

In Vitro におけるアラレ石構造平板状結晶の作出

はじめに

無脊椎動物の硬組織の多くは無機材料である炭酸カルシウムと僅かな有機質（タンパク質）から構築されている。炭酸カルシウムの結晶には多形があり、三方晶系の方解石（カルサイト）、斜方晶系のアラレ石（アラゴナイト）、六方晶系のバテライトである。硬組織を有する代表的な無脊椎動物として、軟体動物貝類の貝殻がある。貝殻の構造は、石灰化していない有機質のみから構成される殻皮層が外側にあり、その下層に石灰化した炭酸カルシウムの層が存在する。石灰化層の構造は貝類により異なり、アラレ石結晶が無機材料である真珠層や、方解石結晶が無機材料である稜柱層や葉状層がある。二枚貝カキの貝殻は殻皮層の下に稜柱層と内側の葉状層から形成され、一方、二枚貝であるアコヤ貝に代表される真珠貝貝殻は殻皮層の下が稜柱層で内側が真珠層である。一枚貝の巻き貝のアワビの貝殻は殻皮層の下がアラレ石結晶の真珠層となっている。稜柱層は方解石の柱状結晶が束ねられた構造であるのに対し、真珠層は厚さ 0.3-0.4 μm のアラレ石の平板状結晶が積層した構造であり、約数千枚積み重なっている。

In vitro の実験系で、アラレ石結晶を析出するには方解石結晶析出母液[Ca(HCO₃)₂]にマグネシウムイオンを添加すれば容易に析出する(Kitano 1962; Oomori and Kitano 1991; Samata et al. 1999)。マグネシウムイオン非存在下の条件では、Keene らによる報告(Keene et al. 2010)があり、 β -キチンにパーリン(Pearlin; Miyashita et al. 2000)の相同遺伝子（ホモログ）である N16 (Samata et al. 1999)の N 末端側の合成ポリペプチド n16N をキチンに吸着させると(n16N には β -キチン結合部位がある)、アラレ石結晶が析出する。キチン及びマグネシウムイオンの非存在下でアラレ石結晶析出させるタンパク質の報告例もあり、アコヤ貝の P10(Zhang et al. 2006)、N40(Yan et al. 2007)、および PFMG1(Liu et al. 2007)が知られている。しかし、以上の報告例におけるアラレ石結晶の形態は平板ではなく、多くは多結晶である。一方、24-hole microplate の底部に置いた glass plate 上に N16 を吸着（固定）させた WISM membrane を設置し、マグネシウムイオン存在下で方解石結晶析出母液を microplate に添加すると、数日後に WISM membrane 上に真珠層のアラレ石平板状結晶に似た結晶が析出した報告がある (Samata et al. 1999)。この実験において、WISM membrane 単独ではこの析出は観察されていない。即ち、N16 を glass plate 上に存在する WISM membrane に固定すると、N16 がマグネシウムイオン存在下でアラレ石平板状結晶析出を誘導したことになる。なお、この WISM membrane の組成は明らかではない。Samata とも報告しているように N16/Pearlin には遊離状態で、炭酸カルシウム結晶形成阻害作用がある。そのため、平板状結晶形成作用を観察するには、N16/Pearlin を固定する必要がある。従って、我々の実験ではアラレ石構造の平板状結晶作出の簡便法としてカイコのシルクフィブロイン溶液を調製し、microplate の底部にアコヤ貝真珠層特異的タンパク質 Pearlin を含むシルクフィブロインを塗布し、乾燥により Pearlin を固定する。この状態で、マグネシウムイオンを含む結晶形成母液をプレートの溝に添加し、Pearlin/シルクフィブロインの薄膜上に平板状アラレ石結晶を作出する方法を解説する。

1. パーリン(Pearlin)の抽出 (Miyashita et al. 2000)

EDTA 不溶性分画の調製

アコヤ貝貝殻の殻皮層と稜柱層を研磨機により削り取り、真珠層のみにする (図1)。



図1. 稜柱層を削り取ったアコヤ貝真珠層

または真珠の珠 (この場合は養殖業者から“屑真珠”を手に入れる) を割り、核を除いて真珠層のみにし、イオン交換水で洗浄する。この場合、イオン交換水を時折交換し、真珠層に付着した汚れがほぼなくなるまで洗浄を続け、その後、乾燥させる。これらの真珠層約 20 g を粉碎器 (Wonder Blender) で粉碎して粉状にし、粉末を 300 ml 容の三角フラスコに入れる。次に、0.01% アジ化ナトリウム (防腐剤、 NaN_3) を含む 0.3M EDTA (この試薬の調製方法は別途記載) 100 ml を入れ、フラスコを室温で3日間振とうする。振とう後、この懸濁液を、高速冷却遠心機にて、 $30,000 \times g$ 、20 分間、 4°C の条件下で遠心分離する。遠心分離後の上清 (EDTA 可溶性分画) を捨て、沈渣 (粗抽出 EDTA 不溶性分画) を得る。次に EDTA 不溶性分画を洗浄するために、適量の滅菌水を加え、フラスコに移し攪拌する。この懸濁液を適当な遠心チューブ (50 ml) に移し、小型低速冷却遠心機にて、 $1150 \times g$ 、5 分間、 4°C の条件下で遠心分離する。上清を捨てた後に、沈渣に含まれる脂溶性分を除くために 30 ml~40 ml のアセトンに沈渣を加え、フラスコに移し攪拌する。この懸濁液を上と同じ条件で遠心分離する。脂溶性分画の上清を捨てた後に、沈渣に再度適量の滅菌水を和え攪拌し、懸濁液を上と同様に遠心分離し、洗浄した沈渣を得る。これらの作業により EDTA 可溶性タンパク質及び脂溶性物質を十分取り除く。以下に上記の EDTA 不溶性分画の調製作業の流れをまとめた (図 2)。

