

ISSN 1348-4656

金沢大学環日本海域環境研究センター

臨海実験施設
研究概要・年次報告 第12号
2013.4 ~ 2014.3



九十九湾で観察されたチョウクラゲ
Ocyropsis fusca (Rang)

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

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	9
* 利用状況	10

【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の探索を実施した。理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 工樂樹洋博士との共同研究により、カルシトニン関連ペプチド(CGRP) 配列を明らかにした。CGRPは、脊椎動物ではカルシトニンと同じ遺伝子にコードされている。現在、このペプチドをコードするmRNAの全長配列決定を行っている。その後、ゲノムDNAより遺伝子を単離し、カルシトニンをコードするエクソンを同定する予定である。

さらに関口俊男助教を中心として原索動物ホヤCCK/ガストリンの研究を行っている。哺乳類において、CCK/ガストリンは、それぞれ胆嚢の収縮、胃酸の放出を刺激する消化ホルモンである。脊椎動物の祖先的動物であるホヤを用いて、これらの祖先遺伝子Cionin が同定されている。我々は、既にCionin 受容体の存在を証明しており、今年度はこの受容体の幼生における局在を解析した。Cionin 受容体プロモーターの下流で蛍光タンパク質kaedeが発現するベクターをホヤ受精卵に導入した結果、幼生の運動神経及び尾部神経索で蛍光が検出された。加えてアセチルコリントランスポーターのプロモーター下で青色蛍光を発するトランスジェニック個体を用いた解析より、Cionin 受容体陽性神経の多くが、コリン作動性神経であることを明らかにした。なお本研究もマリンバイオ共同推進機構（JAMBIO）の助成を受けている。

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。

本年度は、山本 樹氏の修士論文研究の一環として、3次元クリノスタットにより擬似微小重力に対する再生ウロコの骨芽細胞及び破骨細胞に対する応答を調べた。その結果、再生ウロコは非常に感度よく擬似微小重力に反応して、破骨細胞の活性化が起こった。さらに破骨細胞の活性化に関与する遺伝子についても解析して、日本比較内分泌学会（宮崎）で発表した。

宇宙実験（微小重力下での応答解析）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、国際骨代謝学会（神戸）、抗加齢医学会内分泌研究会（東京）、日本比較内分泌学会（宮崎）及び日本動物学会中部支部例会（岡崎）で発表した。なお、メラトニン誘導体に関する研究は、帖地 藍氏の卒業論文研究の一環として行った。

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、表 俊樹氏の卒業論文研究の一環としてウロコを用いて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（日本比較内分泌学会で発表）。現在、富山大学遺伝子実験施設の田渕圭章准教授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。

さらに重金属の1種である水銀に対する影響も評価した。この研究は、谷内口孝治氏の博士論文の一環として行った。海産硬骨魚類のメジナを用いて、独自にアッセイ系を構築して水銀の骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を解析した。その結果、水銀は破骨細胞に対して応答性がよく、短時間で活性が抑制されるが、骨芽細胞は比較的長時間培養しないと、影響が出ないことがわかった。この骨芽細胞に対する水銀の作用を調べるために、水銀の解毒に関与しているタンパク質（メタロチオネイン）を解析して、メタロチオネインmRNAの発現が水銀で処理すると上昇することを明らかにした（Zool. Sci., 2014）。

放射線の骨に対する影響評価

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、X線を用いて、放射線の骨に対する作用を解析した。その結果、2, 4, 8 Gyの強度でX線を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メラトニンのレスキュー作用を確認することができた。特に、4 Gyにおいて有意差が認められた。これらの研究の成果は、上西篤志氏の修士論文の一環として、日本比較内分泌学会（宮崎大会）で発表した。メラトニンは、環形動物のアオゴカイにも存在し（新田沙織氏の卒業論文研究）、無脊椎動物にも何らかの役割を有している。脊椎動物と無脊椎動物に共通なメラトニンの生理的な役割を調べていきたいと考えている。

【研究業績】

1) 学術論文

- (1) 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.*, 30: 217-223 (2013)
- (2) 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*, 166: 74-80 (2013)
- (3) 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.*, 20: 823-830 (2013)
- (4) Kumar, A., Prasad, M.R., 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.*, 83:609-613 (2013)
- (5) 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.*, 5:4 (Online) (2013)
- (6) 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.*, 76:673-678 (2013)
- (7) Undap, S. L., Matsunaga, S., Honda, M., Sekiguchi, T., Suzuki, N., Khalil, F., Qiu, X., Shimasaki, Y., Ando, H., Sato-Okoshi, W., Sunobe, T., Takeda, S., Munehara, H. and Oshima, Y.: Accumulation of organotins in wharf roach (*Ligia exotica* Roux) and its ability to serve as a biomonitoring species for coastal pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 96: 75-79 (2013)
- (8) Srivastav, A.K., Rai, R., Suzuki, N., Mishra, D. and Srivastav, S.K.: Responses of the prolactin cells of the stinging catfish *Heteropneustes fossilis* following lead intoxication Egypt. *J. Aqua. Res.*, 39: 111-114 (2013)
- (9) Tabuchi, Y., Sugahara, Y., Ikegame, M., Suzuki, N., Kitamura, K. and Kondo, T.: Genes responsive to low-intensity pulsed ultrasound in MC3T3-E1 preosteoblast cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 22721-22740 (2013)
- (10) 三島弘幸, 井上昌子, 門田理佳, 服部淳彦, 鈴木信雄, 笥光夫, 松本敬, 里村一人, 見明康雄: 象牙質の成長線の周期と体内時計の情報伝達分子のメラトニンの分泌リズムの関連. *日本再生歯科医学会雑誌*, 11; 27-39 (2013)
- (11) Tabuchi, Y., Wada, S., Ikegame, M., Kariya, A., Furusawa, Y., Hoshi, N., Yunoki, T., Suzuki, N., Takasaki, I., Kondo, T. and Suzuki, Y.: Development of oral epithelial cell line ROE2 with differentiation potential from transgenic rats harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen. *Exp. Anim.*, 63: 31-44 (2014)
- (12) Suzuki, N., Maruyama, Y., Nakano, M., Hattori, A., Honda, M., Shimazaki, Y., Sekiguchi, T., Mishima, H., Wada, S., Srivastav, A.K., Hayakawa, K. and Oshima, Y.: Increased PGE₂ has a positive correlation with plasma calcium during goldfish reproduction. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 59: 97-101 (2014)
- (13) Yachiguchi, K., Sekiguchi, T., Nakano, M., Hattori, A., Yamamoto, M., Kitamura, K., Maeda, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Kamauchi, H., Nakabayashi, H., Srivastav, A.K., Hayakawa, K., Sakamoto, T. and Suzuki, N.: Effect of inorganic mercury and methylmercury on osteoclasts and osteoblasts in the scales of the marine teleost as a model system of bone. *Zool. Sci.*, 31: 330-337 (2014)

- (14) 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.*, 21: 6365–6372 (2014)
- (15) Tabuchi, Y., Yunoki, T., Hoshi, N., Suzuki, N. and Takashi, T.: Genes and gene networks involved in sodium fluoride-elicited apoptosis accompanying endoplasmic reticulum stress in oral epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 15: 8959-8978 (2014)
- (16) Kumar, A., Prasad, M., Srivastav, S.K., Suzuki, N. and Srivastav, A.K.: Toxicological impacts of a botanical pesticide, azadirachtin on corpuscles of *Stannius* of stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* in press
- (17) 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
- (18) Kumar, A., Prasad, M.R., Suzuki, N., Srivastav, S.K. and Srivastav, A.K.: Influence of a botanical pesticide, azadirachtin, on ultimobranchial gland of the freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Toxicol. Env. Chem.*, in press

