

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05034

研究課題名(和文) 造礁サンゴを用いたアラゴナイト・カルサイト問題への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to elucidating calcite aragonite problem by using scleractinian corals

研究代表者

樋口 富彦 (Higuchi, Tomihiko)

東京大学・大気海洋研究所・特任研究員

研究者番号：40570510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：海水中のMg/Caが低い白亜紀は、カルサイトを作りやすい海水組成であり、Mg/Ca比で考えるとカルサイトのサンゴが生息していた可能性はある。しかし、水温が骨格形成に与える影響について、同じMg/Caで比較すると、温度が高いほどアラゴナイト骨格の割合が高いことがわかった。白亜紀は今よりも温暖な気候だったと言われており、水温的にはアラゴナイトが生成しやすい環境だと言える。網羅的遺伝子発現解析の結果では、低Mg/Caで主要骨格タンパク質が大きく発現上昇することがわかった。これらをまとめて、サンゴは能動的にアラゴナイト骨格を作るが、条件によって受動的にカルサイトを生成することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、サンゴの骨格中のカルサイトやアラゴナイト形成の遺伝学的制御に関与する物質の候補がリストアップできたことで、様々な生物における炭酸カルシウム骨格形成のメカニズムの解明に貢献しうる成果が得られた。

また、白亜紀におけるサンゴのアラゴナイト形成は、高水温と、生物による積極的な骨格タンパク形成に起因しているということ結論付けることができ、長年の謎であったカルサイトーアラゴナイト問題解決への一助となった。

研究成果の概要(英文)：Although coral skeletons generally comprise aragonite crystals, changes in the molar Mg/Ca ratio (mMg/Ca) in seawater result in the incorporation of calcite crystals. Previous studies suggested that aragonitic scleractinian corals controlled skeletal formation biologically under low mMg/Ca conditions at higher temperature. The mechanism of formation of aragonite and calcite crystals in coral skeletons was therefore investigated by RNA-seq analysis, using early growth stage calcite and aragonite-based corals. As a result, 1287 genes were up-regulated and 748 down-regulated in calcite-based corals. In particular, 68 skeletogenesis-related genes were detected as up-regulated, and 6 genes down-regulated in low-Mg/Ca conditions. It is thought that corals actively cause the skeletal organic matrix to construct an aragonite skeleton in low-Mg/Ca conditions. These results suggest that the composition of these proteins could be a key factor in the selective formation of aragonite or calcite.

研究分野：生物地球化学

キーワード：アラゴナイト カルサイト 造礁サンゴ バイオミネラリゼーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生物が作る炭酸カルシウムの結晶型は主に2種類、あられ石(アラゴナイト)と方解石(カルサイト)である。海水中で沈着するカルサイト、アラゴナイト結晶型の選択には、海水のマグネシウム(Mg)とカルシウム(Ca)濃度の割合が大きく関わっていることが知られている。基本的には、Mg/Caが高いほどアラゴナイトを形成し、低いほどカルサイトが形成される(Balthasar and Cusack, 2015)。造礁サンゴは様々な場所で地形を形作る主要生物である。現在の海洋では海水中のMgが高くMg/Ca比は5.2で、サンゴはアラゴナイト型の骨格を容易に作っている。一方、過去の海洋では、Mg/Ca比は大きく変動しており、カルサイトを形成する厚歯二枚貝などの生物が地形を形成していた時代もある。(Ries, 2010)。例えば、1億年前のMg/Ca比が1を下回る海、よりカルサイトを作りやすいような環境では、サンゴがどのような骨格を作ってきたのかあまりわかっていなかった。Higuchi et al. (2014)では、Mg/Ca比を変化させた海水でサンゴの骨格形成を促し、ある一定のMg/Ca比を下回った際に(Mg/Ca<1.5)カルサイト骨格を形成することを報告した。さらに、低Mg/Ca比の海水中では、サンゴによるアラゴナイトとカルサイト生成に温度依存性が見られた(Higuchi et al. 2017)。一方で、同じ温度条件において、無機CaCO<sub>3</sub>沈殿実験で生成されるよりも多くのアラゴナイトをサンゴが生成することを報告した。これは造礁サンゴがアラゴナイトを作るための骨格生成メカニズムを持っていることを示唆した。

## 2. 研究の目的

本研究では、造礁サンゴの骨格形成に関わる環境変動や骨格タンパク質に着目し、サンゴがカルサイトとアラゴナイトをどうやって作り分けているのか、造礁サンゴがカルサイト(またはアラゴナイト)を能動的に作るのか、受動的に作るかを明らかにすることを目的に研究を進めた。

