

助成番号 0825

水産生物を模倣した結晶化制御ナノ技術の分子基盤

村本 光二, 小川 智久, 永沼 孝子

東北大学大学院生命科学研究所

概要 水産生物が作り出す殻(外骨格)や棘、真珠などの硬組織は多様であり、超精密構造を有しながら、その組成はタンパク質や糖質などからできた基質(有機マトリックス)を取り巻いて炭酸カルシウムなどの無機分子が結晶化している。本研究では、有機マトリックスと結晶化の制御に関わる諸因子(甲殻類フジツボ・レクチン: BRA, 二枚貝類マベガイ・レクチン: PPL)の生化学的特性を調べ、炭酸カルシウムの結晶化制御の分子基盤を検討した。

フジツボ体液の主要タンパク質である3種類のレクチン(BRA)は、炭酸カルシウムの結晶核の形成を阻害するとともに、それぞれシアル酸の結合位置や還元末端ガラクトース等の特異的な糖鎖への結合活性を示した。マベガイの外套膜から単離した2種類のレクチン(PPL)も特異的な糖鎖認識能を有しており、これらのレクチン・タンパク質は糖質を含む有機マトリックスと相互作用してカルシウム塩の結晶化制御に関与していると考えた。そこでキチン・キトサンからなる有機マトリックス薄膜上にレクチン存在下で結晶を形成させ、結晶形態を各種分光学的方法を用いて分析した。すなわちカルサイト菱面体結晶の表面に BRA が結合すると結晶の成長が止まり、結合しない部分が成長して結晶形態が変化した。走査型電子顕微鏡を用いた結晶構造の観察によっても、六方晶系結晶のカルサイトと斜方晶系結晶のアラゴナイトは、有機マトリックスとレクチンによって結晶形態を多様化させた。

マベガイ貝殻内側にある真珠層をレーザー顕微鏡とX線回折装置で観察した結果、個体によってアラゴナイト結晶の3軸配向性が異なるために光の反射特性の差を生じさせ、良質と不良質の違いとなっていることが分かった。一次構造解析の結果、PPL-1は動物レクチンのラムノース結合性レクチン・ファミリーに、PPL-2は植物レクチンのジャカリン近縁レクチン・ファミリーに分類することができた。PPL-2は、真珠層の脱灰抽出物に存在することが確認できた。いずれのPPLも外套膜だけでなく、筋組織や鰓、体液にも分布しており、このことは、レクチンがバイオミネラリゼーションだけでなく、生体防衛や生殖等、多様な生物機能に関与していることを示唆している。

以上、多様な機能性を有する有殻無脊椎動物レクチンは、カルシウムイオンおよび有機マトリックスと特異的に相互作用し、炭酸カルシウムの結晶化制御因子としての特性を示した。

1. 研究目的

水産生物が作り出す殻(外骨格)や棘、真珠などの硬組織は多様であり、超精密構造を有しながら、その組成は驚くほど単純である。すなわち、タンパク質や糖質などからできた基質(有機マトリックス)を取り巻いて炭酸カルシウムなどの無機分子が結晶化している。この生石灰化(バイオミネラリゼーション)の機構解明は、基礎生物科学分野だけでなく、人工骨・歯、人工真珠、半導体基板などの新素材開発の応用分野でナノ技術の基盤となるものである。生

物のバイオミネラリゼーションでは、結晶表面における有機分子と無機分子の相互作用によって結晶化の制御、つまり結晶の大きさ・形、強度、弾力性や張力などの特性の調節が行われていると理解されている¹⁻⁴⁾。実際、炭酸カルシウムのカルシウムイオン間の距離(4.7 Å)とタンパク質のβ-シートの側鎖官能基間の距離(4.96 Å)はほぼ等しく、両者の相互作用が推測できる。

本研究では、バイオミネラリゼーションを、*結晶化が行われる場としてのマトリックス分子、*結晶となる無機分

子、*そして結晶化の制御に関わる諸因子の3要素に分け、水産生物を模倣したナノレベルでの結晶化制御のための分子基盤を明らかにすることを目指している。これまでに水産甲殻類フジツボ (*Megabalanus rosa*) のマルチプル・レクチン(糖鎖構造認識結合タンパク質)とバイオミネラル化の関連を検討してきた⁵⁻⁹⁾。本研究では、さらに、有機マトリックスとの相互作用に関わるフジツボ・レクチンがもつ糖鎖結合特異性の精密解析と、これまで得てきた知見をさらに敷衍するために、真珠貝マベガイ (*Pteria penguin*) 外套膜のレクチンを単離・精製し、その生化学的特性を明らかにすることを目的にした。

2. 研究方法

2.1 結晶化制御因子の調製

アカフジツボ・リンパ液から、アフィニティークロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーにより、マルチプルレクチン(BRA-1, BRA-2, BRA-3)を単離した⁵⁾。また、ミネフジツボからレクチン(BRL)を同様な方法で調製した。それぞれのレクチンを蛍光試薬 FITC で修飾して結晶化に用いた。

マベガイの外套膜の抽出液をウシ顎下腺ムチン結合 Sepharose 4B カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーと HiTrap Q カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィーに供してレクチン(PPL-1)を単離した¹⁰⁾。ムチンカラムからの非吸着画分に含まれるレクチン(PPL-2)をトレハロース結合 Sepharose 4Bを用いたアフィニティークロマトグラフィーと Resource S カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィーで単離した。レクチンのサブユニット構造を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)と MALDI-TOF 質量分析計(MS)、一次構造をプロテイン・シークエンサーおよび 3',5'-RACE 法による塩基配列分析によって決定した。

