

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20995

研究課題名(和文) アコヤガイ貝殻の方解石結晶の欠陥を制御する有機物ナノファイバーの形成機構の解明

研究課題名(英文) Study on the organic nanofibers regulating the defects of calcite crystals in shells of *Pinctada fucata*

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(農学部)・准教授

研究者番号：10647655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：貝殻のカルサイト結晶には有機物ナノファイバーが含まれるが、これがキチンとキチン分解酵素の複合体であることを明らかにした。キチン分解酵素を作用させたキチンナノファイバーやキチン分解酵素の阻害剤を用いた研究により、カルサイト結晶の成長の過程でナノファイバーがしたキチンが結晶欠陥を誘導することを明らかにした。本研究において申請者は貝殻に含まれるキチン分解酵素がキチンの繊維をナノ化することで、カルサイト結晶の欠陥を増幅し、強度を高めるという役割があることを初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、アコヤガイの貝殻における有機物ナノファイバーの形成機構と機能が明らかとなった。有機物ナノファイバーを有効利用することができれば、真珠養殖後に大量に廃棄される貝殻の付加価値を高めた再利用法に開発に役立つ可能性が考えられる。また、キチン分解酵素を用いて繊維をナノ化し、結晶欠陥を制御することで新たな材料合成の開発に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The organic nanofiber in the molluskan shells consists with chitin and chitinolytic enzymes. Studies using chitin nanofiber prepared by chitinolytic enzymes and inhibitor of chitinases revealed that chitin nanofiber induced the crystal defects in the process of calcite crystal growth. In this study, we showed that the nanofiber of chitin by chitinolytic enzymes increased the number of crystal defects and toughness of shells.

研究分野：生物無機化学

キーワード：アコヤガイ 炭酸カルシウム 結晶欠陥 ナノファイバー バイオミネラリゼーション

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 , CK - 19 (共通)

1 . 研究開始当初の背景

日本では真珠養殖に利用される貝として知られているアコヤガイは、産業的重要性から多くの研究がなされている。アコヤガイ貝殻の内側は真珠光沢を持つ真珠層と呼ばれ、タブレット状の炭酸カルシウムの霰石結晶から構成される。一方、外側は光沢を持たない稜柱層と呼ばれ、柱状の炭酸カルシウムの方解石結晶から構成される。また、蝶番部分には靱帯と呼ばれる繊維状の霰石結晶から構成される微細構造が存在する。方解石および霰石は炭酸カルシウムの結晶多形の種類を表し、常温常圧の条件では方解石が最も安定で、霰石は準安定である。このようにアコヤガイは一つの貝殻内に安定性の異なる多形を同時に形成し、さらに様々な形態の微細構造を作り分けるという非常に高度な石灰化制御機構を有している。そのためアコヤガイの貝殻には石灰化を制御する様々な機能性の有機基質が含まれていると考えられているが、多くの研究は含まれる主要成分を明らかにするものであり、近年では次世代シーケンサや質量分析による網羅的解析が主流になりつつあるが、それぞれの有機基質の機能に着目して詳細な構造および機能の解析を行うという研究はほとんど行われていない。申請者は単なる無機化学反応では再現が困難な特徴を有する炭酸カルシウム結晶の形成に關与する有機基質の構造と機能を明らかにしてきたが、未だ結晶の多様な形態の制御、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の詳細なメカニズムは不明のままである。本研究では特に炭酸カルシウム結晶の欠陥の制御とナノ結晶の形成に關与する有機物ナノファイバーに着目して研究を行うこととした。

2 . 研究の目的

アコヤガイの貝殻稜柱層は方解石結晶と有機基質から構成され、有機物から構成されるフレームワークの内部に稜柱状の方解石結晶が埋まった蜂の巣のような構造をしている。この稜柱状の方解石結晶の内部には有機物のナノファイバーがネットワーク状に広がっている。方解石結晶はこのナノファイバーを貫通して連続した構造となっているが、このナノファイバーの両側ではしばしば結晶の方位が僅かにずれた小角粒界となり、そこには高密度の結晶欠陥や結晶歪みが発生していることが明らかとなっている。そして高密度の小角粒界は方解石結晶をナノオーダーの微結晶の集合体とし、方解石の構造に由来した{104}面における劈開の連続した伝播を防ぐことで結晶の断裂を阻止し、貝殻の強度を増していると考えられている。そこで、貝殻内のキチン分解酵素がどのようにナノファイバーを形成するのか、ナノファイバーがどのように小角粒界を形成するのか、それらの詳細なメカニズムを解析することを目的とした。

