

臨海実験施設  
研究概要・年次報告 第6号  
2007.4 ~ 2008.3



能登半島九十九湾に生息するカバザクラ (*Nitidotellina iridella*) (左)、  
ベニガイ (*Pharaonella sieboldii*) (右)

# 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。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組織や生き様や共生細菌の生態について研究を進め、以下の成果を得た。本年に新たに出版された論文あるいは受理された論文、さらに投稿準備中の結果に関してのみ述べる。

マシコヒゲムシの共生細菌を調べると、その数において、ハオリムシのそれと比較して少なすぎる。このことは、全ての栄養を共生細菌から得るのは難しいことを意味している。過去にヨーロッパ産のヒゲムシでは、海水中に放射性ラベルされたアミノ酸やブドウ糖は一定時間後にヒゲムシの体内に見出されることが報告されているが、その実態は明らかではなかった。研究論文 (Zool. Sci., 2008) において、本種においては、有機物が豊富な海底表面に近い部分の皮膚には $\alpha$ -グルコシダーゼ様の活性があり、これにより海底の分解産物からブドウ糖を取り込んでいる可能性が示唆された。研究論文 (Microbes Environ., 2007; Microbes Environ., 2008) においては、共生細菌の性質がいくつか明らかになった。まず、共生細菌がイオウ酸化細菌であるかメタン酸化細菌であるかに決着がついた。これはイオウ酸化細菌しか持ち得ないゲノム上の配列を本種が持っていることを突き止めたからである。但し、この共生細菌は九十九湾のどこにでもいるが、その密度は本種の生息場所と一致はしなかった。このことは、本種の発生の過程においてこの共生細菌を特異的に取り込んでいることを意味している。さらに、これらの自由生活する共生していない細菌の16S rDNAの配列には平均で3%内外の変異があり、その変異から幾つかの系統に分けられることが知られた。これは共生後の細菌にも引き継がれており、何を意味しているのか現時点では不明である。

なお、X線分析顕微鏡をもちいて共生細菌が住み着いている組織を調べると、そこだけイオウのピークが立つことを見出した。これは共生細菌へと確かに硫化水素が運ばれていることを示している。この結果は投稿準備中である。さらに共生細菌をかくまっている栄養体部分を精査すると、元の消化管内腔に相当する部分は空洞ではなく、おおきな水枕様の細胞がつまり、栄養体がつぶれないように水力学的な支えになっていることを見出した。この結果も投稿準備中である。

上記したように、ヒゲムシは硫化水素が発生する還元的環境に棲息する。研究論文 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007) は、本種のヘモグロビンの酸素との親和性が非常に高く、共生細菌へと硫化水素を運んでも、同時に自分の組織へ酸素を効率よく運ぶことを示している。研究論文 (Zool. Sci., 2007; Acta Zool., 2007) は昨年度の研究報告に発表した論文である。

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。その結果が論文として (The Fish Biol. J. Medaka, 2007) に発表された。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受容体と女性ホルモン受容体また骨形成蛋白遺伝子をRT-PCRによって発現を調べた結果、間性の個体の性ホルモン受容体の発現は正常な雌雄のそれらの発現の中間にあることがわかり、日本動物学会 (弘前) とバンコクの国際学会において発表した。なお先に投

稿中のメダカのカルシトニンの塩基配列の論文が本年、発表された (The Fish Biol. J. Medaka, 2007)。

一方、鈴木は魚のウロコを骨のモデルとして用い、物理的・化学的・生物学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。本年度は科学研究費及び宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループの研究助成を受け、①超音波の音圧による機械的・化学的・生物学的刺激、②遠心機による過重力刺激、③3次元クリノスタットによる微小重力刺激に対する骨芽及び破骨細胞の応答について、ウロコのアッセイシステムを用いて解析した。以下に示す。なおこれらの成果は、カナダのモントリオールで開催された国際骨代謝学会のサテライトシンポジウム (Comparative Endocrinology of Calcium Regulation) で発表 (招待講演) した。

超音波の機械的・化学的・生物学的刺激の骨代謝に対する影響は、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准教授等との共同研究により解析し、第78回日本動物学会、第35回日本生体電気・物理刺激研究会、International Symposium of Sonochemistry and Sonoprocessing 2007で発表した。さらに今年度は、超音波の機械的・化学的・生物学的刺激の歯の発生に及ぼす影響も調べた。超音波の硬組織に対する影響は、最近注目されており、実際に骨折治療にも適用されている。破骨細胞のマーカーもクローニングできたので (Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007)、今後は遺伝子発現等の解析により、超音波の硬組織に対する作用機構を解析していく予定である。

宇宙環境利用科学委員会研究班ワーキンググループのメンバーと共に、遠心機の過重力刺激に対する影響を解析した。その結果、骨芽細胞の活性は、2Gという低強度の重力負荷でも応答し、5及び10分間処理により、その活性が上昇した。4Gでは2Gとあまり変わらないが、7Gでは顕著に骨芽細胞の活性が上昇した。さらに破骨細胞の活性も2Gで5分間処理しても応答し、その活性が低下した。破骨細胞活性の低下率は、強度が上がるにつれて下がり、7Gでは破骨細胞の活性が上昇する傾向にあった (Biol. Sci. Space, 2008)。これらの結果は、バイブレーションによる加速度重力の結果 (Adv. Space Res., 2007) と似ており、ウロコは重力刺激に感度よく応答したことを示している。

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。一方、1軸 (2次元) で回転した場合は、ウロコの骨芽及び破骨細胞の活性は変化しなかった。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反応し、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 Utiliz. Res., 2008)。ウロコは物理的・化学的・生物学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、「きぼう」の国際宇宙ステーションにおける宇宙実験 (船内実験室利用 第二期宇宙実験 2010年から2011年) のフライト候補にも選定された。宇宙航空研究開発機構の大森克徳主任研究員との共同研究により、宇宙実験に向けて準備を進めていく予定である。

ウロコを用いて骨疾患の治療薬の開発も行っている (本研究報告参照)。本年度は独立行政法人科学技術振興機構 平成 19 年度「シーズ発掘試験」の助成を受け、ウロコのアッセイ系でスクリーニングされた新規化合物 (J. Pineal Res., 2008) の卵巣除去ラットにおける影響を評価した。その結果、ウロコで得られた結果が再現され、卵巣除去ラットにおいても骨強度が有意に上昇した (米国、中国、欧州特許出願中)。さらに、ハムリー (株) の関あずさ博士と共に、低 Ca 食ラットを用いて実験を行った結果、骨密度を有意に上昇させることが判明した。これらの成果を本年秋に開催される骨代謝学会で発表予定である。

