化石研究会会誌　　Journal of Fossil Research, Vol. 42(3), 159-166(2010)

［総説］

軟体動物のバイオミネラリゼーション研究の現状
―有機基質の構造解析から機能解析への展開―

佐俣哲郎*

Recent advance on molluscan biomineralization
― Development of the study of organic matrices from structural analysis to functional analysis―

SAMATA, Tetsuro*

Abstract

Recent advances in biotechnology caused evolution in the general study of life sciences, and more specifically, in the study of biomineralization. I here introduce information from recently developed studies on molecular and cellular aspects of molluscan shell formation. First, I summarize the genes encoding for the organic matrix proteins recently identified on the basis of cDNA cloning. Further discussion is focused on the possible function of the organic matrix proteins involved in the regulation of $CaCO_3$ crystal polymorphism and growth by *in vitro* examination of crystallization and cell culture. In addition, several new findings from *in vivo* studies in relation to biomineralization including 1) gene expression in the process of ontogeny 2) daily change of gene expression 3) shell regeneration experiment 4) gene interference and gene transfection experiments. In this manner, a current overview of the process of molluscan shell formation on the molecular level is presented.

Key words: biomineralization, molluscan shell, organic matrix, gene, *in vitro* and *in vivo* experiments

1．はじめに

軟体動物の殻体は，主に炭酸カルシウム結晶と，タンパク質や脂質，糖などから成る有機基質で形成されている．殻体中の炭酸カルシウム結晶にはアラレ石，方解石の２種類の結晶多形があり，それらが様々な微細構造をとることにより，種や殻層によって多様な形状の殻体が作られる．この結晶多形や，微細構造の決定・制御に有機基質が関与していると考えられている（Watabe and Wilbur，1960；Lowenstam，1981；Weiner and Traub，1984）．これまで，殻体形成有機基質の解析は，産業価値のあるアコヤガイ真珠層中の成分を中心に行なわれており，これまでにNacrein（Miyamoto *et al*., 1996），N16（Samata *et al*., 1999），MSI60（Sudo *et al*., 1997）などの有機基質タンパク質が同定されている．一方，方解石からなるアコヤガイ稜柱層中の成分についても研究が進み，MSI31（Sudo *et al*., 1997）やPrismalin14（Suzuki *et al*., 2004）などの有機基質タンパク質が発見されてきている．しかし，それらの多くは可溶性成分であり，不溶性成分としては真珠層から発見されたMSI60と稜柱層から発見されたMSI31のみである．不溶性成分は殻体中からの単離，解析が困難ということもあり，依然として，その全容の解明はなされていない．また，近年，新たに遺伝子解析から報告された成分には，殻体中に一致する成分が確認されていないものも多い．一方，殻体中での存在が確認され，既知成分との一致が見られず，構造解析のなされていない成分（佐藤，未発表）も多数存在する．

このように，最も研究の進んでいるアコヤガイ殻体中の成分についてさえも，さらなる研究をする余地が

2009年９月１日受付，2010年１月28日受理

＊〒229－8501　神奈川県相模原市渕野辺１－17－71　麻布大学大学院環境保健学研究科
To whom correspondence should be addressed. The graduate school of Environmental Health, Azabu University, Sagamihara, 229-8501, Japan; Tel: 0427692560, Fax: 0427692560, E-mail: samata@azabu-u.ac.jp

依然として残されている．殻体形成機構を解明する上で重要な鍵となる問題には，同一個体中でのアラレ石と方解石の作りわけ，特にアラレ石を作りやすい海水中での方解石形成のメカニズムというものがある．そのためには，さらには多くの微細構造特異的あるいは異なる微細構造間での共通成分の構造解析を進める必要がある．

一方，軟体動物の *in vitro, in vivo* での石灰化の分子レベルでの研究は，これまで，殻再生実験（Wada, 1980），外套膜外液中の有機基質成分の分泌順序に関する解析（Moura *et al*., 2001），アコヤガイの上皮組織や細胞の培養実験（Machii, 1985；Awaji, 1991）が行われているものの，軟体動物の石灰化との関連で企画された総合的な実験は試みられていない．とくに，*in vivo* での石灰化の研究は，非常に立ち遅れている．

