

クロム硫酸脱灰法の無脊椎動物硬組織への適用

—— Nautilus 真珠層を例にして ——

岩 田 圭 示 *

I まえがき

従来、現生及び化石の脊椎動物のリン酸石灰質硬組織、無脊椎動物の炭酸石灰質の硬組織の脱灰、腐蝕法として、エチレンジアミン酢酸ナトリウムを用いるキレート脱灰法が広く用いられてきた。この脱灰法の特徴は、希酸による脱灰過程と異なり、カルシウムとの錯イオン形成により脱灰が緩慢に進行するため、CO₂の発泡が生ぜず、有機基質の損傷がきわめて小さいものと考えられてきた。そのため、基質の超微構造の研究の立場からも、この方法が推奨されてきた。しかし、キレート試薬は、本来、有機物質の固定作用をもたず、かえって、有機基質の一部を可溶化するのではないかという懸念が抱かれていた。事実、脊椎動物の歯牙組織や軟体動物の貝殻においても、キレート脱灰を施すと基質の一部は可溶化することが知られている (Grégoire et al., 1955; 塩田, 1969)。基質の微細構造を損傷させず、また基質タンパクを保存するためには、脱灰と同時に、基質タンパクの固定を行なうことが望ましいが、中性キレート脱灰液にホルマリンを加えても超微構造には差異がみられない。

最近、Sundstöm (1966) は、エナメルの新たな脱灰法としてクロム硫酸を用い脱灰と固定を同時に行なう方法を考案し良好な結果をえている。筆者は、これまで、キレート脱灰法を用いて軟体動物貝殻の基質タンパクの超微構造の比較研究を進めてきたが、今回、クロム硫酸脱灰法を軟体動物の貝殻に適用し、基質タンパクの超微構造ならびにその生化学的組成についてしらべたので、その結果の一部について簡単に報告する。

謝辞

常々、御指導、御助言をいただいている当教室

の魚住悟助教授に厚く御礼申しあげる。また、心よくアミノ酸の分析をしていただいた当教室の秋山雅彦助教授にも御礼申しあげる。さらに、クロム硫酸脱灰法につき御教示くださったウプサラ大学の Harry Mutvei 教授にも深謝する次第である。

II 研究材料および方法

今回は、頭足類の Nautilus pompilius Linne の住房部位の真珠層を材料として用いた。クロム硫酸脱灰液を作製するには、まず、結晶性クロム硫酸(Ⅲ)の5%溶液をつくり、これに5N NaOHをゆっくりと加えpHを3.6になるよう調整する。脱灰液のpH調整には、とくに慎重を期す必要があり、脱灰液は作製直後に使用せず、1週間ほど放置しpHが安定化した後に使用することが大切である。クロム硫酸による脱灰の速度は、キレート脱灰に比しきわめて緩慢であり、10 μ /dayほどである。1mlのブロック試料でも1ヶ月以上を要し、しかも、これ以上の大きさの試料では、表面のみが脱灰されても、内部が脱灰されず、キレートにも不溶性の沈澱物が生じることがある。したがって、サンプルは、できるかぎり小さくすることが必要で、また、長期間の脱灰によってpHが変化するので、しばしば、新液を注射器などを用いて交換することが肝要である。

脱灰してえられたコンキオリンは、水洗後、オスミック酸(4°C)で1時間固定し、つづいて、エタノールあるいは、水溶性エポキシ樹脂で脱水し、ゼラチンカプセルを用いて、スチレンあるいは、エポキシ樹脂に包埋、硬化させる。その後、ガラスナイフを用い、ウルトラミクロトームにより、超薄切片をつくり、酢酸ウラニル(pH7.0)による電子染色を施し検鏡した。また一部は、Mutvei (1969) の方法に従い、細い針を2本用いて静かに水中でコンキオリンの薄膜片を双眼顕

* 北海道大学理学部地鉱教室

微鏡下で、電子線を透過させるに十分な厚さになるよう剥離した (hand tearing method)。その後、フォルムバル支持膜を貼ったメッシュに試料をすくい、乾燥後、Pt-Pd を蒸着機を用い低角度 (30度以下) でシャドウイングし検鏡した。さらに一部は、超音波発生装置 (ビット先端振巾約 20 μ) を用い、2~3 秒間、超音波を照射し、同様にシャドウイングを施し検鏡した。

III 結 果

(1) コンキオリン膜の超微構造

Nautilus の貝殻真珠層のキレート不溶性のコンキオリンは、inter-lamellar, inter-crystalline の二種類の基質膜を構成している。このうち、アラゴナイト結晶薄板を水平的に仕切る inter-lamellar conchiolin membrane には、電子顕微鏡下で顕著な微小孔 (openings) が観察され、Grégoire (1960) は、nautiloid の微小孔の形態、分布頻度等が、腹足類及び斧足類のそれらとは明瞭に異なることを指摘し、頭足類型模様となすけた。

inter-lamellar conchiolin membrane に認められる微小孔は、超音波を用いて剥離したコンキオリンだけでなく、超薄切片の観察によっても見い出されており (Mutvei, 1969; Iwata, 1975)、微小孔部分には、特別な物質は見い出されていない。

しかし、クロム硫酸で脱灰してえられるコンキオリンにおいては、第 1 図に示す超薄切片の観察からも、inter-lamellar conchiolin membrane のいずれにも微小孔の存在は認められない。さらに、剥離した inter-lamellar conchiolin membrane の観察によっても、第 2 図に示すように、小突起 (protuberances) が全域に発達する緻密かつ平坦な膜構造を示し、微小孔は観察できない。このコンキオリン膜では、EDTA 脱灰コンキオリンで明瞭に認められる脊梁部 (trabeculae) 及び脊梁間領域 (inter-trabecular area) の区分は識別困難である。このコンキオリン膜からは、電子回折及び X 線マイクロアナライザーによる元素分析を行なったが、不純無機物質は検出されなかった。一方、このコンキオリンに超音波を数秒間照射した後に観察すると、第 3 図のように顕著な微小孔が出現し、この多孔模様は、キレート脱灰によりえられるコンキオリンの模様に酷似している。従って、クロム硫酸により脱灰してえられるコンキオリン膜の構造は、キレートで脱灰してえられるコ

第 1 表 EDTA 及びクロム硫酸で脱灰したコンキオリンの amino 酸組成の比較 (残基/1000)

	EDTA で脱灰した コンキオリン	クロム硫酸で 脱灰したコンキオリン
Lysine	7	8
Arginine	52	51
Aspartic acid	76	104
Threonine	13	18
Serine	91	104
Glutamic acid	50	68
Glycine	340	226
Alanine	250	283
Cystein	10	0
Valine	16	37
Isoleucine	14	26
Leucine	20	32
Tyrosine	8	0
Phenylalanine	54	43

ンキオリンとは異なり、“微小孔”部分には、なんらかの有機物質 (おそらくはタンパク質) が充填あるいは被っていると推察された。

(2) コンキオリンの amino 酸組成

Nautilus の EDTA 不溶性、クロム硫酸不溶性のコンキオリンの amino 酸組成の差異についてしらべた。その結果、第 1 表に示すように両者間には、顕著な差異が認められた。

EDTA で脱灰したコンキオリンでは、グリシンが最も多く、次いで、アラニン、セリン等が多い。一方、クロム硫酸で脱灰したコンキオリンでは、アラニンが最も多く、次いで、グリシン、セリンの順である。酸性 amino 酸 (アスパラギン酸、グルタミン酸) は、クロム硫酸で脱灰してえられるコンキオリンに特徴的に多く、バリン、イソロイシン、ロイシンなども多く含まれている。みかけ上は、グリシンの減少分を、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、バリン、イソロイシン、ロイシン等の amino 酸が補なっているようにみうけられる。

IV 考 察

以上の結果から、従来、EDTA で脱灰してえられた inter-lamellar conchiolin membrane には

多孔模様は識別されてきたが、クロム硫酸で脱灰したコンキオリンでは、微小孔部分は、キレート可溶のタンパク質が周囲にゆるく結合して充填あるいは被覆しているものと考えられる。このタンパクは、アミノ酸組成の比較により、おそらく、アラニン、酸性アミノ酸、バリン、イソロイシン、ロイシン等のアミノ酸からなると推察される。

Hare (1963) は、Mytilus californianus の貝殻のアミノ酸分析を行ない、酸性アミノ酸の側鎖とカルシウム、塩基性アミノ酸と炭酸イオンの結合性を推定した。最近、Crenshaw (1972) は、Mercenaria mercenaria の貝殻の可溶性タンパクがアスパラギン酸にとみ、これが、カルシウムと選択的に結合しやすいことを報告し、可溶性タンパク部分に、結晶化が始まるのかもしれないと述べている。真珠層の“微小孔”部分を充填する可溶性タンパクが、真に石灰化に関与しているかどうかについては、いまのところ不明であるが、上記の研究結果とあわせ考えると、検討の価値があると思われる。これまでは、有機基質のどのような部位が石灰化に関与しているかについてははっきりと判っていなかったが、もしも、“微小孔”部分の可溶性タンパクが関係をもっているとすれば、さらに一步石灰化機序の解明に近づくことができよう。“微小孔”部分に可溶性タンパクがどのような理由で存在するのかについては、石灰化機序との関連以外の問題もあるかもしれない。可溶性タンパク部分は、硬タンパク化という一種の変化をこうむらなかった部分ともみることができ、今後、有機基質の分泌過程についてさらに詳しくしらべる必要があろう。

