

藻類の炭酸カルシウム形成 —その機構と大気 CO₂ 循環への貢献—

岡崎恵視

(215-0012 神奈川県川崎市麻生区東百合丘 3-24-8)

Megumi Okazaki: Formation of Calcium Carbonate by Algae – Its Mechanisms and Contribution to Atmospheric CO₂ Cycle. Jpn. J. Phicol. (Sôru) 56: 185–205, November 10, 2008

Most marine calcareous algae form calcium carbonate (CaCO₃) extracellularly, where aragonite is induced by Mg²⁺ in sea water. However, Mg-calcite is formed in Corallinales. In this group of algae alginic acid at the calcifying site induces calcite. A Ca²⁺-activated ATPase is associated with cell membrane in an apical segment of articulate coralline alga *Serraticardia maxima* and it acts as a proton (H⁺) pump. The coralline algae use HCO₃⁻ effectively for photosynthesis by formation of CO₂ from HCO₃⁻. OH⁻, counter ion to H⁺, released into intercellular space, might induce CaCO₃ deposition. Relatively close association is shown between CO₂ fixation by photosynthesis and calcification. Similar strategies for photosynthesis have been well known in freshwater algae *Chara* and *Nitella* which deposit CaCO₃ (calcite) on the surface of internodal cells, and submerged angiosperms *Potamogeton*, *Elodea* and *Egeria* which have polar leaves. However, in latter cases, calcification is not accompanied with OH⁻ release from the upper surface of leaves. Several precursors of lignin, such as caffeic acid, inhibit the CaCO₃ deposition. Unicellular coccolithophorid, *Emiliania* and *Pleurochrysis* produce calcified scale, coccolith (calcite), in coccolith vesicle, intracellularly. Certain acid polysaccharides have been proposed to participate in template and/or regulation of the calcite growth. The V/R model proposed for coccoliths of *Emiliania* is applicable to *Pleurochrysis*. Proton pumps associated with cell membrane and/or coccolith vesicle, and a link of photosynthesis to calcification have been proposed. However, coccolith formation could be independent of photosynthesis in *Pleurochrysis*. Carbonic anhydrase is associated with coccoliths.

In the recent earth, the supply of Ca²⁺ and HCO₃⁻ by dissolution of limestone with CO₂ in the lands seems to be balanced well with formation of CaCO₃ in the oceans. This CO₂ cycle through CaCO₃ plays an important role in the delicate balance of atmospheric CO₂ with the other CO₂ cycle through organic matters.

Key Index Words: alginic acid, calcareous algae, calcification, Ca²⁺-activated ATPase, calcium carbonate, carbon dioxide cycle, *Chara*, coccolith, coccolithophorid, coralline algae, *Egeria*, *Elodea*, *Emiliania*, Mg²⁺-activated ATPase, photosynthesis, *Pleurochrysis*, *Potamogeton*, proton pump, submerged plants

3-24-8, Higashiyurigaoka, Asao, Kawasaki, Kanagawa, 215-0012 Japan

I. 始めに

生物が鉱物を形成する現象は「生体鉱物形成」(バイオミネラルイゼーション)とよばれ、ここでは藻類による炭酸カルシウム形成(石灰化)を取り上げる。この研究は、動物であるサンゴ類(刺胞動物)の骨格形成や貝類(軟体動物)の貝殻形成における研究と密接に関連する。また、生物学領域、鉱物学領域、さらには地球化学領域にもまたがる、学際的な研究でもある。最近では、材料工学的な視点からも注目されるようになった。

筆者ら(岡崎・古谷 1985)は以前に、総説「藻類の石灰化機構」を本誌(第33巻 pp. 328–344)に著したが、今回はそれ以後の研究を主に取り上げて報告・解説する。また、最近問題になっている「磯焼け」, “地球温暖化”と海洋における石灰化との関係についても触れる。

II. 炭酸カルシウムを形成する藻類 —石灰藻—

藻体に多量の炭酸カルシウム (CaCO₃) を形成する藻類は、総称して石灰藻 (calcareous algae) と呼ばれている。主な石灰

藻は、藍藻、紅藻、褐藻、ハプト藻、緑藻、車軸藻などの分類群に広く分布しており (Borowitzka 1977, 1982a, b, Pentecost 1980) (Table 1), 石灰化はいわゆる収斂進化で獲得した機能と言えよう。そして、生育環境に適応した一種の「生き残り戦略」とも言える。Table 1 に沿って、分類群別にその石灰化の特徴(石灰化部位, 形成される CaCO₃ の結晶形など)を説明する。これらについては、前述の総説(岡崎・古谷 1985)も参照されたい。

1. 藍藻 (シアノバクテリア)

海産の糸状性藍藻が群体をつくり、これに砂や小石などを取り込んでマットを形成し、この閉鎖された特殊なマイクロ環境において、藻体の表面や細胞壁に CaCO₃ (方解石) が形成される。光合成によるマット内の pH の上昇、石灰化を誘導する細胞表面や細胞壁の多糖類が関与すると考えられる (Pentecost 1980)。マット状の藍藻が石灰化し、化石化した堆積物は「ストロマトライト」とよばれ、先カンブリア時代(約5億年前)などのものが知られている。現在でも西オーストラリアのヘマリンプールなど、浅い

海域でこのような藍藻のマットが形成されている。

2. 大型海産石灰藻

(1) 紅藻

ウミゾウメン目ガラガラ科のガラガラ (*Galaxaura fastigiata*) (Okazaki *et al.* 1982b, 岡崎・古谷 1985) (Fig. 1A), コナハダ科ケコナハダ (*Liagora farinosum*) (岡崎・古谷 1985) などは、藻体先端の最も若い部位の皮層組織の細胞間隙 (ICS) で石灰化が開始される。この部位は、外部海水とは隔離された半閉鎖空間であり、最終的には細胞壁も石灰化する。CaCO₃ 結晶形はアラレ石である。海水中には多量のマグネシウムイオン (Mg²⁺) も含まれており (約 50 mM), このような条件化で形成される

CaCO₃ はアラレ石になる (Kitano & Hood 1962)。結晶の形態は、ガラガラの場合は粒状, ケコナハダの場合は針状である。

サンゴモ目サンゴモ科に属する全ての種は石灰化する。この仲間の主に無節サンゴモ類は、珊瑚礁形成に重要な役割をもつ (Goreau 1963)。

有節のオオシコロ (*Serraticardia maxima*) では、藻体先端 (第 1 節先端) の最も若い部位の細胞間隙で石灰化が開始され、第 1 節基部で完了する。最終的には細胞間隙, 細胞壁が完全に石灰化する (Miyata *et al.* 1980, 岡崎・古谷 1985) (Fig. 1 B)。無節サンゴモ類 (ヒライボ *Lithophyllum okamurae* など) の石灰化過程も本質的にはこれと同じであろう。結晶の形態は、細胞間隙に最初に現れるものは棒状 (針状) であるが、

Table 1. Polymorph of CaCO₃ deposited, site of deposition and habitat of various calcareous algae (from Borowitzka 1977, 1982a, b, Pentecost 1980).

Taxa	Polymorph of CaCO ₃ deposited	Site of deposition	Habitat
CYANOPHYTA Cyanophyceae	Calcite (usually)	Extracellular	Freshwater, Marine
RHODOPHYTA Nemaliales Galaxauraceae <i>Galaxaura</i>	Aragonite	Extracellular (intercellular space)	Marine
Liagoraceae <i>Liagora</i>	Aragonite	Extracellular (intercellular space)	Marine
Corallinales Corallinaceae	Calcite (Mg-calcite)	Extracellular (intercellular space and cell wall)	Marine
Gigartinales Peyssonneliaceae <i>Peyssonnelia</i> , <i>Polystrata</i>	Aragonite + Calcite (Mg-calcite)	Extracellular (intercellular space and cell wall)	Marine
PHAEOPHYTA Dictyotales Dictyotaceae <i>Padina</i>	Aragonite	Extracellular inrolled space (initially), extracellular (finally)	Marine
HAPTOPHYTA Isochrysidales <i>Pleurochrysis</i> , <i>Emiliana</i> , <i>Gephyrocapsa</i>	Calcite	Intracellular in coccolith vesicle (initially), extracellular (finally)	Marine
CHLOROPHYTA Caulerpales Udoteaceae <i>Udotea</i> , <i>Halimeda</i>	Aragonite	Extracellular (intercellular space)	Marine
Dasycladales Dasycladaceae <i>Neomeris</i> , <i>Cymopolia</i>	Aragonite	Extracellular (intercellular space)	Marine
Polyphysaceae <i>Acetabularia</i>		Extracellular (intercellular space and cell wall)	Marine
CHAROPHYTA Charales Characeae <i>Chara</i> , <i>Nitella</i>	Calcite	Extracellular	Freshwater

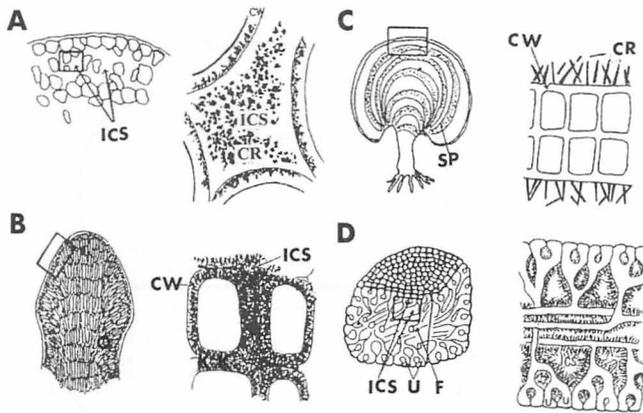


Fig. 1. Schematic diagrams of calcification process in several marine calcareous algae (Okazaki & Furuya 1985). A, *Galaxaura* in Galaxauraceae (Rhodophyta); B, *Serraticardia* in Corallinaceae (Rhodophyta); C, *Padina* in Dictyotaceae (Phaeophyta); D, *Halimeda* in Udoteaceae (Chlorophyta). A rectangular area was studied. ICS, intercellular space; CR, CaCO₃ crystals; CW, cell wall; U, utricle; F, filament; SP, sporangia.

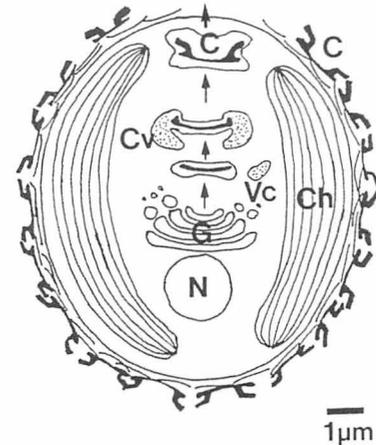


Fig. 2. Schematic diagram of coccolith formation in *Pleurochrysis carterae* (from Okazaki & Furuya 1985). A coccolith is produced intracellularly in a vesicle originated from Golgi-body. C, coccolith; Ch, chloroplast; Cv, coccolith vesicle containing basal plate and coccolithosomes; G, Golgi-body; N, nucleus; Vc, vesicle containing coccolithosomes.

最終的な形態は粒状である。他の紅藻石灰藻と同様に半閉鎖空間で石灰化が進行するにも関わらず、多量の炭酸マグネシウム (MgCO₃, 約6~21 mol%) を含む方解石 (Magnesium calcite, Mg-方解石) を形成する特徴がある (Goldsmith *et al.* 1955, Borowitzka 1982b)。これは、細胞間隙に存在する酸性多糖アルギン酸のためである (後述)。

スギノリ目イワノカワ科の数種も CaCO₃ を形成する。石灰化部位は細胞間隙、細胞壁である (Kato *et al.* 2006)。CaCO₃ の結晶形はアラレ石とされているが、*Peyssonnelia calcea*, *Polystrata dura* ではアラレ石の他に、Mg-方解石の存在が最近報告された (Dixon *et al.* 2007)。これが事実であれば、アラレ石と方解石の両者を形成する種の最初の報告と言える。

(2) 褐藻

褐藻のなかで、アミジグサ目のアミジグサ属のある種のもののみが石灰化する。オキナウチワ (*Padina japonica*)、コナウミウチワ (*P. crassa*) などである。扇状の藻体は縁辺成長するが、縁辺に位置する頂端細胞の表面で石灰化が開始される (Fig. 1C) (岡崎・古谷 1985, Okazaki *et al.* 1986)。この細胞は、縁辺部が巻き込んだ特殊な半閉鎖空間 (inrolled space, 巻き込み空間) 内に位置し、細胞壁表面の毛状繊維上に微小な粒上結晶が形成され、その後細胞壁表面に垂直な針状結晶へ成長する。藻体の成長に伴い、藻体表面 (腹面, 背面) に現れ、外部海水へ露出するようになる。この結晶はよく発達した、アラレ石針状結晶である。

(3) 緑藻

イワズタ目ハゴロモ科のサボテンサ属の数種 (サボテンサ *Halimeda opuntia*, ウチワサボテンサ *H. discoidea* など) は礁湖 (ラグーン) で大量の CaCO₃ 堆積物を形成する (Stark *et*

al. 1969)。また、サンゴ礁沖側、水深約 50 m 付近に大群落をつくり、“*Halimeda Bank*” とよばれる堆積物を形成する (Hillis-Colinvaux 1980)。こうして、珊瑚礁形成に重要な働きをもつ。

サボテンサ、ウチワサボテンサ、ミツデサボテンサ (*H. incrassata*) などは、藻体の先端 (第1節) のよく発達した細胞間隙 (ICS) で CaCO₃ 結晶が形成され始め、最終的にはその空間が針状の長いアラレ石の結晶で埋め尽くされる (Fig. 1D) (Borowitzka *et al.* 1974, 岡崎ら 1977, Böhm *et al.* 1978, Borowitzka 1982a)。細胞壁は石灰化しない。ハゴロモ属の *Udotea cyathiformis* なども細胞間隙にアラレ石の針状結晶が形成されるが、管状糸の細胞壁も石灰化し、鞘となる (Böhm *et al.* 1978)。生理学的な研究は行われていないが、藻体の構造はサボテンサのものによく似ており、その石灰化機構も似ていると考えられる (Borowitzka 1982b)。

3. 円石藻

円石藻 (coccolithophorid) はハプト藻に属する海産性の単細胞性石灰藻である。コッコリス (円石) と呼ばれる方解石を主成分とする鱗 (2~5 μm) を形成する。イソクリリス目のエミリアニア・ハックスレー (*Emiliania huxleyi*)、プレウロクリリス・カルテレー (*Pleurochrysis carterae*)、ゲフィロカプサ・オセアニカ (*Gephyrocapsa oceanica*) (それぞれ、後出 Fig. 20A, B, C 参照) はヘテロコッコリスを形成し、その形成過程は電顕でよく研究されている (Wilbur & Watabe 1963, Outka & Williams 1971)。これらの種では、コッコリスはゴルジ体由来の小胞“コッコリス小胞”で形成されエキソサイトーシスにより細胞外へ放出され、細胞表面に配列される (Fig. 2)。エミリアニア・ハックスレーは外洋において、大規模な CaCO₃ 形成を行う (Holligan *et al.* 1983, Brown & Yoder 1994)。

4. 車軸藻

唯一の淡水産(汽水産)石灰藻である。オオシャジクモ(*Chara corallina*), シャジクモ(*C. braunii*)やヒメフラスモ(*Nitella flexilis*)などは節間細胞表面のアルカリバンド内に方解石を沈着する(Okazaki & Tokita 1988)(後出 Fig. 30 参照)。

III. 大型海産石灰藻の石灰化機構

1. 紅藻サンゴモ類

有節サンゴモ類オオシコロ(*Serraticardia maxima*)の石灰化過程を Fig. 3 に示した。藻体先端(第1節)における皮層組織細胞の細胞間隙に小胞が蓄積し、次いで棒状(針状)の結晶が出現し、その後細胞間隙、細胞壁が完全に結晶で埋め尽くされる(Miyata *et al.* 1980, 岡崎・古谷 1985)。石灰化は第1節基部で完了する(Fig. 3A)。無節サンゴモ類(ヒライボ *Lithophyllum okamurae*)においても、細胞間隙・細胞壁が完全に石灰化する(Fig. 3B)。これらの結晶の特徴は $MgCO_3$ に富む(約 21 mol%) 方解石(Mg-方解石)である。

オオシコロの石灰化は細胞外であることから、筆者らは車軸藻類に類似した石灰化機構(後出 Fig. 31 参照)を想定して、藻体先端部を主に切り取り、その細胞膜を水性二層分配法により単離してその性質を調べた。その結果、細胞膜には Mg^{2+} 活性化 ATPase (Mg^{2+} -activated ATPase) と Ca^{2+} 活性化 ATPase (Ca^{2+} -activated ATPase) の両方が結合しているが、プロトンポンプとして機能する ATPase は Ca^{2+} -ATPase の方で、100 μM 程度の生理学的 Ca^{2+} 濃度で働くことを明らか

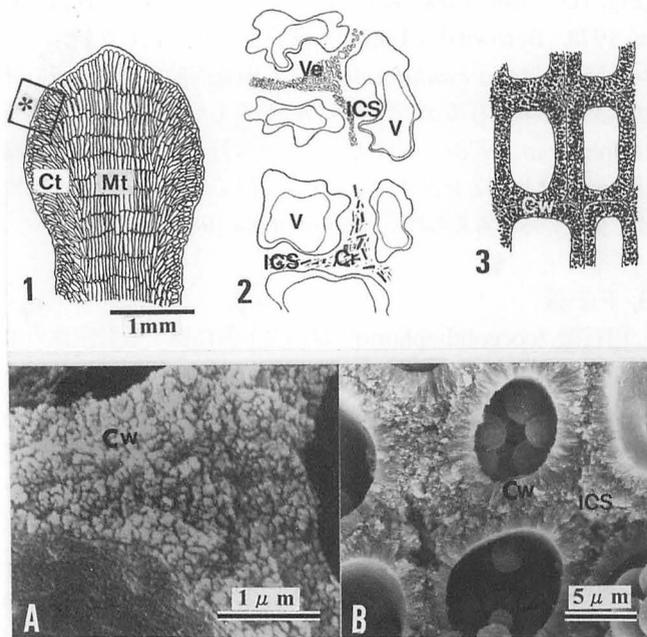


Fig. 3. Schematic diagrams of calcifying process in *Serraticardia maxima* and electron micrographs (SEM) of heavily calcified ICS and cell wall of *S. maxima* and *Lithophyllum okamurae* (from Okazaki & Furuya 1985). The calcification proceeds from 2 to 3. Cr, calcite crystal; Ct, cortical tissue; Cw, cell wall; ICS, intercellular space; Mt, medullary tissue; V, vacuole; Ve, vesicle. A, *S. maxima* (cortical cells in area*); B, *L. okamurae* (cells in perithallum).