本論文では，軟体動物バイオミネラリゼーションにおける有機基質の作用に関する研究の紹介を行う．その中で，従来より行われている分子レベルでの有機基質タンパク質の構造解析の研究の成果を紹介した後で，*in vitro* と *in vivo* での最新の研究成果の紹介を行う．

2．軟体動物での有機基質の発見から遺伝子解析まで

1）軟体動物殻体形成遺伝子発見以前の有機基質の研究

アコヤガイ真珠層中から不溶性有機基質（insoluble organic matrix）が Frémy（1855）により発見された．この不溶性有機基質は，膜状もしくは繊維状の構造を持ち，真珠層形成の土台となり，可溶性有機基質と結合すると考えられている．この成分について，SEM/TEM 観察，アミノ酸組成分析，FT-IR 分析などにより，その構造の解析が試みられた（Samata, 2004）．

一方，Crenshaw（1972）は，ビノスガイ殻体中から酸性糖類を含む可溶性有機基質（soluble organic matrix）を発見した．可溶性有機基質は，通常の溶媒に可溶性のため，その分析にタンパク質の一般的な精製操作や種々の生化学的な分析手法が適用された．その結果，この成分は，石灰化の場を提供する膜状の不溶性有機基質に結合して，HCO_3^- イオンや Ca^{2+} イオンの濃集や結合に関与すると考えられた．

この時期の研究成果として，1）ナノテクノロジーを利用して，殻体中での有機基質成分の構造と分布に関する情報，および2）バイオテクノロジーを利用して有機基質成分の構造に関する情報が得られた（Wada, 1964；Bevelander and Nakahara, 1969；Gregoire, 1972；Weiner, 1975）．しかし，有機基質タンパク質を構成するタンパク質の一次構造などの全容解明には至らなかった．

2）軟体動物殻体形成遺伝子の構造解析

1996年にアコヤガイ真珠層中から Nacrein 遺伝子が発見されて以来，真珠層や稜柱層を中心として30種類以上の有機基質タンパク質とそれらをコードする遺伝子が報告されている．

Nacrein の特徴（Miyamoto *et al*., 1996）

アコヤガイ真珠層から初めて発見された可溶性高分子有機基質タンパク質で，N 末端と C 末端側に炭酸脱水酵素（CA）ドメインを持ち，炭酸イオン濃集に関与している（図1）．

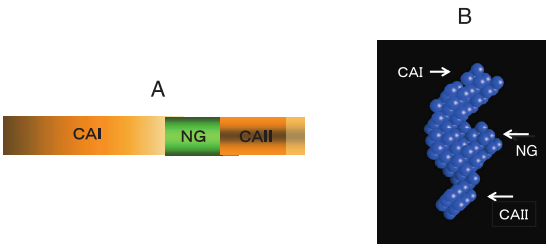

図1　nacrein の特徴
A：nacrein の一次構造の模式図，N 末端側と C 末端側に炭酸脱水酵素（CA）ドメインを持ち，炭酸イオン農集に関与している（Miyamoto *et al*., 1996）．
B：溶液散乱法による nacrein の立体構造推定（Norizuki and Samata, 2008）

MSI60の特徴（Sudo *et al*., 1997）

クモの糸や絹糸の構造に類似したアミノ酸配列から構成されていて，真珠層形成の基盤膜を構成する．

N16の特徴（Kono *et al*., 2000）

アコヤガイ真珠層から発見された低分子量糖タンパク質．MSI60膜に強固に結合して，アラレ石結晶形成に関与する．その後，Norizuki and Samata（2008）により，溶液散乱法によるその構造解析が行われ，NG 繰り返し配列部位が2つの CA ドメインを結合する部位に存在し，この部位が溶液中で常に形を変え，他の分子や結晶と反応していることが推定された．

これらの成分の骨格中での分布に関しては，Nacrein のみが，アコヤガイからサンゴまでの多くの生物種に普遍的に分布するものの，Nacrein 以外の成分は，軟体動物の系統，生息域，殻体微細構造，結晶形などに関連して特異的な分布を示すことが明らかにされた（Norizuki and Samata, 2008）．

