

ISSN 1348-4656

金沢大学環日本海域環境研究センター

**臨海実験施設**  
**研究概要・年次報告 第19号**  
**2020.4 ~ 2021.3**



九十九湾海底に設置した鯨骨の潜水による調査

Annual Report of Noto Marine Laboratory  
Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University

## 活 動 報 告

* 研究概要-----	2
* 研究業績-----	4
* 研究発表及び研究活動-----	7
* 研究交流-----	9
* 研究費-----	11
* 利用状況-----	13

## 【研究概要】

### 1. 魚類の自然免疫系に関する研究（木谷助教）

魚類の免疫系は哺乳類と比較して原始的であることから、標的特異的な獲得免疫系ではなく幅広い病原性微生物に対して非特異的に作用する自然免疫系が重要である。木谷助教は、魚類の体表粘液や血液中に存在する抗微生物因子についての研究を行っている。過去に魚類体表粘液が魚病細菌に効果的に作用することが観察されたことを端緒として、原因物質の同定を試みたところ、この物質は L-アミノ酸オキシダーゼ（LAO）であることがわかった。本成果は、魚類体表から抗菌物質として LAO を見出した初の例となった。

令和2年度においては最近の研究で存在が明らかとなったキジハタ *Epinephelus akaara* の LAO を対象として、その産生組織および産生細胞の特定に着手した。当該年度においては抗キジハタ LAO ウサギ抗血清を作製し、これを用いた免疫化学的手法による標的タンパク質の検出を試みた。はじめに、各組織に含まれる LAO 抗原交差タンパク質をウエスタンブロッティング法により検出した。キジハタ組織抽出液を調製し、これを SDS-PAGE に供し分離した。その後、ポリビニリデンジフルオライド膜に電気的転写を行い、スキムミルクによるブロッキング後、抗キジハタ LAO 抗血清および西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG マウス抗体を順次反応させた。反応後の膜にアミノエチルカルバゾール発色基質溶液を曝露させキジハタ LAO を可視化させた。LAO の同定は可視化されたバンドの移動度および精製抗原による中和で評価した。その結果、キジハタ LAO はキジハタの皮膚、鰓、血清に多くみられたほか、心臓、前腎および後腎で検出された。この結果を踏まえ、組織内における局在を免疫組織化学的手法で検討した。新鮮凍結切片を作製し、ウエスタンブロッティング法に準じた方法で抗キジハタ LAO 抗血清を反応後、ジアミノベンチジン発色基質溶液で LAO を可視化した。その結果、皮膚と鰓では体表粘液と粘液細胞に陽性反応が見られた。前腎および後腎においては、尿細管間隙と血管内皮に強い陽性反応が観察された。心臓においても、混入している血液以外に房室弁で陽性反応が見られた。以上の結果から、キジハタにおいて LAO は体表と血管内皮で産生されていることが予想された。

この成果は山本葉月君の卒業論文として取りまとめられ、「組織化学的手法による魚類抗菌タンパク質の局在について」として令和3年2月15日に卒業論文発表会で公表した。

### 2. 無脊椎動物及び脊椎動物の比較生理・内分泌学的研究（関口助教）

関口助教を中心とするグループは、脊椎動物に近縁な無脊椎動物や原始的な脊椎動物の神経系や内分泌系の働きに着目し、脊椎動物で発達した恒常性維持機構の起源や進化を研究している。現在、軟骨魚類の血中カルシウム濃度の恒常性維持機構の解明を目指して、アカエイ (*Hemitrygon akajei*) を用いたカルシトニンの機能解析を行っている。カルシトニンは、哺乳類や硬骨魚類では、血中カルシウム濃度低下ホルモンとして作用するが、軟骨魚類における機能は不明である。これまでアカエイに 2.5M 塩化カルシウムを含むコンソメ溶液を投与し、経時的に血漿を採取、血漿カルシウム濃度を測定した結果、3時間にピークを示す血漿カルシウム濃度の上昇とその後の緩やかな低下を確認した。今年度は、その再現性を検証するとともに、持続時間を確認した結果、3時間後のピークから定常状態に戻るのが、およそ4日後であり、24時間程度で定常状態に戻る硬骨魚類と比べると長期間高カルシウム血漿の状態にさらされることが明らかになった。このことからアカエイは、カルシウムの排出機構が硬骨魚に比べると未発達であると共に、血中カルシウム濃度が高くても個体の生存に影響がなく、細胞レベルで高カルシウム濃度に対する耐性を有することが推測される。さらに、カルシトニンの下流で働くことが想定される体内へのカルシウム取り込みや体外へのカルシウム排出に関する遺伝子について解析した。今年度は、共同研究者である東京大学大気海洋研究所の兵藤 晋教授、高木 互助教がアカエイ腎臓の RNA-seq 情報から同定した Calcium-sensing receptor (CaSR) の組織発現分布を RT-PCR 法で検討した結果、ユビキタスな CaSR mRNA の発現が認められた。

### 3. 海産無脊椎動物における環境汚染物質応答機構（関口助教）

関口助教を中心とするグループは、海洋汚染物質、特に多環芳香族炭化水素（PAH）類の海産無脊椎動物への影響を研究している。PAH類は、化石燃料や木材の不完全燃焼により生じ大気中に放出される環境汚染物質である。またPAH類は重油に含まれており、重油流出事故などによる海洋汚染の際に、海産動物にも影響を及ぼす。PAH類は、脊椎動物に対し発癌性物質、変異原性物質、内分泌かく乱物質として作用することが知られている。一方、海産無脊椎動物に対しては、様々な影響が指摘されているものの、PAH受容体は不明であり、その作用機序は解明されていない。そこで、海産無脊椎動物のモデルとして、カタユレイボヤ (*Ciona intestinalis* type A) を用い、PAH受容体の探索を目的とした研究を行なっている。本年度は、旭川医科大学の矢澤隆志先生との共同研究で、ホヤのPAH受容体を探索した。候補は、芳香族炭化水素受容体 (AhR) である。ホヤ AhR-GAL4 融合蛋白質発現ベクターと GAL4 ルシフェラーゼレポーターベクターを哺乳類細胞株に導入し、脊椎動物 AhR の著名なリガンドである TCDD (ダイオキシンの一種) を添加後、ルシフェラーゼ活性を測定した結果、濃度依存的な TCDD による AhR の転写活性上昇を検出した。さらに PAH のひとつである Benzo[a]pyrene も濃度依存的にホヤ AhR に応答することが明らかとなった。これらの結果は、ホヤ AhR がリガンド認識活性を持つことを意味する。これは、無脊椎動物で初めての発見である。本研究は、クリタ水・環境科学振興財団の助成のもとで実施された。

### 4. 海洋汚染に関する研究（鈴木教授）

今年度は、住友財団の助成を受けて、マイクロプラスチックから溶出され、実際に海域にも検出されているスチレンオリゴマーの内分泌かく乱作用を調べた。国連環境計画の報告書（2018年）によると、プラスチック製品は世界全体で約 90 億トンが生産され、そのうち 9% しかリサイクルされず、それ以外は地中に埋められるか、捨てられ、海洋ゴミとなっている。特に海洋ゴミなどの大きなプラスチック材料が紫外線や波などにより機械的に壊れて細かい断片になる結果、環境中に形成されてマイクロプラスチックとなっている。マイクロプラスチックは難分解性であり、海洋という低温の環境下では分解しないと信じられてきた。しかし実際に海洋中にはスチレンオリゴマー（特に、スチレントリマー）が存在している。そこでスチレンオリゴマーの毒性を調べた。ビスフェノールAを魚に投与することにより、骨代謝に関与するホルモンの分泌と血液中のカルシウム濃度に影響を及ぼすことを報告している（Suzuki and Hattori, Life Sciences 2003; Suzuki et al., Zoological Science, 2003）ので、骨代謝に注目してスチレンオリゴマーの影響を調べた。魚類のウロコを用いた *in vitro* バイオアッセイを用いて、淡水魚のキンギョのウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析した。即ち、スチレンモノマー、スチレンダイマー及びスチレントリマー（10, 100 及び 1,000 µg/l）を入れてウロコを6時間培養後に破骨細胞及び骨芽細胞の活性を測定した。その結果、キンギョにおいては、スチレンオリゴマー（10 及び 100 µg/l）は、破骨細胞及び骨芽細胞の活性を上昇させるように作用した。したがって、スチレンオリゴマーは、魚類の骨代謝に影響を及ぼしていることが判明した。今後、詳細な機構を調べていく予定である。

