

砂をつくる生物「有孔虫」—pH, カルシウムイオンイメージングから迫る炭酸カルシウム殻形成

豊 福 高 志, 長 井 裕 季 子

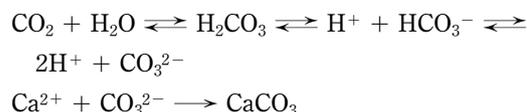
1 はじめに

生物が殻などの硬組織を構成するために自ら沈着する鉱物を「バイオミネラル」や「生体鉱物」、その沈着する過程を「バイオミネラリゼーション」「生体硬化作用」と呼ぶ。例えば、試験管の中でカルシウムイオンと炭酸イオンを無機的に反応させた場合、炭酸カルシウムの微細な粒子が沈殿する。バイオミネラリゼーションにおいては、生物が結晶の大きさや配置を制御することで無機的な鉱物材料に多様な機能や形態を持たせ、硬組織として利用している。バイオミネラルが持つ有用な機能性、形態の特徴について様々な角度から研究が進められているが、生物が反応場をどのように精密に制御しているのか、その素過程についての完全な理解には至っていない。筆者らは石灰質有孔虫を対象としてバイオミネラリゼーションの場となっている微小環境のpH, カルシウム(Ca)イオンを二次元イメージング手法を用いて可視化などを通じて、殻形成メカニズムを解明することを目指している。

親生物元素の地球表層物質循環においては生物が担う役割が大きい。地球表層の七割を占める海洋では、顕微鏡サイズの小さな生物がかかわる生物過程を理解することが重要である。石灰質有孔虫はそのような単細胞生物の一分類である。体長は一ミリ足らずで炭酸カルシウムの殻を持つ石灰化生物である。体サイズは小さいが数が莫大であるため、海洋のカルシウム・炭素循環に与える影響が大きい。例えば、外洋でプランクトン生活者である浮遊性有孔虫による炭酸カルシウムの生産量は年間10億トンを超える。これは外洋で生産される炭酸カルシウムの全体の25~50%程度にもものぼる¹⁾。このことから、有孔虫のバイオミネラリゼーションは、この莫大な炭素・カルシウムが海洋表層から中層、深層に輸送される際に通過する重要な生物過程となっており、地球表層物質循環の理解を深める上でも解明される必要があると考えている。

2 有孔虫のバイオミネラリゼーション

石灰質有孔虫などの生物が炭酸カルシウムの殻を分泌する時には、海水に溶存する二酸化炭素が水和して得られる炭酸イオンと、海水中のCaイオンの間で化学反応が生じている。これは下記のように表される。



炭酸、炭酸水素イオン、炭酸イオンの三者の間では化学平衡が成立している。この平衡はpHに支配されており、通常の海水ではおおむね9割が炭酸水素イオンによって占められている。アルカリ性に傾けば炭酸イオンの割合が増加し、酸性に傾けば炭酸、二酸化炭素の割合が増加する。この平衡関係が存在するため、生物は生物学的過程によってpHを制御するなどして、生息場の周囲の海水よりバイオミネラリゼーションに必要な炭酸イオンを得ていると考えられる。