3）有機基質に含まれる糖成分の分析

Nacrein に結合している *N*－型糖鎖の構造解析が LC/MS を用いて行われ，糖鎖の非還元末端側に SO_3^-

とシアル酸が存在することが明らかにされた．その結果，バイオミネラリゼーションの過程における Nacrein の機能として，1）CA ドメインによる炭酸イオン生合成と 2）糖鎖末端に結合した硫酸基によるカルシウムイオン濃縮作用が推定された（図 2）．

これに対して，*O* －型糖鎖の構造解析は未だ行われていない．

3．有機基質の機能解析（*in vitro*, *in vivo* でのバイオミネラリゼーションの研究）

1）*in vitro* でのバイオミネラリゼーションの研究

(1) *in vitro* 結晶形成実験による有機基質成分の機能解析

slow evaporation の系（Kitano，1968）での実験からは結晶成長に関する情報が得られる．添加した有機基質成分の種類や量により，形成される結晶の形態や結晶形に違いが出るため，それを比較して有機基質成分の機能を解析する．

これに対して，fast diffusion（Wheeler *et al*., 1981）の系での実験からは結晶核形成に関する情報が得られる．すなわち，有機基質タンパク質の添加により，結晶核形成に要する時間が遅延することから，これらの成分に結晶形成阻害機能が推定されている．

(2) 上皮組織・細胞の培養過程での石灰化の解析

アコヤガイ上皮組織の培養は，町井による培地の開発の結果（Machii，1985；Machii and Wada，1989），大きく進展してきた．さらに最近，アコヤガイ上皮組織培養用の新しい培地が開発されたため，50日間を超える長期間の培養が可能になった（Gong *et al*., 2006）．この培養系を用いて，アコヤガイ上皮組織の培養過程での石灰化現象の観察を行う実験が行われている．石灰化は，MSI60と思われる膜の形成に始まり（図 3），この膜上での結晶の形成までが確認されている（図 4，Samata *et al*., 1994）．興味深いのは，Wada（1980）が殻体再生実験で確認したように，最初に形成される結晶中にイオウが濃集している点である．

2）*in vivo* でのバイオミネラリゼーションの研究

(1) 個体発生と石灰化

卵から孵化させた軟体動物の成長過程での殻体形成遺伝子の発現と殻体微細構造等との関係の解析である．リアルタイム PCR と SEM，XRD 解析を組み合わせた実験を行った．その結果，個体発生過程で，アコヤガイ殻体は，複合稜柱層―稜柱層―真珠層の順に形成され，それに伴って，各殻層に特異的な遺伝子の発現が確認された．

(2) 殻体形成遺伝子発現の日周期変動

殻体形成遺伝子の発現と潮汐等の環境要因との関係の解析である．冬季と夏季のそれぞれ 3 日間に渡ってサンプルを採集し，遺伝子発現をリアルタイム PCR による解析を行った結果，遺伝子発現と潮汐との間に有意な関係があることが示された（図 5）．

(3) 殻体再生実験

殻体の一部を破壊し，殻体が再生される過程での石灰化の解析を行う実験である．

殻体に孔を開け，カバーグラスを絹糸で固定するか殻体の一部分を除去するかする．カバーグラスは数日間固定した後，順次摘出し，付着物質をアリザリンレッド S 等で染色し，検鏡する．その結果，再生殻体では，破壊された真珠層の上に複合稜柱層に類似の粒状構造が形成され，その上に稜柱層が形成されることが確認された（図 6）．

(4) 生体内での殻体形成遺伝子の機能解析実験

a）RNAi を用いた殻体形成遺伝子の機能阻害

mRNA を分解する RNAi を貝柱に注入し，特定の遺伝子の働きを止める．その結果，形成される殻体の微細構造・結晶形に生じる変化の観察を行う．この手法により，当該遺伝子の機能の推定が可能となる（Jiang *et al*., 2006）．

