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5号

2006.4 ～ 2007.3

能登半島九十九湾に生息するミヤコウミウシ
(*Dendrodoris denisoni*)

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５号

2006.4～2007.3

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科に属するゴカイで、世界の深海や冷水域に棲む。口も消化管も無く、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（*Oligobrachia mashikoi*）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。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。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に発表した。

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）。この結果は英文の論文としてActa Zoologicaより出版された。

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。この構造の中に不対のシスティンを含むことから、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）。

さらに最近、当研究室では、ヒゲムシが海底の泥の中の多糖類を単糖に分解し、皮膚を通してそれを摂取しているとのデータを蓄積しつつあり、国際誌に投稿準備中である。

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。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。現在、この現象の分子生物学的解析を進めるために、メダカにおける男性ホルモンと女性ホルモンまた骨形成ホルモン、それぞれの受容体のRT-PCRによる増幅に成功しており、次の段階としてホルモン投与を考えている。

一方、鈴木は魚のウロコを骨のモデルとして用い、物理的刺激やホルモン等の生理活性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（財）日本宇宙フォーラムの地上公募研究の研究助成を受け、1）バイブレーションによる加速度の重力刺激、2）超音波の音圧による機械的刺激及び3）3次元クリノスタットによる微小重力刺激に対する骨代謝に及ぼす影響について、ウロコのアッセイシステムで解析した。以下に示す。

金沢大学医学部保健学科の北村敬一郎助教授が独自に製作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、2006年７月に中国の北京で開催された国際学会（Committee on Space Research 36th COSPAR Scientific Assembly）で発表し、Adv. Space Res.に掲載予定である。

超音波の機械的刺激に対する骨代謝の影響は、富山大学の近藤　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解析した。その結果、通常のウロコでは骨芽細胞の活性が上昇し、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。さらに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り、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ことから、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）。

筑波宇宙センターの3次元クリノスタットを用いて、微小重力下で6及び24時間処理し、骨芽及び破骨細胞の変化を解析した。その結果、キンギョの骨芽細胞の活性が低下し、破骨細胞の活性が上昇した。また24時間の方が、3次元クリノスタットの効果がより強く現れていた。したがって、ウロコは3次元クリノスタットによる微小重力に応答し、宇宙空間で進行する骨密度低下に近い状態になったと考えられる（Space Utilz. Res., 2007）。ウロコは物理的刺激の骨代謝に対する影響を解析する良いモデルであり、日本宇宙フォーラムの助成に加えて、宇宙航空研究開発機構（JAXA）の宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ（代表：鈴木信雄）にも採択された。JAXAの大森克徳主任研究員との共同研究により、微小重力及び加重力刺激に対する影響をさらに詳細に解析し、宇宙実験を目指している。

ウロコは磁場刺激にも応答し、骨形成を促進する（本研究報告参照）。本年度は、（財）中部電力基礎技術研究所の助成を受け、キンギョのウロコのデータの再現性を調べるため、ラットの頭蓋骨を用いて実験を行った。その結果、ウロコのデータが再現され、骨形成を促す最適な磁場強度も見出すことができ、磁場（交流磁場）による骨形成機構の一端を解明できた（特許出願中）。さらに物質・材料研究機構の強磁場研究センターの廣田憲之研究員と木村史子特別研究員との共同研究により、超伝導マグネットを用いて静磁場の強い磁場（13T）に対する影響も解析した。今後は、交流磁場と静磁場との違いによる影響を遺伝子レベルで解析する予定である。

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に成功した（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を開発し、国内及び国際特許を申請した。これらの成果は、国際誌（Int. Biodeterior. Biodegradation, 2007）にも発表した。さらに金沢大学日本海域研究所の研究助成を受け、環境汚染物質であるトリブチルスズを分解する可能性の高い海洋細菌を単離し、同定した。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) 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)

(2) Somei, M., Iwaki, T., Yamada, F., Tanaka, Y., Shigenobu, K., Koike, K., Suzuki, N. and Hattori, A.: The ideal synthesis method aimed at the leads for an α_2-blocker, an inhibitor of blood platelet aggregation, and an anti-osteoporosis agent. Heterocycles, 68: 1565-1569 (2006)

(3) Mita, M., Deguchi, M. and Sasayama, Y.: Lipid composition of the trophosome in the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Pogonophora). J. Mar. Biolog. Assoc. U.K., 86: 283-286 (2006)

(4) 倉持大輔，松下和彦，加藤晴康，河野照茂，五十嵐・右高潤子，平田和明，鈴木信雄，服部淳彦，別府諸兄：線維芽細胞成長因子－２の骨芽細胞活性化作用に対する表皮ブドウ球菌膜蛋白質による抑制．聖マリアンナ医科大学雑誌，34: 395-404 (2006)

(5) 鈴木信雄，北村敬一郎，根本 鉄，清水宣明，和田重人，近藤 隆，井尻憲一，田畑 純，新実信夫，服部淳彦：超音波刺激による骨形成促進作用：魚のウロコのアッセイ系を用いた骨芽及び破骨細胞の解析．第15回ソノケミストリー討論会講演論文集，3-4 (2006)

(6) 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., 13: 193-197 (2007)

(7) Kobayashi, F., Daidai, M., Suzuki, N. and Nakamura, Y.: Degradation of phenol in seawater using a novel microorganism isolated from the intestine of *Aplysia kurodai*. Int. Biodeterioration Biodegradation, 59: 252-254 (2007)

(8) Sasayama, Y., Higashide, Y., Sakai, M., Matada, M. and Fukumori, Y.: Relationship between the lifestyle of a Siboglinid (Pogonophoran) Polychaete, *Oligobrachia mashikoi*, and the total sulfide and nitrogen levels in its habitat. Zool. Sci., 24: 131-136 (2007)

