

## 軟体動物と大型有孔虫の殻体有機基質の結晶形成に関わる機能

関口記由\*・佐俣哲郎\*\*

### Function related to crystallization of the organic matrix isolated from molluscan and larger foraminifera shells

SEKIGUCHI Noriyoshi and SAMATA Tetsuro

#### Abstract

Hard tissue formation by organisms is commonly regulated by many kinds of macromolecules constituting organic matrix (OM). OM of molluscan shell is one of the best studied of all  $\text{CaCO}_3$  biominerals, and considerable information has been accumulated regarding the shell microstructure, chemical composition and histochemical property of it.

The other investigations came from *in vitro* studies of crystallization in which matrix activities related to crystal formation were measured. However, by the method of experiment, the result were remarkably different, and therefore, the precise function of OM remains unclear even *in vitro*.

We re-examined the several types of assays commonly encountered, and we newly developed an experimental system to elucidate the specific role of the OM-components excluding the inorganic effect of the crystallization solution. For this purpose, we used three kinds of the purified OM-components, already identified by gene analysis as additives. Clearly, this approach will yield useful information in establishing the function of the OM-components as well.

In addition, we carried out biochemical analysis and crystallization experiment by using the OM isolated from the shell of larger foraminifera, and compared the result with that of molluscan OM.

Key words: molluscan shell, foraminifera shell, organic matrix, crystallization

#### 1. はじめに

バイオミネラリゼーションの分野において、軟体動物の殻体形成機構の解明は長年の課題である。この機構には、殻体中に含まれる有機基質タンパク質 (OM) が深く関与すると考えられ、OMを用いた*in vitro*での多様な実験が行われてきた。しかし、実験系を構成する種々の要素の違いから、得られた結果が研究者ごとに大きく異なっている (Belcher *et al.*, 1996; Falini *et al.*, 1996; Samata *et al.*, 1999)。このため、これまでに行われた実験系の再検討を行い、あわせてOMの機能を明らかにするための新しい実験系の開発を試みた。

一方、アコヤガイの真珠層を構成する有機基質成分の構造解析が終了したため、個々の成分ごとの機能の検討も行った。

また、軟体動物の結晶形成実験との比較・検討のため、原生動物の大型有孔虫類の有機基質タンパク質の機能について、その予察的な実験も行ったため、その結果についても報告する。

#### 2. 分析試料

【軟体動物】

・アコヤガイ [*Pinctada fucata martensii*]

2003年5月5日受付, 2003年6月16日受理

\* 麻布大学環境保健学研究科 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

\*\* 麻布大学環境保健学部細胞生物学研究室 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

e-mail: samata@azabu-u.ac.jp

愛媛県宇和島市 愛媛県水産試験場より提供  
・イケチヨウガイ [*Hyriopsis schlegeli*]

茨城県牛久市 明恒パール株式会社より提供  
【大型有孔虫】

・*Marginopora* sp.

沖縄県島尻郡 阿嘉島臨海研究所岩尾研二氏  
より提供

・*Cycloclypeus* sp.

海洋科学センター坂井三郎氏より提供

### 3. 結果と討論

#### 1) 従来の結晶形成実験の再検討の結果について

Belcher *et al.* (1996) は、無機的に方解石のみを形成する母液に、軟体動物殻体真珠層（アラレ石）から抽出した水可溶性有機基質（WSM）を添加した場合にアラレ石結晶が形成されたことから、「真珠層（アラレ石）のWSMは、結晶をアラレ石に誘導する能力を持つ」と結論づけた。

一方、Falini *et al.* (1996) は、Belcherらが用いたのと同じ組成の母液に、軟体動物殻体真珠層（アラレ石）から抽出したWSMと、水不溶性有機基質（WISM）を添加した場合、WSMとWISMの両成分が存在する場合に限ってアラレ石結晶が形成されたことから、「真珠層（アラレ石）中の有機基質タンパク質は、WSMとWISMの両成分が存在する場合にのみ、結晶をアラレ石に誘導する」と結論づけた。

