

平成 2 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658183

研究課題名（和文）真珠タンパク質フィルムによる真珠の形成

研究課題名（英文）Formation of pearl using pearl protein film

研究代表者

加納 哲（Kanoh, Satoshi）

三重大学・生物資源学研究科・教授

研究者番号：80177550

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000 円、（間接経費） 810,000 円

研究成果の概要（和文）：申請者は真珠を輝かせているマトリックスタンパク質をアコヤガイ貝殻からフィルムとして分離した。これを「真珠タンパク質フィルム」と名付け、その機能を探り基礎データを得ることを目的とした。このフィルムをガラス板上に貼り付け、アコヤガイおよびマガキの外套膜と貝殻の間に挿入し3～6ヶ月間飼育した。アコヤガイに新たにマトリックスタンパク質層、稜柱層および異常形態の稜柱層が確認された。一方、マガキは異常なマトリックスタンパク質層が形成された。新生した各層は挿入されたこのフィルムを異物と認識し、保護のために結晶層を作り出したと考えることもできる。これらの結晶層を真珠形成に利用するにはさらなる検討を要する。

研究成果の概要（英文）：The authors isolated the matrix protein that contributes luster to pearls as a film from the pearl oyster shell and pearl. We named it, the pearl protein film. This study aimed to obtain basic data for the application and development of the pearl industry.

The samples attached the pearl protein film on a glass plate were inserted between the shell and the mantle of the pearl oyster and pacific oyster. These oysters were kept in pearl farm for 3-6 months. Matrix protein layer, prismatic layer and the abnormal prismatic layer were observed newly, in the pearl oyster shell. On the other hand, abnormal matrix protein layers were formed in the pacific oyster. When foreign protein film was inserted into pearl oyster and pacific oyster respectively, it could be considered that newly observed matrix protein layer, prismatic layer and the abnormal prismatic layer were generated for protection of each shellfish. Further investigations were required for the purpose of this study.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水圏応用科学・水圏生命科学

キーワード：真珠 アコヤガイ タンパク質 シート フィルム 結晶

## 1. 研究開始当初の背景

生物がミネラルを沈着してゆくプロセスはバイオミネラリゼーションとよばれ生物の機能研究上、関心をもたれている。真珠もその一環として研究され、直接産業に結びつく点で重要な研究対象である。日本やフランスでは研究事例も多く、近年、中国がこの分野で強い関心を示している。真珠はカルシウムとバイオミネラリゼーションタンパク質が層状構造を形成している。最近の研究では、Pif80 と呼ばれるタンパク質がカルシウム原子を並べて結晶層を造ってゆく役割を担っていることが報告され注目されている (Suzuki et al., 2009, *Science*)。

申請者は御木本製薬およびミキモト真珠研究所との共同研究において、真珠から真珠光沢を持つ真珠層タンパク質フィルムを分離した。そのフィルムは真珠と同様の干渉光を発していた。このタンパク質フィルムの物理化学的特性についてはすでに報告した (平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 2011 年真珠国際シンポジウム)。

Watabe & Wilbur (1960, *Nature*) は貝類の有機マトリックスシートの小片がガラス上にカルシウム結晶を析出することを報告した。申請者の上記の結果とこの報告から、真珠や貝殻から調製した真珠タンパク質フィルムを貝類の外套膜に挿入してカルシウム結晶層を析出させることができれば、アコヤ真珠を造り出す手法に改善を加えることができる。

## 2. 研究の目的

申請者は真珠の輝きをつくりだしているマトリックスタンパク質を真珠や貝殻から分離した。本研究はこのマトリックスタンパク質を真珠タンパク質フィルムと名付け、その機能を探ることにより、真珠産業へと応用展開するための基礎データを得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

アコヤガイの真珠タンパク質フィルムをアコヤガイやマガキの軟体部に挿入し、真珠タンパク質フィルムの結晶生成能について、アコヤガイとマガキで比較した。

### (1) アコヤガイ貝殻から真珠タンパク質フィルムの調製

アコヤガイの貝殻から真珠タンパク質フィルムを作成し、カルシウム結晶の生成方法を調べるための基となる材料とした。アコヤガイの貝殻から稜柱層を削り落とし真珠層のみの貝殻片とし、平成 23 年度日本水産学会秋季大会および 2011 年真珠国際シンポジウムで報告した方法によってアコヤガイ真珠タンパク質フィルムを調製した。

