

贝壳有机基质与生物矿化*

THE ORGANIC MATRIX OF MOLLUSCAN SHELL AND ITS RELEVANCE TO BIOMINERALIZATION

姜国良¹ 陈丽^{2**} 刘云¹

(¹ 青岛海洋大学生命学院 266003)

(² 江苏省淮海工学院食品工程系 222005)

生物矿化是以少量有机大分子(蛋白质、糖蛋白或多糖)为模板,进行分子操作(Molecular manipulation),高度有序地组合成无机材料的过程。在生物矿化材料(如牙齿、骨骼、贝壳等)里,软体动物壳的形成又是受有机大分子控制最复杂、最有序的一个过程,且形成的高度有序的晶体复合体与一般碳酸钙晶体相比有很多特殊的性质,如其强度比单一矿物晶体高3 000倍^[1]。研究软体动物壳有机基质,对研究壳生物矿化机理有着重要意义。

1 软体动物壳的结构

软体动物壳是在一个有机基质框架中的碳酸钙单位组成的高度有序的多重微层结构,含珍珠层和棱柱层,晶体单位分别为文石和方解石。文石和方解石具有相似的晶体结构,钙离子几乎位于其壳层的相同晶格上,与碳酸根离子层交替排列,两种形态的区别在于碳酸盐分子的组织 and 趋向不同。有机基质层通常为片层结构,能限定晶体结构,也能促进下一矿物层的形成。电镜、X射线、电子衍射研究软体动物壳有机基质片层,发现各基质片层又包含5个不同微层,其中心是由两厚层富Gly和Ala的蛋白质夹一薄层β-几丁质组成的夹心结构,外层是亲水性的蛋白质,它

与无机相相连。几丁质聚合物与邻层的蛋白质多肽链几乎垂直,在珍珠层中,它们分别与a、b结晶轴方向一致。

2 软体动物壳有机基质

软体动物壳千变万化,但它们都含有相同的无机成分——碳酸钙,在碳酸钙无机质中分布着有机基质和结构多样的色素。Crenshaw 1972年,首次用温和的去钙化剂EDTA将薪蛤(*Mexenaria mexenaria*)壳去钙化,使壳中的有机基质大分子部分或完整地保留下来,才使人们对有机基质有了较为彻底的研究。软体动物壳有机基质含量约为0.01%~10%,不同动物壳或同一动物壳在不同环境、不同生长期、不同壳层,其有机基质均有差别,如Weiner 1983年从同一软体动物壳的方解石层和文石层中分离得到了不同的多肽。软体动物壳有机基质由不同大分子组成,主要为蛋白质和多糖。蛋白质主要为可溶性糖蛋白、磷蛋白、酸性蛋白质和不溶性贝壳硬蛋白,糖类主要为与蛋白质结合的硫酸多糖和β-几丁质,在新沉淀的壳中,还存在少量酚氧化酶^[2]等。蛋白质的分子量没有确定的范围,腹足类相对较低,蛤类相对较高。将软体动物壳用酸或EDTA等去矿化后,根据有机基质的溶解性,将其分为两大

类:可溶壳有机基质(Soluble matrix, SM)和不溶壳有机基质(Insoluble matrix, IM)。

2.1 可溶壳有机基质的组成

软体动物壳SM的主要成分是酸性蛋白质和多糖,酸性蛋白质是一些中、小分子量的蛋白质,主要有两种不同类型:富Asp蛋白质和富Ser及Glu(Gln)的蛋白质,前者多糖含量少,后者则结合较多多糖。软体动物壳SM蛋白质中的多糖,主要为硫酸多糖,如牡蛎壳SM蛋白质的糖醛酸和氨基己糖或己糖都结合有硫酸基,淡水腹足动物双脐螺等软体动物壳中也有多糖存在^[3],硫酸多糖的起源和功能还不清楚,因为在壳形成组织——外套膜中,未发现硫酸多糖存在。Einbinder等1950年发现牡蛎(*Myostrea*)壳基质硫酸多糖的光谱性质与脊椎动物体中硫酸软骨素性质相似。在双脐螺壳SM和IM中,多糖的形式是相似的,说明GAGs可能是被硬化蛋白的网状结构捕捉的^[3]。SM中的磷酸基团主要

