

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井上 宏隆

---

多くの生物はその細胞内外に鉱物を主成分とする硬組織を形成し、体の保持、外敵からの防御等に利用している。このように生物が鉱物を形成する現象をバイオミネラリゼーション(生鉱物形成作用)といい、それによって形成された無機鉱物をバイオミネラルと呼ぶ。このバイオミネラリゼーションは原核生物から哺乳類まで、生物において普遍的に見られ、生物により厳密に制御された反応であるが、その機構は不明な点が多い。これまでの研究から、バイオミネラルに含まれる少量の有機基質によってバイオミネラリゼーションが制御されていると考えられており、これらの有機基質が結晶の核形成の促進や抑制、結晶多形の選択、結晶成長の制御を行うことにより、人工では作り得ない高機能で高性能な有機-無機複合体を形成すると考えられている。本論文は、代表的なバイオミネラルのひとつであるアメリカザリガニの外骨格を対象にしてそこに含まれる基質ペプチドの構造と機能を調べたもので、序論と3章からなる。

序論では、研究の背景と申請者が修士課程で行った研究、すなわちアメリカザリガニの外骨格から基質ペプチドとして calcification-associated peptide (CAP) -1 および CAP-2 を単離し、その化学的性質について調べた結果について概説している。

第1章では、これら2つのペプチドをコードする cDNA のクローニングと発現解析について述べている。CAP-2 においては、その ORF はシグナルペプチドと CAP-2 ペプチド本体をコードしているのに対して、CAP-1 ではシグナルペプチドと CAP-1 ペプチド本体以外に CAP-1 ペプチドの C 末端に天然物ペプチドには存在しない Arg-Lys をコードしていた。Northern hybridization と RT-PCR の結果、CAP-1 および-2 は外骨格の石灰化が起こる脱皮後期特異的に、石灰化に関与する表皮組織において強く発現していることから、CAP-1 および-2 は脱皮後期の表皮組織で合成され、クチクラに分泌された後に、キチンと結合し、外骨格の石灰化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

第2章では、組み換え体および変異体ペプチドを用いた外骨格基質ペプチドの機能解析および高次構造解析について述べている。得られた cDNA の塩基配列を基に、大腸菌を用いた CAP-1 および-2 の組み換え体(rCAP-1 および rCAP-2)、CAP-1 関連ペプチド(rCAP-1-RK: rCAP-1 の C 末端に Arg-Lys を付加、S70D:リン酸化されるべき 70 残基目の Ser を Asp に置換、ΔN: N 末端 17 残基を削除、ΔC: C 末端 17 残基を削除)の発現系を構築した。すべてのペプチドは誘導後の菌体破砕物の可溶性成分から回収され、2段階の逆相 HPLC によって精製した。これらの組み換え体の *in vitro* における炭酸カルシウム結晶形成阻害活性を測定した結果、ΔN およびΔC の活性はそれぞれ天然物の約 60%お

よび 50%であったことから、N 末端および C 末端領域共に阻害活性に重要であることがわかった。また、rCAP-1 と S70D の活性が約 70%および 80%であり、rCAP-2 が天然物とほぼ同程度の活性であったことから、CAP-1 の 70 残基目のリン酸基の重要性が示された。一方、rCAP-1-RK は rCAP-1 と比較して活性が上昇した。

次に、これらのペプチドのカルシウム結合活性を測定した。すべてのペプチドは濃度依存的な結合を示し、Scatchard 解析の結果、 $\Delta C$  と rCAP-2 以外はカルシウムに対して 2 つの結合様式を有していることがわかった。 $\Delta C$  は rCAP-1 と比較してカルシウムに対する親和性が低下し、rCAP-2 ではその結合量が少ないことがわかった。以上の結果から、CAP-1 の C 末端領域がカルシウムに対する親和性および結合量の両方に重要であることがわかった。

*In vitro* におけるこれら 2 つの機能とペプチドの高次構造の関係性を明らかとすることを試みた。CD スペクトルから、rCAP-1 および変異体ペプチドは $\alpha$ -ヘリックスを含まない構造をしており、 $Ca^{2+}$ の濃度依存的にスペクトルが変化することがわかった。また、 $\Delta N$  ではそのスペクトルが他のペプチドと比較して大きく変化したことから、CAP-1 の N 末端領域はペプチドの構造の維持に寄与していることが示唆された。大腸菌を用いて $^{15}N$  ラベルした rCAP-1 を調製し、NMR スペクトルを測定したが、rCAP-1 は溶液状態ではランダムな構造を有しており、その立体構造を解析することはできなかった。

第 3 章では、CAP-1 の発現制御機構の解析について述べている。CAP-1 は脱皮後期において特異的に発現していることから、その遺伝子の発現は特殊な機構により制御されていると考えられる。そこで発現に重要な領域を特定し、その機構を明らかとするために CAP-1 の上流領域約 1.7 kbp をルシフェラーゼ遺伝子に結合し、レポーターアッセイを行った。様々な長さの上流領域について COS7 細胞に用いて解析を行った結果、コントロールと差がなかったことから、CAP-1 の上流領域は COS7 細胞では機能しないことが示唆された。一方、ザリガニ表皮の組織培養系において、20-ヒロドキシエクジソンに一旦曝された後、それがなくなることによって CAP-1 遺伝子が発現することがわかった。

以上、本論文はアメリカザリガニの外骨格に含まれる 2 種類の微量ペプチド CAP-1 および-2 の構造機能相関解析、遺伝子解析、遺伝子発現解析、カルシウム結合解析、立体構造解析等を行い、外骨格の石灰化におけるこれらのペプチドの機能を推定したもので、バイオミネラリゼーション研究領域において基礎的、応用的にきわめて重要な知見を与えるものである。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。