

アコヤガイ貝殻に穿孔する
ウシケノリ属糸状体の性状について

令和5年度

三重大学大学院 生物資源学研究科

生物圏生命科学専攻

海洋生命分子化学講座

生体高分子化学研究分野

522M328

加藤直久

目次

序論	1
謝辞	5
第1章 アコヤガイ貝殻に存在するフィラメント様構造体の解析	6
試料と方法	6
結果	10
考察	16
第2章 アコヤガイ貝殻中の糸状体の種同定	18
試料と方法	19
結果	23
考察	25
第3章 総括的考察	27
参考文献	28

序 論

アコヤガイ *Pinctada fucata* はウグイスガイ目ウグイスガイ科の二枚貝であり、真珠養殖に用いられる真珠母貝として知られている。1893年、御木本幸吉が三重県鳥羽市の相島にて世界初のアコヤガイによる半円真珠の養殖を成功させている。その後の1905年には真円真珠の養殖にも成功している¹。この真珠養殖は志摩地方の主要産業として発展しており、令和4年度における農林水産省発表の漁業、養殖業生産統計では長崎、愛媛県に次ぐ2800 kgの真珠生産量を誇っている²。真珠養殖に利用されてきたアコヤガイはこれまで食用とされてきた貝柱以外は捨てられることが多かったが、近年では貝殻に含まれているタンパク質を化粧品に利用し、貝肉残渣などは堆肥に用いるなど様々な方面での活用が期待されている³。

アコヤガイの貝殻は3つの層から構成されており、外側から殻皮、稜柱層、真珠層に分かれている（図1）。殻皮はキチン質であり、炭酸カルシウムからなる稜柱層や真

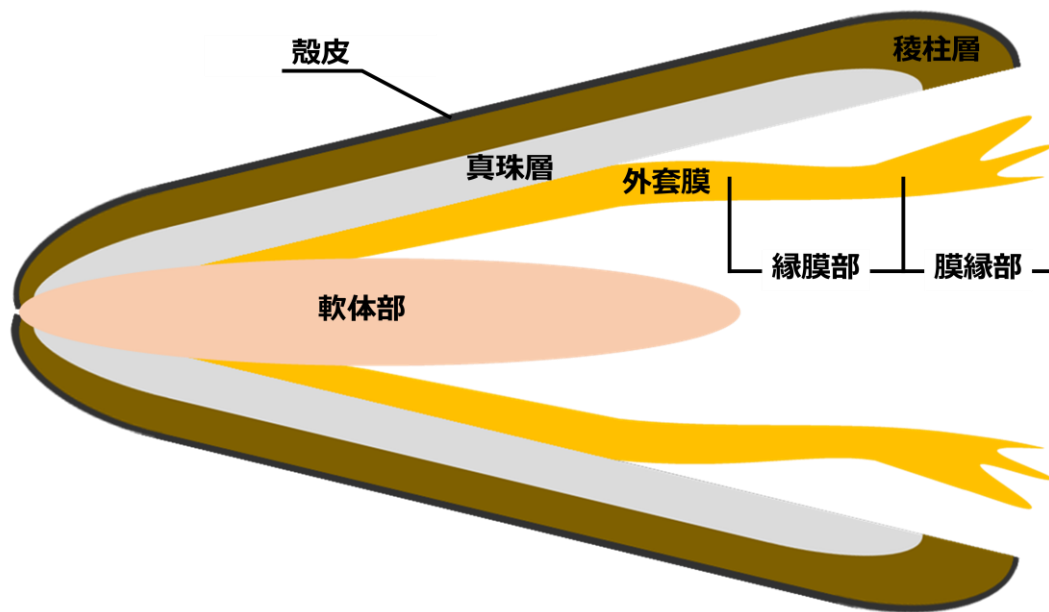


図 1. アコヤガイ断面の模式図。

珠層を保護する役割がある。稜柱層、真珠層はどちらも主として炭酸カルシウムからなるが、その結晶構造が異なっている。稜柱層はカルサイト（方解石）の結晶が柱状に並んだ構造をしている（図2）。真珠層はアラゴナイト（霰石）結晶と有機基質が交互に重なった層状構造で、アラゴナイト結晶がレンガのように積み重なっている（図2）。このような貝殻の層は外套膜外側上皮で作られる。外套膜から分泌されたタンパク質を媒介にして、血流によって運ばれたカルシウムイオンと炭酸イオンが結合し、結晶として沈着するという繰り返しによって貝殻は形成される。この貝殻形成の過程

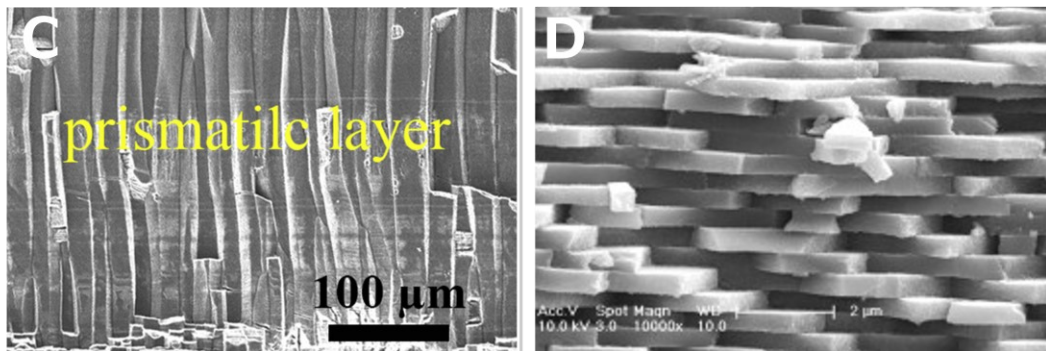
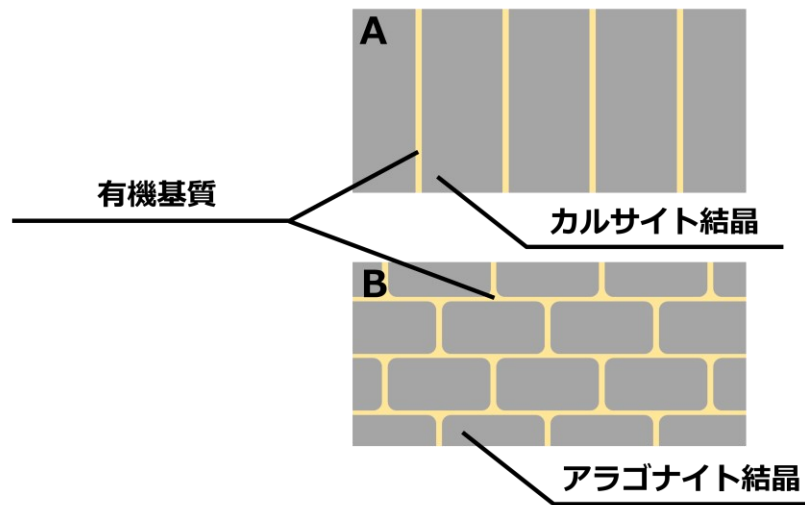


図2. 稜柱層、真珠層における炭酸カルシウムの結晶構造の模式図 (A、B) と SEM 撮影画像 (C、D)。

- A:稜柱層の炭酸カルシウム結晶構造。柱状のカルサイト結晶が並んでいる。
- B:真珠層の炭酸カルシウム結晶構造。アラゴナイト結晶がレンガ状に積み重なっている。
- C:稜柱層の SEM 撮影画像 (文献 14 より引用)。
- D:真珠層の SEM 撮影画像 (文献 15 より引用)。

においてタンパク質は重要な役割を果たし、アコヤガイ貝殻を構成する炭酸カルシウムがカルサイトあるいはアラゴナイトになるかはタンパク質によって制御されと考えられている。稜柱層形成に関わるタンパク質にはアスパラギン酸 (Asp)、グリシン (Gly)、セリン (Ser) のアミノ酸割合が高く酸性が強いアスぺイン⁴や N 末端のシグナルペプチド・炭酸イオンと相互作用する塩基領域・タンパク質の架橋に参与する 3 つの領域を持つ KRMP ファミリー⁵、キチン質との結合とアラゴナイトの形成阻害の働きがある Prsilkin-39⁶、炭酸脱水酵素と選択的に結合するとされる MSI31⁷ などがある。真珠層形成に関わるタンパク質には炭酸脱水酵素であり Gly-Xaa-Asn (Xaa=Asp、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Glu)) ドメインを持つナクレイン⁸ や飽和炭酸カルシウム溶液における炭酸カルシウムの沈殿形成を促進し、炭酸カルシ

ウムを直接アラゴナイトとして形成させる働きをもつ P10⁹、炭酸カルシウムの結晶化を阻害する N19¹⁰、MSI31 と同様に炭酸脱水酵素と選択的に結合するとされる MSI60⁷などのタンパク質が挙げられる。これらのタンパク質は稜柱層、真珠層から回収されたものや稜柱層を作る外套膜先端部、真珠層を作る外套膜縁膜部でそれぞれ発現するタンパク質であり、稜柱層や真珠層の形成に関わると考えられている。

アコヤガイのような二枚貝の貝殻は閉殻筋によって接着されており、貝殻の開閉はこの閉殻筋の収縮や弛緩によって制御されている。この殻を閉じる力は非常に強力であり、殻の開閉に関わる閉殻筋と貝殻の接着が非常に強いことを意味している。閉殻筋が接着していた部分は閉殻筋痕と呼ばれ、この部分には光輝層という構造が存在している（図3、4）。光輝層は柱状のアラゴナイト結晶からなり、同じアラゴナイト結

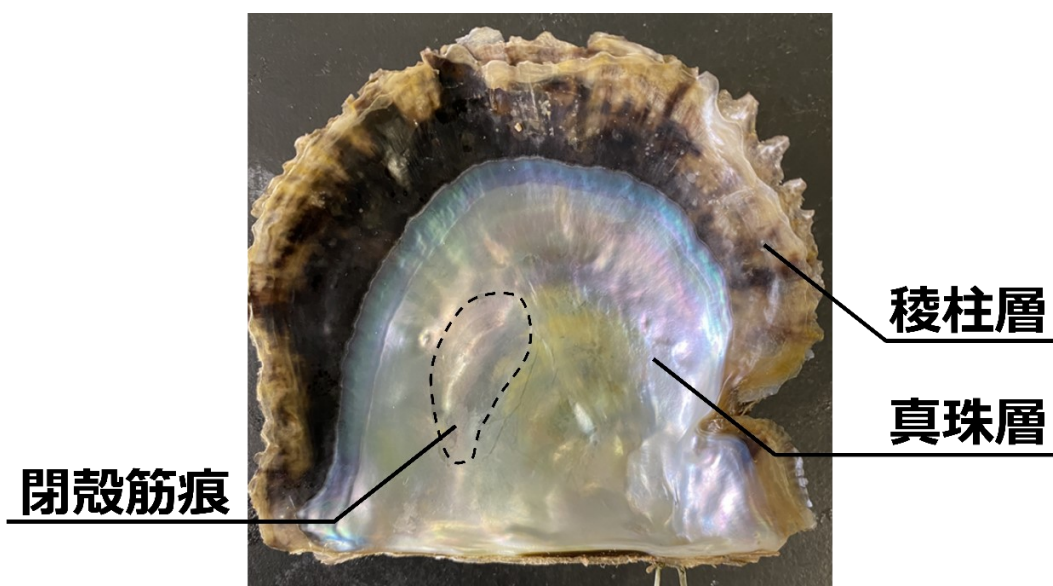


図3. アコヤガイ貝殻内面の構造。

外側の黒や茶褐色の部分が稜柱層で、内側の虹色の光沢が見られる部分が真珠層である。点線で囲っている部分は閉殻筋がついていた閉殻筋痕である。

晶からなる真珠層とは構造が異なる。光輝層が貝殻と閉殻筋の接着を担っていると考えられるが、その詳細は不明である。炭酸カルシウム結晶構造はタンパク質によって制御されることから、光輝層の形成にもタンパク質が関わっていると考えられる。当研究室の先行研究によって、光輝層にはパラミオシン、トロポミオシン、カルポニンなどの筋タンパク質が存在することが分かった¹¹。パラミオシンは無脊椎動物に広く存在する筋タンパク質で、二枚貝では閉殻筋に特に多く存在している。パラミオシンの炭酸カルシウム結晶形成への影響を調べるために、アラゴナイト結晶形成実験を行ったところ、パラミオシン非存在下では放射状のアラゴナイト結晶が形成されたが、パラミオシン存在下では柱状のアラゴナイト結晶が形成された。この結果から、光輝層の形成にはパラミオシンが関与していると考えられた¹²。そこでパラミオシンの貝

