

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22331

研究課題名(和文) 貝殻の貝柱接着面で形成される光輝層における筋タンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of muscle proteins in the myostracum formed on the shell surface attached to the adductor muscle

研究代表者

舩原 大輔 (Funabara, Daisuke)

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：00335150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：二枚貝の閉殻筋と貝殻の接着面には、光輝層という柱状の炭酸カルシウム結晶構造が形成されるが、その形成メカニズムは不明である。光輝層に含まれるタンパク質を解析したところ、パラミオシンやトロポミオシンカルポニンといった筋肉タンパク質が存在することが分かった。パラミオシン存在下で炭酸カルシウム結晶を形成させたところ、柱状のアラゴナイト結晶が生じた。貝殻を抗パラミオシン抗体を用いて免疫染色したところ、光輝層のみにパラミオシンが存在することがわかった。本研究の結果、パラミオシンが光輝層形成に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二枚貝は強い力で貝殻をとし続けることができるが、これは閉殻筋が貝殻に強力に接着しているからである。閉殻筋と貝殻の接着面に形成される光輝層が両者の接着に重要であると考えられているが、光輝層の形成メカニズムは分かっていない。本研究では光輝層の形成に筋肉タンパク質であるパラミオシンが関与している可能性が明らかとなった。これは閉殻筋と貝殻の接着メカニズムの解明につながるものである。

研究成果の概要(英文)：Myostracum, columnar calcium crystals, is formed on shell surfaces attached to adductor muscles. It is unknown how the myostracum is formed. We revealed that the myostracum contains some muscle proteins, such as paramyosin, tropomyosin, and calponin. In vitro calcium crystallization analysis in the presence of paramyosin produced columnar aragonite crystals like myostracum. Immunostaining using the anti-paramyosin antibody against the shells showed that paramyosin is localized only in the myostracum. Our study raised the possibility that paramyosin participates in the formation of myostracum.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：二枚貝 光輝層 炭酸カルシウム結晶 アラゴナイト パラミオシン アコヤガイ 閉殻筋 貝殻

### 1. 研究開始当初の背景

アサリやハマグリ、カキなどの二枚貝はとても強い力で殻を閉じつづけることができる。これは貝柱（閉殻筋）が強力に収縮して2枚の殻を固く閉じているためである。この収縮機構はキャッチ収縮と呼ばれ、このとき閉殻筋は10 kg/cm<sup>2</sup>以上の力を発揮している。そのような大きな力で閉殻筋は収縮しているにもかかわらず、閉殻筋は貝殻から剥がれることはない。閉殻筋は貝殻と強力に接着しているからである。

閉殻筋と貝殻との接着面に関する研究は、材料学的見地から1980年前後に盛んに行われた。閉殻筋を剥離した貝殻面には凹凸があること、貝殻からはがした閉殻筋の剥離面にも凹凸があることなどから、閉殻筋のコラーゲンを主体とする結合組織が貝殻の凹部に入り込む、いわゆる投錨効果によって、閉殻筋と貝殻が接着していると考えられている（図1）<sup>1</sup>。投錨に加えて、タンパク質由来のカルボキシ基と貝殻由来のカルシウムイオンとの静電結合が寄与している可能性も示されているが、これまでに実験的な証拠はない。

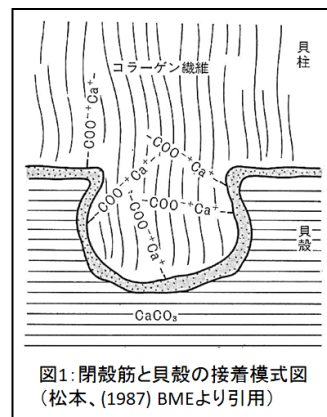


図1: 閉殻筋と貝殻の接着模式図  
(松本, (1987) BMEより引用)

貝殻の閉殻筋の接着面下には、特別な炭酸カルシウム結晶層（光輝層）が形成されている。光輝層は数百 nm の太さの柱状結晶が密に並ぶ構造をしている<sup>2</sup>。光輝層が閉殻筋との接着に重要な役割をしていると考えられているが、そのメカニズムは不明である。貝の成長に伴って閉殻筋が移動することによって、光輝層の場所も移動し、貝殻中には閉殻筋が移動した痕跡として光輝層が埋もれている（図2）。

