現生および化石カキ殻体中の可溶性有機基質の 分子進化に関する研究

佐 俣 哲 郎*

Studies on molecular evolution of soluble organic matrix from
the recent and the fossil oyster shells

Tetsuro SAMATA*

Abstract The water-soluble organic matrices were isolated from the recent oyster shells (*Crassostrea gigas*) and three fossil oyster shells (Miocene *Ostrea crassissima*, Cretaceous *Lopha diluviana* and Jurassic *Lopha marshi*). After incubation with ^{45}Ca for the determination of the Ca-binding capacity, the whole water-soluble matrices were fractionated by six different chromatographic procedures into at least eight components. These procedures finally yielded a highly purified Ca-binding peptide from each of the species examined. Its molecular weight was estimated between 2000 and 6000 daltons. Amino acid analysis showed that it was composed mainly of five predominant amino acids, i. e., glycine, glutamic acid, serine, aspartic acid and alanine. Their total content reached more than 60 mole percent.

The chromatographic profiles of the whole matrices from the recent and the fossil oyster shells were remarkably similar, indicating excellent preservation of each component in the fossil species. Moreover, the presence of the functionable Ca-binding peptide in the fossil species indicates that no critical damages had occurred to its peptide structure. Binding with CaCO_3 crystals might protect the peptide in the fossil oyster shells from diagenetic decomposition.

It was supposed that phylogenetic relationship may be reflected in the amino acid composition of the Ca-binding peptide. It was postulated as (1) *L. marshi*-*L. diluviana*-*O. crassissima* and (2) *L. marshi*-*L. diluviana*-*C. gigas*. This relationship accorded very well with the result of SIEWERT(1972), who proposed a phylogenetic relationship of oysters on the basis of comparison of the shell ultrastructures. The molecular evolution process of the Ca-binding peptide in the oyster shells is believed to have occurred since Jurassic time. This process is replacement of some amino acids without significant change in its peptide structure.

ま え が き

ABELSON (1954) によって化石軟体動物殻体中からアミノ酸が発見されて以来, 化石硬組織中の有機物を研究する分野として古生化学が生まれた. 化石軟体動物殻体中の有機物は, FRÉMY (1855) が発見して「コンキオリン」

と名付けた有機基質に由来すると考えられた. 1950～1970 年代前半にわたる古生化学の初期の研究段階では, 化石種と現生種の硬組織中の全有機基質のアミノ酸組成の比較に基づく研究が主体であった. この時期の研究結果は, WYCKOFF (1972) によって総括されている. 特に軟体動物殻体中の有機基質に関しては, 種ごとに基質のアミノ酸組成に違いの存在することが多くの研究者によって示されたが (堀田, 1965; DEGENS & LOVE, 1965; DEGENS *et al.*, 1967; MATTER *et al.*, 1969), 化石種の

1980 年 11 月 29 日受理

* 麻布大学教養部, Faculty of General Education, Azabu University, Sagami-hara City, 229 Japan.

有機基質に対する汚染や続成作用の影響を先ず徹底的に検討する必要のあることも強調された(秋山, 1964; AKIYAMA, 1971; ARMSTRONG & TARLO, 1966; GRÉGOIRE & VOSS-FOUCART, 1970). 複雑な高分子量の硬タンパク質の分析はきわめて困難であるため, この時期の研究においては硬組織中の基質の構造に関しては余り触れられなかった. そのなかで GRÉGOIRE(1955)は, 軟体動物殻体中の有機基質が各々性質の異なる少くとも三つの成分から構成されており, このうちの一つは酸や水に可溶性であることを示した. また HOTTA(1969)は, 軟体動物有機基質の赤外線吸収像を解析して基質の一部が β シート構造を持っている可能性を示した. その後, CRENshaw(1972)は, 現生の *Mercenaria mercenaria* の殻体中に存在する可溶性有機基質を分析して, Ca イオンを結合する高分子量の糖タンパク質の分離に成功した. この研究によって, タンパク質の性質を調べるために生化学の分野で用いられている諸種の分析手段を用いて殻体中の有機基質を研究する端緒が開かれた. 現在までに何人かの研究者によって軟体動物殻体中の可溶性有機基質が分析され, 基質の構造と機能に関する重要な報告がなされている. これらの研究結果に関しては, DEGENS(1976)と KRAMPITZ & WITT(1978)が総括を行っている. また, 化石軟体動物殻体中の可溶性有機基質の分析も行われ, 最高1億6500万年前の殻体中から保存良好な基質の存在が報告されている. これらの化石種の基質のタンパク質成分の構造は, 類縁の現生種の基質の構造と良く比較できるとされ, アミノ酸組成も類似しているという(WEINER *et al.*, 1976; WEINER *et al.*, 1979; WESTBROEK *et al.*, 1979; SAMATA, 1979; 佐俣, 1981).

筆者は, KRAMPITZ & ENGELS(1975)の分析方法を基にして, 現生と化石種の4種類のカキの殻体中の可溶性有機基質の古生化学的研究を行った. 本研究の方法上の特色は, 殻体の脱灰後に抽出された全可溶性有機基質を放射性同位元素である ^{45}Ca で標識し, Ca イオンと結合する成分のみを6段階のクロマトグラフィーを通して分離した点にある. その結果, 現生および化石種の全てのカキの殻体から, 高度に純化された Ca イオンを結合する小ペプチドが分離できた. このペプチドの構造を4種間で比較した結果, 注目すべき事実が明らかになったのでここに報告する.

材料と分析法

I 材料

カキ科の現生種1種と化石種3種を試料として用い

Table 1 Localities and horizons of the samples.

<i>Crassostrea gigas</i> (THUNBERG) : Bassin d'Arcachon (southern part of France), Recent
<i>Ostrea crassissima</i> (LAMARCK) : Clermont L'Herault (southwestern part of France), middle Miocene (Burdigarian Stage, about 15 million years old)
<i>Lopha diluviana</i> (LINNAEUS) : Essen Green Sandstone of Kassenberg, Muhlheim (northwestern part of Fed. Rep. Germany), upper Cretaceous (Cenoman or Turon Stage, about 100 million years old)
<i>Lopha marshi</i> (SOWERBY) : Between Beuren and Jungingen (southwestern part of Fed. Rep. Germany), middle Jurassic (Dogger Stage, about 165 million years old)

た. 現生種は *Crassostrea gigas*(THUNBERG)であり, 化石種は *Ostrea crassissima*(LAMARCK), *Lopha diluviana*(LINNAEUS)および *Lopha marshi*(SOWERBY)である. 試料の採集地および産出層準は表1に示した. なお, *L. diluviana* と *L. marshi* については西ドイツのボン大学理学部古生物学教室付属博物館所有の標本を提供していただいた.