また鈴木は、金沢大学大学院自然科学研究科の小林史尚准教授及び九州大学大学院の大嶋雄治准教授との共同研究により、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 (日本海域研究、2008)。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., 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.*, 40:1711-1721 (2007)
- (2) 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.*, 362: 594-600 (2007)
- (3) 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)
- (4) 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)
- (5) Sasayama, Y., Higashide, Y., Sakai, M., Matada, M. and Fukumori, Y.: Relationship between the lifestyle of a Siboglinid (Pogonophoran) Polychaete, *Oligobranchia mashikoi*, and the total sulfide and nitrogen levels in its habitat. *Zool. Sci.*, 24: 131-136 (2007)
- (6) Ngamniyom, A., Magtoon, W., Nagahama, Y. and Sasayama, Y.: A study of the sex ratio and fin morphology of the Thai medaka, *Oryzias minutillus*, inhabiting suburbs of Bangkok, Thailand. *The Fish Biol. J. Medaka*, 11: 17-21 (2007)
- (7) Sakamoto, H. and Sasayama, Y.: Nucleotide sequence of cDNA of bone-mineralizing hormone calcitonin in medaka (Teleostei). *The Fish Biol. J. Medaka*, 11: 5-8 (2007)
- (8) Aki, Y., Nakagawa, T., Nagai, M., Sasayama, Y., Fukumori, Y. and Imai, K.: Oxygenation properties of extracellular giant hemoglobin from *Oligobranchia mashikoi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 360: 673-678 (2007)
- (9) Kubota, N., Kanemori, M., Sasayama, Y., Aida, M. and Fukumori, Y.: Identification of Endosymbionts in *Oligobranchia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida). *Microbes Environ.*, 22: 136-144 (2007)
- (10) Deguchi, M., Kubota, N., Matsuno, A., Kanemori, M., Fukumori, Y. and Sasayama, Y.: Actual distribution of bacteriocytes in the trophosome of a beard worm (*Oligobranchia mashikoi*, Siboglinidae, Annelida): Clarification using whole-mount *in situ* hybridization. *Acta Zool.*, 88: 129-135 (2007)
- (11) 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 Utiliz. Res.*, 23: 318-321 (2007)
- (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.*, 44: 326-334 (2008)
- (13) 鈴木信雄, 小林史尚, 又多政博, 服部淳彦, 伊藤 靖, 大嶋雄治: 能登半島沿岸の海水中のトリブチルスズ濃度測定と海洋細菌によるトリブチルスズの浄化の試み. *日本海域研究*, 39: 49-53 (2008)
- (14) 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, 久保田幸治, 奈良雅之, 服部淳彦: 擬似微小重力及び過重力下における骨代謝制御: 培養ウロコを用いた解析. *Space Utiliz. Res.*, 24: 230-233 (2008)

- (15)Aida, M., Kanemori, M., Kubota, N., Matada, M., Sasayama, Y. and Fukumori, Y.: Distribution and population of free-living cells related to endosymbiont harbored in *Oligobranchia mashikoi* (a siboglinid polychaete) inhabiting Tsukumo Bay. *Microbes Environ.*, in press
- (16)Koizumi, T. and Sasayama, Y.: On the alpha-glucosidase-like activity detected in a siboglinid polychaete, *Oligobranchia mashikoi*. *Zool. Sci.*, in press
- (17)Suzuki, N., Omori, K., Nakamura, M., Tabata, M.J., Ikegame, M., Ijiri, K., Kitamura, K., Nemoto, T., Shimizu, N., Kondo, T., Matsuda, K., Ando, H., Kasahara, H., Nagase, M., Nara, M. and Hattori, A.: Scale osteoblasts and osteoclasts sensitively respond to low-gravity loading by centrifuge. *Biol. Sci. Space*, in press
- (18)Takahashi, H., Suzuki, N., Takagi, C., Ikegame, M., Yamamoto, T., Takahashi, A., Moriyama, S., Hattori, A. and Sakamoto, T.: Prolactin inhibits osteoclastic activity in the goldfish scale: A novel direct action of prolactin in teleosts. *Zool. Sci.*, in press

## 2) 総説

- (1) 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)
- (2) Suzuki, N., Somei, M., Seki, A., Reiter, R.J. and Hattori, A.: Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J. Pineal Res.*, in press
- (3) 鈴木信雄, 清水宣明, 北村敬一郎, 根本 鉄, 染井正徳, 池亀美華, 和田重人, 近藤 隆, 大森克徳, 中村正久, 井尻憲一, 田畑 純, 服部淳彦: 物理的刺激に対する骨芽細胞・破骨細胞の応答: 魚類のウロコを骨のモデルとした骨代謝の解析. *日本生体電気・物理的刺激研究会誌*, 印刷中

## 3) 著書

- (1) 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)
- (2) Srivastav, A.K., Yadav, S., Srivastav, S.K. and Suzuki, N.: The ultimobranchial gland in poikilotherms: Morphological and functional aspect. In “Experimental Endocrinology and Reproductive Biology”, Haldar et al. eds, Science Publishers, Enfield, NH, USA, 269-296 (2008)
- (3) 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
- (4) 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

## 【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, 井尻憲一, 田畑 純, 新実信夫, 服部淳彦: 加速度刺激による骨形成促進作用: 魚のウロコを用いた新規モデルシステムの開発. 第46回日本生体医工学会, 仙台 (2007, 4), *生体医工学*, 45 Suppl.: 110 (2007)
- (2) Kakikawa, M., Oda, Y., Sunata, S., Suzuki, N., Kitamura, K., Hattori, A., Iwasaka, M., Ueno, S. and Yamada, S.: Effects of extremely low frequency magnetic fields on osteoclasts and osteoblasts: Development of a new model system using fish scale. *Bioelectromagnetics Society 29th Annual Meeting, Kanazawa, Japan (2007.6)*

