

助成番号 9958

## タンパク質分解物によるカルシウム塩結晶化阻害の作用機構と制御

助成研究者：村本 光二 (東北大学大学院農学研究科)

共同研究者：小川 智久 (東北大学大学院農学研究科)

永沼 孝子 (東北大学大学院農学研究科)

各種食品タンパク質の酵素分解物はカルシウム塩の結晶化に対する阻害作用を示し、その阻害作用はグルタミナーゼ処理や食塩などの共存物質によって増強される。タンパク質分解物は結晶核の生成と成長の両方を阻害することを昨年度までの研究で明らかにした。このような有機物と無機イオンとの相互作用は、生体における石灰化(バイオミネラリゼーション)にとっても重要である。たとえば、水産甲殻類アカフジツボ(*Megabalanus rosa*)のリンパ液の主要タンパク質成分であるCタイプレクチン(BRA)がガラクトースなどの糖鎖に結合性を持つだけでなく、カルシウム塩の過飽和状態にあるリンパ液での結晶析出の阻害に働き、殻形成の制御にも関わることを我々は指摘してきた。本研究では、タンパク質とその分解物によるカルシウム塩結晶化阻害の作用機構の解明と制御を目的として、アカフジツボの近縁種であるミネフジツボ(*Balanus rostratus*)のリンパ液から単離したカルシウム塩結晶化阻害作用を持たないレクチン(BRL)の1次構造を解明し、BRAとの比較によって構造活性相関を検討するとともに、これらのレクチンがカルシウム塩結晶の形態に及ぼす影響を調べた。

ガラクトースとの結合活性にカルシウムイオンを必要とするBRLは、22 kDaのサブユニットが分子間SS結合でホモダイマーを形成し、これが多量体化して構成されていた。サブユニットは182アミノ酸残基からなり、アカフジツボから単離した140 kDaのBRA-2(173アミノ酸残基)及び64 kDaのBRA-3(138アミノ酸残基)との間に46%及び15%の相同性がみられた。BRA-2とBRA-3には25%の相同性しかないことから、BRLとBRA-2は同じ祖先遺伝子から分子進化したと考えられる。

BRA-2とBRA-3は、0.01 mg/3 ml以上の濃度で過飽和炭酸カルシウムの結晶化を阻害したが、その10倍濃度でもBRLとコントロールとして用いたBSAには阻害作用が観察されなかった。BRA-2とBRA-3を共存させて炭酸カルシウムの結晶化を行うと、丸みを帯びた形態の小さな結晶が生成した。さらにBRA-2の臭化シアン分解物の共存により、異なる形態を持つ結晶が生成した。一方、阻害作用を示さなかったBRLでは、中央部がくぼんだ円盤状の形態を持った結晶が生じた。このようなBRLとBRAのカルシウム塩結晶化に対する作用の違いを、ヒドロパシープロフィールやカルシウムイオンと結合するカルボニル基酸素原子を側鎖にもつアミノ酸残基の分布を基に検討した。



助成番号 9958

## タンパク質分解物によるカルシウム塩結晶化阻害の作用機構と制御

助成研究者：村本 光二 (東北大学大学院農学研究科)

共同研究者：小川 智久 (東北大学大学院農学研究科)

永沼 孝子 (東北大学大学院農学研究科)

## 1. 研究目的

カルシウムイオンは弱アルカリ性の小腸では様々な酸と塩を形成して沈殿してしまうため、小腸からの受動輸送による吸収率を高めるには、牛乳カゼインから調製したCPPのようなカルシウム塩の結晶化を阻害する物質の利用が有効である(1)。筆者らは、大豆タンパク質などの食品タンパク質の分解物にもカルシウム塩結晶化阻害作用があることを見出し、昨年度までの研究ではタンパク質分解率と阻害作用の強さの相関、グルタミナーゼ処理による阻害作用の増強、食塩や糖などの共存物質の影響などについて調べた。また、食品タンパク質分解物は結晶核の生成と成長の両方を阻害すること、分解物の共存によって結晶の形態が異なることも明らかにした。

一方、このような有機物と無機イオンとの相互作用は生体における石灰化(バイオミネラリゼーション)に重要であることが示されてきた。筆者らも、水産甲殻類アカフジツボ(*Megabalanus rosa*)のリンパ液の主要タンパク質成分であるCタイプレクチン(BRA)がガラクトースなどの糖鎖に結合性を持つだけでなく、カルシウム塩の過飽和状態にあるリンパ液での結晶析出の阻害に働き、生理機能が殻形成の制御にあることを提唱した(2)。