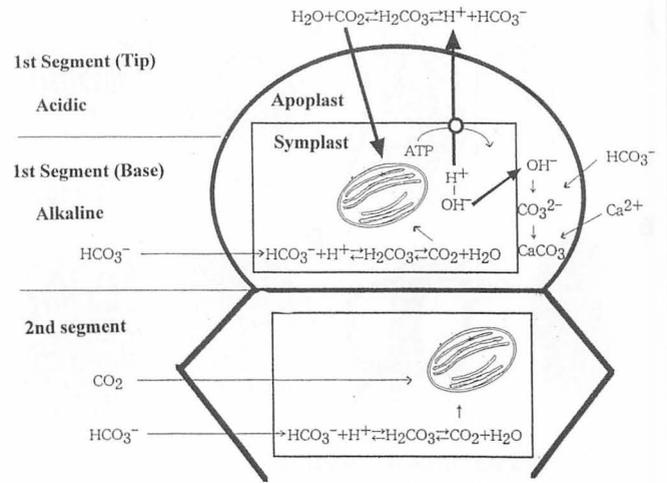


Fig. 4. Hypothetical scheme of *trans*-calcification in apical segments of *Serraticardia maxima* (from Mori *et al.* 1996). Proton is pumped out into external medium by the action of proton pump (Ca^{2+} -activated ATPase) at the tip of 1st segment in the light, accompanying OH^- efflux into intercellular space at the basal part of same segment. The OH^- accelerates the dissociation of HCO_3^- to CO_3^{2-} , resulting in $CaCO_3$ deposition.

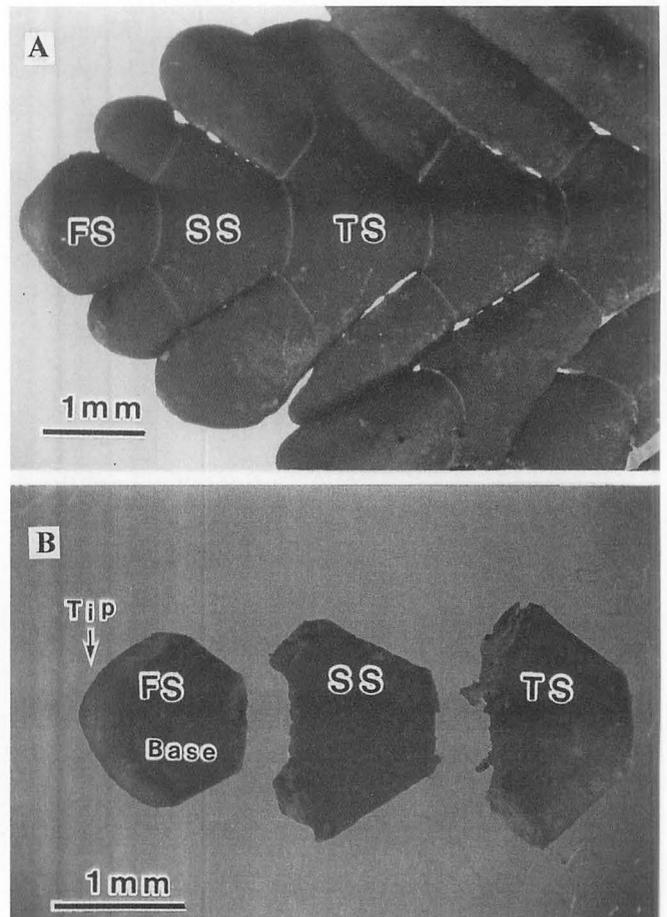


Fig. 5. Age-gradient in segments from apical to basal along main axis of *Serraticardia maxima* (from Shinomiya 2000). A, age-gradient of segments; B, segments cut off from the frond. FS, first (apical) segment; SS, second segment; TS, third segment; Tip, growing point at first segment; Base, basal position at first segment.

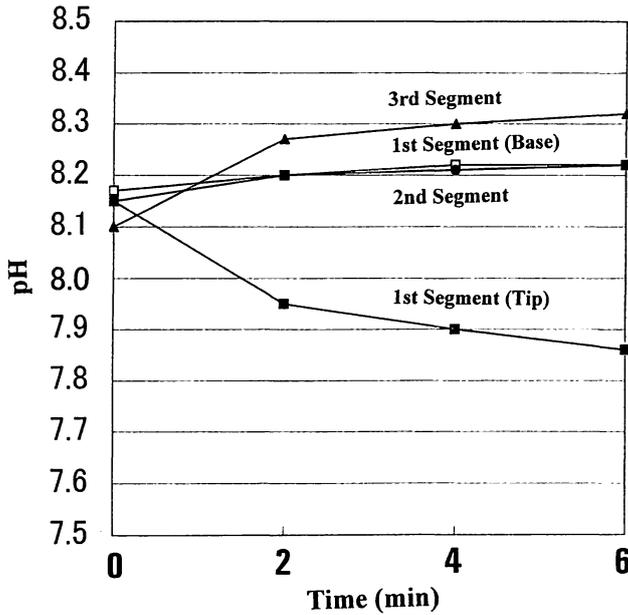


Fig. 6. Effects of light on pH change at surface of several segments of *Serraticardia maxima* (from Shinomiya 2000). Light intensity: $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

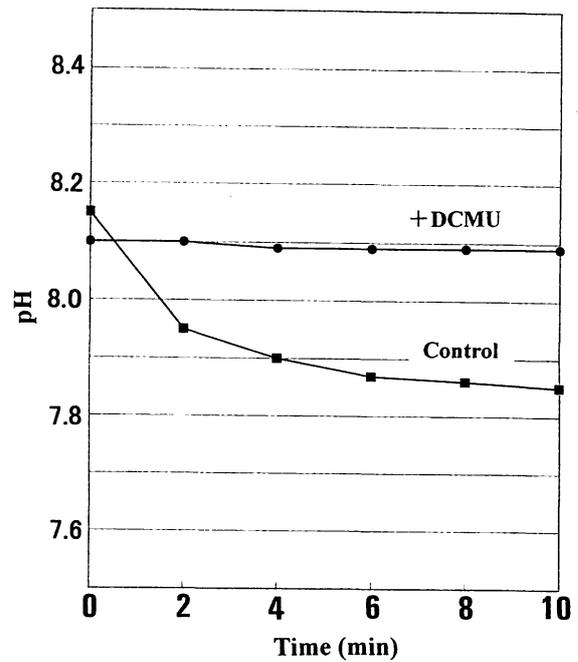


Fig. 7. Effect of DCMU, a potent inhibitor of photosynthesis, on the light-inducing pH change at the tip surface of the first segment of *Serraticardia maxima* (from Shinomiya 2000). 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) was added into agar at $4 \mu\text{M}$. For other condition, see Fig. 6.

にした (Mori *et al.* 1996)。これまで、プロトンポンプとして働く ATPase は Mg^{2+} -ATPase であることから、オオシコロ細胞膜のプロトンポンプは新しい ATPase と言える。この逆転膜小胞を使ったプロトン輸送の実験で、細胞内から細胞外へ向けてプロトンが輸送されることから、筆者らは Fig. 4 で示す石灰化機構を提案した (Mori *et al.* 1996)。すなわち、第 1 節先端から細胞外 (細胞間隙) へ放出されたプロトン (H^+) は海水中に豊富な炭酸水素イオン (HCO_3^-) と反応して CO_2 を形成して光合成に供給する。一方、細胞内に形成された水酸化物イオン (OH^-) は細胞間隙の別の部位に放出され、 HCO_3^- と反応して炭酸イオン (CO_3^{2-}) が形成され、これが Ca^{2+} と反応して CaCO_3 が沈着すると想定している。実際に第 1 節先端からプロトンが放出されていることを共同研究者の四宮 (2000) が証明した。オオシコロの第 1 節 (FS)、第 2 節 (SS)、第 3 節 (TS) を切り取り (Fig. 5A, B)、それぞれを寒天ゲル (2%、海水で調製) 中に包埋して先端が針のように尖ったペンシル型 pH 電極を藻体表面に接触させて、藻体表面の pH を pH メーターで測定した。その結果、第 1 節の先端部 (Tip) 表面の pH は光照射下 ($230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で顕著に低下した。一方、第 1 節の基部、第 2 節、第 3 節では pH は上昇した (Fig. 6) (四宮 2000)。また、第 1 節先端のこの pH 下降は、光合成阻害剤 3-(3,4-ジクロロフェニール)-1,1-ジメチルウレア (DCMU) (終濃度 $4 \mu\text{M}$) によって阻害された (Fig. 7)。この事実は、第 1 節先端からプロトンが放出されていること、このエネルギーは光合成電子伝達系から供給される ATP に依存していることを強く示唆しており、筆者らの仮説 (前出 Fig. 4 参照) を強く支

持するものである。海水中 (pH 8.2) には、 HCO_3^- の存在比は約 91% で、 CO_2 は 1% 以下に過ぎない (Fig. 8)。光合成における炭酸固定酵素 Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) はその基質として、 CO_2 に親和性が高く、 HCO_3^- に対しては親和性が低い (Cooper & Filmer 1969)。そのため、オオシコロはプロトンポンプにより $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ なる反応で CO_2 を供給する光合成戦略を

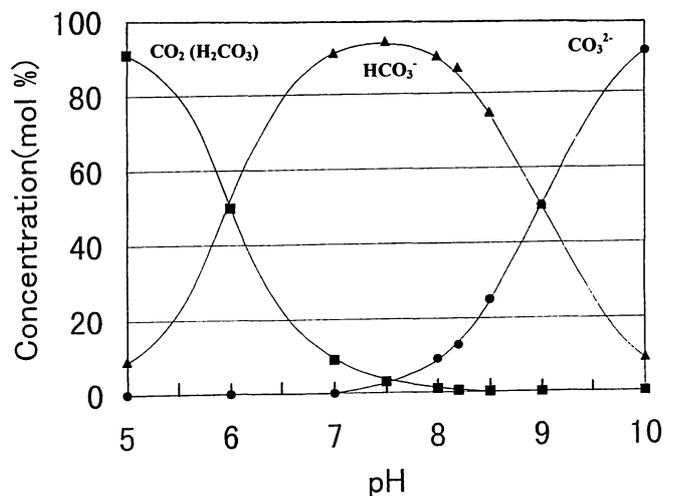


Fig. 8. Relative proportions of inorganic carbon species (carbon dioxide, bicarbonate and carbonate ions) with changing pH in seawater.

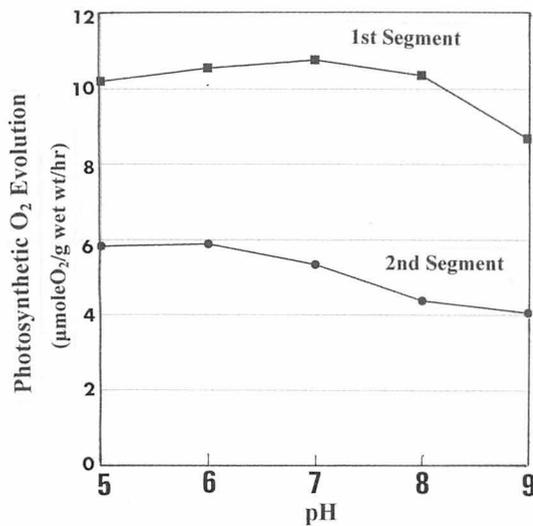


Fig. 9. Rate of photosynthetic O₂ evolution of first and second segments of *Serraticardia maxima* at different pHs (from Shinomiya 2000). pH of seawater was adjusted with HCl and NaOH. Photosynthesis was measured in medium containing 5 mM DIC at light intensity of 230 μmol m⁻²s⁻¹.

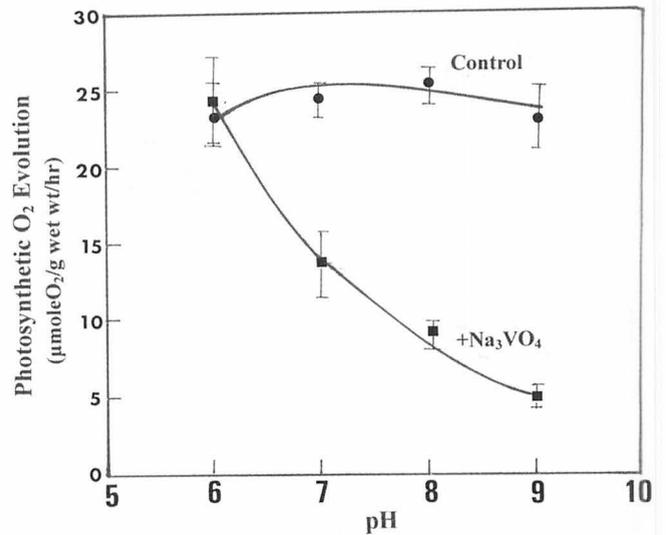


Fig. 10. Effect of vanadate on photosynthetic O₂ evolution of first segment of *Serraticardia maxima* at varying pH of seawater (from Takahashi 2004). Vanadate was added into seawater at 100 μM. Photosynthesis was measured in medium containing 5 mM DIC at light intensity of 750 μmol m⁻²s⁻¹.

