

[原著]

アコヤガイ上皮組織の培養過程でのバイオミネラリゼーションの研究

西田卓馬*・町井 昭*・宮崎陽子*・野川ちひろ*・
親川沙織**・林佑利子**・日高裕輔**・大原 勝*・佐俣哲郎***

Study on biomineralization in cultured epithelium tissue of *Pinctada fucata*

NISHIDA, Takuma*, MACHII, Akira*, MIYAZAKI, Yoko*, NOGAWA, Chihiro*,
OYAKAWA, Saori**, HAYASHI, Yuriko**, HIDAKA, Yusuke**, OHARA, Masaru* and SAMATA, Tetsuro***

Abstract

In this study, we elucidated the process of calcification in the *in vitro* and *in vivo* experimental systems focusing on the relationship between the biomineral and organic substances secreted from the mantle epithelium tissue of *Pinctada fucata*.

In vivo experiment, ten days after cover glass had inserted in inside of shell, membranous organism was formed on the cover glass. Afterwards, the crystal was confirmed by means of scanning electron microscopy.

In vitro experiment, the samples of dissected mantle pallial were cultured in 24 well plates. The cultured tissues were observed under the light microscope at the intervals of two days. Organic substances secreted from mantle pallial with cellular proliferation seem to take part in the induction of biomineralization and eventually shell formation. After ten days culture, a pulsating movement was observed for the cells proliferated from the tissue of mantle pallial followed by the formation of thin membranous structure. Then, crystal-like granules appeared around the membrane.

Similar process was observed in the *in vitro* experiment and we estimate that the initial stage of molluscan shell formation might occur as follows; secretion of the soluble component, formation of the basement membrane and nucleation of crystals.

Key words: Calcification, Membranous structure, Tissue culture, *Pinctada fucata*

1. 緒言

アコヤガイの殻体は炭酸カルシウムで構成され、殻体形成には外套膜から分泌される有機基質タンパク質が関与している。有機基質タンパク質には、可溶性と不溶性のタンパク質の2種類が存在している。とくに、殻体形成との関連では、多くの種類の可溶性有機

基質タンパク質が存在している。軟体動物殻体形成機構の研究では、これまで、走査型電子顕微鏡 (SEM) やエネルギー分散型 X 線分光分析 (EDS) などを用いた殻体微細構造の解析や、バイオテクノロジーを用いた殻体形成遺伝子や有機基質タンパク質の解析が進められており、*In vivo* と *in vitro* の研究と

2009年9月1日受付, 2010年2月8日受理

*麻布大学大学院環境保健学研究科

The graduate school of Environmental Health, Azabu University, Sagami-hara, Japan.

**麻布大学環境保健学部

Department of Environment Health, Azabu University, Sagami-hara, Japan.

***麻布大学大学院環境保健学研究科

To whom correspondence should be addressed. SAMATA, Tetsuro, The graduate school of Environmental Health, Azabu University, Sagami-hara, 229-8501, Japan; Tel: 0427692560, Fax: 0427692560, E-mail: samata@azabu-u.ac.jp

して殻体再生実験（和田，1999），*in vitro*における結晶形成実験（Zaremba *et al.*, 1996），細胞培養による石灰化実験（Machii, 1989）などが試みられている。

殻体再生過程での石灰化実験では，殻体と外套膜の間に挿入したカバーガラス上に結晶を認め，硫酸含有糖タンパク質が結晶形成を誘導することが報告された（和田，1999）。また殻体の形成の前に膜状の有機物ができ，その後結晶が形成されることが指摘された（小川，2006）。

細胞培養による石灰化実験では，Machii（1989）によってアコヤガイの組織培養法が考案され，稜柱層ブリズム間壁の形成や結晶形成などが報告されている。Samata *et al.*（1994）も Machii（1989）と同じ培地を用い，SEM 観察下で結晶の形成を認めた。また，最近，長期間の組織培養を可能にする培地が開発され，この培地中での組織培養により，SEM 観察下での結晶の形成が観察されている（Gong *et al.*, 2008）。

