

第126回化石研究会例会講演抄録

(2006年12月16・17日, 麻布大学にて開催)

Session A: バイオミネラルゼーションと進化

魚類おけるエナメル質とエナメロイドの進化

笹川 一郎・石山巳喜夫
 (日本歯科大学新潟生命歯学部)

脊椎動物の硬組織の進化の中で、エナメル質はきわめて明瞭な段階的形態変化を示し、化石としても残りやすいため、進化過程の解析に適した材料の代表である。従来、両生類の幼生や魚類に発達するエナメロイドからエナメル質が進化した、と考えられていた (Fearhead, 1979など)。一方、エナメル質はエナメロイドと同等か、さらに古い起源をもつという主張 (Smith, 1995など) も提起され、両者の関係は硬組織の進化に関する大きな問題のひとつである。エナメロイドとはエナメル質に類似した機能をもつ、歯の表面を覆う高石灰化組織であるが、その形成機構はエナメル質とは異なり、上皮と間葉の両者によって形成される。また、エナメロイドはその形成様式が分類群によって多様であり、それぞれの適応と進化の過程を反映していると考えられ、同一にはくくれない。エナメロイドは魚類で多様に発達した硬組織なので、そのままエナメル質の原型ではない、と考えられる。エナメロイド形成では上皮由来のエナメル器細胞がエナメロイド有機基質の大部分を吸収・脱却し、一方、ミネラルをエナメロイドに輸送して高石灰化層を形成するが、この点は哺乳類のエナメル質形成と共通しており、エナメル質に受け継がれていると思われる。エナメルタンパクの遺伝子は魚類ではまだ発見されていないが、形態的に明らかなエナメル質は現生生物では硬骨魚類の段階から出現する。肉鰭類のシーラカンス類のみならず、条鰭類のガーヤポリプテルスもエナメル質を形成する。ガーヤポリプテルスでは、エナメル質(カラーエナメル質)は同じ歯でキャップエナメロイドと共存する。さらに、これらのガノイン鱗のガノイン層はエナメルタンパクを含むことからエナメル質と相同と考えられる。

エナメル質組織の進化と細胞学的背景

小澤 幸重 (日本大学松戸歯学部)

歯の進化は、1) 歯数と歯式、2) 歯の形態、3) 歯の組織、4) 石灰化、と区分して分析できる。今回は、エナメル質構造の石灰化機構とその細胞学的背景から進化について検討を加える。エナメル質は、エナメル芽細胞により結晶配向と結晶集合が決まり構造形成される。即ちエナメル芽細胞単位のエナメル小柱、細胞の集合単位のシュレーゲル条という組織が作られ、これで進化することが比較解剖学的に明らかである。これを立証するためには、1) エナメル芽細胞とエナメル質の直接的関係、2) 細胞の集合と動き、を立証しなければならない。前者は厚切り切片によって、後者は免疫組織化学によって検討した。

結果と討論:

- 1) エナメル質の構造はエナメル芽細胞の集合と一致し、未分化な細胞の時期からこの傾向が現れていた。
- 2) 細胞の動き、分泌や集合の細胞内物質は、アクチン、チューブリンなどの細胞骨格、デスマブラキンの接着因子である。イヌの歯胚でその局在を調べると、エナメル質を作るエナメル器でケラチンとアクチンが分かれて局在していた。アクチンの局在は、エナメル芽細胞集合とシュレーゲル条に一致し、分泌期のトームスの突起も局在が特徴的に現れていた。アクチンとケラチン、デスマブラキン等は、エナメル芽細胞のみならず外エナメル上皮までのエナメル器全体に分かれて局在していた。以上の結果は、周期的に因子の分布が変化する、つまりエナメル芽細胞のみならずエナメル器全体での変化と動きを示唆している。つまり、エナメル器全体が調和して各組織が連携を保ちつつ周期的な変化する機能を営み、そのもとでエナメル芽細胞が離合集散しつつかつ動きつつエナメル質の構造(エナメル小柱とシュレーゲル条)を形成することを示す。これをエナメル芽細胞の Grouping and dancing と呼び、エナメル質進化に関する細胞組織学的な基盤と捉えることができる。

無脊椎動物の硬組織中のタンパク質
—構造・機能・進化的観点から—

更科 功 (筑波大学生命環境科学研究科)

化石としてよく保存される骨・歯・貝殻などの生物のつくる鉱物(生体鉱物, 硬組織)は, リン酸カルシウム, 炭酸カルシウムやシリカなどの鉱物相とタンパク質, 多糖類, 脂質などの有機物相からできている。生物のつくる鉱物は, 無機的につくられる造岩鉱物とは著しく異なった合目的な形態や微細構造を示す。このような生体鉱物と無機鉱物の際立った違いの多くは, 生体鉱物に含まれる微量な有機物(有機基質)に起因すると考えられる。中でもそのタンパク質成分が生体鉱物の形成制御の鍵を握っていることは, ほぼ間違いない。