II 分析法

1 可溶性有機基質の抽出法 10 kg のカキの殻体から殻皮をはじめとした殻体表面の付着物を金属ブラシで除去した後, 5分間 0.3 N HCl に浸した. その後蒸留水で洗浄し, 乾燥してから粉末になるまで粉碎した. この粉末試料を脱灰溶液中で 4°C , 24時間かくはんして脱灰した. 脱灰溶液には 0.1 M Tris-HCl, 5% Na-EDTA, 0.1 M 2-メルカプトエタノールを用いた. 脱灰溶液の pH は 7.0 に調整した. 得られた懸濁液をろ紙でこした後, 遠心分離し(3000 rpm, 20分間), 上澄液のみを24時間水で透析した後に凍結乾燥した. この乾燥試料が全可溶性有機基質であり M I (Matrix I) と名付けた. 一ぱう, 遠心分離の結果生じた沈殿物は不溶性有機基質であり M II (Matrix II) と名付けた. 本論文では主に M I のみについて検討を加える. 以上の抽出法は現生種と化石種について全く同様に適用した.

2 ^{45}Ca による標識法と放射能測定法 M I を最初の展開カラム (Bio-Gel P-30) に用いるバッファー溶液中に溶かし, ここに $0.1 \mu\text{Ci}$ の $^{45}\text{CaCl}_2$ を加えて90分間かくはんすることで放射能を付与した. この ^{45}Ca で標識した M I を Bio-Gel P-30 に展開した後, フラクションコレクター中の各試験管から溶出液 0.5 ml を採取し, 9.5 ml の液体シンチレーションカウンタ用

Fig. 1. Scheme for fractionation of EDTA extracts from the oyster shell.

カクテル(299TM)と混合し、液体シンチレーションカウンタ(バックード トリカルブモデル 3003)で放射能測定を行った。この際、0.1 μCi の $^{45}\text{CaCl}_2$ の標準放射能値と自然計数の計測のために、0.5 ml の 0.1 μCi , $^{45}\text{CaCl}_2$ 溶液および等量の Bio-Gel P-30 用のバッファー溶液を各々 9.5 ml のシンチレーションカクテルと混合してその放射能を測定した。

3 全可溶性有機基質の分画法 MI は ^{45}Ca で標識後、ゲルろ過法(Bio-Gel P-30)によって分画した。試料のカラムへの展開後、10 分間ごとに 5 ml ずつの溶出液がフラクションコレクター中の試験管内に集まるようにした。いっぽう、カラムとフラクションコレクターの間に設置した光電計により、波長 235 nm での溶出液の吸光度が計測されクロマトグラムとして記入されるようにした。フラクションコレクター中に集められた各々の溶出液の放射能強度を測定した後、その値をクロマトグラムと対照して Ca イオン結合画分の位置を決定した。

Bio-Gel P-30 を通して分離した MI の 2 つの成分のうち、Ca イオン結合能力を持つ PB 画分のみを 12 時間水で透析し、凍結乾燥して再分画した。このようにして、Ca イオン結合能力を持つ画分のみを次々と 6 段階の異なる方法で分画した。分画方法と得られた画分の名称を図 1 に示す。なお、各クロマトグラフィーの溶出バッファーの種類と分析条件に関しては改めて報告する。

4 化学分析法 エステル硫酸基の分析は、バリウムクロールアニラート法(WAINER & KOCH, 1962)にて、リン酸基の分析は、TAUSSKY & SHORR(1967)の方法にて、全ヘキソースの分析は、アントロン法(SCHIELDS & BURNET, 1960)にて、ウロン酸の分析は、改良されたカ

ルバツオール法(BITTER & MUIR, 1962)にて、N-アセチルラムリン酸の分析は、AMINOFF(1961)の方法にて、タウリンの分析は、CURZON & GILTROW(1954)の方法にて行った。

アミノ酸分析用試料は、封管した試験管中で 6 N HCl で加水分解し(110°C, 24 時間)、脱塩後、アミノ酸自動分析器(ベックマン B 110)にて分析した。

5 走査型電子顕微鏡による観察 4 種の殻の破断面に炭素蒸着した後、ケンブリッジ インストゥルメント S 4 型走査型電子顕微鏡にて観察した。

結 果

I 分画結果

4 種類のカキの殻体に含まれる EDTA による抽出物を 6 段階のクロマトグラフィーによって分析した分画像と Ca イオン結合画分の位置を図 2 に示す。本図は、4 種類のカキからの EDTA 抽出物が単一の組成の高分子物質ではなく、少なくとも 8 種類以上の異なる成分で構成され、さらにこの成分のうちの 1 つの成分のみが強い Ca イオン結合能力を持っていることを示している。また、各々の純化段階での分画像、Ca イオン結合画分の位置および結合強度は 4 種類のカキを通じて類似しており、とりわけ Bio-Gel P-6 より後の純化の度合いの高い成分のクロマトグラフについては、4 種類の間に差異は全く見出せなかった。

1 ゲルクロマトグラフ法(Bio-Gel P-30)による分画 図 2 に示したように、Bio-Gel P-30 による EDTA 抽出物(MI)の分画の結果、溶出時間が早く、かつ Ca イオン結合能力を持たない PA 画分と、これよりも

Fig. 2. Elution chromatograms of the EDTA extracts from the recent and the fossil oyster shells.

ずっと遅れて溶出し、かつ Ca イオン結合能力を持つ PB 画分の存在が4種に共通して認められた。PB 画分の収量は4種のカキのあいだで、殻体 10 kg 当り 30 g

Table 2. Amino acid compositions of EDTA extracts from the recent and the fossil oyster shells (in mole percent).

