

## 淡水産 二枚貝類 貝殼內 有機媒質 蛋白質 特性

박 성 빈 · 조 동 현

강원대학교 자연과학대학 생물학과

= Abstract =

### Characterization of the Organic Matrix Protein in the Freshwater Pelecypod Shells

Sung-Bin Park and Dong-Hyon Cho

Department of Biology, Kangweon National University, Korea

The electrophoretic and immunological analyses of organic matrices in the shells of freshwater bivalves were made in order to elucidate the biochemical characteristics and species-specific differences of the applied shells. The water-soluble and insoluble matrices of four species of freshwater bivalves, *Anodonta fukudai*, *Unio douglasiae*, *Lanceolaria acrorhyncha* and *Corbicula fluminea*, were used as analytical materials.

There was non-identity in immuno-affinity between anti-soluble matrix (anti-SM) and anti-insoluble matrix (anti-ISM) sera against the organic matrix of *Anodonta fukudai*.

The SMs of four species (*A. fukudai*, *U. douglasiae*, *L. acrorhyncha*, and *C. fluminea*) showed the differences in the precipitate arcs at the level of family, though ISMs did not show differences.

In the electrophoretic analysis, all four species had two SDS-electrophoretic bands of SM, of which molecular weights appeared to be lower than 55,000, whereas the native organic matrices of four species had higher molecular weights than those from SDS-electrophoresis.

Only calcium ion among many ions in extrapallial fluid (EPF) caused SM to change into insoluble molecules, thus the EPF pretreated with  $Ca^{++}$  did not form the precipitate arc when did the immuno-diffusion with anti-SM serum. ISM precursor may be polymerized into macromolecules like periostracin, a precursor of periostracum, judging from the similar polymerization patterns in 0.1 M Tris-formate buffer (pH 3); they may be made insoluble macromolecules due to their strong nature of hydrophobicity.

### 序 論

貝殼의 안쪽 眞珠層은 미세한 aragonite 입자가 불용성 단백질인 유기매질(organic matrix)에 포함되어 층상배열을 한 것이다(Wada, 1961; Wise, 1970; Erben, 1972; Gregoire, 1972). 이러한 패각형성은 패각과 外套膜 사이의 腔所에 존재하는 용액과 관련이 있다

(Bevelander and Nakahara, 1969; Wada and Fujinuki, 1976). 이 용액을 外套液(extrapallial fluid; EPF)이라고 하며(de Waele, 1930) 주위물질과는 성분이 다르고(Crenshaw, 1972a) 패각의 主成分이 되는 칼슘 양이온과 탄산 음이온을 취하여 패각형성에서 결정적인 역할을 하는 蛋白質을 함유하고 있다(Watabe and Wilbur, 1960; Wilbur and Watabe, 1963; Wilbur and Saleuddin, 1983). 실제 외투액에는 많은 종류의 단백질이 함유되어 있으나(Kobayashi, 1964) 이중 어느 단백질이 패각성분으로 이행되는지는 아직까지 알려져 있지

Received November 22, 1987

않다. Kobayashi(1964)는 貝殼의 性質에 따라 외부액 단백질이 다르다고 주장한 반면, Pietrzak 등 (1973)은 種은 달라도 貝殼형성에는 같은 단백질이 참여할 것이라고 했지만 유기매질에 연관시켜 설명하지 못했다.

패각 내의 유기매질은 水溶性 단백질인 水溶性 媒質(soluble matrix; SM)과 不溶性 巨大 重合體인 不溶性 媒質(insoluble matrix; ISM)로 나누어 볼 수 있다(Wilbur and Simkiss, 1968; Gregoire, 1971; Crenshaw, 1972b; Gordon and Carriker, 1980; Krampitz, 1982; Krampitz *et al.*, 1983). SM을 구성하는 아미노산에는 作用基(radicals)가 산성을 띤 아스파르트산과 극성을 나타내는 글리신 같은 아미노산이 풍부하며 산성 아미노산이 칼슘이온과 결합한다고 알려졌다(Meenakshi *et al.*, 1969; 1971; Weiner and Hood, 1975; Weiner, 1979; Wheeler and George, 1981). Crenshaw(1972b)와 Wada(1980)는 SM이 칼슘 沈積(calcification)의 시발점 역할을 한다고 하였으나, Wheeler 등 (1981)과 Sikes and Wheeler(1983) 그리고 Wheeler and Sikes(1984)는 貝殼成長을 억제시키면서 조절작용에 관여한다고 하였다.

반면에 ISM은 패각을 성장시키며 SM보다 상당히 많은 양으로 패각속에 존재한다. Gregoire 등 (1955)은 ISM 절편들의 용해성이 서로 다른 것으로 보아 한 개 이상의 단위체로 구성된 고분자임을 시사하였고, Beedham (1954), Beedham and Owen(1965)과 Meenakshi 등(1971)은 軟體動物의 패각의 器管의 단백질과는 조성이 다르며 류신과 발린, 특히 티로신 함량이 높은 것이 ISM의 특징이라 하였다. 티로신의 함량이 높은 단백질 중에는 periostracum의 前軀體인 periostracin이 있는데 이 단백질의 티로신이 키논(quinone)에 의해 tanning 반응에 참여하여 periostracin을 고분자 중합체로 硬化시킬 수 있다(Waite, 1983). 그러나 ISM 전구체의 작용도 periostracin과 비슷한지는 아직 연구되어 있지 않다.

본 실험은 이와 같은 연구 사실을 기초로 하여 첫째, 패각에서 분리한 유기매질을 ISM과 SM으로 분리한 다음, 각각의 항혈청을 제조하여 면역학적 방법으로 두 단백질의 성분차이에서 오는 구조차이를 항혈청으로 비교 분석하였으며, 그 항혈청이 같은 서식지에 사는 다른 종에 대해 蛋白質親和性에 차이가 있는지의 여부를 비교해 보았다. 둘째, 유기매질의 구조가 중합체인가를 SDS-전

기영동분석과 미처리(crude)추출액에 존재하는 생(native)단백질의 분자량분석에 의해 확인하였으며, 특히 중합체로 존재하는 것이 거의 확실한 ISM이 같은 불용성 고분자인 periostracum의 전구체인 periostracin과 특성이 같은지를 비교하여 보았다. 셋째, 패각의 主成分인 칼슘 이온이 유기매질에 어떤 변화를 주는지를 칼슘이온을 처리한 EPF와 투석한 EPF에서 항-SM 혈청과 항-ISM 혈청의 변화로 확인해 보았다. 또한 EPF의 주요성분을 실험관내에서 EPF에 처리하여 항-유기매질 혈청과 抗原抗體 沈降反應을 시켜 생 SM과 생ISM의 변화를 관찰하였다.

궁극적으로 본 연구는 패각형성에 참여하는 같은 패각 내의 유기매질이면서도 物理化學의 특성이 서로 다른 SM과 ISM 단백질을 比較免疫化學의 方法으로 분석한 것이다.

## 材料 및 方法

### 1. 實驗材料

실험 이매패는 江原道 春川市 衣岩湖에서 채집되는 古異齒目(Palaeoheterodonta)에 속하는 石貝科(Unionidae)의 대칭이 (*Anodonta fukudai*), 말조개(*Unio douglasiae*), 칼조개(*Lanceolaria acrorhyncha*)와 재첩과(Corbiculidae)의 재첩(*Corbicula fluminea*)을 사용하였다(Yoo, 1976; Kwon and Choi, 1982). 실험에 사용된 각 종의 개체수는 50개체 이상이었고 모두 성체를 택하였다.

### 2. 實驗方法

패각은 수산화나트륨용액으로 異物質을 제거한 후 다시 사포로 갈아 periostracum을 제거한 안쪽 층만 사용하였고, 조직추출액은 각 조직을 떼어낸 즉시 4°C에서 유리 磨碎機로 粉碎한 후 15,000 rpm에서 15분 원심분리한 상등액을 미처리(crude) 시료로 하여 그 용액에 있는 생(native)蛋白質을 다음과 같이 직접 혹은 다른 처리를 하여 변화된(unnative) 상태에서 전기영동 및 면역화학실험에 사용하였다.

#### 1) 有機媒質의 分離 및 電氣泳動分析을 위한 處理

패각속에서 유기매질을 분리하기 전에 실험 이매패 4종의 패각을 마쇄하여 분말로 만든 후 패각속의 단백질 함량을 Kjeldahl법(Rand *et al.*, 1976)으로 확인하였

다. 이때 사용한 패각분말을 다시 다음과 같은 방법으로 처리하여 패각에서 유기매질을 분리하였다.

먼저 패각분말을 10% EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid)와 1:3(w/v)비율로 섞어 칼슘을 제거한 후 6,000 rpm에서 1시간 遠心分離하였다. 이 침전물은 진한 염산으로 3번 더 세척하여 잔여 칼슘을 제거하고 0.9% 염화나트륨용액으로 5차례 세척하여 ISM을 얻었다. 또한 원심분리 후 따로 모아 놓은 EDTA 상등액은 0.2 $\mu$ m 구경의 室素化纖維素膜(Whatman membrane cellulose nitrate filter)으로 濾過하였다. 5,000 이상의 분자량은 통과할 수 없는 셀로판지 안에서 이 여과액 2ml를 증류수와 5:1 비율로 2번 투석한 후 다시 황산암모늄으로 80%까지 염석하여 침전물을 증류수 5 l에 24시간 간격으로 3차례 透析하여 15,000 rpm에서 15분 원심분리한 상등액을 SM 실험에 사용하였다.

이 試料를 전기영동법으로 분리하기 위해서 다음과 같은 처리를 하였다. 즉 건조한 ISM을 1g 취하여 요소 48g, thioglycolic acid 0.96 ml, EDTA 0.2 g, 수산화나트륨 13.5 g, 증류수 86.5 ml를 함유한 還元試藥 150 ml에 넣었다. 환원은 실온에서 室素氣流하에서 4~6시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 후 즉시 알킬화시약(식초산요드 16.6 g을 0.5 N 수산화나트륨용액 90 ml에 용해시킨 것)을 가해 pH 9.5가 될 때까지 1.0 N 수산화나트륨 용액으로 滴定하였다. 알킬화시약은 패각에서 분리한 ISM 1 g당 200 ml 정도 가하였다. 이 용액을 외과용 가아제로 여과시킨 후 여과액에 7.5% 삼염화식초산을 가하여 얼음상자에 2시간 방치한 뒤에, 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 沈澱物을 0.05 M tetraborate 용액에 용해시킨 다음 透析하여 전기영동에 사용하였다(Harrap and Woods, 1964). 이는 ISM의 폴리펩티드를 연결하는 유황결합을 끊어 알킬화시키기 위한 방법이다.

또 하나의 방법은 ISM을 강하게 환원시키기 위한 방법으로 진한 염산으로 칼슘을 제거한 후 얻은 ISM을 건조시킨 다음 진한 개미산과 1g/1 ml 농도로 懸濁液을 만들어 4°C에서 12시간 진탕시킨 후 전기영동 하였고, 한편으로는 ISM-개미산현탁액을 40°C에서 개미산을 氣化시켜 침전물을 얻은 다음 8 M 요소, 0.5% SDS(sodium dodecyl sulfate)와 10% 2-mercaptoethanol이 들어 있는 0.1 M tris-formate 완충액(pH 3)에 녹여 15,000 rpm에서 20분간 원심분리한 상등액을 실온에서 방치한 후 重

침정도를 알기 위해 시간별로 취하여 전기영동에 사용하였다(Waite *et al.*, 1979).

## 2) 電氣泳動

非解離 不連續緩衝系(none-dissociating discontinuous system)를 사용한 전기영동은 上層겔(stacking gel)은 tris-HCl 완충액(pH 6.7)으로 4% polyacrylamide겔을 리보플라빈을 사용하여 자외선하에서 굳혔고, 分離겔(separating gel)은 tris-HCl 완충액(pH 8.4)으로 7% polyacrylamide겔을 만들어 사용하였다. 實行완충액(reservoir buffer)은 tris-glycine 완충액(pH 8.3)이었고 150 V로 4시간 동안 4°C에서 전기영동 하였다(Davis, 1964).

요소-전기영동은 위 용액에 요소를 8 M 농도가 되도록 加한 후 실시하였다(Andrew, 1981).

