領域のプライマーを用いたPCRから、約500bpのPCR産物をえることに成功した (Fig. 1-A)。また、3'-RACE法では、約1400bpのPCR産物が確認でき (Fig. 1-B)、5'-RACE法では、約1300bpのPCR産物 (Fig. 1-C) をえることに成功した。

3. 塩基配列分析

インナー領域の塩基配列 (221塩基)、と3'領域の塩基配列 (1495塩基数) を同定した。さらに、5'-RACE法の解析で、開始コドンまでの塩基配列を同定し、これらの結果を組み合わせた配列をFig. 2に示した。なお、3 個体のヌタウナ

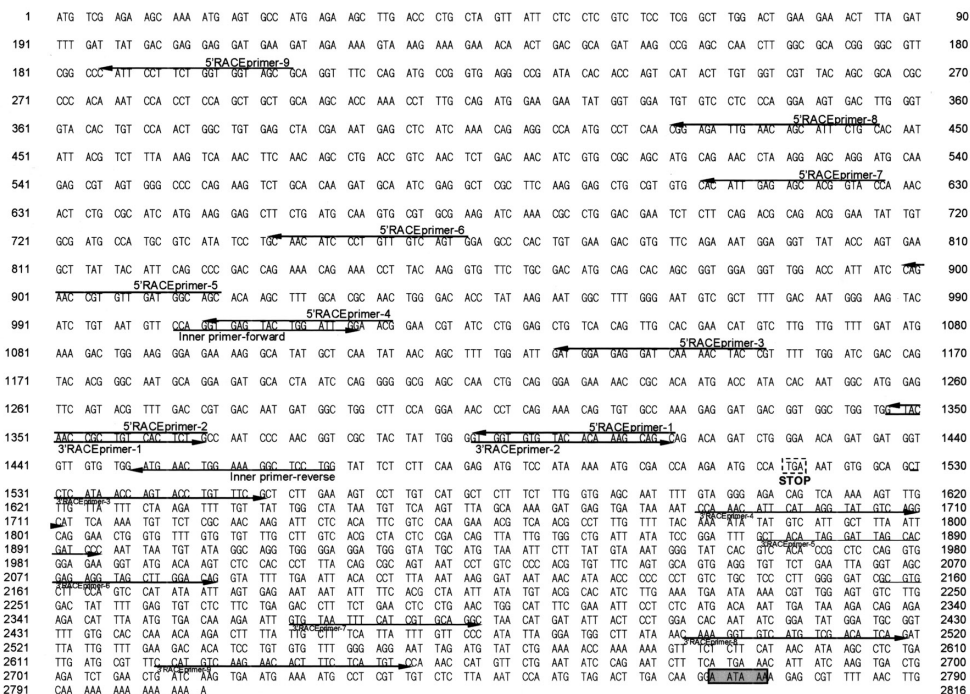


Fig. 2 Nucleotide sequence of the fibrinogen Bb chain of hagfish. The PCR primer sites are indicated by arrows. The stop codon is denoted by a dash box, the polyadenylation signal sequence AATAAA is indicated by a gray background, and the poly(A) addition site is shown as a double underline.