2.2 組み換え体 BRA の作成

アカフジツボの cDNA ライブラリーの PCR によって BRA の DNA を調製し、ベクター pET32a を用いて発現プラスミドを構築した。チオレドキシンの融合タンパク質として大腸菌で発現させた BRA は可溶画分に得られた。この融合タンパク質は塩化カルシウムの添加によって選択的に沈殿させることが可能であり、チオレドキシンを酵素分解で切断後、陰イオン交換クロマトグラフィーで BRA のリコンビ

ナント体を得た。

2.3 糖鎖結合特異性試験

レクチンの糖鎖結合特異性の精密解析をフロンタルアフィニティークロマトグラフィー (FAC) で行った。レクチンを NHS 活性化 Sepharose 4FF に固定化後、ステンレスカラム (2 × 10 mm) に充て込んで自動 FAC 分析装置に接続した。約 100 種類の標準糖鎖のアミノピリジン化 (PA) 誘導体を自動注入装置で逐次レクチンカラムに注入し、0.125 ml/min で溶出した。PA 化糖鎖の溶出時間を蛍光検出器 (Ex: 310 nm/Em: 380 nm) で精密に測定し、Woelf-Hofstee プロットにより、個々の糖鎖の解離定数を算出してレクチン・糖鎖間の親和性を評価した¹¹⁾。

2.4 マベガイ貝殻の真珠層の光学特性

マベガイの貝殻をダイヤモンドカッターで 5 × 5 mm² に切断し、表面の微細構造をレーザー顕微鏡で観察した。また、アラゴナイト結晶配向性を X 線回折法 (XRD, Bruker) で調べた¹²⁾。

2.5 有機マトリックスの調製

アカフジツボ殻を酸で脱灰し、有機マトリックス画分を得た。これを HiTrap Q HP カラムで分画後、さらに逆相分配系高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供して分離した。カバーガラス (18 × 24 mm) にキトサン膜を作製し、これをアセチル化してキチン膜を作製した。キトサン・キチン膜の確認はフーリエ変換赤外分光スペクトル (FT-IR) 装置で行った。

2.6 炭酸カルシウム結晶化

炭酸カルシウムの結晶化をカルサイト母液用人工海水 (0.5 M NaCl/11 mM KCl)、またはアラゴナイト母液用人工海水 (0.5 M NaCl/11 mM KCl/50 mM MgCl₂) を使用して行った¹³⁾。プラスチック・シャーレ (φ 30 × 10 mm) に人工海水と最終濃度が 10 mM、8 mM となるように CaCl₂ と NaHCO₃ を加え、さらにレクチンを添加した。この結晶母液にキチン膜、またはキトサン膜をコーティングしたカバーガラスを入れ、20°C で 3 日間インキュベートした。コントロールには牛血清アルブミン (BSA) を用いた。上記の条件下、レクチンあるいは有機マトリックスを添加して炭酸カルシウムの結晶化を行った。有機マトリックス濃度は 0 ~ 100 μg/3 ml とし、レクチンは 20 ~ 40 μg/3 ml に調整した。

2.7 結晶多形の観察

炭酸カルシウム結晶に取り込まれた蛍光標識 BRA を共

焦点レーザー顕微鏡によって観察した。また、カバーガラス上のキチン膜とキトサン膜に炭酸カルシウムを結晶化させ、核形成と成長を光学顕微鏡で観察した。結晶をイオンスプッターで白金-パナジウム・コーティング後、走査型電子顕微鏡で観察した。炭酸カルシウム結晶多形の同定は、ペレット法でFT-IR スペクトルを測定して行った。

3. 研究結果

3.1 結晶化制御因子の調製

マバガイ外套膜からムチンカラム・アフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーを用いてレクチン PPL-1 を単離した。PPL-1 は、還元・非還元下の SDS-PAGE で 21 kDa に単一バンドを示し、MALDI-TOF-MS で 18,432 Da であった。PPL-1 の赤血球凝集活性は D-ガ

ラクトースで最も強く阻害され、FAC 分析により、PPL-1 は Galβ1-3GlcNAc や Galβ1-4Glu のモチーフ構造に強い親和性を持つことが分かった。PPL-1 の一次構造は 167 アミノ酸残基からなり、20 - 78 位と 107 - 165 位に 2 回の繰返し配列が存在した。魚類卵から単離されたラムノース結合性レクチン (RBL) ファミリー¹⁴⁻¹⁶⁾ に対して約 40% の相同性がみられた (Fig. 1)。

一方、PPL-2 は、α (16.9 kDa)、β (16.2 kDa)、γ (15.8 kDa) の 3 種のサブユニットが異なる組み合わせで二量体を形成しており、トレハロースとイソマルトースに親和性を示した。3 種類のサブユニットは、いずれも 146 アミノ酸残基から構成され、サブユニット間には約 50% の相同性がみられた (Fig. 2)。α サブユニットのみは、N 結合型糖鎖が結合した糖タンパク質であった。PPL-2 には、植物に多く