- (3) Suzuki, N.: Effect of physical stress on the osteoblasts and osteoclasts: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. The 6th International Satellite Symposium on the Comparative Endocrinology of Calcium Regulation (17th Scientific Meeting Second Joint Meeting of International Bone and Mineral Society), Montreal, Canada (2007, 6) (招待講演)
- (4) Suzuki, N., Somei, M., Kitamura, K. and Hattori, A.: Novel bromomelatonin derivatives activate osteoblasts and suppress osteoclasts simultaneously in the goldfish scale. 17th Scientific Meeting Second Joint Meeting of International Bone and Mineral Society, Montreal, Canada (2007, 6)
- (5) 小泉 隆, 山田哲也, 笹山雄一: 環形動物門マシコヒゲムシに存在する $\alpha$ -グルコシダーゼ様活性を示す蛋白質の生化学的研究. 第 78 回日本動物学会, 弘前 (2007, 9)
- (6) Ngamniyom A., 長濱嘉孝, 笹山雄一: バンコク郊外に棲むタイメダカの性比: 特に間性の個体の鰭の形態に注目して. 第 78 回日本動物学会, 弘前 (2007, 9)
- (7) 崎村宗徳, 上田 誠, 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囊の炭酸カルシウム結晶融解のホルモン調節. 第 78 回日本動物学会, 弘前 (2007, 9)
- (8) 鈴木信雄, 北村敬一郎, 清水宣明, 田畑 純, 池亀美華, 中村正久, 近藤 隆, 和田重人, 井尻憲一, 大森克徳, 服部淳彦: 超音波の機械的刺激及び加速度の重力刺激に対する骨芽・破骨細胞の応答. 第 78 回日本動物学会, 弘前 (2007, 9)
- (9) 池上太郎, 東 恭一, 服部淳彦, 鈴木信雄, 中村正久, 安東宏徳: キンギョのメラトニン受容体遺伝子の発現の日周変動. 第 78 回日本動物学会, 弘前 (2007, 9)
- (10) 小多雄太, 柿川真紀子, 鈴木信雄, 山田外史, 北村敬一郎, 服部淳彦, 廣田憲之, 岩坂正和, 上野照剛: 骨形成におよぼす交流磁場効果. 第 31 回日本応用磁気学会, 東京 (2007, 9)
- (11) 小多雄太, 柿川真紀子, 鈴木信雄, 山田外史, 廣田憲之: 骨形成におよぼす静磁場効果に関する研究. 平成 19 年度電気関係学会北陸支部連合大会, 福井 (2007, 9)
- (12) 古谷 遼, 小林正樹, 中村正久, 鈴木信雄, 服部淳彦: キンギョの再生ウロコを用いた骨形成関連遺伝子の発現解析. 第 32 回日本比較内分泌学会, 栃木 (2007, 10)
- (13) Thamamongood T., 田畑 純, 中村正久, 鈴木信雄, 服部淳彦: キンギョのウロコを用いた種々の骨破壊-骨再生モデル系の確立. 第 32 回日本比較内分泌学会, 栃木 (2007, 10)
- (14) 鈴木信雄, 小林史尚, 又多政博, 伊藤 靖, 大嶋雄治, 服部淳彦: トリブチルスズのカルシウム代謝に及ぼす影響と海洋細菌による浄化の試み. 第 32 回日本比較内分泌学会, 栃木 (2007, 10)
- (15) Ngamniyom, A., Magtoon, W., Nagahama, Y. and Sasayama, Y.: The comparison of expression rates of mRNA of androgen receptor, estrogen receptor and bone morphogenic protein between male and female fins in Japanese medaka, *Orizias latipes*. The International Symposium of Orizias Fish. Bangkok, Thailand (2007, 11)
- (16) Kitamura, K., Suzuki, N., Nemoto, T., Shimizu, N., Tabata, M.J., Wada, S., Omori, K., Nakamura, M., Kondo, T. and Hattori, A.: Effects of low-intensity ultrasound on bone metabolism in goldfish scale. International Symposium of Sonochemistry and Sonoprocessing 2007, Kyoto, Japan (2007, 12)
- (17) 鈴木信雄: 魚類 (キンギョ) のウロコを骨のモデルとして用いた評価システムの開発と応用: 微小重力環境下で進行する骨密度低下の治療・予防を目指して.  
宇宙基礎医学生物学研究に用いるべき最適なモデル生物に関するワークショップ  
(第3回筋骨格系の実験に向けたモデル生物), 東京 (2008, 1)

- (18)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, 久保田幸治, 奈良雅之, 服部淳彦: 擬似微小重力及び過重力下における骨代謝制御: 培養ウロコを用いた解析. 第 24 回宇宙利用シンポジウム, 東京 (2008, 1)
- (19)鈴木信雄, 北村敬一郎, 根本 鉄, 清水宣明, 池亀美華, 和田重人, 近藤 隆, 大森克徳, 中村正久, 井尻憲一, 田畑 純, 染井正徳, 服部淳彦: 物理的刺激に対する骨芽・破骨細胞の応答: 魚類のウロコを骨のモデルとした骨代謝の解析. 第 35 回日本生体電気・物理的刺  
激研究会, 新潟 (2008, 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) 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) 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) Prof. 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, 九州大学大学院農学研究院准教授 安東宏徳氏
- (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, 東京慈恵会医科大学医学部准教授 高田耕司氏
- (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, 新潟大学農学部助教 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薬学総合研究科教授 山本敏男氏, 同准教授 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 高橋明義氏, 同准教授 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, 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科准教授 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, 同准教授 兵藤 晋氏
- (14) 鈴木信雄: 交流磁場の骨代謝に及ぼす影響, 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 工学部准教授 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
- (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
- (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
- (23) 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，同准教授 唐原一郎氏
- (24) 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
- (25) 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准教授 大嶋雄治氏
- (26) 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）国際事業部長 関あずさ氏
- (27) 鈴木信雄：魚類の骨代謝におけるビタミンKの作用，神戸薬科大学教授 岡野登志夫氏，同講師 中川公恵氏

## 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

## 【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，600,000 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，700,000 円。

### 2) 受託研究費

- (1) 鈴木信雄（代表），独立行政法人 科学技術振興機構 平成19年度「シーズ発掘試験」，新規インドール化合物による骨粗鬆症治療薬の研究開発，2,000,000 円。

