

生体鉱物に含まれる基質タンパク質の構造と機能

遠藤 一佳¹⁾・更科 功¹⁾

1. はじめに

化石としてよく保存される骨・歯・貝殻などの硬組織(生体鉱物)は、リン酸カルシウム、炭酸カルシウムやシリカなどの鉱物相とタンパク質、多糖類、脂質などの有機物相からできている。空を飛ぶ鳥の中空になった骨、海に浮かぶ放散虫の繊細な殻、深海を泳ぐオウムガイの丈夫な貝殻など、生物のつくる鉱物は、無機的につくられる造岩鉱物とは著しく異なった合目的な形態や微細構造を示す。瀬戸物やファインセラミックスに代表される機能的な鉱物を人工的につくことはできるが、自然界の生物はそのようなセラミックス合成を常温常圧下でやってのける。このような生体鉱物と無機鉱物の際立った違いの多くは、生体鉱物に含まれる微量な有機物(有機基質)に起因すると考えられる。中でもそのタンパク質成分が生体鉱物の形成制御の鍵を握っていることは間違いない。ここでは貝殻に代表される無脊椎動物の硬組織にどのような基質タンパク質が含まれるのか、そしてどのような働きをしていると考えられるのか簡単にまとめた。

2. 無脊椎動物の硬組織中のタンパク質の構造

無脊椎動物の硬組織中のタンパク質として初めて、ムラサキウニの骨片の基質タンパク質・SM50の全アミノ酸配列がSucovらによって発表されてから、ほぼ20年が経つ(Sucov *et al.*, 1987)。この間、棘皮動物きょくひどうぶつに加えて節足動物、軟体動物、海綿動物、刺胞動物しほうどうぶつにおいても硬組織中のタンパク質の全アミノ酸配列が決定され、現在、無脊椎動物の硬組織中のタンパク質で全アミノ酸配列が決定されたものは、約80に

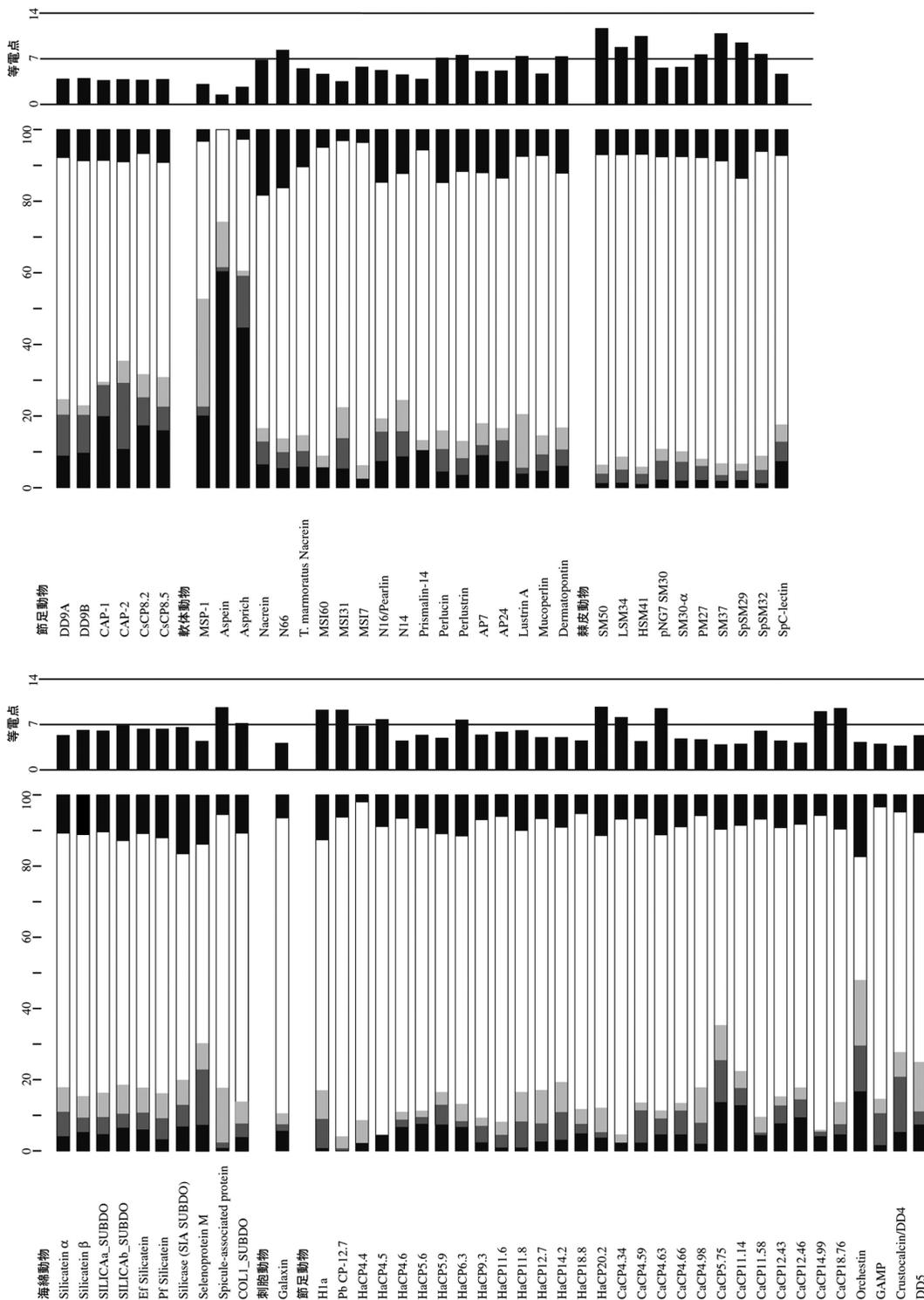
及ぶ(Sarashina and Endo, 2006)。この内、海綿動物のものはシリカ骨格から単離されたものだが、他は全て炭酸カルシウムで出来た硬組織中のタンパク質である。脊椎動物の硬組織(骨、軟骨、歯、耳石など)の形成に関わる分子の研究に比べれば、無脊椎動物の硬組織中の分子の研究が遅れている感は否めないが、それでもかなりのデータが蓄積されつつあるのは事実である。そこでここでは、現時点で全アミノ酸配列が決定されている無脊椎動物の硬組織中のタンパク質を、その構造に注目して概観する。

