

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：82706

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07490

研究課題名(和文) 深海の巻貝スケーリーフットはどのように鱗の硫化鉄層を形成するか？

研究課題名(英文) How does scaly-foot gastropod form iron sulfide layer on its scale?

研究代表者

岡田 賢 (OKADA, Satoshi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・研究員

研究者番号：90780916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：深海の巻貝であるスケーリーフットは、その体表に鱗を持ち、鱗の内外に硫化鉄ナノ粒子を保持するという特異的な生物である。その生息する熱水噴出孔の熱水組成により硫化鉄の有無が異なるが、この硫化鉄の結晶化メカニズムについて、鱗内外および殻の電子顕微鏡観察から推察を行なった。また、硫化鉄を含むスケーリーフットが生息する環境に硫化鉄を含まないスケーリーフットから得られた殻および鱗を放置し回収した試料と比較検討することで、硫化鉄は熱水により作られたナノ粒子の拡散あるいは表面に付着した微生物の鉱化作用ではなく、スケーリーフットが体内で自発的に生成したものであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Scaly-foot gastropod, *Chrysomallon squamiferum*, is a deep-sea snail living on hydrothermal vent that possesses scales with iron sulfide nanoparticles. The appearance of iron sulfide nanoparticles depends on the composition of hydrothermal fluids, namely “black scaly-foot” with iron sulfide nanoparticles, and “white scaly-foot” without iron sulfide. The mechanism of biomineralization remained as a question and was explored based on electron microscopic observation of cross section of scale and shell. In addition, the white scaly-foot sample left on the habitat of black scaly-foot was also investigated. It was revealed that the iron sulfide nanoparticle was synthesized biologically within the scale, not by adsorption of hydrothermally synthesized nanoparticles nor by adsorbed bacteria.

研究分野：物理有機化学

キーワード：スケーリーフット バイオミネラリゼーション 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

黄鉄鉱 (FeS_2) に代表される金属カルコゲナイドは、地殻中に豊富に存在する安価な半導体材料として、太陽電池などへの応用が期待されている物質である。金属カルコゲナイドを産業的に応用するにあたっての課題として、粒径の微小化や形状制御といった物性に直結する課題と共に、安価かつ大量に生産するためのプロセス上の課題も存在する。現在、金属カルコゲナイドを実験室で無機的に合成するには数百度の高温が必要とされるためにエネルギーコストおよび環境負荷がかかる。常温付近での合成が可能となればコストダウンおよび大量生産への道が開かれる。

自然界を見渡すと、硫化鉄ナノ粒子を体内に保持するという特異的な生物が存在する。インド洋の深海約 2500m に存在する天然の温泉 (熱水噴出孔) 周辺に生息する巻貝スケーリーフット *Chrysomallon squamiferum* は、貝類で唯一鱗を持ち、その鱗の表面および内部に硫化鉄ナノ粒子を保持するという特異な生物である。スケーリーフットが生息する環境は、約 300°C 程度の熱水と約 2°C の海水に挟まれた、水温が常温程度の領域に生息する。すなわち、スケーリーフットが保持する硫化鉄ナノ粒子は、常温に近い温度帯で生成されたものであると考えられる。そのため、スケーリーフットが硫化鉄ナノ粒子を鱗内部に獲得するバイオミネラリゼーション機構を理解し模倣することができれば、硫化鉄ナノ粒子の低温合成への応用が可能になると考えられる。

さらに興味深いことに、スケーリーフットが生息する熱水噴出孔によっては、硫化鉄ナノ粒子を保持しないものも存在することが明らかとなっている。これは、湧出する熱水に含まれる鉄イオンの濃度差に起因すると考えられている。ゆえに、スケーリーフット鱗の内部構造を生息熱水噴出孔間で比較検討することで、バイオミネラリゼーション機構を明らかにすることができると考えられる。

