

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780216

研究課題名（和文） 海洋細菌の石灰化機構に関わる低分子化合物の探索

研究課題名（英文） The mechanism of calcium carbonate formation by marine bacteria

研究代表者

安元 剛（YASUMOTO KO）

北里大学・海洋生命科学部・講師

研究者番号：00448200

研究成果の概要（和文）：環境から単離した海洋細菌株を用い  $\text{CaCO}_3$  形成能を検討したところ、空気とよく触れるような培養条件が  $\text{CaCO}_3$  形成には重要であることが示唆された。そこで工業的な  $\text{CO}_2$  吸収剤として利用されているアミン系化合物に着目した。生物体内に多く存在する各種ポリアミンを 10 mM  $\text{CaCl}_2$  と混合し一晩静置すると、 $\text{CaCO}_3$  結晶が多量に生じることが明らかとなった。また、海洋細菌の培地上に生じる特徴的な形状をしたカルサイトを、培地成分であるクエン酸三ナトリウムやペプトンを添加することで再現することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Bacteria, including cyanobacteria, as well as some fungi, are known to deposit calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) extracellularly in calcium-containing artificial medium. Despite extensive investigation, the mechanisms involved in extracellular formation of  $\text{CaCO}_3$  by bacteria remain unclear. The ability of synthetic amines to remove carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) from natural gas led us to examine the role of biogenic polyamines in  $\text{CaCO}_3$  deposition by bacteria. Here, we demonstrate that biogenic polyamines do accelerate the formation of  $\text{CaCO}_3$ , suggesting a novel scheme for  $\text{CO}_2$  dissipation that could be a potential tool in reducing atmospheric  $\text{CO}_2$  levels and, therefore, global warming.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：炭酸カルシウム

### 1. 研究開始当初の背景

地球上に存在する炭素のうち約 40%は石灰岩やドロマイトなどの炭酸塩堆積物である。この炭酸塩堆積物は有孔虫や円石藻といった炭酸カルシウム ( $\text{CaCO}_3$ ) 形成を行う海洋生物などの死骸が堆積したものが主である。原始地球の二酸化炭素 ( $\text{CO}_2$ ) は 30 気圧下で 97% に上ると見積もられており、現在の 1 気圧下で 0.03% まで大きく減少してきたことになる。地球の炭素分布から考えても、この  $\text{CO}_2$  減少

には海洋生物による  $\text{CaCO}_3$  形成が大きく関与したことは明らかである。しかし、海洋生物の  $\text{CaCO}_3$  形成は、海水中に溶け込んだ重炭酸イオン ( $\text{HCO}_3^-$ ) を基質とすると考えられており、 $\text{CaCO}_3$  形成に伴いプロトン ( $\text{H}^+$ ) が生じる ( $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}^+$ )。生じた  $\text{H}^+$  は、海水中の炭酸平衡を酸性側に傾けるため二酸化炭素が発生すると推測されている ( $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ )。つまり、この  $\text{CaCO}_3$  形成メカニズムでは  $\text{CO}_2$  濃度を減少させてきた

海洋生物の役割を説明できない。海洋生物の  $\text{CaCO}_3$  形成に関する研究は石灰化組織中の有機基質に着目して行われてきており、アコヤガイのナクレインや円石藻の酸性多糖 PS-2 などが単離、構造解析されてきた。しかし、これらの有機基質に配列上の関連性は見だされておらず、種をまぐような  $\text{CaCO}_3$  形成機構は未だ存在していない。

## 2. 研究の目的

上記の背景から、より普遍的な  $\text{CaCO}_3$  形成メカニズム解明を目的とし、カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) を含む培地上で菌体外に  $\text{CaCO}_3$  顆粒形成を行う海洋細菌に着目した。海洋細菌による  $\text{CaCO}_3$  形成は、硫酸塩還元菌、尿素分解菌および光合成細菌などの特定の種が有する代謝機構によって説明される。しかし、多くの異なる種の海洋細菌が  $\text{CaCO}_3$  顆粒形成を行うことが明らかとなり、上記とは異なる  $\text{CaCO}_3$  形成機構の存在が示唆されている。本研究では、より普遍的な  $\text{CaCO}_3$  形成機構を解明する第一歩として、海洋細菌の菌体外にみられる  $\text{CaCO}_3$  形成機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 深海熱水噴出孔付近の環境及び熱帯域の生物より単離された海洋細菌の  $\text{CaCO}_3$  形成能と 16S rRNA 系統解析を行った。  
 (2) 火力発電所などで排ガス中の  $\text{CO}_2$  回収にアミン系化合物が利用されていることからアミンの持つ  $\text{CO}_2$  との親和性に着目した。生体内に多量に存在するアミンである各種 polyamine (図 1) を 10 mM  $\text{CaCl}_2$  と混合し一晩静置した。また、polyamine の塩基性と  $\text{CaCO}_3$  形成の関係を考察するため、10 mM  $\text{CaCl}_2$  を反応前の polyamine 溶液と同等の pH 11 に NaOH および  $\text{NH}_3$  を用いて調整し、 $\text{CaCO}_3$  形成量を比較した。