ここで、石灰質有孔虫が殻形成する様子を紹介する。石灰質有孔虫は細胞の成長に伴って間欠的に殻を形成する(図1)。一回に形成される一つの部屋を房室(チャンバー)と呼ぶ。有孔虫は殻形成に際しほぼ相似形で少し大きいチャンバーを一定の角度で付加する成長様式を持つ。チャンバー形成の都度これを繰り返すために幾何学的な形態を呈す。また、その角度やチャンバーサイズの増加率などが種や属によって異なるために多様な形態を持つ。殻形成の部位において上記化学反応によって炭酸カルシウムがチャンバーの形に沈着される。チャンバーの形成過程を経時的に微分干涉顕微鏡(DIC)を用いて観察した例を示す。有孔虫のチャンバー形成は数時間から24時間程度の時間を要する。そのため動画や微速度撮影(タイムラプス撮影)し観察する方法が有効である。ここで紹介するのは*Ammonia*(アンモニア)という干潟などに生息する底生有孔虫で、現在4000種ほどの有孔虫の中で、もっとも飼育・観察が容易なものの一つである(図1A)。この個体は矢印の箇所チャンバーを形成中である。チャンバーが殻の中心部分まで連なっており、ぐるぐると渦を巻いているように見える。実はこの中心部分は細胞分裂や遊走子融合によって産まれてきた言わば赤ん坊のときのチャンバーである。チャンバーとチャンバーの間は口孔(アパーチャー)が存在し、チャンバー相互間を細胞質が行き来する。このような殻構造を持つため単細胞生物ではあるが、殻の中心と最もサイズが大きい最終チャンバーでは外界との距離が異なっている。別の個体でより倍率を高めて観察した像を図1Bから図1Dに示す。餌として与えている緑藻

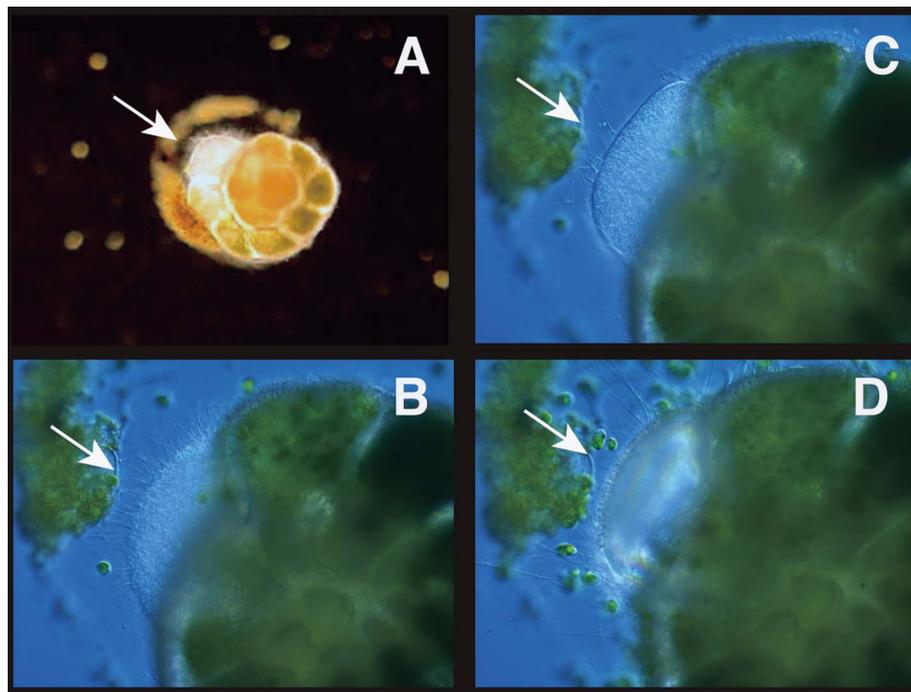


図1 有孔虫の殻形成の様子 矢印で示した部分が新しく形成しているチャンバー。
A. 殻形成中の有孔虫の全体像。**B.** 殻形成開始直後のチャンバー。**C.** 30分後のチャンバー。**D.** 6時間後のチャンバー。

