

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02009

研究課題名(和文) 生体内石灰化におけるvital effectの物理化学的考察

研究課題名(英文) Physicochemical considerations of vital effect in calcification process

研究代表者

川野 潤 (Kawano, Jun)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：40378550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内を模したゲル状物質内で炭酸カルシウムの合成実験を行い、蛍光プローブを用いてゲル内における炭酸カルシウム形成環境のpHおよびイオン濃度を可視化することにより、生体鉱物形成プロセスを物理化学的に理解することを目指した。その結果、ゲル状物質内でイオンが拡散して炭酸カルシウムが形成する過程におけるpH変化を捉えることに成功し、場所によるpH変化の傾向の違いが、形成する結晶の形態の違いに影響を及ぼしていることを示唆した。さらにこの手法を共焦点システムに適用して形成した結晶周囲の局所的なpH変化を捉えることに成功し、多形や形態の違いを局所的な環境変化と関連付けて議論することを可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、ゲル状物質内で結晶が形成する局所的な環境変化を蛍光プローブを用いて可視化する手法を確立できた。このことにより、(1) 結晶多形や形態の違いが生じる要因を、個々の結晶の形成条件と関連づけて議論することが可能になった。(2) 蛍光プローブを用いた可視化手法が、水溶液中だけでなく、ゲル状物質内での反応などに幅広く利用できることが示された。以上により、生体鉱物やその他の結晶形成メカニズムの理解を促進させるのみならず、材料の評価や新素材の開発に利用することで、新たな知見をもたらすことができると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to gain a physicochemical understanding of the biomineral formation process, by visualizing pH or ionic concentration around forming calcium carbonate crystals in the gel media with the fluorescent probes. As a result, the pH change during the process of calcium carbonate formation by double diffusion method within gel media was successfully observed, which would make us discuss the differences in polymorphism and morphology of forming crystals in relation to the local environmental changes.

研究分野：鉱物学、結晶成長学

キーワード：バイオミネラリゼーション 可視化 炭酸カルシウム

### 1. 研究開始当初の背景

生体鉱物には無機条件では出現しないような複雑で美しい組織を示すものが多く、生物活動にとって不可欠な機能が反映されていると考えられる。特にサンゴや二枚貝のような炭酸カルシウムを主成分とする硬組織においては、多形の選択がその機能と直結していると考えられる。そのため、それがどのようにコントロールされているかを知ることは、生物が生体鉱物形成に果たす役割を明らかにすることにつながるが、これまで実現されてこなかった。

複雑な生体鉱物の形成メカニズムを考えるうえで、リファレンスとして無機環境での形成プロセスを理解することは重要であると思われるが、炭酸カルシウム多形の形成過程の解析は、通常水溶液からの形成過程に焦点を置いており、生体内における形成過程と結びつけて考えるためには、微量の有機物を添加する系での実験が行われてきた。しかし、生体内において鉱物形成がおこる環境がこのような水溶液で近似できるかどうかは議論があり、サンゴや二枚貝においてはキチンやタンパク質で構成されるゲル状の物質中で鉱物形成が行われているのではないかと報告もある。このような事実から、従来行われてきたような水溶液環境からの結晶成長実験のみを行っているのみでは不十分であるとして、生体環境を模したものとゲル状の物質中での合成を行う試みも近年行われるようになった。しかしこの手法に関しては、現在までのところ結晶生成に及ぼす拡散を抑制する効果が主に強調されてきており、多形形成に関する議論は少ない。さらに近年、水溶液からの結晶の形成初期過程において、前駆物質として非晶質相が形成したり、従来考えられてきたような核形成・結晶成長の理論では説明できない多様な形成パスが存在するなど、その形成プロセスはこれまで予想されたよりも複雑であることが示されるようになったが、そのようなプロセスとの関わりはほとんど議論されていなかった。

研究代表者の川野は、分担者の豊福と共同で、彼が生体細胞内で行ってきた観察手法を応用し、偏光顕微鏡に独自の工夫を加えた蛍光観察用システムを構築し、蛍光試薬を用いて鉱物が水溶液中で溶解する際の pH および Ca 濃度変化の可視化することに初めて成功した。この手法をゲル状物質内における炭酸カルシウムの形成過程に適用して、結晶形成環境を可視化することにより、生体内環境を想定した炭酸カルシウムの形成メカニズムを議論することが可能となる。