本研究では、タンパク質とその分解物によるカルシウム塩結晶化阻害の作用機構の解明と制御を目的として、アカフジツボの近縁種ではあるミネフジツボ(*Balanus rostratus*)のリンパ液から単離したカルシウム塩結晶化阻害作用を持たないレクチンの1次構造を解明し、BRAとの比較により構造活性相関を検討するとともに、これらのレクチンがカルシウム塩結晶の形態に及ぼす影響を調べた。

## 2. 研究方法

## 2.1. ミネフジツボレクチンの単離と断片化

アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーによってミネフジツボのリンパ液(200 ml)からガラクトース結合特異性レクチン(*Balanus rostratus* lectin, BRL)を58 mg単離した(3)。還元カルボキサミドメチル化したBRLを1 mgずつ用い、V8プロテアーゼ、リジルエンドペプチダーゼ、キモトリプシンによる酵素的断片化、及びトリプトファン残基の化学的切断による断片化を行っ

た。

これらの分解物をそれぞれ、TSKgel ODS 120Tカラムと0.1%トリフルオロ酢酸/アセトニトリル溶媒系の濃度勾配溶出法を使った逆相分配高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離した。

## 2.2. BRLの1次構造分析

単離精製したペプチド断片を6 M HCl中、110°C、22時間加水分解後、生成したアミノ酸をダブシルクロライドで誘導体化してアミノ酸組成分析を行った。アミノ酸配列は気相プロテインシーケンサーで分析し、BRLの全1次構造を決定した。

ハイドロプロパシープロフィールはKyteとDoolittle (1982)の方法によって作成した。

## 2.3. カルシウム塩結晶化阻害作用の測定

pH自動滴定装置(東亜電波工業)を用い、以下の手順でカルシウム塩結晶化阻害作用を測定した。反応セルに、試料(0.1 mg)を溶解した人工海水(0.5 M NaCl/0.011 M KCl) 2.91 mLと1 M塩化カルシウム水溶液0.03 mLを加え、20°C、10分間放置した。あらかじめ20°Cに保っておいた0.4 Mの炭酸水素ナトリウム水溶液0.06 mLを加え入れ(全量3.0 mL)、同時にpHスタットを作動させた。反応セルを循環恒温水で20°Cに保持して30分間の反応を追跡した。カルシウム塩の結晶化にともないH<sup>+</sup>が放出されてpHが低下するので、pHを8.5に保持するのに消費した0.1M NaOH量を経時的に記録した。

## 2.4. 結晶の生成と観察

タンパク質及び分解物の共存下、過飽和炭酸カルシウムから生成した結晶の形態は、Korex X線スペクトル元素分析装置を装着した日立S-4200走査型電子顕微鏡(10 kV)で観察した。

## 3. 研究結果

ミネフジツボのリンパ液から単離した120 kDaのレクチン(BRL)のガラクトース結合活性にはカルシウムイオンを必要とした。22 kDaのサブユニットが分子間SS結合でホモダイマーを形成し、これが多量体化してBRLが構成されていた。サブユニットは182アミノ酸残基からなり、分子内にはメチオニン残基を含まず、8つの半システチン残基を有していた(Fig. 1)。アカフジツボから単離した140 kDaのBRA-2及び64 kDaのBRA-3は、それぞれ173アミノ酸残基と138アミノ酸残基のサブユニットから構成されている(4)。それらの1次構造をBRLと比較すると、46%及び15%の相同性

がみられた。BRA-2とBRA-3のサブユニット間の相同性は25%であり、BRLとBRA-2は同じ祖先遺伝子から分子進化したと考えられる。8つの半シスチンはすべて保存されており、BRA-2との比較から、BRLのCys-23とCys-54はサブユニット間SS結合に、Cys-57とCys-68, Cys84とCys-176, Cys-152とCys-168はサブユニット内SS結合してループを形成していると考えられる。BRA-2のAsn-39にはN-アセチルグルコサミン、マンノース、フコースからなる糖鎖が結合している。BRLではこれに対応する位置にN結合型糖鎖のコンセンサス配列はなく、N末端から4位にコンセンサス配列Asn-Gln-Serが見つかった。しかし、糖鎖は結合しておらず、分子内の他の位置にも糖鎖の結合は検出されなかった。なお、ミネフジツボからはBRA-3に対応するレクチンはこれまでのところ見つかっていない。

