

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850078

研究課題名(和文) 軟体動物貝殻の炭酸カルシウム結晶の形態と欠陥を制御する有機基質の探索と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analyses of organic matrices regulating morphology and defect in calcium carbonate crystals of mollusk shells

研究代表者

鈴木 道生 (Suzuki, Michio)

東京大学・農学生命科学研究科・講師

研究者番号：10647655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：軟体動物の貝殻はバイオミネラルの一種であり、炭酸カルシウムと少量の有機基質から構成され、様々な微細構造を形成する。私達はアコヤガイの蝶番部に存在する靱帯から新規の酸性ペプチドLICPを明らかにした。私達はLICPがアラゴナイト結晶のc軸方向の成長を止め、繊維状のアラゴナイト結晶の形成に参与することを明らかにした。また、モノアラガイの貝殻抽出液にキチナーゼ活性を見出し、キチナーゼが貝殻の再構成に参与する可能性を見出した。本研究において、私達は軟体動物の貝殻微細構造の形成に重要ないくつかの有機基質の機能を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Biominerals are biogenic mineralized tissues containing not only inorganic compounds, but also a small amount of organic matrices that play an important role in biomineral formation. The mollusk shells which are typical biominerals consisting of calcium carbonate and organic matrices, have various microstructures.

We identified a novel, small acidic peptide, named ligament intra-crystalline peptide (LICP), from the aragonite crystal of the hinge ligament of *Pinctada fucata*. We revealed that LICP inhibited the growth of aragonite crystal to stop elongation in the c-axis direction and make the thin fiber of aragonite crystals in the ligament. On the other hand, we showed the chitinase activity from the extract of the shell from fresh water snail, *Lymnaea stagnalis*. Chitinases degraded the inner side of the shell to reconstruct the shell shape.

In this study, we revealed some important organic matrices to form the fine microstructure of the mollusk shells.

研究分野：バイオミネラルリゼーション、生物無機化学、生物有機化学、分析化学

キーワード：バイオミネラル 炭酸カルシウム アコヤガイ モノアラガイ 酸性ペプチド キチナーゼ

1. 研究開始当初の背景

軟体動物の貝殻は多種多様な形態や色を持つことから、古代では貝殻が貨幣として使用された時期もあり、貝殻の構造の一種である真珠は生物が作る宝石として現代でも珍重され、人類にとって身近な存在である。このような貝殻の成分は 90%以上の炭酸カルシウムと少量の有機基質(5%以下)から主に構成されている。貝殻は肉眼で見える形態が多様なだけでなく、目では見えないマイクロもしくはナノメートル単位の微細構造を有し、この微細構造が有機-無機のハイブリッド構造から構成されることで非常に強い強度と剛性を持ち、また真珠光沢のような美しい模様を描き出す。貝殻の炭酸カルシウム結晶の形成において、多形の制御、結晶形態の制御、結晶欠陥の制御、方位の統一性、結晶子サイズの小さいナノ結晶の形成、結晶形成前の不定形状態の持続など、単なる無機化学反応では説明できない特徴的な結晶形成過程を有しており、そのほとんどに有機基質が関与していると考えられているが、それぞれの現象に対して一対一対応で説明できるような有機基質はほとんど明らかにされていないのが現状であった。

2. 研究の目的

貝殻の炭酸カルシウム結晶が持ついくつかの具体的な特徴を挙げると、真珠層と呼ばれる微細構造は炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶から構成される。このアラゴナイト結晶は丸型もしくは六角形のタブレット状の形態を有するが、二枚貝の蝶番部に存在する靱帯と呼ばれる組織においては、約 100 nm 程の直径を持つ六角形の細長い繊維状のアラゴナイト結晶が連なっており、同じアラゴナイト結晶でも組織によってその形態は大きく異なっている。また靱帯のアラゴナイト結晶では、結晶の欠陥の一種である双晶面がちょうど一つの繊維につき