### 3) 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，797,250 円。

【利用状況】

1) 利用者及び研究目的

- |                 |  |
|-----------------|--|
| 4 / 5 ~ 4 / 7   | 三重大学教育学部<br>後藤 太一郎 教授 他2名<br>「イソヤムシの採集」                      |
| 6 / 19 ~ 6 / 23 | 名古屋大学大学院工学研究科<br>飯田 孝夫 教授 他1名<br>「海水中に含まれる微量ガスのラドン濃度の測定」     |
| 7 / 20 ~ 7 / 22 | 財団法人水産無脊椎動物研究所<br>池田 友之 他13名<br>「うみうしくらぶ磯の生物勉強会」             |
| 7 / 26 ~ 7 / 27 | 金沢大学大学院自然科学研究科<br>福森 義宏 教授 他20名<br>「研究資料に関する報告会」             |
| 8 / 2           | のと海洋ふれあいセンター<br>東出 幸真 主任技師<br>「海洋生物の調査」                      |
| 9 / 12 ~ 9 / 14 | 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科<br>池亀 美華 准教授<br>「骨組織縫合部における機械的刺激への反応に関する研究」 |
| 9 / 13          | のと海洋ふれあいセンター<br>坂井 恵一 普及課長<br>「研究打ち合わせ」                      |
| 10 / 11         | のと海洋ふれあいセンター<br>横井 将人 主事<br>「海洋生物の調査」                        |
| 11 / 1 ~ 11 / 2 | 静岡大学理学部<br>鈴木 雅一 准教授<br>「サケカルシトニンの測定法の修得」                    |
| 11 / 17         | スーパーサイエンスハイスクール<br>「海洋生物の観察」七尾高校                             |

- 11/27～11/28 金沢大学大学院自然科学研究科  
加藤 道雄 教授 他4名  
「九十九湾周辺地域の地質調査並びに採集試料の処理・整理」
- 12/12 のと海洋ふれあいセンター  
横井 将人 主事  
「海洋生物の採集」
- 1/17 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」
- 2/14 のと海洋ふれあいセンター  
東出 幸真 主任技師  
「海洋生物の調査」
- 2) 臨海実習等
- 7/4～7/5 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および磯の生物調査」
- 8/1～8/3 福井大学教育地域科学部  
前田 柁夫 教授 他26名  
「臨海実習」
- 8/9～8/10 金沢大学理学部生物学科  
中村 浩二 教授 他15名  
「臨海実習」
- 8/19～8/24 公開臨海実習  
東北大学 原田正晴 他10名
- 8/27～9/1 富山大学理学部生物学科  
小松 美英子 教授 他25名
- 9/26～9/28 金沢大学理学部生物学科  
福森 義宏 教授 他22名  
「臨海実習」

### 3) 利用者数及び船舶の使用状況

平成19年度臨海実験施設利用者数（延べ人数869人の内訳）

(月)	研究者		学生	
	学内	学外	学内	学外
4	1	8	4	6
5	2	10	9	0
6	10	6	64	4
7	4	60	38	120
8	2	17	58	264
9	7	7	68	24
10	1	2	3	0
11	2	6	8	40
12	1	2	2	0
1	0	2	0	0
2	1	2	2	0
3	0	2	0	0
合計	31	124	256	458

平成19年度臨海実験施設船舶使用回数

(月)	あおさぎ	くろさぎ
4	3	1
5	4	1
6	4	2
7	3	3
8	3	5
9	2	3
10	3	4
11	4	3
12	3	3
1	3	3
2	4	2
3	3	2
合計	39	32



## 研究報告

- \* バイブレーションによる加速度負荷に対する骨芽細胞及び破骨細胞の応答  
鈴木信雄, 北村敬一郎, 根本 鉄, 服部淳彦 (p 14-15)
  
- \* 新規プロモメラトニン誘導体の破骨細胞及び骨芽細胞に対する影響  
鈴木信雄, 染井正徳, 北村敬一郎, 服部淳彦 (p 16-17)
  
- \* 環形動物門マシコヒゲムシ (*Oligobrachia mashikoi*) の体前・体中部におけるEST解析  
岡田アキ (p 18)
  
- \* 環形動物門マシコヒゲムシ (*Oligobrachia mashikoi*) の栄養体の組織化学的・微細構造学的研究  
山田哲也 (p 19)
  
- \* 海底からのトリブチルスズ耐性細菌の単離  
鈴木信雄, 小林史尚, 又多政博, 伊藤 靖, 大嶋雄治, 服部淳彦 (p 20-21)

## バイブレーションによる加速度負荷に対する骨芽細胞及び破骨細胞の応答

鈴木信雄<sup>1</sup>, 北村敬一郎<sup>2</sup>, 根本 鉄<sup>2</sup>, 服部淳彦<sup>3</sup>

<sup>1</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; <sup>2</sup>〒920-0942 金沢市小立野 金沢大学大学院医学系研究科; <sup>3</sup>〒272-0827 千葉県市川市国府台 東京医科歯科大学 教養部

Nobuo SUZUKI<sup>1</sup>, Kei-Ichiro KITAMURA<sup>2</sup>, Tetsu NEMOTO<sup>2</sup>, Atsuhiko HATTORI<sup>3</sup>: Response of osteoblasts and osteoclasts to acceleration loading by vibration

魚類のウロコは、膜性骨に似た硬組織であり<sup>1)</sup>、I型コラーゲンからなる線維層とハイドロキシアパタイトから構成される骨質層の上に、骨芽細胞と破骨細胞が共存し、骨代謝を行っている。そこで我々はウロコの特徴に注目し、キンギョのウロコを用いて培養システムを開発した。キンギョの場合、1個体からほぼ均一な細胞活性をもつウロコを約100枚もサンプリングでき、ホルモン<sup>2, 3)</sup>、内分泌攪乱化学物質<sup>4, 5)</sup>、重金属<sup>6)</sup>等の様々な物質に対する影響を容易に解析できる。したがってウロコを用いると、株細胞や初代培養細胞では再現できない骨芽細胞と破骨細胞の相互作用が、生体内に近い状態で再現できる。そこで本研究では、バイブレーションによる加速度の影響を解析した。

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：バイブレーションによる加速度負荷の骨芽細胞及び破骨細胞に及ぼす影響

材料としてキンギョ (メス、体重50-80 g) を用いた。これらのキンギョをMS-222で麻酔し、キン

ギョからウロコを取った。そのウロコを1.5 ml用のエッペンドルフチューブ (BM機器) に入れた。次にそのチューブにHEPES (20 mM)

(pH 7.0) 及び抗生物質 (1%) を含む培地 (MEM、ICN Biomedicals Inc.) を500 µl加え、ウロコが回転により動かなくするために、綿球 (直径1 cm) を入れてウロコを固定した。このチューブをFig.1の装置

にセットし、0.5, 1, 2, 4, 6Gで5及び10分間処理し、その後6及び24時間培養し、ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞の活性を測定した。骨芽細胞及び破骨細胞の活性の測定方法は