3 . 研究の方法

アコヤガイ貝殻稜柱層から単離した方解石結晶内の有機物ナノファイバーの詳細な成分の解析を行った。単離したナノファイバーから LC-MS/MS を用いたアミノ酸配列および翻訳後修飾の解析および cDNA cloning の手法により、キチン分解酵素が含まれることを明らかにし、それらの完全な一次配列の決定を行った。さらにナノファイバーにはキチン分解酵素以外に酸性の基質タンパク質の断片も含まれていたことから、その全一次配列の決定も同様に行った。有機物ナノファイバーの主成分を明らかにするため、キチン染色法および赤外分光法 (IR) を用いて繊維の主成分にキチンが含まれることを明らかにした。キチンは *N*-Acetyl-D-glucosamine の重合体であるが、非常に強固な 3 次元構造をとることで水に不溶の繊維となり、通常の *in vitro* の合成系ではナノファイバー化しない。このような取り扱いの困難な繊維をアコヤガイは貝殻内でどのような仕組みで緻密に配置し、ナノファイバー化しているのかは、これまで明らかにされてこなかった。そこで、キチンの分解酵素がキチンの繊維を細くすることでナノファイバー化し、ナノファイバーの表面に酸性基質タンパク質等が存在することで高密度の小角粒界を

含む結晶ができるのではないかと仮説を立て、*in vitro* での結晶形成実験およびキチナーゼの阻害剤であるアロサミジンを用いた *in vivo* での実験を行った。

4. 研究成果

結晶欠陥形成に関与していると考えられる有機基質ネットワークの構成成分を調べた。結晶内の有機基質を抽出するために、稜柱層を次亜塩素酸で処理することで結晶間の有機基質のみを溶かして個々のカルサイト結晶を得た。その後、カルサイト結晶を酢酸で脱灰することで、結晶内有機基質として酸可溶性成分と酸不溶性成分を得た。有機基質ネットワーク成分である酸不溶性成分からはさらに、SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) と DTT (Dithiothreitol) を混合した変性剤で煮沸することで有機基質の架橋を壊し、タンパク質を抽出した。大部分は不溶物として残り、この不溶物をフーリエ変換型赤外分光法 (FT-IR) で測定したところ、多糖のキチンであることが判明した。キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミンを構成糖としたポリマーであり、生物界に広く分布している。また、酸可溶性成分と、変性剤で抽出した成分を SDS-PAGE に供したところ、変性剤抽出成分に特異的に多く含まれるタンパク質が存在していた。このタンパク質をトリプシンで消化後、LC/MS/MS に供し、アコヤガイゲノムデータベースから一致する遺伝子を調べたところ、キチン分解酵素であるキチナーゼであることが判明した。軟体動物においてキチナーゼは免疫機構以外にも貝殻の石灰化に関わっているのではないかと考えもあるが、具体的な機能は分かっておらず確かなエビデンスは得られていなかった。しかしここで我々の研究において、実際に貝殻の炭酸カルシウム結晶内から有機基質ネットワークの構成成分としてキチナーゼを同定し、さらに活性を有していることを確認することができ、キチナーゼが石灰化に何らかの機能を担っていることが示唆された。そこで次にキチナーゼの阻害剤を用いて、生体のアコヤガイに阻害剤を注射しながら飼育することで、キチナーゼ活性の抑制が稜柱層の形成に影響を及ぼすかを調べた。

キチナーゼの阻害剤は放線菌の二次代謝物質であるアロサミジンを用いて、アロサミジンを4日ごとに軟体部に注射して海水で1ヶ月間飼育した。1ヶ月後の個体の外套膜抽出成分からキチナーゼの活性を測定すると、コントロール個体と比較して有意に活性が下がっており、キチナーゼが抑制されていることが確認できた。稜柱層表面構造を SEM で観察したところ、アロサミジン注射個体では、部分的にはあったが柱状結晶の形が歪になり、微細構造の乱れが見られた。さらに結晶の断面を調べるために、集束イオンビームを用いて結晶の薄片を作製して TEM で観察したところ、結晶内部のキチン繊維が太くなっていることが分かった。キチナーゼ活性を抑制したことで、結晶内のキチン繊維が太くなり、さらに微細構造が乱れていたことから、通常のアコヤガイ稜柱層ではキチナーゼがキチンを分解して、細くナノファイバー化しているのではないかと考えられた。細くなることが結晶化にどのような影響を及ぼすかは次項で述べるが、本実験によって初めてキチナーゼが貝殻の石灰化に関与していることを示す結果が得られた。