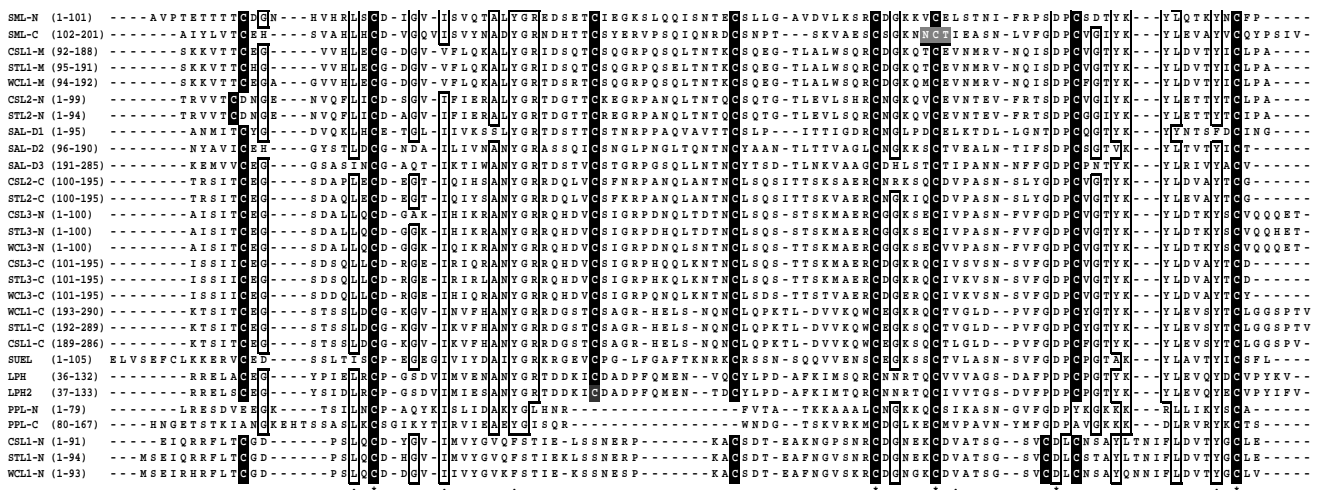


Fig. 1. Comparison of amino acid sequences among PPL and other homologous animal lectins. PPL: Penguin wing oyster (*Pteria penguin*) mantle lectin, STL: steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg lectin, WCL: white spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) egg lectin, SAL: cat fish (*Silurus asotus*) egg lectin, SUEL: sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) egg lectin. The CRDs located in the N-terminal, middle and C-terminal region are represented by N, M and C, respectively.

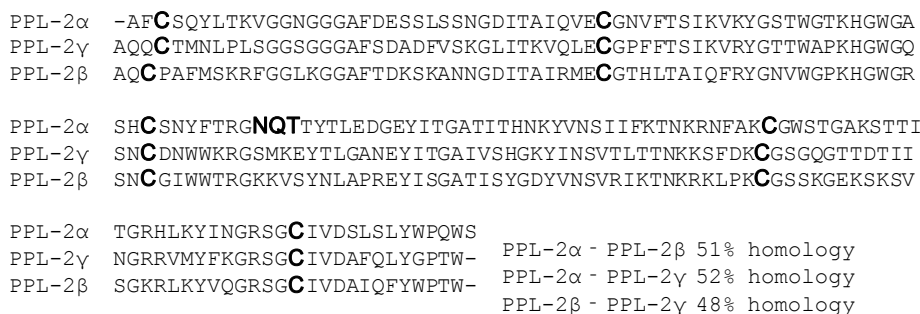


Fig. 2. The amino acid sequences of PPL-2 subunits

見つかっているジャカリン近縁レクチンのドメイン構造が検出され、菊芋塊茎由来のレクチンやラット膵臓由来のレクチンとの間で相同性があった。

マベ貝の外套膜、筋組織、消化盲嚢、鰓、生殖腺からRNAを抽出し、ノーザンブロットおよび *in situ* PCR により mRNA の発現を調べた。PPL-1 は外套膜のほか、雌性生殖腺と消化盲嚢で発現を確認した。PPL-2 mRNA もこれらの組織で発現しており、抗 PPL-2 抗体を用いたウエスタンブロットでも、筋組織、鰓、外套膜、体液のいずれにおいても陽性反応を検出した。

3.2 糖鎖結合特異性試験

BRA はいずれも、分岐ガラクトシル型 N 型糖鎖(307、313、314、323、405、418、419、420 など)に強い親和性を持ち、高マンノース型やアガラクト型 N 型糖鎖には親和性を示さなかった(Figs. 3, 4)。BRA-2 は α 2-6 結合したシアル酸を認識して結合したが、 α 2-3 結合したシアル酸には認識能を示さなかった。BRA-3 は α 結合した非還元末端のガラクトースに強い親和性を示したが末端のシアル酸には結合しなかった。ミネフジツボレクチン(BRL)は Lewis^x と Lewis^a に強い親和性を持っていた。

