

真珠層の形成機構

はじめに

生物の多くはカルシウムのリン酸あるいは炭酸塩に代表される無機質を材料とし、少量の有機質を含んだ複合材料で鉱物（硬組織）を合成する。合成反応は常温、常圧下、ほぼ中性の条件下で行われ、高温下で高い活性化エネルギーを用いて行われる工業的材料合成とは大きく異なる。これら硬組織は少量のタンパク質を含むことで様々な形態と物理的特性を持つ。例えば、骨や貝殻などは硬く曲げに対して強く、ウニのトゲは方解石の結晶中に有機質が混入しているため折れにくい。この形成機構は遺伝的にプログラミングされており、タンパク質により制御され、生物の持つナノテクノロジーといえる。このように生物が無機・有機からなる硬い組織を合成することをバイオミネラリゼーション(Biomineralization)という。

貝殻は炭酸カルシウムの結晶と有機質タンパク質より構成される。炭酸カルシウムの結晶構造には多形があり、三方晶系の方解石(Calcite)、斜方晶系のアラレ石(Aragonite)および六方晶系のバテライト(Vaterite)があり、貝殻の場合は、方解石とアラレ石である。炭酸カルシウムの柱状の方解石結晶から形成された構造は稜柱構造といい、このような構造を持つ貝殻の層を稜柱層という。また、葉状の結晶から形成されたものは葉状層で、マガキの貝殻の場合は外側の石灰化していない殻皮層の下に稜柱層と葉状層があり、3層が重なった構造である。アラレ石と方解石との結晶構造の顕著な相違はCO₃グループのCa原子に対する位置であり、両者においては30度の差があり、アラレ石は方解石よりすき間が少ない構造となる。したがって、アラレ石は方解石より比重が大きく硬度も高いが、熱力学的には不安定で自然の条件下ではゆっくりと安定な方解石に変わる。

真珠貝貝殻は外側の殻皮層の下に稜柱層があり、内側は真珠層から構成される。真珠層は有機質でコーティングされた炭酸カルシウムの平板状アラレ石結晶が積層した構造を持つ。また、真珠は真珠層の形成を司る遺伝子群を持つ真珠貝と称される貝類により合成され、貝殻とは独立した硬組織である。貝殻真珠層との違いはその真珠層が核を中心に同心円状に積層して球状になっていることである。真珠は生物が持つナノテクノロジーにより生み出された唯一の宝石で、他の宝石と大きく異なる点は研磨の必要性がないことである。なお、貝殻形成を司る重要な器官・組織は外套膜であり、形成に関与する遺伝子群は特異的にこの組織で発現している。

分子生物学の誕生と遺伝子組み換え技術の発展により、様々な生物現象が遺伝子のレベルで理解できるようになった。真珠層の形成を制御する多くのタンパク質およびそれらの遺伝子についての単離・同定・機能解析も行われ、未解明の部分も未だ多いが分子レベルでの理解が徐々に進んでいる。本総説は真珠層の形成機構と形成に関与するタンパク質とそれらの機能及び遺伝子について焦点を当て研究の現状を述べる。

1. 真珠貝貝殻と外套膜の構造

代表的な真珠貝である二枚貝アコヤ貝 (*Pinctada fucata*) の貝殻と外套膜の構造を図1に示す。

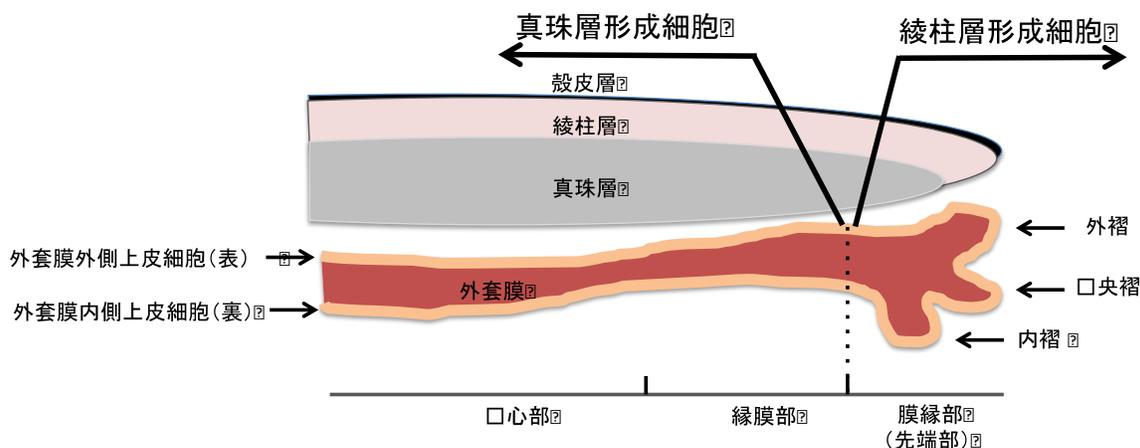


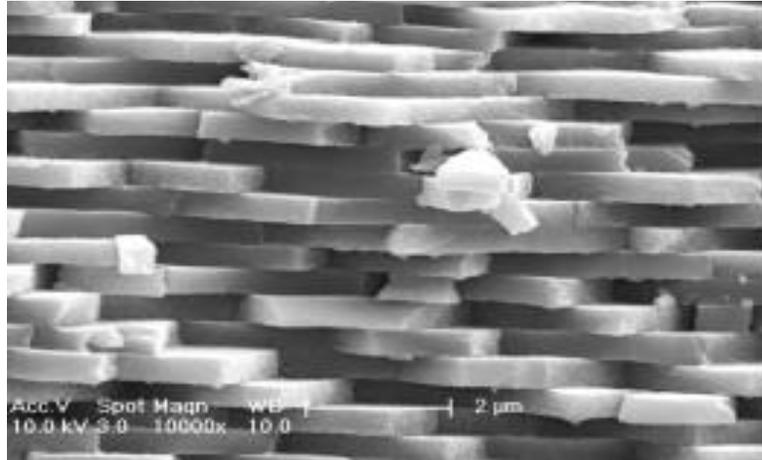
図1. 貝殻と外套膜

殻皮層は硬タンパク質からなり、中層の稜柱層および内層の真珠層は約95%以上の炭酸カルシウムと約数パーセントのタンパク質を主とする有機質で構成される。稜柱層は多角形の柱状の方解石結晶が集合して束ねられた構造であるのに対し、真珠層は、有機質で覆われた薄い多角形の平板状のアラレ石結晶が積層した構造をとる。このような構造は、外套膜の表面において、上皮細胞から分泌されたタンパク質の媒介のもとに、血流により運ばれたカルシウムイオンと炭酸イオンが合体し、炭酸カルシウム結晶として沈着した結果、形成されたものである。外套膜は貝殻形成を司る重要な器官・組織であり、真珠貝貝殻形成に関与する部分は外套膜外側上皮細胞でこの部分は外套膜縁部（先端部）と縁膜部から構成される。外套膜縁部は黒茶色をした部分で外褶・中央褶・内褶からなり、その上皮細胞は稜柱層形成に関与し、外套縁膜部は外套膜の外側上皮細胞の白色をした部分でその上皮細胞は真珠層形成に関与する。真珠層を合成する代表的な貝としては、巻き貝のアワビ、二枚貝では海洋に生息するアコヤ貝、シロチョウ貝、クロチョウ貝、淡水に生息するイケチョウ貝、ドブ貝等がある。