BRL, BRA-2, BRA-3及び牛血清アルブミン(BSA)のカルシウム塩結晶化阻害作用を調べた。BRA-2とBRA-3は、0.01 mg/3 ml以上の濃度で過飽和炭酸カルシウムの結晶化を阻害したが、その10倍濃度でもBRLとBSAには阻害作用が観察されなかった(Fig. 2)。

このBRLとBRAのカルシウム塩の結晶化に対する作用の違いを検討するためにハイドロパシープロフィールを作成した(Fig. 3)。BRA-2とBRA-3はC末端部に2つの大きな親水性ドメインを有し、ここにカルシウム結合部位と糖鎖認識結合部が存在していると予測される。BRLにも2つの大きな親水性ドメインがみられるものの、BRA-2に比べると小さく、また、分子全体に分布する小さな親水性ドメインの数も少なかった。

阻害物質が無い場合、過飽和炭酸カルシウム溶液からは速やかに規則構造を持った結晶が形成される(Fig. 4a)。これまでの研究で示したように、タンパク質分解物の添加によって結晶核の形成が阻害され、結晶の成長も遅くなった。例えば、小麦グルテンのパパイン消化物では、プリズムが積み重なった形態をもつ結晶が生成した(Fig. 4b)。カルシウム塩の結晶化に対して強い阻害作用を持つBRA-2とBRA-3、及びBRA-2構成単位のさらなる多量体であるBRA-1を共存させて炭酸カルシウムの結晶化を行うと、丸みを帯びた形態の小さな結晶が生成した(Fig. 5)。一方、阻害作用を示さなかったBRLでは、中央部がくぼんだ円盤状の形態を持った結晶が生じた。

さらにタンパク質分解物が結晶形態に及ぼす影響を観察するために、BRA-2の臭化シアン分解物を調製した。BRA-2のサブユニットにはMet-73とMet-106が存在する。臭化シアン分解により、N末端から73位までのサブユニット結合部を含む146残基からなる断片と、SSループのMet残基が切断された2本鎖からなる100残基の断片が得られた。これらCB-1及びCB-2と命名した断片の共存により、これまでとはさらに異なる形態を持つ結晶が生成した(Fig. 6)。

#### 4. 考察および今後の課題

これまでに大豆タンパク質、卵白アルブミン、小麦グルテン、米タンパク質を種々のプロテアーゼで消化し、得られたタンパク質分解物の炭酸カルシウム結晶化阻害作用を調べた。その結果から、ペプチドのカルシウム塩結晶化阻害作用には、プロテアーゼの基質特異性に基づく構造的要因が強く影響していることを明らかにした。食品タンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用は、ラクトース、食塩、クエン酸などの添加によって増強が認められた。タンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用は、ペプチドに含まれるグルタミン酸またはアスパラギン酸とカルシウムとの相互作用によるものと考えられ、事実、ペプチドのアミド基をグルタミンナーゼで加水分解すると阻害作用が増強した。さらに阻害作用測定における分解物の添加実験から、タンパク質の分解物はカルシウム塩の結晶核の生成だけでなく結晶の成長を妨げていることが明らかになった。本研究では、タンパク質とタンパク質分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用の機構をさらに詳しく調べ、結晶化制御に資するために、バイオミネラリゼーションに関わると予測している2種類のフジツボから単離したレクチンの構造比較と走査型電子顕微鏡を使った生成結晶の観察を行った。

強いカルシウム塩結晶化阻害作用を持つBRA-2及びBRA-3と、これらの構造に高い相同性があるにも関わらず阻害作用が全くないBRLの1次構造を構成するアミノ酸残基で、カルシウムイオンと結合するカルボニル基酸素原子を側鎖に含む数を比較したのがTable 1である。サブユニット分子全体で見ると、BRAはBRLよりも20～30%多くこれらのアミノ酸を含むだけであるが、2つのSSループからなる糖鎖認識結合ドメイン(CRD)内では40～90%多い。BRLには、糖鎖との結合に関与すると考えられるカルシウムイオン結合部位(Gln-149, Asp-151, Glu-156, His-171, Asp-172)がすべて保存されており、これらのアミノ酸残基を除くと、BRAはBRLの70～120%多くカルシウムイオンと結合しうるアミノ酸残基を含有していた。これらのことから、BRAのカルシウム塩結晶化阻害作用はレクチン活性部位とは異なる、分子内に分布するカルボニル基酸素原子を側鎖にもつアミノ酸残基によって発現していると考えられる。

