

助成番号 0629

有機マトリックス薄膜上における炭酸カルシウムの結晶化制御

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科

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(キチン薄膜)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)の相互作用を調べ、炭酸カルシウムの結晶化制御を検討した。

フジツボ体液の主要タンパク質であるBRAは糖鎖構造を認識して結合するタンパク質であるが、さらにBRAには過飽和炭酸カルシウム溶液における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 µg/ml以上、後者では2 µg/ml以上で阻害活性を示した。フーリエ変換赤外分光スペクトルを用いて結晶多形を調べた結果、両結晶多形に対するBRAの影響にも違いがみられた。BRAの阻害活性は、アミノ糖(グルコサミン, キトサンオリゴ糖)や塩基性アミノ酸(アルギニン, ヒスチジン)により増強された。有機マトリックス薄膜上でも同様な結晶形態の変化がみられた。BRAを変性させると結晶化阻害作用や結晶形態への影響も失われた。この結果から、結晶化制御にはBRAの高次構造が重要な因子であることが分かったが、リガンド糖の添加によっても変化はみられず、糖鎖認識部位とは異なる構造要因が関わることが明らかになった。

BRA存在下で生成したカルサイト結晶には層状の部分と平面の部分が見られ、結晶への蛍光標識BRAの部位特異的結合が共焦点レーザー顕微鏡で観察された。すなわちカルサイト菱面体結晶の表面にBRAが結合して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することが分かった。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BRAによって結晶形を多様化させた。これらの結果から、フジツボの殻形成の場に倣った条件により炭酸カルシウムの結晶化を制御することが可能性であることが示された。

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、ナノテクノロジー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考えられている^{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、両者の相互作用が可能となる。

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三要素に分けて、これらの要素の相互関係を明らかにすることによりナノレベルでの結晶化制御を検討した。すなわち、キチン薄膜を有機マトリックスとして、また、水産甲殻類フジツボ(*Megabalanus rosa*)のマルチプルレクチンを結晶化制御因子として用い、炭酸カルシウム結晶化の制御を試みた。

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⁾。それぞれの

レクチンを蛍光試薬 FITC で修飾後、過剰試薬を除去、透析して凍結乾燥した。また、レクチンを 0.4 M 炭酸水素アンモニウム/6 M 尿素中、ジチオスレイトールで還元後、モノオドアセトアミドで修飾した CAM-BRA を調製した。

2.2 有機マトリックスの調製

アカフジツボ殻を 4%酢酸で脱灰し、その可溶性画分を限外ろ過で分子量 20,000 以下を除去・濃縮後、透析・凍結乾燥して有機マトリックス画分を得た。これを陰イオン交換クロマトグラフィー (Hi Trap Q HP) 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) (カラム: Wakosil 5C4-200) に供して分離した。溶出は 0.1%トリフルオロ酢酸を用いてアセトニトリルのグラジエントで行った。

高分子キトサンの 4%酢酸溶液をカバーガラス(18×24 mm)の片面に塗付し、シャーレ(φ 90×15 mm)に塗付面を上にして並べた。15 分間室温に放置して脱泡後、メタノール:4 M NaOH(10:1) (使用時調製)を加え、1 時間浸漬して固定化した。水洗後、さらにメタノールと蒸留水で洗浄、一晚風乾させてキトサン膜を作製した。

キチン膜を無水酢酸でアセチル化してキトサンを作製した。風乾したキトサン膜を 1.0 M 無水酢酸/メタノールに浸し、室温で 4 時間振とうした。これをメタノールと蒸留水で洗浄後、風乾させて使用した。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-4100 type A, BioRad) で行った。

