

Form 3

## 論 文 要 旨

Abstract

## 論 文 題 目

Title Analysis of proteinaceous components on the biomineralization of calcitic sclerites from the two alcyonarian coral species

**Abstract**

Calcified organic substances in the skeleton contain a protein-polysaccharide complex taking a key role in the regulation of bio-calcification. However, information concerning the matrix proteins in alcyonarian and their effect on calcification process is still unknown. For this reason, I have studied the proteinaceous organic matrices of endoskeletal sclerites from the alcyonarian corals, *Lobophytum crassum* and *Simularia polydactyla*, to analyze the proteins with their sequences and investigate the functional properties of the proteins present. The separated sclerites from the colonies of both species were identified by Scanning electron microscope (SEM). By recording the decline of pH in the experimental design, the inhibitory effect of the matrix on  $\text{CaCO}_3$  precipitation was revealed. In an in vitro assay, I show that the matrix proteins extracted from the calcitic sclerites induce the formation of amorphous calcium carbonate prior to its transformation into the calcitic crystalline form. I also show scanning electron micrographs of the rhombohedral calcite crystals used as template, the protein imprinted with these crystals. Analysis of proteinaceous components in the soluble fraction of *L. crassum* shows particularly high content of aspartic acid followed by alanine, glycine and glutamate. Aspartic acid, glycine, alanine and glutamate are most abundant residues in the insoluble fraction. In both cases, the fractions show the highest concentration of aspartic acid from the total proteins.

Prior to electrophoresis, our analysis of proteins extracted from the soluble and insoluble organic matrices of the sclerites revealed an abundance of proteins in molecular weight. The sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of the preparations in the soluble fraction showed four bands of proteins with the apparent molecular weights of 102, 67, 48 and 37 kDa for *L. crassum* and seven bands with 109, 83, 70, 63, 41, 30, and 22 kDa for *S. polydactyla*. The SDS-PAGE analysis in the insoluble matrices shows the protein fractions at 67 and 48 kDa for *L. crassum* and five protein fractions at 109, 83, 70, 63, 30 and 22 kDa for *S. polydactyla*. A major band of about 67 kDa protein in *L. crassum* and two bands of proteins of about 70 and 63 kDa in *S. polydactyla* yielded N-terminal amino acid sequences. Periodic acid-Schiff staining (PAS) for both fractions indicated that the 67-kDa protein in *L. crassum*, and 83 and 63-kDa proteins in *S. polydactyla* were glycosylated. For detection of calcium binding proteins, a  $\text{Ca}^{2+}$  overlay analysis was conducted in the extract with a  $^{45}\text{Ca}$  autoradiography. The 102 and 67 kDa calcium binding proteins in *L. crassum*, and the 109 and 63 kDa  $\text{Ca}^{2+}$  binding proteins in *S. polydactyla* were found to be radioactive. An assay for carbonic anhydrase (CA), which is thought to play an important role in the process of calcification, revealed specific activities. Newly derived protein sequences were subjected to bioinformatics analysis involving identification of similarities to other proteins. These findings suggest that the endoskeletal sclerites of alcyonarian corals have protein-rich organic matrices, which might be related to the calcification process.

Name MD. AZIZUR RAHMAN

平成18年8月17日

琉球大学大学院  
理工学研究科長 殿

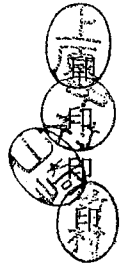
論文審査委員

主査 氏 名 上 原 剛

副査 氏 名 中 村 宗 一

副査 氏 名 山 崎 秀 雄

副査 氏 名 竹 村 明 洋



### 学位（博士）論文審査及び最終試験の終了報告書

学位（博士）の申請に対し、学位論文の審査及び最終試験を終了したので、下記のとおり報告します。

記

申請者	専攻名 海洋環境学 氏名 Rahman Md. Azizur 学籍番号038563J	
指導教員名	上 原 剛	
成績評価	学位論文 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格	最終試験 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格
論文題目	Analysis of proteinaceous components on the biomineralization of calcitic sclerites from the two alcyonarian coral species.	
審査要旨（2000字以内）		
論文題目の和文：刺胞動物ウミトサカ目2種のカルサイト骨片の生体鉱物化に関するタンパク質成分の分析		
地球上の海域はサンゴ礁によって、多様な生態系が構築されている。この系の中で、ソフトコーラルは普通に見られ、景観、レクリエーションの場、環境保全等や化学成分の抽出、薬の開発等とも深く係っている。ソフトコーラルは、ハードコーラルにはない小さい骨片（sclerites）を持っていて体の基盤を強固にする役目があると考えられている。また、種の同定にも用いられる。このような石灰化した組織には糖-タンパク質複合体からなる有		

機基質があり石灰化過程で重要な働きをしていると考えられる。他方、ほとんどの生物では、全 Ca イオンの大部分がカルシウム・ヒドロキシアパタイト（水酸化リン灰石）として存在し、海産動物ではミネラルだけでなく多様なタンパク質を含む生体結晶として、しばしば見られる。しかしこれらの生体結晶の成長に関して、タンパク質の作用機構の研究は始まったばかりである。その上、多くの研究がハードコーラルの骨格形成に関するタンパク質に集中し、小さい骨片を持つソフトコーラルでは、本学理学部の生体鉱物学研究室の独創的な発想でもって、取り上げるまでは、研究例がほとんどなかった。学位申請者のアジズル氏も含めて研究室仲間の努力により本体から骨片の分離方法を確立し、走査型電顕で確かめたところからアジズル氏を筆頭にした今回の研究は急速に進展したと考えられる。

材料として、ソフトコーラル（八方サンゴの仲間）の *Lobophytum crassum*（和名 フトウネタケ）と *Sinularia polydactyla*（和名 タカアシカタトサカ）の 2 種を使い、これらの本体から骨片を分離し、骨片中に含有される有機基質について電気泳動法によってタンパク質の組成分析をおこなった。その結果、11 種の新しいタンパク質を見つけ、石灰化、脱石灰化、骨片の形成、サンゴ体の成長に重要な働きをすることもわかった。更に、これらについてアミノ酸組成を決定し、*in vitro* 実験による石灰化への影響試験や免疫学的な検定をおこなった。その結果、ソフトコーラルの石灰化に強く影響するタンパク質や、高い酵素活性を示すタンパク質が存在することを示した。これらは、ソフトコーラルにおける、生物的石灰化に関するプロテオミクス（Proteomics）分野（分子生物学のブランチ）での最初でかつ詳細な基礎的研究でありカルサイト骨片の有機基質に関する新しい知見を提供した。今後、生体骨格組織の再生などの応用研究にも期待がもたれる。また、タンパク質のアミノ酸配列の研究も行い、生物種間の類似性についても議論を深めた。

これらの研究成果を積極的に国際シンポジウムやコンファレンス等において、若手研究者に与えられる 5 つの賞を受けて発表し、ひき続きインパクトファクターの高い分子生物学分野の国際学術誌に投稿し 4 編が印刷または受理され、国際的にも注目を集めている。

審査会では、これまでの研究方法、資料のまとめかた、論文作成等についても出来るだけ実態を把握して審査を進めてきた。それらの判断も含めて、博士学位主論文の審査、口頭発表による試験結果から、博士学位の授与に相当するものと判断し合格と認定した。