SDS-전기영동은 실험에 사용한 모든 용액을 0.1% 濃度로 SDS를 함유시켰다. 상층겔의 완충액은 0.125 M tris-HCl 용액(pH 6.8)이었고, 분리겔은 0.375 M tris-HCl완충액(pH 8.8)으로 10% polyacrylamide겔을 만들었다. 실행완충액은 0.025 M tris-glycine 완충액(pH 8.3)에 SDS를 0.1%로 유지시키고 실행하였다. 전기영동시료는 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% 설탕(sucrose), 0.002% BPB(bromophenol blue)가 되게 농도를 맞추는 다음 80~90°C에서 2분간 열처리를 하였다. 이를 15,000 rpm에서 원심분리하고 上臈液의 단백질 함량을 1~5 mg/ml 농도로 조절한 다음 전기영동에 사용하였다. 전기영동의 전류는 0.1 mA/cm로 하여 12시간 동안 가동시켰다(Hames and Rickwood, 1981). 전기영동 후 polyacrylamide겔 속의 단백질은 0.1% Coomassie blue R-250(Sigma) 용액에서 1시간 염색한 후 7% 식초산으로 비단백질 부위를 탈색하였다.

SDS-전기영동에서 분자량을 확인하기 위한 標品단백질로는 Sigma(1981) 제품인 myoglobin(M.W.:16,950), carbonic anhydrase(M.W.: 29,000), chicken egg albumin (M.W.: 45,000), bovine serum albumin (M.W.: 66,000)과 동시에 각 종의 유기매질을 전기영동하였다(Fig. 1, 2). 표준단백질의 비례곡선은 BPB를 가장 빠른 이동 물질로 보고 구한 相對易動度(relative mobility; R.M.)로 표준곡선을 만들어 이 기술기에 시료단백질의 R.M.을 삽입하여 분자량을 구하였다(Fig. 3).

## 3) 免疫學 的方法

抗血清 製造: EPF와 패각속에서 분리한 SM의 항혈

청을 제조하기 위해서 미처리 EPF와 패각에서 분리한 SM을 15,000 rpm에서 원심분리를 한 후 상등액의 단백질함량은 Folin-Ciocalteu법(Lowry *et al.*, 1951)으로 정량하여 1 mg/ml 농도로 10일 간격으로 토끼 등쪽皮下 2부분과 다리근육 4부분 등 총 6부분에 시료와 同量の Freund's complete adjuvant와 함께 4차례 注射하였다.

ISM의 주사액은 패각속에서 분리한 ISM을 냉동 건조한 후 시료를 파쇄시켜 2 mg을 1 ml adjuvant에 현탁시켜 항체형성을 위한 주사액으로 사용하였다.

항혈청은 최종주입 10일뒤 토끼의 頸動脈에서 採血하여 4°C에서 1시간 방치시킨 후 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등부분의 혈청을 황산암모늄으로 0.2 M 농도에 5배 濃縮하여 실험에 사용하였다(Clausen, 1969).

**免疫擴散**: 면역확산은 37°C의 0.9% agarose겔에서 48시간 이상 반응시켰다(Ouchterlony and Nilsson, 1973).

無機鹽類와 아미노산의 영향을 조사하기 위하여 염화칼슘, 염화마그네슘, 염화아연과 같은 2가 양이온과 글루타민산, 아스파르트산 그리고 글리신을 각각 1 mM과 5 mM로 미처리 EPF에 첨가하였다. 또한 CAH(carbonic anhydrase; E.C. 4.2.1.1)가 유기매질에 끼치는 영향을 알기 위해 소의 赤血球에서 精製한 CAH(Sigma, 1981)와 CAH 沮害製인 acetazolamide(Freeman, 1960; Carriker and Chauncey, 1973; Dawson *et al.*, 1986)를 미처리 EPF에 1 mM로 처리하여 37°C에서 30분간 방치한 후 면역확산에 사용하였다.

면역전기영동은, 단백질이 분리된 polyacrylamide 전기영동겔을 50°C에 맞춘 0.9% agarose겔 속에 넣어 굳힌 후 이 polyacrylamide겔 側面이 1 cm 떨어지게 agarose겔에 항혈청 흡을 對稱으로 만들어 면역확산시켰다. 면역확산 실험은 Clausen(1969) 방법에 準하였다.

#### 4) Ferguson plot에 의한 生蛋白質의 分子量測定

생단백질의 분자량을 확인하기 위하여 Ferguson plot 분석방법을 이용하였다(Hedrick and Smith, 1968; Oxford, 1973). 표준단백질로는  $\alpha$ -lactalbumin(M.W.: 14,200), carbonic anhydrase(M.W.: 29,000), chicken egg albumin(M.W.: 45,000), bovine serum albumin(M.W.: 單量體는 66,000; 二量體는 132,000), urease(M.W.: 이량체는 240,000; 四量體는 480,000)를 사용하였고, 겔의 농도가 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0%에서 각각

전기영동하여(Fig. 9) Ferguson plot을 위한 기울기를 얻었다(Fig. 10). 실험에 사용한 모든 시약과 방법은 Sigma MKR-137(1981)법에 준하였다. 이 전기영동상에서 구한 겔 농도에 따른 기울기는 Sigma제품에 기재된 결과와 일치하였다.

생단백질 상태의 SM분자량을 확인하기 위하여 대칭이 항-SM혈청과 같은 SM항원 親和性を 나타내는 선택과 3종의 EPF를 Ferguson plot을 위한 농도별 전기영동(Sigma MKR-137, 1981)을 한뒤, 0.9% agarose겔에서 대칭이 항-SM혈청과 침강반응을 시켜 전기영동겔 농도에 따라 나온 항-SM 沈降帶의 기울기를 구하여 표준단백질기울기에 비례시켜 분자량을 구했다(Fig. 11). 이 방법은 면역전기영동 방법으로 시료를 polyacrylamide 겔에서 분리시키고 항원항체 침강반응은 0.9% agarose 겔에 넣어 시킨 것이다.

## 結 果

### 1. 有機媒質의 電氣泳動

전기영동으로 분리하기 전에 실험 二枚貝類 4종의 패각을 분말로 만들어 Kjeldahl법(Rand *et al.*, 1976)에 의해 단백질함량을 확인한 결과 貝殼粉末 1g당 대칭이는 14.36 mg, 말조개는 14.53 mg, 갈조개는 12.78 mg이지만 재첩은 6.13 mg으로 石貝科 3종의 평균 1.4%보다 반이하의 함량을 나타내었다. 이 결과는 Wilbur and Simkiss(1968)가 실험한 패각속의 유기매질함량인 0.01~10%와 Price등(1976)의 기수역 이매패류에서 얻은 1.4~21.4% 범위내에 있다. Krampitz(1982)에 의하면 鳥類卵殼의 有機物質含量도 2~3%가 된다고 했다.

10% EDTA에 의해 패각에서 분리된 이매패류 4종의 수용성 유기매질은 SDS-전기영동상에서 Fig. 1과 Fig. 2와 같이 분리되었다. 4종 모두 SM의 밴드수는 2개씩 나타났으며 각 밴드의 分子量은 대칭이에서 나타난 ASM-1밴드와 ASM-2밴드가 55,000과 26,000이었으며, 갈조개 LSM-1밴드와 LSM-2밴드는 54,000과 30,000, 재첩 CSM-1밴드와 CSM-2밴드는 49,000과 28,000 정도로 각 종마다 2개의 밴드가 대략 25,000 정도의 분자량 차이를 보였다. 그러나 말조개 SM은 USM-1밴드가 55,000, USM-2밴드가 47,000 정도의 분자량을 나타내어, 분자량 차이가 8,000 밖에 안되었다(Fig. 3). 대체적으로 분자량이 큰 것은 실험 이매패 4종에서 모두 50,000 정도

를 나타냈으며, 분자량이 작은 밴드그룹은 말조개의 USM-2밴드(M.W.:47,000)만을 제외하고, 나머지 3종의 분자량범위는 25,000~30,000이었다.

Ferguson plot에 의해 구한 생 SM단백질의 분자량은 Fig. 11의 分子量檢量線에서 볼 수 있다. 이 분자량 값은 재첩을 제외한 석패과 3종의 EPF안에 있는 SM이 대칭이 항-SM 혈청에 대하여 1개의 침강대를 나타내어 주므로(Fig. 6, 7) 각 종의 EPF를 농도가 다른 polyacrylamide 겔에서 똑 같은 조건으로 전기영동한 후 agarose 겔에 넣어 대칭이 항-SM 혈청과 免疫擴散시켜 농도가 다른 겔에서 나타난 침강대의 기울기를 이용하여 추정된 분자량이다(Fig. 11). 석패과 3종의 SM에 대한 생단백질의 분자량은 대칭이가 각기 약 250,000(ANS-1)과 450,000(ANS-2)이며, 칼조개가 약 200,000(LNS), 말조개가 약 350,000(UNS)정도이다(Fig. 11). 이 값은 SDS-전기영동에 의해 분리한 SM밴드의 분자량보다 상당히 높은 것으로 대칭이의 경우 ANS-2밴드(M.W.:450,000)만 강하게 나타났고(Fig. 5), ANS-1밴드(M.W.:250,000)는 잘 안 나타나는 경우가 많았다. 말조개와 칼조개의 경우는 1개의 밴드만 나타났다(Fig. 6; 7).

抗血清製造에 사용한 대칭이 ISM은 깃털의 케라틴(keratin)을 단량체로 분리하는데 사용한 방법(Harrap and Woods, 1964)으로는 SDS-전기영동상을 통하여 불용성 단백질이 겔속으로 들어가지 못하고 겔의 출발점에 모여있는 것을 알 수 있다(Fig. 2의 LIS). 이 결과로 ISM은 조류깃털의 케라틴과는 구조가 달라 위의 방법(Harrap and Woods, 1964)으로는 알킬화되지 않거나 알킬화되어도 분자가 크므로 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)상에서는 분리되지 않는다고 예상할 수 있다. 그러나 진한 개미산을 사용하여 강하게 단백질을 환원시켜 불용성 단백질을 抽出하는 방법(Waite et al., 1979)으로는 다른 단백질에 비해 상당히 크고 불용성이 ISM 단백질이 성분으로 나뉘어져 SDS-요소전기영동법으로 분리되었다(Fig. 12의 1), 즉 분자량이 커서 겔속에 들어가지 못하고 출발점에 남아있는 Fe-1밴드 외에 Fe-3(M.W.:75,000), Fe-6(M.W.:52,000), Fe-7(M.W.:51,000) 및 Fe-9(M.W.:20,000)등 모두 5개의 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 13). 이 시료에서 개미산을 제거한 후 남은 沈澱物을 다시 tris-formate 완충액(pH 3)에 녹여 즉시 전기영동을 하면 분자량이 큰 밴드는 없어지고 단지 분자량이 20,000인 Fe-9밴드 한 개만 나타

난다(Fig. 12의 2). 다시 이 시료를 室溫에서 2시간 방치한 후 원심분리(10,000×g에서 5분)하여 상등액과 침전물을 각각 전기영동하면 상등액에서는 Fe-5(M.W.:58,000)와 Fe-8(M.W.:40,000) 2종류의 밴드가 나타나고(Fig. 12의 3), 침전물에서는 Fe-2(M.W.:77,000)와 Fe-1밴드가 나타난다(Fig. 12의 4와 5). 36시간 실온에 방치한 시료는 Fe-1밴드와 강도가 약해진 분자량 67,000의 Fe-4밴드가 나타났다(Fig. 12의 6). 따라서 개미산을 제거한 후 tris-formate 완충액(pH 3)에 녹여 작은 분자로 분리된 대칭이 ISM 단위체는 방치시간이 경과할수록 분자량이 큰 重合體를 형성한다는 것을 알 수 있었다.

## 2. 外套液의 蛋白質分析

대칭이 外套液(extrapallial fluid; EPF)의 항혈청에 대한 각 조직추출액의 면역확산반응은 Fig. 4에서 볼 수 있다. 대칭이 항-EPF혈청(anti-EPF)은 EPF외에 內臟囊(visceral hump; V), 부족근추출액(foot; F)과 외투막가장자리조직(mantle edge; ME)에서도 침강반응을 많이 나타냈지만 外套膜(mantle; M)과 아가미조직(gill; G)에서는 거의 침강반응을 볼 수 없었다.

