

[原著]

## 発生過程におけるアコヤガイ幼生の殻体微細構造の観察

宮崎陽子\*・西田卓馬\*・青木秀夫\*\*・佐俣哲郎\*

Observation of shell microstructures in  
*Pinctada fucata martensii* larvae during development

MIYAZAKI, Yoko\*, NISHIDA, Takuma\*, AOKI, Hideo\*\* and SAMATA, Tetsuro\*

## Abstract

The present report describes the ontogenetic changes of shell microstructures in *Pinctada fucata martensii* larvae. Larval samples were collected from different developmental stages, such as trochophore, veliger, pediveliger and juvenile stages. Microscopic observation and X-ray diffraction analysis were carried out to identify the shell microstructure and the crystal form constituting the larval shell. Several novel findings were obtained : 1) The shells of the early veliger stage in *Pinctada fucata* were estimated to be composed of amorphous calcium carbonate. 2) The early calcitic prismatic layer was distinguished as a thin membrane-like structure. 3) Initial formation of the nacreous layer started from the mantle pallial region at the age of 31 days. Our results are very important with respect to the mechanism of shell formation in *Pinctada fucata*.

Key words: *Pinctada fucata martensii*, Larva, Shell microstructure, Crystal polymorphism, Biomineralization

## 要旨

本論は、アコヤガイのトロコフォア期 (trochophore), ベリジャー幼生初期 (veliger), ベリジャー幼生後期 (pediveliger), 付着期と稚貝期 (juvenile) の幼生サンプルを人工授精によって採取し、各発生過程における幼殻の SEM/EDS 観察と X 線回折分析による結晶多形解析を行った結果、得られたいくつかの新知見についての報告である。他の軟体動物の幼殻において、アモルファス炭酸カルシウム (ACC) の存在が報告されているが、本研究結果からアコヤガイの発生初期の幼殻においても ACC の存在する可能性が示された。また、方解石から成る稜柱層の形成は、授精31日目の幼殻で、外側の均質な構造を示す幼殻上で薄い膜状の構造として開始されていた。一方、アラレ石から成る真珠層の形成は、殻体内表面上における外套膜外縁部の領域から開始されることが明らかになった。このような発生初期における幼殻の微細構造の観察は、アコヤガイの殻体形成の機構の解明にとって重要な情報を提供するものである。

キーワード： アコヤガイ, 幼生, 殻体微細構造, 結晶多形, バイオミネラリゼーション

2009年9月1日受付, 2010年2月1日受理

\*麻布大学環境保健学部細胞科学研究室

Laboratory of Cell Biology, Graduate School of Environmental Health Sciences, Azabu University, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

\*\*三重県水産研究所

Mie Prefecture Fisheries Research Institute, Hamajima, Shima, Mie 517-0404, Japan

To whom correspondence should be addressed. SAMATA, Tetsuro, Laboratory of Cell Biology, Graduate School of Environmental Health Sciences, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan. Tel: 042777692560, Fax: 042777692560, E-mail: samata@azabu-u.ac.jp.

## 1. はじめに

アコヤガイ (*Pinctada fucata martensii*) の発生は、大きく分けると6つの段階を経ることが知られている(藤村ほか, 1995)。すなわち, (1)胞胚期, (2)授精6時間後の浮遊幼生となるトロコフォア幼生期, (3)授精24時間以降の炭酸カルシウム ( $\text{CaCO}_3$ ) からなるD型の貝殻を持つベリジャー幼生初期 (D型幼生期), (4)授精約12日目の貝殻の頭頂部が膨出して丸みを増すベリジャー幼生後期 (アンボ期), (5)授精約28日以降の足糸によって付着する付着期, (6)体構造や殻体がアコヤガイ成体とほぼ同じになる稚貝期である。アコヤガイの発生過程における第一原殻 (prodissoconch I) の形成は、トロコフォア幼生期において1対の貝殻腺が分化して開始され、アコヤガイ幼生殻体の結晶形はアラレ石であることが知られている (Watabe, 1956, 1983; Kobayashi, 1980)。二枚貝幼生 (*Mercenaria mercenaria*, *Crassostrea gigas* と *Mytilus galloprovincialis*) の発生初期の幼殻は、アモルファス炭酸カルシウム (ACC) から成り、その後アラレ石に転移するとされ、幼殻の微細構造は、粒状-均質構造 (granular-homogeneous structure) と表層上に存在する薄い稜柱構造から成ることが既に報告されている (Weiss *et al.*, 2002; Weiss and Schonitzer, 2006; Wilt *et al.*, 2003)。