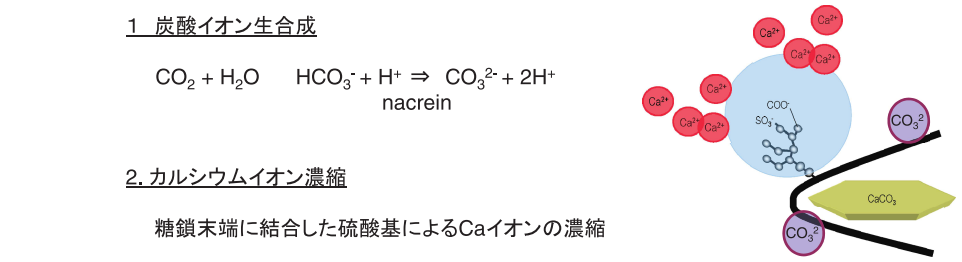

図 2　アコヤガイ殻体形成過程における nacrein の機能
CA ドメインによる炭酸イオンの濃集と糖鎖末端に結合した硫酸基による Ca イオンの濃集作用
（Norizuki and Samata，2008）

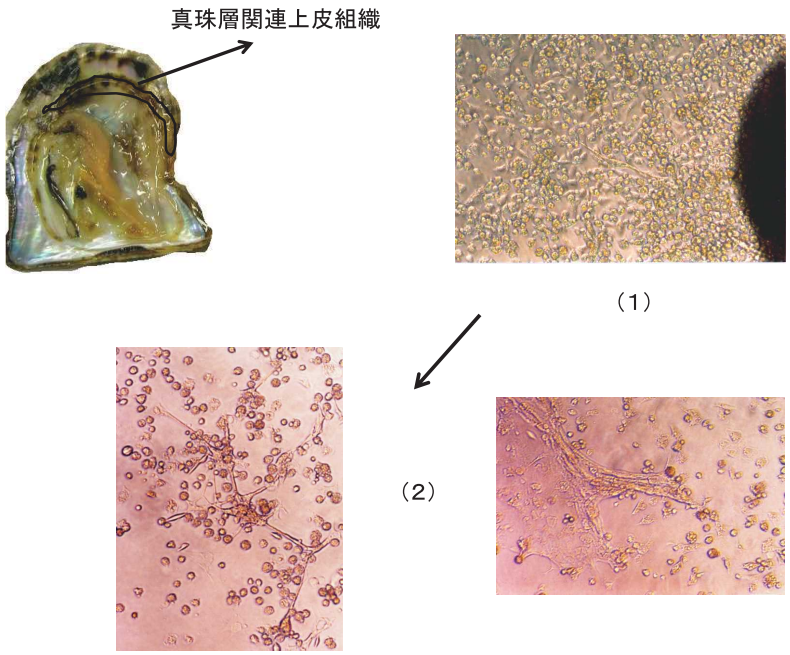

図３　アコヤガイ上皮組織・細胞の培養過程で出現する膜状有機物
真珠層関連上皮組織を切り出し，Gong *et al*.(2006）の培地中で培養する
(1)　培養開始後７日目の増殖細胞
(2)　培養開始後14日目に分泌された有機膜

