

[原著]

イワガキ (*Crassostrea nippona*) 殻体中に含まれる 有機基質タンパク質の *in vitro* 結晶形成実験による機能解析

池田大介*・高倉大輔*・佐俣哲郎**

Functional analysis by the *in vitro* crystallization experiment on
the organic matrix protein included in the shell of *Crassostrea nippona*

IKEDA, Daisuke*, TAKAKURA, Daisuke* and SAMATA, Tetsuro**

Abstract

Molluscan shell consists of complicated structure called shell microstructure, which is composed of two polymorphisms of calcium carbonate crystals, aragonite and the calcite together with a tiny amount of the organic matrix (OM) secreted from the mantle tissue. Experiments have been conducted specifically to investigate the nacreous layer, which mainly comprises aragonite, and has a specific geometry, in order to gain an understanding of the effect of OM on shell formation. Several hypotheses of the nacreous structure formation have been demonstrated such as the compartment hypotheses (Bevelander & Nakahara, 1969), the template hypotheses (Degens, 1976, Weiner, 1979) and the epitaxy hypotheses (Neuman & Neuman, 1958, Crenshaw & Ristedt, 1976, Wada, 1980). In contrast to the nacreous layer, information about mineralization of the calcitic foliated layer is very limited. In spite of the recent report on the genes encoding the OM components in the foliated layer (Sarashina and Endo, 2001; Samata *et al.*, in press), the process of the foliated layer formation is left a matter open.

In the present study, we attempted to elucidate the process of the microstructure formation of the foliated layer, focusing on the function of the specific molecules in the oyster organic matrix by *in vitro* crystallization experiment. After decalcification by acetic acid, the soluble and insoluble organic matrices were extracted from the foliated layer of *C. nippona*. The insoluble organic fraction was further treated by alkaline and 2-mercaptoethanol, resulting in separation of the mercaptoethanol soluble fraction (MESM).

The crystallization experiment was performed by adding OM components in the supersaturated crystallizing solution. When the MESM and the WISM were added to the crystallizing solution, calcite crystals with similar morphology of thin plate to those of the foliated layer of *C. nippona* were induced on the WISM.

These results may present new concepts that we think may well have implications to the biomineralization process of oyster shell.

キーワード: カキ, 葉状層, 有機基質タンパク質, 結晶形成実験, 結晶多形

2007年2月28日受付, 2007年6月11日受理

*麻布大学大学院環境保健学研究科細胞生物学研究室

Laboratory of Cell Biology, Graduate School of Environmental Health, Azabu University

**〒229-0006 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71 麻布大学大学院環境保健学研究科細胞生物学研究室

To whom correspondence should be addressed. Laboratory of Cell Biology, Faculty of Environmental Health, Azabu university, Sagami-hara 229-0006, Japan; Tel: 04277692560, Fax: 04277692560. E-mail: samata@azabu-u.ac.jp.

1. 序文

生物は自らの体を支えるため、外的から身を守るためや捕食の道具などとして、様々な無機鉱物からなる硬組織、すなわちバイオミネラル (biomineral) を形成する。それらには、殻体 (貝殻)、甲殻、骨、歯、卵殻などがある。生物による硬組織の形成をバイオミネラリゼーションと呼び、その現象は、原核生物から真核生物にいたるまで多くの生物に見られる。

軟体動物の二枚貝類は、海生種、淡水生種を問わず、炭酸カルシウム (CaCO_3) の結晶で硬組織の形成を行う。 CaCO_3 結晶には、方解石 (calcite)、アラレ石 (aragonite) 及びバテライト (vaterite) の3種類の結晶多形が存在する。このうち、方解石は最も安定した結晶で、アラレ石、バテライトの順に不安定な結晶になる。 CaCO_3 結晶は、カルシウムイオン (Ca^{2+}) と炭酸イオン (CO_3^{2-}) が飽和状態のときに形成されやすく、その際に、マグネシウムイオン (Mg^{2+}) が多く含まれるほど、アラレ石が形成されやすいことが実験的に証明されている (北野, 1990)。