の一種であるドナリエラの影響で細胞質が緑色を呈している。ドナリエラは飼育実験のために実験室で常に培養しているものを与えている。個体の周辺に小さな粒としてドナリエラの姿が捉えられていることがわかる。餌を与え、有孔虫の最終チャンバーの半分くらいまでが細胞質によって占められると新しいチャンバーを形成する傾向がある。それを判断基準として経過観察する個体に目星をつけることもある。大体は図1Aのように新しいチャンバーの形成箇所に細胞質が集まり、微小な毛のようなものが表面を覆うことで殻形成の開始を知り観察を開始することが多い。この毛のようなものは「仮足」と呼び、有孔虫が摂餌・移動のために細胞表面から突出させる運動性のある構造である。有孔虫は新たなチャンバー形成に際し、仮足でその新たなチャンバーの概形を構築し、その表面に有機物の膜を形成する。この膜をチャンバーの骨格として炭酸カルシウムを沈着させることで殻が形成されるのである。つまり、この膜が殻形成の鑄型の役割を果たしている。チャンバーの形態を形成する際には図1Bのように、長さの揃った仮足が密集して存在する。その後チャンバー形成から20~30分程度のうちには細胞質がチャンバーを形作るようにまとまって存在する。この時には石灰化の足場となる有機物の膜が形成され、膜の両面で初期の石灰化が始まっている(図1C)。その結果、完成した殻は有機膜を炭酸カルシウムの殻でサンドイッチしたような構造を持つ。炭酸カルシウムの殻と言っているが、実は有機物の膜構造を内部に挟み込んだ複合素材となっているのである。更に

20~30分程度たつと、膜の上にはっきりとした白い帯が見えるようになる。これは石灰化が進み炭酸カルシウムが光学顕微鏡レベルで観察できる厚みに増加したことを示している。その後も6~12時間に渡って石灰化が進み、殻の厚みが増していく。チャンバー形成が完了すると、密集していた仮足は見られなくなり、長さが不揃いな仮足が、新たに形成されたチャンバーのアーチャーから出てきて餌を探して移動を始める。この時点ではまだチャンバーの殻は柔らかく、誤って針などで触ったりすると凹んだり、穴が空くことがある。翌日以降には硬度が増してくることから、チャンバー形成が終わった後も石灰化は継続していると考えている²⁾。

3 顕微鏡下のpH、カルシウムイオンイメージング

石灰質有孔虫が殻形成するとき、材料であるカルシウムや炭素をどこから取り込んでいるかは基本的な疑問である。これらは海水や餌から得られていることが推測されるが、どのように挙動しているか、動きを探る方法は限られている。同位体ラベル実験が行われ一定の成果をあげたとはいえ、生きた有孔虫を対象としてイオンがどのように取り込まれ、その後石灰化の場に輸送されるかについては知る方法がなかった。図1に示すように、殻形成は数時間のうちにナノメートルからマイクロメートル程度のスケールで営まれる現象である。そのため、十分な時間的、空間的解像度を有する測定方法が必要となる。われわれはこの点を解決するために、蛍光

指示薬を用いた手法を顕微鏡観察に応用した。図2にチャンバー形成を行っている有孔虫に対して、ピラニン(8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid, HPTS)(Sigma-Aldrich, H1529)というpHによって蛍光特性が変化する試薬と、Rohd-3AM(Thermo-Fisher Scientific, R10145)というCaイオンの存在下で特異的に蛍光を発する試薬を取り込ませたときの観察例を示す。なぜpHを観察するのかというと、炭酸イオンを直接検出するための市販の蛍光プローブは存在しないが、前述の通り炭酸イオンの平衡状態はpHに支配されてその存在量が変わるため、pHを測定することが炭酸イオンや炭酸水素イオン、二酸化炭素の分布を推測する上で有効であると考えたからである。生きている底生有孔虫*Ammonia*を20 μM のピラニン・Rhod-3-AM海水溶液で一晩室温でインキュベートした³⁾。ピラニンは2波長励起1波長蛍光のpHを示す蛍光試薬である。410 nmの紫色光および470 nmの青色光で励起すると、緑色蛍光(535 nm)を有するが、pHが低いと410 nmの紫色光(λ_1^{ex})で励起したときに蛍光(λ_1^{em})が強くなり、pHが高いと470 nmの青色光(λ_2^{ex})で励起したと

