

軟体動物の石灰化組織の鉍物化に関する研究XVIII

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	371
掲載ページ	p. 13-17
発行年月	1971年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat



軟体動物の石灰化組織の鉱物化に関する研究—XVIII.

外套膜が分泌する粘液の酸性多糖体*

和田浩爾・古橋 保

(1970年7月25日受理)

Studies on the Mineralization of the Calcified Tissue
in Molluscs—XVIII.Acid Polysaccharide of Mantle Mucus of
Some Marine Bivalves

Koji WADA** and Tamotsu FURUHASHI***

Sulfomucopolysaccharide or acid mucoprotein with sulfate group is detected in mantle mucus of some bivalves⁴⁻⁷), and is considered to act as a calcium carrier and provide calcium concentration high enough for the growth of shell minerals at the site of mineralization⁴). Histochemical and biochemical studies have suggested that the inner and outer mucus of the mantle of *Pinctada fucata* show metachromasia on staining with toluidine blue and are very similar to each other in their amino acid composition¹). If the acid mucous substances play the above-mentioned functional role in the calcium metabolism of molluscs, the mucus does not always form a shell. To answer this question, biochemical analysis of the acid polysaccharide was made on the inner and outer mucus of the mantle of *Pinctada fucata* and *Chlamys nobilis*.

Inner mucus adhered on the inner surface of the mantle and outer mucus secreted between the mantle and shell were collected with an injector. In each case the dry mucus obtained by addition of ethyl alcohol was digested with "pronase" at pH 8.0 and 50°C for 72 hours and subsequently with trypsin at pH 7.5 and 37°C for 72 hours. Acid polysaccharide was then separated by the cetyl pyridinium chloride treatment and analysed as described in the preceding paper²).

The amount and chemical composition of fraction A containing acid mucopolysaccharide are shown in Tables 1 and 2. The fraction contains a relatively large amount of sulfuric ester and a little amount of protein, but not chondroitine sulfate, as shown by paper electrophoresis. Galactosamine, glucosamine, galactose and glucose are detected in fraction A of both the inner and outer mantle mucus of *Pinctada fucata* by paper chromatography (Table 3). The fraction seems to be composed of sulfomucopolysaccharide or sulfated polysaccharide-protein complex.

From these results, it may be concluded that the presence of the acid mucous substance with sulfate group is necessary to induce shell mineralization though it does not always induce it.

貝殻は外套膜外側面上皮が分泌する粘液 extrapallial fluid から生成するが、内側面上皮が分泌する粘液からは生成しない。外套膜の内外側面にそれぞれ分泌される粘液の組成は全く異なるのか、両粘液の組成は

* 国立真珠研究所業績 No. 185

** 国立真珠研究所 (National Pearl Research Laboratory, Kashikojima, Mie-ken, Japan)

*** 生化学工業株式会社 (Seikagaku Kogyo Co., Ltd., Kurihama, Kanagawa-ken, Japan)

全く類似しているが外套膜内側面は粘液が貝殻になるための必要条件を満たしていないのか、あるいはどんな条件がそうとうと生体で鉱物化がおこるのかという諸問題は、生生物学にとつて最も基本的な課題であり、ひいては病的な結石の生成を解明する上でも重要な基礎研究課題である。

ところで、外套膜外側面上皮の粘液から生成する貝殻鉱物は、多くの貝類でアラレ石、ごく少数の貝類で方解石であり、いずれの結晶形になるかは貝の種類によつて決つている。また、アコヤガイの仲間のように、外套膜縁からの分泌液からは方解石が生成し、その他の外套膜外側面上皮の分泌液からはアラレ石が晶出する種類もある。生体で生じる炭酸カルシウム鉱物の同質多像形形成は多くの研究者によつて論じられており、硬組織の形成に関与する細胞の複雑な代謝によつて制約因子がつくられ、あるいは決められると考えられている。

著者の一人である WADA¹⁾ は外套膜分泌液の全アミノ酸組成を調べたが、著者らは生物系における鉱物化のある過程において局所因子として作用すると考えられる酸性多糖体の分離を行ない、その種類と存在形態を明らかにすることをここに試みた。