軟体動物の殻体では、カキ (*Crassostrea nippona*)、ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*)、アコヤガイ (*Pinctada fucata*) の外層などには方解石が局在し、残りの大半の殻体はアラレ石から構成されている。殻体は、殻体微細構造と呼ばれる CaCO_3 結晶の集合した複雑な構造から形成されている。殻体微細構造は、1920~1930年代にかけての Schmidt (1923, 1924)、Bøggild (1930) の古典的な研究に始まり、Kobayashi (1964, 1994)、Dauphin (2000) により、アラレ石結晶からなる真珠構造 (nacreous structure)、交差板構造 (cross lamellar structure)、複合稜柱構造 (composite prismatic structure)、方解石結晶からなる葉状構造 (foliated structure)、稜柱構造 (prismatic structure) など、現在までに、約18種類の殻体微細構造が定義されている。

軟体動物の殻体の形成は、殻体中に含まれる有機基質タンパク質 (organic matrix = OM) が殻体形成の制御に関与していると考えられている (Crenshaw, 1972)。OM には、2種類の形態のものが存在する。第一のものは、可溶性のタンパク質である可溶性有機基質 (soluble organic matrix = SM) であり、他方は不溶性のタンパク質である不溶性有機基質 (insoluble organic matrix = ISM) である。真珠構造中の OM は、SM として nacrein (Miyamoto *et al.*, 1996)、N16 (Samata *et al.*, 1999)、N66/N14 (Kono *et al.*, 2000)、Mucoperlin (Marin *et al.*, 2000)、ISM では MSI60 (Sudo *et al.*, 1997) が報告されており、稜柱構造中の OM は、SM として Aspein (Tskamoto *et al.*, 2004)、Prismalin-14 (Suzuki *et al.*, 2004)、ISM

では MSI31 (Sudo *et al.*, 1997) が報告されている。他にも、葉状構造では、ホタテガイ (*P. yessoensis*) の MSP-1 (Sarashina and Endo, 1998, 2001) とイワガキの MF44 (Samata *et al.*, *in press*) が SM 中から報告されている。

真珠構造、稜柱構造、葉状構造などの殻体微細構造の形成機構は、未だ不明である。しかし、真珠構造の殻体形成機構に関しては、有機基質により微小な空間を作り、結晶を成長させ、真珠構造を形成するコンパートメント説 (Nakahara, 1980)、ISM 上の特定の部位に結晶の形成を誘導する OM が存在し、その部位に結晶が形成され、真珠構造を形成する鑄型説 (Kalisman *et al.*, 2001)、ISM 上で結晶が成長する時に、OM が結晶構造や結晶多形を制御するエピタキシー説 (Weiner and Hood, 1975) などのような仮説が提示されている。一方、葉状構造では、未だに OM の報告が少なく、*in vitro* 実験における葉状構造の形成の成功例の報告もない。

本研究では、葉状構造を持つイワガキを試料とし、殻体中の OM を分離し、外套膜外液類似の結晶化母液を用い、*in vitro* 環境の中で OM の機能を推定することを試みた。また、その機能から、葉状構造殻体形成機構の追及を試みた。

2. 試料および実験方法

1) 有機基質タンパク質 (OM) の抽出・精製

イワガキの殻体は、グラインダーにより殻体表面をクリーニングした後、葉状層とチョーク層をスパーテルで分離した。有機性汚染物質除去のため、分離した殻体は 1% sodium hypochlorite 水溶液に30分間浸し、流水洗浄、蒸留水で洗浄し、乾燥した。その後、殻体はステンレス乳鉢で粉末状にした。粉末化した殻体 20 g を 200 ml の蒸留水に攪拌し、5% 酢酸溶液で pH を 4.0 に調整し、4℃で2日間脱灰した。脱灰後、脱灰液を定性濾紙 No.1 (ADVANTEC, Tokyo, Japan) でろ過し、濾液を透析用セルロースチューブ (三光純薬株式会社, Tokyo, Japan) に移し、溶液中の酢酸が除去されるまでイオン交換水中で透析を行った。透析終了後、抽出した全 OM を、9,600×G, 30分, 4℃で遠心を行った。遠心後、上清の酸可溶性有機基質 (WSM) と酸不溶性有機基質を分離した。

酢酸脱灰で得られた ISM を、1% アンモニア水溶液を用いて pH を 8.0~9.0 に調整したアルカリ溶液中で、一晚、スターラー上で攪拌しながらアルカリ処理を行った。この処理溶液の遠心後、上清のアルカリ可溶性有機基質 (ALSM) と沈殿のアルカリ不溶性有機基質を分離した。