これに対してSamata *et al.* (1999) は、上述の2つの報告で用いられたものと同じ組成の母液に、軟体動

物殻体真珠層（アラレ石）から抽出したWSMとWISMの両成分を種々の組み合わせに加えて実験を行った結果、両成分単独でも、両成分を混合した場合でも、アラレ石結晶は形成されなかった。一方、無機的にアラレ石のみを形成する母液を用いて実験を行った場合には、WSMとWISMの両成分が存在する場合に、真珠層に特有の六角形平板上の結晶が形成された。このためSamata *et al.* は、「真珠層（アラレ石）中の有機基質タンパク質は、結晶多形の制御には関与せず、結晶の形態を規制する働きを持つ」と結論づけた。

本研究では、これらの3種類の実験系について再実験を行った。それぞれの実験系に用いられた実験方法と同条件で実験を行ったところ、すべての実験系で報告と同様の結果を得ることが出来た。また、有機基質タンパク質を添加せずに実験を行ったところ、Belcher *et al.*, Falini *et al.* の実験系ともに、無機的にアラレ石結晶が形成されることが明らかになった。

上記の実験において得られた結果を明らかにするために、それぞれの実験系での母液のpH変動、および結晶形成開始時間を測定した。その結果を表1と表2に示す。

Belcher *et al.* とFalini *et al.* の実験系では、実験開始10分間で母液のpHが急激に上昇する（表1）と共に、実験開始30分間で結晶形成が開始されていることが判明した（表2）。

北野（1990）は、無機的にアラレ石結晶が形成されやすい条件として、(1) 溶液中にMg<sup>2+</sup>が存在する場合

表1 各実験系における母液のpH変動

	Blank	10分後	30分後	60分後	3時間後	6時間後	24時間後	48時間後
Belcher <i>et al.</i> (1996)	7.23	8.00	8.04	8.15	8.32	8.46	8.62	8.66
Falini <i>et al.</i> (1996)	7.23	9.88	9.80	9.81	9.97	10.17	10.56	10.71
Samata <i>et al.</i> (1999)	6.20	6.21	6.43	6.52	6.71	6.82	7.31	8.19

表2 各実験系における結晶形成開始時間

	Blank	10分後	30分後	60分後	3時間後	6時間後	24時間後	48時間後
Belcher <i>et al.</i> (1996)	×	×	○	○	○	○	○	○
Falini <i>et al.</i> (1996)	×	×	○	○	○	○	○	○
Samata <i>et al.</i> (1999)	×	×	×	×	×	×	○	○

○：結晶形成  
×：結晶未形成



と、(2) 結晶の形成速度が著しく早い場合を挙げている。今回の再実験の結果は、Belcher *et al.*, 及びFalini *et al.*の実験系でアラレ石結晶が形成されたのは、有機基質タンパク質の機能によるものではなく、不適切な実験条件により結晶が著しい早さで形成されたことに起因することを暗示している。

## 2) 新しい実験系での結晶形成実験の結果

従来の結晶形成実験では、軟体動物殻体から抽出した未精製の有機基質タンパク質を用いていたが、今回の研究では、有機基質タンパク質をSDS-PAGE等で分離・精製し、結晶形成実験系に添加することにより、個々の成分の機能を明らかにすることができた。

### (1) アコヤガイ真珠層中の有機基質タンパク質を用いた実験

アコヤガイ真珠層中の有機基質タンパク質には、WSMとして、nacrein (Miyamoto *et al.*, 1996) と、N16 (Samata *et al.*, 1999) と命名された2成分と、フィブロインに類似の構造を持つMSI60の重合体である膜状の不溶性タンパク質のWISMが存在する。

#### 1) N16

N16はCys, 芳香族アミノ酸, 酸性アミノ酸に富む球状タンパク質であり、分子表面にAsnとGlyの繰り返し配列からなるGlyループ部分が露出している。WISMと複合体を作り、アラレ石結晶形成に関与すると考えられている (Samata *et al.*, 1999)。

