

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24654167

研究課題名(和文) 軟体動物の貝殻微細構造：ナノスケールの新規系統学的形質の探索

研究課題名(英文) Molluscan shell microstructure in search of novel nano-scale phylogenetic characters

研究代表者

佐々木 猛智 (Sasaki, Takenori)

東京大学・総合研究博物館・准教授

研究者番号：70313195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：軟体動物の様々なグループの貝殻の微細構造を詳細に観察し、微細構造を分類した。その結果を分子系統解析に基づく系統仮説と比較し、系統と微細構造の対応を検証した。各微細構造は、走査型電子顕微鏡による観察結果に加えてアラゴナイトとカルサイトの決定を行い、結晶方位解析の比較を行うことにより特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Molluscan shell microstructures were observed and compared in detail across various taxonomic groups. Phylogenetic correspondence is evaluated between molecular phylogenetic trees and taxonomic distribution of microstructures. Each microstructure is characterized by a combination of electron microscopy, distinction of aragonite and calcite, and crystallographic analysis.

研究分野：分類学

キーワード：微細構造 軟体動物 貝殻 バイオミネラル

1. 研究開始当初の背景

大部分の絶滅生物は貝殻のように石灰化した部分が化石として産出する。その化石から系統学的情報を得るためには硬組織に注目した研究が必要であるが、その精度を向上させるためには硬組織をよりミクロに研究することが重要であると考えられる。

貝殻構造の研究は古くから行われており Bogild (1930)が軟体動物の貝殻の断面を光学顕微鏡で観察した研究が出发点である。その後 1970 年代以降は走査型電子顕微鏡が導入され、微細構造の比較と記載が行われてきた。その結果、貝殻は稜柱構造、真珠構造、葉状構造、交差板構造などの微細構造からなることが明らかにされ、それらの形質の組み合わせが系統推定や上位分類群の同定に有効であると考えられてきた(Carter et al., 1990 など)。

一方、21 世紀に入り、バイオミネラリゼーションの観点から生体鉱物の研究が盛んに行われるようになってきている。その結果、結晶の構造から殻の有機物、タンパク質の配列からゲノムまで精度の高い研究が行われるようになってきているが、その大半は真珠の形成メカニズムの解明を目指したものであり、系統分類学的研究に用いられた例はほとんどない。そこで、最先端の鉱物学的手法を組み合わせることで殻体の比較研究に応用すれば微小な系統学的新規形質を抽出できると考えたことから本研究計画の着想を得た

2. 研究の目的

本研究の目的は、ナノスケールの微細構造に注目し、軟体動物の硬組織の微細構造から系統学的研究に有用な新しい形質を発見する手法を確立し、化石種の系統学的研究に応用することである。具体的には、(1)貝殻を構成する結晶を高解像度かつ効率的に観察する手法を確立する、(2)様々な分類群で比較を行い新規形質を発見する、(3)有機物と殻の関係にも注目する、(4)化石から情報を抽出するための研究法を模索する、の4つのサブテーマからなる。これらの研究を組み合わせることにより、貝殻からより多くの系統分類学的情報を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1)殻層の巨視的構造の確認：ナノスケールの研究に入る前に、マイクロメートルスケール以上の構造の確認を行う。貝殻は複数の殻層からできており、その数と分布を確認する。貝殻をダイヤモンドカッターで切断し、アセテートピールを作成し、光学顕微鏡で撮影する。

(2)走査型電子顕微鏡(SEM)による撮影：まず、簡易型の SEM(Hitachi S-2250N, Keyence VE-8800)を用い低倍で全体像を撮影する。次に電界放射型 SEM(FE-SEM: Hitachi S4500)を用い、微小領域の高倍率撮影を行う。最高倍率は 10 万倍である。この過程で、微細構

造の2次構造以下の構造を明らかにする。サンプルの処理は、酸処理(エッチング)、アルカリ処理(有機物除去)、無処理のものを作成する。さらに、撮影の方向は、成長方向に垂直、成長方向に平行、および殻の内表面の3通方向から行い、3次的に立体構造を明らかにする。

SEM-EBSD: FE-SEM に装着された後方散乱電子回折装置(EBSD)(Thermo Noran PhaseID:)を用いて微細構造の撮影と同時に結晶方位解析を行う。EBSDによって得られるパターン映像(菊池パターン)を撮影し、小暮研究室が開発したプログラム(Kameda et al., 2007)を用いて結晶方位を特定する。また、貝殻は炭酸カルシウムからなっているが、アラゴナイト、カルサイトの多形があり、各微細構造がそれぞれの多形からなるかを決定する。