(9) Deguchi, M., Kubota, N., Matsuno, A., Kanemori, M., Fukumori, Y. and Sasayama, Y.: Actual distribution of bacteriocytes in the trophosome of a beard worm (*Oligobrachia mashikoi*, Siboglinidae, Annelida): Clarification using whole-mount *in situ* hybridization. Acta Zool., 88: 129-135 (2007)

(10)鈴木信雄，大森克徳，井尻憲一，北村敬一郎，清水宣明，田畑 純，池亀美華，中村正久，近藤 隆，松田恒平，安東宏徳，笠原春夫，永瀬 睦，服部淳彦：魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究．Space Utliz. Res., 23: 318-321 (2007)

(11)Suzuki, N., Kitamura, K., Nemoto, T., Shimizu, N., Wada, S., Kondo, T., Tabata, M.J., Sodeyama, F., Ijiri, K. and Hattori, A.: Effect of vibration on osteoblastic and osteoclastic activities: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. Adv. Space Res., in press

(12)Suzuki, N., Kitamura, K., Somei, M. Reiter, R.J. and Hattori, A.: Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: Implications for the treatment of bone diseases. J. Pineal Res., in press

(13)Azuma, K., Kobayashi, M., Nakamura, M., Suzuki, N., Yashima, S., Iwamuro, S., Ikegame, M., Yamamoto, T. and Hattori, A.: Two osteoclastic markers expressed in multinucleate osteoclasts of goldfish scales. Biochem. Biophys. Res. Commun., in press

2) 総説

(1) 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．日本抗加齢医学会誌，2: 78-86 (2006)

(2) 鈴木信雄，田畑　純，和田重人，服部淳彦：魚のウロコを用いた新しい実験系の開発と医歯学への応用．Dental Diamond, 31: 68-73 (2006)

(3) 田畑　純，鈴木信雄，服部淳彦：魚鱗−硬組織研究と再生研究のフロンティア．細胞，39: 55-57 (2007)

3) 著書

(1) 鈴木信雄，田畑　純，服部淳彦：第３章　キンギョ．『身近な動物を使った実験１』，鈴木範男編，三共出版，東京，印刷中

(2) 服部淳彦，田畑　純，鈴木信雄：第３章　親子判別．『身近な動物を使った実験４』，鈴木範男編，三共出版，東京，印刷中

(3) 笹山雄一，鈴木信雄：副甲状腺，鰓後腺，スタニウス小体（概論）−1.副甲状腺ホルモン，2.カルシトニン，3.カルシトニン遺伝子関連ペプチド，4.スタニオカルシン，『ホルモンハンドブック新訂 eBook 版』，南江堂，東京，776-854 (2007)

【研究発表及び研究活動】

1) 研究発表

(1) 北村敬一郎，鈴木信雄，根本 鉄，清水宣明，和田重人，近藤 隆，袖山文彰，井尻憲一，服部淳彦：骨芽および破骨細胞に対する超音波の影響−キンギョのウロコを骨モデルとした解析．第 45 回日本生体医工学会，福岡（2006, 5），生体医工学，43 Suppl.: 363 (2006)

(2) Suzuki, N., Kitamura, K., Nemoto, T., Shimizu, N., Wada, S., Kondo, T., Tabata, M.J., Sodeyama, F., Ijiri, K. and Hattori, A.: Effect of acceleration on osteoblastic and osteoclastic activities: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. Committee on Space Research 36th COSPAR Scientific Assembly, China, (2006, 7)

(3) 笹山雄一，山口正晃：脊椎動物における左右相称性のくずれの起源．平成 18 年度日本動物学会中部支部大会，名古屋（2006, 7）

(4) 山田哲也，笹山雄一：マシコヒゲムシ（環形動物多毛類）の単離されたバクテリオサイトにおけるバクテリアと細胞骨格．平成 18 年度日本動物学会中部支部大会，名古屋（2006, 7）

(5) 小泉 隆，笹山雄一：環形動物多毛類のマシコヒゲムシ栄養体の生化学的研究．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1159 (2006)

(6) 国田慎平，金森正明，福森義宏，笹山雄一：マシコヒゲムシのバクテリオサイトにおける熱ショック蛋白の検出の試み．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1159 (2006)

(7) 浅田光子，角 明子，笹山雄一，松野あきら：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．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1159 (2006)