Fig. 14는 대칭이의 순수한 EPF와 투석하여 칼슘을 제거한 EPF의 차이를 요소-전기영동으로 알아본 것이다. 그 결과 순수한 EPF의 밴드는 11개가 나타났으며(Fig. 14의 EBD), 투석 후에 E-2, E-3, E-5, E-6, E-7등 모두 5개의 밴드는 그 強度가 증가하였다(Fig. 14의 EAD).

이와 같은 실험은 대칭이 항-ISM 혈청과 강한 반응을 나타내는 부족근추출액(Fig. 17)에도 적용하였는데 순수한 부족근추출액에서는 12개의 밴드가 나타났으며(Fig. 14의 FBD) 투석 후에는 그 중 F-11 밴드가 완전히 없어졌으며(Fig. 14의 C), 나머지 밴드들도 강도가 많이 약해졌다. 이는 부족근추출액의 단백질들이 EPF단백질들과 相反되는 특징을 가지고 있는 것으로 보인다. F-11 밴드의 위치는 부족근추출액을 전기영동한 겔과 항-ISM 혈청을 면역확산을 시켰을 때 침강대를 나타내는 部位(Fig. 8)와 비슷한 위치이다.

## 3. 有機媒質의 免疫化學의 特性

패각에서 분리한 대칭이 ISM의 항혈청을 각조직추출액과 면역확산을 시켰을 때 부족근추출액(F)에서 강한 침강대를 보여주었고, 내장(V), EPF(EP)에서는 항혈

청을 주입한 흠 쪽에서 약하고 확산된 침강대를 볼 수 있었다(Fig. 17). 그러나 EPF내로 패각형성물질을 분비한다고 알려진 외투막가장자리(ME)에서는 ISM침강대를 찾기 힘들었다(Fig. 17의 ME). 이 결과는 Fig. 4의 항-EPF 혈청이 외투막가장자리(ME)에서 강한 침강반응을 나타내어 준 것과는 달랐다.

대칭이 항-SM 혈청을 각 조직추출액과 면역확산반응을 시키면 단지 EPF(EP)에서만 2개의 침강대를 나타내며(Fig. 18), 항혈청(anti-SM) 흠쪽에 있는 침강대(SA-2)는 나타나지 않는 경우가 많았다. 두 침강대의 항원 항체 친화성은 非同質性(non-identity)임을 투석 후 EPF(DI)와 항-SM(anti-SM)사이에 있는 SM과 ISM 침강대에서 볼 수 있다(Fig. 20의 면역확산 2번 겔). Fig. 18의 SA-2 침강대는 Fig. 19의 항-SM(anti-SM)과 항-ISM(anti-IS) 두항혈청이 부족근추출액과 EPF혼합액(F+EP)에 반응한 침강대에서 ISM과 SA-2가 항원 항체동질성(identity)을 보여 주므로 같은 항체임을 확인할 수 있었다. 이것은 패각에서 SM을 분리할 때 소량의 ISM을 구성하는 용해성 전구체가 혼합된 것으로 생각된다. 이는 ISM과 SM이 상호관련성이 있는 것으로 생각되며, 특히 periostracin과 같이 중합(polymerization)이 잘 일어나는 ISM의 용해성 前軀體(Fig. 12)는 상당히 고분자인 생SM(Fig. 11)에 결합될 수도 있다고 생각된다.

EPF속에 있는 말조개와 칼조개의 SM은 대칭이 항-SM 혈청과 항원의 同質性을 보여 주었으며 칼조개의 경우 7% polyacrylamide겔로 전기영동한 후 (Fig. 6의 B) 똑같은 길이로 10등분한 겔조직중 두번째 겔과 抗原 抗體침강대를 나타내었다(Fig. 6의 A). 이 부위의 R.M.은 0.09에서 0.17 사이에 있다. 말조개는 13등분한 겔(Fig. 7의 B)중 역시 두번째 겔조직과 침강대를 나타내었다(Fig. 7의 A). 이 부위는 R.M.이 0.14이었다. 기울기를 근거로 분자량을 확인한 결과 말조개 SM의 생단백질은 대략 350,000이었고 칼조개 SM은 약 200,000의 모두 큰 고분자였다(Fig. 11의 LNS와 UNS).

대칭이 EPF의 SM 성분을 추적하기 위해 電氣泳動원 동도가 다른 겔과 항-SM 혈청을 면역확산 시켰을 때 나타내는 전기영동밴드는 8% polyacrylamide겔에서 R.M.은 0.04, 7% 겔에서는 0.07, 6% 겔에서는 0.18, 그리고 5% 겔에서는 0.28에 있었다(Fig. 5). 이 밴드는 겔 농도에 따른 기울기에 근거해서 분자량이 약 450,000에

달함을 암시한다(Fig. 11의 ANS-2). 이로서 석패과 3종 모두 분자량이 상당히 큰 고분자가 生蛋白質상태에서 패각의 SM성분으로 참여하는 것 같다.

패각에서 추출한 ISM의 항혈청은 斧足筋抽出液에서 강한 반응을 보여 면역반응을 위한 전기영동실험에서는 부족근추출액을 사용하였다. 부족근추출액은 7% polyacrylamide 겔에서 전기영동한 후 10 등분한 겔중 6번과 7번 겔사이에서 항-ISM 혈청과 확산된 침강대를 보여 주었다(Fig. 8의 B). 이 위치의 밴드는 농도가 다른 각 겔에서 기울기 0.6을 나타냈으며(Fig. 11의 NAI) 분자량은 대략 100,000 정도였다. 결과적으로 EPF안에 있는 SM과 ISM 전구체의 생단백질의 분자량은 SM이 확실히 크며, 대칭이의 경우 4배 이상 차이가 났다.

EPF에 있는 칼슘결합단백질은 非透析性이란 근거(Crenshaw, 1972a; Samata and Krampitz, 1982)하에 항-SM혈청이 1mM로 칼슘을 처리한 EPF와 투석한 EPF에서 어떤 양상을 나타내는지 보았다. 그 결과는 Fig. 20과 같다. 미처리 EPF에서는 두 개의 침강대를 나타내지만 칼슘을 처리한 EPF(Fig. 20의 CC)에서는 ISM 침강대만 나타났고, 투석한 EPF(Fig. 20의 DI)에서는 SM침강대만 나타났다. 항원의 비동질성(non-identity)을 나타낸 SM과 ISM침강대는 칼슘에 대한 作用樣이 다르나, 단백질 자체의 특성이 다르다는 것을 암시했다. 특히 Fig. 15에서 볼 수 있는 것과 같이 항-SM혈청은 석패과가 아닌 재첩에서는 침강대를 나타내지 않는 반면 Fig. 16의 항-ISM 혈청의 種間比較실험에서는 대칭이 항-ISM혈청(anti-IS)이 석패과와 재첩 모두에서 抗原 同質性의 침강대를 나타내주어 SM은 종 사이에서 다른 구조를 가질 수 있는 반면 ISM은 종간의 구분이 뚜렷하지 않다는 암시를 주었다.

EPF 성분중 농도가 높은 아스파르트산, 글로타민산과 글리신같은 아미노산이 수용성 유기배질에 어떤 영향을 나타내는지 알기 위해 위의 아미노산 1mM과 5mM을 각기 EPF에 첨가한 후 항-SM 혈청과 抗原 抗體沈降反應을 시켰다(Fig. 21). 그 결과 유리아미노산에 의한 수용성 유기배질의 침강대는 변화하지 않았다.

또한 1mM 이상에서 貝殼成長을 저해한다는 마그네슘(Crenshaw, 1972a; Wada and Fujinuki, 1976; Wilbur and Bernhardt, 1984)도 항-SM혈청에 의한 SM 沈降帶에 영향을 주지 못했다(Fig. 22). 하지만 염화이온의 경우는 항 SM의 침강대를 볼 수 없었다(Fig.

23의 Z<sub>1</sub>과 Z<sub>5</sub>). 특히 관심을 끄는 것은 아연 양이온은 마그네슘 양이온과는 달리 칼슘 양이온과 같은 4주기의 2가 원소라는 점이다.

EPF에 패각분말이나 炭酸나트륨을 처리한 결과는 항-SM침강대에 아무런 변화를 주지못했고(Fig. 24의 SP; Fig. 22의 N1과 N5), 특히 패각형성에 중요한 CAH의 활성을 1mM에서 저해하는 acetazolamide(Freeman, 1960; Carriker and Chauncey, 1973; Dawson *et al.*, 1986)로 처리한 EPF(Fig. 25의 AZ)와 직접 CAH를 첨가한 EPF(Fig. 24의 CA)에서 나타나는 항-SM의 침강대에는 아무런 변화가 없었다. Freeman and Wilbur (1948)도 패각형성은 CAH가 없어도 일어난다고 했다.

SM을 산과 알칼리에 대한 敏感性을 알아보기 위해 EPF의 완충력을 이용하여 약간의 pH 변화를 줄 정도로 약하게 EPF에 산과 알칼리를 처리한 후 항-SM혈청과 침강반응을 시켜본 결과 침강대를 형성하지 못하였다(Fig. 25의 HP와 LP). 고로 SM은 약한 pH 변동에도 변화 겪는 단백질임을 암시하였다.

## 考 察

水溶性 媒質(soluble matrix; SM)은 Cho 및 Park (1982)의 EPF電氣泳動實驗과 EPF抗原抗體實驗(Cho *et al.*, 1985)과 같은 결과를 보였다. 즉 분류학상 科수준에서는 항원성이 달라 석패과의 대칭이 항-SM 혈청은 같은 석패과인 칼조개와 말조개에서만 SM 침강대가 나타났고, 과가 다른 재첩에서 SM 침강대를 나타내지 않았다(Fig. 15). 반면 不溶性 媒質(insoluble matrix; ISM)의 경우는 실험 이매패 4종 모두 ISM항원의 동질성을 보여(Fig. 16) 科가 다른 재첩에서도 침강대를 나타냈다. 이런 결과는 Hare and Abelson (1963-1964, 1964-1965)이 발표한 貝殼構造가 같고 類線關係가 가까운 종은 같은 유기매질을 가지고 있다고 한 결과와 부분적으로 밖에 일치하지 않으며 단지 종은 달라도 패각형성에는 같은 단백질 성분이 참여할 것이란 Pietrzak 등 (1973)의 가정은 ISM에 국한하여야 할 것으로 생각된다.

SM과 ISM의 항원성이 같은 종에 대해 다른 결과를 나타내는 것은 두 물질이 패각형성에서 기능이 다른 것과 관련있는 것 같다. 왜냐하면 ISM은 패각의 성장에 참여하고(Waite, 1983), SM은 패각성장의 抑制와 調節

作用(Wheeler *et al.*, 1981; Sikes and Wheeler, 1983; Wheeler and Sikes, 1984)에 참여하기 때문이다.

특히 SM이 科수준에서 구분되는 것은 SM이 패류가 進化하는 동안 많은 변화를 받은 때문이 아닐까 생각된다. 이런 추측을 뒷받침해 줄만한 간접적인 근거는 Akiyama (1966), Degens 및 Spencer (1966)와 Degens *et al.*(1967)의 연구에서 볼 수 있다. 이에 따르면 현재의 이매패류는 化石으로 채집한 원시패각과는 전혀 다른 구조를 가지고 있고 新生種은 舊種보다 패각성분 중 유기물질함량이 적다고 하였다. 이런 점으로 미루어 보아 패각의 유기물질의 주성분인 ISM은 진화하는 동안 줄어들었으며 패각의 구조변화에는 크게 기여하지 못한 것으로 보이나 대신 少量으로 존재하면서 패각형성에 조절작용을 하는 SM이 패각구조를 변화시킨 것이 아닌가 추측된다. SM은 진화과정에서 변화를 한 것으로 생각되며, 이런 사실을 뒷받침해 주는 것은 Kobayashi(1980)의 연구에서 원시패각은 단순한 結晶體덩어리로 어떤 정교함이 없지만 현재 이매패류의 패각은 SM의 영향하에 독특한 결정구조를 가지고 있다고 했다. 이런 사실로 미루어 보아, 유기매질의 아미노산은 환경영향을 받지 않는다(Mitterer, 1966)고 했음에도 불구하고, 貝殼結晶構造에 영향력이 큰 SM 분자(Watabe and Wilbur, 1960; Wilbur and Watabe, 1963)는 淡水地域으로 옮겨와 새로운 환경에 적응하게 된 종들에서 변화가 있어서 科수준에서 구분되는 것 같다. 특히 科수준에서 두드러진 차이점은 재첩의 패각 단백질 함량이 석패과 3종보다 상당히 적다는 것이다.