軟体動物における殻体微細構造の分類と進化に関しては、多くの報告がなされている (Taylor *et al.*, 1969; Watabe, 1988; Kobayashi, 1980; 魚住・鈴木, 1981)。アコヤガイの成体における殻体の外層は、方解石稜柱構造 (calcite simple prismatic structure) から成り、内層はアラレ石で構成される真珠構造 (nacreous structure) から成る。しかし、アコヤガイの発生過程において、幼殻からどのように方解石稜柱構造や真珠構造が形成されるのかについては未だ不明な点が多い。

本研究では、アコヤガイの個体発生における各ステージ (トロコフォア幼生期, ベリジャー幼生初期・後期および稚貝期) の殻体微細構造を、走査型電子顕微鏡 (SEM) とエネルギー分散型 X 線分析 (EDS) を用いて観察した。また、X 線回折分析 (XRD) により、炭酸カルシウムの結晶形の同定を試みた。

## 2. 試料および実験方法

### 1) 試料

アコヤガイの幼生サンプルは、三重県水産研究所において別々の水槽で飼育されていた2年貝雌と3年貝雄を人工授精することで採取した。採卵は切開法で行い、採取した卵子は、1Nアンモニア0.75mlを加えた25℃の濾過海水1リットル中で40分間処理し、卵核

胞を破壊した。人工授精は、同様に切開法で得た精子を卵子と混合することで実施された。授精2時間後に授精率を測定し、授精7時間後に浮上したトロコフォア幼生を採取し、水槽中で49日間飼育した。各発生段階の幼生サンプルは、授精1, 3, 7, 17, 21, 24, 31, 36, 43および49日目の合計10サンプルを採取し、4%ホルマリン/人工海水 (4℃) または人工海水中 (-20℃) で保存した。

### 2) 幼殻の観察

幼生サンプルは、光学顕微鏡 (Diaphot-TMD, Nikon, Japan) と走査型電子顕微鏡 (SEM; JSM-5400, JEOL Ltd., Japan) によって観察した。電子顕微鏡用の幼生サンプルは、蒸留水による洗浄・風乾後、イオンスパッタリング装置 (JFC-1100E, JEOL Ltd., Japan) を用いて金蒸着した。

### 3) エネルギー分散型 X 線 (EDS) 分析

SEMに接続されたエネルギー分散型 X 線分析装置 (JED2001, JEOL Ltd., Japan) を用いて幼殻の構成元素を分析した。

### 4) X 線回折 (XRD) 分析

幼殻の炭酸カルシウムの結晶形を同定するために、幼生サンプルは、X 線回折装置 (JDX8010, JEOL Ltd., Japan) を用いて分析した。幼生サンプルは、蒸留水による洗浄・風乾後、メノウ乳鉢で粉末化し、分析に用いた。

## 3. 結果

### 1) SEM 観察結果

授精1日目のベリジャー幼生の第一原殻は、Dの形をした薄い膜状の構造を示した (図1.A)。幼殻表面において、明瞭な成長線が確認された。授精3から24日目までの殻体表面は、主に顆粒状の結晶微粒子から成る均質様の構造として確認され、アコヤガイ成体で見られる稜柱構造は確認できなかった (図1.B, C, D)。授精17日目の殻体の破断面から、均質様構造と表層上に薄い層として存在する稜柱様の構造を持つことが確認された (図1.C, J)。この稜柱様の構造は、厚い稜柱間壁が見られない点でアコヤガイ成体の殻体外層を構成する方解石稜柱構造とは異なった。光学顕微鏡によって観察された授精24日目の幼生サンプルを図2に示した。

稚貝形態を示す授精31日目の幼殻から、稜柱層と真珠層が確認された。形成初期の方解石稜柱層は、薄い膜状の構造を呈し、外側幼生殻上で一斉に形成されることが明らかになった (図1.E, H)。一方、真珠層

