

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02284

研究課題名（和文）貝殻と閉殻筋の接着面に生じる光輝層の形成におけるパラミオシンの役割に関する研究

研究課題名（英文）Study on the role of paramyosin in the myostracum formation on the surface of the shell attached to the adductor muscle

研究代表者

船原 大輔（Funabara, Daisuke）

三重大学・生物資源学研究所・教授

研究者番号：00335150

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：二枚貝では閉殻筋（貝柱）と貝殻が強固に接着している。貝殻の接着面には光輝層と呼ばれる結晶構造が形成される。光輝層には筋タンパク質の1つであるパラミオシンが含まれることから、本研究ではパラミオシンの光輝層形成への関与について調べた。パラミオシンは光輝層だけでなく、アコヤガイ貝殻真珠層全体に分布していた。また、パラミオシンはアコヤ真珠の真珠層にも存在し、真珠層表層やキズ・シミ周辺に分布していた。パラミオシン存在下で炭酸カルシウム結晶化実験を行ったところ、板状のアラゴナイト結晶が形成された。以上の結果から、パラミオシンがアラゴナイト結晶形成に関与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、二枚貝貝殻と閉殻筋の接着に関わると考えられる光輝層構造が筋タンパク質によって形成される可能性を示した。これは貝殻と閉殻筋の接着機構の解明への手がかりとなるものである。また、真珠にも筋タンパク質が含まれることが分かり、真珠品質と筋タンパク質が関係していることを示した。これは高品質真珠作出のための基礎的知見となるものである。

研究成果の概要（英文）：In bivalves, the adductor muscle and the shell are tightly adhered. The myostracum layer is formed on the adhesive surface of the shell. As the myostracum contains paramyosin, one of the major muscle proteins in bivalves, we investigated how paramyosin is involved in the formation of the myostracum layer. It is revealed that paramyosin is distributed not only in the myostracum layer but also throughout the nacreous layer of the shell. Paramyosin also resides in the nacreous layer of Akoya pearls and is distributed on the surface and around irregular structures inside the nacreous layer. Calcium carbonate crystallization assay in the presence of paramyosin resulted in forming plate-like aragonite crystals. These results indicate that paramyosin is involved in the aragonite crystal formation.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：二枚貝 光輝層 閉殻筋 真珠層 アコヤガイ 真珠 筋タンパク質 接着

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

二枚貝の2枚の殻は閉殻筋(貝柱)によってつながれている。閉殻筋が収縮して縮むことによって、殻を固く閉じることができる。閉殻筋の力は非常に強く1cm<sup>2</sup>あたり10kgにも及ぶと言われている。このとき閉殻筋はキャッチ収縮と呼ばれる特殊な収縮をしており、長時間にわたって大きな力を発生し続けることが可能である。これは閉殻筋が2枚の殻をつなぎとめているおかげである。すなわち閉殻筋と貝殻はそれに耐えられるように強く接着していることになる。

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(船をいかりで係留するようなイメージ)によって、閉殻筋と貝殻が接着していると考えられた。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、これらについて実験的な証拠はない。

貝殻と閉殻筋の接着面には光輝層と呼ばれる炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶層が存在する。研究代表者らは光輝層が貝殻と閉殻筋の接着に深く関わっていると考え、光輝層の形成メカニズムを解明を目指している。そのなかで、光輝層に含まれるタンパク質を解析したところ、複数の筋タンパク質が存在することを見出し、それらの筋タンパク質が光輝層の形成に関わっている可能性を示した。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は閉殻筋と貝殻の接着構造の詳細を解明することである。キーワードはパラミオシンである。本研究では、長い間機能が不明で現在ではほとんど研究対象となっていないパラミオシンに再度注目し、パラミオシンの新しい一面を明らかにし、現在のところ全く不明である光輝層の形成メカニズムの一端を明らかにする。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ある。また二枚貝以外にも貝殻のような硬組織を持つ生物は多く存在する。本研究において、パラミオシンが閉殻筋と貝殻の接着に関わっていることが明らかになれば、多くの無脊椎動物において二枚貝と同様に、軟体部と炭酸カルシウム結晶との接着がパラミオシンによって制御されている可能性がある。軟体動物の貝殻の多くの構造は進化した後に獲得した形質で作られたものが多いが、光輝層はほとんどの軟体動物の貝殻接着部において保存されており、進化的にも重要な貝殻微細構造である。本研究では光輝層の形成メカニズムを明らかにするものであるが、そこで得られる成果は広く生物の接着メカニズムの解明につながるものであり、学術的な波及効果ははかりしれない。

### 3. 研究の方法

本研究では、実験材料として、基本的にアコヤガイを使用した。アコヤガイは真珠養殖の母貝として使用され容易に入手できること、ゲノム解析が終了しておりゲノムデータベースが公開されていること、研究代表者らのこれまでの知見が生かせることがその理由である。

#### (1) パラミオシンの炭酸カルシウム結晶化能の解析

大腸菌発現系を用いて合成したパラミオシンの存在下で、炭酸カルシウムの結晶化実験を行い、パラミオシンの炭酸カルシウム結晶化能を調べた。

#### (2) アコヤガイ貝殻におけるパラミオシンの分布解析

アコヤガイ貝殻におけるパラミオシンの分布を調べるために、アコヤガイ貝殻に対して抗パラミオシン抗体を用いた蛍光免疫染色法ならびに免疫電顕法を実施した。また、アコヤガイ貝殻を脱灰して得られた有機基質と脱灰液に対して、抗パラミオシン抗体を用いたウェスタンブロットング法を実施した。

#### (3) 真珠真珠層におけるパラミオシンの分布解析

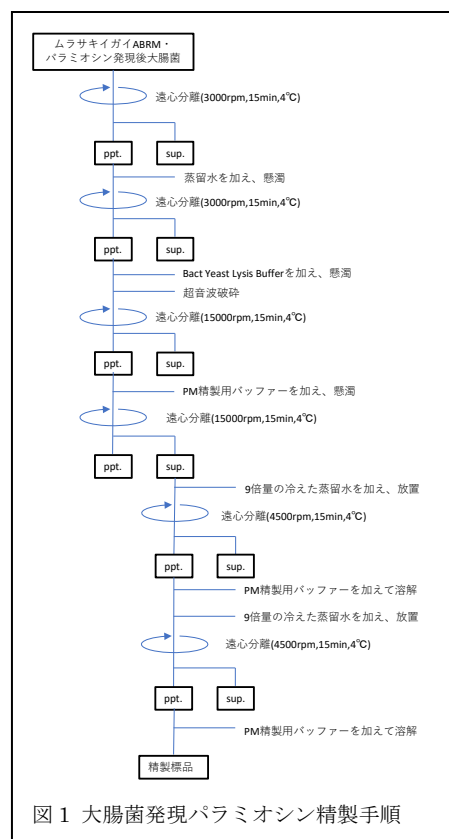


図1 大腸菌発現パラミオシン精製手順

アコヤガイ貝殻と真珠の真珠層は同じ構造をしていると考えられている。そこで、真珠真珠層にもパラミオシンが分布していると考え、分布解析するために免疫電顕法を実施した。

#### 4. 研究成果

(1) パラミオシンの炭酸カルシウム結晶化能の解析

大腸菌発現系を用いてパラミオシンを合成し、図1の方法で精製した。その結果、パラミオシンを単一成成分として得た(図2)。120 mLの培地を用いた培養で約3.85 mgのパラミオシンが得られた。

カルサイト形成条件で炭酸カルシウム結晶形成実験を行ったところ、パラミオシン非存在下と存在下ともに約3~5  $\mu\text{m}$ の菱面体の結晶が観察された(図3)。アラゴナイト形成条件で同様の実験を行ったところ、パラミオシンを含まないコントロールにおいては、アラゴナイトと考えられる約1~3  $\mu\text{m}$ の針が放射状に広がった結晶のみが観察された。パラミオシンを加えた条件においては、アラゴナイトと考えられる約1~3  $\mu\text{m}$ の針が放射状に広がった結晶だけでなく、約20  $\mu\text{m}$ ~60  $\mu\text{m}$ の板状の凝集体が観察された(図4)。