アルカリ抽出で得られた ISM を、62.5 mM Tris-

HCL (pH6.8) / 2-mercaptoethanol 溶液 400 μ l に溶解し、1 分間加熱処理を行った。この溶液をアトプレッブ MF (ATTO, Tokyo, Japan) で、15,000 $\times$ g, 30 分、24 $^{\circ}$ C で遠心し、上清のメルカプトエタノール可溶性成分 (MESM) と不溶性成分 (ISM) とに分離した。MESM は、マイクロコン-3 (Nihon Millipore, Tokyo, Japan) にて脱塩した。

2) SDS-PAGE

10% Polyacrylamide gel と e-パジェル (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて、MESM および ISM 中の成分の分離を行った。分析試料を乾固後、泳動用 Sample Buffer (0.5M Tris-HCl/10% SDS/5% 2-Mer/10% Glycerol) 20 μ l に溶解して、1 分間加熱処理を行った。加熱処理終了後、氷水で急冷したものを泳動用試料として用いた。泳動は 20mA の定電流にて 90 分間行った。泳動後、全ての分析試料について CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色、Negative 染色 (Fernandez-Patron *et al.*, 1995), Methyl Green 染色 (Cutting and Roth, 1973) および Alcian Blue 染色を行った (Wardi and Michos, 1972)。

3) ISM に含まれる糖の分離

ISM 中でのキチンの有無を確認するため、Horowitz *et al.* (1957) のキチン分離法 (図 2) を基礎に、WISM を 2N NaOH, 50 $^{\circ}$ C, 2.5 時間加水分解後、33,900 $\times$ G で遠心し、上清と沈査 (キチン画分) を分離する方法を用いた (堀田, 1972)。上清は、ISM に結合するキチン以外の糖の確認のため、SupelcleanTM ENVTTM-Carb (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA) を用い、精製した。

4) FR-IR 分析

分離した OM のうち、MESM と ISM の糖成分について、キチン画分後の上清の糖成分を FT-IR Magna-IR750 (Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan) で分析した。試料は、100 倍量の KBr と混合してペレットを作り、4000–400 cm^{-1} の波長で解析した。比較対象として、キチン標品 (和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan) も同様の方法にて解析した。

5) X 線回折解析

X 線回折装置 JDX8010 型 (日本電子, Tokyo, Japan) を用いて、乾燥させた ISM とキチンの X 線回折を行った。分析条件は、スタート角度 25.00 度、ストップ角度 40.00 度、スリット幅 0.05 度、計測時間 3.00 秒、管電圧 40.00kV、管電流 20.00mA とした。

6) *in vitro* 結晶形成実験

in vitro 結晶形成実験では、下記の 3 種類のアッセイ系にて行った。(1)Ca²⁺を含む溶液に対し、炭酸アンモニウムで CO₂を常時供給し、OM の作用を解析する実験 (Belcher *et al.*, 1996; Wada *et al.*, 2004)。

(2)無機的にアラレ石と方解石が 9:1 の割合に形成される母液中に OM を添加することで、OM のアラレ石と方解石の多形制御への関与を確認する実験。

(3)CaCO₃が無機的に形成される溶液に OM を添加して、溶液の pH の変化を追跡して、石灰化に及ぼす OM の作用を解析する実験 (Wheeler *et al.*, 1992)。

アッセイシステム 1) : 24 穴マイクロプレートの B-1 と C-1 に ammonium bicarbonate を各 250mg 入れ、ウェルを密閉してから、直径 5 mm の穴を開けた。5mM CaCl₂, 1.5ml を母液として、A-2, B-2, C-2, D-2 のウェルのみを使用した。試料は、SM を 2 ml の母液と混合して、カバーガラス上で乾燥させた ISM とともに添加した。

アッセイシステム 2) : 10mM CaCl₂/10mM MgCl₂/12mM NaHCO₃水溶液を Filter Papers No.44 でろ過したものを、母液として準備した。試料はアッセイシステム 1) と同様の方法にて添加した。

アッセイシステム 3) : Wheeler ら (1992) の *in vitro* 炭酸カルシウム沈殿形成実験の手法に基づいて実験を行った。20mM NaHCO₃水溶液を 20mM Na₂CO₃水溶液で、pH を 8.7 に調整した。この溶液 3 ml と 10mM CaCl₂水溶液 3 ml を混合し、D.W.または SM を添加した。試料添加後の pH の変化を経時的に測定した。