本研究では，アコヤガイ殻体の石灰化過程を *in vivo* と *in vitro* で経時的に観察し，殻体形成過程の解明を試みた。*in vivo* での実験では殻体再生実験を行い，カバーガラス上で結晶形成の有無を観察し，*in vitro* での実験では外套膜上皮組織の培養方法を検討し，培養過程での組織の形態変化を観察すると共に，培地中に分泌される有機物および生鉱物の形成に関して考察を行った。

2. 試料と実験方法

1) 試料

実験試料としては，三重県科学技術振興センター水産研究部より提供された殻長 5～6 cm の日本産アコヤガイを使用した。またアコヤガイは三重から送られた後，研究室の水槽で餌を与えながら 1～2 週間ほど飼育したものを実験に使った。

2) 実験方法

(1) *In vivo* での殻体再生実験

アコヤガイの殻体にドリルで孔を開け，孔の部分にカバーガラスを挿入した後，孔を上からパラフィルムで密封し外套膜外液が漏れないようにした。施術後，水槽中で飼育し，5 日目，10 日目，15 日目のそれぞれのカバーガラスを摘出して，微分干渉顕微鏡および SEM にて観察した。

(2) *In vitro* での外套膜上皮組織の培養実験

i) 培地の作製

滅菌蒸留水 1 ℓ に NaCl を 18.875g 加え，高圧蒸気滅菌機で滅菌した。滅菌後，1 × Leibovitz-15medium（GIBCO, Invitrogen）と 1 × Medium 199（GIBCO,

Invitrogen）を添加し，40mg/ℓ Ascorbic acid，128.9mg/ℓ Taurine，10mg/ℓ ATP，400mg/ℓ Lactalbumin hydrolysate を添加した後，濾過滅菌をした。その後，上記を添加された培地 90mℓ に対して FBS（BLG，コスモ・バイオ）を 10mℓ 添加し，抗生物質としてカナマイシン（Wako）100μℓ，ペントシリン（富士山化学工業）100μℓ を添加した。

なお今回作製した培地は，Gong *et al.*（2008）が考案した Pf-CM2.5 培地に，塩濃度を海水の塩濃度に上げ，HEPES 等の細胞毒を除去したものである。

ii) 外套膜の切り出し

水槽から取り出したアコヤガイを水道水で洗った後，貝を開き外套膜を中心にヨードチンキを塗り，その後エタノールを塗った。外套膜を約 5 mm 幅で切除し真珠層形成に関与する組織を切り出し，切除した外套膜を MMBSS（Machi and Kawai, 1980）に 6 回浸し洗浄した。洗浄後，外套膜を約 2 mm 角の大きさに細切し，組織の殻体に面していた側と 24well plate（TPP，ビーエム機器）の底が向かい合うように 24 穴シャーレに入れ，培地を 400μℓ 添加した。

iii) 培養方法

組織を入れた plate は，24℃の低温インキュベータで培養し，その培地は，切り出しを行った翌日に半量液換えをおこない，それ以降も一日おきに半量液換えを行った。

3. 結果

1) *In vivo* での殻体再生実験結果

SEM による観察の結果，挿入後 10 日目以降のカバーガラス上に膜状の有機物が形成された（図 1）。その後，結晶が SEM 観察により確認された（図 2）。観察結果より，膜状の有機物が形成されてから結晶が形成されるものと考えられる。