## 3. 研究の方法

各Mg/Ca比(5.2~0.5)の海水で、サンゴのプラヌラ幼生を変態させ、(2 μM Hym-248を使用)、骨格成長を促した。実験は、水温をコントロールしたインキュベータ内で行った。材料には、高知県で採取したエンタクミドリイシを用いた。生成した骨格の炭酸カルシウム結晶型をX線回折法(XRD)およびMeigen染色により確認し、アラゴナイト/カルサイトの比率も求めた(図1)。各条件下で飼育したサンゴを固定し、網羅的遺伝子解析(RNA-seq)を行った。そして、サンゴのアラゴナイト・カルサイト生成に関わる遺伝子を同定した。

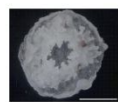
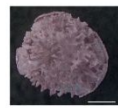
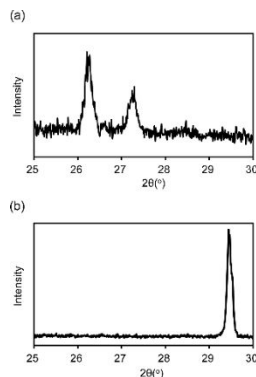


図1. サンゴ骨格のXRDスペクトルおよびMeigen染色後のサンゴ骨格。スケールバーは0.5 mm。

(a) Mg/Ca=5.2で成長したサンゴ。XRD、染色共にアラゴナイトの特徴を示す。

(b) Mg/Ca=0.5で育てたサンゴ。XRDはカルサイトの特徴を示すが、ごく一部の骨格が染色され、アラゴナイトの混在が見られる。

Higuchi and Yuyama (2019)より。

## 4. 研究成果

カルサイト(mMg/Ca=0.5)またはアラゴナイト(mMg/Ca=5.2)を形成したサンゴを用いて、RNA-seq解析を行った結果、合計2,035個の発現変動遺伝子が検出された(FDR < 0.05)。アラゴナイトサンゴと比較して、カルサイトサンゴでは1287個の遺伝子が発現上昇し、748個の遺伝子が発現低下した(図2)。これらの遺伝子をデータベースで検索したところ、骨格有機マトリックスタンパク質をはじめ、コラーゲンαなど細胞外マトリックスタンパク質やいくつかのtoxin(トキシン)が発現上昇率が高い遺伝子として同定された。一方、発現減少した遺伝子として同定されたのは、細胞外マトリックスタンパク質のdermatopontin(デルマトポンチン)やhemicentin-2(ヘミセンチン2)、cytochrome P450(シトクロム p450)等であった。

特筆すべきこととして、低Mg/Ca条件下でectin(エクチン)、galaxin(ギャラクシン)などのアラゴナイトサンゴで報告されている骨格形成に関連する遺伝子68個の発現上昇が見られた。対して、骨格有機マトリックスタンパク質など発現減少した遺伝子は6個のみ検出された。アラゴナイト骨格の骨格有機マトリックスに関連する発現上昇した遺伝子の数は、発現減少した遺伝子の数よりもはるかに多かったことから、サンゴは低Mg/Ca条件下でアラゴナイト骨格を構築するために骨格有機マトリックスタンパク質の積極的な生成を試みていたことが考えられる。

さらに、低Mg下(mMg/Ca=0.5)とコントロール(mMg/Ca=5.2)の間で発現が異なる遺伝子を、Gene ontology(GO)エンリッチメント解析により、エンリッチメントカテゴリに分類した。GO解析の結果、カルサイトサンゴではWntシグナル伝達経路(GO:0016055)やJAK-STATカスケード(GO:0007259)などのシグナル伝達経路が発現上昇していることがわかった。また、カルシウムイオン結合(GO:0005509)や細胞外マトリックス(GO:0031012)に関連するGOは、アラゴナイトサンゴと比較して、いずれもカルサイトサンゴで特に発現上昇遺伝子が多いこと

が示された。一方で、Ca ATPase など、石灰化部位の炭酸系に關与する遺伝子には、変動が見られなかった。Mg/Ca の低い海水では石灰化速度は低下するが、海水中の mMg/Ca の変化は石灰化液の炭酸系化学に影響を与えないことが示唆された。