### 2. 研究の目的

以上より本研究においては、生体環境を模したゲル状の物質中における炭酸カルシウム多形の形成過程を解明するために、その形成場を可視化して形成条件を明らかにし、従来 vital effect として現象論的に捉えられてきた生体鉱物形成プロセスを物理化学的に理解することを目的とした。ゲルを用いた結晶成長実験においては、ゲル中におけるイオンの濃度、拡散速度が不明であり、その結果結晶形成が実際に起こっている場所の条件が解析できないという問題があった。条件によって、様々な多形や形態の炭酸カルシウム結晶が形成することが知られており、異なる多形・形態をもつ結晶がごく近傍で形成されることも報告されているが、ゲル内環境の推定が困難であるため、その形成メカニズムは不明であった。本研究においては、pH およびイオン濃度によって蛍光の異なる試薬(蛍光プローブ)を用いて、ゲル内環境の拡散場を可視化することにより、その問題を解決する。特に、多形や形態の異なる結晶近傍の局所的な形成環境の違いを検出することができれば、それらの形成メカニズムを明らかにする手がかりとなりうる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛍光プローブを用いた可視化

形成環境の可視化には、紫外線を照射した際に、pH やイオン濃度によって異なる蛍光を発する蛍光プローブを用いる。本研究においては、pH の可視化は HPTS (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid) を用いた。このプローブを数 10 mM 程度溶液に混合しておくとし、溶液の pH が高いほど、波長 405 nm 付近の紫外光を励起光として照射した場合 520 nm 付近の蛍光強度( $\lambda_{405}$ )が弱くなり、488 nm 付近の励起光を照射した場合と同じ波長の蛍光強度( $\lambda_{488}$ )が強くなる。そのため、この両者の比をとって規格化した  $\lambda_{488}/\lambda_{405}$  の値を既知の pH の溶液で測定して検量線を作成することにより、定量化してイメージングすることができる。これをゲル状物質に適用する場合、pH が既知の溶液をゲルに浸漬した場合と、そのゲルと同じ厚みの溶液は同じ  $\lambda_{488}/\lambda_{405}$  を示すことを確認した。これにより、ゲルと同じ厚みで pH の異なる溶液の  $\lambda_{488}/\lambda_{405}$  を測定したところ、図 1 のような関係が得られ、定量化が可能であることが確認された。ただし、ゲルが厚いほど測定できる pH 範囲が狭くなり、本研究で用いたゲルの場合、約 6~9 であった。これにより、一定時間ごとに波長 405 および 488 nm の紫外線を照射して蛍光像を撮影し、ピクセルごとに上記の検量線に応じた演算を行えば、pH 変化を示す連続画像を得ることができる。

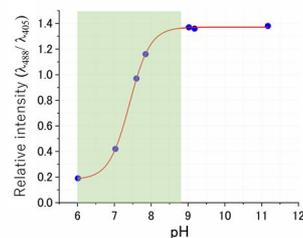


図 1 ゲル状物質内での pH 可視化に用いる検量線

## (2) ゲル内二重拡散法

ゲル状物質内での炭酸カルシウムの合成は、ゲルの両側から Ca イオン源と、CO<sub>3</sub> イオン源の水溶液を拡散させ、両イオンが会合する中央部で結晶を形成させるゲル内二重拡散法を用いて行った(図1)。当初、CO<sub>3</sub> イオン源として Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液を用い、高過飽和状態から非晶質物質が形成する条件での合成実験を想定していたが、キャリブレーションカーブ(図1)から得られた HPTS を用いた場合の pH の適用範囲から外れるため、より低い pH で反応が完結する NaHCO<sub>3</sub> を用いた実験を行うこととし、ゲルおよび反応溶液すべてに HPTS を混合して実験を行った。イオンが両側から拡散して結晶が形成する間、一定時間ごとに、一定間隔でステージをスキャンし、それぞれの場所で紫外線を照射して蛍光強度を測定することにより、pH の可視化を行った。