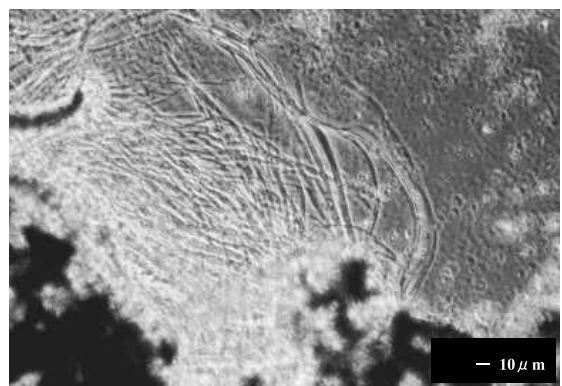


図 1. 殻体再生実験開始から 10 日目の膜状有機物。

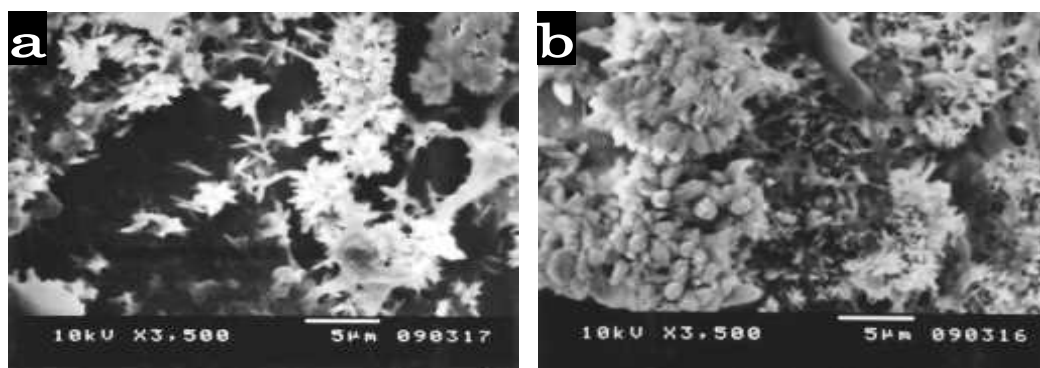


図2．殻体再生実験開始から15日目の結晶のSEM像（a，b）．

2) *In vitro* での外套膜上皮組織の培養実験結果

今回の培養方法では、約50日間の組織の生育が確認された。微分干渉顕微鏡による観察では、組織培養をはじめて2週間目以降に外套膜組織がplateに貼りつき、組織の一部が伸びていくのが観察された（図3）。組織の一部が伸びるに伴い、組織に拍動様の動きが認められた。そして拍動様の動きと同時に膜状の

有機物の形成が観察された（図4）。この膜状の有機物は殻体再生実験でカバーガラスに観察された有機物と形態が類似していた（図5）。また、組織周辺部に結晶の形成が認められた。結晶は組織を入れたwell plateでは形成されたが（図6）、培地のみでは結晶の形成は生じなかった。

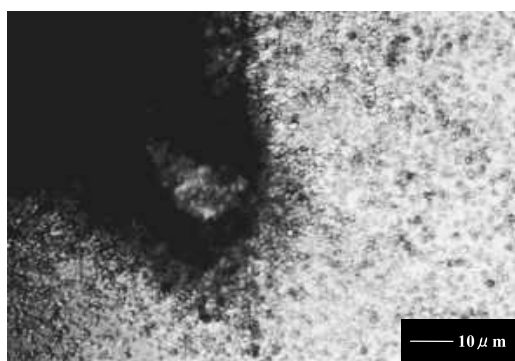


図3．組織培養開始から34日目の組織。

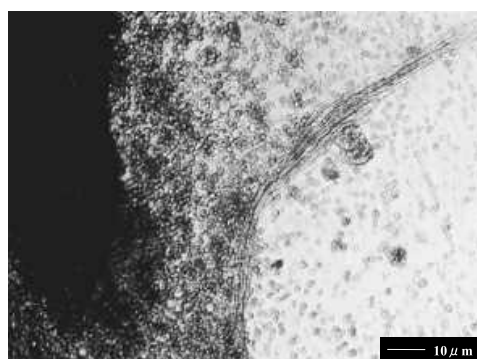


図4．組織培養開始から36日目の膜状有機物。

4. 考察

In vivo での殻体再生実験では、カバーガラス挿入から10日目以降に膜状の有機物が形成され、その後、結晶が形成された。この結晶はSamata *et al.*(1994)が行った組織培養で形成された結晶と、その形態が類似していた。