2. 真珠層の構造

真珠層の構成単位は数ナノメートル程のタンパク質の層でコーティングされた約0.5ミクロンの厚みを持つ平板状のアラレ石結晶が積層した無機-有機の複合体である。従って、無機結晶層部分とタンパク質の層が交互に存在し、1mmの真珠層

の場合、コーティングされた平板状アラレ石結晶の枚数は2000枚にもなり、この有機質を含んだ積層構造（図2）が真珠層に強靱な物理的性質を与えている。



真珠層の平板状アラレ石結晶の積層構造

図2. Gong et al. 2008よりELSEVIERの許可を得て掲載

3. 真珠層の色

無機-有機の積層構造からなる複合体である真珠層の表面に光が当たると、交互に積み重なった結晶層と有機質シートの平行層からの反射光の干渉や結晶層を構成する結晶粒による拡散反射光の干渉などが生じ、真珠層に固有の光沢色を与えると共にピンク色の干渉色が生じる。さらに、有機質シートに存在するタンパク質には微量の色素が含まれ、アコヤ貝およびシロチョウ貝の黄色、クロチョウ貝の褐色や緑色などはポルフィリン系色素に由来すると考えられている。実際に真珠層中のタンパク質を分光学的に解析すると、アコヤ貝真珠では620nmに、クロチョウ貝真珠では700nmにポルフィリンの存在を示す吸収のピークが観察される (Miyoshi et al. 1987)。ポルフィリン (porphyrin) はピロールが4つ組み合わさって出来た環状構造を持ち、ヘモグロビンやミオグロビンおよびヘムの基本骨格で、生物の恒常性に必須の物質である。

4. 真珠層多層構造の形成機構

二枚貝における真珠層の形成機構については透過型電子顕微鏡による観察等から、次のように説明されていた (Bevelander and Nakahara 1969; Wada 1972; Wada 1980; 和田 1993)。β-シート構造をとるシルクフィブロイン様繊維性タンパク質から構成される層があり、この層が結晶形成が生じる空間である区画 (コンパートメント) を形成する。この区画の中には外套膜から分泌された有機質及び結晶核形成と結晶成長に必要なカルシウムイオンと炭酸イオンを含む分泌液が入っている。この区画化されたコンパートメント内で結晶核形成・結晶成長・結晶成長停止とい

う一連の過程が進行する。石灰化の条件として濃縮されたこれらの有機質・イオンが封じ込まれた空間を必要とするが、この区画域がそれに相当する。しかし、それらイオンの濃度は自然に結晶核が生じるほど高くない。そのため結晶核は有機物質が媒介となって形成される。コンパートメントを形成する膜の表面上には酸性タンパク質を含む薄い顆粒状の有機質膜(エンベロップ)が存在し、酸性タンパク質が結晶核形成の媒体であり、結晶核形成後に結晶成長が起こる。結晶は薄い顆粒状の有機質膜(エンベロップ)に覆われながら次のコンパートメントに到達するまで縦に成長しつつ隣の結晶と接合するまで横に成長し、板状の結晶ができる。したがって、板状結晶間の接合部分は薄い有機質膜すなわちエンベロップで仕切られることになる。さらに、接合するころには次のコンパートメントが形成されており、結晶層はコンパートメントの膜状のシートに点在すると考えられる孔(Mineral bridge)から新しく形成されたコンパートメント内に出芽する。そして出芽したばかりの結晶は球形をしており、エンベロップに覆われた状態で成長する。このような過程をくり返すことにより、真珠層の層状構造が図3の様に形成されると考えられる。したがって、結晶層と結晶層の間、即ち結晶層間基質であるシルクフィブロイン様繊維性タンパク質は上下が顆粒状の酸性タンパク質を含むエンベロップで挟まれた3層構造となる。