(8) 中浜重之，中川太郎，金森正明，福森義宏，笹山雄一：マシコヒゲムシの巨大ヘモグロビン－*in situ* hybridization 法を用いた産生部位の検討．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1159 (2006)
(9) 榎本 洸，岡田アキ，福森義宏，笹山雄一，山口和男：マシコヒゲムシの cDNA ライブラリーの作製と発現遺伝子の解析．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1159 (2006)
(10)崎村宗徳，鈴木雅一，戸村秀明，笹山雄一，田中滋康：ウシガエル内リンパ嚢の濾胞上皮におけるミトコンドリアリッチ（MR）細胞の存在．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1209 (2006)
(11)東出幸真，坂井恵一，笹山雄一：ミトコンドリア DNA 解析に基づく能登半島に来遊するオヤビッチャの母集団の解明．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1228 (2006)
(12)鈴木信雄，染井正徳，北村敬一郎，服部淳彦：ブロモメラトニンは破骨細胞の活性を抑制し、骨芽細胞の活性を上昇させる．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1209 (2006)
(13)三木真之介，八島さやか，鈴木信雄，中村正久，服部淳彦，岩室祥一：キンギョのウロコにおけるメラトニン合成酵素のクローニングとその発現．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1209 (2006)
(14)東恭一，杉浦 領，鈴木信雄，中村正久，服部淳彦：キンギョのウロコの破骨細胞分化に及ぼすメラトニンの効果．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1210 (2006)
(15)倉持大輔，加藤晴康，別府諸兄，右高潤子，平田和明，鈴木信雄，服部淳彦：キンギョの再生ウロコにおける骨芽および破骨細胞の FGF-2 に対する反応．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1210 (2006)
(16)勝又敏行，岡崎三代，鈴木信雄，服部淳彦：キンギョのウロコの再生および破壊過程におけるシンデカンの解析．第 77 回日本動物学会，島根（2006, 9），Zool. Sci., 23: 1210 (2006)
(17)Teruchi, Y., Sugiyama, T, Suzuki, N., Sano, Y., Gay, C.V. and Kusuhara, S.: Molecular cloning of a calcitonin receptor in chicken medullary. XIIth AAAP Animal Science Congress 2006, Korea, (2006, 9)
(18)砂田 聡，鈴木信雄，山田外史，柿川真紀子，橋本松進，北村敬一郎，服部淳彦，岩坂正和，上野照剛：破骨細胞・骨芽細胞における交流磁界効果．第 30 回日本応用磁気学会，島根（2006, 9）
(19)鈴木信雄，北村敬一郎，根本 鉄，清水宣明，和田重人，近藤 隆，井尻憲一，田畑 純，新実信夫，服部淳彦：超音波刺激による骨形成促進作用－魚のウロコのアッセイ系を用いた骨芽及び破骨細胞の解析．第 15 回ソノケミストリー討論会，金沢（2006, 10）
(20)三島弘幸，鈴木信雄，田畑 純，大野由香，中石裕子，野村加代，服部淳彦：歯の成長線の周期性にメラトニンが関与する可能性．第 61 回日本解剖学会中国・四国支部学術集会，広島（2006, 11）
(21)鈴木信雄，大森克徳，井尻憲一，北村敬一郎，清水宣明，田畑 純，池亀美華，中村正久，近藤 隆，松田恒平，安東宏徳，笠原春夫，永瀬 睦，服部淳彦：魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究．第 23 回宇宙利用シンポジウム，東京（2007,1）
(22)鈴木信雄，服部淳彦，唐原一郎，神阪盛一郎，染井正徳：新規 1-ヒドロキシインドール誘導体の抗菌作用．第 127 回日本薬学会，富山（2007, 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：メダカの鰭の形成に及ぼす性ホルモンの研究，基礎生物学研究所教授　長濱義孝氏

(3) 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

(4) 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

(5) 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

(6) 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

(7) 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

(8) 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，九州大学大学院農学研究院助教授　安東宏徳氏

(9) 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

(10) 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

(11) 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

(12) 鈴木信雄：プロラクチンの骨組織に対する作用，岡山大学理学部付属臨海実験所教授　坂本竜哉氏，北里大学水産学部名誉教授　川内浩司氏，同教授　高橋明義氏，同助教授　森山俊介氏

(13) 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

(14) 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

(15) 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　上野照剛氏，千葉大学　工学部助教授　岩坂正和氏

(16) 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名誉教授　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

(17) 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

(18) 鈴木信雄：脂肪酸の石灰化に対する作用，富山大学　和漢薬研究所教授　浜崎智仁氏

(19) 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教授　近藤 隆氏，同大学 医学部講師　和田重人氏

(20) 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

(21) 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

(22) 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

(23) 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

(24) 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　神坂盛一郎氏，同助教授　唐原一郎氏

(25) 鈴木信雄：魚のウロコを用いた宇宙生物学的研究，宇宙航空研究開発機構主任研究員　大森克徳氏，富山大学大学院理工学研究部教授　松田恒平氏

(26) 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助教授　大嶋雄治氏

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，2005-現在

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，2005-2006

【研究費】

1）科学研究費

(1) 笹山雄一（代表），基盤研究（C），ヒゲムシと化学合成細菌の共生：宿主細胞による細菌の支配の解明に向けて，2,600 千円．

(2) 鈴木信雄（代表），基盤研究（C），新規硬組織モデルによる骨・歯の疾患に対する超音波治療方法の開発，2,200 千円．

2）受託研究費

(1) 鈴木信雄（代表），（財）日本宇宙フォーラム，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，2,858 千円．

3）奨学寄付金

(1) 鈴木信雄（代表），財団法人　中部電力基礎技術研究所研究助成，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，900 千円．

4）その他

(1) 鈴木信雄（代表），宇宙航空研究開発機構 宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループ活動支援，魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究，380 千円．

(2) 鈴木信雄（代表），金沢大学日本海域研究所　研究助成，日本海域のトリブチルスズ濃度測定及び海洋性菌による浄化，100 千円．

【利用状況】

1）利用者及び研究目的

4／5～4／6	金沢大学自然科学研究科 博士後期課程２年 會田　将人　他２名 「研究試料の採集」
4／6～4／7	金沢大学自然科学研究科 博士後期課程２年 會田　将人　他１６名 「研究試料の採集及びセミナー」
6／１９～6／２１	金沢大学自然科学研究科 長谷川　浩　助教授　他１名 「九十九湾の生物撮影」
6／２０	富山大学附属病院 和田　重人　講師　他１名 「研究打ち合わせ」
6／２０～6／２１	神戸大学内海域環境教育研究センター 羽生田　岳昭　助手　他１名 「海藻類の採集」
6／３０～7／1	スーパーサイエンスハイスクール 「臨海実習」 石川県立七尾高校
7／１５～7／１７	スーパーサイエンスハイスクール 「臨海実習」 福井県立藤島高校
8／１３	のと海洋ふれあいセンター 文野　康男　館長 「海洋生物の調査」

９／１	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」
９／５	金沢大学自然科学研究科 博士後期課程２年 會田　将人　他４名 「マシコヒゲムシと海底土壌の採集」
１０／２	金沢大学生物学科４年 板津　秀彰 「採泥」
１０／２３	金沢大学生物学科４年 浅田　光子　他７名 「採集」
１１／１５	のと海洋ふれあいセンター 東出　幸真　主任技師 「海洋生物の採集」
１２／４	金沢大学自然科学研究科 博士前期課程　１年 山田　哲也　他４名 「採集」
１２／２０	金沢大学自然科学研究科 加藤　道雄　教授　他２名 「微小生物群集調査」
１／１３	のと海洋ふれあいセンター 福島　広行　専門員 「海洋生物の調査」
２／１７	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」