In vitro での組織培養実験で観察された膜状の有機物は、微分干渉顕微鏡での観察の結果、殻体再生実験の過程で生じた膜状有機物と、その形態が類似していた。Gong *et al.*(2008)も組織培養の長期化に成功しているが、本実験で認められたような膜状有機物に関する言及はない。今回作成した培地の組成は、Gong *et al.*(2008)が考案した組成に塩濃度を海水の塩濃度に上げ、HEPES等の細胞毒を除去しており、また、

組織の切り出し方も、Gong *et al.*(2008)は抗生物質を添加した溶液中に数時間浸け、微生物の混入を処理しているのに対し、本実験ではヨードチンキとエタノールを使い、短時間で処理している点が異なる。これら2点の差異が、膜状の有機物の形成に関係していることが考えられる。この膜状有機物は、組織に拍動様の動きが観察されると同時、あるいはその直後に形成された。このことから膜状有機物は、組織からの分泌成分から生成されたと考えられる。また、本研究で*in vitro*で確認された膜状有機物が、本研究で行った*in vivo*実験で確認された成分とその形態が類似していることから、この膜状有機物が可溶性有機基質成分とともに、結晶形成に関与していることが強く示唆される。

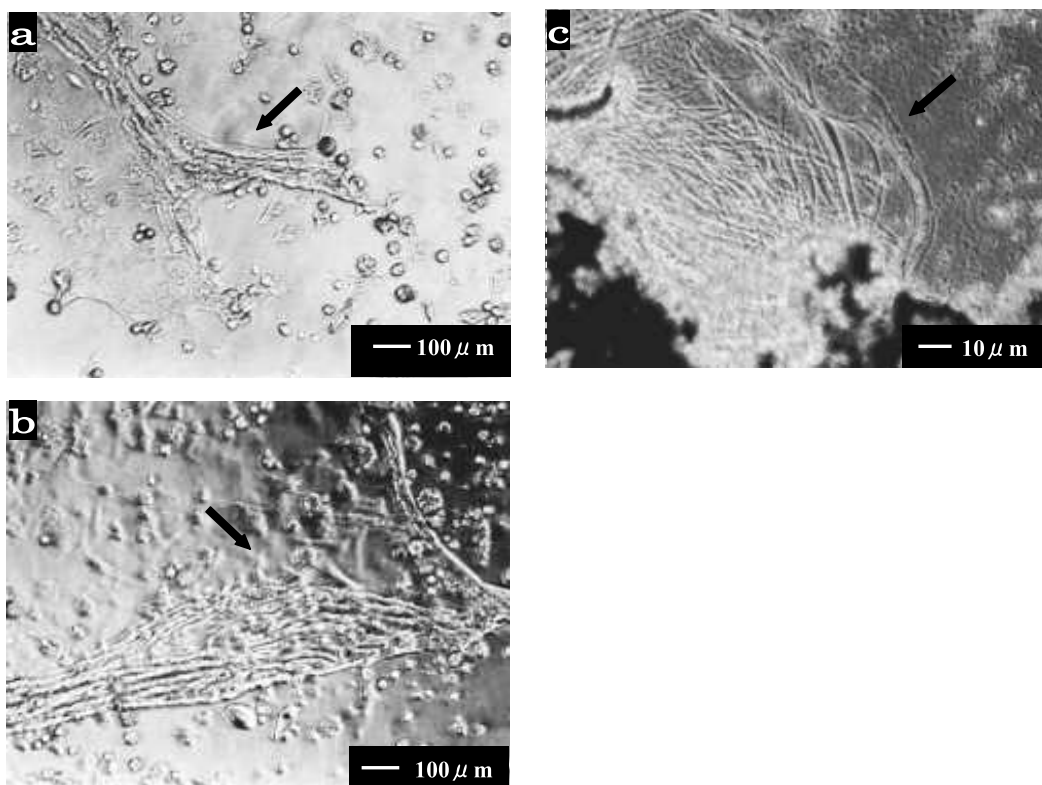


図5．組織培養開始から36日目の膜状有機物（a, b 矢印）と殻体再生実験開始から10日目の膜状有機物（c 矢印）の比較。

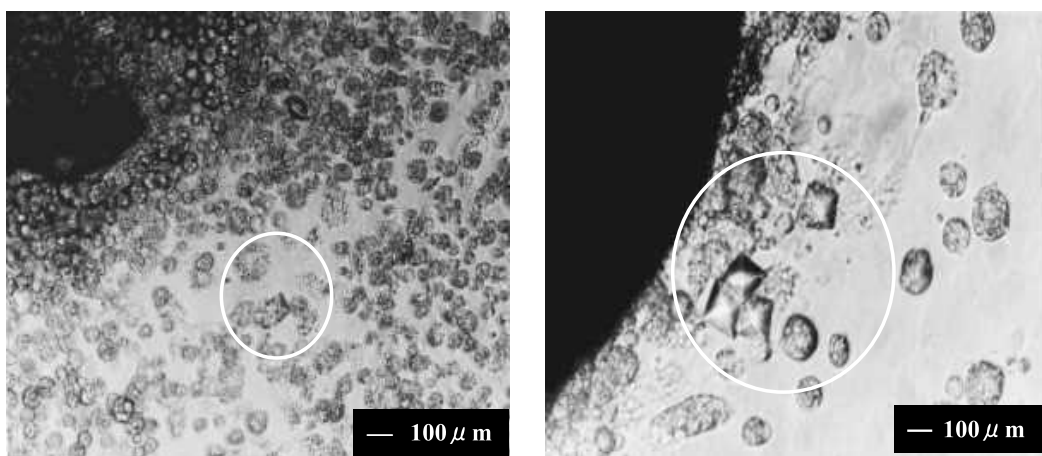


図6．組織培養開始から40日と42日目の結晶（サークル内）。

本研究で用いた培地中では、組織の生育は50日間の培養の長期化に成功した。しかし、50日目には、それまで伸長していた組織が凝集し、最終的には、plateから剥がれて死滅した。今後、より長期の培養を可能にする培地のさらなる改良が必要とされる。

今後は、膜状有機物のアミノ酸組成分析やFT-IR分析などの生化学的解析を行い、膜状有機物がこれまでに報告されているMSI60などの殻体形成に関与する成分であるかどうかの比較や、また培養後期に形成される結晶のSEM観察、EDS解析、XRD解析(X線回折)などを通じて、形成された結晶の結晶形などの解明と、この結晶と殻体形成に関して検討を加える。