	<i>C. gigas</i>	<i>O. crassissima</i>
Asp	20.3	7.7
Thr	5.5	4.6
Ser	8.1	13.2
Glu	7.3	7.9
Pro	5.6	4.5
Gly	23.1	26.5
Ala	5.4	10.7
Cys	-	-
Val	4.1	2.3
Met	0.4	+
Ile	3.4	2.7
Leu	2.8	2.5
Tyr	0.5	+
Phe	0.7	1.4
Lys	3.4	9.0
His	6.2	1.4
Arg	3.2	1.3
acidic amino acids	27.6	15.6
basic amino acids	12.8	11.7
acidic / basic	2.2	1.3
Glu / Asp	0.4	1.0
*major amino acids	64.2	66.0

* : Asp + Ser + Glu + Gly + Ala

+ : trace amount

- : not detected

～75 g の範囲で、10 g～25 g の範囲にあった PA 画分の収量よりもはるかに多かった。PA 画分はこのゲルの分子量排除限界付近にピークを持つため分子量は約 40,000 ダルトン、PB 画分のピークはこれよりも遙かに遅れて出現するためその分子量は 40,000 ダルトンよりも遙かに小さいと推定された。

2 イオン交換クロマトグラフ法 (DEAE-SS-セルロースと DEAE-セファデックス A-25) による分画 イオン交換法による PB 画分の分画の結果、現生種と化石種で基本的に同様に、溶出時間の早い PB I または PB I A 画分と溶出時間の遅い PB II 画分とが分離できることが明らかになった。分画像を詳細に比較すると現生種では PB I 画分の中が、非常に早い溶出時間帯に現われる画分とこれにやや遅れて現われる画分とに分けることができることが判る。いっぽう、白亜紀種ではピークの見分けは明確でなく、ジュラ紀種では PB I 画分は単一の大きなピークで構成されている。また、強い Ca イオン結合能力は4種とも溶出の早い画分に認められたが、化石種のみから溶出の遅い画分にも弱い Ca イオン結合能力が認められた。各々の画分の収量は、PB I ま

たは PB I A 画分が 10 kg の殻体当り 10 g~15 g, PB II 画分が 8 g~10 g で, 前者の方が多かった。

3 脂質成分の分別抽出 イオン交換クロマトグラフ法で分離した Ca イオン結合画分 (PB I または PB I A 画分) 中の脂質成分の分離のために, クロロフォルム/メタノール溶液 (混合比 2:1) が用いられた。その結果, 上澄液である水画分 (非脂質成分) に Ca イオン結合能力が局在することが明らかになった。

4 ゲルクロマトグラフ法 (Bio-Gel P-6) による分画 Bio-Gel P-6 による水画分の分画は, 単一の Ca イオン結合画分の存在を明らかにした。このため, 結果的にはこのカラムによる分画は行われず, ただ脱塩による試料の純化が行われただけであった。また, この画分は, このゲルの分子量排除限界 (約 6,000 ダルトン) よりかなり遅れて溶出するため, 6,000 ダルトン以下の分子量を持つと推定された。

5 ペーパークロマトグラフ法による分画 ペーパークロマトグラフ法による水画分の分画により, 4 種の試料とも全く同一の位置に 3 本の明瞭なニンヒドリン反応帯の存在することが確認できた。反応帯の位置は, 試料添付位置 (ろ紙下部) からろ紙上部に向かって, ニンヒドリン溶液で紫色に発色する PC I 画分 (Rf 値は 0.2), 同じく紫色に発色する PC II 画分 (Rf 値は 0.3), そして黄色に発色する展開速度の早い PC III 画分 (Rf 値は 0.75) であった。PC I 画分のみが Ca イオン結合能力を持っていた。PC I 画分が最も多量に (10 kg の殻体当り 1 g~1.5 g) 含まれ, PC II 画分と PC III 画分はほぼ等量 (10 kg の殻体当り 0.5 g~1 g) ずつ含まれていた。

6 ろ紙高圧電気泳動法による分画 PC I 画分は電気泳動法によって, 陽極方向へわずかに移動し, ニンヒドリン溶液で紫色と黄色の発色を示す HE I 画分と, 陰極方向へ移動し, 茶色の発色を示す HE II 画分とに分離された。この分画像は 4 種のカキのあいだで全く同一であった。Ca イオン結合能力は HE I 画分に存在した。HE I 画分の収量は殻体 10 kg 当り 200 mg~300 mg, HE II 画分の収量は 60 mg~100 mg であった。

7 ゲルクロマトグラフ法 (Bio-Gel P-2) による分画 HE I 画分の Bio-Gel P-2 による分画の結果, 溶出時間の早い HE I-A 画分と溶出時間のやや遅い HE I-B 画分とが 4 種のカキで共通に分離できた。Ca イオン結合能力は HE I-A 画分に局在していた。このゲルの分子量排除限界 (約 2,000 ダルトン) から, HE I-A 画分の分子量は 2,000 ダルトン以上, HE I-B 画分の分子量は 2,000 ダルトン以下であると推定された。ま

Table 3. Chemical composition of the Ca-binding fractions from the recent and the fossil oyster shells obtained at various steps of purification (in weight percent).

	amino acid	sulphate	phosphate	hexose	uronic acid
<u>C. gigas</u>					
MI	0.5	0.4	0.2	2.0	0.5
PB	2.0	4.3	0.1	1.2	0.1
PBI	4.3	1.5	0.1	3.0	0.2
PBI-P6-Ca	10.7	/	/	/	/
PCI	12.5	2.4	0.1	/	/
HEI-A	95.0	4.8	0.2	-	-
<u>O. crassissima</u>					
MI	0.4	0.1	0.2	4.0	0.3
PB	5.7	0.8	0.2	2.0	0.2
PBI	1.3	1.2	0.1	1.0	0.2
PBI-P6-Ca	6.0	/	/	/	/
PCI	20.0	2.6	0.1	/	/
HEI-A	94.4	5.5	0.1	-	-
<u>L. diluviana</u>					
PBIA	1.0	/	/	/	/
PCI	12.0	2.8	0.1	/	/
HEI-A	93.8	6.0	0.2	-	-
<u>L. marshi</u>					
PBIA	1.4	/	/	/	/
PCI	10.0	3.1	0.1	/	/
HEI-A	91.5	7.0	0.5	1.0	-

/: not analysed

-: not detected

た収量は, 前者が殻体 10 kg 当り 20~30 mg, 後者が 50~60 mg であった。

II 全可溶性有機基質の性質

分画を行っていない EDTA 抽出物 (MI) は多くの成分の混合物である。試料が多量に得られた現生種と中新世種の MI についてそれらのアミノ酸組成を分析した。結果を表 2 に示す。両種の組成は非常に異っており, 現生種では多量のアスパラギン酸とグリシンの含有が, また中新世種では多量のグリシン, セリン, アラニン, リジンの含有が特徴となっている。

III 全可溶性有機基質中の各画分の性質

4 種のカキの EDTA 抽出物から分離された各画分の中で, Ca イオン結合画分については各純化段階ごとにアミノ酸総量, エステル硫酸基含量, リン酸基含量, 全ヘキソース量, ウロン酸量およびアミノ酸モル濃度を定量した。また, 残りの全ての Ca イオン結合能力を持たない画分についてはアミノ酸モル濃度のみを分析した。化学分析の結果を表 3 に示す。

1 純化した Ca イオン結合画分の性質 分画と化学

Table 4. Amino acid compositions of the highly purified Ca-binding peptides from the oyster shells (in mole percent).