試料の添加方法

MESM を、結晶形成実験のそれぞれの母液に添加した。添加量は、0.04 μ g/2ml, 0.2 μ g/2ml, 0.6 μ g/2ml とした。ISM は、カバーガラス上で乾燥させて母液中に静置した。

結晶の観察手法

形成された結晶は、透過型ノマルスキー微分干渉顕微鏡 BHS (OLYMPUS Co., Tokyo, Japan) にて観察した。鏡検による結晶の同定では、形成された結晶の結晶数、結晶サイズ、結晶の形、結晶の種類を測定した。

結晶形の確認

in vitro 結晶形成実験で形成された結晶の形の同定には、X 線回折装置 JDX8010 型 (日本電子株式会社, Tokyo, Japan) を用いた。分析条件は、スタート角度 20.00~25.00 度、ストップ角度 40.00~50.00 度、スリット幅 0.05 度、計測時間 3.00 秒、管電圧 40.00kV、管電流 20.00mA で行った。比較対象として、イワガキ殻体に関する X 線回折分析も行った。

3. 結果

1) SDS-PAGE

試料殻体より抽出された MESM について、それぞれ SDS-PAGE を行った結果、Negative 染色、Methyl Green 染および Alcian Blue 染色により、52kDa 近傍に明瞭なバンドが確認された (図 1)。

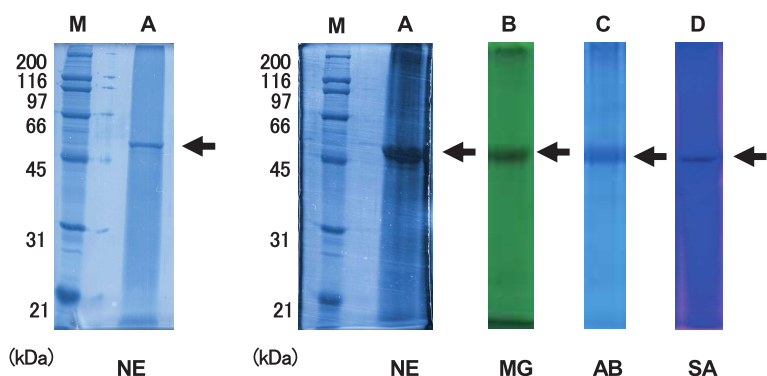


図 1 イワギ葉状構造から抽出した MESM 画分の SDS-PAGE 像。Lane M：マーカータンパク質，Lane A：Negative 染色，Lane B：Methyl Green 染色，Lane C：Alcian Blue 染色，Lane D：Stains All 染色

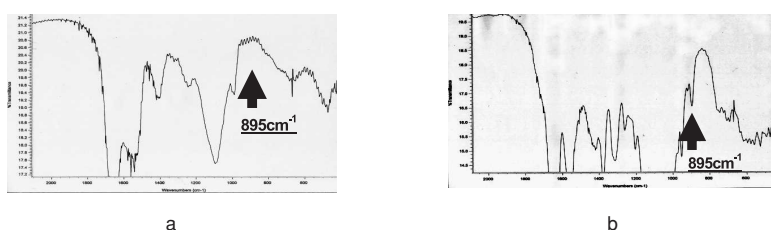


図 2 FT-IR 分析による WISM と chitin の比較

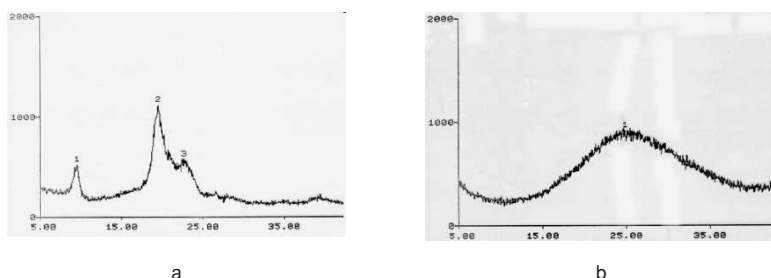


図 3 X 線回折分析による WISM と chitin の比較

2) FT-IR

葉状層の MESM および ISM 試料では、ほぼ同様のピークパターンが得られた。すなわち、 $1680\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ にアミド I， $1580\sim 1510\text{ cm}^{-1}$ にアミド II， $1200\sim 1250\text{ cm}^{-1}$ にアミド III， $1000\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ に糖に相当するピークが認められた。ISM を加水分解した試料では、沈査は得られなかった。上清から得られた成分を FT-IR で分析した結果、 $1000\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ に糖に相当するピークが認められた (図 2 - a)。比較対象としたキチン標品では、 $1000\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ に糖に相当するピークと 895 cm^{-1} の位置に chitin に特有のピークが認められた (図 2 - b)。

