

ISSN 1348-4656

金沢大学自然計測応用研究センター

臨海実験施設
研究概要・年次報告 第4号
2005.4 ~ 2006.3



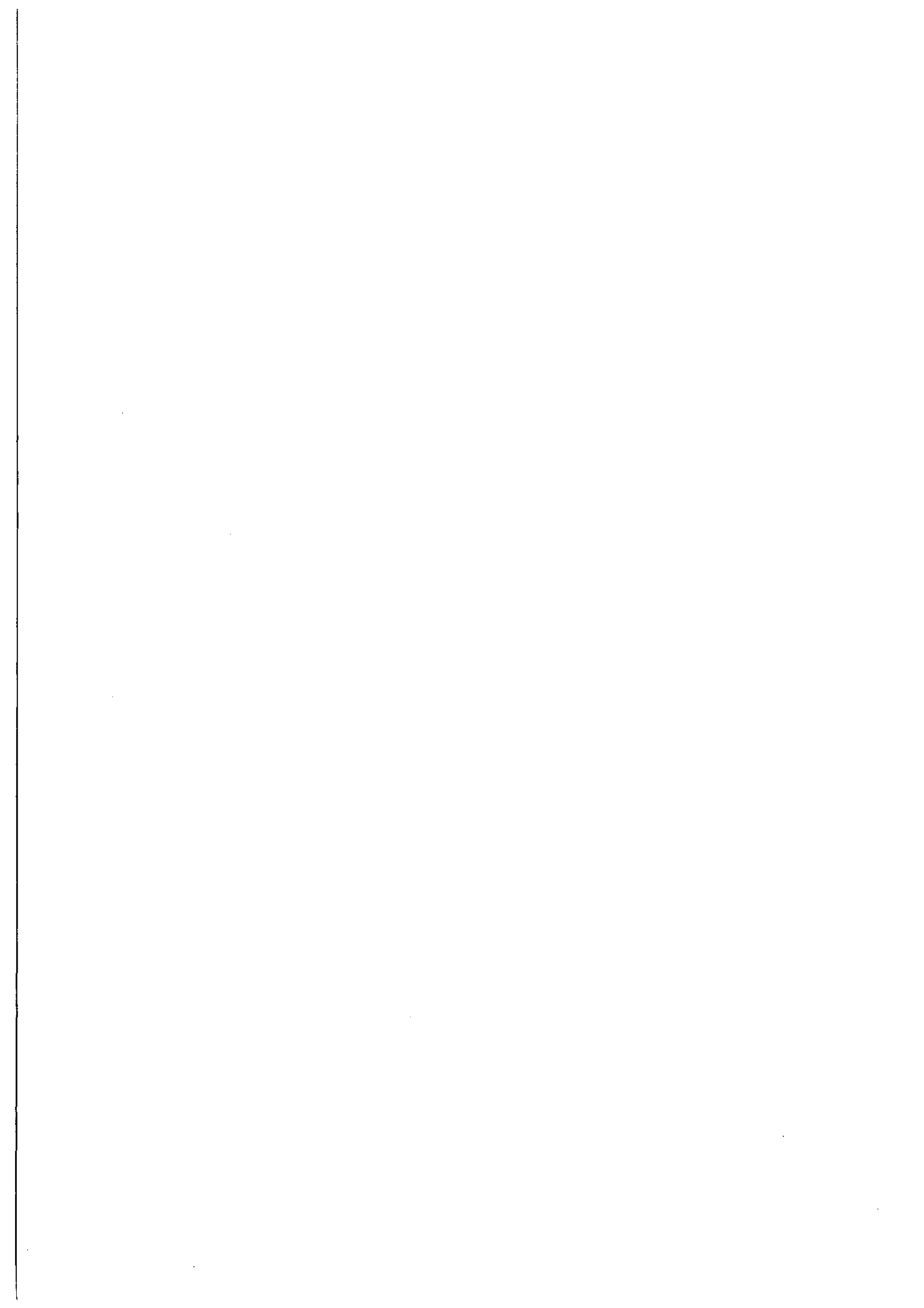
能登半島九十九湾に生息するムツサンゴ
(*Rhizopsammia minuta mutsuensis*)

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

臨海実験施設
研究概要・年次報告 第4号
2005. 4～2006. 3



デザイン：自然計測応用研究センターエコテクノロジー研究部門 小林史尚 助手
兼六園のことじ灯籠は「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	7
* 研究費	8
* 利用状況	9

【研究概要】

ヒゲムシは環形動物門多毛綱のSiboglinidae科に属し、世界の深海や冷水域に棲む。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。また、積極的に共生細菌を細胞内消化によって栄養としている。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、以下の成果を得ている。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。2005年度は、ヒゲムシが生息する海底土壌の表面と深さ40cmまでの硫化水素濃度と全窒素濃度を調べた。その結果、どちらも表面が最も高いことが知られた。ヒゲムシの生態と硫化水素濃度との関係を現在、英文の論文として、*Zoological Science*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、そこには多量の脂肪が蓄えられており、しかもその6割以上がオレイン酸などの1価の不飽和脂肪酸が占めていた。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。以上の内容は*Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*より出版された（東京学芸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、栄養体の中の細菌を含む細胞（バクテリオサイト）に存在する共生細菌の16S rRNA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（金沢大学福森先生との共同研究）。

またヒゲムシは、巨大（40万Da）ヘモグロビンを持ち、それは4つのサブユニットよりなることが構造生物学的手法を用いて明らかになった。この構造の中に不對のシステインを含むことから、このヘモグロビンは、酸素と同時に硫化水素を運ぶこともわかった（金沢大学福森先生との共同研究）

タイからの留学生のArin Ngamnyiyom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。また、性比が異常な池では、DDTが痕跡的に見つかった。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る。

さらに臨海実験施設では、大学院後期過程に社会人の学生が2人在籍している。一人は、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起源があるかを、ミトコンドリアDNAのDループの塩基配列から解明しつつある。もう一人は、マシコヒゲムシの栄養体の生化学的研究を行い、消化管との類似性を検討しつつある。

一方、鈴木は魚のウロコを骨のモデルとして使い、ホルモン等の生理活性物質や物理的刺激的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、金沢大学薬学部の染井正徳教授と東京医科歯科大学教養部の服部淳彦教授との共同研究により、新規メラトニン誘導体（Heterocycles,

in press) の骨に対する作用を解析し、骨粗鬆症等の骨疾患に対する治療薬の開発を行った。メラトニンは、睡眠等の体内リズムの調節に関係しているホルモンであるが、特に破骨細胞（骨を壊す細胞）の活性を抑制することを数年前に証明した（Suzuki and Hattori, *J. Pineal Res.*, 2002）。この新規メラトニン誘導体は、破骨細胞の活性を抑制する作用の他に、骨芽細胞（骨を作る細胞）を活性化する作用もあることがわかった（平成17年度薬学会発表）（*J. Pineal Res.*に投稿予定）。この研究に基づいて、金沢大学のTLO（KUTLO）から国内及び国際特許を出願した。さらに独立行政法人科学技術振興機構の「シーズ育成試験」の助成も受けて行われた。今後、キンギョのウロコで得られたデータを卵巣摘出ラットや哺乳類の培養細胞を用いて確認し、新薬の開発につなげていく予定である。

