

軟体動物の殻体形成機構の *in vivo* での解明の試み

In vivo experiments for elucidation of the process of molluscan shell formation

佐俣哲郎¹, 其木茂則², 中明賢二³

¹環境保健学部細胞生物学研究室, ²環境保健学部環境化学研究室, ³環境保健学部生活環境学研究室

Tetsuro Samata¹, Shigenori Sonoki², Kenji Nakaaki³

¹Laboratory of Cell Biology, Faculty of Environmental Health,

²Laboratory of Environmental Chemistry, Faculty of Environmental Health,

³Laboratory of Life Environment, Faculty of Environmental Health

Abstract. Molluscan shell consists mainly of CaCO_3 with small amount of organic matrix. CaCO_3 crystals which have two polymorphs of aragonite and calcite, are arranged into specific direction and form microstructure with geometric alignment.

Species used for this research are *Pinctada fucata martensii*, whose shells are composed of inner aragonitic nacreous and outer calcitic prismatic layers. Recent studies on molluscan biomineralization have been focused on the analysis of genes encoding organic matrix proteins, while *in vivo* and *in vitro* analysis of their functions should be clarified in future.

In this research, we intend to elucidate the process of shell formation based on the experiment of shell regeneration, tissue culture and crystallizing experiment.

As the result, several kinds of organic materials were observed on the cover glass which can relate to formation of crystal nucleus and shell microstructure. Additional observation was the formation of regenerated shell with different microstructure from the nacreous layer. X-ray diffraction analysis resulted in the formation of calcite instead of aragonite forming the nacreous layer. Observation of surface microstructure of the regenerated shell by scanning electron microscope showed similar structure to the prismatic layer.

Needle-like microcrystals, containing high contents of sulphur were observed from the cultured epithelial tissues. These sulphurs were estimated to be derived from sulphur-containing glycoprotein, protein with high amount of Cys or sulfated protein. Finding of such sulphur-rich components will support the template theory about molluscan shell formation and further precise identification of the components will be the key for understanding crystal nucleation, control of crystal polymorphism and shell microstructure in the process of molluscan shell formation.

1. 目的

バイオミネラリゼーションの研究は、ヒトの骨や歯を中心に、医学、歯学、化学、生化学、分子生物学、進化系統学などの多くの分野で行われてきた。一方、無脊椎動物のバイオミネラルについては、軟体動物の殻体に関する研究が最も進んでいる。軟体

動物殻体のバイオミネラリゼーションは、無機結晶の主成分である炭酸カルシウムの他に、多様なタンパク質、多糖類および脂質などからなる有機基質成分が関連して起こる。炭酸カルシウムの結晶には、アラレ石と方解石という2種類の結晶多形が存在し、この結晶多形が、軟体動物の系統および殻体微細構造と密接な関連を持って分布する。このため、軟体

動物のバイオミネラル化の研究は、殻体のナノレベルでの研究、有機基質の生化学的・分子生物学的研究、殻体分泌上皮組織の細胞学的研究など多岐に渡っている。その中でも近年は、軟体動物殻体中の有機基質成分をコードする遺伝子の研究が進んでおり、一部の有機基質タンパク質の機能に関する研究も開始されているが、*in vivo*や*in vitro*での殻体形成機構の研究は、未だほとんど行われていない。その中で、Wada (1)、和田 (2) は、アコヤガイの破壊殻体と外套膜の間にカバーグラスを挿入し、カバーグラス上に付着する有機物や殻体の再生過程の解析を行なった。その結果、結晶形成開始時に硫酸含有糖タンパク質が出現し、この成分の表面が結晶形成を誘導する *template* となる可能性を指摘した。また、ムラサキイガイ (*Mytilus edulis*) を用いた殻体再生実験では、外套膜が3期に分かれて再生することや、殻体再生過程において真珠層の形成に先立って粒状層と呼ばれる原始的な殻体殻体微細構造が出現することなどが報告された (3)。一方、アコヤガイなどで外套膜上皮組織の組織・細胞培養が行われ、外套膜上皮組織の血球シート上での培養、有機基質様物質の分泌と結晶形成が確認された (4, 5, 6)。