しかし、結晶化阻害作用を示さない場合でも、タンパク質とペプチドは成長中のカルシウム塩結晶核の特異的な部位と相互作用し、結晶形態を変化させており、カルシウム塩結晶の格子間距離とペプチド側鎖の立体的分子間相互作用が重要な役割を担っていると考えられる。

以上のことから、タンパク質とその分解物のカルシウム塩結晶化阻害作用と結晶形態への影響の強さを個別に評価することによって、カルシウムの腸管からの吸収、缶石や歯石の防止、結晶形成制御などの応用への展開が期待できる。

## 5. 文献

- (1) R. Sato, T. Noguchi and H. Naito (1986) Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 67-76.
- (2) K. Muramoto, H. Yako, K. Murakami, S. Odo and H. Kamiya (1994) Inhibition of the growth of calcium carbonate crystals by multiple lectins in the coelomic fluid of the acorn barnacle *Megabalanus rosa*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **107B**, 401-409.
- (3) M. Toda, M. Jimbo, K. Muramoto, R. Sakai and H. Kamiya (1998) Isolation and characterization of a D-galactose-binding lectin from the acorn barnacle *Balanus rostratus*, *Fisheries Sci.*, **64**, 638-642.
- (4) K. Muramoto and H. Kamiya (1990) The amino acid sequence of multiple lectins of the acorn barnacle *Megabalanus rosa* and its homology with animal lectins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1039**, 42-51.

Table 1. Numbers of the amino acids having side chains with carbonyl oxygen atoms in each lectin.

(a) Whole subunit

	Asp	Glu	Asp+Glu	Asn	Gln	Asn+Gln	Total
BRL	11	12	23	7	4	11	34
BRA-2	14	15	29	9	6	15	44
BRA-3	12	6	18	15	8	23	41

