

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05149

研究課題名(和文) 基質小胞モデルを用いた生体鉱物の結晶化過程の時空間解析

研究課題名(英文) Analysis of the crystallization process of biominerals using a substrate vesicle model

研究代表者

越山 友美 (Koshiyama, Tomomi)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：30467279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：バイオミネラリゼーションにより作り出されるカルシウム塩などの生体鉱物の組成、結晶系、結晶サイズや形態は、化学的・物理的性質や強度を決定する重要なファクターである。多くの生体鉱物の結晶化は、細胞から分泌される生体膜で囲まれた基質小胞で進行し、基質小胞には核形成・結晶成長に寄与する複数の蛋白質が存在することが知られているものの、小胞における結晶化においては未解明の部分が多い。そこで本研究では、人工膜であるリポソーム、および天然の脂質膜である赤血球膜を基質小胞モデルとして、ペプチドフラグメント導入による基質小胞モデルの作製、および、イオン濃度やpHなどの結晶化条件のスクリーニングに取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの生体鉱物の結晶化は、細胞から分泌される生体膜で囲まれた基質小胞内で進行する。つまり、基質小胞のような構成イオンの取り込みと結晶化に関する蛋白質の固定化が可能な環境を人工的に再現し、種々の分光分析による結晶化過程の経時変化追跡が可能な測定・解析系を確立できれば、小胞内における生体鉱物の結晶化過程の時間的・空間的な制御メカニズムの解明に繋がる知見が得られる。また、メカニズム解明のみならず、カルシウム塩、シリカや磁性酸化鉄などの様々な有用な生体鉱物材料の作製法の開発にも繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：The composition, crystal system, crystal size and morphology of biominerals produced by biomineralization are important factors that determine their chemical and physical properties and strength. Crystallization of many biominerals proceeds in vesicles surrounded by a lipid membrane. Although it is known that there are several proteins in the vesicles that contribute to nucleation and crystal growth, crystallization in vesicles remains unexplored. In this study, we attempted to create a vesicle model using artificial liposomes and natural lipid membranes of red blood cells, and to screen crystallization conditions such as ion concentration and pH.

研究分野：無機・錯体化学関連

キーワード：基質小胞 生体鉱物 結晶化 モデル リン酸カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

バイオミネラリゼーションにより作り出されるカルシウム塩、シリカや磁性酸化鉄などの生体鉱物の組成、結晶系、結晶サイズや形態は、骨や貝殻などの構造体の化学的・物理的性質や強度を決定する重要なファクターであり、生物学や生体材料工学の分野において生体鉱物の形成機構に関する研究が進められている。多くの生体鉱物の結晶化は、細胞から分泌される生体膜で囲まれた「基質小胞」で進行し、基質小胞には核形成・結晶成長に寄与する複数の蛋白質が存在することが知られている。例えば、骨のヒドロキシアパタイトでは、(i) 骨芽細胞から分泌された直径 50 ~ 200 nm の基質小胞内への膜輸送体を介した無機リン酸とカルシウムイオンの取り込み・濃縮、(ii) アモルファス相などの前駆体を經由した結晶成長により均一な HAp ナノ結晶が形成されると推定されている(図 1)。しかしながら、基質小胞における核形成・結晶成長の具体的な分子機構は未だ明らかとなっていない。その理由としては、結晶化開始前の基質小胞を生体から大量に単離精製できず、*in vitro* での詳細な結晶化過程の解析が行われていないからである。一方で、一般的な *in vitro* での生体鉱物の結晶化解析の取り組みとしては、核形成・結晶成長に関与している蛋白質のアミノ酸配列の一部を抽出したペプチドフラグメントの結晶化に与える影響が調べられており、簡易的に水溶液中でペプチドと構成イオンを混和する系や、ペプチドを修飾した高分子などの有機マトリックスと構成イオンを反応させる系などが多数報告されている。つまり、基質小胞のような「構成イオンの取り込み」と「結晶化に関与する蛋白質の固定化」が可能な環境を人工的に再現し、種々の分光分析による結晶化過程の経時変化追跡が可能な測定・解析系を確立できれば、基質小胞内における生体鉱物の結晶化過程の制御メカニズムの解明に繋がる知見が得られると考えらえる。

