

提出日平成18年9月30日

## 調査航海概要報告書

1. 航海番号/レグ名/使用船舶 :  
NT06-14/なつしま
2. 研究課題名 :  
「マイクロデバイス技術を応用した深海現場複合計測技術に関する国際共同研究」  
提案者/所属機関/課題受付番号 :  
藤井輝夫/東京大学生産技術研究所/S06-21
3. 首席研究者/所属機関 :  
藤井輝夫/東京大学生産技術研究所
4. 乗船研究者 :  
藤井輝夫/東京大学生産技術研究所  
竹村明洋/琉球大学  
山本啓之/JAMSTEC  
三輪哲也/JAMSTEC  
吉田尊雄/JAMSTEC  
林 純子/JAMSTEC  
北田 貢/新江ノ島水族館  
福場辰洋/東京大学生産技術研究所  
宮地輝光/東京大学生産技術研究所  
玉井雄一郎/東京大学生産技術研究所  
福沢範行/東京大学生産技術研究所  
岡本拓士/東京大学生産技術研究所  
前田義明/セレス  
小池祐一/セレス  
山崎秀雄/琉球大学  
山田明德/琉球大学  
緒方泰介/琉球大学  
柏木朋美/琉球大学  
保 智己/奈良女子大学  
大久保磨美/奈良女子大学
5. 調査海域 :  
鳩間海丘(水深1300-4900m)  
24°48.5' N、24°54.5' N  
123°48.5' E、123°53.5' Eの経緯度線で囲まれる範囲内
6. 実施期間 :  
平成18年7月22日~7月30日

## 調査航海概要

### (目的と背景)

NT06-14 は、平成 17 年度深海調査研究プロポーザル S06-21「マイクロデバイス技術を応用した深海現場複合計測技術に関する国際共同研究」(課題提案者：藤井輝夫/東京大学)及び S06-22「浅海から深海への環境適応における海洋動物の生理的機能と進化」(課題提案者：竹村明洋/琉球大学)に基づくものである。前者は熱水地帯の化学及び生物的などに関する複合的な計測を行うための、先端的な計測機器、技術の開発を、また後者は深海性魚類の生物時計形成機構及び熱水・冷湧水域の無脊椎動物の環境適応について調査研究を行い、これを浅海に棲息する生物と比較することにより、海洋生物の生理機能を明らかにすることを主な目的としている。

### (具体的研究内容)

本航海では、調査海域である鳩間海丘カルデラ内の熱水活動を主たる対象とし、以下に述べるような課題について調査研究を行った。

#### 1) マイクロ現場遺伝子解析システム (IISA-Gene) の開発

首席研究者のグループでは、フロースルー型 PCR デバイスを中核とした現場遺伝子解析システム(図 1)の開発を進めている。本航海では、そのプロトタイプをハイパードルフィンに搭載して動作試験を行った。#586 及び#587 潜航では潜航全体を通してシステムは正常に作動し、各潜航につき 2 回ずつ遺伝子検出操作を行った。現在、実験結果の詳しい解析を進めているところである。