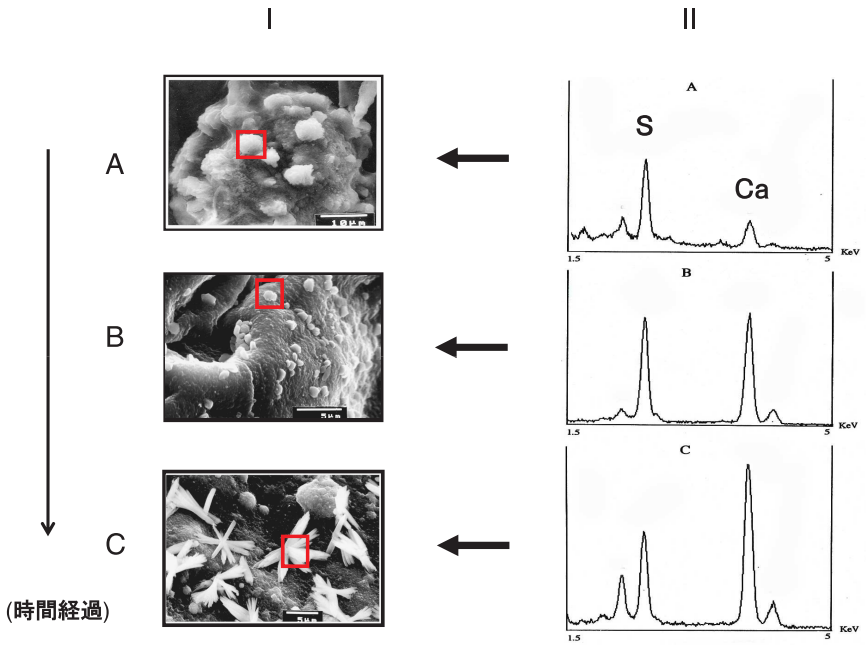

図４　アコヤガイ培養上皮組織上に形成された結晶（Samata *et al*., 1994を改図）
Ⅰ：細胞上に形成された結晶の SEM 像
Ⅱ：当該領域（Ⅰの赤枠部位）の EDS 解析データ，
A：培養開始後７日目，B：培養開始後10日目，C：培養開始後14日目
Wada（1980）の殻体再生実験で，初期に形成される結晶に類似の結晶が培養細胞上に形成されていた