3) X 線回折分析

キチンでは、 $2\theta = 9.6, 19.6, 22.5$ にピークが認められた (図 3 - a)。カキの ISM 試料については、明瞭なピークは認められなかった (図 3 - b)。

4) 結晶形成実験

in vitro 結晶形成実験で無機的に形成されるアラレ石は、針状結晶の集合で、球状、鉄アレイ状の形態を呈する。また、無機的に形成される方解石は、扁平な平行四辺形の結晶である。

アッセイシステム 1)

CO_2 濃度を一定に保つ条件下での方解石形成母液による無機的に形成された結晶は、平行四辺形ないし、

立方体の形状を呈した。X線回折分析の結果から、この結晶は方解石であることが確認された。この母液に、MESMを、それぞれ0.04 μ g/2ml, 0.2 μ g/2ml, 0.6 μ g/2ml添加した場合には、添加量が増加するにつれ、ISM上に形成される結晶は増加したが、結晶の形態は不規則なものになり、結晶同士の結合が認められた。これらの結晶は、X線回折分析の結果から、方解石であることが確認された。

アクセシシステム2)

アラレ石/方解石共存母液中で無機的に形成された結晶は、鏡検下では、アラレ石：方解石が9：1の割合で存在していた。これらの結晶は、X線回折分析の結果から、アラレ石と方解石であることが確認された。アラレ石/方解石共存母液に、MESMを、それぞれ0.04 μ g/2ml, 0.2 μ g/2ml, 0.6 μ g/2ml添加した場合には、添加量の増加とともに、球状のアラレ石と平行四辺形状の方解石の形成が認められなくなった。

また、ISM上にMESMを、それぞれ0.04 μ g/2ml, 0.2 μ g/2ml, 0.6 μ g/2ml添加した場合には、添加量の増加とともに、平板状の結晶が形成された。この結晶をSEMで観察すると葉状構造に特有の形態を持つことが明らかになった(図4)。さらに、この結晶は、X線回折分析から方解石であることが証明された。一方、WISMとMESMを方解石形成母液に添加した場合(初期CO₂濃度を過飽和にする条件下での実験)には、MESMを添加した場合に形成された結晶と同様の平板状の結晶と、花卉状の結晶が形成された。これらの結晶は、X線回折分析の結果から、方解石であることが確認された。

アクセシシステム3)

比較対象としてD.W.を添加した場合、添加時点でのpHは約8.0であった。DW添加3分後にpHは下降し始め、15分後にはpHは約7.3まで下降した。MESMを添加した場合には、pHの急激な変動は起こらず、15分後には、実験開始時とほぼ同じpH8.2であった。