本研究では、海水環境中に生息し、殻体の内側と外側に異なる結晶を持つアコヤガイでの実験を通じて、殻体再生の初期段階における有機基質の形成と炭酸カルシウムの沈着の関係を明らかにすることを目的とした。この目的のために、試料の殻体部（アコヤガイでは真珠層部位）に穿孔し、そこにカバーグラスを挿入・固定し、このカバーグラスに付着した有機物および硬組織の観察を、微分干渉顕微鏡やSEMなどを用いて行った。有機物の染色には、炭酸カルシウムの存在の確認のためには、アリザリンレッドS染色法を用いた。

2. 方法

2-1. 試料

本研究には、内殻にアラレ石からなる真珠層と外殻に方解石からなる稜柱層と持つ海生種のアコヤガイ（三重県志摩市賢島養殖個体）を用いた。

2-2. 方法

(1) カバーグラス挿入法による殻体再生実験

殻体に穿孔し、そこにカバーグラスを挿入・固定

して、カバーグラス上に形成される成分の解析を行った。

アコヤガイ生体試料は、神奈川県真鶴市岩漁港内に係留し、実験を行った。穿孔を行った個体からは、1, 2, 3, 7, 10, 14, 60 日間の飼育後にカバーグラスを摘出した。

Ca検出のためには、アリザリンレッドS染色法を用いた。カバーグラス上の有機基質は染色後、透視型ノマルスキー型微分干渉顕微鏡を用いて観察した。カバーグラス試料は、金蒸着後、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて表面および断面の形態の観察を行なった。また、カバーグラス上に付着した物質に含まれる元素の定性分析は、SEMに付属の元素分析器 (EDS) を用いて面分析として行った。

殻体再生実験において形成された硬組織の結晶形の同定には、X線回折分析計を用いた。試料の回折像を方解石とアラレ石の標準ピークと比較して結晶形の同定を試みた。

可溶性有機基質 (SM) および殻体再生実験によって得られたアコヤガイ膜状不溶性有機基質 (ISM) の機能解析は、北野 (7) の実験系に基づき、結晶形成母液を用いて *in vitro* 結晶形成実験により行った。アコヤガイ真珠層から抽出された有機基質タンパク質は、2mlの結晶形成母液と混和され、24穴マイクロプレートのウェル上に滴下された。これらの作業の後、24穴マイクロプレートは、低温インキュベータ中で22度、48時間インキュベートされた。形成された結晶は、微分干渉顕微鏡およびX線回折分析器により解析した。

外套膜上皮細胞培養実験には、アコヤガイの外側外套膜上皮の細胞や組織の培養用に開発された塩類溶液であるMMBSSを用いた (8)。摘出した外套膜上皮組織片は、MMBSS内で穏やかにピペッティングして洗浄後、24穴マイクロプレート中に入れたMMBSS中で、pH7.2～7.6、23℃、10%二酸化炭素下で行った。形成された結晶の解析には、SEMおよびEDSを用いた。

3. 結果と考察

全ての試料において、カバーグラスが挿入されてから、まず、膜状有機基質の発達が認められた。この膜状有機基質の形成初期の単層の状態では、アリ

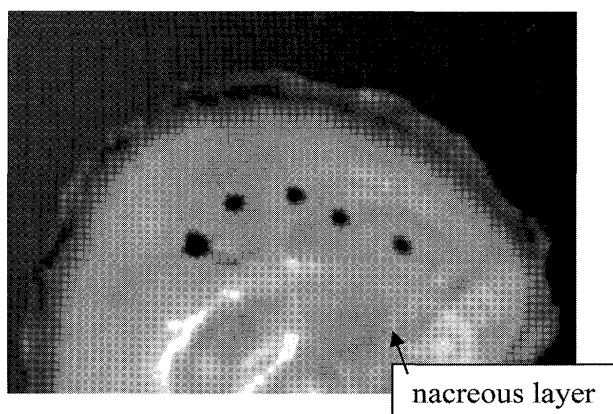


Figure 1: Boring shell used for the experiment.