species	<i>C. gigas</i>	<i>O. crassissima</i>	<i>L. diluviana</i>	<i>L. marshi</i>
Asp	11.3	14.4	9.5	8.1
Thr	5.5	5.7	4.3	5.2
Ser	13.0	9.5	13.5	19.4
Glu	15.1	11.9	17.0	14.5
Pro	6.8	4.8	—	—
Gly	15.2	13.6	21.4	22.8
Ala	11.3	9.1	6.8	10.5
Cys	+	—	—	—
Val	2.9	4.6	4.3	2.3
Met	—	—	—	—
Ile	4.0	4.2	2.8	2.2
Leu	5.0	6.4	7.4	6.1
Tyr	—	—	—	—
Phe	—	2.5	—	—
Lys	4.4	6.5	6.1	4.6
His	2.8	3.0	2.8	5.0
Arg	3.3	3.8	3.8	+
acidic amino acids	26.4	26.3	26.5	22.9
basic amino acids	10.5	13.3	12.7	9.6
acidic / basic	2.5	2.0	2.1	2.4
Glu / Asp	1.3	0.8	1.8	1.8
*major amino acids	65.9	58.5	68.2	75.6

* : Asp + Ser + Glu + Gly + Ala

+ : trace amount

- : not detected

分析の結果, 高度に純化した Ca イオン結合画分である HE I-A 画分は, 現生種と化石種ともに 2,000 ダルトン以上, 6,000 ダルトン以下の分子量を持つ酸性ペプチドであることが明らかになった. 酸性であることはろ紙高圧電気泳動における画分の位置および多量の酸性アミノ酸の存在から明らかである.

4 種のカキの殻体から得られた Ca イオン結合ペプチドのアミノ酸組成を表 4 に示す. その基本的な特徴は 4 種間で類似しており, 5 つの主要なアミノ酸(グリシン, グルタミン酸, セリン, アスパラギン酸, アラニン)の含有量がアミノ酸総量の 60% 以上にのぼり, このうちに 20% 以上の酸性アミノ酸が含まれ, また酸性アミノ酸の中ではグルタミン酸含有量の方がアスパラギン酸含有量よりも多い. システイン, メチオニンおよびチロシンは全ての Ca イオン結合ペプチド中に痕跡量以上は含まれず, またフェニルアラニンは *O. crassissima* からのみ少量が検出されたにすぎない. さらにアルギニンは, *L. marshi* からは痕跡量以上は検出されなかった.

分析したすべての HE I-A 画分についてはアミノ酸分析のクロマトグラフ上で, アスパラギン酸よりやや前の位置に 2 つの同定不能のピークが出現した. このピークはタウリンのピークに近い位置を占めている(図 3 参照). このため, 引き続いてこの物質のタウリンとの比較同定を CURZON & GILTROW (1954) の方法に基づいて行い, タウリンに特有の黄色～橙色の発色を確認した.

Fig. 3. Unknown ninhydrin-positive peaks before the aspartic acid peak position on the chromatogram of amino acid analysis.

Table 5. Amino acid compositions of the weakly Ca-binding basic peptides from the oyster shells (in mole percent).

species	<i>C. gigas</i>	<i>O. crassissima</i>	<i>L. diluviana</i>	<i>L. marshi</i>
fractions	*PBII	PBIB	PBIB	PBII
Asp	10.8	7.9	8.1	7.3
Thr	7.1	3.3	3.8	4.6
Ser	10.4	17.3	10.1	8.8
Glu	9.1	5.3	9.6	8.5
Pro	4.2	4.3	4.3	2.4
Gly	16.3	16.8	13.0	13.7
Ala	9.8	7.7	6.4	7.3
Cys	—	—	—	—
Val	5.8	3.2	5.5	4.2
Met	—	—	0.9	+
Ile	4.7	3.3	3.2	2.6
Leu	7.0	4.5	5.8	3.7
Tyr	1.9	2.6	2.3	0.4
Phe	2.4	4.1	3.8	0.6
Lys	6.9	10.3	8.1	2.7
His	2.2	6.3	2.3	31.3
Arg	1.6	3.1	13.8	1.9
acidic amino acids	19.9	13.2	17.7	15.8
basic amino acids	10.7	19.7	23.2	35.9
acidic / basic	1.9	0.7	0.8	0.4
Glu / Asp	0.8	0.7	1.2	1.2
**major amino acids	56.4	55.0	47.2	45.6

* : PBII does not bind ⁴⁵Ca

** : Asp + Ser + Glu + Gly + Ala

+ : trace amount

- : not detected

これらの分析結果は, この物質がタウリン類似物質(タウリン誘導体)であることを暗示している.

2 弱い Ca イオン結合能力を持つ画分の性質 化石の 3 種から分離された弱い Ca イオン結合能力を持つ画分は, 多量の塩基性アミノ酸を含むことから塩基性の性質を持つと判断された. これらの画分のアミノ酸組成を表 5 に示す. 本表によれば酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸の量比は 0.4~0.8, 主要な 5 種類のアミノ酸の総量も 50% 前後と Ca イオン結合ペプチドよりも低い. 各々の塩基性アミノ酸の濃度には種ごとに大きなばらつきが見られた.

Table 6. Numbers of the amino acid residues in the highly purified Ca-binding peptide of each oyster species.

species	<i>C. gigas</i>	<i>O. crassissima</i>	<i>L. diluviana</i>	<i>L. marshi</i>
period	Recent	Tertiary	Cretaceous	Jurassic
time (m.y.)	0	15	100	165
Asp	3-6	4-7	2-5	2-4
Thr	1-3	1-3	1-2	1-3
Ser	3-7	2-5	3-7	5-10
Glu	4-8	3-6	4-9	4-7
Pro	2-3	1-2	0	0
Gly	4-8	3-7	5-11	6-11
Ala	3-6	2-5	2-3	3-5
Cys	0	0	0	0
Val	1	1-2	1-2	1
Met	0	0	0	0
Ile	1-2	1-2	1	1
Leu	1-3	2-3	2-4	1-3
Tyr	0	0	0	0
Phe	0	1	0	0
Lys	1-2	2-3	2-3	1-2
His	1	1-2	1	1-3
Arg	1-2	1-2	1-2	0
total	26-52	25-50	25-50	26-50
molecular weight (dalton)	2600-5200	2700-5100	2500-5000	2400-4700