3／9	金沢大学生物学科４年 板津　秀彰　他３名 「採泥」
3／24～3／25	金沢子ども科学財団　８名 「海の自然学校～臨海実習」

2）臨海実習等

7／5～7／6	富山県立砺波高校 松原　禎弘　教諭　他４４名 「ウニの初期発生の研究及び磯生物の多様性」
8／1～8／5	金沢大学自然科学研究科 笹山　雄一　教授　他２３名 「臨海実習」
8／9～8／11	金沢大学自然科学研究科 植田　邦彦　教授　他２０名 「生物学演習」
8／20～8／26	公開臨海実習 北海道大学 西村　俊哉　他８名
8／28～9／2	富山大学理学部生物学科 小松　美英子　教授　他２７名 「臨海実習」
9／7～9／9	金沢大学自然科学研究科 中村　浩二　教授　他１４名 「生物学演習」
9／27～9／29	金沢大学自然科学研究科 福森　義宏　教授　他２４名 「生物学演習」

3) 利用者数及び船舶の使用状況

平成18年度臨海実験施設利用者数（延べ人数919人の内訳）

	研究者		学生	
（月）	学内	学外	学内	学外
4	6	3	31	0
5	0	4	0	0
6	6	11	0	28
7	0	22	0	220
8	6	11	167	167
9	6	7	119	52
10	1	3	8	0
11	0	3	0	0
12	1	3	7	0
1	0	3	0	0
2	0	2	0	0
3	0	4	4	14
合計	26	76	336	481

平成18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	2	5
7	3	4
8	5	4
9	2	4
10	5	4
11	2	4
12	3	4
1	2	4
2	2	3
3	2	4
合計	36	45

研 究 報 告

＊キンギョのウロコを用いた培養系における磁場の骨芽及び破骨細胞に対する影響
鈴木信雄，柿川真紀子，山田外史（p 14-15）

＊環形動物門Siboglinidae科マシコヒゲムシの消化管内腔に由来する栄養体内腔の形態学的研究
水野文敬（p 16）

＊環形動物門Siboglinidae科マシコヒゲムシの栄養体におけるアポトーシスに関する免疫組織化学的研究
浅田光子（p 17）

＊環形動物門Siboglinidae科マシコヒゲムシの棲息する土壌中における全硫化物及び全窒素濃度の研究
板津秀彰（p 18）

＊環形動物門Siboglinidae科マシコヒゲムシで発現する熱ショック蛋白質に関する研究
国田慎平（p 19）

＊アメフラシ腸内細菌を用いた海水中のフェノール除去
小林史尚，鈴木信雄，中村嘉利 （p 20-21）

キンギョのウロコを用いた培養系における磁場の骨芽及び破骨細胞に対する影響

鈴木信雄[1]，柿川真紀子[2]，山田外史[2]

[1]〒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；[2]〒920-8667 金沢市小立野　金沢大学自然計測応用研究センター

Nobuo SUZUKI[1], Makiko KAKIKAWA[2], Sotoshi YAMADA[2]: Effects of magnetic fields on osteoblasts and osteoclasts in an *in vitro* culture system using goldfish scales

ヒトの脊椎骨は破骨細胞と骨芽細胞から構成され、これら2種類の細胞はコミュニケーションをとり、お互いに増殖及び分化を制御している。しかしながら、両方の細胞を同時に培養することは、非常に難しく、これまでの骨形成に関する知見は、ほとんどが単独で培養した結果に基づいている。一方、磁場が骨形成を促すということは、よく知られている。さらにそれを利用した治療機器も発売されているが、そのメカニズムに関する基礎的なデータは少ない。そこで本研究では、魚類のウロコの特徴を生かした骨のモデルとなる培養系を用い、そのメカニズムの解析を行った。

材料としてキンギョ（*Carassius auratus*）を用い､以下2種類の実験を行った。

実験１：超低周波磁場による破骨及び骨芽細胞に及ぼす影響

キンギョ（*Carassius auratus*）（メス30匹）を麻酔（MS222、Aldrich Chemical Company Inc.）し、ウロコを取り、2ml用のチューブ（BM機器）に入れた。次にそのチューブにHEPES（20mM）（pH7.0）及び抗生物質（1%）を含む培地（MEM、ICN Biomedicals Inc.）を500μl加えた。そのチューブを3、5、10及び30mTの磁場に15℃、24時間曝露し、破骨及び骨芽細胞の活性に及ぼす影響を調べた。磁場発生装置の詳細は、Miyakawa et al. (2001)に示してある。本研究では、破骨細胞の活性の指標として酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)を用い、骨芽細胞の活性の指標としてアルカリフォスファターゼ(ALP)を使用し、磁場の骨組織に対する作用を調べた。詳細な方法は、Suzuki and Hattori (2002)に示してある。また培地中に放出された酵素活性も同様にして測定した。

実験２：超低周波磁場の遺伝子発現に及ぼす影響

キンギョ（メス5匹）のウロコを取り、実験Ｉと同様に30mTの磁場に曝露（15℃、24時間）した。そのウロコからアイソゲン（ニッポンジーン）によりmRNAを抽出し、タカラのキットを用いてcDNAを合成した。破骨細胞のマーカーであるcalcitonin receptor及び骨芽細胞のマーカーであるinsulin-like growth factor-Iとestrogen receptorの発現をRT-PCRにより解析した。詳細な方法は、Suzuki et al. (1997)に示してある。