* 国家863计划资助项目819-07-10。
第一作者:姜国良,出生于1963年,副教授,从事海洋生物学研究。电话:0532-2032913。

** 青岛海洋大学在职研究生。

收稿日期:2000-12-12;

修回日期:2001-01-04



与 Ser 结合,生成磷酰丝氨酸 [(p) Ser], 叶状方解石壳中磷酸含量较高,为 12.9%~15.7%,而方解石棱柱层壳或各种文石蛋白质中磷酸含量非常低(0~3.3%)。

研究发现,不同软体动物壳或同一动物不同壳层基质中氨基酸的相对浓度也不同,如方解石基质中酸/碱氨基酸比率比文石结构要高。在有些双壳类再生壳的新沉淀壳区,则存在大量高活性的 Lys 和 Tyr,它们参与基质的交联聚合作用,在成熟壳中则没有活性,在新壳区还存在酚氧化酶。

2.2 不溶壳有机基质的组成

Beecham 1958 年就提出软体动物壳有机基质是硬化的,并通过组织化学实验得以验证。软体动物壳 IM 是一些疏水并交联的成分,去矿化后不溶,由于其难溶性,除氨基酸分析外研究较少。一般认为 IM 主要是结合了少量 β -几丁质的蛋白质,也有报道这是一种结合了大量多糖的蛋白多糖物质,在腹足类和双壳类 IM 硬蛋白中则存在碱性蛋白质。Bowen 等 1996 年水解了部分软体动物壳珍珠层 IM, PAGE 电泳得到 3 种成分 HIM、MIM 和 LIM, HIM 即是含大量脂肪族氨基酸的碱性蛋白质。Wheeler 等 1988 年用 NaOH 处理牡蛎壳 LIM 得到层析谱与 SM 相似的可溶肽成分,认为 LIM 可能是丧失或改变了功能的交联 SM。Antarctic scallop SM 和 LIM 的氨基酸成分具有相似性,也证明了此观点。

2.3 壳有机基质蛋白质的结构

为了解释软体动物中不同矿物形态的控制,人们对可能引起这些不同性质的壳基质蛋白的结构作了大量研究,但要得到碳酸钙、磷酸钙生物矿物基质蛋白完整的一级结构很难,因为其 N 末端发生乙酰化而无法用 Edman 降解法测定其一级结构,常用来产生肽谱的

化学和酶制剂对它也不易降解,即使降解后由于其内部含大量高度重复的多聚 Asp 序列和 (p) Ser 序列而缺乏重叠肽段难以研究其结构^[1]。随着生物技术的发展,利用分子生物学手段,通过建立 cDNA 文库,可成功测定有机基质的一级结构。

SM 中的主要氨基酸是 Asp, Gu, Gly 和 Ser/ (p) Ser, SM 一级结构中都有 (DX)_n 的重复序列, X 等于 Gly 或 Ser。对生物矿化调节蛋白研究较多的是贞洁巨牡蛎 (*Cassostrea virginica*), 在贞洁巨牡蛎和 Antarctic scallop 壳 SM 蛋白质中,都存在聚 Asp、富 (p) Ser 和 Gly 的功能区域,脊椎动物的骨桥蛋白中也发现有 Asp 区域。红外光谱研究发现,SM 酸性蛋白质结合钙时采用 β -折叠形式,结合钠时则为随机螺旋形式。原子力显微镜 (AFM) 研究牡蛎壳,发现叶状壳片层表面的有机片层排列着球状结构,与从方解石、云母中提取的蛋白质的球体结构相似。体外实验中,用 AFM 观察分离出的牡蛎壳蛋白,发现当其接近生长中的方解石时也为球形结构^[4]。