(b) CRD domain

BRL	9	6	15	6	1	7	22
BRA-2	13	7	20	6	4	10	30
BRA-3	12	6	18	16	8	24	42

(c) CRD domain excluding Ca2+ binding sites

BRL	6	4	10	5	0	5	15
BRA-2	10	6	16	6	3	9	25
BRA-3	7	6	13	13	7	20	33



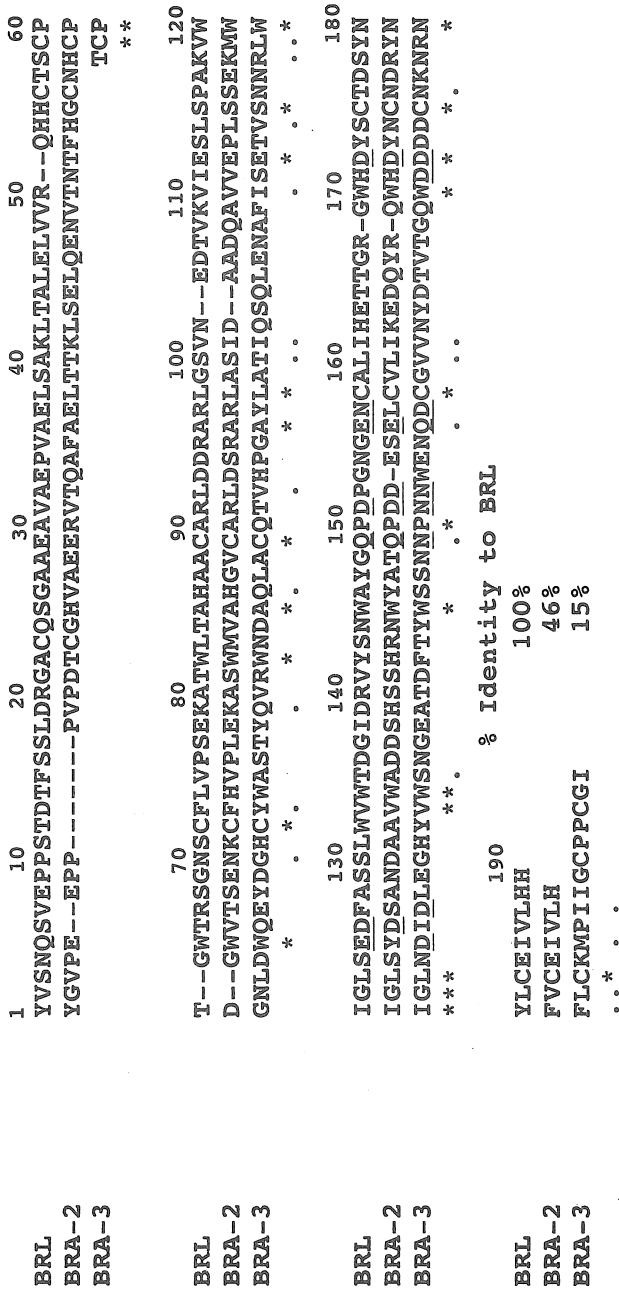


Fig. 1. Aligned amino acid sequences of barnacle lectins. BRL: *Balanus rostratus* lectin, BRA-2: 140k lectin from *Megabalanus rosa*, BRA-3: 64k lectin from *Megabalanus rosa*. Asterisks indicate the conserved amino acid residues in all sequences. Underlines indicate the calcium binding sites involved in carbohydrate recognition domains.

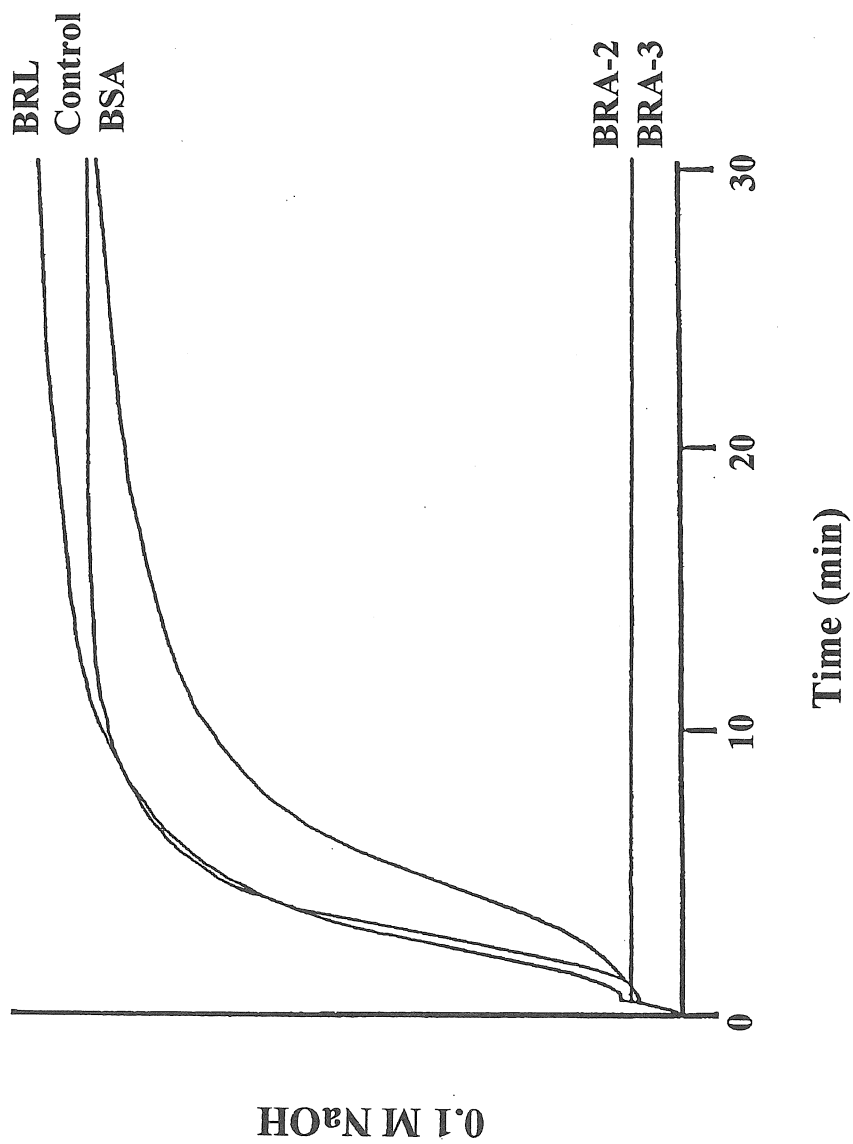


Fig. 2. Inhibition of the crystal growth of calcium carbonate monitored by a pH-stat meter. Concentration of protein samples was 0.1 mg/3 ml.