今年スイスで国際骨代謝学会が開催され、その関連シンポジウム（Comparative Endocrinology of Calcium Regulation）で、鈴木は軟骨魚類と円口類のCa代謝を調節するホルモンであるカルシトニンの生理作用について招待講演をした。さらにウロコでもメラトニンが合成されており、生殖期のCa代謝にメラトニンが関与する可能性を示すデータを発表した。本国際会議は隔年開催されており、2007年にカナダで開催される会議においても、これまでの研究成果を発表する予定である。

鈴木は、物理的な刺激として、加速度の重力刺激、超音波のメカニカルな刺激及び交流磁場による刺激について研究してきた。以下に順に示す。

（財）日本宇宙フォーラムの宇宙利用先端研究が採択され、その助成を受け、加速度の重力刺激及び超音波のメカニカルストレスがウロコの骨組織に及ぼす影響について調べた。金沢大学医学部保健学科の北村敬一郎助教授が独自に作成した加速度の重力発生装置を用いて、ウロコの骨芽及び破骨細胞に対する影響を評価した。その結果、非常に弱い重力刺激（0.5G）でも破骨細胞の活性が抑制され、ある一定以上（1G以上）の重力刺激により骨芽細胞が活性化することが判明した。この結果は、今年7月に中国の北京で開催される国際学会で発表の予定である。一方、富山大学医学部の近藤隆教授と当センターの清水宣明教授及び北村敬一郎助教授等との共同研究により、超音波のメカニカルストレスに対する影響を調べた。ウロコの骨芽及び破骨細胞を活性化した骨代謝亢進モデルを作成し、超音波の影響を調べると、骨芽細胞が活性化され、破骨細胞の活性が抑制された。骨芽細胞の活性化は、インシュリン様成長因子やエストロゲン受容体mRNAの発現の上昇を伴っていることも判明した（本研究報告参照）。骨代謝亢進ウロコは、骨粗鬆症とよく似た状況を作り出しているため、本研究の成果はその治療に貢献できると思われる（*Life Sci.*に投稿予定）。

さらに、磁場刺激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、磁場刺激にもよく反応し、磁場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。これらの成果の一部を、2005年4月に筑波で開催された日本生体医工学会のシンポジウムで招待講演をした。さらに独立行政法人科学技術振興機構の「シーズ育成試験」の助成を受けて行われた。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、治療機器の開発を目指している。

また鈴木は、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）。この海洋細菌は重金属に耐性があり、フェノールと重金属を共に含む汚染水の浄化技術の開発を行い、国内特許を申請した。これらの成果は、国際誌（*Int. Biodeterior. Biodegradation*, in press）に出版の予定である。今後これらの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) 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)
- (2) 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)
- (3) Numoto, N., Nakagawa, T., Kita, A., Sasayama, Y., Fukumori, Y. and Miki, K.: Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of extracellular giant hemoglobin from pogonophoran *Oligobranchia mashikoi*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1750: 173-176 (2005)
- (4) Numoto, N., Nakagawa, T., Kita, A., Sasayama, Y., Fukumori, Y. and Miki, K.: Structure of an extracellular giant hemoglobin of the gutless beard worm *Oligobranchia mashikoi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:14521-14526 (2005)
- (5) 北村敬一郎, 鈴木信雄, 瀬川泰子, 服部淳彦, 根本 鉄, 清水宣明, 和田重人, 近藤 隆: 骨粗鬆症予防に関する基礎的検討: 低強度超音波刺激によるキンギョのウロコの骨芽細胞及び破骨細胞活性への影響. 第20回生体・生理工学シンポジウム論文集, 209-212 (2005)
- (6) 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.*, 78: 2533-2541 (2006)
- (7) Mita, M., Deguchi, M. and Sasayama, Y.: Lipid composition of the trophosome in the beard worm, *Oligobranchia mashikoi* (Pogonophora). *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.*, 86: 283-286 (2006)
- (8) Kobayashi, F., Daidai, M., Suzuki, N. and Nakamura, Y.: Degradation of phenol in seawater using novel microorganism isolated from the intestine of *Aplysia kurodai*. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, in press
- (9) Wada, S., Tazawa T., Suzuki, N., Furuta, I. and Nagano, I.: Pulp ablation therapy by inductive heating: Heat generation characteristics in the pulp cavity. *Oral Dis.*, in press
- (10) Somei, M., Iwaki, T., Yamada, F., Tanaka, Y., Shigenobu, K., Koike, K., Suzuki, N. and Hattori, A.: The ideal synthetic method aimed at the leads for an α_2 -blocker, an inhibitor of blood platelet aggregation, and an anti-osteoporosis agent. *Heterocycles*, in press

2) 総説

- (1) 鈴木信雄: 魚類のカルシトニンの特徴. *Clinical Calcium*, 15: 459-466 (2005)
- (2) 服部淳彦, 鈴木信雄, 染井正徳: メラトニンUp to Date—骨とメラトニン. *日本抗加齢医学会雑誌*, 2: 78-86 (2006)
- (3) 鈴木信雄, 田畑純, 和田重人, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた新しい骨モデル系の開発と歯科医療への応用. *Dental Diamond*, 印刷中

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, 服部淳彦: 酢酸トリブチルスズはカルシウム代謝を攪乱する. 平成17年度日本水産学会大会, 東京 (2005, 4)
- (2) 鈴木信雄, 柿川真紀子, 橋本松進, 山田外史, 北村敬一郎, 服部淳彦, 岩坂正和, 上野照剛: 磁界と骨代謝に関する研究: 魚のウロコを用いたモデル系による解析. 日本生体医工学第44回大会, シンポジウム: 電磁場環境と生体影響に関する最近の動向, つくば (2005, 4) (招待講演)
- (3) Suzuki, N.: Physiological role of calcitonin in cartilaginous fish and cyclostomes. The 5th International Satellite Symposium on the Comparative Endocrinology of Calcium Regulation. Second Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society, Switzerland, (2005, 6), Bone 36: S467-S468 (2005) (招待講演)
- (4) Suzuki, N., Yashima, S., Iwamuro, S. and Hattori, A.: Physiological role of melatonin in the scale of teleost. Second Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society, Switzerland, (2005, 6), Bone 36: S302 (2005)
- (5) 鈴木信雄, 坂本竜哉, 池亀美華, 山本敏男, 高橋明義, 森山俊介, 川内浩司, 服部淳彦: プロラクチンはキンギョのウロコに存在する破骨細胞の活性を抑制する. 第76回日本動物学会, つくば (2005, 9), Zool. Sci., 22: 1498 (2005)
- (6) 八島さやか, 岩室祥一, 鈴木信雄, 服部淳彦: 繁殖期の雌キンギョにおけるウロコ内メラトニン濃度とその動き. 第76回日本動物学会, つくば (2005, 9), Zool. Sci., 22: 1498-1499 (2005)
- (7) 小林雅樹, 東恭一, 鈴木信雄, 服部淳彦, 中村正久: キンギョの破骨細胞マーカー, TRAP, カテプシンKのcDNAクローニング. 第76回日本動物学会, つくば (2005, 9), Zool. Sci., 22: 1499 (2005)
- (8) 東恭一, 服部淳彦, 鈴木信雄, 中村正久: 魚類破骨細胞の分化・活性化に関わるTimp-2遺伝子の発現調節. 第76回日本動物学会, つくば (2005, 9), Zool. Sci., 22: 1499 (2005)
- (9) 西村明紘, 菊山榮, 鈴木信雄, 原正幸, 服部淳彦: キンギョのウロコにおける破骨細胞の誘導及び多核化過程で発現する特異的遺伝子の解析. 第76回日本動物学会, つくば (2005, 9), Zool. Sci., 22: 1499 (2005)
- (10) 出口真理子, 久保田憲宏, 松野あきら, 金森正明, 福森義宏, 笹山雄一: 有鬚動物マシコヒゲムシにおけるバクテリオサイト (BC) の視覚化. 第76回日本動物学会, つくば (2005, 9), Zool. Sci., 22: 1432-1433 (2005)