ppt:沈殿 sup:上清

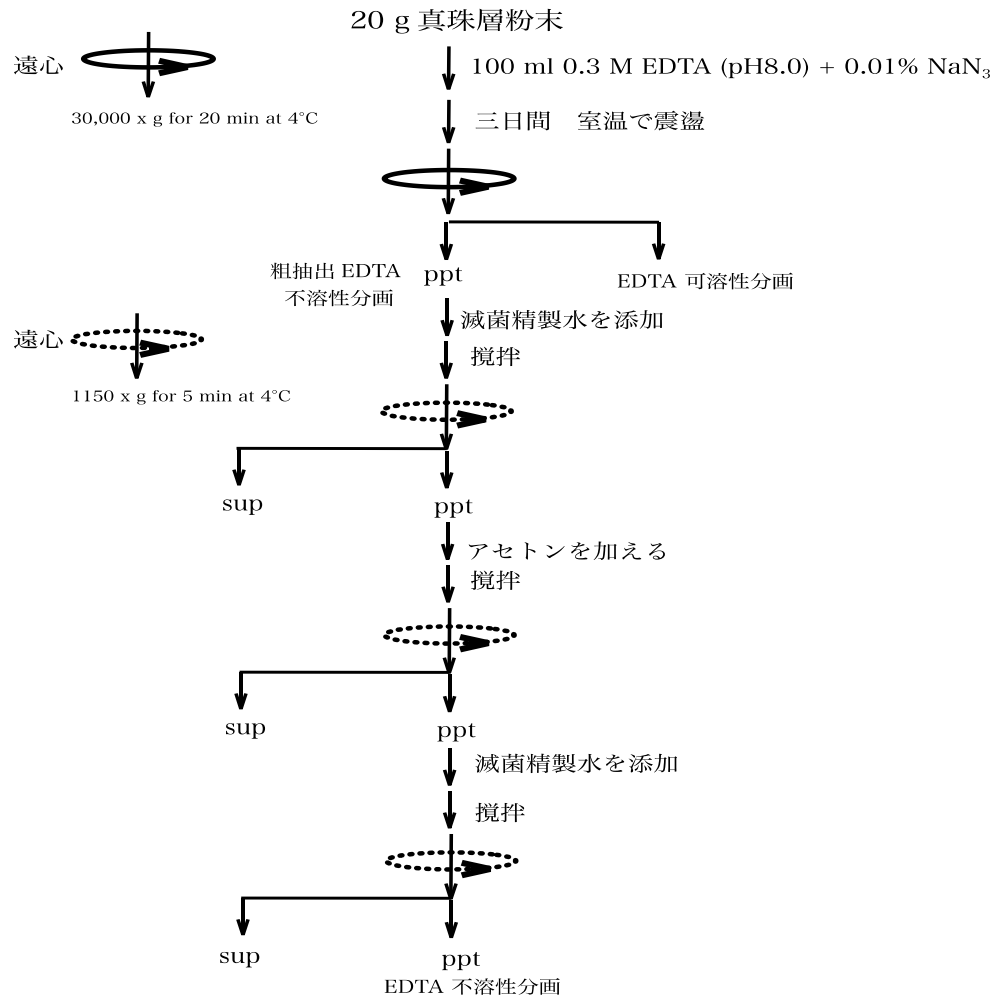


図 2. EDTA 不溶性分画の調製

EDTA不溶性分画からPearlinの抽出

このようにして得られたEDTA不溶性分画を100 ml の 0.3 M EDTA (pH8.0)-8 M urea (この試薬の調製方法は別途記載) に懸濁し、60°Cで激しく一晩(O/N: overnight)振とうする。振とう後、懸濁液を、30,000×gで、20分間、4°Cの条件下で遠心分離して上清を回収する。この上清に粗抽出のPearlinが高純度で存在する。次に、上清を透析膜(3500 cut)に移し(透析膜の調製方法は別途記載)、滅菌水(3 L)に対して、スターラーで水を攪拌しながら透析を4°Cで行う(塩濃度が高いため、透析後体積が数倍になる。その点を考慮して透析膜の体積は十分に余裕を持った状態で透析を開始する)。その間、約4~6時間の間隔(この時間より長くてもよい。しかし、数時間で平衡になる)で、滅菌水を3回交換する。透析後、タンパク質溶液を凍結乾燥する(凍結乾燥の具体的方法は別途記載)。凍結乾燥後、凍結乾燥したサンプルを30 mM Tris-HCl(pH8.0) 4-5 mlに溶解し、アジ化ナトリウム(NaN₃)を終濃度0.02% (重量体積パーセント)で入れ、4°Cで保存する。以下に上記に記載したEDTA不溶性分画からのPearlinの抽出作業