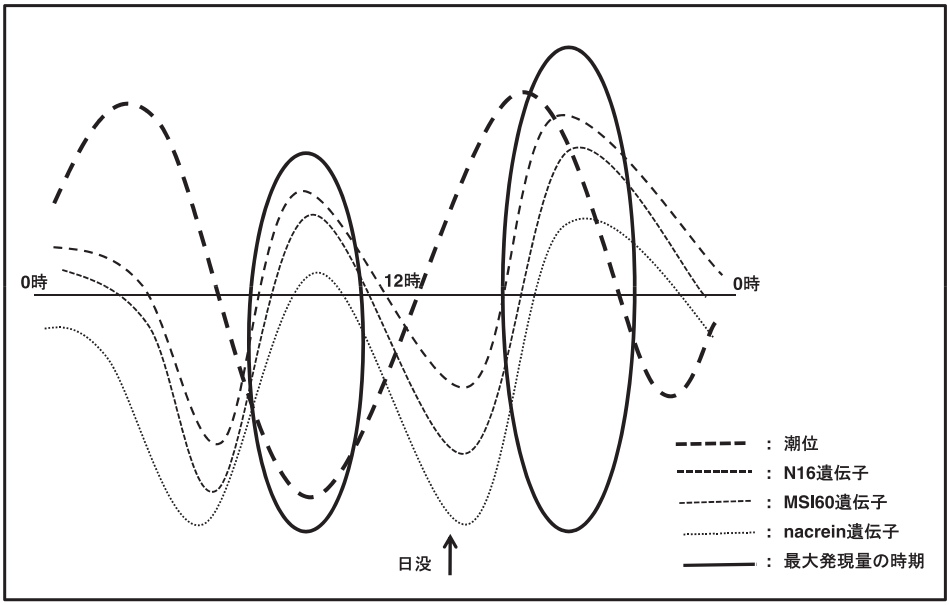

図５　遺伝子発現量と発現量に影響を与える可能性のある外的要因（水温・日照時間・潮位）との関係
（Miyazaki *et al*., 2008）

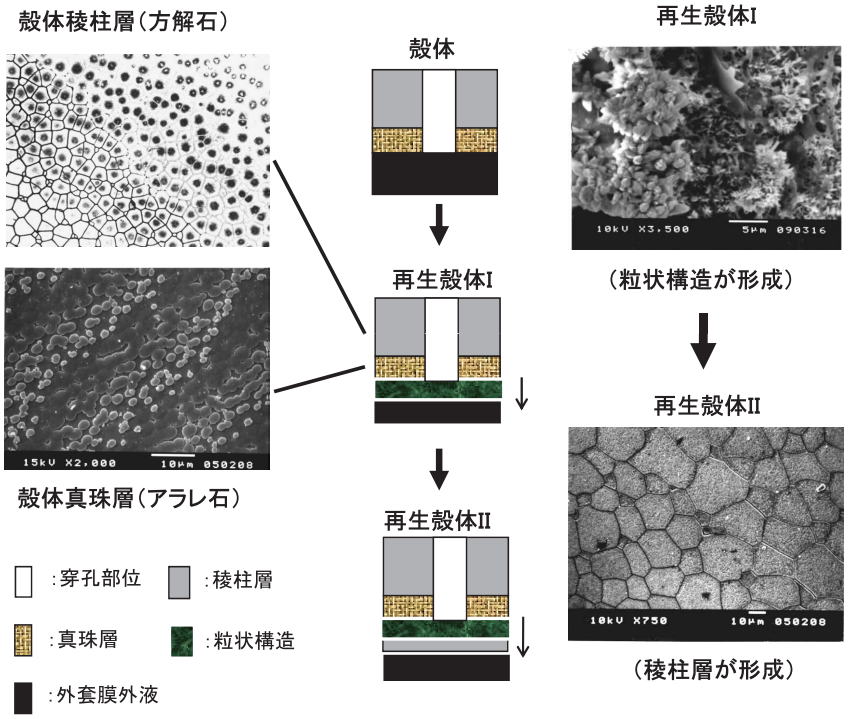

図６　アコヤガイの殻体再生実験結果
再生殻体Ⅰ：アラレ石からなる粒状の構造が観察された
再生殻体Ⅱ：方解石からなる典型的な稜柱層が形成された

b）遺伝子導入による殻体形成遺伝子の機能解析

特定の遺伝子をジーンガンなどで貝の上皮組織に導入し，その結果，形成される殻体の微細構造・結晶形に生じる変化の観察を行う．この手法は，RNAi を用いた実験とは反対に殻体形成遺伝子を過剰発現させてその遺伝子の機能を推定するものである．この実験により，真珠層形成遺伝子を導入した場合には，真珠層の過剰形成が，稜柱層形成遺伝子を導入した場合には，真珠層形成阻害が起こることが確認された．

4．有機基質成分の医療・再生医療への応用

有機基質成分により骨再生が誘導されるという多くの報告がある（Westbroek and Marin，1998；Lopez *et al*.，2000；Pereira *et al*.，2002）．我々は，ラットの頭骨の一部を剥離し，その部分にコラーゲンとともに有機基質成分を導入し，一定期間飼育後に，手術部位の薄切―染色―検鏡を行うという手法で実験を行った．その結果，BMP（Bone Morphogenetic protein family）を導入した場合に繊維状骨の再生が，アコヤガイ可溶性有機基質を導入した場合に，骨様組織の形成が確認された．

5．バイオミネラリゼーションの学説

1）テンプレート説（ハイドロゲル説）；Levi-Kalisman *et al*.（2001）

真珠層の形成機構に関する学説で，MSI60を含むゲル状の領域中で，キチン膜上に可溶性の酸性高分子量タンパク質が結合し，これがテンプレートとして機能して石灰化が開始されるとするものである．

2）白血球中での石灰化

Mount *et al*.（2004）により提示されたもので，アメリカガキの葉状層の石灰化が白血球細胞中で開始されるというものである．ある種の白血球細胞中に複屈折性を示す炭酸カルシウム顆粒を含む顆粒球が形成され，この顆粒球が石灰化前線まで運搬されて，そこで結晶粒を放出する．この放出された結晶顆粒が葉状層として再構成される．

3）イワガキ葉状層の形成機構（Samata *et al*.，2008）

強酸性リン酸化タンパク質である MPP 1 とこのコアタンパク質に結合した GAGs（グリコサミノグリカン類）により形成される強い負電荷のゲル状の領域の中で，MSI60膜上で石灰化が起こる．この領域に Ca イオンが引き寄せられ，それが MPP 1 の Asp のカルボキシル基にトラップされる．一方，Nacrein により供給される CO_3 イオンがカルボキシル基にトラップされた Ca イオンとイオン結合して $CaCO_3$ 結晶核が形成される．その後は，この過程が繰り返されて，結晶が成長する．MPP 1 と Nacrein はその分子中にある NG 繰り返し配列部位で MSI60膜と結合するため，結晶核形成と結晶成長はこの膜上でのみ起こる（図 7）．