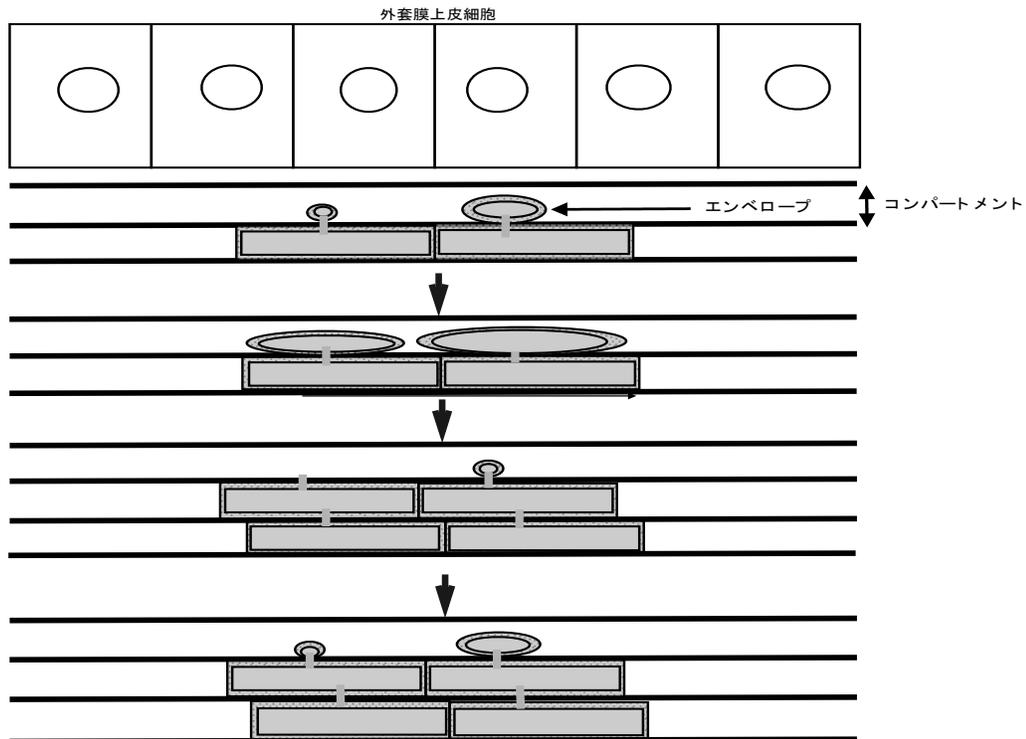


図3. 真珠層の形成機構

このモデルが提唱された当時は真珠貝真珠層において、 β -シート構造をとるシルクフィブロイン様繊維性タンパク質の存在が確認されていた (Weiner and Traub 1980)。一方、 β -キチンの存在は巻き貝の真珠層では確認されていたが、二枚貝真珠層ではその存在が明確ではなかった (Nakahara 1983)。その後、二枚貝真珠層で β -キチンが同定され (Weiner S and Traub 1984; Levi 1998)、さらに、Levi らによる cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM: クライオ電子顕微鏡法) を用いた二枚貝 *Atrina serrata* の真珠層の詳細な構造が解析された (図 4)。

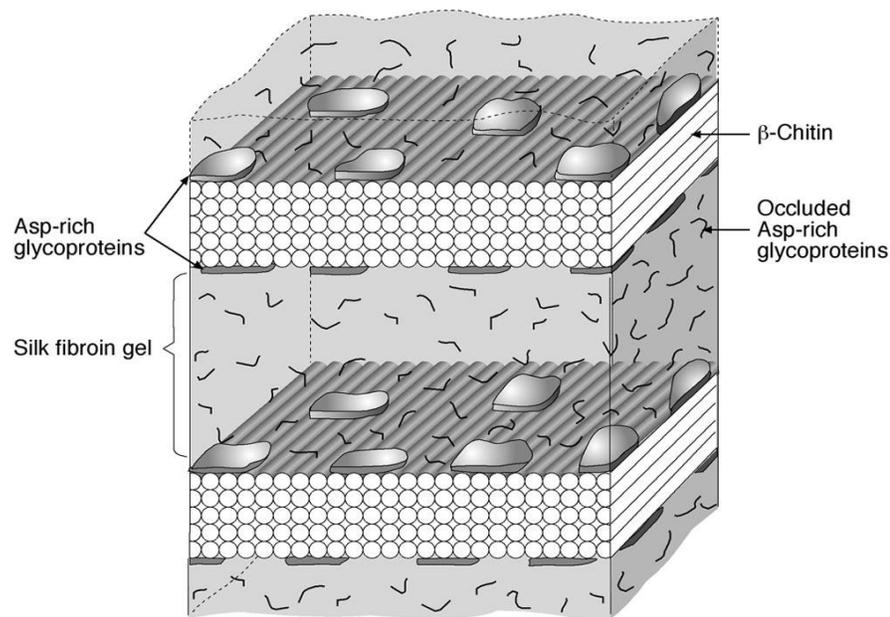


図4. Levi-Kalisman らによるモデル

Levi et al. 2001よりELSEVIERの許可を得て掲載

それによると、コンパートメントを形成する膜状シートの主要な構成成分は β -キチンであると報告している (Levi et al. 2001)。また、シルクフィブロイン様繊維性タンパク質のコンパートメント内での状態はゲル状であること。さらに、このシルクフィブロイン様タンパク質には β -キチンを主成分とする膜状のシート上に存在するアスパラギン酸を多く含む可溶性の酸性糖タンパク質からなる有機質が結合しており、ゲル状態のシルクフィブロイン様タンパク質はこれら酸性糖タンパク質に親水性の環境を提供し (Nudelman et al. 2008; Addadi et al. 2006)、可溶性の酸性糖タンパク質がアラレ石結晶核形成を誘導する (Addadi et al. 2006; Nudelman et al. 2006)。また、シルクフィブロイン様タンパク質と可溶性の酸性糖タンパク質の結合については、N16 が両者のリンカーとして働き、アラレ石結晶形成に関与すると考えられる (Mann 2001)。アラレ石結晶核形成を誘導するタンパク質は同定されていない。

平板状のアラレ石結晶形成過程において、Addadi らにより “**前駆物質**”として不定形のアモルファス炭酸カルシウム (ACC : Amorphous Calcium Carbonate) が存在し、形質転換で ACC がアラレ石に変化する”というモデルが提唱された (Addadi et al. 2006)。その後、走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡による詳細な観察及び X 線構造解析の結果はこの仮説を裏付けることになり、それによると “ACC の微粒子が形成され、それらが自己集合して平板状の形を形成し、次にアラレ石結晶の核形成が複数の場所で起こり、一定方向に結晶が成長して成熟アラレ石平板状結晶が形成される”と報告している (Zhang and Xu 2013)。なお、ACC をアラレ石に形質転換 (相転移) 誘導するタンパク質として 38 kDa の ACCBP (Amorphous Calcium Carbonate-Binding Protein) が報告されている (Ma et al. 2007; Su et al. 2016)。さらに、コンパートメントの膜状のシートに点在する孔 (Mineral bridge) の実在については、Schaffer らによる原子間力顕微鏡の観察からその存在が確認され (Schaffer et al. 1997)、また、Checa らによる高分解能透過型電子顕微鏡 (High-resolution TEM) や高分解能電界放出形走査電子顕微鏡 (FESM) による詳細な観察結果は巻き貝、二枚貝とオウム貝の真珠層に Mineral bridge が存在することを証明している (Checa et al. 2011)。