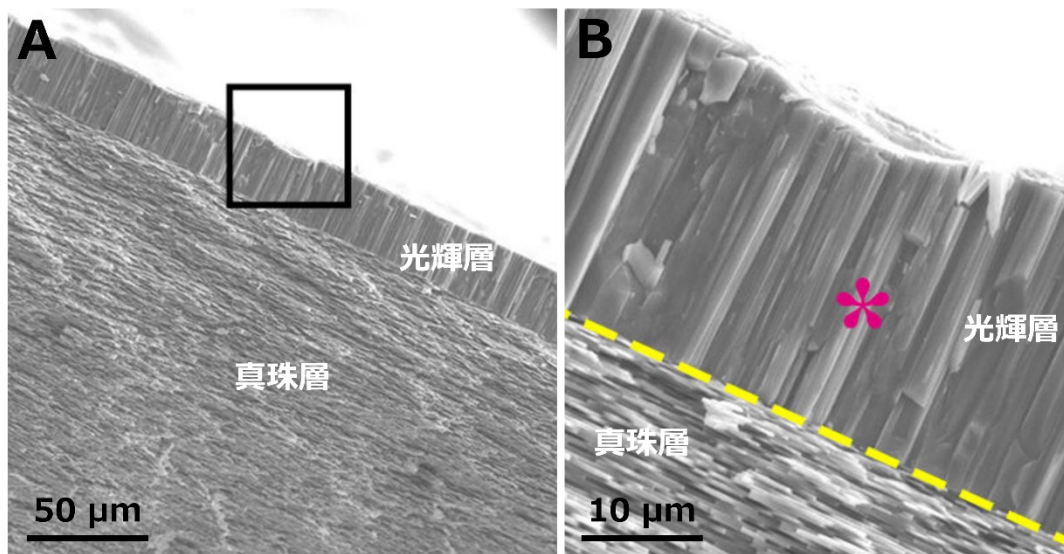


図4. アコヤガイ光輝層のSEM撮影画像（文献16より引用）。

A：光輝層のSEM撮影画像。黒枠はBの部分を示している

B：Aの黒枠部分の拡大画像。紫のアスタリスクは光輝層、黄色の点線は光輝層と真珠層の境目を示す。

殻内での分布を調べるために、アコヤガイ貝殻にウサギ抗アコヤガイ・パラミオシン抗血清をもちいて貝殻への蛍光免疫染色を行った¹³。その過程で貝殻中に黒いフィラメントのような構造体を発見した（図5）。

アコヤガイ貝殻にこのようなフィラメント様構造体が存在することは、これまで報告がない。このフィラメントが貝殻形成に参与している可能性が考えられたので、アコヤガイ貝殻におけるフィラメント様構造体の正体を明らかにすることを目的に本研究を実施した。第1章でアコヤガイ貝殻中のフィラメント様構造体の分布を調べ、第2章でそれが紅藻糸状体であることを突き止めた。第3章で総合的な考察をした。

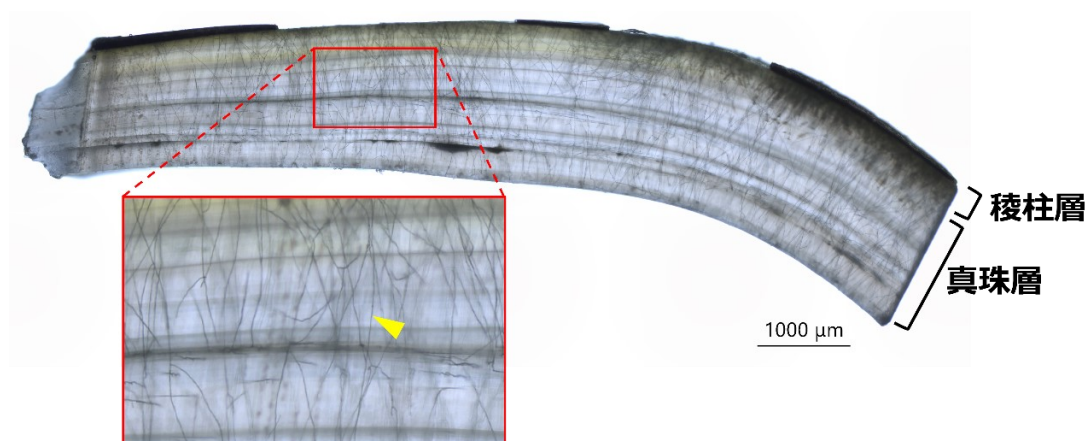


図5. アコヤガイ貝殻切片の断面で観察されたフィラメント様構造体。

黒い筋がフィラメント様構造体である。黄色の矢じりで示した黒い筋が無数にあることがわかる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、三重大学大学院生物資源学研究科生体高分子化学研究室船原大輔教授ならびに水谷雪乃助教には、終始適切なご指導、ご鞭撻をいただきました。東京大学大学院農学生命科学研究科鈴木道生教授からはウサギ抗アコヤガイ・パラミオシン抗体を、御木本製薬株式会社前山薫博士ならびに株式会社ミキモト真珠研究所永井清仁博士からはアコヤガイ貝殻を提供していただきました。本研究科海洋食糧化学研究室柴田敏行准教授には、快く蛍光顕微鏡を使用させていただきました。同海洋生物化学研究室柿沼誠教授、浅海増殖学研究室筒井直昭教授には、本論文の審査をしていただくとともに、貴重な助言をいただきました。生体高分子化学研究室卒業生岡村美里氏、同四年生大橋功輝氏にはアコヤガイ貝殻中のフィラメント様構造体分布解析で多大な協力をいただきました。生体高分子化学研究室の皆様には、様々なご協力をいただきました。

以上の皆様に心から感謝いたします。

第1章 アコヤガイ貝殻に存在するフィラメント様構造体の解析

序論で述べたように、アコヤガイ貝殻真珠層の蛍光免疫染色解析の過程で、フィラメント様構造体が貝殻中に存在していることが分かった¹³。フィラメント様構造体は抗パラミオシン抗体による免疫染色で蛍光が検出されたことと、その外観が線維状だったことから筋線維である可能性が考えられた。筋タンパク質のパラミオシンがアコヤガイ貝ア殻に存在することがわかっている。もしフィラメント様構造体が筋線維であるとすれば、貝殻形成にフィラメント様構造体が関わっている可能性が考えられた。そこでフィラメント様構造体の役割を明らかにするために、本章ではまずそれがアコヤガイ貝殻にどのように分布し、何の成分が含まれているかなど詳しく解析した。

また、フィラメント様構造体に含まれる成分を解析するために、フィラメント様構造体に対して抗パラミオシン抗体などの筋タンパク質に対する抗体を用いた蛍光免疫染色法や免疫電顕法を行い、観察した。

試料と方法

試料

株式会社ミキモト多徳養殖場（三重県志摩市）で浜揚げされたアコヤガイ母貝の貝殻で、御木本製薬株式会社（三重県伊勢市）において大半の稜柱層を取り除いたものを実験に用いた（図6、図7）。

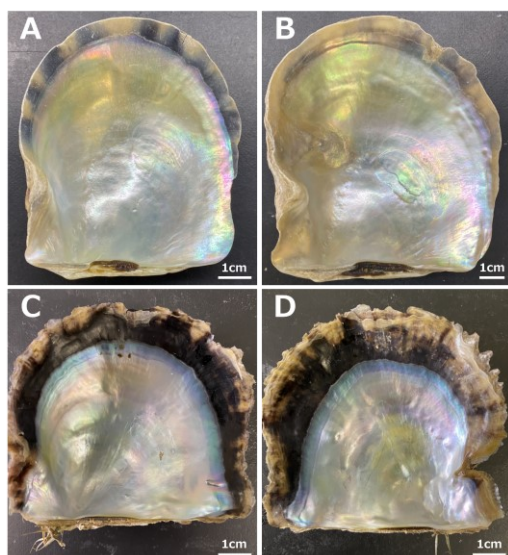


図6. 使用したアコヤガイ貝殻。

CとDはアコヤガイの同じ個体の左殻(C)と右殻(D)である。

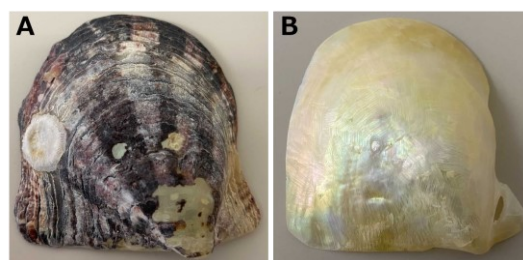


図7. 稜柱層を取り除いたアコヤガイ貝殻。

A：稜柱層を取り除く前のアコヤガイ貝殻。

B：稜柱層を取り除き真珠層のみにしたアコヤガイ貝殻。

稜柱層を取り除いたアコヤガイ貝殻を免疫染色に用いた。

アコヤガイ貝殻切片の作成

アコヤガイ貝殻を K-110 PCB CUTTER (HOZAN) で約 1.5 cm 幅に切断した (図 8)。スライドガラスを貼り付けたアルミ板を 120 °C に設定したホットプレート (MAGNETIC STIRER REMIX RSH-1D (AS ONE)) 上で温め、Quickstick™135 Mounting Wax (PELCO) を塗り付けて貝殻の切断面を接着させた。アルミ板を数分放置して十分に冷却させた後、精密低速ダイヤモンドホイールソー (メイワフォーシス) に取り付け、貝殻を 1 mm 幅に切断し切片を作製した (図 9)。

ディスクグラインダーで稜柱層を取り除き真珠層のみにしたアコヤガイ貝殻 (図 7 B) から上記と同様の手順で切片を作製した。

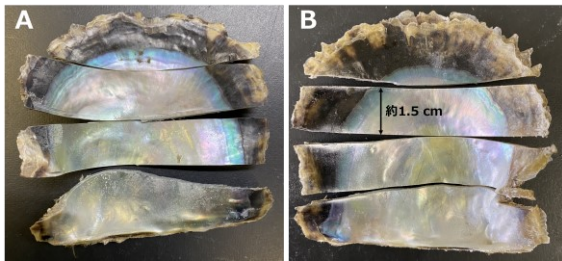


図 8. 切断したアコヤガイ貝殻。

A は図 6C、B は図 6D で示したものを切断したものである。

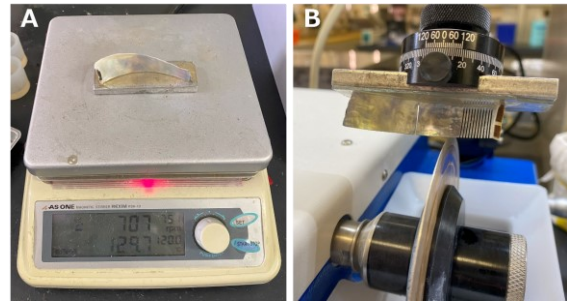


図 9. アコヤガイ貝殻切片作製。

A : 貝殻切片をアルミ板に張り付けている様子。

B : 精密低速ダイヤモンドホイールソーで貝殻を 1mm 幅に切断する様子。

貝殻切片の観察

オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X810 (KEYENCE) を用いて貝殻切片の断面を観察した。撮影した貝殻切片の画像から 1 mm²あたりのフィラメント様構造体の本数を数え、アコヤガイ貝殻画像上にマッピングすることにより分布図を作成した。