同じ低 Mg 条件で無機的に析出した CaCO<sub>3</sub> 結晶 (アラゴナイト/カルサイト混合結晶) と比較すると、サンゴの骨格中ではより多くのアラゴナイトが形成されている (図 3、Balthasar and Cusack 2015; Higuchi et al. 2017)。特徴的なのは、カルサイトサンゴではシグナル伝達に関わる多くの遺伝子や骨格形成に関する遺伝子の発現が上昇したことである。このことは、サンゴが骨格形成に関する遺伝子の発現上昇によって能動的にアラゴナイト生成を促すことで、低 mMg/Ca 条件でもより多くのアラゴナイト結晶が形成されたことを示唆している。

これまでの一連の研究により、サンゴは能動的にアラゴナイト骨格を作るが、ある一定の条件を超えると受動的にカルサイトを生成することが明らかとなった。本研究では、サンゴのアラゴナイト骨格形成に関わる多くの遺伝子が低 Mg 環境下で発現上昇することを明らかにした。また、カルサイトサンゴとアラゴナイトサンゴでは、異なる種類の有機マトリックスタンパク質、細胞外マトリックスタンパク質、カルシウムイオン結合タンパク質が発現しており、これらのタンパクがサンゴの結晶形成に寄与している可能性が示唆された。このような遺伝子の違いが本当にカルサイトやアラゴナイトの骨格形成に寄与しているのかどうかを明らかにするためには、カルサイト形成サンゴの骨格有機基質のプロテオーム解析など、さらなる研究が必要である。しかし、サンゴの骨格中のカルサイトやアラゴナイト形成の遺伝学的制御に関する物質の候補をリストアップしたことで、様々な生物における炭酸カルシウム骨格形成のメカニズムの解明に貢献しうる成果が得られた。

海水中の Mg/Ca が低い白亜紀は、カルサイトを作りやすい海水組成であり、Mg/Ca 比で考えるとカルサイトのサンゴが生息していた可能性はある (Higuchi et al., 2014)。しかし、実際のサンゴ化石はアラゴナイトが主体で (Janiszewski et al. 2011)、なぜアラゴナイトが多いかその理由は謎であった。水温が骨格形成に与える影響について調べたところ、同じ Mg/Ca で比較すると、温度が高いほど、アラゴナイト骨格の割合が高いことがわかった (図 3、Higuchi et al., 2017)。白亜紀は今よりも温暖な気候だったと言われており (Pandolfi et al., 2011)、水温的にはアラゴナイトが生成しやすい環境だと言える。網羅的遺伝子発現解析の結果では、低 Mg/Ca で主要骨格タンパク質が大きく発現上昇することが明らかとなった (Yuyama and Higuchi, 2019)。これらをまとめて、白亜紀のアラゴナイト化石は、高水温と、生物による積極的な骨格タンパク形成に起因しているということ結論付けた。



図 2 異なる Mg/Ca 下で成長したサンゴの網羅的遺伝子発現解析結果。Control (Mg/Ca=5.2), Low-Mg (Mg/Ca=0.5)。Higuchi and Yuyama (2019)より。

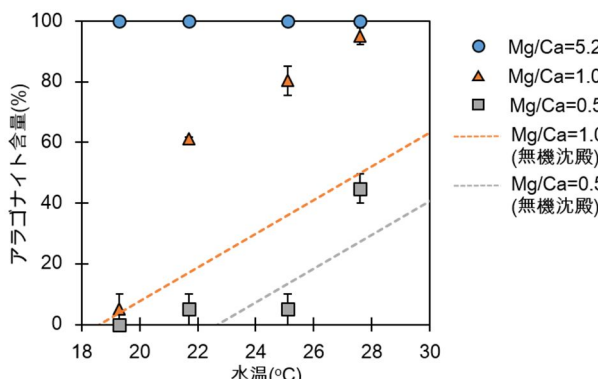


図 3 サンゴが生成した炭酸カルシウム骨格と無機沈殿実験 (破線, Kiessling, 2015)におけるアラゴナイト含量の比較。サンゴ骨格、無機沈殿どちらも水温が増加するにつれアラゴナイトが生成しやすい。同じ水温、同じ Mg/Ca 比で比較すると、基本的にはサンゴは無機的な沈殿よりもアラゴナイトの含量が高い。Higuchi et al. (2017)を改編。

