

硬組織中のキチン-タンパク質複合体*

堀 田 進**

1. はじめに

動物の硬組織を構成する有機物質には、タンパク質・糖・脂質・色素などいろいろのものがあげられる。石灰質の殻や骨・歯などに含まれる有機基質には、タンパク質が存在するが、何らかの形で多糖類が結びつき、石灰化の歴史や生物進化を調べるに際し重要な要素のひとつになっている。

無脊椎動物の硬組織に含まれる多糖類は主として中性多糖類キチンであり、しばしば、これを含む部位を“キチン質である”といわれる。軟体動物の殻の有機物質の研究においても、糖類に関する問題を検討しなければならない。

ここでは、糖類(多糖類を中心に)の現在までの内外の研究報告や綜説、および筆者のおこなったいくつかのデータから、硬組織研究へのアプローチをかねて、現状をまとめ、その問題点を指摘したい。さらに、軟体動物に関しておこなったキチン-タンパク質複合体の赤外線吸収スペクトルによる検討結果を概報する。

2. キチン-タンパク質複合体の分布とその問題点

キチンは節足動物の外皮(クチクラ)をはじめ、軟体動物、環形動物、腔腸動物、線形動物など広く無脊椎動物に分布する。さらに、真菌類の細胞壁や緑藻類などの下等植物界にもキチンが分布する。動物界でのキチンの分布を系統的にみると、キチン合成能は旧口動物の特徴であり、扁形動物、紐形動物など少数のグループでは二次的にキチン合成能が失なわれたものと考えられている(FLOKIN, 1966)。

* 1970年8月15日受理

Susumu HOTTA, Chitin-Protein Complexes in Calcified and Non-calcified Hard Tissues

** 東京教育大学理学部地質学鉱物学教室

軟体動物におけるキチンの分布は、腹足類や頭足類の歯舌や顎、頭足類 *Nautilus* や *Spirula* の殻 (FLORKIN, 1966), イカの甲、腹足類のいわゆるキチン質のふたなどに含まれる。ことに、イカ *Loligo* その他の甲には、ほとんど純粋なキチンが含まれることが明らかにされている。(FOSTER et al, 1960)。

イカの甲はアンモナイトから進化し、体内に移行した特殊な殻とみることができるが、*Sepia* (甲イカ) のように石灰化した甲をもつものと *Doryteuthis* (ヤリイカ), *Ommastrephes* (スルメイカ) や *Loligo* (ペガ) のように非石灰質の甲をもつものが存在する。*

Sepia の甲は、Aragonite (CaCO_3) からなるが、脱灰残渣は不溶性キチンと水溶性タンパク質から形成される。一方、腹足類のふたには、石灰化したふたといわれるキチン質のふたがある (SHROCK and TWENHOFEL, 1952)。

キチンは通常遊離した形では存在せず、タンパク質その他の有機物と結合し、さらに、ポリフェノールや炭酸カルシウムなど無機成分と結合して不溶性の物質となっている。節足動物の外皮 (クチクラ) では、柔軟なタンパク質の層の外表面に脂質が付着し、内側にキチンを伴ったラメラ構造をとり、さらに、カルシウム塩やポリフェノールの重合体を伴って固化している (FOSTER et al, 1960)。

キチン質は、一般に石灰質と対応関係を示すものと考えられており、たとえば、フズリナの殻の成分では、キチン質 (下等なもの) から CaCO_3 (高等なもの) への進化したものであると考察されている (WELLER, 1942)。これが事実とすれば、*Parafusulina*, *Neoschwagerina*, *Pseudoschwagerina* には、キチンと石灰質が混在し、その移行型ということになる (藤原, 1961)。

生物界全体を歴史的にみると、キチンの存在は真菌類 (Eumycetes) にまでさかのぼることができ、石灰化の発生は、それより新しいものと考えられる。しかし、無脊椎動物のより高等な節足動物、軟体動物、擬軟体動物では、キチン質と石灰化の関係はより複雑であり、キチン $\rightarrow$ CaCO_3 の移行のみでは説明することができない。

