

平成 26 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	無脊椎動物の硬組織形成を制御する結晶成長因子の作用機構の解明	
研究者所属・氏名	研究代表者：高木 良介 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

アコヤ貝稜柱層の成長因子であるプリズミンは、分子量約 5KDa のカルシウム結合能を持つタンパク質であり、*in vitro* 結晶成長実験から、3 つの軸方向への方解石の結晶成長を強力に促進する作用を持つ。本研究は、合成ポリペプチドを用いてプリズミンの方解石結晶成長に関与するアミノ酸配列を特定し、カルシウム結合領域の機能を明らかにすることで、プリズミンの結晶成長の分子機構を解明することを目的とする。

2. 研究経過及び成果

プリズミンは 2 つのファミリーをもち (DDBJ: AB368930, AB433980)、プリズミン 1 は 27、47 番目の 2 ヶ所、プリズミン 2 は 27、44、47 番目の 3 ヶ所にリン酸化される可能性がある。また、web 上の不規則領域予測プログラム IUPred: (<http://iupred.enzim.hu/index.html>)等から、プリズミン C 末端側の 15 アミノ酸残基は不規則構造をとると予測され、この領域がカルシウム結合領域であり、炭酸カルシウム結晶表面と相互作用するためにフレキシブルに構造を変化させることで結晶成長を制御していると考えられる。これまでに行った合成ポリペプチドを用いた *in vitro* 結晶形成実験から、プリズミンの機能領域は C 末端側のアスパラギン酸に富む領域に存在し、この領域に含まれる 47 番目のチロシンのリン酸化修飾が結晶成長に必須であることが明らかになっている。しかし、この 47 番目のチロシン残基をリン酸化したプリズミン C 末端側領域 15 アミノ酸残基の合成ポリペプチドを用いた実験では、プリズミンで観察されるような、方解石結晶に対して 3 つの軸方向への強力な結晶成長作用が見られなかった。つまり、プリズミンの結晶成長作用は C 末端側の領域だけでなく、web 上の 2 次構造予測プログラム PSIPRED v3.0: (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psi-pred/>)を用いて予測された、プリズミン 1、プリズミン 2 それぞれの N 末端側領域のほぼ同じ位置に推測される β ストランド構造、また、他のリン酸化修飾部位や糖鎖修飾部位が結晶成長作用に関与する可能性が考えられた。そこで、本研究では、プリズミン 1 をもとにして、 β ストランド構造が推測された領域を含めた 24 アミノ酸残基の合成ポリペプチド Pri24aa(+ β) (GRFPIYREYDFDRPDPYDPPYDRFD) と、 β ストランド構造が推測された領域を他のアミノ酸で置換することで β ストランド構造をとらないようにした 24 アミノ酸残基の合成ポリペプチド Pri24aa(- β) (GRAPAEREYDFDRPDPYDPPYDRFD) を用いて、*in vitro* 結晶形成実験を行い、プリズミンの N 末端側に予測される β ストランド構造が方解石結晶成長作用に与える影響を検証した。

それぞれの合成ポリペプチドを作製し、*in vitro* 結晶形成実験に用いた。走査型電子顕微鏡で方解石結晶の表面構造を観察した結果、Pri24aa(+ β)を用いた方解石結晶の表面構造は結晶が均一な大きさ・形状で並んでいたが、Pri24aa(- β)を用いた方解石結晶の表面構造は結晶が不均一な大きさで歪な形状をしていた。また、Pri24aa(+ β)とアコヤ貝から精製したプリズミンを用いて行った *in vitro* 結晶形成実験の結果は、表面構造において結晶が均一な大きさ・形で並んでいる点で非常によく類似していた。しかし、方解石結晶全体の形状は、プリズミンを用いて得られる結晶とは異なっていた。

本研究により、プリズミンの β ストランド構造をとると予測される領域が方解石結晶の大きさと形状を制御する機能をもつことが示唆された。しかし、プリズミンのもつ 3 つの軸方向への方

解石結晶成長を強力に促進する作用は再現されなかった。つまり、プリズミンの C 末端側 15 アミノ酸残基と N 末端側の β 構造領域に加え、糖鎖修飾や他のリン酸化修飾、および全体の構造が方解石結晶成長の方向を制御している可能性が考えられる。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究において *in vitro* 結晶形成実験に用いた合成ポリペプチドのカルシウム結合能を解析する。カルシウム結合能は、 ^{45}Ca を用いたオートラジオグラフィによって検出し、カルシウムの結合によるポリペプチドの構造変化を CD spectra によって推測する。さらに、脱リン酸化酵素を用いて抽出・精製したプリズミンのリン酸化修飾を除去し、これを用いて *in vitro* における結晶形成実験を行うことで、プリズミンの結晶成長作用におけるリン酸化修飾の関与を明確にする。これらの実験で得られた結果から、プリズミンの方解石結晶成長に関与するアミノ酸配列を特定し、結晶成長の分子機構を解明する。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Zoological Science	雑誌	2016. 9 (予定)