貝殻切片の脱灰

フィラメント様構造体を免疫染色するために、貝殻切片を脱灰して有機基質シートを作製した。スライドガラスに紫外線硬化樹脂を滴下し、その上に稜柱層を

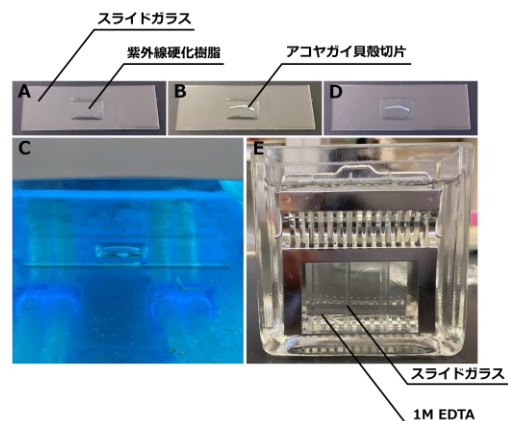


図 10. 貝殻切片の脱灰操作。

A : スライドガラスに紫外線硬化樹脂を塗布。

B : 切片を樹脂の上に静置。

C : 紫外線を照射。

D : 樹脂硬化後の切片。

E : 1 M EDTA による脱灰。

取り除いたアコヤガイ貝殻から作製した切片を乗せ、紫外線を照射し切片をスライドガラス上に接着させ、スライドガラスごと 1 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (pH 7.0) に浸し、約 3 日間、常温で放置して脱灰した (図 10)。脱灰には、断面を顕微鏡で観察してフィラメント様構造体の存在が確認された切片のみ供した。

蛍光免疫染色による観察

貝殻切片を脱灰して得られた有機基質シートに存在するフィラメント様構造体を蛍光免疫染色した。蛍光免疫染色には、VectaFluor™Excel Amplified Anti-Rabbit IgG, DyLight®594 Antibody Kit

(VECTOR) を使用した。一次抗体にはウサギ抗アコヤガイ・パラミオシン抗血清を使用した。貝殻切片有機基質シートを

1×Phosphate-buffered saline (PBS) で 10 分間洗浄した。洗浄後、キット付属の Normal Horse Serum を滴下し、20 分間室温でインキュベートした。次に 1×PBS で 50 倍に希釈したウサギ抗アコヤガイ・パラミオシン抗血清を滴下し、室温で 30 分間インキュベートした。1×PBS で 10 分間洗浄した後、キット付属の Amplifier Antibody を添加して室温で 15 分間インキュベートした。1×PBS で 10 分間洗浄し、キット付属の VectaFluor Antibody を添加して室温で

30 分間インキュベートした後、1×PBS による 10 分間の洗浄を 2 回行った (図 11)。一次抗体をウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン 1 抗血清、ウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン 2 抗血清、ウサギ抗ホタテガイ・カルポニン抗血清に変えて同様の手順で蛍光免疫染色を行った。染色した貝殻切片はオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X810 (KEYENCE) で観察した。フィルターには BZ-X Filter TRITC (励起波長：545/25、ダイクロイックミラー波長：565、吸収波長：605/70) を用いた。

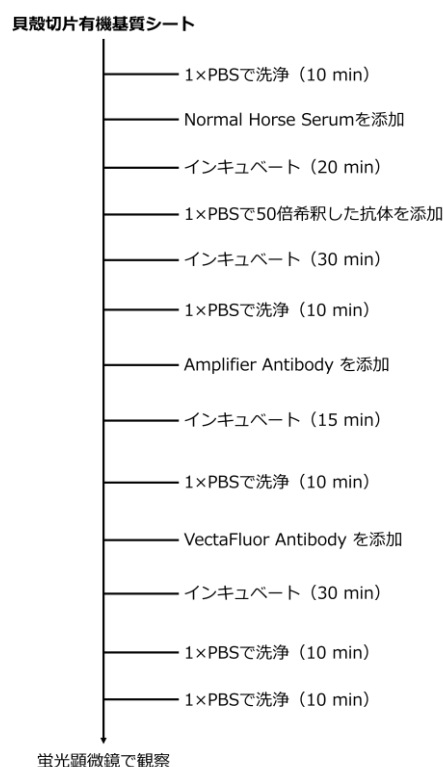


図 11. 貝殻切片有機基質シート蛍光免疫染色法の手順。

ナノゴールド銀増感剤免疫電顕法による観察

試薬は VectaFluor™Excel Amplified Anti-Rabbit IgG, DyLight®594 Antibody Kit (VECTOR) の一部を流用した。一次抗体にはウサギ抗アコヤガイ・パラミオシン抗

血清を用いた。脱灰した貝殻切片有機基質シートを1×PBSで10分間洗浄した。洗浄後、キット付属のNormal Horse Serumを滴下し、室温で20分間インキュベートした。1×PBSで50倍に希釈した抗アコヤガイ・パラミオシン抗血清を滴下し、有機基質シートを室温で30分間インキュベートした。1×PBSで10分間洗浄し、キット付属のAmplifier Antibodyを滴下し、室温で15分間インキュベート後、1×PBSで10分間洗浄した。Milli-Qで30倍希釈したAnti-igG (H+L) ,Goat,Rabbit-Poly,Gold 15 nm ,EM (funakoshi)を滴下し、室温で60分間インキュベートした後、Milli-Qで5分間の洗浄を2回行った。LI Silver-Enhancement Kit (funakoshi)を用いて銀増感を行った。LI Silver-InitiatorとLI Silver-Enhancerを等量混合して銀増感試薬を作製し、有機基質シートに200 μL滴下して反応させた。Milli-Qで5分間の洗浄を2回行った(図12)。一次抗体をウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン1抗血清、ウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン2抗血清、ウサギ抗ホタテガイ・カルボニン抗血清に変えて同様の手順で染色を行った。染色した貝殻切片を走査型電子顕微鏡TM4000Plus II Miniscope (HITACHI)で観察した。

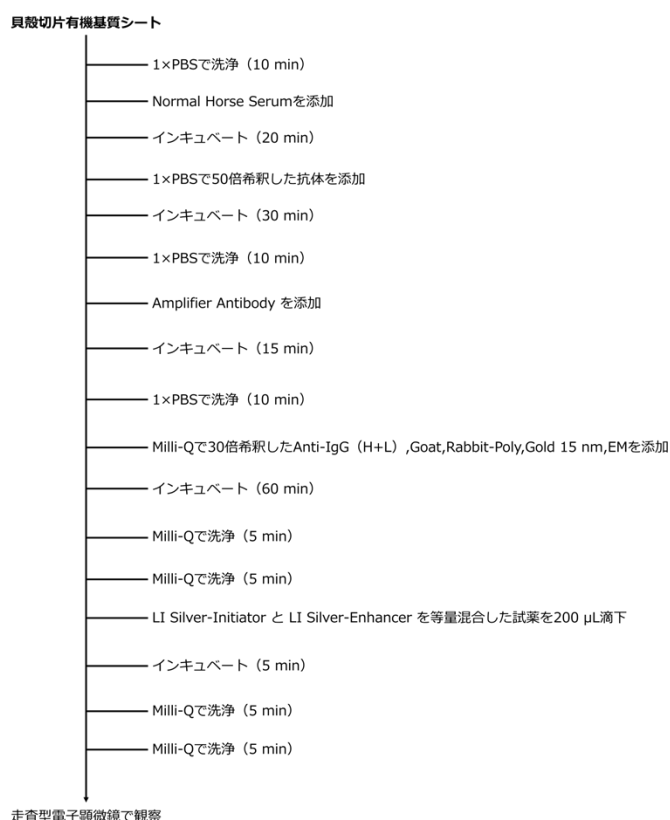


図12. 貝殻切片有機基質シートナノゴールド銀増感免疫電顕法の手順。

結果

貝殻切片の観察

アコヤガイ貝殻 (図 6A) から作製した切片 (図 13) を観察した結果から、真珠層 1 mm²あたりのアラマト様構造体の本数を数え、貝殻上にマッピングした (図 14)。アコヤガイ貝殻でアラマト様構造体が存在していた領域を赤の濃淡で示して



図 13. 観察したアコヤガイ貝殻切片 (図 6A)。

おり、濃い領域ほど本数が多いことを示している (図 14A)。アラマト様構造体は、貝殻蝶番側の前耳に多く分布していた。前耳とは貝殻蝶番付近にある出っ張りのうち、殻頂より前方にある部分のことである。

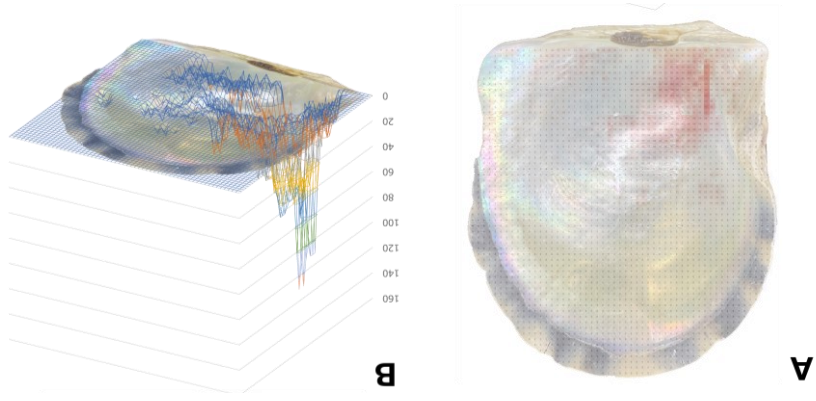


図 14. アコヤガイ貝殻 (図 6A) におけるアラマト様構造体の分布。
A : 真珠層 1 mm²あたりのアラマト様構造体の本数をマッピングした結果。赤で示した部分がアラマト様構造体の存在している領域で、赤が濃いほど本数が多いことを示す。
B : A で示したアラマト様構造体の本数と位置を等高線グラフで示す。

フィラメント様構造体は、多いところでは 1 mm^2 あたり約 100 本を超えていた (図 14 B)。別のアコヤガイ貝殻 (図 6 B) から作製した切片 (図 15) を観察したところ、

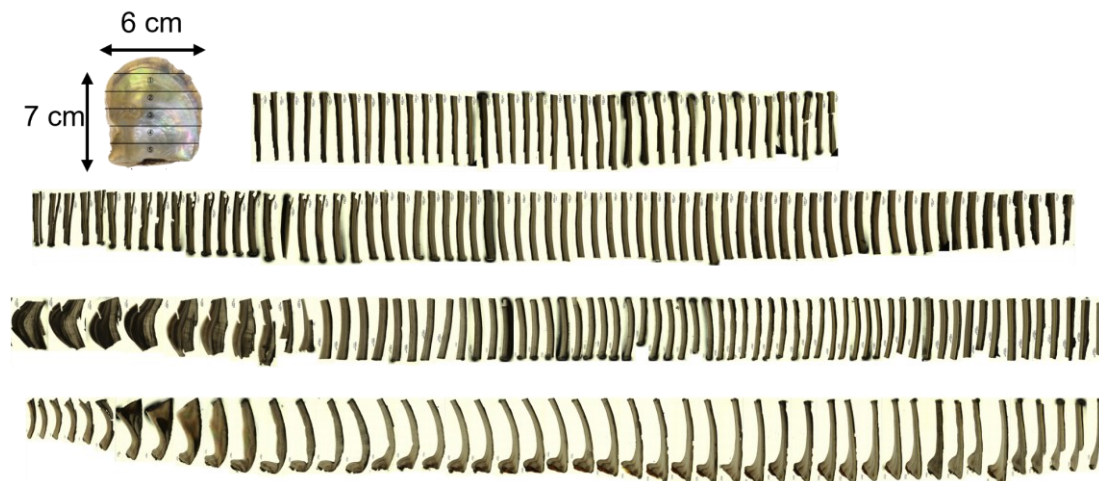


図 15. 観察したアコヤガイ貝殻切片 (図 6B)。

同様に前耳あたりにフィラメント様構造体が存在していた (図 16 A)。その 1 mm^2 の本数は図 14 で示したものと比べてかなり多く、 1 mm^2 あたり最大約 250 本のフィラメント様構造体が存在していた