スケーリーフットのバイオミネラリゼーション機構がこれまで明らかになってこなかった理由には、3週間以上の地上での飼育ができないため、硫化鉄ナノ粒子の結晶成長過程を追跡できなかつたことが挙げられる。そのため、現在に至るまで以下の3種類の仮説が提唱されているが、いずれの説も確からしいと保証するに足るデータが得られていなかった。(1) 鱗に含まれるタンパク質であるコンキオリンに含硫アミノ酸が豊富に含まれるため、スケーリーフットが生物学的に合成したという仮説。(2) 熱水噴出孔が熱水と共に黒色粒子を放出していることから、熱水により自発的に生成された硫化鉄ナノ粒子が鱗表面に吸着し、後に内部へと拡散したという仮説。(3) 鱗表面に硫酸還元菌等の微生物が多く見られることから、微生物

によりナノ粒子が合成されたという仮説。各説の説得力が乏しいのは、いずれの仮説もナノ構造と結びつけた説明が不十分であったからである。

2. 研究の目的

スケーリーフットのバイオミネラリゼーション機構を、複数生息域から採取された試料の鱗・殻断面構造および元素組成の電子顕微鏡により詳細に解析し、従来から提唱されている仮説と照らし合わせることで、硫化鉄ナノ粒子の形成要因を明らかにすることを第一の目的とした。その上で、ポリマー等を用いてバイオミネラリゼーション機構を模倣した系を構築することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

海洋研究開発機構の調査航海から得られ、同機構に保管されているスケーリーフットの内、インド洋かいいいフィールド由来 (黒色試料, 硫化鉄を含む, エタノール脱水試料), ソリティアフィールド由来 (白色試料, 硫化鉄を含まない, 冷凍およびエタノール脱水試料試料) の鱗および殻をそれぞれ走査電子顕微鏡 (SEM) により表面形状観察し、またエポキシ樹脂包埋後マイクロトームにより、あるいは徳安方に従い薄片化し、走査透過電子顕微鏡 (STEM) および透過電子顕微鏡 (TEM) による形態観察、エネルギー分散型 X 線分光 (EDS) による組成分析を行なった。また、ソリティアフィールド由来のスケーリーフットの殻および鱗をかいいいフィールドに2週間放置した試料 (黒化試料) についても同様の分析を行なった。

4. 研究成果

黒色スケーリーフットの鱗断面構造からは、表面から 7 μm 程度の範囲では 1 μm 程度の粗大粒子が、より内部では 10nm 程度の球状硫化鉄粒子が凝集した 150-300nm の構造と、50nm 程度のロッド状硫化鉄粒子が凝集した構造がそれぞれ確認され、凝集粒子は層状構造を形成していた (図 1 a, b)。一方、黒化試料の殻断面構造では、全長 1-3 μm 程度の微生物と共に、400nm 程度の板状硫化鉄が凝集した 0.5-2 μm 程度の構造が見られた (図 1 c, d)。凝集していない板状硫化鉄が微生物表面に確認されることから黒化試料で見られる板状硫化鉄は硫酸還元菌と推定される微生物により生じた硫黄が熱水中の鉄と反応して生じたものであると推定された。また、黒化試料表面には 0.2-1 μm 程度の角ばった硫化鉄結晶も存在しており、これは熱水中で合成された硫化鉄微結晶が堆積したものと考えられるが、この構造も黒色スケーリーフット断面で観察されたナノ構造と異なる。以上の観察結果は、仮説 (2) (3) を否定するものである。

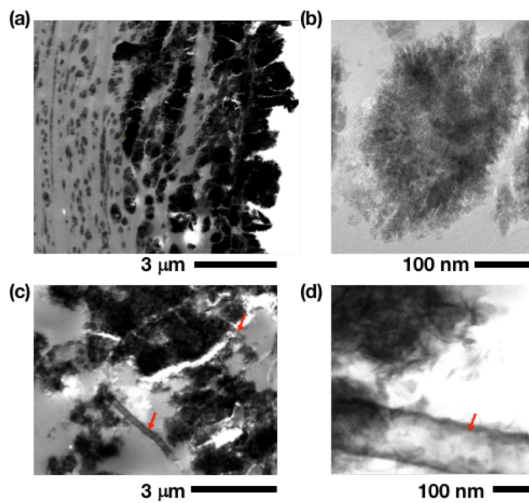


図1. スケーリーフットで見られた硫化鉄ナノ粒子の構造. (a) 黒色試料鱗断面 STEM 像. 黒色部が硫化鉄, 画面右側が海水面. (b) 黒色試料鱗内部で見られる微結晶粒凝集体 TEM 像. (c) 黒化試料殻断面 STEM 像. 赤矢印は微生物を示す. (d) 黒化試料殻断面拡大 STEM 像. 赤矢印で示す微生物表面に板状結晶が, 右上に凝集体が見られる.