海綿動物は最も原始的な多細胞動物と考えられており、シリカあるいは炭酸カルシウムで出来た骨針を持っている。シリカテインはシリカで出来た骨針中のタンパク質で、海綿動物の硬組織で最初に全アミノ酸配列が決定されたタンパク質である(Shimizu *et al.*, 1998)。あるタンパク質分解酵素と相同だが、活性部位のアミノ酸が変化しているため実際にはタンパク質を分解する活性はなく、シリカの重合を触媒する酵素として働いているらしい。また、コラーゲンも同定されており、骨針形成に関与していると考えられている。

刺胞動物はサンゴ礁という非常に巨大なバイオミネラルをつくる種を含み、バイオミネラル化の研究に大変重要な分類群であるが、全アミノ酸配列が決定されている硬組織中のタンパク質は、唯一、サンゴの外骨格から同定されたガラクシンだけである(Fukuda *et al.*, 2003)。ガラクシンは約30残基のアミノ酸が10回繰り返す配列を含み、各々の繰り返し配列は決まった位置にシステイン4残基を含む。システイン同士は強固なジスルフィド結合をつくることが知られているので、ガラクシン同士がシステインを介して結合し、高分子のネットワークをつくることが予想されている。

1) 筑波大学 大学院 生命環境科学研究科

キーワード: アラゴナイト, 海綿動物, カルサイト, 基質タンパク質, 棘皮動物, 酸性タンパク質, 刺胞動物, 節足動物, 軟体動物, バイオミネラル化



第1図 無脊椎動物の硬組織中のタンパク質の氨基酸組成(%)と等電点。氨基酸組成の左側の黒:アスパラギン酸, 暗灰色:グルタミン酸, 灰色:リン酸化して酸性になっていると予想される氨基酸, 右側の黒:塩基性氨基酸。等電点は7が中性で, それより数字が小さければ酸性, 大きければ塩基性のタンパク質。

軟体動物や上述した刺胞動物では、硬組織に含まれる有機質全体のアミノ酸組成の分析(アミノ酸の配列は分からないが、含まれているアミノ酸の比率は分かる)から、酸性の(生理的な条件では負に荷電する)アミノ酸が多いことが知られていた。そのため、酸性アミノ酸を多く含んだ酸性タンパク質が負に荷電し、正に荷電したカルシウムイオンと相互作用することが、硬組織の形成に重要だと予想されていた。さらにタンパク質の中での酸性アミノ酸の配置の仕方によって結晶形の制御をしている可能性も指摘されていた。軟体動物では今日までに、硬組織中のタンパク質が20種類同定され、その中にはMSP-1、アスぺイン、アスプリッチの3種類の強酸性タンパク質が含まれる(Sarashina and Endo, 2001; Tsukamoto *et al.*, 2004; Gotliv *et al.*, 2005)。特にアスぺインは、今日までに知られている全てのタンパク質の中で最も強酸性のタンパク質である。酸性のアミノ酸はアスパラギン酸とグルタミン酸の2種類があり、これら3つのタンパク質はアスパラギン酸の方を圧倒的に多く使っているが、その理由はまだ不明である。