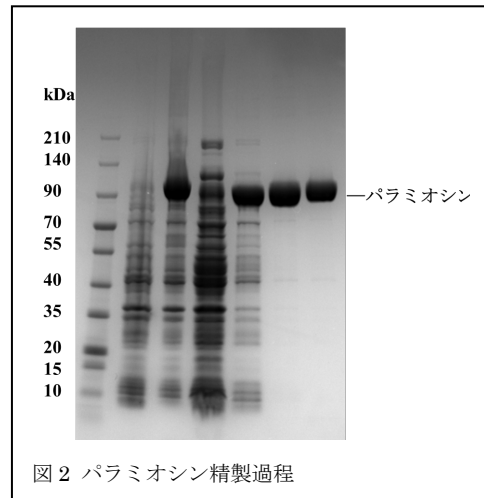


図2 パラミオシン精製過程

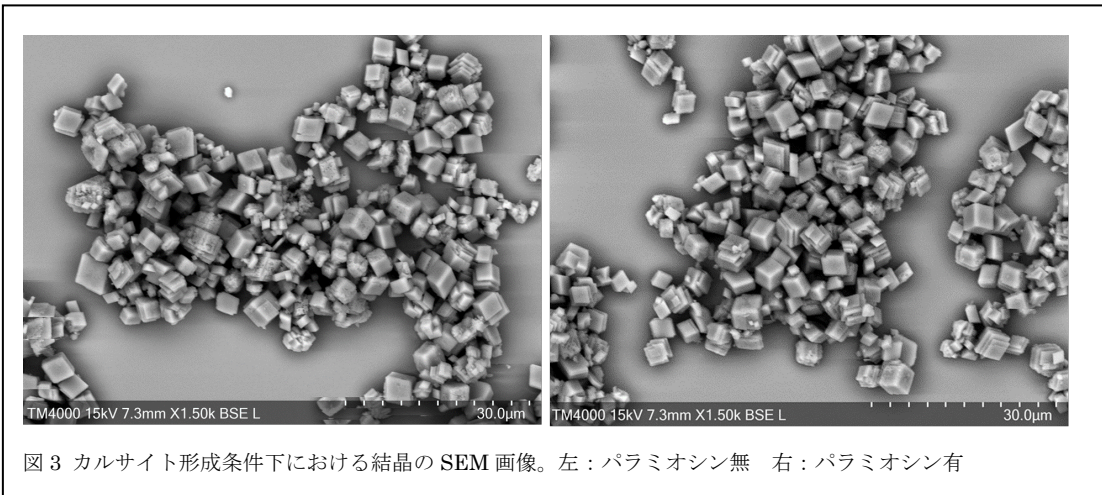


図3 カルサイト形成条件下における結晶のSEM画像。左：パラミオシン無 右：パラミオシン有