- (11)角明子, 笹山雄一: 有鬚動物と環形動物の脳に分布するカルシトニン免疫陽性細胞. 第76回日本動物学会, つくば (2005, 9), Zool. Sci., 22: 1433 (2005)
- (12)山田哲也, 笹山雄一, 松野あきら, 福森義宏, 金森正明: 有鬚動物マシコヒゲムシの宿主細胞と共生細菌とのクロストーク: 細胞構造学的観察. 第76回日本動物学会, つくば (2005, 9), Zool. Sci., 22: 1444 (2005)
- (13)砂田聡, 鈴木信雄, 柿川真紀子, 橋本松進, 山田外史, 北村敬一郎, 服部淳彦, 岩坂正和, 上野照剛: 破骨・骨芽細胞の活性における交流磁界効果. 平成17年度電気関係学会北陸支部連合大会, 石川 (2005, 9)
- (14)鈴木信雄, 北村敬一郎, 瀬川泰子, 根本鉄, 清水宣明, 和田重人, 近藤隆, 井尻憲一, 服部淳彦: メカニカルストレスの骨芽・破骨細胞に対する作用: ウロコを骨のモデルとした解析. 第30回日本比較内分泌学会, 熊本 (2005,11), Proc. Japan Soc. Comp. Endocrinol., 20:28 (2005)
- (15)勝又敏行, 岡崎三代, 鈴木信雄, 服部淳彦: キンギョのウロコにおけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの解析. 第30回日本比較内分泌学会, 熊本 (2005,11), Proc. Japan Soc. Comp. Endocrinol., 20:29 (2005)
- (16)杉浦領, 東恭一, 小林雅樹, 中村正久, 鈴木信雄, 服部淳彦. キンギョの破骨細胞に対するメラトニンの作用: 破骨細胞誘導系を用いた解析. 第30回日本比較内分泌学会, 熊本 (2005,11), Proc. Japan Soc. Comp. Endocrinol., 20:30 (2005)
- (17)八島さやか, 岩室祥一, 鈴木信雄, 服部淳彦: 卵黄形成期にキンギョのウロコで合成されるメラトニンとその役割. 第30回日本比較内分泌学会, 熊本 (2005,11), Proc. Japan Soc. Comp. Endocrinol., 20:31 (2005)
- (18)鈴木信雄, 服部淳彦: トリブチルスズはカルシウム代謝を攪乱する. 第5回カルシトニン/副甲状腺ホルモン研究会, 東京 (2005, 12), 「第5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, p35
- (19)鈴木信雄, 染井正徳, 関あづさ, 服部淳彦: 新規メラトニン誘導体の破骨細胞及び骨芽細胞に対する作用. 第126回日本薬学会, 仙台 (2006, 3)
- (20)染井正徳, 山田文夫, 岩木貴子, 服部淳彦, 鈴木信雄, 重信弘毅, 田中芳夫: 独自の合成哲学に基づく創薬研究: 有望な対骨粗鬆症, α_2 -ブロッカー等の知的財産の創造. 第126回日本薬学会, 仙台 (2006, 3)
- (21)照内友也, 杉山稔恵, 八木敬広, 鈴木信雄, 楠原征治: 鶏カルシトニン受容体遺伝子の解析と発現. 第106回日本畜産学会, 福岡 (2006, 3)

2) 受賞

- (1) 鈴木信雄: 財団法人 中部電力基礎技術研究所研究助成 (90万円), 魚のウロコを用いた磁場による新規骨疾患治療システムの研究開発 (2006, 3)

【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，東京学芸大学教授 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 都木靖章氏，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：交流磁場の骨代謝に及ぼす影響，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組織に対する作用，東京大学 アイソトープ総合センター
助教授 井尻憲一氏
- (21)鈴木信雄：歯の石灰化に関する研究，高知学園短期大学教授 三島弘幸氏
- (22)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 研究員 廣田憲之氏，同研究センター 特別研究員 木村史子氏

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スクール運営委員会委員，2004-現在
- (5) 笹山雄一：石川県公共事業評価監視委員会委員，本年より

学会活動

- (1) 笹山雄一：日本動物学会中部支部長，2005-現在
- (2) 鈴木信雄：日本動物学会中部支部地区委員，2005-現在

【研究費】

1) 受託研究費

- (1) 鈴木信雄（代表），（財）日本宇宙フォーラム，2,432千円，
微小重力に対する骨芽及び破骨細胞の影響：魚類のウロコを用いた解析。
- (2) 鈴木信雄（代表），独立行政法人 科学技術振興機構 平成17年度「シーズ育成試験」，
2,000千円，磁場による骨疾患治療システムの研究開発。
- (3) 鈴木信雄（分担）（代表：染井正徳、金沢大学大学院自然科学研究科薬学系・教授），
独立行政法人 科学技術振興機構 平成17年度「シーズ育成試験」，
2,000千円，新規骨粗鬆症治療薬の卵巣摘出マウスモデルでの効果判定試験。

2) 奨学寄付金

- (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。

3) その他

- (1) 鈴木信雄（代表），学長戦略経費（重点研究経費）若手の萌芽的研究，495千円，
超音波による骨治療システムの研究開発。

【利用状況】

1) 利用者及び研究目的

- 4 / 16 ~ 4 / 17 金沢大学自然科学研究科
福森 義宏 教授 他 23名
「マシコヒゲムシの採集と小実験」
- 4 / 26 ~ 4 / 27 金沢大学自然科学研究科
博士後期課程1年
會田 将人 他 2名
「九十九湾の海底土壌の採集」
- 6 / 1 千葉大学大学院自然科学研究科
仲岡 雅裕 助教授 他 4名
「九十九湾周辺のアマモ場の調査」
- 6 / 17 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
- 6 / 23 ~ 6 / 24 金沢大学低レベル放射能実験施設
21世紀COE研究員
村田 祥全 他 1名
「海水試料の採取」
- 7 / 19 ~ 7 / 20 金沢大学自然科学研究科
博士前期課程2年
田中 英里子
「淡水生貝形虫の調査」
- 7 / 27 ~ 7 / 29 三重大学教育学部
後藤 太郎 助教授 他 2名
「イソヤムシの採集」

- 8 / 23 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」
- 9 / 13 のと海洋ふれあいセンター
達 克幸 主任技師
「海洋生物の調査」
- 9 / 26～9 / 30 金沢大学自然科学研究科
博士後期課程1年
會田 将人 他1名
「能登北部地域におけるスナヤツメの生息調査」
- 10 / 12 のと海洋ふれあいセンター
福島 広行 主任技師
「海洋生物の採集」
- 11 / 15 のと海洋ふれあいセンター
横井 将大 主事
「海洋生物の調査」
- 12 / 14 のと海洋ふれあいセンター
達 克幸 主任技師
「海洋生物の採集」
- 1 / 12 のと海洋ふれあいセンター
福島 広行 主任技師
「海洋生物の調査」
- 2 / 15 のと海洋ふれあいセンター
横井 将大 主事
「海洋生物の採集」