Suzuki and Hattori (2002) により行った。

なおこの加速度発生装置は、サンプルステージに直接加速度計を設置し、それを増幅し、モニターにおいてリアルタイムで表示し、実際にチューブに加わっている加速度を計測しながら実験を行った。

実験2：ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞で発現している遺伝子に対する加速度負荷の影響

キンギョのウロコを取り、実験1と同様にFig.1の装置にチューブをセットし、0.5, 1, 2, 4, 6Gで

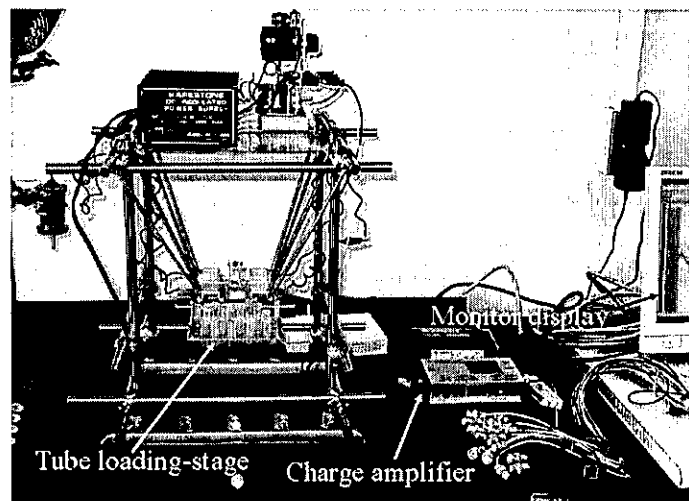


Fig. 1 Photograph of a custom-made G-load apparatus, providing a sine wave of acceleration ranging from 0.5-G to 12-G.

5及び10分間処理し、その後6及び24時間培養した。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。骨芽細胞のマーカであるestrogen receptor (ER) 及び破骨細胞のマーカであるtartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)の発現をRT-PCRにより解析した。

ウロコの骨芽細胞は1Gという低強度の重力刺激にも応答し、強度が上昇すると共に骨芽細胞の活性も上昇し、6Gで最も高くなった。なお、骨芽細胞の応答は主に6時間培養で有意に変化し、24時間培養では6Gのみ有意に上昇した。一方破骨細胞も0.5及び1Gという低強度の重力刺激でも反応し、6時間培養では変化せず、24時間でその活性が低下した。2Gで最も破骨細胞の活性抑制作用が強く、6及び24時間でも反応した。4及び6Gでは有意差が認められたが、徐々に破骨細胞の活性抑制作用が低下し、6時間培養でのみ有意差が認められた。

これらの細胞活性の変化は、骨芽及び破骨細胞のマーカであるER mRNAとTRAP mRNAの変化ともほとんど一致した。即ち、ER mRNAの発現は6時間培養において2、4及び6Gの負荷で有意に上昇し、TRAP mRNAの発現は、低強度（0.5及び1G）では24時間培養後に低下し、2、4及び6Gでは6時間培養で低下することが判明した。

本研究により得られた骨芽細胞と破骨細胞の反応は、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用により行われている可能性が高く、今後遺伝子発現を中心に調べていく予定である。

#### 引用文献

- 1) 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)
- 2) Suzuki, N., Suzuki, T. and Kurokawa, T.: Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler fish (seawater teleost), Peptides, 21: 115-124 (2000)
- 3) Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. J. Pineal Res., 33: 253-258 (2002)
- 4) Suzuki, N. and Hattori, A.: Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish, Life Sci., 73: 2237-2247 (2003)
- 5) 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)
- 6) 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)

#### 謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金（基盤研究（C）No. 18500375、代表：鈴木信雄）及び（財）日本宇宙フォーラム（第8回選定 宇宙環境利用に関する公募地上研究、代表：鈴木信雄）の援助により行われた。



## 新規ブロモメラトニン誘導体の破骨細胞及び骨芽細胞に対する影響

鈴木信雄<sup>1</sup>, 染井正徳<sup>2</sup>, 北村敬一郎<sup>3</sup>, 服部淳彦<sup>4</sup>

<sup>1</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; <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; <sup>3</sup>〒920-0942 金沢市小立野 金沢大学大学院医学系研究科; <sup>4</sup>〒272-0827 千葉県市川市国府台 東京医科歯科大学 教養部

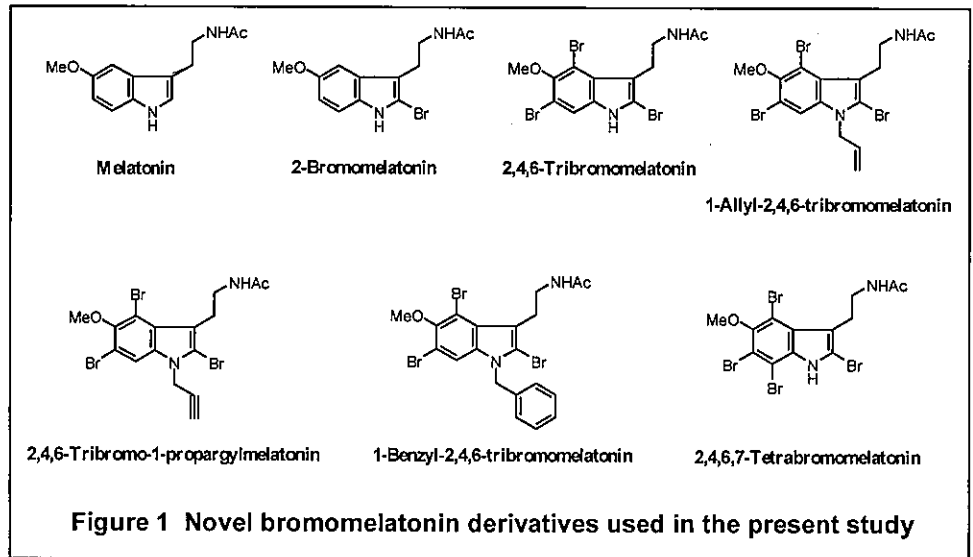
Nobuo SUZUKI<sup>1</sup>, Masanori SOMEI<sup>2</sup>, Kei-Ichiro KITAMURA<sup>3</sup>, Atsuhiko HATTORI<sup>4</sup>: Effects of novel bromomelatonin derivatives on osteoclasts and osteoblasts

前報告のように、ウロコは石灰化した骨基質の上に骨芽細胞と破骨細胞が共存しており、骨のモデルとして使用可能である。そこで本研究では、骨粗鬆症等の骨疾患の治療薬の開発を行うため、新規ブロモメラトニン誘導体を合成し、骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析した。

材料としてキンギョ (*Carassius auratus*) を使い、以下の実験を行った。

実験1: 新規ブロモメラトニン誘導体の破骨細胞及び骨芽細胞に及ぼす影響

材料としてキンギョ (メス、体重 50-80 g) を用いた。これらのキンギョをMS222で麻酔し、キンギョからウロコを取った。そのウロコをHEPES (20 mM) (pH 7.0) 及び抗生物質 (1%) を含



む培地 (MEM, ICN Biomedicals Inc.) に加え、メラトニン、2-ブロモメラトニン、2,4,6-トリブロモメラトニン、1-アリル-2,4,6-トリブロモメラトニン、1-プロパルギル-2,4,6-トリブロモメラトニン、1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニン及び2,4,6,7-テトラブロモメラトニン (Figure 1) の破骨細胞及び骨芽細胞に対する作用を評価した。培養時間は6 時間で、濃度は $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-4}$  Mでその作用を解析した。骨芽細胞及び破骨細胞の活性の測定方法はSuzuki and Hattori (2002) により行った。

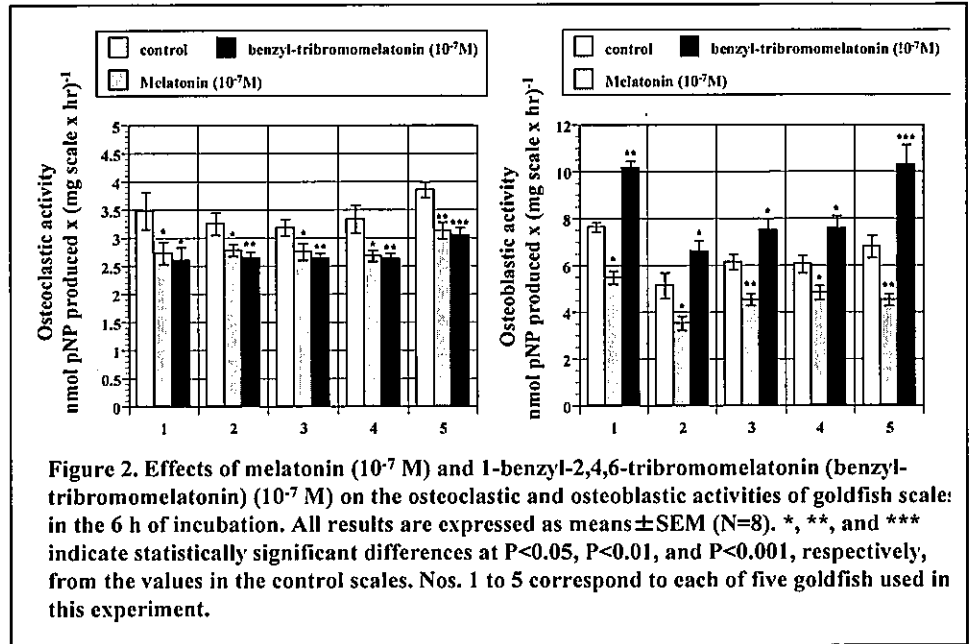
次に最も効果があった化合物において、6時間及び18時間培養で、 $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  Mにおいて、骨に対する作用をメラトニンと比較し、詳細に調べた。

実験2: 1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニンのエストロゲン受容体mRNA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1と同様に1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニンを加えて6 時間培養した。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。その後、骨芽細胞のマーカであるestrogen receptor (ER) mRNAの発現に対する影響をSuzuki et al. (2004) の方法に従い、解析した。さらにこの化合物の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を確認するため、 $10^{-7}$  Mのメラトニンと1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニンを培地に添加し、実験1の結果の再現性を確認した。

その結果、Br原子を3個導入した誘導体では、破骨細胞の活性抑制作用は強く、メラトニンと同程度であった。しかしBr原子を1及び4個入れた誘導体は、メラトニンの方が破骨細胞の活性抑制作用は強かった。一方、メラトニンは骨芽細胞の活性を低下させたが、Br原子を導入した全ての誘導体は、骨芽細胞の活性を上昇させることが判明した。特に、1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニンの作用は強く、この化合物を用いて、詳細に調べた。

1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニンの破骨細胞の活性抑制作用は、メラトニンのそれよりも強く、6時間培養で $10^{-10}$  Mでも効果がみられた。また1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニンはメラトニンとは異なり、骨芽細胞の活性を上げ、その作用は18時間でも持続しており、 $10^{-8}$  Mでも効果がみられた。



骨芽細胞のマーカーであるER mRNAの発現は、1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニン処理で有意に上昇することも判明した。さらに実験1と同様にして、メラトニンは破骨細胞及び骨芽細胞の両方の活性を低下させた (Figure 2)。しかし、1-ベンジル-2,4,6-トリブロモメラトニンは破骨細胞の活性を低下させ、骨芽細胞の活性を上昇させた (Figure 2)。

したがって、この新規ブロモメラトニン誘導体は骨疾患の治療薬として有望である。現在、骨疾患のモデルとして用いられている卵巣除去ラットや低カルシウム食を与えたラットを使用した動物実験により、この化合物の作用を確認中である。

#### 引用文献

- 1) Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, 33: 253-258 (2002)
- 2) 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)

#### 謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金 (基盤研究 (C) No. 18500375、代表: 鈴木信雄) 及び (財) 日本宇宙フォーラム (第8回選定 宇宙環境利用に関する公募地上研究、代表: 鈴木信雄) の援助により行われた。

## 環形動物門マシコヒゲムシ(*Oligobrachia mashikoi*)の体前・体中部におけるEST解析

岡田アキ

〒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

Aki OKADA: Expressed Sequence Tag analysis in the head body and middle body of the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Annelida)

石川県能登半島九十九湾に生息するマシコヒゲムシは、発生の過程で退化した消化管に相当する部位に、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、共生細菌が合成した炭水化物を貯える栄養貯蔵細胞とから成る栄養体という器官を持ち、栄養体に共生するイオウ酸化細菌が合成する炭水化物を栄養源として生きている。これまでヒゲムシでは、組織学的・形態学的研究が中心に行われてきたが、近年、マシコヒゲムシの持つ細胞外巨大ヘモグロビンの立体構造が明らかにされるなど、生化学的研究も進んできた。さらに、分子生物学的手法を用いて分類も行われている。本研究では、遺伝子の網羅的な機能解析において有効な手段である、Expressed Sequence Tags解析(EST解析)により、発現しているタンパク質の特徴や塩基配列から推測される遺伝子の情報を明らかにすることを試みた。