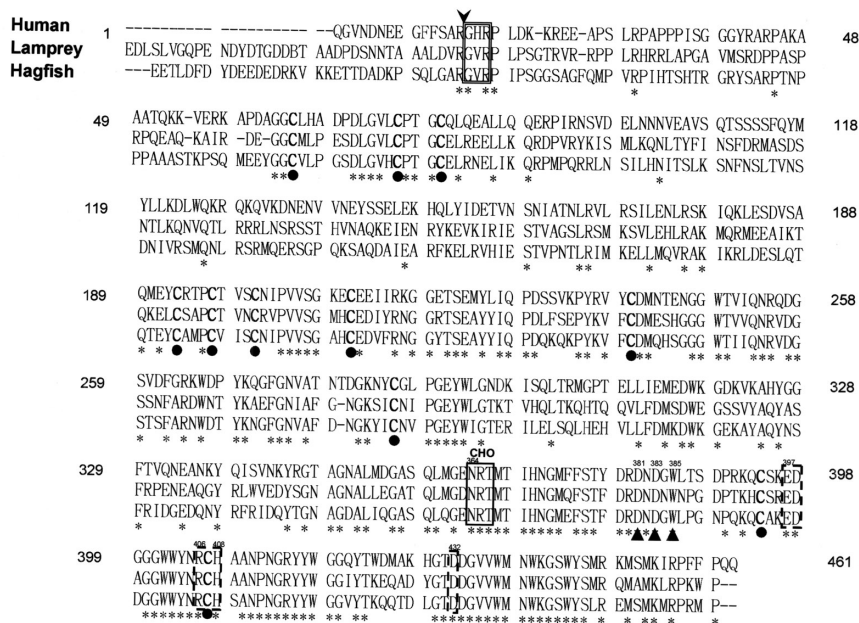


Fig. 3 Comparison of the fibrinogen Bb chain amino acid sequences of several species. Identical amino acid residues are indicated as an asterisk (*). Conserved cysteine residues are in bold. The arrow denotes the thrombin attack point, and the double box indicates fibrin polymerization site 'B'. The glycosylation point is indicated by a single box, the fibrin polymerization site 'b' is shown by a dash box and Ca²⁺ binding sites are denoted by closed triangles.

ギの肝臓より合成したcDNAは、いずれも同一の塩基配列であった。

IV. 考 察

今回の検討で、スタウナギ肝臓より、開始コドンからpoly(A) tailを含む2816塩基の遺伝子を同定した。また、真核動物にはpoly(A) tailの数10塩基上流にpoly(A)付加シグナル配列であるAT-rich配列 (AATAAA, ATTTAT, TAATAA, ATTAATAAやTTAAAT) が存在することが知られている^{15, 16)}。したがって、今回、同定したスタウナギ遺伝子のpoly(A) tailより24塩基上流の2769位から2774位のAATAAA配列はpoly(A)付加シグナル配列と思われる。このことから今回の検討で完全長のスタウナギFbg Bβ鎖遺伝子の同定に成功したことが強く示唆された。

スタウナギFbg Bβ鎖の翻訳領域の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、ヒトおよびヤツメウナギのFbg Bβ鎖のアミノ酸配列と比較した結

果をFig. 3に示した。スタウナギFbg Bβ鎖のアミノ酸数は480個で、ヒトまたはヤツメウナギFbg Bβ鎖を構成するアミノ酸数は各々461個と479個であり、スタウナギFbg Bβ鎖はいずれの動物種のFbg Bβ鎖と著しい違いは認められなかった。また、3種の動物種のFbg Bβ鎖の相同性を比較すると、ヒトとヤツメウナギでは46.1%、ヒトとスタウナギでは43.5%、スタウナギとヤツメウナギでは53.3%の相同性が認められた。また、Fbg構造の高次構造を担うシステインの位置 (●) は、スタウナギFbgも種々の脊椎動物同様に保存されていることが明らかとなった。

さらに、ヒトFbg Bβ鎖のカルボキシル基末領域に存在するゲル化に関わるFbn重合基'b' siteは、他分子のFbgまたはFbnと直接結合する6個のアミノ酸 (β Glu397, β Asp398, β Arg406, β Cys407, β His408, β Asp432, β Met438) と、緊密なFbn塊形成に重要なカルシウム結合部位の3種のアミノ酸 (β Asp381, β Asp383, β

Trp385) (▲) が知られている¹⁷⁻²³⁾。これら 9 種のアミノ酸ついて、ヒト、ヤツメウナギおよびヌタウナギの各々の Fbg B β 鎖カルボキシル基末領域のアミノ酸配列を比較したところ、これら 9 種の全てのアミノ酸が、3 種の動物種でいずれも保存されていた。また、ヒト Fbg で認められる糖鎖結合の共通配列は同じアミノ酸部位に存在することも明らかとなった。

したがって、今回、ヌタウナギより同定された遺伝子は、Fbg B β 鎖をコードする遺伝子であることが強く示唆された。さらに、Fbg の構造の安定化にかかわるシステインや機能部位に関わる 9 種のアミノ酸が保存されていることから、高等動物で認められるフィブリン重合反応は、進化の過程でヌタウナギの段階にも維持されていることが考えられる。