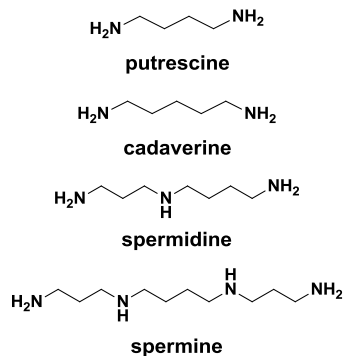


図 1. Biogenic polyamines

(3) 海洋細菌にみられるダンベル状や球状の calcite 結晶 (図 2A) の形成機構を解明するため、培地成分が  $\text{CaCO}_3$  結晶に与える影響を検証した。

(4) 海洋細菌培養液を LC/QTOF 型質量分析計で分析した。  
 (5) NMR を用いて polyamine が  $\text{CO}_2$  を溶液中にどのように取り込むかを解析した。

## 4. 研究成果

(1)  $\alpha$  および  $\gamma$ -プロテオバクテリア、バチルスまたは放線菌といった広範な菌種で  $\text{CaCO}_3$  形成を確認した。培養条件による  $\text{CaCO}_3$  形成能の変化について検討した結果、空気とより接触するような条件で、 $\text{CaCO}_3$  形成が促進された。すなわち、海洋細菌の培地中に形成される  $\text{CaCO}_3$  の炭素源は培地由来ではなく空気中の  $\text{CO}_2$  であることが示唆された。

(2) 各種 polyamine を 10 mM  $\text{CaCl}_2$  と混合し一晩静置したところ、その水溶液から多量の  $\text{CaCO}_3$  結晶が生じ、溶液中  $\text{Ca}^{2+}$  が 90% 以上減少することを発見した。この溶液には炭酸源は添加しておらず、生じた  $\text{CaCO}_3$  は空気中の  $\text{CO}_2$  を炭素源としている。

NaOH を用いて調整した  $\text{CaCl}_2$  溶液からは  $\text{CaCO}_3$  はほとんど生じなかった。 $\text{NH}_3$  で調整した  $\text{CaCl}_2$  溶液からは僅かに  $\text{CaCO}_3$  結晶が見られたが、ポリアミンによる石灰化反応は反応溶液が塩基性であるためではないことが明らかになった。また、この石灰化反応の最適温度は  $40^\circ\text{C}$  付近であることもわかった。

(3) クエン酸塩やペプトンを添加することで bacterial calcite を再現することに成功した (図 2)。

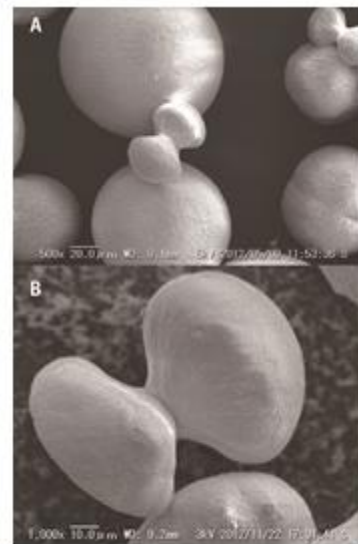


図 2. Scanning electron microscopy (SEM) images of  $\text{CaCO}_3$  crystals. A) bacterial calcite. B) Synthetic calcite using polyamine and peptone.

(4) 代表的な polyamine のほかに新規な誘導体を検出することに成功した。

(5) NMR 解析の結果、末端の 1 級アミンが徐々にカルバメイト体となった後、水と徐々に反応して  $\text{HCO}_3^-$  が生じることが明らかになった。Polyamine は分子内に複数のアミノ基を有するため非常に効率よく  $\text{CO}_2$  を取り込むことが出来ることが明らかになった。

以上の結果をまとめると、polyamine 存在下での顕著な  $\text{CaCO}_3$  形成反応は、アミノ基が空気中の  $\text{CO}_2$  と結合してカルバメイト誘導体となり(図 3)、カルバメイト誘導体が徐々に水と反応して  $\text{HCO}_3^-$  が生じ、溶液中の  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  濃度が上昇して  $\text{CaCO}_3$  が沈殿するというメカニズムが強く示唆された。細菌は polyamine を特に多量に生産することが知られており、細菌のコロニー付近で bacterial calcite が生じることから、海洋細菌の産生した polyamine が  $\text{CaCO}_3$  顆粒形成に重要な役割を果たしているかと推定できる。