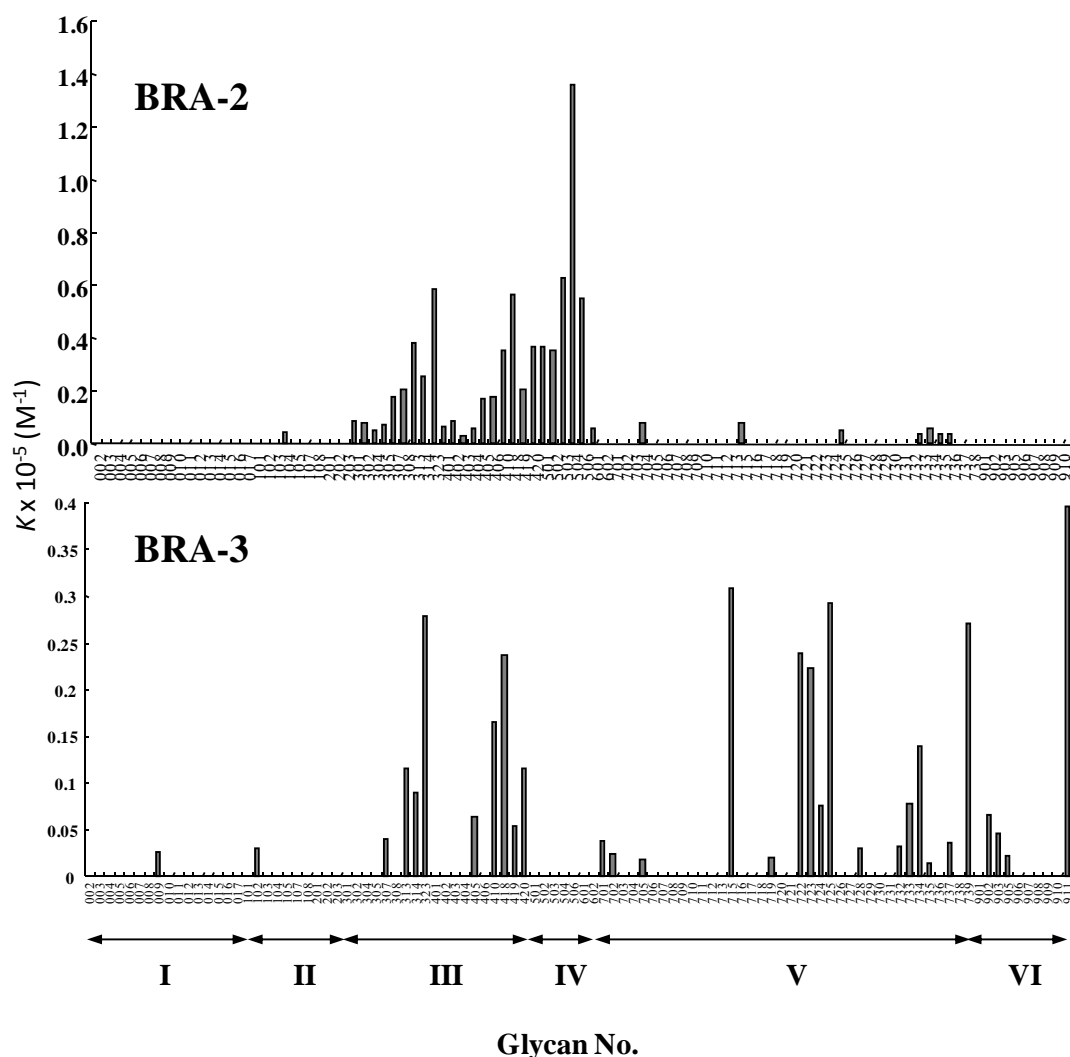
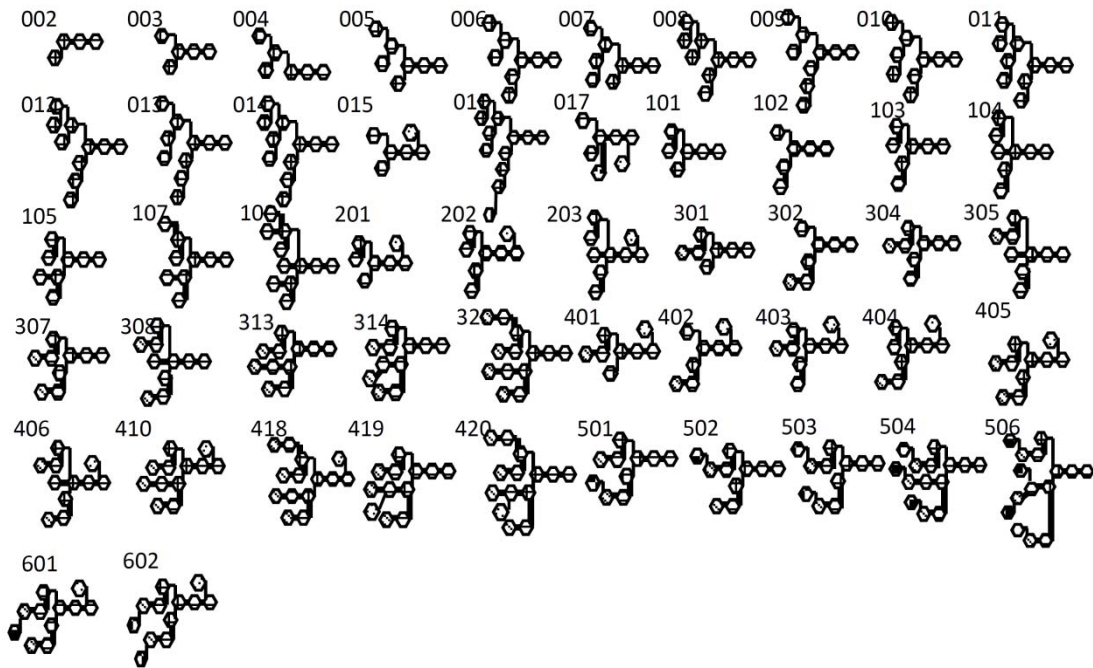
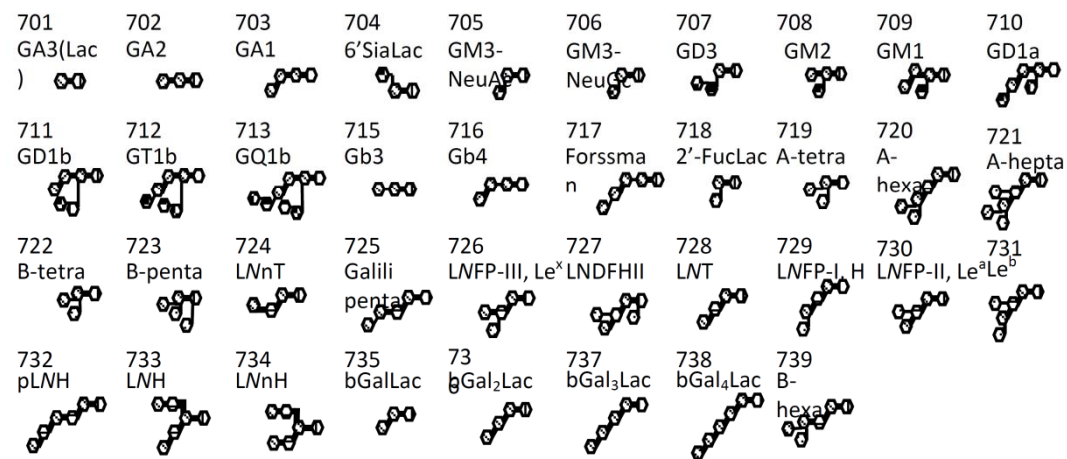