持つと考えられる。事実、第1節の酸素発生により測定した光合成速度 (230 μmol m⁻²s⁻¹ 光照射下, pH 8.3) は約 10 μmole O₂/g wet wt/hr で、第2節のそれ (約 4 μmole O₂/g wet wt/hr) より約 2.5 倍大きい (Fig. 9) (四宮 2000)。このことは、クロロフィル *a* 当たりの光合成速度に換算しても言える (データは示していない)。また、海水の pH をアルカリ側にシフトさせた場合の光合成速度の下降は、第2節より少ない (Fig. 9)。また、共同研究者の高橋 (2004) はプロトンポンプの阻害剤ヴァナジ酸 (Na₃VO₄) の 100 μM の存在下で、第1節の光合成 (750 μmol m⁻²s⁻¹ 光照射下) は、海水の pH を高めるに伴い、著しく阻害されることを明らかにした (Fig. 10)。さらに、石灰化の強力な阻害剤ヒドロキシエチリデン 1, 1-ビスホソフォン酸 (HEBP) を使って、光合成と CaCO₃ 形成との関係を調べた (Fig. 11)。HEBP は湯垢防止剤として知られ、CaCO₃ の結晶表面に吸着して結晶成長を阻害する物質である (Nancollas & Sawada 1982)。試験管内で或る物質の CaCO₃ 形成阻害能を調べるには、Wheeler *et al.* (1981) の方法がよく使われる。この方法は、CaCl₂ 溶液に NaHCO₃ 溶液を添加することで、Ca²⁺ + HCO₃⁻ → CaCO₃ + H⁺ なる反応

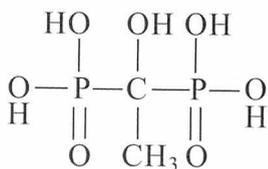


Fig. 11. Molecular structure of (1-hydroxyethylidene) bisphosphonic acid (HEBP). mol. wt.=206.03

で CaCO₃ の形成に伴う pH の下降を測定する方法である (Fig. 12)。この方法では、HEBP は僅か 0.5 μM で CaCO₃ 形成を阻害する (Fig. 13) (Asahina & Okazaki 2004)。この試薬は非石灰藻であるツノマタ (*Chondrus ocellatus*)、ムカデノリ (*Grateloupia asiatica*)、ヒラアオノリ (*Ulva compressa*)、カヤモノリ (*Scytosiphon lomentaria*) の光合成 (酸素発生) (光強度 750 μmol m⁻²s⁻¹) を 1 mM 濃度でも阻害しないことから (Table 2), この試薬は光合成の阻害剤でないことが分かる (高橋 2004)。しかし、オオシコロの第1節の光合成は著しく阻害 (約 50% 阻害) されることが明らかになった。一方、石灰化が終了している第5節では阻害が見られない。更に、他の有節サンゴモ類であるウスカワカニノテ (*Amphiroa zonata*) やピリヒバ (*Corallina pilulifera*) の第1~3 (2) 節を含む先

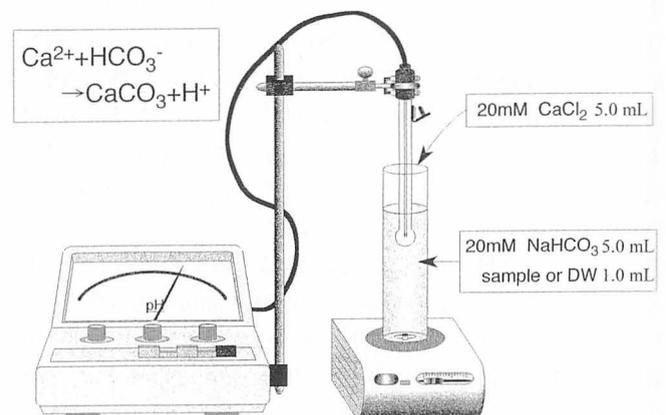


Fig. 12. Method of Wheeler *et al.* (1981) to determine the inhibitory effect of substances on CaCO₃ formation *in vitro*.

Table 2. Effects of HEBP on photosynthetic activity of *Chondrus ocellatus*, *Grateloufia asiatica* (as *G. filicina*), *Ulva* (as *Enteromorpha compressa*) and *Scytosiphon lomentaria* (from Takahashi 2004).

Species	HEBP	Photosynthetic rate (pH 8.3) ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{g wet wt}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)	Inhibition (%)
<i>C. ocellatus</i>	-HEBP	285.4 ± 0.3	0
	+1 mM HEBP	278.1 ± 1.1	2.6 ± 0
<i>G. asiatica</i>	-HEBP	170.2 ± 0.8	0
	+1 mM HEBP	164.0 ± 2.4	3.6 ± 1.5
<i>U. compressa</i>	-HEBP	275.6 ± 8.4	0
	+1 mM HEBP	301.7 ± 8.5	-8.7 ± 4.6
<i>S. lomentaria</i>	-HEBP	58.3 ± 3.0	0
	+1 mM HEBP	57.9 ± 2.9	1.1 ± 2.2

Photosynthesis was measured in seawater containing 5 mM DIC at light intensity of $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

端部では約 30%の阻害が見られる (Table 3)。これらの結果から、オオシコロなどの有節サンゴモ類の光合成は石灰化と密接に共役していることが窺える。この点をより明確にするためには、実際に石灰化が HEBP により阻害されていることを確かめなければならない。そこで高橋 (2004) は放射性炭素 ¹⁴C を用いて、HEBP 存在下での炭素 ¹⁴C の取り込みを有機画分 (光合

Table 3. Effects of HEBP on photosynthetic activity of calcareous coralline algae *Serraticardia maxima*, *Amphiroa zonata* and *Corallina pilulifera* (from Takahashi 2004).

Species (Site)	HEBP	Photosynthetic rate (pH 8.3) ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{g wet wt}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)	Inhibition (%)
<i>S. maxima</i> (1st Segment)	-HEBP	24.3 ± 5.0	0
	+1 mM HEBP	11.6 ± 1.5	52.3 ± 11.6
(5th Segment)	-HEBP	14.3 ± 1.3	0
	+1 mM HEBP	13.5 ± 1.1	5.6 ± 11.5
<i>A. zonata</i> (1st-2nd Segment)	-HEBP	27.1 ± 1.0	0
	+1 mM HEBP	19.3 ± 2.2	28.8 ± 8.5
<i>C. pilulifera</i> (1st-3rd Segment)	-HEBP	15.3 ± 0.4	0
	+1 mM HEBP	10.7 ± 1.6	30.0 ± 10.6

For explanation, see Table 2.

成産物) と無機画分 (CaCO₃) に分けて調べた。その際、両画分の分離には、筆者の研究室の野口 (1992) の開発した Y 字型炭素分画装置を使った (Fig. 14)。この装置は、ガラスバイアル瓶 A と B (液体シンチレーションカウンターで放射能を測定する際に使うもの) を装着できるようになっており、A 容器に試料を、B 容器にはアルカリ液 (2-phenylethylamine) を浸み込ませたろ紙を瓶の底に入れる。Y 字管上部のゴム栓を通して注射器で A 容器に塩酸を注入する。こうして、CaCO₃ に取り込まれた放射性炭素を CO₂ に変え、約 1 昼夜放置して、バイアル瓶 B のろ紙に完全に吸収させる。その後、A、B 容器を装置から外して、両容器に親水性液体シンチレーターを加えて放射能を測定する。こうして、光合成量と石灰化量を経時的に

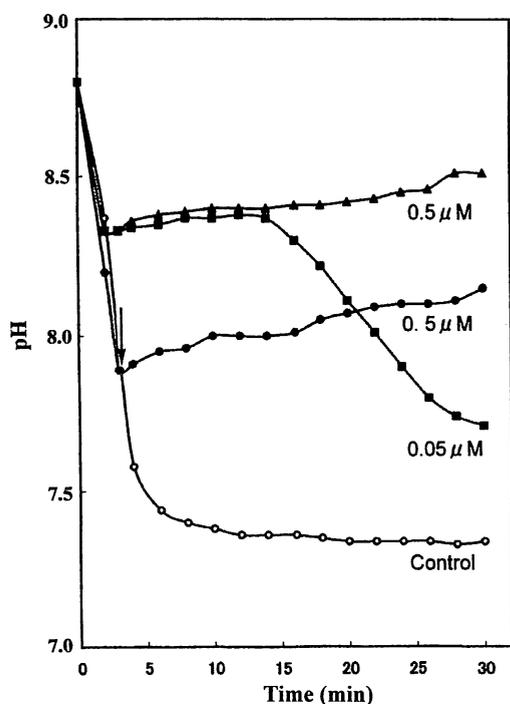


Fig. 13. Effects of HEBP on CaCO₃ precipitation *in vitro* (from Asahina & Okazaki 2004). 3 mL of 20 mM CaCl₂ was added to 3 mL of 20 mM NaHCO₃ (pH 8.7) and 0.3 mL of H₂O (control) or 0.3 mL of HEBP solution. Alternatively, HEBP solution was added after 3 min after onset of precipitation (arrow).

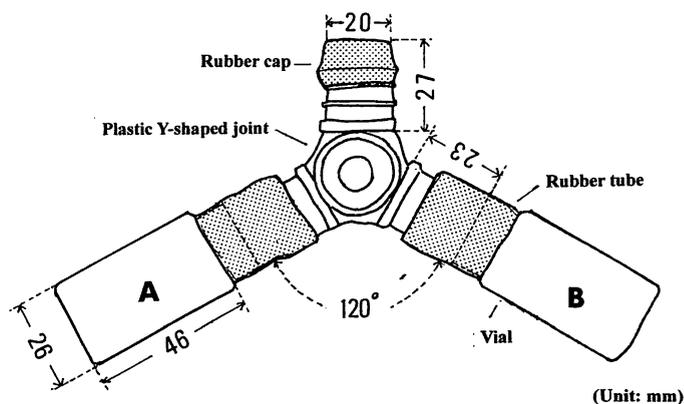


Fig. 14. Y-shaped apparatus for separation of organic and inorganic ¹⁴C carbon incorporated by fronds (from Noguchi 1992). A and B, glass vial for liquid scintillation counter. Sample is put in vial A, and a piece of filter paper absorbed with 2-phenylethylamine for CO₂ trap is put at the bottom of B. 0.5 mL of hydrochloric acid (2N) is added to decompose CaCO₃ from rubber cap by syringe.

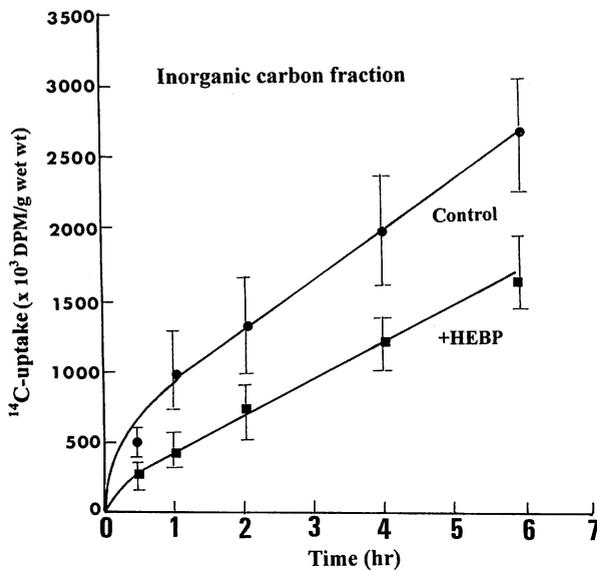


Fig. 15. Incorporation of ^{14}C into inorganic carbon (CaCO_3) by the first segment of *Serraticardia maxima* in the light (from Takahashi 2004). First segments were incubated in the 1 mM HEBP at light intensity of $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

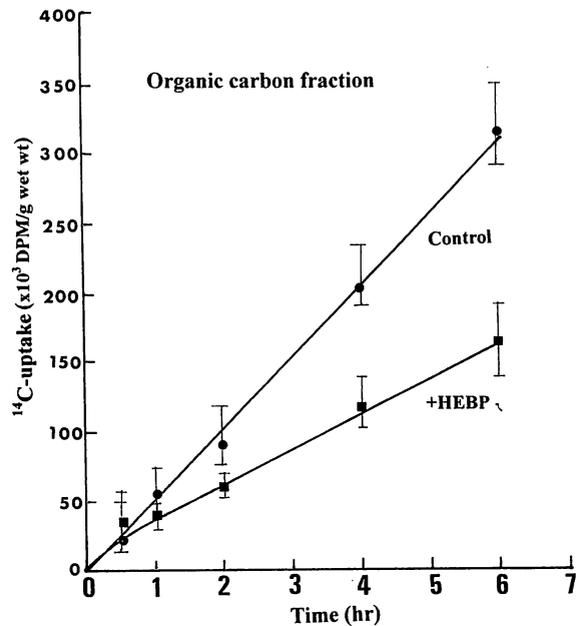


Fig. 16. Incorporation of ^{14}C into organic carbon (photosynthate) by the first segment of *Serraticardia maxima* in the light (from Takahashi 2004). For explanation, see Fig. 15.

測定できる。Figs. 15, 16 に、オオシコロ第1節で得られた結果を示す(高橋 2004)。1 mM HEBP を含む海水中では、光照射下(光強度 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)で無機炭素成分(CaCO_3)への取り込みは、その取り込みの勾配から、約 23% 阻害されている(Fig. 15)。一方、有機炭素成分(光合成産物)への取り込みは約 40% 阻害されていることが分かる(Fig. 16)。この事実は、オオシコロの第1節の光合成は石灰化阻害によって影響を受けることを示しており、両者の密接な共役が強く示唆される。プロトンが放出される部位と石灰化部位が異なる石灰化(“トランス-石灰化”)(McConnaughey & Whelan 1997)とは言い、1細胞を隔てる程の近さで接近しているため、相互に影響し合

うと考えられる。サンゴモ(*Corallina officinalis*)第1節の表皮細胞やモカサ属(*Fosliella*)の表皮細胞では、細胞壁が複雑に細胞質内へ突出して、細胞膜の表面積を広げていることが報告されている(Borowitzka & Vesik 1978)。沈水植物のカナダモ(*Elodea canadensis*)などに見られる“輸送細胞”(Gunning & Pate 1969)的機能を果たし、プロトンポンプもこの細胞膜に埋め込まれて、強力に機能しているのかもしれない。

サンゴモ類の CaCO_3 はマグネシウムを多く含む方解石(Mg-方解石)である(前出 Table 1 参照)。石灰化部位は細胞間隙、細胞壁で、外部海水とは比較的近いところにある。海水には Mg^{2+} は高濃度(約 50 mM)で含まれるので、このような環境ではアラレ石が形成されるのが普通である(Kitano & Hood 1962)。事実、ガラガラ(の細胞間隙や緑藻の細胞間隙)で形成される CaCO_3 は全てアラレ石である(Table 1)。この矛盾は細胞間隙に存在する酸性多糖のアルギン酸によるものであることが次の筆者らの研究で明らかになった。

筆者らは、オオシコロの石灰化機構には、細胞壁成分が何らかの役割を演じていると考え、“ Ca^{2+} を結合する物質”(CaBS)を探した。そして、炭酸ナトリウムやキレート試薬エチレンジアミン四酢酸(EDTA)でオオシコロ藻体からそのような物質を抽出することを試みた。その結果、粘性があり、その溶液を酸性にしたり、 Ca^{2+} を加えることでゲル化して沈殿し、EDTA によって再び可溶化する物質を得た。この性質は、褐藻アルギン酸と大変酷似したものであった。そこでこの物質の赤外線吸収スペクトラムを市販の褐藻アルギン酸と比較したところ、ほぼ完全に一致した(Fig. 17)。また、加水分解物を薄層クロマトグラフィーで分析したところ、アルギン酸構成成分と一致

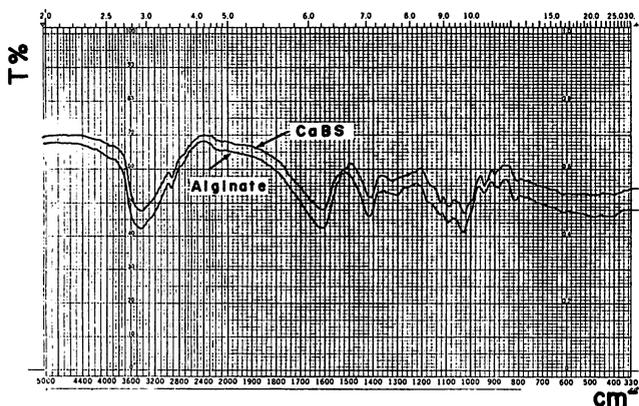


Fig. 17. Infrared absorption spectra of crude Na-CaBS and Kelco commercial alginate (from Okazaki *et al.* 1982a). CaBS: calcium-binding substance from *Serraticardia maxima*. Samples were analyzed in potassium bromide disks.



Fig. 18. Silica-gel thin layer chromatogram of acid hydrolysates of crude Na-CaBS from several articulate coralline algae and Kelco commercial alginate (from Yamaguchi 1982). Sm, *Serraticardia maxima*; L.j, *Lithothamnion japonicum*; M.a, *Marginisporum aberrans*; Alg, Kelco commercial alginate; G, L-guluronic acid; M, D-mannuronic acid. Na-CaBSs and commercial alginate were hydrolyzed with 2N HCl for 3.5 hr at 110°C.

し、L-guluronic acid (G)、D-mannuronic acid (M) の 2 成分から成ることが明らかになった (Fig. 18)。これは、ガスクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーによっても証明された (データは示していない)。また、ツツナミガイ (*Dolabella auricularia*) の中腸腺から単離・純化したアルギン酸分解酵素 (alginate lyase) によっても分解された。M/G 比は約 1.0 であり、比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ は -140° で褐藻アルギン酸の -130° とほぼ一致した。こうして、筆者らは CaBS をアルギン酸と同定し、“紅藻アルギン酸”と名付けた (Okazaki *et al.* 1982a)。これは、これまでの藻類の褐藻類と細菌類の *Pseudomonas* (Linker & Jones 1964) や *Azotobacter* (Cohen & Johnstone 1964) などしか存在しないとされていたアルギン酸が紅藻類にも存在することを示した最初の報告である。共同研究者の山口 (1982) はオオシコロのアルギン酸は、平均分子量は 25 ~ 50 万で、褐藻のもの (約 300 万) より小さいことを示した。また、オオシコロにおける含量は乾燥藻体 (この重量の約 90% を CaCO₃ が占める) の僅か 0.4% に過ぎない。この研究は、東京教育大学理学部を退官され、当時日本大学農獣医学部水産学科に移られていた西澤一俊教授と共同で進めたものである。オオシコロ以外のサンゴモ類のフサカニノテ (*Marginisporum aberrans*, M.a)、ミヤベオコシ (*Lithothamnion japonicum*, L.j) にもアルギン酸が存在した (山口 1982) (Fig. 18)。さらに、エゾシコロ (*Calliarthron yessoense*)、ウスカワカニノテ (*Amphiroa zonata*)、ピリヒバ (*Corallina pilulifera*)、ミヤヒバ (*Corallina confusa*)、ヘリトリカニノテ (*Marginisporum crassissimum*)、ハチノスイシ (*Lithophyllum tortuosum*)、エダウチイシモ (*Mesophyllum erubescens*) にも含まれていることが分かったが、サンゴモ類以外の紅藻には、調べた限り存在しない

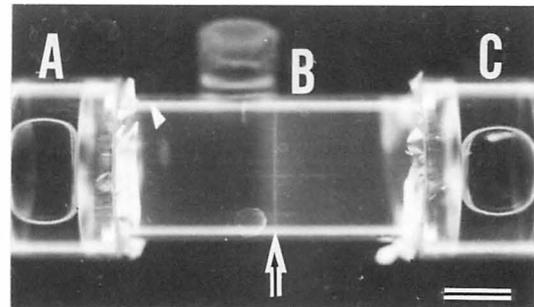
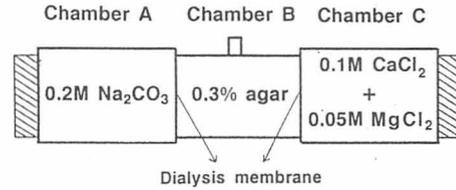


Fig. 19. Apparatus for studying precipitation of CaCO₃ under condition of double diffusion (Wada *et al.* 1993). Upper: Apparatus is made of acrylic tube and consists of chamber A, B and C. Chamber B contains 0.3% agar gel with test sample. Size: 100 mm in length and 20 mm in diameter. Bottom: arrow shows the CaCO₃-precipitation disc from which CaCO₃ was collected and used for analysis of its polymorphs.

ことが明らかになった (Okazaki & Tazawa 1989)。アルギン酸は、紅藻においてはサンゴモ目に特徴的な酸性多糖と考えられる。

アルギン酸は組織化学的研究から細胞壁、細胞間隙に含まれており、石灰化部位と一致した (岡崎ら 1984)。そこで、筆者らはアルギン酸が CaCO₃ の同質異形 (結晶形) に及ぼす影響を二重拡散法によって調べた (Wada *et al.* 1993)。この方法は、アクリル樹脂製の小管 (Fig. 19) に寒天ゲル (0.3%) を詰め、管の両端 (A, C) から 0.1 M CaCl₂ と 0.2 M Na₂CO₃ を拡散させて、ゲル中に CaCO₃ の沈殿を形成させる方法である。寒天中に結晶形に影響を及ぼすと考えられる物質を加えて形成される CaCO₃ を取り出して X 線回折法で結晶形を調べる。この方法でアルギン酸の影響を調べた結果を Table 4 に示す。寒天中に 0.05M MgCl₂ が存在すると、形成される CaCO₃ の 98% がアラレ石になる。これは、Mg²⁺ のアラレ石誘導能によるものであるが (Kitano & Hood 1962)、これにオオシコロのアルギン酸を共存させると、アルギン酸の濃度が高まるに伴い方解石 (Mg-方解石) の形成される割合が大きくなり、10 mg/mL の濃度で 100% の方解石に変わることが分かる。同時に、結晶がゲル中に出現する時間は、添加しない場合に比べて約 5 時間遅れる。これらの結果は、アラレ石の結晶核にアルギン酸が結合して、より安定な方解石核に固体-固体転移が起こるためと考えられる。同様な効果は、結晶成長阻害剤 HEBP (前出 Fig. 11 参照) にも見られ、また円石藻プリュウロクリシス・カルテレーの細胞から単離した酸性多糖 B においても見られた。こうして、サンゴモ類の CaCO₃ がなぜアラレ石ではなく Mg-方解石になるかが解明された。

Table 4. Effects of alginic acid of *Serraticardia maxima*, acid polysaccharide (PB^{a)} of *Pleurochrysis carterae* and HEBP (from Wada *et al.* 1993).

Additives	Amount added (mg/10mL)	Polymorph of CaCO ₃ (%)		Increase in incubation time (hr)	Fraction of MgCO ₃ (mol %)
		Aragonite	Calcite		
Control	0.0	98	2	0 ^{b)}	—
Alginic acid	0.5	95	5	1.0	3.1
	2.0	75	25	2.0	4.0
	4.0	49	51	3.5	4.1
	10.0	0	100	5.0	4.7
PB	4.0 × 10 ⁻³	83	17	5.0	3.0
	2.0 × 10 ⁻³	40	60	6.0	3.8
	0.1	19	81	7.5	5.1
	0.5	0	100	8.0	5.8
HEBP	8.0 × 10 ⁻³	91	9	4.6	3.4
	4.0 × 10 ⁻²	82	18	5.1	5.4
	0.2	68	32	5.1	5.8
	0.5	40	60	6.5	7.5

^{a)} acid polysaccharide B from whole cells of *P. carterae*.

^{b)} It took 19 hrs to form the first CaCO₃ precipitation disc. For experimental conditions, see Fig. 19.

2. 緑藻サボテングサなど

石灰化は細胞間隙が、藻表面の小囊が互いに融着することで外部海水から隔離されるに伴って開始されること、石灰化は暗所に比べて明所で速く、かつ光合成速度に比例して促進されることなどが明らかにされている (Borowitzka & Larkum 1976a, b, 1977)。これらのことから、良く発達した細胞間隙での光合成による HCO₃⁻ や CO₂ の取り込みに基づく pH 変化、それに伴う炭酸平衡の変化が石灰化に密接に関連しているモデルが提唱されている (Borowitzka & Larkum 1976a, Borowitzka 1982b)。これは、いわゆる“シスー石灰化” (McConnaughey & Whelan 1997) に当たる。しかし、筆者は前述の紅藻サンゴモ類のように (前出 Fig. 4 参照)、プロトンポンプを使う光合成戦略に共役した OH⁻ の細胞間隙への放出による、“トランスー石灰化” の可能性もあるのではないかと考えている。

IV. 円石藻の石灰化機構

ハプト藻に属する円石藻は単細胞石灰藻で、コッコリスと呼ばれる方解石から成る鱗を細胞内のコッコリス小胞で形成し、細胞表面に配置する (前出の Table 1, Fig. 2 参照)。このように、石灰化のための細胞小器官を有し、コッコリスの形態・構造が厳密に制御されるため、典型的な「生物制御型石灰化」 (biologically controlled calcification) と呼ばれている (Mann 1983)。良く知られた代表的な種として、イソクリシス目に分類されているエミリアニア・ハックスレー (*Emiliania huxleyi*, Fig. 20A), プリュウロクリシス・カルテレー (*Pleurochrysis carterae*, Fig. 20B) 及びゲフィロカプサ・オセアニカ

(*Gephyrocapsa oceanca*, Fig. 20C) などが挙げられる。

エミリアニア・ハックスレーのコッコリスは直径約 4 μm で、約 30 個の同一な小単位(セグメント)から構築されている。個々のセグメントは左官屋が使う“塗りごて”のような形をしているが、方解石の単結晶であることが知られている (Westbroek *et al.* 1984, Didymus *et al.* 1991)。この奇妙な形のセグメントが形成される過程を模式的にしたものが Fig. 21 (Young *et al.* 1992) である。まず、コッコリス小胞内に円盤状の有機物の薄い基盤 (ベースプレート) がつくられ (図には示されていない)、その縁に立方体の微小な方解石結晶が形成される。この結晶には 2 種類あり、一つは c- 軸がこのプレートに平行で円盤の周辺へ向いている結晶 (R- 結晶)、もう一つはプレートに垂直な軸を持つ結晶 (V- 結晶) で、これらが交互に並び、プロトコッコリスリング (proto-coccolith ring) をつくる (Fig. 21, ステージ 1)。この R- 結晶がベースプレートに垂直な方向、さらには水平方向に成長して V- 結晶を覆い隠し (ステージ 2~3)、さらに成長を続け、最後に“塗りごて”の形態になる (ステージ 4~6)。すなわち、各セグメントは R- 結晶の成長したものである。しかし、エミリアニア属の直接の祖先 *Toweius* 属 (古第三紀始新世、約 5,000 万年前に繁栄) コッコリスでは、V- 結晶の発達の方が著しく、R- 結晶も比較的よく発達しているという (Young *et al.* 1992)。エミリアニア属のコッコリスが V/R 結晶で構築されるとするモデルは V/R モデルとよばれる (Young *et al.* 1992)。

筆者らはプリウロクリシス・カルテレーのコッコリス構造を調べた (Okazaki *et al.* 1998)。コッコリスの直径は約 2.5 μm の楕円体で、2 種の単位 A, B が交互に配列し、それぞれ 12

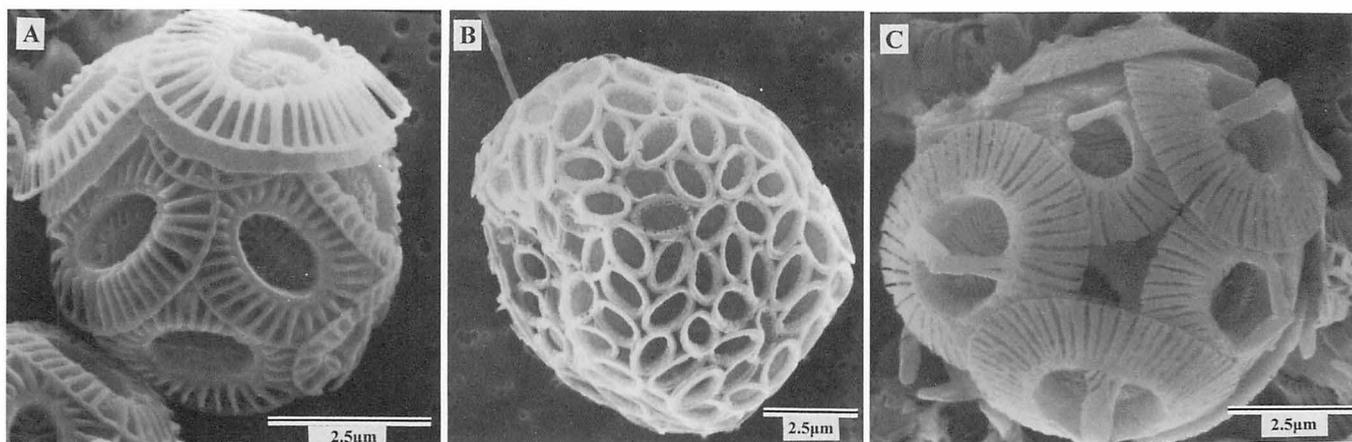


Fig. 20. Scanning electron micrographs of 3 species in coccolithophorid. A. *Emiliana huxleyi*. B. *Pleurochrysis carterae*. C. *Gephyrocapsa oceanica*.

個から構築される (Fig. 22C) (Okazaki *et al.* 1998)。B は A を固定するリベットのような形態をしている。共同研究者の多田 (2008) はその形成過程を調べた。細胞を超音波破碎し、コッコリスを遠心分離して回収し、その形態を透過型、走査型電子顕微鏡で観察すると共に、制限視野電子線回折分析で結晶学的知見を得た。その結果、プロトコッコリスリング様の形成初期段階のコッコリス (Fig. 22A) や、その成長過程のもの (Fig. 22B)、完成したもの (Fig. 22C) が観察された。また、単位 A は方解石の c-軸がコッコリスの平面に平行であり (R-結晶)、単位 B はこれに垂直であること (V-結晶) が明らかになった。これらの知見を総合して、コッコリス形成の過程を Fig. 23 に示した。プロトコッコリスリングの V-結晶を両隣の R-結晶が覆い隠し (Fig. 23, ステージ 2~3)、単位 A, B の形態が明確になり (ステージ 4)、完成する (ステージ 5)。従って、プレウロクリシス属のコッコリス形成もエミリアニア属のコッコリス形成で提唱された V/R モデルが当てはまると思われる。

それでは、コッコリス形成における結晶成長を制御している機構はどのようなものであろうか。詳細は全く不明と言わざるを得ないが、結晶の方向性や形態を決定する分子レベルの鋳型のような物が存在するかもしれない。そのような観点から、コッコリスの CaCO₃ の結晶核となり、結晶の成長を制御する特殊な酸性多糖類に注目した研究もある (Westbroek *et al.* 1984,

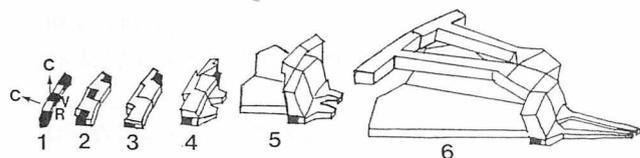


Fig. 21. Growth sequence illustrating coccolith development of *Emiliana huxleyi* (modified from Young *et al.* 1992). The sequence shows how the initial simple crystals (1) of the proto-coccolith ring develop into the morphologically complex crystal units (6) of the complete coccolith. Each diagram shows main (R) crystal units and adjacent interstitial (V) crystals. Arrows show the direction of c-axis of calcite. R, radial c-axis crystal; V, vertical c-axis crystal.

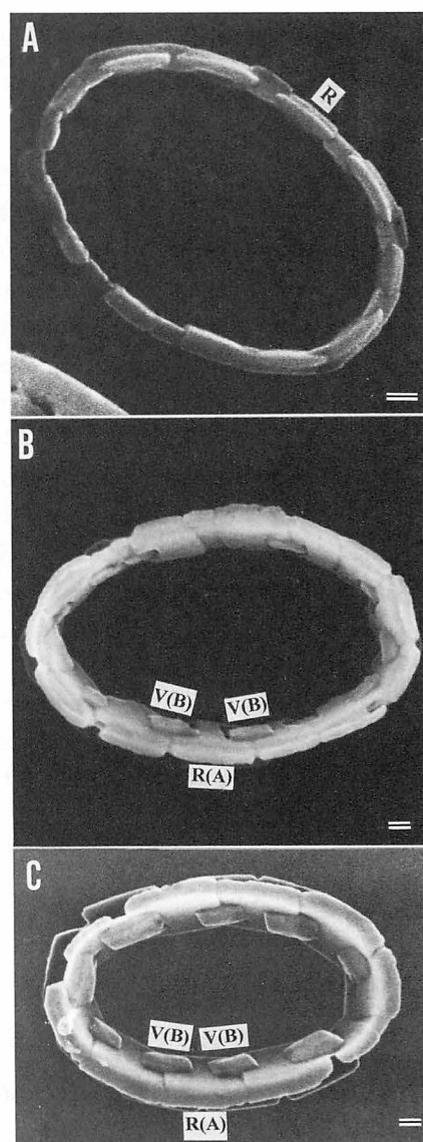


Fig. 22. Growth stages of coccolith of *Pleurochrysis carterae* (from Tada 2008). A, early stage; B, late stage; C, final stage (complete coccolith). R, R-crystal; R(A), R-crystal (A unit); V(B), V-crystal (B unit). Scale = 0.1 μm.

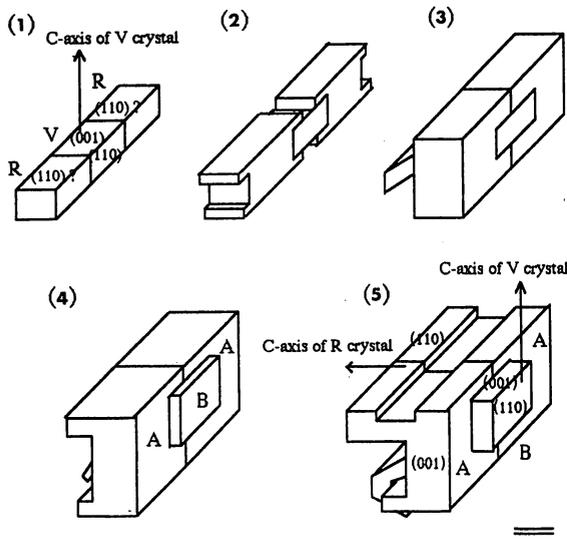


Fig. 23. Growth sequence of coccolith of *Pleurochrysis carterae* showing 5 stages of development (from Tada 2008). For other explanations, see Fig. 22. Scale = 0.1 μm .

Young *et al.* 1992)。オランダのライデン大学の地質生化学研究グループは、エミリアニア・ハックスレーの単離したコッコリスに結合した可溶性の特殊な酸性多糖が1種存在することを発見した。この多糖は Mannose と Galacturonic acid を主成分とし、それ以外にも種々の糖と硫酸基を含む複雑な構造をしている (De Jong *et al.* 1976, Fichtinger-Schepman *et al.* 1981, Borman *et al.* 1987)。酸性基として Galacturonic acid と硫酸基が関与している。また、プリウロクリシス・カルテレーの単離コッコリス、及びコッコリス小胞中にも特殊な酸性多糖類が2種 (PS-1, PS-2) 存在することが明らかになっている (Marsh *et al.* 1992, Marsh 1994)。PS-1 は Galacturonic acid が主成分で、Glucuronic acid も含む。PS-2 は PS-1 より多く含まれ、直鎖状の糖鎖中に、Glucuronic acid—meso-Tartaric acid—Glyoxylic acid を繰り返し含み、極度に酸性化している (Fig. 24)。さらに、同種から Glucuronic acid が全て L-Iduronic acid に置き換わった新たな酸性多糖 CMAP (coccolith matrix acid polysaccharide) が報告されている (尾

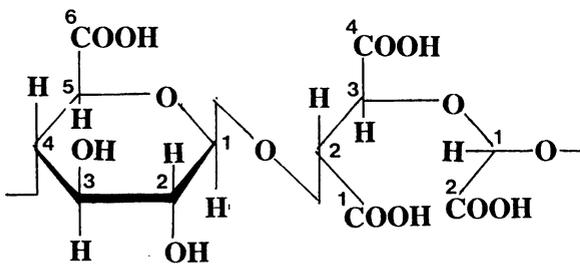


Fig. 24. Repeating unit consisting of D-glucuronic, meso-tartaric and glyoxylic acid residues of an acid polysaccharide PS-2 from *Pleurochrysis carterae* (from Marsh 1994).

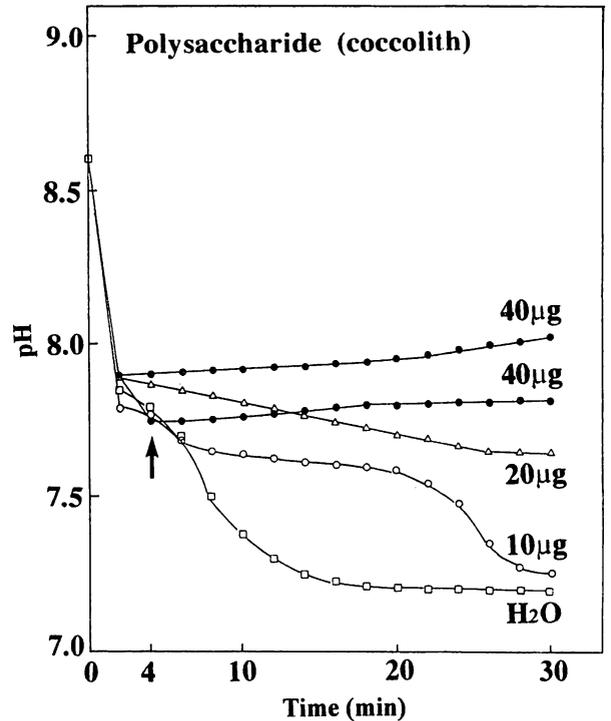


Fig. 25. Effects of acid polysaccharide B associated with coccoliths of *Pleurochrysis carterae* on CaCO_3 precipitation *in vitro* (from Okazaki *et al.* 1998). For methods, assay medium and arrow, see Fig. 13.

崎 2001, Ozaki *et al.* 2004)。筆者らがプリウロクリシス・カルテレーの単離コッコリスから単離した酸性多糖 B (上記 Marsh らの PS-2 に該当すると思われる) は、前述の Wheeler *et al.* (1981) の方法 (Fig. 12 参照) で CaCO_3 形成に及ぼす効果を調べたところ、40 $\mu\text{g}/6.3 \text{ mL}$ の低濃度でこれを強く阻害した (Fig. 25) (Okazaki *et al.* 1998)。細胞から調製した多糖 B はより低濃度 (4 $\mu\text{g}/6.3 \text{ mL}$) でこれと等しい効果が見られた (結果は図に示していない)。この事実は、多糖 B はコッコリス小胞中において、何らかの働きをしていることを示唆している。また興味あることに、プリウロクリシス・ハプトネモフェラ (*Pleurochrysis haptoneofera*) の非石灰化変異株には、このような酸性多糖は存在しない (岡崎ら 1996)。これらの多糖はコッコリス小胞中の膜に埋め込まれた状態では、結晶形成の核になる可能性、結晶成長を制御している可能性も考えられている (Young *et al.* 1992)。今後、この方面での研究が期待されるが、そのためには新たな実験方法を開発することが必要であろう。

それでは、前述の紅藻サンゴモ類に見られるようなプロトンポンプが関与する光合成戦略が円石藻のコッコリス形成にも関与しているのであろうか。この点について議論するために、コッコリス形成において筆者らが想定している細胞内炭素代謝、カルシウム輸送系の模式図を Fig. 26 に示す。プロトンポンプは細胞膜、コッコリス小胞膜両方に存在すると考えられる。細胞膜のプロトンポンプによって細胞外へ放出された H^+ は、 HCO_3^-

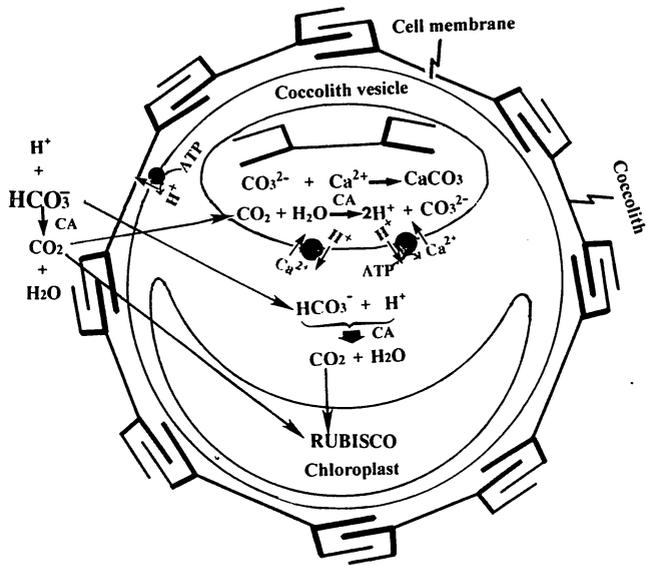


Fig. 26. Hypothetic scheme in utilization of dissolved inorganic carbon for photosynthesis and coccolith formation with Ca^{2+} transport in cells of *Emiliana huxleyi* and *Pleurochrysis carterae*. Proton pump (Mg^{2+} -activated ATPase) is assumed to be associated with coccolith vesicle membrane and/or with cell membrane.

と反応して CO_2 を形成し、これは細胞内に取り込まれて光合成に利用される可能性がある。また、コッコリス小胞膜にポンプが存在するとすれば、小胞内はアルカリ化し、 $\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-}$ により CO_3^{2-} を供給して、コッコリス形成の原動力となる。同時に、細胞質内に取り込まれた HCO_3^- が、小胞内より放出された H^+ によって、光合成のための CO_2 を供給することになる。

筆者の研究室では、プリウロクリス・カルテレーのコッコリスを脱灰・除去して調製した細胞（プロトプラスト）を低張処理して、膜画分を調製したところ、細胞膜のマーカ酵素である、 Na_3VO_4 で阻害される Mg^{2+} -ATP アーゼ活性が強く、かつその活性が HCO_3^- で活性化される膜画分を得た（森 1992）。また、エミリアニア・ハックスレーについては、水性二層分配法（前述 III, 1, サングモ類の項参照）により細胞膜を単離して調べたところ、 Na_3VO_4 で阻害される Mg^{2+} -ATPase が存在すること、さらにプロトンポンプとして機能していることを確認した（岡崎（敦）1997）。しかし、両種のコッコリス小胞膜についてはこれまでに殆ど研究されておらず、 Mg^{2+} -ATPase 活性についても、プロトンポンプ（もしくは能動的な $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ アンチポーター）の存在についても不明である。

また、共同研究者の野口（1992）はプリウロクリス・カルテレーのコッコリス形成と光合成の関係を、 CaCO_3 形成の強力な阻害剤ではあるが光合成そのものには作用しない前述の HEBP（前出 Figs. 11, 13 参照）を使って ^{14}C 法で検討した。無機炭素と有機炭素中に取り込まれた ^{14}C の放射能測定には前述の Y-型反応容器（前出 Fig. 14 参照）を使った。その結果、海水中に 1 mM の濃度で HEBP を投与すると、無機炭素画分 (CaCO_3) への ^{14}C の取り込み（石灰化）はほぼ完全に阻害さ

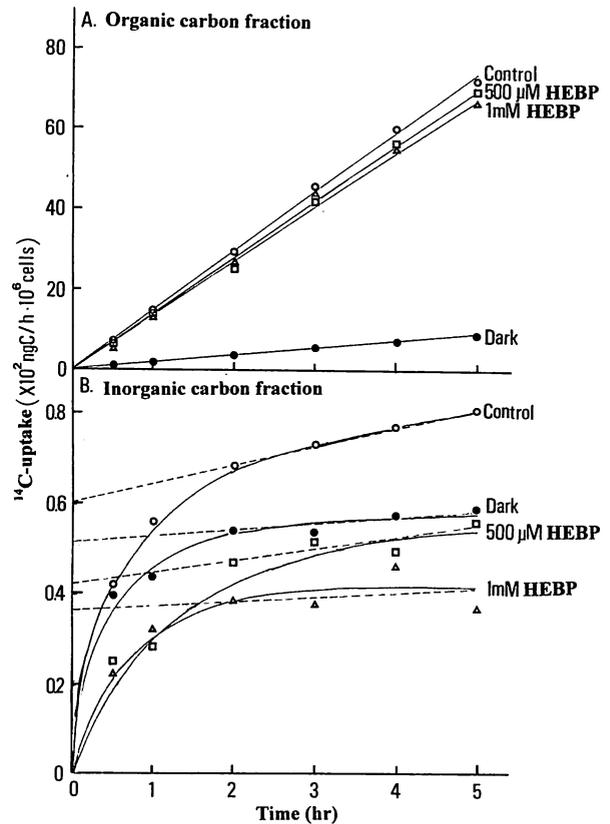


Fig. 27. Time course of ^{14}C -uptake into organic carbon (photosynthate) and inorganic carbon (CaCO_3) fractions in the light ($140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) by *Pleurochrysis carterae* cells in logarithmic phase of growth (from Noguchi 1992). Details for fractionation of organic and inorganic carbon, see Fig. 14.

れたが（Fig. 27B）、有機炭素画分（光合成産物）への取り込みは殆ど影響を受けなかった（Fig. 27A）。コッコリス小胞膜に存在すると考えられるプロトンポンプはコッコリス形成が阻害されることで、その能力が抑制されると考えられるので、この結果はこのポンプは光合成戦略に関与していないことを強く示唆する。また、コッコリス形成は明所で促進されるものの、暗所でも行われる（Fig. 27B）。ここにはデータは示さないが、筆者の研究室の林（2004）は予めコッコリスを脱灰・除去した細胞では、光合成速度は未処理の細胞とほぼ同じであるにも関わらず、石灰化速度が著しく促進されることも明らかにした。既に van der Wal *et al.* (1987) は、細胞の周りのコッコリスを除去するとコッコリス形成が促進されること、暗所でもコッコリスは形成されることを報告しており、これを支持するものである。

筆者らはコッコリス形成が HEBP によって実際に阻害されるかについても形態学的に調べた（Asahina & Okazaki 2004）。その結果、海水中に 1 mM HEBP を加えると、プリウロクリス・カルテレーのコッコリス形成は、ほぼ完全に阻害されることを電子顕微鏡観察で確認した（Fig. 28）。図から明らかのように、細胞表面にはベースプレートの縁に未熟な結晶を付けたコッコリスと石灰化しない鱗（オーガニックスケール）が観察されるのみである

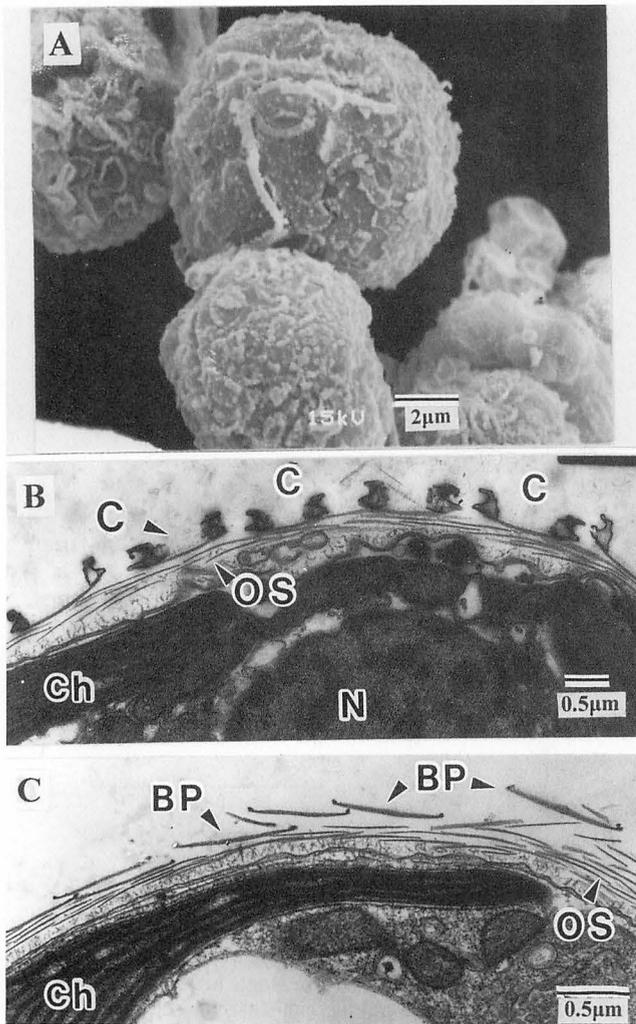


Fig. 28. Scanning and transmission electron micrographs of *Pleurochrysis carterae* cultured with 1mM HEBP for 7 days (from Asahina and Okazaki 2004). A, scanning electron micrograph (with HEBP); B, transmission electron micrograph (without HEBP); C, transmission electron micrograph (with HEBP); BP, base plate of coccolith; C, coccolith; Ch, chloroplast; OS, organic scale; N, nucleus. Stained by Pb-U in B and C.

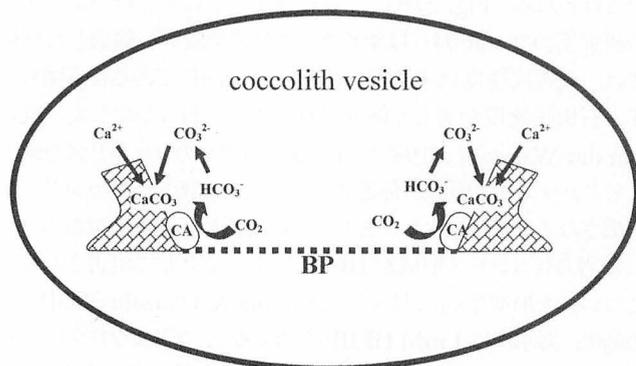


Fig. 29. Possible function of carbonic anhydrase (CA) in coccolith vesicle. CA is assumed to catalyze a reaction $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. BP, base plate of coccolith.

Table 5. Carbonic anhydrase activity associated with isolated coccoliths from several coccolithophorid algae (from Okamura 1995).

Species	Activity (E.U./mg Ca)
<i>Pleurochrysis carterae</i>	1.0
<i>P. haptonemofera</i>	0.54
<i>Emiliania huxleyi</i>	0.22
<i>Gephyrocapsa oceanica</i>	0.18

Enzyme activity was measured at 2°C by manometric method of Waygood (1955). One enzyme unit was defined as amount of enzyme which gives a value of $(R-R_0)/R = 1$, where R and R_0 represent the reaction rate by fresh and boiled enzyme, respectively.

(Fig. 28A, C). この図には示していないが、細胞内のコッコリス小胞中には僅かに石灰化したコッコリスしか観察できなかった。

このように、少なくともプレウロクリシス・カルテレーにおいては、プロトンポンプがコッコリス形成に関与しているとしても、これが光合成の炭素固定に有利に働いている可能性は低いと言えよう。

一方、エミリアニア・ハックスレーについては見解を異にする報告が見られる。例えば、Paasche (1964) は ^{14}C 法を使って、光合成とコッコリス形成の関係をしらべ、コッコリス形成は明所で著しく促進されるが、光合成を阻害してもコッコリス形成はそれ程阻害されないことを示した。また、Sekino & Shiraiwa (1994) は、コッコリス形成を石灰化阻害剤の HEBP (前述) で阻害すると、光合成は促進されることを報告している。これらの結果は、コッコリス形成と光合成の炭素固定との間には密なる共役は無いことを示唆している。一方、Nimer & Merrett (1992) は、コッコリス形成能が高い株 (高石灰化株) は光合成に海水中の HCO_3^- を有効に利用できるのに対して、コッコリス形成を殆ど行わない低石灰化株はこれを利用できないこと、高石灰化株は高 pH (～ pH 9.0) の海水中でも光合成が行なえることを示した。これは、高石灰化株には、プロトンポンプによるコッコリス形成とこれに共役した光合成戦略の可能性を示すもので、上述の他の研究者の結果と異なるものである。このようにエミリアニア・ハックスレーでは、コッコリス形成と光合成の間に統一した見解が得られていないのが現状である。今後、プロトンポンプの阻害剤である Na_3VO_4 の光合成、コッコリス形成への影響も調べる必要がある。

最後に、円石藻の石灰化に炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase, CA) が関与していることに触れる。共同研究者の岡村 (1995) と尾崎 (1998) はプレウロクリシス・カルテレーの細胞から CA を抽出した。更に、プレウロクリシス・カルテレー、エミリアニア・ハックスレー及びゲフィロカプサ・オセアニカから単離したコッコリスに CA が結合していることを明らかにした (Table 5) (岡村 1995)。このことは、コッコリス小胞中で CaCO_3 が形成される過程でこの酵素が働いていたことを強く示唆するが、コッコリス小胞中に供給される無機炭素種は CO_2 と考えると、小

胞中に CA が存在する理由がよく説明できる (Fig. 29)。

動物の石灰化部位に CA が存在することは以前から指摘されて来たが, Miyamoto *et al.* (1996) はアコヤガイ (Pearl oyster, *Pinctada martensii*) の貝殻で, 真珠層の基質の一成分であるナクレイン (Nacrein) の遺伝子解析を行い, このタンパク質が CA であること, 分子内に CA の活性部位と Ca²⁺ を結合する部位を合わせて持っていることを明らかにした。硫酸基, シアル酸を側鎖に持つナクレインも報告されている (Takakura *et al.* 2008)。エミリアニア・ハックスレーでも, c-DNA 解析から 2 種の CA が存在し, 細胞質中やココリス小胞中の局在が推定されているが, 蛋白分子としては未だ確認されていない (Soto *et al.* 2006)。しかし最近, 共同研究者の古村 (2007) はブリュウロクリシス・カルテレーとエミリアニア・ハックスレーの単離ココリスを脱灰し, その可溶性成分中に CA タンパク質が存在することを CA と特異的に結合する蛍光試薬ダンシルアミド (Dansylamide) を使って示した。

ココリス小胞膜におけるプロトンポンプやカルシウム輸送系, 結晶成長に関与する CA の存在などを証明するためには, コクリス小胞の単離が大変期待されるが, 試みられているものの未だ成功していない (Wainwright *et al.* 1992)。

V. 車軸藻と高等沈水植物の石灰化機構

1. 車軸藻

淡水産 (～汽水産) であるシャジクモ類は節間細胞表面に CaCO₃ (方解石) を沈着する。この仲間は, 節間細胞表面にアルカリバンドと酸性バンドを交互に形成し (Spear *et al.* 1969,

Lucas & Smith 1973), Ca²⁺ イオンが十分な濃度で存在すれば, このアルカリバンド域に CaCO₃ が形成される (Okazaki & Tokita 1988) (Fig. 30)。アルカリバンドは, 0.1 mM フェノールレッド (pH 指示薬, 変色点 pH 7.4) と 1 mM NaHCO₃ を加えて pH 7.0 に調整した寒天ゲル (0.5%) 中に藻体を包埋し, 照射することによって簡単に検出できる (Fig. 30A)。このバンドと CaCO₃ 沈着部位はよく一致する (Fig. 30B)。Fig. 31 はシャジクモ (*Chara braunii*) の石灰化機構を模式的に示したものである。類似の機構はオオシャジクモ (*Chara corallina*) (Borowitzka 1982a) やフラスモ類 (*Nitella*) (Smith 1968) でも提唱されている。プロトンポンプは細胞膜に埋め込まれた Mg²⁺-ATPase に依るもので, この部位の細胞膜は内部に複雑に陥入して表面積を増やし, その結果ポンプは高密度に局在している。陥入した構造は“プラズマレンマゾーム”とよばれている (Price *et al.* 1985)。一方, 過剰になった OH⁻ は他の部位から放出され, アルカリバンドが形成される。酸性バンドは照射下でのみ作動するので, プロトンポンプに必要なエネルギーは, 光合成で作られた ATP に依存していると考えられる。プロトンポンプによる H⁺ 放出は, 培地中の HCO₃⁻ を CO₂ に変えて光合成に効率よく利用するための光合成戦略と考えられる。事実, オオシャジクモをアルカリ化した培地で培養すると, プラズマレンマゾームの密度は増える (Price *et al.* 1985)。こうして, 車軸藻類の石灰化は, プロトンポンプを用いた光合成戦略に共役していると言える。筆者らは, 石灰紅藻サンゴモ類の石灰化機構の研究 (前述 III. 1 参照) をこの車軸藻類の石灰化機構を参考にして行ったが, 両者は本質的に同じ機構であることが明らかになった (前出 Fig. 4 参照)。

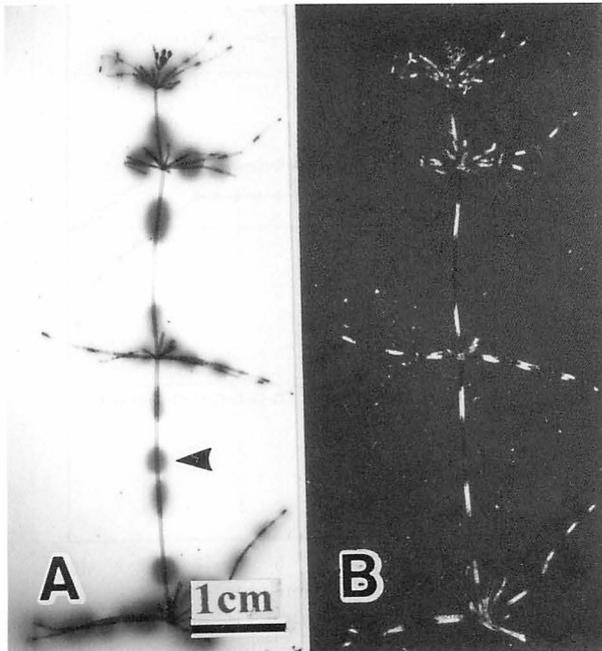


Fig. 30. Alkaline bands associated with CaCO₃ deposition at the surface of internodal and branch cells of *Chara braunii* (from Okazaki & Tokita 1988). A, Alkaline band; B, CaCO₃ crystals (photographed under polarized light). Arrowhead in A shows an alkaline band inducing CaCO₃ crystals later.

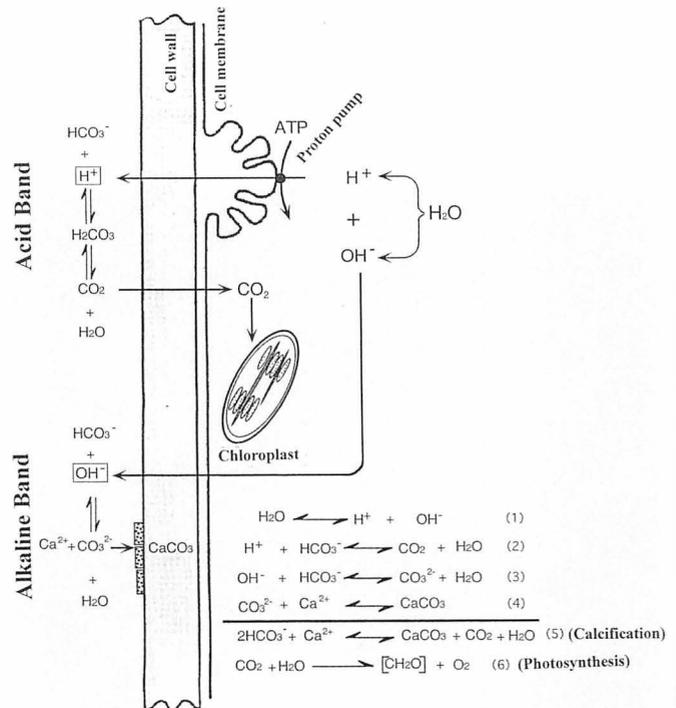


Fig. 31. Schematic diagram showing a relationship between photosynthetic utilization of bicarbonate by the action of proton pump, efflux of OH⁻ ion and calcification in *Chara braunii*.

2. 沈水植物

沈水植物のエビモ (*Potamogeton crispus*), センニンモ (*P. maackianus*) などのヒルムシロ科の数種やオオカナダモ (*Egeria densa*) は極性葉を持ち、葉の裏側は酸性化し、葉の表側はアルカリ化することが知られている (Prins *et al.* 1980, 1982)。これは、葉の裏側での $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ なる反応により、 HCO_3^- を CO_2 に変換して光合成に効率よく利用するための戦略である。一方、葉の表側からは余った OH^- が放出される。すなわち、車軸藻で見られる光合成戦略がこの仲間にも見られるのである。Fig. 32 は、共同研究者の伊澤 (1994) がセンニンモの極性葉を例にして作成した模式図である。また伊澤 (1994) は、葉の裏側の H^+ 放出が細胞膜に存在するプロトンポンプ (Mg^{2+} -ATPase) に依るもので、葉の表側のアルカリ化は

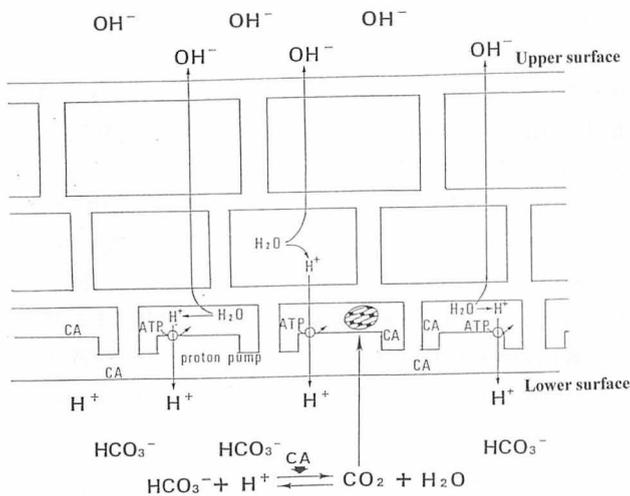


Fig. 32. Model of photosynthetic bicarbonate utilization by the polar leaf of submerged angiosperm *Potamogeton maackianus* (from Izawa 1994).

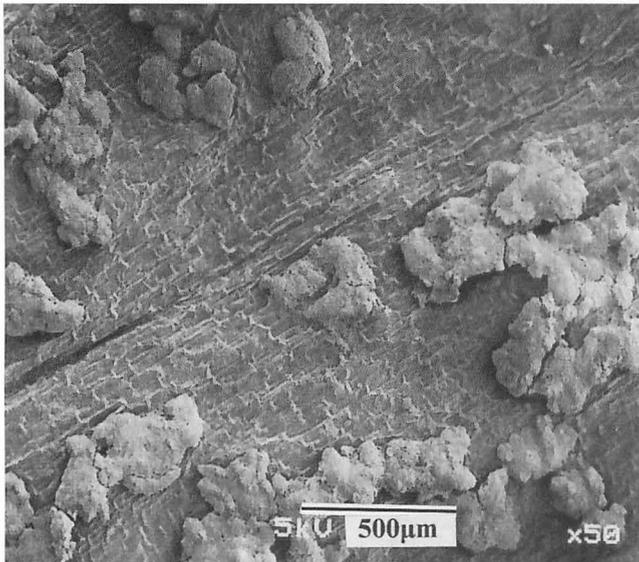


Fig. 33. CaCO_3 (calcite) deposited on upper surface of an aged leaf of aquatic angiosperm *Egeria densa* (from Hirayama 2000).

プロトンポンプの阻害剤 Na_3VO_4 (1 mM) で阻害されることを示した。さらに共同研究者の高橋 (2004) はオオカナダモの葉を使って、 $100 \mu\text{M}$ Na_3VO_4 存在下で光合成を測定し、 CO_2 が豊富な pH 6.5 では全く阻害されないのに対して、 HCO_3^- に富むアルカリ域 (pH 8.5) では約 90% 阻害されることを示した。

ところで、エビモやオオカナダモの葉は、葉の表側がアルカリ化するにもかかわらず、若い葉では石灰化は見られず、老化すると方解石の CaCO_3 の沈着が起こる (Fig. 33)。筆者の研究室の押田と平山は、なぜ光合成の盛んな若い葉では石灰化が生じないのかについて調べた。その結果、エビモ、オオカナダモの葉からは、石灰化を阻害する物質が培地に分泌されることが明らかになった (押田 1997, 平山 2000) (Fig. 34)。一方、石灰化するヒメフラスモ (*Nitella flexilis*) からはそのような物質が分泌されない。この阻害物質を濃縮して高速液体クロマトグラフィーで調べたところ、紫外線吸収物質が含まれていることが示された。その一つは、吸収スペクトラムから Caffeic acid と同定され、Ferulic acid 類似の物質も含まれることが強く示唆された (平山 2000)。ここでは示さないが、Caffeic acid と Ferulic acid は試験管内での CaCO_3 形成を強く阻害した。また培養液中に Ferulic acid を加えると、ヒメフラスモの石灰化は完全に阻害された (押田 1997)。両物質はフェノール物質で、リグニンの前駆物質の一つである (Norman & Yamamoto 1990) (Fig. 35)。事実、これらの植物の葉にはリグニンが存

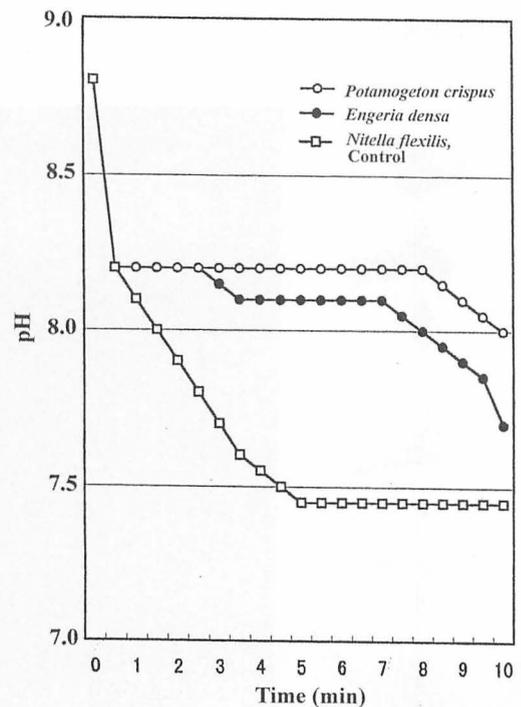


Fig. 34. Effect of CaCO_3 precipitation *in vitro* by substances secreted into culture medium of *Potamogeton crispus*, *Egeria densa* and *Nitella flexilis* (from Hirayama 2000). Plants were cultured in glass container (approximately 150 mL) in the light for one month, and the culture medium was concentrated into 5 mL after treatment with cation-exchange. For assay medium and method, see Fig. 13.

