

サンゴの骨格形成過程で生じる結晶微粒子を可視化

大野 良和¹・高橋 有南¹・堤 元佐²・窪田 梓^{1,3}・井口 亮^{4,5}・飯島 真理子^{4,6}・
水澤 奈々美¹・中村 崇⁷・鈴木 淳^{4,5}・鈴木 道生⁸・安元 純⁹・
渡部 終五¹・酒井 一彦¹⁰・根本 知己²・安元 剛¹

※本稿は、2024年8月21日に行ったプレス発表 (https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2024/pr20240821_2/pr20240821_2.html) に加筆し、再編したものです。

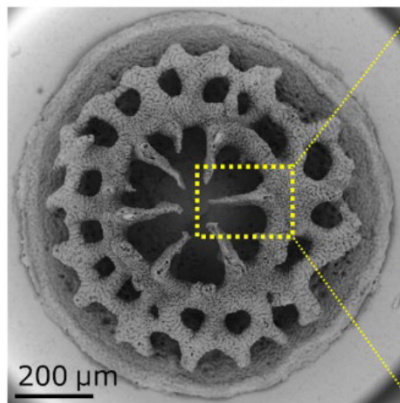
1. はじめに

造礁サンゴは炭酸カルシウムを主成分とした立体的な骨格を作ります。サンゴの表面に分布するポリプで、垂直方向に成長する骨格は隔壁(第1図)と呼ばれ、サンゴ種の判別にも用いられる重要な部位です。サンゴ骨格の形態形成に参与する成長部には石灰化中心(Cuif and Dauphin, 1998)が存在し、隔壁の形成に関係することも地球化学的な観点から研究が進んでいました。特に、塊状のハマサンゴの仲間は、骨格に年輪を刻みながら成長するため、数百年間の環境記録を保持し、骨格中の微量元素を分析することで、古環境の復元(過去の海洋のpH、温度、イオン組成など)に利用されています。最近では人為的要因による温暖化に伴い海水温が上昇傾向にあることが報告されま

した(Stolarski, 2003)。

サンゴは周囲の海水からミネラルを濃縮し、炭酸カルシウム骨格を形成しますが、このメカニズムについてもいまだ分からないことが多くあります。石灰化中心と呼ばれる部位は、生物作用が大きく、骨格の形態形成を制御する重要な部位であることは古くから知られていました。1990年代に入ると、分析技術の発展により、生物作用の大きい石灰化中心は、その他の骨格部位に比べてイオン組成が異なることが明らかになっていました(Inoue *et al.*, 2023)。最近では、サンゴ骨格中の微量元素組成を高解像に分析する手法が発展していますが、実際に生体のサンゴを用いて、石灰化中心の骨格形成過程を可視化した研究例はありませんでした。

サンゴ骨格の表面画像 (SEM)



隔壁の拡大写真



第1図 サンゴ稚ポリプの骨格表面と隔壁の電子顕微鏡 (SEM) 写真。サンゴ骨格の表面構造を観察するために、電子顕微鏡観察が使用される。サンゴ骨格のみを上から観察すると、稚ポリプの中心部には放射状の立体構造(隔壁)が観察できる。右図は隔壁の一部を拡大したもので、周囲の骨格は凸凹とした微細構造も観察できる。

- 1 北里大学 海洋生命科学部 〒252-0329 神奈川県相模原市南区北里1丁目15-1、岡山大学 学術研究院環境生命科学学域 〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中3-1-1
- 2 自然科学研究機構 生命創成探究センター／生理学研究所 〒444-0864 愛知県岡崎市明大寺町東山5-1、防衛医科大学校 医用工学講座 〒359-8513 埼玉県所沢市並木3丁目2番地
- 3 日本電子株式会社 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3丁目1番2号
- 4 産総研 環境調和型産業技術研究ラボ
- 5 産総研 地質調査総合センター地質情報研究部門

- 6 産総研 地質調査総合センター地圏資源環境研究部門
- 7 琉球大学 大学院理工学研究科海洋自然科学専攻／海洋環境学専攻 〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原1番地
- 8 東京大学 大学院農学生命科学研究科 〒113-0032 東京都文京区弥生1丁目1-1
- 9 琉球大学 農学部地域農業工学科 〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原1番地
- 10 琉球大学 熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設 〒905-0227 沖縄県国頭郡本部町瀬底3422