## 引用文献

- Balthasar, U. and Cusack, M., 2015, Aragonite-calcite seas—Quantifying the gray area: *Geology* 43, 99–102.
- Higuchi, T., Fujimura, H., Yuyama, I., Harii, S., Agostini, S. and Oomori, T., 2014, Biotic control of skeletal growth by scleractinian coral in aragonite-calcite seas. *Plos One* 9, e91021.
- Higuchi, T., Shirai, K., Mezaki, T. and Yuyama, I., 2017, Temperature dependence of aragonite and calcite skeleton formation by a scleractinian coral in low *mMg/Ca* seawater. *Geology* 45, 1087-1090.
- Janiszewska, K., Mazur, M., Escrig, S., Meibom, A., and Stolarski, J., 2017, Aragonitic scleractinian corals in the Cretaceous calcitic sea: *Geology* 45, 319–322.
- Kiessling, W., 2015, Fuzzy seas: *Geology* 43, 191-192.
- Pandolfi, J.M., Connolly, S.R., Marshall, D.J. and Cohen, A.L., 2011, Projecting Coral reef futures under global warming and ocean acidification. *Science* 333: 418–422.
- Yuyama, I. and Higuchi, T., 2019, Differential gene expression in skeletal organic matrix proteins of scleractinian corals associated with mixed aragonite/calcite skeletons under low *mMg/Ca* conditions. *PeerJ* 7, e7241.
- Ries, J.B., 2010, Review: geological and experimental evidence for secular variation in seawater *Mg/Ca* (calcite-aragonite seas) and its effects on marine biological calcification, *Biogeosciences* 7, 2795–2849.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuyama Ikuko, Higuchi Tomihiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Differential gene expression in skeletal organic matrix proteins of scleractinian corals associated with mixed aragonite/calcite skeletons under low mMg/Ca conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e7241 ~ e7241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.7241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Higuchi Tomihiko, Shirai Kotaro, Mezaki Takuma, Yuyama Ikuko	4. 巻 45
2. 論文標題 Temperature dependence of aragonite and calcite skeleton formation by a scleractinian coral in low mMg/Ca seawater	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Geology	6. 最初と最後の頁 1087 ~ 1090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1130/G39516.1">https://doi.org/10.1130/G39516.1</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Higuchi Tomihiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Studies on Stress Responses of Corals in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Coral Reef Studies of Japan	6. 最初と最後の頁 29 ~ 40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1007/978-981-10-6473-9_3">https://doi.org/10.1007/978-981-10-6473-9_3</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tomihiko Higuchi, Ikuko Yuyama, Kotaro Shirai
2. 発表標題 Skeletal formation of scleractinian coral <i>Acropora</i> in response to Mg/Ca fluctuation
3. 学会等名 International Coral Reef Symposium 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomihiko Higuchi, Ikuko Yuyama
2. 発表標題 Skeletal formation of scleractinian corals in response to Mg/Ca fluctuation
3. 学会等名 Japan Geoscience Union (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋口 富彦, 田中 健太郎, 白井 厚太郎, 湯山 育子, 高畑 直人, 佐野 有司
2. 発表標題 NanoSIMSを用いたサンゴ-褐虫藻における硫黄動態の可視化
3. 学会等名 第22回日本サンゴ礁学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomihiko Higuchi, Ikuko Yuyama
2. 発表標題 Skeletal formation of scleractinian corals in response to Mg/Ca fluctuation
3. 学会等名 JPGU 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Higuchi T, Shirai K, Mezaki T, Yuyama I
2. 発表標題 Temperature dependence of aragonite and calcite skeleton formation by scleractinian coral in low-Mg/Ca seawater
3. 学会等名 14th International Symposium on Biomineralization (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuyama I, Higuchi T
2. 発表標題 Identification of genes related to aragonite/calcite crystal growth in modern scleractinian coral.
3. 学会等名 14th International Symposium on Biomineralization (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

造礁サンゴの骨格が海水温によって変わる ~ 過去の海水マグネシウム/カルシウム変動を再現 ~  
<http://www.aori.u-tokyo.ac.jp/research/news/2017/20171020.html>  
 造礁サンゴ骨格の炭酸カルシウム結晶構造は水温によって変化する 白亜紀を模した海洋環境で  
<https://academist-cf.com/journal/?p=6575>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	目崎 拓真  (Mezaki Takuma)	公益財団法人黒潮生物研究所  (86404)	
連携研究者	湯山 育子  (Yuyama Ikuko)  (80565995)	筑波大学・生命環境系・特任助教  (12102)	
連携研究者	白井 厚太郎  (Shirai Kotaro)  (70463908)	東京大学・大気海洋研究所・准教授  (12601)	