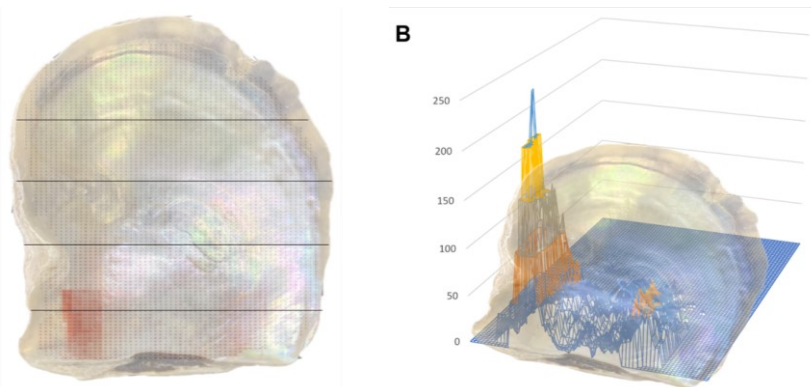


図 16. アコヤガイ貝殻 (図 6B) におけるフィラメント様構造体の分布。
 A : 真珠層 1 mm^2 あたりのフィラメント様構造体の本数をマッピングした結果。赤で示した部分がフィラメント様構造体の存在している領域で、赤が濃いほど本数が多いことを示す。
 B : A で示したフィラメント様構造体の本数と位置を等高線グラフで示す。

(図 16 B)。アコヤガイのサイズとフィラメント様構造体の分布の関係を調べるために、小さい貝殻の左殻 (図 6 C) でも同様に解析をした。切片を観察 (図 17) した結果、フィラメント様構造体は図 14 と 16 で示したのと同様に前耳付近に分布していた



図 17. 観察したアコヤガイ貝殻切片 (図 6C)。

が、その分布領域は狭く (図 18 A)、本数も最大で 1 mm^2 あたり約 80 本であり (図 18 B)、大きな貝殻と比較して少ないことがわかった。次に左殻と右殻におけるフィラメント様構造体の分布を比較するため

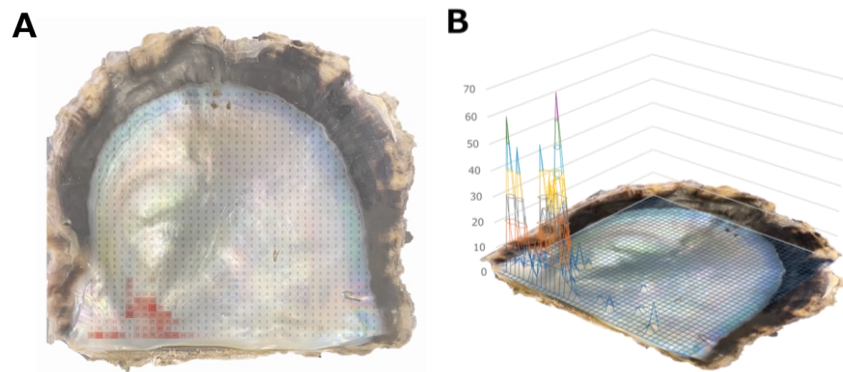


図 18. アコヤガイ貝殻 (図 6C) におけるフィラメント様構造体の分布。
 A: 真珠層 1 mm^2 あたりのフィラメント様構造体の本数をマッピングした結果。赤で示した部分がフィラメント様構造体の存在している領域で、赤が濃いほど本数が多いことを示す。
 B: A で示したフィラメント様構造体の本数と位置を等高線グラフで示す。

に、図 6 C の貝殻 (左殻) と同じ個体の右殻について調べた (図 6 D)。切片を観察した結果 (図 19)、これまでの結果と同様に、この貝殻でもフィラメント様構造体は前耳付近に存在しており、分布領域は左殻と同様大きな貝殻より狭かった (図 20 A)。 1 mm^2 あたりの本数は最大で 35 本程度であった (図 20 B)。以上の結果から、フィラメント様構造体はどの貝殻においても前耳付近に分布していたが、その本数は 1 mm^2 あたり約 250 本から約 35 本と、大きな差が見られた。本数が多い貝殻は、本数の少ない貝殻に比べて、貝殻内側で真珠層の占める面積が大きく、より成長している貝であることから、成長した貝ほどフィラメント様構造体が多いということが分かった。本数だけでなくフィラメント様構造の分布領域も異なっており、大きな貝殻では広範囲に渡っているが、小さい貝殻では狭い範囲であった。同個体の貝殻では、左殻と右殻

でフィラメント様構造体の本数と分布はほぼ同じであることが分かった。



図 19. 観察したアコヤガイ貝 (図 6D)。

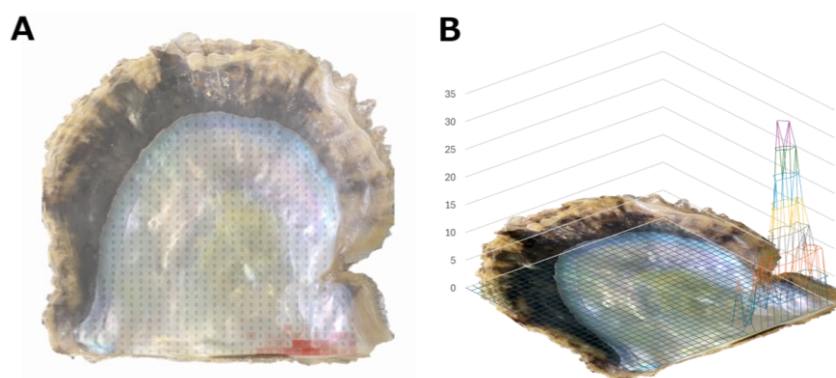


図 20. アコヤガイ貝殻 (図 6D) におけるフィラメント様構造体の分布。

A：真珠層 1 mm² あたりのフィラメント様構造体の本数をマッピングした結果。赤で示した部分がフィラメント様構造体の存在している領域で、赤が濃いほど本数が多いことを示す。

B：A で示したフィラメント様構造体の本数と位置を等高線グラフで示す。

蛍光免疫染色による観察

アコヤガイ貝殻有機基質シートに対して、ウサギ抗アコヤガイ・パラミオシン抗血清をもちいて蛍光免疫染色した結果、フィラメント様構造体が検出された (図 21)。次にウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン 1 抗血清を用いて蛍光免疫染色した結果、フィラメント様構造体が検出された (図 22)。一次抗体にウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン 2 抗血清を用いて蛍光免疫染色した結果、フィラメント様構造体が検出さ

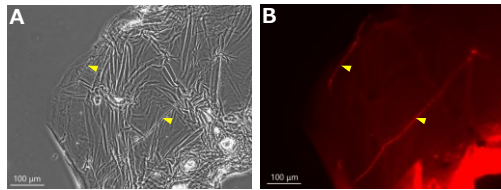


図 21. アコヤガイ貝殻有機基質シートのウサギ抗アコヤガイ・パラミオシン抗血清による蛍光免疫染色。

A：位相差観察した貝殻有機基質シート。
B：蛍光観察した貝殻有機基質シート。
黄色の矢じりは主なフィラメント様構造体を示し、AとBで同じ場所を指している。

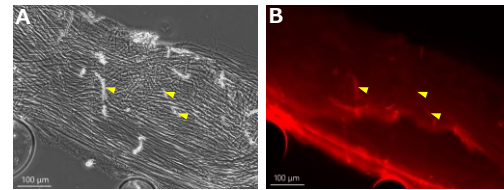


図 22. アコヤガイ貝殻有機基質シートのウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン 1 抗血清による蛍光免疫染色。

A：位相差観察した貝殻有機基質シート。
B：蛍光観察した貝殻有機基質シート。
黄色の矢じりは主なフィラメント様構造体を示し、AとBで同じ場所を指している。

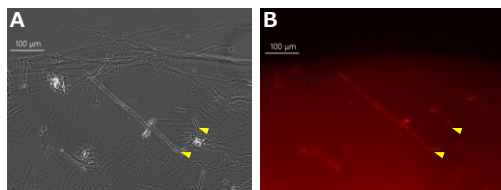


図 23. アコヤガイ貝殻有機基質シートのウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン 2 抗血清による蛍光免疫染色。

A：位相差観察した貝殻有機基質シート。
B：蛍光観察した貝殻有機基質シート。
黄色の矢じりは主なフィラメント様構造体を示し、AとBで同じ場所を指している。

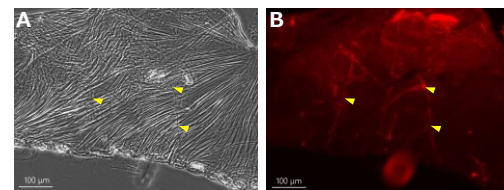


図 24. アコヤガイ貝殻有機基質シートのウサギ抗ホタテガイ・カルボニン抗血清による蛍光免疫染色。

A：位相差観察した貝殻有機基質シート。
B：蛍光観察した貝殻有機基質シート。
黄色の矢じりは主なフィラメント様構造体を示し、AとBで同じ場所を指している。

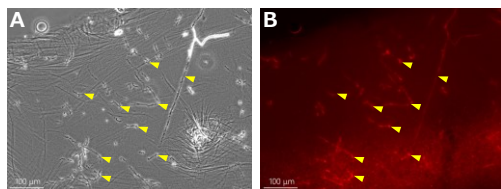


図 25. アコヤガイ貝殻有機基質シートの一次抗体を用いていない蛍光免疫染色ネガティブコントロール。

A：位相差観察した貝殻有機基質シート。
B：蛍光観察した貝殻有機基質シート。
黄色の矢じりは主なフィラメント様構造体を示し、AとBで同じ場所を指している。

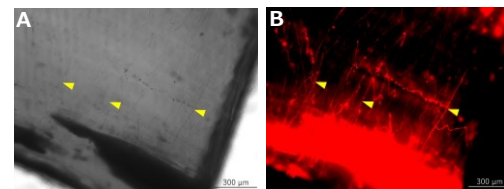


図 26. アコヤガイ貝殻有機基質シートの蛍光観察。

A：明視野観察した貝殻有機基質シート。
B：蛍光観察した貝殻有機基質シート。
黄色の矢じりは主なフィラメント様構造体を示し、AとBで同じ場所を指している。

れた (図 23)。一次抗体にウサギ抗ホタテガイ・カルボニン抗血清を用いた場合でもフィラメント様構造体が検出された (図 24)。ネガティブコントロールとして一次抗体を用いずに蛍光免疫染色をしたところ、予想に反してフィラメント様構造体が検出された (図 25)。そこで何も処理をせず有機基質シートをそのまま蛍光観察したところ、フィラメント様構造体に蛍光が検出された (図 26)。この結果からフィラメント

様構造体は自家蛍光を有することが分かった。したがって、抗体を用いた場合に検出されたのは抗体が反応したからではなく、フィラメント様構造体の自家蛍光による可能性が考えられた。