IM 中则含有更多的 Gly, Ala 和疏水性氨基酸残基。Shu Sudo 等通过建立 cDNA 文库,成功测定了珍珠贝 IM 的一级结构,发现珍珠层 IM 蛋白 MSI 60 是富 poly(Gly) 域的蛋白质,含 39 个 poly(Gly) 域,11 个 poly(Ala) 域和 2 个富 Ala 域;棱柱层 IM 蛋白 MSI 31 无 poly(Ala) 域,但其 N 端部分含 10 个 poly(Gly) 域, C 端部分有一个含 6 个连续的 ES-EEDX(GuSer Gu Asp X) 序列的酸性区域, X = Met 或 Thr。X 衍射证明两者均采用 β -折叠形式,两者的 poly(Gly) 域都参与 β -折叠的形成,在蛋白质 N 端和 C 端均有两个二硫键可形成分子间氢键,进行分子自组装。文石层蛋白质以 N 端和 C 端的 poly(Asp) 域结合钙;棱

柱层蛋白质则以 C 端的酸性域结合钙。电子衍射发现 IM 蛋白质的 β -折叠结构与丝心蛋白相似。

3 壳有机基质与生物矿化

软体动物壳生物矿化中,壳形成材料均由外套膜分泌,但壳形成的方式至今还不清楚。而任何软体动物壳的晶体单位都有一定的大小、形状和方位,说明它们的矿化作用受到高度控制。晶体生长可受环境因素或机体新陈代谢状态的影响,但直接地生物控制,特别是通过有机基质对控制壳生物矿化最有效。有机基质对生物矿物生长的调节包括几方面:诱导晶体生长、决定晶体形态、控制晶体形状或终止晶体生长。但基质对晶体生长控制的程度、机制还不很清楚。

IM 是有机基质的结构框架,IM 的硬蛋白构成了晶体生长的网状三维空间结构,决定着每一壳层的框架并结合可溶聚阴离子蛋白。在矿化过程中,IM 能促进晶体生长,也影响它的结构,Geogire 等 1961 年认为 IM 中存在着两种化学结构和化学成分不同的硬蛋白,从而导致了文石和方解石的区别。软体动物壳 IM 中的几丁质,在壳的结构框架中具有特殊的作用。

SM 在壳形成中有两种功能——诱导晶核形成及调节晶体生长。SM 的酸性蛋白质和多糖覆盖在有机基质表面,它们与无机相接触,有机基质局部阴离子电荷的积累形成离子位效应,能诱导晶核的形成且利于阳离子的初步结合,晶核形成通常是在有机基质大分子的功能基团与无机离子之间的界面电荷及空间结构互补处^[2]。实验也证明,SM 在体外、体内均有控制结晶的作用,如 Watabe 等 1960 年发现软体动物文石壳中的有机基质在形成方解石的系统中仍诱导产生文石;Si mkiss 1965 年用牡蛎壳



可溶有机基质在体外诱导产生了方解石。红外光谱研究发现,对富Asp的蛋白质,钙结合配体是羧基,对糖蛋白和磷蛋白,钙结合位点则是硫酸或磷酸基团;它们与钙的亲合力也不同,前者以高亲合力与钙结合,后者则以低亲合力与钙结合。SM中的黏多糖因起源、种类和位置不同,功能也各异,它们存在于钙化作用的所有位点,是钙结合位点,在壳中浓缩钙离子,在核化和矿物的生长调节中起一定作用^[3]。只存在于新沉淀壳有机基质中的酚氧化酶,与钙化壳的物理特性有关。壳皮层和基质在酚氧化酶作用下发生硬化作用而变得不溶^[3]。在腹足动物和双壳动物壳中,酚氧化酶作用于IM中的多巴胺(DOPA),能产生黑色的“类黑素”物质。基质中还有些微量成分,它们在生物矿化中的作用还不清楚。Falini等1996年用人工模拟的成核基底研究基质成分对晶体形态的控制发现,基底中没有可溶大分子时,没有结晶形成;而没有丝心蛋白时,文石晶层提取的大分子诱导形成球形方解石,方解石中提取的大分子仍诱导形成方解石。可见,可溶蛋白决定着晶体的形成及类型,丝心蛋白则影响几丁质表面离子的扩散和接近,从而决定吸收何种可溶蛋白。