2) 総説・解説等

- (1) Satake, H., Aoyama, M., Sekiguchi, T. and Kawada, T.: Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors. *Protein Pept. Lett.*, 20: 615-627 (2013)
- (2) 服部淳彦, 池亀美華, 矢野幸子, 染井正徳, 鈴木信雄: 宇宙メラトニン研究と抗加齢医学との接点. *抗加齢医学会雑誌*, 9: 356 -363 (2013)
- (3) 大澤剛士, 鎌内宏光, 細矢 剛, 伊藤元己: LTER、GBIFにおける国際的な生物多様性データベースの動向と日本国内の課題: 国際ワークショップ参加報告. *日本生態学会誌*, 63: 269-273 (2013)
- (4) 木下栄一郎, 鈴木信雄, 関口俊男, 中村浩二: 環日本海域における生物多様性研究の10年ー自然計測領域生物多様性研究部門ー. *日本海域研究*, 45: 15-17 (2014)
- (5) 鈴木信雄, 関口俊男, 木下栄一郎, 中村浩二: 生物多様性を基盤にした環境学研究. *日本海域研究*, 45: 45-47 (2014)

3) 著書

- (1) 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】

研究発表及び講演会

- (1) Suzuki, N.: Development and application of a fish scale *in vitro* assay system. The 9th International Satellite Symposium on the Comparative Endocrinology of Calcium Regulation (Second Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society, Japanese Society for Bone and Mineral Research), Kobe, Japan (2013, 28 May - 1 June) (招待講演)
- (2) 三島弘幸, 門田理佳, 井上昌子, 服部淳彦, 鈴木信雄, 田畑 純, 寛 光夫, 松本 敬, 里村一人, 見明康雄: 象牙質の成長線形成と体内時計の情報伝達分子メラトニンの関連. 第31回化石研究会総会・学術大会, 下仁田町文化ホール, 群馬県 (2013, 6/1-2)

- (3) 鈴木信雄, 関 あずさ, 関口俊男, 染井正徳, 高垣裕子, 矢野幸子, 服部淳彦: 新規メラトニン誘導体—骨粗鬆症の治療に向けて. 第 5 回抗加齢内分泌研究会. 立教大学, 東京 (2013, 9/1) (招待講演)
- (4) 奈良雅之, 服部淳彦, 大西晃宏, 赤塚陽子, 矢野幸子, 鈴木信雄, 松田准一: キンギョウロコのアパタイトの解析—赤外ラマン分光によるアプローチ. 第 22 回日本バイオイメーキング学会, 東京大学薬学部, 東京 (2013, 9/14-16)
- (5) 関口俊男, 上西篤志, 山本 樹, 谷内口孝治, 鈴木信雄: 円口類のカルシトニンとカルシトニン受容体についての研究. 第 84 回日本動物学会, 岡山大学, 岡山県 (2013, 9/26-28)
- (6) 赤塚涼佑, 黒田美翔, 丸山雄介, 鈴木信雄, 服部淳彦: キンギョの再生鱗における時計遺伝子と骨芽細胞関連遺伝子の発現. 第 84 回日本動物学会, 岡山大学, 岡山県 (2013, 9/26-28)
- (7) 鈴木信雄, 池亀美華, 山本 樹, 北村敬一郎, 田渕圭章, 矢野幸子, 服部淳彦: 微小重力におけるウロコの破骨細胞の応答. 第 84 回日本動物学会, 岡山大学, 岡山県 (2013, 9/26-28)
- (8) 谷内口孝治, 関口俊男, 羽賀雄紀, 松村千里, 鶴川正寛, 中野武, 北村敬一郎, 鳥羽 陽, 早川和一, 近藤 隆, 田渕圭章, 和田重人, 遠藤雅人, 服部淳彦, 鈴木信雄: ポリ塩化ビフェニル (PCB118) は魚の骨代謝を攪乱する. 第 84 回日本動物学会, 岡山大学, 岡山県 (2013, 9/26-28)
- (9) 鈴木信雄, 矢野幸子, 服部淳彦: 魚のウロコを用いた宇宙実験. 第 84 回日本動物学会 動物学のひろば, 玉野海洋博物館, 岡山県 (2013, 9/28)
- (10) 鈴木信雄, 福森義宏, 又多政博, 関口俊男, 小木曾正造, 三田雅敏, 笹山雄一: 口・腸・肛門も無い変な動物 (マシコヒゲムシ) はどうやって生きているか? それに未来はあるか? 第 84 回日本動物学会 動物学のひろば, 玉野海洋博物館, 岡山県 (2013, 9/28)
- (11) Tabuchi, Y., Sugahara, Y., Ikegame, M., Suzuki, N., Kitamura, K., Kondo, T.: Identification of genes responsive to low-intensity pulsed ultrasound in mouse preosteoblast cells. 2013 ICBMU (International Conference on Biomedical Ultrasound), National Taiwan University, Taiwan (2013, 22-23 October)
- (12) 帖地 藍, 谷内口孝治, 田渕圭章, 近藤 隆, 北村敬一郎, 清水宣明, 関口俊男, 矢野幸子, 服部淳彦, 鈴木信雄: 新規メラトニン誘導体の魚類の骨代謝に対する作用. 第 38 回日本比較内分泌学会大会, 宮崎市民プラザ, 宮崎県 (2013, 10/24-26)
- (13) 上西篤志, 丸山雄介, 中野真樹, 松本謙一郎, 大森克徳, 田渕圭章, 和田重人, 近藤 隆, 遠藤雅人, 北村敬一郎, 早川和一, 矢野幸子, 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) に対する放射線とメラトニンの影響. 第 38 回日本比較内分泌学会大会, 宮崎市民プラザ, 宮崎県 (2013, 10/24-26)
- (14) 北村敬一郎, 安藤 忠, 桶作若菜, 遠藤雅人, 服部淳彦, 鈴木信雄: キンギョを用いた糖尿病様モデルのインスリン産生能の解析. 第 38 回日本比較内分泌学会大会, 宮崎市民プラザ, 宮崎県 (2013, 10/24-26)
- (15) 新田沙織, 関口俊男, 金澤直子, 海老原充, 服部淳彦, 鈴木信雄: アオゴカイ (環形動物) におけるメラトニンの同定. 第 38 回日本比較内分泌学会大会, 宮崎市民プラザ, 宮崎県 (2013, 10/24-26)
- (16) 山本 樹, 池亀美華, 田渕圭章, 矢野幸子, 遠藤雅人, 近藤 隆, 中野真樹, 北村敬一郎, 関口俊男, 清水宣明, 服部淳彦, 鈴木信雄: 擬似微小重力に対する骨モデル (ウロコ) の破骨細胞及び骨芽細胞の応答解析. 第 38 回日本比較内分泌学会大会, 宮崎市民プラザ, 宮崎県 (2013, 10/24-26)
- (17) 表 俊樹, 川部季美, 北村敬一郎, 服部淳彦, 田渕圭章, 近藤 隆, 鳥羽 陽, 早川和一, 鈴木信雄: 多環芳香族炭化水素類の魚類の骨代謝に対する作用. 第 38 回日本比較内分泌学会大会, 宮崎市民プラザ, 宮崎県 (2013, 10/24-26)
- (18) 関口俊男, 帖地 藍, 関あずさ, 高垣裕子, 池亀美華, 田渕圭章, 近藤 隆, 北村敬一郎, 清水宣明, 矢野幸子, 服部淳彦, 鈴木信雄: 新規メラトニン誘導体の卵巣摘出ラットに対する作用. 第 38 回日本比較内分泌学会大会, 宮崎市民プラザ, 宮崎県 (2013, 10/24-26)

- (19)鈴木信雄：金沢大学能登臨海実験施設のこれまでの活動と今後の方向について．能登キャンパス構想推進協議会，のと海洋ふれあいセンター，石川県（2013, 11/9）（招待講演）
- (20)三島弘幸，門田理佳，井上昌子，服部淳彦，鈴木信雄，寛光男，松本敬，里村一人，見明康夫：象牙質の成長線形成とサーカディアンリズム同調因子メラトニンの関係．バイオミネラルゼーション研究会，東京大学，東京都（2013,11/30）
- (21)大嶋雄治，本田匡人，松永啓志，Suanne Undap，関口俊男，鈴木信雄，島崎洋平：フナムシを用いた渚域の汚染評価．第16回環境ホルモン学会，東京大学山上会館，東京都（2013, 12/12-13）
- (22)田渕圭章，菅原有希，池亀美華，鈴木信雄，北村敬一郎，近藤隆：MC3T3-E1骨芽前駆細胞において低出力パルス超音波によって誘導される遺伝子のDNAマイクロアレイ解析．第17回超音波骨折研究会，クラウンパレス神戸，兵庫県（2014, 1/25）
- (23)三島弘幸，門田理佳，服部淳彦，鈴木信雄，寛光男，松本敬，里村一人，見明康雄：メラトニン投与における象牙質の成長線の形成や象牙質組成に関する分析学的及び組織学的研究．第119回日本解剖学会，自治医科大学，栃木県（2014, 3/27-29）
- (24)鈴木信雄，関口俊男，帖地藍，山本樹，上西篤志，関あずさ，高垣裕子，池亀美華，田渕圭章，近藤隆，北村敬一郎，清水宣明，矢野幸子，染井正徳，服部淳彦：新規メラトニン誘導体の骨代謝に対する作用：魚類及び哺乳類における *in vivo* の解析．平成25年度日本動物学会中部支部例会，愛知県（2014, 3/8-9）

【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）Prof. 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，新潟大学理学部附属臨海実験所教授 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：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
- (9) 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
- (10) 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
- (11) 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

- (12) 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
- (13) 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
- (14) 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
- (15) 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
- (16) 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
- (17) 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
- (18) 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，同主任研究員 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
- (19) 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、同准教授 島崎洋平氏
- (20) 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
- (21) 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
- (22) 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
- (23) 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
- (24) 鈴木信雄：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
- (25) 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，同教授 田中大祐氏
- (26) 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
- (27) 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
- (28) 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
- (29) 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 生命科学研究部門准教授 桑迫健二氏
- (30) 関口俊男：ヌタウナギカルシトニンの機能解析研究，理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・ゲノム資源解析ユニット ユニッタリーダー 工樂樹洋氏

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，1,500,000 円。
- (2) 関口俊男（代表），若手研究（B），消化管ペプチドの機能進化の研究：ホヤの受容体トランスジェニック個体を用いた解析，1,700,000 円
- (3) 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 400,000 円（直接経費 total 1,600,000 円）
- (4) 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 2013 年 100,000 円（2013 年の直接経費 total 1,600,000 万円）

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 シーズ頭在化タイプ，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. 1,500,000 円（2013 年の直接経費 total 4,000,000 円）

3) 共同研究費

- (1) 鈴木信雄（代表），公益財団法人三谷研究開発支援財団，新規骨疾患治療薬の骨疾患動物モデルに対する作用及び骨形成機構の解析，1,000,000 円
- (2) 鈴木信雄（代表），ハムリー（株），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，150,000 円
- (2) 関口俊男（代表），マリンバイオ共同推進機構公募利用研究助成，原索動物における CCK/ガストリンの機能進化における研究，150,000 円

【新聞発表】

- (1) 鈴木信雄・関口俊男，平成25年4月28日（北國新聞）：いしかわシティカレッジ海洋生化学演習に関する記事
- (2) 鈴木信雄，平成25年7月16日（北陸中日新聞）：いしかわシティカレッジ生物多様性実習に関する記事
- (3) 鈴木信雄・関口俊男，平成25年9月4日（北國新聞）、平成25年9月7日（北陸中日新聞）：全国公開臨海実習に関する記事

【利用状況】

1) 来訪者及び研究目的

4 / 16 ~ 4 / 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6名 「大気観測装置の保守及び校正」
4 / 25 ~ 4 / 26	石川県立大学 柳井 清治 教授 他5名 「九十九湾における生態、植生調査」
5 / 14	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」
6 / 17 ~ 6 / 18	金沢大学理工研究域 ロバート・ジェンキンス 助教 「マシコヒゲムシに関する研究打ち合わせ」
6 / 17 ~ 6 / 18	忠北大学校基礎科学研究所 洪 天祥 教授 「国際実習の打ち合わせ」
6 / 17 ~ 6 / 19	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2名 「大気観測装置の保守及び校正」
7 / 13 ~ 7 / 15	長浜バイオ大学 和田 修一 准教授 「日本海の動物採集」
7 / 20 ~ 7 / 21	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 「大気観測装置の保守および校正」
7 / 20 ~ 7 / 21	台湾大学 H s i n - Y i n g 「大気観測サイト見学」

- 7 / 20 ~ 7 / 23 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2名
「大気観測装置の保守および校正」
- 7 / 27 金沢大学医薬保健学域 5年
袴田 真理子 他18名
「能登での海洋実験の実態を学ぶ」
- 8 / 19 ~ 8 / 20 東京医科歯科大学 修士1年
赤塚 涼佑
「メラトニンに関する研究」
- 8 / 19 ~ 8 / 20 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15名
「宇宙メラトニン研究会の実施」
- 8 / 31 ~ 9 / 7 金沢大学自然科学研究科 修士1年
山本 樹 他4名
「公開臨海実習に関する実験補助」
- 9 / 9 ~ 9 / 11 国立科学博物館
並河 洋 研究主幹
「ヒドロ虫類の系統分類学的研究の材料採集のため」
- 9 / 25 ~ 9 / 26 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2名
「大気観測装置の保守および校正」
- 10 / 22 ~ 10 / 23 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2名
「大気観測装置の保守および校正」
- 10 / 22 ~ 10 / 24 北海道大学 修士2年
富岡 森理 他1名
「水産無脊椎動物の採集」
- 11 / 9 金沢大学地域連携推進センター
宇野 文夫 特任教授 他14名
「施設見学」

- 11/25～11/26 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および校正」
- 12/5 金沢大学理工研究域
ロバート・ジェンキンス 助教 他9名
「九十九湾へのウミガメ遺骸の設置」
- 12/8 富山大学
中村 省吾 教授 他1名
「ウニを用いた発生生物学実験」
- 12/16～12/17 金沢大学自然科学研究科 修士1年
山本 樹 他6名
「魚類の骨代謝に関する研究打ち合わせ」
- 1/11 金沢大学理工研究域
ロバート・ジェンキンス 助教
「鯨骨群集観察」
- 1/11 アメリカ自然史博物館
A n d r z e j ・ K a i m
「鯨骨群集観察」
- 2/12 のと海洋ふれあいセンター
東出 幸真 専門員 他1名
「海洋生物の採集」
- 2/28 のと海洋ふれあいセンター
坂井 恵一 普及課長
「研究打ち合わせ」
- 3/14 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」
- 3/27 NPO法人角間里山みらい
越石 あきこ
「視察のため」

2) 大学の実習及び演習

- 5 / 30 ~ 5 / 31 石川県立大学
柳井 清治 教授 他2名
「森林と海洋の生態的關係に関する演習」
- 6 / 9 金沢大学地域連携推進センター
中村 浩二 特任教授 他12名
「里山体験実習 in 能登半島」
- 6 / 21 ~ 6 / 22 石川県立大学
柳井 清治 教授 他3名
「森林と海洋の生態的關係に関する演習」
- 7 / 16 ~ 7 / 18 東海大学
野原 健司 講師 他3名
「潜水・釣りによる沿岸性魚類の採集実習」
- 7 / 22 ~ 7 / 28 石川県立大学 修士1年
北原 隆志 他5名
「森林と海洋の生態的關係に関する演習」
- 8 / 21 ~ 8 / 22 石川県立大学
柳井 清治 教授 他1名
「九十九湾における動物プランクトンに関する演習」
- 8 / 23 ~ 8 / 26 金沢大学理工研究域
鈴木 信雄 准教授 他12名
「生物学実習4」
- 8 / 30 金沢工業大学バイオ化学部
藤永 薫 教授 他16名
「海洋生物観察」
- 9 / 2 ~ 9 / 7 「第1回公開臨海実習」
奈良女子大学 2年 井上 結衣 他20名
- 9 / 14 ~ 9 / 15 金沢大学地域連携推進センター
宇野 文夫 特任教授 他10名
「スタディツアー」
- 9 / 14 ~ 9 / 17 東海大学
野原 健司 講師 他2名
「潜水・釣りによる沿岸性魚類の採集実習」

- 9 / 18 ~ 9 / 20 金沢大学理工研究域
田岡 東 助教 他 23名
「生物学実習2」
- 9 / 19 ~ 9 / 21 石川県立大学
柳井 清治 教授 他 2名
「九十九湾における動物プランクトンに関する演習」
- 10 / 17 ~ 10 / 19 金沢大学自然科学研究科 修士1年
寺島 佑樹
「森林と海洋の生態的關係に関する演習」
- 10 / 17 ~ 10 / 19 石川県立大学 修士1年
中山 貴将 他 2名
「森林と海洋の生態的關係に関する演習」
- 11 / 2 ~ 11 / 4 「第2回公開臨海実習」
千葉大学 4年 高橋 勇介 他 3名
- 11 / 29 ~ 11 / 30 石川県立大学大学院 修士1年
中山 貴将 他 8名
「森林と海洋の生態的關係に関する演習」
- 12 / 7 ~ 12 / 8 金沢大学理工研究域
ロバート・ジェンキンス 助教 他 14名
「海洋実習」

3) 高等学校の実習及び演習

- 7 / 4 ~ 7 / 5 富山県立砺波高校
大代 敏彦 教諭 他 24名
「臨海実習」
- 7 / 9 ~ 7 / 11 石川県立七尾高校
平野 敏 教諭 他 42名
「海洋生物の観察」
- 8 / 5 ~ 8 / 7 福井県立高志高校
山崎 秀樹 教諭 他 27名
「臨海実習」
- 8 / 7 ~ 8 / 9 福井県立高志高校
山崎 秀樹 教諭 他 26名
「臨海実習」

3) 利用者数及び船舶の使用状況

平成25年度臨海実験施設利用者数（延べ人数1,601人の内訳）

(月)	研究者		学生	
	学内	学外	学内	学外
4	6	4	72	38
5	0	10	27	33
6	8	4	44	31
7	8	30	83	216
8	4	37	98	192
9	12	7	150	175
10	3	5	31	36
11	5	17	30	29
12	10	7	70	1
1	2	3	23	0
2	0	2	17	0
3	0	3	18	0
合計	58	129	663	751

平成25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	5
5	6	6
6	4	8
7	7	4
8	6	4
9	3	5
10	3	5
11	2	3
12	2	5
1	3	4
2	3	4
3	4	4
合計	47	57

研 究 報 告

*海水硬骨魚（メジナ）の破骨細胞と骨芽細胞に対する無機水銀と有機水銀の影響

谷内口考治 (p17-18)

*臨海実験施設周辺における海水温度と塩分、気温と湿度の関係

小木曾正造, 又多正博 (p19-20)

*新規メラトニン誘導体の骨代謝に対する作用

帖地 藍, 関口俊男, 鈴木信雄 (p21-22)

*アオゴカイにおけるメラトニンの同定

新田沙織, 関口俊男, 鈴木信雄 (p23-24)

*多環芳香族炭化水素類の魚類の骨代謝に対する作用

表 俊樹, 関口俊男, 鈴木信雄 (p25-26)

海水硬骨魚（メジナ）の破骨細胞と骨芽細胞に対する無機水銀と有機水銀の影響

谷内口孝治

〒927-0553 鳳珠郡能登町小木ム4-1,金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設

Koji YACHIGUCHI : Effect of inorganic mercury and methylmercury on osteoclasts and osteoblasts in the scales of the marine teleost as a model system of bone

【はじめに】

水銀は、毒性が強く残留性も高いため、ひとたび陸地で汚染が拡大すると、やがて河川を經由して海洋汚染へと拡散する。汚染された生物は、生物濃縮を起こすことによりさらに深刻な汚染となることが、水俣病を例として知られている。水俣病は汚染された魚介類の食をとおして、人の中枢神経系に疾患をもたらせた。そのため、神経系に対する作用を中心に解析が進められたが、骨についての研究は十分とは言えない。近年、汚染された魚の研究により、ウロコと筋肉との総水銀濃度において相関関係が高いことが明らかとされ、ウロコを用いた水銀の評価が可能となってきた。また、放射性同位元素を用いた研究から、骨よりもウロコの方がより活発なカルシウムの貯蔵器官であることが認められている。つまり、硬骨魚類のウロコは、ヒトの骨と同じようなカルシウム調節能を有しているのである。

そこで、海水硬骨魚のウロコを使って、新たな *in vitro* 評価システムの開発を行った。さらに、このシステムを用いて、無機水銀 (HgCl_2 : InHg) と有機水銀 (CH_3HgCl : MeHg) の破骨細胞と骨芽細胞に対する影響を調べた。

【実験方法】

海水硬骨魚（メジナ、*Girella punctata*）を実験材料として用い、2-フェノキシエタノール（0.004 %）で麻酔してウロコを採取した。この際、およそ同じ大きさのウロコを採取し、ウロコの面積あたりの TRAP や ALP 活性が同じ活性を持つウロコを探索した。さらに、破骨細胞と骨芽細胞の共存状態の形態学的な観察も行った。次に、ほぼ同じ TRAP と ALP 活性を持つウロコを用いて、InHg と MeHg をそれぞれ添加した培地で 6, 18 及び 36 時間培養を行い、InHg と MeHg との作用を比較した。

遺伝子発現の実験に際し、最初に RNA 抽出キット（NucleoSpin RNA II、タカラバイオ社）を使って全 RNA を調製し、cDNA は PrimeScript™ RT 試薬キット（タカラバイオ社）を用いて合成した。その後、既に報告されている動物群の配列に基づき縮重プライマーを設計して、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP)、タイプ 1 コラーゲン $\alpha 1$ (COL1A1) 及びメタロチオネイン (MT) の cDNA 断片をクローニングした。これらの配列に基づき特異的なプライマーを用いてリアルタイム PCR 法で mRNA の変化を調べた。

【実験結果及び考察】

メジナのウロコを採取して、ウロコの面積あたり、TRAP や ALP 活性がほぼ同じになるようなウロコの位置を探した。その結果、1 行のウロコの中では、隣同士は活性が非常に近いことが半明した。そこでウロコを交互に分けて、2 群（対照群と実験群）を設定した (Fig. 1)。さらに、形態学的な観察により、ウロコの溝条の部位において、破骨

細胞と骨芽細胞の共存が観察された。

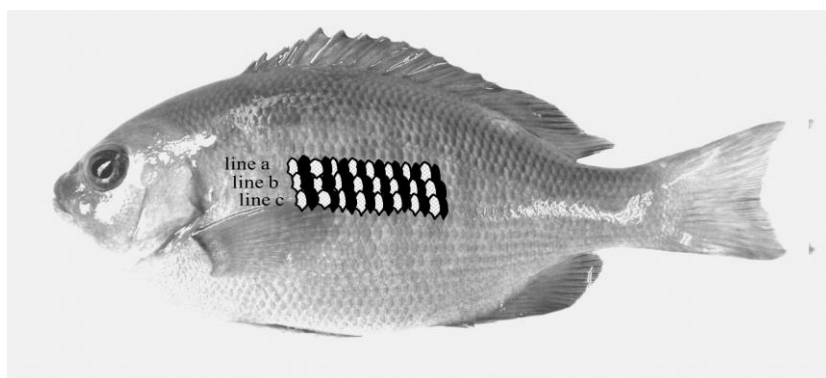


Fig. 1. Location of the scales used in the present study. In nibbler fish, lines of scales of approximately the same size were chosen. In each line, the removed scales were divided into two groups: a control group and an experimental group. The scales of each group are shown in white and black, respectively.

InHg と MeHg のメジナの培養ウロコに対する作用を比較すると、TRAP 活性は、6 時間培養で InHg ($10^5 \sim 10^4$ M) 処理によって有意に低下した。また MeHg においても 6 時間で TRAP 活性が有意に低下した ($10^6 \sim 10^4$ M)。一方、InHg と MeHg の ALP 活性に対する作用を調べた結果、6 時間の培養では変化がなかった。しかし、18 時間や 36 時間の培養では、InHg 及び MeHg とともに ALP の活性が低下していた。InHg 及び MeHg に対する酵素活性の応答性は、いずれも海水硬骨魚のメジナの方が淡水硬骨魚のキンギョの結果と比較して低い傾向にあった。この結果は、淡水魚の方が海水魚より低いカルシウム環境に生息しているため、淡水硬骨魚のウロコの方が、カルシウム代謝に重要な働きをしていることと一致する。

マーカー遺伝子の mRNA 発現解析から、6 時間の培養で、骨芽細胞のマーカーである COL1A1 の mRNA 発現は変わらなかったが、InHg と MeHg で処理したウロコにおける TRAP mRNA の発現量は有意に低下し、MT の発現は上昇していた。この結果は、淡水硬骨魚類のキンギョにおける結果と一致する。6 時間の培養で、骨芽細胞は MT を作ることで、水銀に対する耐性を得ている可能性がある。

このように破骨細胞と骨芽細胞の関連性がみられる実験結果より、両細胞を同時に行う培養実験は、水銀の骨代謝に対する作用を評価する上で必要である。しかし、破骨細胞と骨芽細胞の共存培養は、特に破骨細胞の取扱いが困難なため容易ではない。そこで本研究では、海水硬骨魚を用いたウロコの *in vitro* 分析システムを開発した。このシステムにより、破骨細胞と骨芽細胞の活性を同時に調べることができた。さらに、メジナのウロコから TRAP、COL1A1 と MT のクローニングも行うことができ、遺伝子発現解析も可能になった。したがって、本研究により開発された *in vitro* の評価システムは、重金属の骨に対する作用を調べるのに有効であると思われる。

本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻 谷内口孝治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、Yachiguchi, K., et al.: Effect of inorganic mercury and methylmercury on osteoclasts and osteoblasts in the scales of the marine teleost as a model system of bone. Zoological Science (Submitted :Dec. 2013) 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。

臨海実験施設周辺における海水温度と塩分、気温と湿度の観測

小木曾正造, 又多政博

〒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

Shouzo OGISO, Masahiro MATADA : The observation of seawater temperature, salinity and atmospheric temperature around the Noto Marine Laboratory

【はじめに】

臨海実験施設では、1975年以前（当時理学部附属臨海実験所）より1994年まで施設前にて表面海水の水温と比重、気温の測定を行っていた。1980年から1985年までは九十九湾内2カ所、湾口及び湾沖の計4カ所にて月1回の定点観測を行い、各地点の水深0 m、5 m、20 mの水温と比重や溶存酸素量（DO）などを記録した。これらのうち、1980年から1985年の6年間分は金沢大学能登臨海実験所年報1980～1985で報告している。

1994年に近隣にのと海洋ふれあいセンターが開館し、毎日の気象と海水温等の観測と、月1回の九十九湾内外での定点観測が行われるようになり、それ以降、当施設での観測は行わなかった。

2012年7月に当施設が教育関係共同利用拠点として文部科学省に認定されたことを受け、当施設を利用した実習・演習などの教育や研究の基礎資料とするため、2013年10月より海水温と塩分、2013年12月より気温等の観測を再開した。

【測定方法】

海水温と塩分

施設前の浮棧橋に日油技研工業株式会社製「水温リモート監視装置AEM-04H」を設置し、水温計アレイ（H）（精度±0.1℃）を用いて水深5.0 m及び7.5 mにおける水温を1時間に1回測定している。また、水深0.5 mではJFEアドバンテック株式会社製「ワイパー式メモリー水温塩分計INFINITY-CTW ACTW-USB」を用いて水温（精度±0.01℃、分解能0.001℃）と電気伝導度（精度±0.01 mS/cm、分解能0.001 mS/cm）を測定し、電気伝導度を実用塩分に換算している。測定したデータは「データ転送装置Aqua e monitor」によって1日に数回電子メールで送信され、集計ソフト「e monitor Compiler 2」で自動的に記録される。

気温と湿度

過去に気温測定を行っていたのと同じ直射日光が当たらず、風通しの良い地上180 cmの高さにfourtec社製「温湿度データロガーMicroLite LITE5032P-RH」を設置し、気温（精度±0.3℃、分解能0.1℃）と湿度（精度±2%、分解能0.5%）を1時間に1回測定している。機器を月1度回収し、データを保存している。

【結果と考察】

月別の平均水温を見るといずれの水深でも3月が最も低く、水深0.5 m、5.0 m、7.5 mでそれぞれ9.66℃、9.3℃、9.5℃だった（Figs. 1, 2, 3）。測定値全体での最低水温は2月15日8:00の水深0.5 mで8.35℃だった。

月別の平均塩分は10月から徐々に上昇し、3月が最も高く33.54だった（Fig. 4）。測定値全体での最高塩分は3月9日3:00、4:00、5:00の33.92‰で、最低塩分は11月20日0:00の28.48‰だった。

月別の平均気温は2月が最も低く、2.6°Cで、全体の最低気温は2月5日23:00の-3.3°Cだった (Fig. 5)。月別平均湿度の最高は12月の89%で最低は2月の83%だった (Fig. 6)。

今後のデータ蓄積により、年ごとの比較や各水深における水温変化の比較を行うなどして、九十九湾における気象観測の基礎資料として有効活用したい。研究者等から依頼があれば、各データをExcel表で提供したり、機器の測定間隔を縮めたりすることも可能である。

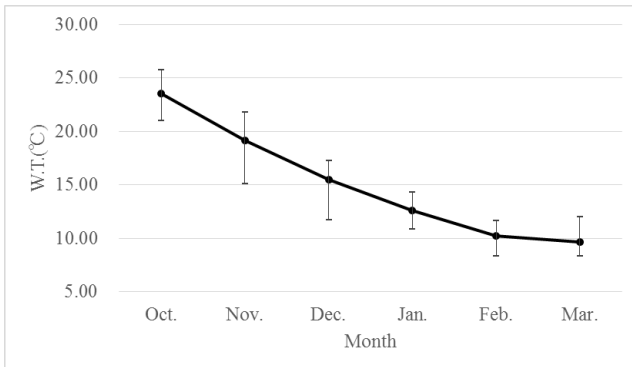


Fig. 1. Monthly average water temperature at a depth of 0.5 m. Vertical bars indicate the range of the highest and lowest temperature.

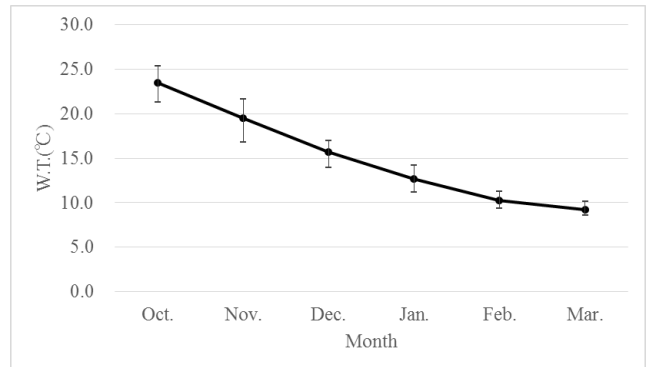


Fig. 2. Monthly average water temperature at a depth of 5.0 m. Vertical bars indicate the range of the highest and lowest temperature.

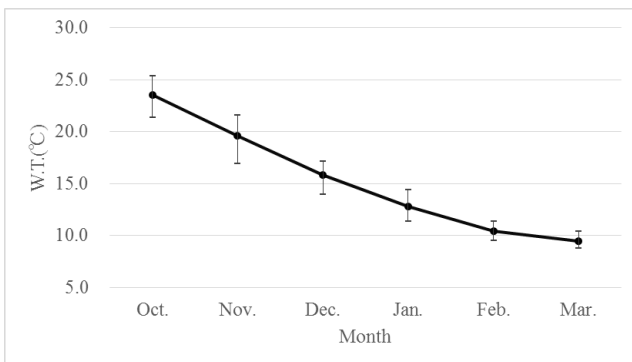


Fig. 3. Monthly average water temperature at a depth of 7.5 m. Vertical bars indicate the range of the highest and lowest temperature.

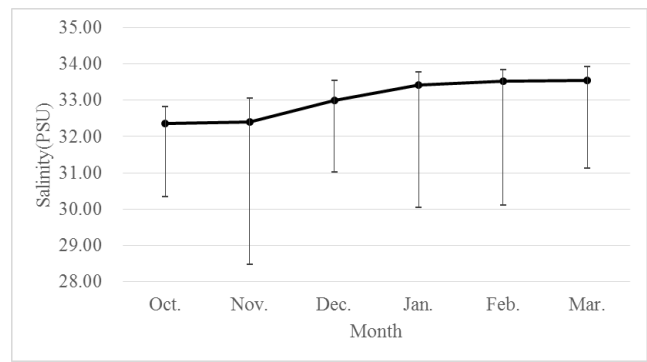


Fig. 4. Monthly average salinity at a depth of 0.5 m. Vertical bars indicate the range of the highest and lowest salinity.

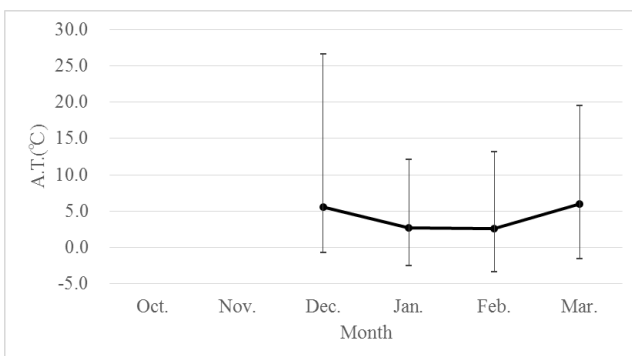


Fig. 5. Monthly average atmospheric temperature. Vertical bars indicate the range of the highest and lowest temperature.

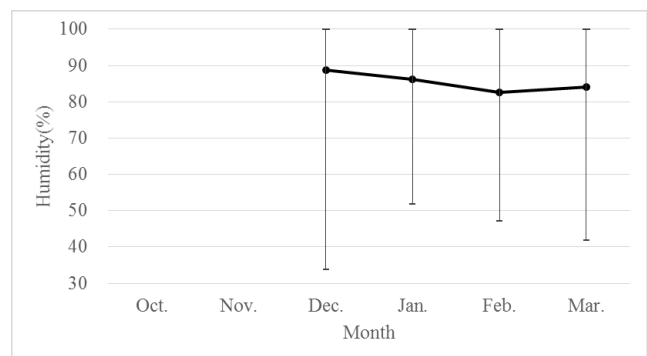


Fig. 6. Monthly average Humidity. Vertical bars indicate the range of the highest and lowest temperature.

新規メラトニン誘導体の骨代謝に対する作用

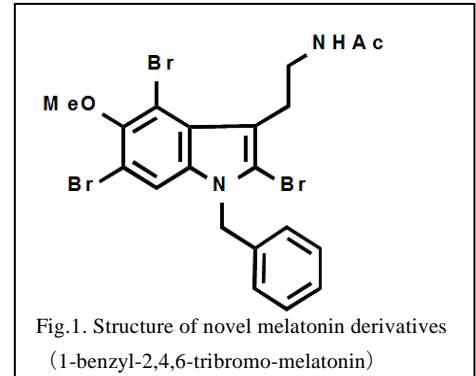
帖地 藍, 関口俊男, 鈴木信雄

〒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

Ai Chouchi, Toshio Sekiguchi, Nobuo Suzuki: Effect of novel melatonin derivatives on bone metabolism.

【背景】

メラトニンは、概日リズムを調節するホルモンであるが、最近、骨代謝への関与を示唆する報告がある。一方、真骨魚類のウロコには哺乳類の骨と同様に、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・骨代謝を行う（Suzuki et al., 2008a）。そこでメラトニンの骨に対する作用を、ウロコという骨モデルを用いて *in vitro* で解析した。その結果、メラトニンは骨芽細胞と破骨細胞の両方の細胞の活性を抑制することがわかった（Suzuki and Hattori, 2002）。さらに、メラトニンの新規誘導体（1-benzyl-2,4,6-tribromo-melatonin: BTBM）（Fig. 1）を合成し、ウロコに対する作用を調べた結果、新規メラトニン誘導体は、骨芽細胞の活性を上昇させるが、破骨細胞の活性を抑制することをウロコの *in vitro* の培養系により見出した（Suzuki et al., 2008b）。



【目的】

本研究では、以下の2種類の実験を行った。実験1では、魚の骨代謝に対する新規メラトニン誘導体の作用を調べるために、キンギョを用いて *in vivo* の実験を行い、*in vitro* で行った実験の再現性を調べた。次に、実験2では、ラット（骨折治癒モデル）を用いた *in vivo* の実験により、魚類で得られた結果の再現性を哺乳類で確認すると共に、骨折治癒の効果を調べた。

【方法】

実験1：魚の骨代謝に対するBTBMの作用 (*in vivo*)

内在性の性ホルモンの影響を除くために、材料として、未成熟なキンギョ (*Carassius auratus*) (体重4 - 6 g) を用いた。キンギョの腹腔内にBTBMを0.5 g/ g body weightの割合で未成熟なキンギョに投与し、1、2、及び3日目にそれぞれのキンギョの鰓を切断して、ヘパリン処理したキャピラリーを用いて採血し、さらにウロコを採取して細胞活性と遺伝子発現を調べた（それぞれの日数において、n = 10）。なお、BTBMは、1% DMSOに溶解して、キンギョの腹腔内に投与した。一方、コントロールも実験群と同様に1% DMSOを腹腔内に投与して、1、2、及び3日目に採血及びウロコを採取した。採取した血液及びウロコは、測定まで-80°Cで保管した。

血液中のカルシウム濃度は、和光のキットを用いて測定した。一方、ウロコで発現している遺伝子を調べるために、まず、キアゲンのキットを用いてトータルRNAを抽出して、タカラのキットを用いてcDNA合成を行った。その後、リアルタイムPCRにより、ウロコで発現している骨代謝マーカー遺伝子を解析した。

実験2：ラット（哺乳類）の骨代謝に対するBTBMの作用 (*in vivo*)

