

平成22年6月30日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20740301  
 研究課題名(和文) 石灰質有孔虫細胞内のカルシウムイオンの定量と挙動のリアルタイム観察  
 研究課題名(英文) Quantification and real time observation of calcium in living calcareous foraminifera  
 研究代表者  
 豊福 高志 (TOYOFUKU TAKASHI)  
 独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・チームリーダー  
 研究者番号：30371719

研究成果の概要(和文)：本研究では炭酸カルシウムを主成分とする殻を持つ、海洋に生息する原生生物である石灰質有孔虫の石灰化過程とカルシウムの取り込みについて検討した。市販されているカルシウムプローブ(Fluo-3AM)を海産無脊椎動物に初めて応用し、細胞内のカルシウムイオン分布を観察した。その結果、細胞内に取り込まれた海水からカルシウムを取り込んでいることが示唆された。また、チャンバー形成時にはカルシウムイオンが細胞質と共に石灰化部位に輸送される様子が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Calcium uptakes and usages of calcareous foraminifera, unicellular marine protist, are investigated. This is the first application of fluorescent calcium probe Fluo-3AM on a marine organism. The Fluo-3AM experiment revealed the intracellular calcium distributions. The observations suggest that foraminiferal organism uptake calcium from vacuolized seawater. This study show the vacuolized calcium was transported to the calcification site by moving of the cytosol during chamber formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・層位・古生物学

キーワード：バイオミネラリゼーション, 石灰質有孔虫, 原生生物, 海洋酸性化, 炭酸カルシウム, 飼育実験, 古生物学, 地球生物学

## 1. 研究開始当初の背景

石灰質有孔虫類は海洋における主要な炭酸塩生産者であり、その炭酸塩の殻は地層中に保存される。特に近年では、殻のマグネシウム-カルシウム比(Mg/Ca比)古水温計に代表される、海洋の環境によって変化する殻の化学組成に着目した古環境指標の開発・応用が盛んである。そのため石灰質有孔虫の炭

酸塩殻の形成過程の解明は、海洋化学的、古海洋学的に重要なテーマである。

従来の研究では、カルシウムの同位体を用いたトレーサー実験が行われ、有孔虫細胞内のカルシウムイオンの滞留時間や、量が明らかになっている(Anderson and Faber, 1984; Lea et al., 1995; Erez, 2003)。また、殻の成長過程については偏光顕微鏡を用いて、

炭酸塩の沈着について詳細な観察例が多数報告されている (e. g. Angell, 1979). しかし, トレーサー実験では, ボックスモデルとしてカルシウムのバジェットが見積もられたに過ぎず, それがどのような過程を経て炭酸塩として沈着しているかは, 未だ十分に理解されたとはいえない. 特に海水からのカルシウムイオンの取り込みや, 石灰化中の細胞内におけるカルシウムイオンの挙動についての仮説や議論はあるが, 実際には殆どわかっていない (Bentov and Erez, 2006).

## 2. 研究の目的

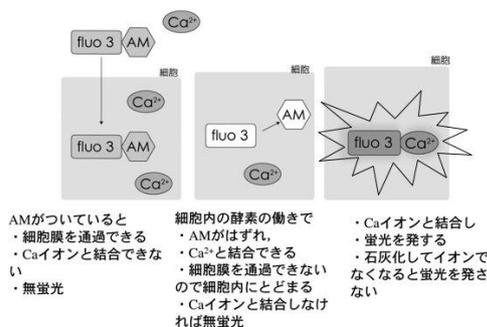
有孔虫が石灰化する際のカルシウムの挙動を明らかにするために, これまで予察的に行っていた fluo-3 を用いたカルシウムの可視化手法を発展させ, 海水から有孔虫細胞への, カルシウムの取り込み-貯蔵-消費を計測し, 石灰質有孔虫のカルシウムサイクルを明らかにすることを目的とする.

## 3. 研究の方法

本研究では市販の Fluo-3 (1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-9-xanthenyl)phenoxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid,  $C_{51}H_{50}$ ,  $C_{12}N_2O_{23}$ ) というカルシウム蛍光試薬 (プローブ) を用いた. Fluo-3 は, カルシウムが存在すると, 青色光 (488nm) による単波長励起によって, 黄緑色 (525nm) の蛍光を発する (Minta et al., 1989). 蛍光の強度は溶存するカルシウムイオンの濃度に依存する. 一方で, Fluo-3 自身や, エステル結合でアセトキシメチル修飾された Fluo-3AM は蛍光を発さない. また, Fluo-3AM はカルシウムと結合しない. アセトキシメチル修飾された蛍光試薬は脂溶性で, 細胞膜を透過できる. そのため, 蛍光試薬を細胞内に取り込ませる手法として, 簡便で失敗も少ないため, 一般的によく使われている. Fluo-3AM は有孔虫に取り込まれた後, 細胞内の酵素 (エステラーゼ) によって速やかに分解を受け, Fluo-3 の形になる. そして, 細胞内のカルシウムイオンとキレートとなり, 蛍光を発するのである. Fluo-3 はキレートになったときだけ蛍光を発するが, 石灰化して炭酸塩になったカルシウムとは反応しない. そのため, 石灰化した後は蛍光を示さない.