の流れをまとめた(図3)。タンパク質の濃度決定はBio-Rad のProtein assay dye reagentを使用 (WEB sites 参照)。

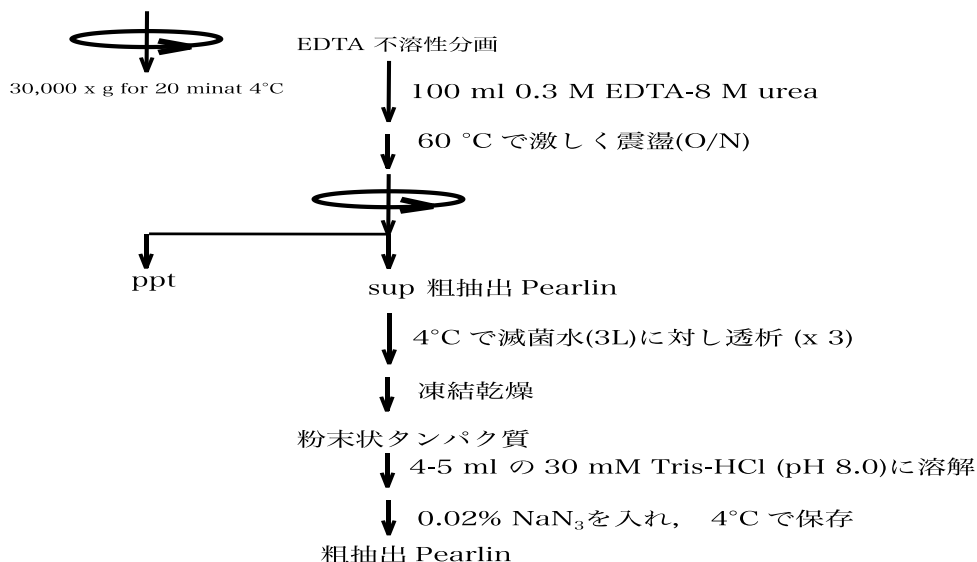


図3. EDTA不溶性分画からPearlinの抽出

以上のように抽出した Pearlins は SDS-PAGE で確認すると、純度は大変高い (図 4, 矢印)。

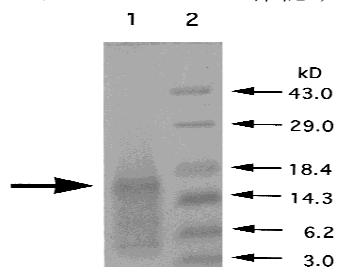


図 4. 抽出したパーリンの電気泳動

レーン 1 : 真珠層から抽出した Pearlins (矢印) レーン 2 : Size marker (Miyashita et al. 2000)

この Pearlins をシルクフィブロイン溶液を用いて固定すれば、マグネシウムイオン存在下で平板状アラレ石結晶形成に使用できる。ただし、EDTA で抽出しているため、透析後も Pearlins に EDTA が残存する可能性がある (イオン交換カラムでこの残存 EDTA は除去できる)。この残存 EDTA がカルシウムイオンを結合させる。残存 EDTA を除き、高純度の Pearlins を得るため、次に記載されているようにイオン交換カラムで Pearlins を精製する。Pearlins は強いカルシウムイオンを結合能があり (Matsushiro et al. 2003)、精製 Pearlins を用いても、勿論、マグネシウムイオン存在下でシルクフィブロインに固定すれば平板状アラレ石結晶形成を誘導する。

2. Pearlin の精製[DEAE-Sephacel (GE ヘルスケア バイオサイエンス)]樹脂を用いたバッチワイズ法による精製

Pearlin の溶媒を 30mM Tris-HCl(pH8.0)から Buffer A[8M 尿素(Urea)+ 30mM Tris-HCl(pH8.0) + 5mM DTT] 緩衝液に透析により置換する[あるいは、凍結乾燥後、粉末状タンパク質を Buffer A に溶解する (前ページ)]。次に、スクリーキャップ付き 15 ml チューブ(Nunc あるいは Falcon)に同じ緩衝液で平衡化した DEAE-Sephacel 樹脂 2 ml を準備し、ここに 1 ml (約 2 mg) の Pearlin 溶液を入れ、37°Cで 1 時間ゆっくり混ぜて Pearlin を DEAE-Sephacel 樹脂に吸着させる。そして、小型低速冷却遠心機にて遠心分離 (2,260 x g for 3 min、4°Cの条件下で) し、上清と沈殿 (樹脂) に分け、上清を捨て、沈殿の樹脂を同じ緩衝液で 2 回洗浄する (緩衝液と沈殿を混合後、遠心分離する)。次に、Buffer A-0.3M NaCl 緩衝液 1 ml を入れ、10 分間ゆっくり混合する。混合後、この緩衝液で溶出される分画を上記と同様に遠心分離で上清として回収する。同様に、Buffer A-0.6 M NaCl 緩衝液 1 ml、Buffer A-0.8 M NaCl 緩衝液 1 ml、さらに、Buffer A-1.0 M NaCl 緩衝液 1 ml によって溶出される分画も遠心分離で上清として回収する。以下に上記に記載したバッチワイズ法による Pearlin の精製の流れをまとめた (図 5)。