一つか二つのみ繊維の断面の中心部に存在していることが分かっている。アラゴナイトの双晶は{110}面と呼ばれる結晶面を境に原子配列が鏡状に反転しており、これはカルシウムイオンと炭酸イオンの原子配置が正三角形に近い状態で並んでいることで、反転してもその配置が非常に似ていることから起こると考えられている。このような双晶は通常の実珠層にはほとんど入っていないが、品質が悪く白濁した真珠層には双晶が多く含まれることが申請者の観察によって明らかとなっている。

また、巻貝の貝殻においては交差板構造と呼ばれるアラゴナイト結晶が螺旋を描きながら成長する様子が知られている。螺旋の成長の過程で、螺旋の内部の貝殻が薄くなる現象が知られているが、これがどのような分子の働きによるものかは明らかになっていない。

そこで申請者は、二枚貝貝殻の靱帯部および巻貝の貝殻から、結晶の形態と欠陥を制御する有機基質、特に基質タンパク質に焦点を当て、そのような活性を持つ基質タンパク質を明らかにし、その構造と機能の解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

日本では真珠養殖に利用される二枚貝であるアコヤガイの貝殻の靱帯部をスパーテルとピンセットを用いて取り外し、靱帯部だけを得た。これを次亜塩素酸ナトリウムで処理を行った。次亜塩素酸ナトリウム処理後に残ったアラゴナイト結晶を酢酸で脱灰し、結晶内に含まれ、結晶の形態や欠陥を制御していると思われる有機成分の抽出を試みた。抽出した有機成分を質量分析を行いペプチドであることが判明したため、プロテインシーケンサによるアミノ酸配列解析を行いペプチド(LICP)の構造を決定した。LICPの機能を調べるため、ペプチドの化学合成を行い、

炭酸カルシウム結晶形成実験に供した。形成した炭酸カルシウム結晶を電子顕微鏡により観察し、炭酸カルシウム結晶の性質を明らかにすることで、LICPの機能を考察した。

また、淡水での飼育が用意である巻貝であるモノアラガイの貝殻を使い、螺旋の内部の貝殻が薄くなる現象について研究を行った。まずは螺旋の内部の貝殻が薄くなるためには、貝殻の有機基質の骨格となるキチンを溶かす必要があると考え、貝殻および生体抽出液からキチン分解活性の確認を行った。さらにモノアラガイのキチン分解酵素のクローニングを行った。そして、キチン分解酵素の阻害剤であるアロサミジンを用いて、貝殻形成にキチン分解酵素がどのように関与するのか明らかにした。

4. 研究成果

靱帯を次亜塩素酸ナトリウムで処理することにより、靱帯内部のアラゴナイト結晶のみを単離することができることを走査型電子顕微鏡により確認した。繊維状アラゴナイト結晶を酢酸で脱配し、内部の有機成分を逆相 HPLC で分離したところ、ペプチドの成分が含まれることが判明した。このペプチドは N 末端にピログルタミン酸が存在し、pQPDPHEGTYDY の配列を持つことが判明した。この新規のペプチドを Ligament IntraCrystalline Peptide (LICP) と命名した。この配列をコードする遺伝子をゲノムデータベース内の遺伝子モデルから探索したが、見つけることはできなかった。そこで、遺伝子ではなくゲノム配列内で検索を行ったところ、部分塩基配列を見付けることができた。この部分塩基配列を元に RT-PCR および 3' -RACE を行うことにより、LICP をコードする遺伝子の全領域を決定することができた。その結果、LICP はシグナルペプチドを持つ分泌性のタンパク質であり、LICP の下流に別のペプチドもコードされることが判明

した。LICP は酸性のペプチドであったが、下流にコードされたペプチドは塩基性であった。炭酸カルシウム結晶形成阻害活性の結果から LICP は炭酸カルシウム結晶と相互作用することが明らかとなったが、下流のペプチドは炭酸カルシウム結晶と相互作用しないことが分かった。また、*in vitro* での LICP を含む炭酸カルシウム飽和液内で炭酸カルシウム結晶を形成させたところ、結晶の *c* 軸方向への成長が抑制された、短いアラゴナイト結晶が多数観察された。