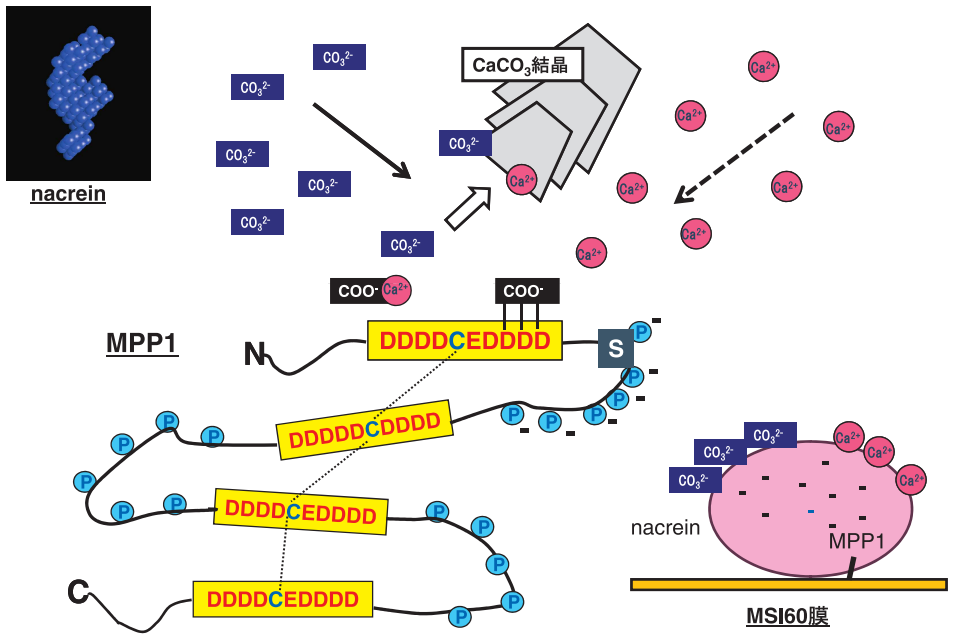

図 7　イワガキ葉状層の形成機構

謝辞

この研究（の一部）は日本私立学校振興・共済事業団の私学助成により行ったものである．

引用文献

Awaji, M.（1991）Separation of outer epithelial cells from pearl oyster mantle by dispase digestion. *Proceedings of the 8th internat. conference on invertebrate and fish tissue culture*, pp.43-46, Anaheim, USA.

Bevelander, G. and Nakahara, H.（1969）An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain mollusks. *Calc. Tissue Res*. **3**, 84-92.

Crenshaw, M.A.（1972）The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biomineralization* **6**, 6-11.

Frémy, M.（1855）Recerches chimiques sur les os. *Ann. Chem. Phys*. **43**, 47-107.

Gong, N., Ma, Z., Li, Q., Yan, Z., Xie, L. and Zhang, R.（2006）Vharacterization of calcium deposition and shell matrix protein secretion in primary mantle tissue culture from the mantle pearl oyster *Pinctada fucata*. *Mar. Biotechnol*. **10**（**4**）, 457-465.

Grégoire, C.（1972）Structure of the molluscan shell. In : Florkin, M. and Scheer, B.T.（eds）*Chemical Zoology*, vol.7, pp.45-102, Academic Press, New York, USA.

Jiang, Y., Locker, E.S. and Zhang, S.（2006）*In vivo* and *in vitro* knockdown of FREP2 gene expression in the snail *Biomphalaria glabrata* using RNA interference. *Develop. Comp. Immun*. **30**, 855-866.

Kitano, Y.（1968）Factors controlling the crystal type and minor element content of carbonates formed in marine biological systems − The geochemical significance of carbonate fossil. *Chemistry and Industry* **21**, 1017-1028.

Kono, M., Hayashi, N. and Samata, T.（2000）Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada fucata*. *Biochem. Biophy. Res. Commun*. **269**, 213-218.

Levi-Kalisman, Y., Falini, G., Addadi, L. and Weiner, S.（2001）Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using Cryo-TEM. *J. Struc. Biol*. **135**, 8-17.