節足動物では比較的多くのタンパク質の構造が調べられており、全アミノ酸配列が決定された無脊椎動物の硬組織中のタンパク質の内、ほぼ半数は節足動物の甲殻類のものである。ヨコエビの中腸のカルシウム貯蔵器官から同定されたオーケスティンは、全アミノ酸の約3割が酸性アミノ酸である強酸性タンパク質である(Testenièrre *et al.*, 2002)。しかし、酸性アミノ酸の内、アスパラギン酸のみをほぼ独占的に含む軟体動物の強酸性タンパク質とは異なり、オーケスティンが含む酸性アミノ酸は、アスパラギン酸とグルタミン酸の両方を多く含んでいる。これは、甲殻類の他の強酸性タンパク質CaCP4.98、クラストカルシン、CAP-1、CAP-2、CsCP8.2、CsCP8.5についても同様で、甲殻類に共通な特徴と考えられる。また、HaCP18.8、CpCP5.75、CpCP11.14、クラストカルシン、DD5、CAP-1、CAP-2、CsCP8.2、CsCP8.5の9種類のタンパク質には、キチンと結合するリーバース・リディフォード配列を持っており、この配列は甲殻類や昆虫の上皮のタンパク質に特有であることが知られている。したがってこの9種類のタンパク質は、他の動物門と分かれた後に節足動物の中で固有に進化したクチクラタンパク質が、新たに硬組織の形成に使い回されたものと推測される。

棘皮動物のウニの骨片から同定されたSM50は、前述したように最初に全アミノ酸配列が明らかになった無脊椎動物の硬組織中のタンパク質である(もっとも、最初に出版されたSM50のアミノ酸配列は後半がまちがっており、4年後に訂正された: Katoh- Fukui *et al.*, 1991)。塩基性(生理的な条件では正に荷電する)のタンパク質で、13アミノ酸残基から成る伸縮性に富むと予想される繰り返し配列を持つ。このタンパク質の最も顕著な特徴はC型レクチンに似た配列(C-Type lectin-like domain: CTLDと略す)を持つことである。C型レクチンはカルシウムの存在下で糖に結合するタンパク質として知られているが、CTLDは必ずしも糖に結合するとは限らず、他の機能を担っているものもある。SM50のCTLDも糖結合能はないと考えられており、その機能は現在のところ不明である。しかし、棘皮動物の硬組織からは10種類のタンパク質で全アミノ酸配列が決定されているが、その全てがCTLDを持っているので、何らかの重要な機能を担っていることが予想される。一方、軟体動物でもCTLDを持つ硬組織中のタンパク質、パールシンが報告されている。しかしパールシンは糖結合能を持ちCTLDの中の別のファミリーに属するので、棘皮動物とは独立に硬組織の形成に使われるようになったと考えられる。

無脊椎動物の硬組織中のタンパク質には、分類群を越えて共通の特徴があるようである。まず、強酸性タンパク質があること。これはカルシウムイオンとの相互作用が硬組織の形成に重要なためであると考えられる。次に、繰り返し配列が多いこと。これは硬組織をつくる結晶の規則的な繰り返し構造を反映している可能性がある。多細胞動物の硬組織はほぼ動物門ごとに独立に獲得されたと考えられており、上述したリーバース・リディフォード配列やCTLDの知見も、その考えを支持するように見える。したがって、無脊椎動物の硬組織中のタンパク質に共通の特徴があるのは、進化における収斂現象と考えられる。

3. 「カルサイトーアラゴナイト問題」と強酸性基質タンパク質の機能

機能的な生体鉱物を形成するには、(1) 結晶を沈殿させる閉じた空間や構造を支える枠組みを形成し、(2) その中に材料となるイオンが過飽和になるよう

に供給し、(3) 結晶成長を開始させる核を形成し、(4) 適当なところで結晶成長をストップさせることが一般に必要であろう。また、これに加え、(5) 構造的な強度を増強するための添加物を加えたり、(6) 結晶方位や結晶成長の方向を揃えたり、(7) 結晶形を変化させたりといった微調節が生存のために欠かせない場合もあるかもしれない。このいずれのプロセスもタンパク質が主役であり、その一部または大部分が基質タンパク質として生体鉱物中に取り込まれていると考えられる。構造が決定された上述の基質タンパク質もこれらのプロセスのいずれかにかかわっていると思われるが、その機能を断定できるタンパク質は皆無に近い。基質タンパク質の構造と機能の関連については、遺伝子ノックダウンなどによる *in vivo* (生体内) での機能解析も含めた今後の研究で解明されることが期待される。ここでは一つの予察的な例として、上述 (7) の結晶形制御のメカニズムに関係した最近の研究を紹介したい。