3 Ca イオン結合能力を持たない画分の性質 4 種類のカキの MI から各々 7 種類ずつの Ca イオン結合能力を持たない画分が分離された。これらの画分は分子量が 2,000 ダルトン以下から 40,000 ダルトンにまで及び、種々の異なる性質を持つ。いっぽう、アミノ酸モル濃度分析の結果、各画分ごとに若干の組成上の違いはあるものの、一般に現生種は多量のアスパラギン酸とグリシンまたは多量のセリンとグリシンの含有で、化石種は多量のセリンとグリシンの含有で特徴づけられることが明らかになった。

4 純化した Ca イオン結合ペプチド 1 モル中に含まれるアミノ酸残基数 MI の 6 段階の分画を通じて最終的に分離された Ca イオン結合ペプチドのアミノ酸組成とおおよその分子量を明らかにできたため、このペプチド 1 モルを構成する各アミノ酸の残基数を推定算出した。結果を表 6 に示す。本表で 4 種類のペプチドの各々のアミノ酸残基数に幅があるのは、分子量に一定の幅を持たせて推定しているためである。アミノ酸配列順序の決定を行っていないため正確な残基数は判らないが、おおよそ表 6 の範囲に入ると考えられる。4 種類のペプチドの残基数のあいだには以下のような関係の存在することが判った。

1) *L. marshi*-*L. diluviana* 同じ *Lopha* 属に属す

る両種の Ca イオン結合ペプチドはほぼ同数のアミノ酸残基から構成されており(最小の分子量を想定した場合に 25 残基, 最大の分子量を想定した場合に 50 残基), 各アミノ酸残基上の差違は, 最小の分子量を推定した場合に両種間で 7 残基以下, 最大の分子量を推定した場合に 17 残基以下であった。*L. diluviana* には *L. marshi* よりも多量のアミノ酸残基, ロイシン, リジン, グルタミン酸と少量のセリン, アラニン, グリシン, ヒスチジン各残基が含まれていた。

2) *L. diluviana*-*O. crassissima* *Lopha* 属と *Ostrea* 属の Ca イオン結合ペプチドはほぼ同数の 25~50 アミノ酸残基から構成されており, 両ペプチドの各アミノ酸残基の間には最大 8~20 残基に違いの存在することが推定された。*O. crassissima* のペプチドは *L. diluviana* のペプチドよりも多量のアスパラギン酸, プロリン, アラニン, フェニルアラニン各残基を含み, 少量のグリシン, グルタミン酸, セリン各残基を含む。

3) *L. diluviana*-*C. gigas* *Lopha* 属と *Crassostrea* 属の 2 種の Ca イオン結合ペプチドはほぼ同数のアミノ酸残基(25~52 残基)から構成されており, 両ペプチドの残基上の差違は 6~17 残基以下であると推定された。*C. gigas* の Ca イオン結合ペプチドにはより多量のプロリン, アラニン, アスパラギン酸各残基が含まれ, グリシン, ロイシン, グルタミン酸各残基の含有量は小さい。

考 察

I 本研究によってカキの殻体中の可溶性有機基質が, 少なくとも 8 種類の異なる物理・化学的性質を持つ成分から構成されていることが明らかになった。このことから, 基質が持っている諸機能は単一の巨大分子の複雑な構造を通して発現されるのではなく, 機能に応じて分化した諸成分によって発現されることが推定できた。このため筆者は, 現在までのところ主要な研究対象となっている全有機基質(分画を行わない全 EDTA 抽出物)に関する分析結果は慎重に取り扱わなければならないと考える。とくに, 系統関係や分子進化, または石灰化機構などに関する複雑な問題を全有機基質の分析結果のみに基づいて検討する場合には, その限界をはっきりと見きわめる必要がある。カキの殻体中の有機基質の分析結果を例にとると, 全可溶性有機基質のアミノ酸組成は Ca イオン結合能力を持たない画分の組成に類似しているが, Ca イオン結合ペプチドの組成とは全く異っている。すなわち全可溶性有機基質のアミノ酸組成には, 相対的に

含有量の多い Ca イオン結合能力を持たない画分の組成が強く反映し、含有量の少ない Ca イオン結合ペプチドの組成はほとんど反映していないと言える。このため、全有機基質の分析結果のみによってカキの系統関係や分子進化の問題を検討する場合には、それは特定の機能の明白な物質に関するものではなく、機能の不明なかつ複数の物質に関するものにならざるを得ないことを考慮する必要がある。

Ⅱ 化石種の殻体中に残存している有機基質の研究に際しては、汚染と続成作用の影響という二つの大きな問題が存在する。化石種の有機基質の初源構造を完全に復元することが不可能な以上、これらの問題を根本的に解決することはできないが、化石試料を用いる場合には、可能な限り汚染と続成作用の影響について検討を加える必要がある。

本研究に用いた 3 種類の化石カキの殻体では、まず、走査型電子顕微鏡観察を通じてその微細構造を現生種のものと比較し、殻の保存状態を検討した。その結果、稜柱層と葉状層が全ての種で良く確認でき、各結晶形態にも変形の痕跡が見られないことから、微細構造上の大きな物理的な変化は起っていないことが確認できた。炭酸カルシウム結晶のこのような良い保存状態は、カキ殻体が比較的単純な殻構造を持つことやカキ殻体の大部分が相対的に安定である方解石結晶から構成されていることと関係があるのかも知れない。

化石カキの殻体中の有機基質の汚染については、以下の諸種の理由からその可能性が小さいことを明らかにできた。第一に、殻体表面の付着生物による汚染の可能性は、物理・化学的な洗浄を徹底的に行ったために無視できる。第二に、化石カキの殻体が死後埋没するまでのあいの海水による汚染、埋没後の周囲の地下水やバクテリアなどによる汚染の可能性も小さいと判断した。もしもこの種の汚染があったならば、図 2 に示したような化石種と現生種とのあいだでほとんど同一の分画像が出現するという事実は逆に説明し難い。また、バクテリアに汚染された試料に認められるとされるアラニンを含むアミノ酸組成(WYCKOFF, 1972)は、どの画分から見出せなかった。さらに、バクテリアやその生産物中には Ca イオン結合能力を持つ成分は存在しないと思われる点も、上記の判断の根拠となった。第三に、実験室での抽出および分画の過程での抽出液や溶出液などによる汚染の可能性も否定できる。4 種のあいだにほとんど同一の分画像が出現した根拠に、このような汚染の存在を

想定することも理論上では可能であるが、その場合には 4 種類の Ca イオン結合ペプチドのアミノ酸組成は完全に同一でなければならないし、Ca イオン結合能力も存在しないはずである。脱灰液による汚染の可能性は、脱灰後の試料を十分に透析したことや、Bio-Gel P-30 による脱塩効果を考え合わせるとほぼあり得ないことではあるが、念のために透析後の脱灰液のみを分画の第一段階の Bio-Gel P-30 に展開した。その結果、235 nm の波長に対する吸収ピークが出現しなかったため、脱灰液による汚染の可能性は否定できた。

