バイオミネラリゼーションを制御する有機基質の構造と機能に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科　鈴　木　道　生

はじめに

生物が金属などの無機元素を濃集し，固体として沈着させる現象をバイオミネラリゼーションと呼ぶ．バイオミネラリゼーションは単細胞生物から植物，動物に至るまで，あらゆる生物に見られる普遍的な現象である．その中で，地球上で最もバイオマスが多いバイオミネラルは，炭酸カルシウムである．カルシウムイオンは海水中に大量に存在し，炭酸イオンと強く静電相互作用して容易に沈殿物を作るので，沈殿物である炭酸カルシウムは生体において，外敵からの防御のための硬組織，重力の感知，ミネラルの貯蔵など様々な用途に用いられている．炭酸カルシウム形成の化学反応は，カルシウムイオンと炭酸イオンの結合という単なる静電相互作用であり，共有結合とは異なり電子のやり取りも生じない非常に単純なものである（図1A）．実際には，この一つの炭酸カルシウム分子から分子同士が重合していき，高分子の炭酸カルシウム結晶へと成長していく．炭酸カルシウム分子から炭酸カルシウム結晶への結晶成長において，どのような原子配置のものが，どのような条件で形成され，どのような形態や方位になるということは鉱物結晶学の分野で大変よく研究されており，一見すると新たに研究する余地は何もないかと思われる．しかし，バイオミネラルにおける結晶成長では，鉱物結晶学でよく研究されている低過飽和条件で無機的な環境での古典的な結晶成長モデルと全く異なり，高過飽和条件で多くの有機分子が共存する環境で反応が進行する．このような非古典的な結晶成長において合成されたバイオミネラルは，古典的な条件では形成されないような特異的な方位，形態，多形，欠陥密度，結晶子サイズなどを示すことが多く，これらがどのように制御されて形成されるのか多くのことが全く未解明である．このようなバイオミネラリゼーションの反応において，有機分子がどのような役割を果たすのか明らかにすることを目標に取り組んできた研究のいくつかを紹介する．

1.　アコヤガイ貝殻の有機基質の研究

真珠の養殖技術は日本発祥であり，1900年前後に世界で初めてアコヤガイを用いて確立されたため，真珠の研究は日本が最も盛んである．アコヤガイ貝殻は炭酸カルシウムと有機物から構成されるが，貝殻の内側の真珠層，外側の稜柱層，蝶番部の靭帯と複数の石灰化された微細構造から成り立っている．

1-1.　真珠層形成に関与する新規基質タンパク質

真珠は貝殻の内層に存在する真珠層と同じ微細構造を有している．真珠層の微細構造は，キチンとタンパク質を含有する有機薄膜に挟まれた，厚さが300–400 nm程度の扁平状の炭酸カルシウム結晶が積層した構造である（図1B）．このような微細構造に光が入射すると，光の干渉作用により特定の光が強め合ったり，弱め合ったりすることで虹色の真珠光沢が見えるのである．また，炭酸カルシウム結晶にはいくつかの結晶多形が