硫化鉄ナノ粒子形成メカニズムを詳細に理解するため, 黒色スケーリーフットの鱗断面の EDS 分析を行なった (図2). その結果, 硫化鉄微結晶凝集体とは別に, 硫黄濃集部が存在し, その大きさは硫化鉄微結晶凝集体より小さいことが判明した. 硫黄濃集部の炭素濃度は周辺組織よりやや少ない程度であるため, 本部位は硫黄を豊富に含むタンパク質ないしは, 硫黄を何らかの形で取り込んだ組

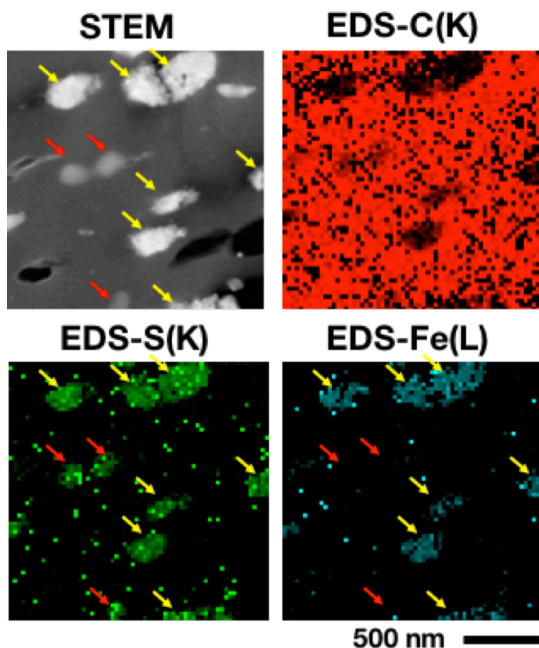


図2. 黒色試料鱗断面の STEM および炭素, 硫黄, 鉄の EDS マッピング像. 赤矢印が硫黄濃集部, 黄矢印が鉄濃集部を示す.

織であることが示唆された. 一方, 鉄のみで同様に凝集している構造は見られなかった. さらに, 鉄濃度は微結晶凝集体の周辺部で低く中央部で高いため, 凝集体は球状構造を取ることが示唆された.

黒化試料の元となった白色スケーリーフットの鱗も同様に電子顕微鏡観察と元素分析を行なった. 鱗表面には, 硫酸カルシウムや硫酸バリウムと考えられる六面体結晶が多数確認された一方, 鱗内部では確認されなかった. 白色スケーリーフットが生息する熱水にはカルシウムやバリウムが含まれていることから, 鱗表面の鉱物種が堆積由来であると推定され, またナノ粒子が鱗表面から取り込まれ内部へ拡散するというモデル (2) に否定的な結果である. 以上の結果から, モデル (1) が尤もらしいという結論が得られた.

モデル (1) を示すためには, スケーリーフットが生息しているときのみ硫化鉄ナノ粒子が生成することを示す必要がある. そのため, 黒化試料の鱗断面も同様に分析を行なった. その結果, 黒化試料の鱗にも硫黄濃集部が含まれているものの, 硫黄と鉄の分布が一致しないことが判明した (図3). また, 鉄濃度には表面から内部への勾配が見られず, 局所的に濃集しているような構造が見られた. すなわち, 生体が生存していない状態では鉄イオンは鱗表面から内部へと拡散しようが, 単純な拡散のみでは硫化鉄形成が起こらないことを示している. また, 硫黄濃集部とは別に, 生体組織内部に鉄が濃集しやすい部位が存在しているが, 鉄濃度の偏りは黒色スケーリーフットでは見られなかったことから, 生きているスケーリーフットでは鉄イオンの能動的輸送が起きていることを示している.

