

## 地球環境保全を目指した海洋生物における石灰化の制御機構の解明

Elucidation of regulation mechanism of calcification in marine organisms toward preservation of global environment

長澤 寛道 (NAGASAWA HIROMICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授



### 研究の概要

地球温暖化の主要原因とされる二酸化炭素の固体への固定反応である海洋生物による石灰化反応は、現在の地球の大気中の低い二酸化炭素濃度の維持に大きく貢献してきたが、石灰化の機構は不明の点が多く残されている。本研究は、石灰化組織に含まれる微量の有機基質の構造と機能を明らかにすることによって、石灰化の制御機構を解明することを目的としている。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学、環境農学

キーワード：環境分析

### 1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素の炭酸カルシウムへの固定反応は生物が無機鉱物を形成する反応（バイオミネラリゼーション）の主要なものであり、地球環境の維持に貢献してきた。しかし、その機構の詳細は不明である。これまで、その反応機構には、バイオミネラルに含まれる微量の有機物（有機基質）が重要な役割をしていると考えられてきた。最近になって、これらの有機基質の構造が少しずつ明らかになってきたが、それらの機能については不明のものが多いのが現状である。

### 2. 研究の目的

石灰化反応を有する代表的な海洋生物として、円石藻、サンゴ、軟体動物、甲殻類、魚類を選び、それぞれの石灰化組織から、石灰化に関わっていると考えられる有機基質を抽出・精製・構造解析を行い、機能を推定することによって石灰化の制御機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

石灰化組織を酸またはEDTA溶液を用いて脱灰し、可溶性画分と不溶性画分に分離する。不溶性画分から界面活性剤を含む溶液で処理することによって抽出する。それぞれに含まれる有機基質を、石灰化阻害活性、炭酸カルシウム結晶多形認識活性などを指標にして精製し、有機基質を単離し、構造解析、機能解析を行う。機能解析には、石灰化阻害活性、試験管内での結晶形成に対する効果、RNA

干渉、抗体を利用した局在解析等を行う。

### 4. これまでの成果

この2年間で、学術的に最もインパクトのある研究成果は、非晶質炭酸カルシウム (ACC) を安定に保つために利用されているリン含有化合物の同定である (Sato et al., Nature Chem. Biol., 2011)。これは、結晶多形の制御に関することで、バイオミネラリゼーション研究における主要な課題の一つである。炭酸カルシウムには3つの結晶多形が存在し、生物は必ずしも最も安定なサイトを利用しているわけではなく、準安定なアラゴナイトやバテライトを利用しているものもある。さらに、これらの3つの結晶よりさらに不安定な非晶質炭酸カルシウム (ACC) を利用している生物もいる。その代表が甲殻類であり、甲殻類では脱皮のたびに体内で炭酸カルシウムを移動させ、再利用しているが、そのために最も溶けやすいACCを外骨格や胃石に用いている。外骨格および胃石からACC誘導活性を指標にして、可溶性有機基質を精製解析した結果、ACCを安定化する因子として、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) および3-ホスホグリセリン酸 (3-PG) を同定した。以前からACC形成とリンの関連が指摘されていたが、本研究によって長年の懸案が解決された。

その他の個々の生物種における研究進展状況は以下のとおりである。

円石藻のココリス形成—ココリス基質タンパク質の機能を解析する方法として、円石藻

に直接外来遺伝子導入する方法を検討してきた。その結果、円石藻を低張液で処理してプロトプラスト化したのち、ポリエチレングリコール法により外来遺伝子を導入できることを確認した。一方、ココリスの有機基盤に強く結合していると考えられるタンパク質CSAP-2をすでに同定している。このCSAP-2の発現時期がココリス形成と同調していることからCSAP-2遺伝子をRNAiによりノックダウンしたところ、ココリスの形態に異常が認められた。このことから、CSAP-2が正常なココリス形成に必須であることが推定された。現在、再現性を確認中である。軟体動物—アコヤガイの真珠層形成に関わるタンパク質Pif 80が炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶により特異的に結合することに注目し、その性質がタンパク質のアミノ酸配列のどの部分に由来するかを調べた。近縁種のPifホモログとの配列との比較から類似している部分を2箇所、類似していない部分を1箇所選び、それらの組換え体を調製し、活性を調べた。その結果、類似している2箇所の組換え体はいずれもアラゴナイトにより特異的に結合する可能性が示された。また、稜柱層における結晶格子の歪みが有機基質によることを示唆した。