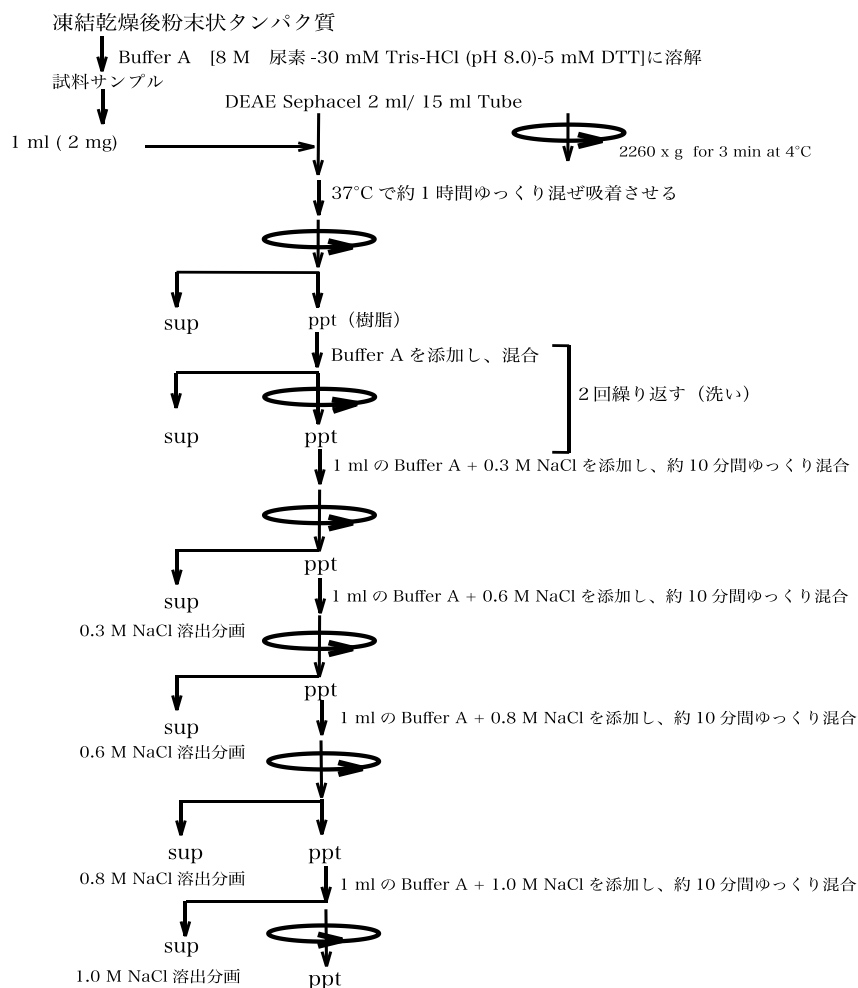


図 5. バッチワイズ法による Pearlin の精製

回収サンプルの溶媒置換と濃縮

これらの回収した上清分画（各約 1 ml）を、別々に VIVASPIN 6（MWCO 5,000-10,000: GEヘルスケア バイオサイエンス）で遠心濃縮する。遠心濃縮は高速冷却遠心機にて、4000 g /4°Cで行った（濃縮の程度は適時、遠心を止め、確認）。Urea と食塩を除くために、Urea の存在しない Buffer A を加えながら連続的に遠心・濃縮を行い溶媒を置換する。食塩と Urea の濃度が 1 mM 以下になるまで脱塩・濃縮する（約 300 μ l）。そして、脱塩・濃縮した Pearllin を SDS-PAGE で電気泳動を行い、精製 Pearllin を含むフラクションを確認する（図 6）。

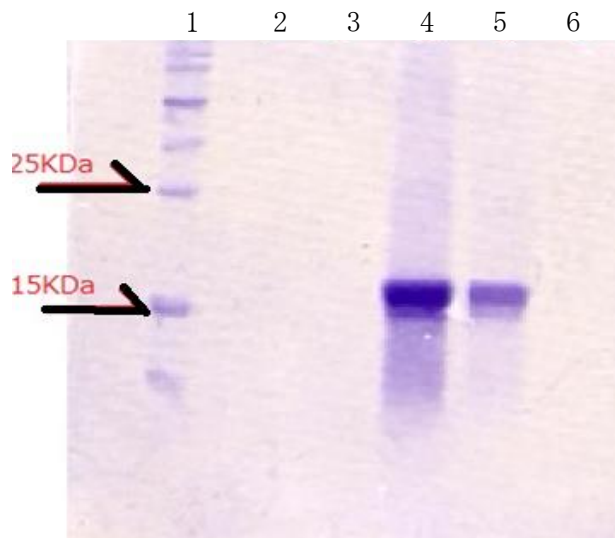


図 6. バッチワイズ法で得られた分画の Pearllin の電気泳動

レーン 1: Perfect protein Markrs

レーン 2: Buffer A で溶出した分画

レーン 3: Buffer A-0.3M NaCl 緩衝液で溶出した分画

レーン 4: Buffer A-0.6M NaCl 緩衝液で溶出した分画

レーン 5: Buffer A-0.8M NaCl 緩衝液で溶出した分画

レーン 6: Buffer A-1.0M NaCl 緩衝液で溶出した分画

それぞれ脱塩、濃縮した Pearllin 20 μ l を分析

なお、Pearlin はシステインを多く含むため、容易に分子間でジスルフィド結合を形成して多量体（オリゴマー）になる。精製時には還元剤 DTT（ジチオスレイトール）を含む緩衝液を使用しているので殆ど単量体（モノマー）の状態であるが、緩衝液から還元剤 DTT を除くと容易に多量体を形成する。上記のバッチワイズ法で得られた精製 Pearllin は還元剤存在 DTT 在下で精製しているため単量体であり、電気泳動時にも還元剤 β メルカプトエタノールがサンプルバッファーに存在しているため単量体として確認できる（上図の電気泳動）。多量体として取得するためには、Buffer A より 8M Urea と還元剤 DTT を除いた 30mM Tris-HCl(pH8.0) で濃縮作業を行うか上記の過程で得られた尿素と塩を除いた濃縮試料を 30mM Tris-HCl(pH8.0)に対して透析を行う。この多量体を確認するためには電気泳動時に還元剤（この場合はサンプルバッファーの β メルカプトエタノール）を除く必要がある。