ナノゴールド銀増感剤免疫電顕法による観察

蛍光免疫法では抗体が特異的にフィラメント様構造体を検出していない可能性が考えられたので、フィラメント様構造体に筋タンパク質に対する抗体が特異的に反応するかどうかを確認するために、ナノゴールド銀増感免疫電顕法（金コロイド染色）により調べた。ウサギ抗アコヤガイ・パラミオシン抗血清を用いて免疫染色した貝殻有機基質シートを走査型電子顕微鏡で観察したところ、フィラメント様構造体が確認された（図 27）。フィラメント様構造体は直径が 2~5 μm で、ねじれた構造をしていた。フィラメント様構造体に金コロイドの付着は確認できなかった（図 27）。ウサギ

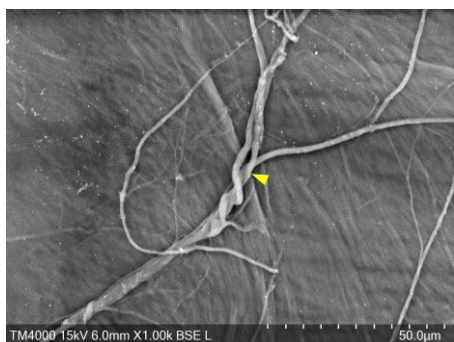


図 27. アコヤガイ貝殻有機基質シートのウサギ抗アコヤガイ・パラミオシン抗血清による金コロイド染色。

黄色の矢じりはフィラメント様構造体を示す。

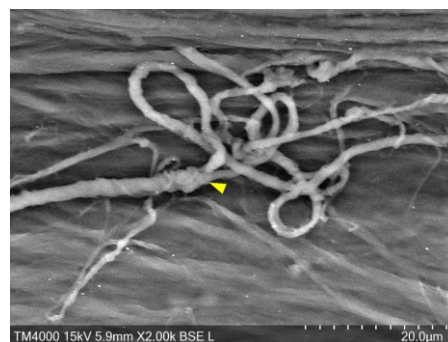


図 28. アコヤガイ貝殻有機基質シートのウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン 1 抗血清による金コロイド染色。

黄色の矢じりはフィラメント様構造体を示す。

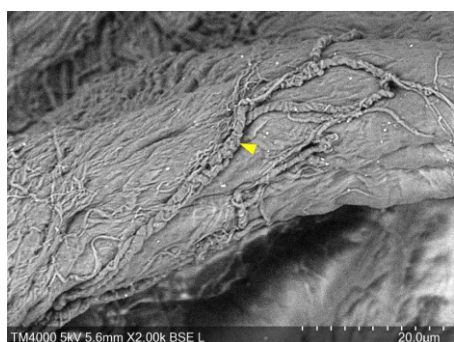


図 29. アコヤガイ貝殻有機基質シートのウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン 2 抗血清による金コロイド染色。

黄色の矢じりはフィラメント様構造体を示す。

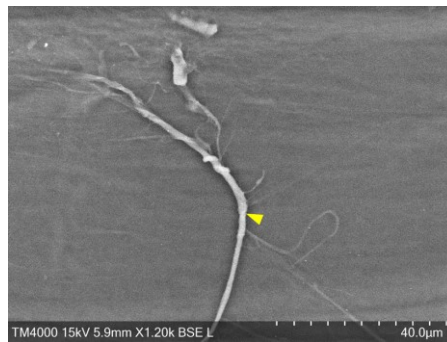


図 30. アコヤガイ貝殻有機基質シートのウサギ抗ホタテガイ・カルポニン抗血清による金コロイド染色。

黄色の矢じりはフィラメント様構造体を示す。

抗アコヤガイ・トロポミオシン1抗血清を用いた金コロイド染色でも、フィラメント様構造体への金コロイドの付着は確認できなかった(図28)。一次抗体にウサギ抗アコヤガイ・トロポミオシン2抗血清を用いた場合でも、フィラメント用構造体に対する金コロイドの付着は確認できなかった(図29)。ウサギ抗ホタテガイ・カルポニン抗血清を用いても同様であった(図30)。これらの結果は、一次抗体を用いないネガティブコントロールの結果と一致した(図31)。以上の結果から、フィラメント様構造体には、パラミオシンなどの筋タンパク質は存在していないと結論した。

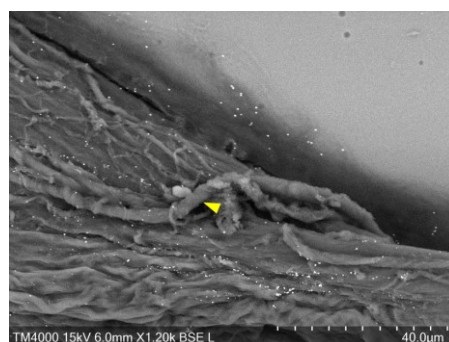


図31. アコヤガイ貝殻有機基質シートネガティブコントロールの金コロイド染色。
黄色の矢じりはフィラメント様構造体を示す。

考 察

本章では、貝殻中のフィラメント様構造体の分布状況と、筋タンパク質の有無について調べた。フィラメント様構造体は貝殻の前耳付近に存在していた(図14、16、18、20)。フィラメント様構造体の量については個体の大きさによって異なり、成長した大きな貝殻(7 cm×6 cm)には最大1 mm²あたり150本のフィラメント様構造体が存在していた(図14)。一方で、小さな貝殻(5.5 cm×6 cm)の場合は、最大でも1 mm²あたり約80本程度であった。これらの結果は、フィラメント様構造体は成長した貝の貝殻ほど多く存在することを意味している。また、フィラメント様構造体の分布範囲も大きい貝殻ほど広いことが分かった。しかし、貝殻の外套膜が接着しているところなど、フィラメント様構造体が全く存在していない場所もあり、この解析結果からフィラメント様構造体の機能は分からなかった。

先行研究でフィラメント様構造体が筋タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色で検出されたことから、フィラメント様構造体が筋線維である可能性が考えられたので、それを貝殻から取り出して免疫染色することにした。貝殻切片を脱灰したところ、有機基質シートが得られ、顕微鏡観察したところ、フィラメント様構造体と思われるものが確認できた(図21 A)。有機基質シートに対して抗パラミオシン抗血清、抗トロポミオシン1・2抗血清、抗カルポニン抗血清を一次抗体として用いて免疫染色した結果、いずれの場合でもフィラメント様構造体に蛍光が検出された。したがって、フィラメント様構造体にこれらのタンパク質が含まれていると考えられた。しかし、フィラメント様構造体が自家蛍光をもち、そのために蛍光が検出された可能性が

あるため、有機基質シートをそのまま蛍光観察したところ、フィラメント様構造体に蛍光が検出された（図26）。このことからフィラメント様構造体が筋タンパク質を含んでいない可能性が考えられた。そこで、自家蛍光の影響を受けないように、免疫電顕法により有機基質シートを調べた。走査型電子顕微鏡で金コロイドの付着を確認したところ、フィラメント様構造体部分には金コロイドの特異的な付着は確認できなかった。フィラメント様構造体には、パラミオシンやトロポミオシン、カルポニンのような筋タンパク質は存在していないことが分かった。予想に反してフィラメント様構造体は筋線維ではなく、貝殻形成には関わっていないと考えられた。

フィラメント様構造体は一体何なのだろうか。その正体について、本章で得られた結果から推察した。まずその形状から考えた。フィラメント様構造体は貝殻中で線維状であり、また貝殻中で枝分かれするなど四方八方に広がっている（図5）。この様子はアマノリの糸状体が貝殻に穿孔しているのによく似ている。実際、人為的にアコヤガイ貝殻に糸状体を成長させる実験で観察された糸状体によく似ている¹⁷（図32）。

次に、その分布状況である。本章の結果、フィラメント様構造体のアコヤガイ貝殻における分布には偏りがあり、前耳付近に集中し、貝殻先端には存在しなかった（図14、16、18、20）。アコヤガイの前耳付近は、貝殻に隙間があり、そこから足や足糸を出したりすることから、環境海水との接触が多い場所である。海洋中にあるアマノリ果胞子が、そこからアコヤガイに取り込まれ、貝殻内部に穿孔して糸状体に成長したと考えれば、フィラメント様構造体の分布が前耳付近に集中しているのも説明がつく。成長した貝殻ほどフィラメント様構造体の量が多いのも、長く生きている貝の方では内部に穿孔した糸状体が時間の経過とともに成長して、本数が増加したと説明ができる。さらにフィラメント様構造体は自家蛍光を持つ。自家蛍光は様々な物質にみられるが、光合成色素は自家蛍光をもつ代表的なものである。糸状体は紅藻ウシケノリ科の生活環の形態であり、光合成を行うための光合成色素を持つ。

以上3つの理由から貝殻中のフィラメント構造体は紅藻糸状体であると結論した。

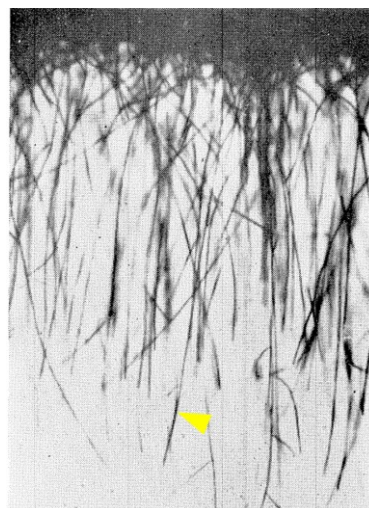


図32. アコヤガイ貝殻で成長させたアサクサノリの糸状体（参考文献17から引用）。

糸状体の垂直方向の成長を調べるためにアコヤガイ貝殻の内側にアサクサノリ糸状体を植え、その成長を観察する実験で得られた。この写真はアサクサノリを植えてから60日目のものである。主な糸状体を黄色の矢じりで示す。

第2章 アコヤガイ貝殻中の糸状体の種同定

第1章で貝殻中に存在するフィラメント様構造体が紅藻ウシケノリ科の糸状体であることが明らかとなった。

糸状体は紅藻ウシケノリ科の生活環の中でみられる形態である。ノリ生活環は肉眼的な配偶体と微視的な孢子体（コンコセリス期糸状体）の二世代が交代する（図32）。私たちがよく目にする海藻の状態は単相(n)の配偶

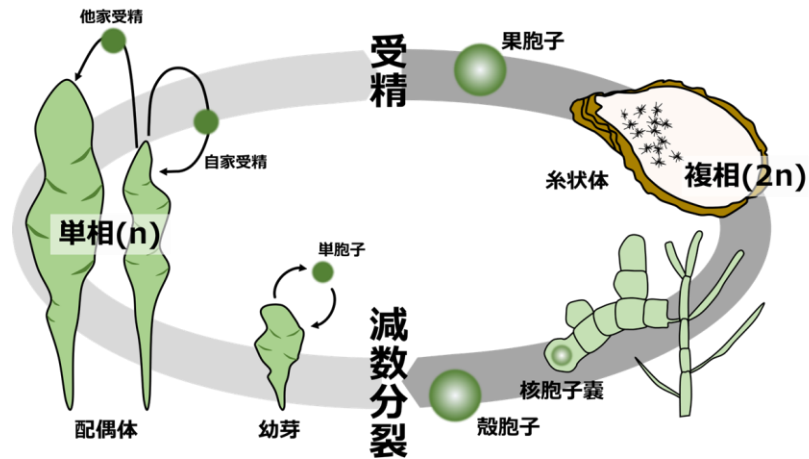


図 33. ウシケノリ科の生活環。

体である。その配偶体の自家受精や他家受精によって受精した卵細胞が細胞分裂して果胞子が形成される。果胞子が放出され貝殻に付着すると糸状体になる。糸状体は貝殻中に穿孔して成長する。糸状体はコンコセリス (conchocelis) とも呼ばれる。糸状体は貝殻中だけでなくカルシウムを多く含む培養液中で果胞子を培養することで増やすこともできる。糸状体が成長すると殻胞子嚢形成され、放出された殻胞子は減数分裂して幼芽になる。幼芽は単胞子を生産し、放出する。単胞子が発芽して配偶体になる。これがウシケノリ科の生活環である¹⁸。