FIB-TEM: 結晶の内部構造の詳細を明らかにするために透過型電子顕微鏡(TEM)(JEOL JEM-2010)を用いて撮影する。TEM用のサンプルは電子線を透過する程度まで薄くする必要があり、集束イオンビーム装置(FIB)(Hitachi FB-2100)を用いてアルゴンイオンによる削り出しにより作成する。さらに、集束入射ビームを用いて菊池パターンの解析(Saruwatari et al., 2008)を行い、小暮研究室が開発したプログラムを応用して結晶方位を決定する。菊池パターンが明瞭に得られない場合は、電子回折パターンを用いて結晶方位を決定することができる。

結晶方位の分析は多数の結晶に対して行い、結晶軸、格子面の極点の分布はステレオ投影図に表す。結晶全体の形態は立体図として表現する。様々な微細構造の結晶について、結晶方位を精密に測定し比較することが有効であると考えられる。

有機物分析：殻には有機物が含まれており、その存在は脱灰後の殻を SEM 撮影するか、あるいは TEM 像によっても確認することができる。有機物の存在形態が結晶の形態と対応すると予想されるため、有機物の SEM 撮影を試みる。

4. 研究成果

(1)腹足綱カサガイ類：カサガイ類は腹足類中で最も初期に分岐したクレードであると考えられており、腹足類における貝殻の進化を考える上で重要な存在である。8科25属55種のカサガイ類の貝殻微細構造を比較検討した結果、稜柱構造、葉状構造、交差板構造に18の微細構造が識別され、それぞれアラゴナイト、カルサイトの分布を特定した。それらの形質状態の分布を近年発表された分子系統樹と対比させた結果、カサガイ類の貝殻微細構造の進化について下記のような仮説が考えられる。

(1)カサガイ類の殻層の数は3層から6層まで様々である。最も原始的な状態では4層の殻層を持つ。(2)カサガイ類の共通祖先はM+1層に同心状方向の交差板構造を持っていたと推定される。(3)多くの属が特異的な組み合わせ

せの微細構造を持っている。属レベルで見られる特異性は固有派生形質である。(4) 祖先的なカサガイ類はアラゴナイトとカルサイトを両方持っており、カルサイト層をアラゴナイト層の外側に作る。

(2) 腹足類異鰓類：異鰓類は、軟体動物門腹足綱に属し、陸貝やウミウシ類を含むクレードである。その系統関係と上位分類体系は依然流動的な部分があるが、10以上のサブグループに分類されてきた。これらのグループのうち代表的な種の貝殻微細構造を走査型電子顕微鏡で撮影し比較した。その結果分かったことは以下のように要約される。(1) 異鰓類の貝殻は交差板構造を主体としており、他の構造はほとんど見られない。(2) 交差板構造は複数の層からなり、多いものでは5層ある。(3) 最外層は薄い均質構造に覆われている。(4) 浮遊性の翼足類のみ螺旋構造を持ち、交差板構造が変化したものであると考えられる。(5) 貝殻が退化的なグループでは、殻が薄くなり、殻層の数も少ない。異鰓類の進化の過程では微細構造は極端に大きく変化することなく、生態や生存戦略の違いによって、貝殻のマクロな形態に差が生じているものと考えられる。

(3) 二枚貝綱翼形亜綱フネガイ科アカガイ：アカガイの外層は外側に混合稜柱構造、内側に交差板構造が形成され、これら構造の外層に占める割合は周期的に変化する。酸素同位体比から復元された水温記録と対比すると、高水温期に交差板構造が厚く発達し、低水温期には混合稜柱層が厚く発達することがわかった。本種は冬の低水温期と夏の高水温のピークの直後に成長障害輪を形成しており、断面で微細構造を観察することで、夏・冬の障害輪を見分けることができる。日本近海、韓国、ロシア産のアカガイの対比より、南域の貝ほど高水温期が長いために、交差板構造を厚く発達させている期間が長いことがわかった。

(4) 二枚貝綱原亜綱：原鰓類の貝殻微細構造を評価するために分子系統解析を行った。系統解析には、ミトコンドリア遺伝子(COI, 16S)と核遺伝子(H3, 18S, 28S rDNA)の計5領域の塩基配列の解読を行ったほか、Sharma et al. (2012) による核遺伝子4種のデータを追加し、計6725塩基対について系統推定を行った。その結果、4つある原鰓亜綱の上科(Solemyoidea, Manzanelloidea, Nuculoidea, Nuculanoidea)の単系統性は、高いブートストラップ値で支持された。ただし、形態形質による過去の分類によりNuculoideaとされていたSareptidaeはNuculanoideaのクレードに含まれることが明らかになった。このためSareptidaeは上科レベルで分類を改める必要があることを指摘した。

次に、原鰓類の貝殻微細構造を記載し、分子系統解析の結果と照合することにより系統学的な再評価を行った。走査型電子顕微鏡(SEM)による微細構造の観察の結果、各分類群の微細構造組み合わせは、上科ごとにはっ