同じ炭酸カルシウムの骨格を持つ生物でも、生物種によって結晶構造の異なる鉱物をつくる(結晶多形を示す)ことが知られる。例えば現生サンゴの骨格はすべてアラゴナイト(あられ石)であるのに対し、ココリスやウニの棘、有関節腕足類の殻などはいずれもカルサイト(方解石)からできている。また、同一個体の骨格内で結晶多形を示す例もある。アコヤガイなどの軟体動物の貝殻がその典型であり、たとえばアコヤガイの貝殻は外側の菱柱層がカルサイトから、内側の真珠層がアラゴナイトからできている。ホタテガイの貝殻はほとんどがカルサイトだが、貝柱の付着する筋肉痕の部分はアラゴナイトから成る。このように成分は同じでも結晶構造の異なる鉱物をどのように生物がつくり分けているかは、「カルサイト-アラゴナイト問題」と呼ばれ、生体鉱物学上最大の難問とされる(Lowenstam and Weiner, 1981)。

過去100年におよぶ「カルサイト-アラゴナイト問題」の研究史において、温度、 Mg^{2+} などの無機イオン、炭酸脱水酵素、有機基質などさまざまな要因がその制御機構として提唱されてきたが、1990年代に入り水溶性の基質タンパク質が中心的役割を果たしていることが *in vitro* の実験により示された(Fallini *et al.*, 1996; Belcher *et al.*, 1996)。では具体的にどのタンパク質が鍵なのか問題であるが、筆者らは、最近アコヤガイから同定された強酸性基質タンパク質アス

イン(Tsukamoto *et al.*, 2004)がその制御因子そのものではないかと考えている。その根拠として、まずアスぺインがカルサイトでできた菱柱層でのみ見られ、アラゴナイトでできた真珠層で見られないことがあげられる(Tsukamoto *et al.*, 2004; Takeuchi and Endo, 2006)。これはタイラギの仲間で見つかったアスぺインの相同タンパク質アスプリッチでも同様である(Gotliv *et al.*, 2005)。

他にもカルサイト特異的に発現するタンパク質(MSI-31, プリズマリン-14)やアラゴナイトの真珠層に特異的に発現するタンパク質もある(MSI-60, N-16)が(Takeuchi and Endo, 2006)、まず前者のカルサイト特異的な他のタンパク質はいずれも不溶性タンパク質であるため、多形制御の直接的な因子とは考えにくい。上述の *in vitro* の実験結果もさる事ながら、アコヤガイの菱柱層を構成する結晶は不溶性基質から直接析出するのではなく、その表面を覆うエンベロープと呼ばれる構造の中で沈殿することが透過電顕による観察で示されているからである。またこのエンベロープのアミノ酸組成はアスパラギン酸に非常に富み、アスぺインのアミノ酸組成と酷似していることも知られている(文献はTsukamoto *et al.*, 2004参照)。

一方、アラゴナイトに特異的に含まれるタンパク質が多形制御をしている可能性もゼロとは言わないが、少なくとも海生種ではかなり低いと考えられる。なぜなら、海生種の外套膜外液(貝殻と外套膜の間にある溶液:ここから貝殻は沈殿する)には Mg イオンが多く含まれることが知られ、また Mg イオンを多く含む水溶液からはデフォルトとしてアラゴナイトが沈殿することが知られているからである(Tsukamoto *et al.*, 2004)。つまり、貝はわざわざアラゴナイトをつくる「必要」がないのだ。また、アスぺインが結晶多形の制御因子であることを示すもう一つの強い根拠として、 Mg イオンを多く含む水溶液中にポリアスパラギン酸を入れるとカルサイトが析出しやすくなるという *in vitro* の実験結果がある(Tsukamoto *et al.*, 2004)。アスぺインは約60%がアスパラギン酸からなるタンパク質であり、ポリアスパラギン酸と非常に類似した構造をしていると言える。

以上のように、強酸性基質タンパク質が結晶多形の制御スイッチとなっていることを示す状況証拠は揃いつつあると思われるが、もしそうだとすると、ではどのようなメカニズムでその制御はなされているのだろうか