アコヤガイ貝殻に糸状体が存在するという報告はなく、これが初めてである。アコヤガイ貝殻は序論で述べたように、主として稜柱層と真珠層からなる。第1章ではアコヤガイ真珠層に糸状体が穿孔することが明らかにしたが、炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶からなる真珠層は大変硬く、糸状体は存在しないと考えられてきた。ノリ養殖では糸状体をカキ殻で成長させるが、カキ殻の炭酸カルシウム結晶はカルサイトでアラゴナイトに比べて柔らかい。真珠層に穿孔する糸状体に特徴があるのかもしれないとも考えられる。

本章では糸状体の種を同定し、その特徴を探る手掛かりとすることを目的とした。第1章で貝殻切片を脱灰して得られた有機基質シートに糸状体が含まれていることが分かった。そこで有機基質シートから糸状体のDNAを抽出し、それを鋳型としてアマノリ属のミトコンドリアゲノムや、藻類の葉緑体ゲノムを特異的に増幅するプライマーを用いたPCRを行うことにした。得られたDNA断片のシーケンス解析を行って種同定

を試みた。

試料と方法

試料

株式会社ミキモト多徳養殖場（三重県志摩市）で浜揚げされたアコヤガイ母貝の貝殻で、御木本製薬株式会社（三重県伊勢市）において大半の稜柱層を取り除いたものを実験に用いた。

サンプルの調製

ディスクグラインダーで稜柱層を取り除き真珠層のみにしたアコヤガイ貝殻から、K-100 PCB CUTTER（HOZAN）を用いて貝殻の前耳付近を切断して集めた（図 34）。

貝殻切片の脱灰

回収した前耳付近の貝殻片を 1 M EDTA (pH 7.0) 中で約 5 日間室温で上下転倒させて脱灰した（図 35）。

DNA の抽出

脱灰し得られた有機基質シートから DNeasy Plant mini kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。手順はキットのプロトコールに従った（図 36）。抽出した DNA を Qubit™ dsDNA BR Assay kit (Invitrogen) を用いて濃度を測定した。

プライマーの設計

PCR のプライマーとして、アマノリ属ミトコンドリア DNA の *trnC* (tRNA-Cys 遺伝子)、*rps11* (リボソームタンパク質 11)、*sdh3* (コハク酸デヒドロキナーゼ 3)、*trnG* (tRNA-Gly 遺伝子)、*trnN* (tRNA-Asn 遺伝子)、*trnP* (tRNA-Pro 遺伝子)、および *rns* (リボソーム RNA 遺伝子) を含む領域を増幅する

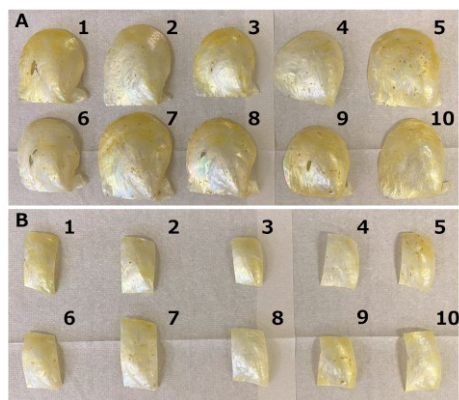


図 34. 糸状体種同定に用いたアコヤガイ貝殻。
A：稜柱層を除去した貝殻。
B：貝殻から切り出した前耳付近片。

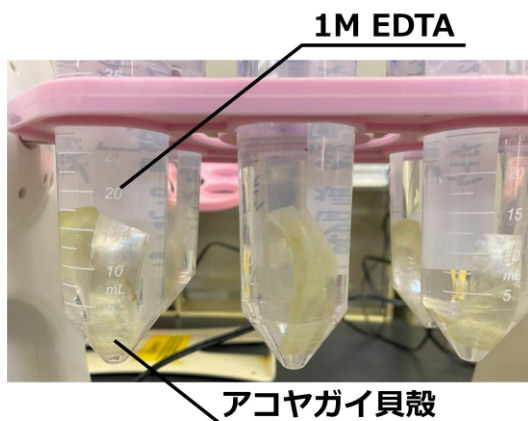


図 35. アコヤガイ貝殻片の脱灰操作。

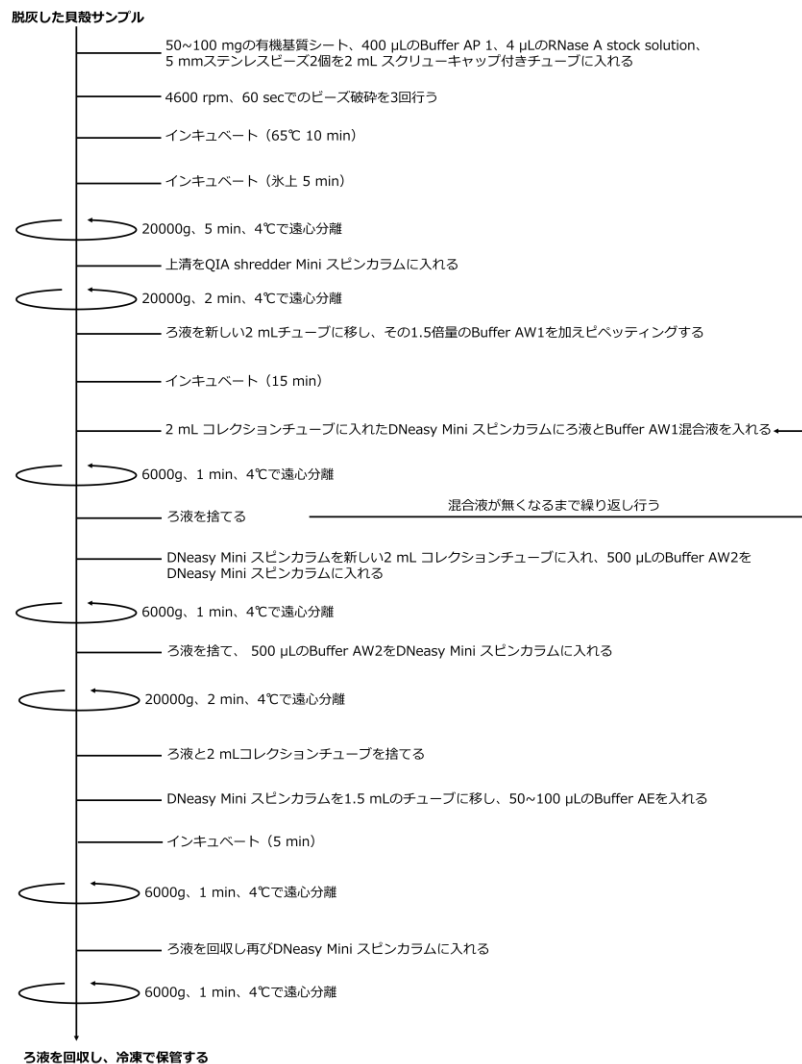


図 36. DNeasy mini Plant Kit の操作手順。

mit17BF(5'-GTCAGTTCGAATCTGGCCCTAGTT -3') と mit17 R (5'-ATGTGT TAGGCCGACCACTA -3')¹⁹ (図 37.)、植物葉緑体 DNA に特異的な 16S rRNA 遺伝子領域を増幅する PSf (5'-GGGATTAGATACCCCWGTAGTCCT-3') を用いた²⁰ (図 38)。対となるプライマーには 16Sr RNA のユニバーサルプライマーの Ur を使用した (表 1)。

表 1. 使用したプライマーの配列と増幅できるサイズ

プライマー名称	配列	増幅サイズ (bp)
mit17 BF	GTCAGTTCGAATCTGGCCCTAGTT	約1300
mit17 R	ATGTGTTAGGCCGACCACTA	
PSf	GGGATTAGATACCCCWGTAGTCCT	約700
Ur	ACGGYTACCTTGTACGACTT	

mit17 BF

32821 AAATCTTTAT TAGGTGAGT CGAATCTGAC CCTAGTCTTT ACTACTACAA CATAAAATTA
trnC

32881 AACTACATAT GGGTATACTG TTTTATCTTT TTAGTTCCAA TAATATTCAT TTTCTTTTAA

32941 CAGACTGTAA AGGCAAAATT AAATCTTGA CAACCTGCAGG CAAGTCAAGG TCAAAAGGGG

33001 TAAAAAAGAG CCGTCTCTTT TCTTCGTCGG AAATAACCCA CTCTTAGAG ATAAAGACTA

rps11

33061 AAGCACTCAG TTATACTTCT TTACATGTAC GGATAAAGG ATGAGGTAAA AATAAAAAAA

33121 ATGTGTTTAA AATATTAATA CAGCTAAAC TTAATTTAT CTCTGTAATG GATATTACAA

33181 CTTGTCGCA TAATGGCTGT AAAATCCCAA GAAAAAGAAA ACTATAATAT GCAGAACATC

33241 AATAGACCAA TTTCTCCACA TTTAACTATA TACAATCCGC AAAGATCTTC TATTTTTTCT

33301 ATTTGGCATA GAATTTCTGG CGTTATTATG TTTGTTTTAA TTGATGCCG TATTCTTTTA

33361 CTAATCAAG TATACTTTTT ATATATTACT ATTCGCGCAA TACATTTTTT TGATAGTAC

sdh3

33421 CTTCTTTTTT CTTGGTTTTT AACTAGTGTG CGGTGAAGTAT TGTCGCCAT ATTTCTATAC

33481 CACATAAGTA ATGGAATACG CCATTTTTTT TGAGATTGAG TAAAATATGT AAATACAAGG

33541 AAAATGTACA AAGATAGCAA TTATCTTTTA CTTTTTTTAC TTATTGCTAA TATTATTCAA

33601 CTTTATATC AATTTTAAAG GCGGAAATAG CTTAATAGGC AAAGCATGAC CTTGCCAAGG

trnG

33661 TCATTATAAG GGTCAAGTC CTTTTTTTTC CTTTTTATTT TCTGGTAGCT TCAATGGTTA

33721 GAGCAGGTAG CTGTAACTA CAAGGTTATA GGTTCAAATC CTATCCAGAA AGAGTCAATA

trnN

33781 TCACTATATC AAGATGTAGC GTAATGGTAA CGTACTTGCT TTGGGTGCAA GGAATGGTA

trnP

33841 GTTCAAATCT GCCCATCTTG ATACACAATAT GTATGAATAA AATAAAAAAA TATAGGAGAC

33901 TTTTTATACG TAGAACAAG CTAGAAAATA AACTATGTTT CGCATTAAAA CAAAAAAGT

33961 ATACAACCTT TTGTAAAGCA AATTTTATCC TCATTACCAA AAGGAAGATT ACCAACATAT

34021 ATATCGCTTC TGTCTTAGCT CGCTGGATAA CTTTATACAA TCAAATTTAA TTTCTGAGAT

34081 AGCAAACATA AAAACATAAC ATAATAATAA AAGAGTTTGA TCCTGGCTCC GAATGAATAC

mit17 R

34141 TAGTGGTCGG CCTAACACAT GCAAGTTTAA TAATTTTCGT AACTTATGAA AAAGATAGCG

rns

図 37. 糸状体 DNA の増幅に用いたプライマー mit17 BF と mit17 R の位置。

スサビノリのミトコンドリアゲノム (OR123501.1) における mit17 BF と mit17 R によって増幅される領域を示す¹⁹。増幅される配列に *trnC*, *rps11*, *sdh3*, *trnG*, *trnN*, *trnP*, *rns* が含まれている。

PCR

PCR は Quick Taq™HS DyeMix (TOYOBO) を用いて行った。鋳型 DNA には貝殻有機基質シートから抽出した DNA を用いた。PCR は熱変性を 94°C で 30 秒、アニーリングを 58°C で 30 秒、伸長を 68°C で 90 秒を 1 サイクルとして、計 40 サイクル行った。PCR 産物は、1% アガロースゲルで電気泳動に供し、増幅 DNA 断片を確認した。増幅が確認された PCR 反応液を MultiScreen (MILLIPORE) で限外濾過し、増幅 DNA 断片を回収した。Qubit™dsDNA BR Assay kit (Invitrogen) を用いて濃度を