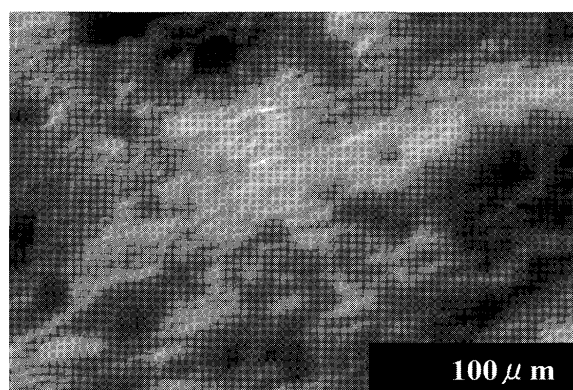


Figure 2: Membrane-like organic matrix stained by alizarin red S formed on coverglass placed between boring shell and mantle epitherium, 3 days after the start of experiment.

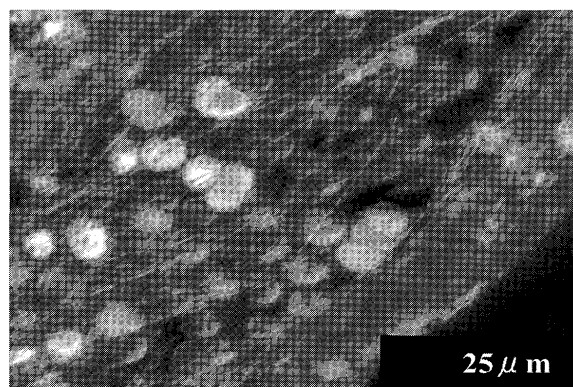


Figure 3: Microcrystals formed between membrane on coverglass placed between boring shell and mantle epitherium, 7 days after the start of experiment.

ザリンレッドSで染色されず、多層化して初めて染色が確認された。このことは、膜状有機基質の層間に染色部分が存在することを示しており、石灰化の

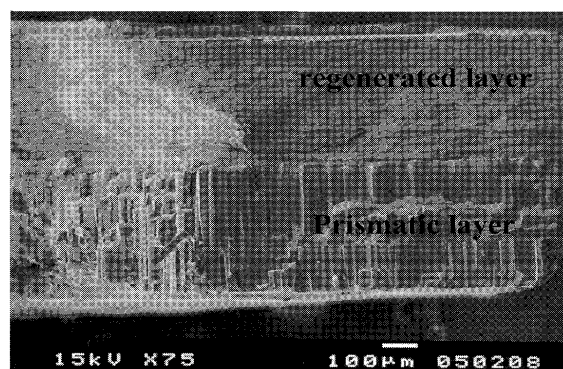


Figure 4: SEM micrograph of cross-section of the regenerated shell layer 30 days after the start of experiment.

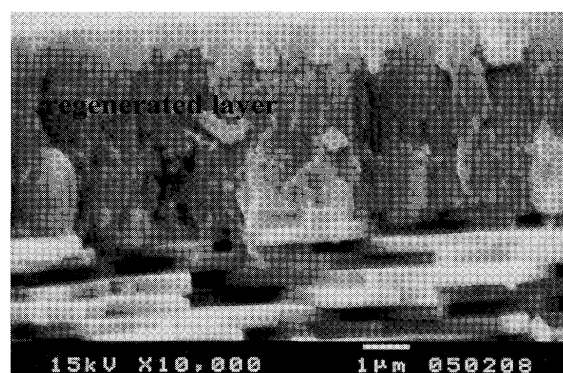


Figure 5: SEM micrograph of cross-section of the regenerated shell layer.

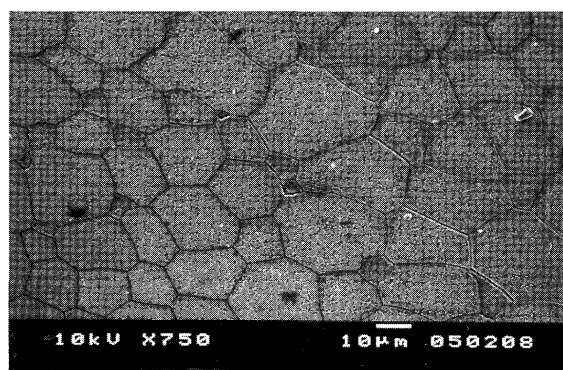


Figure 6: SEM micrograph of planeview of the regenerated layer.

