

# 海生無脊椎動物骨格における炭酸カルシウム 結晶多形制御機構の解明

*Elucidation of control system of CaCO<sub>3</sub> polymorphism in marine invertebrate skeleton*

佐俣哲郎, 其木茂則, 秋山孝洋

環境保健学研究科

Tetsuro Samata, Shigenori Sonoki, Takahiro Akiyama

Graduate School of Environmental Health

**Abstract.** Molluscan shell consists of complicated structure called shell microstructure, which is composed of two polymorphisms of calcium carbonate crystals, aragonite and 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 comprises aragonite, and has a specific geometry, in order to gain an understanding of the effect of OM on shell formation. 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 OMs were extracted from the foliated layer of *Crassostrea nippona*. SDS-PAGE of these OM fractions resulted in a consecutive band with size of approximately 52 kDa, which could be visualized with stainsall, negative and methyl green stainings.

The crystallization experiment was performed by adding OM components in the supersaturated crystallizing solution. When the 52 kDa component 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.

## 1. 目的

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<sub>3</sub>) の結晶で硬組織の形成を行う。CaCO<sub>3</sub> 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。軟体動物の殻体では、カキ、ホタ

テガイ、アコヤガイ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  $\text{CaCO}_3$  結晶の集合した複雑な構造から形成されており、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には、殻体中に含まれる有機基質タンパク質 (organic matrix = OM) が深く関与していると考えられている (1)。OM は、可溶性有機基質 (soluble organic matrix = SM) と不溶性有機基質 (insoluble organic matrix = ISM) に区分される。多くの種類の微細構造のうちで、主に真珠層と稜柱層について、これまでに約 20 種類の有機基質中のタンパク質成分の一次構造が決定されている (2-10)。今回、分析対象とした、葉状構造については、ホタテガイ (*Patinopecten. yessoensis*) の MSP-1 (11) とイワガキ (*Crassostrea nippona*) の MF44 (12) が SM 中から報告されている。

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* 環境中で OM の機能を推定することを試みた。とくに、葉状構造を構成している方解石結晶の OM による多形制御の機構に関する考察を行った。

## 2. 方法

### 1) 有機基質タンパク質 (OM) の抽出・精製

イワガキ殻体からの有機基質の抽出方法は、(12) に記載された方法によった。

### 2) SDS-PAGE

10 % Polyacrylamide gel と e-パジェル (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて、ISM 中の成分の分離を行った。分析試料は、還元処理後、20 mA の定電流にて 90 分間電気泳動した。泳動後、全ての分析試料について CBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色、Stainall 染色 (13)、Negative 染色 (14)、Methyl Green 染色 (15) および Alcian Blue 染色を行った (16)。

### 3) *in vitro* 結晶形成実験

*in vitro* 結晶形成実験は、下記の 2 種類のアッセイ系にて行った。

アッセイシステム 1) : 10 mM  $\text{CaCl}_2$ /10 mM  $\text{MgCl}_2$ /12mM  $\text{NaHCO}_3$  水溶液を Filter Papers No. 44 でろ過したもの、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 2) : Wheeler ら (17) 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。20 mM  $\text{NaHCO}_3$  水溶液を 20 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液で、pH を 8.7 に調整した。この溶液 3 ml と 10 mM  $\text{CaCl}_2$  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。

試料は、それぞれの母液に添加した。添加量は、0.04  $\mu\text{g}/2\text{ml}$ , 0.2  $\mu\text{g}/2\text{ml}$ , 0.6  $\mu\text{g}/2\text{ml}$  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。

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, 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。また、結晶形の同定には、X 線回折装置 JDX8010 型 (日本電子株式会社, Tokyo, Japan) を用いた。

## 3. 結果と考察

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. (12) 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、この成分中にも 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 (16) は、アメリカカキ (*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、 $\text{CaCO}_3$  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

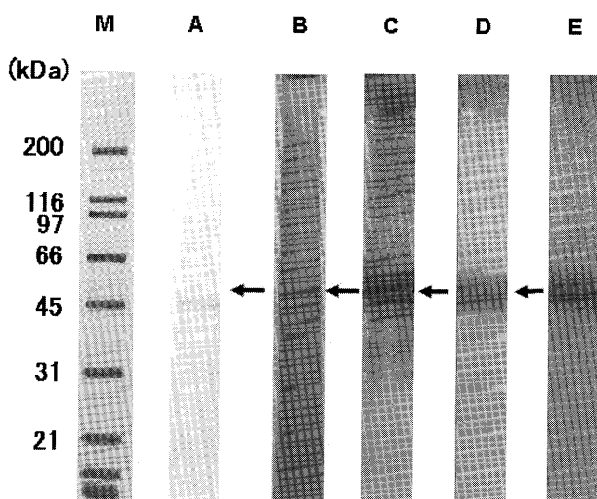


Fig.1: SDS-PAGE electrophoretogram of MESM in OM of *C. nippona*. A same amount of approximately 50  $\mu\text{g}$  samples was applied to each lane. Lane M, molecular weight standards; Lane A, CBB staining; Lane B, Stainsall staining; Lane C, Negative staining; Lane D, Methyl Green staining; and Lane E, Alcian Blue staining. The arrows on the left side of the gels indicate the position of the 52 kDa component.

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(10)。本研究で用いたイワガキの葉状層のMESMの52 kDa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、葉状層からMESM中の52 kDa成分を検出することに成功した。さらに、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(Fig. 1)。

*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した。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った。

アッセイシステム1のアラレ石/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

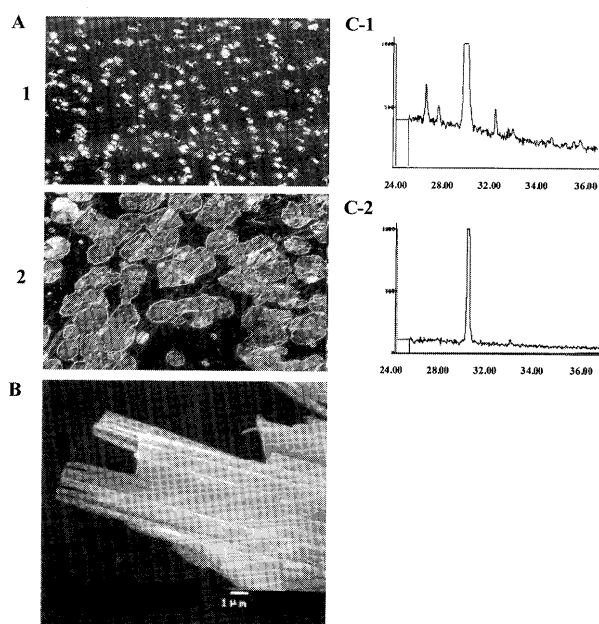


Fig. 2. Surface views of crystals induced by crystallization experiment, and X-ray diffraction profiles of the induced tabular oval crystals in comparison with those of synthesized calcite and aragonite. Left: A-1, Spontaneously formed rhombohedral calcite crystals; A-2, Tabular oval crystals induced on the ISM membrane after addition of the 52 kDa component at 5  $\mu\text{g}$ . B, Fine structure of the edge of a tabular oval crystal under SEM observation ( $\times 7500$ ). Right: C-1, X-ray diffraction profiles of crystals in A-1. Reflections corresponding to the mineral calcite ( $2\theta$  and  $hkl$ ) 29.60 (104) and aragonite ( $2\theta$ ) 26.40, 27.40, 31.90, 33.30, 36.35, 37.50, 38.10 and 38.60 were detected. C-2, X-ray diffraction profiles of crystals in A-2. Reflections corresponding to the mineral calcite ( $2\theta$  and  $hkl$ ) 29.60 (104) were detected. The lateral axis shows scattering angle ( $2\theta$ ) and the longitudinal axis shows intensity (arbitrary units). The experiment was carried out in the crystallizing solution, which resulted in spontaneous formation of the mixture of calcite and aragonite as is shown in C-1. The presence of residual undissolved  $\text{CaCO}_3$  crystals was carefully checked using SEM, energy dispersive X-ray spectrometer, FT-IR and X-ray diffractometer. Experiments were repeated at least 10 times for each batch. The use of acetic acid instead of EDTA for decalcification greatly contributed to the removal of remaining crystals and unknown aggregates of OM components and EDTA.

レ石：方解石が9：1の割合で存在していた。この母液に、OMを、それぞれ0.04  $\mu\text{g}/2\text{ml}$  から0.6  $\mu\text{g}/2\text{ml}$  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OMを等量添加した場合には、添加量の増加とともに、平板状の結晶が形成された。この結晶は、X線回折分析から方解石と同定された(Fig. 2)。

アッセイシステム2では、比較対象としてD.W.を

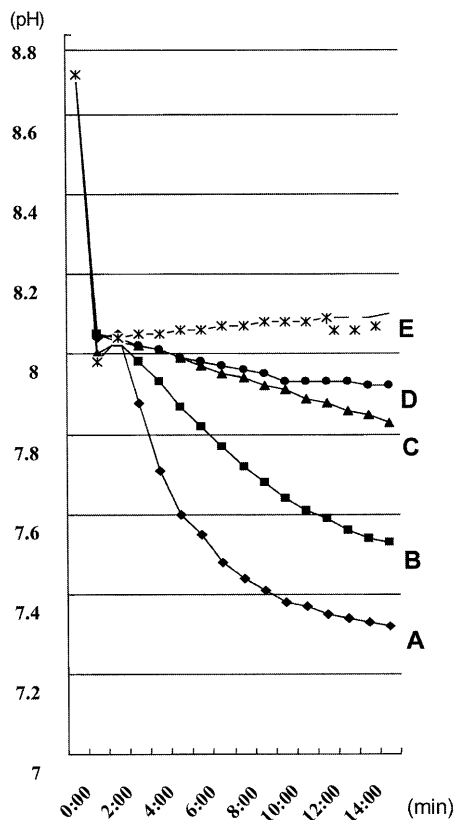


Fig. 3. Crystal precipitation experiment. A, Reference experiment performed by the addition of DW to the crystallizing solution, B, D, E, Addition of the 52 kDa component to the crystallizing solution at 2.5  $\mu$ g (B), 10  $\mu$ g (D) and 50  $\mu$ g (E), EC, Addition of phosphovitin to the crystallizing solution at 50  $\mu$ g.

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。OM を添加した場合には、pH の急激な変動は起こらず、15 分後の pH は、実験開始時とほぼ同じ pH 8.2 であった (Fig. 3)。

*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この成分が関与している可能性が示唆された。また、X 線回折により、結晶形成実験で誘導されたこの平板状の結晶が、方解石のみから構成されていることが明らかになったため、この成分には、方解石の形成を誘導する機能が存在することが示唆され、非常に注目される。

#### 4. 要約

- 1 軟体動物イワガキ殻体中に含まれる有機基質タンパク質の主要成分として、高度にリン酸化された 52 kDa の酸性糖タンパク質を同定した。
- 2 この成分の機能解析を結晶形成実験により試みた。その結果、この成分が、単独では結晶形成を阻害するものの、不溶性有機基質の膜とともにインキュベートした場合に、平板状の方解石結晶が誘導されることが明らかになった。
- 3 この結果から、リン酸化されたこの種の成分が  $\text{CaCO}_3$  の結晶多形の制御に関係していることが推定された。

#### 文献

- 1) Crenshaw, M. A. (1972) *Biom mineralization* 6, 6-11.
- 2) Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T. & Matsushiro, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9657-9660.
- 3) Sudo, S., Fujikawa, T., Nagakura, T., Ohkubo, T., Sakaguchi, K., Tanaka, M., Nakashima, K. & Takahashi, T. (1997) *Nature* 387, 563-564.
- 4) Shen, X., Belcher, A. M., Hansma, P. K., Stucky, G. D. & Morse, D. E. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 32472-32481.
- 5) Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C. & Akera, S. (1999) *FEBS Lett.* 462, 225-229.
- 6) Kono, M., Hayashi, N. & Samata, T. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 213-218.
- 7) Marin, F., Corstjens, P., de Gaulejac, B., de Vrind-De Jong, E. & Westbroek, P. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 20667-20675.
- 8) Tsukamoto, D., Sarashina, I. & Endo, K. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 1175-1180.
- 9) Suzuki, M., Murayama, E., Inoue, H., Ozaki, N., Tohse, H., Kogure, T. & Nagasawa, H. (2004) *Biochem. J.* 382, 205-213.
- 10) Gotliv, B. A., Kessler, N., Sumerel, J. L., Morse, D. E., Tuross, N., Addadi, L. & Weiner, S. (2005) *ChemBiochem* 6, 304-314.
- 11) Sarashina, I. & Endo, K. (2001) *Mar. Biotechnol.* 3, 362-369.
- 12) Samata et al., in press.
- 13) Campbell, K. P., MacLennan, D. H., and Jorgensen, A. O. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11267-11273.
- 14) Fernandez-Patron, C., Calero, M., Collazo, P. R., Garcia,

- J. R., Madrazo, J., Musacchio, A., Soriano, F., Estrada, R., Frank, R., and Castellanos-Serra, L.R. (1995) *Anal. Biochem.* **224**, 203-211.
- 15) Cutting, J. A., and Roth, T. F. (1973) *Anal. Biochem.* **54**, 386-394.
- 16) Wardi, A. H., and Michos, G. A. (1972) *Anal. Biochem.* **49**, 607-609.
- 17) Wheeler, A. P. (1992) In *Hard Tissue Mineralization and Demineralization* (Suga, S. and Watabe, N. eds.) pp.171-187, Springer-Verlag, Berlin-Hederberg-Tokyo.