ウロコの培養系を用いて、超低周波磁場（3mT）による破骨及び骨芽細胞に及ぼす影響を評価した結果、破骨細胞の活性が有意に低下した。また、細胞の活性と同様に培地中のTRAP活性もコントロールに比べて有意に低下していた。一方、ウロコの骨芽細胞の活性は変化しなかったが、培養液中のALP活性が、コントロールと比較して上昇していた。したがって、3mTの磁場刺激でも骨形成が進行中であると推測される。さらに5mTでも3mTと同様の結果が得られた。

10及び30mTでは、骨芽細胞の活性が上昇し、それに伴い破骨細胞の活性も上昇していた。これら2種類の細胞は、密接に連絡しており、骨芽細胞で発現しているリガンドであるReceptor Activator of NF-κB Ligand (RANKL)と破骨細胞にあるレセプターであるReceptor Activator of NF-κB（RANK）とにより結合することにより、破骨細胞が活性化し、多核の活性型の破骨細胞に分化する（Teitelbaum,

2000）。したがって、10及び30mTで24時間曝露することにより、骨芽細胞が活性化し、RANK-RANKLを通して破骨細胞も活性化されたと考えられる。

超低周波磁場の遺伝子発現に及ぼす影響を調べた結果、膜レセプターであるcalcitonin receptor mRNAの発現は上昇したが、核レセプターであるestrogen receptor mRNAの発現は変化しなかった。磁場刺激は、細胞膜に影響を及ぼし、細胞活性に影響を与えると考えられているので、これまでの知見（Luben, 1991）と一致している。calcitonin receptorは破骨細胞に特異的に発現している遺伝子なので、実験１で得られた結果と一致している。さらにinsulin-like growth factor-Iは骨芽細胞で特異的に発現している遺伝子であり、ALP活性の上昇と同様にそのmRNAレベルも上昇していた。したがって、calcitonin receptorに加えてinsulin-like growth factor-Iの発現に関しても実験１の結果を支持していた。

以上のことから、磁場刺激に対する反応性は破骨細胞の方が高く、まず破骨細胞の活性が低下し、次に磁場強度が上がると、骨芽細胞が活性化され、破骨細胞も活性化させる可能性が示された（Table 1参照）。副甲状腺ホルモンは、骨芽および破骨細胞の両方の細胞活性を上昇させて、骨形成を促していることが最近わかってきた（Neer et al., 2001）。したがって、磁場による骨形成も副甲状腺ホルモンのようなメカニズムで進行している可能性が高い。

Table 1. Effects of magnetic fields on osteoclastic and osteoblastic activities in an *in vitro* culture system using goldfish scale that contains osteoblasts, osteoclasts, and bone matrix.

	Osteoclastic activity	Osteoblastic activity
3mT	decrease	no change
5mT	decrease	no change
10mT	increase	increase
30mT	increase	increase

引用文献

Luben, R.A.: Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems. Health. Phys., 61: 15-28 (1991)

Miyakawa, T. et al.: Exposure of *Caenorhabditis elegans* to extremely low frequency high magnetic fields induces stress responses. Bioelectromagnetics, 22: 333-339 (2001)

Neer, R.M. et al.: Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. N. Eng. J. Med., 344: 1434-1441 (2001)

Suzuki, N. et al.: Nucleotide sequences of reptile calcitonins: their high homology to chicken calcitonin. Zool. Sci., 14: 833-836 (1997)

Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. J. Pineal Res., 33: 253-258 (2002)

Teitelbaum, S.L.: Bone resorption by osteoclasts. Science, 289: 1504-1508 (2000)

謝辞

本研究の一部は、平成16年度（財）磁気健康科学研究振興財団研究助成（代表：鈴木信雄）、平成17年度（財）中部電力基礎技術研究所研究助成（代表：鈴木信雄）及び科学研究費補助金（基盤研究（C）No. 18500375、代表：鈴木信雄）の援助により行われた。

環形動物門Siboglinidae科マシコヒゲムシの消化管内腔に由来する栄養体内腔の形態学的研究

水野文敬
〒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

Hisataka MIZUNO: Morphological study of the trophosomal cavity that originates from the cavity of the digestive tract of the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida)

マシコヒゲムシは口も消化管もないが、そのかわり体の後部に栄養体と呼ばれる器官を発達させている。そこには化学合成細菌が共生し、宿主はそれが作る栄養物で生きている。栄養体は発生学的には消化管に由来し、消化管上皮に相当する部位は、細菌を共生させているバクテリオサイトと脂肪貯蔵細胞が占める。一方、消化管内腔は栄養体内腔と一致し、そこにはこれまで体腔液と似た組成の液体が充填されていると考えられてきた。

高等動物の消化管は食物が通過しない時は内腔が閉じているのが普通である。しかしながら、ヒゲムシ栄養体内腔は常に膨張した状態を維持している。本研究では栄養体内腔を組織学的に調べ、その生理的意味を検討した。

電子顕微鏡観察用の固定剤として使用するグルタルアルデヒド・オスミウム酸二重固定法によって、組織を固定した後に、一般染色による光学顕微鏡観察を行った。その結果、栄養体内腔は液体ではなく、比較的大きな細胞が詰められた組織であることが明らかになった。連続切片を作成し、詳しく調べると、内腔内の94%は細胞で満たされており、残りの6%には液体が貯まっているように見えた。また、内腔内の細胞の体積は平均8240 μm³、直径が約25 μmであった。ヒトのリンパ球の直径が約10 μm、肝細胞の直径が10～30 μmであることからも、この細胞は大きいことがわかる。栄養体内腔を埋めているこれらの細胞は、栄養体が消化管のように容易に閉じないように、内腔において水力学的圧力を維持し、その形を保つ役割を担っていると考えると興味深い。