Fig. 3. Bar graph representation of association constants K_a ($= 1/K_d$) of BRA-2 and BRA-3 toward N-linked glycans. The small Arabic figures correspond to the sugar numbers indicated in Fig. 4. Large Roman figures at the bottom represent types of glycans: glycan numbers from 002 to 017, high-mannose-type (group I), from 101 to 203, agalacto-type (group II), from 301 to 420, galactosylated-type (group III), and from 501 to 602, sialylated-type (group IV). N-linked glycans: from 701 to 739, glycolipid-type glycans (group V), and from 901 to 911, others (group VI).

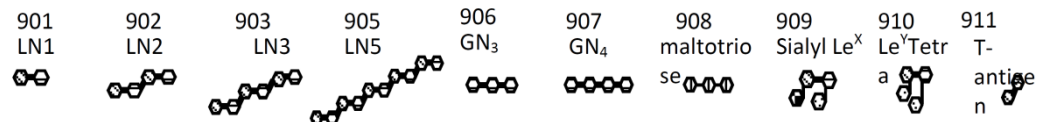
N-linked glycans



Glycolipid-type glycans



Others



Symbols

	GlcNAc		GalNAc - β-linkage
	Man		Glc
	Gal		Fuc
	NeuAc		Xyl
	NeuGc - α-linkage		

Fig. 4. Schematic representation of PA-oligosaccharides used in this study. The reducing terminals are pyridylaminated. Symbols used to represent pyranose rings of monosaccharides are shown in the box at the bottom of the figure.

3.3 マベガイ貝殻の真珠層の光学特性

マベガイの貝殻内側表面 (Fig. 5) をレーザー顕微鏡で観察した (Fig. 6)。良質層 (a, c) では低倍率で渦巻き状模様が観察され、高倍率では成長面の先端から後方に向かって疎から密になるように一方向に配向した六辺形の小結晶がみられた。一方、不良質 (b, d) の貝殻表面には規則構造が検出されず、また、結晶形は類似していたが配向は不規則であった。さらに二次元検出器搭載 X 線回折装置で真珠層アラゴナイト結晶を調べたところ、良質と不

良質の貝殻から得られたデバイ環のパターンには顕著な違いがみられ、3 軸配向性の違いが光の反射特性の差を生じさせていることが分かった。

3.4 炭酸カルシウム結晶化と結晶多形の観察

マベガイの真珠層を酸で脱灰して得た有機マトリックスを逆相分配系 HPLC で分離後、アミノ酸配列分析することにより PPL-2 を検出した。したがって、PPL-2 は、フジツボの BRA と同様に、有機マトリックス成分としてバイオミネラリゼーションに関与していることが示唆された。

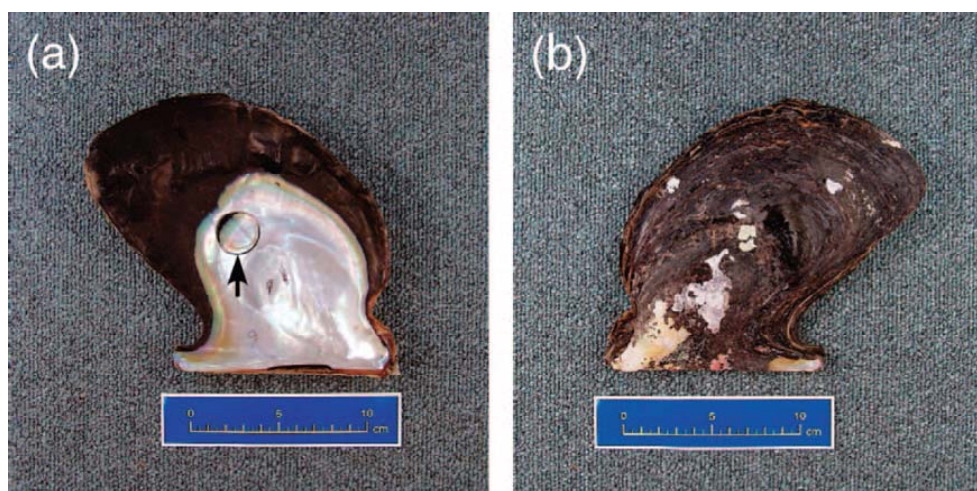


Fig. 5. Images of inner and outer morphology of a good-quality shell

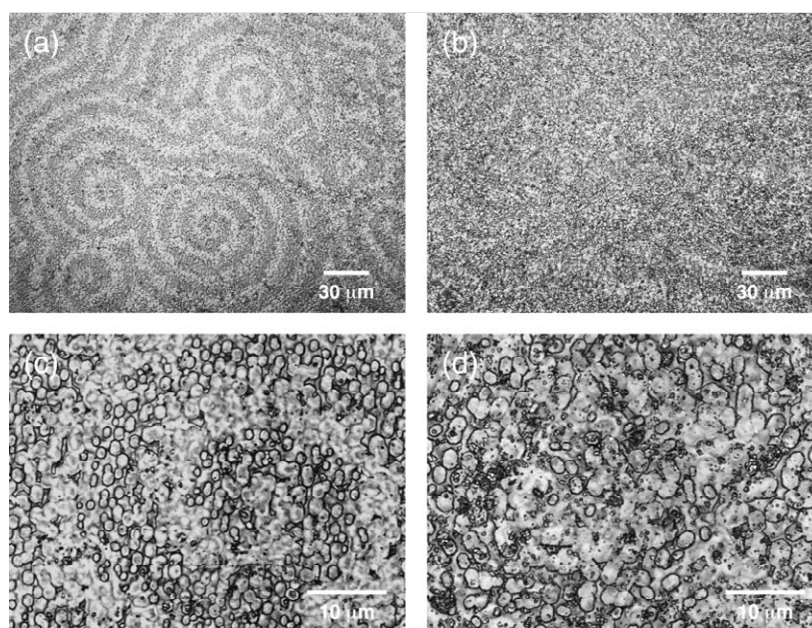


Fig. 6. Laser micrographs of surface microstructures of the nacreous layers in (a) and (c) good- and (b) and (d) bad-quality shells