패각 단백질 성분중 항-SM혈청은 여러 조직중에서 특히 부족근추출액과 강하게 沈降反應을 나타낸다(Fig. 17). 따라서 斧足筋組織과 ISM은 어떤 관계가 있을 것으로 생각되지만 부족근조직이 ISM의 分泌組織이란 확실한 근거를 찾기는 힘들었다. 다만 부족 아래 부분인 內腸(gut)에서 패각형성을 위한 칼슘이 흡수된다는 것이 van der Borgh 및 van Duymbroeck(1966)에 의해 발견되었고, 불용성 足絲(byssus)를 만드는 족사전구체의 분비조직이 부족에 존재한다는 점(Waite and Tanzer, 1981; Waite, 1983)으로 보아 ISM 전구체도 斧足에서 분비되는 것이 아닌지 더 연구하여야 되겠다.

Beedham and Owen(1965)은 ISM이 용해성의 전구체로 分泌된 뒤에 키논(quinone)으로 연결되어 불용성 고분자인 ISM으로 된다고 했는데, 이에 비추어 보아 대

칭이 항-SM혈청의 免疫擴散實驗에서 나타난 두 개의 침강대(Fig. 18)중 항혈청쪽에 있는 SA-2 침강대는 ISM의 수용성 전구체일 가능성도 있다(Fig. 19).

ISM은 SM과 항원성에서 非同質性(non-identity)을 보여 줌으로(Fig. 19; Fig. 20의 2번 겔에서 anti-SM과 DI사이) 서로 다른 구조를 가지고 있을 가능성이 큰데, 두 단백질의 아미노산組成이 차이가 있다는 것은 이미 밝혀져 있다(Simkiss, 1965; Meenakshi *et al.*, 1971; Weiner, 1979).

Fig. 20의 항-SM혈청이 칼슘을 처리한 EPF에서 침강대가 나타나지 않는 것은, SM의 성분이 아스파르트산과 글루타민산이 많은 칼슘결합단백질(Simkiss, 1965; Meenakshi *et al.*, 1971; Weiner and Hood, 1975; Weiner, 1979; Wheeler and George, 1981; Krampitz *et al.*, 1983)이기 때문에 이런 아미노산부위가 칼슘과 결합하여 SM 단백질의 구조가 변하기 때문에 나타나는 현상으로 생각된다. 이런 현상은 쉽게 나타나는 것 같은데, SM은 칼슘과 결합하여 비수용성이 되면서 패각성장을 억제하여(Wilbur, 1964; Wada, 1968) 貝殼單位體(Watabe, 1965)를 만든다는 것이 알려졌다. 또한 遊離 아미노산은 패각형성에 영향을 미치지 못한다고 하였는데(Wilbur and Bernhardt, 1984) 본 실험에서도 유리 아미노산은 항-SM혈청의 沈降相에 아무런 영향을 주지 않았다(Fig. 21). SM은 陰電荷를 가지고 있는 단백질(Wada, 1980)이지만 다른 2가 양이온과는 변화를 나타내지 않고 4주기에 속하는 칼슘 2가 양이온이나 이연 2가 양이온에 의해 변화를 받는 것(Fig. 20, Fig. 23)은 칼슘과 SM 사이의 어떤 作用特異性 때문이 아닌가 생각된다.

EPF를 투석하면 전기영동밴드가 강해지는데 그 이유는 Pietrzak등(1973)의 EPF단백질 전기영동밴드의 頻度와 강도가 항상 일정치 않고 다르다는 것과 EPF 칼슘의 대부분이 다른 분자와 複合體를 형성하며 패각의 탄산칼슘 축적은 이런 칼슘의 결합성에 의한다는 Misogianes and Chasteen(1979)의 결과에서 볼 수 있듯이 SM 및 다른 EPF 단백질과 칼슘의 결합에 의한 EPF 단백질의 조성상 변화로 생각된다. 또한 패류의 嫌氣性代謝時 생성되는 有機酸을 中和하기 위한 패각칼슘의 해리 역시 EPF 이온조성에 변화를 주며(Crenshaw and Neff, 1969), 이에 따라 EPF의 단백질도 변화하는 것 같다.

또한 Fig. 14에서 투석한 후 강해지는 밴드 위치가 전기영동한 EPF와 항-SM혈청이 침강대를 나타내는 부위(Fig. 5, 6, 7)와 거의 일치되는 것은 칼슘이 SM에서 떨어져 SM분자가 용해된 상태로 많이 존재하는 것과 관련있는 것 같다. 이런 사실은 EPF속에서 패각 有機媒質의 전구체를 확인한 결과, 전기영동한 SM의 위치가 EPF속의 항-SM침강대와 같다는 것(Robert and Young, 1980)과 일치한다. 그러나 칼슘을 처리한 EPF(Fig. 20의 CC)에서는 ISM 침강대가 강하게 나타나고 투석한 EPF(Fig. 20의 DI)에서는 ISM침강대가 없어지는데 이는 SM에서와는 상반되는 결과이다. 그 원인은 뚜렷하지는 않지만 陰荷電된 작용기를 가진 아미노산이 많은 SM과 티로신과 글리신 같은 非荷電된 極性 작용기를 가진 아미노산이 많은 ISM(Beedham and Owen, 1965; Meenakshi *et al.*, 1971)과의 차이에서 나타나는 결과로 생각된다. ISM은 SM처럼 칼슘에 직접 결합하여 패각형성을 조절하기는 보다는 이온강도가 낮아진 상태에서 疎水性 結合으로 SM이 이루어 놓은 패각단위체를 서로 연결하는 작용(Wilbur, 1972; Erben and Watabe, 1974)을 한다는 사실과 어떤 관련이 있는 듯 하다. Gordon등(1980) 역시 ISM이 패각성장에서 SM과 같은 觸媒質역할을 하는 것을 발견하지 못했다고 했다.

ISM전구체의 重合은 ISM을 개미산으로 환원시켜 ISM의 작은 단위성분으로 분리시킨 다음 0.1 M tris-formate 완충액(pH 3)에 녹여 실온에 방치하면 시간이 지남에 따라 중합체로 변하는 것이 확인되는데(Fig. 12), 이와 같은 변화는 periostracum의 構成單位인 periostracin이 나타내는 현상과 비슷하다(Waite *et al.*, 1979; Waite, 1983). 따라서 ISM단위체 역시 periostracin과 구조적으로 닮아 tanning 반응에 의해 不溶性 高分子로 될 가능성이 있다(Beedham, 1954; Meenakshi *et al.*, 1971; Crenshaw and Ristedt, 1976; Waite and Andersen, 1978, 1980).

SDS-전기영동법으로 구한 유기매질의 분자량분포는 Krampitz등(1976)의 연구와 비슷하게 50,000이상을 크게 넘지는 못했으며, 두 종류가 나타난다(Fig. 1, 2, 3). 그러나 생단백질의 分子量은 상당히 높아(Fig. 11) 유기매질이 고분자重合體일 가능성을 시사하는데 Crenshaw(1972b)는 SM의 분자량이 160,000, 그리고 Wheeler등(1981)은 굴의 일종인, *Crassostrea virginica*에서 170,000 정도의 높은 SM 분자량을 확인하였다.



EPF속에 분자량이 큰 SM이 칼슘과 결합하여 불용성이 되면서 貝殼形成過程에 참여하지 않고 존재하는 이유는 外套膜 자체가 칼슘이온과 탄산이온의 분비를 조절하므로(Florkin and Besson, 1935; Jodrey, 1953; Crenshaw, 1972a) EPF의 이온조성에 변화를 주어 유기매질 분자가 주위조건에 따라 패각형성에 참여하게 되는 것으로 생각된다. 이런 조절작용은 계절에 따른 溫度 및 生理的變化에 의한 것(Wada and Fujinuki, 1976; Wilbur and Saleuddin, 1983)으로 여겨진다.

### 結 論

淡水産 二枚貝類 有機媒質(organic matrix)인 水溶性 媒質(soluble matrix; SM)과 不溶性 媒質(insoluble matrix; ISM)의 蛋白質特性 및 이 특성에 따른 種間比較를 위해 電氣泳動과 免疫化學方法을 통하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. SDS-전기영동으로 분리된 패각 SM의 종류는 실험된 4종의 이매패에서 모두 2개씩이었으며 分子量은 말조개만 2개가 서로 비슷하였고 나머지 3종은 비교적 큰 차이를 보였다. 반면 EPF에서 분리한 생SM分子量은 SDS-전기영동에 의해 구한 분자량보다 상당히 큰 것으로 나타났다.
2. 실험 4종의 ISM은 항-ISM혈청에서 모두 抗原抗體同質性(identity)을 보여 주었으나 SM은 재첩을 제외한 石貝科 3종에서만 항원항체동질성을 보여 科수준에서 구분되는 것을 알 수 있었다. 貝殼蛋白質含量에서도 재첩은 석패과 3종에 비해 반 이하의 함량을 보였다.
3. SM과 ISM의 항혈청은 抗原抗體親和性(antigen-antibody affinity)에서 非同質性(non-identity)을 나타내어 서로 다른 특징을 가지고 있음을 암시하였다.
4. ISM의 항혈청은 여러 조직중에서 斧足筋조직에서만 강하게 沈降反應을 나타내었다.
5. 칼슘을 처리한 EPF는 항-SM혈청에 대한 항원항체침강반응에서 전혀 沈降帶를 나타내지 않은 반면, 투석한 EPF는 항-ISM혈청과 항원 항체침강대를 나타내지 않았다.
6. ISM단위체의 특징은 개미산으로 抽出한 후 방치 시간이 길어짐에 따라 重合되어 큰 고분자로 변화되어가는 것을 알 수 있었다.
7. 透析한 EPF에는 강도가 강해지는 전기영동밴드들

이 많이 존재하고, 항-ISM혈청에 대해 沈降帶를 나타낸 斧足筋抽出液에서는 반대 현상을 나타냈다.

### 참 고 문 헌

Akiyama, M. (1966) Cited from Gregoire, C. Structure of the molluscan shell. In: Florkin, M. and Scheer, B.T. (Eds.) Chemical Zoology Vol. VII. Mollusca, pp. 45-102 Academic Press, N.Y.

Andrew, A.T. (1981) Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical application. pp. 83-105 Clarendon Press, Oxford

Beedham, G.E. (1954) Properties of the non-calcareous material in the shell of *Anodonta cygnea*. *Nature*, **174**: 750

Beedham, G.E. and Owen, G. (1965) The mantle and the shell of *Solemya parkinsoni*. *Proc. Zool. Soc. London*, **145**:405-430

Bevelander, G. and Nakahara, H. (1969) An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain bivalve molluscs. *Calc. Tiss. Res.*, **3**:84-92

van der Borgh, O. and van Duymbroeck, S. (1966) Calcium metabolism in a freshwater mollusc: Quantitative importance of water and food as supply for calcium during growth. *Nature*, **210**:791

Carriker, M.R. and Chauncey, H.H. (1973). Effect of carbonic anhydrase inhibition on shell penetration by the mucricid gastropod *Urosalpinx cinerea*. *Malacol.*, **12**(2):247-263

Cho, D.H., Kwon, O.K. and Park, S.B. (1985) On the formation of nacreous layer of freshwater bivalves, II. SDS-Electrophoresis of extrapallial fluid. *Kor. J. Lim.*, **18**:61-66

Cho, D.H. and Park, S.B. (1982) On the shell formation of Korean freshwater bivalves, I. Vertical slab gel electrophoresis of extrapallial fluid protein. *Res. Bull. Kangweon Natl. Univ.*, **17**:87-88

Clausen, J. (1969) Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. pp. 399-572 North-Holland, Amsterdam

Crenshaw, M.A. (1972a) The inorganic composition of molluscan extrapallial fluid. *Biol. Bull.*, **143**:506-512

Crenshaw, M.A. (1972b) The soluble matrix from *Mercenaria mercenaria* shell. *Biom mineralization*, **6**:6-11

Crenshaw, M.A. and Ristedt, H. (1976) Histochemical localization of reactive groups in septal nacre from *Nautilus pompilius* L., In: Watabe, N. and Wilbur, K.