軟体動物のイカの甲で、*Loligo* (ペガ) ではほとんど純粋なキチンが含まれるといわれ、*Sepia* (甲イカ) では、無機質は CaCO_3 からなるが、有機物質の主体は不溶性のキチンであり、タンパク質その他の有機物質が結合している。軟体動物の石灰化した殻にも、その有機基質にわずかな量の糖 (おそらくキチン) が存在する。頭足類の殻や斧足類の殻の真珠層には、殻全体の 0.005~0.07%, 真珠層以外で 0.0001~0.003 % 程度のグルコサミンが検出される。腹足類のなかで、古腹足類の真珠層で 0.01~0.05 %, 真珠層以外で 0.0002~0.002 %, 中腹足類および新腹足類の真珠層以外の層で 0.00001~0.0006 % 程度のグルコサミンを含んでいる (HARE and ABELSON, 1965)。

* 分類上、これらは十腕目 (Decapoda) のセピア亜目 (Sepioidea) とイカ亜目 (Teuthoidea) に位置づけられている。

貝殻真珠層のばあい、脱灰したときの残査において、電子顕微鏡下で観察されるナクロイン繊維の0.5~6%はキチンであるといわれ(FLOKIN, 1966)、一方、組織化学的研究においても、いずれの貝殻構造であっても、脱灰基質のPAS-反応が陽性であるということ(小林, 1968)が、キチンの存在を示しているのかもしれない。

甲殻類の外皮(クチクラ)には25~50%のキチンが含まれるが、タンパク質が結合し、さらに、 CaCO_3 あるいはポリフェノールが結合している(FOSTER et al 1960)。

Lingula の殻は、キチンとタンパク質その他の有機物から大部分が構造されているが、そこに、アパタイト(磷酸カルシウム)が沈着している。アパタイトは脊椎動物の骨や菌の構成鉱物であるが、脊椎動物のばあい、含まれる糖質はコンドロイチン硫酸である。

このような硬組織中のキチンの分布をみると、キチンをただ石灰質に先行する物質としてみるだけでなく、石灰化基質有機物質の構成員としてとらえ、キチンがどの程度石灰化に関与するかといった問題の存在をみることができる。キチンは何らかの結合でタンパク質と結びついていることから、単にキチンを分離するのではなく、タンパク質と結合した物質としてとらえていかなければならない。*

脊椎動物の骨や菌などは、無機物質としてリン酸カルシウムを有し、有機基質に含まれるタンパク質は、一般にコラーゲンとよばれている。その有機基質には、コンドロイチン硫酸が含まれる。生物の系統関係と石灰化現象の関連を調べることは重要な課題である。無脊椎動物における多糖類-タンパク質複合体の研究も、このような点における位置づけがなされなければならないだろう。

3. キチンの性質と同定

キチンを分離・精製する方法は多くの研究により、種々の方法がなされている(BE MILLER, 1965)が、いずれにも共通していることは、 KOH や NaOH などのアルカリ性水溶液や Na_2CO_3 溶液を用いてキチンを分離していることである。その結果、精製されたキチンは無色の不溶性物質であり、N量約6.8~7.1%を示す。すなわち、キチンは、水、アルカリ、希酸に不溶で、濃酸には溶ける性質をもっている。

キチンの組成と構造を決めるために多くの研究がなされているが、その過程はFOSTER et al, (1960)に綜括されている。その結果、キチンの構成単糖は2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコースであり、これが $\beta(1\rightarrow4)$ 構造のグリコシド結合をもつ直鎖ホモグリカンであることが示された。このような分子構造の研究に分子旋光度の測定、赤外吸収など物理化学的な方法も寄与している。

* キチンがタンパク質と結合して存在していることは考えられているが、キチンと結合したタンパク質の部分については詳細な検討がなされていない。

たとえば、赤外線吸収において、タイプ2の吸収が、エクアトリアル C_1-H 変角振動により 890 cm^{-1} 、アキシアル C_1-H 変角振動により 840 cm^{-1} 付近にみられ、キチンの吸収は $884\sim 890\text{ cm}^{-1}$ 、に存在することから、 $\theta-D$ 構造のグリコシド結合が推定されている(FALK et al., 1966)。

