

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560406

研究課題名(和文) 卵殻と貝殻のカルシウム移動を司る有機分子の探索

研究課題名(英文) Investigation of organic molecules responsible for calcium translocation in eggshell and nacre shell

研究代表者

犀川 陽子 (SAIKAWA, Yoko)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：20348824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：鳥類の卵殻から胚へのカルシウム移動に寄与する有機分子の探索を行った。ダチョウの卵殻から一種のリン酸エステルを含む4種の成分を同定し、その中のリン酸エステルAは結晶よりも溶解性の良い非晶質の炭酸カルシウムの生成を誘起することを明らかにした。また、卵殻成分の定量およびマスマイメーシングを行い、Aは骨形成の際に溶解する卵殻内側部分に局在することがわかった。よって、Aは卵殻からのスムーズなカルシウムイオンの溶解と移動に寄与していると言える。一方、南洋真珠の貝殻が骨芽細胞の分化を活性化する現象に注目した。検討により、骨芽細胞の活性化を再現するためには、貝殻小片が培養系に共存する必要があることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated organic compounds which contributes to calcium translocation from eggshell to chick embryo. From the ostrich eggshell, we identified four compounds including an organophosphate. Among these compounds, the organophosphate A turned out to induce the formation of amorphous calcium carbonate. In addition, quantification of eggshell components by stepwise extraction revealed that organophosphate A was located in the inner layer of eggshell and decreased as an embryo bone is formed. This localization was also proved by MALDI-TOF imaging analysis of cross section of eggshell. The above results support the assumption that organophosphate A assists decalcification and translocation of calcium ion. On the other hand, we focused on the shell of nacre (*pinctada maxima*) which is said to promote the differentiation of osteoblast. We found that the reproducible differentiation and calcification of the osteoblast require not the extract of nacre powder, but nacre chips.

研究分野：天然物化学、有機合成化学

キーワード：カルシウム移動 鳥類 卵殻 リン酸エステル 骨形成 南洋真珠 骨芽細胞 炭酸カルシウム

1. 研究開始当初の背景

(1) 鳥類の卵殻から胚へのカルシウム移動

鳥類の雛の骨形成に必要なカルシウムの80%は卵殻のカルシウムが使われると言われており、胚がカルシウムを取り込む際に炭酸脱水酵素が働いて卵殻を溶かしだし、カルシウム結合タンパク質がエンドサイトーシスによってカルシウムイオンを蔞尿膜から取り込むと言われている。これらは1970年代からカルシウム同位体を用いて調べられ、卵殻から取り込まれたカルシウムイオンが卵黄を経由して吸収されることも明らかとなった。しかし、卵殻の代わりに卵殻構成主成分である炭酸カルシウムを投与してニワトリの体外培養を試みた例では、カルシウム欠乏となるために孵化しないという報告があり、蔞尿膜からの分泌物がカルシウム移動の全てを担っているのではなく、卵殻側にもスムーズなカルシウム移動に寄与するしくみがあると考えられる。そこで、卵殻の物理的構造や炭酸カルシウムと共存する別の成分にカルシウム移動を促進するしくみがあると考えて研究に着手した。

(2) シロチョウガイの石灰化促進効果

南洋真珠(シロチョウガイ)の貝殻片をインプラントとして顎の骨に埋め込むと周りの骨と同化されると言われており、シロチョウガイは古代の整形外科手術に用いられたという。貝殻は炭酸カルシウムを主成分とするため、そのまま移植しても骨の代わりとはならないが、シロチョウガイ粉末は骨芽細胞を活性化して石灰化を促進するという報告があり、このスムーズな同化には骨芽細胞の活性化、免疫の制御、カルシウムの溶解とリン酸カルシウムの再構築と様々な要素を含むと考えられる。フランスの研究グループが10年に渡りこの現象の追及を行っているが具体的な活性物質は不明である。そこで、本研究では(1)と同様にカルシウムの溶解、石灰化の段階に注目し、カルシウムイオンと結合して貝殻から骨芽細胞へのカルシウム取り込みに寄与する有機分子の存在を想定して鍵分子を探索することにした。

