

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19020

研究課題名（和文）バイオミネラリゼーションにおけるアラゴナイトの双晶密度制御機構の解明

研究課題名（英文）Study on the twin density of aragonite in biomineralization

研究代表者

鈴木 道生（Michio, Suzuki）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：10647655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：バイオミネラリゼーションにより形成された鉱物は、人工的には合成が難しいマイクロもしくはナノオーダーの緻密な微細構造を有しており、形態、方位、多形、サイズ、欠陥の密度などが非常に厳密に何らかの有機分子により制御されていると考えられている。しかしながら、欠陥の密度を制御する有機分子に関する報告はこれまで存在しない。炭酸カルシウムの準安定相であるアラゴナイトの結晶欠陥である{110}双晶の密度を上昇させる新規の基質タンパク質をカサガイの殻から同定した。この基質タンパク質にはグルタミンに富む配列が多数存在し、凝集化することで{110}双晶を誘導する可能性が*in vitro*の実験より示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

双晶のような結晶欠陥を多数内在させることで、へき開が連続的に起こることを防ぎ、結晶の断裂の範囲を限定することが可能となる。すなわち結晶の欠陥を制御することができれば、生物が持つような高強度、高靱性の材料を人工的に作り出すことにつながるかもしれない。さらに、交差板構造では双晶の方向が平行に並んでおり、このように欠陥の方向を制御することで特定の方向に強い特殊な機能性材料の合成手法の開発に貢献する可能性も考えられる。今回の研究成果により双晶の導入に関与する有機分子が明らかになれば、それを人工的に模倣することが可能となり、新規の高機能材料を自在にデザインすることが可能になるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Mineral crystals formed through biomineralization process have a fine microstructure that is difficult to synthesize artificially, because the morphology, orientation, polymorphism, size and density of defects are extremely regulated. These functions are controlled by some kinds of organic molecules. However, there have been no reports on organic molecules that control the density of defects. A novel matrix protein that increases the density of {110} twins, which are crystal defects in aragonite, has been identified from the shell of a limpet. The matrix protein contains many glutamine-rich sequences. *In vitro* experiments suggested that their aggregation may induce {110} twinning.

研究分野：生物無機化学

キーワード：バイオミネラリゼーション アラゴナイト 双晶 欠陥

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究において巻貝であるカサガイの交差板構造の cryo 電顕による観察と、赤外分光法による原子歪みの評価を行い、交差板構造のアラゴナイトには双晶が高密度に含まれることで、結晶の強度を落とすはずの欠陥を厳密にコントロールして導入することで、生存戦略上有利に働いているのではないかと考えた。XRD を用いた双晶の密度の定量を行い、双晶の密度が貝殻の微細構造により差があることを定量的に示した。しかしながら、なぜ双晶密度や配置が厳密に制御されるのか疑問のままであった。このような経緯から、双晶密度を制御する因子の探索を提案するに至った。

2. 研究の目的

生物が鉱物を形成す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により形成された鉱物は、人工的には合成が難しいマイクロもしくはナノオーダーの緻密な微細構造を有しており、形態、方位、多形、サイズ、欠陥の密度などが非常に厳密に制御されていることが特徴的である。このような緻密な制御には、バイオミネラル形成における金属イオン濃度、温度、不純物である微量元素濃度、有機分子の分泌が生体の作用により調節されることが非常に重要であると考えられてきた。その中でも特に、バイオミネラルに含まれる特異的な有機分子が鉱物形成に様々な機能を有することで、緻密な構造が作られるということが多くの研究者により示されてきた。申請者の研究を含むこれまでの成果では、鉱物の形態、方位、多形、サイズを制御する新規の有機分子については多くの報告がある。しかしながら、欠陥の密度を制御する有機分子に関する報告はこれまで存在しない。これまでの研究から炭酸カルシウムの準安定相であるアラゴナイトに結晶欠陥である{110}双晶が多数含まれることを見出している。{110}双晶とは、アラゴナイト結晶の{110}面において結晶が反転して成長してしまう現象で、アラゴナイト内の炭酸イオンの配置が{110}面に対してほぼ正三角形の形状であることから起こり易いと考えられている。その密度は、貝殻微細構造の種類によって厳密に制御されており、密度の高いものから低いものまで知られているが、その制御メカニズムについては全く不明であり、人工的に再現することも不可能である。これらは生息環境や貝殻の微量元素組成などに大きな違いがないにも関わらず、異なる双晶密度をもつ貝殻微細構造が明確に区別されて形成されることから、含まれる有機分子の違いにより双晶密度が制御されているのではないかと考えた。そこで、本研究では双晶密度の異なる貝殻微細構造から、双晶形成に関与する有機分子を見出し、その構造機能解析を行うことで、鉱物における双晶の制御メカニズムを明らかにし、結晶欠陥の新たな制御手法を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