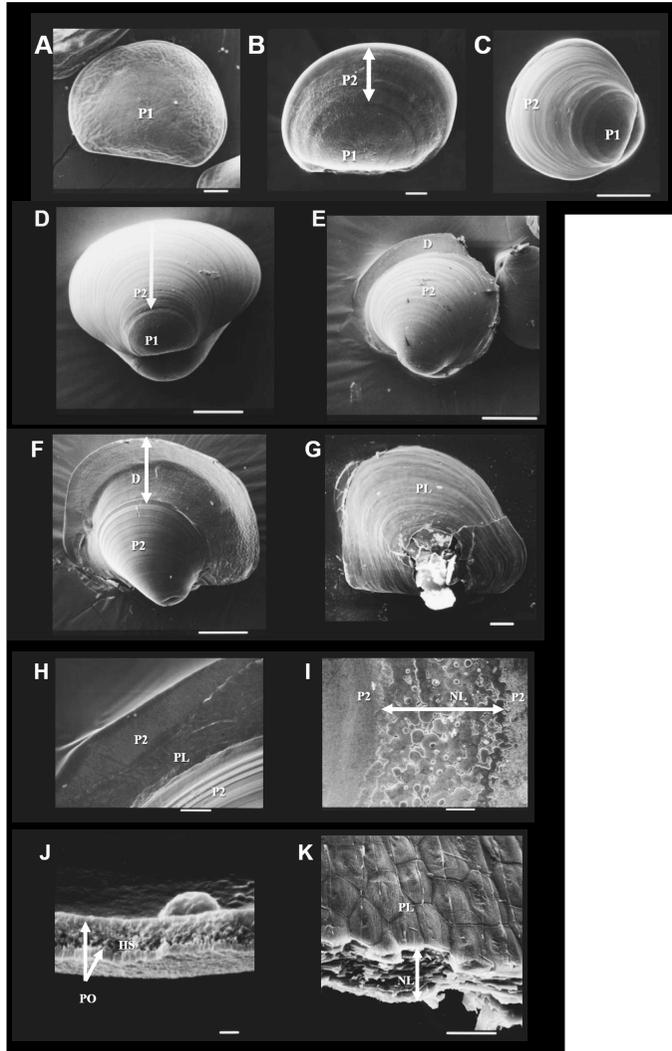


図1. アコヤガイの幼殻の走査型電子顕微鏡像。

A, B; 授精1日目(A)と3日目(B)のベリジャー初期の幼生 (bar=10 $\mu$ m). C, D; 授精17日目(C)と24日目(D)のベリジャー後期の幼生 (bar=50 $\mu$ m). E, F, G; 授精31日目(E), 43日目(F)と49日目(G)の幼生 (bar=100 $\mu$ m). H; Eの拡大図. 形成初期の膜状の方解石稜柱層が確認された (bar=10 $\mu$ m). I; 授精31日目の幼殻の内表面部 (bar=1 $\mu$ m). 写真左側が蝶番部. 外套膜外縁部領域に帯状に真珠層が形成されているのが確認された. J; 17日目の幼殻の破断面 (bar=1 $\mu$ m). 均質構造様の構造のほかに複合稜柱構造様の構造が確認された. K; 49日目の幼殻の破断面 (bar=10 $\mu$ m). 方解石稜柱層とアラレ石真珠層が確認された. P1; 原殻I (prodissoconch I), P2; 原殻II (prodissoconch II), D; 幼生殻 (dissoconch shell), HS; 均質様の構造, PO; 複合稜柱様の構造, PL; 方解石稜柱層, NL; アラレ石真珠層

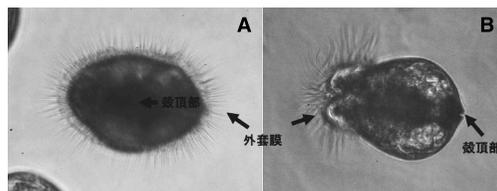


図2. 授精24日目のベリジャー幼生後期の光学顕微鏡像 (400倍). A; 蝶番側から見た図. B; 幼生を横から見た図. 外套膜が殻体の外側にせり出し, 外套膜の繊毛運動によって浮遊している。

の形成は、殻体内表面上の外套膜外縁部の領域から形成されることが観察された(図1.I)。

授精43日目の殻体表面において、稜柱層がさらに発達した(図1.F)。授精49日目のアコヤガイ幼生はほぼアコヤガイの成体に近い形態を示し、外表面は稜柱層で覆われた(図1.G)。また、その破断面において、稜柱層と真珠層が層状に発達しているのが確認された(図1.K)。