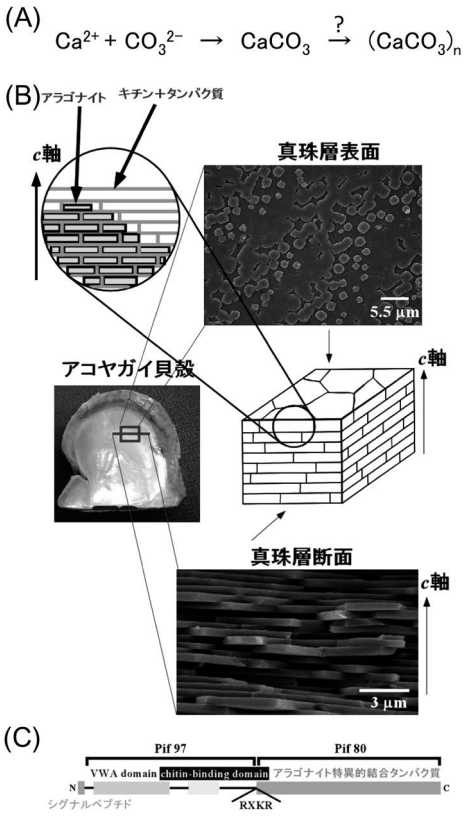

図1.　(A) 炭酸カルシウムの沈着反応
(B) 真珠層の微細構造模式図
(C) Pif の構造模式図

存在し，最安定なのがカルサイト，準安定なのがアラゴナイト，不安定なのがヴァテライトである．真珠層は準安定なアラゴナイトでできており，準安定なアラゴナイトを扁平状に配置させるようなメカニズムは不明であった．そこで合成した炭酸カルシウムのカルサイトとアラゴナイトに対し結合実験を行うことで，真珠層の抽出液からアラゴナイトに特異的に結合するタンパク質成分を見出した．このタンパク質は既知のものとは相同性を持たない新規のタンパク質であることが判明したため，Pif と命名した．Pif は前半に VWA ドメインとキチン結合ドメインを有し，後半のアラゴナイト結合部位に解離性のアミノ酸を合計で60%も含む配列を有していた．これまでの先行研究から，酸性のアミノ酸が重合したタンパク質成分が非古典的な炭酸カルシウムの結晶成長に重要であると提唱されていたが，実際に真珠層から酸性のアミノ酸が多く含まれるタンパク質を同定したのは本成果が初めてであった．また，RNAi によるノックダウン実験や Pif タンパク質を用いた *in vitro* での炭酸カルシウム結晶形成実験の結果から，Pif は真珠層の有機薄膜を形成しアラゴナイトの成長方向を制御して扁平状の形態を作り出す役割があることが示唆された．

1–2. その他の貝殻構造の基質タンパク質に関する研究

アコヤガイの貝殻外層には太さが30–60 μm程度の柱状のカルサイトが厚い有機膜に覆われたハチの巣状の構造を有している．この有機膜にも新規のタンパク質prismalin-14が含まれることを明らかにした．Prismalin-14はキチンと炭酸カルシウムを仲介しバイオミネラルの構造を強固にする役割を持つことが示唆された．また，稜柱層内のカルサイト結晶に含まれる有機物ナノファイバーの形成にキチン分解酵素が働くことを示した．キチン分解酵素が高密度に存在するとキチンの水素結合による凝集を阻害し，分散化することで，有機物ナノファイバーがカルサイト結晶に多数入り込み，カルサイト内に高密度の欠陥を生じさせ，劈開を防ぐことで貝殻の強度を増している可能性を示した．

アコヤガイは二枚貝であるため蝶番部に靭帯と呼ばれる繊維状の構造を持つ組織が存在する．特に50–100 nm程度の非常に細い繊維状のアラゴナイトファイバーが圧力に強い構造を作り出すと考えられている．靭帯のアラゴナイトファイバーの内部から新規の酸性ペプチドであるLICPを見出した．LICPは10アミノ酸から成り，特にアラゴナイト結晶の*c*軸の成長を抑制することで，細いアラゴナイトの形態を維持していると考えられた．さらに靭帯のアラゴナイトファイバーの外側に存在する有機膜からはMMP（matrix metalloproteinase）の阻害剤であるTIMP（tissue inhibitor of metalloproteinase）が存在することが示された．ノックダウン実験および*in vitro*での炭酸カルシウム結晶形成実験の結果から，MMPとTIMPの働きにより，アラゴナイトファイバー間の有機膜の繊維形成が調整される可能性が示された．

2. その他のバイオミネラリゼーションに関与する有機分子に関する研究

特殊な貝類としてスケーリーフットと呼ばれる鉄の鱗を貝殻および足に付加する生物が知られている（図2A）．特に黄鉄鉱（FeS2）のナノ粒子を作ることから，鉄鉱物をナノ化する有機分子を体内に含むことが示唆されていた．黄鉄鉱ナノ粒子は性能が高く安価で環境に優しいことから，太陽光発電や蓄電池の材料として期待されている．スケーリーフットから黄鉄鉱のナノ粒子を含む成分を抽出したところ，特定の有機分子が含まれることを見出した．その有機分子を用いて*in vitro*の系で黄鉄鉱ナノ粒子を合成したところ，非常に粒径の揃った安定性のある黄鉄鉱ナノ粒子を合成することに成功した．