in vitro の実験によって、キチンとキチナーゼがどのように炭酸カルシウムの結晶化に影響を与えるかを調べることにした。まず、キチンゲルを作製した。稜柱層では結晶間の有機基質の枠組みが作られた後に、キチンや炭酸カルシウムを含むゲル状の溶液が分泌されて石灰化が行われると考えられている。そのため、水に不溶のキチンをゲル化させるため、塩化カルシウム二水和物を飽和させたメタノール溶液に溶かし、そのキチン溶液を水に加えて、メタノールと水を置換させることでキチンゲルを得た。キチンゲルに市販のキチン分解酵素を添加して、24時間反応させた後に酵素を洗浄除去して、炭酸アンモニウムガス法を用いてキチンゲル内で炭酸カルシウムを結晶化させた。酵素濃度は0, 0.12, 1.2 mg/mL とした。酵素を加えていな

いキチンゲル内では、通常の炭酸カルシウムのみで形成させた際に見られる典型的な菱面体結晶が観察され、キチンは影響を与えていなかった。しかし、酵素濃度が上昇するにつれて形が変化していき、最も濃い濃度では丸みを帯びた結晶が観察された。キチン繊維はキチン分子鎖が水素結合して凝集した構造をしており、キチン分解酵素はキチン繊維の表面のキチン分子鎖から分解していくため、キチンは酵素処理によって細くなっていくと思われる。従って、キチン繊維が分解されて細くなったことが結晶化に影響を及ぼしたと考えられた。そこで、酵素処理ではなく、物理的・化学的にキチン繊維を解繊して細くしたキチンナノファイバーを用いて、キチンナノファイバー溶液内で炭酸カルシウムの結晶化を同様に行った。その結果、結晶の表面構造は変化し、多角体の結晶が見られた。また、これらの結晶内に結晶欠陥がどの程度生じているかを調べるためにX線回折測定を行った。X線回折測定によって得られた各回折スペクトルから、Williamson-Hallの式を用いて、結晶欠陥の指標として結晶格子歪み値を算出した。結果として、酵素濃度が濃いと値が高く、またナノファイバー溶液で形成した結晶においても高い値が見られ、細いキチン繊維は結晶欠陥をより生じさせることが判明した。結晶欠陥を生じさせる理由としては、キチンが分解されて細くなるほど表面積が大きくなり、炭酸カルシウムと相互作用する領域が多くなるために、結晶が成長する過程で方位を歪める頻度も高くなったのではないかと考えた。以上より、アコヤガイ稜柱層では、キチンを分泌後、キチン分解酵素によってキチンの細さを調節しているという新たな可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

1. **Michio Suzuki***, Hiroki Mukai, Hideo Aoki, Etsuro Yoshimura, Shohei Sakuda, Hiromichi Nagasawa, Toshihiro Kogure. Microstructure of iridescence-lacking pearl formed in *Pinctada fucata*. *Journal of Crystal Growth*, 433, 148-152, (2016).
2. Mai Yonezawa, Shohei Sakuda, Etsuro Yoshimura, **Michio Suzuki***. Molecular cloning and functional analysis of chitinases in the fresh water snail, *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Structural Biology*, 196, 107-118, (2016).
3. Fumiya Kikuchi, Yugo Kato, Kazuo Furihata, Toshihiro Kogure, Yuki Imura, Etsuro Yoshimura, **Michio Suzuki***. Formation of gold nanoparticles by glycolipids of *Lactobacillus casei*. *Scientific Reports*, 6, 34626, (2016).
4. Takaaki Yamaguchi, Yoshijiro Tsuruda, Tomohiro Furukawa, Lumi Negishi, Yuki Imura, Shohei Sakuda, Etsuro Yoshimura, **Michio Suzuki***. Synthesis of CdSe quantum dots using *Fusarium oxysporum*. *Materials*, 9, 855, (2016).
5. **Michio Suzuki***, Toshihiro Kogure, Hiromichi Nagasawa. Studies on the chemical structures of organic matrices and their functions in the biomineralization processes of molluscan shells. *AGri-Bioscience Monographs*, 7, 25-39, (2017).
6. Hiroyuki Kintsu, Taiga Okumura, Lumi Negishi, Shinsuke Ifuku, Toshihiro Kogure, Shohei Sakuda, **Michio Suzuki***. Crystal defects induced by chitin and chitinolytic enzymes in the prismatic layer of *Pinctada fucata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 489, 89-95, (2017).
7. Kazuki Kubota, Yasushi Tsuchihashi, Toshihiro Kogure, Kaoru Maeyama, Fumihiro Hattori, Shigeharu Kinoshita, Shohei Sakuda, Hiromichi Nagasawa, Etsuro Yoshimura, **Michio Suzuki***. Structural and functional analyses of a TIMP and MMP in the ligament of *Pinctada*