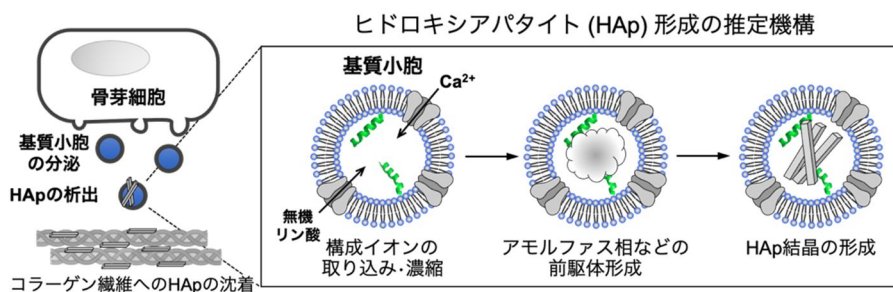


図 1 骨のヒドロキシアパタイト形成の推定機構

## 2. 研究の目的

本研究では、人工の球状脂質二分子膜であるリポソーム、および天然の脂質膜である赤血球から水溶性内容物を除去した赤血球膜を基質小胞モデルとして、天然の基質小胞内における生体鉱物の結晶化メカニズムの解明を目指した。まずは、骨のヒドロキシアパタイト (HAp,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) の結晶化過程に着目した。HAp はリン酸カルシウム的一种であり、基質小胞ではアモルファス相やリン酸八カルシウム ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_8 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , OCP) などの前駆体を經由して相転移により HAp 結晶が形成すると考えられている。(1) リポソーム、および赤血球膜へのペプチドフラグメント導入による基質小胞モデルの作製、および (2) イオン濃度、pH や反応温度などの結晶化条件の系統的なスクリーニングに取り組んだ。

## 3. 研究の方法

- (1) リポソーム、および赤血球膜へのペプチドフラグメント導入による基質小胞モデルの作製  
リン酸カルシウムの結晶化に関与するペプチドフラグメントは固相合成した。赤血球膜は、すでに報告されている遠心精製により作製した。赤血球膜の内部表面には蛋白質から成る網目状細胞骨格が存在するため、アミノ酸残基の化学修飾によりペプチドの固定化を試みた。リポソームは単純水合法により作製した。
- (2) イオン濃度、pH や反応温度などの結晶化条件の系統的なスクリーニング  
HAp の結晶化において、イオン濃度、pH や反応温度は重要なファクターであるため、これらを系統的に変化させた条件下で結晶化を行い、光学顕微鏡観察と TR FT-IR 測定により結晶化過

程を追跡した。

#### 4. 研究成果

##### (1) リポソーム、および赤血球膜へのペプチドフラグメント導入による基質小胞モデルの作製

リン酸カルシウム生成に関与することが知られているタンパク質であるオルテオポンチンやスタテリンのアミノ酸配列の一部を抽出したペプチドフラグメントの固相合成に取り組んだ。酸性アミノ酸を多く含む配列であり、固相合成で反応が進みにくい残基がいくつかあり、反応条件の最適化を行った。粗精製のペプチドが得られており、現在も単離精製を進めている。加えて、赤血球膜の網状細胞骨格へのペプチドフラグメントの修飾確認のため、蛍光分子であるフルオレセインを修飾したペプチドも固相合成した。単離精製したフルオレセイン修飾ペプチドと赤血球膜を 4°C で一晩反応させ、遠心精製した。蛍光顕微鏡観察により赤血球膜からのフルオレセイン由来の蛍光が観察され、本手法により赤血球膜へのペプチド修飾が可能であることが確認できた。