以上のように汚染の可能性が少ないため、図 2 に示した現生種と化石種のあいだでの分画像の高い一致は、化石カキの殻体中の有機基質が、続成作用による大きな二次的变化を受けていないことを暗示していると判断できる。すなわち、Bio-Gel P-30, P-6, P-2 などのゲルろ過法による分画像からは、現生種の成分と良く対比できる高分子成分が化石種中に保存されていることが判る。また、イオン交換法による分画結果からは、化石種の基質中にイオン交換セルロースに対して十分に反応し、現生種と同様の吸着パターンを示す成分が保存されていることが明らかである。さらに、ペプチドの大きさがほぼ等しいことを考慮に入れると、ろ紙電気泳動法による分画像は、化石種中の成分が現生種中の成分と同一の等電点を持っていることを示している。さらに重要なのは、すべての化石種の EDTA 抽出物から Ca イオン結合能力を持つペプチドが発見されたことである。このペプチドの Ca イオン結合能力は、現生種に比較してジュラ紀の種で 20% 程度劣っていただけであり、その他の物理・化学的性質は 4 種のペプチドで完全に同一であった。このような特定の機能を持つ成分が化石種の基質中に存在することは、この成分の構造が少くとも、その機能を発現しえなくなる程には破壊されずに保存されていることを示している。

いっぽう、4 種類のカキの殻体に含まれる Ca イオン結合ペプチドのアミノ酸組成の比較から、このペプチドの一次構造を形成している個々のアミノ酸についても顕著な続成作用の影響は確認できなかった。その理由の第一は、結果の項で既に明らかにしたように、4 種類のカキの殻体中のペプチドのアミノ酸組成の基本的な特徴が良く似ていた点である。4 種類のペプチドからは、生物体に普遍的に存在する 17 のアミノ酸以外にはタウリン誘導体の可能性のある物質が検出されたのみであり、アミノ酸の分解産物である β -アラニン、オルニチン、 γ -アミノ酪酸などは化石種からも全く検出されなかった。第

二に、各アミノ酸の安定性と Ca イオン結合ペプチドでの含有量とのあいだに相関関係が見出せなかった点が注目される。化石殻体中の有機基質を構成する個々のアミノ酸に対する続成作用の影響としては、熱や圧力のような物理的な影響や地下水などによる化学的な影響が考えられるが、一般に熱の影響が大きいとされている。HARE & MITTERER (1969) は、実験室内でアミノ酸標準試料の加熱実験を行った結果、セリンとトレオニンが熱に弱く、アラニンとグリシンが熱に強いアミノ酸であるとした。また、SCHROEDER & BADA (1976) は、硬組織中でのアミノ酸の安定性を検討して、アルギニン、アスパラギン、グルタミンが最も不安定であり、続いてシステイン、メチオニンが、そしてセリン、トレオニン、ヒスチジンなどが不安定であるとした。逆に、アラニンは最も安定で、グルタミン酸、イソロイシン、プロリン、バリンなどが安定であるとした。さらに、AKIYAMA (1978) は、ホタテガイの殻体の加熱実験を行った結果、セリンが熱に対してきわめて不安定なアミノ酸であることを明らかにした。これらの実験結果から、セリンやトレオニンのような水酸基を持つアミノ酸が熱に対して不安定であるいっぽう、アラニンは安定なアミノ酸であることができる。したがって、熱による続成作用を強く受けた化石試料では、セリンやトレオニン含有量が減少し、アラニン含有量が増加していることが推定される。事実、このようなアミノ酸含有量の変化傾向が、化石軟体動物殻体中の全有機基質について報告されている (HARE & MITTERER, 1969; AKIYAMA, 1971, 1978)。ところが、カキの殻体中の Ca イオン結合ペプチドの分析結果(表4参照)によれば、系統上古い位置にあるカキのペプチドの方が多量のセリンを含有しているのに反して、アラニン含有量には変化が見られない。またトレオニン濃度は4種類のペプチドでほぼ一定であった。以上の事実は、これらの Ca イオン結合ペプチドが少くともアミノ酸の構造変化を引き起こす程の強い熱による続成作用の影響からは免れていたことを暗示している。

第三に、4種類の Ca イオン結合ペプチド中のアミノ酸組成が試料の地質年代とは相関関係を持たずに、推定された4種の系統関係に従って一定方向に変化している事実が注目される。この点に関しては次項で詳しく述べる。

このような Ca イオン結合ペプチドの続成作用に対する強い抵抗力は、このペプチドと殻体を構成する方解石結晶との強い結合に由来する可能性が考えられる。Ca イオン結合ペプチドは、Ca イオンを吸着することによ

って引きつづく CO₃ イオンの沈積を可能にし、方解石結晶核の形成を導くと推定される。ペプチドによる Ca イオンの吸着は、ペプチド鎖中の特定のアミノ酸分子(主としてグルタミン酸分子あるいは γ -カルボキシンググルタミン酸とセリン分子)を通じて行われる可能性がある (SAMATA *et al.*, 1980; 佐俣, 1981)。このため、殻体の形成に伴って Ca イオン結合ペプチドは、Ca 分子とこれらの特定のアミノ酸分子を通じて固く結びついたまま方解石結晶内部に包み込まれていくと推定される。その結果、Ca イオン結合ペプチドは続成作用に対してきわめて強い抵抗力を持つようになると考えられる。硬組織による有機基質の保護の可能性については、DEGENS (1976)が検討を加えている。

近年、保存良好な可溶性有機基質が化石軟体動物殻体中から報告されている。WEINER *et al.* (1976)は、8,000 万年前の *Scabrotrigonia thracica* の殻体中のペプチドの一部が、近縁の現生種である *Neotrigonia margaritacea* の殻体中のペプチドで推定された -X-ASP-Y-(ASP はアスパラギン酸, X, Y はそれぞれグリシンまたはセリン)なるアミノ酸配列順序を保存しつつづけているらしいことを明らかにした。また、WEINER *et al.* (1979)は、白亜紀のアンモナイトの *Baculites inornatus* 中の有機基質が、イオン交換セルロースと十分に反応する程度に良く保存されていることを報告した。さらに、WESTBROEK *et al.* (1979)は、白亜紀の矢石類の *Goniatites* sp. から分離した成分が、近縁の現生種である *Nautilus pompilius* 中の成分と類似の免疫反応を示すことを報告した。

III カキの系統関係には不明な点が多く、本研究に用いた *Lopha*, *Ostrea*, *Crassostrea* の3属のあいだの系統関係も必ずしも明確にされてはいない。いっぽう、SIEWERT (1972)は、カキの殻体の微細構造を検討した結果、図4—Aに示したような系統関係を考えた。ここでは、*Ostrea* 属と *Crassostrea* 属は白亜紀から古第三紀にかけてのある時期とともに *Lopha* 属から分岐したとされている。

本研究では、汚染や続成作用の影響の軽微な特定の機能を持つペプチドが化石種のカキの殻体からも分離されたため、カキの系統関係に関する何らかの生化学的情報が得られることが期待された。このため、4種の Ca イオン結合ペプチドのアミノ酸組成が SIEWERT (1972) の系統樹を基にして比較された結果、興味ある事実が明らかとなった。すなわち第一に、アスパラギン酸、セリ

Fig. 4. Phylogenetic relationship of the several genera of *Ostreidae*.