アカフジツボから単離したマルチプル・レクチン(BRA)には炭酸カルシウム結晶核の形成阻害活性がみられ、その強さはカルサイトよりもアラゴナイトで強くみられた。とくにBRA-2の活性は強く、前者では13 $\mu\text{g/ml}$ 以上、後者では2 $\mu\text{g/ml}$ 以上で阻害活性を示した。このことはアカフジツボの殻が主にカルサイトで構成され、そのマトリックス成分としてBRA-2が含有されている事実と一致する⁹⁾。コントロールとして用いたBSAでは形態変化や結晶化阻害はみられず、BRAに特異的であった。FT-IRを用いて結晶多形を調べた結果、カルサイト母液ではBRAによって形態が変化しても多形には変化はみられなかった。

カルサイト母液にBRAを1.7 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えても結晶化に対する阻害はみられないが、アミノ糖(D-グルコサミン、D-ガラクトサミン、キトサンオリゴ糖)、L-アルギニン、L-ヒスチジン、およびL-アスパラギン酸を添加すると阻害がみられた。すなわち、これらの生体分子には活性の増強作用がある一方、中性糖や中性アミノ酸には阻害作用はみられなかった。

BRA存在下で結晶化したときのカルサイト結晶とアラゴナイト結晶をSEMにより観察した(Fig. 7)。カルサイト結晶では、BRAによって層状に変化する部分と平面を保つ部分とが見られ、BRAが結晶の部位特異的に作用していることが示唆された。層状に変化した部分はBRA濃度の増加に伴い拡がりを示した。アラゴナイト母液では、低濃度BRAで生成した結晶は針状結晶を保持したが、高濃度BRAでは球状や棒状の不規則な結晶形がみられた。

水産無脊椎動物の殻は炭酸カルシウムと少量の有機マトリックスから構成されており、結晶化制御に関わる有機マトリックスにはキチン質が含まれている。アカフジツボ殻から調製した有機マトリックスを固定化したガラス板とキチンの脱アセチル化物であるキトサンを固定化したキトサン膜を用い、有機マトリックス薄膜上に形成される結晶形を観察した。キチンおよびキトサンの薄膜にもカバーガラスと同様な結晶形態に変化がみられた。溶液中の結晶化ではキトサンに阻害作用がみられ、キチンには促進作用がみられたが、結晶形には違いはなかった。

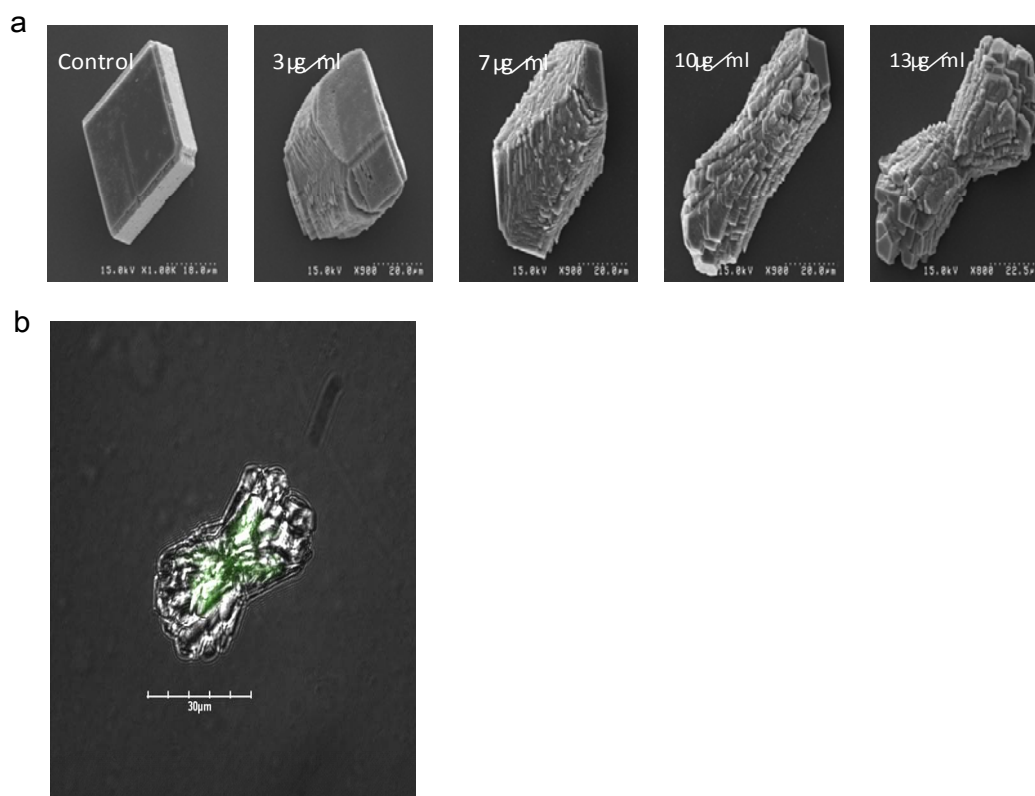


Fig. 7. Calcite formed in the presence of BRA-2. (a) SEM images of calcite crystals formed in the presence of BRA-2 (0, 3, 7, 10, 13 mg/mL). (b) Confocal microscopic image of calcite formed in the presence of 13 mg/mL FITC-BRA-2/BRA-2 (1:1 by wt).