一方、キチンに α -キチンと β -キチンの区別がなされているが、これはX線回折で決められたキチンの固体状態における立体配座(コンフォメーション)によるものである。

Loligo の"pek"やAphroditeの剛毛のキチンは β -キチンで、節足動物や真菌類のキチンは α -キチンであるといわれる(LOTMAR et al., 1950)。

4. 硬組織中のキチンの存在形態

キチンは、生物体でほとんど単独の形では存在せず、タンパク質と何らかの形で結合している。甲殻類の外皮(クチクラ)では、基本構造はタンパク質とキチンのラメラ構造でできていることはさきに引用した。FOSTER et al. (1960)も指摘しているように、キチンが十分に伸びた β -立体配置(configuration)を示すばあい、容易に、キチン-タンパク質複合体を形成するだろう。

糖とタンパク質との間がどのように結合しているかという問題は、石灰化硬組織中の無機-有機の結合の問題とともに、硬組織のミクロのレベルにおける構造を検討するに際して大きな課題のひとつであろう。

クチクラのはあい、タンパク質の部分は水溶性で、キチンとタンパク質の間に弱い結合が存在する(HACKMANN, 1955)、*Sepia*の甲、腹足類のキチン質のフタ、*Lingula*の殻などにおいても、筆者の調べた限りにおいては、キチン-可溶性タンパク質複合体として存在し、その間の結合は弱いことが認められる。

糖とタンパク質の結合はこのような比較的ゆるやかな結合(温和な条件で切れる)と、より強い共有結合性のものなど、いくつかの結合のタイプがある。後者のばあい、一群の化合物は糖タンパク質とよばれている。糖タンパク質の結合様式にはいくつかのタイプがある(平野, 1968)。

(1) 酸性アミノ酸の β -カルボキシル基とアミノ糖の間でアミド結合をつくるもので、N配糖体型とイミノエーテル型が考えられている(山科, 1963)。

(2) タンパク質の遊離カルボン酸とムコ多糖の水酸基のエステル結合(KATSURA et al., 1966)。

(3) タンパク質中のセリンやスレオニンの水酸基と糖のグリコシド結合しているもの(ANDERSON et al., 1964)などが知られている。

より強い結合体で結びついている糖タンパク質の糖部分はいずれも2種以上の単糖からなるヘテロ多糖であるので、ここで問題としているキチンのようなホモ多糖とはかなり性質が異なる。

ただ、上に記したエステル結合やD-グリコシド結合などは、アルカリ処理で分解すること(平野, 1968)を考慮すると、ホモ多糖-タンパク質にあっても、それらの結合が存在しないかといったことが問題となろう。キチンとタンパク質がどのような結びつき方をしているかは残されている問題である。

5. 軟体動物の硬組織におけるキチン-タンパク質複合体の検討

筆者は軟体動物の殻に含まれる有機物質を検討する過程で、殻がキチン-タンパク質複合体から構成されているタイプについて調べている。すでにのべたように、キチンを含んだ殻であっても石灰化の程度は生物の種類によりかなり異なる。また、単にキチンを分離するのみでなく、キチンとタンパク質(その他の有機物も結合している可能性がある)が結合されている全体を比較研究の対照にすることは、すでにのべたように筆者の考えである。そして、当面の研究として、イカの甲および腹足類のフタを対照にしている。

現在までに、この検討のために用いた試料標本は、頭足類の十腕目(Decapoda)のイカ亜目、スルメイカ(*Ommastrephes*), セビア亜目、コウイカ(*Sepia*), 腹足類のサザエ(*Turbo*) ツメタガイ(*Neverita*), エッチュウバイ(*Buccinacea*), ツノキガイ(*Pleuroploessa*)のフタおよび、比較のため擬軟体動物のシャミセンガイ(*Lingula*)の殻である。