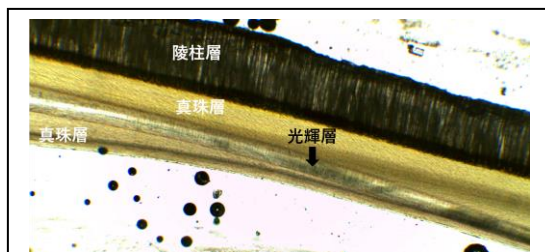


図2: アコヤガイ貝殻の光輝層を含む領域の断面構造。  
真珠層の中に光輝層が存在している

貝殻は炭酸カルシウム結晶からなるが、その形成は外套膜から分泌されるタンパク質によって制御されると考えられている。したがって、貝殻にはタンパク質が含まれている。予備実験においてアコヤガイ貝殻真珠層と光輝層に含まれるタンパク質を比較解析したところ、明らかにそれぞれに含まれるタンパク質の組成は異なっていた。光輝層タンパク質を分析すると、筋肉タンパク質であるパラミオシン、トロポミオシン、カルボニンが含まれていることが分かった。これらの知見は、筋肉タンパク質が光輝層の形成に何らかの関与をしている可能性を示唆していた（図3）。

### 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、光輝層の形成メカニズムを解明し、閉殻筋と貝殻の接着メカニズムを明らかにすることである。そのために、光輝層に存在する筋肉タンパク質のうち、特にパラミオシンに注目し、パラミオシンが光輝層形成にどのように関与するのかを明らかにする。

パラミオシンは、無脊椎動物に広く存在するタンパク質で、特に二枚貝閉殻筋に多く存在する。パラミオシンは古くから知られたタンパク質であるが、その役割についてはよく分かっていない。本研究で、光輝層形成メカニズムを明らかにすることを通じて、パラミオシンの新しい役割についても明らかにすることができると考えている。

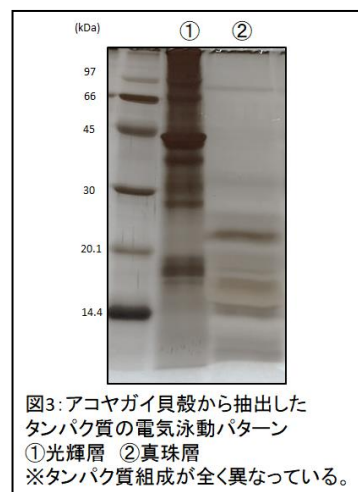


図3: アコヤガイ貝殻から抽出したタンパク質の電気泳動パターン  
①光輝層 ②真珠層  
※タンパク質組成が全く異なっている。

### 3. 研究の方法

本研究では実験対象としてアコヤガイを選んだ。アコヤガイは我が国で真珠養殖の母貝として用いられている重要種であるとともに、ゲノム解読が終了しており、ゲノムデータベースを活用したトランスクリプトーム解析などが世界的に精力的に進められていることなどで、事実上の二枚貝のモデル生物となりつつあるためである。

本研究では次の3つの方法を実施した。

#### (1) 光輝層パラミオシンの解析

光輝層に含まれるパラミオシンの性状について解析した。まずパラミオシンのC末端側配列をもとに合成したペプチドを用いてウサギ抗アコヤガイ・パラミオシン抗体を作製した。光輝層から抽出したタンパク質に対して抗パラミオシン抗体によるウェスタンブロッティング解析を行った。

#### (2) 光輝層におけるパラミオシンの局在解析

アコヤガイ貝殻に対して抗パラミオシン抗体を用いた免疫染色を行った。光輝層を含むよう

に貝殻の切片を作製し、常法に従って一次抗体に抗パラミオシン抗体を、二次抗体に蛍光標識抗ウサギ IgG 抗体を使用して、反応を行った。検出には落射蛍光顕微鏡を用いた。

### (3) パラミオシン存在下での炭酸カルシウム結晶形成

パラミオシンをアコヤガイ閉殻筋から精製した。精製パラミオシンの存在下で、炭酸カルシウム結晶化実験を行った。生成した炭酸カルシウム結晶の形状を、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 光輝層パラミオシンの解析

アコヤガイ貝殻から光輝層のみを注意深く削り出し、界面活性剤と還元剤存在下でタンパク質を抽出した。抽出した成分をウェスタンブロットに供したところ、複数のバンドが検出された。最も強く検出されたバンドは約 55kDa であった。筋肉中のパラミオシンの分子量は約 90kDa であることから、光輝層からタンパク質を抽出する過程で分解したか、あるいはアイソフォームである可能性が考えられた。

