

平成18年度深海調査研究  
「なつしま／ハイパードルフィン」調査行動  
(NT06-14 鳩間海丘)  
クルーズレポート

平成18年9月

首席研究者 藤井 輝夫  
(東京大学生産技術研究所)



## はじめに

本レポートは、平成18年7月22日～7月30日に行われた海洋調査船「なつしま」及び無人探査機「ハイパードルフィン」を用いた調査行動（NT06-14）の内容を速報的にとりまとめたものである。

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。

そのため、これまでも複数回に渡って調査が行われてきた鳩間海丘カルデラ内を調査海域とし、熱水プルームの広がりについて、物理的、化学的、生物学的な見地から複合的な計測を試みると同時に、魚類や無脊椎動物の捕獲を実施した。調査にあたっては、機器開発が主目的であることから、新たに開発した計測機器や生物捕獲機器を無人探査機に搭載して海域に投入するとともに、既存の手法による試料のサンプリングや計測も並行して行った。ハイパードルフィンで全5潜航（Dive #583～#587）に渡って鳩間海丘カルデラ内の調査を実施し、うち2潜航では魚類捕獲作業を、また1潜航ではCO<sub>2</sub>液滴の挙動観察を試みた。また折からの台風接近に伴って日程変更を余儀なくされたため、当初予定していた黒島海丘の調査は見送ることとした。

調査結果に基づく学術上の成果を述べるためには、今後の詳細な解析を待たねばならないが、マイクロデバイス技術を用いた新しい計測システムの動作確認ができたこと、現場型化学センサはじめ複合的な計測の実施ができたこと、多数の生物サンプルを捕獲し、その観察・解析が実行できたこと、など今後につながる大きな成果が得られたものとする。

最後になるが、本航海を実施するにあたり、無人探査機「ハイパードルフィン」運航チーム（運航長：千葉和宏）ならびに海洋調査船「なつしま」乗組員（船長：請蔵栄孝）の皆様には大変お世話になった。ここに深甚なる感謝の意を表す。

平成18年9月

藤井 輝夫（NT06-14 首席研究者）



## 目 次

1. 調査研究の目的	1
1-1 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	1
1-2 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	1
2. 調査日程	2
2-1 調査海域図	2
2-2 航海ログ	2
3. 乗船者リスト	3
3-1 研究者	3
3-2 乗組員	3
4. 主要な搭載機器（研究者持ち込み機器）	4
5. 調査結果	5
5-1 マイクロ現場遺伝子解析システム（IISA-Gene）の開発	5
5-2 現場型 ATP 計測システムの開発	6
5-3 深層水および熱水中に含まれる微生物の付着力測定法の開発	8
5-4 現場型化学センサの開発と二酸化炭素液滴の挙動観察	10
5-5 深海生物サンプルに関するストレス蛋白質解析	20
5-6 深海棲動物の周期性活動の適応進化	21
5-7 深海性魚類の側眼及び松果体の光受容能	23
5-8 ウロコムシの環境適応機構に関する研究	25
5-9 深海底の化学合成生態系研究：現場計測と生物試料の採集	28
5-10 保圧式生物採集装置（ディープアクアリウム）の開発	29
5-11 深海生物の長期飼育について	31
6. 将来の研究計画	33
7. まとめ	36
Appendix	36

(別紙)

1 : 調査海域図

2 : NT06-14 Ship Log

3 : Participants aboard – Research Group

4 : Participants aboard – Hyper Dolphin Operation Team & Natsushima Crew

5 : 採取サンプルのインベントリ情報

6 : 持ち込み機器による観測\_\_インベントリ情報

## 1. 調査研究の目的

調査研究の目的は、S06-21 および S06-22 のそれぞれについて、以下の通りである。

### 1-1 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

近年の深海研究における計測ニーズは、物理計測や化学分析にとどまらず、微生物群集解析等を含めて、現場での直接計測や長期変動モニタリングなど多様な計測形態が求められるようになった。しかしながら、これまでのところ十分な技術開発が行われてきておらず、特に生物学的な計測については、サンプリングによる以外には、ほとんど手段がないとあってよい。首席研究者らのグループでは、このような現状をふまえ、マイクロデバイス技術を応用し、従来の計測システムに比べて、格段に小型、高性能で、なおかつ現場での複合計測が可能なシステムの開発を進めている。具体的には、分析操作のマイクロ流体デバイスならびに化学センサ用の半導体デバイスなどの製作を行い、それらを主要な構成要素とした1) マイクロ現場遺伝子解析システム、2) マイクロ現場化学分析システム、ならびに3) 現場型化学センサなどを完成させつつあり、耐圧試験装置等を用いて、その性能評価を進めている。本調査研究では、これらのシステムを無人探査機に搭載し、実験室内では再現することが難しい実際の深海環境における計測を実施し、現場型計測システムとしての性能評価を行うことを目的とする。また、これまでに実績のある計測システムや計測手法とのデータ比較作業を通して、さらに改良を加え、時空間的に連続かつ複合的な計測を行うための基盤技術として、将来の深海研究に大きく貢献することを目標とする。