- 2 / 28 ~ 3 / 1 金沢大学自然計測応用研究センター
小林 史尚 助手 他4名
「バイオエアロゾルに関する研究打ち合わせ」
- 3 / 24 ~ 3 / 26 北海道大学大学院理学研究科
鈴木 範男 教授
「研究打ち合わせ」
- 3 / 27 ~ 3 / 29 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」
- 2) 臨海実習等
- 7 / 5 ~ 7 / 7 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及び磯の生物調査」
- 8 / 21 ~ 8 / 27 公開臨海実習
静岡大学 北川 大地 他9名
- 8 / 29 ~ 9 / 3 富山大学理学部生物学科
小松 美英子 教授 他33名
「臨海実習」
- 11 / 25 ~ 11 / 27 金沢大学理学部生物学科
中村 浩二 教授 他10名
「臨海実習」

3) 利用者数及び船舶の使用状況

平成17年度臨海実験施設利用者数（延べ人数801人の内訳）

(月)	研究者		学生	
	学内	学外	学内	学外
4	6	0	50	0
5	0	0	1	0
6	4	5	16	40
7	0	18	2	126
8	0	6	144	166
9	0	7	10	96
10	0	0	0	0
11	8	2	44	18
12	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	5	0	0	0
3	5	8	0	14
合計	28	46	267	460

平成17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	2
5	4	3
6	5	4
7	3	4
8	3	5
9	4	3
10	4	2
11	4	4
12	1	6
1	4	4
2	2	2
3	6	2
合計	44	41

研 究 報 告

- * 超音波によるメカニカルストレスの骨芽及び破骨細胞に対する影響
鈴木信雄 (p 14-15)
- * 有鬚動物マシコヒゲムシの栄養体における抗アポトーシス関連酵素抗体による免疫組織学的研究
角 明子 (p 16)
- * 能登半島九十九湾において有鬚動物マシコヒゲムシが生息する土壤中の硫化水素濃度
岡田アキ (p 17)
- * 有鬚動物マシコヒゲムシのバクテリオサイトにおける共生細菌の分布と細胞骨格との関係
山田哲也 (p 18)
- * 有鬚動物マシコヒゲムシのcDNAライブラリーの作製とその配列解析
榎本 洸 (p 19)
- * **A morphometrical study of the intersex of Thai medaka, *Oryzias minutillus*, inhabiting suburbs of Bangkok, Thailand and its histological view of the gonads**
Arin Ngamniyom (p 20)
- * 有鬚動物門マシコヒゲムシの栄養体の形態生理学的研究
出口真理子 (p 21)
- * 16S rDNA解析による新規海洋細菌の同定 (p 22-23)
小林史尚, 鈴木信雄, 中村嘉利

超音波によるメカニカルストレスの骨芽及び破骨細胞に対する影響

鈴木信雄

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

Nobuo Suzuki: Effect of mechanical stress by ultra-sound stimulation on osteoblasts and osteoclasts

骨組織には骨を作る細胞（骨芽細胞）と骨を壊す細胞（破骨細胞）があり、骨形成を調節している。骨芽細胞の培養は容易であるが、破骨細胞を培養することは難しく、コラーゲン等の骨基質タンパク質も共存させて培養するシステムは未だ開発されていない。さらに物理的な刺激には、骨基質が重要な役割を担っており、このことが*in vitro*（試験管内）での細胞培養の開発を困難にしている。最近超音波が骨形成を促進させることがわかってきたが、骨芽細胞・破骨細胞・骨基質を共存させたモデルシステムが欠如しているため、超音波の骨に対する作用を正確に評価できていない。そこで本研究では、骨芽細胞・破骨細胞・骨基質が共存した魚のウロコの培養システム（*in vitro*）を用い、骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析した。さらに、ホルモンやホルモン受容体の遺伝子発現も調べた。

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：超音波の条件設定

本研究では、市販の超音波治療器（UX-301: Celcom Inc.）の振動子の上にシャーレを置き、その中に培地（4ml）を入れ、培地の中にキンギョ（メス、体重30-40g）のウロコを入れて超音波を照射した。その後、15°Cで18時間培養し、ホルマリンで固定し、ウロコの細胞の活性をSuzuki and Hattori (2002)の方法に従って測定した。本研究では、まず骨芽細胞の活性（アルカリフォスファターゼ活性：ALP活性）を指標に1) 超音波の強度、2) 超音波の刺激頻度、3) 温度上昇の影響を評価した。

実験2：超音波の骨組織に対する作用（細胞活性及び遺伝子発現の解析）

実験1で決定した条件で、骨芽細胞と破骨細胞に対する影響をこれらのマーカーであるALP及び酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性を指標に評価した。さらにそのウロコからmRNAを抽出し、骨芽細胞の増殖・分化に関与するホルモン（insulin-like growth factor-I: IGF-I）やホルモン受容体（estrogen receptor: ER）の発現をRT-PCRで調べた。

実験3：骨代謝亢進ウロコによる解析

右側のウロコを取ると、左側のウロコの骨吸収・骨修復が進行し、骨芽及び破骨細胞の活性が上昇し、3日経過した時が最も高いことを見出した。そこでキンギョの右側のウロコを取り、3日後の左側のウロコを用いて、骨芽及び破骨細胞に対する超音波の影響を解析した。

1MHzで40、60、165及び275mW/cm²I_{SATA}の強度の超音波を照射した結果、40及び165mW/cm²I_{SATA}ではコントロールとの間に有意差は認められなかった。しかしながら、60mW/cm²I_{SATA}の強度の時にALP活性が有意に上昇し、275mW/cm²I_{SATA}の強度では逆に低下した。したがって、骨芽細胞の活性を上昇させる超音波の強度は、60mW/cm²I_{SATA}が最適であることがわかった。

次に、超音波の刺激頻度に対する影響を調べた。1MHzで60mW/cm²I_{SATA}の強度の超音波を1秒間照射し、その後1秒間照射しないというサイクルを1回とし、60、120、180、300及び600回照射した。その結果、180回行った時に骨芽細胞の活性がプラトーに達し、その後回数を増やしても変化がなかった。したがって、超音波の刺激頻度は180パルスとした。

さらに、超音波照射による温度上昇の影響についても調べた。1MHzで60mW/cm²I_{SATA}の強度の超

音波を 180 パルス照射し、培地の温度変化を調べた。その結果、温度は 3℃しか上昇せず、コントロールは室温より 3℃高い温度で培養することにした。

実験 1 で検討した条件（超音波の強度：60mW/cm²I_{SATA}；超音波の刺激頻度：180パルス；コントロールは室温より3℃高い温度で培養）で骨芽及び破骨細胞の変化を調べた。その結果、骨芽細胞の活性は有意に上昇したが、破骨細胞の活性は変化しなかった。

超音波照射により骨芽細胞の活性が上昇したので、骨芽細胞で特異的に発現しているマーカー遺伝子であるIGF-IとERの遺伝子発現をRT-PCRにより調べた。ERのmRNAレベルは、超音波刺激後、培養3時間では変化しなかったが、18時間では有意に増加した。IGF-IのmRNAレベルは、3時間培養で有意に増加し、18時間培養では有意に変化しなかった。したがって、超音波刺激によりIGF-IのmRNA発現は、ERのmRNA発現よりも早期に起こり、骨芽細胞を活性化していることが示された。