## 2) EDS 分析結果

アコヤガイ幼生殻体のEDS分析結果を図3に示す。授精1日目の幼殻の構成元素は、C, O, Mg, P, Caと金蒸着に由来するAuのピークなどが確認された(図3.A)。授精3日目の幼殻の構成元素は、主にC, OとCaが確認され、第一原殻の部分を選定してもMgとPに由来するピークは消失していた(図3.B)。授精7日目以降49日目までの幼殻の構成元素は、主にC, OとCaが確認され、授精3日目と同様のスペクトルを示した。

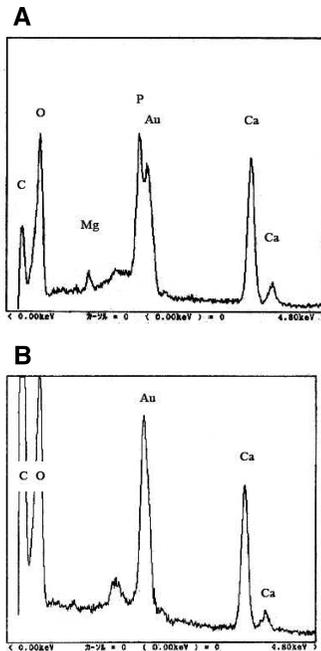


図3. アコヤガイの幼殻のEDSスペクトル。

A; 授精1日目の幼殻の構成元素。C, O, Mg, P, Caと金蒸着に由来するAuのピークなどが確認された。B; 授精3日後の幼殻の構成元素。授精3から49日目までほぼ同様のスペクトルを示し、主にC, OとCaが構成元素として確認された。

## 3) XRD 分析結果

XRD分析結果を図4に示す。授精1日目の殻体の結晶形は、X線回折分析によって同定できなかった(図4.A)。アラレ石のピークは、授精3日目の幼殻から検出され(図4.B)、授精24日目までの幼殻は、アラレ石で構成されることを確認した(図4.C)。

稚貝形態を示す授精31日目の幼殻において、アラレ石のピークの他に3.025d ( $2\theta$ ; 29.5)に方解石に特有のピークが確認された(図4.D)。36—49日目のサンプルも31日目のもと同様にアラレ石と方解石のピークを確認することができた(図4.E)。

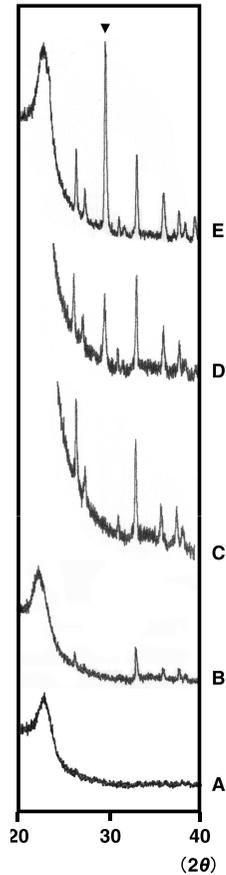


図4. アコヤガイの幼殻のXRD分析結果。

図のAからEは、それぞれ授精1日目(A)、授精3日目(B)、授精24日目(C)、授精31日目(D)および授精49日目(E)の幼殻のXRDスペクトルを示す。授精3から24日目までの幼殻では、アラレ石に特有のピークのみが確認された。授精31日目以降の幼殻において、方解石に特有のピーク( $2\theta$ ; 29.5)が確認された(矢頭)。

#### 4. 考察

本研究における結果を表1にまとめた。SEM/EDS分析結果から、授精1日目の幼生の第一原殻は、膜状の構造を示し、構成元素としてC, O, Mg, P, Caが確認された(図3.A)。これに対して、授精3日目の第一原殻部では、鈹物化が進行し、MgとPは確認できなかった(図3.B)。和田(Wada, 1980; 和田, 1985)は、結晶形成過程を鈹物がまったく存在しない場合の結晶生成(初期石灰化)と石灰化の場に鈹物が存在する場合の結晶生成(添加的石灰化)とに大別している。Pは、膜状成分を構成していると考えられ、アコヤガイの初期石灰化において重要な成分である可能性が高い。