### 1-2 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

太陽光の降り注ぐサンゴ礁海域では光合成生物を中心に生態系が成り立っているのに対し、太陽光の届かない深海においては化学合成生物群集が中心となって生態系が構成されている。こうした生物の生息環境への適応について、浅海性の生物は太陽光の明暗を基準にした一日のリズムを刻んでいることが知られているが、深海においてのリズム形成に関しては不明である。また、深海の熱水・冷湧水域の環境では、地殻および堆積物層から供給される水素、メタン、硫化水素などをエネルギー源とする化学合成生物群が生息している。ここに生息する動物は、熱水・冷湧水に含まれる毒性物質に対して防御機能を獲得している。本調査研究では、これら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検討を加え、海洋動物の持つ生理機能の一端を明らかにすることを目標とする。

## 2. 調査日程

調査日程は平成18年7月22日～7月30日とし、途中、台風による海域離脱、荒天待機ならびに海域復帰（7月23日午後～27日朝まで）をはさんで、7月23日、7月27日～7月29日の4日間、無人探査機ハイパードルフィンにより合計5潜航（Dive #583～#587）を実施した。その主な作業は以下の通りである。

### □Dive #583（鳩間海丘カルデラ内）

現場型 pH センサの設置、地中温度測定、現場遺伝子解析システム動作テスト  
海底面観察、採水、採泥、生物採集

### □Dive #584（鳩間海丘カルデラ内）

地中温度計×2の設置、トラップ設置、現場遺伝子解析システム動作テスト  
採水、保圧式生物採集

### □Dive #585（鳩間海丘カルデラ内）

CO<sub>2</sub> 液滴観察、生物採集

### □Dive #586（鳩間海丘カルデラ内）

現場遺伝子解析システム動作テスト、採水、保圧式生物採集、トラップ回収

### □Dive #587（鳩間海丘カルデラ内）

現場遺伝子解析システム動作テスト、現場型 pH センサ及び地中温度計の回収  
CO<sub>2</sub> 液滴採集と観察、採水、生物採集

## 2-1 調査海域図

（別紙） 1：調査海域図

## 2-2 航海ログ

（別紙） 2：NT06-14 Ship Log



3. 乗船者リスト

3-1 研究者

(別紙)

3 : Participants aboard- Research Group

3-2 乗組員

(別紙)

4 : Participants aboard- Hyper Dolphin Operation Team & Natsushima Crew

#### 4. 主要な調査機器（研究者持ち込み機器）

##### (1) 現場遺伝子解析システム（IISA-Gene）

研究機関：東京大学生産技術研究所

本体：125×125×125mm、耐圧容器：100φ×350mm、重量：12.5kg

使用目的：海水中に含まれる微生物の現場遺伝子解析（PCR 反応）

設置場所：ハイパードルフィン搭載

##### (2) ATP 計測装置

研究機関：東京大学生産技術研究所、本体：250×400×300mm、重量：5kg

使用目的：海水中的 ATP 濃度の船上計測、設置場所：ウェットラボ内

##### (3) CTDT

研究機関：電力中央研究所、本体：700×500×1000mm、重量：10kg

使用目的：塩分、温度、深度、濁度の現場計測、採水

設置場所：ハイパードルフィン搭載

##### (3) 現場型 pH センサ、pCO<sub>2</sub> センサ、ORP センサ

研究機関：電力中央研究所、本体：80φ×200mm、重量：2kg×7個

使用目的：pH、pCO<sub>2</sub>、ORP の現場計測、設置場所：ハイパードルフィン搭載

##### (4) 液滴追跡ボックス

研究機関：電力中央研究所、本体：150×500×900mm、重量：10kg

使用目的：CO<sub>2</sub> 液滴の追跡撮影、設置場所：ハイパードルフィン搭載

##### (5) 採水器

研究機関：電力中央研究所、本体：10φ×650mm、重量：3kg×6個

使用目的：海水採取、設置場所：ハイパードルフィン搭載

##### (6) フィールド実体顕微鏡

研究機関：琉球大学、本体：150×160×100mm、重量：2.6kg

使用目的：生物観察用、設置場所：ウェットラボ内

##### (7) 電気生理実験セット一式

研究機関：琉球大学、使用目的：電気生理実験、設置場所：ウェットラボ内

##### (8) 保圧式生物捕獲装置

研究機関：JAMSTEC、本体：1000×700×1700mm、重量：130kg

使用目的：生物採集、設置場所：ハイパードルフィン搭載

##### (9) スラープガン+キャニスター

研究機関：JAMSTEC、本体：1500×1500×1500mm、重量：60kg

使用目的：生物採集、設置場所：ハイパードルフィン搭載

## 5. 調査結果

本調査研究の最終的な目標は、1) マイクロデバイス技術を導入して、無人探査機に搭載可能な小型の現場型計測システムを実現し、遺伝子解析、pH 計測微生物現存量などの多項目に関する複合計測を深海の現場で行うことを可能とするような技術を開発すること、及び2) 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検討を加え、海洋動物の持つ生理機能の一端を明らかにすることにある。本航海では、調査海域である鳩間海丘カルデラ内の熱水地帯を対象として、以下に述べる課題について調査研究を行った。

### 5-1 マイクロ現場遺伝子解析システム (IISA-Gene) の開発

福場辰洋、宮地輝光、岡本拓士、藤井輝夫 (東京大学生産技術研究所)

首席研究者のグループでは図 5-1 に示すようなフロースルー型 PCR デバイスを中核とした現場遺伝子解析システム (図 5-2) の開発を進めている。本デバイスは、マイクロファブリケーション技術を応用して、シリコンゴムの一種である PDMS (polydimethylsiloxane) を材料とし、幅 100 $\mu\text{m}$  ほどの微細な流路を形成したものであり、遺伝子解析に必要となる DNA の抽出、精製と PCR 反応操作を現場で実行可能である。

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。#583、#584 では、ハイパードルフィンとの間の通信不具合 (#583 終了後、解決済み)、検出用光ファイバの断線により、データを得ることはできなかった。しかし、#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 回ずつ遺伝子検出の操作を行い、図 5-3 に示すようなデータが得られた。メタン酸化細菌が有する酵素の遺伝子である pMMO をターゲットとして PCR を行ったが、増幅産物由来のシグナルは見られなかった。なお、実験結果の詳しい解析のため PCR 産物の溶液は回収し、冷凍保存した。

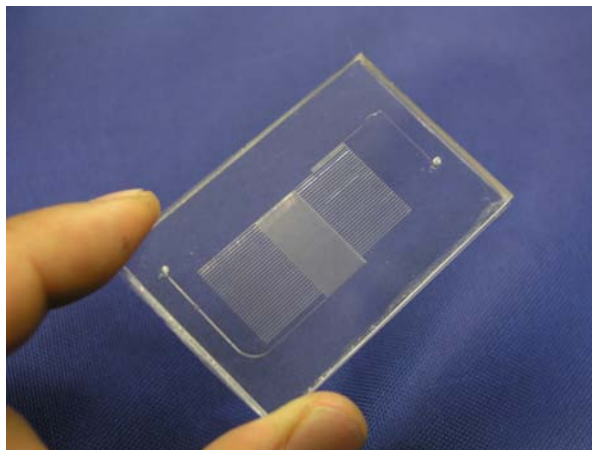


図 5-1 マイクロ PCR デバイス

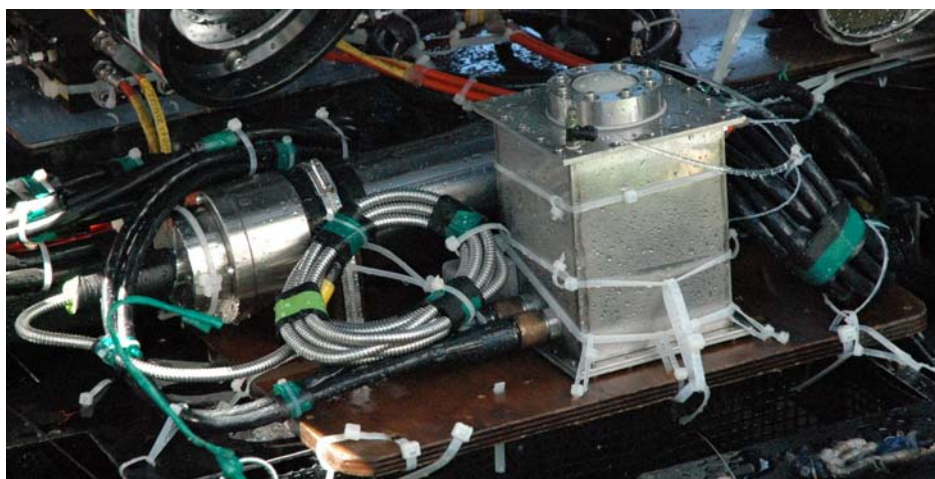


図 5-2 IISA-Gene のハイパードルフィンへの搭載写真

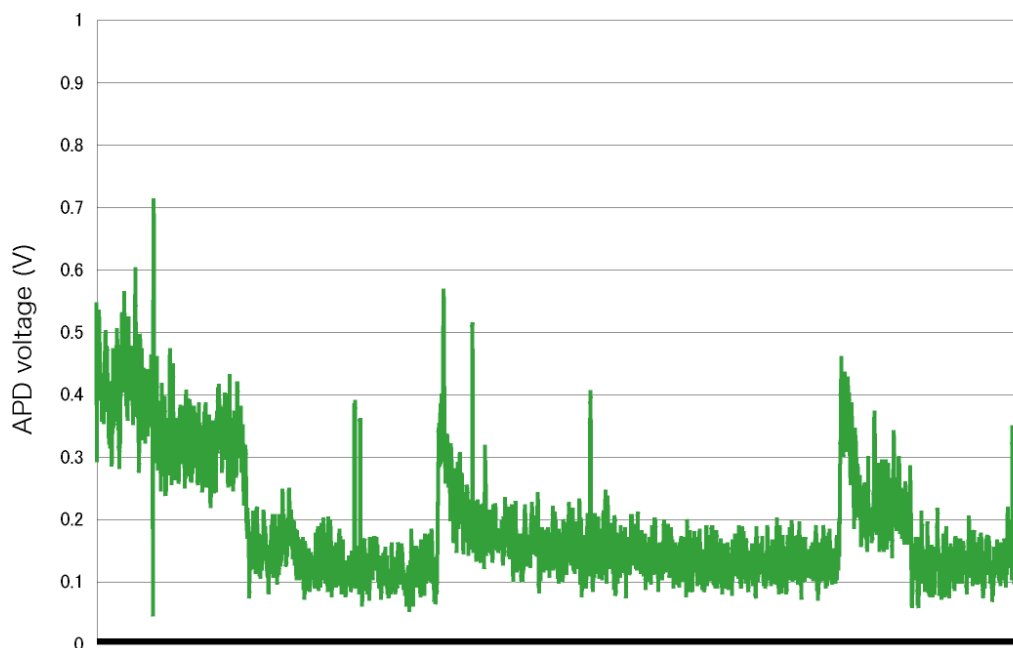


図 5-3 IISA-Gene によって得られたデータ (#586 潜航)

## 5-2 現場型 ATP 計測システムの開発

福沢範行、福場辰洋、藤井輝夫（東京大学生産技術研究所）

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、図 5-4 に示す地点において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. 検量線は、現場海水を濾過し、遊離 ATP を除去したものに濃度既知の ATP 溶液を加えることによって導出した. 本計測では試薬類にキッコーマン(株)の「ルシフェール AT100」、発光計測器に同社のルミテスターC-100N を用いた. また、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. 船上における ATP 濃度の計測結果を表 5-1 に示す.