2. 研究の目的

2つの研究テーマのいずれも硬組織からのカルシウムの溶解、移動に有機分子が関与すると想定した研究であり、ほとんどが無機物である硬組織からの鍵有機分子の抽出、活性評価、単離方法まで、これまで培った天然物化学の手法に無機分析技術を組み合わせる挑むものである。

(1) 鳥類の卵殻から胚へのカルシウム移動

鳥類の卵殻は内側から外側にかけて層構造になっており、物理的な卵の保護に役立つ

外側に比べて、胚の骨形成の段階では溶解する卵殻内側は物理的な構造が異なることが知られている。そこで、後に溶解する卵殻内側に注目し、硬組織の観察と共に内側のみに存在する有機成分の化学構造を明らかにし、カルシウムの溶解、移動に関わるかを調べることにした。胚の骨形成時期のカルシウムのスムーズな溶解と移動という生物現象に新たに有機分子が関与することが明らかになれば、胚の骨形成という大きなステージのために予め卵殻側に施されたしくみを理解に至ると共に、廃材である卵殻のカルシウム源としての特別な価値を科学的根拠に基づいて証明できる。

(2) シロチョウガイの石灰化促進効果

シロチョウガイの貝殻が骨芽細胞を活性化するという点については、先行研究において様々なアプローチが行われているが、活性物質は未だ明らかとなっていない。一番新しい報告では、水溶性の低分子が骨芽細胞の分化を促進するとあり、本研究では水溶性の有機化合物を扱ってきた経験を活かして水溶性の低分子画分からの活性分子の探索を試みることにした。また、評価方法については、先行研究の方法にとらわれず、貝殻の炭酸カルシウムの溶解と骨芽細胞への移動、石灰化のプロセスに注目し、カルシウムイオンと相互作用の強い有機分子を探索するという切り口でこの生物現象へアプローチすることにした。シロチョウガイのインプラントとしての優れた効果を司る有機分子が特定することで、骨粗鬆症治療への応用などの社会貢献にも繋がると考えている。

3. 研究の方法

(1) 鳥類の卵殻から胚へのカルシウム移動

試料および抽出方法

卵殻内側の観察および卵殻成分の抽出のために、大きくて扱いやすいダチョウの卵を使用した。ダチョウの卵は食用卵および孵化に至らなかった中死卵を用い、胚の成長段階を観察した上で分類して使用した。これらの卵をノコギリで割り、上部から内容物を取り出した。卵殻の観察試料としては、一部を切り取ってそのまま観察、または次亜塩素酸ナトリウム水溶液で処理して卵殻膜を除去して観察した。卵殻内側からの有機成分の抽出方法としては、卵殻に希酢酸を注ぎ、一定時間炭酸カルシウムを溶解させることで行った。また、有機成分の局在を調べるためにこの抽出方法を段階的に行った。

活性評価

炭酸カルシウムのスムーズな溶解と移動に関わる有機成分を絞り込む方法として、カ

ルシウムイオンと相互作用して石灰化を阻害する物質をスクリーニングすることにした。そこで、牡蠣の硬組織からの石灰化阻害物質を調べた先行研究に倣い、炭酸カルシウムが生成する系内に卵殻抽出画分を添加して、炭酸カルシウムの析出に伴う濁度の変化を測定し、濁度の上昇を抑える画分を調べる方法をとった。

顕微鏡観察、マスイメージング

で示した試料について、走査型電子顕微鏡(SEM)および透過型電子顕微鏡(TEM)により観察を行った。4で述べるように、後に有機分子が炭酸カルシウムの結晶系に影響することがわかったため、TEMによる観察では部分的な結晶系の違いをより細かに観察した。また、にて得られた有機分子の硬組織内での分布を可視化する方法としてMALDI-TOF マスイメージングを行った。