	<i>Bacillus</i>	AGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCA
	<i>Mycobacterium</i>	AGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCA
バクテリア	<i>Vibrio</i>	AGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCA
	<i>Pseudomonas</i>	AGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCA
	<i>Roseobacter</i>	AGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCA
	<i>Anacystis</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
シアノ	<i>Synechococcus</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
バクテリア	<i>Gloeotheca</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Microcoleus</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Gloeobacter</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Cyanophora</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Spirogyra</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Chlorella</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Scenedesmus</i>	AGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
真核藻類	<i>Euglena</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
色素体	<i>Cyanidium</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Porphyra</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Olisthodiscus</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Odontella</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Gyrosigma</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Halsea</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Emiliania</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Cryptomonas</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Dinophysis</i>	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT
	<i>Gymnodinium</i>	AGGATTAGGTACCCTT GTAGTCCCT
	PSforward	GGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCCT

図 38. 糸状体 DNA の増幅に用いたプライマー PSf。

PSf は *Bacillus subtilis* の 16S rDNA (PP125636.1) における 784 ~ 807 bp に対応する 24 bp の領域を元に作製されたプライマーである¹⁷。シアノバクテリアおよびその色素体をもつ真核藻類では 4 つの塩基配列の置換が保存されており、図中では灰色にハイライト部分とその配列を示している。PSf はその置換された塩基配列から設計されたプライマーであり、図中では PSforward で示されている。対となるプライマーには 16S rRNA のユニバーサルプライマーの Ur を使用した。

測定した。

塩基配列決定による種同定

シーケンス解析はユーロフィンに依頼した。指定の条件で試料を調製した。PCR産物が30~120 ng、プライマーは9.6 pmolになるようにし、Milli-Qで合計21 µLに調整した。プライマーはPCRに使用したプライマーmit17 BFあるいはPSfを用いた。解析結果をコンピューターソフトウェア Chromas で確認し、得られた塩基配列を Blast 検索した。

系統樹によるクラスター解析

シーケンス解析で得られた塩基配列と NCBI に登録されているウシケノリ科紅藻のミトコンドリアゲノムと葉緑体の塩基配列を用いて、MEGA7.0 で系統樹を作製した。

貝殻糸状体の培養

アコヤガイ貝殻から、K-100 PCB CUTTER (ホーザン) を用いて貝殻の前耳付近を切断して集めた。その貝殻を2か月間17°Cの強化海水培地 (Provasoli's enriched sea water : PES 培地)²¹ 中に入れ、糸状体の培養を試みた。PES 培地は濾過した外洋海水をオートクレーブ (120 °C、20 分) で滅菌後、滅菌海水 1000 mL に対し 20 mL の PES medium を加え攪拌し作成した。PES medium の組成は表 2 に示した通りで、作製の際には試薬を表の順番通りに所定量加えた。

表 2. PES medium の組成

PES medium		*Fe stock solution	
Tris hydroxymethyl aminomethane	5.0 g	Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O	330 mg
NaNO ₃	3.5 g	Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	351 mg
Na ₂ -glycerophosphate	500 mg	DW	
*Fe stock solution	250 mL	Total	500 mL
**P-2 metal mix	250 mL	**P-2 metal mix	
Vitamine B12 stock solution (0.1 mg / ml)	1.0 mL	Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O	500 mg
Thiamine-HCl stock solution (0.1 mg / ml)	5.0 mL	H ₃ BO ₃	570 mg
Biotine stock solution (0.1 mg / ml)	0.5 mL	FeCl ₃ · 6H ₂ O	24.5 mg
DW		MnSO ₄ · 4H ₂ O	82.0 mg
Total	1000 mL	CoSO ₄ · 7H ₂ O stock solution (4.8 mg / ml)	0.5 mL
pH 7.8		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	11.0 mg
		DW	
		Total	500 mL

結果

DNA の抽出

脱灰したアコヤガイ貝殻有機基質シート (No.1~10) から抽出した DNA の濃度はいずれも 50 ng/mL 以下であった。これらの DNA 溶液を PCR に供した。

PCR

プライマー mit17 BF および mit17 R を用いて PCR を行った結果、試料 No.2、4、5、8 で 1300 bp の DNA の増幅が確認された (図 39)。これらの増幅が確認できた PCR 産物を精製し、DNA 濃度測定を行ったところ、試料 No.2 のみで濃度が測定できたため、試料 No.2 の PCR 産物をシーケンス解析に供した。プライマー PSf および Ur を用いて PCR を行った結果、試料 No.2、4、5、6、7、8、9 で約 700bp の DNA の増幅が確認された (図 40)。これらの増幅が確認できた PCR 産物を精製し、DNA 濃度測定を行った結果 No.2、4、5、6、9 で濃度が測定できた。そのためこれらの PCR 産物をシーケンス解析に供した。

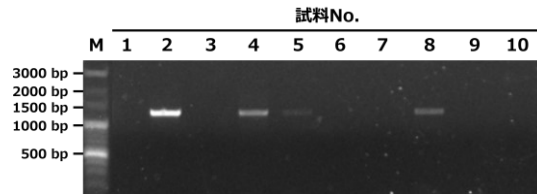


図 39. アコヤガイ貝殻有機基質シートから抽出した DNA を鋳型として、プライマーに mit17 BF と mit17 R を用いた PCR 結果。

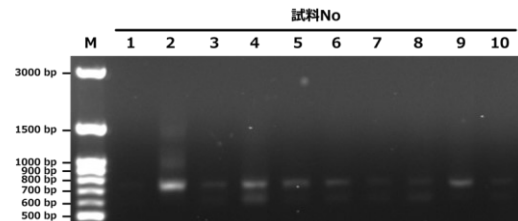


図 40. アコヤガイ貝殻有機基質シートから抽出した DNA を鋳型として、プライマーに PSf と UR を用いた PCR 結果。

塩基配列決定による種同定

シーケンス解析で得られた塩基配列を Blast 検索した。試料 No.2 では、プライマー mit17 BF を用いた場合に、*Bangia fuscopurpurea* ミトコンドリア DNA と 93.75% の相同性が、プライマー PSf の場合に、同じく *Bangia fuscopurpurea* の葉緑体と 94.16% の相同性があつた (表 3)。試料 No.4 では、Uncultured bacterium clone SGU1395 16S ribosomal RNA gene と相同性が 94.48% で、試料 No.5、6 では Uncultured *Desulfocaldus* sp. Clone N-181 16S ribosomal RNA gene と相同性がそれぞれ 85.29% と 96.89%、試料 No.9 では Uncultured organism clone ELU0040-T218-S-NIPCRAMgANa_000124 small subunit ribosomal RNA gen と相同性が 97.89% であつた。

た (表 3)。

表 3. 得られた塩基配列の Blast 検索結果

鋳型DNA 使用したプライマー	検索結果	相同性
試料No.2 mit17 BF	<i>Bangia fuscopurpurea</i> isolate OUPT01 mitochondrion	93.75%
試料No.2 PSf	<i>Bangia fuscopurpurea</i> chloroplast	94.16%
試料No.4 PSf	Uncultured bacterium clone SGUS1395 16S ribosomal RNA gene	94.48%
試料No.5 PSf	Uncultured <i>Desulfocaldus</i> sp. clone N-181 16S ribosomal RNA gene	85.29%
試料No.6 PSf	Uncultured <i>Desulfocaldus</i> sp. clone N-181 16S ribosomal RNA gene	96.89%
試料No.9 PSf	Uncultured organism clone ELU0040-T218-S-NIPCRAMgANa_000124 small subunit ribosomal R	97.89%

系統樹によるクラスター解析

ミトコンドリア DNA の塩基配列を用いて系統樹を作製した (図 41)。今回得られた配列は、ウシケノリ属のクラスターに属していた。葉緑体 DNA の塩基配列を用いて作製した系統樹でも、ウシケノリ属のクラスターに属していた (図 42)。この結果から、アコヤガイ貝殻から抽出した DNA はウシケノリ属のものであると考えられた。

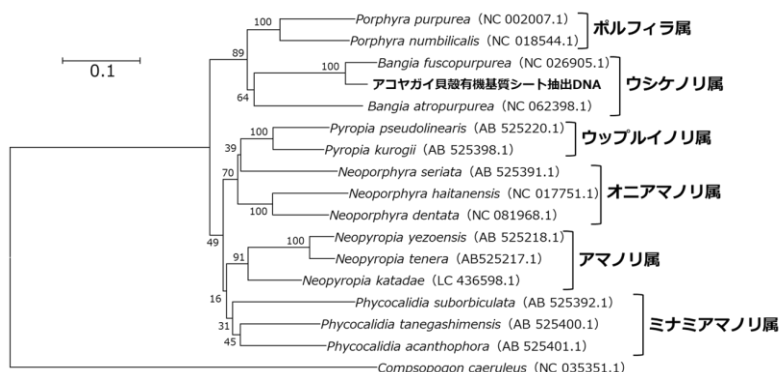


図 41. ミトコンドリア DNA の塩基配列を用いて作製した系統樹。

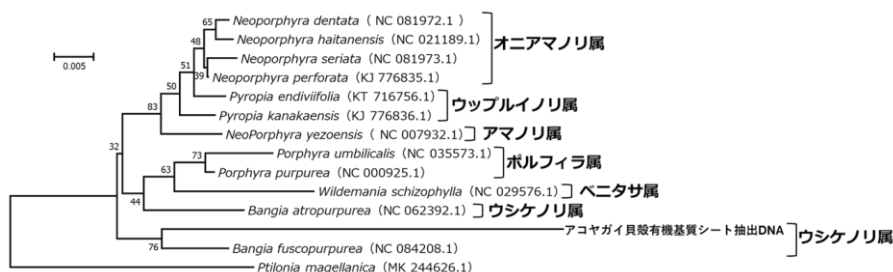


図 42. 葉緑体 DNA の塩基配列を用いて作製した系統樹。

糸状体培養実験

PES 培地で 2 か月間培養したアコヤガイ貝殻の真珠層表面には褐色の斑点があり、また藻のようなものが確認できたことから、糸状体から成長したものではないかと考えられた (図 43A)。また、図 43B で示した貝殻にも同様の斑点や藻のようなものが確認できたが、貝殻の右側には褐色の斑点がなかった。この貝殻の左側部分は前耳で、右側部分は第 1 章の結果で示したように、糸状体が分布していないところであるという点からも、貝殻表面の褐色の斑点と藻のようなものは糸状体によるものであると考えた。

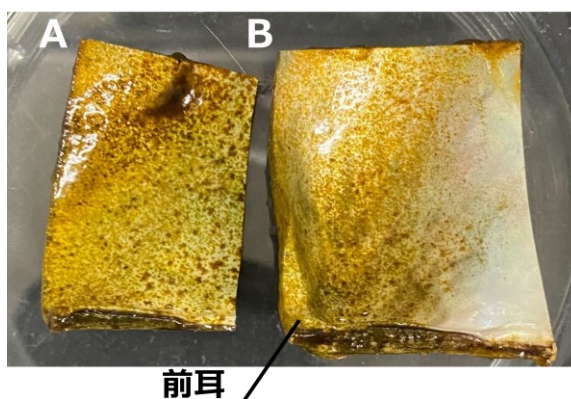


図 43. 2 か月間 PES 培地で培養したアコヤガイ貝殻前耳付近。

A : アコヤガイ貝殻前耳付近のみ切り取った貝殻片。

B : アコヤガイ貝殻前耳付近およびその周辺を切り取った貝殻片。

考察

アコヤガイ貝殻有機基質シート DNA を鋳型にして、アマノリ属特異的プライマーを用いた PCR で得られた DNA 断片の塩基配列を Blast 検索したところ、試料 No.2 が *Bangia fuscopurpurea* と約 94% の相同性を示した (表 3)。*Bangia fuscopurpurea* は紅藻で、ウシケノリ綱ウシケノリ目ウシケノリ科ウシケノリ属ウシケノリであることから、アコヤガイ貝殻中に存在する糸状体はウシケノリ属の一種のものであると明らかになった。今回使用したプライマー mit17 はアマノリ属 DNA を特異的に増幅するもので、プライマー PSf は植物葉緑体 DNA を特異的に増幅するものであったが、今回 PCR で増幅したのは、アマノリ属がウシケノリ属と近縁であるためと考えられた。今回得られた塩基配列はデータベースには完全一致するものがなかった。したがって種同定には至らなかったが、系統樹解析からウシケノリ属の一種であると判断した。