キーワード：サンゴ、骨格形成、隔壁、石灰化中心、偏光顕微鏡、2光子励起顕微鏡

2. 成果の概要

コユビミドリイシ (*Acropora digitifera*) のサンゴ稚ポリプをガラス基板に着底させ、偏光顕微鏡を用いて骨格形成過程の様子を数日間撮影することに成功しました。偏光顕微鏡による生体の観察は一般的ではありませんが、サンゴ底盤に出現する薄い炭酸カルシウム結晶を観察対象とした場合は、生体に比べて高い偏光特性を有するため、微結晶の観察をすることができると分かりました。

本研究ではサンゴポリプ着底部で直径数 μm の微粒子の出現を起点とした、石灰化中心の形成過程を撮影することにしました(第2図)。画像解析により、石灰化中心が形成される際、造骨細胞の周囲や間隙で、まず急速降着前線堆積物(Rapid accretion deposit: RAD)と呼ばれる小さな微粒子が形成され、その後、繊維状の炭酸カルシウム結晶が成長すること(Thickening deposit: TD)が分かりました。そして、この2つの過程には、別々のメカニズムが関与していることも報告しました。

さらに、ポリプの生体内で隔壁を Calcein という蛍光色素試薬で染色し、微粒子の動態を画像解析することにも成功しました。Calcein は様々な生物種の硬組織の染色に使用されており、サンゴにおいても細胞毒性の少ない試薬として報告されています。

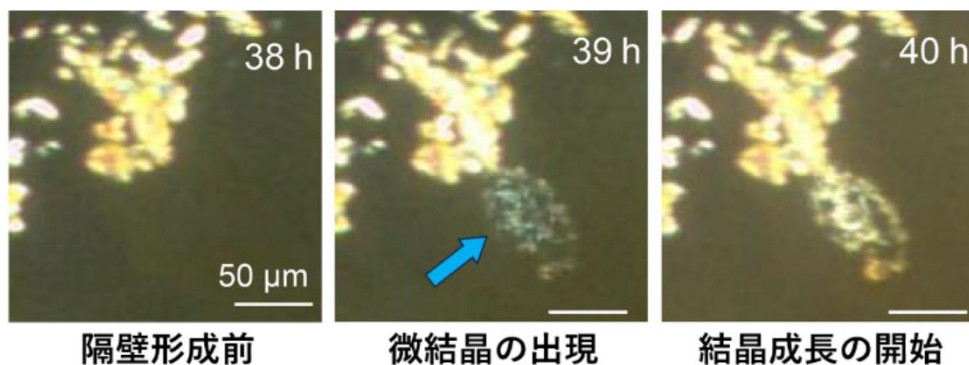
2光子顕微鏡による骨格の観察例も海洋無脊椎動物では初めて報告することができました。一般的な共焦点顕微鏡レーザーは、蛍光顕微鏡に比べ、レーザーにより1光子により蛍光物質を励起させ、ピンホールを通過した蛍光を検出し焦点面でピンボケの少ない画像を取得することができます。

一方で、2光子顕微鏡は神経医学分野で発達してきた顕

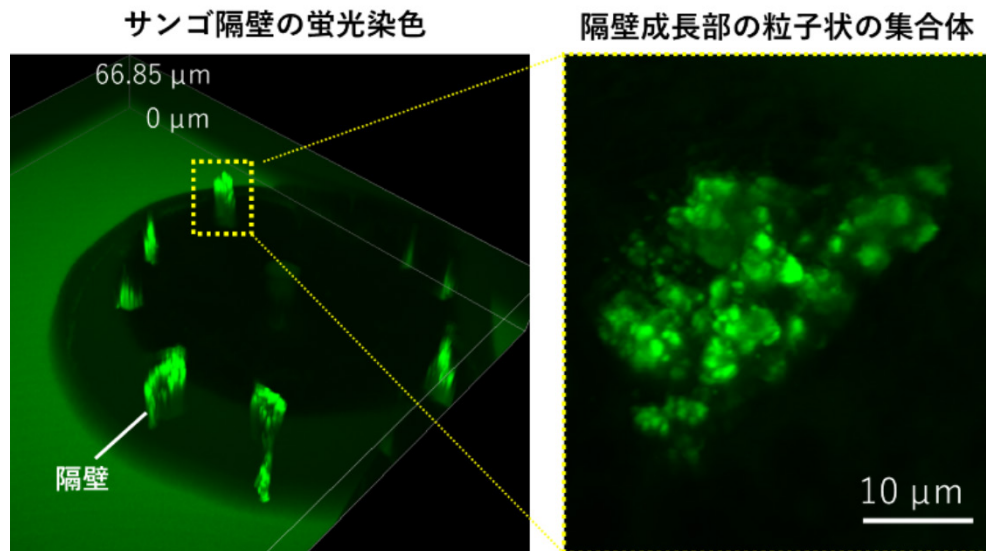
微鏡で、近赤外線(NIR)の超短パルスレーザーが用いられます。2光子顕微鏡下では、約100フェムト秒のパルス幅でレーザーをレンズで集光することで、焦点のみで光の密度が異常に強くなり、2つの光子が同時に蛍光分子に吸収され、励起現象が発生します。本研究では、920 nm で Calcein を励起させ、緑色の蛍光画像を上方の口側から取得しました(第3図)。近赤外光は生体観察において散乱にも強く、外胚葉と内胚葉の口腔側と着底部までの合計4層を NIR が骨格表面まで貫通し、低侵襲で骨格を観察できたこととなります。画像解析から、隔壁の石灰化中心も、1 μm 以下の微粒子で構成されており、微粒子が付着しながら隔壁が成長する様子が明らかになりました。

3. 今後の展望

本研究のように、生体のサンゴを顕微鏡により観察する手法の開発は、サンゴを生理学的に理解する上で必要不可欠と言えます。本研究で用いた2光子顕微鏡観察という生体イメージング技術を用いることで、サンゴのみならず、様々な海洋生物の生理現象の理解につながります。最近では、骨格形成部位でのカルシウムイオンや炭酸イオンの化学反応に加え、サンゴの骨格成長の促進には炭酸カルシウム骨格の前駆体となる非結晶構造(アモルファス構造)が重要であることが、国際的に議論されるようになりました。また、骨格成長界面で、どのような物理・化学現象が起こっているのかの議論も深まっています(Gilbert *et al.*, 2022)。サンゴの生体を対象にした、イメージング技術の発展により、サンゴの骨格形成メカニズムが明らかになることが期待されます。



第2図 隔壁の石灰化中心の形成過程。生体の稚ポリプの着底部(底部)を偏光顕微鏡で観察したところ、周りの黄色く見える結晶とは異なり、青白い小さな結晶が出現した(観察開始39時間後)。その後、隔壁が形成される様子を動画記録した。



第3図 2光子顕微鏡による隔壁成長部の微粒子の可視化。隔壁を特異的に染色し、サンゴ稚ポリプの上方から体内の隔壁形成の様子を2光子顕微鏡で観察を行った。右の写真は隔壁先端部の厚さ約40 μmの立体構造で、隔壁成長面では直径1 μm以下の微粒子が動く様子も報告した。

謝辞：本研究は、産総研環境調和型産業技術研究ラボ(E-code)、日本学術振興会科研費(23K14222, 23H00339, JP22H04926)、環境省・(独)環境再生保全機構の環境研究総合推進費(JPMEERF20221C01)、総合地球環境学研究所(RIHN14200145)、新エネルギー・産業技術総合開発機構、先端バイオイメージング支援プラットフォームによる支援を受けて行われました。

文 献

Cuif, J. P. and Dauphin, Y. (1998) Microstructural and physico-chemical characterization of 'centers of calcification' in septa of some Recent scleractinian corals. *Paläontologische Zeitschrift*, **72**, 257–269.

Gilbert, P. U. P. A., Bergmann, K. D., Boekelheide, N., Tambutté, S., Mass, T., Marin, F., Adkins, J. F., Erez, J., Gilbert, B., Knutson, V., Cantine, M., Hernández, J. O. and Knoll, A. H. (2022) Biomineralization: Integrating mechanism and evolutionary history. *Science Advances*, **8**, eabl9653.

Inoue, M., Fukushima, A., Chihara, M., Genda, A., Ikehara, M., Okai, T., Kawahata, H., Siringan, F. P. and Suzuki, A. (2023) Natural and anthropogenic climate variability signals in a 237-year-long coral record from the Philippines. *Paleoceanography and Paleoclimatology*, **38**, e2022PA004540.

Stolarski, J. (2003) Three-dimensional micro- and nanostructural characteristics of the scleractinian coral skeleton: a biocalcification proxy. *Acta Palaeontologica Polonica*, **48**, 497–530.

OHNO Yoshikazu, TAKAHASHI Anan, TSUTSUMI Motosuke, KUBOTA Azusa, IGUCHI Akira, IJIMA Mariko, MIZUSAWA Nanami, NAKAMURA Takashi, SUZUKI Atsushi, SUZUKI Michio, YASUMOTO Jun, WATABE Shugo, SAKAI Kazuhiko, NEMOTO Tomomi and YASUMOTO Ko (2025) Live imaging of center of calcification formation during septum development in primary polyps of *Acropora digitifera*.

(受付：2024年9月2日)