#### ●方解石系母液を用いた実験

##### ①方解石系母液+N16

N16のみを添加した場合、アラレ石結晶の形成は認められなかった。方解石結晶に関しては添加量に関わらず、結晶に変化はほとんど見受けられず、過剰に添加した場合 (20  $\mu\text{g/ml}$ 以上) でのみ結晶形成の阻害傾向が認められた。

##### ②方解石系母液+N16+WISM

N16とWISMを混合して添加した場合も、N16のみを添加した場合と同様の結果が得られた。

#### ●アラレ石系母液を用いた実験

##### ①アラレ石系母液+N16

無機的に形成される黒色球状のアラレ石結晶と同じ形態の結晶が形成された。N16の添加量の増加に従って結晶サイズが大きくなる一方、結晶数は減少した。

##### ②アラレ石系母液+N16+WISM

N16のみを添加した場合と同じ形態の結晶が形成された。結晶はWISM膜外のみならず、膜上にも形成された。

以上の結果から、N16の持つ機能としては、結晶核をWISM上に誘導する働き、及びWISMと結晶核を結

びつける“receptor”的な働きが考えられる。

#### 2) nacrein

nacreinは分子の中央付近にNGNNGの繰り返し配列が存在し、その両端に炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase:CA) 類似配列が存在するという特異的な構造を持つ (Miyamoto *et al.*, 1996)。

#### ●方解石系母液を用いた実験

##### ①方解石系母液+nacrein

アラレ石結晶の形成は認められなかった。nacreinの添加量の増加に従って結晶数は減少し、結晶形態も、アラレ石の標準形では半透明で平行四辺形を示すのに対し、黒色で凹凸の多い不均一な結晶が形成された。

##### ②方解石系母液+nacrein+WISM

nacreinのみを添加した場合と同様、アラレ石結晶の形成は認められなかった。しかし、形成された方解石結晶のサイズが、nacreinの添加により大きくなる特徴が認められた。また、有機基質タンパク質の添加量が一定量 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 以上になると結晶形成は完全阻害された。

#### ●アラレ石系母液を用いた実験

##### ①アラレ石系母液+nacrein

無機的に形成される黒色球状のアラレ石結晶と同じ形態の結晶が形成された。nacreinの添加量の増加に従って結晶サイズが大きくなる一方、結晶数が減少した。

##### ②アラレ石系母液+nacrein+WISM

真珠構造に特徴的な円盤状の結晶がWISM上に形成された。

以上の結果から、nacreinの持つ機能としては、結晶を成長させる“promoter”的な働き、及び結晶の成長方向を制御する“regulator”な働きが考えられる。

N16, nacrein, WISMのどの成分に関しても、無機的に方解石を形成する溶液中で、アラレ石結晶を誘導する働きは認められなかった。つまり、これらの成分には、結晶をアラレ石に誘導する炭酸カルシウム結晶多形制御の働きがないか、あっても極めて弱い活性しか持たないことが明らかになった。

### (2) イケチョウガイ真珠層中の有機基質タンパク質を用いた実験

イケチョウガイは淡水中でアラレ石からなる真珠層を形成する。淡水生軟体動物の外套膜外液は、海生種のものとは異なり、無機的に方解石が形成されやすい組成をもつ。それに関わらず、淡水中に生息するこの貝がアラレ石からなる真珠層を形成する機構は不明である。我々は、有機基質成分中にアラレ石結晶核を誘導するいわゆる“aragonite-nucleator”成分が存在し、この成分の働きでアラレ石殻体が形成される可能性を



考えている。

本研究ではこの可能性を確認するための実験を行った。その結果、無機的に方解石のみを形成する母液に、イケチョウガイ真珠層中から抽出したWSM及びWISMを同時に添加したところ、アコヤガイ真珠層中に見られる円盤状のアラレ石と形態的に非常によく類似した結晶が形成された。この結晶を粉末状にしたものを、X線を照射する領域を20 $\mu$ mまで絞ることが出来る微小領域X線回折分析を行った。その結果、方解石、バテライトと共にアラレ石が検出された。このことは、イケチョウガイの有機基質タンパク質成分には、結晶をアラレ石に誘導する機能を持つ可能性を示唆しており、より詳細な追加実験の必要があろう。