SM中有几种不同的大分子,但核化作用和晶体生长抑制是由相同分子控制的,最可能是高阴离子蛋白,它们在生物矿化中起关键作用,酸性大分子能通过立体选择影响晶体形态^[1,2,3]。Belcher等1996年发现鲍鱼壳珍珠层SM中的多聚阴离子蛋白质可控制碳酸钙两种晶型之间的相互转换,这种蛋白质存在时,产生文石;不存在或耗尽时,则产生方解石。这些阴离子蛋

白的翻译后修饰作用,如Ser残基的磷酸化作用及与糖的结合作用,能影响它们对矿化作用的调节能力。SM磷酸化的程度可能是体内控制碳酸钙晶体生长的部分因素,如文石壳基质的磷酸化程度比方解石壳基质要低得多。磷酸基团能增强晶体生长位点的识别能力而降低晶体结合的亲合力。

Hidaka等1983年认为SM中的poly(Asp)能激活磷酸二酯酶(PDE),也可充当钙调蛋白调节钙代谢,即基质可能间接影响细胞的功能,反过来又抑制钙化作用。

Myamoto等1996年则发现珍珠层的珍珠质蛋白具有碳酸酐酶活性,能催化CO₂和HCO₃⁻之间的可逆反应。

4 软体动物壳的形成

外套膜细胞分泌的成壳物质进入外套膜外腔溶液,SM固定化离子簇或珍珠质晶体,在生理条件下,这些离子簇或珍珠质晶体反复溶解与形成,最后稳定下来形成晶核,在晶核上随着晶体的形成和生长,最终形成碳酸钙结晶,碳酸钙结晶有秩序地沉积在壳内表面,完成壳的长大和加厚,形成的壳是碳酸钙结晶与壳基质层相互交替排列的结构^[2]。这一过程受基因的调控,形成的晶体的形态、大小和方位取决于有机基质高度有序的结构。Gordon等1980年还发现,在新沉淀的壳区,有机基质需要几周的安装、加固过程才能成熟,此过程包括基质的交联聚合作用。Bowen等1996年根据基质蛋白质的性质,提出一种软体动物壳珍珠层蛋白质间关系的合理模型,解释了文石晶体的成因。他们认为,有机基质自组装时,IM中高分子量的蛋白质H作为锚蛋白,将可溶的酸性蛋白

质连到不溶的IM上,锚蛋白的碱性氨基酸侧链可与酸性蛋白的羧基结合,由于酸性蛋白的酸性侧链比锚蛋白的碱性侧链多,就存在多余的未结合的离子化羧基,这些羧基就能作为文石晶体沿几何轴线生长的取向模板,IM+锚蛋白+酸性蛋白的复合物限制着有机模板,阻止有机结构在空间重新定向而生成方解石。可见,在矿化形成过程中,有机大分子本身的结构是控制特定晶核形成的关键,生物矿化过程是生物大分子指导无机晶体的晶核形成、定向及生长的过程,是有机相-无机相、无机相-无机相界面分子识别的过程^[1,2]。

主要参考文献

- 1 何良,麦康森。贝类生物矿化生物大分子与分子识别,生物化学与生物物理进展,1999,4:310~312
- 2 唐敏,石安静。贝类钙代谢研究概况,水产学报,2000,24(1):86~91
- 3 Marxen J.C. et al.. Carbohydrates of the organic shell matrix and the shell-forming tissue of the snail *Bio naphalaria glabata* (Say), *The Biological Bulletin*, 1998,194:231~240
- 4 Sikes C.S. et al.. Oyster shell protein and atomic force microscopy of oyster shell folia, *The Biological Bulletin*, 1998,194:304~316

辅助参考文献

- Shu Sudo et al.. Structure of mollusk shell framework proteins, *Nature*, 1997,387:563~564
- Marxen J.C.,Becker W.. The organic shell matrix of the freshwater snail *Bio naphalaria glabata*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1997, 118B:23~33

(本文编辑:李本川)