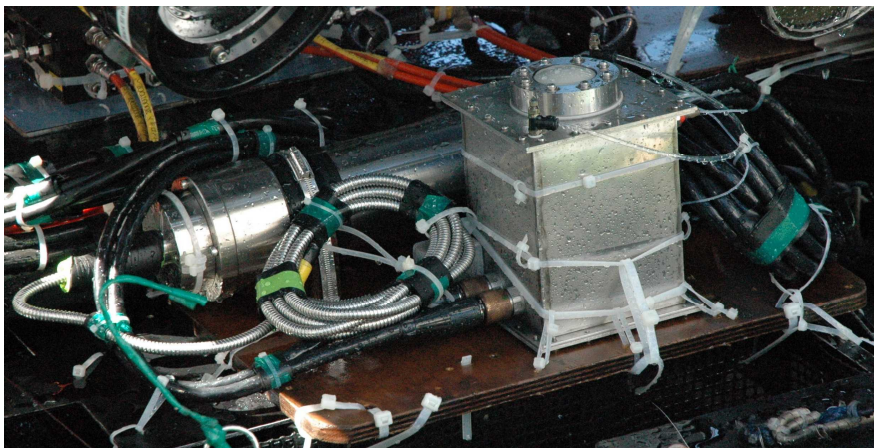


図 1 IISA-Gene のハイパー搭載写真

#### 2) 現場型 ATP 計測システムの開発

微生物活性評価の指標となる ATP(アデノシン 3 リン酸)の現場計測を行うデバイスの開発を行うための基礎データを得るため、採取した海水サンプルについて船上分析を行った。ニスキン採水器で海水サンプルを採取し、船上でサンプル中の微生物由来の ATP 量をルシフェリン-ルシフェラーゼ発光反応を用いて定量した。まずサンプル中の遊離 ATP のみを消去し、次に微生物の細胞を破碎し、細胞内 ATP を抽出した。この抽出した細胞内 ATP を含むサンプル 100  $\mu$ L を発行試薬 100  $\mu$ L と混合し、発光計測器で発光強度を計測した。その発光強度をあらかじめ作成しておいた検量線の式に代入し、さらにサンプルと他の試薬との体積比から逆算することで、元の海水サンプル中の ATP 量を定量した。採取したサンプルの変性の可能性を調べるため、各サンプルを冷蔵保存したものと冷凍保存したものを研究室に搬送した。

### 3) 現場型化学センサの開発

現場型化学センサとして、半導体素子であるイオン感応性電界効果型トランジスタ(ISFET)を応用したpHセンサならびにpCO<sub>2</sub>センサ、またORP(酸化還元電位)センサをハイパードルフィンに搭載し、現場計測を行うと同時に、図2に示すように海底面上に長期(6日間)設置し計測を行った。

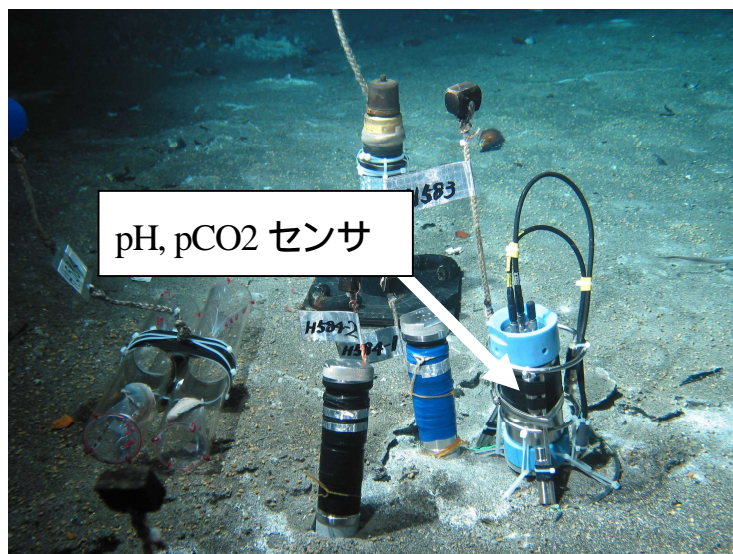


図2 海底面(白色域)に設置した現場型化学センサ)

### 4) 深海生物サンプルに関するストレス蛋白質解析

現場に生息している超好熱性アーキア *Thermococcus* の細胞内のストレス蛋白質の遺伝子発現パターンを検出することで、*Thermococcus* が生息していた熱水環境を推定する技術を開発することを目的として、本航海では、ニスキン採水器で採取したサンプル水をフィルターを過し、サンプル水中の微生物を捕捉した。また、パラアルビネラおよびシンカイヒバリガイについてもストレス蛋白質の発現解析を行い、共生や熱耐性に関する性質を調べるため、個体採取を行った。

### 5) 深海棲動物の周期性活動の適応進化

深海棲魚類の時計遺伝子の解析を行うため、ソコビクニンの個体を保圧式生物採集装置(ディープアクアリウム)を用いて採集し、目、肝臓及び松果体を船上で凍結保存した。このサンプルは、熱帯生物圏研究センター瀬底実験所へ凍結したまま持ち運び、RNA抽出後cDNAとして保存した。それぞれのサンプルについてメラトニン合成酵素[aaNAT1(網膜由来)及びaaNAT2(松果体由来)]及び時計遺伝子の部分配列を決定する。一方、船上で眼を細切し、実験群として光曝露、対照群として全暗条件下で、4度で12時間培養した(図3)。培養後の培養液はメラトニン測定用に凍結し、細切した眼は凍結し、aaNAT1遺伝子発現量の比較を行う。

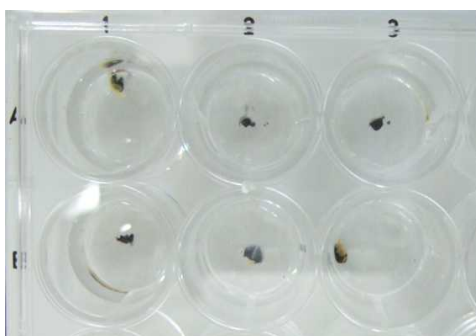


図3 船上で培養中の網膜片



図4 ソコビクニンの卵巣

また、生殖腺（卵巣）及び肝臓は4%パラホルムアルデヒドに保存した。これらのサンプルは生殖腺の構造及び成熟度の判定のために用いる。ソコビクニンの卵巣には様々な発達段階にある卵母細胞が認められた（図4）。このことから繁殖は周年行われている可能性がある。また、潜行中の映像を注視すると、大小個体がペアになっている場合が見受けられた。今回採集できた個体が、大型個体であったことを考えられると、体長に個体差があることも考えられた。

#### 6) 深海性魚類の側眼及び松果体の光受容能

上記により捕集したソコビクニンについて、採集された個体は死亡していたが、比較的損傷が少なかったため、側眼網膜からの光応答の記録を試みた。提出された眼球に金属電極を刺入し、525nmの光を照射した。その結果、死亡個体からの眼球のため得られた結果からは光受容能の判定は不可能であるが、わずかではあるが光刺激に対応した反応が記録された。生きた個体による実験が可能になれば、感度や分光感度を調べることも可能であると考えられる。

#### 7) 保圧式生物採集装置（ディープアクアリウム）の開発

鳩間海丘カルデラ内を遊泳するビクニンの捕獲ならびに生個体の回収を試みた。#584では4個体を捕獲し、保圧状態での揚収にも成功したが、排水口における隙間(1cm程度)にすべて魚が吸引されてしまい、アクアリウムタンク内には魚の存在が確認できなかった。そこで、図5のように保圧アクアリウムタンク内の排水口周辺に塩ビチューブを用いて籠を設置し、魚の流出を防ぐ工夫をした。その後、#586において7個体を捕獲、回収したが、Oリングの不具合により、保圧タンク内の圧力が保持できなかった。そのため、図6のように魚はほぼ全てショック状態に陥った。再加圧(13MPa)したのち、3時間様子を見たが、生物の回復は確認できなかった。

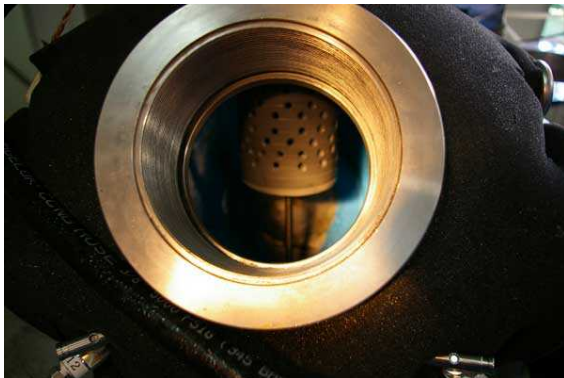


図5 新たに設置した排水側のケージ



図6 減圧によるショック状態のビクニン

#### (調査結果のまとめ)

調査の結果、マイクロデバイスを用いた現場型遺伝子解析システムを実海域に展開し、2潜航について合計4回にわたり解析操作を行うことができた。得られたデータの妥当性については、後日の詳細な解析によって明らかにする必要があるが、今後システムの完成度を高める上で有用な知見を数多く得ることができた。一方、CTD、濁度、pH、ATP量（生物現存量）など、多項目について計測を行い、今後の現場型センサならびに計測システムの開発の基礎となるデータが得られた。これらの知見を今後の技術開発に活用し、より効率的で、なおかつ情報量の多い複合計測技術の確立につなげる予定である。また、魚類をはじめとする多数の生物採集を行い、それらの深海環境への適応について船上実験を行うとともに、ラボへ持ち帰ってからの解析に供するサンプルを得ることができた。今後、これらのサンプルについて、解析を進めることにより、深海生物における生理機能の環境適応や、太陽光に依存しない生物のリズムに関する新たな知見につながることを期待される。