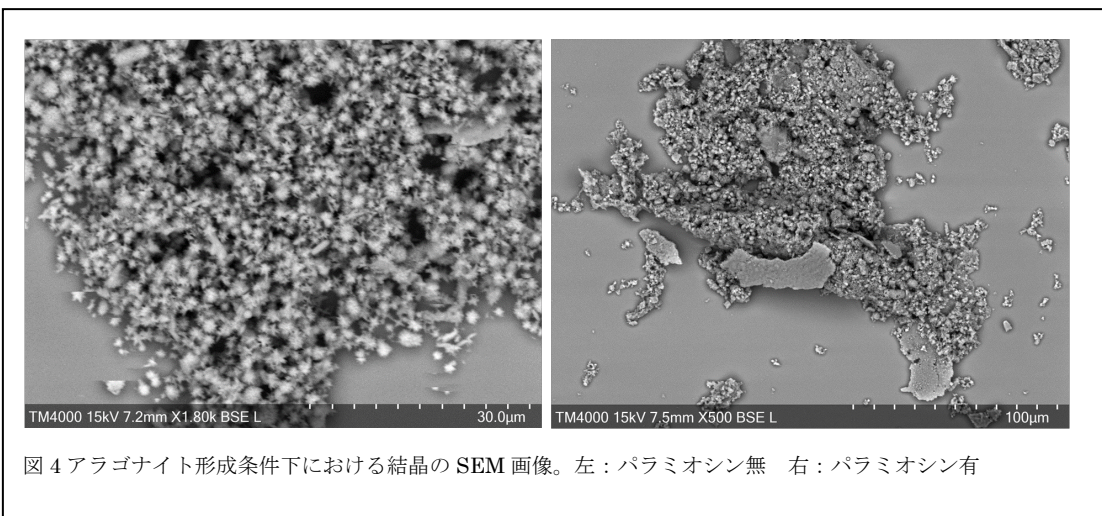


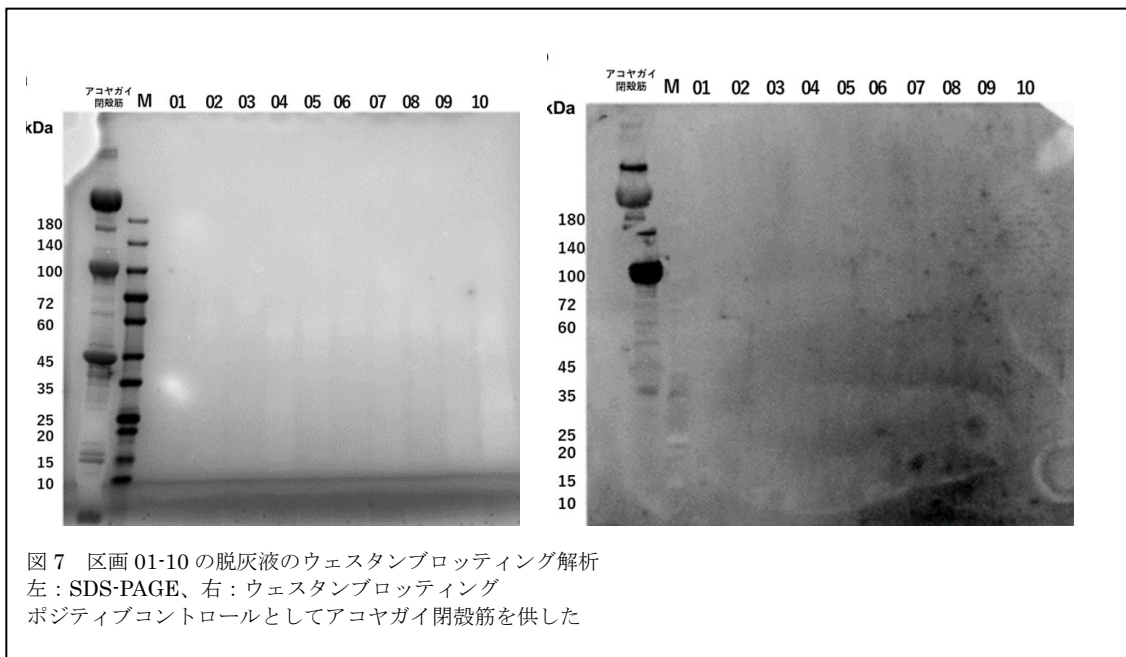
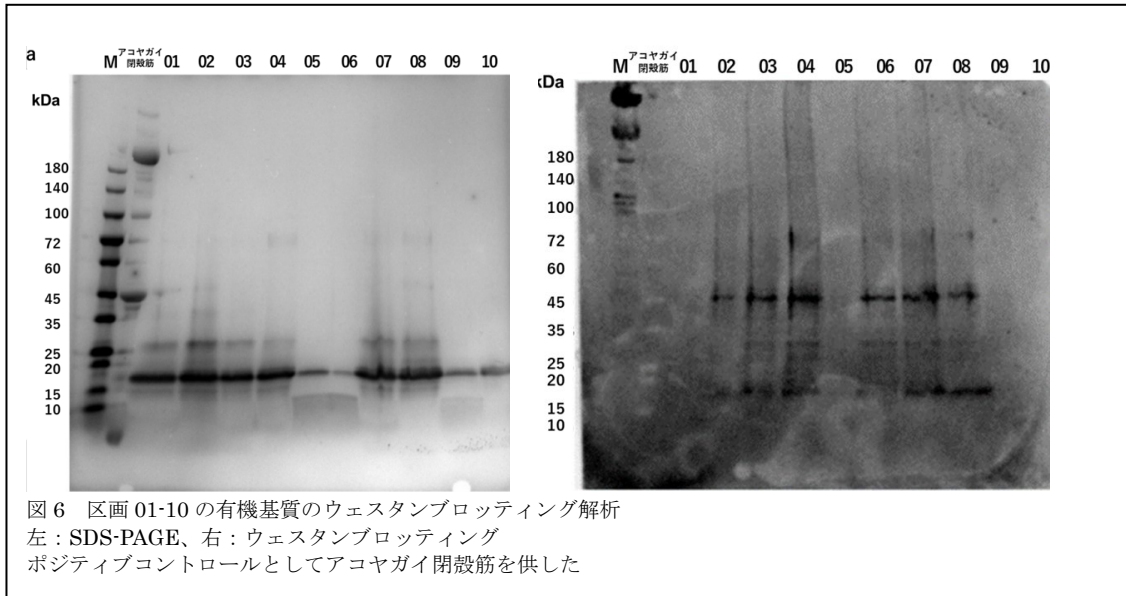
図4 アラゴナイト形成条件下における結晶のSEM画像。左：パラミオシン無 右：パラミオシン有