実験材料および方法

実験材料 英真湾にある真珠研究所多徳島臨海実験場前の筏からつり下げて飼育しておいたアコヤガイ *Pinetada fucata* の外套膜内外側面およびヒオウギガイ *Chlamys nobilis* の外套膜外側面に分泌されていた粘液をそれぞれ集めて実験に供した。外套膜外側面粘液は、長い注射針を貝殻内側面に沿わせて外套膜と貝殻との間に挿入、外套膜組織片が混入しないように注意しながら外套膜中央域（アコヤガイではアラレ石からなる真珠層域、ヒオウギガイでは方解石からなる葉片構造層域）から注射器で採液した。外套膜内側面粘液は注射針を使わずに組織片やプランクトンなどが混入しないように注意して外套膜内側面に粘着していた粘液を外套縁膜域から注射器で採液した。

酸性多糖体の抽出 集めた各粘液にそれぞれ3倍容エチルアルコールを加えて得られる沈殿物を遠心分離、無水エチルアルコールで洗滌、真空デシケーターに入れ、無水リン酸上で乾燥してから、前報²⁾にしたがつて酸性多糖体を含む分画を得た。すなわち、各乾燥物をそれぞれ50 ml の脱塩水と攪拌、乾燥物の1/1000重量の蛋白酵素「プロナーゼ」（科研化学製）を加えて溶解、pH 8.0 で50°C に72時間保温、100°C で10分間加熱、冷却後さらに市販トリプシンを乾燥物の2/1000重量に加え、pH 7.5 で37°C に72時間保温した。これらの酵素処理は前報²⁾と同様にいずれもトルオールを随時添加して行なつた。この反応液をビュスキングチューブに入れ、流水および脱塩水に対してそれぞれ2日間透析、透析内液を減圧濃縮して50 ml にした。

酸性多糖体の分離 前報²⁾と同様に、得られた各粘液の抽出液についてセチル・ピリジニウム・クロリド (cpc) を用いる酸性多糖体の分離³⁾を行なつた。なお、分画した Fr. A および Fr. B については前報²⁾と同様の方法と条件で定量分析、滷紙電気泳動、ペーパークロマトグラフィーを行なつた。

結 果

上記の方法によつて、アコヤガイの外套膜内外側面粘液とヒオウギガイの外套膜外側面粘液とから得られ

Table 1. Amounts of fractions A and B obtained by cetyl pyridinium chloride treatment from mantle mucus (mg/g dry material).

Material Fraction	<i>Pinetada fucata</i>		<i>Chlamys nobilis</i>
	Inner mucus	Outer mucus*	Outer mucus*
A	45.24	50.34	10.41
B	88.18	33.04	16.74

* outer mucus=extrapallial fluid.

た食塩画分 Fr. A と Fr. B の収量とその組成を Table 1 および 2 に示した。実験に供した試料量が十分でなかつたので、Fr. A の細かい分画を行なえなかつた。それぞれの試料の Fr. A は共にムコ物質の存在を示す指標となるヘキソサミンを含み、その含有量はヒオウギガイでアコヤガイの約 1/2 から 1/3 と少ない。

Table 2. Composition of fractions A and B of mantle mucus (per cent on dry basis of each fraction).

Component	Material	<i>Pinctada fucata</i>				<i>Chlamys nobilis</i>	
		Inner mucus		Outer mucus		Outer mucus	
		Fr. A	Fr. B	Fr. A	Fr. B	Fr. A	Fr. B
Crude protein (as BSA*)		5.85	4.97	5.52	2.50	9.51	4.04
Hexose (as Glucose)		9.75	42.90	14.80	75.94	2.46	10.63
Hexosamine (as Glucosamine)		12.59	2.54	18.55	1.93	6.66	1.22
Galactosamine		1.27	—	5.00	—	1.22	—
Sulfuric ester				19.04			
Inorganic sulfate				4.96			

* Bovine serum albumin.