試料 No.4 では Uncultured bacterium clone SGU1395 16S ribosomal RNA gene と 95% の相同性を示した。この遺伝子は病気のサンゴに含まれる細菌成分を調べるために行われた実験で検出された細菌由来のもので、サンゴに含まれている細菌を検出する際に得られたものであった²²。このことから試料 No.4 の結果は、糸状体 DNA 抽出の際に貝殻に存在していたこの細菌の DNA が混入し、それが増幅されたと考えられた。アコヤガイもサンゴのどちらも海洋中に存在していることから Uncultured

bacterium clone SGU1395 は海洋中に普遍的に存在する難培養性細菌と考えられた。また、プライマーPSf はシアノバクテリアを増幅することができるためこの細菌はシアノバクテリアである可能性がある。

試料 No.5、6 では Uncultured *Desulfocaldus* sp. Clone N-181 16S ribosomal RNA gene とそれぞれ 84%、97%の相同性を示した。*Desulfocaldus* はデルタプロテオバクテリア属の細菌で、詳細は不明である。アコヤガイ貝殻に存在していたこの細菌が混入した結果検出されたと考えられた。

試料 No.9 は Uncultured organism clone ELU0040-T218-S-NIPCRAMgANa_000124 small subunit ribosomal RNA gene と 95%の相同性を示した。この遺伝子はヒト回腸に存在する微生物の組成についての研究で得られたものであった²³。これもアコヤガイ貝殻に存在していた細菌が混入して検出されたと考えられた。

アコヤガイ貝殻の前耳付近を用いて糸状体の培養を試みた結果、糸状体によるものと思われるものが確認できた。解析を行い、これがウシケノリ科のノリならば、アコヤガイ貝殻に糸状体が存在している決定的な証拠になる。今後の課題である。

本章ではアコヤガイ貝殻中の糸状体 DNA の抽出、また PCR による検出に成功した。得られた塩基配列はデータベースになく種同定には至らなかったが、ウシケノリ属の一種であることがわかった。これまで糸状体は貝殻真珠層には存在しないとされていたが、実は存在していることを明らかにした。真珠層では光学顕微鏡で構造が透けて観察できたので糸状体の存在が確認できた。ほとんどの貝殻ではそうはいかない。また、本章で行った DNA 抽出法は、さまざまな貝殻中から糸状体 DNA を抽出する際の手段として利用できると考えている。

本章の成果は、ウシケノリ科生活環の研究に新たな手法を加えるものであり、紅藻の研究発展に資するものと期待される。

第3章 総括的考察

本研究ではアコヤガイ貝殻中に存在するフィラメント様構造体の正体を突き止めることを目的とした。

第1章では、フィラメント様構造体は貝殻の前耳付近に存在していること、パラミオシンなどの筋タンパク質は含まれていないこと、自家蛍光を持っていること、またその形状から紅藻の糸状体だと明らかにした。

第2章では、その糸状体の種を確かめるために、貝殻から抽出したDNAを鋳型にしてアマノリ属特異的プライマーを用いたPCRを行い、増幅したDNAのシーケンス解析を行ったところウシケノリ属の糸状体であるということが分かった。

当初はフィラメント様構造体が貝殻形成に関与していると予想していたが、予想に反して貝殻形成メカニズムには関与していないということが分かった。

今回の実験でアコヤガイ貝殻中に糸状体が存在しているということが分かったが、自然環境中に存在する糸状体の存在については未知の部分が多い。いくつかの研究結果では自然環境中に存在するペルナイガイ *Perna perna* やホンヒバリ *Modiolus modiolus* の貝殻、フジツボの殻などに糸状体が存在していることが確認されている²⁴。今回得られた結果は、自然環境中におけるアコヤガイの貝殻中に糸状体が入り込んでいることを示した数少ない例の一つであると考えられる。

アコヤガイ貝殻中に存在している糸状体がウシケノリであったという点については、より多くのサンプルに含まれる糸状体を解析することでウシケノリ以外の種が検出される可能性が高い。なぜなら海洋中に当然ウシケノリ以外のノリが存在しており、それらの胞子が海洋中に存在しうるからである。その際、アコヤガイ貝殻中にウシケノリの糸状体、もしくは他の種のノリの糸状体が優位に多く存在していた場合、特定のノリの選別に利用できるのではないかと考えられる。つまり、貝殻の種類ごとに成長しやすい、もしくは成長可能な糸状体の種が異なるのであれば、繁殖させる貝殻を変えることで特定の糸状体のみを狙って増やすことが可能になるのではないかと考えた。ウシケノリ綱の紅藻は形態的には類似しているが遺伝的には異なるものが存在している。そのためそれらを区別するには詳細な観察やPCR-RFLP解析を行うことで区別することができる²⁵。もし貝殻ごとに成長しやすい糸状体が分かれば特定のノリのみを獲得や特定を簡便に行うことができるのではないかと考えられる。

今後のノリ研究にこれらの結果が役立つことが期待できる。

参考文献

- 1 “真珠の歴史” 三重県真珠養殖漁業協同組合 <https://www.mie-pearl.net/company/pearlhistory.html> (参照 2024.02.08)
- 2 “真珠産業及び真珠に係る宝飾文化の振興に関する情報” 農林水産省 <https://www.jfa.maff.go.jp/j/saibai/attach/pdf/shinju-2307-03.pdf> (参照 2024.02.08)
- 3 Etsuko Aiko “真珠養殖成功から 130 周年。海を守り、自然と共生する MIKIMOTO の真珠づくり” THE NIKKEI MAGAZINE <https://magazine.nikkei.com/article/DGXZQOKC135MV0T10C23A3000000> (参照 2024.02.08)
- 4 Daiki Tsukamoto, Isao Sarashina, Kazuyoshi Endo “Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004 320 (4) p1175-1180
- 5 Cen Zhang, Liping Xie, Jing Huang, Xiaolei Liu, Rongqing Zhang “A novel matrix protein family participating in the prismatic layer framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006 344 (9) p735-740
- 6 Yawei Kong, Gu Jing, Zhenguang Yan, Hongzhong Wang, Liping Xie, Rongqing Zhang “Cloning and Characterization of Prsilkin-39, a Novel Matrix Protein Serving a Dual Role in the Prismatic Layer Formation from the Oyster *Pinctada fucata*” *Journal of Biological Chemistry* 2009 284 (16) p10841-10854
- 7 Shu Sudo, Takahiko Fujikawa, Takeshi Nagakura, Takeshi Ohkubo, Kesami Sakaguchi, Minoru Tanaka, Kunio Nakashima, Takao Takahashi “Structures of mollusc shell framework proteins” *Nature* 1997 387 p563-564
- 8 H Miyamoto, T Miyashita, M Okushima, A Matsushiro “A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls.” *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1996 93 (18) p9657-9660
- 9 Cen Zhang, Shuo Li, Zhuojun Ma, Liping Xie, Rongqing Zhang “A Novel Matrix Protein p10 from the Nacre of Pearl Oyster (*Pinctada fucata*) and Its Effects on Both CaCO₃ Crystal Formation and Mineralogenic Cells” *Marine Biotechnology* 2006 8 p624-633
- 10 Masato Yano, Kouhei Nagai, Koichi Morimoto, Hiroshi Miyamoto “A novel nacre protein N19 in the pearl oyster *Pinctada fucata*” *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications* 2007 362 (1) p158-163
- 11 山本彩愛“アコヤガイ貝殻におけるパラミオシンの分布観察”三重大学卒業論文 2020
 - 12 岩橋晴香 “アコヤガイ貝殻内の ACC 結合タンパク質の構造・機能解析” 東京大学大学院修士論文 2020
 - 13 中川遙香 “アコヤガイ貝殻中の筋タンパク質の蛍光免疫染色による局在解析” 三重大学卒業論文 2021
 - 14 Jingliang Huang, Taifeng Jiang, Chuang Liu, Yangjia Liu, Guilan Zheng, Hongzhong Wang, Guiyou Zhang, Liping Xie, Rongqing Zhang “Transition from horizontal expansion to vertical growth in the oyster prismatic layer” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2021 563 p47-53
 - 15 Ningping Gong, Junlong Shangguan, Xiaojun Liu, Zhenguang Yan, Zhuojun Ma, Liping Xie, Rongqing Zhang “Immunolocalization of matrix proteins in nacre lamellae and their in vivo effects on aragonitic tablet growth” *Journal of Structural Biology* 2008 164 (1) p33-40
 - 16 Wentao Dong, Jingliang Huang, Chuang Liu, Hongzhong Wang, Guiyou Zhang, Liping Xie, Rongqing Zhang “Characterization of the Myostracum Layers in Molluscs Reveals a Conservative Shell Structure” *Marine Molecular Biology and Ecology* 2022 9
 - 17 尾形英二 “ノリ糸状体の成長に関する研究” 水産大学校研究報告 1961 10 (3) p423-500
 - 18 千原光雄 “藻類の多様性と系統” 裳華房 1999 p6、184
 - 19 Mahiko Abe, Masahiro Kobayashi, Eiji Fujiyoshi, Motoya Tamaki, Norio Kikuchi, Noboru Murase “Use of PCR-RFLP for the discrimination of Japanese *Porphyra* and *Pyropia* species (Bangiales, Rhodophyta)” *Journal of Applied Phycology* 2012 25 p225-232
 - 20 John W. Stiller, Ana Mcclanahan “Phyto-specific 16S rDNA PCR primers for recovering algal and plant sequences from mixed samples” *Molecular Ecology Notes* 2004 5 (1) p1-3
 - 21 “培地、培養法” 神戸大学 海藻類系統株コレクション <https://ku-macc.nbrp.jp/strain/cultureCondition> (参照 2024.02.08)
 - 22 Shinichi Sunagawa, Todd Z DeSantis, Yvette M Piceno, Eoin L Brodie, Michael K DeSalvo, Christian R Voolstra, Ernesto Weil, Gary L Andersen, Mónica Medina “Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*” *The ISME*

- Journal* 2009 3 p512-521
- 23 Ellen Li, Christina M Hamm, Ajay S Gulati, R Balfour Sartor, Hongyan Chen, Xiao Wu, Tianyi Zhang, F James Rohlf, Wei Zhu, Chi Gu, Charles E Robertson, Norman R Pace, Edgar C Boedeker, Noam Harpaz, Jeffrey Yuan, George M Weinstock, Erica Sodergren, Daniel N Frank “Inflammatory bowel diseases phenotype, *C. difficile* and NOD2 genotype are associated with shifts in human ileum associated microbial composition” *PLoS One* 2012
- 24 Eduardo R. Mizuno, Mariana C. Oliveira, Eurico C. Oliveira “On the natural populations of the conchocelis phase of *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta) in southeastern Brazil” *Algal Resources* 2010 3 (2) p145-152
- 25 Kyosuke Niwa, Norio Kikuchi, Mi Sook Hwang, Han-Gu Choi, Yusho Aruga “Cryptic species in the *Pyropia yezoensis* complex (Bangiales, Rhodophyta) : Sympatric occurrence of two cryptic species even on same rocks” *Phycological Research* 2014 62 (1) p36-43