きの蛍光(λ_2^{em})が強くなる性質を持つ。そのため同一視野で紫色光と青色光で励起し、それぞれの蛍光画像の比($\lambda_2^{\text{em}}/\lambda_1^{\text{em}}$)を得ることで、画像としてpH分布を捉えることができる。さらに、これを既知のpH標準液に対しても行い校正することで定量も可能である⁴⁾。電極での分析に比べるとpHの値に対する鋭敏さは劣るが、pHの二次元分布を画像として取得できる点が大きな魅力である。また、タイムラプス観察を行うことで時系列的な変化をとらえることが可能である。励起・蛍光波長がピラニンと干渉しないRohd-3(励起光550 nm; 蛍光600 nm)を選択することで、pHとCaイオンの同時観察が行える。図2においては、左から有孔虫の細胞の動きを見るためのDIC像、pH像そしてCaイオン像を、上から順に撮影開始時、3時間後、6時間後の様子を撮影している。DIC像では図1同様にチャンバー形成時の細胞の分布を示しており、まず新たに形成されるチャンバーの部位に細胞質が新しいチャンバーの形で塊状になっており、観察開始時(図2A)、3時間後(図2B)、6時間後(図2C)ではその形に沿って殻が石灰化していることがわかる。この時、pH像では部位によ