4. 考 察

マベガイ外套膜から、異なる糖結合特性をもつ 2 種類のレクチン PPL-1 と PPL-2 を単離して生化学的特性を明らかにした。PPL1 は動物レクチンの RBL ファミリーに、PPL-2 は植物レクチンのジャカリン近縁レクチン・ファミリーに属していることが分かり、二枚貝類であるマベガイには非常に特徴的なレクチン群が存在していることが明らかになった。しかし、PPL-2 は、通常のジャカリン近縁レクチンが持つマンノースやガラクトースに対する結合特異性を失っていた。PPL-2 の立体構造を Molecular Operating Environment (MOE) を用いて予測した (Fig. 8)。ジャカリン近縁レクチンのうち、マンノース結合特異性である Heltuba とガラクトース結合特異性であるジャカリンとマルチプルアラメントを作成したところ、糖結合部位は完全に保存されており、17、133 位 Gly、134 位 Cys、135 位 Ile、137 位 Asp と、 β 、 γ では 92 位 Gly、 α では Asp が糖認識部位に関わっていると考えられる。ノーザンブロットおよびウエスタンブロットの結果から、PPL-1 と PPL-2 はマベガイの組織に幅広く存在しており、PPL はバイオミネラリゼーションなどの多様な生物機能をこれらの組織・器官で果たしていると考えられる。

マベガイ貝殻内側にある真珠層をレーザー顕微鏡と X 線回折装置で真珠層で観察した結果、アラゴナイト結晶の 3 軸配向性が光の反射特性の差を生じさせて真珠層の

良質と不良質の違いを生み出し、その要因には有機マトリックスを構成するタンパク質の機能性の関与が考えられる。すなわち、同じく有機マトリックスを構成する複合糖質などの生体分子との相互作用による結晶化の制御であり、事実、BRA および PPL のマルチプルレクチンのいずれもが多様、かつ特異的な糖鎖認識機能を持つことが FAC 分析によって明らかになった。さらに、これらの分子によって炭酸カルシウムの結晶形態が多様に変化することも実験証拠としてあげることができる。

BRA には炭酸カルシウム結晶核形成阻害作用と結晶成長阻害作用があり、BRA の糖鎖認識結合部位 (CRD) の立体構造を破壊すると結晶化阻害作用は失われ、結晶形態の変化も失われた。これらの結果から、BRA の炭酸カルシウム結晶化制御はレクチンの高次構造が重要な因子であるが CRD とは異なる構造要因が関わっていると考えられる。蛍光標識 FITC-BRA を添加して生成した結晶では、カルサイト結晶の層状部分に蛍光が局在して観察された。すなわちカルサイト菱面体結晶の表面に BRA がみられ、BRA が結合した部分は成長が止まり、結合しない部分が成長して結晶形態の変化が起こると考えられる。

5. 今後の課題

本研究では、バイオミネラリゼーション (生石灰化) を、結晶化が行われる場としてのマトリックス分子、結晶となる

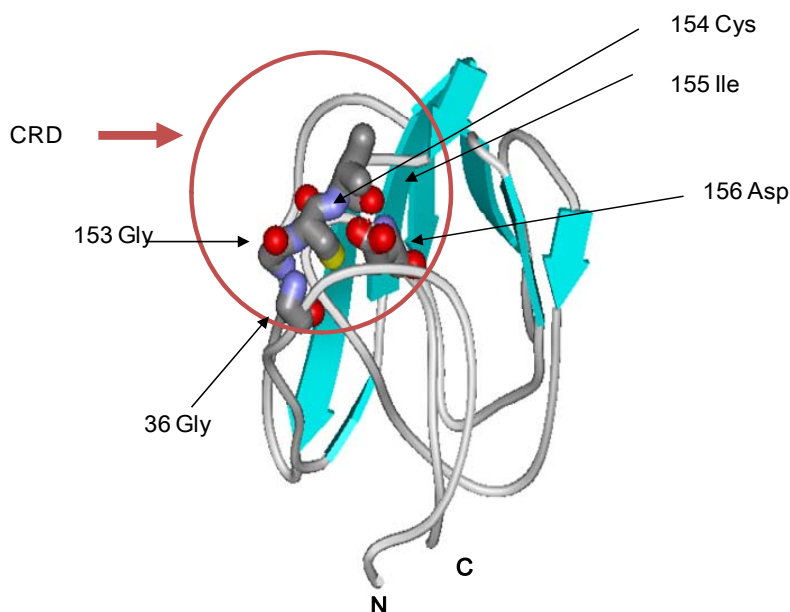


Fig. 8. The three-dimensional model of PPL-2 α subunit built from the X-ray coordinates of Heltuba (HTL)

無機分子、そして結晶化の制御に関わる諸因子の3要素に分け、制御因子としての甲殻類アカフジツボ (*Megabalanus rosa*) のマルチプルレクチン (BRA-1, BRA-2, BRA-3) と、二枚貝類マベガイ (*Pteria penguin*) 外套膜のレクチン (PPL-1, PPL-2) の生化学的特性を明らかにした。しかし、有機マトリックスには未同定の分子も存在しており、今後、これらの特性と役割を明らかにする必要がある。