### (2) アコヤガイ真珠タンパク質フィルムのアコヤガイおよびマガキへの挿入

#### 1 真珠タンパク質フィルムの挿入

アコヤガイの真珠タンパク質フィルムを外套膜外面上皮と貝殻の間に挿入し約 3 ヶ月間、養殖場で飼育した。

#### 2 ガラス板に張り付けた真珠タンパク質フィルムの挿入

アコヤガイおよびマガキのそれぞれ 5 個体を 2-フェノキシエタノールを少量混合した人工海水に入れた。真珠タンパク質フィルムを薄く剥がし概ね 8mm 四方のサイズに切り分け、人工海水中で十分に濯いだ後、5mm 四方のガラス板の上に被せ、アコヤガイおよびマガキの外套膜外面上皮と貝殻の間にガラス面が貝殻側に向くように挿入した。この作業を各 5 個体に行い、網に入れて養殖場の海に戻し、3 ~ 6 ヶ月間飼育した。

### (3) 真珠タンパク質フィルム周辺に作り出された結晶様構造の観察

真珠タンパク質フィルム周辺の微細構造を観察するため、切り出した試料を金でコーティングし、走査型電子顕微鏡 S-4000 (日立) を用いて観察した。また、真珠タンパク質フィルム剥離後の貝殻上の結晶状構造物のマ

クロ構造は Dino-Lite pro 500x (ANMO Electronics Corporation)を用いて観察した。ガラス板を含む真珠タンパク質フィルムの横断面の構造は実体顕微鏡 SZX12( OLYMPUS ), 金属顕微鏡 BX51( OLYMPUS ) デジタルマイクロ스코プ VHX-700F ( KEYENCE ) を用いて観察した。

#### (4) ガラス板を含む真珠タンパク質フィルム周辺の横断面の構造解析

##### 1 X線照射によるガラス板の位置の特定

アコヤガイ真珠タンパク質フィルムを挿入し飼育したアコヤガイとカキ各4個体を回収し、それぞれの貝殻にX線照射装置 Ray8400(松定プレジジョン)でX線を照射してガラス板の位置を特定した。その後ガラス板の埋まった貝殻周辺をガラス板ごとダイヤモンドカッターで切り出した。

##### 2 レジン包埋

切り出した各貝殻試料を縦向きに固定し、それらが中央に配置されるように内側にワセリンを塗布した塩化ビニル管を置いた。管内に主剤(レジン)と硬化剤を5:1の割合で混合したレジン溶液を流し込み、脱気後、室温で一晩静置して硬化させた。レジン包埋した各貝殻試料を切り分け、電子顕微鏡観察および光学顕微鏡観察用とした。

##### 3 鏡面研磨

顕微鏡観察用の各貝殻試料の観察面をサンドペーパーで研磨した。サンドペーパーは目が粗いものから細かいものへと順番に用いた。次いで研磨クロスに METPOLISH 1 $\mu$ m 酸化クロムパウダー( BUEHLER ), MICROPOLISH H 0.05 $\mu$ m 酸化アルミパウダー( BUEHLER ) を添加しクロス上でさらに研磨を続け、鏡面レベルにまで平滑にした。

##### 4 包埋試料のアルカリエッチング

2M 水酸化ナトリウム, 0.026M 四ホウ酸ナトリウム溶液中, 22℃で15分間攪拌しタンパク質部分を溶出させた。

#### 4. 研究成果

真珠の輝きをつくりだしているバイオミネラリゼーションタンパク質であるマトリックスタンパク質を透明な真珠タンパク質フィルムとして貝殻や真珠から分離した。本研究はこの真珠タンパク質フィルムを用いて、アコヤガイさらにはカキなどの真珠をつくらない貝類でも結晶を形成するかその機能を検証し、真珠産業へと応用展開するための基礎的データを得ることを目指した。