2.3 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。プラスチック・シャーレ (φ 30×10 mm, φ 60×10 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 BRA を添加した。この結晶母液にカバーガラスまたはキチン膜、キトサン膜を入れ、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 (BRA) と有機マトリックス (セメントタンパク質) を添加して炭酸カルシウム結晶化を行った。有機マトリックス濃度は 0~100 μg/3 ml とし、BRA は 20~40 μg/3ml に調整した。BRA を加えずに有機マトリックスのみを添加したものをコントロールとした。また、結晶化におけるレクチンの作用に対するリガンド糖の影響をみるために、カルサイト母液にガラクトースを加えて実験を行った。

2.4 結晶化阻害活性に対する生体分子の影響

カルサイト母液における BRA の結晶化阻害活性に対する生体分子の影響を、pH スタット自動適定装置 (Toa Electronics, AUT-211) を用いて調べた⁶⁾。pH は 8.5 に設定し、単糖 (20 mM)、キチンオリゴ糖 (0.05%)、キトサンオリゴ糖 (0.05%)、アミノ酸 (10 mM)、アミン類 (0.07~10 mM)、有機酸 (24~40 μM) の共存下、BRA の活性をアルカリ消費量によって測定した。

2.5 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 (Olympus Fluoview FV1000 FV10-ASW) によって観察した。FITC-BRA を添加後、遮光条件下で 3 日間、20°C で炭酸カルシウム結晶をカバーガラス上に成長させた。スライドガラス (76×26×0.8~1.0 mm) に退色防止封入剤 (Aqua-Poly Mount) を 1 滴のせた上に、生成した結晶がスライドガラス側になるようにカバーガラスを被せて風乾させた。油浸して共焦点レーザー顕微鏡にセットし、微分干渉画像と蛍光画像を撮影した。

3 日間インキュベートした反応溶液からカバーガラスおよびキチン膜、キトサン膜を取り出して蒸留水で洗浄後、スライドガラス (76×26×0.8~1.0 mm) にのせ、炭酸カルシウム結晶の核形成と成長を光学顕微鏡 (Olympus BH-2) で観察した。結晶をイオンスパッター (E-1030 イオンスパッター装置: Hitachi) で白金-パナジウム (Pt-Pd) コーティング後、走査型電子顕微鏡 (SEM: Hitachi S-4200 走査型) で観察した。炭酸カルシウム結晶多形の同定は、KBr を用いたペレット法で FT-IR スペクトルを測定して行った。

3. 研究結果および考察

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 μg/ml 以上、後者では 2 μg/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⁷⁾。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 (Fig. 1)。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。一方、低濃度 BRA 存在下のアラゴナイト母液から生成した結晶ではアラゴナイトを示すスペクトルが観察されたが、

高濃度BRAではそのスペクトルはみられなかった (Fig. 2)。BSAを加えたときには、カルサイト母液からはカルサイトが、アラゴナイト母液からはアラゴナイトが生成された。このとき炭酸カルシウムの結晶核が形成されてからBRAを加えた。