在することが組織化学的に検出された (押田 1997)。一方、車軸藻の細胞壁にはリグニンが存在しないことが報告されており (Anderson & King 1961), 組織化学的にも検出できなかった。また、フェノール物質が石灰化阻害物質であることが報告されている (Reynolds 1978)。こうして、極性葉を持つ沈水植物は、若い葉ではリグニン前駆物質を葉の表面から分泌して石灰化を阻害していると考えられる。葉の裏側でのプロトンポンプは、アルカリ化する葉の表側からは数細胞を隔てられており、この部位での石灰化が阻害されても影響を受けないと思われる。この点は、紅藻のサンゴモ類とは異なるのであろう。また、葉表面の石灰化は光を遮ることなどにより、光合成に不利に働くと思われる。

近年、日本各地の沿岸で“磯焼け”が起こり、海産資源に大きな影響を与えている。これには、サンゴモ類の繁茂も関与していると言われている。これに関して、リグニンの前駆体やその分解物であるフェノール物質が石灰化を阻害する事実は大変興味深い。沿岸の山林が失われ、川から海へ流れ込むこれらの物質が減少していることが磯焼けを促進している可能性も考えられる。また、大型の褐藻類にも細胞壁にリグニンが存在し、フェノール物質にも富むので、磯焼けによるこの仲間の減少はサンゴモ類の生育に好都合に働くであろう。

VI. 海洋における CaCO₃ 形成と地球における炭素循環

海洋においては、藻類を始めとする光合成生物によって海洋の溶存無機炭素は有機物に固定されると同時に、CaCO₃を形成する生物によって無機物の CaCO₃中に固定される。海洋における地球規模の CaCO₃形成量 (堆積量)は炭素量に換算して、年間 0.38 ギガトン (0.38 × 10⁹ トン, CaCO₃量で約 3.2 ギ

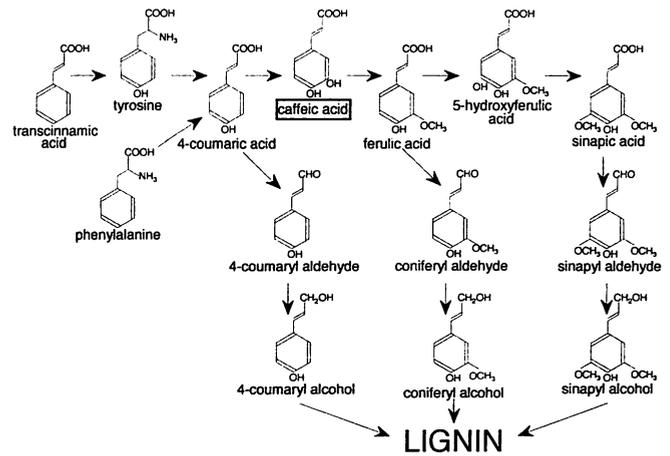


Fig. 35. Phenol substances as precursors in lignin synthesis (from Norman & Yamamoto 1990). Caffeic acid and unknown phenol substances were detected in the culture media of angiosperm *Egeria densa* and *Potamogeton crispus*.

ガトンに相当)と推定されている (Fig. 36, 図中の太字数値の和) (Milliman 1993, 鈴木 1997)。この CaCO₃形成は、サンゴ類、軟体動物 (貝殻形成)、有孔虫類、大型石灰藻 (石灰紅藻サンゴモ類、石灰緑藻サボテングサ類など)、円石藻 (エミリアニア・ハックスレーなど)などの石灰化によるものである。北野 (1993)によれば、海水中のカルシウム濃度は、少なくとも過去 20 億年の間は一定であり、このイオンに関して定常状態にあるとしている。このことから、現海洋では、CaCO₃として沈着するカルシウムは、それに等しい量が海洋に供給されていることになる。Milliman (1993)は、毎年河川から 1.3 × 10¹³ モル、地下水

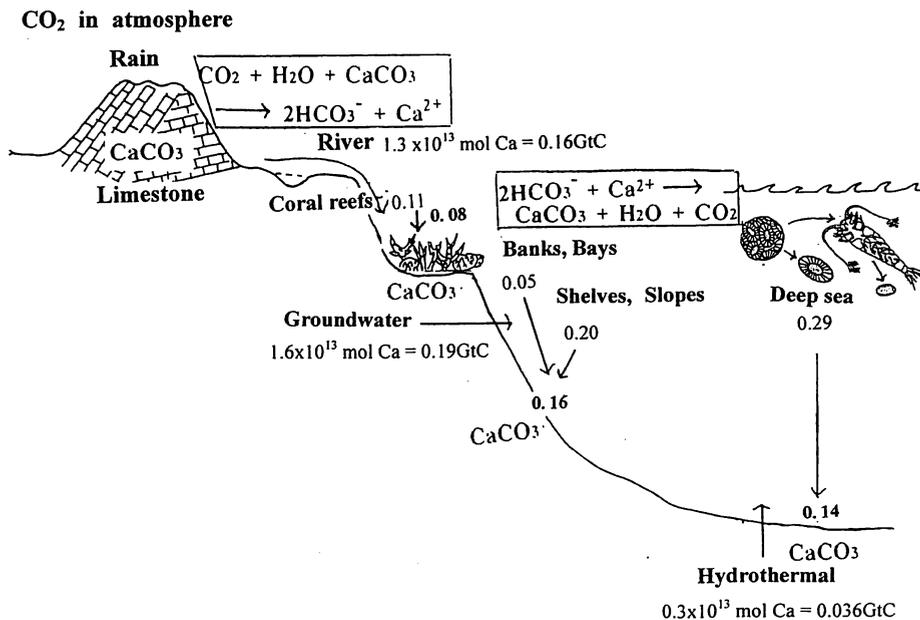


Fig. 36. Schematic diagram showing a possible steady state between supply of calcium and its consumption by accumulation of CaCO₃ in the modern ocean (from Suzuki 1997). The amount of CaCO₃ is calculated from the amount of Ca supplied into the ocean per year and shown as Giga-ton (10⁹ ton) of carbon.



Fig. 37. Limestone at Kimmeridge in South England. This limestone is estimated to be produced by coccolithophorid at late Jurassic Period.

から 1.6×10^{13} モル、深海熱水鉱床から 0.3×10^{13} モルの流入量 (合計 3.2×10^{13} モル) と見積もっており、これが CaCO_3 の沈着量 (堆積量) と釣り合っていると考えている。これらの値から計算される CaCO_3 沈着量の炭素換算量は、上記の炭素換算量 0.38 ギガトンとほぼ等しい。海に供給されるこれらのカルシウムは石灰岩が溶解によるものと考えられており、 $\text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{Ca}^{2+}$ の反応に因るものと考えられている (Fig. 36)。石灰岩の溶解で、 HCO_3^- も同時に供給されることになる。この溶解過程では大気中の CO_2 が吸収される。一方海洋での石灰化過程では、これとは逆の反応で CaCO_3 が形成されるので (Fig. 36)、この過程では CO_2 が放出されることになる。こうして、海洋生物による石灰化で CO_2 が放出されるが、石灰岩の溶解過程を合わせて考えれば、大気中の CO_2 を増やすことは無い。しかし、過去の地球では、岩石中のカルシウムが溶解して海洋に供給され、非生物学的に CaCO_3 が形成された (北野 1993)。この過程では、海洋に溶解した大気中の CO_2 は HCO_3^- となり、その 1 分子が CaCO_3 中に固定さ

れ ($2\text{HCO}_3^- + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$)、1 分子は海水中に放出され海水を酸性化するが、岩石や土壌からアルカリ金属などの溶解で海水の再アルカリ化も並行して起こり、上記の反応が繰り返されて、大気中の CO_2 は石灰岩中に徐々に固定されて行ったと考えられる。現地球では無機過程による炭酸塩の形成はあるものの、地球全体から見れば極く僅かで、石灰岩の溶解と海洋生物による石灰化が中心に行われて、海洋のカルシウムにおいても、大気中の CO_2 においても平衡が保たれた状態であると考えられる。地球の石灰岩量は約 15 億年前から変化していないとする報告もある (大嶋 1989)。Fig. 37 はイギリスの南海岸キンメリッジで撮影された石灰岩で、ジュラ紀後期 (約 1 億 4000 万年前) に円石藻によって形成されたものである。現在でも、北大西洋 (北海) ではエミリアニア・ハックスレーによる大規模なブルームが人工衛星写真で示されており、大量の CaCO_3 が形成されている (Holligan *et al.* 1983)。こうして、現地球では、海洋生物による CaCO_3 形成と陸における石灰岩の溶解は一つの CO_2 循環 (約 0.38 ギガトン炭素 / 年) (Milliman 1993) を形成しており、他方では陸と海洋での生物の光合成と呼吸による有機物を介した CO_2 循環 (約 110 ギガトン炭素 / 年) (Schimel 1995, 鈴木 1997) が行われ (Fig. 38)、2 つの CO_2 循環は、大気中の CO_2 濃度を微妙かつ一定に保つのに重要な役割を担っていると言える (小野寺・岡崎 2005)。

地球温暖化の対策として、関西電力 (株) 総合技術研究所環境技術研究センターでは、円石藻ゲフィロカプサ・オセアニカやブリュウロクリシス・カルテレーを使って火力発電の排ガス中の CO_2 を不溶性の CaCO_3 (コッコリス) 中に固定する試みがなされた (日本エヌ・ユー・エス 1992)。微細藻類による有機物中に CO_2 を固定しようとする研究が多いが (例えば、Kodama *et al.* 1993 など)、 CaCO_3 中に固定するアイデアは独創的なものであった。筆者もこの研究に関係した。海水中に排ガスの CO_2 を吹き込むと、 HCO_3^- が形成され、この 2 分子の HCO_3^- のうち 1 分子を不溶性の CaCO_3 として固定できる (Fig.

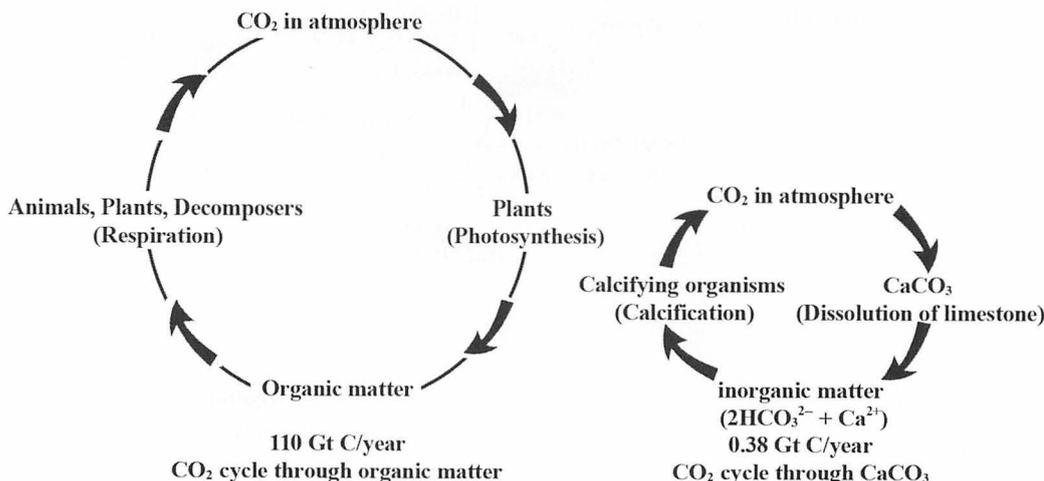


Fig. 38. Two global CO_2 cycles through organic matter by photosynthesis and respiration, and through CaCO_3 by dissolution of limestone and calcification (modified from Onodera & Okazaki 2005).



Fig. 39. Cultivation of coccolithophorid *Gephyrocapsa oceanica* or *Pleurocysis carterae* under sun light for fixation of CO₂ from exhaust gas. This project was funded by Kansai Denryoku Power Plant in 1991–1992.

36)。同センターでは上記2種円石藻の大量培養に成功した。Fig. 39は同センターの屋上で、太陽光を利用して培養している様子を示す(写真には補助的な人工光源も示されている)。また、筆者の研究室の中村(2002)は大気(0.03% CO₂を含む)を通気した場合、プリユロクリシス・カルテレーでは、CO₂固定能は東北電力(株)で研究されている緑藻 *Chlorococcum littorale* (Kodama *et al.* 1993)に匹敵し、取り込まれた炭素の約20%がCaCO₃中に固定されることを示した。しかし、排ガス中のCO₂濃度は約20%と高く、かつ亜硫酸ガスなどが含有されており、これを直接培養海水に吹き込むと海水が酸性化し、藻体が増殖せず、また形成されたコッコリスが溶解してしまうことが予想される。そのため、培養海水をアルカリで中和する必要が生じてしまうことも考えられる。

VII. 最後に

本総説では、藍藻、紅藻、褐藻、ハプト藻、緑藻、車軸藻に属する石灰藻の石灰化部位、CaCO₃結晶の結晶形及び石灰化機構について解説した。そして、紅藻サンゴモ類には、筆者らによってアルギン酸が発見されたこと、この酸性多糖がMg-方解石を誘導することを述べた。この仲間は細胞膜に存在するプロトンポンプ(Ca²⁺-ATPase)によって海水中に豊富なHCO₃⁻をCO₂に変えて効率的に光合成で利用する“光合成戦略”を持ち、これと石灰化が共役している可能性を指摘した。この石灰化機構は既に車軸藻で知られているものである。極性葉によって同様な光合成戦略を持つ沈水被子植物はリグニンの前駆物質(フェノール物質)が石灰化を阻害していることから、細胞壁成分の進化と石灰化との関連が考察される。ハプト藻の円石藻類については、コッコリスの形成過程、結晶学的特徴、V/Rモデル、コッコリスに含まれる酸性多糖類の機能、プロトンポンプと光合成、石灰化との関連の有無について議論した。さらに、現在の地球においては、海洋でのCaCO₃形成は大気中のCO₂の微妙な平衡を保つのに貢献していることを述べた。また、石灰化と“磯焼け”との関係を論じた。

VIII. 謝辞

本総説を発表するにあたり、藻類の石灰化に関する研究テーマをいただき、永年に亘りご指導いただいた東京学芸大学名誉教授古谷庫造先生及び東京教育大学名誉教授西澤一俊先生に深く感謝申し上げます。しかし、古谷庫造先生は一昨年暮れ(2007年12月)に突然他界され、この総説をお見せすることができないのは本当に残念です。この総説を恩師古谷庫造先生に捧げます。また、CaCO₃の結晶学について、共同研究者として良き助言をいただいていた工学博士和田徳雄氏にお礼申し上げます。

本総説中には、筆者の研究室で卒業研究、修士論文を作成された次の諸氏の未発表の貴重な研究結果やデータを引用させていただきました。それは、山口俊也、野口大和、森 泉、岡村好子、安弘(伊澤)百代、尾崎紀昭、岡崎敦視、蒔田(押田)智子、多田智子、平山蘭子、四宮範明、山田(中村)絵里、高橋史明、林 義彦、古村武人の諸氏(カッコ内は旧姓)の研究によるもので、ここに厚くお礼申し上げます。これら共同研究者の学部卒業論文は東京学芸大学生物学教室の図書室に、また修士論文は同大学附属図書館に全て保管されていますので、必要があればご覧ください。

引用文献

- Anderson, D. M. W. & King, J. 1961. Polysaccharides of the Characeae. II. The carbohydrate content of *Nitella translucens*. *Biochim. Biophys. Acta* 52: 441–449.
- Asahina, M. & Okazaki, M. 2004. Inhibition of crystal growth in coccolith formation of *Pleurocysis carterae* by a potent scale inhibitor, (1-hydroxyethylidene) bisphosphonic acid (HEBP). *Thalassas* 20: 51–58.
- Böhm, L., Fütterer, D & Kaminski, E. 1978. Algal calcification in some Codiaceae (Chlorophyta): Ultrastructure and location of skeletal deposits. *J. Phycol.* 14: 486–493.
- Borman, A. H., de Jong, E. W., Thierry, R., Westbroek, P. & Bosch, L. 1987. Coccolith-associated polysaccharides from cells of *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae). *J. Phycol.* 23: 118–123.
- Borowitzka, M. A. 1977. Algal calcification. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 15: 189–223.
- Borowitzka, M. A. 1982a. Morphological and cytological aspects of algal calcification. *Int. Rev. Cytol.* 74: 127–162.
- Borowitzka, M. A. 1982b. Mechanisms in algal calcification. In: Round, F. E. & Chapman, D. J. (eds.) *Progress in Phycological Research* 1: 137–177. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Borowitzka, M. A. & Larkum, A. W. D. 1976a. Calcification in green alga *Halimeda*. III. The sources of inorganic carbon for photosynthesis and calcification and a model of the mechanism of calcification. *J. Exp. Bot.* 27: 879–893.
- Borowitzka, M. A. & Larkum, A. W. D. 1976b. Calcification in green alga *Halimeda*. IV. The action of metabolic inhibitors on photosynthesis and calcification. *J. Exp. Bot.* 27: 894–907.
- Borowitzka, M. A. & Larkum, A. W. D. 1977. Calcification in the green alga *Halimeda*. I. An ultrastructure study of thallus development. *J. Phycol.* 13: 6–16.
- Borowitzka, M. A. & Vesik, M. 1978. Ultrastructure of the Corallinaceae. I. The vegetative cells of *Corallina officinalis* and *C. cuvierii*. *Mar. Biol.* 46: 295–304.
- Borowitzka, M. A., Larkum, A. W. D. & Nockolds, C. E. 1974. A scanning electron microscope study of the structure and