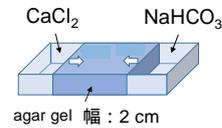


図2 ゲル内二重拡散法の模式図

## (3) レーザー共焦点顕微鏡の利用

上記の実験を蛍光顕微鏡を用いて行った場合、ゲルの厚み分の蛍光強度が積算されて観測されるため、形成した結晶の大きさ程度のスケールでの pH 変化は検出できない可能性がある。そのため、より精密な局所変化を観察するために、北海道大学二コニイメージングセンター設置の高速共焦点レーザー顕微鏡を用い同様の実験を行った。

## 4. 研究成果

HPTS を含有したゲル内で炭酸カルシウムを合成し、その過程における pH 変化を可視化した結果、ゲル状物質の両側から Ca イオンと HCO<sub>3</sub> イオンが拡散して炭酸カルシウムが形成する過程における pH 変化の全貌を捉えることに成功した。すなわち、(1) HCO<sub>3</sub> イオンが拡散する側(図3の右側)から pH が 9 程度まで上昇し、その範囲が徐々に Ca イオン側(図3の左側)に広がっていく。(2)数時間後、ゲルの中央よりやや HCO<sub>3</sub> イオン側に結晶が形成しはじめ、それに伴って pH が低下する。(3)はじめに結晶の形成が起こった場所の両側に結晶が形成しはじめる。ただし、HCO<sub>3</sub> 側では、結晶の形成によって pH が 9 付近から低下するが、Ca イオン側では結晶形成時の pH は 9 より低く、その状態から低下する(図4)。すなわち、HCO<sub>3</sub> により近い側では、HCO<sub>3</sub> の拡散により pH が 9 付近に保たれたのち、Ca イオンが拡散してくることにより結晶の形成が起こるが、Ca イオン側とは結晶が形成する際の Ca/CO<sub>3</sub> 比が異なっていることがわかる。ラマン分光分析を行った結果によると、これらの場所に形成する炭酸カルシウム結晶は、ともにカルサイトである可能性が高いが、図4に見られるように、場所によって主に観察される形態が異なっており、この違いはこのような pH 変化の傾向の違いに起因している可能性がある。

さらに、レーザー共焦点顕微鏡を用いてより高倍率で観察を行った結果、通常蛍光顕微鏡を用いた可視化では検出が困難であった、形成する結晶周囲のわずかな pH の低下が検出できた。この変化は、結晶が多く形成される部分でより明確に観察されるようである。現状で、形態や多形によって異なる傾向を示すかどうかは不明であるが、本研究で結晶周囲での局所的な pH の低下が存在する可能性を示したことは、形成する多形や形態の違いを、局所的な環境変化と関連付けて議論することが可能となる点で大きな意味をもつ。近年進展が見られる画像解析の手法と組み合わせることなどにより詳細な観察を行えば、多形の選択メカニズムをより定量的に捉えることが可能となり、それとの比較により、生体内の石灰化プロセスの理解に大きな進展をもたらすことができる。さらに、本研究で構築した結晶形成環境の可視化手法は、材料の新たな評価手法としても利用可能であり、新たな知見をもたらすことが期待できる。