(2) アコヤガイ貝殻におけるパラミオシンの分布解析

アコヤガイ貝殻をアコヤガイ貝殻からディスクグラインダーを用いて稜柱層を完全に除去し真珠層のみにした。1 cm × 1 cm 程度の大きさに区画し、PCB カッターで細断して切片を作製した(図5)。各区画を脱灰して得られた有機基質と脱灰液を抗パラミオシン抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した(図6、7)。その結果、すべての区画にパラミオシンが検出され、パラミオシンは貝殻全体に存在していることが分かった。図6と7には代表的な結果のみを示す。

	01	02	03	04	05		
06	07	08	09	10	11	12	
13	14	15	16	17	18	19	
20	21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31	32	33	34	35
36	37	38	39	40	41	42	43
44	45	46	47	48	49	50	51
52	53	54	55	56	57	58	59
60	61	62	63	64	65	66	67

図5 区画したアコヤガイ貝殻真珠層



(3) 真珠真珠層におけるパラミオシンの分布解析

アコヤガイ真珠(不良真珠)を、光硬化樹脂を用いて包埋し、ロースピードダイヤモンドホイールソーに取り付け、0.2mm幅に切断した(図8)。一次抗体として抗パラミオシン抗体を二次抗体として金コロイド標識抗体を用いて反応させ、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した結果、抗体が反応した場所が、白点として検出された(図9)。その結果、真珠核が接触していたところや真珠層表面などにパラミオシンが分布していることが分かった。