5. 真珠層形成を制御する様々なタンパク質

真珠層を持つ二枚貝綱の貝殻真珠層および真珠真珠層、さらに副足綱の巻き貝の真珠層に存在するタンパク質についてはこれまでに様々なものが単離・同定されてきた。その内幾つかのものは遺伝子もクローニングされている。タンパク質についての分析は EDTA あるいは酸可溶性のタンパク質は、抽出が容易であることから早くから単離・精製され、分析された。最初に遺伝子が単離されたものとして、アコヤ貝 (*Pinctada fucata*) の EDTA 可溶性分画から二酸化炭素と水を炭酸水素イオンと水素イオンに変換する酵素として知られる炭酸脱水酵素の活性を持つナクレイン (Nacrein) (Miyamoto et al. 1996) があり、続いてシロチョウ貝 (*Pinctada maxima*) からその **相同タンパク質** N66 (Kono et al. 2000) の遺伝子が単離された。その後様々なタンパク質が同定され、*Pinna nobilis* の真珠層から Mucoperlin (Marin et al. 2000) が、*Haliotis laevigata* の真珠層からは Perlucin や Perlustrin (Weiss et al. 2000; Blank et al. 2003) がある。また、*Pinctada fucata* の酸不溶性分画あるいは EDTA 不溶性分画からは N16 (Samata et al. 1999) とその相同遺伝子 (ホモログ) であるパーリン (Pearlin) (Miyashita et al. 2000) が、さらには、MSI60 (Sudo et al. 1997) が同定された。また、*Haliotis rufescens* の真珠層からは Lustrin A (Shen et al. 1997) が同定されている。

Nacrein と N66 はそれぞれ糸鰓亜綱に属する真珠貝であるアコヤ貝 (*Pinctada fucata*) とシロチョウ貝 (*Pinctada maxima*) における相同な炭酸脱水酵素で、同様な相同遺伝子は巻き貝である夜光貝 (*Turbo marmoratus*) から外套膜 cDNA ライブラリーより単離されている (Miyamoto et al. 2003)。Nacrein は大きさは 60 kDa であり、無脊椎動物の硬組織形成に関与するタンパク質の遺伝子としては最初に単離されたものである。陵柱層に存在する炭酸脱水酵素も Nacrein であることから (Miyashita et al.

2002)、Nacreinは結晶多形の制御とは無関係であり、重要な機能の一つは炭酸脱水酵素として炭酸カルシウム結晶形成に必要な重炭酸イオンを供給していると推測される。Nacreinは外套膜だけでなく、貝柱、肝臓及び足でも強く発現しており、これらの組織では酸・塩基平衡やイオン輸送等に関与することが考えられる(Miyashita et al. 2012)。Nacreinは反応速度と活性部位のアミノ酸配列からタイプII炭酸脱水酵素に属している。炭酸脱水酵素としての大きさはアミノ酸配列から約48kDaで、全体としては一般のタイプII酵素の触媒領域の後に約16 kDaのGly-Xaa-Asn(G-X-N)を基本とした繰り返しが挿入された構造となっている(図5)。このような構造は一般的な炭酸脱水酵素にはない。

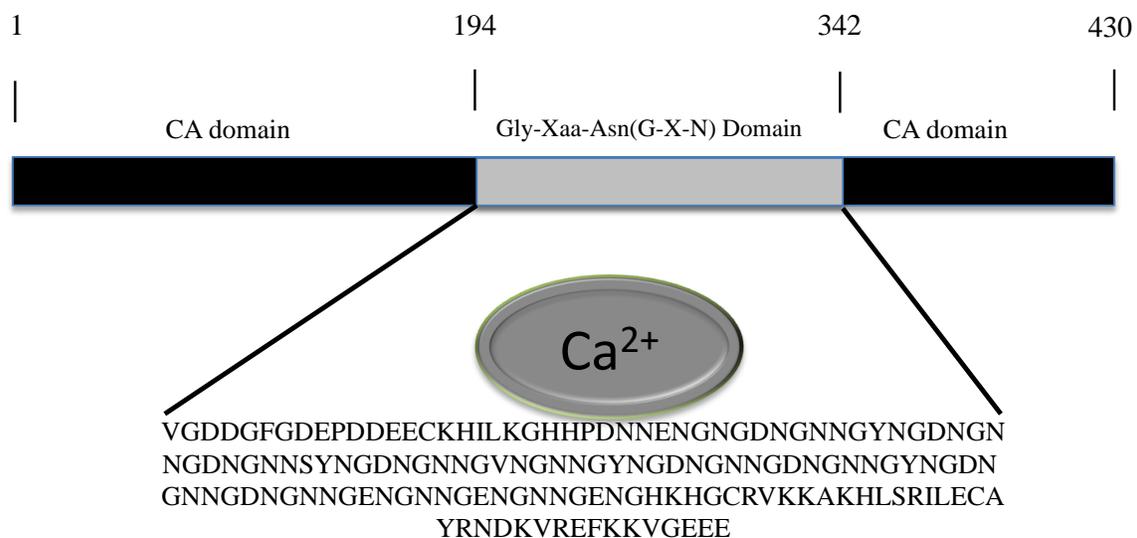


図5. 炭酸脱水酵素ナクレインの構造
数字は分泌シグナルを除くアミノ酸の位置をナンバーで示している。
CA: Carbonic Anhydrase

この挿入領域には炭酸カルシウム結晶の成長を抑制的に制御する機能がある(Miyamoto et al. 2005)。また、挿入領域にはカルシウム結合能があり、ゲノム構造解析からこの挿入繰り返し配列は第5エキソンに単独にコードされる(Takagi and Miyasita 2011)。挿入部のカルシウム結合能を持つ繰り返し領域が単独のエキソンとしてコードされ、機能部位であることは大変興味深い。この挿入部はエキソンシャフリングにより他の遺伝子のカルシウム結合能を持つエキソンがコピーされ導入されたものと考えられる。遺伝子のゲノム構造のデータの蓄積により、全く関係のない遺伝子間で構造を比較した場合、共通のエキソンを共有することは決して例外的ではない。エキソンシャフリングと呼ばれる機構によりエキソンが遺伝子から遺伝子に移動しているのである(Patthy 1999; Patthy 2003)。

シロチョウ貝のN66や夜光貝(*Turbo marmoratus*)の炭酸脱水酵素についてもNacrein同様繰り返し領域が存在しているが、これらの挿入部をNacreinの挿入部と比較すると、三者は構造的には似ているもののN66及び夜光貝炭酸脱水酵素は非常に長いNGリピートを持つ点がNacreinと異なる。シロチョウ貝の真珠層はアコヤ貝よりも厚く、真珠も大きい。また、夜光貝は真珠層を持つ巻き貝の中では最大で、真珠層が極めて緻密である。このようなことを考え合わせると、殻体中の炭酸脱水酵素のタンパク質の繰り返し領域の大きさと真珠層の特徴とがどのような関連にあるのか興味のあるところである。