一方、片側のウロコを除去すると、残りのウロコ（ontogenic scale）の骨芽細胞及び破骨細胞の活性が上昇し、3日経過した時が最も高いことを最近見出した。そこでそのウロコ（骨代謝亢進ウロコ）を用いて、超音波刺激による骨芽及び破骨細胞活性への影響を解析した。その結果、15℃で18時間培養後、骨代謝亢進ウロコの骨芽細胞の活性は4個体中3個体において有意に増加し、破骨細胞の活性は4個体すべてにおいて有意に低下した（Figure 1）。

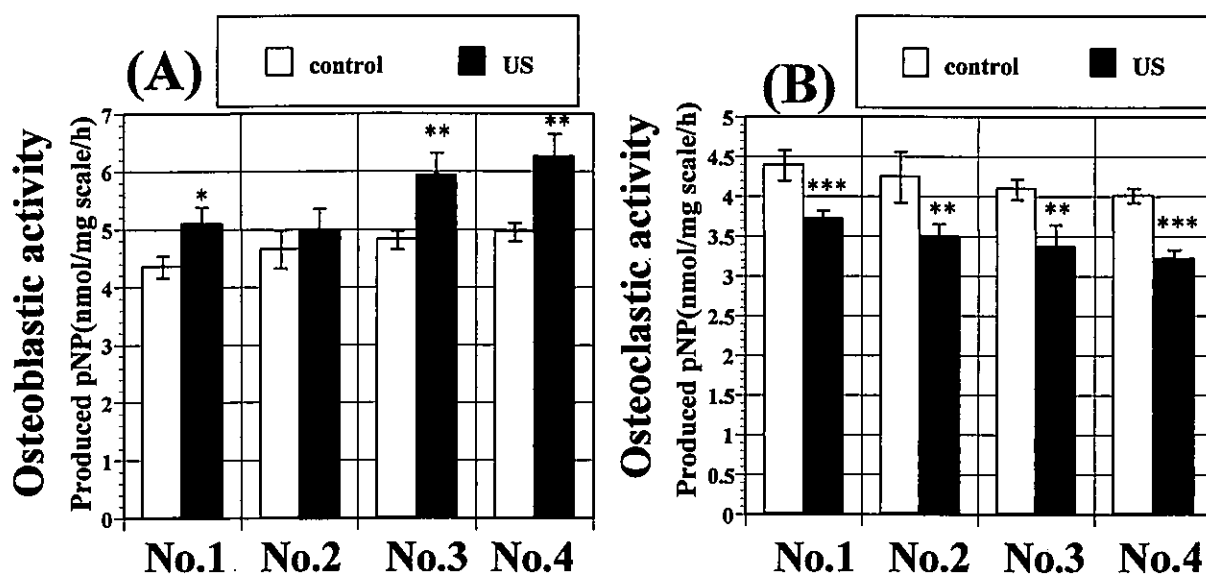


Figure1. Changes in osteoblastic (A) and osteoclastic (B) activities by ultra-sound (US) stimulation using the ontogenic scales in the left side at 3 days after removal of scales in the right side.

Values are the means± SEM (N=8). *,**,*** indicate statistically significant differences from the control scales at P<0.05, P<0.01 and P<0.001, respectively.

超音波による刺激（メカニカルストレス）により骨芽細胞活性は上昇することが判明した。さらに骨代謝亢進ウロコにおいて、骨芽細胞活性は上昇し、破骨細胞活性は低下した。骨代謝亢進ウロコは、骨粗鬆症とよく似た状況を作り出しており、本研究の成果はその治療に貢献できると思われる。

謝辞

本研究は、（財）日本宇宙フォーラム及び平成17年度学長戦略経費の援助により行われた。

有鬚動物マシコヒゲムシの栄養体における抗アポトーシス関連酵素抗体による 免疫組織学的研究

角 明子

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

Akiko Sumi: Immunohistological study using antibodies against apoptosis-related enzymes in the trophosome of the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Pogonophora)

マシコヒゲムシは口も消化管も無いが、体の後部に栄養体と呼ばれる器官を発達させ、そのバクテリオサイトという特殊な細胞に化学合成細菌を共生させて、それが作る有機物で、あるいは直接、細菌を細胞内消化することによって生きている。このバクテリオサイトは、発生の過程から消化管上皮細胞に由来することがわかっている。高等動物において消化管上皮は、典型的な細胞再生系に属し、常にアポトーシスによって細胞を新たにして消化管機能を保っている。しかしながら、消化管を退化させ、その機能を失った栄養体において、アポトーシスは発現しているか、発現しているとすればその生理的意義は何であるか興味深い。本研究においては、免疫組織学的手法を用いてその解明の為の手がかりを得ることに努めた。

これまで線虫からヒトまでアポトーシス系で働く酵素は極めて保存性が高いことが知られている。本研究では細胞のプログラム死を進行させるヒト由来のカスパーゼ3（不活性型）に対する抗体と、カスパーゼ3を活性化させるための上位の酵素に結合して細胞死を抑制するヒト由来のBcl-2蛋白に対する抗体を用いた。本研究では、マシコヒゲムシの栄養体のみでなく、ヒゲムシに近縁のミミズやゴカイの消化管や、同じく細胞再生系に属する皮膚にも免疫染色を施した。また対照としてラット等の消化管にも染色を施した。

栄養体においてバクテリオサイトは脂肪貯蔵細胞と共に、細胞索を形成していたが、カスパーゼ3に対する抗体でも、Bcl-2に対する抗体でも、ほとんど全てのバクテリオサイトが陽性の反応を示すように見えた。細胞質の反応に強弱は認められず、一様に染色された。栄養貯蔵細胞には、まったく反応が見られなかった。ヒゲムシの皮膚において表皮細胞は頂端部と基底部が染色された。ミミズの消化管上皮細胞において、アポトーシスが起る典型的な位置に陽性反応が見られた。皮膚も陽性であった。Bcl-2に対する抗体では、ミミズの消化管とゴカイの皮膚も陽性であった。ラットとハムスターの消化管は、Bcl-2に対してのみ反応が見られた。カスパーゼ抗体では反応が見られなかった。発現量が少なかったのかもしれない。

もし、ヒゲムシにおける結果が正しいならば、消化管上皮に由来するバクテリオサイトは、おそらく消化管を持っていた祖先におけると同じくアポトーシスの進行を促す酵素を発現させるが、栄養体になった現在では、同時に抑制する蛋白も発現させて、バランスをとっているのかもしれない。あるいはバクテリオサイトにおいても、やはりアポトーシスが発現し、この現象は消化管の維持におけると同じく、栄養体の維持に機能している可能性もある。ヒゲムシは、消化管におけるアポトーシスと消化管の細菌感染というどちらもありふれた現象を利用して、他の動物ではまったくみられないユニークな生き方を創造したのかもしれない。

(本研究は、金沢大学理学部生物学科 角 明子君の卒業論文の一環として行われた)

能登半島九十九湾において有鬚動物マシコヒゲムシが生息する土壌中の硫化水素濃度

岡田アキ

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

Aki Okada: Hydrogen sulfide concentration of the soil in which the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Pogonophora), inhabits in the Tsukumo Bay of Noto Peninsula

有鬚動物門のヒゲムシ類は、消化管の代わりに栄養体を発達させて化学合成細菌を共生させ、それが作る有機物で生きている。この細菌はイオウを酸化してエネルギーを得る。イオウは海底火山の噴出孔から硫化水素の形で供給されるか、あるいはクジラなどの大型動物の屍骸の分解により供給される。能登半島九十九湾は、深さ25mの浅い海で、リアス式海岸として発達している。ここにマシコヒゲムシ (*Oligobrachia mashikoi*) が棲息する。しかしながら、海底には火山の噴出口は無く、大型の動物の屍骸も無い。それにもかかわらず、本種が棲息する海底の土壌はかすかに硫化水素の臭いがする。したがって、本研究においては、まず九十九湾海底の泥中の水平方向と垂直方向の硫化水素濃度を調べた。

泥は九十九湾のヒゲムシの棲息場所と棲息しない場所を併せて8点を設定し、また他の2点を加えて3点については表面から深さ40cmまでを5cmおきにコアサンプラーにより採取した。泥中の硫化水素はガス検知管法 (ガステック社) によりその濃度を測定した。その結果、どの場所からも硫化水素が検出されたが、その濃度は湾奥の、水が滞留しやすい場所で最も高く、ヒゲムシが生息する湾中央に向かってやや下がる傾向があり、湾口において最も低かった。また、垂直的には、表面が最も高く、深くなるにつれてその濃度は低くなった。このことは、硫化水素は、海底表面において有機物の分解により生じることを示唆している。次に、その仮説をより確かなものにする為に、採泥した8点と同じ場所の全窒素濃度を調べた。また垂直方向の濃度にも検討を加えた。その結果、全窒素濃度は、少なくとも垂直方向に関しては硫化水素濃度の分布の変化とだいたい一致した。

九十九湾には、周囲から大小併せて複数の川が流れ込んでおり、陸から有機物が運ばれる。また湾に覆い被さるように生育している草木から秋には大量の枯葉が海に落ち、腐食する。海底には硫酸塩還元菌が普遍的にいるので、有機物に由来する硫酸イオンを用いて硫酸塩呼吸を行い、その結果、電子受容体であるイオウが還元されて硫化水素が生成されると考えられる。しかしながら、本研究の結果、ヒゲムシは硫化水素の濃度が高ければ高い方を好むという結果にはならなかった。硫化水素は、共生細菌には必要欠くべからずものではあるが、宿主のヒゲムシにとっては猛毒であり、その兼ね合いが、生息域を決定しているのかもしれない。また、水深などの他の要因も考慮する必要がある。さらに、九十九湾は過去には山岳地帯であり、水深もかなり変化してきた。したがって、地誌的变化も考えに入れる必要がある。

ヒゲムシの共生細菌は体の後半部にある栄養体に存在する。ヒゲムシは海底にはヒゲしか出していない。もしできるだけ硫化水素を効率的に吸収したいのなら、栄養体は体において、できるだけヒゲに近い部位になければならず、説明が困難である。しかしながら、ヒゲの付け根には極めて発達した心臓があり、それが体の後方に大きな血管を走らせており、硫化水素はこの血流によって運ばれると考えると理解しやすい。

(本研究は、金沢大学理学部生物学科 岡田アキ君の卒業論文の一環として行われた)

有鬚動物マシコヒゲムシのバクテリオサイトにおける共生細菌の分布と細胞骨格との関係

山田哲也

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

Tetsuya Yamada: Distributions of symbiotic bacteria and their relationship with the cytoskeleton in the bacteriocytes of the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Pogonophora)

ヒゲムシの栄養体は、化学合成細菌を共生させているバクテリオサイトと呼ばれる細胞と、その細菌がつくる有機物を蓄積させる、あるいはその細菌を細胞内消化した時に生じる有機物を蓄積させる栄養貯蔵細胞より成る。これまで栄養体の形態・生理学的側面を研究している過程で、光学顕微鏡を用いて観察していたところ、バクテリオサイトの細胞質において、リソゾームの分布に偏りがあることに気がついた。また、透過型電子顕微鏡写真で栄養体を観察すると、共生細菌についても細胞質内で偏りがあることが明らかになった。但し、栄養貯蔵細胞と接している側に細菌が多く、接していない側にリソゾームが分布する傾向があるとわかった。しかしながら、電子顕微鏡で観察される範囲は極めて狭いので、この傾向を一般化できるか否か不明であった。一方、光学顕微鏡は、大きな範囲を観察できるが、共生細菌は小さいので、通常の方法では細菌を見ることはできなかった。

そこでバクテリオサイトにおいて、リソゾームや細菌の分布に偏りがあるのは、生理学的に意味があるのではないかと考えた。これまで細胞内小器官の動的分布は、細胞骨格と密接な関係があることが示唆されている。したがって、本研究においては、蛍光顕微鏡を用いて、細胞骨格要素を染色し、細菌の分布と何らかの関係があるか否かを調べた。

まず、バクテリオサイトの細胞質において細菌の位置を明確に捉えるために、DNAのアデニンとチミンに特異的に結合して蛍光を発するDAPI染色 (KPL社) を行った。細胞骨格要素の微小管を構成するチューブリンは、一次抗体 (ラットモノクローナル抗体、Abcam社) に対する二次抗体に蛍光色素であるAlexa Fluor488 (Molecular Probe社) を標識した二次抗体を用いて検出した。アクチンフィラメントは、これに特異的に結合するRhodamin Phalloidin (Cytoskeleton社) を用いて蛍光染色を行った。

その結果、共生細菌はDAPI染色により明瞭に染め出すことができた。微小管は緑の蛍光の繊維として観察された。細菌はその繊維に沿って認められる場合とまったく関係がない部分に見出される場合もあった。共焦点レーザー顕微鏡を用い、微小管との関係を精査すると、細菌の53%に微小管との関連性を見出せなかったが、47%が微小管に近接しているとわかった。また細菌自体はperibacterial membraneと呼ばれる小胞に入っているため、微小管に沿っている場合は、これが微小管に接しているのかもしれない。一方、アクチンフィラメントは赤い繊維として染め出されたが、ヒゲムシにおいては、体壁の筋肉層のみが染色された。

以上の結果を併せて考えると、栄養貯蔵細胞が隣接するときは、やはり微小管などの細胞骨格によって細菌の分布は偏るように規制されると考えるのが、妥当と思われる。今後は、組織の中のバクテリオサイトを観察するのではなく、生体より分離して培養し、より細部にわたって詳細に観察することを目指したい。

(本研究は、金沢大学理学部生物学科 山田哲也君の卒業論文の一環として行われた)

有鬚動物マシコヒゲムシのcDNAライブラリーの作製とその配列解析

榎本 洸

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

Hiroshi Enomoto: Construction of the cDNA library from the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Pogonophora) and its sequence analysis

ヒゲムシは、口も消化管も肛門も退化しており、共生細菌によってエネルギーを得ている。また、元来が深海の低温で高圧に棲む動物のため、通常の細胞膜成分では、その流動性は失われる。しかしながら、ヒゲムシは脂質代謝系を不飽和脂肪酸が多く産生されるように変化させ、細胞膜の流動性を確保している。また光に対して鈍感である。これらの事実は、この動物の消化器系・生理代謝系・光受容系には、かなりの変形が起きていることを示唆している。一方、共生細菌はイオウを酸化してエネルギーを得るため、硫化水素を要求する。しかしながら、硫化水素は宿主にとって猛毒であるため、硫化水素を結合させて無毒化し、しかも酸素も当然、結合させることができる特殊なヘモグロビンを作り出している。ヒゲムシは、環形動物のゴカイに似た動物を先祖に持つと言われており、最近の分子生物学的証拠も、この説を支持している。しかしながら、ヒゲムシは過去より現在までの進化の間に、退化と特殊化の過程を経て、通常の高産無脊椎動物とはかなり異なった生理をつくり出したと考えられる。