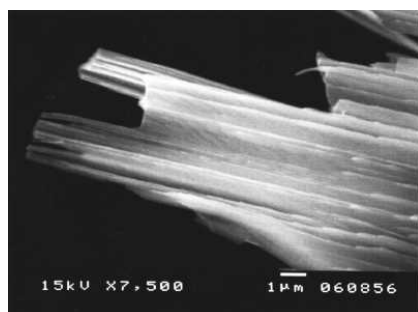


図4 *in vitro* 結晶形成実験でMESMとWISMを添加した場合に形成された結晶のSEM像

4. 考察

OMについて

軟体動物の殻体形成に関与するとされるOM中から、これまでに、およそ20種類の成分が報告されている(Sarashina and Endo., 2006)。その中には、Aspein (Tsukamoto *et al.*, 2004)のように、OMを分泌する外套膜中でのそのmRNAの発現が確認されているものの、殻体中での存在が確認されていないものもあるが、それらの多くは殻体中に存在することが報告されている。これらのOM成分は、真珠構造と稜柱構造中のSM成分に集中しており、それら以外の殻体からのOM成分についての報告の数は数えるほどしかない。すなわち、ホタテガイとイワガキの葉状構造中から、MSP-1 (Sarashina and Endo., 2001)とMF44 (Samata *et al.*, *in press*)が、また、ビノスガイの均質構造と複合稜柱構造中から、それぞれ、MHG18とMCP16が報告されている (Ikeda *et al.*, *in press*) だけである。これまでに軟体動物で報告されたOM成分の中には、MSP-1, Aspein, Asprichなどのように、Aspに富む強い酸性タンパク質が存在している。興味深いことに、これらの酸性タンパク質は、アラレ石から形成される真珠構造などの殻体微細構造中からは発見されておらず、方解石から形成される葉状構造や稜柱構造中からのみ発見されている。最近、Samata *et al.* (*in press*) は、イワガキの殻体形成に関与するOMの一種であるMF44の一次構造を決定したが、その組成にもAspが多量に含まれていた。これらのことは、方解石殻体の形成に、Aspに富む酸性タンパク質が特異的に関与していることを暗示している。

一方、Wheeler (1992) は、カキ (*Crassostrea virginica*) の殻体中のOMが、多量のリン酸化されたSer残基およびAsp残基を含み、この酸性成分が、CaCO₃結晶の特定面へと吸着し、結晶成長の制御をすることで、殻体形成に関与していると考えた。ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) のMSP-1でも、9~10ヶ所のリン酸化モチーフが確認されており、リン酸化の可能性が示唆されている。しかし、アコヤガイなどの真珠構造の形成に関与するOM成分に関しては、高度なリン酸化を伴うタンパク質成分は報告されていないため、リン酸化アミノ酸の存在は方解石系殻体に特有の現象である可能性が示唆される。

これまでに発見されている殻体形成に関与するSM成分の多くは、CBB染色や銀染色などの通常の染色法で染色されるが、OMタンパク質の中には酸性アミノ酸含有量が非常に高いために、CBB染色や銀染色で染色されない成分も存在する (Gotliv *et al.*, 2003)。CBBは、非共有結合でタンパク質に結合するため、タンパク質の負電荷部位には結合できない。銀

染色もまた、硝酸銀イオンがタンパク質の負電荷部位に結合できないため、酸性アミノ酸含有量が極端に多い成分の検出には適していない。本研究で用いたイワガキの葉状層の MESM の52kDa 近傍成分も、CBB 染色では染色されなかった。このため、シアル酸含有糖タンパク質やリン酸化タンパク質などの負電荷部位をもつタンパク質を染色するのに適した Stains All 染色を行うことにより、葉状層中から MESM 中の52Da 成分を検出することに成功した。この成分は、リン酸を染色する Methyl Green 染色と酸性ムコ多糖類を染色する Alcian Blue 染色に対して、高い染色性が確認されたことから、高度にリン酸化された、酸性ムコ多糖類を含む糖タンパク質であると考えられる。

ISM 成分とキチンとの関連性

イワガキの葉状層中の ISM は透明なゲル状を呈する。このゲルをカバーガラス上で乾燥させると、アコヤガイ真珠層中の ISM の膜に類似の、薄くて表面が滑らかな膜状に変化する。Weiner and Traub (1984) は、*Atrina rigida* の真珠層中の ISM の主成分が β -キチンであり、ここに絹-フィブリン様タンパク質と酸性タンパク質が結合するモデルを提唱している。Kwon ら (2002) は、キチンを X 線回折で分析すると、 α -キチンは $2\theta = 9.6, 19.6$ に特異的なピークが出現するのに対して、 β -キチンでは、 $2\theta = 9.1, 20.3$ に特異的なピークが認められるとしている。また、堀田 (1972) は、キチンを FT-IR で分析すると、 890cm^{-1} 付近に特異的なピークが認められることを報告している。このため、本研究では、イワガキの葉状層中の ISM にキチンが含まれるかどうかを検討するために、2 ME 処理後の ISM を、X 線回折と FT-IR にて解析した。しかし、X 線回折分析からは、顕著なピークは得られなかった。FT-IR 分析からも、キチンに特異的とされる 890cm^{-1} 付近のピークは認められなかった。このことから、イワガキの ISM は、キチンが主成分としては構成されてはいないと推定された。一方、イワガキの ISM のアミノ酸組成は、アコヤガイの真珠層の ISM の主要成分とされる MSI 60 とは大きく異なるとされている (Samata *et al.*, *in Press*)。このことは、葉状構造と真珠構造の ISM は、形態が類似の膜状の構造を持つものの、組成は全く異なる成分から構成されていることを示している。