これまでの透過型電子顕微鏡による靱帯のアラゴナイト結晶形成過程の観察の結果から、多数の小さなアラゴナイト結晶が配向し、積み重なることで、繊維状のアラゴナイト結晶が形成されることが明らかになっている。LICP は靱帯のアラゴナイト結晶の内部に局在することで、アラゴナイト結晶の *c* 軸方向への成長を抑制し、小さい結晶のまま靱帯内に取り込まれることで、それらが靱帯内の有機膜内で配向し、繊維状のアラゴナイト結晶を形成するという役割があると考えられた。

一方、巻貝における研究では、モノアラガイの貝殻抽出液および外套膜にキチン分解活性があることを示した。そこで、キチン分解酵素が貝殻の厚みを調整している可能性を考えた。まずは外套膜において発現するキチン分解酵素を 5 種類同定することに成功した。実際に貝殻にキチン分解酵素を作用させると貝殻の微細構造が破壊されることを確認した。また、キチン分解酵素の阻害剤であるアロサミジンを投与するとモノアラガイの幼生の貝殻の厚みが薄くなることを見出した。以上の結果から、モノアラガイはキチン分解酵素を利用して貝殻の形態形成を調整している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. **Michio Suzuki**, Seiji Nakayama, Hiromichi Nagasawa and Toshihiro Kogure. Initial formation of calcite crystals in the thin prismatic layer with the periostracum of *Pinctada fucata*. *Micron*, **45**, 136-139, (2013).
2. **Michio Suzuki**, Arisa Sugisaka-Nobayashi, Toshihiro Kogure, Hiromichi Nagasawa. Structural and functional analyses of a strongly chitin-binding protein-1 (SCBP-1) from the exoskeleton of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **77**, 361-368, (2013).
3. **Michio Suzuki**, Ai Iwashima, Mariko Kimura, Toshihiro Kogure and Hiromichi Nagasawa. The molecular evolution of the Pif family proteins in various species of mollusks. *Marine Biotechnology*, **15**, 145-158, (2013).
4. **Michio Suzuki** and Hiromichi Nagasawa. Mollusk shell structures and their formation mechanism. *Canadian Journal of Zoology*, **91**, 349-366, (2013). Taiga Okumura, **Michio Suzuki**, Hiromichi Nagasawa and Toshihiro Kogure. Microstructural control of calcite via incorporation of intracrystalline organic molecules in shells. *Journal of Crystal Growth*, **381**, 114-120, (2013).
5. Hiroshi Miyamoto, Hirotoshi Endo, Naoki Hashimoto, Kurin Iimura, Yukinobu Isowa, Shigeharu Kinoshita, Tomohiro Kotaki, Tetsuji Masaoka, Takumi Miki, Seiji Nakayama, Chihiro Nogawa, Atsuto Notozawa, Fumito Ohmori, Isao Sarashina, **Michio Suzuki**, Ryouyuke Takagi, Jun

Takahashi, Takeshi Takeuchi, Naoki Yokoo, Nori Satoh, Haruhiko Toyohara, Tomoyuki Miyashita, Hiroshi Wada, Tetsuro Samata, Kazuyoshi Endo, Hiromichi Nagasawa, Shuichi Asakawa, Shugo Watabe. The diversity of shell matrix proteins: genome-wide investigation of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Zoological Science*, **30**, 801-816, (2013).