きりと異なる傾向を示した。キヌタレガイ科では微細構造の組み合わせが従来の分類体系と整合ではないこと、従来二枚貝では知られていなかった新しい構造である網目状構造を持つことを報告した。Nuculoideaは全ての種の殻の内層にシート状真珠構造があり、Solemyoideaは外層に特異な稜柱構造を持つ。また、ManzanelloideaとNuculanoideaは均質構造を有することで特徴づけられた。そしてこのような貝殻微細構造組み合わせに基づいたグルーピングと分子系統樹の結果は整合的であった。Sareptidaeの系統上の位置が上科レベルで改められるという分子系統解析の結果は、貝殻微細構造の形質でも支持された。

(5) 結晶方位解析：原鰓類を対象に結晶方位解析に基づき貝殻微細構造の分類の再評価を行った。従来の研究では、SEMによる形態と鉱物種の対応関係だけを根拠に分類されることが多かったが、結晶方位解析を併用することで、各微細構造の類似度をより詳細に評価できることを確認した。単結晶XRDの回折パターンから(111)面と(012)面の結晶方位を再構築したところ、SolemyoideaとNuculanoideaは上下の殻層で結晶方位があまり変化しないのに対して、Nuculoideaは外層・中層・内層で全て結晶方位パターンが異なっていることが明らかとなった。また、SolemyoideaとNuculoideaでは、科・属レベルで結晶方位に違いがみられた。

(6) アラゴナイト双晶の密度の比較：様々な軟体動物の貝殻のアラゴナイトの{110}双晶の密度をXRDを用いて決定し、比較した。その結果、双晶の密度は貝殻の微細構造によって大きく異なっていることが明らかになった。真珠層は腹足綱、二枚貝綱ともに双晶の密度が低い。一方、交差板構造では、双晶の密度はグループによって異なっている。TEM観察の結果から軟体動物の双晶には2つのタイプが存在することが明らかになった。

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4件)

- 1) Nishida, K., Ishimura, T., Suzuki, A. & Sasaki, T. 2012. Seasonal changes in shell microstructures of the bloody clam, *Scapharca broughtonii* (Mollusca: Bivalvia: Arcidae). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 363-364: 99-108.
- 2) Sato, K., Nakashima, R., Majima, R., Watanabe, H. & Sasaki, T. 2013. Shell microstructures of five Recent solemyids from Japan (Mollusca: Bivalvia: Protobranchia).