ムラサキガイからPifと類似の基質タンパク質を得ることに成功した。これは、Pifタンパク質が真珠層を形成する種に置いて普遍性を持って機能していることを示唆した。また、殻皮という貝殻を覆っているキチンを主体とした膜組織に含まれる2種類のタンパク質をはじめ同定した。

サンゴ骨格の形成—サンゴの骨格は炭酸カルシウムのアラゴナイトで作られている。以前にわれわれはアザミサンゴの骨格から酸可溶性画分からgalaxinと名付けた基質タンパク質を同定したが、その機能は不明である。そこで、全長のほかに部分断片を含む組換え体を作製し、in vitroで炭酸カルシウム結合活性及びキチン結合活性を調べた。その結果、アラゴナイトとカルサイトの両方に結合すること、およびキチン結合能を有することが推定された。

魚類の鱗の石灰化—キンギョの鱗から石灰化に関与していると考えられる高度にリン酸化された基質タンパク質を単離した。このリン酸化修飾が石灰化の制御に重要であることを示した。免疫組織化学からこのタンパク質は骨芽細胞や破骨細胞とは異なる細胞で作られることがわかった。

有機基質の石灰化における役割と石灰化組織中の分布モデル—われわれはすでにバイオミネラリゼーションにおける有機基質の分布と役割についてより一般的なモデルを提出している。上述の代表的生物材料を用いた研究をもとにして、このモデルを検証した。その結果、可溶性有機基質の役割にACC形成を追加する必要があることがわかった。

## 5. 今後の計画

有機基質と無機鉱物(カルシウム塩)との相互作用の解明を主要課題にしてこれまでの研究を継続する。特に、石灰化における有機基質の役割を化学的、分子生物学的、鉱物結晶学的側面から解析し、石灰化を含めたより一般的なバイオミネラリゼーションの分子機構を明らかにしていきたい。この研究分野でブレークスルーとなる可能性のある円石藻における外来遺伝子導入法の確立、結晶多形の有機基質による制御(ACC安定化やアラゴナイト結晶誘導など)、サンゴにおける新たな有機基質の同定等に特に力点をおいて研究を進める。

## 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

T. Okumura, M. Suzuki, H. Nagasawa and T. Kogure (2012) Microstructural variation of biogenic calcite with intracrystalline organic macromolecules. *Cryst. Growth Des.*, 12, 224-230.

A. Sato, S. Nagasaka, K. Furihata, S. Nagata, I. Arai, K. Saruwatari, T. Kogure, S. Sakuda and H. Nagasawa (2011) Glycolytic intermediates induce amorphous calcium carbonate formation in crustaceans. *Nature Chem. Biol.*, 7, 197-199.

K. Saruwatari, N. Ozaki, S. Nagasaka and H. Nagasawa (2011) Morphological and crystallographic transformation from immature to mature coccoliths, *Pleurochrysis carterae*. *Mar. Biotechnol.*, 13, S 801-809.

N. Yokoo, M. Suzuki, K. Saruwatari, H. Aoki, K. Watanabe, H. Nagasawa and T. Kogure (2011) Microstructures of the larval shell of a pearl oyster, *Pinctada fucata*, investigated by FIB-TEM technique. *Amer. Mineral.*, 96, 1020-1027.

M. Suzuki, A. Iwashima, N. Tsutsui, T. Ohira, T. Kogure and H. Nagasawa (2011) Identification and characterization of a calcium-carbonate binding protein, blue mussel shell protein (BMSP), from the nacreous layer. *ChemBioChem.*, 12, 2478-2487.

H. Nagasawa (2011) The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization. In *Frontiers in Bioscience*, Ed. By E. Bonucci. Electric edition.

### 受賞

長澤寛道：平成23年度日本農学賞・読売農学賞(日本農学会・読売新聞社)

小暮敏博：Marion L. Chrystie M. Jackson Mid-Career Scientist Award(米国粘土鉱物学会)

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/seiyu/>