N16とPearlinはアコヤ貝から単離されたもので、同一のファミリーに属し、シロチョウ貝から発見されたN14もこのファミリーに属している (Kono et al. 2000)。また、このファミリーは真珠層特異的タンパク質である。N16/Pearlinのアミノ酸構成はアスパラギン酸等の酸性アミノ酸の割合が比較的高い点は可溶性タンパク質と類似しているが、チロシンやシステインに富むという特徴がある(Miyashita et al. 2000)。また、短いNGリピートを持つ。Pearlinには強いカルシウム結合能があり (Matsushiro et al. 2003)、PAS染色およびアルシアンブルー染色でも染色されることからPearlinは硫酸基が結合した多糖を有する糖タンパク質である(Miyashita et al. 2000)。また、47番目のアミノ酸であるスレオニンが唯一のリン酸化されたアミノ酸であり、Pearlinの単独・遊離状態におけるアラレ石結晶特異的炭酸カルシウムの結晶形成阻害作用はこのスレオニンのリン酸基を介して働く (unpublished)。

一方、Samata らによる N16 を用いてアラレ石平板状結晶析出させた報告がある。これによると、24-hole microplate の底部に設置した glass plate 上に、N16 を吸着 (固定) させた WISM membrane を置き、マグネシウムイオン存在下で方解石結晶析出母液を添加すると、数日後に WISM membrane 上に真珠層に存在するものと形態が似たアラレ石平板状結晶が析出している (Samata et al. 1999)。対照として、N16 が存在しない WISM membrane 上では平板状結晶が析出しない。このことは、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。WISM membrane の組成は明らかではないが、この実験は真珠層における平板状結晶析出要因が N16/Pearlin であることを示唆している。なお、Samata らは N16 は遊離状態では炭酸カルシウム結晶形成阻害作用があると報告している (Samata et al. 1999)。また、巻き貝の一種である *Haliotis laevigata* の真珠層 EDTA 不溶性分画を用いてセルロースとキトサンの基板上に平板状アラレ石結晶形成を誘導した実験が報告されたが (Heinemann et al. 2006; Gries et al. 2012)、タンパク質については未同定である。

アコヤ貝真珠層酸不溶性分画を SDS-DTT で処理し、その可溶性成分から Pif80 と Pif97 が同定された (Suzuki et al. 2009)。この報告にある Pif 遺伝子は真珠層におけるアラレ石平板状結晶形成において重要な役割を果たす。遺伝子も単離され、これら二つは一つの遺伝子 (Pif177) にコードされており、二つのタンパク質は Pif177 遺伝子の mRNA が翻訳され、分泌後に kex2 様タンパク質分解酵素により分断されて生じる (図6)。Pif80 はアラレ石結晶との、また Pif97 は β -キチンとの結合能を有して

いる。さらに、Pif80とPif97はN16/Pearlinを含む他のタンパク質と複合体（Pif complex）を形成し、 β -キチン上に平板上アラレ石結晶形成を誘導し、垂直方向に結晶を成長させる（Suzuki et al. 2009）。

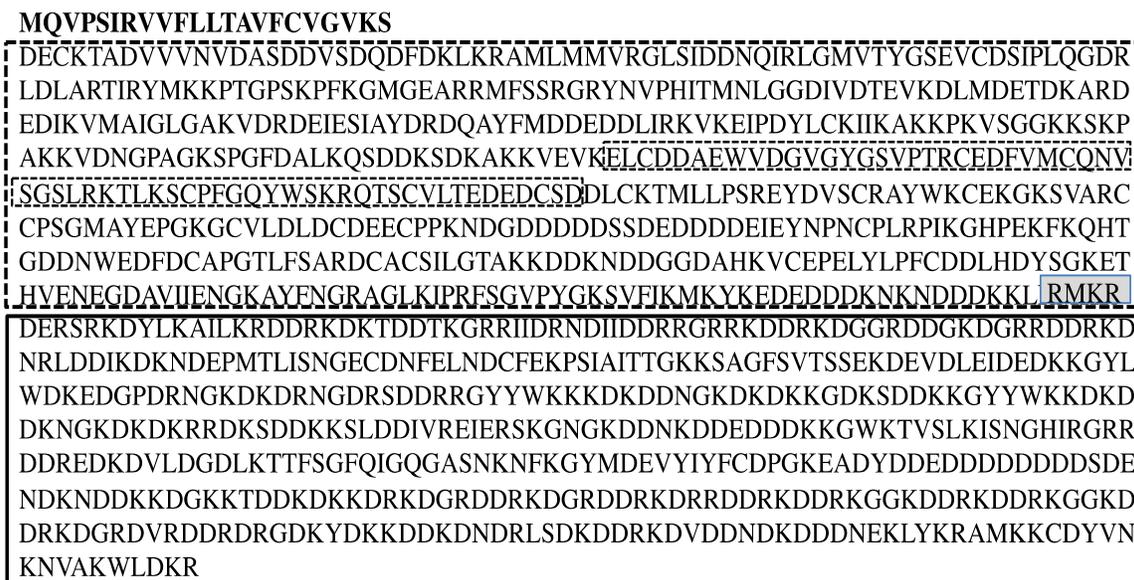


図6. Pif177のアミノ酸配列

太い字体の部分は分泌シグナルを示す。破線の囲いの部分のアミノ酸配列がPif97に、実線の囲いの部分のアミノ酸配列がPif80に相当する。Pif97の細い破線の囲いの部分はキチン結合ドメイン。背景が灰色のアミノ酸配列RMKRはkex2様タンパク質分解酵素切断部位。

Mucoperlinは*Pinna nobilis*の真珠層から単離されたムチン様タンパク質で、66.7 kDaの大きさを持ち、真珠層の板状アラレ石結晶の周囲に局在している。カルシウム結合能があり、炭酸カルシウムの結晶成長を停止させる機能がある。また、大腸菌で発現させたものはこれらの機能が発揮できないため、カルシウム結合能と結晶成長阻害機能はMucoperlinに結合している多糖に依存していると推測している（Marin et al. 2000）。PerlucinおよびPerlustrinは巻き貝に属する*Haliotis laevigata*の真珠層酢酸可溶性分画より単離されたそれぞれ17 kDaと13 kDaのタンパク質であり、前者はc-typeレクチンに属し、結晶形成に促進的に働く。後者のN末端側は次ぎに述べるLustrin Aと部分的に相同性があり、この部分はホ乳類のインシュリン様成長因子結合性タンパク質とも相同性のある領域である（Weiss et al. 2000）。