- Paleontological Research 17(1): 69-90.
- 3) Hrabankova, I., Fryda, J., Sepitka, J., Sasaki, T., Frydova, B. & Lukes, J. 2013. Mechanical properties of deep-sea molluscan shell. Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering 16 (Supplement 1): 287-289.
 - 4) Kogure, T., Suzuki, M., Kim, H., Mukai, H., Checa, A. G., Sasaki, T. & Nagasawa, H. 2014. Twin density of aragonite in molluscan shells characterized using X-ray diffraction and transmission electron microscopy. Journal of Crystal Growth 397: 39-46.
- [学会発表](計 22 件)
- 1) 酒井理恵・鍵 裕之・亀形菜々子・佐々木猛智. 2013.1.26. カサガイ類(腹足綱)における貝殻微細構造と構成鉱物の進化. 日本古生物学会第 162 回例会.
 - 2) 西田 梢・石村豊穂・佐藤 圭・佐々木猛智. 2013.1.26. 二枚貝リュウキュウサルボウ亜科の貝殻微細構造と水温の関係 系統進化・古生物地理の視点から 日本古生物学会第 162 回例会.
 - 3) 佐藤圭・渡部裕美・佐々木猛智, 「日本産原鰓亜綱(二枚貝綱)における貝殻微細構造の進化」, 日本古生物学会, B06W, 神奈川県横浜市, 2013 年 1 月
 - 4) 西田梢・石村豊穂・鈴木淳・佐藤圭・佐々木猛智, 「リュウキュウサルボウ亜科(二枚貝)における水温の微細構造形成に与える影響」, 第 7 回バイオミネラルリゼーションワークショップ, 東京 (2012 年 12 月).
 - 5) 佐藤圭・渡部裕美・佐々木猛智, 「日本近海産原鰓亜綱(二枚貝綱)の貝殻微細構造」, 第 7 回バイオミネラルリゼーションワークショップ, P20, 東京都文京区, 2012 年 12 月
 - 6) 酒井理恵・鍵裕之・亀形菜々子・佐々木猛智. 2012.12.1. カサガイ類における貝殻微細構造の進化史. 第 7 回バイオミネラルリゼーションワークショップ. 東京大学理学部小柴ホール
 - 7) 小暮敏博・鈴木道生・金恵眞・A.G. Checa・佐々木猛智・長 澤寛道. 2012.12.1. X 線回折を用いた軟体動物貝殻を構成するあられ石中の{110}双晶密度評価. 第 7 回バイオミネラルリゼーションワークショップ. 東京大学理学部小柴ホール
 - 8) Kozue Nishida, Takenori Sasaki, Toyoho Ishimura, 「Seasonal changes in shell microstructures of the bloody clam, *Scapharca broughtonii* (Mollusca: Bivalvia)」, JpGU International Symposium, Chiba (Japan) (2012 年 5 月).
 - 9) 佐々木猛智. 2012.11.9 貝殻の比較形態学: 生存戦略、生活様式と系統. 東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会 バイオミネラルリゼーションと石灰化 - 遺伝子から地球環境まで-
 - 10) 西田 梢・石村豊穂・鈴木 淳・佐々木猛智. 2012.11.9 二枚貝リュウキュウサルボウ亜科における水温の貝殻形成に与える影響 - 地球化学と進化古生物学的アプローチの融合 - 東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会 バイオミネラルリゼーションと石灰化 - 遺伝子から地球環境まで-
 - 11) 佐藤圭・渡部裕美・佐々木猛智, 「日本近海産原鰓亜綱(二枚貝綱)の貝殻微細構造」, 日本進化学会, P-80, 東京都八王子市, 2012 年 8 月
 - 12) 佐藤圭・中島礼・間嶋隆一・渡部裕美, 佐々木猛智, 「日本産原鰓亜綱(二枚貝綱)の貝殻微細構造」, 古生物学会, P40, 愛知県名古屋市, 2012 年 6 月
 - 13) 酒井理恵・鍵裕之・亀形菜々子・佐々木猛智. 2012. 6. 30. 軟体動物腹足綱カサガイ類における 貝殻微細構造の進化. 日本古生物学会 2012 年年会. 名古屋大学
 - 14) 西田梢・佐々木猛智・石村豊穂, 「アカガイの貝殻微細構造形成の地理的変異」, 日本貝類学会, 東京 (2012 年 4 月).
 - 15) 佐藤圭・中島礼・間嶋隆一・渡部裕美, 佐々木猛智, 「日本近海産キヌタレガイ類(二枚貝綱)の貝殻微細構造」, 日本貝類学会, 0-21, 東京都千代田区, 2012 年 4 月
 - 16) 佐藤圭・佐々木猛智. 二枚貝類原鰓亜綱における貝殻微細構造の進化. 第 8 回バイオミネラルリゼーションワークショップ. 2013 年 11 月 30 日. 東京大学理学部 1 号館小柴ホール.
 - 17) 佐々木猛智・西田梢・佐藤圭. 軟体動物の貝殻微細構造の多様性. 第 8 回バイオミネラルリゼーションワークショップ. 2013 年 11 月 30 日. 東京大学理学部 1 号館小柴ホール.
 - 18) 佐々木猛智・佐藤 圭・酒井理恵・西田 梢. ミクロな新規形質の探索: 貝殻微細構造に注目して. 2013.6.7. 日本動物分類学会第 49 回大会. 宮城教育大学.
 - 19) Kozue Nishida, Atsushi Suzuki, Ryosuke Isono, Yusuke Watanabe, Yukihiro Nojiri, Chiharu Mori, Mizuho Sato, Kei Sato, Takenori Sasaki, 「Temperature-controlled experiments for the shell microstructural formation of *S. broughtonii* (Mollusca: Bivalvia)」, JpGU International Symposium, Chiba (Japan) (2013 年 5 月)
 - 20) 佐藤圭・佐々木猛智. 2014 年 6 月 28 日. 二枚貝類原鰓亜綱における貝殻微細構

造の分類形質としての検討. 日本古生物学会 2014 年年会. 九州大学総合研究博物館.

- 21) 佐々木猛智・村中貴・茶木歩. 2014.12.12. 異鰓類(軟体動物門腹足綱)の貝殻微細構造の比較. 第 9 回バイオミネラリゼーションワークショップ. 東京大学大気海洋研究所.
- 22) 佐藤圭・佐々木猛智. 2014.12.12. 原鰓類(軟体動物:二枚貝綱)における貝殻微細構造の進化. 第 9 回バイオミネラリゼーションワークショップ. 東京大学大気海洋研究所.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 猛智 (SASAKI TAKENORI)
東京大学・総合研究博物館・
准教授
研究者番号: 70313195

(2)研究分担者

小暮 敏博 (KOGURE TOSHIHIRO)
東京大学・理学系研究科
准教授
研究者番号: 5028272

遠藤 一佳 (ENDO KAZUYOSHI)
東京大学・理学系研究科
教授
研究者番号: 80251411

(3)連携研究者

()

研究者番号: