

臨海実験施設  
研究概要・年次報告 第11号  
2012.4 ~ 2013.3



石川シティーカレッジ、集魚灯による採取実習

## 活 動 報 告

* 研究概要	2
* 研究業績	4
* 研究発表及び研究活動	5
* 研究交流	6
* 研究費	7
* 利用状況	9
* 研究報告	14

## 【研究概要】

### 無脊椎動物及び脊椎動物の生理・生化学的研究

マリンバイオ共同推進機構（JAMBIO）の助成を受けて、ヌタウナギのカルシトニン様物質の構造決定を試みている。これまで最古の脊椎動物として知られるヌタウナギ（*Eptatretus burgeri*）において鰓後腺は存在しないと言われているが、その血液中にカルシトニン様分子の存在を確認し、さらにラットを用いたバイオアッセイにより、ラットの血中カルシウム濃度を低下させる活性があることを報告している（Suzuki, 1995）。本年度は、ヌタウナギのカルシトニン受容体に注目して実験を行った。ヌタウナギの脳からカルシトニン受容体遺伝子を単離、2350 bp の部分配列を決定した。N末端の細胞外領域にホルモン結合ドメインを複数持つ魚類に特徴的なカルシトニン受容体で、フグカルシトニン受容体と70%のアミノ酸配列類似性を示した。

さらに関口助教を中心として、原索動物ナメクジウオのカルシトニンの研究を行っている。本研究は（公益財団法人）サントリー生命科学財団の佐竹 炎博士との共同研究によるものである。ナメクジウオは、脊椎動物に近縁な無脊椎動物であり脊椎動物カルシトニンの起源を探る目的で、ナメクジウオのカルシトニンの存在を検討した結果、ナメクジウオゲノムから3つのカルシトニンを同定した。さらにナメクジウオのカルシトニン受容体及び受容体修飾蛋白を同定し、これらがナメクジウオカルシトニンペプチドの内因性の受容体であることを明らかにした。

### 様々な物理的刺激に対する骨組織の応答に関する研究：魚類のウロコを用いた解析

魚のウロコを骨のモデルとして、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鈴木准教授が中心となり研究を進めている。

2008年3月に国際宇宙ステーション「きぼう」船内実験室第2期利用に向けた候補テーマとして採択され、2010年5月にスペースシャトル（アトランティス号）でキンギョのウロコが打ちあがり、野口聡一宇宙飛行士により、宇宙実験が実施された。僅か2年の準備期間で宇宙実験が行われたのは、ウロコという非常に優れた材料を用いたおかげである。ウロコは低温（4℃）でも約2週間保管可能であり、低温保管後も重力刺激に保管前と同様に応答する。現在、宇宙実験のサンプルの解析を行っている。本年度は、山本 樹君の卒業論文研究の一環として、大規模な地上実験を実施した。この地上実験では、3次元クリノスタットを用いた疑似微小重力に対する応答を調べ、宇宙実験の結果と合わせて論文にまとめる予定である。さらに2012年7月21日に、JAXAとの共催で市民向けのシンポジウムを実施した。このシンポジウムは、動物学会関東支部の公開講演会の一環として実施し、鈴木准教授と矢野幸子氏が招待講演を行った。これまでの宇宙実験に関する展示も同時に行われ、好評であった。宇宙実験では、新規メラトニン誘導体の作用についても解析している。この研究は、東京医科歯科大学の服部淳彦教授と金沢大学の染井正徳名誉教授との共同研究であり、2004年から継続して研究しているテーマである。既に、国内特許（タイトル：インドール誘導体及びその用途、JP Patent 4014052号）及び米国特許（title: Indole derivative and application thereof、8,053,462）を取得済である。本年度、JSTのa-stepの助成を受けて、メラトニン誘導体の骨折ラットにおける影響を評価して、現在解析中である。メラトニンは、原核生物であるシアノバクテリアにも存在し（赤塚亮介君の卒業論文研究）、歴史の古い生理活性物質である。今後、メラトニンを含め、その誘導体の生理作用を調べていきたい。

磁場刺激に対する応答についても解析を行った。2011年にサンプリングしたウロコを本年度に解析した。これまで骨芽細胞の培養系や*in vivo*の系により、低強度の静磁場を用いて骨形成に及ぼす影響を調べた報告があるが、結果に一致を欠き、効果が見られたという結果と変化がなかったという結果がある。そこで物質・材料研究機構の超伝導マグネットを用いて、12Tの静磁場の骨代謝に対する影響を再生ウロコの培養系により解析した。12Tの静磁場により、再生ウロコの破骨細胞の活性が低下

することが判明した。3個体中2個体において有意差が認められ、1個体においても破骨細胞の活性低下傾向がみられた。この結果は、通常ウロコを用いた実験の結果と一致する。なお、骨芽細胞の活性は、少なくとも今回の実験では、有意な変化はなかった。今後は、遺伝子レベルで詳細な解析を行う予定である。なお、本研究は、環日本海域環境研究センターの山田外史教授、柿川真紀子助教、物質・材料研究機構 強磁場研究 センター 廣田憲之主任研究員との共同研究により実施した。

### 海洋汚染に関する研究

金沢大学医薬保健研究域薬学系の早川和一教授、鈴木准教授、関口俊男助教との共同研究により、多環芳香族炭化水素類（PAH）の内分泌攪乱作用を調べている。多環芳香族炭化水素（PAH）類は化石燃料の燃焼に伴って生成して大気中に放出される非意図的生成化学物質の一つであり、その中にはベンゾ[a]ピレンのように発癌性/変異原性を有するものが多い。また、PAH類は原油にも含まれており、1997年1月に日本海で発生したロシア船籍タンカーナホトカ号の重油流出事故では、流出した大量の重油による海洋生態系への影響が危惧された。しかし、重油残留海域で採集した魚類に癌が見出された報告はこれまでなく、重油汚染海水で孵化した稚魚に脊柱彎曲が観察されている。したがって、魚類に及ぼす重油の影響は発癌ではなく、骨代謝異常であることを強く示唆しているが、その発症機序は不明のままである。そこで、ウロコを用いてPAH類の骨に対する作用を解析した。ウロコの*in vitro*の培養系で解析した結果、水酸化PAH（P450により代謝されたPAHの代謝産物）の内分泌攪乱作用が、PAH自体よりも強いことが示唆された（Suzuki et al., Life Sci., 2009）。現在、富山大学遺伝子実験施設の田渕圭章准教授と高碕一朗助教との共同研究により、GeneChip解析を行い、詳細な機構を解析中である。

さらにダイオキシンの1種であるPCBに対する影響も評価した。PCBの研究は、谷内口孝治氏の博士論文の一環として行った。PCB118をキンギョの腹腔内に投与すると、血液中のカルシウム濃度が有意に上昇した。さらにウロコの破骨細胞の活性も上昇したので、PCBはウロコの破骨細胞の活性を寄せた結果として、骨吸収を促進している可能性が示された。そこでウロコの培養系を用いて、*in vitro*の実験を行った。その結果、*in vivo*の結果が再現され、ウロコの破骨細胞の活性が上昇して、破骨細胞で発現しているマーカー遺伝子の発現が有意に上昇した。さらに骨芽細胞で発現して、破骨細胞を活性化させる因子であるReceptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand（RANKL）の発現を調べた結果、PCBで処理するとRANKLの発現が上昇することもわかった。以上のことから、PCB118は破骨細胞を活性化して骨吸収を促進することが明らかになった。今後、海産魚類（メジナ）に対するPCB118の作用を解析する予定である。

