

## 自己評価報告書

平成23年 3月31日現在

機関番号：11301  
 研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間： 2008 ~ 2011  
 課題番号： 20350073  
 研究課題名 (和文) マベ真珠アラゴナイトナノ結晶配向制御機構の解明とフォトニック機能材料創製への応用  
 研究課題名 (英文) Molecular Mechanism of Bio-mineralization of Orientated Aragonite Crystals in Mabe Pearl and Its Development to The Novel Photonic Nano-materials  
 研究代表者  
 小川 智久 (OGAWA TOMOHI SA)  
 東北大学・大学院生命科学研究科・准教授  
 研究者番号 80240901

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：バイオミネラリゼーション, 自己組織化, レクチン, X線構造解析, 結晶配向性

## 1. 研究計画の概要

(1) マベガイ真珠バイオミネラリゼーションのアラゴナイト結晶の3軸配向性制御に関わるタンパク質の機能解析

(2) アラゴナイト結晶形成反応における動態、構造変化、相互作用解析

(3) マベガイ真珠バイオミネラリゼーション関連タンパク質の立体構造解析

(4) マベガイ真珠バイオミネラリゼーション関連タンパク質のリコンビナント発現

(5) 真珠アラゴナイト結晶3軸配向性分子メカニズムのタンパク工学による制御

## 2. 研究の進捗状況

(1) アラゴナイト結晶配向性に相関を示した2種の26 kDaADP リボシルトランスフェラーゼ様タンパク質 HSC-2 と HSC-3 がアルギニン特異的 ADP リボシルトランスフェラーゼ活性をもつことを明らかにした。

(2) 26 kDaADP リボシルトランスフェラーゼ様タンパク質 HSC-2 と HSC-3 (3アミノ酸残基のみ異なる) は、HSC-2 が核形成に働くのに対して HSC-3 は結晶の形態制御に働き、異なるバイオミネラリゼーション機能をもつことを示した。また、両者が存在する場合に、アラゴナイトが優先的に形成されることも判明した。

さらに、外套膜分泌液中に主要成分として含まれる4種のジャカリン関連レクチンタンパク質 PPL2A, PPL2B, PPL3 および PPL4 を単離し、マベガイ幼生段階におけるノックダウン実験での機能解析の結果、PPL2A, PPL2B および PPL4 が貝殻形成に関与すること、また真珠層アラゴナイトタンに PPL2A

αサブユニットのみがマトリックス成分として含まれることを明らかにした。

(3) マベガイレクチン PPL-1 と相同性を持ち、魚類卵ラムノース特異性レクチンファミリーに属する CSL3 の立体構造を X 線構造解析によりはじめて解明。糖鎖結合部位2箇所をもつサブユニット2量体により、擬似的な4量体構造をとることを示した。

(4) マベガイ外套膜分泌液から単離したレクチン PPL-1, PPL-2, PPL-3 および PPL-4 については、まだリコンビナント発現に成功していないが、PPL-1 と相同性を示す魚類卵レクチン (RBL) ファミリーである CSL1 の糖鎖認識ドメイン (CRD) 部分の His タグをもちいた大腸菌での大量発現に成功した。またアルギニン誘導体を用いたリフォールディング反応により、糖鎖認識能をもつ CRD ペプチドの調製に成功した。

さらにマベガイ基部にもなりうる細胞外基質タンパク質を足糸から単離精製し、一次構造を明らかにした。興味深いことに 45 kDa の組織金属プロテアーゼ様タンパク質 (MMP) とそのインヒビター TIMP 2 種 (15kDa および 30kDa) の組み合わせにより、線維構造を調節していることを明らかにした。このうち 15 kDa 組み換えタンパク質について、Con2 - 融合タンパク質発現系を用い、シャペロン (pG-Tf2) と共発現させることで、可溶画分での発現に成功した。また、アフィニティークロマトグラフィーにより1段階での精製に成功し、LB 培地 800mL から 6.4mg の融合タンパク質を得た。

## 3. 現在までの達成度

③ やや遅れている。

(理由)

項目(1)および(2)に関しては、計画以上の成果を得ることができているが、項目(3)~(5)について、リコンビナント発現系の構築の面で成功に至っていないため。

#### 4. 今後の研究の推進方策

X 線構造解析および大腸菌での発現系構築にさらに注力する。また、タンパク質の発現だけでなく、機能性部分ペプチドの合成(調製)と機能解析をすすめる。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件, 下記の他6件)