- organization of the calcium carbonate deposits of algae. *Phycologia* 13: 195–203.
- Brown, C. W. & Yoder, J. A. 1994. Coccolithophorid blooms in the global ocean. *J. Geophys. Res.* 99: 7467–7482.
- Cohen, G. H. & Johnstone, D. B. 1964. Extracellular polysaccharides of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 88: 329–338.
- Cooper, T. G. & Filmer, D. 1969. The active species of “CO₂” utilized by ribulosediphosphate carboxylase. *J. Biol. Chem.* 244: 1081–1083.
- De Jong, E. W., Bosch, L. & Westbroek, P. 1976. Isolation and characterization of a Ca²⁺-binding polysaccharide associated with coccoliths of *Emiliania huxleyi* (Lohmann) Kamptner. *Eur. J. Biochem.* 70: 611–621.
- Didymus, J. M., Mann, S., Sanderson, N. P., Oliver, P., Haywood, B.R. & Aso-Samper, E.J. 1991. Modelling biomineralization: Studies on the morphology of synthetic calcite. In: Suga, S. & Nakahara, H. (eds.) *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*. pp. 267–271. Springer-Verlag, Tokyo.
- Dixon, K. R., Kraft, G. T. & Saunders, G. W. 2007. Morphological and molecular studies on the Peyssonneliaceae from Vanuatu and southeastern Australia. *J. Phycol.* 43 (Suppl. 1): 47–48.
- Fichtinger-Schepman, A. M. J., Kamerling, J. P., Versluis, C. & Vliegthart, J. F. G. 1981. Structural studies of the methylated, acid polysaccharide associated with coccoliths of *Emiliania huxleyi* (Lohmann) Kamptner. *Carbohydrate Res.* 93: 105–123.
- Goldsmith, J. R., Graf, D. L. & Joensuu, O. I. 1955. The occurrence of magnesium calcite in nature. *Geochim. Cosmochim. Acta* 7: 212–230.
- Goreau, T. F. 1963. Calcium carbonate deposition by coralline algae and corals in relation to their roles as reef-builders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 109: 127–167.
- Gunning, B. E. S. & Pate, J. S. 1969. “Transfer cells”: plant cells with wall ingrowths, specialized in relation to short distance transport of solutes – their occurrence, structure, and development. *Protoplasma* 68: 107–133.
- 林 義彦 2004. 円石藻 *Pleurochrysis carterae* CCMP645 (ハプト植物門) の石灰化(コッコリス形成)が光合成に及ぼす影響. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- Hillis-Colinvaux, L. 1980. Ecology and taxonomy of *Halimeda*: Primary producer of coral reef. *Adv. Mar. Biol.* 7: 1-327.
- 平山蘭子 2000. 石灰化の進化と細胞壁組成—沈水被子植物エビモ, オオカナダモの葉から分泌される石灰化阻害物質の同定—. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- Holligan, P. M., Viollier, M., Harbour, D. S., Camus, P. & C-Philippe, M. 1983. Satellite and ship studies of coccolithophore production along a continental shelf edge. *Nature* 304: 339–342.
- 伊澤百代 1994. 沈水被子植物センニンモ (ヒルムシロ科) の葉の光合成における HCO₃⁻ の利用機構. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- Kato, A., Baba, M., Kawai, H. & Masuda, M. 2006. Reassessment of the little-known crustose red algal genus *Polysratria* (Gigartinales), based on morphology and ssu r-DNA sequences. *J. Phycol.* 42: 922–933.
- 北野 康 1993. 地球化学の目でみる炭素循環. *地学雑誌* 102: 633–653.
- Kitano, Y. & Hood, D. W. 1962. Calcium carbonate crystal forms formed from sea water by inorganic processes. *J. Oceanogr. Soc. Japan* 18: 141–145.
- Kodama, M., Ikemoto, H. & Miyachi, S. 1993. A new species of highly CO₂-tolerant, fast-growing marine microalga suitable for high-density culture. *J. Mar. Biotechnol.* 1: 21–25.
- 古村武人 2007. 植物の石灰化部位におけるカーボニックアンヒドラーゼ (CA) の有無—円石藻 *Pleurochrysis carterae* と *Emiliania huxleyi* の単離コッコリス, 及びガジュマルの鍾乳体について—. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- Linker, A. & Jones, R. S. 1964. A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* micro-organism. *Nature* 204: 187–188.
- Lucas, W. J. & Smith, F. A. 1973. The formation of alkaline and acid regions at the surface of *Chara corallina* cells. *J. Exp. Bot.* 24: 1–14.
- Mann, S. 1983. Mineralization in biological systems. *Struct. Bonding* 54: 125–174.
- Marsh, M. E. 1994. Polyanion-mediated mineralization-assembly and reorganization of acidic polysaccharides in the Golgi system of a coccolithophorid alga during mineral deposition. *Protoplasma* 177: 108–122.
- Marsh, M. E., Chang, D. & King, G. C. 1992. Isolation and characterization of a novel acidic polysaccharide containing tartrate and glyoxylate residues from the mineralized scales of a unicellular coccolithophorid alga *Pleurochrysis carterae*. *J. Biol. Chem.* 267: 20507–20512.
- McConnaughey, T. A. & Whelan, J. F. 1997. Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake. *Earth-Sci. Rev.* 42: 95–117.
- Milliman, D. J. 1993. Production and accumulation of calcium carbonate in the ocean. Budget of a nonsteady state. *Global Biochem. Cycles* 7: 927–957.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T. & Matsushiro, A. 1996. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9657–9660.
- Miyata, M., Okazaki, M. & Furuya, K. 1980. Initial calcification site of the calcareous red alga *Serraticardia maxima* (Yendo) Silva (Studies on the calcium carbonate deposition of algae III. In: Omori, M. & Watabe, N (eds.) *The Mechanisms of Biomineralization in Animals and Plants*. pp. 205–510. Tokai Univ. Press, Tokyo.
- 森 泉 1992. 円石藻 *Pleurochrysis carterae* (ハプト植物門) の細胞膜画分の調製と膜結合 ATP アーゼの性質. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- Mori, I. C., Sato, G. & Okazaki, M. 1996. Ca²⁺-dependent ATPase associated with plasma membrane from a calcareous alga, *Serraticardia maxima* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Phycol. Res.* 44: 193–202.
- 中村絵里 2002. 円石藻を含む海産微細藻4種における炭酸固定能の比較. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- Nancollas, G. H. & Sawada, K. 1982. Formation of scales of calcium carbonate polymorphs: The influence of magnesium ion and inhibitors. *J. Petro. Technol.* 34: 645–651.
- Nimer, N. A. & Merrett, M. J. 1992. Calcification and utilization of inorganic carbon by the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* Lohmann. *New Phytol.* 121: 173–177.
- 日本エヌ・ユー・エス (株) 1992. ハプト藻における CO₂ 固定に関する基礎研究. 平成3年度下期報告書.
- 野口大和 1992. 円石藻 *Pleurochrysis carterae* (ハプト植物門) の石灰化が光合成に及ぼす影響. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- Norman, G. L. & Yamamoto, E. 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 41: 455–496.
- 岡村好子 1995. 円石藻 (ハプト植物門) のカーボニックアンヒドラーゼの生理学的役割. 東京学芸大学大学院修士課程 (理科教育専攻) 修士論文.
- 岡崎教視 1997. 円石藻 *Emiliania huxleyi* の原形質膜における Mg²⁺ 依存性 ATPase と Ca²⁺/H⁺ アンチポーターの共役による輸送. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- 岡崎恵視・古谷庫造 1985. 藻類の石灰化機構. *藻類* 33: 328–344.
- Okazaki, M., Furuya, K., Tsukayama, K. & Nisizawa, K. 1982a.

- Isolation and identification of alginic acid from a calcareous red alga *Serraticardia maxima*. Bot. Mar. 25: 123–131.
- Okazaki, M., Ichikawa, K. & Furuya, K. 1982b. Studies on the calcium carbonate deposition of algae-IV. Initial calcification site of calcareous red alga *Galaxaura fastigiata* Decaisne. Bot. Mar. 25: 511–517.
- 岡崎恵視・佐藤達也・武藤尚子・和田徳雄 1996. 円石藻の炭酸カルシウムの鱗“コッコリス” – その微細構造, 結晶学的特性および酸性多糖. 和田・小林(編著) 海洋生物の石灰化と硬組織, pp. 117–125. 東海大学出版会.
- Okazaki, M., Sato, T., Mutho, N., Wada, N. & Umegaki, T. 1998. Calcified scales (coccoliths) of *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta): Structure, crystallography, and acid polysaccharides. J. Mar. Biotechnol. 6: 16–22.
- 岡崎恵視・白戸 爾・古谷庫造 1984. 石灰紅藻オオシコロとミヤベオコンにおけるウロン酸多糖の局在性と石灰化部位との関連について(藻類のCaCO₃沈着に関する研究VI). 藻類 32: 364–372.
- 岡崎恵視・高田真美・宮田昌彦 1977. 石灰緑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.
- Okazaki, M., Tanaka, Y., Miyata, M. & Pentecost, A. 1986. A study of calcium carbonate deposition in genus *Padina* (Phaeophyceae, Dictyotales). Br. Phycol. J. 21: 217–224.
- Okazaki, M. & Tazawa, K. 1989. Alginic acid in Corallinaceae (Cryptonemiales, Rhodophyta). Korean J. Phycol. 4: 213–219.
- Okazaki, M. & Tokita, M. 1988. Calcification of *Chara braunii* (Charophyta) caused by alkaline band formation coupled with photosynthesis. Jpn. J. Phycol. 36: 193–201.
- 大嶋和雄 1989. 地球温暖化の原因と対策について. 地質ニュース 422: 34–45.
- 小野寺彩子・岡崎恵視 2005. コンクリートつららの教材化の基礎研究 – 生物石灰化機構, 及び石灰岩を通じた大気中のCO₂循環のモデル. 東京学芸大学紀要. 自然科学系 57: 41–56.
- 押田智子 1997. 沈水被子植物エビモ, オオカナダモの葉はなぜ石灰化しないのか. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- Outka, D. E. & Williams, D. C. 1971. Sequential coccolith morphogenesis in *Hymenomonas carterae*. J. Protzool. 18: 285–297.
- 尾崎紀昭 1998. 円石藻(ハプト植物門)の石灰化機構の解明 – カルシウム結合酸性多糖とカーボニックアンヒドラーゼの役割. 東京学芸大学大学院修士課程(理科教育専攻) 修士論文.
- 尾崎紀昭 2001. 円石藻の石灰化に関する酸性多糖の構造と機能に関する研究. 東京大学大学院農学生命科学研究科博士論文.
- Ozaki, N., Okazaki, M., Kogure, T., Sakuda, S. & Nagasawa, H. 2004. Structural and functional diversity of acid polysaccharides from various species of coccolithophorid algae. Thalassas 20: 59–68.
- Paasche, E. 1964. A tracer study of the inorganic carbon uptake during coccolith formation and photosynthesis in the coccolithophorid, *Coccolithus huxleyi*. Physiol. Plant., Suppl. 3: 5–82.
- Pentecost, A. 1980. Calcification in plant. Int. Rev. Cytol. 62: 1–27.
- Price, G. D., Badger, M. R., Bassett, M. E. & Whitecross, M. I. 1985. Involvement of plasmalemmasomes and carbonic anhydrase in photosynthetic utilization of bicarbonate in *Chara corallina*. Aust. J. Plant. Physiol. 12: 241–256.
- Prins, H. B. A., Snel, J. F. H., Helder, R. J. & Zenstra, P. E. 1980. Photosynthetic HCO₃⁻ utilization and OH⁻ excretion in aquatic angiosperms. Plant. Physiol. 66: 818–822.
- Prins, H. B. A., Snel, J. F. H., Zenstra, P. E. & Helder, R. J. 1982. The mechanism of bicarbonate assimilation by the polar leaves of *Potamogeton* and *Elodea*. CO₂ concentrations at the leaf surface. Plant Cell Environ. 5: 207–214.
- Reynolds, R. C. 1978. Polyphenol inhibition of calcite precipitation in Lake Powell. Limnol. Oceanogr. 23: 585–597.
- Schimmel, D. C. 1995. Terrestrial ecosystems and the carbon cycle. Global Chang Biol. 1: 77–91.
- Sekino, K. & Shiraiwa, Y. 1994. Accumulation and utilization of dissolved inorganic carbon by a marine unicellular coccolithophorid, *Emiliania huxleyi*. Plant Cell Physiol. 35: 353–361.
- 四宮範明 2000. 石灰紅藻オオシコロにおけるプロトン放出と光合成戦略. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- Smith, F. A. 1968. Rates of photosynthesis in Characean cells. II. Photosynthetic ¹⁴C-fixation and ¹⁴C-bicarbonate uptake by Characean cells. J. Exp. Bot. 19: 207–217.
- Soto, A. R., Zheng H., Shoemaker, D., Rodriguez, J., Read, B. A. & Wahlund, T. M. 2006. Identification and preliminary characterization of two cDNAs encoding unique carbonic anhydrases from the marine alga *Emiliania huxleyi*. Environ. Microbiol. 72: 5500–5511.
- Spear, D. G., Barr, J. K. & Barr, C. E. 1969. Localization of hydrogen ion and chloride ion fluxes in *Nitella*. J. Gen. Physiol. 54: 397–414.
- Stark, L. M., Almodovar, L. & Krauss, R. W. 1969. Factors affecting the rate of calcification in *Halimeda opuntia* (L.) Lamouroux and *Halimeda discoidea* Decaisne. J. Phycol. 5: 305–312.
- 鈴木 款(編著) 1997. 海洋生物と炭素循環, pp. 157–162. 東京大学出版会.
- 多田智子 2008. 円石藻 *Pleurochrysis carterae* (ハプト植物門) のコッコリスの構造と形態形成. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- 高橋史明 2004. 沈水植物及び藻類の光合成戦略とその石灰化機構との関連. 東京学芸大学大学院修士課程(理科教育専攻) 修士論文.
- Takakura, D., Ishikawa, F. & Samata, T. 2008. Isolation and characterization of the N-linked oligosaccharides in nacrein from *Pinctada fucata*. Mar. Biotechnol. 10: 290–296.
- van der Wal, P., de Vrind, J. P. M., de Vrind-de Jong, E. W. & Borman, A. H. 1987. Incompleteness of the coccosphere as a possible stimulus for coccolith formation in *Pleurochrysis carterae* (Prymnesiophyceae). J. Phycol. 23: 218–221.
- Wada, N., Okazaki, M. & Tachikawa, S. 1993. Effects of calcium-binding polysaccharides from calcareous algae on calcium carbonate polymorphs under conditions of double diffusion. J. Crystal Growth 132: 115–121.
- Wainwright, I. M., Kwon, D.-K. & Gonzalez, E. 1992. Isolation and characterization of golgi from *Coccolithus pelagicus* (Prymnesiophyceae). J. Phycol. 28: 643–648.
- Waygood, E. R. 1955. Carbonic anhydrase (plants and animals). In: Colowick, S.P. & Kaplan, N. O. (eds.) Methods in Enzymology. vol. II. pp. 836–846. Academic Press, New York.
- Westbroek, P., De Jong, E. W., Van der Wal, P., Borman, A. H., de Vrind, J. P. M., Kok, D., De Bruijn, W. C. & Parker, S. B. 1984. Mechanisms of calcification in the marine alga *Emiliania huxleyi*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 304: 435–444.
- Wheeler, A. P., George, J. W. & Evans, C. A. 1981. Control of calcium carbonate nucleation and crystal growth by soluble matrix of oyster shell. Science 212: 1397–1398.
- Wilbur, K. M. & Watabe, N. 1963. Experimental studies on calcification in molluscs and the alga *Coccolithus huxleyi*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 109: 82–112.
- 山口俊也 1982. 紅藻アルギン酸の発見とその諸性質について. 東京学芸大学生物学教室卒業論文.
- Young, J. R., Didymus, J. M., Bown, P. R., Prins, B. & Mann, S. 1992. Crystal assembly and phylogenetic evolution in heterococcoliths. Nature 356: 516–518.