

軟体動物殻体真珠層形成の分子機構の解明

Elucidation of molecular mechanism of molluscan nacreous layer formation

佐俣哲郎, 中明賢二, 其木茂則

環境保健学研究科

Tetsuro Samata, Kenji Nakaaki, Sigenori Sonoki

Graduate School of Environmental Health

Abstract. The organic matrix of molluscan shells is one of the best studied of all CaCO_3 biomineral structures, and about 10 genes encoding the matrix proteins have been isolated. In them, nacrein, N16 and MSI60 were reported to be involved in the nacreous layer formation of Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. Here we report the result based on the comparative analysis of the primary structures of these 3 proteins among 10 molluscan species. In addition, cDNA cloning of the newly found 25 kDa component and new informations from *in vitro* studies of the crystallization experiment will be discussed.

High homology was determined at CA domain of nacrein, particularly the active site of CA, and sulfation site of N16 in contrast to low homology at NG repeat region of nacrein and N16. MSI60 was highly conservative through its whole structure among 10 species. Crystallization experiment clarified that nacrein and N16 may be involved in crystal form regulation and not be in crystal nucleation. MSI60 was thought to be important as base membrane for crystal layer formation but no relation to regulation or nucleation of crystal.

On the basis of these results, we proposed a new model for nacreous layer formation. According to our hypothesis, it includes the processes 1) concentration of Ca^{2+} and CO_3^{2-} ions to the site for crystal nucleation 2) crystal nucleation and 3) regulation of crystal form. For all these processes, several kinds of proteins may play important roles; 1) compartment and Ca^{2+} - and CO_3^{2-} -ion concentrators, 2) nucleator and 3) regulator. We propose MSI60 as a component for compartment, the active site of CA in nacrein as CO_3^{2-} concentrator and sulfation site of N16 as Ca^{2+} concentrator. In addition, newly found MSI25 was thought to be a candidate of nucleator as it can be a Ca^{2+} and CO_3^{2-} binding protein. We suppose nacrein and N16 as regulator through reaction of their NG repeat region and crystals.

The model for nacreous layer formation will give a new insight into the process of molluscan shell formation and will give important information to CO_2 fixation by marine creatures.

1. 目 的

軟体動物には、貝殻、歯舌、殻板などの多様な硬組織・バイオミネラルが体内・外に形成され、非常に変化に富んだバイオミネラリゼーション現象が見られる。このため、貝殻を中心とした軟体動物の研究は、無脊椎動物のバイオミネラリゼーション研究の中で最も盛んに行われ、多くの情報が蓄積してい

る。近年のバイオテクノロジーの発達に伴い、軟体動物殻体中の有機基質成分をコードする cDNA が同定され、そこから有機基質タンパク質成分の全一次構造も明らかにされている (1)-(6)。しかし、遺伝子解析を通じたこれらの研究は、不特定の有機基質中の主要成分の構造を明らかにすることが目的とされており、同定されたタンパク質成分の殻体形成における役割にまで踏み込んだ検討は行われていない。

一方、有機基質成分の殻体形成における *in vitro* の機能を検討する研究も行われている。これらの研究の中には、有機基質成分による炭酸カルシウム結晶多形の制御に関するものもある (7, 8)。しかし、この種の実験では、実験条件の違いが結果を大きく左右するため、発表された研究結果が研究者毎に大きく異なっている。それ故、有機基質成分の機能は、*in vitro* のレベルでさえ明確にはなっていない現状である。このため筆者らは、真珠層形成に特異的に関与する有機基質タンパク質成分の分子構造を明らかにするとともに、*in vitro* での結晶形成実験を通じて真珠層形成に関わる成分の機能を推定し、真珠層形成機構を分子レベルで解明することを目的として研究を行った。

この目的のために、真珠層形成に関与するナクレイン、N16、MSI60の3種類のタンパク質の一次構造をウグイスガイ科を中心とした軟体動物の異なる系統間で比較し、構造の保存性に関する情報を基に分子の機能の推定を試みた。さらに、結晶形成実験を基に、3種類の真珠層形成タンパク質の機能解析を行って、分子の構造から推定される機能の検証を試みた。