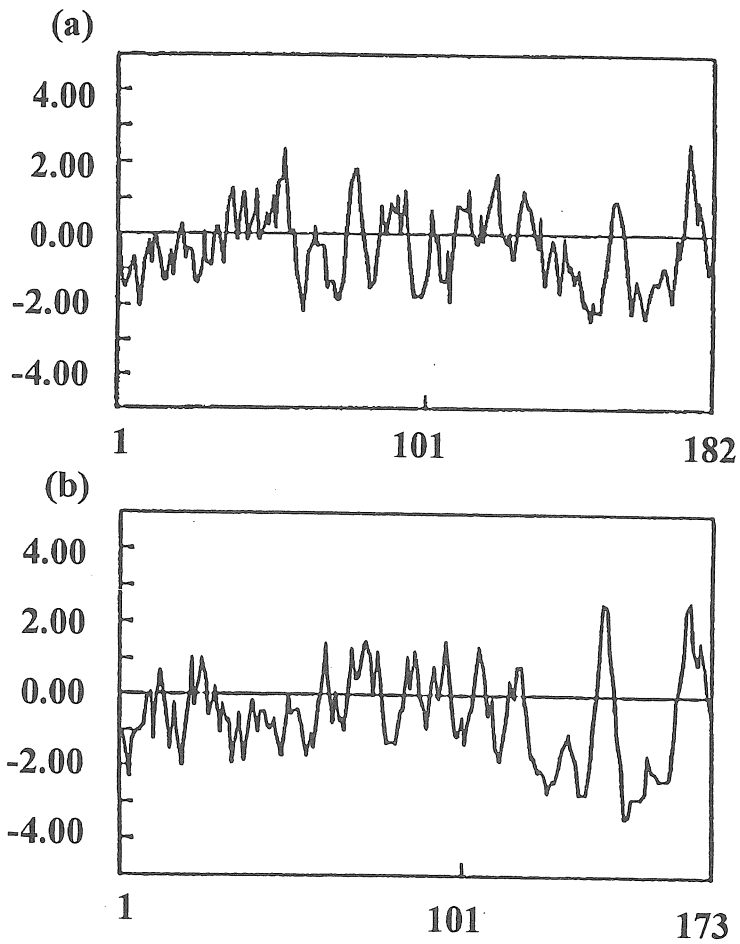
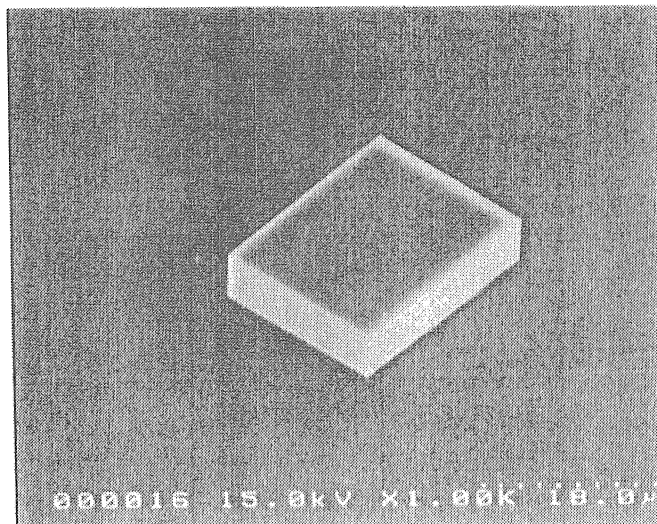


Fig. 3. Hydropathy profiles of BRL (a) and BRA-2 (b). Numbers of the amino acid residues are shown at the bottom. Data presented as hydrophobic and hydrophilic portions are plotted above and below the vertical line, respectively.

(A)



(B)

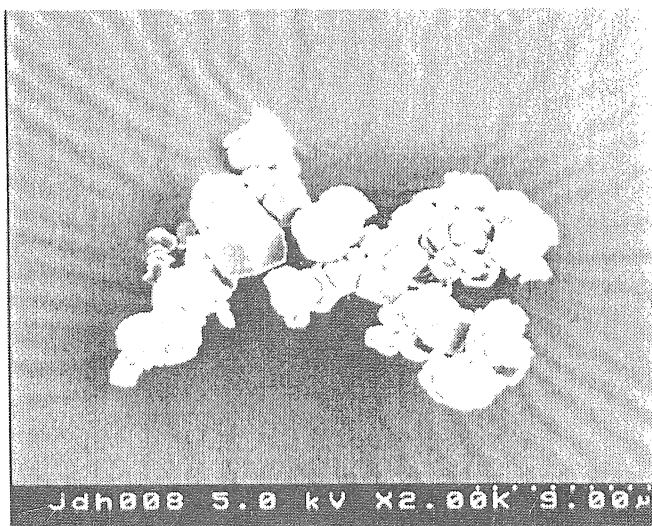


Fig. 4. Scanning electron micrographs of calcium carbonate crystals. (B) The crystals were formed in the presence of gluten hydrolysates.