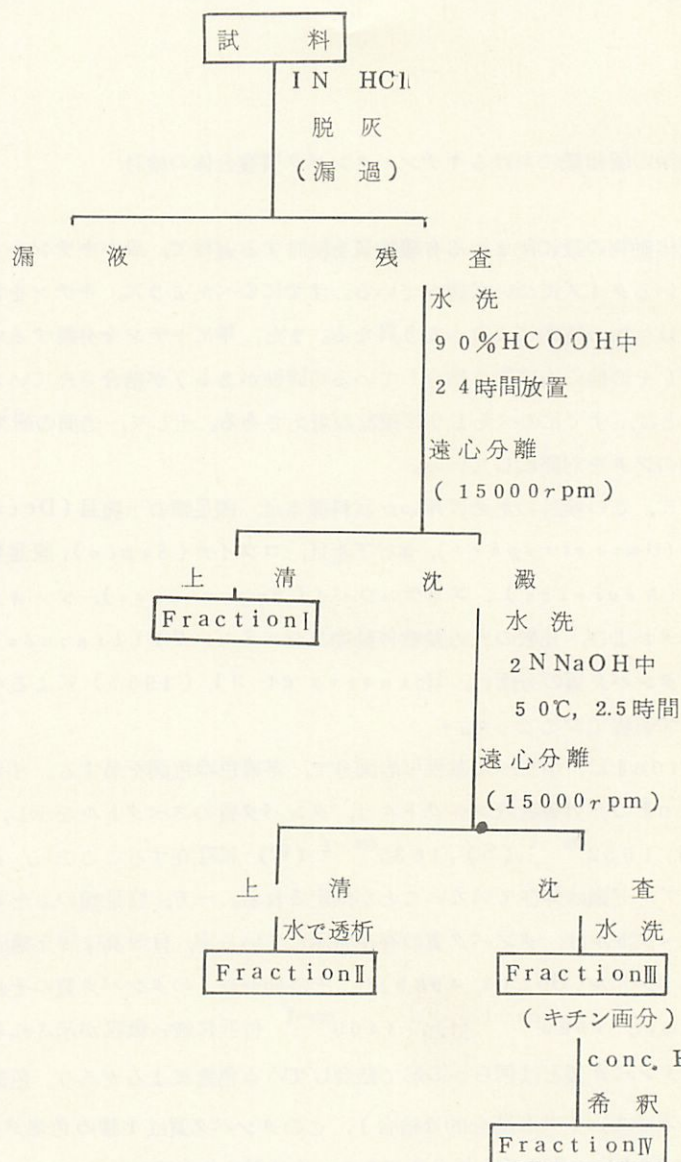
キチンとタンパク質の分画は、HOBOWITZ et al. (1957)によるキチン分離法を基礎に第1図に示す過程でおこなった。*

FractionⅡは、中性~塩基性可溶画分で、茶褐色の色調を呈する。イカ(*Sepia*)の甲のFractionⅡの赤外線吸収スペクトルは、タンパク質のスペクトルを示し、アミド吸収帯は 1665 cm^{-1} (S), 1652 cm^{-1} (S), 1635 cm^{-1} (W)に存在することから、このタンパク質のおおくのポリペプチド鎖は伸びていないことが推定される。一方、腹足類のふたのFractionⅡの赤外線吸収スペクトルは、タンパク質の存在を示しているが、貝殻真珠層を構成するタンパク質の赤外線吸収スペクトル(Hotta, 1969)や、その他おおくのタンパク質のそれらとは異なる。腹足類のふたのばあい、 1590 cm^{-1} 付近、 1400 cm^{-1} 付近に強い吸収が示される。これらの吸収は、おそらく、タンパク質とは何らかの形で結合している色素によるだろう。色素がタンパク質と強く結合しているばあい(共有結合的な結合)、このタンパク質は1種の色素タンパク質といえる。この点、FractionⅡをさらに分画できないか検討する必要がある。

FractionⅢは、不溶性物質で、conc. HCl 中で溶け、HCl の濃度を低くすると再沈殿する。イカの甲、シャミセンガイ(*Lingula*)の殻、バイ(*Buccinacea*)やツノキガイ(*Pleuroploessa*)のふたに、FractionⅢを分画することができる。これらのFractionⅢ

* この分画法は、微量に含まれるキチンを分画するには適当でない。

(第1図) キチン, 可溶タンパク質分画法



の赤外線吸収スペクトルは、多糖類のスペクトルを示している。このスペクトルは、コンドロイチン硫酸などの $S=O$ 基や、タンパク質のアミドⅢによる 1240 cm^{-1} 付近の吸収が検出されず、 β -D 構造を示す 890 cm^{-1} 付近の吸収が存在することから、キチンのスペクトルであることが確認できる。