- M. (Eds.) The Mechanisms of mineralization of the invertebrates and plants. pp. 355-367, *Univ. South Carolina Press, Columbia*
- Crenshaw, M.A. and Neff, J.M. (1969) Decalcification at the mantle-shell interface in molluscs. *Amer. Zool.*, **9**:881-885
- Davis, B.J. (1964) Disc elctrophoreis-II, Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**:404-427
- Dawson, R.M., Elliott, D.C. Elliot W.H. and Jones, K.M. (1986) Data for biochemical research(3rd Ed.) p.316, *Oxford Univ. Press*
- Degens, E.T. and Spencer, D.W. (1966) Cited from Gregoire, C. Structure of the molluscan shell. In: Florkin, M. and Scheer B.T. (Eds.) Chemical Zoology Vol. VII. Mollusca, pp. 45-102, *Academic Press, N.Y.*
- Degens, E.T., Spencer, D.W. and Parker, R.H. (1967) Paleobiochemistry of molluscan shell protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, **20**:553-579
- de Waele, A. (1930) Le sang d' *Anodonta cygnea*, et la formation de la coquille. *Mem. Acad. Roy. Belg. Classe Sci.*, **10**:1-52
- Erben, H.K. (1972) Uber die Bildung und das Wachstum von Perlmutter. *Biom mineralization*, **4**:15-46
- Erben, H.K. and Watabe, N (1974) Crystal formation and growth in bivalve nacre. *Nature*, **248**:128-130
- Florkin, M. and Besson, G. (1935) Le liquide extrapalleal de l' 'anodonten' est pas identique au sang de cet animal. *Soc. Belge. Biol.*, **18**:1222-1223
- Freeman, J.A. (1960) Influence of carbonic anhydrase inhibitors on shell growth of freshwater snail, *Physa heterostropha*. *Biol. Bull.*, **118**:412-418
- Freeman, J.A. and Wilbur, K.M. (1948) Carbonic anhydrase in Molluscs. *Biol. Bull.*, **94**:55-59
- Gordon, J., Tomaszewski, C. and Carriker, M.R. (1980) Role of organic matrix in calcification of the molluscan shell. *Amer. Zool.* **20**:801
- Gordon, J. and Carriker, M.R. (1980) Sclerotized protein in the shell matrix of a bivalve mollusc. *Mar. Biol.* (Berlin), **57**:251-260
- Gregoire, C. (1971) Structure of the molluscan shell. In: Florkin, M. and Scheer, B.T. (Eds.) Chemical Zoology Vol. VII. Mollusca, pp.45-102, *Academic Press, N.Y.*
- Gregoire, C. (1972) Ultrasturcture des composants organiques des coquilles de mollusques, *Heliotis* **2**:51-79
- Gregoire, C., Duchateau, G.H. and Florkin, M. (1955) The proteinic network of nacre and pearl. *Ann. Inst. Oceanogr.*, **31**:1-6
- Hames, B.D. and Rickwood, D. (1981) Gel electrophoresis of proteins, A practical approach. pp.1-86, *IRL Press, England*
- Hare, P.E. and Abelson P.H. (1963-1964) Cited from Gregoire, C. Structure of the molluscan shell. In: Florkin, M. and B.T. Scheer, (Eds.) Chemical Zoology Vol. VII. Mollusca, pp.45-102, *Academic Press, N.Y.*
- Hare, P.E. and Abelson, P.H. (1964-1965) Cited from Gregoire, C. Structure of the molluscan shell. pp. 45-102, *Academic Press, N.Y.*
- Harrap, B.S. and Woods, E.R. (1964) Soluble derivative of feather keratin, I. isolation, fractionation and amino acid composition. *Biochem. J.*, **92**:9-19
- Hedrick, J.L. and Smith, A.J. (1968) Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of protiens by disc gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**:155-164
- Jodrey, L.H. (1953) Studies on shell formation, III. Measurement of calcium deposition in shell and calcium turnover in mantle tissue using the mantle-shell preparation and Ca<sup>45</sup>. *Biol. Bull.*, **104**:398-407
- Kobayashi, S. (1964) Studies on shell formation, X. A study of the proteins of the extrapallial fluid in some molluscan species. *Biol. Bull.*, **123**:414-422
- Kobayashi, I. (1980) Various patterns of biomineralization and its phylogenetic significances in bivalve mollusce. In: Omori, M. and Watabe, N. (Eds.) The mechanisms of biomineralization in animals and plants, pp.145-155, *Tokai Univ. Press, Tokyo*
- Krampitz, G.P. (1982) Structure of the organic matrix in mollusc shells and avain eggshells. In: Nancilas G.H. (Ed.) Biological mineralization and demineralization, pp. 219-232, *Dahlem Konferenzen, Berlin*
- Krampitz, G., Drolshagen, J., Hausle and Hof-Irmscher, K. (1983) Organic matrices of mollusc shells. In: Westbroek, P. and de Jong, E.W. (Eds.) Biomineralization and biological metal accumulation, pp. 231-247, *D. Reidel Pub. Co.*
- Krampitz, G., Engels J. and Cazaux, C. (1976) Biochemical studies on water-soluble proteins and related components of gastropod shells. In: Watabe, N. and Wilbur, K.M. (Eds.) The mechanisms of mineralization of the invertebrates and plants, pp. 155-173, *Univ. South Carolina Press, Columbia*
- Kwon, O.K. and Choi, J.K. (1982) The studies on the mollusks in the Lake Uiam (2). *Kor. J. Lim.*, **15**:39-50

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275
- Meenakshi, V.R. (1968) Cited from R.M. Wilbur and K. Simkiss, Calcified shells. In: Florkin, M. and Stotz, E. H. (Eds.) Vol. 26A, pp. 299-295, Elsevier, Amsterdam
- Meenakshi, V.R., Hare, P.E., Watabe, N. and Wilbur, K. M. (1969) The chemical composition of the molluscan shell. *Comp. Biochem. Physiol.*, **29**:611-620
- Meenakshi, V.R., Hare, P.E. and Wilbur, K.M. (1971) Amino acids of the organic matrix of neogastropod shells. *Comp. Biochem. Physiol.*, **40B**:1037-1043
- Misogianes, M.J. and Chasteen, N.D. (1979) Extrapallial fluid: a chemical and spectral characterization of the extrapallial fluid of *Mytilus edulis*. *Anal. Biochem.*, **100**:324-334
- Mitterer, R.M. (1966) Cited from Gregoire, C. Structure of the molluscan shell. In: Florkin, M. and Scheer, B.T. (Eds.) Chemical Zoology Vol. VII. Mollusca, pp.45-102, Academic Press, N.Y.
- Ouchterlony, O. and Nilsson, L.A. (1973) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir, D.M. (Ed.) Handbook of experimental immunology, pp. 1-19 and 44, Mansell Ltd., Witham, Essex
- Oxford, G.S. (1973) Molecular weight relationships of the esterases in *Cepaea nemoralis* and *Cepaea hortensis* (Mollusca: Helicidae) and their genetic implications. *Biochem. Genet.*, **8**:365-382
- Pietrzak, J.E., Bates, J.M. and Scott, R.M. (1973) Constituents of Unionid extrapallial fluid, I. Electrophoretic and immunological studies of protein components. *Biol. Bull.*, **144**:391-399
- Price, T.J., Thayer, G.W., La Croxi, M.W. and Montgomery, G.P. (1976) The organic content of shells and soft tissues of selected estuarine gastropods and pelecypods. *Proc. Nat. Shellfish Assoc.*, **65**:26-31
- Rand, M.C., Greenberg, A.E. and Taras, M.J. (1976) Nitrogen. In: Standard Methods. p.437, Amer. Public Health Association, Washington, D.C.
- Robert, C.H. and Young, S.D. (1980) Detection of shell matrix precursors in the extrapallial fluid of the hardshell clam, *Mercenaria mercenaria*. *Amer. Zool.*, **20**:801
- Samata, T. and Krampitz, G. (1982) Ca<sup>++</sup>-binding polypeptides in oyster shells. *Malacologia*, **22**:225-233
- Sigma, (1981) Technical Bulletin No. MKR-137., Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo
- Sikes, C.S. and Wheeler, A.P. (1983) A systematic approach to some fundamental questions of carbonate calcification. In: Westbroek P. and de Jong, E.W. (Eds.) Biomineralization and biological metal accumulation, pp.285-289, D. Reidel Pub. Co.
- Simkiss, K. (1965) The organic matrix of the oyster shell. *Comp. Biochem. Physiol.*, **16**:427-435
- Wada, K. (1961). Crystal growth of molluscan shells. *Bull. Natl. Pearl Res. Lab.*, **7**:703-828
- Wada, K. (1968) Electron microscopic observations of the formation of the periostracum in *Pinctada fucata*. *Bull. Natl. Pearl Res. Lab. (Jpn)*, **13**:1540-1560
- Wada, K.(1980). Initiation of mineralization in bivalve molluscs. In: Omori, M. and Watabe, N. (Eds.) The Mechanisms of biomineralization in animals and plants, pp.79-92, Tokai Univ. Press, Tokyo
- Wada, K. and Fujinuki, T. (1976) Biomineralization in bivalve molluscs with emphasis on the chemical composition of the extrapallial fluid. In: Watabe, N. and Wilbur, K.M. (Eds.) The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants, pp.175-190, Univ. South Carolina Press, Columbia
- Waite, J.H. (1983) Quinone-tanned scleroproteins. In: Wilbur, K.M. (Ed) The Mollusca Vol. I. pp.467-504, Academic Press, N.Y.
- Waite, J.H. and Tanzer, M.L. (1981) Polyphenolic substance of *Mytilus edulis*: Novel adhesive containing L-dopa and hydroxyproline. *Science*, **212**:1038-1040
- Waite, J.H. and Andersen, S.O. (1978) 3,4-Dihydroxyphenylalanine in an insoluble shell protein of *Mytilus edulis*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **541**:107-114
- Waite, J.H. and Andersen, S.O. (1980) 3,4-Dihydroxyphenylalanine (DOPA) and sclerotization of periostracum in *Mytilus edulis* L. *Biol. Bull.*, **158**:164-173
- Waite, J.H., Saleuddin, A.S.M., Andersen, S.O. (1979) Periostracin-A soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. *J. Comp. Physiol.*, **130**:301-307
- Watabe, N. (1965) Studies on shell formation, XI. Crystal-matrix relationships in the inner layers of mollusk shells. *Ultrastructure Res.*, **12**:351-370
- Watabe, N. and Wilbur, K.M. (1960) Influence of the organic matrix on crystal type in molluscs. *Nature*, **188**:334
- Weiner, S. (1979) Aspartic acid-rich protiens: Major components of the soluble organic matrix of mollusc shells. *Calcif. Tiss. Int.*, **29**:163-167
- Weiner, S. and Hood, L. (1975) Soluble protein of the