有機分子の単離と構造決定

で述べた石灰化阻害試験を指標に有機分子を分離した。まず、酢酸抽出物から酢酸カルシウムを除くために、陽イオン交換を行った。得られた酸性化合物を含む画分の分離方法として、陰イオン交換、ゲルろ過、アミドゲルを検討した。得られた有機分子の構造は ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR およびそれらの二次元スペクトル、マススペクトルにより同定した。また、光学活性化合物については旋光度の文献値との比較および化学合成により標品を得た上で、標品との比較により絶対立体配置を決定した。

(2) シロチョウガイの石灰化促進効果

試料および抽出方法

試料として、真珠業者からご恵与いただいたシロチョウガイの真珠、貝殻の他に、比較としてアコヤガイの真珠、貝殻を用いた。真珠は核の部分を取り除き、すり潰して粉にしたもの、ある程度の大きさでそろえた小片を用意した。これらの試料について、先行研究の方法に倣ってPBS バッファー、水、希酢酸に浸漬して抽出し、溶媒を除去して活性試験に用いた。

活性評価

(1) で示した石灰化阻害試験の系は、その後の調査で炭酸カルシウムの生成やその晶系に与える影響を観察するためにも有用であることがわかったため、(1)と同様の方法で石灰化阻害を示すものを探索した。また、後に研究協力者を得て、マウスの骨芽細胞を用いた分化、石灰化活性試験を実施していただいた。

4. 研究成果

(1) 鳥類の卵殻から胚へのカルシウム移動

石灰化阻害活性試験を指標とした有機分子の探索

本研究に用いた活性試験は、簡便で生物、細胞を扱わない石灰化阻害試験である。この方法では過去に主にタンパク質が得られており、本研究においても活性分子がタンパク質である可能性を考えて、まず陽イオン交換後の画分を透析にて低分子画分と高分子画分に分離した。それぞれの画分について石灰化阻害試験を行ったところ、低分子画分のみ顕著な石灰化阻害活性が見られた。そこで、低分子画分について、陰イオン交換、ゲルろ過、アミドゲルによる分離を試み、炭酸カルシウム以外の主な成分として、リン酸、クエン酸、L-乳酸、リン酸エステル A を得た。単離した各成分について改めて石灰化阻害試験を行ったところ、同じモル濃度ではリン酸エステル A、リン酸、クエン酸の順であり、乳酸には石灰化阻害活性はみられなかった。リン酸エステル A はカビの代謝産物の主成分として得られた報告があるが、鳥類の卵殻から得られた報告はなく、本研究にて初めてその存在を明らかにすることができた。

炭酸カルシウムに対するリン酸エステル A の作用

石灰化阻害活性のあったリン酸およびリン酸エステル A について、石灰化阻害試験の際のセルを観察すると、石灰化を完全に阻害しているわけではなく、析出する炭酸カルシウムの形態が対照と比べて異なることがわかった。これをデジタル顕微鏡で観察すると、サンプルを添加していない対照実験に比べて炭酸カルシウムが丸みを帯び、小さな粒状になっていることがわかった(図1)

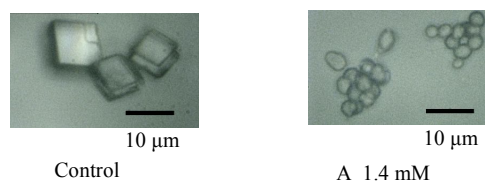


図1 生成した炭酸カルシウムの形状

そこで、リン酸およびリン酸エステル A 共存下で生成した炭酸カルシウムについて粉末 X 線回折法(XRD)による測定を行った結果、リン酸共存の場合ではカルサイト結晶の存在を示す回折ピークが減衰し、リン酸エステル A 共存の場合ではピークが完全に消失していた。これは非晶質炭酸カルシウムの生成が誘起されていることを示している。非晶質の炭酸カルシウムはカルサイト結晶に比