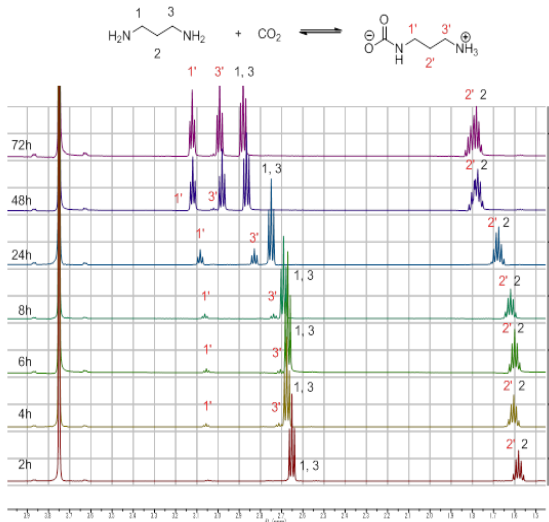


図 3.  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) spectra of atmospheric  $\text{CO}_2$  absorption with 50 mM 1,3-propanediamine in  $\text{D}_2\text{O}$  at room temperature for 72 hours. An external standard of 1,4-dioxane was added to each NMR sample.

本研究は polyamine と  $\text{CO}_2$  の親和性を指摘した初めての報告である。Polyamine は全ての生物の細胞内に  $\text{Mg}^{2+}$  に次ぐ高濃度で存在する低分子化合物で、細胞の増殖や分化に必須だが、その生理的役割には不明な点が多かった。他方、海洋生物の石灰化反応に必要であると推定されている無機炭素の濃縮機構は未だ発見されていない。Polyamine のトランスポーターはすでに発見されており、polyamine が  $\text{CO}_2$  を能動的に取り込み、無機炭素を濃縮する機構が存在している可能性は高い。また、polyamine による石灰化反応

は、空気中の  $\text{CO}_2$  を能動的に取り込んでいるため、海洋生物の石灰化が  $\text{CO}_2$  を固定であると分子レベルで証明できる可能性がある。現在、人為的に放出された  $\text{CO}_2$  (80 億 C トン)のうち、19 億 C トンの行方がわかっていない。海洋生物の石灰化が  $\text{CO}_2$  放出とされているため、 $\text{CO}_2$  の固定量が過小評価されているのではないだろうか。現在、我々は polyamine が植物の個葉レベルの光合成量を顕著に増加させるとも新たに見出している。地球上の全炭素のうち約 4 割は石灰岩などの炭酸塩堆積物で、残りの 6 割は石油や石炭など主に光合成によって固定されたと考えられている有機炭素である。Polyamine が地球の炭素循環において非常に重要な役割を果たしている可能性は大きい。

### 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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 安元 剛, 廣瀬美奈, 村田 龍, 佐藤駿一、神保 充, 大島泰克: 海洋細菌の石灰化機構に関する研究; 2012 年 5 月、第 26 回海洋生物活性談話会、鹿児島(口頭)
- ② 海洋細菌の石灰化機構に関する研究 その 1: 村田 龍, 安元 剛, 佐藤駿一、廣瀬(安元)美奈、大島泰克、神保 充、渡部終五; 平成 24 年度日本水産学会秋季大会、2012 年 9 月、山口(ポスター)
- ③ 海洋細菌の石灰化機構に関する研究 その 2: 佐藤駿一、安元 剛、村田 龍、廣瀬(安元)美奈、大島泰克、神保 充、渡部終五; 平成 24 年度日本水産学会秋季大会、2012 年 9 月、山口(ポスター)
- ④ 安元 剛, 廣瀬美奈, 村田 龍, 佐藤駿一、神保 充, 大島泰克、渡部終五: 海洋細菌のカルサイト顆粒形成メカニズム; 第 7 回バイオミネラリーゼーションワークショップ、2012 年 12 月、東京(口頭、ポスター)
- ⑤ 安元 剛、村田 龍、佐藤駿一、廣瀬(安元)美奈、池田大介、神保 充・渡部終五: 海洋細菌の石灰化機構に関する研究、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月、東京(口頭)
- ⑥ 安元 剛、廣瀬(安元)美奈、村田 龍、安元 純、安元(森)加奈未、神保 充、渡部終五: ポリアミンは  $\text{CO}_2$  を捕捉し石灰化を促進する、第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会、2013 年 6 月、沖縄、シンポジウム

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：空気中の二酸化炭素を用いたアルカリ  
土類金属炭酸塩の製造方法とその利用  
発明者：安元 剛，廣瀬美奈  
権利者：学校法人北里研究所  
種類：特願  
番号：2011-165398  
出願年月日：平成 24 年 7 月 30 日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安元 剛 (YASUMOTO KO)  
北里大学・海洋生命科学部・講師  
研究者番号：00448200

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし