

造礁サンゴ骨格形成における石灰化の分子機構

渡辺俊樹¹⁾

1. はじめに：造礁生物と石灰化

石灰化した硬組織を形成する生物は、原核生物、菌類、動植物を含めて多数存在するが、生物圏で最も大量の石灰化を行うのは熱帯・亜熱帯のサンゴ礁域に棲むいわゆる造礁生物であろう。造礁生物の代表的なものとしては、有孔虫、石灰藻、そして造礁サンゴがあげられる。これらの生物は人工的な飼育が難しく、分子レベルでの石灰化の機構の研究は殆ど未知のままである。それらの中ではサンゴの研究が比較的進んでいるので、本稿ではサンゴの石灰化の分子機構の研究について紹介することにする。

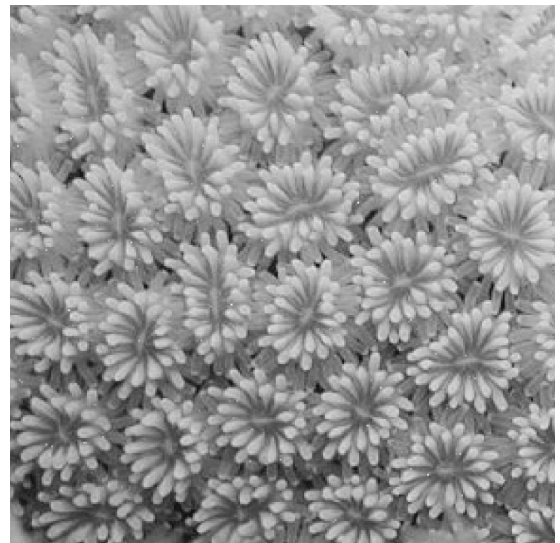
サンゴとは、石灰質または角質の骨格を持つ刺胞動物（イソギンチャク、ヒドロ虫などのなかま）の総称である。石灰質の骨格を造るサンゴのうち、熱帯・亜熱帯に棲息してサンゴ礁の形成に寄与するものを造礁サンゴと呼ぶ。造礁サンゴの大部分は、イソギンチャクと同じ花虫綱・六放サンゴ亜綱・イシサンゴ目に属し、その大部分は多数のポリプ（個虫とも呼ばれる）からなる群体性の生物である。

上にあげた造礁生物（サンゴ、有孔虫、石灰藻）に共通する特徴は、石灰化と光合成の両方を行うということである。石灰藻は植物であるから光合成を行うのは当然であるとして、動物であるサンゴや有孔虫はどのようにして光合成を行うのであろうか。実は、造礁サンゴやサンゴ礁域に棲む底生有孔虫の体内には、単細胞の微細藻類が共生している。造礁サンゴには、褐虫藻と呼ばれる渦鞭毛藻（*Symbiodinium* spp.）が共生している。有孔虫では渦鞭毛藻が共生するもの（ゼニシ）や珪藻が共生するもの（ホシズナ）など様々である。サンゴや有孔虫にとって、共生藻が光合成でつくった有機物は重要な栄養源になっている。さらに造礁サンゴの場合、下に述べるように褐虫

藻の光合成によって骨格での石灰化（炭酸カルシウム結晶の形成）が促進されることが知られている。

2. サンゴのからだの構造

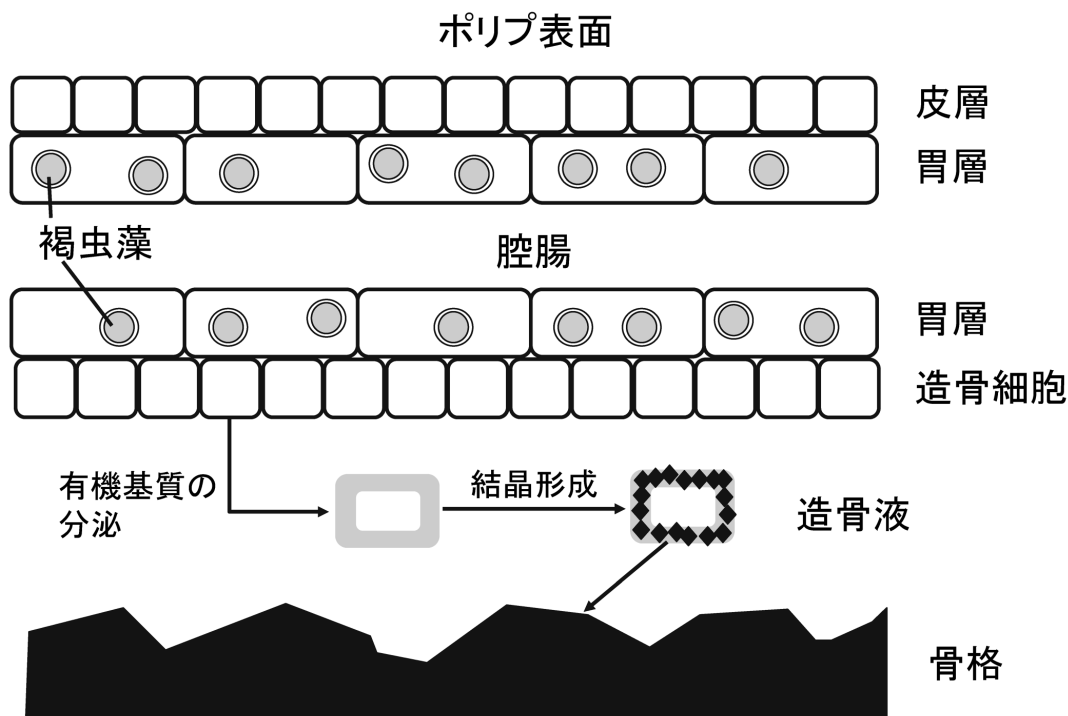
上に述べたように造礁サンゴの多くはイソギンチャクに近縁であり、サンゴの群体は多数のポリプ（個々のポリプが一匹のイソギンチャクに相当）が繋がりがあって出来ている（第1図）。ポリプはサンゴ群体の表面部分にのみ存在し、群体の内部は炭酸カルシウム（おもにあられ石）の骨格でできている。サンゴが捕食した餌は口を通して胃腔に入り消化され、その後胃腔から分岐した腔腸に入って体の各部へと送られる。



第1図 アザミサンゴ (*Galaxea fascicularis*) の群体の表面。多数のポリプからなっていることがわかる。個々のポリプの直径は数ミリ程度で、中央に口がある。

1) 東京大学 海洋研究所

キーワード：サンゴ、サンゴ礁、石灰化、光合成、共生、褐虫藻、有機基質、炭酸脱水酵素、タンパク質、cDNAクローニング



第2図 造礁サンゴのからだの構造と骨格形成の模式図.

刺胞動物の体制は単純であり、基本的に外胚葉と内胚葉の二層の細胞層からなっている(第2図)。内胚葉層は腔腸に面しており、胃層とも呼ばれる。外胚葉層には骨格に隣接するものと体の最外部を覆うものがあり、それぞれ造骨細胞および皮層とも呼ばれる。なお、褐虫藻は成体のサンゴでは内胚葉細胞内にも共生する。

造骨細胞と骨格の間にはcalicoblastic fluid (CF, ここでは造骨液と訳す)と呼ばれる液体が存在し、石灰化はここで起こる(第2図)。石灰化に必要な物質は、 Ca^{2+} 、 HCO_3^- および有機基質の3つである。 Ca^{2+} は腔腸から胃層および造骨細胞層を通してCFに輸送されと考えられる。 HCO_3^- がCF中に蓄積されるには、次の2つのルートが考えられる。(a)隣接する細胞または腔腸から HCO_3^- の形で輸送される。(b)CF中またはその近傍に炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase, 以下CAと略)が存在し、 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ の反応を触媒して HCO_3^- を生ずる。後述のように、CAを阻害する物質の存在下では石灰化が抑制されることから、(b)のルートがサンゴの石灰化に関与しているのは間違いない。有機基質という

は、造骨細胞からCFに分泌される有機分子(タンパク質、多糖、脂質など)が形成する細胞外基質で、 CaCO_3 結晶核の形成を促進する働きを持つと考えられている。

3. 共生藻の光合成と石灰化

上に述べたように、造礁サンゴでは内部共生する褐虫藻が光合成を行うと、骨格における石灰化が促進される。この興味深い関係についての手掛かりを最初につかんだのは、日本の川口四郎であった。川口らは1940年代という早い時期に、明下と暗下でサンゴを飼育して海水中の Ca^{2+} 濃度の変化を測定し、光照射下の方がサンゴへの Ca^{2+} の取り込みが早いことを示唆するデータを得た。その約15年後、T. F. Goreauは $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いて明下でサンゴ骨格での石灰化が促進されることを実証した。光が当たっていても、光合成阻害剤(DCMU)の存在下では石灰化が促進されないこともわかっている(Barnes and Chalker, 1990; 山里, 1991を参照)。

褐虫藻の光合成により石灰化が促進されるメカニ

ズムとしては、次のいくつかの可能性が考えられる(山里, 1991を参照)。

- i. 石灰化にはエネルギーが必要(例えば Ca^{2+} をCFに輸送するのにATPが必要)であり、褐虫藻が供給する栄養がその素となる。
- ii. 石灰化により CO_2 が産生される($\text{Ca}^{2+} + 2\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \uparrow$)が、褐虫藻の光合成により CO_2 が消費され、同反応が右向きに進みやすくなる。
- iii. 褐虫藻の光合成により、骨格有機基質などの石灰化を促進する物質が生産される。褐虫藻自身がこうした物質を合成する可能性と、何らかのシグナルが褐虫藻から宿主に送られた結果、サンゴがそうした物質を生産する可能性が考えられるであろう。
- iv. 光合成を行う褐虫藻が、石灰化を阻害する物質を除去する。阻害物質としてはリン酸塩などが考えられている。
- v. 後述するように、現在までに(i)の仮説を支持する実験結果が得られている。

4. サンゴ骨格有機基質の化学的分析とその問題点

脊椎動物、貝類、甲殻類などでは、骨格等の石灰化硬組織に隣接した細胞から多糖、脂質、タンパク質などの有機分子が分泌されて有機基質と呼ばれる細胞外基質を形成し、その中で石灰化が起こると考えられている(Mann, 2001; 長澤, 2005; 佐保, 2005)。上記の動物では酸性アミノ酸を多く含むタンパク質が有機基質中に見出されており、これらはヒドロキシアパタイトや炭酸カルシウム結晶の核形成を促進する働きがあると考えられている。また一部の貝類では、殻中の有機基質にCA活性を持つタンパク質が含まれており、 CaCO_3 結晶の形成に必要な HCO_3^- の形成を触媒すると考えられている。

電子顕微鏡を用いた観察により、サンゴでも造骨細胞が分泌する有機基質の中で微小な CaCO_3 結晶の形成が起こることが確認されている。ミドリイシの骨格形成を研究したIsa(1986)によると、造骨細胞層と骨小板の間には空隙があり、造骨細胞からそこに有機物からなる中空上の構造体が分泌される。これらの構造体は石灰化されて結晶体となり、それらが集

積して骨格が出来上がってゆくと考えられる(第2図)。

以上の観察から、有機基質に含まれる何らかの分子に CaCO_3 結晶核の形成を促進する働きがあると考えられ、有機基質の化学的分析によりそうした分子を同定することに関心が集まっている(Watanabe *et al.*, 2003)。しかしながら、造骨細胞から分泌されたばかりの有機基質を大量に集めることは技術的に極めて困難である。よって、微小な CaCO_3 結晶の形成が起こりつつある状態の有機基質ではなく、できあがった骨格中に含まれている有機分子の分析が通常行われている。

以下に述べるようにサンゴの骨格には、 CaCO_3 結晶の他に微量成分として多糖、脂質、タンパク質などが含まれている。これらは上に述べたように造骨細胞から分泌された有機基質の名残であると考えられているが、有機基質に含まれる高分子の一部は分解され、骨格の中に残らない可能性がある。骨格中の高分子の分析結果を見る際には、そうした可能性を心に留めておく必要がある。多くの造礁サンゴ種で骨格中の有機物の分析がなされているが、以下に述べるように種によって組成が大きく異なっている。こうした結果が、元々の有機基質の組成が種によって大きく異なるためなのか、それとも有機基質の組成には種による大きな差が無く、その後の一部成分の分解により異なる成分が残るためなのか、現在のところ不明である。

造礁サンゴの骨格から抽出された高分子には、脂質、多糖、タンパク質が含まれている。Isa and Okazaki(1987)は、ミドリイシの骨格に Ca^{2+} 結合能を有するリン脂質が含まれていることを見出し、これらが石灰化を促進する可能性を提唱した。