べて水や弱酸への溶解性が高く、バイオミネラル化の分野では、生物が一時的なカルシウムのストックとして非晶質炭酸カルシウムを利用していることが知られている。そこで、卵殻の場合も、特に溶解しやすいところに非晶質の環境をつくり出し、炭酸カルシウムが溶解しやすい状態に保っているのではないかと考え、卵殻内側のみを FIB にてくりぬいた薄片を調製して TEM 観察を行った。その結果、内側表面には丸みを帯びた微小粒子の集まりがあり、その粒子表面は一部非晶質になっていることがわかった(図 2)。

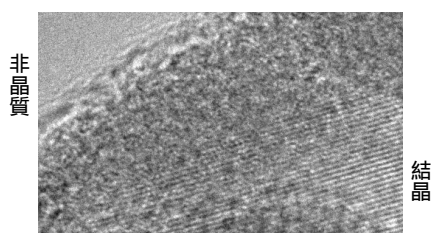


図 2 卵殻内側最表面の TEM 画像

卵殻成分の分布

卵殻内側に非晶質の炭酸カルシウムが存在することで、炭酸カルシウムのスムーズな溶解が起こることが示唆されたため、非晶質を誘起する成分の分布を調べ、それらの非晶質炭酸カルシウム誘起の寄与を調べることにした。まず、「研究方法」で示した卵殻内側の段階抽出によって、本研究で同定された 4 種の化合物について調べた結果、リン酸は全体に分布しているが、内側に特に多く、クエン酸は全体に様に分布、乳酸とリン酸エステル A は内側に局在していることがわかった。また、骨形成後の卵殻について同じ操作を行ったところ、乳酸もリン酸エステル A もほとんど無いことがわかった。乳酸は非晶質の炭酸カルシウムの誘起には寄与しないため、次にリン酸とリン酸エステル A についてさらに詳細な分布を調べるため、MALDI-TOF マスイメージングを行った。卵殻を断面から観察するために切片を作り、マトリックスを噴霧してリン酸およびリン酸エステル A の分子イオンを検出してイメージングしたところ、リン酸は圧倒的な量ではあるが卵殻よりも卵殻膜に多く存在し、卵殻中ではほぼ様に分布することがわかった。一方、リン酸エステル A は卵殻膜には存在せず、卵殻内側表面付近に局在することがわかった(図 3)リン酸エステル A の分布は胚の骨形成時に溶解する範囲と一致していることから、卵殻形成時に予め取り込まれ、脱灰過程でスムーズなカルシウムの溶解に寄与していると言える。

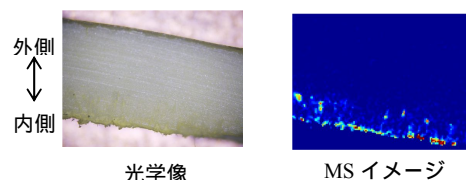


図 3 卵殻断面のマスイメージング画像

ニワトリ、エミュー卵殻のリン酸エステルダチョウの卵殻にはリン酸エステル A が含まれ、それが卵殻内側に局在して非晶質の炭酸カルシウム生成に寄与しているという結果を得たため、鳥類の他の種にも同様のリン酸エステルが含まれているかを調べることにした。市販のニワトリおよびエミューの卵について、ダチョウと同様に内容物を取り除いた卵殻から希酢酸にて抽出し、³¹P NMR のシグナルを指標に分離したところ、ニワトリにもエミューにもリン酸エステル A は含まれておらず、代わりに類縁体であるリン酸エステル B が主成分として存在することがわかった。特にエミュー卵殻にはリン酸エステル B の他にマイナー成分としてリン酸エステル C が含まれており種による違いがある一方で、いずれも構造の近いリン酸エステルを含むため、ダチョウ卵殻の場合と同様の作用を持っている可能性が示唆された。