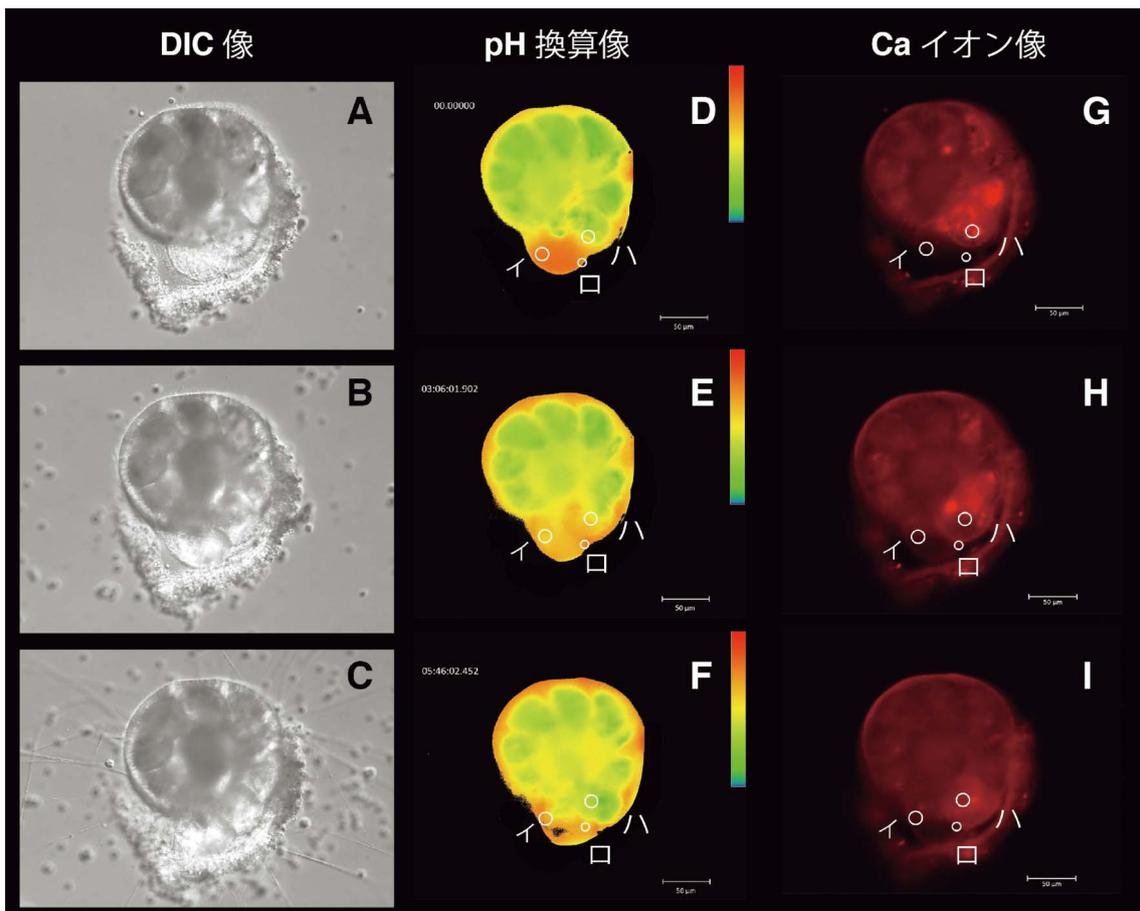


図2 殻形成中の有孔虫のDIC像と細胞内pH、カルシウムイオンの同時イメージング

図A-C: 有孔虫の殻形成の様子を示したDIC像。図D-F: 二波長の蛍光をレシオ換算しpHを算出した疑似カラーでのイメージング。図G-I: 局在するCaイオンの疑似カラー蛍光イメージング。A, D, G: 撮影開始時, B, E, H: 3時間後, C, F, I: 6時間後。白丸イ: 形成中のチャンバー。白丸口: 殻形成部位。白丸ハ: 形成中のチャンバーの一つ手前のチャンバー内の細胞質。

て色が異なる。赤は pH が高く、青は pH が低いことを示す。図 2D イ、ロを見ると撮影開始時において、他の細胞質部分と比べて新しいチャンバーが形成される部位において赤に近いオレンジ色を示し、すでに pH が上昇していることがわかる。pH を高めることで、炭酸水素イオンを炭酸イオンへと変化を促すため、炭酸カルシウムの合成に有利に働く。一つ前のチャンバーにおいては pH が他のチャンバーと同程度の色で示されていることから (図 2D ハ)、有孔虫は単細胞生物でありながら細胞中の pH 環境を局所的に制御可能であることを示唆する。更に時間が経過すると殻の周囲全体の pH が高まっていることがわかる。この *Ammonia* という有孔虫はチャンバーを形成する際には殻全体も覆うため、殻の周囲においても pH を高め、炭酸イオンを得ていると考えられる。Ca イオンについては、最初の段階では新しく形成される部位の一つ前のチャンバーに強いシグナルが見えるが (図 2G ハ)、これから形成されるチャンバーにおいて強いシグナルが見られない点は pH と違っている (図 2G イ、ロ)。3 時間後や 6 時間後にはある程度チャンバーも石灰化されているが、このときには Ca イオンのシグナルが殻を取り囲むような形でやや強くなる (図 2H イ、ロ)。有孔虫は鋳型となる有機膜の両方の面において石灰化が起きる。そのため、最初は Ca イオンは海水からチャンバー形成部にほぼ直接取り込むことが可能であるが、ある程度チャンバーが石灰化して殻の壁が形成されてからは、殻の内側には海水が直接面していないことになるため、あらかじめ細胞内にカルシウムを貯蔵したり、一旦海水から細胞にカルシウムを貯めてから殻形成場へと輸送している可能性が示唆される。以上の観察は蛍光試薬を細胞内に取り込ませたときの結果であるが、pH については海水中に試薬を存在させることで殻形成時の細胞外の海水中の pH 分布を観察することも可能である⁵⁾。海水中の pH は殻形成部位とは逆で、石灰化部位を中心として有孔虫周辺の pH が元の海水よりも 1 ユニット程度低下しており、これはすなわち水素イオン濃度では 10 倍程度多くなっていることを示している。また、水素イオンの分布を定量したところ、拡散によって形成が予想される pH 勾配とわずかに異なる分布を示したことから、水素イオンが海水中で消費されていることが推測された。おそらく、海水中の炭酸水素イオンが二酸化炭素に変化するために使われたと考える事ができる。以上の細胞内外の結果をあわせて考えると、この種類の有孔虫は殻形成部位から周囲の海水へ水素イオンを輸送することで、殻形成部位では pH を高め、細胞外では pH が低下する。殻形成部位では高められた pH によって二酸化炭素や炭酸水素イオンが炭酸イオンへと変わり石灰化が促進され、炭素源が減少することになる。細胞外では放出された水素イオンによって pH が低下した結果、炭酸水素イオンが二酸化炭