本研究においては、マシコヒゲムシの生理の基礎となる発現蛋白にどのような特徴が認められるかを調べる基礎として、cDNAライブラリーを作製し、得られた塩基配列をBLASTにより検索した。ヒゲムシは、共生細菌が存在する栄養体部分と存在しない非栄養体部分に分けて、別々にmRNAの発現を調べた。まずtotal RNAを抽出しoligo dTをプライマーにして逆転写してcDNAとした。それにNotI/EcoRIアダプターを結合させて、pUC19プラスミドに組み込んだ。それを大腸菌に感染させ、形質転換した大腸菌をX-galにより選別した。pUC19の2ヶ所の塩基配列から2種のプライマーを作製し増幅させて、シーケンスした。その結果、栄養体部分からは現在までに約300クローンを読むことができた。そのうち最も発現が多かったのは、ヘモグロビンサブユニットであり、その数は約80クローンにも上がった。これは栄養体ではmRNAの約25%はヘモグロビンmRNAであることを示しており、ヒゲムシにおいてヘモグロビンが生命の維持にいかにか重要かが明らかである。18Sや28SなどのリボソームRNAの配列も20クローン以上見つかったが、これは本来の発現量が極めて多いためであろう。今後、精査を要するが、原始的な紐状の軟体動物であるカセミミズの28S rRNAに相同性の高いrRNAや、原索動物のナメクジウオのリボソーム蛋白をコードする配列と相同性が高い配列も知られた。これらの結果は、ヒゲムシの祖先が環形動物であり、環形動物は軟体動物と類縁性があること、またヒゲムシは、一時、脊索動物と関係があると思われたこと等、ヒゲムシの系統学的位置を考えると興味深い。またミトコンドリアにあるチトクロームCオキシダーゼのサブユニットも多く存在した。この理由は、現在、不明である。一方、非栄養体の部分を約80クローン読んだ時点では、ヘモグロビンのサブユニットは見つからず、28S rRNA が多く認められた。この結果は、ヘモグロビンの産生部位がどこにあるかを示唆しているのかもしれない。また、非栄養体部分には生殖巣など、重要な器官があり、今後の解析が待たれる。

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

**A morphometrical study of the intersex of Thai medaka, *Oryzias minutillus*,
inhabiting suburbs of Bangkok, Thailand and its histological view of the gonads**

Arin Ngamniyom

Noto Marine Laboratory, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, Ogi, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, Japan

Thai medaka, *Oryzias minutillus*, were collected from 10 localities in the suburbs of Bangkok, Thailand. Sex ratios (male to female) were normal almost 1:1 in localities 1, 2, 4, 5, 7 and 9. Those ratios were 1:1.3, 1:1.4, 1:1.3, 1:1.1, 1.3:1 and 1.1:1, in order. In contrast, in localities 3, 6, 8, and 10, sex ratios were unbalanced. Those ratios were 1:2.9, 1:3.4, 1:3.0 and 1:2.8, respectively. Furthermore, in those populations, many intersexes were found. The percentages of the intersexes occupied in each population were 15.6, 21.4, 16.7 and 17.9, respectively. In the secondary sex characters of the intersexes, the values (%) of dorsal fin height (HD) divided by standard length (SL), and anal fin height (HA) divided by SL were there between the values of normal males and females. Testes of the intersexes appeared to be undeveloped. In ovaries, number of mature oocytes was smaller in the intersexes than that in normal females. Aromatase is an enzyme to accelerate the production of estrogen in females. The aromatase immunoreactivity was detected in both ovaries of normal females and intersexes. In total meaning, however, the expression of aromatase may be poor in the intersexes, because mature oocytes are poor in the number. In both testes of normal males and intersexes, aromatase activity was not detected. DDT in the sediment of the ponds in which the percentages of intersex were high was detected in localities 3 and 6 (0.2 ppm, each). The pH values of the water were relatively low in those ponds. Taking these results into considerations, it was suggested that in the intersexes, secondary sex characters and developing gonads might be affected by agricultural chemicals.

(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 Arin Ngamniyom君の修士論文の一環として行われた)

有鬚動物門マシコヒゲムシの栄養体の形態生理学的研究

出口真理子

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

Mariko Deguchi: Morpho-physiological study of the trophosome in the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Pogonophora)

有鬚動物門マシコヒゲムシ (*Oligobrachia mashikoi*) の栄養体には、共生細菌を細胞質に持つバクテリオサイトと呼ばれる細胞が存在する。宿主が生きるためには、また共生細菌が分裂・増殖するためには、このバクテリオサイトが栄養体の中で、実際にどのような三次元的配置になっているのかは、極めて重要な問題である。本研究においては、研究Iとして、これを明らかにすべく、一般染色による光学顕微鏡観察、電子顕微鏡による観察に加えて、共生細菌の16S rDNAの塩基配列に基づいてRNAプローブを作製し、ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

その結果、一般染色で顆粒をもった細胞と空胞をもった細胞が細胞索をつくり、腹側血管の両側から背側血管の両側へと互いに絡み合っている像が目撃された。電子顕微鏡による観察では、その顆粒はバクテリオサイトのリソゾームであり、空胞は栄養貯蔵細胞の脂肪滴の痕跡であることが確認された。*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、バクテリオサイトの細胞群は不規則な葉状を呈し、腹側血管の両側から背側血管の両側に伸長していることが明らかになった。この形態は以下の理由で物質の交換に有利であると推察された。栄養体は中心部に内腔液が詰まった内腔をもち、その周囲にはバクテリオサイトと栄養貯蔵細胞が存在し、栄養体には背側血管と腹側血管に血液が流れ、さらに栄養体は体腔液が入った体腔の中にある。虫体が伸縮を繰り返すと、バクテリオサイト周囲には、液体成分が流れ、その複雑な形態とあいまって、表面積が増大し、物質の交換はスムーズに進行すると思われる。

一方、栄養体には、中性脂肪が大量に蓄積されており、それがヒトで言えば高脂血症に相当するほど血流に出てくること、また毛細血管が発達していることから、ヒゲムシでは血栓ができやすいのではないかと推察されるが、実際にそのような現象は認められない。これらの事実は、本種には特異な血栓溶解酵素があることを示唆している。したがって、本研究においては、研究IIとして、それをコードする塩基配列をPCRにより増幅することを試みた。

ヒゲムシと系統学的に近いとされているミミズでは、これまで13種の血栓溶解酵素が同定され、それらのN末端のアミノ酸の配列が明らかにされている。その一部の酵素では、全長にわたってcDNAがとられている。従って、まずN末端アミノ酸の配列から11種類の5'-プライマーを設計し、3'RACE法によりPCRを行った。さらに増幅産物を鋳型にしてnested PCRを試みた。一方、これまでにミミズで見つかっている酵素はトリプシンなどセリンプロテアーゼ系の酵素であり、一次構造で200番目前後の11種類のアミノ酸の配列は極めて保存性が高い。従って、本研究においては、その配列に基づいてさらに3種類の5'-末プライマーを作製し、3'-末のユニバーサルプライマーとの間でPCRを行った。現在、7個の増幅産物を得て、それらすべてをダイレクトシーケンスした。しかしながら、未だ目的の増幅産物を得ていない。PCR条件を検討しながら、さらに研究を進めている。