2. 方法

分析に用いた試料はウグイスガイ科の *Pinctada fucata martenshii* (日本産)、*P. fucata martenshii* (中国産)、*P. fucata fucata*、*P. margaritifera*、*P. maxima*、*Hyriopsis shilegeli*、*Cristaria plicata*、*Atrina vexillum* の8種の軟体動物である。

生体試料から上皮組織を採取後、直ちに液体窒素中で凍結し、デュープフリーザー中で保存した。この凍結試料中から AGPC 法にて全 RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて対象 cDNA を同定した。PCR のためのプライマーは、ナクレイン、N16、MSI60 をコードする遺伝子の塩基配列に基づいて設計した。得られた PCR バンドを切り出し、サブクローニングを行った後、塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列からアミノ酸配列を推定し、3種類のタンパク質の一次構造のホモロジーを検索した。

一方、(Obara ら, M.S.) は、アコヤガイの真珠層を脱灰し、得られた全可溶性有機基質の SDS-PAGE から、ナクレイン、N16 とは異なる 25 kDa の新しい

有機基質成分を検出した。彼らは、この成分をコードする遺伝子の同定を行い、その塩基配列をアミノ酸配列に変換し、一次構造を決定した。

有機基質成分の結晶形成に関与する機能の解析のために *in vitro* 結晶形成実験を行った。実験は、殻体が形成される部位と炭酸カルシウムについてほぼ同じイオン濃度を持つ過飽和炭酸カルシウム溶液を結晶化溶液とし (9, 10)、この溶液から無機的に形成される結晶とこの溶液に有機基質成分を添加して形成される結晶を比較して、有機基質成分の機能を推定した。結晶形の同定には X 線回折分析器を、結晶形態の観察には微分干渉顕微鏡と SEM を用いた。

3. 結果と考察

ナクレインのアミノ酸配列のホモロジーは、CA ドメイン前半部について 99.2 %、後半部については 98.9 % であり、NG 繰返し配列部位については 70.9 % であった。また、CA ドメインの活性部位については 100 % であった。N16 のアミノ酸配列のホモロジーは、NG 繰返し配列部位については 75.0 % であり、残りの領域については 90.0 % であり、とくに C 末端部位側に存在するチロシンの sulfation 部位を含む酸性アミノ酸部位では 100 % であった。MSI60 のホモロジーについては、分子全体に渡って 99 % であった。以上の結果から、ナクレイン分子はその CA 部位の酵素活性が、N16 分子は sulfation 部位を含む酸性アミノ酸部位が真珠層形成に重要な役割を持つことが示唆される。MSI60 分子については、この分子の構造が種間でほとんど変化しないことから、構造タンパク質として何らかの極めて重要な機能を持つことが考えられる。

炭酸カルシウム溶液から種々の条件下で晶出される結晶の特性に関しては、北野の精力的な研究 (9, 10) により既に実験系が確立しており、有機化学分野で多くの情報が蓄積している。バイオミネラリゼーションの研究分野では、Belcher *et al.* (7) が、結晶多形の制御が WSM 単独の作用によるものとする結果を公表したが、これに対して、Falini *et al.* (8) は、キチンとフィブリン基底膜と WSM が共存して初めて多形制御が行われると報告している。本研究では、過飽和炭酸カルシウム溶液中に海水とほぼ同量の Mg^{2+} を含む溶液をアラレ石系母液として、

淡水と同様の極めて少量の Mg^{2+} を含む溶液を方解石系母液として結晶形成実験を行い、結晶形成と有機基質の関係に関して以下の基本的な事実を知ることができた。

まず、ナクレインと N16 の働きは基本的には同じであるが、不溶性有機基質の主成分である MSI60 の働きは、これらとは全く異なっていた。すなわち、前者は、単独では結晶形成（アラレ石であろうが方解石であろうが）に阻害的に働く（図 1-B）が、後者は単独では、結晶形成には特に影響を及ぼさなかった。一方、WISM 膜を基盤として、その上に前者を加えると、母液中から無機的に形成される球晶状のアラレ石結晶とは異なる形態の、楕円形または六角形で平板状のアラレ石結晶が膜上に形成された。さらに、時間がたつにつれて、このアラレ石結晶が

膜全体に広がり、真珠層に良く似た形態の層を形成した（図 1-C, D）。これに対して、方解石系の母液中で同様の実験を行っても、アラレ石結晶は全く形成されず、方解石結晶形成が阻害されただけであった。このことは、真珠層中の有機基質成分には、結晶多形を制御する働きはないことを示している。以上の事実、これまでの実験結果とは大きく異なっており、有機基質成分による結晶形成への関与についての新しい機構の提示に結びつく可能性があるものと考えている。

Obara ら (M.S.) は、アコヤガイの真珠層を EDTA で脱灰し、抽出物の遠心後、上清の可溶性有機基質を SDS-PAGE し、CBB 染色したところ、これまでに知られているナクレインと N16 に相当するバンドの他に、約 25 kDa 近傍に 1 本のバンドを認めた。この

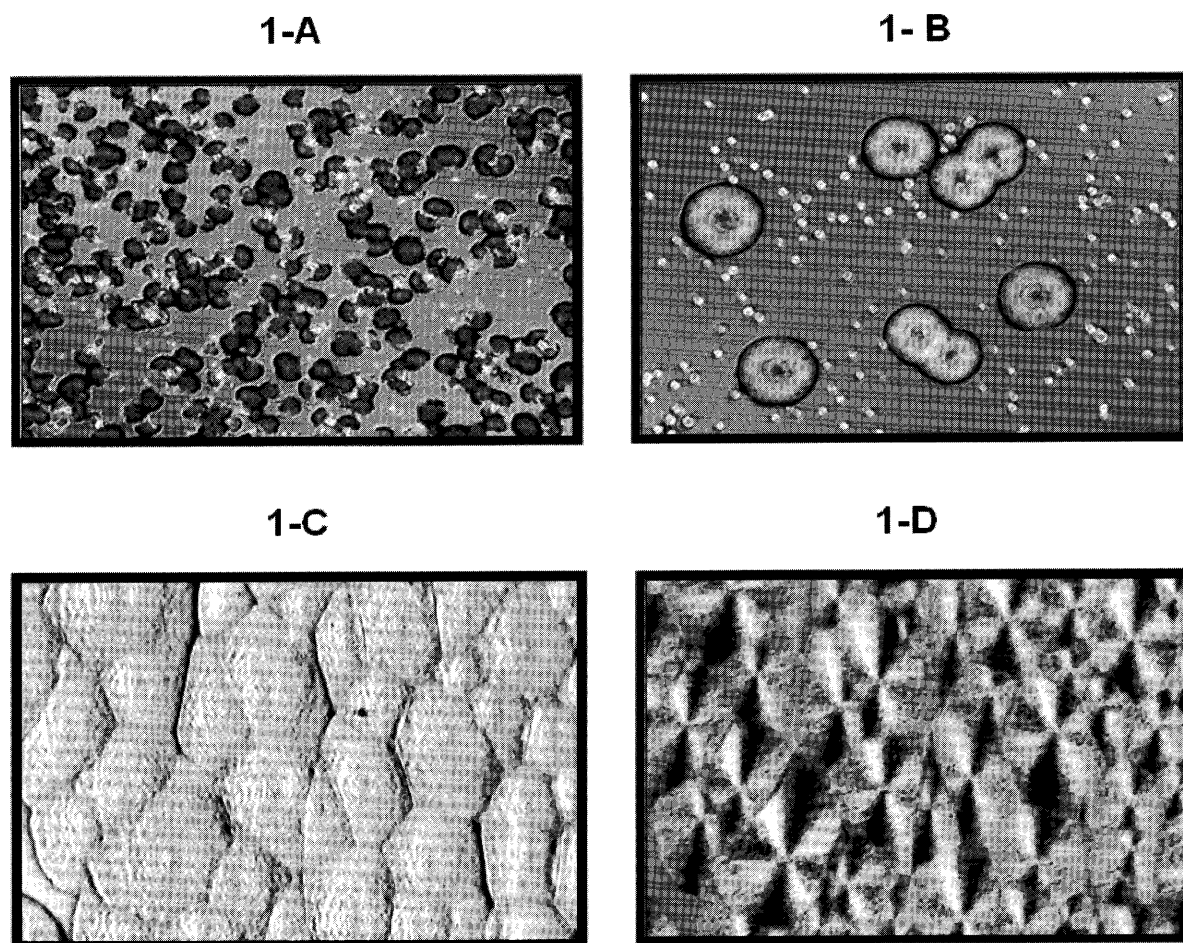


Fig.1: Crystals induced from supersaturated $CaCO_3$ solution

1-A; spontaneously formed aragonite crystals

1-B; crystals induced by addition of nacrein or N16

1-C; crystals induced by addition of nacrein or N16 on the basement MSI60 membrane (under normal light)

1-D; crystals induced by addition of nacrein or N16 on the basement MSI60 membrane (under polarized light)

ため、上記の可溶性有機基質をブロッテイングにより PVDF 膜に転写し、エドマン法による N 末端アミノ酸分析を行って、この成分の N 末端アミノ酸配列を決定した。一方、アコヤガイの上皮組織中の全 RNA からこのアミノ酸配列を基に設計したプライマーにより cDNA クローニングを行い、25 kDa 成分をコードする遺伝子の塩基配列を決定し、それをアミノ酸配列に変換した。この配列は極めて特異的なものであり、N 末端部位に 18 残基のアスパラギン酸からなる酸性アミノ酸部位が、分子の中央部分には、poly A と poly G の繰り返し配列が存在し、その間に 3 回の塩基性アミノ酸に富む部位が挟まれていた。この成分は Obara ら (M.S.) により MSI25 と命名された。

以上の結果を基に真珠層形成のモデルを提示した。従来の真珠層形成機構に対する考えでは、海水の組成に類似したとう外液と呼ばれる石灰化溶液中に、結晶核を誘導する特別な成分が存在すると考えられてきた (11)。炭酸カルシウムの結晶多形 (アラレ石と方解石) も決定するとされるこの成分の探索が続けられているが、今日までに決定的な証拠は見られていない。次に、形成された結晶核はそのまま成長して、最終的に真珠層を構成する六角形板状のアラレ石結晶層になると推定されてきた。しかし、今回の分析結果から筆者らは、従来の説よりもより複雑な機構を提示した。すなわち、結晶核が形成される前に、結晶形成の場が炭酸カルシウムに対して過飽和状態になる必要があり、そのための炭酸とカルシウムイオンを濃縮する成分が存在する可能性を指摘した。とう外液中に MSI60 の膜による仕切りが先ず形成され、一つづつの小さな compartment が形成される。この部屋の中で、膜に ion concentrator と名付けた Ca^{2+} イオンと CO_3^{2-} イオンを濃集する成分が結合して、両イオンを膜上に集める。集められたイオンは nucleator によってトラップされて炭酸カルシウムの結晶核が形成される。一たび形成された結晶核はそのまま成長するのではなく、結晶面の特定部位に regulator と名づけた結晶形態を制御する成分が吸着し、結晶の成長方向が制御される。これにより、最終的にアラレ石結晶が六角形平板状になり、真珠層が形成されると考えた。Ca-ion concentrator としては、膜に結合した N16 の sulfation 部位が候補となる。

N16 に結合した SO_4 により、Ca イオンの膜状への流れが形成される。 CO_3^{2-} ion concentrator としては、膜に結合したナクレインの CA ドメインが候補となる。CA の酵素としての機能により CO_3^{2-} が濃集される。両成分の対象部位とも 100 % のホモロジーを示した部分である。次に、nucleator として今回新規成分として同定された N25 が候補として挙げられる。この成分の分子中に存在する酸性アミノ酸部位に Ca^{2+} イオンが、塩基性アミノ酸部位に CO_3^{2-} イオンがトラップされ、これらの 2 種類のイオン同士が反応して炭酸カルシウム結晶核が形成される可能性が考えられる。このような特異的な一次構造を持つ成分はこれまで発見されておらず、炭酸カルシウム結晶核形成機構の解明につながる極めて興味深い結果である。regulator 成分としては、ナクレインと N16 の NG 繰り返し配列部位が候補として挙げられる。この部位はホモロジーが他の部位と比較して低い部位である。NG 繰り返し配列部位は、グリシンループ構造をとって分子の外側に突き出て、他の分子との反応に関与することが想像される。この部位が結晶表面に吸着してこの方向への結晶成長を抑制し、結晶をこの面に対して垂直面方向への成長方向を制御し、最終的に真珠層に特有の六角形板状結晶層の形成を導くと考えられる。

4. 要 約

本研究課題では、真珠層形成機構を分子レベルで明らかにするために、これらの分子の構造をウグイスガイ科を中心とした軟体動物の異なる系統間で比較し、構造の保存性に関する情報を基に分子の機能の推定を試みた。さらに、結晶形成実験を基に、3 種類の真珠層形成タンパク質の機能解析を行って、分子の構造から推定される機能の検証を試みた。

その結果、ナクレインの CA 活性部位と N16 の sulfation 部位の保存性が高い反面、両成分中に存在する NG 繰り返し配列部位の保存性が低いことが明らかになった。また、MSI60 は、分子全体に渡って極めて保存性の高いことが明らかになった。結晶形成実験からは、ナクレイン、N16 ともにアラレ石結晶の形態を制御するものの、結晶形の決定には関与しないと考えられた。これに対して MSI60 は、これが存在しないと結晶の層状成長が起こらないものの、

結晶形態や結晶形の制御などには関与していないことが判明した。

殻体真珠層は、1) 石灰化の場の形成 2) カルシウムイオンと炭酸イオンの濃集 3) 炭酸カルシウム結晶核の形成 4) 結晶形の制御の各段階を経て形成される。上記の結果を基に筆者らは、真珠層形成機構を以下のように考察した。まず、石灰化の場が、MSI60を主体とした不溶性の膜により形成され、続いて、炭酸イオンとカルシウムイオンの石灰化の場への濃集が、ナクレインのCA活性部位とN16のsulfation部位の働きによって計られる。過飽和状態となった膜上で、炭酸カルシウム結晶核の形成がtemplateの働きによって起こり、この結晶核が次第に成長して、真珠層に特有の板状の形態を持つようになる。この結晶形態制御は、ナクレインとN16分子中に存在するNG繰り返し配列部位の結晶表面への吸着により遂行される。これまでに報告された10数種類の軟体動物殻体形成に関与する成分の中で、templateに相当する明確な特徴を持った成分は発見されていない。アコヤガイ真珠層中からObaraら(M.S.)により発見されたMSI25に結晶核形成を誘導する構造上の特徴が見出された。MSI25は、N末端領域に集中する酸性アミノ酸領域にカルシウムイオンを結合し、分子中に3回出現する塩基性アミノ酸領域に炭酸イオンを結合し、この2種類のイオン同士のイオン結合により炭酸カルシウム結晶核を誘導する可能性がある。この成分の機能については、現在、結晶形成実験により検証を進めている。

文 献

- 1) Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima M., Nakano, S., Morita, T., Matsushiro, A.: A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9657-9660 (1996).
- 2) Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K.: Structures of mollusc shell framework proteins. Nature 387, 563-564 (1997).
- 3) Shen, X., Belcher, A. M., Hansma, P. K., Stucky, G.D., Morse, D. E.: Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliothis rufescens*. J. Biol. Chem. 272, 32472-32481 (1997).
- 4) Sarashina, I., Endo, K.: Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: Implications for calcium carbonate biomineralization. Amer. Mineralogist, 83, 1510-1515 (1998).
- 5) Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., Akera, S.: A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. FEBS Letters.
- 6) Kono, M., Hayashi, N., Samata, T.: Molecular mechanism of the nacreous layer formation of *Pinctada maxima*. Bioch. Bioph. Res. Commun., in press.
- 7) Belcher, A. M., Wu, X.H., Christensen, R. J., Hansma, P. K., Stucky, G.D., Morse, D.E.: Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. Nature 381, 56-58 (1996).
- 8) Falini, G., Albeck, S., Weiner, S., Addadi, L.: Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. Science 271, 67-69 (1996).
- 9) 北野康, 吉岡小夜子, 金森暢子, 都築俊文, 水溶液中における炭酸カルシウムの同質多像形組成の変化. 化石, 23.24, 15-25 (1972)
- 10) Kitano, Y., Hood, D. W.: The influence of organic material on the polymorphic crystallizations of calcium carbonate. Geochim. Cosmochim. Acta, 29, 29-41 (1965).
- 11) Weiner, S., Hood, L.: Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: A potential template for shell formation. Science 190, 987-989 (1975).