

**臨海実験施設**  
**研究概要・年次報告 第3号**  
**2004.4 ~ 2005.3**



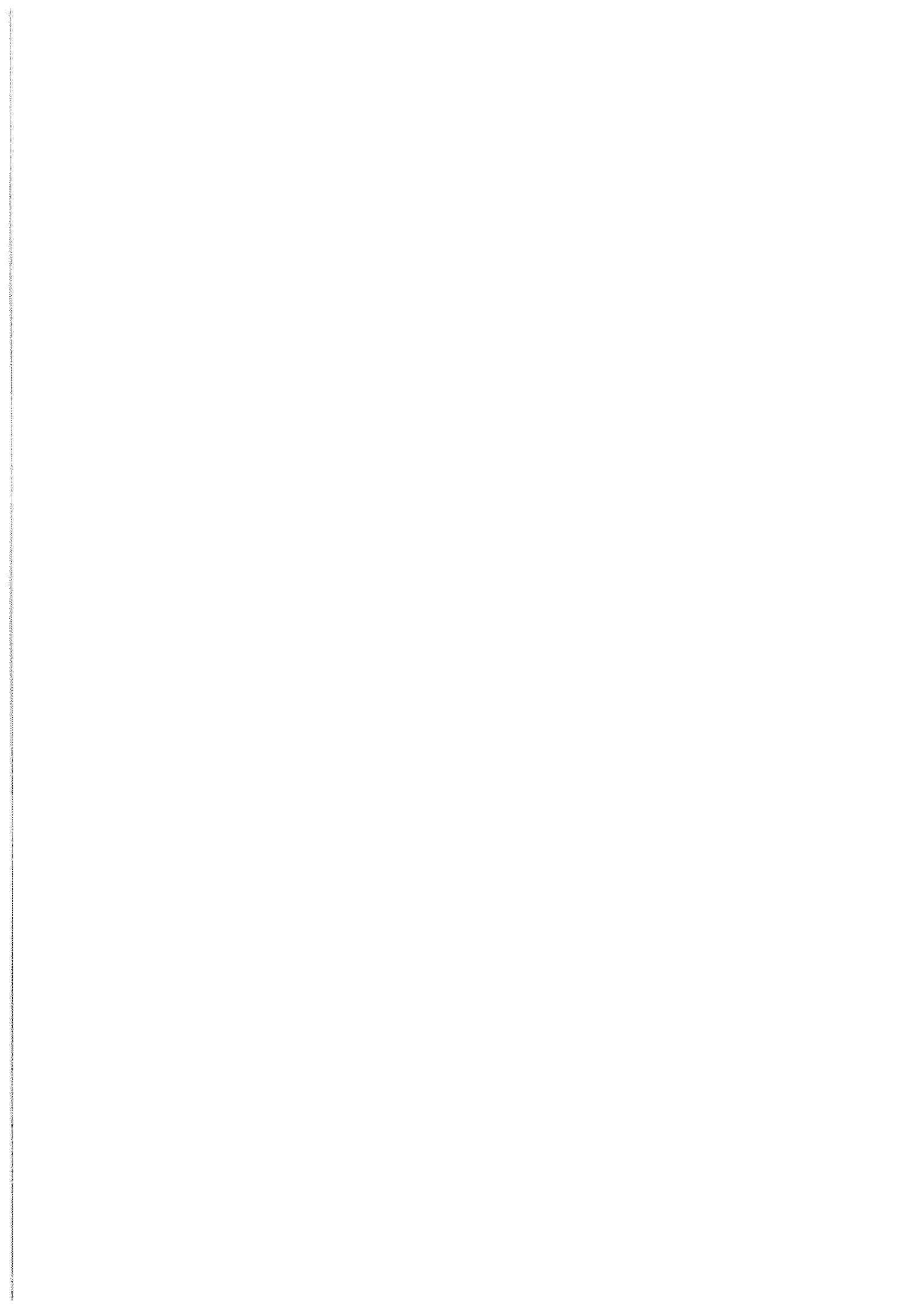
スーパーサイエンスハイスクール「海洋生物の観察」  
七尾高校，金沢泉丘高校（7月3日）

臨海実験施設  
研究概要・年次報告 第3号  
2004. 4～2005. 3



デザイン：エコテクノロジー研究部門 小林史尚 助手

兼六園のこじ灯籠は「金沢（大学）」，背景の白山は「自然」，兼六園の日本最古といわれる噴水は「計測」を表している。



# 活 動 報 告

* 研 究 概 要 .....	2
* 研 究 業 績 .....	4
* 研 究 発 表 及 び 研 究 活 動 .....	5
* 研 究 交 流 .....	6
* 研 究 費 .....	8
* 利 用 状 況 .....	9

## 【研究概要】

ヒゲムシは世界の深海や冷水域に棲む動物で、口も消化管も無い。体内に化学合成細菌を共生させて、それが作る炭水化物で生きている。しかしながら、世界でも例外的に、対馬暖流が流れ込む暖かい浅い湾である能登半島九十九湾にヒゲムシの一種であるマシコヒゲムシが生息する。本年も主としてこの動物の形態や生理について研究を進めてきたが、以下の成果を得ている。これらの内容は、英文の論文としてすでに投稿したか、順次、投稿する予定である。すなわち、2003年度に、本種を実験室において水槽に飼い、共生細菌のいわゆる”餌”として硫化水素を与えるとヒゲを出すことを明らかにした。2004年度は、実際のフィールドにおいてヒゲを出している写真を世界で初めて撮影に成功した（堺井雅彦君の卒業論文研究）。これらは、現在、英文の論文として、Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom (JMBA) に投稿中である。

共生細菌は栄養体と呼ばれる部分に存在するが、そこは電顕で部分的にしか調べられていない。そこには電顕で多量の中性脂肪が存在することが知られており、生化学的研究に調べるとその6割以上がオレイン酸などの1価の不飽和脂肪酸で占められていた。この事は、深海にすむ無脊椎動物の特徴で、低温でも固化しがたく、高水圧下でも固まらない細胞膜を作り出すことができる理由とされている。すなわち、現在のマシコヒゲムシは、水深に25mの浅海に生息するが、深海に棲む動物の特徴をよく備えており、浅海に移住して時間はあまり経過していないことを意味している。以上の内容を論文にして同じくJMBAに投稿している（帝京大学三田先生との共同研究）。