(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 出口真理子君の修士論文の一環として行われた)

16S rDNA解析による新規海洋細菌の同定

小林史尚^{1,2)}, 鈴木信雄³⁾, 中村嘉利²⁾

¹〒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;

²〒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; ³〒920-0553 鳳珠郡能登町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Fumihisa Kobayashi, Nobuo Suzuki, and Yoshitoshi Nakamura: Identification of novel marine bacteria using 16S rDNA analysis

海水に生息する動物の腸管には、海水、底泥、餌などを通して常に多数の細菌が入り込み、動物種固有の細菌相を形成している。海産動物の腸内は一つの生態系と見なすことができ、腸内の細菌と宿主、及び細菌同士の相互作用を明らかにすることは、微生物生態学的に重要な課題である。海産動物の腸内の生態系についての研究の歴史は浅く、不明なことが多い¹⁾。したがって陸上由来の細菌では、資化できなかつた物質を分解可能な細菌が生息している可能性がある。そこで前報²⁾では、海水中の難分解性芳香族化合物の処理を目的として、有害物質フェノールを分解する新規海洋細菌をクロシタナシウミウシの腸内から単離し、グラム染色等の同定試験を検討した。その結果、単離されたEBR01株は*Acinetobacter*属の菌株と類似性が高いことを明らかにした。本研究では、EBR01株と同時に単離されたEBR02株の2菌株について16S rDNAのシーケンス解析を行い、相同性検索による菌株同定を行った。

単離された菌体 (EBR01株及びEBR02株) をNutrient Agar (Oxoid, England, UK) に植菌し、30°Cで1日間培養した。ゲノムDNAの抽出は、PepMan Method (Applied Biosystems, CA, USA) を使用した。抽出したゲノムDNAを鋳型として、PCRにより16S Ribosomal RNA遺伝子 (16S rDNA) の5'末端側約500 bpの領域を増幅した。その後、増幅された塩基配列をシーケンシングし、16S rDNA部分塩基配列を得た。PCR産物の精製、サイクルシーケンスにはMicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を使用した。なお、ゲノムDNA抽出からサイクルシーケンスまでの基本的操作はApplied Biosystems社のプロトコール (P/N4308132 Rev.A) に従った。解析は、得られた16S rDNAの塩基配列を用いて行った。相同性検索にはMicroSeq Microbial Identification System Software V.1.4.1を、データベースとしてはMicroSeq Bacterial 500 Library v.0023 (Applied Biosystems, CA, USA) を使用した。

Figure 1 にEBR01株とEBR02株の16S rDNA塩基配列を示す。なお、これらの塩基配列はDDBJ (DNA Data Bank of Japan) 登録を行い、Accession Number としてそれぞれAB247271とAB247452を得ている。MicroSeqを用いた解析の結果、EBR01株の16S rDNA部分塩基配列は相同率99.24 %で*Acinetobacter johnsonii*³⁾の16S rDNAに対し最も高い相同性を示した。したがってEBR01株は、*Acinetobacter johnsonii*である可能性が高い。一方EBR02株の16S rDNA部分塩基配列は相同率97.32 %で*Acinetobacter lwoffii*⁴⁾の16S rDNAに対し最も高い相同性を示した。EBR02株は、*Acinetobacter lwoffii*の16S rDNAの塩基配列とは、数%異なっていたので、*Acinetobacter lwoffii*と近縁であるが、別種である可能性が考えられる。これを分類学的に判断するためには、16S rDNA塩基配列解析のみでこの種の異同を判断することは難しく、検体菌株と基準株との間でハイブリダイゼーションを用いて

DNA-DNA相同値を比較することが必要である⁵⁾。

以上の結果から、クロシタナシウミウシの腸内から単離されたEBR01株は、*Acinetobacter johnsonii*である可能性が高いが、EBR02株は*Acinetobacter lowffii*に近縁の新種である可能性が示された。

(a)
TGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGATTGAAC GCTGGCGGCA GGCTTAACAC ATGCAAGTCG AGCGGGGAAR GGTAGCTTGC
TACCTGACCT AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA TGCTTAGGAA TCTGCCTATT AGTGGGGGAC AACATTCCGA AAGGAATGCT
AATACCGCAT ACGCCCTACG GGGGAAAGCA GGGGATCTTC GGACCTTGCG CTAATAGATG AGCCTAAGTC AGATTAGCTA
GTTGGTGGGG TAAAGGCCTA CCAAGGCGAC GATCTGTAGC GGGTCTGAGA GGATGATCCG CCACACTGGG ACTGAGACAC
GGCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAATGGGCG AAAGCCTGAT CCAGCCATGC CGCGTGTGTG
AAGAAGGCCT TTTGGTTGTA AAGCACTTTA AGCGAGGAGG AGGCTACTKG GATTAATACT CTDGGATAGT GGACGTTACT
CGCAGAATAA GCACCGGCTA ACTCTGTGCC AGCAGCCGCG GTA

(b)
TGGAGAGTTT GATCCTGGCT CAGATTGAAC GCTGGCGGCA GGCTTAACAC ATGCAAGTCG AGCGGGGAAA GGTAGCTTGC
TACTGGACCT AGCGGCGGAC GGGTGAGTAA TGCTTAGGAA TCTGCCTATT AGTGGGGGAC AACATTCCGA AAGGAATGCT
AATACCGCAT ACGTCTACG GGAGAAAGCA GGGGACCTTC GGGCCTTGCG CTAATAGATG AGCCTAAGTC GGATTAGCTA
GTTGGTGGGG TAAAGGCCTA CCAAGGCGAC GATCTGTAGC GGGTCTGAGA GGATGATCCG CCACACTGGG ACTGAGACAC
GGCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAATGGGGG GAACCCTGAT CCAGCCATGC CGCGTGTGTG
AAGAAGGCCT TATGGTTGTA AAGCACTTTA AGCGAGGAGG AGGCTACTAG TATTAATACT ACTGGATAGT GGACGTTACT
CGCAGAATAA GCACCGGCTA ACTCTGTGCC AGCAGCCGCG GTA

Figure 1 Partial sequence of 16S rDNA in EBR01 strain (a) and EBR02 strain (b).

引用文献

- 1) 杉田治男, 出口吉昭: 海産動物の腸内細菌相, 海洋科学, 211, 51-57 (1988)
- 2) 小林史尚, 岩井尚子, 鈴木信雄, 中村嘉利: 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, 金沢大学自然計測応用研究センター臨海実験施設研究概要・年次報告, 3, 18-19 (2005)
- 3) Bouvet, P.J.M. and Grimont, P.A.D.: Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lowffii*. Int. J. Syst. Bacteriol., 36, 228-240 (1986)
- 4) Skerman, V.B.D., McGowan, V. and Sneath, P.H.A.: Approved Lists of Bacterial Names, Int. J. Syst. Bacteriol., 30, 225-420 (1980)
- 5) Stackebrandt, V.B.D. and Goebel, B.M.: Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 44, 846-849 (1994)

謝辞

本研究のシーケンス及び相同性検索においては、(株) テクノスルガの協力をいただいた。また本研究の一部は、科学研究費若手研究B (小林史尚、17710060) の援助により行われた。ここに記して謝意を表します。

【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

博士後期課程2年 (社会人特別選抜)

東出幸真
小泉隆

博士前期課程2年

出口真理子
Arin Ngamniyom

4年生

角 明子
岡田アキ
山田哲也
榎本 洸



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