*サンプルバッファー

試料処理液（試料調製用溶液）

WEB site

“SDS sample bufferの調整”に記載

*バッチ精製法

バッチ精製は、粗抽出タンパク質とイオン交換樹脂をチューブに入れ、一定時間攪拌してタンパク質を樹脂に吸着させた後、遠心で上清を捨て（これにより吸着しないタンパク質は除かれる）、樹脂から吸着しているタンパク質を一定濃度の塩 (NaCl) を含む溶液を用いて溶出させ、上清にタンパク質を回収する方法である。塩濃度を順次上げた緩衝液を加え、溶出させ、それぞれの塩濃度で溶出したタンパク質を回収する。このようにして、様々なタンパク質を分離できる。最後に、純度を電気泳動で確認し、精製度の高い目的タンパク質を含む分画を取得する。タンパク質によってはカラムを使用する方法より簡便にタンパク質を精製できる。なお、先に述べたように、Pearlin はシステインを多く含むため、容易に分子間でジスルフィド結合を形成して多量体（オリゴマー）になる。精製時に還元剤 DTT を含む緩衝液を使用すると、単量体（モノマー）の状態であるが、緩衝液から還元剤 DTT を除くと多量体となる。この多量体を確認するためには電気泳動時のサンプルバッファーから還元剤（この場合はβメルカプトエタノール）を除く必要がある。なお、シルクに付着した平板状結晶形成に対する多量体の効果は単量体と比較して直径の大きな結晶が観察され[図 7(b) vs. (a)]、シルクのみだとシルクに付着しない球状結晶である[図 7(c)]。図 7 における(a)と(b)の左上の結晶は浮いている球状結晶である。

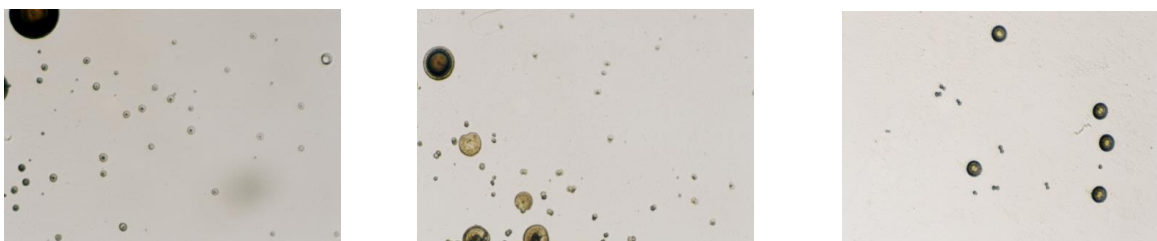


図 7. (a)シルク + 単量体

(b) シルク + 重合体
(x 100)

(c)シルク

3. Protein complex の抽出

Pearlinの抽出方法で述べたように0.3 M EDTA抽出で得られたEDTA不溶性分画に対し、EDTAを加えない8M Urea（この試薬の調製方法は別途記載）を抽出溶媒として用いる。抽出条件とその後の処理はPearlinと同様で、抽出後、抽出分画の上清を透析膜（3500 cut）に移し、滅菌水（3 L）に対して、スターラーで水を攪拌しながら透析を行う（Pearlin同様に塩濃度が高いため、透析後体積が数倍になる。その点を考慮して透析膜の体積は十分余裕を持った状態で透析を開始する）。その間、約4-6時間の間隔で、滅菌水を3回交換する。透析後、凍結乾燥機で凍結乾燥する。乾燥サンプルに約数mlの緩衝液30mM Tris-HCl(pH8.0)に加え溶解する。

次に、3 Lの30mM Tris-HCl (pH 8.0)に対して透析を行う。透析後、濃縮キット（VIVAPORE 5; Sartorius）を使って、約10倍（約500 μl）に濃縮する。保存する場合は、アジ化ナトリウム(NaN₃)