巻き貝の一種である*Haliotis rufescens*の真珠層から尿素とSDSを用いて抽出されたLustrin Aは116 kDaの大きさを持ち、多様なドメインから構成される。一つは12個のシステインを含む約79-89個のアミノ酸からなるドメインが10(C1-C10)回繰り返している。システインドメインに挟まれてプロリンに富むドメインが存在し、最

後の二つのシステインドメイン間にはグリシンとセリンに富むGSドメインが存在する。このGSドメインは骨のdentinやavian eggshellタンパク質と相同性がある。C-末端に存在する45個のアミノ酸の配列はヒトのエラスターゼインヒビター等のプロテアーゼインヒビターと高い相同性を持つ (Shen et al. 1997)。アコヤ貝不可溶性分画に存在するMSI60はグリシンとアラニンに富みコンパートメント内に存在するゲル状のシルクフィブロイン様繊維性蛋白質で、フレイムワークプロテインと呼ばれる (Sudo et al. 1997)。

6. 炭酸カルシウム結晶の多形の制御因子

貝殻炭酸カルシウムの多形には、方解石とアラレ石がある。**In vitro**の実験系で、これらを作成することは容易であり、方解石結晶析出母液 $[\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2]$ にマグネシウムイオンを添加すれば容易にアラレ石結晶が析出する (Kitano 1962; Oomori and Kitano 1991; Samata et al. 1999)。一方、貝殻形成においてはこれらの多形形成は有機質が媒介している。実際、これらの形成を制御する因子として幾つかの報告がある。海水中ではマグネシウムイオンが豊富であるからアラレ石結晶析出は容易であると考えられるが、真珠層有機質中にはマグネシウムイオン非存在下でアラレ石結晶形成を誘導するタンパク質の存在は幾つもの実験から示唆されてきた。実際、貝殻における炭酸カルシウム結晶の多形を制御するタンパク質の存在は古くは渡部・Wilberの研究があり、アコヤ貝の真珠層および稜柱層をEDTAで脱灰後の不溶性有機質 (WISM) 中に多形を制御する因子があると報告している (Watabe and Wilbur, 1960)。その後、真珠層および稜柱層の可溶性タンパク質を用いたin vitro結晶形成系の実験から、可溶性タンパク質が結晶多形を規定するということがBelcherら (Belcher et al. 1996)とFalini ら (Falini et al. 1996) により報告された。すなわち、真珠層の可溶性タンパク質を用いた場合はマグネシウムイオン非存在下でアラレ石構造の、稜柱層の可溶性タンパク質を用いた場合は方解石構造の結晶が誘導されるという結果である。これら二つの報告において、Belcherらは結晶の多形が可溶性タンパク質により制御されるとしているのに対し、Falini らは可溶性タンパク質によるアラレ石結晶形成には β -キチンおよびその上に展開したシルクフィブロイン様繊維性タンパク質が必要であるとしており、違いが見られる。一方、これらの報告ではその有機分子を特定するまでには至らなかった。

In vitro結晶形成系を用いて機能解析を行った上記の三つの報告では前者と後者の二つとの間に基本的な違いが存在している。それは用いたタンパク質が不溶性と可溶性の違いである。これは矛盾しているようであるが、不溶性分画に存在しているタンパク質が可溶性分画にも溶出している可能性があることを考えると説明できる。EDTA不溶性あるいは酸不溶性タンパク質のうち可溶性様酸性タンパク質は可溶性分画に一部混入する可能性がある。参考となる報告にシロチョウ貝の真珠層粉末を超純水で抽出すると、グリシン・アラニンに富むシルクフィブロイン様のタンパク質が溶出されるという報告がある (Pereira-Mouriès et al. 2002)。これは本来不溶性であるシルクフィブロイン様のタンパク質の一部は、多糖の付加等の転写後修飾に

よりこの抽出条件では可溶性分画に溶出されたものと考えられる。その後、アラレ石結晶析出因子については、マグネシウムイオン非存在下でアラレ石結晶析出させるタンパク質であるアコヤ貝のP10 (Zhang et al. 2006)、N40 (Yan et al. 2007)、およびPFMG1 (Amos et al. 2010)、さらには、*Haliotis rufescens* のAP7 (Amos et al, 2009) が報告された。これらは単独でβ-キチンおよびその上に展開したシルクフブロイン様繊維性タンパク質の非存在下でアラレ石結晶を析出させる。また、Keene (John S. Evans)らによる報告では、β-キチンにPearlinのホモログであるN16のN末端側の合成ポリペプチドn16Nをβ-キチンに吸着させると(n16Nにはβ-キチン結合部位がある)、マグネシウムイオン非存在下でアラレ石結晶が析出するとしている(Keene et al. 2010)。なお、方解石結晶形成については、アコヤ貝稜柱層形成細胞より、アスペインの遺伝子が単離され(Tsukamoto et al. 2004)、この組み換え体がマグネシウムイオン存在下でも方解石結晶形成を誘導することが実証されている(Takeuchi et al. 2008)。

7. 結晶形成を制御する複合体タンパク質

細胞における様々な代謝経路において、タンパク質が単独で機能し働くことは少ない。電子伝達系、プロテアソーム系等の例を出すまでもなく、多くのタンパク質は関連する他のタンパク質と巨大な複合体を形成し機能している。貝殻形成も例外ではなくそのようなことが予想されるが、複合体の報告例は極めて少ない。真珠層形成において今まで幾つかの複合体が発見されてはいるが、それら複合体の構成因子が明確に同定されたものは未だ報告例がない。

アコヤ貝で報告された大きさ数百万kDaのタンパク質複合体には飽和Ca(HCO₃)₂溶液中でマグネシウムイオン存在下、多量のアラレ石結晶を析出させる活性がある(Matsushiro et al. 2003)。この複合体は少なくとも、20 kDa、16 kDaおよび10 kDaタンパク質から構成される。16 kDaタンパク質はPearlinで、20 kDaタンパク質はケラチン様タンパク質であるが、10 kDaタンパク質についての詳細は不明である。また、稜柱層にはこの複合体は存在しないことから、この複合体は真珠層形成において、結晶核形成後、アラレ石結晶を成長させる機能があるものと推測している。真珠層の酢酸可溶性分画に存在するP60複合体は少なくともN28、N35およびNacreinとその誘導體らがジスルファイド結合を介して形成されており、バイオミネラルの結晶の塊形成を刺激(誘導)すると予想される(Lao et al., 2007)。さらに、平板状アラレ石結晶析出に關与するPifタンパク質を含む複合体については上述した。