fucata. *Journal of Structural Biology*, 199, 216-224, (2017).

8. Toshiyoshi Yamamoto, Daiki Yamamoto, Keiji Rokugawa, Ko Yoshimura, Yuki Imura, Etsuro Yoshimura, **Michio Suzuki***. Decreased aluminium tolerance in the growth of *Saccharomyces cerevisiae* with SSO2 gene disruption. *Biometals*, 31, 203-215, (2018).
9. Kazuko Saruwatari, **Michio Suzuki**, Chunhui Zhou, Promlikit Kessrapong, Nicholas Sturman. DNA techniques applied to the identification of *Pinctada fucata* pearls from Uwajima, Ehime prefecture, Japan. *Gems & Gemology*, 54, 40-50, (2018).
10. Akihiro Matsuura, Ko Yoshimura, Hiroyuki Kintsu, Takashi Atsumi, Yasushi Tsuchihashi, Takeshi Takeuchi, Noriyuki Satoh, Lumi Negishi, Shohei Sakuda, Tomiko Asakura, Yuki Imura, Etsuro Yoshimura, **Michio Suzuki***. Structural and functional analyses of calcium ion response factors in the mantle of *Pinctada fucata*. *Journal of Structural Biology*, 204, 240-249, (2018).
11. Kazuki Kubota, Hiroyuki Kintsu, Akihiro Matsuura, Yasushi Tsuchihashi, Takeshi Takeuchi, Noriyuki Satoh, **Michio Suzuki***. Functional analyses of MMPs for aragonite crystal formation in the ligament of *Pinctada fucata*. *Frontiers in Marine Science*, 5, 373, (2018).

他 5 件

〔学会発表〕(計 72 件)

国際会議招待講演

1. **Michio Suzuki**, Hiroki Matsuda, Tomoko Ariga, Yohey Suzuki, Yuki Imura, Etsuro Yoshimura. Studies on the functions of organic matrices in molluscs to make the fine shell microstructures. JpGU meeting 2016, Makuhari Messe, Chiba, Japan (May 2016).
2. **Michio Suzuki**. Function of chitin degradation enzymes in the molluscan shells. Gordon Research Conference (Biomaterialization), PGA Catalunya Business and Convention Centre, Girona, Spain, (August 2016).
3. Akihiro Matsuura, Ko Yoshimura, Takashi Atsumi, Yasushi Tsuchihashi, Takeshi Takeuchi, Noriyuki Sato, Lumi Negishi, Shohei Sakuda, Yuki Imura, Etsuro Yoshimura, **Michio Suzuki**. Study on the calcium ion response of *Pinctada fucata* in the sea water with high concentration of calcium ion. 2nd Interdisciplinary Symposium on Ocean Acidification and Climate Change, Hong Kong University, China, (December 2016).
4. **Michio Suzuki**. Structural and functional analyses of matrix proteins related to the formation of fibrous microstructure in the shell of *Pinctada fucata*. 12th Pacific Rim Conference on Ceramic and Glass Technology, Hilton Waikoloa Village, USA, (May 2017).