か？ 大半の研究者が信じていると思われるのが、基質タンパク質のアスパラギン酸とカルシウムイオンとの間の立体化学的相互作用による制御（鑄型説）である。そのような相互作用は一般にはおそらく存在するだろう。しかしそれによって炭酸カルシウムの結晶多形制御を説明することは実は困難だと思われる。なぜなら(001)面(c軸に垂直な面で、カルシウムイオンだけの層と炭酸イオンだけの層が交互に繰り返す：酸性タンパク質の規則的に並んだカルボキシル基が最もうまくフィットできると考えられる)におけるカルシウムイオンの配置はカルサイトとアラゴナイトでほとんど一致するからである。ホタテガイの葉状層(カルサイト)に含まれる強酸性基質タンパク質MSP-1とアスぺインの間でアスパラギン酸残基の配置具合に目立った共通性が見られないことも、鑄型としての構造的制約がないことを示唆する。

もう一つの可能性として、アスぺインがカルシウムの輸送タンパク質として機能している可能性が考えられる。ポリアスパラギン酸は陽イオン交換体としての働きが調べられているが、それによるとポリアスパラギン酸のCaイオン吸着能力はMgイオン吸着能力の10倍以上である(Tsukamoto *et al.*, 2004)。すなわち、アスぺインがCaを選択的に吸着して結晶成長の場に供給すると、ローカルにMg/Ca比が低下し、不純物であるMgを含んだカルサイトが形成されなくなり、アラゴナイトに比べてカルサイトの溶解度が相対的に減少する(アラゴナイトにはイオン半径の都合上もともとMgは入らない)ため、カルサイトが形成されるのかもしれない。それによってカルシウムを迅速に供給できることを考えると理にかなった説明のようにも思われるが、その検証はもちろんこれからである。

文 献

- Belcher, A. M., Wu, X. H., Christensen, R. J., Hansma, P. K., Stucky, G. D. and Morse, D. E. (1996) : Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc shell proteins. *Nature*, 381, 56-58.
- Fallini, G., Albeck, S., Weiner, S. and Addadi, L. (1996) : Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*, 271, 67-69.
- Fukuda, I., Ooki, S., Fujita, T., Murayama, E., Nagasawa, H., Isa, Y. and Watanabe, T. (2003) : Molecular cloning of a cDNA encoding a soluble protein in the coral exoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304, 11-17.
- Gotliv, B.-A., Kessler, N., Sumerel, J. L., Morse, D. E., Tuross, N., Addadi, L. and Weiner, S. (2005) : Asprich: A novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *ChemBioChem*, 6, 304-314.
- Katoh-Fukui, Y., Noce, T., Ueda, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, N., Higashinakagawa, T., Killian, C. E., Livingston, B. T., Wilt, F. H., Benson, S. C., Sucov, H. M. and Davidson, E. H. (1991) : The corrected structure of the SM50 spicule matrix protein of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.*, 145, 201-202.
- Lowenstam, H. A. and Weiner, S. (1981) : On biomineralization. Oxford University Press, Oxford, 324.
- Sarashina, I. and Endo, K. (2001) : The complete primary structure of Molluscan Shell Protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Mar. Biotechnol.*, 3, 362-369.
- Sarashina, I. and Endo, K. (2006) : Skeletal matrix proteins of invertebrate animals: Comparative analysis of their amino acid sequences. *Paleontol. Res.*, 10, 311-336.
- Shimizu, K., Cha, J., Stucky, G. D. and Morse, D. E. (1998) : Silicatein a: Cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 6234-6238.
- Sucov, H. M., Benson, S., Robinson, J. J., Britten, R. J., Wilt, F. and Davidson, E. H. (1987) : A lineage-specific gene encoding a major matrix protein of the sea urchin embryo spicule. II. Structure of the gene and derived sequence of the protein. *Dev. Biol.*, 120, 507-519.
- Takeuchi, T. and Endo, K. (2006) : Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar. Biotechnol.*, 8, 52-61.
- Testeniere, O., Hecker, A., Le Gurun, S., Quenedey, B., Graf, F. and Luquet, G. (2002) : Characterization and spatiotemporal expression of *orchestin*, a gene encoding an ecdysone-inducible protein from a crustacean organic matrix. *Biochem. J.*, 361, 327-335.
- Tsukamoto, D., Sarashina, I. and Endo, K. (2004) : Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 1175-1180.

ENDO Kazuyoshi and SARASHINA Isao (2007) : Structure and function of skeletal matrix proteins.

<受付：2006年12月22日>