{110}双晶の多い交差板構造(カサガイ由来)から有機分子を抽出し、アラゴナイトの結晶をエピタキシャル成長させる基盤に添加した後に、アラゴナイト結晶を成長させる。合成したアラゴナイト結晶について X 線回折(XRD)による歪み測定および双晶密度の定量、集束イオンビーム(FIB)を用いた断面切片の作製による内部構造を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察する。アラゴナイト内の双晶の密度を明らかにする。添加

した有機分子の粗抽出液の種類および量により双晶密度が変化すれば、さらに有機分子を SDS-PAGE やクロマトグラフィーで分離することで、双晶の形成に最も関与する有機分子の画分を明らかにする。双晶を誘導する画分が明らかになれば、その画分に含まれる成分を質量分析により解析を行い、構造を明らかにする。そして構造が明らかとなった有機分子を合成することにより、*in vitro* で双晶を制御する手法の開発を進める。有機分子が双晶の密度変化にどのような影響を与えるのか、放射光 XRD のスペクトルの半値幅や TEM を用いたコントラストの解析により、詳細を明らかにする。

4. 研究成果

カサガイの貝殻は EGTA を用いて脱灰し有機成分を抽出した。これらの抽出された有機物を用いてアラゴナイト生成実験に用いた。アラゴナイトの生成物は XRD によって分析し {211} ピークと {221} ピークの間の FWHM の差を調べることによって {110} 双晶の密度の定量分析を行った。その結果、カサガイの貝殻由来の有機抽出物が濃度依存的にアラゴナイト構造内の双晶形成を顕著に促進することが明らかになった。SEM 観察では、有機物を添加した系においては、アラゴナイトの結晶はより角張った形状に変化し、いくつかのアラゴナイト結晶ではプリズムに顕著な亀裂が生じた。この形態の変化は、タンパク質が 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で最も顕著であった。抽出液の成分をタンパク質酵素で処理すると、双晶密度の割合が対照群 (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と比較してわずかな変化しか生じなかった。これらのことから、カサガイの貝殻の抽出液におけるタンパク質の重要性を示している。

カサガイ貝殻の抽出液に含まれ活性を有するタンパク質を明らかにするため、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) を使用して、交差板構造層と M+2 層の間で比較プロテオミクス分析を実施した。交差板構造層に顕著に含まれ、M+2 層には少ない成分を同定することに成功した。さらに、無機的に合成されたモロッコ産の鉱物アラゴナイトを使用して、生物起源のアラゴナイトの {110} と {001} を表出させた切片を準備し、これらに対して結晶面特異的結合実験を行った。その結果、タンパク質の大部分が {001} に対してより高い親和性を示した。しかしながら、Unigene15736_C2.p1 は存在量が多いだけではなく、{001} と比較して {110} に対して 3 倍近く高い親和性を示した。これは、Unigene15736_C2.p1 がアラゴナイト結晶の {110} 双晶の形成に強く関係していることを示唆している。

Unigene15736_C2.p1 は分泌シグナルを有し、分子質量は約 33.8 kDa でグルタミン含有量が高かった (17.4%)。組換え Unigene15736_C2.p1 を作製し、*in vitro* のアラゴナイト結晶形成実験を行ったところ、XRD の結果から双晶密度の多いアラゴナイト結晶が形成されたことが確認された。以上のことから、Unigene15736_C2.p1 がカサガイの貝殻の交差板構造において {110} 双晶の形成に重要な役割を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	奥村 大河 (Okumura Taiga) (90867508)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
イスラエル	テクニオン大学			