解析試料は、ヒゲムシの最も特徴的な器官でもある“ヒゲ”や心臓など、生存に重要な役割を担っていると予想される器官が多く存在する体前・体中部より得て、total RNAからmRNAを精製後、それを鋳型としたcDNAクローンを作製し、BLASTxによる相同性検索を行った。本研究では、少なくとも30%以上相同な部分配列を持ち、且つE-value = e-05以下のものを、相同性有りという基準とした。

その結果、579クローン中40.5%のクローンで機能性タンパク質が、12.6%のクローンでリボソームタンパク質が、9.9%のクローンでチトクローム関連タンパク質をコードするアミノ酸配列が見出された。また、38.2%のクローンが機能や構造がまだ明らかになっていないタンパク質として分類された。最も多く認められた配列はリボソームタンパク質に相同的な配列で、環形動物は勿論のこと、原始的な脊索動物であるナメクジウオの40SリボソームタンパクS18とも高い相同性を示し、ムカデ[節足動物門・ムカデ綱]の持つ翻訳開始因子 $\gamma$ サブユニットとも高い相同性を示した。したがって、DNAからmRNAの転写・翻訳に至る、生物の生存にとって非常に根本的なプロセスに関するタンパク質は、系統学的な位置を超えて広く、高い相同性を持って保存されているということが示された。次いで多く見つかった配列はチトクローム関連タンパク質に相同的な配列で、その約70%がヒゲムシの一種である*Galathea brachiosum*のチトクローム酸化酵素サブユニットI・II・IIIと、平均して71.2%という高い相同性を示した。また、エネルギー生産に関わるタンパク質では、ミミズ[環形動物門・貧毛綱]の持つATP合成酵素F0サブユニット6とも高い相同性を示したが、*G. brachiosum*のチトクローム関連タンパク質と比較するとその相同性は10%程度落ち、還元的な生活環境という状況が関係しているか否かは不明であるが、近縁の種間でより高度にその配列は保存されていた。また、マシコヒゲムシの生存において重要な役割を担う酸素結合・運搬関連のタンパク質と相同性のある配列は、全クローンの約1.8%を占め、海棲無脊椎動物の中でも特にSiboglinidaeに属するガラパゴスハオリムシ及び*G. brachiosum*の間で高度に保存された、重要なタンパク質であるということが改めて確認された。更に、細胞骨格・運動を支持するタンパク質と相同性のある配列も全体の約1.7%を占め、全ての生理現象に細胞空間的に関与する重要なタンパク質であるというだけでなく、本種の場合には特に、このタンパク質に、将来共生細菌の生活場所の提供の意味を見出すことが出来れば興味深い。

現時点では、ヒゲムシが属する環形動物門に関する分子生物学的データが少ないことが解析の限界となっているが、定期的にデータベースで検索を行うことによって、マシコヒゲムシの発現遺伝子に関する情報を少しでも蓄積していくことが今後の課題である。

(本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科 生物科学専攻 岡田アキ君の修士論文の一環として行われた)

# 環形動物門マシコヒゲムシ(*Oligobrachia mashikoi*)の栄養体の組織化学的・ 微細構造学的研究

山田哲也

〒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

Tetsuya YAMADA: Histochemical and ultra-structural study in the trophosome of the beard worm, *Oligobrachia mashikoi* (Annelida)

マシコヒゲムシ (*Oligobrachia mashikoi*) は石川県能登半島九十九湾に生息する、環形動物門 Siboglinidae科の動物である。本種は口も消化管も持たず、体の後部にある栄養体という組織に共生する化学合成細菌が合成する炭水化物をエネルギー源として生きている。これまでの電子顕微鏡を用いた研究によると細菌が共生しているバクテリオサイトと名付けられた細胞においてリソソームにより共生細菌を消化している像も報告されているので、細菌を直接の栄養源にしている可能性もある。また、バクテリオサイトに直接、接している栄養貯蔵細胞には多数のグリコーゲン顆粒の存在も認められている。しかしながら、それらの細胞の間で糖をどのように輸送するかについてはほとんど見解がない。また、バクテリオサイト内で共生細菌がどのように分布するかについてもまったく知られていない。したがって、本研究では、これら2つの問題の解明を目指した。

栄養体において、バクテリオサイトと栄養貯蔵細胞は少なくとも通常の染色法を用いた光学顕微鏡レベルでは常に隣り合っているように見える。したがって、バクテリオサイトにおいて共生細菌が作り出した有機物を糖に変え、栄養貯蔵細胞へと輸送するための機構があるのではないかと考えた。本研究ではグルコース輸送タンパク質の glucose transporter-2 (GLUT-2) に注目し、GLUT-2抗体を用いた蛍光免疫染色法により組織化学的に、ウエスタンブロッティング法により生化学的に、GLUT-2の検出を試みた。蛍光免疫染色の結果、栄養体を含む体後部ではバクテリオサイトに、栄養体を含まない体前部では表皮にそれぞれ強い反応があった。また、ウエスタンブロッティングの結果、マシコヒゲムシから抽出されたタンパク質の中にラット十二指腸由来のGLUT-2とほぼ同じ分子量(約60KDa)を持つタンパク質が存在することが分かった。これらの結果は、本種において糖の輸送を考える上で極めて興味深い。

マシコヒゲムシの共生細菌は自身のエネルギー産生のためにイオウを必要とする。そのために、本種は有毒な硫化水素を無毒化して血管中を運ぶことの出来る特殊なヘモグロビンを発達させている。また、種々の生理学的代謝も血管系を仲介して行われることは論を待たない。したがって、栄養体における毛細血管の分布は極めて重要な役割を担っていると考えられる。本研究では、まず、腹血管への墨汁を注入して毛細血管の分布の立体的可視化を試みた。その結果、栄養体における毛細血管は腹血管と背血管とを結ぶ血管とその血管同士をつなぐ血管が組み合わさり、網目状を呈していることが分かった。さらに、組織切片にした標本を観察すると栄養貯蔵細胞とバクテリオサイトは直接隣り合うのではなく、その間に毛細血管が介在することが分かった。このような毛細血管の分布は、両方の細胞において毛細血管を介した物質のやり取りを行ううえで極めて有効と考えられる。また、島根大学松野煒先生との共同研究において、電子顕微鏡観察により、バクテリオサイトにおいてリソソームに消化されている細菌が毛細血管に近いか否か調べると、リソソームに消化されている細菌のうち、その78%の細菌が毛細血管の近くに存在していた。また、リソソームに消化されている細菌を含むバクテリオサイトのほとんどが毛細血管と接していることが分かった。これらの結果は共生細菌の分布と毛細血管とが深く関わっていることを示唆している。