素に変えられる。細胞膜はリン脂質の二重膜で構成されているため、イオンチャネルやイオンポンプなどがなければ炭酸水素イオンは輸送されないが、二酸化炭素は無極性であるため細胞膜を通過し、盛んに二酸化炭素が消費されている殻形成部位へ濃度勾配に従って拡散される。殻形成部位では pH が高いため、二酸化炭素は炭酸水素イオンを経て、炭酸イオンへと変わり、別途輸送されてきた Ca イオンと化学反応を起こし、炭酸カルシウムとなる。このような石灰化モデルを構築するに至った。もちろん、拡散だけではなく、各種イオンチャネルやイオンポンプについても発現している可能性は大いに有り得ることであり、今後の検証が必要であるが、微小領域における pH 二次元分布の時系列的变化に着目したことによって、単細胞生物である有孔虫が極めて巧みな石灰化戦略を有する可能性を指摘するに至った。細胞外の pH の変化の動画を含めた実験の様子は Youtube でも公開している⁶⁾。

4 おわりに

今回紹介した pH、Ca イオンの二次元分布の時系列的観察手法は依然として改善が必要な部分は複数ある。たとえば、校正を含めた観察方法の標準化や対象となる溶液の厚みが測定結果に与える影響や、従来の電極を使った手法に比べ精度が犠牲になる点などが挙げられる。また、海水の Ca イオンなどは試薬の蛍光強度が飽和する濃度を遥かに超えている点なども今後の課題である。しかし、化学的な環境勾配を時系列的に追跡したいような場面では選択肢の一つとして数えておきたい。pH は様々な反応を支配する重要な指標であるため、潜在的に広範囲の研究分野への応用が見込まれると考えられる。すでに、無機炭酸塩鉱物において溶解過程へ適用することで成果が上がり始めているところである⁷⁾。今後も分析化学を始めとする他分野の研究者との協働を通じてより広い範囲への応用可能性を探るとともに、方法の単純化などを進めたいと考えている。

文 献

- 1) R. Schiebel: *Global Biogeochemical Cycles*, **16**, 3-1-3-21 (2002).
- 2) Y. Nagai, K. Uematsu, R. Wani, T. Toyofuku: *Frontiers in Marine Science*, **5**, 67 (2018).
- 3) F. Frontalini, M. T. Losada, T. Toyofuku, J. Tyszka, J. Goleń, L. J. de Nooijer, B. Canonico, E. Cesarini, Y. Nagai, U. Bickmeyer, T. Ikuta, R. Tsubaki, C. Besteiro Rodriguez, E. Al-Enezi, S. Papa, R. Coccioni, J. Bijma, J. M. Bernhard: *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, **124** 2823 (2019).
- 4) L. J. de Nooijer, T. Toyofuku, K. Oguri, H. Nomaki, H., H. Kitazato, H. Limnology and Oceanography: *Methods*, **6**, 610 (2008).
- 5) T. Toyofuku, M. Y. Matsuo, L. J. de Nooijer, Y. Nagai, S. Kawada, K. Fujita, G.J. Reichart, H. Nomaki, M. Tsuchiya,

H. Sakaguchi, H. Kitazato: *Nature Communications*, 8, 14145 (2017).

- 6) 有孔虫の炭酸カルシウム殻形成は水素イオン排出がカギ～海洋酸性化に対する予想外の耐性～, JAMSTEC, (2017), <https://youtu.be/PsZ12jccmo8>, (2020年, 9月7日, 最終確認).
- 7) J. Kawano, T. Toyofuku, K. Nishimura, A. Ueda, Y. Nagai, S. Kawada, H. Teng, T. Nagai: *Crystal Growth & Design*, 19, 4212 (2019).



豊福高志 (Takashi TOYOFUKU)

国立研究開発法人海洋研究開発機構超先鋭研究開発部門超先鋭技術開発プログラム (〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15)。東京海洋大学海洋環境科学部門 (〒108-8477 東京都港区港南 4-5-7)。静岡大学大学院理工学研究科博士後期課程環境科学専攻。博士(理学)。《現在の研究テーマ》バイオミネラリゼーションの解明。《趣味》食べ歩き。
E-mail: toyofuku@jamstec.go.jp



長井裕季子 (Yukiko NAGAI)

国立研究開発法人海洋研究開発機構超先鋭研究開発部門超先鋭技術開発プログラム (〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15)。国立科学博物館地学研究部 (〒305-0005 茨城県つくば市天久保 4-1-1)。横浜国立大学環境情報学府環境生命学専攻。博士(学術)。《現在の研究テーマ》有孔虫や珪藻などの超微細構造解析と細胞生物学の解析。《趣味》絵を書くこと。
E-mail: nagai.y@jamstec.go.jp

農薬成分及び金属成分分析用標準物質頒布のお知らせ

『農薬成分分析用土壌標準物質 (シマジン, デイルドリン) S-高濃度 (JSAC 0441), S-低濃度 (JSAC 0442)』

土壌中の残留農薬として, シマジンとデイルドリンの含有率, またシマジンについては溶出濃度を認証した土壌標準物質です。シマジンは土壌環境基準 (溶出濃度) が定められているものですが, デイルドリンは現在環境基準の項目にはない成分です。しかし, 今日もしばしばその残留が観測されているほど残留性が高いものであるため認証対象としました。認証値は JSAC 0441 ではシマジンの含有率は 92 ± 14 ng/g, 溶出濃度は 4.96 ± 0.36 μ g/L, デイルドリンの含有率は 76 ± 14 ng/g, また JSAC 0442 では, シマジンの含有率は 28.2 ± 5.0 ng/g, 溶出濃度は 1.33 ± 0.18 μ g/L, デイルドリンの含有率は 221 ± 24 ng/g です。頒布価格: 60 g 瓶入り 1 本につき本会団体会員のみ 52,500 円, その他は 78,750 円 (送料込み)。

『金属成分分析用土壌標準物質

添加 (JSAC 0401), 無添加 (JSAC 0411)』

褐色森林土及び火山灰土壌に含まれる Cd, Pb, Cr, As, Se, Be, Cu, Zn, Ni, Mn 及び V の 11 金属成分の含有率を認証した標準物質です。認証値は元素組成と溶出組成とに分けて示されています。JSAC 0401 は各成分を添加して調製したもので, 例えば Cd: 4 mg/kg のように各成分の含有率は比較的高く, JSAC 0411 は無添加の清浄な土壌で, 例えば Cd: 0.3 mg/kg のように各成分の

含有率は低くなっています。頒布価格: 50 g 瓶入り 1 本につき本会団体会員のみ 52,500 円, その他は 78,750 円 (送料込み)。

『無機成分分析用河川水標準物質

無添加 (JSAC 0301-1), 添加 (JSAC 0302)』

水質管理基準及び水道水質基準測定用の河川水標準物質です。基準項目の各元素を添加していないもの (無添加) と基準値の 1/10 程度の濃度となるように添加したもの (添加) との 2 本のセット (各 500 g) で頒布しています。Pb, Cr, Cd, Se, As, Cu, Fe, Mn, Zn, B, Al, Ni, Be, Ba, Mo, U (以上 μ g/L レベル), K, Na, Mg, Ca (以上 mg/L レベル) の 20 成分の含有率が認証されています。頒布価格: 「無添加」「添加」の 1 セットで本会団体会員のみ 52,500 円, その他は 78,750 円 (送料込み)。

*その他の標準物質につきましては下記申込先までお問合せください。

申込方法 希望標準物質名, 氏名 (会員の場合は会員番号), 所属, 電話番号, 送付先, 請求書宛名を明記の上, 下記にお申込下さい。なお, 価格は送料込みです。

申込先 〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2 五反田サンハイツ 305 号 日本分析化学会標準物質係 [電話: 03-3490-3351, FAX: 03-3490-3572, E-mail: shomu@jsac.or.jp]