脊椎動物において赤血球が毛細血管に入るために体積を変化させる時に重要な役割を果しているアクアポリン1は細胞膜に存在する水チャネルタンパクとして知られている。本研究では同様のタンパク質がヒゲムシの栄養体を埋めているこれらの細胞においても発現しているのではないかと考え、抗アクアポリン1抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、アクアポリン1は栄養体内腔ではなく、バクテリオサイトの一部に反応がみられることがわかった。哺乳類においては血管や腎臓などの水の輸送に関わる器官に幅広く分布しているアクアポリン1がヒゲムシにおいてはバクテリオサイトという特殊な細胞でのみ存在することは興味深い。内腔に沿って存在するバクテリオサイトが内腔に存在する細胞に水を輸送するならば、結果として内腔の水量が調整され、内腔の形態維持に関係すると考えられる。あるいは、栄養体内腔とは関係なく、バクテリオサイトにおいて独自の役割があるのかもしれない。しかしながら、この抗体はヒト由来のアクアポリン1に対する抗体であるため、ヒゲムシでの抗体特異性を確認する必要があり、今後ウエスタンブロッティング法を行う予定である。

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

環形動物門Siboglinidae科マシコヒゲムシの栄養体におけるアポトーシスに関する免疫組織化学的研究

浅田光子
〒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

Mitsuko ASADA: Immunohistochemical study regarding apoptosis in the trophosome of the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida)

石川県能登半島にある九十九湾には、環形動物門に属するマシコヒゲムシが生息している。ヒゲムシ類は口も消化管も持たず、体の後部にある栄養体と呼ばれる部分に化学合成細菌を共生させ、これが合成する炭水化物を利用して生きている。しかしながら、ヒゲムシ類の幼生には口や消化管が存在し、消化管内の卵黄顆粒を吸収して成長する。この時期に口から化学合成細菌が侵入し、消化管上皮細胞内に入り込む。幼生が卵黄顆粒を吸収し終えると消化管は退化し、体の後部の消化管上皮細胞は化学合成細菌を共生させるバクテリオサイトと呼ばれる細胞に変化する。バクテリオサイトとそれに密着する脂肪貯蔵細胞を合わせた部分が栄養体である。一般的に、消化管上皮細胞は消化管の形態を維持するために高頻度でアポトーシスを起こしている。本研究では消化管上皮由来であるバクテリオサイトでも同じようにアポトーシスが起きているか否かを検証した。

研究方法１：実際にアポトーシスが起きている細胞を特定するためにアポトーシスの初期に現れる断片化DNAを検出するTUNELアッセイを行った。ヒゲムシ栄養体、また本種と同じく定在性であるがエサをとるケヤリムシと、本種が生息する海底土壌中に生息するタケフシゴカイの消化管を含む部分の3試料について凍結切片を作成し、アポトーシスを起こしている細胞を検出した。その結果、ケヤリムシとタケフシゴカイの消化管上皮細胞では高頻度にアポトーシスが起きていることが確認された。それに対してヒゲムシではバクテリオサイトの一部の細胞でアポトーシスが起こっているが、その頻度は極めて低いものであった。この結果はヒゲムシの栄養体が消化管としての特徴を失っていることを示唆している。

研究方法２：ヒゲムシ栄養体の凍結切片についてアポトーシス実行分子である活性型カスパーゼ-3の前駆体である不活性型カスパーゼ-3、およびアポトーシスを抑制する酵素の一つであるBcl-2に対する抗体を使用して免疫染色を行った。現在これらの抗体についてウエスタンブロッティング法によりその抗原特異性を確認中であり、抗不活性型カスパーゼ-3抗体についてはすでにこのタンパク質の分子量32kDa付近にバンドが確認されている。研究の結果、不活性型カスパーゼ-3、Bcl-2はともにバクテリオサイトのほぼ全領域で発現していることが明らかになった。不活性型カスパーゼ-3は、化学合成細菌を共生させているために他の細胞より異常を起こしやすいと考えられるバクテリオサイトで、いつでもアポトーシスを起こせるように準備しているのではないかと考えられる。一方、ヒゲムシのエネルギー源である炭水化物を生産するバクテリオサイトで容易にアポトーシスが起こらないように、アポトーシス抑制酵素であるBcl-2が発現しているのかもしれない。

このように、ヒゲムシの栄養体では化学合成細菌にエネルギー源を合成させながらも、細菌の異常な繁殖などにより宿主の機能異常に陥らないようバランスをとっていると考えるとこの結果は理解しやすい。

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

環形動物門Siboglinidae科マシコヒゲムシの棲息する土壌中における全硫化物及び全窒素濃度の研究

板津秀彰
〒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

Hideaki ITATSU: Study of the total sulfide and total nitrogen concentrations of soil in which the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida) inhabits.

環形動物門のヒゲムシ類は、消化管を持たない代わりに栄養体を発達させて化学合成細菌を共生させ、それがつく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。深海において、イオウは海底火山の熱噴出孔や冷水湧出域から硫化水素として供給されたり、あるいはクジラ等、大型動物の屍骸の分解により供給される。能登半島にある九十九湾は深さ約25mの浅い海で、リアス式海岸である。ここにはマシコヒゲムシ（*Oligobrachia mashikoi*）が棲息している。しかしながら、海底には火山の噴出孔は無く、大型動物の屍骸も無い。昨年の当研究室の卒業論文研究によると、本種が必要とする硫化水素は、地上に存在する植物から供給されるという考察がなされた。しかしながら、その仮定は冬季のみの測定により導き出されたものである。したがって、本研究において一年を通じ測定を行い、季節的変動を調べることにより、より確かな結論を導きたいと考えた。

採泥地点は、本種の棲息場所とその付近の非棲息場所の８点を設定し、グラブ型採泥機により海底表面を採取、うち棲息場所を含む３点にお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。採泥は、海底表面の８箇所においては６月19日に、深部までの採泥は3月29日、5月29日、10月2日に行った。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、海底表面の硫化水素は湾奥において1.0～1.2mg/gと最も高く、ヒゲムシの棲息している湾中央においては0.3～0.5mg/g程度と下がっていく傾向にあり、湾口においては0.2mg/g以下と最も低かった。一方、どの地点でも、海底表面で硫化水素濃度が最も高く、深さ10cmほどまでに急激に減少、その後はなだらかに減少していくことが確認された。海底表面の硫化水素濃度は30cm以下の硫化水素濃度と比較すると4~15倍程度の高い濃度であった。また、有機物量の指標として、アルカリ性ペルオキソ二硫酸カリウム分解ー紫外線吸光光度法により全窒素量も測定した。その結果、硫化水素のような顕著な差がある現象は見られなかったが、深さを増すにつれ、なだらかに減少するか、あるいはほとんど変化が認められなかった。

しかしながら、事情により本研究を継続することが困難となった為、秋以降は顕微鏡下で行える研究として、環形動物門Siboglinidae科のヒゲムシ類の形態観察を行った。このサンプルは相模湾内の深度約1260～1290mの地点における一度のドレッジで採取されたもので、国立科学博物館の今島実先生が保存していた標本である。本研究において、前体部の形状及びヒゲの本数等から、少なくとも３種以上のヒゲムシが採取されていたことが確認できた。現在、引き続き種の同定を試みている。

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

環形動物門Siboglinidae科マシコヒゲムシで発現する熱ショック蛋白質に関する研究

国田慎平
〒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

Shinpei KUNITA: Study of the heat shock protein expressed in the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida)

環形動物門のヒゲムシ類は通常、冷水域や深海に生息する。しかしながら、能登半島にある九十九湾は対馬暖流が流れ込む暖かく浅い海にも関わらず、例外的にマシコヒゲムシ(*Oligobrachia mashikoi*)が生息する。日本海深部は通年で水温は0.5℃と極めて低く、常に一定であるが、九十九湾海底の水温は最も高い10月で20℃、最も低い3月で10℃であり、一年の間に10℃前後の変動がある。このような環境に生息する本種は、深海から九十九湾に移住する過程で、まず水温の上昇に対して何らかの対応を迫られたであろう。さらに定着後も水温の変化に適応する必要があったに違いない。

熱ショック蛋白質(heat shock protein:HSP)は、細胞質でつくられる蛋白質の立体構造の形成や輸送および分解を担っており、分子シャペロンとして生命維持に必要不可欠な蛋白質である。HSPは、恒常的に発現しているタイプと、ストレスによって発現が誘導されるタイプの2つに分けられる。後者は温度変化や重金属および細菌の感染などのストレスにより変性した蛋白質の修復や分解に関わっており、この応答は微生物から高等生物に至るまで広く保存されている。

本研究において、元来、深海の動物であった本種が九十九湾の水温に適応すべくHSPを発現させているのではないかと推察し、RT-PCRによってHSP遺伝子が発現しているか否かを調べた。HSPは分子量や構造の違いから数種類の区別があるが、一般的に熱ショック応答で発現が誘導されるのはHSP70である。したがって、本種と同じ環形動物門に属するツルヒゲゴカイ（*Platynereis dumerilii*)のHSP70遺伝子を基に、軟体動物から脊椎動物に至る広い種で保存性の高いN末端領域を認識するprimerを作成した。ヒゲムシ類は体の後部に存在する栄養体と呼ばれる組織にのみ化学合成細菌を共生させており、ここは他の部位とは構造的に異なっている。したがって、本実験では非栄養体と栄養体を分離し、それぞれからtotal RNAを抽出してRT-PCRを行った。その結果、非栄養体・栄養体ともに420bpの増幅産物が得られ、それをシーケンスしたところ、両者ともに同じ配列であることが分かった。この配列を他の動物との間で比較をすると、海綿動物や脊椎動物、軟体動物で発現している熱誘導型のHSP70と相同性が高いことが分かった。この結果は本種がHSPを発現することにより、温度のショックに適応している可能性を示唆している。次に、本種において発現しているHSP70遺伝子の未知領域の塩基配列を明らかにするため3′race法によりPCRを行った。その結果、非栄養体・栄養体ともに2000bp程度の大きさの増幅産物が得られた。現在、その塩基配列を調べている。今後は九十九湾における海底の水温の変動と、今回検出されたHSP遺伝子の発現量との関連について研究を行う予定である。

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

アメフラシ腸内細菌を用いた海水中のフェノール除去

小林史尚[1,2)]，鈴木信雄[3)]，中村嘉利[2)]

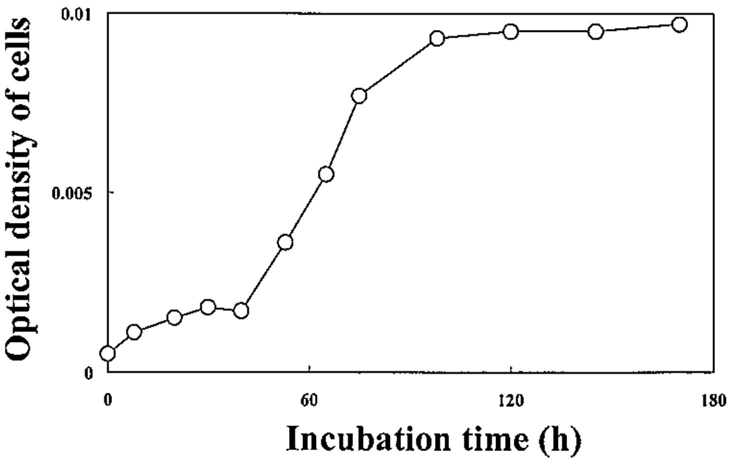
[1]〒920-1192　金沢市角間町　金沢大学自然計測応用研究センター，エコテクノロジー研究部門；[2]〒920-1192　金沢市角間町　金沢大学大学院自然科学研究科，物質工学専攻；[3]〒920-0553　鳳珠郡能登町小木　金沢大学自然計測応用研究センター，臨海実験施設