授精1日目の幼殻において、炭酸カルシウムの構成元素であるC, OとCaの存在が確認されたにも関わらず、結晶形を同定することはできなかった。ACCは結晶構造をとらないため、XRD分析によって同定することができない。Weiss *et al.*(2002)は、*M. mercenaria*と*C. gigas*の発生初期の幼殻中にACCの存在を報告している。このことから、授精1日目のアコヤガイの幼殻においてもACCで構成されている可能性が高い。魚住・鈴木(1981)は、軟体動物の殻体微細構造と進化の関係から、粒状構造が最も初源的な構築構造であると提唱し、非晶質粒状構造を先駆としてアラレ石質粒状構造や方解石質粒状構造へ発展すると推察している。本研究において、授精1日目の殻体でACCの存在が示唆され、表層上で顆粒状の結晶様微粒子を確認した。その後、アラレ石から成る主に顆粒状の結晶微粒子から構成される均質様構造と、表層上に薄い層として存在する稜柱様の構造をとるようになった。このことは魚住・鈴木(1981)の説を支持するものである。

アコヤガイ幼生の殻体微細構造の観察結果から、授精3~24日目までのベリジャー幼生初期と後期の殻体では、アコヤガイ成体において確認される真珠構造や

稜柱構造は見られず、アラレ石から成る均質様構造と稜柱様構造を持つことが確認された(図1.B, C, D, J)。このような幼殻の微細構造は、他の二枚貝の幼殻(*P. margaritifera*, *M. mercenaria*, *C. gigas*, *M. galloprovincialis*)で報告された殻体微細構造とほぼ一致した(Mao *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2002; Weiss and Schonitzer, 2006)。また、本研究において観察された稜柱様構造は、厚い稜柱間壁が見られない点でアコヤガイ成体の方解石稜柱構造とは異なり、アサリなどの外殻層で見られるアラレ石で構成される混合稜柱構造(composite prismatic structure)に類似していた。小林ら(小林, 1981; Kobayashi and Samata, 2006)は、軟体動物の系統と殻体微細構造の間には密接な関係が存在し、外殻から内殻への3種類の形態型における組合せ(真珠層グループ、葉状グループと交差板グループ)が存在することを提唱している。この分類に従えば、アコヤガイ成体の殻体微細構造は、方解石稜柱構造と真珠構造から成る組合せであることから、真珠層グループに属する。本研究では、アコヤガイ幼殻は均質様構造と混合稜柱様構造の組合せとなり、真珠層グループではなく交差板グループに属することとなり、小林ら(小林, 1981; Kobayashi and Samata, 2006)の提唱が支持される。

以上の結果は、軟体動物の進化に伴う殻体微細構造の変化の過程を考察する上で非常に興味深い。すなわち、アコヤガイの発生過程に伴う初期鈹物化過程において、まず初めにACCから、アラレ石から成る粒状構造をとり、その後、交差板グループ(均質様構造と混合稜柱様構造)の組合せから、真珠層グループ(真珠構造と方解石稜柱構造)の組合せへと変化したことになる。このことは個体発生の過程をとおして、軟体動物の進化を考察できる可能性があることを示した。

SEM観察結果から、授精31日目以降の幼殻において稜柱間壁を持つ稜柱構造の存在が確認され(図1.E, H)、この時期から方解石の存在が示された

表1. 各発生段階における幼生の殻体微細構造と結晶形について。

No.	経過日数	発生段階	殻体微細構造	殻体の構成元素	結晶形
1	1	ベリジャー幼生初期 (D型幼生期)	均質様の構造	C, O, Ca, Mg, P	—
2	3				
3	7				
4	17				
5	21	ベリジャー幼生後期 (アンボ期)	均質様の構造と 混合稜柱様の構造	C, O, Ca	アラレ石
6	24				
7	31				
8	36	付着期~稚貝期	真珠構造と 稜柱構造		アラレ石と 方解石
9	43				
10	49				

(図4.D)ことから、この稜柱構造が方解石稜柱構造であることを確認した。形成初期の方解石稜柱層は、幼殻上に薄い膜状の構造を呈して外側殻体上のみ存在し、外側の殻体先端部を縁取るように幼殻が存在していた(図1.H)。アコヤガイ幼生は、附着期までは外套膜を常に貝の外側にせり出し、外套膜の繊毛運動などによって浮遊している(図2)。形成初期の方解石稜柱層が殻体外表面上のみ存在していた理由としては、外套膜を常に外側にせり出して生活している浮遊幼生期の生活様式によるものと考えられた。このような殻体外面での方解石稜柱層の形成は、幼生が固着生活に入る時期(授精49日目)では見られなくなった。殻体外表面上に確認される成長線を基に観察した結果、方解石稜柱層の形成は、外側殻体上である時期より一斉に起こる事が明らかになった(図1.E, H)。このことから、アコヤガイの稜柱層の形成能の獲得は、外套膜先端部において稜柱層分泌型の細胞が、同時期に出現することによるものと推測された。一方、真珠層の形成は、殻体内表面上の外套膜外縁部の領域から形成されることが、殻体内表面のSEM観察から明らかになった(図1.I)。この外套膜外縁部は、アコヤガイ成体において最も真珠形成能が高いとされ、真珠養殖のピース片として用いられている。アコヤガイの発生過程において、最も早く真珠形成能を獲得する領域が、外套膜外縁部であったことは注目に値する。