カルサイト母液とアラゴナイト母液とも、BRAを添加するとそれ以降の結晶成長が阻害されたが、この結晶成長阻害作用は核形成阻害よりも低濃度でみられた。

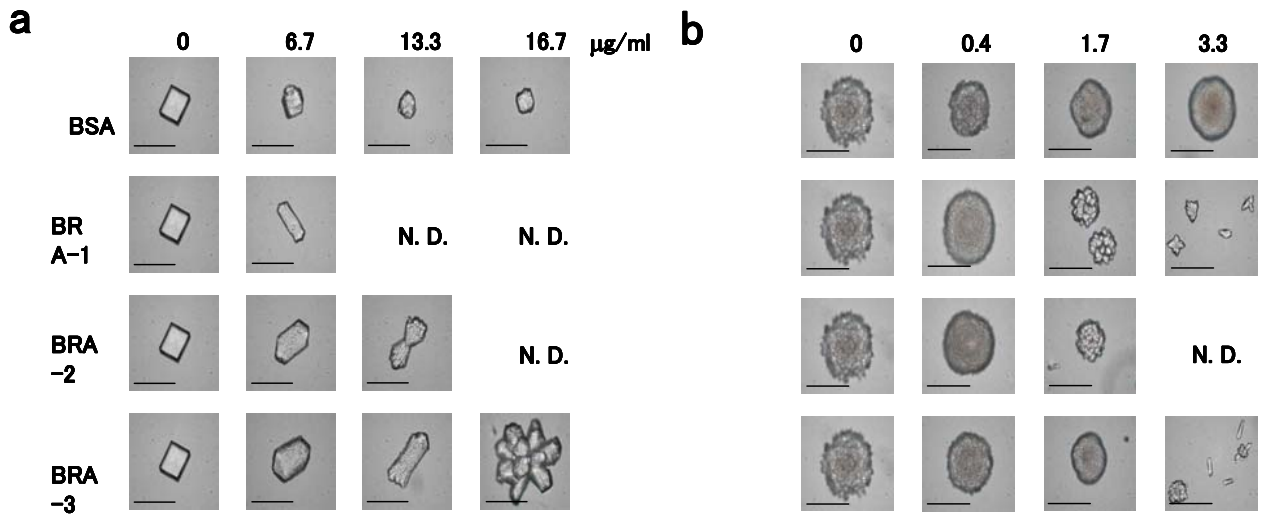


Fig. 1 Dose-dependent inhibition of BRAs toward calcite (a) and aragonite (b) crystallization. N. D.: No crystals. Scale bar = 100 µm.