平成 24 年度はアコヤガイの貝殻から真珠タンパク質フィルムを作成した。作成したフィルムを適当なサイズに切り分け、アコヤガイの外套膜外面上皮に挿入し、約3ヶ月間養殖場でアコヤガイを飼育した。アコヤガイを水揚げ後、貝殻内面および真珠タンパク質フィルム上の炭酸カルシウムの結晶の生成の程度を、USB マイクロ스코プを用いて500倍で反射光により観察した。さらに生成した結晶面に金をコーティングし走査型電子顕微鏡によって析出した炭酸カルシウムの結晶を観察した。真珠タンパク質フィルム剥離後の貝殻面に結晶状の物質の析出が確認された。これはアコヤガイ真珠タンパク質フィルムの挿入により、結晶の析出を促進した可能性が示唆された。

平成 25 年度はアコヤガイ真珠タンパク質フィルムをガラス板上に貼り付けたものをアコヤガイおよびマガキの外套膜外面上皮と貝殻の間に挿入し3~6ヶ月間養殖場で飼育し両貝に結晶が析出するかどうかを調べた。真珠タンパク質フィルムを挿入した部位をX線照射し挿入位置を確認後、貝殻をガラス板ごと切り出した。この部位を樹脂包埋した後、アコヤガイ真珠タンパク質フィルムとガラス板周辺を包埋樹脂ごと切断し断面を鏡面研磨した。次いでこの断面をアルカリエッチングすることにより、真珠タンパク質フィルムや結晶生成に関与したと思われるマトリックスタンパク質層を除去し結晶の

生成状況を観察した。

アコヤガイでは真珠タンパク質フィルムから軟体部側に向かって、挿入後に新たにマトリックスタンパク質層、稜柱層、さらにこれに接して異常形態の稜柱層が誘導された。その後、軟体部に接する位置に正常な真珠層が形成された。一方、マガキの場合は、真珠タンパク質フィルムの周辺に異常なマトリックスタンパク質層が形成された。軟体部側には葉状層、次いで正常なチョーク層が観察された。

Watabe & Wilbur(1960, *Nature*)は貝類の有機マトリックスシートの小片がガラス上にカルシウム結晶を析出することを報告したが、今回アコヤガイで形成された真珠タンパク質フィルムの軟体部側に生成したカルサイトの稜柱層と異常形態の稜柱層はWatabe & Wilbur が報告した結晶であるかもしれないが判断はできない。今回、我々が確認したアコヤガイ稜柱層のカルサイト結晶はアコヤガイおよびマガキに挿入された真珠タンパク質フィルムを異物と認識し、保護のために結晶層を作り出したと考えることもできる。これらの結晶層を真珠形成に利用するにはさらなる検討を要する。

## 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 1 件)

Funabara, D., Ohmori, F., Kinoshita, S., Koyama, H., Mizutani, S., Ota, A., Osakabe, Y., Nagai, K., Maeyama, K., Okamoto, K., Kanoh, S., Asakawa, S., Watabe, S. Novel genes participating in the formation of prismatic and nacreous layers in the pearl oyster as revealed by their tissue distribution and RNA interference knockdown. PLOS ONE, 査読有り, DOI: 10.1371 (2014)

### 〔学会発表〕(計 1 件)

金 紫菊, 服部文弘, 前山 薫, 船原大輔, 加納 哲 アコヤガイ貝殻の有機マトリックスタンパク質のヒト表皮細

胞に対する影響 平成 25 年度日本水産学会秋季大会. 三重大学. 2013 年 9 月 20 日, 津

### 〔図書〕(計 1 件)

Funabara, D., Mizutani, S., Ota, A., Osakabe, Y., Kinoshita, S., Ohmori, F., Nagai, K., Maeyama, K., Kanoh, S., Watabe, S. Novel nacreous layer formation-related genes in the pearl oyster identified by RNA interference. In Recent Advances in Pearl Research., Eds., S. Watabe, K. Maeyama, H. Nagasawa, 276 (77-92) TERRAPUB, 2013.

### 〔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:  
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

加納 哲 (KANOH, Satoshi)

三重大学・生物資源学研究所・教授  
研究者番号: 80177550

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

永井清仁 (NAGAI, Kiyohito)

株式会社ミキモト・真珠研究所・所長