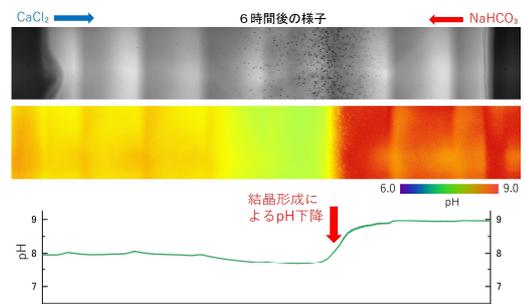


図3 実験開始から6時間後のゲル内の様子(上段)と、可視化された pH(中段)およびそのプロファイル(下段)。

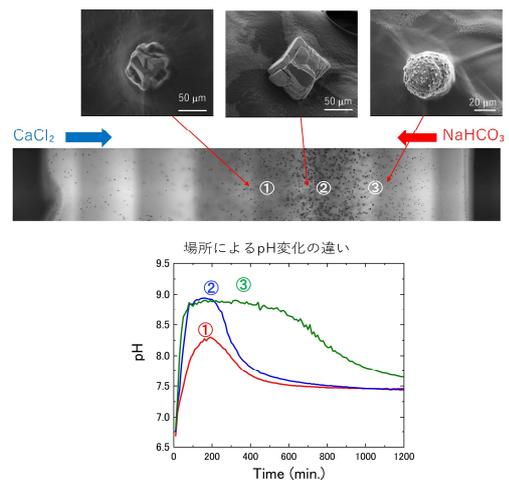


図4 実験開始から20時間後に観察された結晶の形態。ゲルの場所ごとに見られる代表的な二次電子像を示す。下段はその場所ごとでの pH 変化。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 17件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 川野 潤	4. 巻 42
2. 論文標題 無機環境下における炭酸カルシウムの結晶成長をバイオミネラリゼーションにどのように結びつけるか？	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊地球	6. 最初と最後の頁 533-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Saito Ayaka, Kagi Hiroyuki, Marugata Shiho, Komatsu Kazuki, Enomoto Daisuke, Maruyama Koji, Kawano Jun	4. 巻 10
2. 論文標題 Incorporation of Incompatible Strontium and Barium Ions into Calcite (CaCO <sub>3</sub> ) through Amorphous Calcium Carbonate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Minerals	6. 最初と最後の頁 270 ~ 270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/min10030270	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 Kawano Jun, Toyofuku Takashi, Nishimura Kaede, Ueda Akiyuki, Nagai Yukiko, Kawada Sachiko, Teng Henry, Nagai Takaya	4. 巻 19
2. 論文標題 Direct Two-Dimensional Time Series Observation of pH Distribution around Dissolving Calcium Carbonate Crystals in Aqueous Solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Crystal Growth & Design	6. 最初と最後の頁 4212 ~ 4217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.cgd.9b00045	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 該当する
1. 著者名 TANAKA Jun-ya, KAWANO Jun, NAGAI Takaya, TENG Henry	4. 巻 114
2. 論文標題 Transformation process of amorphous magnesium carbonate in aqueous solution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Mineralogical and Petrological Sciences	6. 最初と最後の頁 105 ~ 109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2465/jmps.181119b	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 該当する

〔学会発表〕 計32件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 14件）

1. 発表者名 Jun Kawano, Makoto Yazaki, Yukiko Konno, Takashi Toyofuku, Yukiko Nagai, Takaya Nagai
2. 発表標題 Visualization of Two-Dimensional Distributions of pH and Ca <sup>2+</sup> Concentration Around Dissolving/Forming CaCO <sub>3</sub> Minerals
3. 学会等名 Goldschmidt Conference 2020 virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川野潤
2. 発表標題 水溶液成長における準安定相の形成プロセス：炭酸カルシウムを例として
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会，オンライン（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川野潤
2. 発表標題 バイオミネラル形成における多形選択の要因を探る - 炭酸カルシウムを例として -
3. 学会等名 日本セラミックス協会第33回秋季シンポジウム，オンライン（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川野潤
2. 発表標題 蛍光プローブによる結晶形成/溶解場の可視化
3. 学会等名 令和2年度日本材料学会半導体エレクトロニクス部門委員会第1回特別研究会，愛媛（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川野 潤
2. 発表標題 結晶形成溶解過程におけるpH/イオン濃度変化を可視化する：新たな固液界面反応評価の試み
3. 学会等名 日本粉体工業技術協会晶析分科会2021年度第2回晶析分科会、オンライン（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川野 潤
2. 発表標題 鉱物溶解/成長時の pH およびイオン濃度分布変化を可視化する：蛍光プローブを用いた試み
3. 学会等名 日本地球化学会第68回年会、オンライン（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川野研究室ホームページ <a href="http://www.kawano-lab.com/">http://www.kawano-lab.com/</a>
--

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	鈴木 道生  (Suzuki Michio)  (10647655)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授    (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	豊福 高志  (Toyofuku Takashi)  (30371719)	国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭技術開発プログラム)・主任研究員     (82706)	

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			
中国	天津大学			