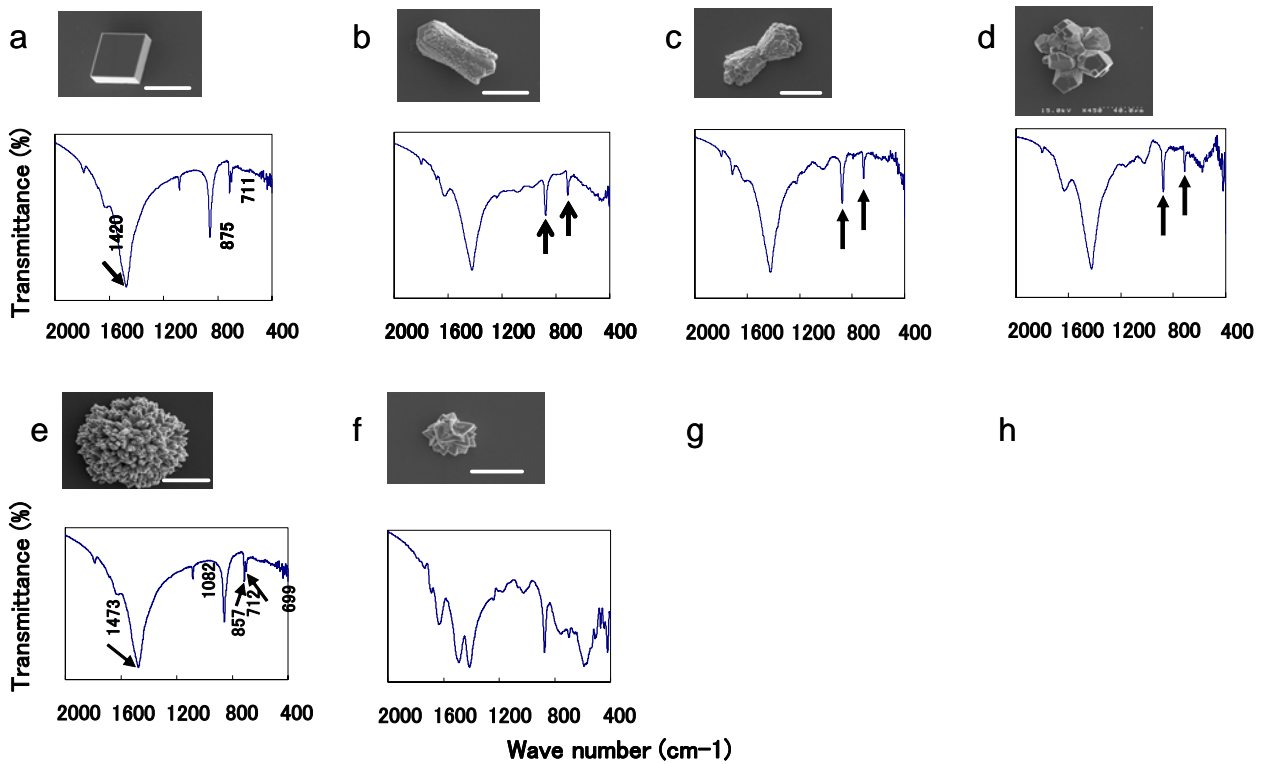


Fig. 2 SEM images (top) and FT-IR spectra (bottom) of calcite (a-d) and aragonite (e-h) formed in the absence (a, e) or in the presence of BRAs. BRA-1: 6.7 (b), 3.3 (f) µg/ml, BRA-2: 13.3 (c), 1.7 (g) µg/ml, BRA-3: 16.7 (d), 3.3 (h) µg/ml. Scale bar = 30 µm.

BRA の結晶化阻害活性に対する生体分子の影響を調べた。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-アルギニンや 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 (Fig. 3)。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そのような作用はみられなかった。

BRA 存在下で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。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。本研究では、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 (Fig. 4)。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。

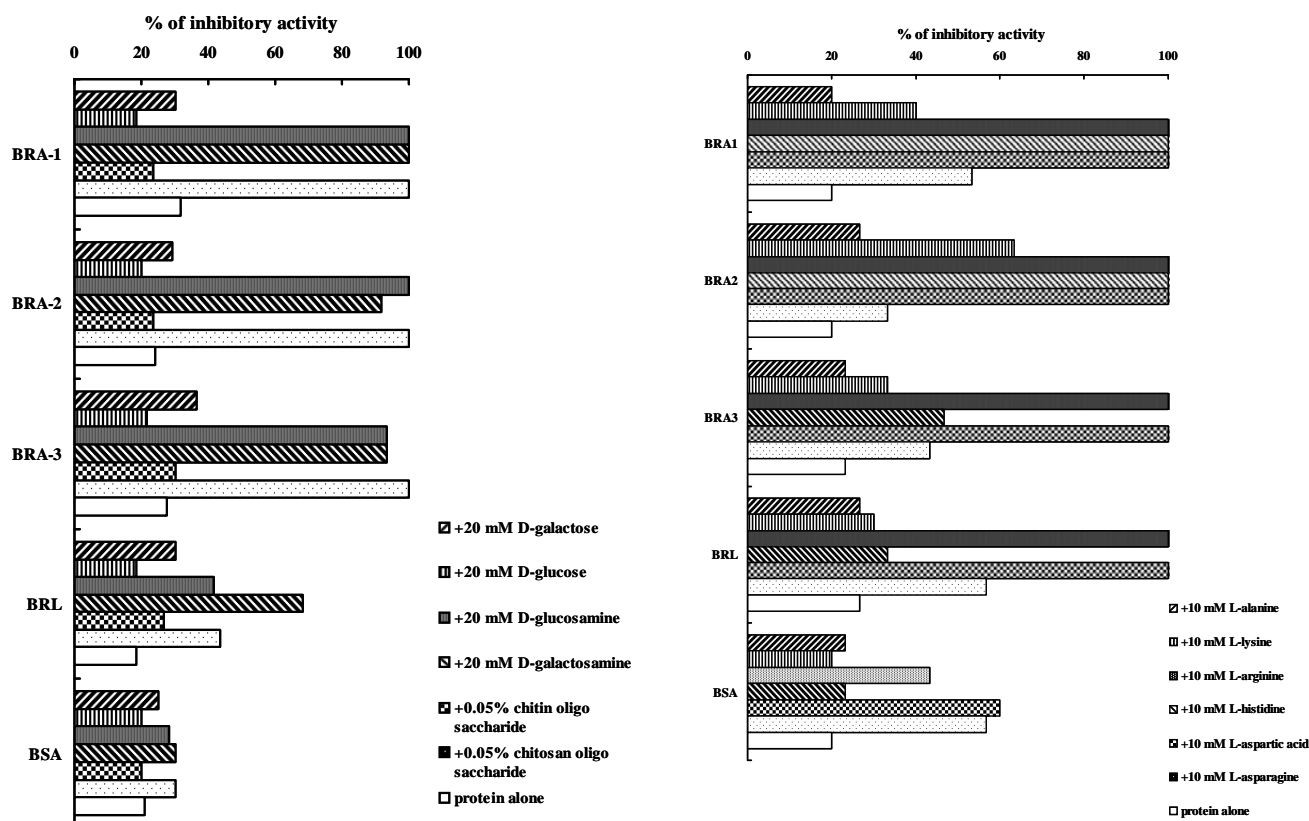


Fig. 3 Effect of various additives on the inhibitory activity of BRAs. BRA concentrations were 1.7 $\mu\text{g/ml}$. BRL: *Balanus rostratus* lectin, BSA: bovine serum albumin. Each additive showed no inhibition activities toward calcium carbonate crystallization at the concentration used.