### 5. 魚類に対する海洋深層水の影響評価（鈴木教授）

海洋深層水とは、水深 200 m 以深に存在する深海の海水のことを示し、低温状態で、豊富なミネラルや無機栄養分を含み、細菌数が少ないという特徴を持つ。また海洋深層水は、水産増養殖分野において、海産動物の生育を改善する飼育水等に利用されているが、その根拠は明らかになっていない。鈴木教授を中心としたグループは、海洋深層水の魚類生理に及ぼす影響について生理学的な側面から研究を行い、海洋深層水にメジナ及びヒラメのストレス低減作用を見出した。その結果を基にして特許を申請した（能登海洋深層水のストレス低減作用、特願 2018-022738、審査請求中）。本年度、この特許を基にして三井物産ケミカル（株）と共に申請した科学技術振興機構の A-STEP が採択された。さらに今年度、三井物産ケミカル（株）に加えて、赤穂化成工業（株）との共同研究も開始した。海洋深層水を魚の養殖事業に生かすことを計画中である。

## 【研究業績】

### 1) 学術論文

- (1) Kitamura, K., Hirayama, J., Tabuchi, Y., Minami, T., Matsubara, H., Hattori, A. and Suzuki, N., Glyoxal-induced formation of advanced glycation end products in type 1 collagen decreases both its strength and flexibility *in vitro*. *Journal of Diabetes Investigation*, in press.
- (2) Srivastav, A.K., Agarwal, K., Kumar, A., Prasad, M.R., Srivastav, S.K. and Suzuki, N., Effect of chromium chloride on serum calcium and phosphate levels of stinging catfish *Heteropneustes fossilis*. *International Aquatic Research*, in press.
- (3) Srivastava, B.D., Srivastava, M., Srivastav, S.K., Urata, M., Suzuki, N. and Srivastav, A.K., Cypermethrin-induced alterations in serum calcium and phosphate of rats: protective role of jamun seed and orange peel extracts. *Jordan Journal of Biological Sciences*, in press.
- (4) Srivastava, B.D., Srivastava, M., Srivastav, S.K., Urata, M., Suzuki, N. and Srivastav, A.K., The protective effects of jamun seeds and orange peels extracts on calcitonin cells and parathyroid glands against cypermethrin toxicity. *Iranian Journal of Toxicology*, in press.
- (5) Takahashi, Y., Kawago, U., Shimasaki, Y., Oshima, Y. and Suzuki, N., Simple analysis method of hexavalent chromium in soil using a portable device. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, in press.
- (6) Yazawa, T., Inaba, H., Imamichi, Y., Sekiguchi, T., Uwada, J., Islam, M.S., Orisaka, M., Mikami, D., Ida, T., Sato, T., Miyashiro, Y., Takahashi, S., Khan, R.I., Suzuki, N., Umezawa, A. and Kitano, T., Profiles of 5 $\alpha$ -reduced androgens in human and eel: 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and 11-ketodihydrotestosterone are active androgens produced in eel gonads. *Frontiers in Endocrinology*, in press.
- (7) Yazawa, T., Sato, T., Nemoto, T., Nagata, S., Imamichi, Y., Kitano, T., Sekiguchi, T., Uwada, J., Islam, M.S., Tanguchi, T., Mikami, D., Nakajima, I., Takahashi, S., Khan, R.I., Suzuki, N., Umezawa, A. and Ida, T., 11-ketotestosterone is a major androgen produced in porcine adrenal and testis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, in press.
- (8) Osaka, Y. and Kitani, Y., 2021, Blood loss induces L-amino acid oxidase gene expression in the head kidney of the red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Developmental & Comparative Immunology*, **114**, 103842.
- (9) Srivastava, B.D., Srivastava, M., Srivastav, S.K., Urata, M., Suzuki, N. and Srivastav, A.K., 2021, Ameliorative effects of jamun seed and orange peel extracts on microcystin LR induced alterations in calcitonin cells and parathyroid gland of rats. *Microscopy Research and Technique*, **84**, 571-578.
- (10) Tabuchi, Y., Hasegawa, H., Suzuki, N., Furusawa, Y., Hirano, T., Nagaoka, R., Hirayama, J., Hoshi, N. and Mochizuki, T., 2021, Identification of early response genes to low-intensity pulsed ultrasound in mouse ST2 bone marrow stromal cells. *Molecular Medicine Reports*, **23**, 173.
- (11) Zahangir, Md.M., Matsubara, H., Ogiso, S., Suzuki, N., Ueda, H. and Ando, H., 2021, Expression dynamics of the genes for the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in tiger puffer (*Takifugu rubripes*) at different reproductive stages. *General and Comparative Endocrinology*, **301**, 113660.
- (12) Furusawa, Y., Yamamoto, T., Hattori, A., Suzuki, N., Sekiguchi, T., Hirayama, J. and Tabuchi, Y., 2020, De novo transcriptome analysis and gene expression profiling in fish scales isolated from *Carassius auratus* during space flight: A impact of melatonin on the expression of genes responsive to space radiation. *Molecular Medicine Reports*, **22**, 2627-2636.

- (13) Idowu, A., Benjakul, S., Sinthusamran, S., Sae-leaw, T., Suzuki, N., Kitani, Y. and Sookchoo, P., 2020, Effect of alkaline treatment on characteristics of bio-calcium and hydroxyapatite powders derived from salmon bone. *Applied Sciences*, **10**, 4141.
- (14) Igarashi-Migitaka, J., Seki, A., Ikegame, M., Honda, M., Sekiguchi, T., Mishima, H., Shimizu, N., Matsubara, H., Srivastav, A.K., Hirayama, J., Maruyama, Y., Kamijo-Ikemori, A., Hirata, K., Hattori, A. and Suzuki, N., 2020, Oral administration of melatonin contained in drinking water increased bone strength in naturally aged mice. *Acta Histochemica*, **122**, 151596.
- (15) Iwamoto, S., Shimizu, K., Negishi, L., Suzuki, N., Nagata, K. and Suzuki, M., 2020, Characterization of the chalky layer-derived EGF-like domain-containing protein (CgELC) in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Structural Biology*, **212**, 107595.
- (16) Kitani, Y., Srivastav, A.K. and Suzuki, N., 2020, Influence of oral administration of a high-calcium solution into a marine teleost (nibbler fish) and a freshwater teleost (goldfish) on their plasma calcium levels. *International Journal of Zoological Investigations*, **6**, 65-70.
- (17) Kobayashi-Sun, J., Kondo, M., Yamamori, S., Kuroda, J., Ikegame, M., Suzuki, N., Kitamura, K., Hattori, A., Yamaguchi, M. and Kobayashi, I., 2020, Uptake of osteoblast-derived extracellular vesicles promotes the differentiation of osteoclasts in the zebrafish scale. *Communications Biology*, **3**, 190.
- (18) Kobayashi-Sun, J., Suzuki, N., Hattori, A., Yamaguchi, M. and Kobayashi, I., 2020, Melatonin suppresses both osteoblast and osteoclast differentiation through repression of epidermal Erk signaling in the zebrafish scale. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **530**, 644-650.
- (19) Mori, T., Kitani, Y., Hatakeyama, D., Machdia, K., Goto-Inoue, N., Hayakawa, S., Yamamoto, N., Kashiwagi, K. and Kashiwagi, A., 2020, Predation threats for a 24-hour period activated the extension of axons in the brains of *Xenopus* tadpoles. *Scientific Reports*, **10**, 11737.
- (20) Srithongthum, S., Au, H.-L., Amornsakun, T., Chesoh, S., Jantararat, S., Suzuki, N., Takeuchi, Y., Hassan, A., Kawamura, G. and Lim, L.-S., 2020, Yolk-sac absorption, mouth size development, and first exogenous feeding of Sultan fish, *Leptobarbus hoevenii*. *AACL Bioflux*, **13**, 1320-1327.
- (21) Srivastav, A.K., Agarwal, K., Kumar, A., Prasad, M. and Suzuki, N., 2020, Acute toxicity of mercuric chloride to the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *International Journal of Zoological Investigations*, **6**, 301-305.
- (22) Srivastav, A.K., Kumar, A., Srivastav, S.K., and Suzuki, N., 2020, Effects of chlorpyrifos on ultimobranchial and parathyroid glands of Indian skipper frog, *Euphlyctis cyanophlyctis*. *European Journal of Biological Research*, **10**, 296-306.
- (23) Srivastava, B.D., Srivastava, M., Srivastav, S.K., Urata, M., Suzuki, N. and Srivastav A.K., 2020, Efficacy of jamun (*Syzygium cumini*) seed and orange (*Citrus sinensis*) peel extracts against microcystin LR induced histological damage in the kidney of rat. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, **7**, 247-259.
- (24) Srivastava, B.D., Srivastava, M., Srivastav, S.K., Urata, M., Suzuki, N. and Srivastav, A.K., 2020, Jamun seed and orange peel extracts protects effects of microcystin LR on serum calcium and phosphate of rats. *European Journal of Biological Research*, **10**, 198-206.
- (25) Srivastav, S., Mishra, D., Srivastav, S.K., Suzuki, N. and Srivastav, A.K., 2020, Estradiol affects ultimobranchial gland of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* kept in different calcium environments. *Jordan Journal of Biological Sciences*, **13**, 519-523.
- (26) Tabuchi, Y., Hasegawa, H., Kondo, T., Suzuki, N., Furusawa, Y., Hirano, T., Nagaoka, R., Takeuchi, S., Shiiba, M. and Mochizuki, T., 2020, Identification of early response genes to low-intensity pulsed ultrasound in bone marrow stromal cells. *Journal of Medical Ultrasonics*, **47**, 193-201.

- (27) Yamamoto, T., Ikegame, M., Kawago, U., Tabuchi, Y., Hirayama, J., Sekiguchi, T., Furusawa, Y., Yachiguchi, K., Matsubara, H., Urata, M., Hattori, A. and Suzuki, N., 2020, Detection of RANKL-producing cells and osteoclastic activation by the addition of exogenous RANKL in the regenerating scales of goldfish. *Biological Science in Space*, **34**, 400-403.
- (28) Yamamoto, T., Ikegame, M., Hirayama, J., Kitamura, K., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Sekiguchi, T., Endo, M., Mishima, H., Seki, A., Yano, S., Matsubara, H., Hattori, A. and Suzuki, N., 2020, Expression of sclerostin in the regenerating scales of goldfish and its increase under microgravity during space flight. *Biomedical Research (Tokyo)*, **41**, 279-288.
- (29) Yazawa, T., Imamichi, Y., Uwada, J., Sekiguchi, T., Mikami, D., Kitano, T., Ida, T., Sato, T., Nemoto, T., Nagata, S., Khan, R., Takahashi, S., Ushikubi, F., Taniguchi, A., Suzuki, N. and Umezawa, A., 2020, Evaluation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity using androgen receptor-mediated transactivation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **196**, 105493.
- (30) 川村龍矢・中町 健・小木曾正造・岡村隆行・鈴木信雄, 2021, 能登半島の九十九湾沿岸林周辺に生息するアカテガニ *Chiromantes haematocheir* の食性に関する研究. のと海洋ふれあいセンター研究報告, **26**, 13-18.
- (31) 幸塚久典・小木曾正造・中野裕昭, 2021, 能登沿岸で実施された JAMBIO 沿岸生物合同調査で得られたウニ類 (棘皮動物門: ウニ綱). のと海洋ふれあいセンター研究報告, **26**, 1-12.
- (32) 関 友信・松田 乾・馬久地みゆき・鈴木道生・鈴木信雄・大平 剛, 2020, ナンキョクオキアミのフッ素取り込み機構の分子基盤の解明. *Science Journal of Kanagawa University*, **31**, 75-78.

## 2) 総説・解説等

- (1) Kitani, Y., and Nagashima, Y., 2020, L-Amino acid oxidase as a fish host-defense molecule. *Fish & Shellfish Immunology*, **106**, 685–690.
- (2) Okamoto-Uchida, Y., Nishimura, A., Izawa, J., Hattori, A., Suzuki, N. and Hirayama, J., 2020, The use of chemical compounds to identify the regulatory mechanisms of vertebrate circadian clocks. *Current Drug Targets*, **21**, 425-432.
- (3) 松原 創・永見 新・鈴木信雄・藤井寛之・木下邦則・中村 将・山内皓平・長浜嘉孝・柳町隆造, 2021, 能登の里海で実践するトラフグのオーガニック養殖. アクアネット, **2**, 50-53.

## 3) 著書

- (1) Katayama, Y., Kitahashi, T., Suzuki, N. and Sakamoto, T., 2020, Chapter 4.3 Endocrinology, In “Japanese Marine Life - A Practical Training Guide in Marine Biology”, Inaba, K. ed., Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore, 197-204.
- (2) Sekiguchi, T., Amphioxus calcitonin family peptide. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (3) Sekiguchi, T., Echinoderm calcitonin-type peptide. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (4) Sekiguchi, T., Gastrin family. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.

- (5) Sekiguchi, T., Gastrin. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (6) Sekiguchi, T., Cholecystokinin. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (7) Sekiguchi, T., Caerulein. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (8) Suzuki, N., Parathyroid hormone family. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (9) Suzuki, N., Parathyroid hormone. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (10) Suzuki, N., Parathyroid hormone-related protein. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd Eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (11) Suzuki, N., Tuberoinfundibular peptide of 39 amino acids. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd Eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (12) Suzuki, N., Calcitonin/Calcitonin Gene-Related Peptide Family. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd Eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (13) Suzuki, N., Calcitonin. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (14) Suzuki, N., Staniocalcin. In “Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research”. H. Ando, K. Ukena, and S. Nagata. 2nd eds. ELSEVIER, Oxford, United Kingdom, in press.
- (15) 関口俊男, 2020, 棘皮動物・原索動物. “動物の事典”, 末光隆志他編, 朝倉書店, 東京, 455-456.
- (16) 鈴木信雄, 2020, カルシウム代謝とホルモン. “動物の事典”, 末光隆志他編, 朝倉書店, 東京, 461-463.

## 【研究発表及び研究活動】

### 1) 研究発表及び講演会

- (1) Atthi, N., Sripumkhai, W., Pattamang, P., Meananeatra, R., Saengdee, P., Thongsook, O., Ranron, N., Pankong, K., Uahchinkul, W., Radomyos, S., Klunngien, N., Jeamsaksiri, W., Kitani, Y., Ogiso, S. and Suzuki, N., Robust PDMS micro-structures with hydrophobic properties for marine antifouling applications. Joint International Symposium: Challenging the Research Development and Collaboration Through Online Discussions, Kanazawa University, Ishikawa, Japan (2020.11.30-12.3)



- (2) Kawago, U., Yachiguchi, K., Sekiguchi, T., Hattori, A., Yamamoto, M., Kitamura, K., Tabuchi, Y. and Suzuki, N., Both inorganic mercury and methylmercury decrease osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of marine teleosts. Joint International Symposium: Challenging the Research Development and Collaboration Through Online Discussions, Kanazawa University, Ishikawa, Japan (2020.11.30-12.3)
- (3) Migitaka, J., Seki, A., Hattori, A. and Suzuki, N., Effect of melatonin on bone metabolism in naturally aged mice. Joint International Symposium: Challenging the Research Development and Collaboration Through Online Discussions, Kanazawa University, Ishikawa, Japan (2020.11.30-12.3)
- (4) Seki, T., Miyuki, M., Matsuda, T., Nakajima, K., Suzuki, N., Suzuki, M. and Ohira, T., Identification and characterization of a cuticular protein from the Antarctic krill *Euphausia superba*. The 20<sup>th</sup> Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan, Tokyo, Japan (2020.7.28)
- (5) Sekiguchi, T., Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons receptor in marine invertebrate ascidian *Ciona intesitinalis* Type A. International Symposium: Challenging the Research Development and Collaboration Through Online Discussions, Kanazawa University, Ishikawa, Japan (2020.11.30-12.3)
- (6) Srivastav, A.K. and Suzuki, N., Environmental Toxicants: Impact on Fish. Joint International Symposium: Challenging the Research Development and Collaboration Through Online Discussions, Kanazawa University, Ishikawa, Japan (2020.11.30-12.3)
- (7) Yamamoto, T., Ikegame, M., Kawago, U., Tabuchi, Y., Hirayama, J., Sekiguchi, T., Furusawa, Y., Yachiguchi, K., Matsubara, H., Urata, M., Hattori, A. and Suzuki, N., Detection of RANKL-producing cells and osteoclastic activation by the addition of RANKL in the regenerating scales of goldfish. Joint International Symposium: Challenging the Research Development and Collaboration Through Online Discussions, Kanazawa University, Ishikawa, Japan (2020.11.30-12.3)
- (8) 鈴木信雄, 宇宙空間における骨代謝制御: キンギョの培養ウロコを骨のモデルとした解析. 日本宇宙生物科学会特別 WEB 講演会~2020 年度受賞者を囲んで~, オンライン開催, 東京, 日本 (2020.9.26)
- (9) 鈴木信雄・池亀美華・田渕圭章・古澤之裕・北村敬一郎・関口俊男・山本 樹・矢野幸子・平山 順・服部淳彦, メラトニンは骨芽細胞で産生されるカルシトニンの分泌を促進する, 日本動物学会第 91 回オンライン大会, 東京, 日本 (2020.9.4-5)
- (10) 浦田 慎・木下靖子・能丸恵理子・谷内口孝治・松原道男・鈴木信雄, コロナ時代に適応した体験型海洋教育:「里海科体験学習キット」の開発と地域外展開. 第 8 回 全国海洋教育サミット, オンライン開催, 東京, 日本 (2021.2.11)
- (11) 小木曾正造・笹山雄一・古澤之裕・平山 順・服部淳彦・鈴木信雄, 特異的に浅海に生息するマシコヒゲムシの概日リズム. 第 4 回富山湾研究会研究会, 金沢, 日本 (2021.3.2)
- (12) 重松惇志・中出雅大・坂井一博・古澤之裕・田渕圭章・永見 新・小木曾正造・木谷洋一郎・関口俊男・鈴木信雄・松原 創, カリウムによるヒラメのストレス応答. 第 4 回富山湾研究会研究会, 金沢, 日本 (2021.3.2)
- (13) 高内さつき・三宅裕志・平田尚也・長井百花・鈴木信雄・小木曾正造・池口新一郎, 直達発生したミズクラゲ *Aurelia coerulea* のエフィラの形態的特徴. 令和 3 年度公益社団法人日本水産学会春季大会オンライン, 東京, 日本 (2021.3.26-29)

## 【研究交流】

### 1) 共同研究

- (1) 木谷洋一郎：カニ体液中の貝毒解毒機構について，新潟食糧農業大学（教授 長島裕二）
- (2) 木谷洋一郎：サケ科魚類体表における抗微生物ペプチドの役割，NORD University（ノルウェー王国）（Prof. Kiron Viswanath）
- (3) 木谷洋一郎：特徴的な微細構造による生物付着抑制技術について，NECTEC-TMEC（タイ王国）（Dr. Nithi Atthi）
- (4) 木谷洋一郎：L-アミノ酸オキシダーゼの構造，東京海洋大学（教授 石崎松一郎）
- (5) 関口俊男：原索動物のカルシトニンの生理作用に関する研究，基礎生物学研究所形態形成部門（助教 高橋弘樹）
- (6) 関口俊男：原索動物神経ペプチドの研究，千葉大学大学院融合科学（准教授 小笠原道生）
- (7) 関口俊男：ヌタウナギカルシトニンの生理作用についての研究，理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 分子配列比較解析ユニット（ユニットリーダー 工樂樹洋）
- (8) 関口俊男：インドール化合物の放射線防御機構についての研究，福井県立大学看護福祉学部（教授 水谷哲也）
- (9) 関口俊男：インドール化合物の放射線防御機構解明，富山大学大学院医学薬学研究部（助教 趙 慶利）
- (10) 関口俊男：ペプチド受容体の分子機能に関する研究，オークランド大学（ニュージーランド）（Prof. Debbie L. Hay）
- (11) 関口俊男：イカの腸内細菌の多様性に関する研究，イェール NUS カレッジ（シンガポール）（Prof. Steve B. Pointing）
- (12) 関口俊男：アカエイカルシトニンの生理作用についての研究，岡山大学理学部附属牛窓臨海実験所（教授 坂本竜哉）
- (13) 関口俊男：ヒラムシ GPCR のリガンド認識機構に関する研究，岡山大学理学部附属牛窓臨海実験所（准教授 坂本浩隆）
- (14) 関口俊男：軟骨魚類における血中カルシウム濃度調節機構の研究，東京大学大気海洋研究所（教授 兵藤 晋，助教 高木 互）
- (15) 鈴木信雄：魚類の副甲状腺ホルモンに関する研究，メルボルン大学（オーストラリア）（Prof. T. John Martin），RMIT 大学（オーストラリア）（Prof. Janine A. Danks）
- (16) 鈴木信雄：魚類のカルセミックホルモン（カルシトニン，ビタミン D，スタニオカルシン）に関する研究，ゴラクプール大学（インド）（Prof. Ajai K. Srivastav）
- (17) 鈴木信雄：魚類の骨代謝に対するフッ素の影響に関する研究，カントー大学（ベトナム）（Prof. Tran Ngoc Hai），富山大学研究推進機構研究推進総合支援センター（教授 田淵圭章）
- (18) 鈴木信雄：メラトニンの骨代謝に関する研究，東京医科歯科大学（教授 服部淳彦），新潟大学理学部附属臨海実験所（教授 安東宏徳）
- (19) 鈴木信雄：重金属の骨芽・破骨細胞に及ぼす影響：ウロコのアッセイ系による解析，国立水俣病研究センター生理影響研究室（室長 山元 恵），東京慈恵会医科大学（教授 高田耕司）
- (20) 鈴木信雄：ニワトリのカルシトニンレセプターのクローニングとその発現に関する研究，新潟大学農学部（教授 杉山稔恵）
- (21) 鈴木信雄：ウロコの破骨細胞に関する研究，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（准教授 池亀美華）
- (22) 鈴木信雄：交流磁場の骨代謝に及ぼす影響，九州大学大学院工学研究院（特任教授 上野照剛），広島大学 ナノデバイス・バイオ融合科学研究所（教授 岩坂正和）
- (23) 鈴木信雄：超音波の骨代謝に及ぼす影響，富山大学大学院医学薬学研究部（特任教授 近藤 隆），富山大学研究推進機構研究推進総合支援センター（教授 田淵圭章），昭和大学（准教授 舟橋久幸），JAXA（主任研究員 矢野幸子）

- (24) 鈴木信雄：歯の石灰化に関する研究，鶴見歯科大学（講師 三島弘幸）
- (25) 鈴木信雄：静磁場の骨代謝に及ぼす影響，独立行政法人 物質・材料研究機構 強磁場研究センター（主任研究員 廣田憲之，特別研究員 木村史子）
- (26) 鈴木信雄：インドール化合物の抗菌活性及び植物の根の成長促進作用に関する研究，富山大学大学院理工学研究部（客員教授 神坂盛一郎，教授 唐原一郎）
- (27) 鈴木信雄：魚のウロコを用いた宇宙生物学的研究，亜細亜大学経済学部（教授 大森克徳），JAXA（主任研究員 矢野幸子），富山大学大学院理工学研究部（教授 松田恒平），公立小松大学保健医療学部（教授 平山順）
- (28) 鈴木信雄：トリブチルスズの海域汚染に関する研究，九州大学大学院農学研究院（教授 大嶋雄治，准教授 島崎洋平）
- (29) 鈴木信雄：インドール化合物のラットの骨代謝に及ぼす影響，ハムリー（株）国際事業部（部長 関あずさ），神奈川歯科大学（特任教授 高垣裕子），朝日大学歯学部（教授 江尻貞一）
- (30) 鈴木信雄：魚類の骨代謝におけるビタミンKの作用，神戸学院大学（教授 中川公恵）
- (31) 鈴木信雄：魚のウロコで発現している遺伝子のメカニカルストレスに対する応答，富山大学研究推進機構研究推進総合支援センター（教授 田淵圭章）
- (32) 鈴木信雄：耳石の石灰化に対するメラトニンの作用，茨城県立医療大学（教授 大西 健）
- (33) 鈴木信雄：カルシトニンの構造進化及び作用進化に関する研究，公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部（主幹研究員 佐竹 炎，主席研究員 川田剛士）
- (34) 鈴木信雄：海洋細菌に関する研究，富山大学生物圏地球科学科（教授 田中大祐，講師 酒徳昭宏）
- (35) 鈴木信雄：放射線の骨に対する影響評価，放射線医学総合研究所（主任研究員 松本謙一郎），富山大学大学院医学薬学研究部（特任教授 近藤 隆，教授 田淵圭章）
- (36) 鈴木信雄：脊椎動物の破骨細胞に対するカルシトニンの作用に関する研究，松本歯科大学大学院歯学独立研究科（教授 高橋直之，准教授 山下照仁）
- (37) 鈴木信雄：黒色素胞刺激ホルモンの魚類の骨代謝に対する作用に関する研究，北里大学海洋生命科学部（教授 高橋明義），京都大学フィールド科学教育研究センター里域生態系部門（准教授 田川正朋），東北大学農学研究科（教授 鈴木 徹）
- (38) 鈴木信雄：メラトニンの骨代謝に対する作用に関する研究，東京医科歯科大学教養部（教授 服部淳彦），公立小松大学保健医療学部（教授 平山 順），金沢大学生命理工学類（准教授 小林 功）

## 2) 共同利用・共同研究（文科省）

- (1) 木谷洋一郎：海産魚類のカルシウム代謝に対するフッ素の影響評価（一般研究），富山大学研究推進機構研究推進総合支援センター（教授 田淵圭章）
- (2) 関口俊男：安定海水泡沫「波の花」の成因に関する研究（一般研究），東京大学大気海洋研究所（教授 瀧崎恒二）
- (3) 関口俊男：PAHs が生殖腺機能に及ぼす影響の包括的な解析（重点研究），旭川医科大学学生化学講座（講師 矢澤隆志）
- (4) 関口俊男：海産無脊椎動物における芳香族受容体 AhR の分子機能および発現調節機構の研究（一般研究），長浜バイオ大学バイオサイエンス学部（准教授 和田修一）
- (5) 関口俊男：環境 DNA による日本海で変動する無脊椎生物相モニタリングと環境汚染物質との関連性（一般研究），島根大学生物資源学部（准教授 吉田真明）
- (6) 鈴木信雄：大気汚染物質，多環芳香族炭化水素類が 体内時計に与える影響の解明（一般研究），公立小松大学保健医療学部（教授 平山 順）

- (7) 鈴木信雄：カキの貝殻チョーク層の形成が海洋環境 から受ける影響の解析（一般研究），東京大学大学院農学生命科学研究科（准教授 鈴木道生）
- (8) 鈴木信雄：能登半島七尾湾における底質の溶存遊離アミノ酸及び微生物群集構造に関する研究（一般研究），北海道大学地球環境科学研究院（教授 沖野龍文）
- (9) 鈴木信雄：金沢市及び能登半島の周辺河口域底質の生物影響リスク評価（一般研究），鹿児島大学水産学部（教授 宇野誠一）
- (10) 鈴木信雄：富山湾沿岸の流れの経年変化とその環境に及ぼす影響について（一般研究），富山高等専門学校（准教授 福留研一）
- (11) 鈴木信雄：多環芳香族炭化水素類のタイ産淡水魚への毒性評価（一般国際研究），プリンスオブソンクラ大学（タイ）（Dr. Thumronk Amornsaku N.）

### 3) 非常勤講師

関口俊男：長浜バイオ大学バイオサイエンス学部非常勤講師，2015-現在

### 4) 各種活動

#### 社会活動

- (1) 鈴木信雄：石川県環境影響評価委員会委員，2010-現在
- (2) 鈴木信雄：石川県温排水影響検討委員会，2014-現在
- (3) 鈴木信雄：日本海海洋調査技術連絡会，2014-現在
- (4) 鈴木信雄：石川県能登町小木港マリンタウン推進協議会，2010-現在

#### 学会活動

- (1) 関口俊男：ペプチド・ホルモン研究会 世話人，2014-現在
- (2) 関口俊男：日本動物学会男女共同参画委員，2017-現在
- (3) 関口俊男：日本動物学会 中部支部会 会計，2020-現在
- (4) 鈴木信雄：日本動物学会 中部支部代表委員，2016-現在
- (5) 鈴木信雄：日本宇宙生物科学会 代議員，2012-現在
- (6) 鈴木信雄：Journal of Experimental Zoology part A (Editorial board), 2014-現在
- (7) 鈴木信雄：International Journal of Zoological Investigations (Editorial board), 2017-現在
- (8) 鈴木信雄：International Journal of Environmental Research and Public Health (Gest Editor), 2019-2020
- (9) 鈴木信雄：American Journal of Agricultural and Biological Sciences (Gest Editor), 2019-2020

### 【研究費】

#### 1) 科学研究費

- (1) 木谷洋一郎，基盤研究（C），フグ毒結合タンパク質の構造と機能に関する研究—フグ毒に対する生体防御機構—（代表：長島裕二，新潟食料農業大学），分担者，令和2年度，250千円（令和2年度の直接経費 total 1,100千円）
- (2) 鈴木信雄，基盤研究（C），骨芽細胞で作られるホルモンによる破骨細胞の調節機構：骨モデル（ウロコ）による解析，代表者，令和2年度，1,000千円。
- (3) 鈴木信雄，基盤研究（C），血中Ca濃度調節機能の進化的変遷:円口類と軟骨魚類に注目したカルシトニンの研究（代表：関口俊男，金沢大学），分担者，令和2年度，100千円（令和2年度の直接経費 total 1,400千円）。

- (4) 関口俊男, 基盤研究 (C), 血中 Ca 濃度調節機能の進化的変遷:円口類と軟骨魚類に注目したカルシトニンの研究, 代表者, 令和2年度, 1,400 千円.
- (5) 関口俊男, 基盤研究 (C), 骨芽細胞で作られるホルモンによる破骨細胞の調節機構:骨モデル (ウロコ) による解析 (代表:鈴木信雄, 金沢大学), 分担者, 令和2年度, 100 千円 (令和2年度の直接経費 total 1,000 千円).

## 2) 研究助成金等

- (1) 鈴木信雄, 公益財団法人 住友財団研究助成, マイクロプラスチック由来の有害化学物質による魚類の骨吸収促進作用の解析, 代表者, 1,500 千円
- (2) 鈴木信雄, 公益財団法人 渡邊財団 第26回磁気健康科学研究助成, 魚のウロコ (骨モデル) を用いた磁場による骨形成機構の解析:渦電流による新規機構の解明, 代表者, 1,000 千円
- (3) 関口俊男, クリタ水・環境科学振興財団 継続助成, 海産無脊椎動物における多環芳香族炭化水素のバイオモニタリングシステムの確立, 代表者, 1,000 千円
- (4) 小木曾正造, 公益信託 ミキモト海洋生態研究助成基金, 深海から浅海に進出したマシコヒゲムシの概日リズムの解明, 代表者, 630 千円

## 3) 共同研究費

- (1) 鈴木信雄, 海洋深層水に含まれる微量有機物質の利活用, 赤穂化成工業 (株) との共同研究, 代表者, 1,500 千円
- (2) 鈴木信雄, 海洋生物の標本教材の開発と利用, 隠岐ユネスコ世界ジオパーク中核・拠点施設との共同研究, 代表, 140 千円

## 4) 受託研究費

- (1) 鈴木信雄, 独立行政法人 科学技術振興機構 A-STEP 機能検証フェーズ, 能登海洋深層水のストレス低減作用の水産増養殖への応用, 代表者, 3,000 千円

## 【学術賞等の受賞状況】

- (1) 関口俊男, 「脊索動物における骨代謝ホルモンペプチド、カルシトニンの構造と機能の進化についての研究」, 日本比較内分泌学会奨励賞 (2020.10)
- (2) 鈴木信雄, 「宇宙空間における骨代謝制御:キンギョの培養ウロコを骨のモデルとした解析」, 日本宇宙生物科学学会賞 (2020.9)

## 【新聞発表等】

- (1) 鈴木信雄, 令和2年10月2日 (北國新聞): 県内初の日本宇宙生物科学学会賞
- (2) 鈴木信雄, 令和2年10月2日 (北國新聞): スルメイカの解剖 (能登町立松波中学校の出前講義)
- (3) 鈴木信雄, 2020年10月4日 (北國新聞朝刊18面): 九十九湾の生物を観測 小木小6年, 金大施設
- (4) 鈴木信雄, 令和2年10月26日 (北國新聞): DNAの抽出を体験 (海未来図書館の公開講座に関する記事)
- (5) 鈴木信雄, 令和2年11月28日 (北國新聞): 九十九湾固有の動物 (夕刊の舞台の記事)
- (6) 中町 健, 早川和一, 2021年3月9日 (北陸中日新聞朝刊17面): 実習できない今 里海教育紹介

## 【利用状況】

### 1) 利用者数及び船舶の使用状況

令和2年度臨海実験施設利用者数(延べ人数 5,322人の内訳)

(月)	研究者		学生	
	学内利用	学外利用	学内利用	学外利用
4	94	81	239	0
5	93	71	251	0
6	91	73	326	7
7	94	71	368	0
8	93	74	253	16
9	110	78	274	40
10	117	92	272	34
11	97	75	254	0
12	96	100	224	15
1	94	39	267	0
2	92	41	216	0
3	101	46	223	30
合計	1,172	841	3,167	142

令和2年度臨海実験施設船舶使用回数及び人数(延べ回数 99回、人数 311人の内訳)

(月)	くろさぎ				あおさぎ			
	学内利用		学外利用		学内利用		学外利用	
	回数	人数	回数	人数	回数	人数	回数	人数
4	4	13	0	0	1	3	0	0
5	4	6	0	0	0	0	0	0
6	12	22	1	2	2	6	1	2
7	4	8	0	0	1	2	0	0
8	3	6	1	17	3	11	0	0
9	6	21	0	0	3	10	1	44
10	9	19	0	0	4	29	1	13
11	3	6	1	2	0	0	0	0
12	3	5	0	0	4	7	0	0
1	2	4	0	0	6	8	0	0
2	4	8	0	0	3	5	0	0
3	8	17	1	2	2	10	1	3
合計	62	135	4	23	29	91	4	62



## 研 究 報 告

**\* 組織化学的手法による魚類抗菌タンパク質の局在について**

山本葉月, 木谷洋一郎 (p16-17)

**\* アカテガニ幼生の浸透圧調節機構に関する研究**

川村龍矢, 鈴木信雄 (p18-19)

**\* クルマエビの外骨格の石灰化に関与する基質ペプチドの機能解析**

関本愛香, 鈴木信雄 (p20-21)

**\* 臨海実験施設周辺における海洋観測及び気象観測 (2020年度)**

小木曾正造, 中町 健 (p22)



# 組織化学的手法による魚類抗菌タンパク質の局在について

山本葉月, 木谷洋一郎

〒927-0553 石川県鳳珠郡能登町小木 金沢大学環日本海域環境研究センター 臨海実験施設

Hazuki YAMAMOTO, Yoichiro KITANI: Histological analysis of the antibacterial protein in fish

## **Introduction and purpose**

All lives have complexed host-defense mechanisms to avoid the diseases – it called the immune system. The immune system consists of two types of systems: innate immunity (primitive and nonspecific) and adaptive immunity (sophisticated and specific). In fish, innate immunity is essential because of the poor adaptive immunity traceable to the less complexity of the lymphoid organs. Several substances were founded as the innate immune molecules from fishes, such as lysozymes, lectins, antimicrobial peptides, *et cetera*. However, unidentified innate immune molecules still exist. Previously, we identified an L-amino acid oxidase (LAO) as an antibacterial protein from the skin mucus and serum of the marine teleost (Kitani et al., 2007). The LAO is an amino acid metabolism enzyme and generates ammonia, alpha-keto acid and hydrogen peroxide. The LAO acts on various bioactivities such as apoptosis, antiviral activity and antibacterial activity via resulted hydrogen peroxide. However, few studies refer to the immunological functions of LAO in fish. In the case of Atlantic cod and Atlantic salmon, LAO gene expression was upregulated by the pathogen exposure and it suggested that LAO relates to infection control (Kitani et al., 2015, 2019). Recently, the novel LAO was isolated from the serum of the red-spotted grouper *Epinephelus akaara* in our lab (Osaka & Kitani, 2021). The grouper LAO was 450 kDa (67 kDa subunits) and could react with L-Methionine, L-Phenylalanine and L-Tryptophan. The grouper LAO gene was not altered by the pathogen injection, different from other fishes mentioned above. Interestingly, the grouper LAO gene was strongly induced in the head kidney one day after blood loss. This result suggested that grouper LAO is necessary to avoid pathogen invasion via a wound.

However, the detail of the LAO regulation system is still unclear. Identification of the LAO producing tissue and/or cell type could help understanding the LAO production mechanism in the grouper. In this study, we tried to clarify the intra-tissue and inter-tissue localization of the grouper LAO protein using immunochemical/immunohistochemical methods with an anti-grouper LAO antibody.

## **Materials and methods**

To recognize LAO protein-containing tissues, the tissue extracts were prepared from the healthy red-spotted grouper tissues as follows; skin, gill, muscle, stomach, intestine, liver, spleen, head kidney, trunk kidney, brain and heart. Each tissue was homogenized with the phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0) using a reciprocal beads disruptor. The homogenates were centrifuged ( $18,000 \times g$  for 15 min at 4 °C) and the supernatants were used as the tissue extracts. The serum sample was diluted with PBS. These extracts were applied on SDS-PAGE (2.5 µg/lane) and electrophoretically blotted onto polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was treated with a blocking solution; subsequently, anti-grouper LAO antibody and horseradish peroxidase-

conjugated secondary antibody. The grouper LAO cross-reactive protein was visualized by 3-amino-9-ethylcarbazol. In addition, the LAO activity of these tissue extracts was measured by the peroxidase/*o*-phenylenediamine method.

To observe the localization of the LAO protein, immunohistochemistry of the head kidney was tried as a first step. The head kidney was dissected and embedded into a frozen-sectioning compound without fixation and quickly frozen by dry ice-hexane coolant. The frozen block was sliced a thickness of 5  $\mu\text{m}$  using a cryostat and mounted onto the slide glass. The slices were treated with a blocking solution—subsequently, anti-grouper LAO antibody and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The grouper LAO cross-reactive protein was visualized with 3,3'-diaminobenzidine substrate solution and observed by a light microscope.

### **Results and Discussion**

LAO activity measurement showed that the strongest activity was detected in serum, followed by intestine, skin, gill, head kidney and heart (n=3). The LAO cross-reactive protein (70 kDa) was detected dominantly in serum, following skin, gill, head kidney, heart and spleen. Similar results were observed in the other grouper (n=3). This reaction disappeared by the neutralization of the anti-grouper LAO antibody with the purified grouper LAO. Both experiments reflected that the LAO activity detected from these tissues was caused by the grouper LAO cross-reactive protein except the intestine. LAO activity in the grouper intestine might be caused by unknown LAO that could not detect by anti-grouper LAO antibody.

In the head kidney, anti-grouper LAO antibody was localized at blood vessel (BV), the periphery of renal tubes and vascular sinusoids in collecting tubules and hematopoietic tissue. The positive signal was also detected at adenoid tissue (glandular, sparse, lymphoid tissue-like). These signals disappeared by the neutralization of the anti-grouper LAO antibody with the purified grouper LAO. Similar reactions were found in the other specimen (n=4). In addition, the positive signals were observed in skin and gills. These results suggested that the grouper LAO may act as a host defense molecule to protect whole body protection from invaders.

### **Reference**

- Kitani, Y., Tsukamoto, C., Zhang, G., Nagai, H., Ishida, M., Ishizaki, S., Shimakura, K., Shiomi, K., & Nagashima, Y. (2007). Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli*. *The FEBS Journal*, 274(1), 125–136.
- Kitani, Y., Fernandes, J. M. O., & Kiron, V. (2015). Identification of the Atlantic cod L-amino acid oxidase and its alterations following bacterial exposure. *Developmental and Comparative Immunology*, 50(2), 116–120.
- Kitani, Y., Hieu, D. Q., & Kiron, V. (2019). Cloning of selected body surface antimicrobial peptide/protein genes of Atlantic salmon and their responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fisheries Science*, 85(5), 847–858. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01331-1>
- Osaka, Y., & Kitani, Y. (2020). Blood loss induces l-amino acid oxidase gene expression in the head kidney of the red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Developmental and Comparative Immunology*, 114, 103842.

本研究は、金沢大学自然システム学類生物コース山本葉月氏の学位論文の一環として行われた。

# アカテガニ幼生の浸透圧調節機構に関する研究

川村龍矢, 鈴木信雄

〒927-0553 鳳珠郡能登町小木 金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設

Ryoya KAWAMURA, Nobuo SUZUKI: Study on the mechanism of osmoregulation in the larva of red-clawed crab *Chiromantes haematochea*

## BACKGROUNDS

Red-clawed crab *Chiromantes haematochea* (DE HAAN) (Figure 1) are crabs that belong to Decapoda, Sesamidae and that habits on the coastal forests. These crabs have unique life history. The adults are highly adapted to the life on lands while larvae are released into the sea by adult female crabs and spend in the sea during the growth process from the zoea period to the megalopa period. From June to September, adult red-clawed crab mated and then females carried eggs in their abdomen. Thereafter, the zoea larvae released into the sea by female crabs transform into juvenile crabs *via* megalopa larvae. Juvenile crabs land on ashore *via* brackish water and begin their land life.



Figure 1. Photograph of male red-clawed crab, *Chiromantes haematochea* collected in the coastal forests of Tsukumo bay.

Continuing from last year, we conducted a survey of megalopa larvae from September to November in this year. Similar to last year's results, no megalopa larvae were collected on the revetment coast. However, megalopa larvae were collected in the estuary. Therefore, it is presumed that the larvae move from the sea to the coastal ashore in where freshwater flows to the sea, transform into juvenile crabs, and then land as grabbing the root of reed. In the present study, thus, we investigated changes in the osmoregulatory functions of larvae of red-clawed crab, in order to elucidate the mechanism of the behavior by which megalopa larvae are attracted to the estuary.

## METHODS

In the present study, we tried to examine artificial breeding of zoea larvae to obtained megalopa larvae and

then investigated the mRNA expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NAKA), an enzyme involved in osmoregulation, in the eggs carried in their abdomen, zoea larvae and megalopa larvae immediately after metamorphosis. Total RNA extraction and cDNA synthesis were performed using respective kit (Takara Bio Inc., Otsu, Japan). The obtained cDNAs were used for NAKA mRNA expression analysis. Based on the RNA sequencing data using zoea larvae, the sequence of NAKA gene in red-clawed crab was determined. Primer sets were designed based on the sequence of NAKA gene. The expression levels of NAKA mRNA in the eggs and larvae were examined by quantitative real-time PCR.

Next, in order to investigate the osmoregulatory ability of zoea larvae immediately after release into seawater, zoea larvae were placed in artificial seawater with several salt concentrations to examine the survival rate of zoea larvae in these environmental water.

## RESULTS and DISCUSSION

In the present study, we succeeded in transforming the zoea larva of red-clawed crab into megalopa larva by artificial breeding. Then, we examined the NAKA mRNA expression in the eggs carried in their abdomen, zoea larvae and megalopa larvae immediately after metamorphosis.

The expression levels of NAKA mRNA were very low values in the eggs immediately after spawning. Subsequently, the NAKA mRNA expression increased with the development of the eggs. In the eggs just before hatching, NAKA mRNA expression rose remarkably. This indicating that red-clawed crab has osmoregulatory ability even before hatching. Thereafter, the hatched zoea larvae released into the sea showed higher values than the NAKA expression level in the eggs. However, the expression levels of NAKA mRNA in megalopa larvae was significantly lower than those in zoea larvae. We speculated that megalopa larvae reduce their abilities to seawater adaption and promote their specific behavior that moves from the sea to the coastal ashore.

Next, the osmoregulatory ability of zoea larvae immediately after release was examined using several salt concentration of breeding water (0 PSU, 9 PSU: diluted seawater, 33 PSU:100% seawater). In both 9 and 33 PSU, the zoea larvae were found to be 100% survival at least for 3 days. Additionally, even 0 PSU water, zoea larvae can survive for a short period of time. The survival rate of zoea larvae was  $88.9 \pm 6.41\%$  in one day after keeping with 0 PSU water. We are planning to investigate the changes in osmoregulatory ability during early development of red-clawed crab. NAKA mRNA expression will be examined in detail during the developmental stage from eggs to juvenile crabs.

本研究は、金沢大学自然システム学類生物コース 川村龍矢氏の学位論文の一環として行われた。

# クルマエビの外骨格の石灰化に関与する基質ペプチドの機能解析

関本愛香, 鈴木信雄

〒927-0553 鳳珠郡能登町小木 金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設

Aika SEKIMOTO, Nobuo SUZUKI: Functional analysis of a matrix peptide associated with calcification in the exoskeleton of the Kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*

## BACKGROUNDS

Many living organisms have unique hard tissues inside and outside of their body for body retention, protection from foreign enemies, and storage of minerals. These minerals made by living organisms are called biominerals, and the process of forming biominerals is called biomineralization. The main component of vertebrate biominerals such as bones, teeth and fish scales are calcium phosphate ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). In contrast, the main component of invertebrate biominerals are calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ). Among invertebrates, the exoskeleton of crustaceans is a typical calcified tissue. The exoskeleton of crustaceans has a layered structure. From the outside of their exoskeletons, it is composed of epicuticle, exocuticle, endocuticle, and epidermal cells in order. The both exocuticle and endocuticle form a chitin-protein complex, and the exoskeleton contributes to hardening by depositing and calcifying calcium carbonate in this chitin-protein complex.

For the first time, a substrate peptide involved in exoskeleton calcification called Calcification Associated Peptide-1 (CAP-1) has been purified and determined the amino acid sequence in freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*) (Inoue et al. 2003). Additionally, another type of CAP (CAP-2) have been identified from the crayfish (Inoue et al., 2004). However, the calcium-binding activity of the American crayfish CAP-1 (Prc-CAP-1) was stronger than that of Prc-CAP-2. (Inoue et al. 2003; Inoue et al., 2004). In crayfish, therefore, Prc-CAP-1 seems to be mainly involved in exoskeleton calcification.

In marine crustaceans, the substrate peptides involved to exoskeleton calcification have not been reported. In the present study, for the purpose of clarifying the calcification mechanism of marine crustaceans, we searched for candidate molecules of CAP-1 from the data of RNA-sequencing in kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). Secondly, we tried to examine functional analyses such as chitin- and calcium-binding activities and mRNA expression of kuruma prawn CAP-1 in their molt-cycle. Thirdly, the determination of CAP-1 producing cells in the exoskeleton of kuruma prawn was examined using by *in situ* hybridization methods.

## METHODS

Firstly, a sequence homologous to Prc-CAP-1 was searched from the data of RNA-sequencing from kuruma prawns. In order to perform functional analyses of the searched sequence, thereafter, total RNA was extracted from adult prawn tail fan, and sequence of kuruma prawn CAP-1 (Maj-CAP-1) was determined by PCR methods with specific primer sets. Next, a recombinant peptide (rMaj-CAP-1) for functional analyses was prepared. Both

chitin-binding and a calcium carbonate crystal formation inhibition activities were carried out using the prepared rMaj-CAP-1.

Furthermore, in order to clarify a part of the physiological function of Maj-CAP-1, mRNA expression analysis was performed using juvenile prawns. The molting stage of juvenile prawn was discriminated, and the mRNA expression level of Maj-CAP-1 was examined by quantitative real-time PCR using cDNAs prepared from the swimming legs and tail fans of each molting stage. In addition, in order to identify Maj-CAP-1 expressing cells, the swimming legs collected at each molting stage were fixed and tissue sections were prepared. We attempted to identify Maj-CAP-1 expressing cells by *in situ* hybridization of these tissue sections.

## RESULTS and DISCUSSION

From the RNA-sequencing data, the sequence showing 68% homology with Prc-CAP-1 could be obtained. This sequence was presumed to be Maj-CAP-1 because specific sequences such as chitin binding sites and repeat sequence of aspartic acid in C-terminus possessed in this sequence. After cloning Maj-CAP-1 from kuruma prawn cDNA, the rMaj-CAP-1 was expressed by *E. coli*. Thereafter, the rMaj-CAP-1 was purified by RP-HPLC and determined N-terminal amino acids sequence. As a result of N-terminal amino acid sequence analysis of the main peak obtained by RP-HPLC, the sequence of rMaj-CAP-1 was confirmed. Namely, the sequence was identical to the amino acid sequence deduced from cDNA excepting that alanine residue was added to the N-terminus. Additionally, mass spectrometry was equivalent to the theoretical value.

Next, we performed the functional analysis of the recombinant. We demonstrated that both chitin-binding and calcium carbonate crystal formation inhibitory activities possessed in the prepared rMaj-CAP-1. As a result of mRNA expression analysis with the swimming limb and tail fan of juvenile prawn, it was clarified that the expression level of Maj-CAP-1 remarkably increased in the late pre-molt stage. In addition, we detected Maj-CAP-1 expressed cells in epidermis of exoskeleton using by *in situ* hybridization methods.

In marine crustaceans, CAP-1 was the first to determine from their exoskeleton in my study. Then, we confirm the chitin- and calcium-binding activities in Maj-CAP-1, changes in Maj-CAP-1 mRNA expression during molt-cycle, and determination of Maj-CAP-1 producing cells in exoskeleton. In kuruma prawn, thus, these obtained results indicated that Maj-CAP-1 plays important roles in the calcification of exoskeleton.

## REFERENCES

- Inoue, H. et al., 2003. Cloning and expression of a cDNA encoding a matrix peptide associated with calcification in the exoskeleton of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 136: 755–765.
- Inoue, H. et al., 2004. A novel calcium-binding peptide from the cuticle of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318:649–654.

本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻 関本愛香氏の学位論文の一環として行われた。

## 臨海実験施設周辺における海洋観測及び気象観測（2020年度）

小木曾正造<sup>1</sup>，中町 健<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒927-0553 鳳珠郡能登町小木，金沢大学 総合技術部 環境安全部門，<sup>2</sup>〒927-0553 鳳珠郡能登町小木，金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設（当時）

Shouzo OGISO, Takeru NAKAMACHI : The oceanographic and meteorological observations around the Noto Marine Laboratory (2020-2021)

### 【はじめに】

金沢大学環日本海域環境研究センター臨海実験施設では、2013年10月から海洋観測と気象観測を継続して行っている。2020年度は、2020年4月1日0時から1時間おきに、海水温と塩分を研究棟前の浮き桟橋下にて、気温と湿度を宿泊棟前にて測定した。JFEアドバンテック株式会社製「INFINITY-CTW ACTW-USB」を用いて水深0.5mで水温と電気伝導度を測定し、電気伝導度を実用塩分に換算した。日油技研工業株式会社製「水温計アレイ（H）」を用いて水深5.0m及び7.5mの水温を測定した。Vaisala社製「HMP-155D」を用いて気温と湿度を測定した。観測方法とデータの詳細は臨海実験施設のWebサイトと環日本海域環境研究センターのデータベースにて公開している。

### 【結果】

**測定回数：**海水温は各水深とも7月29日まで2880時点で欠測なく測定したが、7月30日に観測機器が故障し、水深0.5mは10時、水深5.0mと7.5mは12時で観測が終了した。塩分は7月17日13時まで欠測なく2582時点で測定したが、7月17日と18日に8時点で異常値を示し、機器の故障により7月30日10時で観測が終了した。気温と湿度では、機器の動作異常により測定されない時点が多く、年間で5683時点しか測定できなかった。4月から10月までの各月で70回から214回の欠測が生じ、10月16日10時から1月6日1時までは欠測なく測定を行ったが、それ以降は機器が異常停止し観測できなかった。

**測定機器の更新及び維持：**海水温と塩分はこれまで用いてきた観測機器が故障したため、2020年10月20日にこれまでと同じ位置の水深5.0mと7.5mに株式会社ハイドロシステム開発社製「RuggedTROLL 100」を設置し、12時より海水温と水深の毎時観測を開始した。同位置の水深0.5mでは、10月20日12時から2021年2月25日9時までOnset社製「CO-U24-002C」を用いて海水温を毎時測定し、2月25日10時以降はJFEアドバンテック社製「INFINITY-CTW」を用いて海水温と電気伝導度を測定して実用塩分に換算した。気温と湿度の観測では、観測制御版内の結露による水分が欠測を引き起こす原因と考えられたため、除湿剤を設置して観測を続けている。

**新規観測：**九十九湾の当施設対岸にある金沢大学理工学域能登海洋水産センターの海水取水口付近にて、2020年10月21日14時より毎時海洋観測を開始した。水深5.0mと7.0mでは「RuggedTROLL 100」を用いて海水温と水深を測定している。水深0.5mでは「CO-U24-002C」を用いて海水温の測定を開始し、2021年2月25日10時から「INFINITY-CTW」を用いて海水温と電気伝導度を測定して実用塩分に換算している。この他に、九十九湾内にてJFEアドバンテック社製「AAQ-RINKO」を用いて深度、水温、電気伝導度、実用塩分、クロロフィル、濁度、DO、光量子の鉛直観測を2017年11月から1定点で、2021年1月からは8定点で毎月1回行っている。これらの観測方法と結果もこれまでの観測結果と同様に臨海実験施設Webサイトと環日本海域環境研究センターデータベースにて公開している。

## 【構成員】

### 1) 教員

教授（施設長）

鈴木信雄（nobuos@staff.kanazawa-u.ac.jp）

博士（理学）

専攻 環境生物学，比較生理学，骨学

（生理活性物質，環境汚染物質及び物理的刺激の骨に対する作用と海産無脊椎動物・海産魚類の生理活性物質の分子進化を研究している）

助教

関口俊男（t-sekiguchi@se.kanazawa-u.ac.jp）

博士（医学）

専攻 比較内分泌学，環境生理学

（海産動物の神経・内分泌系について，分子進化及び生理機能進化の観点で研究している）

助教

木谷洋一郎（yki@se.kanazawa-u.ac.jp）

博士（水産学）

専攻 魚類免疫学，生化学，環境生理学

（魚類の粘膜組織における生体防御機構，とくに自然免疫機構について研究している）

### 2) 職員

技術専門職員

小木曾正造（shozoogiso@se.kanazawa-u.ac.jp）

専門 海産無脊椎動物一般

技術補佐員

中町 健（take-nakamachi@se.kanazawa-u.ac.jp）

令和3年3月31日退職

事務補佐員

曾良美智子（msora@se.kanazawa-u.ac.jp）



### 3) 学生

4 年生	川村龍矢 山本葉月
修士課程 1 年	東野将也 河合 海
修士課程 2 年	関本愛香
博士課程 2 年	山本 樹 小木曾正造
博士課程 3 年	右高潤子

### 4) 客員教授

山内皓平  
大嶋雄治

### 5) 連携研究員

浦田 眞  
上田 宏  
木下靖子  
坂井恵一  
笹山雄一  
清水宣明  
染井正徳  
布村 昇  
平山 順  
三宅裕志  
安田 寛  
谷内口孝治  
山田外史



金沢大学  
環日本海域環境研究センター

環日本海域環境研究センター 臨海実験施設

〒927-0553 石川県鳳珠郡能登町小木ム 4-1

TEL (0768) 74-1151 FAX (0768) 74-1644

Noto Marine Laboratory, Kanazawa University, Ogi, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, JAPAN