8. まとめ

硬組織を形成する生物の殆どは無脊椎動物や珪藻などの藻類である。これら無脊椎動物の硬組織については古くはタンパク質の分析を中心に生化学的な研究や固体物理学・結晶学的に多くの優れた研究があり、無脊椎動物・藻類における硬組織形成もタンパク質の支配下にあることが明確となった。一方、1970年代に登場した

遺伝子工学が発展し、その手法が取り入れられ、代表的な硬組織である脊椎動物の骨を中心にその形成に参与するタンパク質の遺伝子が単離されるようになった。少し遅れて無脊椎動物においても、1990年代に遺伝子工学を駆使してアコヤ貝の真珠層の主要なタンパク質ナクレインの遺伝子が単離された。この後、遺伝子レベルでの解析が進み、無脊椎動物・藻類における硬組織形成も脊椎動物の骨と同様、その形成機構が遺伝的な制御下にあることが示され、近年では単離した遺伝子について、RNA干渉法等を用いた逆遺伝学(Reverse Genetics)を用いて個体レベルでの機能解析も盛んに行なわれている。

無脊椎動物の硬組織形成機構において、最も研究が進んでいるのは真珠貝における真珠層である。アコヤ貝の真珠層におけるアラレ石の平板状結晶の積層構造は、結晶形成が生じる空間である区画（コンパートメント）の形成から始まる。コンパートメントを形成する膜状シートの主要な構成成分は β -キチンである。コンパートメント内にゲル状で存在するシルクフィブロイン様繊維性タンパク質はシート上のアスパラギン酸を多く含む可溶性の酸性糖タンパク質と結合し、これらの酸性糖タンパク質に親水性の環境を提供している。この区画化されたコンパートメント内では有機質を媒介として結晶核形成・結晶成長・結晶成長停止という一連の過程が進行する。結晶は薄い顆粒状の有機質膜(エンベロープ)に覆われながら次のコンパートメントに到達するまで縦に成長しつつ隣の結晶と接合するまで横に成長し、板状の結晶ができる。接合するころには次のコンパートメントが形成されており、結晶層はコンパートメントの膜状のシートに点在する孔(Mineral bridge)から新しく形成されたコンパートメント内に出芽し、エンベロープに覆われた状態で成長する。このような過程を繰り返すことにより、真珠層の積層状構造が形成される。さらにアラレ石結晶形成過程において、前駆物質として存在する不定形のアモルファス炭酸カルシウムがACCBPの媒介により形質転換でアラレ石に変化する。

真珠層形成に参与すると予想されるタンパク質について同定され、機能が解析され、実体が明らかになったものは主に可溶性分画に存在するタンパク質である。一方、不溶性分画に存在するタンパク質は遺伝子が単離できても、抽出・精製が大変困難且つ量的にも充分得られないため、タンパク質として実体が十分捉えられていない。そのため機能解析の進展が遅れている。また、可溶性・不溶性タンパク質に共通していえることは機能を発揮する上で重要である多糖の付加、硫酸化やリン酸化と言った翻訳後修飾に関する研究も今後の重要な課題である。

最後に、骨の形成を司る細胞は間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞と骨細胞であるが、この細胞分化に至るまでの過程は分子の言葉で概略を説明できるところまできている(Komori 2010;小守 2006)。一方、無脊椎動物貝類における貝殻硬組織形成の責任細胞である外套膜は、外胚葉系細胞である貝殻分泌細胞が上皮細胞に特化して形成されるのであるが、この発生・分化の過程の解析が骨細胞のそれと比較して分化因子等不明な点が多い。従って、貝殻硬組織形成に参与する細胞・組織レベルでの分化過程とそれに関与する因子の解明も今後の研究課題と言える。

文献

Addadi L, Joester D, Nudelman F, and Weiner S. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem-Eur. J.* 12: 981-987 (2006)

Amos FF and Evans JS. AP7, a partially disordered pseudo C-RING protein, is capable of forming stabilized aragonite in vitro. *Biochemistry* 48:1332-1339 (2009)

Amos FF, Destine E, Ponce CB and Evans JS. The N- and C-Terminal Regions of the Pearl-Associated EF Hand Protein, PFMG1, Promote the Formation of the Aragonite Polymorph in Vitro. *Cryst. Growth Des.* 10: 4211-4216 (2010)

Belcher AM, Wu XH, Christensen RJ, Hansma PK, Stucky GD and Morse DE. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature* 381: 56-58 (1996)

Bevelander G. and Nakahara H. An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain bivalve molluscs. *Calc. Tiss. Res.* 3: 84-92 (1969)

Blank S, Arnoldi M, Khoshnavaz S, Treccani L, Kuntz M, Mann K, Grathwohl G and Fritz M. The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *J. Microsc.* 212: 280-291 (2003)

Checa AG, Cartwright JHE and Willinger MG. Mineral bridges in nacre. *J. Struct. Biol.* 176: 330-339 (2011)

Falini G, Albeck S, Weiner S and Addadi L. Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science* 271: 67-69 (1996).

Gries KI, Heinemann F, Rosenauer A and Fritz M. In vitro growth of flat aragonite crystals between the layers of the insoluble organic matrix of the abalone *Haliotis laevis*. *J. Cryst. Growth* 358: 75-80 (2012)

Gong N, Shangguan J, Liu X, Yan Z, Ma Z, Xie L and Zhang R. Immunolocalization of matrix proteins in nacre lamellae and their in vivo effects on aragonitic tablet growth. *J. Struct. Biol.* 164: 33-40 (2008)

Heinemann F, Treccani L and Fritz M. Abalone nacre insoluble matrix induces growth of flat and oriented aragonite crystals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344: 45-49 (2006)

Keene EC, J Evans JS and Estroff LA. Silk Fibroin Hydrogels Coupled with the n16N- β -Chitin Complex: An in Vitro Organic Matrix for Controlling Calcium Carbonate Mineralization. *Cryst. Growth Des.* 10: 5169-5175 (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)

小守壽文 *生化学* 78, 501-508 (2006)

Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 339: 189-195 (2010)

Kono M, Hayashi N and Samata T. Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 269:213-218 (2000)

Lao Y, Zhang X, Zhou J, Su W, Chen R, Wang Y, Zhou W and Xu ZF. Characterization and in vitro mineralization function of a soluble protein complex P60 from the nacre of *Pinctada fucata*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 148: 201-208 (2007)

Levi Y, Albeck S, Brack A, Weiner S and Addadi L. Control over aragonite crystal nucleation and growth: An in vitro study of biomineralization. *Chem. Eur. J.* 4: 389-396 (1998)