赤外線吸収スペクトルによるこれらの検討から、いくつかの考察および問題が指摘される。

(1) 腹足類のふたには、石灰化しているものと石灰化度の低いあるいは非石灰質があるが、後者のばあい、必ずしも、キチン質であるとはかぎらない。*Buccinacea* および *Pleuroploosa* のふたにはキチン-タンパク質複合体が存在するが、*Neverita* のふたには、赤外線吸収スペクトルによるかぎり、キチンが確認されない。*Turbo* の石灰化したふたの内側に付着している茶褐色の膜はキチン質ではない。

(2) Fraction II と III は、2 N NaOH で分離されるので、キチンと可溶性タンパク質画分の間は、弱い結合、(共有結合ではない)が存在するであろう。Fraction II のアミノ酸組成や、Fraction III の中にタンパク質が存在するか否かは、今後調べてゆきたい。

(3) Fraction II に含まれるタンパク質は水溶性であるが、現在まで調べられている貝殻構成タンパク質は、酸やアルカリに対して常温で安定な不溶性タンパク質である。この点、イカの甲の Fraction II の中のタンパク質の構造に関するデータは、石灰化硬組織構成タンパク質の構造に関する研究に新しい内容を提供する。ことに、これらのタンパク質がキチンと何らかの形で結合していることが重要であると思われ、石灰化に際して、キチン-タンパク質複合体が何らかの役割を果しているのかもしれないので、今後、検討してゆきたい。

文 献

- ANDERSON, B., N. SENO, P. SAMPSON, J. G. RILEY, P. HOFFMAN, K. MAYER
(1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, PC2716.
- BE MILLER (1965) "Method in Carbohydrate Chemistry" vol. V,
103-105, Acad. Pres. London.
- DARMON, S.E. and K.M. RUDALL (1950) *Disc. Faraday Soc.*, **9**,
251-260.
- FALK, M., D.G. SMITH, J. MCLACHLAN and A.G. MCINNES (1966)
Canadian Jour. Chem., **44**, 2269-2281.
- FLORKIN, M. (1966) "A MOLECULAR APPROACH TO PHYLOGENY",
Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 「分子からみた生物進化」(江上不二夫監訳). 築地書館
- FOSTER, A.B. and J.M. WEBBER (1960) *Adv. Carbohydrate Chem.*, **15**,
371-393.
- 藤原隆代 (1961) 資源研集報, **54-55**, 2-6
- HACKMAN, R.H. (1955) *Jour. Biol. Sci.*, **8**, 530.
- HERE, P.E. and P.H. ABELSON (1965) *Carnegie Inst. year Book*,
64, 223-232.

- 平野茂博(1968)「ムコ多糖の構造と機能」(長谷川ほか著), 第3章, 南江堂
- HOTTA, S.(1969) *Earth Science*, 23, 133-140.
- HOROWITZ, S.T., S.ROSEMAN and H.J.BLUMENTHAL (1957) *Jour.Amer. Chem. Soc.*, 79, 5046-5049.
- KATSURA, N., and E.A.DAVIDSON (1966) *Biochim. Biophys.Acta*, 121, 120-
- 小林巖雄(1968) *Venus*, 27, 111-121.
- LOTMAR, W. and L.E.R.PICKEN (1950) *Experientia*, 6, 58.
- 前田昌徹(1968)赤外線吸収スペクトル, 「糖質実験法」蛋白質・核酸・酵素(別冊), 108-120.
- NEELY, W.B.(1957) *Adv. Carbohydrate Chem.*, 12, 13-33
- SHROCK, R.R. and W.H.TWENHOFEL (1953) "Principles of Invertebrate paleontology" McGraw-Hill Book Comp.
- WELLER, J.M.W., L.G.HENBEST, and C.O.DUNBAR (1942) *Pennsylvanian Fusulinidae of Illinois, Stategeological Survey.Bull.*, No. 67.
- 山科郁男(1963) 化学と工業, 16, 317-327.