ISM のゲル状から膜状への形状変化は、アコヤガイなどの真珠貝では見られないイワガキに特有のものである。しかし、Addadi ら (2006) は、*A. rigida* の真珠層の中には、キチンを主体とする ISM と ISM の間をシルクゲル状の物質が充填しており、結晶が形成されるにつれ、脱水されて ISM に吸着する可能性を示唆している。このため、葉状層の WISM もこのシ

ルクゲルに類似の形態変化を起こす成分であるとも考えられる。

in vitro 結晶形成実験から考えられるイワガキの OM の機能

アラレ石/方解石形成母液での結晶形成実験では、ISM 上に葉状構造に特有の形態を持つ方解石結晶に類似の結晶が形成された。元素分析の結果、この結晶の表面からリンが多量に検出されたため、この方解石結晶の形成にリン酸化された MESM が関与している可能性が示唆された。この成分の機能としては、葉状構造に特有の微細構造を形成する際に、その形態を誘導すると推定された。葉状層の MESM は、SDS-PAGE の結果より、52kDa 近傍に泳動される単一の成分から成ることが明らかである。また、アミノ酸組成分析の結果より、葉状層の MESM と WISM が同一成分の可能性が高いことも示されている (Samata *et al.*, *in Press*)。以上より、2 ME 処理によって ISM から抽出される52kDa 近傍成分が、葉状構造の殻体微細構造を形成する上で重要な成分であると考えられる。

一方、X 線回折により、結晶形成実験で誘導された平板状の結晶が、方解石のみから構成されていることが明らかになった。このことは、MESM には、方解石の形成を誘導する機能があることを示唆しており、非常に注目される。

一方、 CO_2 濃度を一定に保つ条件下での方解石形成母液による結晶形成実験では、アンモニアの影響によるタンパク質の変性で、ISM 上に平板状の結晶は形成されなかった。この事実は、タンパク質が変性した状態では平板状の結晶が形成されにくいことを意味していると考えられ、タンパク質の立体構造が OM の機能の発現にとって重要である可能性が示唆される。

ISM は、*in vitro* 結晶形成実験の結果から、葉状構造の微細構造を形成する上で、結晶核形成にとっての土台として関与していると思われる。

本研究により、イワガキの ISM を構成する葉状層の MESM の52kDa 成分が葉状構造を形成する上で重要な成分であることが示唆されたが、葉状層の WSM, ALSM の分画が未だに十分に行われておらず、複数のタンパク質が混在していると思われるため、それぞれの画分の各成分を分離して、*in vitro* 結晶形成実験で本研究と同様の機能解析を行う必要がある。

引用文献

Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F. and Weiner, S. (2006) Mollusk Shell Formation: A Source of New Concepts for Understanding Biomineralization