Levi Y, Falini G, Addadi L and Weiner S. Structure of the nacreous organic matrix of a bivalve mollusk shell examined in the hydrated state using cryo-TEM. *J. Struct. Biol.* 135: 8-17 (2001)

Ma ZJ, Huang J, Sun J, Wang GN, Li CZ, Xie LP and Zhang RQ. A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *J. Biol. Chem.* 282: 23253-23263 (2007)

Mann S. Matrix macromolecules from shell nacre. In: *Biomineralization, principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, Oxford, pp. 103-106 (2001)

Marin F, Corstjens P, de Gaulejac B, de Vrind-De Jong E and Westbroek P. Mucins and molluscan calcification. Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, pteriomorpha). *J. Biol. Chem.* 275: 20667-20675 (2000)

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)

- Miyamoto H, T Miyashita T, M Okushima M, S Nakano S, Morita T and Matsushiro A. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93: 9657-9660 (1996)
- Miyamoto H, Yano M and Miyashita T. Similarities in the structure of nacrein, the shell -matrix protein, in a bivalve and a gastropod. J. Molluscan Stud. 69: 87-89 (2003)
- Miyamoto H, Miyoshi F and Kohno J. The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. Zoolog. Sci. 22: 311-315 (2005)
- 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)
- Miyashita T, Takagi R, Miyamoto H and Matsushiro A. Identical carbonic anhydrase contributes to nacreous or prismatic layer formation in *Pinctada fucata* (Mollusca: Bivalvia). The Veliger 45: 250-255 (2002)
- Miyashita T, Takami A and Takagi R. Molecular cloning and characterization of the 5'-flanking regulatory region of the carbonic anhydrase nacrein gene of the pearl oyster *Pinctada fucata* and its expression. Biochem. Genet. 50: 673-683 (2012)
- Miyoshi T, Matsuda Y and Komatsu H. Fluorescence from Pearls and Shells of Black Lip Oyster, *Pinctada Margaritifera*, and Its Contribution to the Distinction of Mother Oysters Used in Pearl Culture. Jpn. J. Appl. Phys. 26: 1069-1072 (1987)
- Nakahara, H. in Biomineralization and Biological Metal Accumulation (ed. Westbroek, P. & de Jong, E. W.) 225-230 (Reidel, Amsterdam, (1983).
- Nudelman F, Gotliv BA, Addadi L and Weiner S. Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. J. Struct. Biol. 153: 176-187 (2006)
- Nudelman F, Shimoni E, Klein E, Rousseau M, Bourrat X, Lopez E, Addadi L and Weiner S. Forming nacreous layer of the shells of the bivalves *Atrina rigida* and *Pinctada margaritifera*: an environmental- and cryo-scanning electron microscopy study. J. Struct. Biol. 162: 290-300 (2008)
- Nudelman F, Gotliv BA, Addadi L and Weiner S. Mollusk shell formation: mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. J. Struct. Biol. 153: 176-187 (2006)

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)

Patthy L. Genome evolution and the evolution of exon-shuffling--a review. *Gene* 238: 103-114 (1999)

Patthy L. Modular assembly of genes and the evolution of new functions. *Genetica* 118: 217-231 (2003).

Pereira-Mouriès L, Almeida MJ, Ribeiro C, Peduzzi J, Barthélemy M, Milet C and Lopez E. Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*. *Eur. J. Biochem.* 269: 4994-5003 (2002)

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)

Schaffer TE, Ionescu-Zanetti C, Proksch R, Fritz M, Walters DA, Almqvist N, Zaremba CM, Belcher AM, Smith BL, Stucky GD, Morse DE and Hansma PK. Does abalone nacre form by heteroepitaxial nucleation or by growth through mineral bridges? *Chem. Mater.* 9: 1731-1740 (1997)

Shen X, Belcher AM, Hansma PK, Stucky GD and Morse DE. Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*. *J. Biol. Chem.* 272: 32472-32481 (1997)

Su J, Zhu F, Zhang G, Wang H, Xie L and Zhang R. Transformation of amorphous calcium carbonate nanoparticles into aragonite controlled by ACCBP. *CrystEngComm.* 18: 2125-2134 (2016)

Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, Ohkubo T, Sakaguchi K, Tanaka M, Nakashima K and Takahashi T. Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature* 387: 563-564 (1997)

Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, Yamamoto Y, Nishimura T, Kato T and Nagasawa H. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science* 325: 1388-1390 (2009)

Takagi R and Miyashita T. The Carbonic anhydrase nacrein gene of *Pinctada fucata*: Organization, Correlation with Exon and functional domain, and Evolution. In :Recent Advances in Pearl Research—Proceedings of the International Symposium on Pearl Research, Eds: Watabe S, Maeyama K and Nagasawa H. TERRAPUB. pp. 93-108 (2011)

- Takeuchi T, Sarashina I, Iijima M and Endo K. *In vitro* regulation of CaCO₃ crystal polymorphism by the highly acidic molluscan shell protein Aspein, FEBS Letters. 582: 591-596 (2008)
- Tsukamoto D, Sarashina I and Endo K. Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 320: 1175-1180 (2004)
- Wada K. Nucleation and growth of aragonite crystals in the nacre of bivalve molluscs. Biomineralisation 6: 141-159 (1972)
- Wada K. Initiation of mineralization of bivalve molluscs. In: The Mechanisms of biomineraliation in Animals and Plants (eds. Omori M and Watabe N), Tokai Univ. Press, Tokyo. pp. 79-92 (1980)
- 和田浩爾 セラミックス 28:12-16 (1993)
- Weiss IM, Kaufmann S, Mann K, Fritz M. Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 267: 17-21 (2000)
- Watabe N and Wilbur KM. Influence of the organic matrix on crystal type in molluscs. Nature 188: 334 (1960)
- Weiner S and Traub W. X-Ray diffraction study of the insoluble organic matrix of mollusk shells. FEBS Lett. 111: 311-316 (1980)
- Weiner S and Traub W. Macromolecules in mollusk shells and their functions in biomineralization. Philos. Tr. Soc. B. 304: 425-433 (1984)
- 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 CaCO₃ crystal formation and mineralogenic cells. Mar. Biotechnol. 8: 624-633 (2006)
- Zhang G and Xu J. From colloidal nanoparticles to a single crystal: new insights into the formation of nacre's aragonite tablets. J. Struct. Biol. 182: 36-43 (2013)

JAXA事務局・注) 本文中***の簡易説明は「参考・用語集」を参照