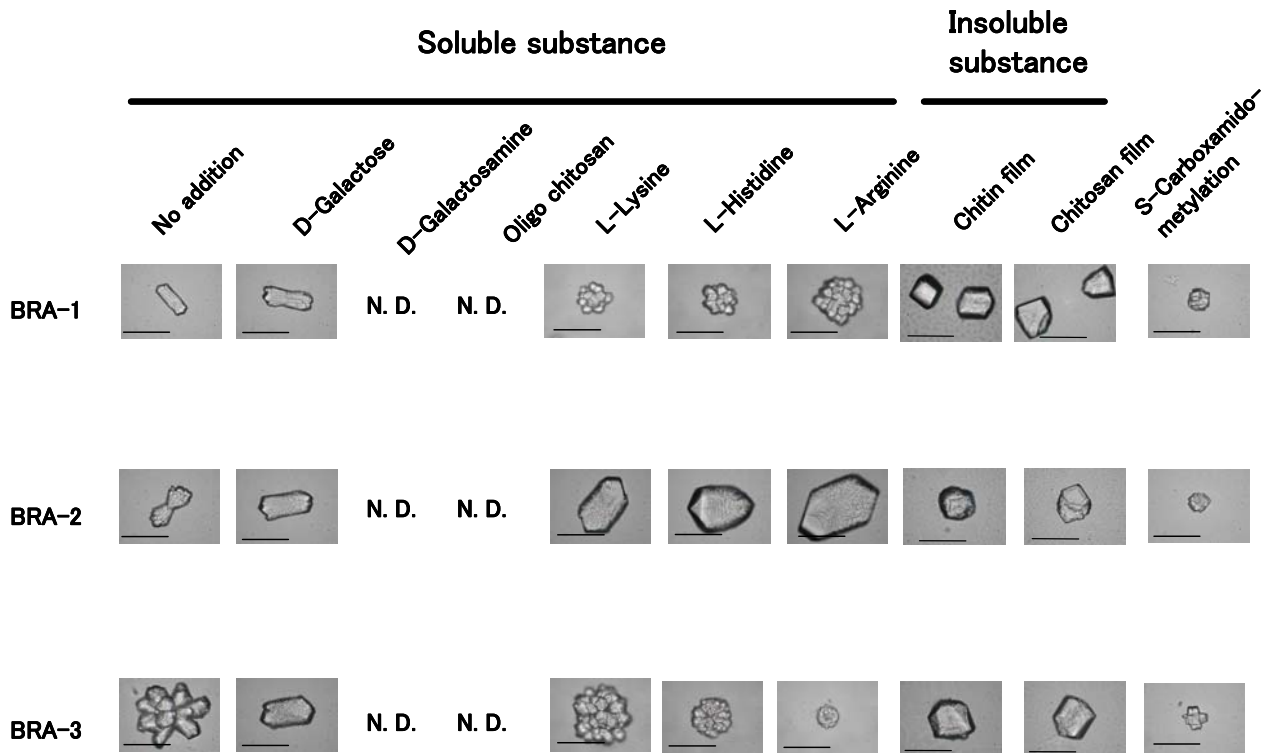


Fig. 4 Effect of various additives on the crystal growth of calcium carbonate in the presence of BRAs (1.7 µg/ml).

アカフジツボの殻から調製した有機マトリックスには殻の接着に関わるセメントタンパク質が含まれていた。セメントタンパク質は炭酸カルシウムの結晶形に変化を引き起こし、その形は CAM-BRA 存在下で生成した結晶に似ていた。セメントタンパク質を BRA と一緒に加えた場合、棒状結晶が丸みを帯びる形態変化がみられたが多形は変化しなかった。

以上の結果から、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ることが明らかになった。そこで BRA の糖鎖認識結合部位 (CRD)^{8,9)} の立体構造と作用の関連を検討した。まず BRA の特異糖であるガラクトースを加えて結晶を作成したところ、レクチン活性が阻害される濃度の 2 倍のガラクトースを加えても形態・多形には変化はみられなかった。還元カルボキサミドメチル化して立体構造を破壊した BRA では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ることが示された。

FITC-BRA を添加して生成した結晶では、従来とは異

なる結晶形を示し、蛍光の局在化が観察された。FITC-BRA のみでは結晶化阻害されたが、未修飾 BRA を 1:1 で混合して生成したカルサイト結晶の層状部分に蛍光が観察された。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ことが示された。

4. まとめと今後の課題

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、これらの要素の相互関係を調べて結晶化制御を検討した。制御因子として用いたアカフジツボ (*Megabalanus rosa*) のマルチプルレクチン (BRA-1, BRA-2, BRA-3) は、いずれも有機マトリックス薄膜上の炭酸カルシウム結晶の結晶核の生成と成長を制御するとともに、アミノ糖や塩基性アミノ酸によって作用が調節を受けることが明らかになった。結晶形にはレクチンによる違いがみられ、今後の研究の進展により、結晶化制御の自由

度が増すことが期待できる。今後の課題としては、より多くの有機マトリックスと制御因子を探索して、それらの特性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) Bourget, E. (1987). Barnacle shell: composition, structure and growth. in *Barnacle biology* (Edited by Southward A. J.), A. A. Balkema, Rotterdam.
- 8) 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.
- 9) 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.

No. 0629

Modulating Effect of Organic Matrix on the 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 C-type lectins and organic matrices on the crystallization of calcium carbonate was investigated. The multiple C-type lectins, named BRA-1, -2 and -3, isolated from the acorn barnacle, *Megabalanus rosa*, inhibited the nucleation and growth of calcium carbonate crystals. Among BRAs, BRA-2 most efficiently inhibited the crystal nucleation of aragonite and calcite at the concentrations of >1.7 and >13.3 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The inhibitory activities of BRAs were enhanced by the addition of various biomolecules such as glucosamine, galactosamine, chitosan oligosaccharides, arginine, and aspartic acid. Although the crystals of aragonite and calcite were formed in the presence of lower concentrations of BRAs, the shape and size of the crystals were changed. The formed crystals were examined under various microscopy (optical, electron and confocal) and analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy. The interaction between BRAs and soluble substrates and its effect on the crystallization of calcite and aragonite were examined. The morphology of the formed crystals was also studied. The obtained findings indicate its applicability to artificial crystallization in the sect of nanotechnology.