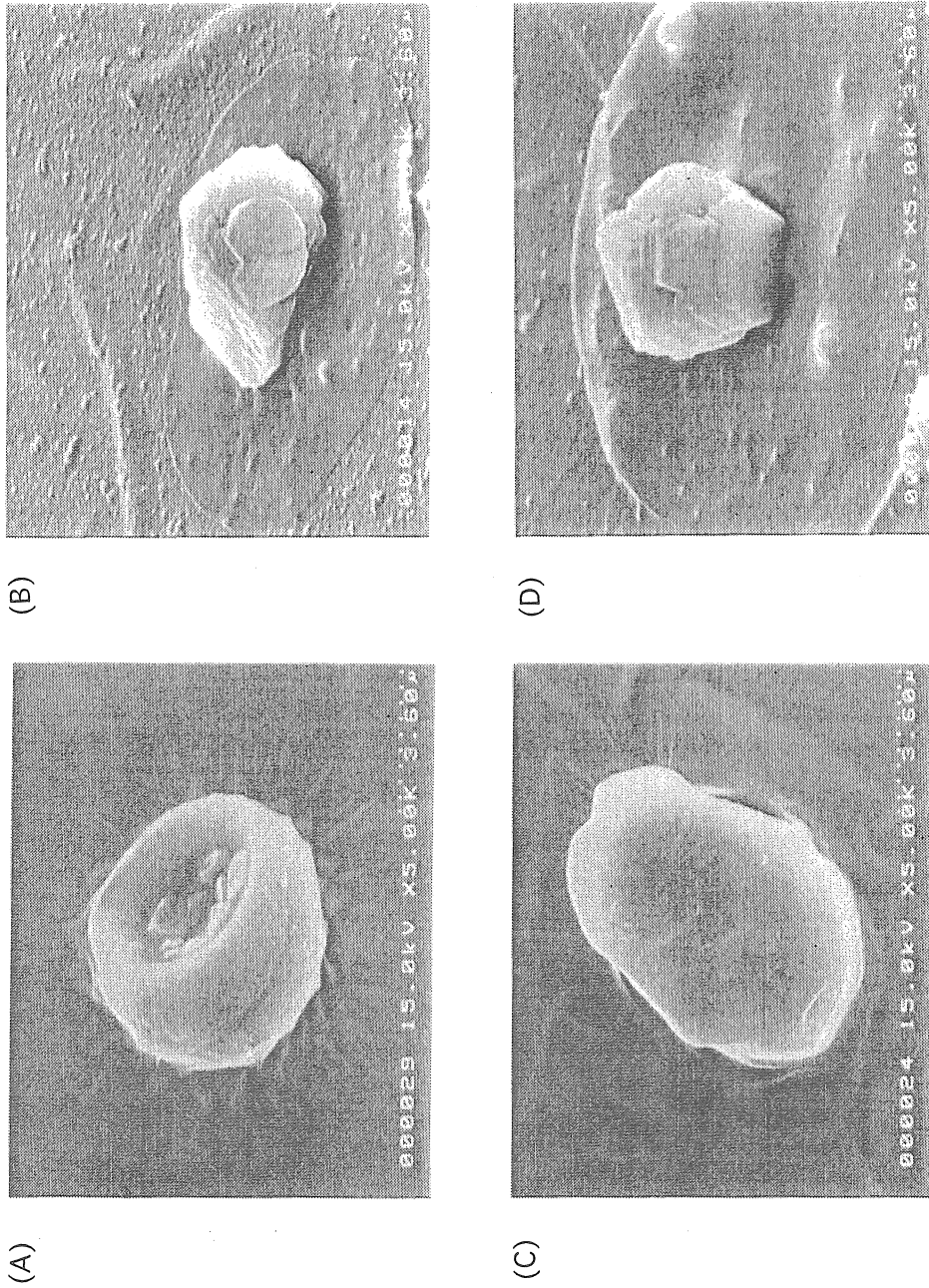
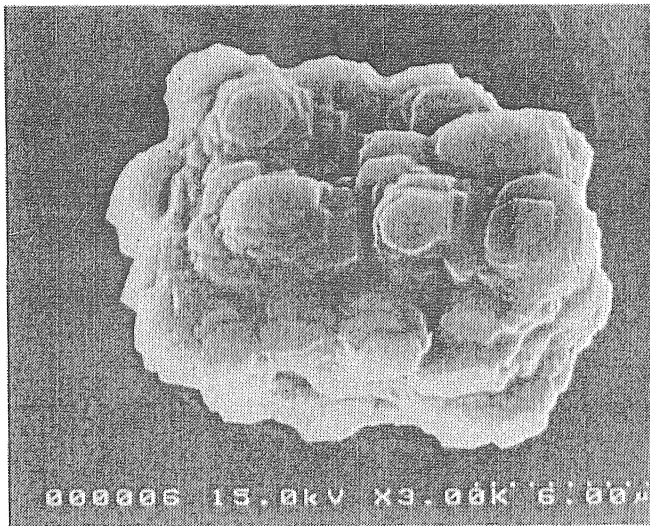