さらに現在まで栄養体全体がどのような形状を示しているか、不明であった。したがって、栄養体の中のバクテリアを含む細胞（バクテリオサイト）に存在する共生細菌の16SrRNAの塩基配列に相補的なプローブを作成して*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、栄養体は、羊歯の葉状で血管を取り巻くような特異的な形をしていることがわかった。これは栄養体と、硫化水素を結合させるヘモグロビンを含む血液との間で物質の交換が容易になるような仕組みであると思われる（出口真理子君の修士卒業論文の一部、金沢大学福森先生との共同研究）。

タイからの留学生のArin Ngamniyom君は、先年、彼の先生であるWichian Magtoon 博士と笹山が見つけたタイ・バンコク郊外の複数の“ため池”におけるタイメダカ (*Oryzias minutillus*) の性比の偏りを、外部性徴を指標に形態計測学的に、また生殖巣を組織学的に調べることによって数値化した。その結果、基本的には人が飲料水として使っている池に棲むメダカの性比は1対1であるが、工業排水が流れ込んだり、殺虫剤が流れ込んだりする池ではメス化が起きており、メスとオスの中間の形態（インターセックス）を示す個体が多く見つかった。性比とインターセックスの割合からその集団の未来予測が可能であり、現在、論文としてまとめている（Arin君の修士論文研究の一部）。

さらに臨海実験施設では、大学院後期課程に社会人の学生が2人入った。1人は、日本海の能登半島沖にまで対馬暖流に乗って死滅回遊してくる海水魚のオヤビッチャが南方のどの集団に親元があるかを、ミトコンドリアDNAの塩基配列から解明する予定である。もう1人は、出口さん（修士課程1年）の研究の後を引き継ぎ、マシコヒゲムシの血中にあると思われる血栓溶解酵素を大腸菌に発現させて、その力価を調べる研究を行う予定である。

鈴木は魚のウロコを骨のモデルとして用い、ホルモンや様々な環境汚染物質の骨に対する作用を調べ、その応答の多様性を研究している。本年度は、内分泌攪乱化学物質の1種であるトリブチルスズ (TBT) に注目した。この物質は、イボニシ等の巻貝に対しオス化を引き起こす物質として知られているが、Ca代謝に及ぼす影響は調べられていない。そこでウロコの *in vitro* の培養システムを用いて調べた。その結果、骨を作る細胞である骨芽細胞に対して特異的に作用し、その活性を低下させることが判明した。この作用は、海産魚のメジナやベラのウロコよりも、淡水魚のキンギョの方が強く、 $10^{-10}$  Mでも影響がみられた。さらにキンギョを用いた *in vivo* の実験では、TBTは血液中のCa濃度を上昇させ、それに伴い血液中のCa濃度を低下させるホルモンであるカルシトニンの分泌を促進させた。したがって本研究により、TBTはオス化と共に、Ca代謝も攪乱していることを初めて証明したことになる (Life Sci., in press)。

物理的な刺激がウロコの骨組織に及ぼす影響についても調べている。平成15年度において、鈴木は学内の特別研究プロジェクト経費の助成を受け、磁界の骨組織に対する影響を調べた。その結果、ウロコには骨芽・破骨細胞以外にもコラーゲンやオステオネクチン等の骨基質が備わっているため、磁界刺激にもよく反応し、磁界の骨形成促進作用の機構解明につながる基礎的なデータを得た。2004年12月に開催された学内の報告会で、この研究成果が評価され、最優秀賞を受賞している。さらに磁気健康科学研究振興財団からの研究助成も採択された。今後は、金沢大学自然計測応用研究センター (旧電磁場実験施設) の山田外史教授、柿川真紀子助手及び橋本松進技官の協力により、キンギョ自体に磁界を曝露する実験や、ラット等の哺乳類を用いた実験を計画している。

魚のウロコは、再生するという特徴がある。そこでウロコの再生過程を観察した結果、ヒトの頭蓋骨と同様の骨化 (膜性骨化) をすることがわかった。骨芽細胞の活性の変化を調べると、10日後の再生ウロコが最も活性化していることが判明した。さらに女性ホルモンであるエストロゲンの骨芽細胞に対する反応性を調べると、再生ウロコの方が通常のウロコよりも反応性が良いことが明らかになった (Life Sci., 76: 2699-2709, 2005)。今後もウロコの再生系を骨再生のモデルとして用い、生理活性物質や磁界・重力に対する応答を調べていく予定である (本研究報告参照)。

カルシトニンは破骨細胞の活性を抑制し、血液中のCa濃度を低下させるホルモンである。魚類においてこのホルモンの血中レベルは、産卵直前になると急激に上昇する。そこでその機構を解明するために、エストロゲンとカルシトニンとの関係を調べた。その結果、エストロゲンが直接的にカルシトニンの分泌を促進していることを証明することができた (Gen. Comp. Endocrinol. 138: 121-127, 2004)。今後はヨウジウオを用いて、岡山大学の坂本竜哉教授とカルシトニンの生殖生理に対する作用を詳細に調べていく予定である。

鈴木は、金沢大学大学院自然科学研究科の中村嘉利助教授と自然計測応用研究センターの小林史尚助手との共同研究により、海産軟体動物の腸内からフェノール分解活性を有する海洋細菌を単離することができた (本研究報告参照)。この成果は、2004年9月にメキシコで開催された The First International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering及び2005年3月にスペインで開催された International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiologyで発表した。さらに細菌の多様な機能を利用し、環境汚染物質を分解・除去するシステムの開発を現在計画している。

## 【研究業績】

### 1) 学術論文

- (1) Suzuki, N., Yamamoto, M., Watanabe, K., Kambegawa, A. and Hattori, A.: Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals in bone metabolism.  
J. Bone Miner. Metab., 22: 439-446 (2004)
- (2) Suzuki, N., Yamamoto, K., Sasayama, Y., Suzuki, T., Kurokawa, T., Kambegawa, A., Srivastav, A.K., Hayashi, S. and Kikuyama, S.: Possible direct induction by estrogen of calcitonin secretion from ultimobranchial cells in the goldfish.  
Gen. Comp. Endocrinol., 138: 121-127 (2004)
- (3) Kobayashi, F., Nakamura, Y. and Suzuki, N.: Bioremediation of undergradable aromatic ring compound in seawater. In “Proceeding of The First International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering (IIMEBE)”, 130: 1-8 (2004)
- (4) 北村敬一郎, 鈴木信雄, 田村まゆこ, 根本鉄, 清水宣明: 運動時ピーク加速度計測システム開発と股関節部および脊椎骨の効果的骨塩増加運動.  
第19回生体・生理工学シンポジウム論文集, 229-232 (2004)
- (5) Katsuyama, H., Otsuki, T., Tomita, M., Fukunaga, M., Fukunaga, T., Suzuki, N., Saijoh, K., Fushimi, S. and Sunami S.: Menaquinone-7 regulates the expressions of osteocalcin, OPG, RANKL and RANK in osteoblastic MC3T3E1 cells.  
Int. J. Mol. Med., 15: 231-236 (2005)
- (6) Ogiso, S., Sakai, K., Matada, M. and Sasayama, Y.: A histological investigation of the maturation of the acorn worm, an inhabitant of the Sea of Japan, and a suggestion about the relationship between synchronized spawning/spermiation and the tidal level.  
Zool. Sci., 22: 579-585 (2005)
- (7) Nakagawa, T., Onoda, S., Kanemori, M., Sasayama, Y. and Fukumori, Y.: Purification, characterization and sequence analyses of the extracellular giant hemoglobin from *Oligobranchia mashikoi*.  
Zool. Sci., 22: 283-291 (2005)
- (8) Yoshikubo, H., Suzuki, N., Takemura, K., Hosono, M., Yashima, S., Iwamuro, S., Takagi, Y., Tabata, M.J. and Hattori, A.: Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis.  
Life Sci., 76: 2699-2709 (2005)
- (9) Suzuki, N., Tabata, M.J., Kambegawa, A., Srivastav, A.K., Shimada, A., Takeda, H., Kobayashi, M., Wada, S., Katsumata, T. and Hattori, A.: Tributyltin inhibits osteoblastic activity and disrupts calcium metabolism through an increase in plasma calcium and calcitonin levels in teleosts. Life Sci., in press
- (10) Kobayashi, F., Daidai, M., Suzuki, N. and Nakamura, Y.: Degradation of phenolic compounds in seawater using novel microorganism isolated from the intestine of *Aplysia kurodai*. In “Proceedings of International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld-2005)”, in press
- (11) Suzuki, N.: Physiological role of calcitonin in fish: with special reference to reproductive and feeding periods. In: Proceedings of IBMS-JSBMR Satellite Symposium on the Comparative Endocrinology of Calcium Regulation (Eds. C. Gay, C.G. Dacke and J.A. Danks), in press

## 2) 総説

- (1) 笹山雄一：有鬚動物門マシコヒゲムシはどのように生きているか：その形態学的，生理学的特徴．比較生理生化学, 21: 30-36 (2004)
- (2) 笹山雄一：カルシウム代謝調節機構の進化—PTHとPTHrP—．The Bone, 18: 17-22 (2004)
- (3) 福森義宏，中川太郎，笹山雄一：ハオリムシ・ヒゲムシの巨大ヘモグロビンの秘密．遺伝, 58: 8-11 (2004)
- (4) 鈴木信雄：魚類のカルシトニンの特徴．Clinical Calcium, 15: 459-466 (2005)

## 3) 著書

- (1) 笹山雄一，鈴木信雄：カルシトニン，カルシトニン関連ペプチド，副甲状腺ホルモン，副甲状腺ホルモン関連蛋白及びそれらの受容体．新ホルモンハンドブック，南江堂，東京，印刷中

### 【研究発表及び研究活動】

#### 1) 研究発表

- (1) 鈴木信雄，山元恵，渡部和郎，神戸川明，服部淳彦：重金属及びビスフェノールAのカルシウム代謝に及ぼす影響．平成16年度日本水産学会大会，鹿児島（2004, 4）
- (2) 鈴木信雄：環境ストレス（環境汚染物質，重力，磁場）に対する骨細胞の応答：ウロコのアッセイ系による解析．バイオサイエンスシンポジウム，金沢（2004, 7）
- (3) Kobayashi, F., Nakamura, Y. and Suzuki, N.: Bioremediation of undergradable aromatic ring compound in seawater. The First International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering (IIMEBE), Mexico (2004, 9)
- (4) 笹山雄一，福森義弘，出口真理子，久保田憲宏，福田貢：マシコヒゲムシも硫化水素を与えるとヒゲを出す：その生物学的考察．第75回日本動物学会，神戸（2004, 9），Zool. Sci., 21: 1269 (2004)
- (5) 出口真理子，笹山雄一，松野あきら，久保田憲宏，金森正明，福森義弘，三田雅敏：マシコヒゲムシの栄養体の組織学的，微細構造学的研究．第75回日本動物学会，神戸（2004, 9），Zool. Sci., 21: 1269 (2004)



- (6) 鈴木信雄, 由久保弘明, 武村啓住, 細正博, 八島さやか, 岩室祥一, 都木靖彰, 服部淳彦: 魚類の骨形成機構: 再生ウロコによる解析. 第75回日本動物学会, 神戸 (2004, 9), *Zool. Sci.*, 21: 1339 (2004)
- (7) 杉浦領, 小林哲也, 町田武生, 鈴木信雄, 服部淳彦: 筋肉内自家移植ウロコにおける破骨細胞の変化とメラトニンの効果. 第75回日本動物学会, 神戸 (2004, 9), *Zool. Sci.*, 21: 1339 (2004)
- (8) 服部淳彦, 八島さやか, 岩室祥一, 鈴木信雄: キンギョのウロコにおけるメラトニンの合成. 第75回日本動物学会, 神戸 (2004, 9), *Zool. Sci.*, 21: 1339 (2004)
- (9) 八島さやか, 岩室祥一, 鈴木信雄, 服部淳彦: キンギョのウロコにおける melatonin と 5-methoxytryptophol の雌雄差及び季節変化. 第75回日本動物学会, 神戸 (2004, 9), *Zool. Sci.*, 21: 1339 (2004)
- (10) 笹山雄一: 下等脊椎動物からみたカルシトニン作用の本質. 第4回カルシトニン/副甲状腺ホルモン研究会, 東京 (2004, 12), 「第4回カルシトニン/副甲状腺ホルモン研究会」要旨集, 株式会社メド・ウイズ, 東京, p18-20
- (11) Kobayashi, F., Daidai, M., Suzuki, N. and Nakamura, Y.: Degradation of phenolic compounds in seawater using novel microorganism isolated from the intestine of *Aplysia kurodai*. International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld-2005), Spain (2005, 3)

## 2) 受賞

- (1) 鈴木信雄, 平成15年度 特別研究プロジェクト経費「若手教官の萌芽的研究」研究成果報告会 最優秀賞, 電磁界による骨形成促進機構の解明 (2004, 12)

## 【研究交流】

### 1) 共同研究

- (1) 笹山雄一: タイ・バンコク郊外におけるメダカの雌雄性を指標にした環境汚染の研究, 国立スリナカリンウイロット大学 (タイ) Dr. Wichian Magtoon

- (2) 笹山雄一：マシコヒゲムシ栄養体のバクテリオサイト微細構造の研究，島根大学生物資源科学部  
教授 松野あきら氏
- (3) 笹山雄一：マシコヒゲムシ栄養体の脂肪酸組成の研究，帝京大学理工学部助教授 三田雅敏氏
- (4) 笹山雄一：特殊な生理機能を有する海産無脊椎動物のデータベースの構築，広島大学理学部教授  
道端齊氏
- (5) 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, Dr. Janine A. Danks
- (6) 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）Dr. Ajai K. Srivastav
- (7) 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 服部淳彦氏
- (8) 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  
研究センター主任研究員 山元恵氏
- (9) 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 楠原征治氏，同助手 杉山稔恵氏
- (10) 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学総合研究科教授 山本敏男氏，  
同助教授 池亀美華氏
- (11) 鈴木信雄：プロラクチンの骨組織に対する作用，岡山大学理学部附属臨海実験所教授 坂本竜哉  
氏，北里大学水産学部教授 川内浩司氏，同助教授 高橋明義氏，同助教授 森山俊介氏
- (12) 鈴木信雄：再生ウロコに関する研究，北海道大学大学院水産科学研究院教授 都木靖彰氏，  
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科助教授 田畑純氏
- (13) 鈴木信雄：円口類と軟骨魚類のカルシトニンの構造決定，東京大学海洋研究所教授 竹井祥郎氏，  
同助教授 兵藤晋氏
- (14) 鈴木信雄：磁界と骨代謝に関する研究，東京大学大学院医学系研究科教授 上野照剛氏，千葉大  
学工学部助教授 岩坂正和氏
- (15) 鈴木信雄：魚類の鰓後腺に存在するエストロゲンレセプターに関する研究，早稲田大学教育学部  
教授 菊山榮氏，早稲田大学人間総合研究センター研究員 山本和俊氏

- (16)鈴木信雄：ヒラメの初期発生におけるカルシトニンの作用，東北大学農学研究科教授 鈴木徹氏，  
独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所発育制御チーム長 黒川忠英氏
- (17)鈴木信雄：脂肪酸の石灰化に対する作用，富山医科薬科大学 和漢薬研究所教授 浜崎智仁氏
- (18)鈴木信雄：超音波の骨代謝に及ぼす影響，富山医科薬科大学医学部教授 近藤隆氏，同大学医学  
部講師 和田重人氏
- (19)鈴木信雄：ウロコの破骨細胞で発現している遺伝子の解析，早稲田大学教育学部教授  
中村正久氏
- (20)鈴木信雄：重力及び微小重力の骨に対する作用，東京大学 アイソトープ総合センター助教授  
井尻憲一氏

## 2) 各種活動

### 社会活動

- (1) 笹山雄一：石川県環境影響評価委員会委員，2003-現在
- (2) 笹山雄一：石川県原子力発電温排水検討委員会委員，2000-現在
- (3) 笹山雄一：のと海洋ふれあいセンター研究報告編集委員会委員，1994-現在
- (4) 笹山雄一：石川県立七尾高等学校スーパーサイエンスハイスクール運営委員会委員，2004-現在

## 【研究費】

### 1) 科学研究費

- (1) 鈴木信雄（代表），若手研究B，900千円

重金属及び内分泌攪乱物質の骨代謝に及ぼす作用：骨硬化ホルモンとのクロストーク

### 2) その他

- (1) 鈴木信雄（代表），財団法人 磁気健康科学研究振興財団研究助成，500千円

磁界による骨形成機構の解明：魚類のウロコを用いた新規モデルシステムの開発

## 【利用状況】

### 1) 利用者及び研究目的

- 5 / 1 1 ~ 5 / 1 2      金沢大学低レベル放射能実験施設  
井上睦夫 助手 他5名  
「海水試料の採取」
- 5 / 1 1 ~ 5 / 1 3      京都大学フィールド科学教育研究センター  
舞鶴水産実験所  
甲斐嘉晃  
「ウミタナゴ・メバル類の採集」
- 5 / 1 1 ~ 5 / 1 3      京都大学農学研究科  
片渕弘志  
「ウミタナゴ類の採集」
- 6 / 1 5                  のと海洋ふれあいセンター  
坂井恵一 普及課長  
「研究打ち合わせ」
- 7 / 3                      スーパーサイエンスハイスクール  
「海洋生物の観察」  
七尾高校、金沢泉丘高校
- 7 / 1 3                  のと海洋ふれあいセンター  
坂井恵一 普及課長  
「研究打ち合わせ」
- 7 / 1 6 ~ 7 / 2 0      金沢大学自然科学研究科  
田中英里子  
「陸域の淡水生貝形虫の調査」

- 7 / 28 ~ 7 / 30 三重大学教育学部  
後藤太一郎 助教授 他2名  
「イソヤムシの採集」
- 9 / 7 ~ 9 / 10 富山大学人文学部  
中井精一 助教授 他25名  
「能登半島における海洋生物に関する社会環境的研究」
- 9 / 16 のと海洋ふれあいセンター  
達克幸 普及課主任技師 他1名  
「海洋生物の調査」
- 10 / 12 のと海洋ふれあいセンター  
東出幸真 普及課技師 他1名  
「海洋生物の採集」
- 11 / 18 のと海洋ふれあいセンター  
達克幸 普及課主任技師 他1名  
「海洋生物の調査」
- 12 / 14 のと海洋ふれあいセンター  
東出幸真 普及課技師 他1名  
「海洋生物の採集」
- 1 / 18 のと海洋ふれあいセンター  
坂井恵一 普及課長  
「研究打ち合わせ」
- 1 / 21 ~ 1 / 24 金沢大学自然科学研究科  
田中英里子  
「陸域の淡水生貝形虫の調査」

- 2 / 1 7                    のと海洋ふれあいセンター  
達克幸 普及課主任技師 他1名  
「海洋生物の調査」
- 3 / 1 5                    のと海洋ふれあいセンター  
坂井恵一 普及課長  
「研究打ち合わせ」
- 3 / 2 4 ~ 3 / 2 6        北海道大学北方生物圏フィールド科学センター  
鈴木範男 教授  
「研究打ち合わせ」

## 2) 臨海実習等

- 7 / 6 ~ 7 / 8            富山県立砺波高校  
松原禎弘 教諭 他43名  
「ウニの初期発生の研究・磯の生物調査」

- 8 / 1 5 ~ 8 / 2 1        公開臨海実習  
京都大学 飯野浩太郎 他30名

- 8 / 2 3 ~ 8 / 2 8        富山大学理学部  
小松美英子 教授 他18名  
「臨海実験の実施」

- 8 / 2 9 ~ 9 / 1        福井大学教育地域科学部  
前田樹夫 教授 他18名  
「臨海実習」

### 3) 利用者数及び船舶の使用状況

平成16年度臨海実験施設利用者数（延べ人数1,114人の内訳）

(月)	研究者		学生	
	学内	学外	学内	学外
4	0	0	0	0
5	4	0	8	6
6	0	1	0	0
7	0	23	5	283
8	0	21	182	366
9	0	5	5	118
10	2	44	0	0
11	0	0	6	0
12	0	0	26	0
1	0	1	4	0
2	0	0	0	0
3	0	4	0	0
合計	6	99	236	773

平成16年度臨海実験施設船舶使用回数

(月)	あおさぎ	くろさぎ
4	4	4
5	2	3
6	2	6
7	3	5
8	6	5
9	1	4
10	1	4
11	3	3
12	2	5
1	3	5
2	4	4
3	2	3
合計	33	51

## 研 究 報 告

\*キンギョの再生ウロコにおける骨芽細胞の活性の変化と骨芽細胞に対するエストロゲンの応答性 (p 14-15)

Changes in the osteoblastic activity and estrogenic response to osteoblasts in the regenerating scale of goldfish

\*数種の真骨魚類において脳下垂体の副腎皮質刺激ホルモン産生細胞はカルシトニン受容体を持つ (p 16)

Adrenocorticotropic hormone-producing cells in the pituitary gland have a calcitonin receptor in some teleosts

\*マシコヒゲムシの“ヒゲ”の生態生理学的研究 (p 17)

Eco-physiological study of tentacles in the beard worm (*Oligobrachia mashikoi*)

\*クロシタナシウミウシの腸から単離された海洋細菌の同定 (p 18-19)

Identification of marine bacterium isolated from the intestine of *Dendrodoris fumata*



# キンギョの再生ウロコにおける骨芽細胞の活性の変化と 骨芽細胞に対するエストロゲンの応答性

鈴木信雄

〒927-0553 鳳珠郡能登町小木ム4-1 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Nobuo Suzuki: Changes in the osteoblastic activity and estrogenic response to osteoblasts in the regenerating scale of goldfish

ヒトの脊椎骨には2種類の細胞（破骨細胞及び骨芽細胞）がある。これらの細胞により、ヒトの骨は骨吸収と骨形成を繰り返し、骨からカルシウムを出し入れしている。さらに、これら2種類の細胞はコミュニケーションをとっており、増殖及び分化を互いに制御している。現在まで、骨形成に関する知見（主に哺乳類）は、両方の細胞を共存させて骨の形成過程を調べるのが非常に難しいため、動物そのものを用いた *in vivo* の実験が多い。*in vitro* の良いモデルシステムは、これまで報告されていない。

魚類のウロコには、両方の細胞が存在し、さらにウロコは再生するという特徴がある。また、ウロコは1個体から多量に採取可能なため、再生過程における骨芽細胞の変化を調べることができる。したがって、再生ウロコが骨再生のモデルとして有効である可能性が高い。そこで本研究では、1) 再生過程の組織学的な変化、2) 骨芽細胞の活性の変化、3) ホルモン（エストロゲン）に対する応答性を調べた。

材料としてキンギョ (*Carassius auratus*) を用い、以下3種類の実験を行った。

実験1：小型のキンギョ（体重約6g）を麻酔し、左側のウロコを取り除いた。その後、3、4、7、10、15及び24日にブアンで固定し、パラフィン法で切片を作成した。その切片をヘマトキシリン・エオシンにより染色し、ウロコの再生を観察した。

実験2：大型のキンギョ（オス、約30g）の左側のウロコを取り、7及び10日後の再生されたウロコの骨芽細胞の活性を調べた。その指標としてアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を Suzuki and Hattori (2002) の方法により測定し、右側のウロコと比較した。

実験3：大型のキンギョ（オス、約30g）のウロコ（左側のみ）を取り、7及び10日後の再生されたウロコを採取した。それらのウロコを培養し、骨芽細胞の増殖・分化に関与するホルモン（エストロゲン）に対する応答性を右側のウロコと比較した。

実験1の観察結果を以下に示す。3日目において骨芽細胞の固まりが観察された。その後骨基質ができ、以後徐々に骨基質が成長し、さらに骨芽細胞の活性が高い状態が続いた。7日目にはカルシウムの沈着が生じ、7-10日目において、骨芽細胞の活性が高いという結果が得られた。15日目では骨芽細胞の活性が低下し、カルシウムの沈着が進行し、24日目において成熟したウロコと同じ状態にまで再生が進行した。したがって、10日前後まで骨芽細胞が活性化され、7日目では石灰化（骨化）が起きていることが判明した。これらの結果は、ラットの頭蓋骨の形成過程と非常によく似ており、再生ウロコは骨再生のモデルとして使用できることが判明した。

ALP活性は、再生ウロコ (Regenerating scales) の方が右側のウロコ (Ontogenic scales) よりも高く、さらに7日より10日の方が高い値を示した (Fig. 1)。したがって、10日目の再生ウロコにおいて、その骨芽細胞の活性がピークに達している可能性が示された。なお15日目の再生ウロコのALP活性を追試した結果、10日目の方が高い値を示した。したがって、10日目の再生ウロコにおいて、骨芽細胞の活性が最も高いと結論づけられる。

エストロゲン処理した右側のウロコ (Ontogenic scales) の骨芽細胞の活性は上昇したが、再生ウロコ (Regenerating scales) の方が高い値を示した (Fig. 2)。また、7日目よりも10日目の再生ウロコの方がその上昇率が大きかった (Fig. 2)。したがって、再生ウロコの方がホルモンに対する反応性が高く、10日目において骨化が活発に進行していることが判明した。

以上のことから、再生ウロコは骨再生のモデルとして使用可能であり、特に10日目の再生ウロコはホルモン等に対する応答性が最も高いことが判明した。今後、このモデルを用いて、様々な生理活性物質や磁界・重力等の物理的な刺激に対する応答を調べる予定である。

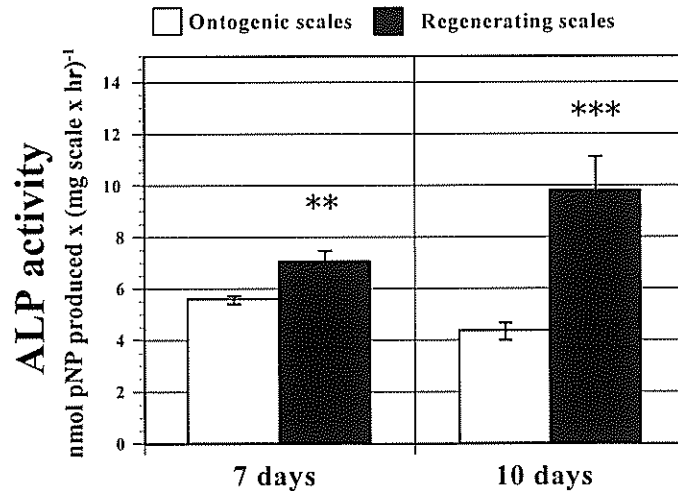


Fig. 1 Osteoblastic activity in the ontogenic and the regenerating scales on days 7 and 10. Values are means $\pm$ SEM. \*\*,\*\*\* indicate statistically significant differences between the ontogenic and the regenerating scales at  $P<0.01$  and  $P<0.001$ , respectively.

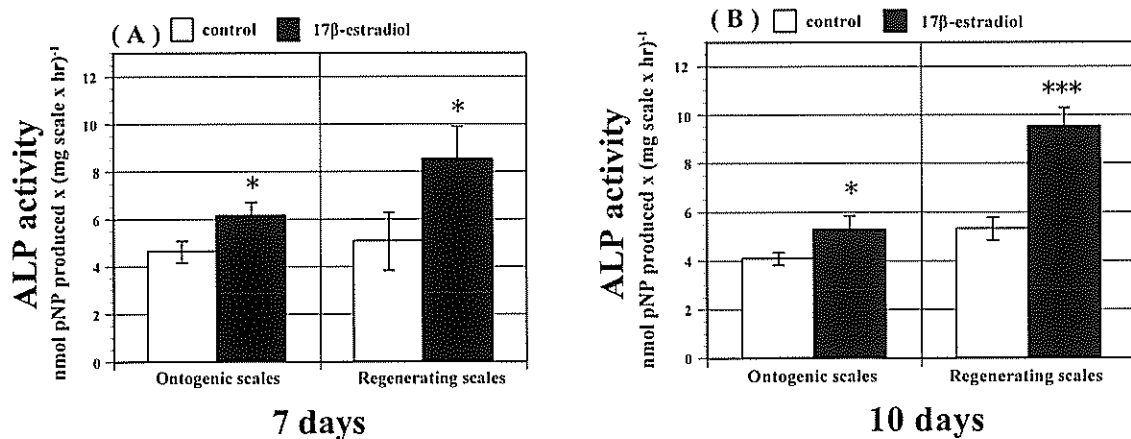


Fig. 2 Osteoblastic activity in the ontogenic and the regenerating scales by the 17 $\beta$ -estradiol treatment on days 7 (A) and 10 (B). Values are means $\pm$ SEM. \*,\*\*\* indicate statistically significant differences at  $P<0.05$  and  $P<0.001$ , respectively, compared with the values in the control.

謝辞

本研究は科学研究費，若手研究B（14740455）の援助により行われた。

## 数種の真骨魚類において脳下垂体の副腎皮質刺激ホルモン産生細胞は カルシトニン受容体を持つ

峯岸孝彰

〒927-0553 鳳珠郡能登町小木ム4-1 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Takaaki Minegishi: Adrenocorticotrophic hormone-producing cells in the pituitary gland have a calcitonin receptor in some teleosts

カルシウムを調節するホルモンの一つとしてカルシトニンが知られている。カルシトニンは腎臓に作用し、カルシウムに加えて、ナトリウムの尿中への排出を増加させる。一方、鉱質コルチコイドの一種であるコルチゾルも尿中へのナトリウムの排出に働く。このコルチゾルは上位ホルモンである脳下垂体の副腎皮質刺激ホルモンの支配を受けている。したがって、カルシトニンと副腎皮質刺激ホルモンとの間に何らかの関係があると考えられるが、この点はこれまで全く注目されていなかった。したがって、本研究では 1) 数種の魚類の脳下垂体における副腎皮質刺激ホルモン産生細胞に対するカルシトニン受容体の抗体を用いた免疫染色、2) カエルとカメの脳下垂体における副腎皮質刺激ホルモン産生細胞に対するカルシトニン受容体の抗体を用いた免疫染色、3) キンギョの脳下垂体よりカルシトニン受容体ファミリー特異的プライマーを用いたRT-PCRによるカルシトニン受容体cDNA断片の増幅、4) キンギョの脳下垂体よりカルシトニン受容体特異的プライマーを用いたRT-PCRによるカルシトニン受容体cDNA断片の増幅を行い、それらの関係を調べた。

海水魚のヨロイメバルと淡水魚のキンギョとメダカの脳下垂体において、副腎皮質刺激ホルモン産生細胞に、カルシトニン受容体の抗体に対する陽性反応が見られた。またこの反応が魚類に特異的なことか否かを調べるために、両生類のシュレーゲルアオガエルと爬虫類のミドリガメにおいて同様の免疫染色を行った結果、共に反応は陽性であった。ただし、調べたすべての動物において、副腎皮質刺激ホルモン産生細胞に免疫反応の強弱がみられた。

この免疫反応は、脳下垂体の副腎皮質刺激ホルモン産生細胞において単に免疫学的に似た物質を検出したのか、実際にカルシトニンの受容体があるのかを調べるために、カルシトニン受容体ファミリーに特異的なプライマーを用いて、キンギョの脳下垂体からRT-PCRによりカルシトニン受容体cDNA断片の増幅を行った。その結果、カルシトニン受容体ではなく、脳下垂体からカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)と結合するカルシトニン受容体様受容体のcDNA断片が増幅された。そこでキンギョの鰓後腺からカルシトニン受容体cDNA断片を増幅させ、その塩基配列よりカルシトニン受容体cDNA断片の増幅に有効なプライマーを設計し直し、再びキンギョの脳下垂体からカルシトニン受容体の増幅を行った。その結果、電気泳動において鰓後腺のカルシトニン受容体cDNA断片の増幅産物と同じ位置にバンドが検出された。

以上の結果より、少なくともキンギョでは脳下垂体の副腎皮質刺激ホルモン産生細胞にカルシトニン受容体があり、下等脊椎動物ではカルシトニンが副腎皮質刺激ホルモンの生産や分泌を調節している可能性が示唆された。

(本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科生命・地球学専攻 峯岸孝彰君の修士論文の一環として行われた。)

## マシコヒゲムシの“ヒゲ”の生態生理学的研究

堺井雅彦

〒927-0553 鳳珠郡能登町小木ム4-1 金沢大学自然計測応用研究センター，臨海実験施設  
Masahiko Sakai: Eco-physiological study of tentacles in the beard worm (*Oligobrachia mashikoi*)

有鬚動物門ヒゲムシ類は体長5.5~25cmに対し、体幅は0.1~2.5mmと極めて細長く、自分でつくったキチン質の直径0.1~2.8mmで長さ数十cmの管に棲んでいる。ヒゲムシは深海や冷たい水域で発見されてきたが、本種は能登半島九十九湾という対馬暖流が流れ込む暖かい浅い湾に例外的に見出される。棲管は先端の約1cm以外は海底の泥にほとんど埋まっている。これまで自然界においてヒゲムシが棲管からヒゲを出しているか否かは確認されたことはなかった。したがって、九十九湾という地の利を生かしてスクーバダイビングにより実際に海底に到達し、そこで精査することを考えた。その結果、ヒゲムシ類の中では世界で初めて、本種が自然界においてヒゲを出していることを確認し、写真撮影にも成功した。マシコヒゲムシの生息場所はやわらかい泥で、本種は生息密度の高い海底では斜めに、密度が低い海底では垂直に棲管が埋まっていた。光に対して敏感にヒゲを引き込める個体と引き込めない個体がいた。しかし、全ての個体が水流の乱れに対して敏感であった。

ヒゲムシは口・消化管・肛門を欠き、硫黄酸化細菌を共生させ、これが化学合成的に生産する炭水化物により生きている。これまで、ヒゲムシはヒゲを出すと仮定され、その意味は共生細菌が要求する硫化水素を吸収するためと考えられてきた。昨年、当研究室の福田は実験室でヒゲムシを硫化水素で処理するとヒゲを出すことを証明した。しかしながら、ヒゲを出す生理学的な意義は不明のままであった。そこでその意義は硫化水素の吸収にあるのではなく、硫化水素処理によって低減した溶存酸素を補うために海水中にヒゲを出すのではないかと考えた。まず、実際に硫化水素で処理をするとヒゲを出したが、その時、海水の溶存酸素濃度は7.80mg/lより7.45mg/lへ約5%下がっていた。次に、硫化水素でなくとも溶存酸素濃度を下げるとヒゲを出すか否かを確かめるために炭酸ガスを用いて同じ溶存酸素濃度に下げた。その結果、18個体中全ての個体が棲管の入り口の方に体を伸ばし、7個体がヒゲを出した。一方、炭酸ガス処理をしなかった水槽に入れられたヒゲムシはまったく動きがみられなかった。ヒゲを出さなかった個体は棲管の入り口が血栓でふさがれており、ヒゲを出すことは物理的に不可能であったと判断された。以上の結果は、ヒゲムシがヒゲを出す生理学的意味は、海水より酸素をとり入れるためであることを強く示唆している。

(本研究は、金沢大学理学部生物学科 堺井雅彦君の卒業論文の一環として行われた。)

## クロシタナシウミウシの腸から単離された海洋細菌の同定

小林史尚<sup>1,2)</sup>, 岩井尚子<sup>3)</sup>, 鈴木信雄<sup>4)</sup>, 中村嘉利<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学自然計測応用研究センターエコテクノロジー研究部門；

<sup>2)</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学大学院自然科学研究科物質工学専攻；<sup>3)</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学工学部物質化学工学科；<sup>4)</sup>〒920-0553 鳳珠郡能登町小木ム4-1 金沢大学自然計測応用研究センター，臨海実験施設

Fumihisa Kobayashi, Naoko Iwai, Nobuo Suzuki, and Yoshitoshi Nakamura: Identification of marine bacterium isolated from the intestine of *Dendrodoris fumata*

日本海や瀬戸内海の閉鎖性海域には、赤潮の発生、重金属などの有害物質による汚染が広がっている<sup>1)</sup>。また大型タンカーによる事故が発生した場合、その被害は長期間かつ広範囲に及ぶため、海洋環境の保全是重要な課題となっている。特に近年、相次いで発生した大型タンカーの事故による大量重油流出事故は、海洋環境に深刻な影響を与え、改めて海洋環境保全の重要性を国際世論に訴えることになった。また活性汚泥法は世界的に広く普及している廃水処理法<sup>2)</sup>であるが、海水のように無機塩類を多く含む場合は、その中の微生物が無機塩類により阻害されるために効率的な処理ができず、処理方法の改善が望まれている。

そこで本研究では、海水中の難分解性芳香族化合物を処理するために、海洋生物からフェノール分解細菌を単離し、その同定を行った。海藻を摂食する海産生物の腸には、海藻中に含まれるリグニンを分解する腸内細菌が存在すると推測される。リグニン（フェノール系ネットワークポリマーから成る天然高分子化合物）を分解することのできる細菌は、フェノールなど難分解性芳香族化合物を分解できる可能性が高い。そこで、海藻を食べるクロシタナシウミウシの腸内容物からフェノール資化性海洋細菌のスクリーニングを試みた。

Fig.1にクロシタナシウミウシの概観を示す。クロシタナシウミウシをMS222(Aldrich)で麻酔し、腸内容物を採取した。この腸内容物約1 mLを改変ALLEN海水<sup>3)</sup> (NaCl 15 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 3.58 g/L, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 2.72 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.6 g/L, KCl 0.39 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0.1 g/L) 9 mLに攪拌溶解した。この溶液を0.5 g/Lフェノールを含む改変ALLEN海水寒天培地（寒天濃度 20 g/L）に200 μLずつ塗抹し、15°Cで4-5日間放置した。薬品は全て和光純薬工業製のものを用いた。数十枚の寒天培地の中で、一枚の寒天培地から数個のコロニーが確認された。この菌株をEBR01と命名した。