文 献

- 1) Belcher, A. M., Wu, X. H., Chistensen, R. J., Hansma, P. K., Stucky, G. D., and Morse, D. E. (1996). Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell protein. *Nature* 381, 56-58.
- 2) Falini, G., Albeck, S., and Addadi, L. (1996). Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science* 271, 67-69.
- 3) Falini, G., Weiner, S., and Addadi, L. (2003). Chitin-silk fibroin interactions: relevance to calcium carbonate formation in invertebrate. *Calcif Tissue Int* 72, 548-554.
- 4) Fu, G., Valiyaveetil, S., Wopenka, B., and Morse, D. E. (2005). CaCO₃ biomineralization: acidic 8-kDa proteins isolated from argonitic abalone shell nacre can specifically modify calcite crystal morphology. *Biomacromolecules* 6, 1289-1298.
- 5) Matsubara, H., Kabuto, S., Nakahara, N., Ogawa, T., Muramoto, K., Jimbo, M., and Kamiya, H. (2005). Structure and possible function of N-glycans of an invertebrate C-type lectin from the acorn barnacle *Megabalanus rosa*. *Fish. Sci* 71, 931-940.
- 6) Muramoto, K., Yako, H., Murakami, K., Odo, S., and Kamiya, H. (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.
- 7) Matsubara, H., Ogawa, T., and Muramoto, K. (2006). Structures and functions of C-type lectins in marine invertebrates. *Tohoku J Agric Res* 57, 71-86.
- 8) 村本光二, 松原裕樹, 小川智久, 神谷久男 (2006) 生理活性物質の資源としての利用, “フジツボ類の最新学”, 日本付着生物学会編, 恒星社厚生閣, 317-334.
- 9) Koike, K., Jimbo, M., Sakai, R., Kaeriyama, M., Muramoto, K., Ogata, T., Maruyama, T., and Kamiya, H. (2004) Octocoral chemical signalling selects and controls dinoflagellate symbionts. *Biol Bull* 207, 80-86.
- 10) Naganuma, T., Ogawa, T., Hirabayashi, J., Kasai, K., Kamiya, H., Muramoto, K. (2006) Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*. *Mol. Div.*, 10, 607-618.
- 11) Matsubara, H., Nakamura-Tsuruta, S., Hirabayashi, J., Jimbo, M., Kamiya, H., Ogawa, T., and Muramoto, K. (2007) Diverse sugar-binding specificities of marine invertebrate C-type lectins. *Biosci Biotech Biochem* 71, 513-519.
- 12) Yoshimi, K., Shoji, M., Ogawa, T., Yamauchi, A., Naganuma, T., Muramoto, K. and Hanada, S. (2004) Microstructure and Orientation Distribution of Aragonite Crystals in Nacreous Layer of Pearl Shells. *Materials Transactions* 45, 999-1004.
- 13) Matsubara, H., Hayashi, T., Ogawa, T., Muramoto, K., Jimbo, M. and Kamiya, H. (2008) Modulating effect of acorn barnacle C-type lectins on the crystallization of calcium carbonate. *Fish Sci*, 74, 418-424.
- 14) 村本光二, 小川智久, 神谷久男 (2005) 動物レクチン”海洋生物成分の利用-マリンバイオのフロンティア-“, 伏谷伸宏編, シーエムシー出版, 276-289.
- 15) Watanabe, Y., Shiina, N., Shinozaki, F., Yokoyama, H., Kominami, J., Nakamura-Tsuruta, S., Hirabayashi, J., Sugahara, K., Kamiya, H., Matsubara, H., Ogawa, T., and Muramoto, K. (2008) Isolation and characterization of L-rhamnose-binding lectin, which binds to microsporidian, *Glugea plecoglossi*, from ayu (*Plecoglossus altivelis*) eggs. *Dev Comp Immunol* 32, 487-499.
- 16) Watanabe, Y., Tatenno, H., Nakamura-Tsuruta, S., Kominami, J., Hirabayashi, J., Nakamura, O., Watanabe, T., Kamiya, H., Naganuma, T., Ogawa, T., Naude, R. J., and Muramoto, K. (2009) The function of rhamnose-binding lectin in innate immunity by restricted binding to Gb3. *Dev Comp Immunol* 33, 187-197.

No. 0825

Molecular Basis of Biomimetic Nano-Technology for Controllable Crystallization of Calcium Carbonate

Koji Muramoto, Tomohisa Ogawa, and Takako Naganuma

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

Summary

Calcified hard tissues and skeletons, such as various shells and pearls, provide structural support and protection for many marine invertebrate phyla. Calcified shell layer is composed of two polymorphs of calcium carbonate, aragonite or calcite, and an organic matrix. The organic matrix is thought to function in shell formation (biomineralization) by determining structural properties such as crystal type, size and shape. The matrix, which consists of various proteins, polysaccharides and proteoglycans, can be separated into soluble and insoluble fractions. In this study, the modulating effect of invertebrate lectins, and organic matrices on the crystallization of calcium carbonate was investigated. The multiple C-type lectins isolated from the acorn barnacle, *Megabalanus rosa*, inhibited the nucleation and growth of calcium carbonate crystals. The crystals of aragonite and calcite were formed in the presence of lower concentrations of lectins. The morphology of the crystals was examined by optical, electron, confocal, and FT-IR spectroscopy.

Microstructure and orientation distribution of aragonite crystals in the nacreous layer of *Pteria penguin* shells were examined. Helical patterns drawn by growth forefronts of the nacreous layer were observed by a laser microscope for good-quality shells, whereas no clear pattern was observed for bad-quality ones. The aragonite crystals in the nacreous layer of the good-quality shell seem to be harmonically oriented along a crystallographic direction. Novel lectins, PPL-1 and PPL-2, were isolated from the mantle of *Pteria penguin* by affinity chromatography and cation exchange chromatography. PPLs showed sequence homologies to unique lectin families and characteristic sugar-binding specificities. PPL-2 was detected in the organic matrix of the shells.

The obtained findings indicate that lectins play an important role in biomineralization as organic matrix components and can be applied to artificial crystallization in the sect of nanotechnology.