### (2) 光輝層におけるパラミオシンの局在

光輝層は閉殻筋と貝殻の接着領域に形成されるが、貝の成長に伴う閉殻筋の移動とともに光輝層は貝殻内部に埋もれ、閉殻筋の移動の痕跡として残っている。そこで貝殻内部の光輝層を対象として、抗パラミオシン抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。蛍光顕微鏡による観察の結果、蛍光は真珠層には検出されず、光輝層にのみ検出された。これはパラミオシンが真珠層には存在せず、光輝層にのみ存在することを示した。また、光輝層中の蛍光強度に偏りがあり、光輝層の陵柱層側の領域に強く蛍光が認められたことから、光輝層におけるパラミオシンの分布が一様ではないことが分かった (図4)。

### (3) パラミオシン存在下での炭酸カルシウム結晶形成

閉殻筋から精製したパラミオシン存在下で、かつアラゴナイト形成条件下で炭酸カルシウム結晶を形成させた。その結果、柱状の結晶が多数形成された。その形態は、パラミオシン非存在下において同様に実験を行って得られた結晶とは全く異なるものであ

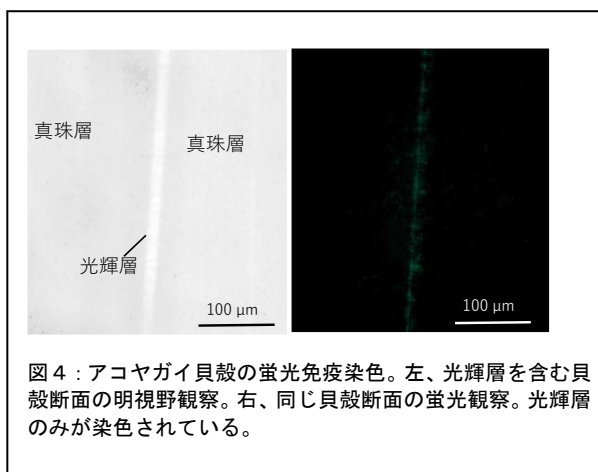


図4：アコヤガイ貝殻の蛍光免疫染色。左、光輝層を含む貝殻断面の明視野観察。右、同じ貝殻断面の蛍光観察。光輝層のみが染色されている。

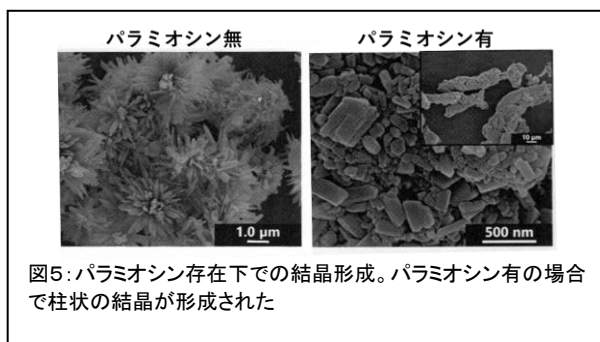


図5：パラミオシン存在下での結晶形成。パラミオシン有の場合で柱状の結晶が形成された

った。これらの結果は、パラミオシンが光輝層の形成に関与している可能性を示唆するものであった (図5)。

本研究の結果、閉殻筋と貝殻の接着面に形成される光輝層に筋タンパク質であるパラミオシンが存在すること、パラミオシンが光輝層形成に関与する可能性があることが明らかとなった。これらの成果は、光輝層の形成メカニズムの解明への一助となるだけでなく、パラミオシンの機能の解明にもつながるものである。

## <引用文献>

1. 松本恒隆. 生物と接着. BME, 1, 330-337, 1987.
2. Seung-Woo Lee, Young-Nam Jang, and Jeong-Chan Kim. Characteristics of the Aragonitic Layer in Adult Oyster Shells, *Crassostrea gigas*: Structural Study of Myostracum including the Adductor Muscle Scar. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, Article ID 742963, 10 pages, doi:10.1155/2011/742963, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩橋晴香、荒城綾香、根岸瑠美、降旗一夫、永田宏次、鈴木道生
2. 発表標題 アコヤガイ貝殻内のACC結合タンパク質の構造・機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 道生  (Suzuki Michio)  (10647655)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------