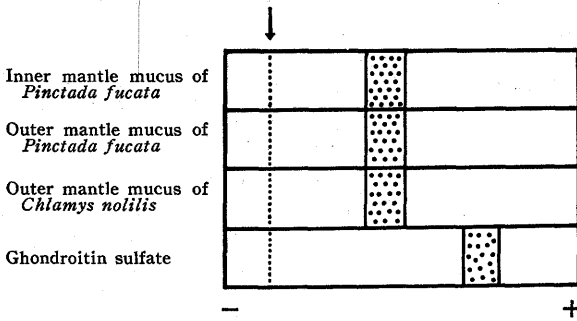


Fig. 1. Schematic electrophoretic patterns of the acid mucopolysaccharide of mantle mucus. Arrow: Origin of electrophoresis.

Table 3. Carbohydrate of the acid mucopolysaccharide of mantle mucus of *Pinctada fucata* detected by paper chromatography.

Material	Galactosamine	Glucosamine	Galactose	Glucose
Inner mucus	+	+	+	+
Outer mucus	+	+	+	+

側面および外側面に分泌されていた粘液は共にガラクトサミン、グルコサミン、ガラクトース、グルコースなどを含有し、類似の構成糖からなることがわかる。なお、アコヤガイの外殻膜粘液はヘキソース、特にグルコースが相当量みられるが、これが粘液採取時に軟体部から流入したグリコーゲン様物質に由来するのか、粘液の固有成分であるかは明らかでない。

考 察

貝殻の石灰化機構と関連して、二枚貝の外殻膜粘液の化学組成が分析され、硫酸ムコ多糖体ないし硫酸基を有するムコ蛋白の存在が報告されている。すなわち、田中・波多野^{4,5)}は Ca と結合した硫酸基を有する

また、この画分はいずれも蛋白質を含む。

Fig. 1 は Fr. A と市販のコンドロイチン硫酸を沓紙電気泳動で比較した結果である。コンドロイチン硫酸にかなり遅れて移動するトルイジンブルーで鮮やかなメタクロマジー陽性を示すスポットは、ヒオウギガイの外殻膜外側面粘液で tailing しているのを除けば、それぞれの試料で互によく似た挙動を示す。しかし、同時に泳動させた Fr. B はいずれの外殻膜粘液でもメタクロマジー陰性であった。Table 2 の分析結果および沓紙電気泳動の挙動から、外殻膜粘液の Fr. A でみられるトルイジンブルーによるメタクロマジーは硫酸エステルによると考えられる。

一次元ペーパークロマトグラフィーにより、アコヤガイの外殻膜内外側面粘液の Fr. A の糖を決定し、その結果を Table 3 に示した。外殻膜内

複合蛋白質がアコヤガイの外殻膜粘液中に多量に存在し、この蛋白質が Ca と結合していることを明らかにした。堀口^{6,7)} もアコヤガイの外殻膜粘液およびイケチョウガイの外殻膜に硫酸ムコ多糖体が多量に存在し、その構成成分は両種間で相違するが、硫酸基が軟体動物の Ca 代謝に関係する可能性を同様に指摘した。一方、左右田・小山⁸⁾ は軟体動物の粘液に強いグルコシルファクターゼ活性を認め、後に左右田⁹⁾ は粘液の硫酸基と結合した Ca がスルファターゼの作用を受けて遊離し貝殻石灰化に寄与すると報告した。ところで、上述の研究はいずれも外殻膜内外側面のいずれに分泌された粘液であるかを区別して分析を行なっていない。すでに緒言で指摘したように、粘液は外殻膜内外両側面に分泌されるにもかかわらず、貝殻は外殻膜外側面のみ形成される事実を考慮すると、外殻膜の分泌液から貝殻が形成される機構をさらに解析するためには、外殻膜内側面および外側面粘液をそれぞれ分離し、その化学組成を明らかにする必要がある。