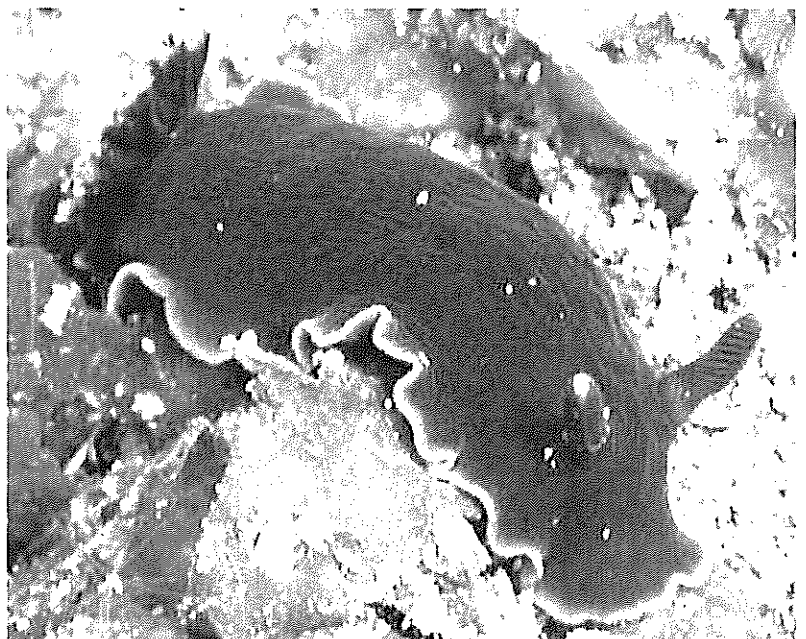


Fig. 1 Photograph of *Dendrodoris fumata*

次に、クロシタナシウミウシの腸内容物から単離されたEBR01菌株の同定を試みた。同定試験は、光学顕微鏡U-LH1000（オリンパス製）による細胞形態、グラム染色性、胞子の有無を観察し、Nutrient Agar（Oxoid, England）上でのコロニー形態を観察した。また、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、ブドウ糖からの酸/ガス発生、ブドウ糖の酸化/発酵（O/F）について試験を行った。

Table 1にEBR01菌株の同定試験結果を示し、Fig.2にはグラム染色後のEBR01菌株の顕微鏡写真を示す。うすい赤色に染まったことからEBR01菌株はグラム陰性菌であった。同定試験の結果、本海洋細菌はグラム染色陰性、桿菌、非運動性、カタラーゼ反応陽性、オキシダーゼ反応陰性、コロニー観察レベルで色素非生産性の性状を示した。これらの性状は*Acinetobacter*に帰属する菌種の特徴に一致していた<sup>4)</sup>。

以上の結果から、クロシタナシウミウシから単離されたフェノール資化性海洋細菌は*Acinetobacter* sp.であることがわかった。今後は本菌株を用いた海水中の難分解性芳香族化合物の分解処理とその効率化について進めていく予定である。

Table 1 Taxonomical properties of EBR01 strain

Properties	EBR01
Morphological:	
Form	Rods
Size (um)	0.8-1.0
Features of colony using Nutrient Agar	
Motility	Smooth
Flagellation	Non-motile
Gram stain	No <sup>a</sup>
Physiological:	
Catalase	+ <sup>b</sup>
Oxidase	-
OF test	-
Growth at 30 °C	+
Growth at 37 °C	+
Growth at 40 °C	-

a Negative, b Positive

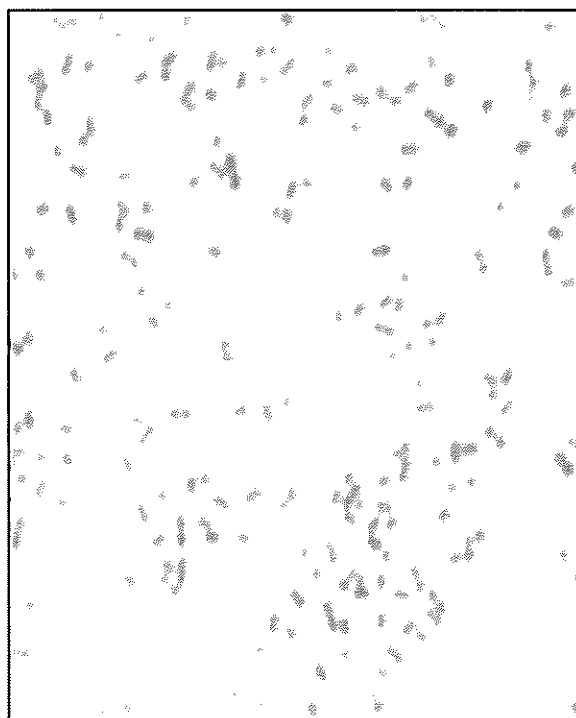


Fig. 2 The micrographs of the Gram stain of EBR01 strain.

#### 引用文献

- 1) 環境省：平成16年度環境白書，ぎょうせい，東京，pp.89-93 (2004)
- 2) 橋本奨，須藤隆一：新しい活性汚泥法，産業用水調査会，東京，pp.1-2 (1986)
- 3) 鈴木信雄，矢澤一良，渡部和郎，赤堀結花里，石川千夏子，近藤聖，高田清克：エイコペンタエノ酸生細菌SRCRC-2738の大量培養条件の検討，日本水産学会誌，58, 323-328 (1992)
- 4) Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.: Bergey's manual of systematic bacteriology Vol.2, Williams and Wilkins, Baltimore (1984)

## 【構成員】

### 1) 職員

教授	笹山雄一 (sasayama@kenroku.kanazawa-u.ac.jp) 理学博士 専攻 生物多様性学、比較生理学 (有鬚動物門マシコヒゲムシの形態学・生理学・生態学を研究している)
助手	鈴木信雄 (nobuo@kenroku.kanazawa-u.ac.jp) 博士 (理学) 専攻 骨学、比較内分泌学 (骨代謝に関与するホルモン、様々な環境汚染物質及び重力・磁界等の環境要因の骨に対する作用を研究している)
技術専門職員	又多政博 (matada@sweet.ocn.ne.jp) 専門 海産無脊椎動物一般
事務補佐員	曾良美智子(msora@sweet.ocn.ne.jp)

### 2) 学生

博士課程後期課程1年 (社会人特別選抜)

東出幸真

小泉隆

博士前期課程2年

峯岸孝彰

博士前期課程1年

出口真理子

Arin Ngamniyom

4年生

堺井雅彦



金沢大学  
自然計測応用研究センター

自然計測応用研究センター 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