- Processes. *Chem. Eur. J.* **12**, 980-987.
- Belcher, A. M., Wu, X. H., Christense, R. J., Hansma, P. K. and Morse, D. E. (1996) Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusk-shell proteins. *Nature* **381**, 56-58.
- Bøggild, O. B. (1930) The shell structure of the mollusks. *Kgl. Danske. Videnskab. Selsk. Skr. Nature* **9.2**, 233-326.
- Campbell, K. P., MacLennan, D. H. and Jorgensen, A. O. (1983) Staining of the Ca^{2+} -binding Proteins, Calmodulin, Troponin C, and S-100, with Cationic Carbocyanine Dye "Stains all". *J. Biol. Chem.* **258**, 11267-11273.
- Crenshaw, M. A. (1972) The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biom mineralisation* **6**, 6-11.
- Cutting, J. A. and Roth, T. F. (1973) Staining of phosphor-proteins on acrylamide gel electrophoregrams. *Anal. Biochem.* **54**, 386-394.
- Dauphin, Y. and Denis, A. (2000) Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **126**, 367-377.
- Fernandez-Patron, C., Calero, M., Cillazo, P. R., Garcia, J. R., Madrazo, J., Musacchio, A., Soriano, F., Estrada, R., Frank, R., Castellanos-Serra, L. R. and Mendez, E. (1995) Protein reverse staining; high efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* **224**, 203-211.
- Gotliv, B. A., Addadi, L. and Weiner, S. (2003) Mollusk Shell Acidic Proteins: In Search of Individual Functions. *Chem. Bio. Chem.* **4**, 522-529.
- Horowitz, S. T., Roseman, S. and Bluementhal, H. J. (1957) The Preparation of Glucosamine Oligosaccharides. I. Separation. *Jour. Amer. Chem. Soc.* **79**, 5046-5049.
- 堀田進 (1972) 軟体動物の殻体を構成する有機物質 (II), -イカの甲のキチン-タンパク質複合体-. 東京経済大学人文自然科学論集37号, 1-18.
- 北野康 (1990) 炭酸塩堆積物の地球科学. 東京大学出版, 東京, 412頁.
- Kobayashi, I. (1964) Microscopical observations in the shell structure of Bivalvia-Part I *Barbatia obtusoides* (Nyst). *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku C.* **82**, 295-301.
- Kobayashi, I. (1994) Twinned aragonite crystals found in the bivalvian crossed lamellar shell structure. *J. Geol. Soc. Japan.* **100** (2), 177-180.
- Kono, M., Hayashi, N. and Samata, T. (2000) Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 213-218.
- Kwon, J. K., Kong, B. G., Jang, M. k., Jang, J. T., Yang, H. P., Jung, T. R. and Nah, J. W. (2002) Thermodynamic characterization of α -, β -, and γ -chitin. *Korean Soc. Chitin Chitosan* **7**, 154-160.
- Levi-Kalishman, Y., Falini, G., Addadi, L. and Weiner, S. (2001) Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *J. Struct. Biol.* **2001** **135**, 8-17.
- Marin, F., Corstjens, P., Gaulejac, B., Jong, E. V.-D. and Westbroek, P. (2000) Mucins and molluscan calcification. *J. Biol. Chem.* **275**, 20667-20675.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T. and Matsushiro, A. (1996) A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9657-9660.
- Nakahara, H., Kakei, M. and Belvelander, G. (1980) Fine structure and amino acid composition of the organic "Envelope" in the prismatic layer of some bivalve shells. *Venus*, **39**, 167-177.
- Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., Akera, S. (1999) A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Letters* **462**, 225-229.
- Voet, D. and Voet, J. G. (1992) ヴォート生化学 (上) 第2版, 118-161頁, 東京化学同人, 東京.
- 佐俣哲郎 (2005) 軟体動物外骨格における石灰化機構. 竹井祥朗編, 海洋生物の機構. 357-373頁, 東海大学出版, 神奈川.
- Sarashina, I. and Endo, K. (2001) The complete primary structure of molluscan shell protein 1 (MSP-1), an acidic glycoprotein in the shell matrix of the scallop *Patinopekten yessoensis*. *Marine Biotech.* **3**, 362-369.
- Sarashina, I. and Endo, K. (2006) Skeletal matrix proteins of invertebrate animals: Comparative analysis of their amino acid sequences. *Paleont. Res.* **10** (4), 311-336.
- Schmidt, W. J. (1923) Bau und Bildung der Perlmuttermassae. *Zool. Jahrb.* **45**, 131-134.
- Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K. and Takahashi, T. (1997) Structure of mollusk shell framework proteins. *Nature* **387**, 563-564.
- Suzuki, M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T. and Nagasawa, H. (2004) Characterization

- of Prismatic-14 a novel matrix protein from the Prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Biochem. J.* **382**(pt 1), 205-213.
- Tsukamoto, D., Sarashina, I. and Endo, K. (2004) Structure and expression of an unusual acidic matrix protein of pearl oyster shells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1175-1180.
- Wada, N., Suda, S., Kanamura, K. and Umegaki, T. (2004) Formation of thin calcium carbonate films with aragonite and vaterite forms coexisting with polyacrylic acids and chitosan membranes. *J. Colloid Interface Sci.* **279**, 167-174.
- Ward, A. H. and Michos, G. A. (1972) Alcian Blue Staining of Glycoproteins in Acrylamide Disc Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **49**, 607-609.
- Weiner, S. and Hood, L. (1975) Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation. *Science* 190 (4218), 978-979.
- Weiner, S. and Traub, W. (1984) Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **304**, 421-438.
- Wheeler, A. P. (1992) Phosphoproteins of oyster (*Crassostrea virginica*) shell organic matrix. In : Suga, S. and Watabe, N. (eds) *Hard Tissue Mineralization and Demineralization*, pp.171-187, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-Tokyo.