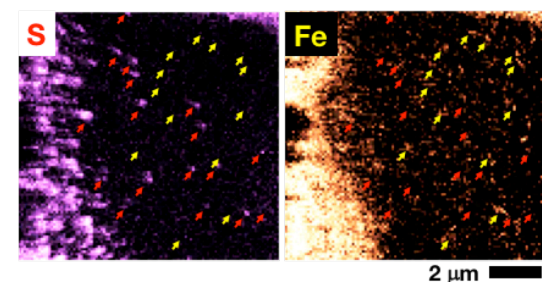


図3. 黒化試料鱗断面の SEM-EDS 像. 赤矢印が硫黄濃集部, 黄矢印が鉄濃集部を示す.

さらに, 鉄イオン拡散の詳細を理解するため, 常温常圧下で鉄イオンを豊富に含む疑似海水中に白色スケーリーフット鱗を2週間含浸した断面を観察したが, 鉄イオンの拡散は見られなかった. このことは, 鉄イオンの拡散には水圧や還元性雰囲気など複数の要因が必要となることを示唆している.

以上の結果より推定されるバイオミネラリゼーション機構は以下のとおりである. まず, スケーリーフットの鱗組織内で硫黄を豊

富に含有するタンパク質が凝集する。ここに血流等を通して鉄イオンが供給されると、硫黄濃集部位で硫化鉄の結晶化が進行する。硫化鉄の結晶成長はタンパク質が表面に吸着しているためにある一定程度の粒径で阻害され、ゆえにナノ粒子を生じる。こうして生じた硫化鉄ナノ粒子の端点が別の硫化鉄ナノ粒子結晶化の種となり、凝集したナノ粒子構造が生じる。

推定されたバイオミネラリゼーション機構は、生体高分子上で硫化鉄ナノ粒子を結晶化させるというものであるため、本系をポリスチレンなどの人工高分子を用いて適用することも将来的には可能であると考えられる。環境中の主たる硫黄源は硫化水素であるため、硫化ナトリウムおよび塩化鉄を用いた結晶化実験を行っているものの、本研究期間内では硫化鉄ナノ粒子の合成を確認するには至っていない。合成環境の酸化還元雰囲気や pH 等が影響を及ぼしているものと考えられる。

以上のように、本研究を通してスケリーフットのバイオミネラリゼーションにはスケリーフット自身が関与しており、自発的に取り込んだ硫黄濃集部を核として硫化鉄の結晶化を行なっているというメカニズムの一端を明らかにすることに成功した。一方で、第二の目的として掲げたバイオミネラリゼーション応用としてのポリマー系による模倣実験に関しては成功に至っていない。今後の課題として、硫化鉄の組成選択性、すなわち硫黄比率が異なる FeS や Fe_3S_4 といった鉱物種ではなく FeS_2 が体内深くにおいて選択的に生成する理由の解明が残されている。さらに、硫黄濃集に関わるタンパク質がどのようなものか、なぜ硫黄濃集が起こるのかを解明して初めてスケリーフットのバイオミネラリゼーション機構が完全に明らかにされたと言える。これらの問題を解決するためには、タンパク質の単離および分子構造解析や、スケリーフット体内における酸化還元環境という、本研究の範囲外かつ研究代表者の専門外であるとした分子生物学的な視点が必要になると考えられる。これらに関しては今後の共同研究等で明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

1. S. Okada, "Formation of Monodisperse Nanoemulsions Inspired by Deep-Sea Environment", Gordon Research Conference, Self-Assembly & Supramolecular Chemistry Equilibrated and Non-Equilibrated Systems for Anomalous Structures and Properties, 2017.

〔その他〕

新聞掲載

読売新聞「深海生物で半導体」2017年2月5日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 賢 (OKADA, Satoshi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・海洋生命理工学研究開発センター・研究員

研究者番号：90780916