Lopez, E.A., Le Faou, A., Borzeix, S. and Berland, S.（2000）Stimulation of rat cutaneous fibroblasts and their synthetic activity by implants of powdered nacre（mother of pearl）. *Tissue and Cell* **32**（**1**）, 95-101.

Lowenstam,H.A.（1981）Albumin systematics of the extinct mammoth and Tasmanian wolf. *Nature* **291**, 409-411.

Machii, A.（1985）Establishment of cell line from veliger larvae of the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Tissue Cult. Res. Commun*. **4**, 18.

Machii, A. and Wada, K.（1989）Some marine invertebrates tissue culture. In : Mitsuhashi,J.（ed）*Invertebrate Cell System Applications*, pp.225-233, CRC Press, Boca Raton, USA.

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.

Miyazaki, T., Usui, T., Kajikawa, A., Matsuzawa, S., Hishiyama, H. and Samata, T.（2008）Circadian rhythm confirmed in the rate of gene expressions involved in the nacreous layer formation and its implication with molluscan physiology. *Frontiers of Materials Science* **2-2**, 162-166.

Mount, A.S., Wheeler A. P., Paradkar, R.P. and Snider, D.（2004）Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* **304**, 297-300.

Moura,G., Vilarinho, L., Santos, A.C. and Machado, J.（2001）Organic compounds in seasonal biominaralization process. *Comp. Biochem. Physiol.* **B125**, 293-306.

Norizuki, M. and Samata, T.（2008）Distribution and function of the nacrein-related proteins inferred from structure analysis. *Marine Biotechnology* **10**, 234-241.

Pereira, L.M., Almeida, M-J., Milet, C., Berland, S. and Lopez, E.（2002）Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pinctada maxima* in there mammalian cell types : fibroblast, bone marrow stromal cells and osteoblasts. *Comp. Biochem. Physiol.*, **B**, **132** 217-229.

Samata, T.（2004）Molecular mechanism of molluscan shell formation. *Thalassas* **20**（**1**）, 25-44.

Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., and Akera, S.（1999）A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Letters* **462**, 225-229.

Samata, T., Ikeda,D., Kajikawa, A., Sato, H., Nogawa, C., Yamada, D., Yamazaki, R. and Akiyama, T.（2008）MPP 1,a novel acidic glycoprotein in the shell matrix of the oyster *Crassostrea nipponica*.

FEBS J. **275**, 2977-2989.

Samata, T., Somiya, H., Horita, C. and Akera, S. (1994) SEM observation of microcrystals developed over black secretion on the cultured tissue of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish. Sci*. **60**, 343-344.

Sudo, S. Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K. and Takahashi, T. (1997) Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* **387**, 563-564.

Suzuki,M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T. and Nagasawa, H. (2004) Characterization of Prismalin-14. a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochemical J*. **382** (**1**), 205-213.

Takakura, T., Norizuki, M., Ishikawa, F. and Samata, T. (2008) Isolation and characterization of the N-linked oligosaccharides in nacrein from *Pinctada fucata*. *Marine Biotech*. **10**, 290-296.

Wada, K. (1964) Studies on the mineralization of calcified tissue in mollusks VII. Histological and histochemical studies of organic matrices in shells. *Bull. Natl. Pearl Res. Lab*. **9**, 1078-1086.

Wada, K. (1980) Initiation of mineralization in bivalve molluscs. In : Omori, M. and Watabe, N. (eds) *The Mechanism of Biomineralization in Animals and Plants*. pp.79-92, Tokai Univ. Press, Tokyo, Japan.

Watabe, N. and Wilbur, K.H. (1960) Influence of the organic matrix on crystal type in molluscs. *Nature* **188**, 334.

Weiner, S. (1975) Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells : Potential template for shell formation. *Science* **190**, 987-988.

Weiner, S. and Traub, W. (1984) Macromolecules in mollusk shell and their functions in biomineralization. *Phil. Trans R. Soc. London* **B304**, 425-434.

Westbroek, P. and Marin, F. (1998) A marriage of bone and nacre. *Nature* **392**, 861-862.

Wheeler, A.P., George, J.W. and Evans, C.A. (1981) Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science* **212**, 1397-1398.