本研究では、種々の発生段階にある幼生サンプルを実験材料として用い、稜柱構造と真珠構造における形成過程の一端を明らかにした。さらに我々は、この幼生サンプルからtotal RNAを抽出し、殻体形成に関連する遺伝子発現についての分子レベルでの解析も行っている(Miyazaki *et al.*, in press)。発生過程における稜柱構造と真珠構造についての鉱物学および分子生物学的研究は、アコヤガイの殻体形成機構の解明にとって重要な情報を提供するものと考えられる。

#### 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

藤村卓也・和田浩爾・岩城俊昭(1995)アコヤガイ幼生の発生と形態。VENUS 54(1), 25-48.  
 Kobayashi, I.(1980) Various patterns of biomineralization and its phylogenetic significances in bivalve molluscs. In: Omori, M. and Watabe, N. (eds) *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants*, pp.145-155., Tokai Univ. Press, Tokyo.

小林巖雄(1981)軟体動物の殻体内部構造とその古生物学的意義。波部忠重・大森昌衛編, 軟体動物の研究, 47-62頁, 大森昌衛教授還暦記念論文集刊行会, 新潟。  
 Kobayashi, I. and Samata, T. (2006) Bivalve shell structure and organic matrix. *Mat. Sci. Eng. C-Bio. S.* 26, 692-698.  
 Mao, C.L., Golubic, S., Le, C.T., Payri, C. (2001) Developmental aspects of biomineralization in the Polynesian pearl oyster *Pinctada margaritifera* var. *cumingii*. *Oceanol. Acta* 24, S37-S49.  
 Miyazaki Y., Nishida T., Aoki H. and Samata T. (in press) Expression of genes responsible for biomineralization of *Pinctada fucata* during development. *Comp. Biochem. Physiol. B.*  
 Taylor, J.D., Kennedy, W.J. and Hall, A. (1969) The shell structure and mineralogy of the bivalvia. Introduction. *Nuculacea-Trigonacea. Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.)* 3, 1-125.  
 魚住悟・鈴木清一(1981)二枚貝における殻体構造の進化。波部忠重・大森昌衛編, 軟体動物の研究, 63-77頁, 大森昌衛教授還暦記念論文集刊行会, 新潟。  
 Wada, K. (1980) Initiation of mineralization in bivalve mollusks. In: Omori, M. and Watabe, N. (eds) *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants*, pp.79-92, Tokai Univ. Press, Tokyo.  
 和田浩爾(1985)二枚貝貝殻石灰化におけるCaCO<sub>3</sub>結晶の成長。日本結晶成長学会誌 12, 57-69.  
 Watabe, N. (1956) Electron diffraction analyses of prodissoconch I, Young shell and pearl of *Pinctada martensii* (Dunker). *Science* 26, 359-360.  
 Watabe, N. (1983) Shell repair. In: Saleuddin, A.S.M. and Wilbur K.M. (eds) *The Mollusca* Vol. 4, pp.289-316, Academic Press Inc.  
 Watabe, N. (1988) Shell structure. In: Trueman, E.R. and Clarke, M.R. (eds) *The Mollusca*, Vol. 11, pp.289-316, Academic Press Inc.  
 Weiss, I.M., Tuross, N., Addadi, L. and Weiner, S. (2002) Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *J. Exp. Zool.* 293, 478-491.  
 Weiss, I.M. and Schonitzer, V. (2006) The distribution of chitin in larval shells of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *J. Struct. Biol.* 153, 264-277.  
 Wilt, F.H., Killian, C.E. and Livingston, B.T. (2003) Development of calcareous skeletal elements in invertebrates. *Differentiation* 71, 237-250.