Fig. 5. Scanning electron micrographs of calcium carbonate crystals in the presence of barnacle lectins. (A) BRL, (B) BRA-1, (C) BRA-2, (D) BRA-3.

(A)



(B)

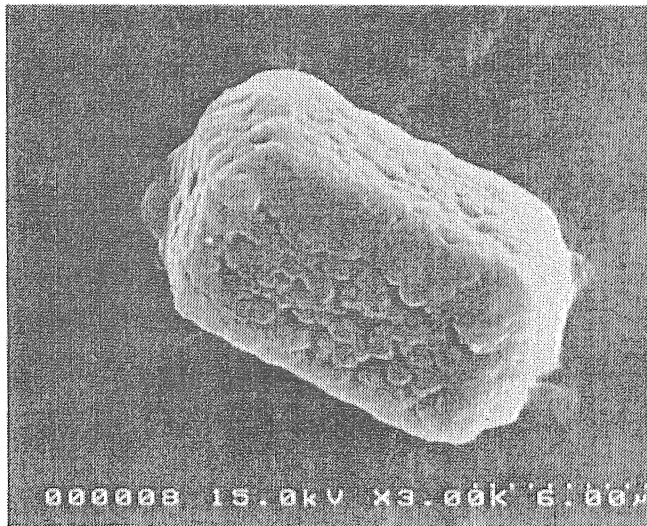


Fig. 6. Scanning electron micrographs of calcium carbonate crystals in the presence of cyanogen bromide fragments derived from BRA-2. (A) CB-1, (B) CB-2.

## Inhibition and regulation of calcium carbonate crystallization by protein hydrolysates

Koji Muramoto, Tomohisa Ogawa and Takako Naganuma  
Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

### Summary

Various protein hydrolysates showed inhibitory activities on the crystal growth of calcium carbonate. The activities increased by treating the protein hydrolysates with glutaminase and by the addition of sodium chloride, lactose, etc. Such interactions between calcium ions and organic compounds are important for biomineralization. In fact, the multiple lectins (BRA-2, BRA-3), which are a group of sugar-binding proteins, from the hemolymph of the acorn barnacle (*Megabalanus rosa*) inhibited the crystal growth at a lectin concentration of >0.1 mg/30 ml. A galactose-binding lectin (BRL) was also isolated from the acorn barnacle (*Balanus rostratus*), however, it had no inhibitory activity. Thus, the amino acid sequence of BRL was determined to explore the structure-activity relationship in terms of the inhibition of the crystal growth of calcium carbonate. BRL was composed of identical subunits of 182 amino acids. BRL was 46% identical to BRA-2 and 15% identical to BRA-3. Therefore, BRL and BRA-2 may have evolved from the common ancestor gene. The distinct activities of these lectins may attribute to the number and the localization of acidic amino acids and their amide forms on the surfaces of the lectin molecules, that interact with the growth sites on crystal surfaces.

Observations by scanning electron microscopy revealed modifications of the size and the morphology of the calcium carbonate crystals grown in the presence of various peptides and proteins. In the presence of peptides and proteins, the crystals seemed to be less well crystallized and smaller, and they showed smooth edges unlike the crystals obtained without peptides and proteins. In conclusion, protein hydrolysates play important roles in regulation of crystal growth, including nucleation, rate of growth, orientation, size and overall morphology of crystals.