(本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科 生物科学専攻 山田哲也君の修士論文の一環として行われた)

## 海底からのトリブチルスズ耐性細菌の単離

鈴木信雄<sup>1</sup>, 小林史尚<sup>2</sup>, 又多政博<sup>1</sup>, 伊藤 靖<sup>3</sup>, 大嶋雄治<sup>3</sup>, 服部淳彦<sup>4</sup>

<sup>1</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; <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; <sup>3</sup>〒920-1192 福岡市東区箱崎 九州大学大学院農学研究院; <sup>4</sup>〒272-0827 千葉県市川市国府台 東京医科歯科大学 教養部

Nobuo SUZUKI<sup>1</sup>, Fumihisa KOBAYASHI<sup>2</sup>, Masahiro MATADA<sup>1</sup>, Sei ITO<sup>3</sup>, Yuji OSHIMA<sup>3</sup>, Atsuhiko HATTORI<sup>4</sup>: Isolation of tributyltin-resistant bacteria from the sediment in Tsukumo Bay of Noto Peninsula

トリブチルスズ (TBT) は、船・漁網に対する貝類や海藻類の付着を防ぐために日本でも大量に使用されてきた物質であり、主に防汚剤として船底塗料に入れて使われてきた。TBTには内分泌攪乱作用があり、貝類や魚のオス化を誘導し、免疫系にも毒性を示す。さらにSuzuki et al. (2006) は、低濃度 ( $10^{-8}$  M) のTBTがメジナとベラの骨芽細胞 (骨を作る細胞) の活性を抑制することを初めて証明した。したがって、低濃度のTBTでも日本海に生息する生物に影響を及ぼす可能性が高い。そこで本研究では、TBTを分解する海洋細菌を海底から単離し、微生物を利用した環境修復を目指す。

能登町小木の九十九湾の沿岸、水深12 mの砂泥を採泥器 (大起理化工業 (株)、DIK-190-A1型) で採取した。最近、著者らはフェノール分解能を有する海洋細菌を単離した (Kobayashi et al., 2007)。本研究では、この方法を応用して、菌のスクリーニングには、TBTのみを栄養源とした培地を用いて実験した。即ち、ろ過滅菌した海水に10 mg/LになるようにTBT (塩化トリブチルスズ、和光純薬工業 (株)) を添加し、その海水50 mlに採取した砂泥 (1 g) を加えた。なお、TBTを海水に添加するときは、まず少量のアセトンで溶解し、その後ジメチルスルホキシドに溶かし、海水に添加した。

TBT入りの海水で砂泥に含まれる細菌を4 °Cで1週間静地培養した後、TBT (10 mg/L) を含む寒天培地に塗抹し、さらに1週間培養 (15 °C) した。その後寒天培地から海洋細菌のコロニーを釣り上げ、TBTの浄化試験を行った。即ち、培地 (ペプトン0.1%, 酵母エキス0.05%及びTBT (10 mg/L) を含む海水培地) にコロニーを懸濁して培養した。4 °Cで2週間静地培養した後、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、UV-1200型) を用いて測定した。菌体密度を測定後、遠心により菌体を除き、その上清中のTBTの濃度を (株) テクノスルガ・ラボに分析を依頼した。TBTは培養中にチューブに付着する可能性がある。そこでTBTの分解率は、菌を植菌していない培地 (コントロール培地) から回収されたTBTの濃度に対する割合で算出した。

単離した菌体は、培地と等量のグリセロールを加え、一部は-80 °Cで保管して、残りを (株) テクノスルガ・ラボに依頼し、16S Ribosomal RNA遺伝子 (16S rDNA) の配列解析により菌体の同定を行った。PCR産物の増幅及びサイクルシーケンスの一連の操作はMicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使用して実験を進めた。相同性検索にはMicroSeq Microbial Identification System Software V.1.4.1を用い、データベースとしてはアポロンDB細菌基準株データベース (株式会社テクノスルガ・ラボ) を使用して解析した。

TBT (10 mg/L) 入り海水で培養後、寒天培地で培養した結果、多数のTBT耐性細菌のコロニーが

検出できた。その中で大きなコロニーを20個釣り上げ、TBT (10 mg/L)、ペプトン及び酵母エキスを含む海水培地に懸濁した。2週間培養後、菌体の増殖が良い株を4種類選び、SK-1、SK-2、SK-3及びSK-4株と命名した。菌の増殖は、SK-1、SK-2、SK-4、SK-3株の順だったが、TBTの分解率はSK-2 (55.5%) 及びSK-3株 (55%) が高く、SK-1株は低い値 (15%) を示した。そこで、TBTの分解率の最も高かったSK-2株の同定を行った。

菌体からDNAを抽出し、PCR法により16S rDNA断片を増幅し、シーケンスした (Figure 1)。さらに近隣接合法により、系統解析を行った結果、*Pseudoalteromonas*属に属することは判明したが、菌の同定はできなかった。SK-2株は、新種の海洋細菌である可能性が高い。

SK-2:

```
TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATG
GTCGAGCGGTAACAGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGCGGACGGG
GTAATGCTTGGGAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGC
TACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTGGCTCTCGCCTTTAGATTGG
AAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATCCCTA
GGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTA
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGC
GTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGG
GAGTTAATACCTCACATCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCGGCTAACT
TGCCAGCAGCCGCGGTAAT
```

### Figure 1 Partial sequence of 16S rDNA in SK-2 strain

本研究では、低温で静地培養したにもかかわらず、半分以上のTBTが減少していた。今後詳細な培養条件の検討やTBTの分解過程を調べ、SK-2株を用いた海洋細菌による浄化法を確立していく予定である。

#### 引用文献

- 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) 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)

## 【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)
助教	鈴木信雄 (nobuo@kenroku.kanazawa-u.ac.jp) 博士 (理学) 専攻 骨学、比較内分泌学、環境生物学 (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	曾良美智子 (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2年

Arin Ngamniyom

博士前期課程2年

岡田アキ  
山田哲也

博士前期課程1年

浅田光子  
板津秀彰  
水野文敬



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