今回の実験は、外殻膜から放出された分泌物だけを内側面と外側面とから注射器で別々に採取して実験に供した。また、酸性多糖体の分離にあたってセチル・ピリジニウム・クロリド (cpc) を用い、酸性多糖体を一度 cpc との複合体とし水不溶物として沈殿、後に cpc を除去する方法で分離した。その結果、アコヤガイの外殻膜内側面粘液と外側面粘液は共に類似の硫酸ムコ多糖体ないし硫酸ムコ多糖体と結合した蛋白質——多分、後者と考えられる——を含み、グルコサミン、硫酸を構成成分とすると考えられる。同様に、ヒオウギガイの外殻膜外側面粘液にも量的な差はあるが硫酸多糖体様物質ないし硫酸ムコ多糖体と結合した蛋白質が存在するが、これらの二枚貝の外殻膜粘液中にコンドロイチン硫酸が存在しているかどうかは、電気泳動の結果、構成糖の組成から疑わしい。

今回の実験結果とアコヤガイの外殻膜内外側面粘液の氨基酸組成が互いに全く類似しているとの WADA¹⁾ の報告とを比較すると、少なくともアコヤガイにおいては外殻膜の内側面に分泌される粘液と外側面に分泌される粘液とは互いに良く類似した成分からなると想像できる。もし分泌物の成分が全く同じであったと仮定するならば、分泌物の有機成分が貝殻有機基質として固化し、貝殻が形成されるために必要な条件はなにかということが問題となる。ところで、アコヤガイの外殻膜内側面上皮と外側面上皮とは機能に差があるとの町井¹⁰⁾ の研究から、固化条件は細胞の働きによつて分泌物の有機成分に与えられると考えられる。一方、分泌物の有機成分が固化条件を備えていたとしても、分泌物の有機成分の固化を阻害する因子が外界に存在するならば、分泌物の有機成分は外界と直接接触する外殻膜内側面では固化できず、殻皮によつて外界と分離されている外殻膜外側面で固化するであろう。あるいは、この両方が問題になるのではなからうか。

かかる固化条件が満たされ、その阻害因子が除かれて有機基質が形成され、そこに炭酸カルシウムの過飽和濃度が作られた場合、WADA^{1,11)} が示唆したように、貝殻鉱物が全くそこに存在していない時には、メタクロマジー陽性の基質蛋白質——硫酸基を有するグリコプロテイン²⁾——が貝殻鉱物の結晶核生成を誘起するのに有効に働くと思像できる。

要 約

1. アコヤガイ、ヒオウギガイの外殻膜から分泌された粘液を注射器で採取し、セチル・ピリジニウム・クロリドを用いて酸性多糖体を分離した。
2. アコヤガイ、ヒオウギガイの外殻膜より分泌される粘液は、いずれも硫酸ムコ多糖体ないしそれと結合した蛋白質を含むほか、多糖類や蛋白質を含む混合物である。
3. アコヤガイの外殻膜内外側面粘液の Fr. A よりガラクトサミン、グルコサミン、ガラクトース、グルコースなどの糖が検出された。
4. アコヤガイの外殻膜内側面粘液と外側面粘液は全く類似した成分からなると想像できる。

文 献

- 1) K. WADA: This Bull., 33, 1007~1012 (1967).
- 2) 和田浩爾・古橋 保: 本誌, 36, 1122~1126 (1970).

- 3) S. SCHILLER, G. A. SLOVER, and A. DORFMAN: *J. Biol. Chem.*, **236**, 983~987 (1961).
- 4) 田中正三・波多野博行: アイソトープ研究利用総覧, 307~311 (1956).
- 5) S. TANAKA and H. HATANO: *Rep. Nippon Inst. Sci. Res. Pearls*, **4**, Rep. No. 73, 1~8 (1963).
- 6) 堀口吉重: 本誌, **22**, 463~466 (1956).
- 7) 堀口吉重: 三重県大産産紀要, **3**, 399~406 (1959).
- 8) 左右田徳郎・小山誠太郎: 日化誌, **56**, 1388~1391 (1935).
- 9) 左右田徳郎: 科学, **7**, 101~103 (1937).
- 10) 町井 昭: 国立真珠研報, **8**, 884~890 (1962).
- 11) 和田浩爾: 「硬組織研究」(荒谷真平編), 399~430, 医歯薬出版, 東京 (1969).