進行に伴って、この染色部位に球状の結晶がスポット状に発達した。以上の事実は、コンパートメントに相当する微小環境内で石灰化が開始されることを示唆しており、この結果は、中原らによって提唱されたコンパートメント説 (9, 10, 11) を実証する初めてのデータとなった。一方、アコヤガイから抽出したSM成分をISM膜とともに添加する結晶形成実

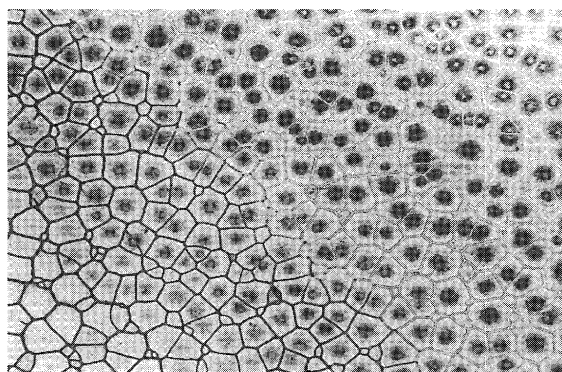


Figure 7: SEM micrograph of planeview of the untreated prismatic layer.

験においても、ISM膜上に類似の球状結晶が形成されることが確認された。このことは、殻体再生実験の石灰化初期段階で形成された膜状有機基質がMSI60である可能性が高いことを示している。この成分が、遺伝子から発現後、どの段階でどのような機構で不溶化するのか検討が必要である。

石灰化の進行とともに、この球状結晶は、真珠層よりもはるかに大きなサイズを持つ方解石結晶へと成長し、実験の最終段階では、稜柱層に類似の形状を持つ殻体微細構造の形成にまで至った。このように、アラレ石からなる真珠層の再生実験において、始めに形成される結晶層として真珠層が選択されるのではなく、方解石からなる稜柱層が選択されることが明らかになった。このことは、Belcherら(12)が、結晶形成実験で方解石の基盤結晶層が存在して初めてアラレ石の結晶が形成されるとした報告に一致するものである。今回の実験では、真珠層の形成までには至らなかったが、より長期間の実験の継続後に、稜柱層の上に真珠層が形成される可能性が考えられる。方解石稜柱層が存在しないとアラレ石真珠層の形成に至らない理由は今のところ全く不明であるが、軟体動物の石灰化を考える上で非常に重要なポイントとなると思われる。

アコヤガイの外套膜組織の培養中に、針状と球状の微小結晶様物質の形成が確認された。この微小結晶様物質は、石灰化の進行に伴ってSに富む、針状の形態を持つものから、相対的にCa含有量の多い花弁状および球状の結晶様物質へと変化する。このような形態と組成を持つ微小結晶様物質は、Wada(1)による殻体破壊実験の際にも石灰化初期段階にその

出現が確認されている。この物質は、軟体動物殻体形成初期の石灰化機構を考察する際に極めて重要な成分と考えられる。最近、Mouraら(13)は、アワビ殻体中の有機基質がマントル上皮細胞の活動を阻害する細胞毒として作用する可能性を指摘している。今後は、組織培養から細胞培養への転換が必要であり、殻体形成に関与する高純度の細胞の集積と増殖を基に、バイオミネラル化の細胞レベルでの展開が求められよう。

以上より、軟体動物の殻体微細構造の再生には
1. 膜状有機基質による微小環境の形成、2. 含硫有機基質による微小結晶の形成、3. 膜状有機基質による殻体微細構造形成のための形態制御、4. 初めに形成される方解石によって構成された土台上でのアラレ石真珠層の形成の条件が必要であると考えられる。これら4項目のうち3項目が、膜状有機基質及び表面に存在する含硫有機基質に関連しており、その働きが軟体動物殻体形成に非常に重要であることが示唆される。軟体動物殻体有機基質中でのこのような成分の存在は従来より指摘されてきた。和田(2)は、結晶形成開始時に硫酸含有糖タンパク質が出現することを明らかにし、Daufin(14)は、FT-IR、UV分析によりSに富む成分の存在を指摘した。その成分として推定されるのは、含硫糖タンパク質あるいは含硫アミノ酸であるが、正確な同定には未だ至っていない。その可能性としては、酸性タンパク質に結合したC4Sなどの多糖類やCysなどの含硫アミノ酸を多量に含むN16(15)やN14(16)などの有機基質タンパク質が挙げられる。このような成分がtemplateになって方解石結晶が形成され、その後、結晶が相転移してアラレ石結晶が形成されると推定される。

4. 要 約

1 殻体再生の初期段階における有機基質の形成と炭酸カルシウムの沈着の関係を明らかにすることを目的として、アコヤガイを試料として、*in vivo*での軟体動物殻体再生実験および上皮組織培養実験が、*in vitro*での結晶形成実験とともに行なわれた。

2 これらの実験の結果、石灰化初期段階に、MSI60と思われる不溶性膜成分が形成され、この不溶性有機基質膜間で、Sに富む可溶性有機基質と思われる

成分の働きにより方解石結晶核が形成されるということが明らかになった。この事実は、compartment theory を支持するとともに、template の存在をも暗示したため、template theory をも支持する結果となった。

3 実験の最終段階で、方解石からなる稜柱層に類似の微細構造の形成が認められた。このことから、アコヤガイでは、真珠層の形成に先立って稜柱層の形成が必須であることが示唆された。

文 献

- 1) Wada, K. (1980). Initiation of mineralization in bivalve molluscs. In M. Omori & N. Watabe Eds., The mechanism of biomineralization in animals and plants. pp.79-92, Tokai Univ. Press, Tokyo, Japan.
- 2) 和田浩爾 (1999) : 真珠の科学, 真珠新聞社.
- 3) 鈴木清一 (1979) *Mytilus edulis* (斧足類) の再生有機膜殻体の鉱物化 地質学雑誌. 第 85 号, 669-678.
- 4) Machii, A. and Wada, K. (1989) Some Marine Invertebrate Tissue Culture. Invertebrate cell system Applications, II, 225-229.
- 5) Awaji, M. and Suzuki, T. (1995) The Pattern of Cell Proliferation during Pearl Sac Formation in the Pearl Oyster. Fisheries Sci. 61(5), 747-751.
- 6) 淡路雅彦, 鈴木徹 (1996) 組織培養による真珠袋形成過程の研究, 月刊海洋, vol.28, No.11, 664-668.
- 7) 北野康 (1990) 炭酸塩堆積物の地球科学. P.1-412, 東京大学出版会, 東京.
- 8) Machii, A. (1974) Organ culture of mantle tissue of the pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). Bull. Natl. Pearl Res. Lab., 18, 2111-2117.
- 9) Nakahara, H. (1979) An Electron Microscope Study of the Grouwing Surface of Nacre in Two Gastropod Species, *Turbo cornutus* and *Tegula pfeifferi*. Venus, 38, 205-211.
- 10) Nakahara, H., Bevelander, G. and Kakei, M. (1980) Fine Structure and Amino Acid Compositon of the Organic "Envelope" in the Prismatic Layer of Some Bicalce Shells. Venus, 39, 169-177.
- 11) Nakahara, H., Bevelander, G. and Kakei, M. (1982) Electron Microscopic and Amino Acid Studies on the Outer and Inner Shell Layers of *Haliotis rufescens*. Venus, 41, 33-46. Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, K., Tanaka, M., Nagashima, K., Takahashi, T. (1997) Structures of mollusks shellframework protein. Nat., 387, 563-564.
- 12) Belcher, A. M., X. H. Wu, R. J. Christensen, P. K. Hansma, G. D. Stucky, and D. E. Morse. (1996) Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. Nature, 381, 56-58.
- 13) Moura, G., Machado, J. & Coimbra, J. (2004). Insights on nacre formation in the freshwater clam, *Anodonta cygnea* (L.): an overview. In I. Kobayashi, & H. Ozawa, Eds., Biomineralization: formation, density, evolution and appli- cation, Tokai Univ. Press, Tokyo, Japan, 33-35.
- 14) Daufin, Y. (2003) Soluble organic matrices of the calcitic prismatic layers of two pteridomorphid bivalves. J. Biol. Chem., 278-17, 15168-15177.
- 15) 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.
- 16) Kono, N., Hayashi, N. and Samata, T. (1990) Molecular Mechanism of the Nacreous Layer Formation in *Pinctada maxima*. Biochemical and Biophysical Research Communication, 269, 213-218.