ン、グリシン、イソロイシンの4種のアミノ酸の含有量が地質時代とともに変化せず、二つのカキの系列① *L. marshi*→*L. diluviana*→*O. crassissima*, ② *L. marshi*→*L. diluviana*→*C. gigas* に沿って一定方向に変化する事実が見出された。例えば、アスパラギン酸濃度は、上記2系列に沿って増加傾向を示した。第二に、グルタミン酸、フェニルアラニン、リジン、アルギニンの4種類のアミノ酸含有量については、上記の2系列に沿った一定の変化傾向は確認できなかったが、*L. diluviana* と *O. crassissima* とのあいだでの濃度変化の方向と、*O. crassissima* と *C. gigas* のあいだでの濃度変化の方向とが逆になっているという事実が見出された。例えばグルタミン酸濃度は、前の2種のあいだでは減少しているのに対して、後の2種のあいだでは増加している。同様の变化傾向は、Ca イオン結合ペプチドを構成する主要な5種類のアミノ酸総量およびグルタミン酸とアスパラギン酸のあいだの量比についても認められた。第三に、アミノ酸残基数の違いを各々の種のあいだで比較してみると、*O. crassissima* と *C. gigas* のあいだに非常に大きな差異が認められた。このことは両種が系統的に比較的隔った位置にある (SIEWERT, 1972) ことの反映かも知れない。以上の事実は、Ca イオン結合ペプチドのアミノ酸組成の比較から推定された4種のカキの系統関係が、SIEWERT (1972) が殻体の微細構造の検討を基にして想定

したカキの系統関係に良く一致していることを示している (図4—B)。このように本研究を通じて、殻体中の有機基質の化学組成に系統関係が反映している可能性を指摘できたが、より詳細な討論のためには系統関係の明確なより多くの種類の殻体の分析が必要であろう。

IV タンパク質の分子進化の過程は、その一次構造の検討を通じて明らかにすることができる。 本研究ではアミノ酸配列順序の分析を行っていないため、Ca イオン結合ペプチドの分子進化に対する確定的な情報は得られなかったが、過渡的手段として行われたアミノ酸残基数の比較から注目すべき事実を明らかにすることができた。第一に、考察の項のIIで述べたように、化石種と現生種のCa イオン結合ペプチドの構造上の類似性が推定される点である。考察の項では、これをペプチドに対する強い続成作用の影響のなかったことの一つの根拠としたのであるが、このことから同時に、Ca イオン結合ペプチドがその立体構造をほとんど変化させずに進化してきたことが推察できる。第二に、4種類のCa イオン結合ペプチドのあいだには、そのアミノ酸残基上にいくつかの相違点が推定されるため、このペプチドが主として一次構造の変化を通じて進化してきたことが推定された。一次構造上の変化とは、アミノ酸残基の置換を意味している。結果の項で述べたような4種間での各アミノ

酸残基の増減の傾向を総合してみると(表6), *C. gigas* および *O. crassissima* の Ca イオン結合ペプチドでは *L. diluviana* および *L. marshi* のような古い型のカキ殻体中のペプチドよりもアスパラギン酸残基とプロリン残基が多く, セリン残基とリジン残基が少ないことが判った. この傾向は4種の Ca イオン結合ペプチドのアミノ酸残基数を SIEWERT(1972) の系統樹に従って比較してみた場合に一層はっきりする. このような事実は, このペプチドが特定のアミノ酸残基の置換を通して進化してきたらしいことを暗示している. また, このような一次構造上の変化は, このペプチドの Ca イオン結合機構の変化をも伴っていた可能性もあると思われる(佐俣, 1981).

今後, Ca イオン結合ペプチドのような, 化石殻体中に保存されながらも特定の機能を持ちつづけている純粋な成分のアミノ酸配列順序が決定されることによって, 分子進化や石灰化機構の進化の過程を解明する糸口の開かれることが期待される.

V 結 論

(1) 現生1種と化石3種のカキの殻体中の全可溶性有機基質を放射性同位元素である ^{45}Ca で標識した後, Ca イオン結合画分について6段階のクロマトグラフィーを通じて分画を行った. その結果, 4種のカキの殻体中の全可溶性有機基質が単一の大分子物質ではなく, 各々が少くとも8種類の成分から構成されていることを明らかにできた.

(2) 分析した全ての種から高純度の強い Ca イオン結合能力を持つ物質が分離された. 化学分析の結果, この物質は分子量 2,000~6,000 ダルトンの酸性の小ペプチドであることが明らかになった. このペプチドのアミノ酸組成は, その 60% 以上までがグリシン, グルタミン酸, セリン, アスパラギン酸, アラニンで占められるという特徴を持つ.

(3) アミノ酸組成と分子量から, Ca イオン結合ペプチド1モル中に存在するアミノ酸残基数が算出された. このペプチドの基本的な性質は4種間に共通に認められたが, アミノ酸組成には4種間で一定の差異の存在することが明らかになった.

(4) 化石種から分離された Ca イオン結合ペプチドに対する汚染の可能性は少ないことが推測できた. また, 少くともペプチドの基本構造を大きく改変するような強い続成作用の影響からも免れていたらしいと考えられた. このような有機基質の良い保存状態は, Ca イオ

ン結合ペプチドと殻体を構成する方解石結晶とのあいだでの強い結合に基づくものと考えられた.

(5) Ca イオン結合ペプチドのアミノ酸残基数の比較から, これらのペプチドのアミノ酸組成に4種のカキの系統関係が反映している可能性が示された.

(6) 4種の Ca イオン結合ペプチドのアミノ酸残基数を, カキ殻体の微細構造の検討に基づく SIEWERT(1972)の系統樹に従って比較した結果, このペプチドが立体構造をほとんど変化させずに特定のアミノ酸分子の置換を通じて進化してきたらしいことが推測できた.

謝辞 本研究を行うにあたり終始御指導いただいたドイツ連邦共和国, ボン大学の G. Krampitz 教授と H. K. Erben 教授に心から感謝の意を表する. また, 本稿の校閲と有益な御助言をして下さった北海道大学の秋山雅彦助教授にも深く感謝する. さらに, 本稿に対する御討論をいただいた麻布大学の大森昌衛教授と藤谷英男助教授, 東京経済大学の堀田進助教授にも厚く感謝する. 最後に, 本研究の遂行を終始支持して下さいたドイツ連邦共和国の DAAD(Deutscher Akademische Austauschdienst)にも心から御礼申し上げる.

なお, 本研究の一部には Deutsche Forschungsgemeinschaft(Forschungsgruppe Biomineralisation, Bonn)の資金を用いた.

文 献

- ABELSON, P. H., 1954: Organic constituents of fossils. Carnegie Inst. Wash. Year Book, **53**, 97—101.
- 秋山雅彦, 1964: 化石のホタテガイに残存するアミノ酸. 地球科学, **72**, 11—16.
- AKIYAMA, M., 1971: The amino acid composition of fossil scallop shell proteins and non-proteins. Biomineralization, **3**, 65—70.
- , 1978: Amino acid composition of heated scallop shells. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. IV, Vol. 18, no. 1—2, 117—121.
- AMINOFF, D., 1961: Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem. J., **81**, 384—391.
- ARMSTRONG, W. G. and TARLO, H., 1966: Amino acid components in fossil calcified tissues. Nature, **210**, 481—482.
- BITTER, T. and MUIR, H. M., 1962: A modified uronic acid carbazole reaction. Analytical Biochem., **4**, 330—334.
- CRENSHAW, M. A., 1972: The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. Biomineralization, **6**, 6—11.
- CURZON, G. and GILTROW, J., 1954: Aromatic ald-

- chydres as specific chromatographic colour reagents for amino-acids. *Nature*, **173**, 314—315.
- DEGENS, E. T., 1976 : Molecular mechanisms on carbonate, phosphate and silica deposition in the living cell. in ; *Topics in Current Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, **76**, 1—112.
- DEGENS, E. T. and LOVE, S., 1965 : Comparative studies of amino acid in shell structure of *Gyraulus trochiformis* STAHL, from the tertiary of Steinheim, Germany. *Nature*, **205**, 876—878.
- DEGENS, E. T., SPENCER, D. W. and PARKER, R. H., 1967 : Paleobiochemistry of molluscan shell proteins. *Comp. Biochem. Phys.*, **201**, 553—579.
- FRÉMY, E., 1855 : Recherches Chimieques sur les os. *Ann. Chem. et Phys. Ser. II*, **43**, 47—107.
- GRÉGOIRE, C., 1955 : La trame protidique des nacre et des perles. *Inst. Oceanographique Annales*, **34**, 1—36.
- and VOSS-FOUCART, M. F., 1970 : Proteins in shells of fossil Cephalopods (*Nautiloids* and *Ammonoids*) and experimental simulation of their alterations. *Arch. Internat. Physiol. Biochem.*, **78**, no. 2, 191—203.
- HARE, P. E. and MITTERER, R. M., 1969 : Amino acid composition of some calcified proteins. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **64**, 223—232.
- 堀田 進, 1965 : 化石タマキガイに残存するアミノ酸. 地質雑, **71**, 554—566.
- HOTTA, S., 1969 : Infrared spectra and conformation of protein constituting the nacreous layer of molluscan shell. *Earth Sci.* **23**, 133—140.
- KRAMPITZ, G. and ENGELS, J., 1975 : BEITRÄGE zur Chromatographie von wasserlöslichen Polymeren aus der Eischalenmatrix. *Biom mineralization*, **3**, 21—31.
- KRAMPITZ, G. and WITT, W., 1978 : Biochemical aspects of biomineralization. in ; *Topics in Current Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, **78**, pp. 57—144.
- MATTER, P., DAVIDSON, F. D. and WYCKOFF, R. W. G., 1969 : The composition of fossil oyster shell proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **64**, 970—972.
- SAMATA, T., 1979 : Paleobiochemische Untersuchung der löslichen Fraktion in den organischen Matrices von Pelecypoden-Schalen. Dissertation of Bonn Univ., Fed. Rep. Germany.
- SAMATA, T., SANGUANSRI, P., CAZAUX, C., HAMM, M., ENGELS, J. and KRAMPITZ, G., 1980 : Biochemical studies on components of mollusc shells. in ; *The Mechanism of Biomineralization in Animals and Plants*, ed. Omori, M. and Watabe, N., Tokai Univ. Press, Tokyo, pp. 37—47.
- 佐俣哲郎, 1981 : カキおよびタマキガイの殻体中の有機物に関する生化学的研究. 軟体動物の研究, 大森昌衛教授還暦記念論文集, 107—123.
- SCHILD, R. and BURNET, W., 1960 : Determination of protein-bound carbohydrate in serum by a modified anthron method. *Analytical Chem.*, **32**, 885—886.
- SCHROEDER, R. A. and BADA, J. L., 1976 : A review of the geochemical application of the amino acid racemization reaction. *Earth Sci. Rev.*, **12**, 347—391.
- SIEWERT, W., 1972 : Schalenbau und Stammesgeschichte von Austern. *Stuttgarter Beitr. Naturk.*, **B**, no. 1, 1—46.
- TAUSKYY, H. H. and SCHORR, E., 1967 : A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus of invertebrate mineralized tissues. *J. Ultrast. Res.*, **13**, 519—550.
- WAINER, A. and KOCH, A. L., 1962 : Determination of inorganic sulfate in urine using barium chloranilate. *Analytical Biochem.*, **3**, 457—461.
- WEINER, S., LOWENSTAM, H. A. and HOOD, L., 1976 : Characterization of 80-million-year-old mollusk shell proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 2541—2545.
- , ———, TABOREK, B. and HOOD, L., 1979 : Fossil mollusk shell organic matrix components preserved for 80 million years. *Paleobiology*, **5**, no. 2, 144—150.
- WESTBROEK, P., van der MEIDE, P. H., van der WEY-KLOPPERS, J. S., van der SLUIS, R. J., de LEEUW, J. W. and de JONG, E. W., 1979 : Fossil macromolecules from cephalopod shells : characterization, immunological response and diagenesis. *Paleobiology*, **5**, no. 2, 151—167.
- WYCKOFF, R. W. G., 1972 : The biochemistry of animal fossils. Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland, U. S. A., pp. 1—152.