無脊椎動物の硬組織中のタンパク質として初めて, ムラサキウニの骨片の基質タンパク質・SM50の全アミノ酸配列がSucovらによって発表されてから, ほぼ20年が経つ(Sucov *et al.*, 1987)。この間, 棘皮動物に加えて節足動物, 軟体動物, 海綿動物, 刺胞動物においても硬組織中のタンパク質の全アミノ酸配列が決定され, 現在, 無脊椎動物の硬組織中のタンパク質で全アミノ酸配列が決定されたものは, 約80に及ぶ(Sarashina and Endo, 2006)。この内, 海綿動物のものはシリカ骨格から単離されたものだが, 他は全て炭酸カルシウムで出来た硬組織中のタンパク質である。脊椎動物の硬組織(骨, 軟骨, 歯, 耳石など)の形成に関わる分子の研究に比べれば, 無脊椎動物の硬組織中の分子の研究が遅れている感は否めないが, それでもかなりのデータが蓄積されつつあるのは事実であり, その一部では *in vitro*・*in vivo*での機能解析が行われ, 硬組織形成システムの起源に関する分子進化的な研究も行われている。本発表では, 硬組織中のタンパク質に関して現在得られている構造・機能・進化に関する情報を概観し, 多細胞動物の硬組織の進化についての考察およびカンブリア紀の爆発に関する一解釈を報告する。

Session B: バイオミネラリゼーションの機構
(有機基質と結晶形成)

アコヤガイ真珠層と稜柱層の形成に関する
新規タンパク質の一次構造

野川ちひろ (麻布大学大学院環境保健学研究科)

小原 万実 (WDB 株式会社)

小澤めぐみ (麻布大学環境保健学部)

佐俣 哲郎 (麻布大学大学院環境保健学研究科)

軟体動物は, 環境中の二酸化炭素イオンとカルシウムイオンを利用して炭酸カルシウムからなる殻体を形成する。この軟体動物の殻体は, アラレ石と方解石の2種類の結晶多形が, 様々な微細構造をとることにより構築されている。この構造は不規則に入り乱れることなく, 特定の配列を成す層構造をとっており, 結晶多形および微細構造の決定・制御には, 有機基質タンパク質が関与していると考えられている。有機基質タンパク質をコードする遺伝子の解析は, 産業価値のあるアコヤガイ真珠層中の成分を中心に行なわれ, これまでに Nacrein, N16, MSI60などの有機基質タンパク質が同定されている。一方, 近年, 方解石からなるアコヤガイ稜柱層中の成分についても研究が進み, MSI31や Prismaticin14などの有機基質タンパク質が発見されてきている。しかし, 最も研究の進んでいるアコヤガイに限っても, その殻体形成の全容は明らかになっていない。とくに, アコヤガイでの真珠層と稜柱層の結晶の作り分けの機構, アラレ石を作りやすい海水中の稜柱層方解石形成機構の解明は, バイオミネラリゼーション研究における大きな課題として残っている。

この課題の究明のためには, さらに多くの微細構造特異的, あるいは構造間での共通成分の構造解析を進める必要がある。このため, 今回の研究では, アコヤガイの殻体を形成する方解石稜柱層の新規成分の解析を試みた。そのために, 稜柱層中に含まれる有機基質成分のN末端アミノ酸配列を基にしたプライマーを用いて, 稜柱層形成に関与していると思われる外套膜上皮組織部位に含まれるmRNAから逆転写したcDNAのクローニングを行った。その結果, ORFを含む2623bpのcDNAとそれによってコードされる分子量約68kDaの新規成分が発見され, RT-PCRにより, 上皮組織の稜柱層と真珠層の両方の形成に関与する部位でのmRNAの発現が確認された。今後, この新規成分についての殻体中での存在の有無や, 結晶形成による機能解析実験などを通じて, アコヤガイ稜柱層形成機構の全容解明につながることを期待される。

軟体動物殻体有機基質の *in vitro* 結晶形成 実験による機能解析

池田 大介 (麻布大学大学院環境保健学研究所)
梶川 彩 (WDB エウレカ株式会社)
佐藤 秀義 (神奈川県警察本部)
野川ちひろ (麻布大学大学院環境保健学研究所)
佐保 哲郎 (麻布大学大学院環境保健学研究所)

本研究では、軟体動物二枚貝綱 翼形亜綱 ウグイスガイ目に属するイワガキ (*Crassostrea nippona*) を分析試料とし、本種の持つ葉状構造殻体中の不溶性有機基質と可溶性有機基質タンパク質を分離し、*in vitro* 結晶形成実験により、葉状構造形成に関与する成分の機能について検討した。