を終濃度0.02%で入れ、4°Cで保存する。以下に上記に記載したEDTA不溶性分画からのcomplexの抽出作業の流れをまとめた(図8)。

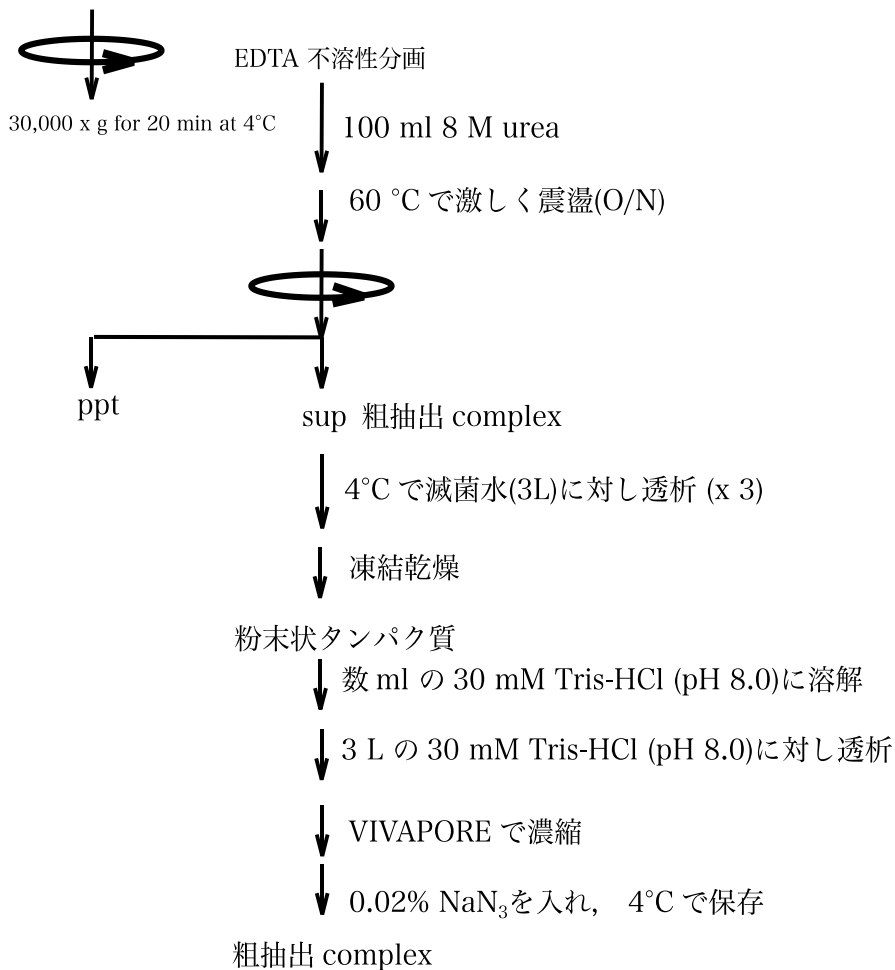


図8. Protein complexの抽出

4. Protein complex の精製 (Matsushiro et al. 2003)

濃縮試料を30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)で平衡化したDEAE Sephacel(GEヘルスケア バイオサイエンス)に吸着させる。溶出は食塩NaCl濃度を段階的に増加させるステップワイズ法で行う。NaCl濃度が0.2, 0.4, 0.6 Mと3段階で溶出させる。これは30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)にNaClを指摘した濃度で溶かしたものの準備し、順次、濃度を上げた溶液を用いてタンパク質を溶出させる。溶出パターンは分光高度計で280 nmの吸収値で追跡する。複合体complexは0.2M NaCl濃度で溶出する。ピークとなるフラクション (図9の太い矢印：縦軸はOD280の吸収値) とその前後を含めて回収し、VIVAPORE5 (Sartorius) で1 ml以下まで濃縮する。この分離過程は陰イオン交換体DEAE Sephacelによる分離であり、資料の “イオン交換クロマトグラフィーを使いこなそう” のWEB サイトを参照。また樹脂DEAE Sephacelについては “製品マニ

ュアル - クロマトグラフィーカラム - GEヘルスケア バイオサイエンス” のWEB サイトを参照。

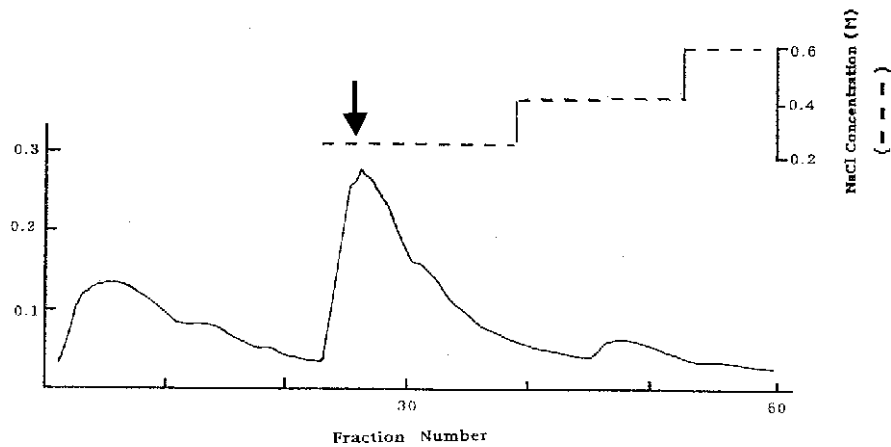


図9. DEAE Sephacel クロマトグラフィー
Matsushiro et al. 2003よりSpringerの許可を得て掲載

次に、濃縮試料を0.2M NaCl を含む30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)で平衡化したSephacryl S-300HR (GEヘルスケア バイオサイエンス)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行う。複合体は空隙容量 (void volume) の位置 (高分子量のためブルーデキストランと同位置：最初に出現するピーク) に溶出する (図10の太い矢印のピーク、細い矢印はマーカートンパク質の溶出位置：縦軸はOD280の吸収値)。

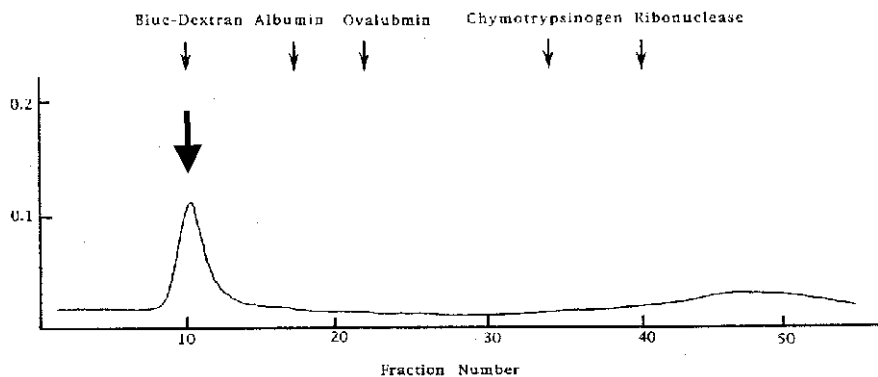


図10. Sephacryl S-300HRゲルろ過クロマトグラフィー
Matsushiro et al. 2003よりSpringerの許可を得て掲載

この分離過程は市販のゲルろ過カラムSephacryl S-300HRを使用したゲルろ過クロマトグラフィーである。ゲルろ過クロマトグラフィーについては、資料の “タンパク質を大きさで分ける(1)-2” のWEB サイトを参照。また、カラムについては、資料の “HiPrep Sephacryl - GEヘルスケア バイオサイエンス” のWEB サイトを参照。