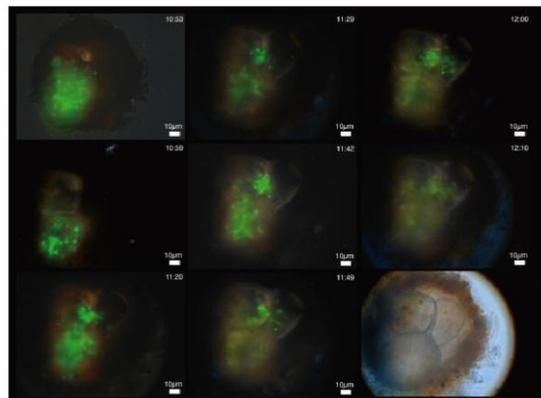
## 4. 研究成果

観察の結果, Fluo-3AM を取り込ませた



個体では, 特徴的な黄緑色の蛍光が, 細胞質全体で観察された. 一方で, カルシウムを含まない人工海水で培養した個体では, Fluo-3AM を取り込ませたのにもかかわらず, 蛍光は観察されなかった. 以上の結果から, 観察されている蛍光は有孔虫内部に取り込まれた Fluo-3 が, カルシウムイオンに反応したものだと考えられる. また, Fluo-3 はカルシウム以外の陽イオンが存在していても, 蛍光を示さないことが確かめられた. また, いずれの条件においても, 炭酸塩殻からは, 蛍光は観察されなかった. 蛍光が観察された個体では, 細胞質全体がぼんやりと蛍光を発する中に, 粒子状 (直径 1~5 μm) に蛍光の強い部分があった. この見え方の異なる二種類の蛍光は, それぞれ細胞質基質中のカルシウムイオンと, カルシウムを含む小胞や, 細胞内小器官を示していると考えられる. 一般に, ミトコンドリアには, 多くカルシウムが含まれている事が知られており, 観察された蛍光の一部はミトコンドリアに対応すると考えられる. 今後, 細胞内小器官を特異的に検出できるプローブを用いて, 多重染色を行うことで, 対応が付けられるようになって考えている.

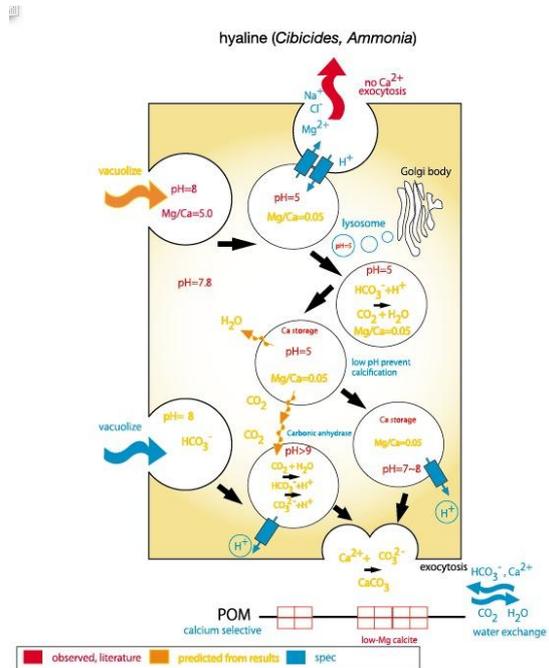
石灰化中のカルシウムイオンの挙動を時系列的に観察を行った. 最初, チャンバーが形成される予定の場所に, 有機膜が展開された. その後, 徐々に炭酸塩が沈着され, チャンバーが形成されていった. その間, 細胞内のカルシウムを示す蛍光は小胞様の形態を示していた. 蛍光の強度は増減したことから, カルシウムが消費される一方ではなく, 石灰化中も海水中から取り込まれていることがわかった. カルシウムを含む小胞は, 新たなチャンバーの内部に侵入しより効率的にカルシウムを輸送していることが示唆される.



カルシウムを含まない人工海水で培養した 5 個体のうち, 4 個体がチャンバーを付加した. これらのチャンバーはカルシウムが含まれない人工海水中で沈着したことになる.