### 放射線の骨に対する影響評価

本年度は、放射線医学総合研究所の松本謙一郎主任研究員との共同研究により、重粒子線がん治療装置を用いて、重粒子線の骨に対する影響を評価した。これまで、骨に対する重粒子放射線の影響を解析した報告は少なく、骨転移したがんを治療するためには、重粒子放射線の骨に対する影響を解析する必要がある。ウロコのシステムは、重油中に含まれる環境汚染物質も検出した実績（Suzuki et al., Life Sci., 2009）やカドミウムを $10^{-13}$  Mのカドミウムを検出した実績（Suzuki et al., J. Bone Miner. Metab., 2004）があり、放射能に対する影響をモニターできる可能性が高い。そこで、ウロコに対する重粒子線の影響を評価した。さらに富山大学近藤 隆教授、同大学田渕圭章准教授、同大学和田重人講師との共同研究により、重粒子放射線に対する作用の再現性を調べるため、X線を用いて詳細な機構を調べている最中である。なお、本研究は上西篤志君の卒業論文研究の一環として行われた。

## 【研究業績】

### 1) 学術論文

- (1) Suzuki, N., Sekiguchi, T., Satake, H., Kato, K., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Danks, J.A., Martin, T.J., Hattori, A., Nakano, M., Kakikawa, M., Yamada, S., Ogoshi, M., Hyodo, S., Yamaguchi, Y., Chowdhury, V.S., Hayakawa, K., Funahashi, H., Sakamoto, T., and Sasayama, Y.: Cloning of two members of the calcitonin receptor family from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in osmoregulation. *Gene*, 499: 90-95 (2012)
- (2) Omori, K., Wada, S., Maruyama, Y., Hattori, A., Kitamura, K., Sato, Y., Nara, M., Funahashi, H., Yachiguchi, K., Hayakawa, K., Endo, M., Kusakari, R., Yano, S., Srivastav, A.K., Kusui, T., Ejiri, S., Chen, W., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Kondo, T., Sasayama, Y., Nishiuchi, T., Nakano, M., Sakamoto, T. and Suzuki, N.: Prostaglandin E2 increases both osteoblastic and osteoclastic activities in the scales of goldfish and participates in the calcium metabolism in goldfish. *Zool. Sci.*, 29: 499-504 (2012)
- (3) Sekiguchi, T., Ogasawara, M., Satake, H.: Molecular and functional characterization of cionin receptors in the ascidian, *Ciona intestinalis*: the evolutionary origin of the vertebrate cholecystokinin/gastrin family. *J. Endocrinol.*, 213: 99-106 (2012)
- (4) Thamamongood, T.A., Furuya, R., Fukuba, S., Nakamura, M., Suzuki, N. and Hattori, A.: Expression of osteoblastic and osteoclastic genes during spontaneous regeneration and autotransplantation of goldfish scale: A new tool to study intramembranous bone regeneration. *Bone*, 50: 1240-1249 (2012)
- (5) Yano, S., Masuda, D., Kasahara, H., Omori, K., Higashibata, A., Asashima, M., Ohnishi, T., Yatagai, F., Kamisaka, S., Furusawa, T., Higasitani, A., Majima, H., Nikawa, T., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Suzuki, H., Shimazu, T., Hattori, A., Tanigaki, F., Shirakawa, M., Takaoki, M., Nakamura, T., Yoshimura, Y., Suzuki, N. and Ishioka, N.: Excellent thermal control ability of cell biology experiment facility (CBEF) on ground basis experiments and board experiments in kibo of the international space station. *Biol. Sci. Space*, 26:12-20 (2012)
- (6) Kakikawa, M., Yamamoto, T., Chowdhury, V.S., Satoh, Y., Kitamura, K., Sekiguchi, T., Funahashi, H., Omori, K., Endo, M., Yano, S., Yamada, S., Hayakawa, K., Chiba, A., Srivastav, A.K., Ijiri, K., Hattori, A. and Suzuki, N.: Determination of calcium sensing receptor in the scales of goldfish and induction of its mRNA expression by acceleration loading. *Biol. Sci. Space*, 26: 26-31 (2012)
- (7) Kitamura, K., Satoh, Y., Inari, M., Takahira, K., Okesaku, W., Endo, M., Yano, S., Yamamoto, T., Kaminishi, A., Akatsuka, R., Hattori, A. and Suzuki, N.: Osteoblasts and osteoclasts in goldfish regenerating scales respond to mechanical loading: Analysis of osteoblastic and osteoclastic marker mRNA expression. *Biol. Sci. Space*, 26: 42-46 (2012)
- (8) Yano, S., Kitamura, K., Satoh, Y., Nakano, M., Hattori, A., Sekiguchi, T., Ikegame, M., Nakashima, H., Omori, K., Hayakawa, K., Chiba, A., Sasayama, Y., Ejiri, S., Mikuni-Takagaki, Y., Mishima, H., Funahashi, H., Sakamoto, T. and Suzuki, N.: Static and dynamic hypergravity responses of osteoblasts and osteoclasts in medaka scales. *Zool. Sci.*, in press
- (9) Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Chowdhury, V.S., Endo, M., Chiba, A., Sekiguchi, T., Nakano, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Wada, S., Mishima, H., Hattori, A. and Suzuki, N.: Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Env. Sci. Poll. Res.*, in press
- (10) Rai, R., Mishra, D., Srivastav, S.K., Suzuki, N., Srivastav, A.K.: Effects of lead nitrate on histocytological alterations of corpuscles of Stannius of stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Iran. J. Toxicol.*, in press
- (11) Kumar, A., Prasad, M., Srivastava, K., Srivastav, S.K., Suzuki, N. and Srivastav, A.K.: Cytohistopathological alterations in the liver of azadirachtin treated catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci., Section B: Biol. Sci.*, in press
- (12) Srivastav, A.K., Rai, R., Suzuki, N., Mishra, D. and Srivastav, S.K.: Effects of lead on the plasma electrolytes of a freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*. *Int. Aquat. Res.*, in press
- (13) Tripathi, S., Suzuki, N. and Srivastav, A.K.: Response of serum minerals (calcium, phosphate and magnesium) and endocrine glands (calcitonin cells and parathyroid gland) of wistar rat after chlorpyrifos administration. *Microsc. Res. Tech.*, in press
- (14) Srivastav, A.K., Rai, R., Tripathi, S., Mishra, D., Srivastav, S.K. and Suzuki, N.: Histo-cytological responses of the prolactin cells of the catfish *Heteropneustes fossilis* to cadmium exposure. *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.*, in press
- (15) Kitamura, K., Takahira, K., Inari, M., Satoh, Y., Hayakawa, K., Tabuchi, Y., Ohgai, K., Nishiuchi, T., Kondo, T., Mikuni-Takagaki, Y., Chen, W., Hattori, A. and Suzuki, N.: Zebrafish scales respond

differently to in vitro dynamic and static acceleration: analysis of interaction between osteoblasts and osteoclasts. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, in press

- (16) 鈴木信雄, 大森克徳, 井尻憲一, 北村敬一郎, 根本 鉄, 清水宣明, 笹山雄一, 西内 巧, 染井正徳, 池亀美華, 田畑 純, 中村正久, 近藤 隆, 古澤之裕, 松田恒平, 田淵圭章, 高崎一郎, 和田重人, 安東宏徳, 笠原春夫, 永瀬 睦, 久保田幸治, 土屋美和, 谷川直樹, 吉馴重徳, 大嶋一成, 鈴木 徹, 遠藤雅人, 竹内俊郎, 江尻貞一, 小萱康徳, 佐藤和彦, 渡邊竜太, 森部絢嗣, 三島弘幸, 前田斉嘉, 内田秀明, 田谷敏貴, 林 明生, 中村貞夫, 杉立久仁代, 芹野 武, 嶋津 徹, 矢野幸子, 関 あずさ, 舟橋久幸, 奈良雅之, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究: 新規メラトニン誘導体のウロコ及び骨疾患ラットの骨代謝に対する作用. *Space Utilization Res.*, 28: 165-168 (2012)

## 2) 総説・解説等

- (1) Satake, H. and Sekiguchi, T.: Toll-like receptors of deuterostome invertebrates. *Front Immunol.*, 3: 34 (2012)
- (2) Satake, H., Aoyama, M., Sekiguchi, T. and Kawada, T.: Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors. *Protein Pept. Lett.*, in press
- (3) 鈴木信雄, 舟橋久幸, 耿 啓達, 柿川真紀子, 山田外史, 廣田憲之, 北村敬一郎, 清水宣明, 早川和一, 三島弘幸, 岩坂正和, 上野照剛, 大森克徳, 矢野幸子, 池亀美華, 田淵圭章, 和田重人, 近藤 隆, 服部淳彦: 魚類のウロコを用いた評価系の開発と骨代謝研究への応用. *まぐね/Magnetics Jpn*, 7: 174-178 (2012)
- (4) 関口俊男: カタユウレイボヤにおける Cionin 受容体の分子機能解析: 脊椎動物 CCK/gastrin family の進化的起源について, *比較内分泌学雑誌* 146: 163-166 (2012)

## 3) 著書

- (1) Suzuki, N. and Sakamoto, T.: Comparative and general aspects of calcium homeostasis and its hormonal regulations. In "Evolution of calcium homeostasis and its hormonal regulation in vertebrates". Suzuki, N. and Sakamoto, T., eds. *Virtual special issues in Zoological Science*
- (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

## 【研究発表及び研究活動】

### 1) 研究発表及び講演会

- (1) 鈴木信雄: ウロコを用いた宇宙実験. 宇宙メラトニン研究会. 金沢大学 臨海実験施設, 石川県 (2012,5/18)
- (2) Mishima, H., Hattori, A., Suzuki, N., Tabata, M.J., Kakei, M., Miake, Y. and Suzuki, M.: The connection between the periodicity of incremental lines in the tooth dentin and the regulation by melatonin. 39th Annual Congress of The European Calcified Tissue Society (2012)(Stockholm, Sweden), May 19-23, 2012
- (3) Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Hattori, A. and Suzuki, N.: Polychlorinated biphenyl disrupts bone metabolism in goldfish. 7th International PCB Workshop (Arcachon, France), May 27-31, 2012
- (4) 服部淳彦, 池亀美華, 矢野幸子, 鈴木信雄: 宇宙(微小重力)における破骨細胞の亢進とメラトニンによる抑制効果—「きぼう」実験棟における研究成果. 第12回日本抗加齢医学会サテライトシンポジウム: 宇宙医学とアンチエイジング医学, (2012, 6/23)
- (5) 鈴木信雄: キンギョのウロコを使って宇宙実験: 宇宙に行くと骨を壊す細胞はどのように変化するのか? 動物学会関東支部公開講演会, 東京医科歯科大学, 東京都 (2012, 7/21) (招待講演)
- (6) 矢野幸子: 宇宙に行った動物と「きぼう」実験棟での今後の展開. 動物学会関東支部公開講演会, 東京医科歯科大学, 東京都 (2012, 7/21) (招待講演)
- (7) 関口俊男, 高橋弘樹, 小笠原道生, 桑迫健二, 鈴木信雄, 笹山雄一, 佐竹炎: ナメクジウオにおけるカルシトニン受容体と受容体共役蛋白(RAMP)の分子機能. 日本動物学会第83回大会, 大阪大学, 大阪府 (2012, 9/13-15)
- (8) 鈴木信雄: 油流出事故が海洋動物に及ぼす影響. 東アジアの大気・海洋汚染と健康影響に関するワークショップ, 金沢大学, 石川県 (2012, 10/13)
- (9) 鈴木信雄, 川部季美, 中野 淳, 赤塚涼佑, 北村敬一郎, 服部淳彦, 田淵圭章, 高崎一郎, 近藤隆, 鳥羽 陽, 早川和一: 魚類の骨代謝に対する多環芳香族炭化水素類の影響評価: 再生ウロコを用いた解析. 平成24年度日本動物学会中部支部例会, 信州大学, 長野県 (2012, 11/17-18)

- (10)鈴木信雄, 池亀美華, 北村敬一郎, 矢野幸子, 服部淳彦: 宇宙空間におけるウロコの破骨細胞の形態及び細胞活性の変化. 平成 24 年度日本動物学会中部支部例会, 信州大学, 長野県 (2012, 11/17-18)
- (11)上西篤志, 丸山雄介, 中野真樹, 松本謙一郎, 大森克徳, 田淵圭章, 和田重人, 近藤 隆, 遠藤雅人, 北村敬一郎, 早川和一, 清水宣明, 関口俊男, 服部淳彦, 鈴木信雄: 骨モデル (魚のウロコ) に対する宇宙放射線 (重粒子線) の影響. 平成 24 年度日本動物学会中部支部例会, 信州大学, 長野県 (2012, 11/17-18)
- (12)山本 樹, 池亀美華, 田淵圭章, 矢野幸子, 遠藤雅人, 近藤 隆, 中野真樹, 北村敬一郎, 関口俊男, 関 あずさ, 清水宣明, 服部淳彦, 鈴木信雄: 過重力及び擬似微小重力に対する破骨細胞及び骨芽細胞の応答解析. 平成 24 年度日本動物学会中部支部例会, 信州大学, 長野県 (2012,11/17-18)
- (13)関口俊男: 原索動物をモデルとしたペプチド・ホルモン研究. 第 37 回日本比較内分泌学会サテライト企画 第3回ペプチド・ホルモン研究会, 福井大学, 福井県 (2012, 11/29)
- (14)赤塚涼佑, 高根正之, 海老原充, 村上明男, 井上和仁, 関口俊男, 鈴木信雄, 服部淳彦: シアノバクテリアにおけるメラトニンの同定. 第 37 回日本比較内分泌学会大会, 福井大学, 福井県 (2012,11/29-12/1)
- (15)谷内口孝治, 松本典子, 関口俊男, 羽賀雄紀, 鈴木元治, 松村千里, 鶴川正寛, 奥野俊博, 中野武, 北村敬一郎, 川部季美, 鳥羽陽, 早川和一, 服部淳彦, 鈴木信雄: ポリ塩化ビフェニル (PCB-118) は魚の破骨細胞を活性化させ骨吸収を誘起する. 第 37 回日本比較内分泌学会大会, 福井大学, 福井県 (2012,11/29-12/1)
- (16)黒田美翔, 舟橋久幸, 鬼木弘明, 宇都理佳, 筒井和義, 鈴木信雄, 服部淳彦: キンギョの再生ウロコにおける隆起線形成リズム. 第 37 回日本比較内分泌学会大会, 福井大学, 福井県 (2012,11/29-12/1)
- (17)関口俊男, 高橋弘樹, 小笠原道生, 桑迫健二, 笹山雄一, 佐竹 炎, 鈴木信雄: 脊索動物における Calcitonin (CT) /CT gene-related peptide family の分子進化. 第 37 回日本比較内分泌学会大会, 福井大学, 福井県 (2012,11/29-12/1)
- (18)関口俊男: 原索動物を用いたホルモン・ペプチドの進化についての研究, 自然システム学セミナー, 金沢大学, 石川県 (2012,12/21)
- (19)鈴木信雄: 骨モデル (ウロコ) に対する放射線の作用. 宇宙メラトニン研究会. 東京医科歯科大学, 東京都 (2013,3/5)
- (20)三島弘幸, 井上昌子, 服部淳彦, 鈴木信雄, 田畑 純, 篁 光夫, 松本 敬, 里村一人, 見明康雄: 象牙質の成長線形成機構と体内時計の情報伝達分子であるメラトニンの分泌リズムの関係, かがわ国際会議場, 香川県 (2013, 3/28-31)

## 【研究交流】

### 1) 共同研究

- (1) 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
- (2) 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
- (3) 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
- (4) 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
- (5) 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, 新潟大学農学部准教授 杉山稔恵氏
- (6) 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
- (7) 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, 同教授 森山俊介氏
- (8) 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
- (9) 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
- (10) 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

- (11) 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
- (12) 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 東北区水産研究所 資源生産部 増養殖管理グループ長 黒川忠英氏
- (13) 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
- (14) 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，同大学准教授 田淵圭章氏，同大学助教 高崎一朗氏，同大学 講師 和田重人氏，昭和大学 舟橋久幸氏，JAXA 主任研究員 矢野幸子氏
- (15) 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
- (16) 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
- (17) 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
- (18) 鈴木信雄：静磁場の骨代謝に及ぼす影響，独立行政法人 物質・材料研究機構 強磁場研究センター 主任研究員 廣田憲之氏，同研究センター 特別研究員 木村史子氏
- (19) 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
- (20) 鈴木信雄：魚のウロコを用いた宇宙生物学的研究，亜細亜大学経済学部教授 大森克徳氏，宇宙航空研究開発機構主任研究員 矢野幸子氏，富山大学大学院理工学研究部教授 松田恒平氏
- (21) 鈴木信雄：トリブチルスズの海域汚染に関する研究，九州大学大学院農学研究院教授 大嶋雄治氏、同助教 島崎洋平氏
- (22) 鈴木信雄：インドール化合物のラットの骨代謝に及ぼす影響，ハムリー（株）国際事業部部長 関あずさ氏，神奈川歯科大学教授 高垣裕子氏，朝日大学歯学部教授 江尻貞一氏，同准教授 小萱 康徳氏，同講師 佐藤和彦氏，同助教 渡邊竜太
- (23) 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，同准教授 中川公恵氏
- (24) 鈴木信雄：魚のウロコで発現している遺伝子のメカニカルストレスに対する応答，富山大学生命科学先端研究センター 遺伝子実験施設 准教授 田淵圭章氏、同助教 高崎一朗氏
- (25) 鈴木信雄：耳石の石灰化に対するメラトニンの作用，茨城県立医療大学教授 大西 健氏
- (26) 鈴木信雄：海産魚類及び海産無脊椎動物のカルシトニンの構造進化及び作用進化に関する研究，(財)サントリー生物有機科学研究所・第二研究部部長・主幹研究員 佐竹 炎氏，同主席研究員 川田剛士氏
- (27) 鈴木信雄：海洋細菌に関する研究，富山大学生物圏地球科学科教授 中村省吾氏，同准教授 田中大祐氏
- (28) 鈴木信雄：放射線の骨に対する影響評価，放射線医学総合研究所主任研究員 松本謙一郎氏，富山大学大学院医学薬学研究部教授 近藤 隆氏，同大学准教授 田淵圭章氏，同大学 講師 和田重人氏
- (29) 関口俊男：ナメクジウオカルシトニン機能の研究，基礎生物学研究所形態形成部門助教 高橋弘樹氏
- (30) 関口俊男：原索動物神経ペプチドの研究，千葉大学大学院融合科学准教授 小笠原道生氏
- (31) 関口俊男：ナメクジウオ受容体活性調節蛋白の機能についての研究，宮崎大学フロンティア科学実験統合センター 生命科学部門准教授 桑迫健二氏

## 2) 各種活動

### 社会活動

- (1) 鈴木信雄：石川県環境影響評価委員会委員，2010 - 現在

### 学会活動

- (1) 鈴木信雄：日本動物学会中部支部地区委員，2012 - 現在
- (2) 鈴木信雄：日本宇宙生物科学会評議員，2012 - 現在

## 【研究費】

### 1) 科学研究費

- (1) 鈴木信雄（代表），基盤研究（C），新規硬組織モデルを用いた微小重力・過重力下での骨吸収及び骨形成の機構解析，1,200,000 円。
- (2) 関口俊男（代表），若手研究（B），ペプチド受容体修飾蛋白の共進化機構の解明：ナメクジウオ Calcitonin family の研究，1,696,665 円

- (3) 鈴木信雄（分担），基盤研究（B），多環芳香族炭化水素類が環境・生体で新たに獲得する毒性に関する戦略研究（代表：早川和一，金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授）  
分担金 2012年 300,000円（2012年の直接経費 total 2,000,000円）
- (4) 鈴木信雄（分担），挑戦的萌芽研究，重油汚染海水で生まれた魚の脊柱彎曲の機構解明と新規解毒タンパク質によるレスキュー（代表：早川和一，金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授）  
分担金 2012年 400,000円（2012年の直接経費 total 1,500,000円）
- (5) 鈴木信雄（分担），基盤研究（C），新規糖尿病モデルを用いた骨代謝機構の解析と運動による改善に関する研究（代表：北村敬一郎，金沢大学医薬保健研究域保健学系・准教授）  
分担金 2012年 100,000円（2012年の直接経費 total 110万円）
- (6) 鈴木信雄（分担），厚生労働省科学研究費，化学物質リスク研究事業，ステロイドホルモン受容体に作用する化学物質の構造活性相関に基づく毒性評価システム。  
分担金 2012年 3,000,000円（代表：早川和一，金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授）  
（2012年の直接経費 total 23,920,000円）

## 2) 受託研究費

- (1) 企業側代表：関あずさ（ハムリー株式会社），研究者代表：鈴木信雄，科学技術振興機構 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム A-step. フィージビリティスタディステージ シーズ顕在化タイプ，新規メラトニン誘導体の骨折治癒モデル動物に対する作用及び骨形成機構の解析. 1,000,000円（2012年の直接経費 total 4,000,000円）

## 3) 共同研究費

- (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，1,500,000円
- (2) 鈴木信雄（代表），ハムリー株式会社，宇宙実験を利用した新規骨疾患治療薬の開発，200,000円

## 4) その他

- (1) 鈴木信雄（代表），マリンバイオ共同推進機構公募利用研究助成，海産無脊椎動物および脊椎動物のカルシトニンの構造及び生理的役割：特に円口類について. 200,000円
- (2) 鈴木信雄（代表），平成24年度 戦略的研究推進プログラム 海外連携促進支援，宇宙実験を目指した国際共同研究. 600,000円

## 【受賞】

- (1) 鈴木信雄，平成24年度 クリタ水・環境科学研究優秀賞，クリタ水・環境科学振興財団「骨代謝異常を評価する迅速・高感度なシステムの開発：魚類のウロコを骨モデルとして用いた解析」

## 【新聞発表】

- (1) 鈴木信雄，平成24年8月4日（北國新聞）：全国共同利用教育拠点に認定
- (2) 鈴木信雄・関口俊男，平成24年9月4日（北國新聞）：全国公開臨海実習に関する記事
- (3) 鈴木信雄・関口俊男，平成24年9月6日（北陸中日新聞）：全国公開臨海実習に関する記事
- (4) 鈴木信雄，平成25年1月7日（北國新聞、富山新聞）：新規骨疾患治療薬に関する記事

## 【研究指導】

### 卒業論文研究

赤塚涼佑：シアノバクテリアにおけるメラトニンの同定，自然システム学類，生物学コース，学士（理学），鈴木信雄

上西篤志：骨モデル(魚のウロコ)に対する放射線の影響，自然システム学類，生物学コース，学士（理学），鈴木信雄

山本 樹：過重力及び疑似微小重力に対する骨芽細胞及び破骨細胞の応答解析，自然システム学類，生物学コース，学士（理学），鈴木信雄

### 博士論文研究

矢野幸子：Development of a fish scale *in vitro* culture apparatus for space biological experiments and gravity response of osteoblasts and osteoclasts in fish scales, 魚のウロコを用いた宇宙生物実験用培養実験装置の開発とウロコの骨芽細胞および破骨細胞の重力応答，自然科学研究科，生命科学専攻，生物多様性動態学講座，博士（理学），鈴木信雄

## 【利用状況】

### 1) 来訪者及び研究目的

- 4 / 18 ~ 4 / 20 金沢大学理工学域 4年  
山本 樹 他 2名  
「海藻に含まれる生理活性物質に関する演習」
- 4 / 27 ~ 4 / 30 東海大学海洋学部  
野原 健司 講師 他 7名  
「潜水・釣りによる沿岸性魚類の採集実習」
- 5 / 2 国立富山高等専門学校  
水本 巖 教授 他 1名  
「寄り回り波観測に関する演習」
- 5 / 18 ~ 5 / 19 金沢大学医薬保健学域 4年  
稲荷 雅人 他 1名  
「魚の骨代謝に関する研究打ち合わせ」
- 6 / 6 ~ 6 / 7 九州大学大学院農学研究院  
大嶋 雄治 教授 他 2名  
「トリブチルスズ及び多環芳香族炭化水素の生物影響にする研究」
- 7 / 2 ~ 7 / 6 金沢大学環日本海域環境研究センター  
岩本 洋子 博士研究員 他 1名  
「大気観測及び観測装置の保守管理」
- 7 / 5 ~ 7 / 6 金沢大学環日本海域環境研究センター  
原 和崇 博士研究員 他 2名  
「大気観測及び観測装置の保守管理」
- 7 / 17 ~ 7 / 20 東海大学海洋学部  
野原 健司 講師 他 4名  
「潜水・釣りによる沿岸性魚類の採集実習」
- 7 / 31 ~ 8 / 3 金沢大学環日本海域環境研究センター  
岩本 洋子 博士研究員 他 1名  
「金沢大学能登学舎にて、大気観測装置の保守および校正」
- 8 / 6 ~ 8 / 7 石川県立大学生物資源環境学部  
柳井 清治 教授 他 7名  
「海洋生態学実習」
- 8 / 17 のと海洋ふれあいセンター  
坂井 恵一 普及課長 他 1名  
「海洋生物の採集」

- 8 / 24 筑波大学下田臨海実験センター  
堀江 健生 助教  
「ホヤトランスジェニック解析について研究打ち合わせ」
- 8 / 25 ~ 8 / 26 のとスノーケリング研究会  
川原 英 他8名  
「能登浅海域における動植物観察」
- 9 / 10 ~ 9 / 11 金沢大学環日本海域環境研究センター  
山田 外史 教授 他14名  
「研究室ゼミ合宿」
- 9 / 18 ~ 9 / 21 九州大学大学院農学研究院  
大嶋 雄治 教授 他1名  
「環境汚染物質の生物影響評価」
- 9 / 19 ~ 9 / 21 金沢大学人間社会学域  
柳 在圭 教授 他17名  
「研究室ゼミ合宿」
- 9 / 26 ~ 9 / 27 北里大学海洋生命科学部  
三宅 裕志 講師 他1名  
「研究打ち合わせ及び刺胞類サンプリング」
- 9 / 26 ~ 9 / 28 東海大学海洋学部  
野原 健司 講師 他6名  
「潜水・釣りによる沿岸性魚類の採集実習」
- 10 / 1 ~ 10 / 2 金沢大学環日本海域環境研究センター  
松木 篤 准教授  
「大気観測装置の保守及び校正」
- 10 / 1 ~ 10 / 4 金沢大学環日本海環境研究センター  
岩本 洋子 博士研究員 他1名  
「大気観測装置の保守及び校正」
- 10 / 17 ~ 10 / 20 筑波大学下田臨海実験センター  
中野 裕昭 助教  
「平板動物の採集・固定」
- 10 / 19 ~ 10 / 20 金沢大学環日本海域環境研究センター  
松木 篤 准教授 他19名  
「能登学舎における授業」
- 10 / 29 ~ 10 / 30 金沢大学環日本海域環境研究センター  
松木 篤 准教授  
「大気観測装置の保守及び校正」

- 10 / 29 ~ 10 / 31 金沢大学環日本海域環境研究センター  
岩本 洋子 博士研究員 他1名  
「大気観測装置の保守及び校正」
- 11 / 15 のと海洋ふれあいセンター  
東出 幸真 専門員 他1名  
「海洋生物の調査」
- 11 / 27 国立富山高等専門学校  
水本 巖 教授 他1名  
「寄り回り波観測に関する演習」
- 12 / 3 ~ 12 / 5 金沢大学環日本海域環境研究センター  
岩本 洋子 博士研究員 他1名  
「大気観測装置の保守及び校正」
- 12 / 16 のと海洋ふれあいセンター  
濱野 琢哉 主事 他1名  
「海洋生物の採集」
- 12 / 17 富山大学理学部  
中村 省吾 教授 他1名  
「ウニを用いた発生生物実験」
- 1 / 15 のと海洋ふれあいセンター  
東出 幸真 専門員  
「海洋生物の調査」
- 1 / 15 ~ 1 / 18 金沢大学環日本海域環境研究センター  
松木 篤 准教授 他3名  
「大気観測装置の保守及び校正」
- 1 / 28 ~ 1 / 29 金沢大学理工研究域  
山口 正晃 教授  
「バフンウニの採集」
- 2 / 21 のと海洋ふれあいセンター  
池森 貴彦 専門員 他1名  
「海洋生物の採集」
- 3 / 3 甲南大学理学部  
島井 光太郎 研究員 他1名  
「ホヤの研究デスクッション」
- 3 / 12 ~ 3 / 18 ゴラクプール大学  
Ajai K.Srivastav教授  
「プロモメラトニンのキンギョのカルシウム代謝に関する研究」

- 3 / 13 ~ 3 / 14 葛西臨海水族園 飼育展示課  
 小木曾 正造 調査員  
 「ミサキギボシムシの標本の観察」
- 3 / 23 金沢大学環日本海域環境研究センター  
 中村 浩二 教授 他21名  
 「能登ふるさと未来塾の研修会」
- 2) 臨海実習**
- 6 / 29 ~ 7 / 1 石川県立七尾高校  
 平野 敏 教諭 他42名  
 スーパーサイエンスハイスクール  
 「海洋生物の観察」
- 7 / 4 ~ 7 / 5 富山県立砺波高校  
 盛合 浩司 教諭 他40名  
 「臨海実習」
- 7 / 31 ~ 8 / 1 石川県立伏見高校  
 見砂 智子 教諭 他39名  
 「臨海実習」
- 8 / 22 ~ 8 / 23 金沢大学理工研究域  
 中村 浩二 教授 他21名  
 「生物学実習4」
- 8 / 31 金沢工業大学バイオ化学部  
 藤永 薫 教授 他11名  
 「臨海実習」
- 9 / 2 ~ 9 / 7 金沢大学環日本海域環境研究センター  
 鈴木 信雄 准教授 他23名  
 「公開臨海実習」
- 9 / 24 ~ 9 / 26 金沢大学理工研究域  
 田岡 東 助教 他25名  
 「生物学実習2」

### 3) 利用者数及び船舶の使用状況

平成24年度臨海実験施設利用者数（延べ人数1,580人の内訳）

(月)	研究者		学生	
	学内	学外	学内	学外
4	0	7	42	36
5	2	19	40	7
6	0	16	38	86
7	44	21	42	190
8	8	33	86	38
9	16	11	221	166
10	17	8	57	0
11	3	38	29	22
12	3	5	19	32
1	14	2	20	24
2	0	2	16	20
3	6	34	19	21
合計	113	196	629	642

平成24年度臨海実験施設船舶使用回数

(月)	あおさぎ	くろさぎ
4	2	4
5	4	2
6	3	3
7	4	3
8	4	5
9	2	6
10	2	3
11	3	4
12	3	4
1	4	7
2	3	6
3	3	4
合計	37	51

## 研究報告

\* 脊索動物におけるCalcitonin /Calcitonin gene-related peptide family の分子進化  
関口俊男 他 (p 15-16)

\* シアノバクテリアにおけるメラトニンの同定  
赤塚涼佑, 関口俊男, 鈴木信雄 (p 17)

\* 骨モデル(魚のウロコ)に対する放射線の影響  
上西 篤志, 関口俊男, 鈴木信雄 (p 18)

\* 過重力及び擬似微小重力に対する骨芽細胞及び破骨細胞の応答解析  
山本 樹, 関口俊男, 鈴木信雄 (p 19)

\* 宇宙実験用の細胞培養実験装置の温度制御に関する研究  
矢野幸子 (p 20-21)

## 脊索動物における Calcitonin / Calcitonin gene-related peptide family の分子進化

関口俊男<sup>1</sup>、高橋弘樹<sup>2</sup>、小笠原道生<sup>3</sup>、桑迫健二<sup>4</sup>、笹山雄一<sup>1</sup>、佐竹 炎<sup>5</sup>、鈴木信雄<sup>1</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>〒444-0867 愛知県岡崎市明大寺町西郷中38, 基礎生物学研究所 発生生物学領域 形態形成部門, <sup>3</sup>〒263-8522 千葉県稲毛区弥生町1-33, 千葉大学大学院 融合科学研究科 ナノサイエンス専攻 ナノバイオロジーコース, <sup>4</sup>〒889-1692 宮崎市清武町木原5200番地, 宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター 生命科学研究部門 生理活性物質探索病態解析分野, <sup>5</sup>〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1, 公益財団法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所 統合生体分子機能研究部

Toshio SEKIGUCHI, Hiroki TAKAHASHI, Michio OGASAWARA, Kenji KUWASAKO, Yuichi SASAYAMA, Honoo SATAKE, Nobuo SUZUKI: Molecular evolution of Calcitonin (CT)/CT gene-related peptide family in chordates.

### 【はじめに】

脊索動物は、我々ヒトを含む脊椎動物、ホヤを含む尾索動物、ナメクジウオを含む頭索動物で構成される。これらの動物は、背側の神経管、脊索、原側の消化管という形質を共有していることなどから、共通祖先を有すると考えられている。近年の比較ゲノム解析の結果、従来の説とは異なり、ナメクジウオよりもホヤが脊椎動物に近縁である説が有力となっている。このようなことから、ホヤとナメクジウオは、無脊椎動物から脊椎動物への進化を研究するモデルとなりうる。

Calcitonin (CT) は、脊椎動物において、CT gene-related peptide (CGRP), Adrenomedullin, amylin, CRSP と共に CT/CGRP family を形成している。これらの脊椎動物において多様化した CT/CGRP family ペプチドは、CT 受容体 (CTR) と CTR 様受容体 (CLR) という互いに相同性の高い GPCR を共有する。リガンド特異性は、1 回膜貫通型の RAMP との共役によって規定されている。

これまで無脊椎動物において、CT/CGRP family は同定されておらず、その起源は不明であった。そこで、これら多様化した CT/CGRP family システムの進化機構を解明するために、はじめに原索動物におけるペプチド進化のモデルであるカタユウレイボヤを用い研究を行った。その結果、CT 様ペプチドと CTR 候補を同定した。さらに祖先に遡るために、我々は頭索動物動物門のフロリダナメクジウオを用い、CT/CGRP family を探索した。

### 【実験方法】

1. フロリダナメクジウオのゲノムデータベースから、相同性検索により、CT, CTR/CLR, RAMPsを検索し、それぞれの遺伝子をクローニングした。CTR/CLR と RAMPs については、発現体構築のた

めに、全長をクローニングし、ORFを発現ベクターpCDNA6.2に組み込んだ。

- クローニングしたナメクジウオCTを合成した。CTRとRAMPの発現ベクターをCOS7細胞にトランスフェクトし、48時間後、合成CT を添加した後、CatchPoint cAMP Fluorescent Assay kitにより細胞内cAMP濃度を測定し、ペプチドとの反応性を検討した。

### 【実験結果及び考察】

CT/CGRP family ペプチド、受容体に加え、RAMPを同定した。これらは、脊椎動物のカウンターパートとアミノ酸配列において高い類似性を持っていた。さらに COS7細胞を用いた解析より、受容体とRAMPが共発現することで、CT ペプチドと反応することを明らかにした。

これまでの脊椎動物における知見と、私たちが明らかにした原索動物における成果により、脊索動物の共通祖先には、CT/CGRP family ペプチド、受容体、RAMPのセットが既に存在していたこと、脊椎動物へと進化した段階で、受容体が遺伝子重複し、ペプチドの多様化が起こったと考えられる。以上のことから、本研究により、無脊椎動物から脊椎動物への進化の過程における CT family 多様化の機構の一端を明らかにすることができた。

### 【参考文献】

- 1) Sekiguchi, T., *et al.*: Further EST analysis of endocrine genes that are preferentially expressed in the neural complex of *Ciona intestinalis*: Receptor and enzyme genes associated with endocrine system in the neural complex. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 150:233-245 (2007)
- 2) Sekiguchi, T., *et al.*: Calcitonin in a protochordate, *Ciona intestinalis*-the prototype of the vertebrate calcitonin/calcitonin gene-related peptide superfamily. *FEBS J.*, 276:4437-4447 (2009)
- 3) Kawada, T., Ogasawara, M., Sekiguchi, T., *et al.*: Peptidomic analysis of the central nervous system of the protochordate, *Ciona intestinalis*: homologs and prototypes of vertebrate peptides and novel peptides. *Endocrinology*, 152:2416-2427 (2011)
- 4) Suzuki, N., Sekiguchi, T., *et al.*: Cloning of two members of the calcitonin-family receptors from stingray, *Dasyatis akajei*: Possible physiological roles of the calcitonin family in osmoregulation. *Gene*, 499:326-331 (2012)
- 5) Sekiguchi, T., Ogasawara, M., Satake, H.: Molecular and functional characterization of cionin receptors in the ascidian, *Ciona intestinalis*: the evolutionary origin of the vertebrate cholecystokinin/gastrin family. *J. Endocrinol.*, 213: 99-106 (2012)

### 【謝辞】

本研究の一部は、科学研究費補助金の研究助成の援助により行われた。本研究の内容は、平成24年11月30日に福井大学において開催された第37回比較内分泌学会で関口俊男氏が発表した。

## シアノバクテリアにおけるメラトニンの同定

赤塚涼佑<sup>1</sup>, 関口俊男<sup>1</sup>, 鈴木信雄<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

Ryousuke AKATSUKA<sup>1</sup>, Toshio SEKIGUCHI<sup>1</sup>, Nobuo SUZUKI<sup>1</sup> : Identification of melatonin in cyanobacterium

メラトニンは分子量232のアミンであり、生体内では生体リズムの同調作用、フリーラジカルの消去、抗酸化酵素の活性化など様々な働きが知られている。メラトニンは、トリプトファンを出発物質として、5-ヒドロキシトリプトファン、セロトニン（5-ヒドロキシトリプタミン）、N-アセチルセロトニンを経て合成される。特に、セロトニンからN-アセチルセロトニンへの合成が重要であり、この酵素の発現が夜間に高くなることにより、夜間にメラトニンの合成が促進され、ヒトでは睡眠を促す。このN-アセチルセロトニンの合成に関与するのが、arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) であり、この酵素がメラトニン合成を調節している因子の一つである。

これらの研究は、主にヒトを含めた脊椎動物で行われており、最近、植物や真核生物の酵母にもメラトニンが存在することが報告された。しかしながら、原核生物におけるメラトニンの研究は行われておらず、メラトニンの同定もされていない。そこで本研究では、シアノバクテリアに注目してメラトニンの同定及びメラトニンの代謝経路の研究を行った。

*Synechococcus* PCC7942を実験材料として用いた。このシアノバクテリアに260 luxの光を12時間の明暗サイクルで照射して、26°Cで培養した。培地は、無機塩のみのBG-11を用いた。培養後、遠心により培地と菌体に分離して、それぞれからメラトニンを抽出した。抽出後、蛍光検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によりメラトニンを定量した。その後、メラトニンのピークを分取して、液体クロマトグラフ/タンデム質量分析器 (LC/MS/MS) によりメラトニンの同定を行った。さらに、シアノバクテリアにおけるメラトニンの代謝経路を調べるため、中間代謝産物及びAANATの活性も測定した。

シアノバクテリアを培養した培地及び菌体からクロロホルムを用いてメラトニンの抽出を行い、その後、HPLCにより解析した。その結果、培地及び菌体からメラトニンの標準物質と同じ位置にピークが検出され、それぞれ68 pg及び5 pgであった。次に、HPLCのピークをLC/MS/MSにより分析すると、このピークはメラトニンであると同定された。またHPLCによる分析から、培地中にセロトニン及びN-アセチルセロトニンも検出された。さらに、菌体を超音波破碎後、AANAT活性を測定した結果、本研究で用いたシアノバクテリアからAANAT活性を確認することができた。

以上のことから、シアノバクテリア (*Synechococcus* PCC7942) からLC/MS/MSによりメラトニンを同定できた。また、メラトニンの中間代謝産物であるセロトニン及びN-アセチルセロトニンも検出でき、菌体中にAANAT活性も確認できた。今後、シアノバクテリアにおけるメラトニンの役割を調べるために、様々な条件下でシアノバクテリアを培養してメラトニンとの関係を調べていきたいと考えている。

(本研究は、金沢大学自然システム学類生物学科 赤塚涼佑氏の卒業論文の一環として行われた)

## 骨モデル（魚のウロコ）に対する放射線の影響

上西 篤志<sup>1</sup>, 関口俊男<sup>1</sup>, 鈴木信雄<sup>1</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  
Atsushi KAMINISHI<sup>1</sup>, Toshio SEKIGUCHI<sup>1</sup>, Nobuo SUZUKI<sup>1</sup>: Effect of radiation such as X ray and heavy ion beams on fish scales as a model of bone

放射線を生物に照射するとラジカルが発生し、ラジカルがDNAにダメージを与え、アポトーシスを誘引する。この放射線の作用を応用して癌治療が行われている。しかしながら、骨は放射線の感受性が低いことから他の組織と比較して研究が少ない。現在、骨に転移した癌に対する放射線治療が行われており、臨床や*in vivo*の研究が多く、それぞれの細胞の単独培養の研究はあるが、骨基質を含み破骨細胞と骨芽細胞が共存する状態で*in vitro*で解析した研究はない。さらに本研究では、メラトニンという物質にも着目した。メラトニンは松果体から分泌される分子量232.28のアミンで、ラジカルをスカベンジする作用がある。この作用により、放射線照射によって生じたラジカルを除去して間接的に細胞を放射線からレスキューすることが報告されている。このレスキュー作用についても表皮細胞や神経細胞などでは調べられているが、骨の細胞では報告されていない。

以上のように、骨については、放射線に関する基礎研究が遅れている。一方、硬骨魚類のウロコは骨と同様に骨基質上で破骨細胞と骨芽細胞が共存しており、骨のモデルとして使用可能であり、ヒトの骨と同様にホルモン応答や重力応答することがわかっている。そこで本実験では、放射線の骨に対する作用をウロコの培養用系を用いて調べ、さらにメラトニンの放射線に対するレスキュー作用についても調べた。

実験材料として淡水魚のキンギョ (*Carassius auratus*) を用いた。これらのキンギョをMS-222で麻酔し、ウロコを抜去した。その後、キンギョを25°Cで2週間飼育後に再生ウロコを採取して、実験に用いた。再生ウロコは、抗生物質(1%)を含む培地(L-15培地、Gibco)に入れて放射線照射まで、4°Cで保管した。放射線として重粒子放射線及びX線を用いた。重粒子放射線は、放射線医学総合研究所の重粒子線がん治療装置を用いて実験した。炭素線290(MeV/u)を8,16,32,64 Gyの強度で照射し、その後24時間、15°Cで培養し、cell counting kit -8を用いて生細胞活性を測定した。X線の実験は、富山大学放射線基礎生物学教室のX線照射装置を用いて、重粒子放射線と同様に実験を行った。

重粒子放射線を8,16,32,64 Gyの強度で照射すると、生細胞の活性が徐々に低下して、64 Gyでは86%に低下した。しかし、メラトニンを添加するとレスキュー作用がみられ、メラトニンの作用は、8 Gyで最も効果が高かった。そこで、8 Gy照射したウロコからtotal RNAを抽出して破骨細胞及び骨芽細胞のマーカー遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより調べた。その結果、破骨細胞のマーカー遺伝子(CathepsinK)と骨芽細胞のマーカー遺伝子(RANKL)において、重粒子放射線に対するメラトニンのレスキュー作用を確認することができた。一方、X線においても、2,4,8 Gyの強度で照射すると生細胞活性が徐々に低下したが、メラトニンを添加すると重粒子放射線と同様にメラトニンのレスキュー作用を確認することができた。現在、キンギョのオリジナルアレイを用いて、メラトニンを添加することで特異的に変化した遺伝子を調べている最中である。

(本研究は、金沢大学自然システム学類生物学科 上西 篤志氏の卒業論文の一環として行われた)

## 過重力及び擬似微小重力に対する骨芽細胞及び破骨細胞の応答解析

山本 樹<sup>1</sup>, 関口俊男<sup>1</sup>, 鈴木信雄<sup>1</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

Tatsuki YAMAMOTO<sup>1</sup>, Toshio SEKIGUCHI<sup>1</sup>, Nobuo SUZUKI<sup>1</sup>: Response of osteoblast and osteoclast in the goldfish scales to hypergravity and simulated microgravity

ヒトの骨には、骨を作る骨芽細胞と骨を壊す（溶かす）破骨細胞が存在する。骨は体を支える役割の他に、神経伝達や筋肉の収縮、ホルモン分泌等の生命維持に欠かせないカルシウムの貯蔵庫として働いている。そこで脊椎動物の血液中のカルシウム濃度は、骨からカルシウムを出し入れすることにより、一定のレベルに保たれている。一方、真骨魚類のウロコには骨芽細胞と破骨細胞が共存しており、ヒトの膜性骨（頭蓋骨及び鎖骨）と非常によく似た骨形成を行う。魚類において背骨は遊泳に重要な役割を持つので、魚は背骨ではなく、ウロコからカルシウムを出し入れしていることが知られている。また、カルシトニン、副甲状腺ホルモン、ビタミンD等の種々のホルモンが哺乳類と同様にウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に作用することも分かっている。さらに、ウロコは再生するという特徴を持ち、この再生したウロコの細胞活性が高く、ホルモンに対する応答性も通常のウロコよりも良いことから、骨の*in vitro*モデルとして有用であると考えられる。

本研究では、再生ウロコを用いて、遠心機による過重力（hyper gravity: HG）及び3次元クリノスタットによる擬似微小重力（micro gravity:  $\mu$ G）に対する骨の応答を解析した。再生14日目のウロコを採取し、洗浄・滅菌した後、培地に入れ、遠心機および3次元クリノスタットで4日間培養した。培養後、遺伝子発現解析及び形態学的解析を行った。遺伝子発現解析では、骨芽細胞のマーカー（I型コラーゲン及びオステオカルシン）と破骨細胞マーカー（カルシトニン受容体及びEphrinB2a）の発現の解析を行い、さらに骨芽細胞と破骨細胞の相互作用に関連する遺伝子の発現を調べた。形態学的解析では、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（TRAP）及びアクチン染色を行い、形態学的な変化を調べた。

骨芽細胞のマーカーであるオステオカルシン及びI型コラーゲンの発現は、過重力下で増加したが、擬似微小重力下においては低下した。また、破骨細胞のマーカーであるカルシトニン受容体は過重力下において減少傾向にあり、擬似微小重力下では有意に増加した。骨芽細胞を活性化して、破骨細胞を抑制するEphrinB2aの発現は、擬似微小重力下において減少した。さらに、骨芽細胞で発現して破骨細胞を活性化する遺伝子であるRANKLとRANKLのデゴイレセプターであるOPGの比は過重力下において減少傾向にあり、擬似微小重力下においては有意に増加して、擬似微小重力では破骨細胞を活性化していることが判明した。また、擬似微小重力下のウロコの破骨細胞は、無処理のコントロールと比較して、多核化し、TRAP陽性でアクチンリングの保有数も有意に上昇して、活性化していた。

以上の結果から、過重力下において骨芽細胞は活性化、破骨細胞は抑制され、擬似微小重力下で骨芽細胞は抑制、破骨細胞は活性化され、骨量変化につながると考える。さらに、これら細胞間の相互作用に関連する遺伝子も重力応答することが判明し、それぞれの細胞の活性に影響を与えていることがわかった。今後は、アレイ解析により、詳細な機構を調べていく予定である。

（本研究は、金沢大学自然システム学類生物学科 山本 樹氏の卒業論文の一環として行われた）

# 宇宙実験用の細胞培養実験装置の温度制御に関する研究

矢野幸子<sup>1,2</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>〒305-8505 茨城県つくば市千現2-1-1, 宇宙航空研究開発機構(JAXA) 有人宇宙ミッション本部 宇宙環境利用センター

Sachiko YANO<sup>1,2</sup>: Study of temperature regulation in cell biology experiment facility for space experiments

## 【はじめに】

2008年に国際宇宙ステーション日本実験棟が完成した。このステーションを用いて生物試料を微小重力環境に曝露することができ、微小重力に対する応答を解析する様々な生物実験が可能になった。しなしながら、国際宇宙ステーションに生物試料を輸送する時には、打ち上げ時の振動、過重力がかかり、さらに宇宙空間には宇宙放射線があり、地上の試料は宇宙に上がった試料の対照群として使用することはできない。宇宙に上がった試料と同じ条件で 1g の対照群を設置する必要がある。そこで我々JAXA は、宇宙空間で 1g の対照実験が可能になる装置を開発して、国際宇宙ステーションに遠心機付きの培養機（細胞培養実験装置 Cell Biology Experiment Facility: CBEF）を設置した。本研究では、CBEF の温度制御能を調べるために、3種類の地上実験を行った。

## 【実験方法】

### 実験 1. 室温の変化による温度制御性能

実験室温度（20℃、24℃、28℃）を変化させ、冷却水により温度制御をおこなった。設定温度は、21.5℃、37.5℃とし、インキュベーター内にセンサーを置き、1分毎の温度データを取得し、60分間の平均温度をプロットした。

### 実験 2. 宇宙実験を想定した地上での温度制御確認試験（地上実験）

実験室温度を 22℃であると想定して、培養温度を 22.0℃及び 37.0℃になるようにインキュベーター内の温度を制御して、宇宙実験と同期間（3.6日間、28日間）の温度データを取得した。

### 実験 3. 湿度制御確認試験（地上実験）

目標温度（23.5℃）になるよう設定温度を調節し、湿度を低減させるため、塩化カルシウムから成る除湿剤を用いた宇宙使用を想定して実験した。宇宙実験と同期間（56日間）の湿度データを取得した。

## 【実験結果及び考察】

CBEF は国際宇宙ステーションの日本の実験棟きぼうに設置され、生命科学実験の試料の培養に使われる。そこでまず、室温付近の 22℃と哺乳類細胞の培養に使われる 37℃での温度制御性能に関し

て、インキュベーター内の試料保持部（Measurement Experiment Unit, MEU）の位置による空間的溫度分布を調べた。その結果、溫度分布は非常に小さかった（ $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ）。次にインキュベーター内の溫度制御を左右する可能性のある実験室の気温と冷却水溫度を変化させた。気温を  $20^{\circ}\text{C}$  から  $28^{\circ}\text{C}$  に変化させた時のインキュベーター内溫度制御結果は  $0.4^{\circ}\text{C}$  から  $0.6^{\circ}\text{C}$  の違いしかなかった。冷却水溫度を  $2^{\circ}\text{C}$  から  $8^{\circ}\text{C}$  に変化させたときの差は  $0.3^{\circ}\text{C}$  以下であり有意な差が見られなかった。

前述の結果に基づいて、実験 2 では、宇宙実験に向けた地上確認試験を実施した。即ち、キンギョのウロコ用に  $22^{\circ}\text{C}$ 、哺乳類培養細胞用に  $37^{\circ}\text{C}$  で宇宙実験と同期間培養して、溫度制御性能を時間的に分析した。その結果、溫度は実験期間の間、それぞれ  $22.0 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、 $36.9 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  の範囲に正確に保たれており、これらの溫度帯で宇宙実験が可能だということがわかった。

CBEF には除湿機能がなかったため、実験 3 では湿度を下げる必要のある実験を想定し、除湿剤を用いることによ

って CBEF 内の湿度を適切に保つことができた。

以上のことから、本研究により、CBEF 内で生命科学実験を実施する培養システムを確立することができ、CBEF の性能は非常に優れていることを立証できた。今後、この基礎データに基づいて、様々な宇宙実験を計画していく予定である。

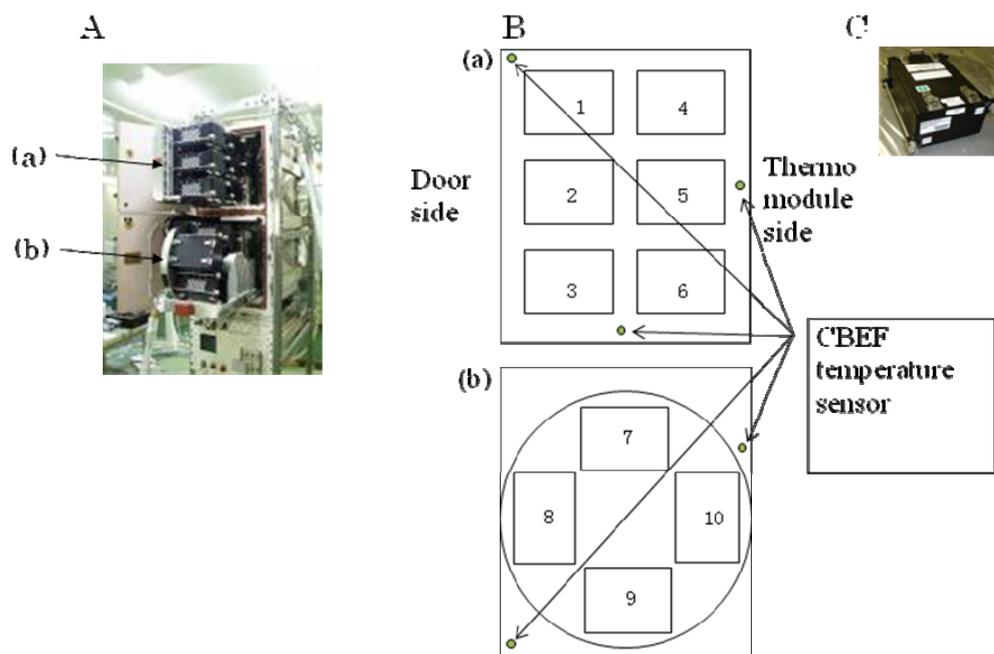


Fig. 1 Experiment hardware, the CBEF incubator unit and MEU. A: External view of the CBEF. (a) microgravity section, (b) artificial gravity section. B: Positions of CBEF-temperature sensors and MEUs (1–10) in CBEF incubator unit. (a) microgravity section, (b) artificial gravity section. C: External view of the MEU

本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻 矢野幸子氏の学位論文の一環として行われた。なお、本研究の成果の一部は、Yano, S., *et al.*: Excellent thermal control ability of cell biology experiment facility (CBEF) on ground basis experiments and board experiments in kibo of the international space station. *Biol. Sci. Space*, 26:12-20 (2012) に記載した。本研究は、多くの研究者にご協力・ご支援していただいた成果である。

## 【構成員】

### 1) 職員

准 教 授

鈴木信雄 (nobuos@staff.kanazawa-u.ac.jp)

博士 (理学)

専攻 環境生物学、比較生理学、骨学

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

助教

関口俊男(t-sekiguchi@se.kanazawa-u.ac.jp)

博士 (医学)

専攻 比較内分泌学

(海産無脊椎動物のペプチドやその受容体について、分子進化及び生理機能進化の観点で研究している)

技術専門職員

又多政博 (matada@ca2.luckynet.jp)

専門 海産無脊椎動物一般

事務補佐員

曾良美智子(msora@ca2.luckynet.jp)

### 2) 学生

4年生

赤塚涼介

上西篤志

山本 樹

博士課程2年

矢野幸子

谷内口孝治

### 3) 連携研究員

染井正徳 (somei.home@topaz.plala.or.jp)

(金沢大学名誉教授)



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