ラットの実験は、ハムリー株式会社で実施した。5週齢のSDラットを用いて、通常食を与え、バリアシステム（BSL2レベル）で飼育した。ラットは、左側の大腿骨の骨幹部を外科的に切断した骨折治癒モデルを用いた。陽性対照薬にビスホスホネートの1種であるアレンドロ酸ナトリウム

(ALN) を用いて、BTBMとの作用を比較した。ALNは、現在、ヒトの骨疾患の治療薬として実際に使用されている化合物である。ALN (20 µg/kg) を1週間に3回投与した。一方、BTBMは0.6 mg/headを1日1回、毎日投与した。投与開始後4週目と8週目で大腿骨及び血液を採取した。骨は破碎し、TaKaRaのキットを用いてトータルRNAを抽出して、cDNAを合成した。その後、リアルタイムPCRにより、ウロコで発現している骨代謝マーカー遺伝子を解析した。一方、血液中のカルシウム濃度は、魚と同様に和光のキットを用いた測定した。

【結果】

実験1：魚の骨代謝に対する新規メラトニン誘導体の作用 (in vivo)

BTBMを投与してから1日目において、有意に血漿中のカルシウム濃度が低下した。そこで、1日目にサンプリングしたウロコの細胞活性を測定した。その結果、破骨細胞の活性が有意に低下していることがわかった。また破骨細胞のマーカーを解析した結果、破骨細胞のマーカーであるカテプシンK及び酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ mRNAの発現量が低下していることがわかった。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 (RANKL) の発現量が有意に低下した。

実験2：ラット (哺乳類) の骨代謝に対するBTBMの作用 (in vivo)

キンギョのみならずラットにおいても、BTBMを投与して4週間後に、血液中のカルシウム濃度が有意に低下した。なお、8週間には対照群の値にまで回復していた。一方、ALNを投与すると、血液中のカルシウム濃度は、有意差は認められなかったが、上昇する傾向があった。骨代謝マーカーのmRNAの発現を調べた結果、骨折治癒が完了していない4週齢で有意な変化が認められた。非骨折部位において、破骨細胞の吸収抑制効果が認められ、骨折部位でも同様の変化があった。さらに骨芽細胞のマーカーにおいては、有意差は認められなかったが、上昇傾向が認められた。したがって、骨折部位及び非骨折部位においても、骨形成が進行している方向で作用していることが判明した。

【まとめ】

- 1) キンギョを用いた *in vivo* の実験により、BTBM は破骨細胞に作用して、破骨細胞の活性を抑制することにより、血液中のカルシウム濃度を低下させることが判明した。
- 2) BTBM は骨芽細胞で発現して破骨細胞を活性化させる因子 (RANKL) の発現も抑制することがわかった。
- 3) ラットにおいても、BTBM は骨吸収抑制作用があり、血液中のカルシウム濃度を低下させ、骨吸収を抑制して、骨形成も促すことがわかった。さらに、骨折治癒にも有効である可能性が示された。

【引用文献】

- Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, **33**: 253-258 (2002)
- 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.*, **45**: 229-234 (2008a)
- Suzuki, N., Somei, M., Kitamura, K., 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 (2008b)

(本研究は、金沢大学自然システム学類生物コース 帖地藍氏の卒業論文の一環として行われた)

アオゴカイにおけるメラトニンの同定

新田沙織, 関口俊男, 鈴木信雄

〒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

Saori Nitta, Toshio Sekiguchi, Nobuo Suzuki: Identification of melatonin in annelid, *Perinereis aibuhitensis*

【背景】

メラトニンは分子量232のアミンであり、その産生量は脊椎動物において、暗期に高く明期に低いリズムを示している。その生理的機能は概日リズムへの同調機構、季節性の繁殖の調節機能、抗酸化物質としての酸化ストレス応答等が知られている。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。哺乳類におけるメラトニン合成の律速段階段階として、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るとされており、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る。このN-アセチルセロトニンの合成に関与するのが、アリルアルキルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ（AANAT）である。

上記の知見は、主にヒトを含めた脊椎動物の研究により得られたものであり、無脊椎動物におけるメラトニンの役割や合成経路は不明な点が多く、特に環形動物ではメラトニンも同定されていない。

【目的】

本研究では、海産環形動物であるアオゴカイ (*Perinereis aibuhitensis*) に注目してメラトニンの同定研究を行った。

【方法】

材料と飼育方法

アオゴカイ成体 (*Perinereis aibuhitensis*) は、伊豆中央水産から購入した (Fig. 1)。インキュベーター (Panasonic MIR-154) を用い、19°C 300 luxの光を12時間の明暗サイクルで、最低5日間飼育した。



Fig. 1. *Perinereis aibuhitensis*

実験1, アオゴカイ頭部におけるメラトニンの同定

アオゴカイの頭部を夜24:00に20個体分採取し、クロロホルム1mlに浸漬、10°Cで24時間攪拌した。クロロホルム層を回収し、窒素乾固後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用のバッファー(メタノール30%、酢酸アンモニウム50mM、pH4.8) 300 μ lに溶解した。試料は、HPLC (Hitachi Model D-2000 Elite) を用い、C18カラムに対し、バッファーを流速0.8ml/minで分析した。メラトニン標準物質と同一のリテンションタイムを示すピークを分取

し、液体高速クロマトグラフ/タンデム質量分析器 (LC/MC/MC) を用いメラトニンであることを確認した。

実験2. メラトニン合成に関わる酵素活性の検討

12時間の明暗サイクルに順化させたアオゴカイの頭部を明期 (12:00) に10個体採取し、PBS 3mlでホモジェナイズし、セロトニンとアセチルCoAを加え26°Cで30分インキュベートした。ネガティブコントロールとして、PBSにセロトニンとアセチルCoAを加えたサンプル、ゴカイ頭部ホモジェネートにアセチルCoAのみ加えたサンプルを用意し、同様の条件でインキュベートした。各サンプルは、メラトニン分析と同じ条件によってHPLCで分析した。産物の有無は、N-アセチルセロトニン標準物質との比較で検討した。

【結果】

実験1, アオゴカイ頭部におけるメラトニンの同定

アオゴカイにおいてメラトニンを同定する為に、頭部をクロロホルム抽出し、HPLCを用い分析した結果、メラトニンの標準物質と同じリテンションタイムである部分にピークが検出された。さらにこのピークを回収し、LC/MS/MSにより質量分析した結果、233と174.4にピークをもつメラトニンに特異的なシグナルパターンを得たため、ゴカイ頭部におけるメラトニンの存在を確認した。

実験2. メラトニン合成に関わる酵素活性の検討

ゴカイのメラトニン合成経路を明らかにするために、哺乳類におけるメラトニン合成の律速酵素であるAANATの酵素活性を、明期のアオゴカイを使用して検討した結果、ゴカイ頭部抽出液にセロトニンとアセチルCoAを加えることで、N-アセチルセロトニンが生成された。加えて、PBSにセロトニンとアセチルCoAを加えたサンプルと、ゴカイ頭部にアセチルCoAのみ加えたサンプルの分析より、基質と補酵素のみでN-アセチルセロトニンが生成しないこと、本解析におけるゴカイ頭部抽出液の量では、セロトニンないし、N-アセチルセロトニンの混入がほとんど認められないことを示した。以上のことから、ゴカイがメラトニンを合成していること、メラトニン合成にAANATが関与していることを明らかにした。

【まとめ】

- 1) HPLCとLC/MS/MS を用いた解析より、アオゴカイにメラトニンが存在することを明らかにした。
- 2) AANAT活性実験の結果、アオゴカイがメラトニンを合成していること、メラトニンの合成経路が脊椎動物と類似していることを明らかにした。

(本研究は、金沢大学自然システム学類生物コース 新田沙織氏の卒業論文の一環として行われた)

多環芳香族炭化水素類の魚類の骨代謝に対する作用

表 俊樹, 関口俊男, 鈴木信雄

〒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

Toshiki Omote, Toshio Sekiguchi, Nobuo Suzuki: Effect of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) on bone metabolism in teleosts.

【背景】

多環芳香族炭化水素 (Polycyclic aromatic hydrocarbon: PAH) 類は原油に含まれる環境汚染物質の一つであり、重油流出事故等を通じて海洋汚染を引き起こす。実際に原油汚染海水で孵化した稚魚には脊柱彎曲が観察されているが (Incarbona et al., 2005)、その発症機序は不明である。そこで骨のモデルとして骨芽細胞と破骨細胞が共存するウロコ (Suzuki et al., 2007) を用いて、PAH類の骨代謝に対する作用を解析した。

【目的】

本研究では、再生ウロコは骨芽細胞と破骨細胞のいずれの活性も高い (Suzuki et al., 2009) ことから、再生ウロコを用いた。PAH類として注目しているのは、Benzo[c]phenanthrene (BcP) (Fig. 1) である。この化合物は、メダカの胚を用いた実験で毒性が強いこと

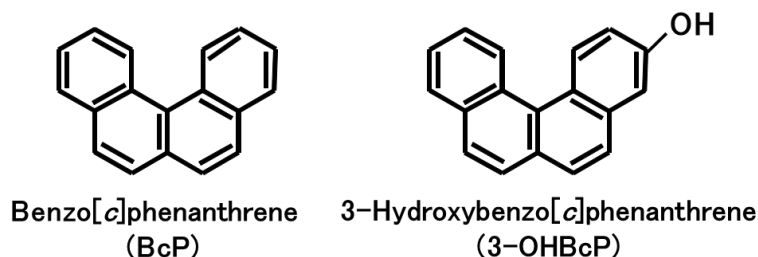


Fig. 1. PAHs used in this study.

が、当研究室で明らかにされている。さらに、このBcPの代謝産物である水酸化体 (3-OHBcP: 3-hydroxybenzo[c]phenanthrene) (Fig. 1) の毒性がBcPよりも強いこともメダカの胚を用いた実験で明らかになったので、BcP及び3-OHBcPに注目して実験を行った。in vivoの実験では、親化合物であるBcPの投与によるウロコの再生率 (%) に対する影響を調べ、さらに実際にBcPが代謝され、3-OHBcPに変換したことを確認した。即ち、BcPを腹腔内に投与後、胆汁を採取して胆汁中の水酸化体を解析した。in vitroの実験では、BcPと3-OHBcPの骨芽細胞及び破骨細胞に対する作用を調べるために、再生ウロコの培養系で解析した。

【方法】

実験1：キンギョのウロコの再生率に対するBcPの影響 (in vivo)

麻酔下でキンギョからウロコを抜き、そのキンギョの腹腔内にBcPをそれぞれ0.1 ng/g body weightの割合で3日おきに投与し、25℃でキンギョを飼育した。ウロコの再生段階で細胞活性が盛んな時期である12日目に再生ウロコを採取した。採取した再生前のウロコの面積を100とした時の割合を調べた。さらにin vivoの実験では、BcPが実際に代謝され水酸化体に変換したことを確認するため、胆汁を採取して胆汁中のBcPの水酸化体を解析した。

実験2：キンギョのウロコの骨芽及び破骨細胞に対するPAHとOHPAH類の影響 (in vitro)

麻酔下でオスのキンギョ (*Carassius auratus*) からウロコを抜き、12日後に、再度麻酔下で再生ウロコを採取した。採取した再生ウロコを 10^{-11} 、 10^{-10} 、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} Mの BcPと3-OHBcPをそれぞれ添加した培地 (L-15培地) で6時間培養した。なお、これらの化合物はエタノールに溶解していたので、対照群にはそれと同様のエタノール (0.1%) を添加した。キンギョの右と左側の同じ位置のウロコは骨代謝がほぼ同じであることから、左側に試験物質を、右側にエタノールをコント

ロールとして入れ、左右同じ位置のウロコで比較した。6 時間培養後、 -80°C で急速冷凍し、保存した。その後、常温で解凍し、破骨細胞活性マーカーとして酒石酸耐性酸ホフターゼの活性を、*p*-ニトロフェニルリン酸ニナトリウムを基質としてpH5.3の酸性酒石酸緩衝液中で生成する*p*-ニトロフェノールを405 nmで吸光度を測定することによって求めた。骨芽細胞活性マーカーとしてアルカリホフターゼの活性を、*p*-ニトロフェニルリン酸ニナトリウムを基質として、pH 9.5の100 mMトリス・塩酸緩衝液中で生成する*p*-ニトロフェノールを同様に測定することによって求めた。ウロコの面積は、メチレンブルー染色を施してイメージスキャナーにより自動測定した。本研究では、20匹のキンギョを用いた。1個体からそれぞれ8枚のウロコをとり、その8枚の平均値を実験群と対照群との間で比較した。

【結果】

実験 1 : キンギョのウロコの骨芽及び破骨細胞に対する PAH と OHPAH 類の影響 (*in vitro*)

*in vivo*の実験においては、ウロコの再生率は、12日目まで有意に低下することが判明した。胆汁中のOHBcP類については、BcPを投与したキンギョから3-OHBcPが検出され、実際にキンギョにおいてBcPが代謝されて、3-OHBcPが作られていることが判明した。

実験 2 : キンギョのウロコの骨芽及び破骨細胞に対する PAH と OHPAH 類の影響 (*in vitro*)

*in vitro*の実験において、3-OHBcPを添加して培養した時に濃度依存的に骨芽細胞の活性の低下し、 10^{-10} Mにおいても有意差が認められた。しかしBcPを添加した場合は、骨芽細胞の活性には影響を示さなかった。破骨細胞においては、BcP及び3-OHBcPを添加しても有意な変化は見られなかった。

【まとめ】

- 1) 非常に低い濃度のBcP (0.1 ng/g body weight) を投与しても、キンギョのウロコの再生率が低下することが判明した。
 - 2) BcPを投与したキンギョの胆汁から3-OHBcPが検出された。
 - 3) *in vitro*の実験により、骨芽細胞の活性を抑制するのは、BcPではなく、3-OHBcPであることが判明した。
- 以上のことから、PAH類は、水酸化体に変換されることで魚の骨代謝に毒性を発生している可能性が高いことがわかった。現在、ゼブラフィッシュのウロコを用いたGeneChip解析を行い、詳細な機構を調べている。

【引用文献】

- Incarbona, J. P., et al., Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environ. Health Perspect.*, **113**, 1755-1762 (2005).
- Suzuki, N., et al., Effect of vibration with a frequency on osteoblastic and osteoclastic activities: Analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. *Adv. Space Res.*, **40**,1711-1721 (2007)
- Suzuki, N., et al., Response of osteoblasts and osteoclasts in regenerating scales to gravity loading. *Biol. Sci. Space*, **23**, 211-217 (2009)

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

【構成員】

1) 職員

准教授 (施設長)	鈴木信雄 (nubuos@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 (海産無脊椎動物の神経・内分泌系について、分子進化及び生理機能進化の観点で研究している)
特任助教	鎌内宏光(kamauchi@se.kanazawa-u.ac.jp) 博士 (地球環境科学) 専攻 陸域水域相互作用 (陸域と陸水・海との相互作用について幅広く研究を進めている。キーワード：土地利用変化、長期環境変動、サブシディー、生物多様性、日本長期生態学研究ネットワーク (JaLTER))
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
技術補佐員	小木曾 正造 (shozoogiso@se.kanazawa-u.ac.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	表俊樹 帖地藍 新田沙織
修士課程1年	上西篤志 山本樹
博士課程3年	谷内口孝治

3) 連携研究員

染井正徳
三宅 裕志
笹山 雄一



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