- organic matrix of mollusc shells: A potential template for shell formation. *Science*, **190**:988-989
- Wheeler, A.P. and Sikes, C.S. (1984) Regulation of carbonate calcification by organic matrix. *Amer. Zool.*, **24**:933-944
- Wheeler, A.P. and George, J.W. (1981) Conformation changes of oyster (*Crassostrea virginica*) soluble matrix in response to calcium. *Amer. Zool.*, **21**:941
- Wheeler, A.P., George, J.W. and Evans, C.A. (1981) Control of calcium nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. *Science*, **212**:1397-1398
- Wilbur, K.M. (1964) Shell formation and regeneration. *In*: Wilbur, K.M. and Yonge, C.M. (Eds.) *Physiology of Mollusca* Vol. I. pp.143-282, *Academic Press, N.Y.*
- Wilbur, K.M. (1972) Shell formation in molluscs. *In*: Florkin, M. and Scheer, B.T. (Eds.) *Chemical Zoology* Vol. VII. Mollusca, pp. 103-145, *Academic Press, N.Y.*
- Wilbur, K.M. and Bernhardt, A.M. (1984) Effects of amino acid, magnesium, and molluscan extrapallial fluid on crystallization of calcium carbonate: *In vitro* experiments. *Biol. Bull.*, **166**:251-259
- Wilbur, K.M. and Saleuddin, A.S.M. (1983) Shell formation *In*: Wilbur, K.M. (Ed.) *The mollusca* Vol. 4, pp. 235-287, *Academic Press, N.Y.*
- Wilbur, K.M. and Simkiss, K. (1968) Calcified shells. *In*: Florkin, M. and Stotz, E.H. (Eds.) *Comprehensive Biochemistry* 26A, pp. 229-295, *Elsevier, Amsterdam*
- Wilbur, K.M. and Watabe, N. (1963) Experimental studies on calcification in molluscs and the alga *Coccolithus huxleyi*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **109**(1):82-112
- Wise, S.W. (1970) Microarchitecture and mode of formation of nacre (Mother-of-pearl) in pelecypods, gastropods, and cephalopods. *Ecol. geol. Helv.*, **63**:775-797
- Yoo, J.S. (1976) Korean shells in colour. pp. 108-125, *Il Jee Sa, Seoul*

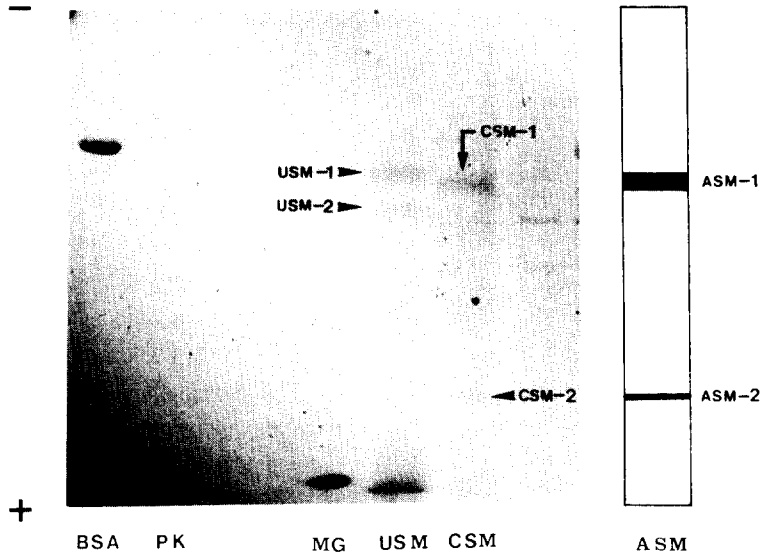


Fig. 1. Electrophoretic patterns of *Unio* and *Corbicula* proteins on SDS-slab gel.  
 BSA : bovine serum albumin ; PK : pyruvate kinase ; MG : myoglobin ; USM : SM of *U. douglasiae* ; CSM : SM of *C. fluminea* ; ASM : SM of *A. fukudai*.

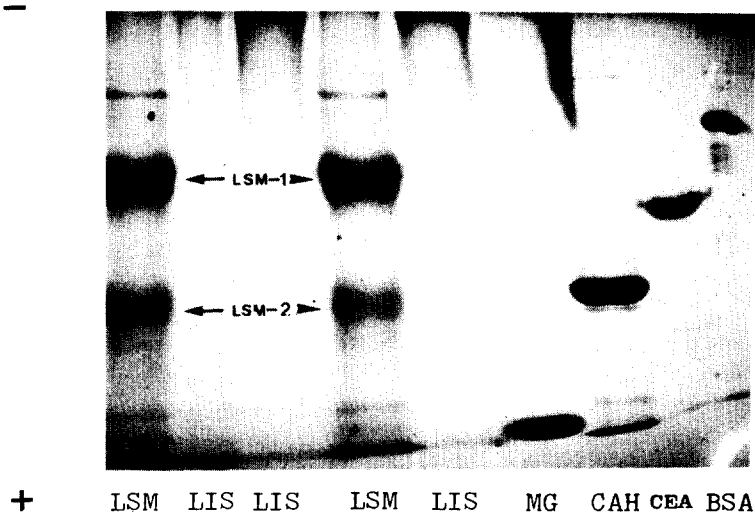
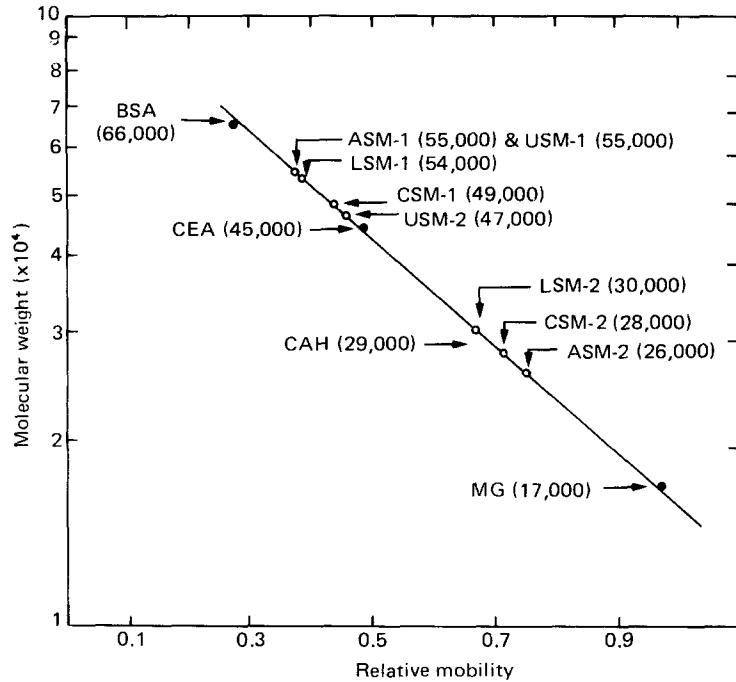
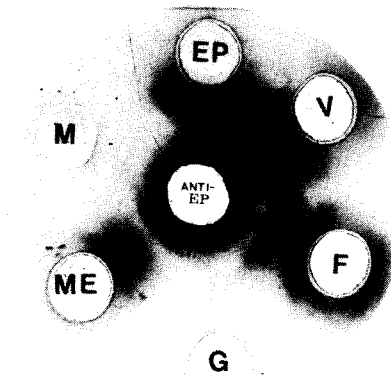


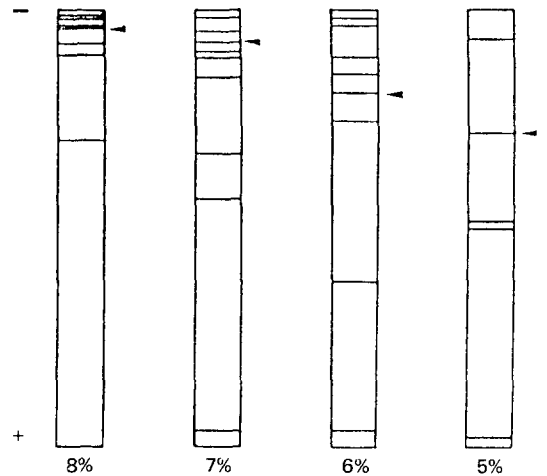
Fig. 2. Electrophoretic patterns of *Lanceolaria* proteins on SDS-slab gel.  
 LSM : SM of *L. acrorhyncha* ; MG : myoglobin ; CAH : carbonic anhydrase ; CEA : chicken egg albumin ; BSA : bovine serum albumin.



**Fig. 3.** Molecular weight calibration curve for SM of 4 species of bivalves by SDS-electrophoresis of Fig. 1 and Fig. 2. Abbreviations are bovine serum albumin (BSA), chicken egg albumin (CEA), carbonic anhydrase (CAH), myoglobin (MG), SM No. 1 and No. 2 of *A. fukudai* (ASA-1 and ASM-2), SM of *L. acrorhyncha* (LSM), SM of *C. fluminea* (CSM), and SM of *U. douglasiae* (USM).



**Fig. 4.** Radial immunodiffusion patterns of the tissue lysates of *A. fukudai* for anti-serum (ANTI-EP) against extrapallial fluid of *A. fukudai*. EP means extrapallial fluid; F : foot extract; V : visceral hump; G : gill; ME : mantle edge; M : mantle.



**Fig. 5.** Immuno-electrophoretic patterns used anti-SM serum of *A. fukudai* with EPF of *A. fukudai* as antigen to identify bands of SM. Electrophoretic gels are used 5%, 6%, 7%, and 8% polyacrylamide gels, and ► indicate the electrophoretic bands of EPF precipitated by anti-SM for different gel concentrations.

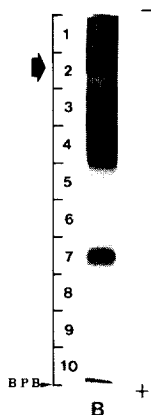
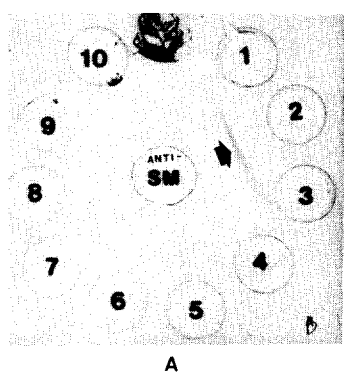


Fig. 6. Radial immunodiffusion (A) of anti-SM serum (ANTI-SM) against SM from shell of *A. fukudai* with electrophoretic gel (B) of EPF of *L. acrorhyncha*.  
 ▴ indicate precipitate position of anti-SM serum for 10 sectional gels (B) by immunodiffusion (A).

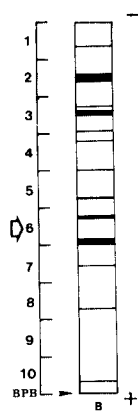
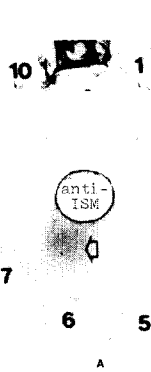


Fig. 8. Radial immunodiffusion (A) of anti-ISM serum (anti-ISM) against ISM purified from the shell of *A. fukudai* with electrophoretic bands (B) of foot tissue lysate of *A. fukudai*.  
 ◻ indicate ISM precipitate position among 10 sectional gels (B) by immunodiffusion (A).

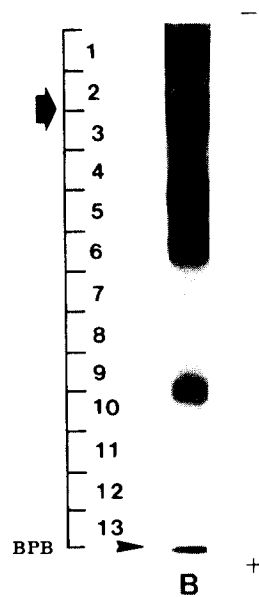
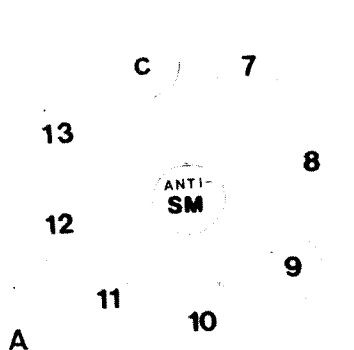
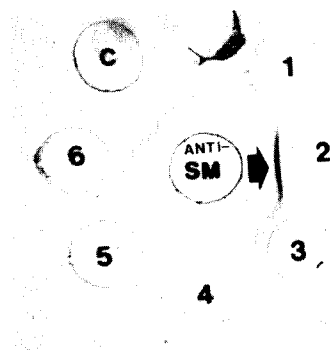


Fig. 7. Radial immunodiffusion (A) of anti-SM serum (ANTI-SM) against SM purified from shell of *A. fukudai* with electrophoretic gel (B) of EPF of *U. douglasiae*.  
 ▴ indicate precipitate of anti-SM serum for 13 sectional gels (B) by immunodiffusion (A) ; c is crude EPF of *U. douglasiae*.