クロム硫酸脱灰法は、キレート脱灰法に比し、脱灰速度がきわめて遅いという欠点はあるが、上述の結果からも、キレート可溶のタンパクの一部を逸散させずに脱灰を進行させることができる。これは、クロムとタンパク質のカルボキシル基との間に安定な共有結合が生じ、タンニン化によって効果的な固定作用が生じるためであると説明されている(塩田, 1969)。基質の超微構造の研究の立場からみると、キレート脱灰法よりすぐれた方法であると思われる。しかし、アミノ酸組成からみて、酸性アミノ酸の保存性は良好であるが、グリシン等の保存には問題があるとみられ、生化学的にもなお検討の余地がある。このクロム硫酸脱灰法は、本来、リン酸石灰質硬組織の脱灰法と

して考案されたものであるが、無脊椎動物の炭酸石灰質硬組織の脱灰法としても適用でき、化石の脱灰にも有効である。Mutvei (1970) は、この方法を走査電子顕微鏡観察のための腐蝕法として利用し、良好な結果をえている。この脱灰法は、各種の石灰質硬組織の微細構造の研究に活用できると思われる。

参 考 文 献

- Crenshaw, M. A. (1972): The soluble matrix from Mercenaria mercenaria shell. Bio-mineralization, vol. 6, 6 - 11.
- Grégoire Ch., G. Duchateau., M. Florquin (1955): La trame protidique des nacrés et des perles. Ann. Inst. Oceanogr., T. 31, 1 - 36.
- Grégoire Ch. (1960): Further studies on structure of the organic components in the mother-of-pearl, especially in pelecypods. Bull. Inst. Roy. Sci. Natur. Belg., vol. 36, 1 - 22.
- Hare, P. E. (1963): Amino acids in the proteins from aragonite and calcite of Mytilus californianus. Science, vol. 139, 216 - 217.
- Iwata, K. (1975): Ultrastructure of the conchiolin matrices in molluscan nacreous layer. Jour. Fac. Sci., Hokkaido Univ., vol. 17, 173 - 229.
- Mutvei, H. (1969): On the micro- and ultrastructure of the conchiolin in the nacreous layer of some recent and fossil molluscs. Stockholm Contributions in Geology, vol. 20, 1 - 17.
- Mutvei, H. (1970): Ultrastructure of the mineral and organic components of the molluscan nacreous layers. Biomineralization, vol. 2, 48 - 72.
- 塩田研次 (1969): エナメル質脱灰切片の作り方. 歯界展望, 33 卷, 第 4 号, 739 - 747.

図版 I

第 1 図. クロム硫酸脱灰後の真珠層コンキリオンの電子顕微鏡写真 (超薄切片)。層状に発達する inter-lamellar conchiolin membrane と垂直に仕きる inter-crystalline conchiolin membrane に囲まれた空隙には, intra-crystalline conchiolin と思われる基質膜が観察される。

第 2 図. Hand tearing method で分離した一枚の inter-lamellar conchiolin。微小孔は見られず顆粒状小突起が膜全体に発達している。

図版 II

第 3 図. 超音波照射後のコンキリオン。微小孔が生じはじめている。

第 4 図. EDTA で脱灰し, hand tearing method で分離したコンキリオン。楕円形の nautiloid pattern がみられる。

(論 文 紹 介)

J. L. Simpson and Ch. A. Vaccaro (1974)

An Ultrastructural Study of Silica Deposition in the
Freshwater Spong Spongilla lacustris.

J. Ultrastr. Res, vol. 47, 296 - 309.

生体鉱物として石英を分泌するものは珪藻, カイメンなどあまり多くないが, 筆者らは淡水性のカイメンの 1 種 Spongilla lacustris について, その骨針 (spicule) の初期段階における分泌と沈着を, 光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察している。また, 数日間の飼育を行ない, 水槽中にゲルマニウムの溶液を加えて, それによって生じる骨針の形成障害についても観察している。

まず, 光顕によれば骨針の初期の分泌には, 2 つの段階がある。a) 石英を含まない中軸部 (axial filament) をもつ分泌細胞, b) 最初から石英があるように見える中軸部をもつ細胞, の 2 つである。

ゲルマニウムの溶液を加えた水槽で飼育したものは, 通常の 8~20本に対し, 2~5本程度しか観察できず, 石英の沈着は阻害されている。

電顕による観察では, 初期の spicule はおよそ

3 つの部分に区分される。すなわち, 1) axial filament (軸部): 幅約 3500~5500 Å, おもに有機質よりなると思われる。100,000 倍ぐらいに拡大しても, 内部に明りような構造は見られない。2) Dense Silica: 軸部に近いところは, 石英がかなり密に存在する。3) Granular Silica: 軸部からはなれると, 石英はまばらになり, HF 処理によっても, すぐに消失する。外側は, 膜状になって, これら 1)~3) をとりかこんでいる。この単位を, Siliclemma とよぶ。

その他, いろいろな観察をもとに, このカイメンにおける石英の分泌は, axial filament によるのではなく, 外側の "membrane" によって行なわれるもので, "membrane phenomenon" のひとつにほかならない。

(神谷英利)