謝辞

本研究の遂行に際し、試料の提供に関してご協力を賜りました三重県水産研究所、青木秀雄氏に深く謝意を表します。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

Gong, N., Li, Q., Huang, J., Fang, Z., Zhang, G., Xie, L.

and Zhang, R. (2008) Culture of outer epithelial cells from mantle tissue to study shell matrix protein secretion for biomineralization. *Cell Tissue Res.* **333**(3), 493-501.

Machii, A. and Kawai, S. (1980) Physiological saline for aquatic mollusca and maintenance of the tissue *in vitro*. *50th Meeting J.T.C.A.*

Machii A. (1989) Tissue culture of shell. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **34**(3), 193-196.

小川崇 (2006) 軟体動物殻体再生実験による有機基質タンパク質の殻体微細構造形成に関する形態学的調査。麻布大学環境保健学研究科修士論文。

Samata, T., Somiya, H., Hirita, 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.

和田浩爾 (1999) 真珠の科学。真珠新聞社、東京。

Zaremba, C. M., Belcher, A. M., Fritz, M., Li, Y., Mann, S., Hansma, P. K., Morse, D. E., Speck, J. S. and Srucky, G. D. (1996) Critical transitions in the biofabrication of abalone shells and flat pearls. *Chem. Mater.* **8**, 679-690.