カルシウム枯渇環境下で付加したチャンバーは不完全で、穴が見られた。これは、有孔虫が貯蔵していたカルシウムを使って、新たなチャンバーを付加したものの、石灰化中に海水からカルシウムを取り込むことが出来ず、材料が不足し、完全なチャンバーを沈着することができなかつたものと考えられる。このことは、有孔虫は種類によってはチャンバー形成に先だって、ある程度のカルシウムを貯蔵するが、その量は一つのチャンバーを完成するには不足しており、チャンバー付加の間も、海水からカルシウムを取り込んでいる可能性を示唆している。一方で、既存のチャンバーを溶解して、新たなチャンバーにカルシウムを供した可能性も否定できない。石灰化に平行して、海水からカルシウムを取り込んでいることは明らかであり、石灰化中のカルシウムの系は閉じていない可能性がこの観察からも示唆された。

以上の観察結果と、先行研究、平行して研究を行った細胞内 pH 分布などを考察し、現在までにわかっている石灰化モデルを以下に図示する。有孔虫は海水を細胞内から取り込み、リソソームなどを使って小胞の pH を下げる。また何らかの方法で海水からカルシウム濃度を増加させる。カルシウムは一定量細胞内に蓄えられ、チャンバー形成時に備えられている。その量はチャンバー一つを完成させるには不足しており、形成中も海水からカルシウムの取り込みが続けられている。チャンバー形成にはカルシウムイオンと反応する炭酸イオンが必要である。炭酸イオンは取り込んだ海水の pH を上昇させ、重炭酸イオンや呼気中の二酸化炭素から得ているものと考えられる。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

① de Nooijer, L. J., Toyofuku, T., Kitazato, H., Foraminifera promote calcification by elevating their intracellular pH, Proc. Nat. Ac. Sci., 査読有り, 106, 2009, 15374-15378.

② 豊福高志, 小栗一将, de Nooijer, L. J., 野牧秀隆, 土屋正史, 北里洋, 地球化学・地球生物学分野への分子イメージング手法の応用, 第四回学際領域における分子イメージングフォーラム, JAXA SP (Special Publication: CD-ROM, 査読無し, 2009.

③ de Nooijer, L. J., Toyofuku, T., Oguri, K., Nomaki, H., Kitazato, H., Intracellular pH distribution in foraminifera determined by the fluorescent probe HPTS. Limnol. Oceanogr.-Methods, 査読有り, 6, 2008, 610-618.

④ Toyofuku, T., de Nooijer, L. J., Yamamoto, H., and Kitazato, H., Real-time visualization of calcium ion activity in shallow benthic foraminiferal cells using the fluorescent indicator Fluo-3 AM, Geochem. Geophys. Geosyst., 査読有り, 9, 2008, Q05005.

⑤ 豊福高志, de Nooijer, L. J., 野牧秀隆, 小栗一将, 土屋正史, 北里洋, 有孔虫細胞内の環境可視化手法の開発と応用-バイオミネラルゼーションの解明を目指して-, 月刊地球, 査読無し, 30(7), 2008, 346-351.

〔学会発表〕(計 18 件)

①豊福高志, 小栗一将, de Nooijer, L. J., 野牧秀隆, 土屋正史, 北里 洋, Internal environmental control within Foraminifera through calcification, 地球惑星科学合同大会, 2009 年 5 月 19 日, 千葉.

②de Nooijer, L. J., Toyofuku, T., Langer, G., Nehrke, G., Kitazato, H. and Bijma, J. (2009), Intracellular control on calcification in benthic foraminifera, European Geosciences Union General Assembly 2009 (EGU2009), 2009 年 4 月 21 日, Vienna.

③Toyofuku, T. de Nooijer, L. J., Kitazato, H. (2009), Fluorescent observations of calcium ion activity in living benthic foraminifera, European Geosciences Union General Assembly 2009 (EGU2009), 2009 年 4 月 21 日, Vienna.

④豊福高志, de Nooijer, L. J., 北里 洋, 底生有孔虫の石灰化過程と Mg 含有量, 日本古生物学会第 158 回例会, 琉球大学, 2009 年 1 月 31 日, 琉球大学.

⑤豊福高志, 小栗一将, de Nooijer, L. J., 野牧秀隆, 土屋正史, 北里 洋, 地球化学・地球生物学分野への分子イメージング手法の応用, 第四回学際領域における分子イメージングフォーラム, 2008 年 10 月 9 日, 早稲田大学.

⑥Toyofuku, T., Nomaki., H., Oguri, K., Kitazato, H., de Nooijer, L. J. (2008), Real-time visualization of chemical environment in the living marine protist "foraminifera" by fluo-3 and HPTS, Japanese-German Joint Seminar -New Prospects of Molecular Imaging Technology for Interdisciplinary Research, 2008 年 9 月 3 日, 東北大学.

⑦豊福高志, de Nooijer, L. J., 野牧秀隆, 小栗一将, 北里 洋, カルシウム・pH 蛍光指示薬を用いた観察から示唆される有孔虫の石灰化モデル, 日本古生物学会 2008 年年会, 2008 年 7 月 6 日, 東北大学.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊福 高志 (TOYOFUKU TAKASHI)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・チームリーダー

研究者番号 : 30371719

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者