- 1) A. Konno, A. Kitagawa, M. Watanabe, T. Ogawa, T. Shirai, Tracing Protein Evolution through Ancestral Structures of Fish Galectin Structure (2011), doi:10.1016/str.2011.02.014 (査読有)
- 2) A. Konno, S. Yonemaru, A. Kitagawa, K. Muramoto, T. Shirai and T. Ogawa, Protein engineering of conger eel galectins by tracing of molecular evolution using probable ancestral mutants. *BMC Evolutionary Biology* 2010, 10:43 doi:10.1186/1471-2148-10-43. (査読有)
- 3) Y. Watanabe, M. Abolhassani, Y. Tojo, Y. Suda, K. Miyazawa, Y. Igarashi, K. Sakuma, T. Ogawa, K. Muramoto, Evaluation of silica gel-immobilized phosphorylcholine columns for size exclusion chromatography and their application in the analysis of the subunit structures of fish-egg lectins. *J. Chromatography A*, 1216 (48), 8563-8566 (2009). (査読有)
- 4) Shirai T., Watanabe Y., Lee M.-s., Ogawa T., Muramoto K., Structure of Rhamnose-binding Lectin CSL3: Unique Pseudo-tetrameric Architecture of a Pattern Recognition Protein. *J. Mol. Biol.*, 391 (2), 390-403 (2009). (査読有)
- 5) M. Seto, T. Ogawa, K. Kodama, K. Muramoto, Y. Kanayama, Y. Sakai, T. Chijiwa and M. Ohno, A novel recombinant system for functional expression of myonecrotic snake phospholipase A<sub>2</sub> in escherichia coli using a new fusion affinity tag. *Protein Exp. Purif.*, 58 (2), 194-202 (2008). (査読有)

[学会発表] (計23件, 下記の他18件)

- 1) 小川智久, 荒川香織, 堀田俊英, 永沼孝子, 村本光二, 渡辺精一, 谷内哲夫, 吉見享祐, マベガイADPリボシルトランスフェラーゼタンパク質による真珠アラゴナイト形成機構の解析(Molecular mechanism of aragonite crystal formation by ADP ribosyltransferase proteins from *Pteria penguin* pearl shell),

BMB2010 第33回日本分子生物学会年会／第83回日本生化学会大会合同大会(平成22年12月7-10日)

2) 【ポスター賞受賞】 小川智久, 荒川香織, 堀田俊英, 永沼孝子, 村本光二, 渡辺精一, 白石孝信, 尾定 誠, 谷内哲夫, 吉見享祐, タンパク質による真珠バイオミネラリゼーション制御の分子メカニズム 平成22年度化学系学協会東北大会(平成22年9月25-26日, 岩手大学工学部)

3) Tomohisa Ogawa, A novel recombinant system for efficient expression of unstable proteins using a new fusion affinity tag and high-performance cleavage enzyme 第3回タンパク質-ペプチド会議 Pepcon-2010(平成22年3月22日, 中国 北京)

4) Tomohisa Ogawa, Kaori Arakawa, Takako Naganuma, Kyosuke Yoshimi, Koji Muramoto, ADP ribosyl transferases regulate the aragonite crystal orientation and formation in the biomineralization of *Pteria penguin* pearl shell 第2回スイスー日本 生命化学シンポジウム(平成21年9月11-12日, 東京大学)

5) Tomohisa Ogawa, Takako Naganuma, Wataru Hoshino, Rie Sato, Yukihiko Shikanai, Koji Muramoto, Kyosuke Yoshimi, and Makoto Osada JACALIN-LIKE MULTIPLE LECTINS RELATED TO BIOMINERALIZATION OF PTERIA PENGUIN PEARL SHELL, Interlec23 (2008 July 11-16, Universities of Edinburgh and Stirling, UK)

[図書] (計1件)

A. Konno, T. Ogawa, \*T. Shirai, ANCESTRAL PROTEIN RECONSTRUCTION AS A NEW FIELD IN PROTEIN ENGINEERING In: Ribosomal Proteins and Protein Engineering: ISBN: 978-1-60741-005-8 (Ed. Ortendhal & Salchow) 2010 Nova Science Publishers, Inc.