以上の研究結果を基にした、結晶形成実験における今後の課題は以下になる。まず、海水生で方解石殻体を持つホタテガイなどの有機基質タンパク質中に存在する可能性がある“calcite-nucleator”の機能を解明することである。これに対して、淡水生でアラレ石殻体を持つイケチョウガイなどの有機基質タンパク質中に存在する可能性がある“aragonite-nucleator”の機能について、さらに詳しい検討を行う必要がある。第2に、今回実験に用いた有機基質成分は、殻体をEDTA脱灰して抽出したものである。このため、有機基質タンパク質にEDTAで溶解せずに残った炭酸カルシウム結晶が存在する可能性を完全に否定できない。この問題を解決する一つの方策として、遺伝子から発現させた組み換えタンパク質を用いて実験を行うことも計画する必要がある。さらに、今回*in vitro*で得られた結果を、*in vivo*で確認するための新しい実験系を考察する必要もある。

### 3) 大型有孔虫の殻体形成機構解明に関する予察的実験結果

今回の報告では、軟体動物での実験結果と比較するため、石灰化を行う動物の中で最も下等な種類の1つである原生動物の1種の大型有孔虫を用いた実験を行った。

まず、有孔虫の殻体中から有機基質タンパク質を抽出し、SDS-PAGEを行い、銀染色を行った結果、*Marginopora* sp.ではスミア状のバンドが、*Cycloclypeus* sp.では37kDa近傍に1本のバンドが確認された。しかし、CBB染色やStains All染色では明瞭なバンドが観察出来なかったことから、これらの種の殻体中に含まれる有機基質タンパク質の量が極めて少ないことが推測された。

次に同試料を用いて結晶形成実験を行った。その結果、*Marginopora* sp.では、WSMを多量に添加(20 $\mu$ g/ml)したところ、方解石結晶上にさらに円形の結晶

と思われるものが形成されたが、*Cycloclypeus* sp.ではWSMを多量に添加すると、結晶形成が阻害されるという結果が得られた。

大型有孔虫は軟体動物と比較して、生体が微小であることから、殻体中に含まれる有機基質タンパク質の量が非常に少ないと考えられる。このため、有機基質タンパク質の構造解析や機能解析を行う際には試料の採取方法に何らかの工夫が必要である。上記の簡単な予察的実験で、軟体動物の有機基質タンパク質で得られた結果から有機基質タンパク質の添加量や、結晶形態などに関する異なる結果が得られたことから、今後、より詳細な実験を行うことで、これまでにない新たな知見を得られる可能性があると考えられる。

### 謝辞

大型有孔虫の予察的研究に関し、種々のご教示をいただきました島根大学教育学部野村律夫氏、琉球大学理学部藤田和彦氏、試料をご提供いただきました愛媛県水産技術センター、明恒パール株式会社、阿嘉島臨海研究所岩尾研二氏、海洋科学センター坂井三郎氏に深く感謝いたします。また、微小領域X線回折分析を行っていただいた日本大学松戸歯学部寒河江登志朗氏にも謝意を表します。

### 文献

- Belcher, A. M., Wu, X. H., Christensen, R. J., Hansma, P. K., Stucky, G. D. and Moese, D. E. (1996) Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusk-shell proteins. *Nature*, 381, 56-58.
- Falini, G., Albeck, S., Weiner S. and Addadi, L. (1996) Control of aragonite of calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*, 271, 67-69.
- 北野 康 (1990) 炭酸塩堆積物の地球化学, 東海大学出版, 391pp.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., and Matsusiro, A. (1996) A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearl. *proc. nati. acad. sci. USA*, 93, 9657-9660.
- 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 Letter*, 462, 225-229.
- Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, K., Tanaka, M., Nakashima, K. and Takahashi, T. (1997) Structures of mollusk shell framework proteins. *Nature*, 387, 563-564.