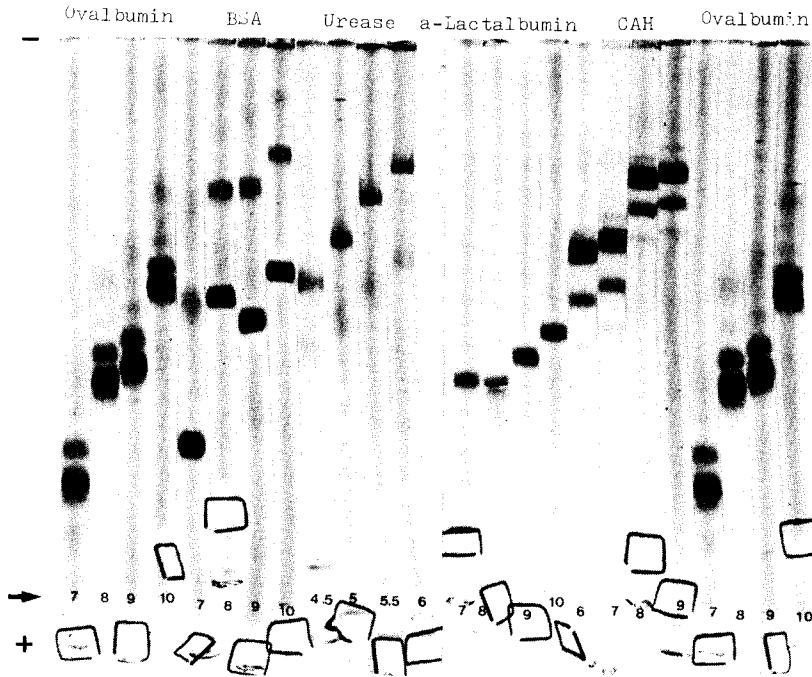


Fig. 9. Electrophoretic patterns of standard proteins for Ferguson plot. Arrow indicates percents of gels.

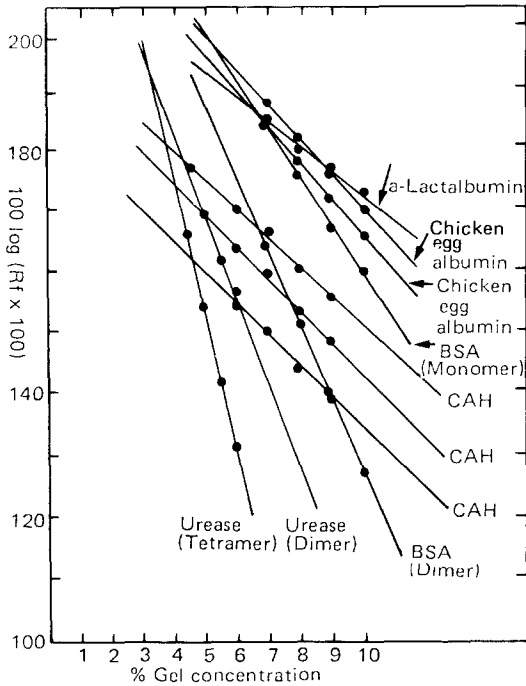


Fig. 10. Slopes for standard proteins through Ferguson plot analysis.

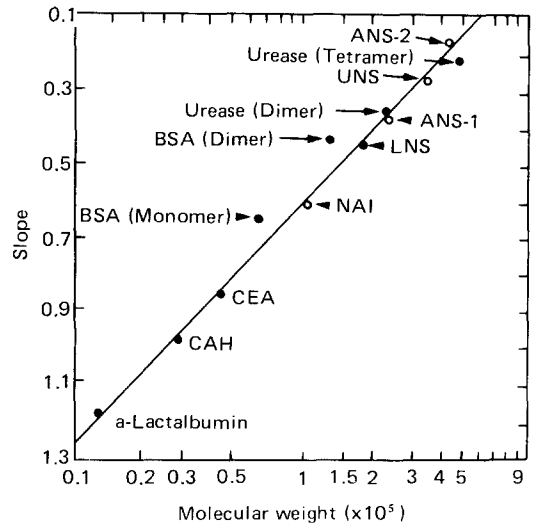
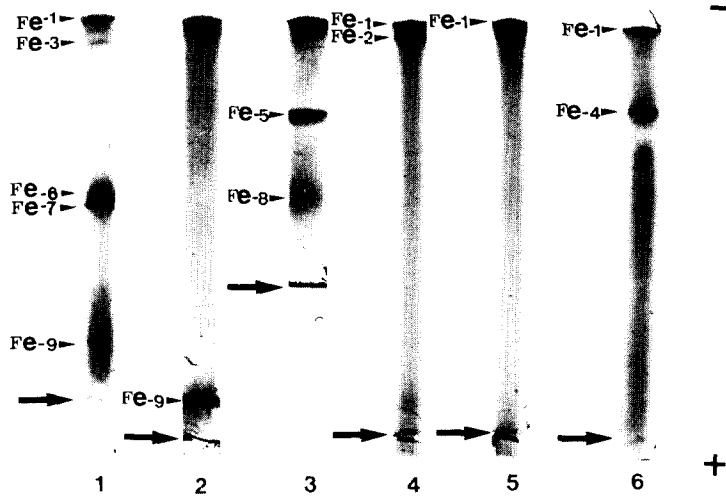
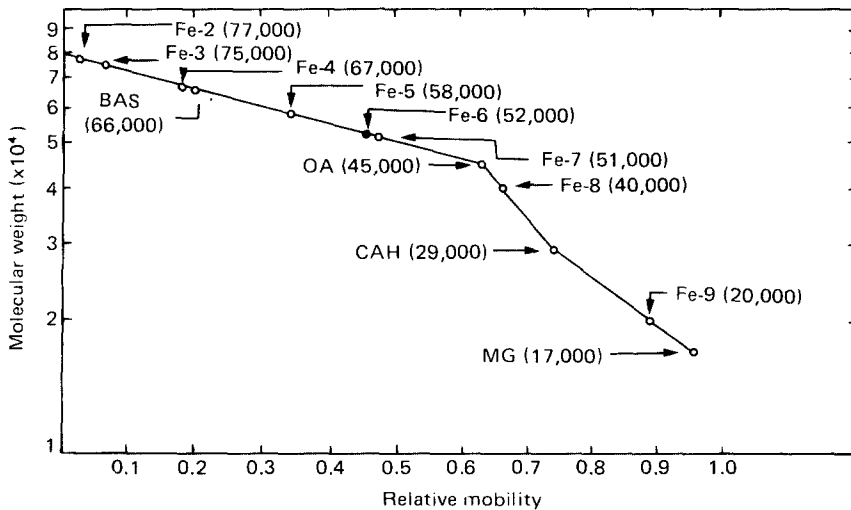


Fig. 11. Molecular weight calibration curve for native SM and ISM through Ferguson plot. ● indicate standard proteins ; a-lactalbumin, CAH (carbonic anhydrase), CEA (chicken egg albumin), BSA (bovine serum albumin), and Urease and ○ are native ISM molecular weight (M. W.) of *A. fukudai* (NAI), native SM M. W. of *L. acrorhyncha* (LNS) and native SM M. W. of *U. douglasiae* (UNS).





**Fig. 12.** SDS-gel electrophoretic patterns of formic acid-extracted ISM of *A. fukudai*. Tracking dye front (BPB) is indicated by arrows ; Fe arrow heads : no. of electrophoretic bands ; 1 : crude ISM in formic acid ; 2 : ISM run immediately after removal of formic acid ; 3 : centrifugation supernatant run 2 hr after removal of formic acid ; 4 and 5 : centrifugational precipitate (ppt) run 2 hr after removal of formic acid ; 6 : ISM run 36 hr after removal of formic acid.



**Fig. 13.** Molecular weight calibration curve for *A. fukudai* ISM in shell extracted by formic acid of Fig. 12. 1 : crude ISM in formic acid ; 2 : ISM run immediately after removal of formic acid ; 3 : centrifugational supernatant run 2 hr after removal of formic acid ; 4 : centrifugational ppt run 2 hr after removal of formic acid ; 6 : ISM run 36 hr after removal of formic acid.

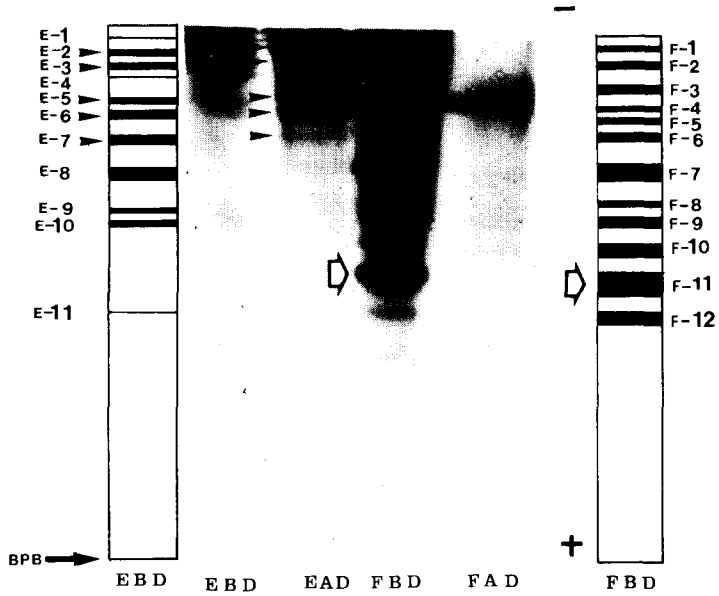


Fig. 14. Urea-electrophoretic patterns of *A. fukudai* before and after dialysis. EBD : extrapallial fluid before dialysis ; EAD : extrapallial fluid after dialysis ; FAD : foot tissue lysate after dialysis ; FBD : crude foot tissue lysate of *A. fukudai* ; F is no. of foot tissue bands ; E is no. of extrapallial fluid bands ; ► indicate major protein bands of EPF after dialysis ; ◊ ; major protein band disappeared after dialysis ; ◄ : bromophenol blue (BPB).

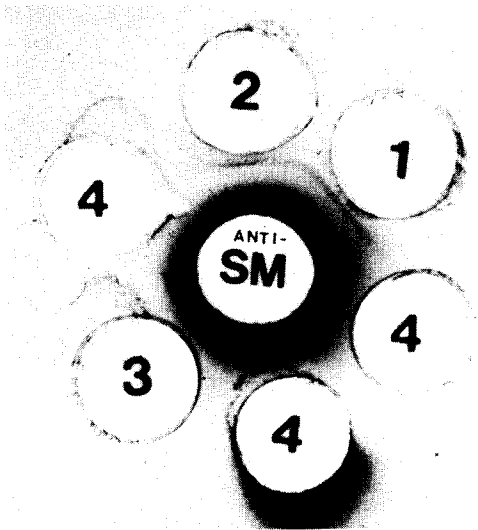


Fig. 15. Radial immunodiffusion patterns of anti-SM serum (ANTI-SM) of *A. fukudai* with extrapallial fluids of *Unio* (1), *Anodonta* (2), *Lanceoraria* (3), and *Corbicula* (4).

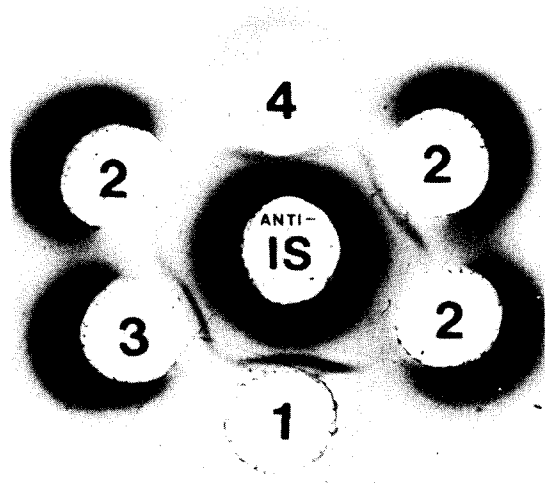


Fig. 16. Radial immunodiffusion patterns of anti-IS serum (ANTI-IS) *A. fukudai* with foot extracts of *Unio* (1), *Anodonta* (2), *Lanceoraria* (3), and *Corbicula* (4).