(2) シロチョウガイの石灰化促進効果

本研究期間内では再現性のよい活性評価法を確立することに注力することとなったが、以下にその概要を述べる。

シロチョウガイ抽出物の石灰化阻害活性

本研究では、ダチョウ卵殻成分探索の際に利用した石灰化阻害試験を指標に活性物質のスクリーニングを試みた。シロチョウガイおよびアコヤガイの真珠および貝殻の部分をバッファー、水、希酢酸にて抽出した抽出物についてそれぞれ石灰化阻害試験を行った。その結果、わずかに活性を示した画分もあったものの、再現性に乏しく、この活性評価方法ではシロチョウガイにまつわる生物現象を司る活性本体の探索には向かないと判断した。

マウスの骨芽細胞を用いた活性評価

本研究期間内に研究協力者を得て、先行研究と同じく骨芽細胞を用いた活性評価を行っていただいた。骨芽細胞の培養液中に抽出物や画分を添加し、培養後にアリザリンレッドによる染色を行った。抽出物や粗精製画分を調製して調べたところ、この方法においても再現性に乏しく、また対象として用いたバッファーのみでも活性が見られるなど疑陽性も考えられた。そこで、現象の再現に立ち

戻り、抽出物ではなくシロチョウガイ貝殻の
小片を培養系内に添加して観察したところ、
再現性よく骨芽細胞が活性化して結節を形
成することがわかった。抽出条件や添加剤を
検討し、シロチョウガイ抽出物ではなく小片
で活性がみられたという原因を探っている。

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 0件)

[学会発表](計 7件)

犀川陽子 (招待講演)「親から子へ
生物界のゆりかごの化学的検証 -」理研シン
ポジウム第11回有機合成化学のフロンテ
ィア、2016年6月24日発表予定、理化学研
究所鈴木梅太郎ホール(埼玉県和光市)

伊藤卓、濱野真理子、加藤優、久保亜紀
子、末松誠、中田雅也、犀川陽子「鳥類の卵
殻から胚へのカルシウム移動に関する化学
的研究」第57回天然有機化合物討論会、2015
年9月11日、神奈川県民ホール(神奈川県
横浜市)

犀川陽子 (招待講演)「生物現象のメ
カニズムに迫る有機分子の探索」岡山大学と
慶應義塾大学の若手交流シンポジウム、2015
年6月26日、慶應義塾大学理工学部(神奈
川県横浜市)

Taku Ito, Suguru Kato, Akiko Kubo,
Makoto Suematsu, Masaya Nakata and Yoko
Saikawa, "Chemical Studies on an Organic
Molecule Responsible for Calcium
Translocation in Ostrich Eggshell" 16th
Tetrahedron Symposium, 2015.6.18, Berlin,
Germany.

犀川陽子 (招待講演)「自然に学ぶ天
然物化学 タマゴの神秘とくしゃみの不思議」
愛媛大学プロテオサイエンスセミナー、
2014年9月8日、愛媛大学医学部(愛媛県東
温市)

伊藤卓、濱野真理子、加藤優、犀川陽子、
中田雅也「鳥類の卵殻におけるリン酸エステ
ルに関する研究」日本化学会第94春季年会、
2014年3月27日、名古屋大学東山キャン
パス(愛知県名古屋市)

犀川陽子 (招待講演)「生物現象のま
だ見ぬ新メカニズムを探る」第一回慶應有機
化学若手シンポジウム、2013年5月11日、
慶應義塾大学理工学部(神奈川県横浜市)

[その他]

ホームページ等

慶應義塾大学理工学部応用化学科天然物有
機化学研究室

<http://www.applc.keio.ac.jp/~msynktxa/index/>

慶應 You Tube 中田・犀川研究室 ユニーク
な構造と機能を持つ天然有機化合物の探索
と合成

https://www.youtube.com/watch?v=eBMDw8Lgi_M

6. 研究組織

(1)研究代表者

犀川 陽子 (SAIKAWA, Yoko)
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号：20348824

(4)研究協力者

末松 誠 (SUEMATSU, Makoto)
慶應義塾大学医学部・教授

久保 亜紀子 (KUBO, Akiko)
慶應義塾大学医学部・講師

今井 祐記 (IMAI, Yuki)
愛媛大学医学部・教授