6. Seiji Nakayama, **Michio Suzuki**, Hirotoshi Endo, Kurin Iimura, Shigeharu Kinoshita, Shugo Watabe, Toshihiro Kogure, Hiromichi Nagasawa. Identification and characterization of a matrix protein (PPP-10) in the periostracum of the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *FEBS Open Bio*, **3**, 421-427, (2013).
7. Toshihiro Kogure, **Michio Suzuki**, Hyejin Kim, Hiroki Mukai, Antonio G. Checa, Takenori Sasaki, Hiromichi Nagasawa. Twin density of aragonite in molluscan shells characterized using X-ray diffraction and transmission electron microscopy. *Journal of Crystal Growth*, **397**, 39-46, (2014).
8. **Michio Suzuki**, Toshihiro Kogure, Shohei Sakuda, Hiromichi Nagasawa. Identification of ligament intra-crystalline peptide (LICP) from the hinge ligament of the bivalve, *Pinctada fucata*. *Marine Biotechnology*, **17**, 153-161, (2015).

〔学会発表〕(計 35 件)

1. **Michio Suzuki**, Toshihiro Kogure and Hiromichi Nagasawa. Molecular evolution of the Pif family proteins that are related to the formation of the nacreous layer in various species of mollusks. XXII International Materials Research Congress

- 2013, Cancun, Mexico, (August 2013). (招待講演)
2. **鈴木道生**「軟体動物のアラゴナイト結晶形成に関する研究」、『第8回バイオミネラルイノベーションワークショップ』、東京大学、2013年11月(招待講演)
 3. **鈴木道生**「貝殻内有機基質の分解酵素が微細構造形成に与える影響の解析」、『第16回マリンバイオテクノロジー学会大会』、三重大学、2014年5月、6月(招待講演)
 4. **鈴木道生**「結晶成長と有機分子の相互作用による生体鉱物の高機能化に関する研究」、『第45回結晶成長国内会議』、北海道大学、2015年10月(招待講演)
 5. Mai Yonezawa, Toshihiro Kogure, Kazuyoshi Endo, Yuki Imura, Etsuro Yoshimura, Shohei Sakuda and **Michio Suzuki**. Study on the chitinases in the shell of *Lymnaea stagnalis*. The 13th International Symposium on Biomineralization, Granada, Spain, (September 2015). (口頭発表)
 6. **Michio Suzuki**, Toshihiro Kogure, Shohei Sakuda, Hiromichi Nagasawa. Identification of ligament intra-crystalline peptide (LICP) from the hinge ligament of the bivalve, *Pinctada fucata*. Gordon Research Conference, Colby-Sawyer college, New London, USA, (August 2014). (ポスター発表)
 7. Hiroyuki Kintsu, Taiga Okumura, Toshihiro Kogure, Shohei Sakuda, **Michio Suzuki**. Study on the formation mechanism of the organic network in the calcite crystal of the prismatic layer of *Pinctada fucata*. 13th International Conference on Chitin and Chitosan, Muster University, Germany, (August-September 2015) (ポスター発表)
 8. Hiroyuki Kintsu, Taiga Okumura, Toshihiro Kogure, Shohei Sakuda, **Michio Suzuki**. Analyses of the organic network in the calcite crystal of the prismatic layer of *Pinctada fucata*. The 13th International Symposium on Biomineralization, Granada, Spain, (September 2015). (ポスター発表)
 9. **鈴木道生**、長澤寛道「アコヤガイ韧带部に存在する低分子ペプチド(LICP)の構造・機能解析」、『日本農芸化学会2013年度(平成25年度)大会』、東北大学、2013年3月(口頭発表)
 10. **鈴木道生**、中山誠志、遠藤博寿、飯村九林、木下滋晴、渡部終五、小暮敏博、長澤寛道「アコヤガイの殻皮に含まれるタンパク質(PPP)の構造および機能解析」、『第15回マリンバイオテクノロジー学会大会』、沖縄県市町村自治会館、2013年6月(口頭発表)
 11. **鈴木道生**、小暮敏博、前山薫、服部文弘、作田庄平、長澤寛道「アコヤガイ貝殻韧带部から見出された PfTIMP の構造・機能解析」、『日本農芸化学会2014年度(平成26年度)大会』、東京大学、2014年3月(口頭発表)
 12. 米澤舞、小暮敏博、作田庄平・**鈴木道生**「軟体動物の貝殻形態形成に関与するキチナーゼの解析」、『日本農芸化学会2014年度(平成26年度)大会』、東京大学、2014年3月(口頭発表)
 13. 近都浩之、奥村大河、小暮敏博、作田庄平、**鈴木道生**「アコヤガイ貝殻稜柱層カルサイト結晶内の小角粒界の形成機構」、『日本農芸化学会2014年度(平成26年度)大会』、東京大学、2014年3月(口頭発表)
 14. 近都浩之、奥村大河、小暮敏博、作

- 田庄平、**鈴木道生**「アコヤガイ貝殻稜柱層カルサイト結晶内におけるキチン分解酵素の役割」、『第 28 回キチン・キトサンシンポジウム』、順天堂大学、2014 年 8 月（口頭発表）
15. 米澤舞、小暮敏博、遠藤一佳、清水啓介、作田庄平、**鈴木道生**「巻貝の貝殻形態形成におけるキチナーゼの機能解析」、『日本農芸化学会 2015 年度（平成 27 年度）大会』、岡山大学、2015 年 3 月（口頭発表）
16. 米澤舞、小暮敏博、遠藤一佳、井村祐己、吉村悦郎、作田庄平、**鈴木道生**「モノアラガイの貝殻形成におけるキチナーゼの機能解析」、『第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会』、東京海洋大学、2015 年 6 月（口頭発表）
17. 吉村真裕、**鈴木道生**、佐々木猛智、小暮敏博「あられ石の起源と格子定数及び方解石への転移温度の関係」、『日本鉱物科学会 2015 年 年会・総会』、東京大学、2015 年 9 月（口頭発表）
18. 松浦 晃宙、吉村 航、渥美 貴史、作田 庄平、井村 祐己、**鈴木 道生**、吉村悦郎「アコヤガイ(*Pinctada fucata*) 外套膜におけるカルシウムイオン応答因子に関する研究」、『日本分析化学会第 64 年会』、九州大学、2015 年 9 月（口頭発表）
19. 近都浩之、奥村大河、小暮敏博、作田庄平、**鈴木道生**「アコヤガイ稜柱層カルサイト結晶内の小角粒界の形成に関する研究」、『第 10 回バイオミネラリーゼーションワークショップ』、東京大学、2015 年 12 月（口頭発表）
20. 吉村真裕、**鈴木道生**、小暮敏博「生体鉱物におけるあられ石の格子定数と方解石への転移温度に関する考察」、『第 9 回バイオミネラリーゼーションワークショップ』、東京大学、2014 年 12

月（口頭発表）

21. 吉村真裕、**鈴木道生**、佐々木猛智、小暮敏博「生物起源あられ石の安定性と結晶学特徴」、『第 10 回バイオミネラリーゼーションワークショップ』、東京大学、2015 年 12 月（口頭発表）

その他、ポスター発表 14 件

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：マトリックスメタロプロテアーゼ活性阻害剤、皮膚外用剤、老化防止用皮膚外用剤、シワ防止用皮膚外用剤、慢性関節リウマチ、動脈硬化、変形性関節症、歯周疾患、異所性脈管形成、腫瘍性浸潤および転移、潰瘍形成、骨疾患、血管再閉塞、血管再狭窄、HIV 感染症、または糖尿病合併症の治療および予防剤
発明者：鈴木道生、長澤寛道、前山薫、服部文弘

権利者：東京大学、御木本製薬

種類：特許

番号：特願 2013-138863

出願年月日：2013 年 7 月 2 日

国内外の別：国内

〔その他〕

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻分析化学研究室ホームページ
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/analchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 道生 (SUZUKI MICHIO)

東京大学大学院農学生命科学研究科・講師
研究者番号：10647655