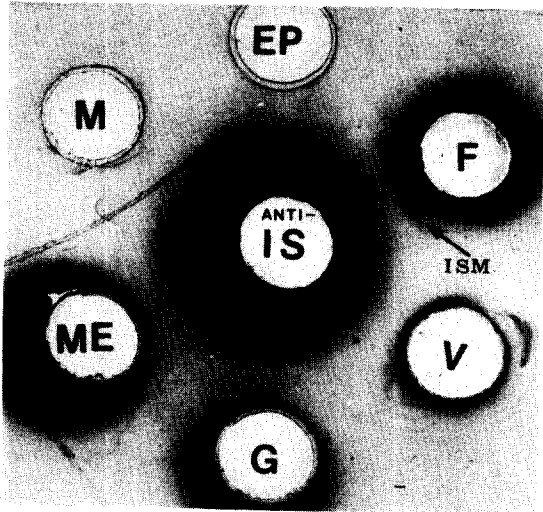


Fig. 17. Radial immunodiffusion pattern of anti-ISM (ANTI-IS) with tissue lysates of *A. fukudai*. EP means extrapallial fluid ; F : foot lysate ; V : visceral hump ; G : gill ; ME : mantle edge ; M : mantle lysate.

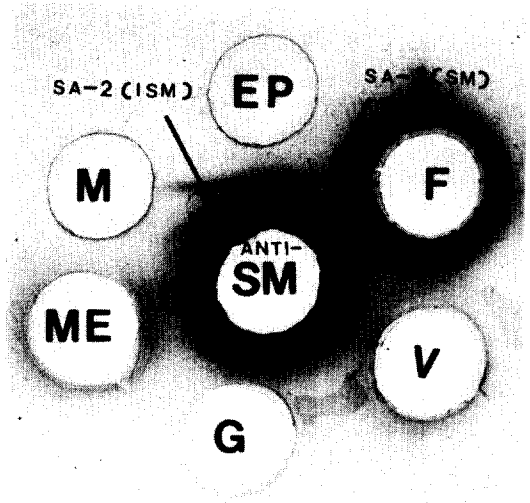


Fig. 18. Radial immunodiffusion patterns of tissues of *A. fukudai* with anti-SM serum (ANTI-SM) against SM purified from shell of *A. fukudai*. SA-1 is SM arc and SA-2, ISM arc judging from Fig. 19.

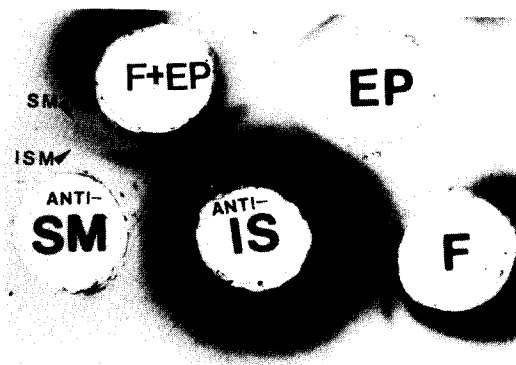


Fig. 19. Immunodiffusion test of EPF (EP) and foot extract (F) of *A. fukudai* with anti-SM (ANTI-SM) and anti-ISM (ANTI-IS) against SM and ISM purified from shell of *A. fukudai* in order to identify SA-1 is SM and SA-2, ISM ; anti-ISM serum (ANTI-IS) forms immuno-identity for SA-2 of anti-SM serum (ANTI-SM) in mixture soln (F + EP) of foot extract and EPF.

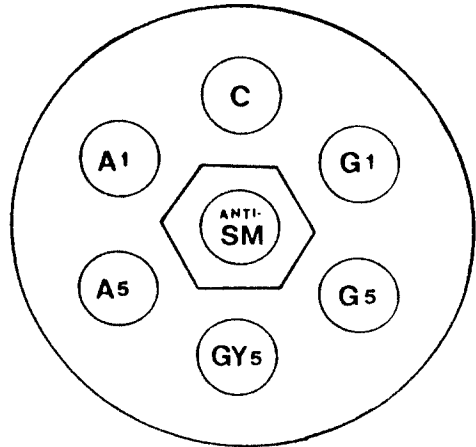


Fig. 21. Radial immunodiffusion patterns of anti-SM serum (ANTI-SM) against SM from shell of *A. fukudai* with EPFs treated with free amino acids. C : crude EPF of *A. fukudai* ; G1 : EPF treated with 1 mM glutamic acid ; C5 : EPF, 5 mM glutamic acid ; A 1 : EPF, 1 mM aspartic acid ; A5 : EPF, 5 mM aspartic acid ; GY5 : EPF, 5 mM glycine.

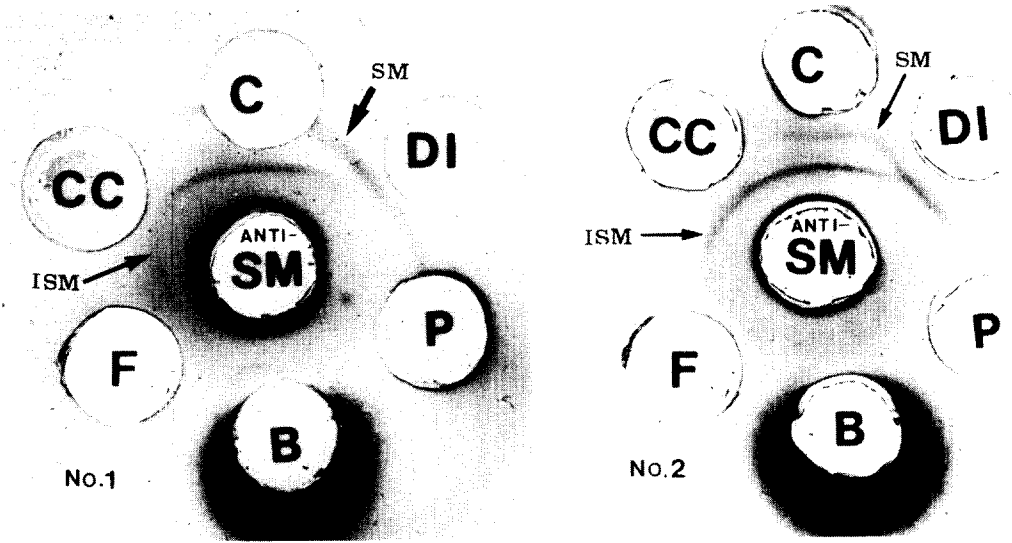


Fig. 20. Radial immunodiffusion patterns of EPFs pretreated with  $\text{Ca}^{++}$  (CC) and dialysate (DI) of *A. fukudai* with anti-SM against SM purified from shell of *A. fukudai* in order to test calcium-organic matrix complex. C means crude extrapallial fluid of *A. fukudai*; DI: EPF after dialysis; CC: EPF with calcium; F: foot extract; P: foot extract in urea; B: EPF in urea.

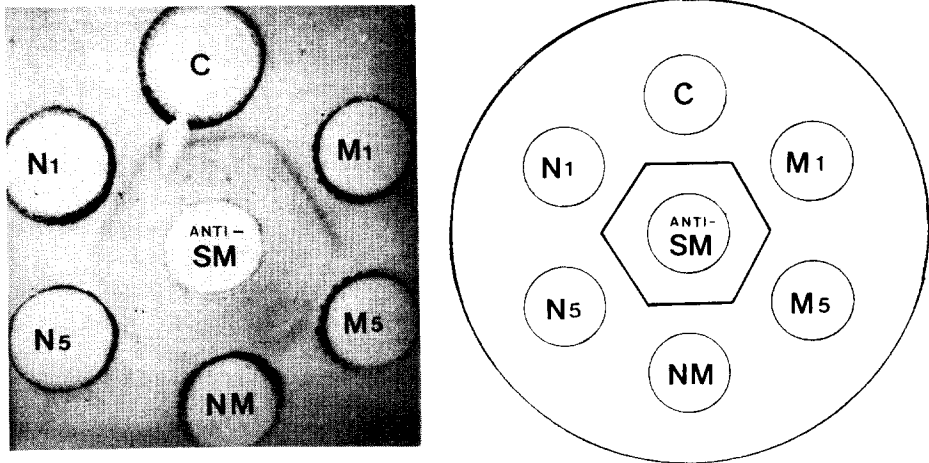


Fig. 22. Radial immunodiffusion patterns of anti-SM serum (ANTI-SM) against SM from shell of *A. fukudai* with EPFs pretreated with  $\text{MgCl}_2$  (M),  $\text{NaHCO}_3$  (N), and  $\text{MgCl}_2 + \text{NaHCO}_3$  (NM). C: crude EPF of *A. fukudai*; M1: EPF treated with 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; M5: EPF, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; NM: EPF, 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; N1: EPF, 1 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; N5: EPF, 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ .

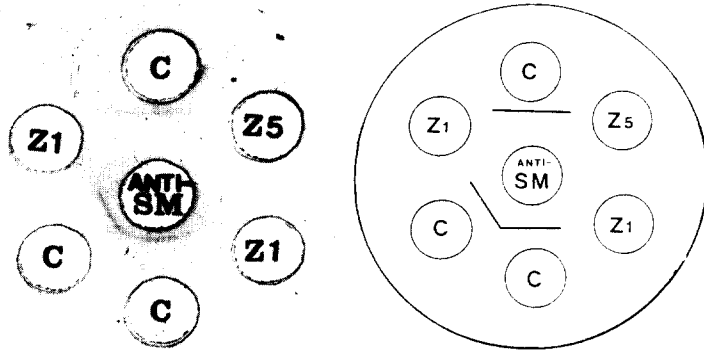


Fig. 23. Radial immunodiffusion patterns of anti-SM serum (ANTI-SM) against SM from shell of *A. fukudai* with EPF pretreated with  $ZnCl_2$ .  
C : crude EPF of *A. fukudai* ; Z1 : EPF treated with 1 mM  $ZnCl_2$  ; Z5 : EPF, 5 mM  $ZnCl_2$ .

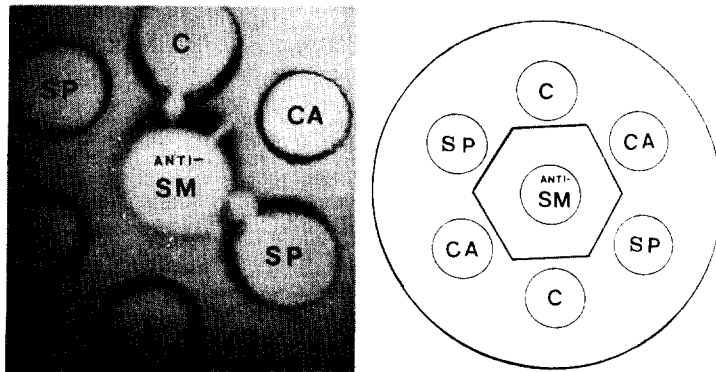


Fig. 24. Radial immunodiffusion patterns of anti-SM serum (ANTI-SM) against SM from shell of *A. fukudai* with EPFs pretreated with carbonic anhydrase (CAH) purified from bovine erythrocyte (CA), and with the shell powder of *A. fukudai* (SP).  
C : crude of *A. fukudai*.

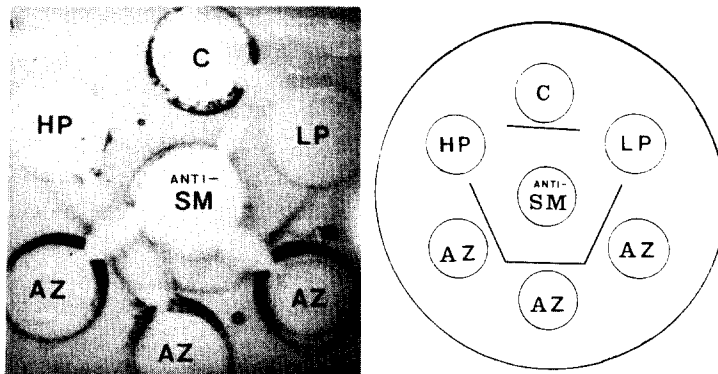


Fig. 25. Radial immunodiffusion patterns of anti-SM serum (ANTI-SM) against SM from shell of *A. fukudai* with EPFs pretreated with acetazolamide, acid and base.  
C : crude EPF of *A. fukudai* ; AZ : EPF pretreated with 1 mM acetazolamide ; LP : EPF with acid ; HP : EPF with base.