溶出分画を回収し、30 mM Tris-HCl buffer に対して透析する (塩濃度が高いため、透析後体積が数倍になる。その点を考慮して透析膜の体積は十分余裕を持った状態で透析を開始する)。

透析後、VIVAPORE 5(Sartorius)で濃縮する。他の濃縮方法としては溶出分画を Vivaspin 6 (GEヘルスケア バイオサイエンス) を用いた遠心による方法がある。具体的には、得られたサンプルには食塩が含まれているので、これを除き且つ濃縮するため、食塩が存在しない 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)を適時加えながら連続的に遠心し、濃縮を行いながら溶媒を置換する。再度遠心濃縮する作業を繰り返すことで、順次に溶媒を置換し、食塩の濃度が 1 mM 以下になるまで行う。

* void volume : 樹脂が充填されているカラムには樹脂が占める体積以外に隙間（移動相やサンプルが通る間隙）があり、この間隙（隙間）の体積をvoidと呼ぶ（空隙容量とも言う）。この体積を測定するにはBlue Dextran溶液を流し、この溶液を添加した時点からBlue Dextranが溶出するまでの溶出液全体の体積を測定する（高分子量の物質はvoid volumeに溶出する）。

5. シルクフィブロイン溶液の調製 :

0.3 g のシルクフィブロインをハサミで細断し15 mlのスクリーキャップ付きチューブ(NuncあるいはFalcon)に入れる。ここに3 mlの9M臭化リチウム (LiBr)溶液を加え40°Cに保つ。適時混ぜて完全に溶解させる(約3時間)。溶解後、透析膜に移し、3リットルの滅菌したH₂Oに対して透析を3回行う。終了後、溶液を4°C、850 x gで10分間遠心分離し、上清を回収する（終濃度約2 % : 体積重量パーセント濃度）。この上清をシルクフィブロイン溶液として用い、4°Cに保存する。この溶液はできれば数日以内に使用する。しばらくすると、ゲル化して使用不能となる。

“シルクフィブロイン溶液による底部表面のコーティング” についての具体的方法は別途“試薬の調製と作業方法” に詳細を記載

6. 結晶形成母液[MS:Mother Solution Ca(HCO₃)₂]の調製 :

10gの炭酸カルシウム (CaCO₃) を200-300 mlのフラスコに入れ、そこに約100 mlの水を加える。この懸濁液 (CaCO₃は本来水には不溶) をスターラーのバーで攪拌する。ここにドライアイスからの炭酸ガス (CO₂) を十分通気する (図11)。約60分通気させた後、得られた炭酸ガスの過飽和溶液Ca(HCO₃)₂をメンブレンフィルター (Iwaki, 0.45 micron filter: シリンジフィルター 2053-025) を接続したシリンジでろ過する。さらに、この溶液に終濃度が50 mMになるように塩化マグネシウムを加え、アラレ石結晶形成母液とする。本来、CaCO₃は水には不溶であるが、Ca(HCO₃)₂の状態ではしばらく溶けている。

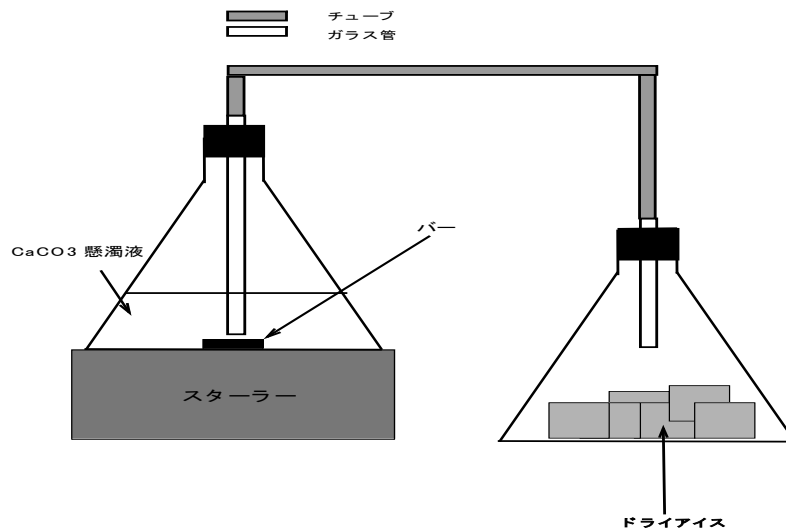


図11. 結晶形成母液 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の調製

7. 電気泳動：SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Laemmli法)

電気泳動はLaemmli法に準拠して行う。精製したタンパク質はSDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)で分析する。電気泳動装置は日本エイドミニゲルスラブ電気泳動装置を使用している (図12)。