国内会議招待講演

5. **鈴木道生**, 小暮敏博, 作田庄平, 長澤寛道「アコヤガイの貝殻靱帯部における新規低分子ペプチド LICP の構造・機能解析」『第 18 回マリンバイオテクノロジー学会』, 北海道大学函館キャンパス, 2016 年 5 月
6. **鈴木道生**「貝殻のバイオミネラルタンパク質」『平成 29 年度日本水産学会春季大会』, 東京海洋大学, 2017 年 3 月
7. 松田大輝, 有賀智子, 鈴木庸平, 根岸瑠美, 吉村悦郎, **鈴木道生**「ウロコフネタマガイに倣う高機能性材料の開発」『第 19 回マリンバイオテクノロジー学会』, 東北大学青葉山新キャンパス, 2017 年 6 月
8. **鈴木道生**「真珠貝微細構造内の有機基質の構造・機能解析によるバイオミネラリゼーション研究」『分子研研究会「生体金属動態」』, 分子科学研究所, 2017 年 8 月

9. **鈴木道生**「アコヤガイの貝殻内の有機基質が真珠の質とどのように関係するのか」
『NPO法人日本科学士協会，日本応用細胞生物学会，シンポジウム-2017 鳥羽-「真珠貝の利用，応用への新展開-その細胞機能，素材からの展望-」』，ミキモト真珠島，2017年10月
10. **鈴木道生**「有機高分子と鉱物結晶の相互作用に着目した真珠貝のバイオミネラリゼーション研究」『2017年度中国四国支部高分子講演会』，2017年12月
11. **鈴木道生**「鉄鋼スラグの藻場造成資材としての高度利用」『鉄鋼環境基金助成研究2017年度第2回研究討論会』，2018年2月
12. **鈴木道生**「バイオミネラルタンパク質による炭酸カルシウム結晶のナノ構造制御」
『日本農芸化学会2018年度（平成30年度）大会』，名城大学，2018年3月
13. **鈴木道生**「真珠層形成の機能タンパク質」
『真珠研究シンポジウム2018』，ミキモト真珠島，2018年11-12月
14. ○**鈴木道生**「バイオミネラリゼーションを制御する有機基質の構造と機能に関する研究」
『日本農芸化学会2019年度（平成31年度）大会』，東京農業大学，2019年3月
国際会議口頭発表
15. Kintsu Hiroyuki, Taiga Okumura, Lumi Negishi, Toshihiro Kogure, Shohei Sakuda, **Michio Suzuki**. Relation between the organic network and the crystal defects in the calcite of the prismatic layer of *Pinctada fucata*. JpGU meeting 2016, Makuhari Messe, Chiba, Japan (May 2016).
16. Kubota Kazuki, Tsuchihashi Yasushi, Kogure Toshihiro, Maeyama Kaoru, Hattori Fumihiro, Kinoshita Shigeharu, Sakuda Shohei, Nagasawa Hiromichi, Yoshimura Etsuro, **Suzuki Michio**. Structural and functional analyses of TIMP and MMPs in the ligament of *Pinctada fucata*. 14th International Symposium on Biomineralization, Tsukuba International Congress Center, Japan, (October, 2017).
17. **Suzuki Michio**, Matsuura Akihiro, Yoshimura Ko, Astumi Takafumi, Tsuchihashi Yasuhi, Takeuchi Takeshi, Satoh Noriyuki, Negishi Lumi, Sakuda Shohei, Kogure Toshihiro, Yoshimura Esturo. Structural and functional analyses of calcium ion response factors in the mantle of *Pinctada fucata*. 14th International Symposium on Biomineralization, Tsukuba International Congress Center, Japan, (October, 2017).
18. Saruwatari Kazuko, **Suzuki Michio**, Zhou Chunhui, Kessrapong Promlikit, Sturman Nicholas. 16S rRNA gene extraction and identification of *Pinctada* species pearls. 14th International Symposium on Biomineralization, Tsukuba International Congress Center, Japan, (October, 2017).
19. Hiroyuki Kintsu, Taiga Okumura, Lumi Negishi, Shinsuke Ifuku, Toshihiro Kogure, Shohei Sakuda, **Michio Suzuki**. Functional analyses of organic network in the calcite crystal of the prismatic layer of *Pinctada fucata*. International Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, Tokyo University of Marine Science and Technology, Japan, (September, 2017).

他 53 件

6 . 研究組織

なし

科研費による研究は，研究者の自覚と責任において実施するものです．そのため，研究の実施や研究成果の公表等については，国の要請等に基づくものではなく，その研究成果に関する見解や責任は，研究者個人に帰属されます．