Fumihisa KOBAYASHI[1,2], Nobuo SUZUKI[3], and Yoshitoshi NAKAMURA[2]: Removal of phenol in seawater using an intestinal bacterium of *Aplysia kurodai*

フェノール類は、農場やゴルフ場において農薬として用いられており、その廃水が川から海へ流れ込むことによる海洋汚染が問題となっている[1,2)]。また、タンカー座礁事故などフェノール類の海洋汚染は深刻な状況となっている。瀬戸内海や富山湾といった閉鎖海域においては、海流による拡散が少ないため、フェノール類の蓄積が著しくその処理方法が模索されている。海水中のフェノール類など汚濁物質の処理に海洋生物の腸内細菌など海洋細菌の応用が提案されている。しかしながら、海洋生物の腸内細菌の研究はまだ歴史は浅く不明な点が多く、スクリーニング法に関してもまだ確立されたとは言い難い[3)]。著者らは、これまで海洋生物の腸内に成育する細菌の単離と同定を行ってきた[4,5)]。本研究では、これまでの著者らの知見を生かし、アメフラシの腸内容物から単離されたEBR03株を用いて海水中に含まれるフェノールの分解実験を行い、海水からのフェノール除去法を検討した。

アメフラシを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[6)]（NaCl 15 g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.58 g/L，$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 2.72 g/L，$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.6 g/L，KCl 0.39 g/L，$NaHCO_3$ 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℃で4から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認められ、その1つをEBR03と命名した。

最初にEBR03株のフェノール耐性を検討した。300 mL容量の三角フラスコを用いて100 mg/Lのフェノールを含む改変ALLEN海水100 mLに植菌し、回転数100 rpmのロータリーバイオシェーカー（Fine, SNC-170）を用いて30℃、約200時間培養した。菌体濃度は波長610 nmの菌体光学密度として分光光度計（島津製作所製UV-1200）を用いて測定した。

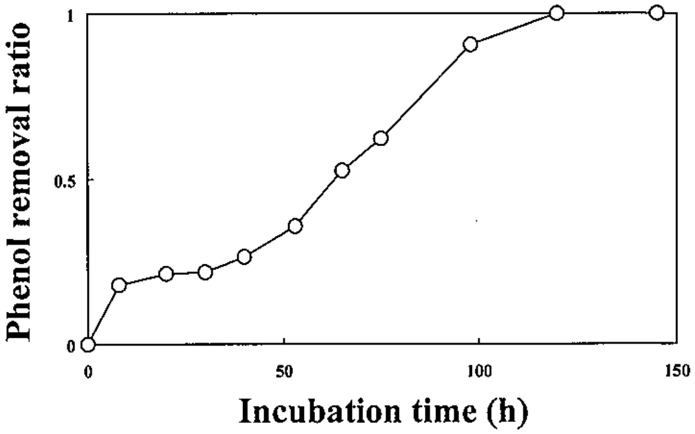


igure 1 Cell growth of EBR03 strain in seawater ontaining phenol.

Figure 1にEBR03株の菌体増殖曲線を示す。培養開始とともに菌体は増殖し、100 時間後には菌体光学密度0.01で一定となった。この結果はフェノールを含まない結果とほぼ変わ

らなかったのでEBR03株はフェノール耐性を持つことがわかった。

次に、EBR03株の海水に含まれるフェノール除去について実験的に検討した。除去実験は耐性実験と同じく100 mg/Lのフェノールを含む改変ALLEN海水を用いて行った。フェノール除去率は、Wakosil Agri-9を充填したカラムが付属している高速液体クロマトグラフィー（島津製作所製LC-10A）を用いてフェノール濃度を測定し初期濃度との比から推算した。測定に用いたキャリヤーは0.01 % EDTAを含む50 mMリン酸緩衝液（pH 3.7）とアセトニトリルを55対45の比で混合した溶液である。キャリヤーの流速は1 mL/minであり、サンプル10 μLをカラムに注入し、波長210 nmにおける吸光度から絶対検量線法によって求めた。Figure 2にフェノール除去率の経時変化を示す。フェノール除去率は約100 時間で1に達し、海水中の100 mg/Lのフェノールをほぼ完全に除去することができた。



igure 2 Removal of phenol in seawater using EBR03 train.

以上の結果から、EBR03株を用いた海水中のフェノール処理は、活性炭処理などの他の物理・化学的処理に比べ処理時間が長いという欠点があるものの、低コスト・低環境負荷でフェノール（100 mg/L）をほぼ完全に分解処理できることがわかった。

引用文献

1) Schwedt, G.: The essential guide to environmental chemistry. John Willey & Sons (1996)
2) Colborm, T., Saal, F.S., Soto, A.M.: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in sildlife and humans. Environmental Health Perspectives, 101: 378-384 (1993)
3) 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)
4) 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)
5) 小林史尚，鈴木信雄，中村嘉利：16S rDNA 解析による新規海洋細菌の同定．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，4: 22-23 (2006)
6) 鈴木信雄，矢澤一良，渡部和郎，赤堀結花里，石川千夏，近藤聖，高田清克：エイコサペンタンエン酸産生菌 SCRC-2738 の大量培養条件の検討．日本水産学会誌，58: 323-328 (1992)

謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金（若手研究（B）No. 17710060、代表：小林史尚）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
（骨代謝に関与する生理活性物質、様々な環境汚染物質及び重力・微小重力・磁場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　　　曽良美智子(msora@sweet.ocn.ne.jp)

2) 学生

博士後期課程3年（社会人特別選抜）

東出幸真
小泉隆

博士後期課程1年

Arin Ngamniyom

博士前期課程1年

岡田アキ
山田哲也

4年生

水野文敬
浅田光子
板津秀彰
国田慎平

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

再生紙を使用しています