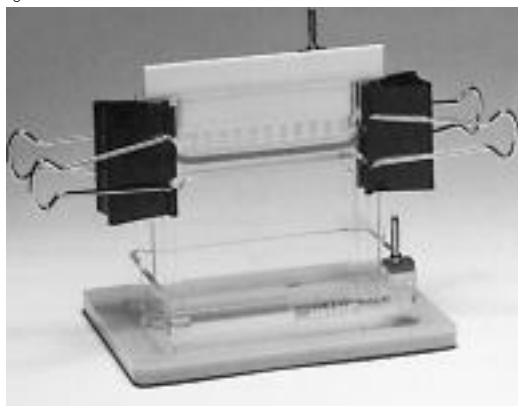


図12. 日本エイドミニゲルスラブ電気泳動装置

ゲルの濃度はPearlinは12.5か15%を、複合体は10%を用いる。なお、既成のゲルがアトー (ATTO) より市販されており [e-PAGELミニゲルサイズ既製ゲル]、これが日本エイドミニゲルスラブ電気泳動装置に適用でき、適当な濃度のゲルを選択し[ATTOの場合はE-T15L (15% 濃度) あるいはE-R10L (10% 濃度)]、電気泳動装置に装着して使用できる。” ATTO e-PAGELミニゲルサイズ既製ゲル” のWEB サイトを参照。但し、この既成の市販のゲル中にはSDSを含んでいないので、泳動の際、SDSを添加した泳動用緩衝液 (25mM Tris+192mM Glycine+0.1%SDS) を使用すればLaemmli法となる。また、Laemmli法に必要な既成の試薬は幾つかのメーカーか

ら市販されている。そこで、日本エイドミニゲルスラブ電気泳動装置に対し、上記の市販既成ゲルを装着後、市販の泳動用緩衝液[例えばNakaraiの製品番号30329-61 (Running Buffer Solution (10 x) for SDS-PAGE, Tris-Glycine)]を使用して電気泳動を行う方法もある。この際、試料は既成のサンプルバッファー[例えばNakaraiの製品番号 09499-14やATTO電気泳動試薬 AE-1430EzApply(イージーアプライ)]と試料を容量1 : 1で混ぜ、2分煮沸後、軽く遠心し、濃縮用ゲルの試料用の溝に添加する。なお、電気泳動の方法の詳細はNakaraiの“よく解る実験プロトコール 「電気泳動」”あるいは“ATTOのPAGE”が大変参考になる。さらに、原著の内容は“PAGE-SDS Laemmli Protocol”に記載してある。これらはWEBサイトを参照。また、“初めての電気泳動(一タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動編)”も参考になり、WEBサイトを参照。なお、電気泳動用のサンプルの調製は容量1.5 mlのマイクロチューブで行い、この場合微量冷却型遠心機(ATTO)を使用する。

8. アラレ石平板状結晶の形成

24 ウェルのマイクロプレート (IWAKI) を用意する。pearlin あるいは対照として BSA (ウシ血清アルブミン) を終濃度 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにシルクフィブロイン溶液と混ぜる。それぞれのウェルに Pearlin あるいは BSA を含むシルクフィブロイン溶液 10 μl (3.2 μg Pearlin) を、底部に添加して表面をコーティングする (別途、コーティング方法の詳細を記述)。さらに、対照としてシルクフィブロイン溶液のみ 10 μl を添加して底部表面をコーティングしたウェルも準備する。室温で 1 晩マイクロプレートの蓋を開け乾燥させる。結晶形成母液を各ウェルに 1.5 ml 加え、蓋をして 24°C で 2-3 日間放置する。次に、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の複合体を含む新しい結晶形成母液を各ウェルに 1.5 ml 加え、24°C で放置し、結晶の状態を観察する。

24 ウェルマイクロプレート;組織培養プレート(IWAKI) 3820-024
<https://www.tech-jam.com/items/KN3361917.phtml>

文献

Keene EC, Evans JS and Estroff LA Matrix Interactions in Biomineralization: Aragonite Nucleation by an Intrinsically Disordered Nacre Polypeptide, n16N, Associated with a β -Chitin Substrate. *Cryst. Growth Des.* 10:1383–1389 (2010)

Kitano Y. The behavior of various inorganic ions in the separation of calcium carbonate from a bicarbonate solution. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 35:1973–1980 (1962)

Liu HL, Liu SF, Ge YJ, Liu J, Wang XY, Xie LP, Zhang RQ and Wang Z. Identification and characterization of a biomineralization related gene PFMG1 highly expressed in the mantle of *Pinctada fucata*. *Biochemistry* 46:844-851(2007)

Matsushiro A, Miyashita T, Miyamoto H, Morimoto K, Tonomura B, Tanaka A and Sato K. Presence of protein complex is prerequisite for aragonite crystallization in the nacreous layer. *Mar. Biotechnol.* 5:37–44 (2003)

Miyashita T, Takagi Y, Okushima M, Nakano S, Miyamoto H, Nishikawa E and Matsushiro A. Complementary DNA cloning and characterization of pearlín, a new class of matrix protein in the nacreous layer of oyster pearls. *Mar. Biotechnol.* 2:120–129 (2000)

Oomori T and Kitano Y. in: *The Mechanism and Phy-logeny of Mineralization in Biological Systems* (Suga S and Nakahara H. Eds.), pp. 501-505, Springer-Verlag, Tokyo. (1991)

Samata T, Hayashi N, Kono M, Hasegawa K, Horita C and Akera S A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Lett.* 462:225–229 (1999)

Yan ZG, Jing G, Gong NP, Li CZ, Zhou YJ, Xie LP and Zhang RQ. N40, a novel nonacidic matrix protein from pearl oyster nacre, facilitates nucleation of aragonite in vitro. *Biomacromolecules* 8:3597–3601 (2007)

Zhang C, Li S, Ma Z, Xie L and Zhang R. A novel matrix protein p10 from the nacre of pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its effects on both CaCO_3 crystal formation and mineralogenic cells. *Mar. Biotechnol.* 8:624-633 (2006)