##### (2) イオン濃度、pH や反応温度などの結晶化条件の系統的なスクリーニング

リポソーム、および、赤血球膜を基質小胞モデルとしたリン酸カルシウムの形成に関する基礎的な知見を得るため、リポソーム、および、赤血球膜の存在下、非存在下でのリン酸カルシウムの生成過程を、光学顕微鏡観察と ATR FT-IR 測定により追跡した。反応温度、反応時間、Ca<sup>2+</sup>イオン/リン酸イオン比、イオン濃度、および pH のパラメーターを変化させて反応させた。赤血球膜の実験では、反応温度 27°C、反応時間 30 分、1 時間、20 時間、Ca<sup>2+</sup>イオン/リン酸イオンの濃度 1.5 ~ 2.5 mM、pH 7.0 および 8.0 で、赤血球膜の存在下、非存在下で反応を行った（図 2）。リン酸カルシウムの生成において pH の影響が大きく、pH 8.0 ではリン酸カルシウムが生成したものの、pH 7.0 では生成しなかった。pH 8.0 において、反応時間とイオン濃度の違いを見てみると、Ca<sup>2+</sup>イオン/リン酸イオンの濃度 1.5 mM では、30 分、1 時間ではリン酸カルシウムの生成は確認されず、20 時間で ATR FT-IR スペクトルにおいてリン酸カルシウム由来のピークが確認された。一方、Ca<sup>2+</sup>イオン/リン酸イオンの濃度 2.0 mM と 2.5 mM では、30 分で ATR FT-IR スペクトルにおいてリン酸カルシウム由来のピークが確認されたものの、赤血球膜同士の凝集が見られた。これは、赤血球の外部表面でリン酸カルシウムが生成し、凝集が引き起こされたと考えられる。

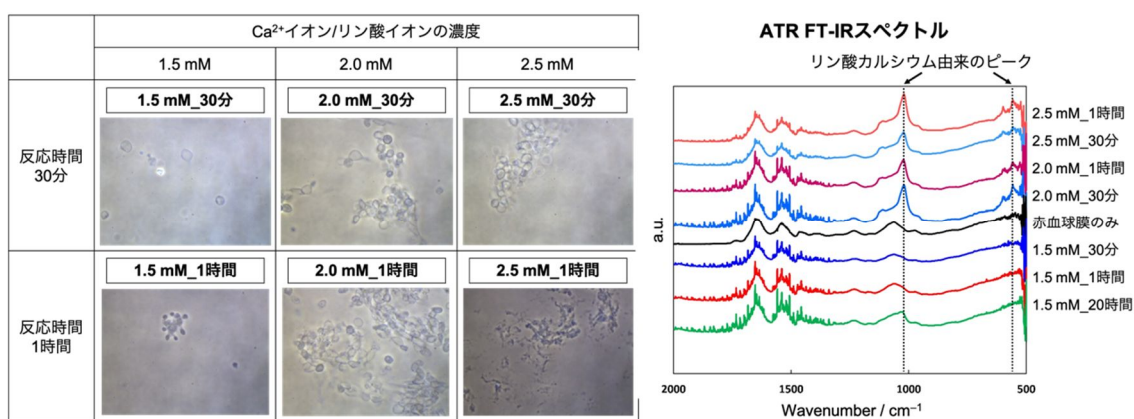


図 2 赤血球膜の存在下でのリン酸カルシウムの形成

これらの結果をもとに、今後は合成したペプチドフラグメントをリポソーム、および赤血球膜に融合し、リン酸カルシウムの結晶過程におけるペプチドフラグメントの影響を明らかとする。また、光学顕微鏡観察と ATR FT-IR スペクトル測定に加えて、ラマンスペクトル測定、粉末 X 線回折測定と TEM 測定を進め、より詳細な生体鉱物の核形成・結晶成長過程の解明に取り組む。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥市健太郎、今村比呂志、加藤稔、越山友美
2. 発表標題 ゴースト赤血球の内部空間におけるリン酸カルシウムの結晶成長
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本歩乃香、今村比呂志、加藤稔、越山友美
2. 発表標題 ゴースト赤血球の内部空間を利用した金属ナノ粒子の合成
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田迪子、越山友美、大場正昭
2. 発表標題 リボソーム内部空間および表面を利用したリン酸カルシウム類の形成制御
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田迪子、越山友美、大場正昭
2. 発表標題 リボソーム内部空間におけるリン酸カルシウム形成の検討
3. 学会等名 錯体化学会第68回討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田迪子、井上雄希、越山友美、大場正昭
2. 発表標題 リボソーム内水相におけるリン酸カルシウム類の選択的形成の検討
3. 学会等名 第55回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関