参考文献

- 1) Doolittle RF and Surgenor DM: Blood coagulation in fish. *Am J Physiol*, 203: 964-970, 1962.
- 2) Wang YZ, Patterson J, Gray JE et al.: Complete sequence of the lamprey fibrinogen α chain. *Biochemistry*, 28: 9801-9806, 1989.
- 3) Bohonus VL, Doolittle RF, Pontes M et al.: Complementary DNA sequence of lamprey fibrinogen β chain. *Biochemistry*, 25: 6512-6516, 1986.
- 4) Strong DD, Moore M, Cottrell BA et al.: Lamprey fibrinogen γ chain: cloning, cDNA sequencing, and general characterization. *Biochemistry*, 24: 92-101, 1985.
- 5) Pan Y and Doolittle RF: cDNA sequence of a second fibrinogen alpha chain in lamprey: an archetypal version alignable with full-length β and γ chains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 2066-2070, 1992.
- 6) Hall CE and Slayter HS: The fibrinogen molecule: its size, shape and mode of polymerization. *J Biochem Cytol*, 5: 11, 1959.
- 7) 岡田 要: 新日本動物図鑑[下]. 第 7 版, 138-141, 北隆館, 東京, 1981.
- 8) Niwa K: The maintenance of amino acids participating in fibrin polymerization in carboxyl terminal portions of the fibrinogen g chain of hagfish, *Eptatretus burgeri*. *J Anal Bio-Sci*, 29: 267-271, 2006.
- 9) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 10) Chung DW, Que BG, Rixon MW, Mace M Jr, and Davie EW: Characterization of complementary deoxyribonucleic acid and genomic deoxyribonucleic acid for the beta chain of human fibrinogen. *Biochemistry*, 22: 3244-3250, 1983.
- 11) Weissbach L, Oddoux C, Procyk R and Grieninger G: The β chain of chicken fibrinogen contains an atypical thrombin cleavage site. *Biochemistry*, 30: 3290-3294, 1991.
- 12) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988.
- 13) Frohman MA, Dush MK, and Martin GR: Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single genespecific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 8998-9002, 1988.
- 14) Gyllenstein UB and Erlich HA: Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 7652-7656, 1988.
- 15) Brown TA: Genomes, 195-230, The bathpress Ltd, UK, 1999.
- 16) Kang CJ, Lee MG, Cho YS et al.: Characterization of geranium (*Pelargonium graveolens*) Chloroplast EF-Tu cDNA. *Mol Cells*, 10: 579-583, 2000.
- 17) Cottrell BA and Doolittle RF: Amino acid sequences of lamprey fibrinopeptides A and B and characterization of the junction split by lamprey and mammalian thrombins. *Biochim Biophys Acta*, 453: 426-438, 1976.
- 18) Everse SJ, Spraggon G, Veerapandian L, and Doolittle RF: Conformational changes in fragments D and double-D from human fibrin(ogen) upon binding the peptide ligand Gly-His-Arg-Pro-amide. *Biochemistry*, 38: 2941-2946, 1999.
- 19) Yang Z, Spraggon G, Pandi L, Everse SJ, Riley M and Doolittle RF: Crystal structure of fragment D from lamprey fibrinogen complexed with the peptide Gly-His-Arg-Pro-amide. *Biochemistry*, 41: 10218-10224, 2002.
- 20) Doolittle RF, Chen A and Pandi L: Differences in binding specificity for the homologous gamma- and beta-chain "holes" on fibrinogen: exclusive binding of Ala-His-Arg-Pro-amide by the beta-chain hole. *Biochemistry*, 45: 13962-13969, 2006.
- 21) Doolittle RF, Pandi L: Probing the beta-chain hole of fibrinogen with synthetic peptides that differ at their amino termini. *Biochemistry*, 46: 10033-10038, 2007.
- 22) Kostelansky MS, Betts L, Gorkun OV and Lord ST: 2.8 Å crystal structures of recombinant fibrinogen fragment D with and without two peptide ligands: GHRP binding to the "b" site disrupts its nearby calcium-binding site.

- Biochemistry, 41: 12124-12132, 2002.
- 23) Everse SJ, Spraggon G, Veerapandian L, Riley M and Doolittle RF: Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. Biochemistry, 37: 8637-8642, 1998.