

[原著]

X線溶液散乱法による nacrein の構造解析

法月美智子*・高倉大輔*・佐藤 衛**・佐俣哲郎***

Tertiary structure of the nacrein inferred from analysis of small-angle X-ray scattering

NORIZUKI, Michiko*, TAKAKURA, Daisuke*, SATO, Mamoru** and SAMATA, Testuro***

Abstract

Molluscan shell is mainly composed of CaCO_3 crystal with little amount of organic matrix (OM). Carbonic anhydrase (CA) is thought to be one of the most important enzyme for molluscan shell formation which catalyzes interaction between CO_2 and HCO_3^- . Nacrein is the main component in the soluble organic matrix (SM) protein in the nacreous layer of *Pinctada fucata* cultured in Japan (Japanese pearl oyster), which contains two functional domains one is a carbonic anhydrase-like domain (CA domain) and another is a repeat sequence domain rich in Asn and Gly (NG-repeat domain).

In this paper showed tertiary structure of nacrein inferred by Small Angle X-Ray Scattering. Tertiary structure analysis of nacrein by using the Small Angle X-ray Scattering resulted in calculated molecular weight of nacrein approximately 47kDa and inferred form of it as "S-model".

キーワード：アコヤガイ，ナクレイン，立体構造，溶液散乱法，DUMMY ATOM MODEL

1. 序文

アコヤガイ (*Pinctada fucata martensii*) の殻体では、殻体外層を作る稜柱層は方解石、内層を作る真珠層はアラレ石の結晶で構成されている。これらの結晶形や殻体微細構造を決定するのに関与していると考えられているのが有機基質 (organic matrix; OM) である。OM は、脱灰溶液、バッファー、水などに不溶性の不溶性有機基質 (insoluble matrix; ISM) (Frémy, 1855) と、これらの溶液に可溶性の可溶性有機基質 (soluble matrix; SM) (Crenshaw, 1972) に区分される。

Miyamoto ら (1996) は、アコヤガイの真珠層中に

含まれる 48kDa の SM の主成分をコードする遺伝子の塩基配列を決定し、この成分を nacrein と命名した。nacrein は、ヒトの炭酸脱水酵素 II (carbonic anhydrase II : CA II) と相同性をもつ CA 類似ドメインと、アスパラギン(N)とグリシン(G)の繰り返し配列から成る NG 繰り返し配列ドメインを持つ 447 個のアミノ酸からなるタンパク質である。OM タンパク質の機能は不明なものが多いが、nacrein に関しては CA 活性部位の存在から、殻体形成時において炭酸の沈着に重要な役割を果たしていると考えられている (Miyamoto, 1996)。

生物の体内では、多種多様なタンパク質がそれぞれ

2007年2月28日受付，2007年6月11日受理

* 麻布大学大学院環境保健学研究科細胞生物学研究室

Laboratory of Cell Biology, Graduate School of Environmental Health, Azabu University

** 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子構造科学研究室

Laboratory of Structural Science of Biological Super-molecules, Graduate School of International General Sciences, Yokohama City University

*** 〒229-0006 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71 麻布大学大学院環境保健学研究科細胞生物学研究室

To whom correspondence should be addressed. Laboratory of Cell Biology, Faculty of Environmental Health, Azabu university, Sagamihara 229-0006, Japan; Tel: 04277692560, Fax: 04277692560. E-mail: samata@azabu-u.ac.jp.

の機能を果たしている。タンパク質の機能の発現には、その立体構造（三次構造）が深く関係している。従って、タンパク質の機能を理解するためには、タンパク質の立体構造を原子レベルで明らかにすることが必要である。

本論文は、nacrein の構造解析により殻体形成への関与の機構を明らかにすることを目的としている。真珠層中に含まれるアコヤガイ nacrein の X 線溶液散乱法を用いた構造解析を行った。X 線溶液散乱は、nacrein の形状やサイズ、サブユニットの相対配置などの構造情報を得るために行なった。

2. 分析試料

アコヤガイ (*Pinctada fucata martensii*) 石川県能登産の天然地貝

殻体は、粉末にし、pH7.5の10.5M EDTA-4Na (0.02%のアジ化ナトリウムを含む) 溶液で約2日脱灰を行った。脱灰後、脱灰液のEDTA-4Naが除去されるまでイオン交換水中で透析を行った。

アコヤガイ SM から、ウサギ抗ヒト CA II IgG 抗体 (フナコシ株式会社) を用いて nacrein の単離を試みた。アフィニティークロマトグラフィーは、アフィニティゲル Hx イムノアフィニティークット (Nippon Bio-Rad Laboratories) のプロトコールに準拠して行った。

3. 分析方法

X 線散乱強度データの収集は、横浜市立大学で開発された X 線溶液散乱システム (SAXS-YOKOHAMA) を用いて行なった。測定条件は、波長1.54 Å, タンパク質の濃度は nacrein では8.0mg/ml, 測定温度20°C, 露出時間11時間で行なった。