上記のように金属ナノ粒子は様々な分野で応用されており，金属ナノ粒子のサイズ，形態，化学形態などを制御し，機能性のナノ粒子を安価に安全に合成する手法の開発が求められている．そこで生物の持つ潜在的なバイオミネラリゼーション反応機構を利用して，環境負荷の小さい新たな手法を見出すことを試みている．乳酸菌を用いて金ナノ粒子を効率的に合成できる手法を確立し，金酸イオンの還元と金の分散化に重要な因子として糖脂質（DGDG, diglycosyldiacylglycerol）を見出した（図2B）．DGDGの持つ不飽和脂肪酸のアリル位からラジカルが生成され，金イオン(III)に1電子を供与し，金イオン(II)が生成される．金イオン(II)は不安定であることから，不均化反応により金イオン(III)と金イオン(I)が生成される．金イオン(I)が同様に還元されることで金が生成すると考えられる．生成された金はラジカル重合したDGDGが分散剤となって表面に結合することで，分散化しナノ粒子となるというメカニズムが示唆された．これまでも微生物を用いて金属ナノ粒子を合成したという報告は数多いが，具体的に反応に関与する分子を明らかにした研究は少なく，乳酸菌では本研究が初めての報告である．

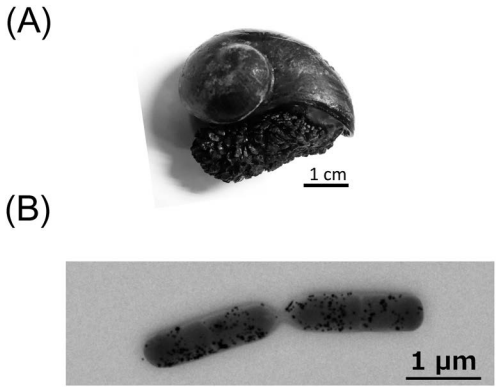

図2. (A) スケーリーフットの貝殻および鱗
(B) 乳酸菌により合成した金ナノ粒子

おわりに

これまでの自身の研究においてもバイオミネラリゼーションに関する有機分子は，新規なもの，報告の無い未知の反応ばかりであり，手掛かりが少なく研究の進め方に苦労する一方で，誰も知らない人類未踏の領域を探検しているような気分が味わえる．いつかこの人類未踏の領域で宝を掘り当て，人類社会の発展に貢献できるような成果が出ることを期待している．

謝　辞　本研究は主に東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻，東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻およびワイツマン科学研究所（イスラエル）において実施されたものです．特に東京大学名誉教授である長澤寛道先生には，学生の頃より多くのご指導，ご支援を賜りました．心より御礼申し上げます．東京大学大学院理学系研究科教授である小暮敏博先生には鉱物学を基礎から教えて頂き，多くの勉強をさせて頂きました．ワイツマン科学研究所教授であるStephen Weiner先生とLia Addadi先生にはバイオミネラリゼーションの神髄とも言える幅広い知識をご教授頂きました．東京大学大学院農学生命科学研究科准教授（現帝京大学教授）である作田庄平先生には研究を継続する機会を与えて頂いたのみならず，多くのご助言と温かい励ましを頂戴しました．東京大学名誉教授（現放送大学教授）である吉村悦郎先生には分析化学，無機化学的視点から研究を進めるための指導を頂きました．先生方との出会いが一つでも欠けておりましたら，現在の自分は無かったと確信しており，ご指導頂いたことに深く感謝申し上げます．また，本研究は尾崎紀昭博士，村山英未博士，井上宏隆博士，猿渡和子博士，木村麻里子氏，鈴木愛氏，奥村大河博士，中山誠志氏，三木匠氏，米澤舞氏，近都浩之博士，菊池郁也氏，松浦晃宙氏，松田大輝氏，加藤由悟氏，窪田一輝氏，山下達也氏をはじめ，ここに書ききれない多くの共同研究者ならびに研究室のメンバー，卒業生の皆さまのご協力によって成り立っています．この場を借りて厚く御礼申し上げます．最後に，本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関東支部長・浅見忠男先生（東京大学大学院農学生命科学研究科教授）に厚く御礼申し上げます．