軟体動物の殻体は、外套膜から分泌される有機基質タンパク質の関与により、アラレ石や方解石の結晶が複雑に集合した殻体微細構造を形成している。アコヤガイ (*Pinctada fucata*) のアラレ石で形成される真珠構造では、不溶性有機基質タンパク質の MSI60 (Sudo *et al.*, 1997) が、殻体微細構造を形成するための土台として重要視されている。イワガキの持つ殻体微細構造の一つである葉状層は、アラレ石からなる真珠構造とは異なり、方解石で形成されている。方解石はアラレ石に比べて安定な結晶であるが、海水中では Mg^{2+} 濃度が高いためアラレ石が形成されやすいとされている (北野, 1990)。イワガキが海水中で方解石からなる殻体を形成する機構や、薄層状結晶が積み重なって特異的な形態を呈する葉状構造が形成される過程は、未だに解明されていない。このため、本研究では、これまでに試みられている数種類の *in vitro* 結晶形成実験により、イワガキ葉状層の形成機構の解明を試みた。その結果、可溶性成分と不溶性成分の存在下で、葉状層形成結晶に類似の結晶が形成されたので、その報告を行う。

X線溶液散乱法による nacrein と N66 の構造解析

法月美智子 (麻布大学大学院環境保健学研究所)
佐藤 衛 (横浜市立大学大学院国際総合科学研究科)
佐保 哲郎 (麻布大学大学院環境保健学研究所)

アコヤガイ (*Pinctada fucata martensii*) とシロチョウガイ (*Pinctada maxima*) の殻体では、殻体外層を作る稜柱層は方解石、内層を作る真珠層はアラレ石の結晶で構成されている。これらの結晶形や殻体微細構造を決定するのに関与していると考えられているのが

有機基質 (organic matrix; OM) である。OM は、脱灰溶液などに不溶性の不溶性有機基質 (insoluble matrix; ISM) (Frémy, 1855) と、脱灰溶液に可溶性の可溶性有機基質 (soluble matrix; SM) (Crenshaw, 1972) に区分される。

nacrein (Miyamoto *et al.*, 1996) と N66 (Kono *et al.*, 2000) は、アコヤガイとシロチョウガイの真珠層中に含まれる可溶性有機基質 (SM) の主成分であり、ヒトの炭酸脱水酵素 II (carbonic anhydrase II : CA II) と相同性をもつ CA 類似ドメインと、アスパラギン (N) とグリシン (G) の繰り返し配列から成る NG 繰り返し配列ドメインを持つタンパク質である。ヒト CA II と相同性をもつ CA 類似ドメインと NG 繰り返し配列ドメインから構成されている。

本研究では、X 線溶液散乱法を用いて、nacrein と N66 の立体構造解析を行った。X 線溶液散乱法の結果から、nacrein と N66 の形状は、“S 型”であった。nacrein と N66 の“S 型”は、上部と下部の湾曲部分が CA 類似ドメイン、上部と下部を結ぶ部分が NG 繰り返しドメインとして存在していることが示唆される。本研究では、X 線溶液散乱の結果を基に、真珠層形成機構の新しいモデルを提示した。

電場とポリアクリル酸の協調作用による 炭酸カルシウムの結晶成長

和田 徳雄 (首都大学東京大学院都市環境科学研究科)

バイオミメティクス材料科学の分野で無機有機界面の相互作用を理解することは重要である。この相互作用のうちイオン、双極子、表面電荷などによる静電相互作用の研究に関して、ハイドロキシアパタイト (HAp) を静電的な操作によりイオン分極をおこさることにより誘起させられた表面誘起電荷 (緩和時間: 10^9 秒) は、その近傍領域において結晶形成に効果 (エレクトロベクトル効果) を及ぼすことが発見された (東医歯大生材研究所・山下)。この効果を基にして、分極処理されたハイドロキシアパタイト (HAp) が持つ表面誘起電荷による電場と、ポリアクリル酸 (PAA) が炭酸カルシウムの結晶成長に及ぼす効果を研究した。

実験は $CaCl_2 - (NH_4)_2CO_3$ 系を用い、 $CaCl_2$ 溶液中に分極処理された HAp ペレットをつるし、PAA (添加量: $1 \sim 5$ mg / 10ml $CaCl_2$ solution) を添加し、そこに $(NH_4)_2CO_3$ から CO_2 を拡散させることで行った。結果として、電場と PAA の協調作用はカルサイトの薄膜形成を促進した。PAA 不添加の場合、部分

的な膜が形成された。PAA 添加の場合，正あるいは負に帯電した面全体にカルサイトの薄膜が形成され，この形成過程は Volmer-Weber mode であった。この薄膜を構成している個々のカルサイト結晶は $[00.1]$ あるいは $\langle 10.4 \rangle$ の成長方向を持ち，膜厚は $2-10 \mu\text{m}$ であった。PAA の添加量が 2 mg 以下のとき，負に帯電している HAp ペレット表面上に，成長方向を c 軸あるいは $\langle 10.4 \rangle$ とする柱状構造のカルサイト結

晶がこの面に垂直に成長した貝殻類似柱状構造の薄膜を形成した。その他の条件では，薄膜の破断面が扇型構造を持つカルサイト柱状結晶集合体（成長方向が c 軸）でできた薄膜が形成された。エレクトロベクトル効果として，負に帯電している HAp ペレット表面付近で Ca^{2+} イオン濃度を高めること，また HAp ペレットに吸着する PAA- Ca^{2+} complexes 集合体の形態をコントロールすることなどが考えられる。