一次元の溶液散乱データを使った nacrein の低分解能溶液構造解析は、プログラム DAMMIN を用いて行なった。

4. 結果と討論

X 線溶液散乱法は、溶液状態の試料に X 線を照射し、散乱される比較的 low angle (小角) 領域の X 線強度の角度分布から試料の構造に関する情報を取り出す方法である。X 線溶液散乱法では、未知の高分子の形状やサイズ、サブユニットの相対配置などの構造情報が得られる。本研究では、nacrein の溶液中での会合状態や分子の形状を調べるために、X 線溶液散乱を測定した。今回の測定で得られた nacrein の X 線溶液散乱データ $I(q)$ のギニアプロットの傾きおよび $I(q)$ のフーリエ変換によって得られる距離分布関数 $P(r)$ から nacrein 分子の慣性半径 R_g および分子最大 D_{max}



Fig.1. DAM structure of nacrein

をそれぞれ32.1 Åおよび130 Åと見積もった。次にプログラム DAMIN を用いて行った nacrein の低分解能溶液構造の DUMMY ATOM MODEL (DAM) を Fig.1に示した。この溶液構造解析から、nacrein 分子は、溶液中で“S型”をとっていることが明らかになった。また、DAM から R_g および D_{max} を求めると $R_g=31.47\text{Å}$, $D_{max}=112.1\text{Å}$ となり、ギニアプロットと距離分布関数 $P(r)$ から算出した値とよい一致を示した。溶液散乱から得られた DAM の構造では、分子の体積と分子量の間には体積=分子量×2という相関がある。nacrein の DAM の排除体積は $9.502\times 10^5\text{Å}^3$ と算出されるので、ここから計算される nacrein の分子量は約47kDa と見積もられた。

溶液散乱法を用いた分析の結果、DUMMY ATOM MODEL により計算された nacrein の予想分子量は約47kDaであった。この分子量は、Miyamotoら (1996) によって報告された分子量と一致している。タンパク質は外側に親水性のアミノ酸が、内側に疎水性のアミノ酸が集合して安定した立体構造を形成している。nacrein は、CA 類似ドメインに NG 繰り返し配列ドメインが挟まれた構造を持つ。NG 繰り返しドメインを構成するアスパラギンは親水性であり、グリシンは側鎖を持たない。側鎖を持たないグリシンはグループ構造と呼ばれる可動性を持って外に伸びた形を取り、他の分子と会合しやすい構造をしていると推測される。GENETYX-MAC9.0による二次構造予測を行なった結果、NG 部分は α ヘリックスも β シート構造も取らない配列であることより、DAM の結果を強く支持するものであった (Fig.2)。nacrein は、CA 類似ドメインのある N 末端側と C 末端側でコアを形成し、NG 繰り返しドメイン部位は立体構造を形成しない「揺らぎ」の状態が存在し、他の分子と会合しやす

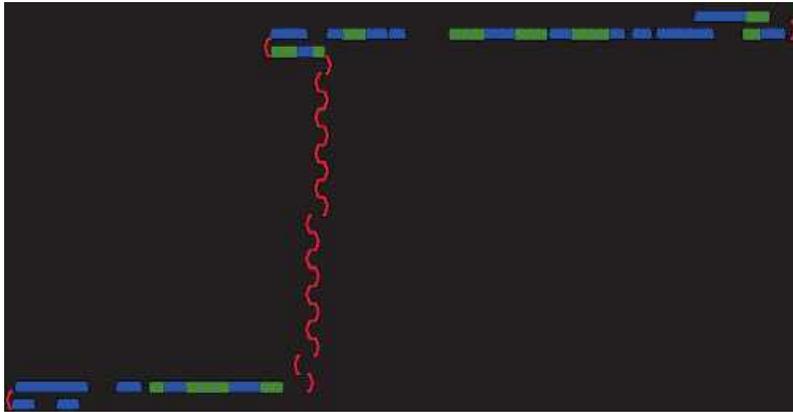


Fig.2. Secondary structure of nacrein

い立体構造を取っていると予測される。X線溶液散乱法の結果より、DUMMY ATOM MODELにおいて nacrein 1分子の形状が“S型”であった。“S型”の形状は、上部と下部の湾曲部分が nacrein のCA類似ドメイン、上部と下部を結ぶ部分がNG繰り返しドメインとして存在していると示唆される。溶液中で nacrein は、NG繰り返しドメインを介して「揺らぎ」の状態で存在していると推測される。

本研究では、溶液散乱法を用いて nacrein の三次構造の輪郭を明らかにすることができた。これは、軟体動物の殻体タンパク質における最初の報告例であり、殻体-OM-タンパク質の殻体形成機構への関与を考える上で大きな意味を持つ。今後、発現 nacrein の構築を行った上でX線結晶構造解析を試み、このタンパク質の三次構造を決定する必要がある。さらに、近

年、無脊椎動物骨格中のOMがヒトの骨、歯形成を促進するという報告例があることなどは、このようにOMを再生医療へ応用するというような新しい研究分野の展開につながる可能性を秘めている。

引用文献

- Crenshaw, M. A. (1972) The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biomaterialization* **6**, 6-11.
- Frémy, M. (1855) Recherches chimiques sur les os. *Ann. Chem. Phys.* **43**, 47-107.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T. and Matsushiro, A. (1996) A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 9657-9660.