図8 真珠切片の作製

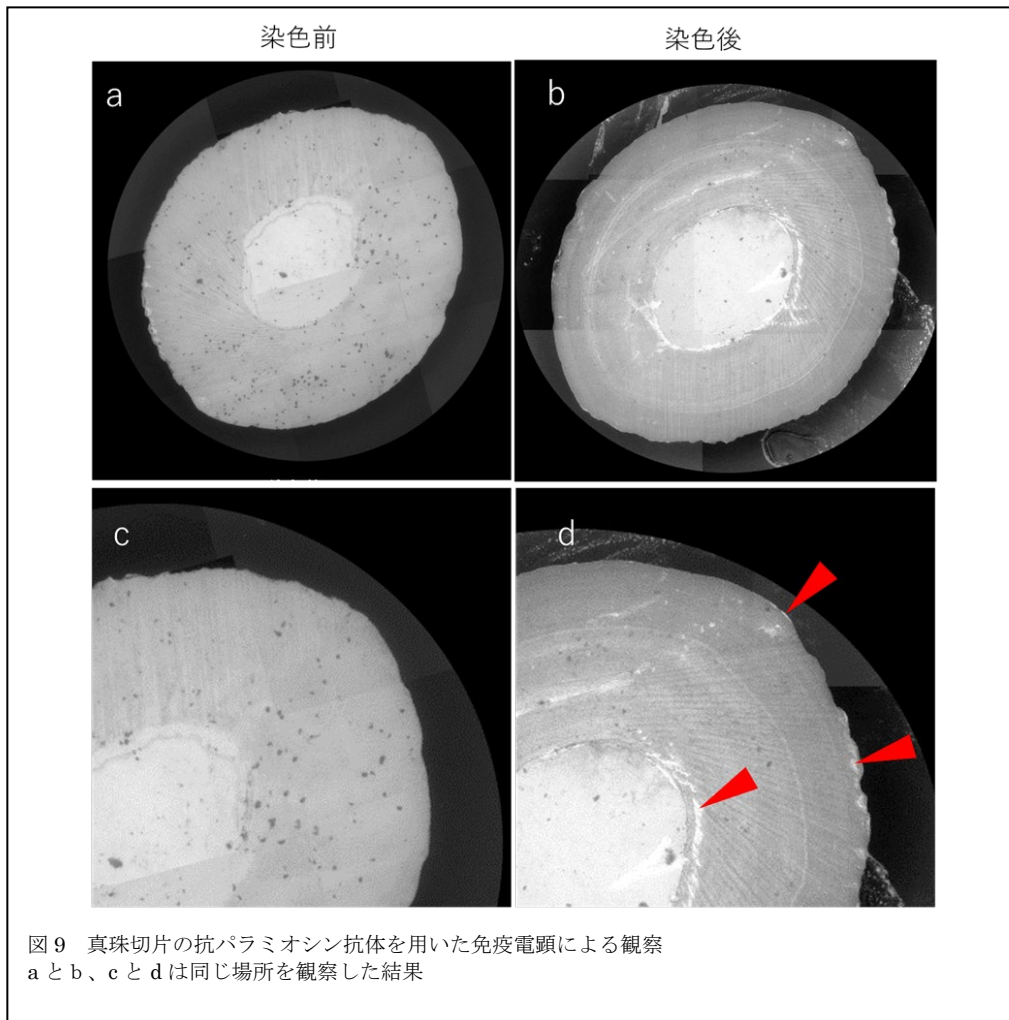


図9 真珠切片の抗パラミオシン抗体を用いた免疫電顕による観察  
aとb、cとdは同じ場所を観察した結果

本研究の結果、パラミオシンがアラゴナイト形成に関与することが示された。また光輝層だけでなく真珠層に広く存在し、パラミオシンは有機基質に結合している可能性が示された。アコヤ真珠の真珠層にも存在が確認されたが、パラミオシンがアラゴナイト結晶形成に影響を及ぼすことから、真珠の品質にかかわっていると示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Futagawa Kei, Ikeda Haruka, Negishi Lumi, Kurumizaka Hitoshi, Yamamoto Ayame, Furihata Kazuo, Ito Yutaka, Ikeya Teppei, Nagata Koji, Funabara Daisuke, Suzuki Michio	4. 巻 40
2. 論文標題 Structural and Functional Analysis of the Amorphous Calcium Carbonate-Binding Protein Paramyosin in the Shell of the Pearl Oyster, Pinctada fucata	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 8373 ~ 8392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.3c03820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吹上瑞季・前山薫・永井清仁・鈴木道生・船原大輔
2. 発表標題 真珠の真珠層に含まれる筋タンパク質パラミオシンの検出
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤直久・岡村美里・中川遥香・永井清仁・前山薫・鈴木道生・柴田敏行・柿沼誠・船原大輔
2. 発表標題 アコヤガイ貝殻真珠層におけるアマノリ類系状体の分布とその形状解析
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川遥香・岡村美里・山本彩愛・柴田敏行・鈴木道生・船原大輔
2. 発表標題 アコヤガイの貝殻と閉殻筋の接着面に形成される光輝層における筋タンパク質の存在について
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本華子・前山 薫・永井清仁・水谷雪乃・鈴木道生・船原大輔
2. 発表標題 アコヤガイ真珠におけるパラミオシンの局在解析
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 牧野菜月・水谷雪乃・鈴木道生・船原大輔
2. 発表標題 アコヤガイ貝殻真珠層におけるパラミオシンの分布解析
3. 学会等名 令和5年度マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 船原大輔
2. 発表標題 アコヤガイの貝殻構造についての新しい発見
3. 学会等名 真珠研究シンポジウム2023
4. 発表年 2023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)・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
---------	---------