

## 大型石灰藻に含まれる特殊な Ca 結合物質に関する研究

### I. 生藻体への $^{45}\text{Ca}$ のとり込みと特殊 Ca 結合物質の抽出

御園生 拓\*・岡崎 恵視\*・西澤 一俊\*\*

\* 東京学芸大学生物学教室 (184 小金井市貫井北町 4-1-1)

\*\* 日本大学農獣医学部水産学科 (154 世田谷区下馬 3-34-1)

MISONOU, T., OKAZAKI, M. and NISIZAWA, K. 1980. Particular Ca-binding substances in marine macro-algae. I. Uptake of  $^{45}\text{Ca}$  by various algae and extraction of the Ca-binding substances. Jap. J. Phycol. 28: 31-36.

Experiments were carried out for studying the roles of Ca-binding substances in special regard to the algal calcification mechanism.

(1) Three species of calcareous algae (*Serraticardia maxima*, *Galaxaura fastigiata* and *Halimeda discoidea*) and five species of non-calcareous algae (*Chondrus verrucosus*, *Gelidium amansii*, *Ulva pertusa*, *Padina arborescens* and *Eklonia cava*) were used as experimental materials. (2) Fronds were incubated in sea water containing  $^{45}\text{Ca}$  in the light (12,000 lux) or in the dark for 24 hrs at 15°C. The uptakes of  $^{45}\text{Ca}$  by the fronds were slightly or even 2.7 times higher in the light than in the dark. (3) The fronds thus incubated were extracted with 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.3) or 2M-KCl in the same buffer. In the gel-filtration of the extracts on a Sephadex G-75 column,  $^{45}\text{Ca}$ -binding substances were found in higher molecular regions of the eluates from only the two calcareous algae, *S. maxima* and *H. discoidea*, among the algae tested. (4) Major portions of  $^{45}\text{Ca}$  taken up by the fronds remained in the residues of most of non-calcareous algae after extraction of the fronds with 0.05 M Tris-HCl buffer, although further investigations of these residual  $^{45}\text{Ca}$  were not carried out in the present work.

These results suggest that particular Ca-binding substances occur in at least some calcareous marine algae and that they seem to be a kind of polysaccharides, although the chemical properties were not investigated in this work.

*Key Index Words:* Ca-binding substance, calcareous algae, calcification, Galaxaura, Halimeda, Serraticardia.

*Taku Misonou and Megumi Okazaki, Department of Biology, Tokyo Gakugei University, Koganei-shi, Tokyo, 184 Japan; Kazutosi Nisizawa, Department of Fisheries, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Shimouma-3, Setagaya, Tokyo, 154 Japan.*

藻類の石灰化機構の解明には、(1)石灰化開始部位への  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{CO}_3^{2-}$  の供給のされかた、(2)炭酸カルシウムの結晶型をアラレ石もしくは方解石のいずれかに誘導する機作、(3)炭酸カルシウムの結晶形態が藻種により塊状、棒状、針状等になる理由、などの諸点に注目しなくてはならない。これらは単に石灰藻に限らず動物を含めた生物界の石灰化機構を解明する上で重要な問題である。

岡崎らは既に(1)については、石灰化開始部位の形態及び微細構造の観察(宮田他1977, 岡崎他1977, 岡崎1979)や  $\text{Ca}^{2+}$  の能動輸送系の検討(OKAZAKI 1977)などを行ってきた。

また(2)の問題に関しては、最近石灰化部位又はその開始部位にみられる Ca 結合物質が注目されている。脊椎動物の骨組織中(BOSKEY & POSNER 1977)やリン酸カルシウムを沈着するある種の細菌(TAKAZOE

*et al.* 1970) に見い出された Ca 結合能力をもつ酸性リン脂質は、準安定なリン酸カルシウム溶液中からリン酸カルシウムの水酸化カルシウム結晶を誘導することが *in vitro* の実験で証明されている。また軟体動物の貝殻中にも Ca 結合タンパク質が存在することが明らかになっている (CRENSHAW 1977)。一方石灰藻においては、DEJONG *et al.* (1976) が単細胞石灰藻である円石藻の炭酸カルシウムの殻 (coccolith) から  $\text{Ca}^{2+}$  を特異的に結合する多糖類を発見し、この物質が芯となって結晶が生長する可能性を示唆した。これらの物質はその分子上に  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{PO}_4^{3-}$  (又は  $\text{CO}_3^{2-}$ ) を濃縮し、特定の結晶型を反映する位置関係に配列して、結晶化に必要な核となり、結晶の配向性重複成長 (エピタキシー) を誘起するものと考えられている。

しかし、この種の研究は大型石灰藻においてはほとんど行なわれておらず、ただ BÖHM (1973) が石灰緑藻サボテングサから Ca 結合能のある多糖類の抽出に成功しているにすぎない。そこで著者らは放射性の  $^{45}\text{Ca}$  を用いて、海産大型石灰藻 3 種及び同非石灰藻 5 種について藻体有機物中への  $^{45}\text{Ca}$  のとり込みと Ca 結合物質の抽出を検討した。

## 材料及び方法

**材料** 実験に用いた海藻は、静岡県下田市鍋田湾及び爪木崎で 1975 年 12 月から 1976 年 10 月にかけて採集した。藻の種類は、紅藻のオオシコロ (*Serraticardia maxima* (YENDO) SILVA), ガラガラ (*Galaxaura fastigiata* DECAISNE), イボツノマタ (*Chondrus verrucosus* MIKAMI), マクサ (*Gelidium amansii* LAMOUROUX), 緑藻のウチワサボテングサ (*Halimeda discoidea* DECAISNE), アナアオサ (*Ulva pertusa* KJELLMAN), 褐藻のウミウチワ (*Padina arborescens* HOLMES), カジメ (*Eklonia cava* KJELLMAN) の 8 種類である。このうちオオシコロ、ガラガラ及びウチワサボテングサの 3 種は石灰藻である。

採集したこれらの藻体の一部を明期 (約 2,000 lux の蛍光灯照射下) 12 時間・暗期 12 時間、15°C の条件下で人工海水 (Jamarin) 中で培養し、一週間以内に実験に使用した。

**$^{45}\text{Ca}$  を含む海水中的での培養** 各種生藻体を 10 g ずつとり、1 mCi/10 ℓ になるように  $^{45}\text{Ca}$  を加えた人工海水 1 ℓ 中で明所及び暗所 (ウミウチワとカジメは明所のみ) 15°C で 24 時間培養を行ない藻体に  $^{45}\text{Ca}$  をとり込ませた。明所培養では藻体を 20 W の蛍光灯 5 本 (12,000 lux) で照射した。培養後藻体を  $^{45}\text{Ca}$  を含まぬ

人工海水で洗い、藻体に付着した余分の海水をペーパータオルで吸いとり、シャーレ中に 5°C で一時保存した。

**各種藻体への  $^{45}\text{Ca}$  とり込み量の測定**  $^{45}\text{Ca}$  をとり込ませた藻体 1 g に 2N-HCl を 10 ml 加え、20°C で 24 時間放置後、東洋濾紙 No. 2 で濾過した。濾液 0.1 ml をステンレスの試料皿にとり乾燥させ、ガスフローカウンターで  $^{45}\text{Ca}$  の放射能を測定した。この値を藻体への  $^{45}\text{Ca}$  総とり込み量として、生藻体 1 g あたりの cpm で表した。

**Ca 結合物質の抽出とゲル濾過による分画** 各種藻体の明所及び暗所で培養したものをそれぞれ 4 g とり、0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.3) 又は同緩衝液に 2 M-KCl を含む溶液 (以後 2 M-KCl 溶液と呼ぶ) を 10 ml 加えてホモジナイザーで 30 分間藻体をすりつぶした。すりつぶし難い藻体では抽出溶媒を適量増した。この磨砕物を 12,000 × g, 10 分間遠心分離して上清を集め、その上清の 0.1 ml をとり  $^{45}\text{Ca}$  の放射能を上記の方法により測定した。この値を可溶性の  $^{45}\text{Ca}$  の量として生藻体 1 g あたりの cpm で表し、また上記で得た藻体への  $^{45}\text{Ca}$  の総とり込み量からこの可溶性  $^{45}\text{Ca}$  量を差引いた値を藻体に結合した不溶性  $^{45}\text{Ca}$  量とした。

次にこうして得た各藻体からの抽出上清液 2 ml を上記緩衝液又は 2M-KCl 溶液で平衡化した Sephadex G-75 カラム (1.5 × 40 cm) にのせ、平衡化に使用した溶液と同じもので流出し 5 ml ずつ分画した。各分画につきその  $^{45}\text{Ca}$  の放射能、タンパク質量及び糖量を測定した。 $^{45}\text{Ca}$  の放射能は 0.1 ml を試料皿にとり前述の方法によって、タンパク質は 280 nm の紫外部吸収により、また糖はフェノール硫酸法によって定量した。

## 結 果

**明所・暗所における各種藻体への  $^{45}\text{Ca}$  とり込み**  $^{45}\text{Ca}$  を含む海水中で明所又は暗所で 24 時間培養した各種藻体の  $^{45}\text{Ca}$  の総とり込み量 (生藻体 1 g あたりの cpm) を Table 1 に示した。石灰藻は一般に明所では暗所よりとり込みが多少多い傾向がみられたが、特にウチワサボテングサにおいては明所で暗所の 3 倍弱のとり込みがみられた。しかし、マクサは非石灰藻ではあるがこの傾向がみられた。褐藻ウミウチワ及びカジメについては暗所のとり込み実験は行なわなかったが、両種とも非石灰藻であるが、 $^{45}\text{Ca}$  のとり込みの絶対量は著しく高い。

Table 1. Total uptake of  $^{45}\text{Ca}$  in the light and in the dark by various marine algae

Species	In the light** (cpm/g wet fr.)	In the dark** (cpm/g wet fr.)	Ratio (L/D)
<i>Serraticardia maxima</i> *	193,269	160,310	1.21
<i>Galaxaura fastigiata</i> *	169,395	116,380	1.46
<i>Chondrus verrucosus</i>	63,000	57,930	1.09
<i>Gelidium amansii</i>	53,300	42,500	1.25
<i>Halimeda discoidea</i> *	73,876	26,933	2.74
<i>Ulva pertusa</i>	67,200	72,640	0.93
<i>Padina arborescens</i>	343,680	—	—
<i>Eklonia cava</i>	294,030	—	—

\* Calcareous algae.

\*\* Algal fronds were cultured at 15°C in the light (at 12,000 lux) or in the dark for 24 hrs.

石灰紅藻においては、明・暗いずれの条件下でも  $^{45}\text{Ca}$  のとり込みが非石灰紅藻より高い。これはその炭酸カルシウムへのとり込みが原因のように思われる。

Ca 結合物質の抽出とゲル濾過による分画 緩衝液または 2M 塩化カリウムでの抽出液中に高分子の特殊 Ca 結合物質が存在するか否かを調べるために、それぞれの抽出液を Sephadex G-75 によりゲル濾過した。その結果をオオシコロ・ガラガラについては Fig. 1 に、イボツノマタ・マクサは Fig. 2 に、ウチワサボテングサ・アナアオサは Fig. 3 に、ウミウチワ・カジメは Fig. 4 にそれぞれ示した。

最も顕著な放射能は主として遊離の  $^{45}\text{Ca}$  を示す画分 (Vi) にみられた。Vi の位置は、2M 塩化カリウム溶液では、その比重が大きいので緩衝液による溶出に比べて少しおくれてくる。石灰紅藻オオシコロと石灰緑藻ウチワサボテングサについては、2M 塩化カリウムの抽出液中に Vo に相当する画分 (Frac. No. 3~5) は高分子の特殊  $^{45}\text{Ca}$  結合物質と思われるものを含んでいた。しかし緩衝液抽出ではその様な結合物質は溶出してこない。恐らく緩衝液では可溶化されないものと思われる。オオシコロに関しては、別の藻体を用いて異なるサイズのカラム (2.6×40 cm) で同様の実験を行なったところ、やはり 2M 塩化カリウム抽出液中に同様な  $^{45}\text{Ca}$  結合高分子物質が溶出してきた (Fig. 5)。

紅藻イボツノマタ・マクサ (Figs. 2a, b) 及び褐藻カジメ (Fig. 4) からの緩衝液抽出液の Vo と Vi の間に  $^{45}\text{Ca}$  のピークがみられるが、この緩衝液抽出液を同緩衝液で 5 倍に希釈して再びカラムにかけると全て Vi の位置にピークが移動した (Fig. 6)。従って、これらの抽出液中には、オオシコロからの特殊  $^{45}\text{Ca}$  結合物質のような物質が存在するのではなく、抽出液中の粘

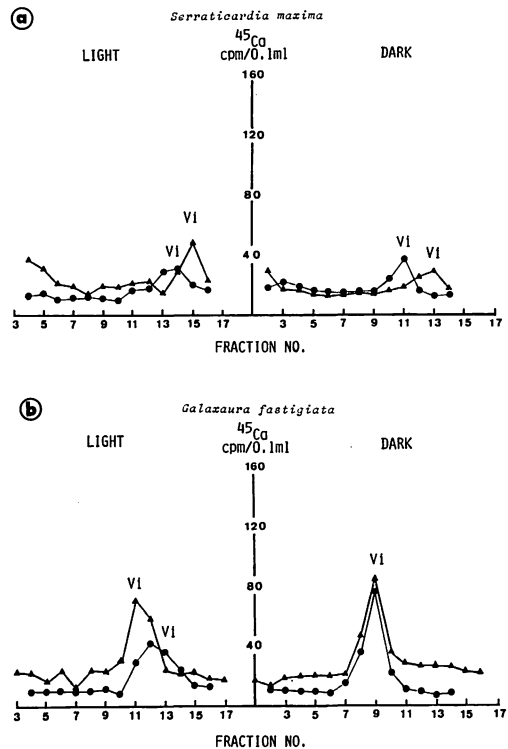


Fig. 1. Gel-filtration on Sephadex G-75 of extracts from calcareous red algae, *S. maxima* (a) and *G. fastigiata* (b).

Light, the fronds cultured in the light; Dark, the fronds cultured in the dark;  $\bullet$ - $\bullet$ - extract with 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.3);  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ - extract with 2M-KCl in the same buffer; Vi, innervolume of a column; Column size, 1.5×40 cm; Fraction volume, 5.0 ml; Temperature 20°C. The column was eluted with 0.05 M Tris-HCl buffer or 2M-KCl in the same buffer, corresponding to the kind of the extraction medium.

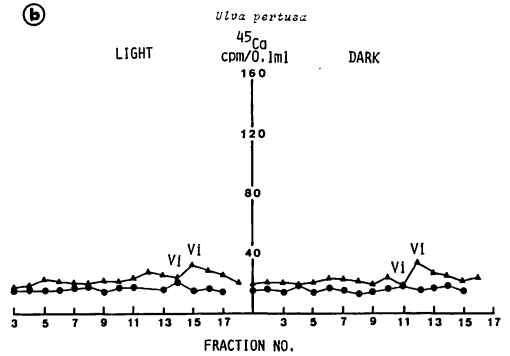
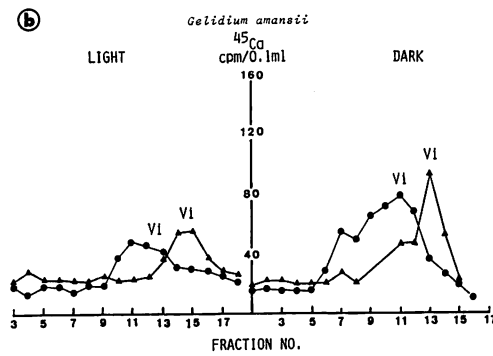
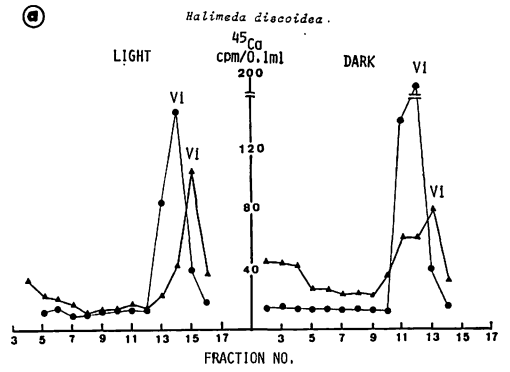
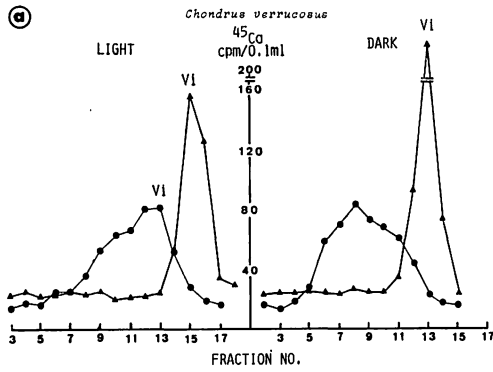


Fig. 2. Gel-filtration on Sephadex G-75 of extracts from non-calcareous red algae, *C. verrucosus* (a) and *G. amansii* (b). For other explanations, see Fig. 1.

Fig. 3. Gel-filtration on Sephadex G-75 of extracts from green algae, *H. discoidea* (calcareous alga, a) and *U. pertusa* (non-calcareous alga, b). For other explanations, see Fig. 1.

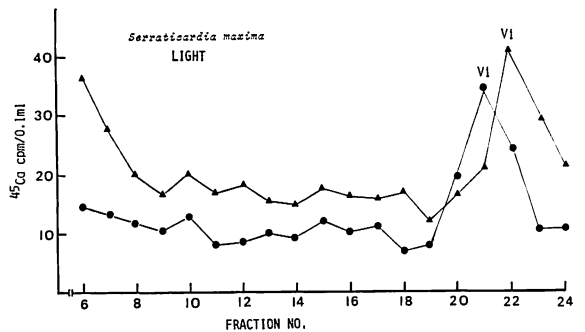
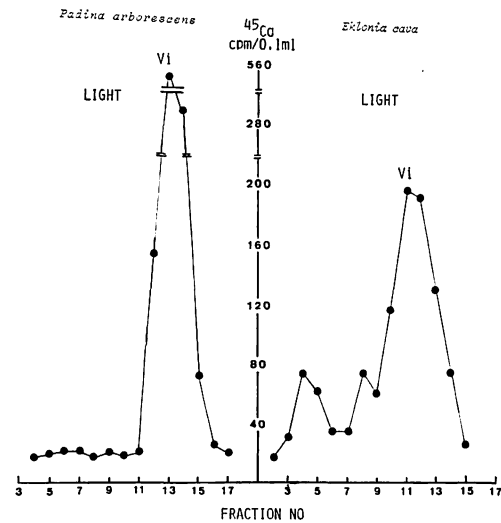


Fig. 4. Gel-filtration on Sephadex G-75 of extracts from non-calcareous brown algae, *P. arborescens* and *E. cava*. For other explanations, see Fig. 1.

Fig. 5. Gel-filtration on Sephadex G-75 of extracts from a calcareous red alga *S. maxima*. Column size; 2.6×40 cm. For other explanations, see Fig. 1.

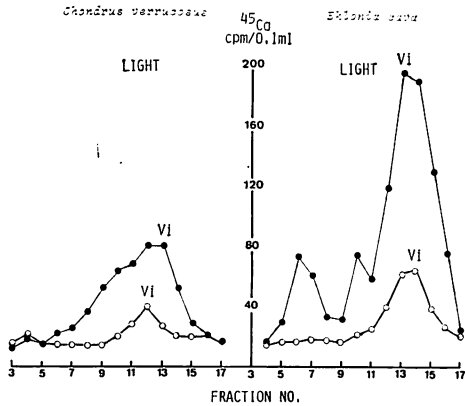


Fig. 6. Gel-filtration on Sephadex G-75 of extracts from non-calcareous algae *C. verrucosus* and *E. cava*.

-●-●- extracts with 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.3); -○-○- same extracts diluted 5-fold with the buffer before gel-filtration.

For other explanations, see Fig. 1.

性物質が遊離の  $^{45}\text{Ca}$  の Sephadex ゲル分子内への流入を妨げたために起こった結果であると思われる。

また、図には示さなかったがタンパク質及び糖は全ての試料において  $V_0$  と  $V_i$  付近にその主要部が存在し、両者の中間にはほとんど検出できなかった。従って、 $^{45}\text{Ca}$  と結合していない高分子物質は  $V_0$  付近に、また低分子の遊離もしくは  $^{45}\text{Ca}$  と結合しているかもしれない物質は  $V_i$  付近に溶出していることになる。

**各種藻体中の遊離及び結合  $^{45}\text{Ca}$  の定量** 藻体にとり込まれた  $^{45}\text{Ca}$  の遊離、および結合の状態のものを定量した。その結果を Table 2 に示す。

この表で注目すべきは、全ての藻体の不溶性画分、すなわち緩衝液抽出残渣にかなりの量の  $^{45}\text{Ca}$  が残存していることである。特に紅藻のイボツノマタ、マクサ以外ではとり込んだ  $^{45}\text{Ca}$  の大部分 (70~98%) が藻体残渣に残っていた。つまり、*in vitro* では  $\text{Ca}^{2+}$  とよく結合する酸性多糖が溶出されていると考えられるのに実際に溶出されてくる  $^{45}\text{Ca}$  が少ないことは一見奇異な現象である。

とり込まれた  $^{45}\text{Ca}$  は石灰・非石灰藻共に、少なくとも一部もしくはその大部分が藻体有機化合物に結合もしくは吸蔵されていると考えられるが、この実験で使用した測定方法では、石灰藻においては炭酸カルシウムにとり込まれたものと有機化合物に結合もしくは吸蔵されているものの両者を同時に測定しているの、不溶性画分の  $^{45}\text{Ca}$  量をそのまま有機化合物にとり込まれている量とすることはできない。

**非石灰藻抽出残渣中の  $^{45}\text{Ca}$  を遊離する試み** 石灰藻では上述のように  $^{45}\text{Ca}$  は有機化合物のほかに炭酸カルシウムにもとり込まれ、両者の区別は困難なため、今回は非石灰藻残渣について試験した。すなわち、 $^{45}\text{Ca}$  をとり込ませた藻体残渣 1g に次亜塩素酸ソーダ液 (有効塩素 4%) もしくは 30% 過酸化水素水を 10 ml 加え 20°C で 24 時間放置し、藻体残渣を東洋濾紙 No. 2 で濾過して集めた。これを蒸留水で充分洗浄後、2 N 塩酸を 10 ml 加えて遊離してくる  $^{45}\text{Ca}$  の放射能を計った。しかし、このような処理でも非石灰藻の藻体残渣中にとり込まれた  $^{45}\text{Ca}$  を完全に遊離させることができなかった。例えば、セルロースなどのミセル間隙に入り込んだ  $^{45}\text{Ca}$  はこの方法では除けないことも考え

Table 2. Buffer extractable and bound  $^{45}\text{Ca}$  in various marine algae

Species	Total uptake (in the light) (cpm/g wet fr.)	Extractable** (cpm/g wet fr.)	Bound*** (cpm/g wet fr.) (%)
<i>Serraticardia maxima</i> *	193,269	7,096	186,173 (96)
<i>Galaxaura fastigiata</i> *	169,395	17,135	152,260 (90)
<i>Chondrus verrucosus</i>	63,000	37,100	25,900 (41)
<i>Gelidium amansii</i>	53,300	38,100	15,200 (29)
<i>Halimeda discoidea</i> *	73,876	22,356	51,520 (70)
<i>Ulva pertusa</i>	67,200	1,600	65,600 (98)
<i>Padina arborescens</i>	343,680	45,025	298,655 (87)
<i>Eklonia cava</i>	294,030	81,240	212,790 (72)

\* Calcareous algae.

\*\* The activities extractable from the fronds with 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.3). The extractable  $^{45}\text{Ca}$  was almost free  $^{45}\text{Ca}$ .

\*\*\* The activities were calculated by subtraction of the extractable  $^{45}\text{Ca}$  from the total uptake of  $^{45}\text{Ca}$ .

られる。従って石灰藻の場合にも、同様な結果に終ることが推定される。

## 考 察

藻体抽出液のゲル濾過による分画の結果より、石灰藻オオシコロ及び石灰緑藻ウチワサボテングサの2種には2M塩化カリウム可溶性の特殊な高分子のCa結合物質が存在することがわかった。これらの物質は今回の実験ではまだ同定していないが、2M塩化カリウムという高い陽イオン濃度下でもなお $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を結合していることからみて、 $\text{Ca}^{2+}$ に対してかなり強い親和力をもつ物質であろうと思われる。

ウチワサボテングサにおいては、BÖHM (1973) が既に同属藻 *H. opuntia* で報告したような、 $\text{Ca}^{2+}$  とよく結合する多糖類であるかも知れない。またオオシコロの場合には、OKAZAKI (1977) の発見した  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 ATPase がこの画分に含有されるので、この酵素が $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を結合してVoの放射能のピークを形成している可能性も考えられる。しかし2M塩化カリウムでは細胞間各種酸性多糖類(例えば紅藻などのカラゲニンやアガール)が一般に抽出されることが知られており、特殊な酸性多糖の可能性も高い。この推論は、オオシコロの石灰化部位が細胞壁又は細胞間隙である事実と関連性があり、注目に値する。

本研究で極めて興味深いのは、pH 8.3の緩衝液で抽出される $^{45}\text{Ca}$ はほとんど全部が遊離型のものであることである。このことは石灰藻でも非石灰藻でもみられるが、少なくとも本研究で用いた非石灰藻には水溶性硫酸多糖が存在することは既知のことであるから(PERCIVAL & MCDOWELL 1967), そしてまたこれらは *in vitro* では当然  $\text{Ca}^{2+}$  とは強さの差はあれ、結合する性質をもっているはずであるから、Table 1 に示す可溶性画分にはこれらの酸性多糖の $^{45}\text{Ca}$ 塩が圧倒的に多いと一応考えられる。しかし実験結果では遊離 $^{45}\text{Ca}$ が圧倒的に多い。この事実、これらの水溶性硫酸多糖は *in vivo* では $^{45}\text{Ca}$ 塩を作り難いことを暗示している。これに関連して、*Ascophyllum nodosum* のフコイダンは  $\text{Pb}^{2+}$  とはよく結合するが  $\text{Ca}^{2+}$  との結合は *in vitro* でも弱いという実験結果(PASKINS-HURLBURT *et al.* 1978) は注目に値する。

これに反して、本研究の結果少なくとも非石灰藻の緩衝液不溶性画分に強い $^{45}\text{Ca}$ とり込み能力をもつ物質があることがわかった。これはいかなる物質に依るものか、またはいかなる構造に基くものかは今回の実験では全く不明である。次亜塩素酸ソーダや過酸化水

素で分解してもなお残留 $^{45}\text{Ca}$ が検出されることから、細胞間酸性多糖の不溶性画分に結合している可能性もあるが、セルロースなどのミセルの間隙に吸蔵されているというさらに高い可能性もある。いずれにせよ、pH 8.3の緩衝液で抽出される画分には $^{45}\text{Ca}$ が著しく少なく、残渣の方に多いことは、海藻の $\text{Ca}^{2+}$ とり込み機作の研究における重要な課題といえよう。

## 引用文献

- BÖHM, E. L. 1973. Composition and calcium binding properties of the water soluble polysaccharides in the calcareous alga *Halimeda opuntia* (L.) (Chlorophyta, Udoteaceae). *Int. Revue ges. Hydrobiol.* **58**: 117-126.
- BOSKEY, A. L. & POSNER, A. S. 1977. The role of synthetic and bone extracted Ca-Phospholipid- $\text{PO}_4$  complexes in hydroxyapatite formation. *Calcif. Tiss. Res.* **23**: 251-258.
- CRENSHAW, M. A. 1977. Ionotropic nucleation by molluscan shell matrix. *Abst. 3rd. Int. symp. on the Mechanism of Biomineralization in the Invertebrates and Plants.* Kashikojima, Japan.
- DEJONG, E. W., BOSCH, L. & WESTBROEK, P. 1976. Isolation and characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding polysaccharide associated with coccoliths of *Emiliania huxleyi* (LOHMANN). *Eur. J. Biochem.* **70**: 611-621.
- 宮田昌彦・岡崎恵視・古谷庫造 1977. 石灰藻ウチワサボテングサの炭酸カルシウム沈着部位と結晶型について(藻類の炭酸カルシウム沈着の研究 I). *藻類* **25**: 1-6.
- OKAZAKI, M. 1977. Some enzymatic properties of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent adenosine triphosphatase from a calcareous red alga *Serraticardia maxima* and its distribution in marine algae. *Botanica mar.* **20**: 347-354.
- 岡崎恵視 1979. 藻類の石灰化開始部位と石灰化機構について. *化石研究会会誌* **12**: 31-36.
- 岡崎恵視・高田真美・宮田昌彦 1977. 石灰藻ウチワサボテングサの炭酸カルシウム沈着部位と結晶型について(藻類の炭酸カルシウム沈着の研究 II). *藻類* **25**: 189-194.
- PASKINS-HURLBURT, A. J., SKORYANA, S. C., TANAKA, Y., MOORE jr., W. & STARA, J. F. 1978. Fucoidan: Its binding of lead and other metals. *Botanica mar.* **21**: 13-22.
- PERCIVAL, E. & MCDOWELL, R. H. 1967. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. Academic Press, London.
- TAKAZOE, I., VOGEL, J. & ENNEVER, J. 1970. Calcium hydroxyapatite nucleation by *Bacterionema matrucotii*. *J. Dent. Res.* **49**: 395-398.