多糖としては、キチンとムコ多糖が造礁サンゴの骨格から検出されている(ただしキチンが検出されなかった種もある)。Cuif *et al.*(2003)はXANES mapping(X線吸収端構造解析)という手法を用いてキクメイシ科の二種のサンゴの骨格を分析し、石灰化中心にイオウが局在することを示した。このイオウはメチオンやシステインなどアミノ酸由来のものではなく、硫酸化ムコ多糖由来と考えられ、タンパク質よりも酸性多糖が石灰化にとって重要である可能性が示唆された。しかし、その後Puverel *et al.*(2005)がショウガサンゴおよびサオトメシコロサンゴの骨格中のムコ多糖およ

び硫酸化ムコ多糖の含有量を調べたところ、後者ではムコ多糖が少なく、特に硫酸化ムコ多糖の量は非常に少なかった。このことから、すべての造礁サンゴの石灰化において硫酸化多糖が重要であるかどうかは現在のところ不明である。またキクメイシの骨格でも、骨格形成過程ではタンパク質が石灰化中心に存在したが、その後分解されて多糖だけが残ったという可能性も現時点では排除できない。

タンパク質は、現在までに分析されたすべての造礁サンゴ種の骨格で検出されている。過去約40年の間に、多くのサンゴ種で骨格から抽出されたタンパク質のアミノ酸分析がなされており、一部の種でAsx（アミノ酸分析ではアスパラギン酸(Asp)とアスパラギン(Asn)を区別できないため両者をあわせてこう呼ぶ）の全アミノ酸中に占める割合が非常に高い（一部の種では約60%にのぼる）ことが特徴的である。これらの結果から、サンゴにも脊椎動物や軟体動物同様に酸性アミノ酸（特にAsp）に富むタンパク質が存在すると予想されてきた。しかし全ての種でAsx含有率が高い訳ではなく、10%程度と低い種もあることから、酸性領域を持つタンパク質の存在は一部のサンゴに限られるかも知れない。

タンパク質のアミノ酸配列がわかると、そのタンパク質がどういう機能を持つかを推定出来る場合がある。現在までに3種の造礁サンゴのタンパク質でアミノ酸配列の解析が行われているが、機能に関する手掛かりが得られているものは1つだけ（後述するショウガサンゴのタンパク質）である。3つのタンパク質のうち全一次構造が明らかになっているのはアザミサンゴのgalaxinというタンパク質だけである(Fukuda *et al.*, 2003)。galaxinは298アミノ酸からなるタンパク質であるが、既知のタンパク質のアミノ酸配列との類似性は見られず、現在のところその機能は不明である。galaxinを構成するアミノ酸のうち最も多く含まれていたのはシステイン(Cys)であり、Asxの含有率は低く、AspとAsnをあわせて約10%であった。galaxinのCa²⁺結合能は検出されておらず、現在のところ石灰化に関与する分子ではなく、有機基質の枠組みの構築に関わる分子であると考えられている。

galaxin以外に、部分アミノ酸配列が明らかになっている造礁サンゴの骨格タンパク質は2つある(サオトメシコロサンゴの47kDaタンパク質およびショウガサンゴの55kDaタンパク質、Puverel *et al.*, 2005)。と

もに既知の配列との相同性は見られていないが、後者のタンパク質にはAspが36残基連続した配列が見つかっており、こうした酸性領域が炭酸カルシウム結晶核の形成を促進する可能性が高い。また、造礁サンゴではないがイシサンゴ目のサンゴであるイボヤギの骨格タンパク質の分析も行われており、可溶性画分中に最も多く含まれる46kDaタンパク質の部分配列がCAに類似していることが分かっている(Watanabe *et al.*, 2003)。

以上のことを総合すると、造礁サンゴの骨格有機基質に含まれる分子のうち、CaCO₃結晶形成の初期過程の促進を行っている可能性のある高分子は、現時点ではリン脂質、酸性多糖、および酸性領域を持つタンパク質の3つである。これらは、Ca²⁺を静電的に誘引して局所的にCa²⁺濃度の高い場を生み出すことによってCaCO₃結晶核の形成を促進すると予想される。

5. Al-Horaniらによる生理学的実験

サンゴの石灰化については、上に述べたような骨格に含まれる高分子の研究だけでなく、生理学的な研究もなされている。それらのうち、近年Al-Horani *et al.* (2003, 2005)がアザミサンゴを用いて行った研究は重要な知見を含んでいるので、以下に簡単に紹介する。

彼らはマイクロセンサーを用いて、ポリブ表面、腔腸内および造骨液内の3カ所(第2図参照)におけるCa²⁺濃度を測定した。暗下においたサンゴに光を当てると、ポリブ表面および腔腸内のCa²⁺濃度は減少し、かわりに造骨液内のCa²⁺濃度が上昇した。このCa²⁺濃度の上昇は、ruthenium redというCa-ATPase(ATPをADPに分解する時に生ずるエネルギーを使ってCa²⁺を輸送する生体膜上のタンパク質)の阻害剤により抑制されたことから、Ca-ATPaseの行うCa²⁺輸送の増加によって起こると考えられる。

光が当たるとCa-ATPaseの行うCa²⁺輸送が増加する理由としては、光照射下でCa²⁺輸送のためのエネルギー源であるATPの生産が増加することが考えられる(彼らはアザミサンゴ組織中のATP量を明暗下で比較し、実際に明下で約35%増加することを示している)。サンゴに光が当たると、褐虫藻の光合成によって宿主への栄養の供給が起り、サンゴ細胞の呼

吸が活発となりミトコンドリアでの酸化的リン酸化によるATPの生産が増加するという訳である。DCMUという物質を使って褐虫藻の光合成を阻害すると、光による造骨液中の Ca^{2+} 濃度の増加は抑えられることも実際に示されており、上の仮説を裏付けている

Al-Horani *et al.* (2005) はまた、呼吸およびCAの阻害剤の添加による骨格への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ および ^{14}C 取り込みの変化を調べている。なお、 ^{14}C の骨格への取り込みはブドウ糖および HCO_3^- を標識した時の両方で起こり、骨格中における CaCO_3 の炭素の由来は単一でないことが分かっている。NaCNおよびacetazolamide (それぞれ呼吸およびCAの阻害剤)の存在下では、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ および ^{14}C の両方の骨格への取り込みが減少しており、細胞呼吸とCAの量が石灰化の律速段階となっていることを示唆している。

6. 造礁サンゴを対象とした分子レベルでの研究の問題点と今後の展望

本稿の始めにあげた主要な造礁生物のうち、石灰化のメカニズムの研究が最も進んでいるのは造礁サンゴ類である。しかし以下に述べるように、脊椎動物や軟体動物などのより高等な動物に比べると、サンゴの研究は大きく立ち遅れている。

上述のように、造礁サンゴの骨格における石灰化の調節機構に関しては、有機基質に含まれる高分子の解析と、褐虫藻の光合成が石灰化におよぼす影響の2つが主に調べられてきた。その結果、リン脂質や酸性多糖の他に、酸性タンパク質、CA、Ca-ATPaseなどのタンパク質が石灰化の調節に関わっていることが示唆された。こうしたタンパク質の姿をはっきりとらえるためには、cDNAクローニング(それらのタンパク質をコードするmRNAに相補的な配列を持つDNAをクローン化すること)という方法を用いるのが近道である。cDNAクローニングを行うことにより、タンパク質の全一次構造が明らかとなり、タンパク質の機能や生化学的性質に関する情報を得ることができる。また、タンパク質やmRNAが生体内のどの場所にどのくらい存在するかを調べ、さらにどういった条件下でそれらの量が変化するかを調べることもできる。

タンパク質のcDNAクローニングを行うには、(1) 先ずそれらのタンパク質を単離し、(2) 次にそのタンパ

ク質の部分アミノ酸配列を得、(3) さらにその情報を元に逆転写PCRという操作を行う、という流れが一般的である。造礁サンゴの場合、1および2の過程は高等動物に比べてそれほど困難ではない。しかし、3の部分でつまづくケースが多く、cDNAクローニングが失敗に終わることがしばしばである。しかしながら、今後造礁サンゴのゲノム情報(ゲノムDNAまたはcDNAの配列データ)が完備してくれば、逆転写PCRを行う必要がなくなり、こうした困難はだんだん減少すると予想される。

筆者の研究室ではミドリイシの稚サンゴを対象に小規模なcDNA配列のデータ収集を行っているが、現在までに得られた数百程度のcDNA配列の中に、骨格形成に関係のありそうなもの(3種のCAとgalaxin相同タンパク質)が含まれている。今後さらにこうしたデータ収集が進めば、さらに多くの石灰化関連タンパク質を同定することも可能になると思われる。また、共生藻の有無により発現が変化するサンゴmRNAの同定も行っており、硫酸イオントランスポーターの発現が共生藻の存在により上昇するという知見を得ている。このタンパク質に対する抗体を作成し、免疫染色によりこの硫酸イオントランスポーターがサンゴ体内のどこに存在するかを調べてみたところ、腔腸と骨格の間に存在する細胞層(胃層および造骨細胞)で強い発現が見られた(湯山・渡辺, 未発表データ)。この結果から、この硫酸トランスポーターは、腔腸を循環する体液(海水および消化された食物を含む)から細胞への硫酸イオンの取り込みに関与していると考えられた。こうした細胞は骨格付近に存在していたことから、取り込まれた硫酸イオンをもとに硫酸化ムコ多糖などの高分子を合成し、骨格形成部位に分泌している可能性が考えられる。こうした分子を詳しく研究することにより、光合成と石灰化の関係について今後新しい知見が得られるのではないかと考えている。

造礁生物における石灰化の研究は、脊椎動物等と比べると現時点では大きく立ち遅れている。しかし、造礁サンゴなどにおける光合成と石灰化との関連という問題は、より高等な動物には見られないユニークなものであり、海洋における炭素循環の問題にも関わってくるものである。今後、多くの研究者がこの分野に参入し、研究がますます進展することを願いつつ筆を置く。

引用文献

- Al-Horani, F.A., Al-Moghrabi, S.M. and De Beer, D. (2003) : The mechanism of calcification and its relation to photosynthesis and respiration in the scleractinian coral, *Galaxea fascicularis*. *Mar. Biol.*, 142, 419-426.
- Al-Horani, F.A., Al-Rousan, S.A., Manasrah, R.S. and Rasheed, M.Y. (2005) : Coral calcification: Use of radioactive isotopes and metabolic inhibitors to study the interactions with photosynthesis and respiration, *Chemistry and Ecology*, 21, 325-335.
- Barnes, D.J. and Chalker, B.E. (1990) : Calcification and photosynthesis in reef-building corals and algae. In: Dubinsky, Z. (Ed.), *Coral Reefs*, Elsevier, Amsterdam, 109-131.
- Cuif, J.-P., Dauphin, Y., Doucet, J., Salome, M. and Susini, J. (2003) : XANES mapping of organic sulfate in three scleractinian coral skeletons, *Geophimica et Cosmochimica Acta*, 67, 75-83.
- Fukuda, I., Ooki, S., Fujita, T., Murayama, E., Nagasawa, H., Isa, Y. and Watanabe, T. (2003) : Molecular cloning of a cDNA encoding a soluble protein in the coral exoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304, 11-17.
- Isa, Y. (1986) : An electron microscope study on the mineralization of the skeleton of the staghorn coral, *Acropora hebes*. *Mar. Biol.*, 93, 91-101.
- Isa, Y. and Okazaki, M. (1987) : Some observations on the Ca^{2+} -binding phospholipid from scleractinian coral skeletons, *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B, 507-512.
- Mann, S. (2001) : *Biom mineralization. Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, Oxford, 198p.
- 長澤寛道 (2005) : バイオミネラリゼーションにおける基質高分子化合物の関与, 竹井祥朗 (編) 海洋生物の機能: 生命は海にどう適応しているか, 東海大学出版会, 298-311.
- Puverel, S., Tambutte, E., Pereira-Mouries, L., Zoccola, D., Allemand, D. and Tambutte, S. (2005) : Soluble organic matrix of two Scleractinian corals: Partial and comparative analysis, *Comp. Biochem. Physiol.*, 141B, 480-487.
- 佐俣哲朗 (2005) : 軟体動物外骨格における石灰化機構, 竹井祥朗 (編) 海洋生物の機能: 生命は海にどう適応しているか, 東海大学出版会, 357-373.
- Watanabe, T., Fukuda, I., China, K. and Isa, Y. (2003) : Molecular analyses of protein components of the organic matrix in the exoskeleton of two scleractinian coral species, *Comp. Biochem. Physiol.*, 136B, 767-774.
- 山里 清 (1991) : サンゴの生物学, 東京大学出版会, 57-62.

WATANABE Toshiki (2007) : Molecular mechanisms of calcification in the skeletogenesis of reef-building corals.

< 受付 : 2006年12月22日 >