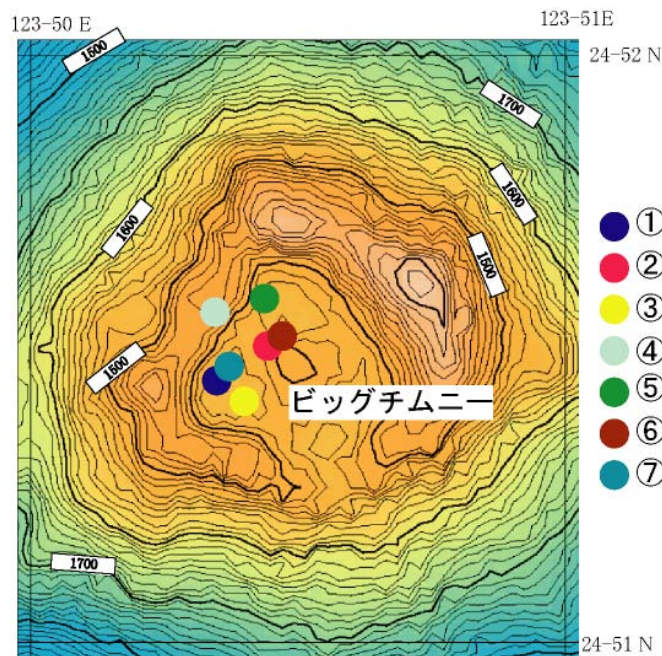


図 5-4 ATP 計測のための海水サンプル採取地点

表 5-1 ATP の船上計測結果

NST05-04 ハイバードルフィン(HPD)鳩間海丘[2006年7月22日~7月29日]											
潜行回	サンプル	ATP $\pm$ SD pM	1	2	3	4	5	6	7	8	9
#583	1(赤)	0.082 $\pm$ 0.096	-0.015	0.065	0.215	0.066					
	2(緑)	0.023 $\pm$ 0.030	0.053	-0.017	0.022	0.036					
#584	3(赤)	0.069 $\pm$ 0.102	0.176	-0.026	0.058						
	4(緑)	0.010 $\pm$ 0.041	-0.022	-0.032	-0.002	-0.023	0.004	0.103	0.041	0.012	0.010
#586	5(黄)	0.001 $\pm$ 0.001	0.001	0.001	0.00	0.003	0.001	0.002			
	6(白)	0.008 $\pm$ 0.004	0.008	0.011	0.004						
#587	7(黄)	No Data									
	8(白)	No Data									
	9(赤)	0.007 $\pm$ 0.011	-0.004	0.007	0.017						

### 5-3 深層水および熱水中に含まれる微生物の付着力測定法の開発

岡本拓士・藤井輝夫(東大 生産技術研究所)

深層水中および深海の熱水中には微生物が多量に含まれており、その活動は深海生態系において重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、現在さかんに行われている研究は 16S rDNA など分子遺伝学的マーカーを用いたものに偏っている。そのため、定性的な情報は増えているものの、定量的な議論はほとんど行っていない。実際にその生態系を把握し、将来的には予測を行えるようになるには定量的な情報も得る必要があり、それぞれの微生物種について、物理的、生理的な特徴を、できれば培養を行わずに知る方法を開発する必要がある。

本研究ではマイクロ微細加工技術によって作成された流路内に導入し、深海微生物の付着度合いについての測定を試みた。特に、熱水中の微生物は、熱水噴出孔下で生態系を構築していたものが熱水に巻き込まれ深層水中に放出されていると考えられている。熱水噴出孔地下で付着生活を行っているとするれば、強い付着性を持つ可能性がある。

3K #583 でニスキン採水器(赤, 緑)および MBARI 式採泥器の直上水を用いて実験を行った。流路は図 5-5 で示されるようなものであり、微生物を含んだ液体を一定流量で流すことによって、底面に対して微生物が付着し、付着場所によってどのような流れの条件下で微生物が付着するのかを評価できるようになっている。構造を PDMS で、微生物が付着する底面はガラスで作成した。試水に対して 1/5000 量の Syber Green I を加え、直後にシリンジポンプを用いて、流路内に導入した。流量は 0.5, 3, 20ul/min の三条件でそれぞれ 240, 40, 6 分間流した。

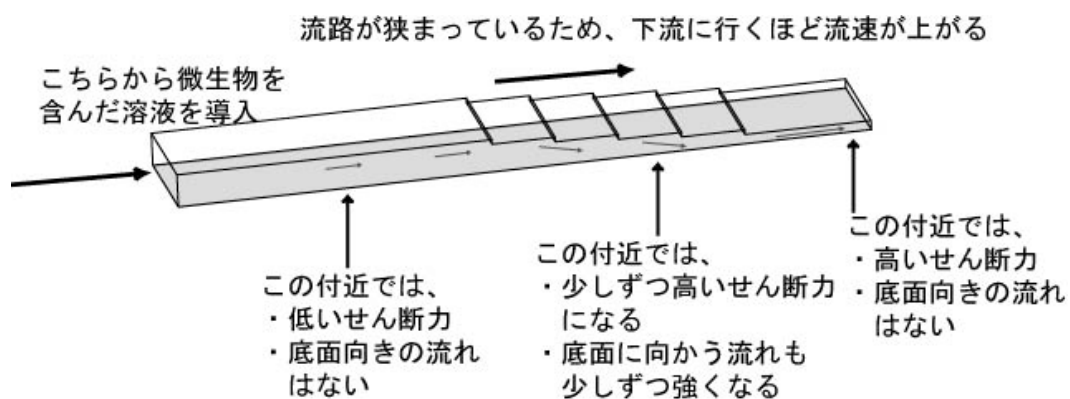


図 5-5 実験に用いた流路の模式図

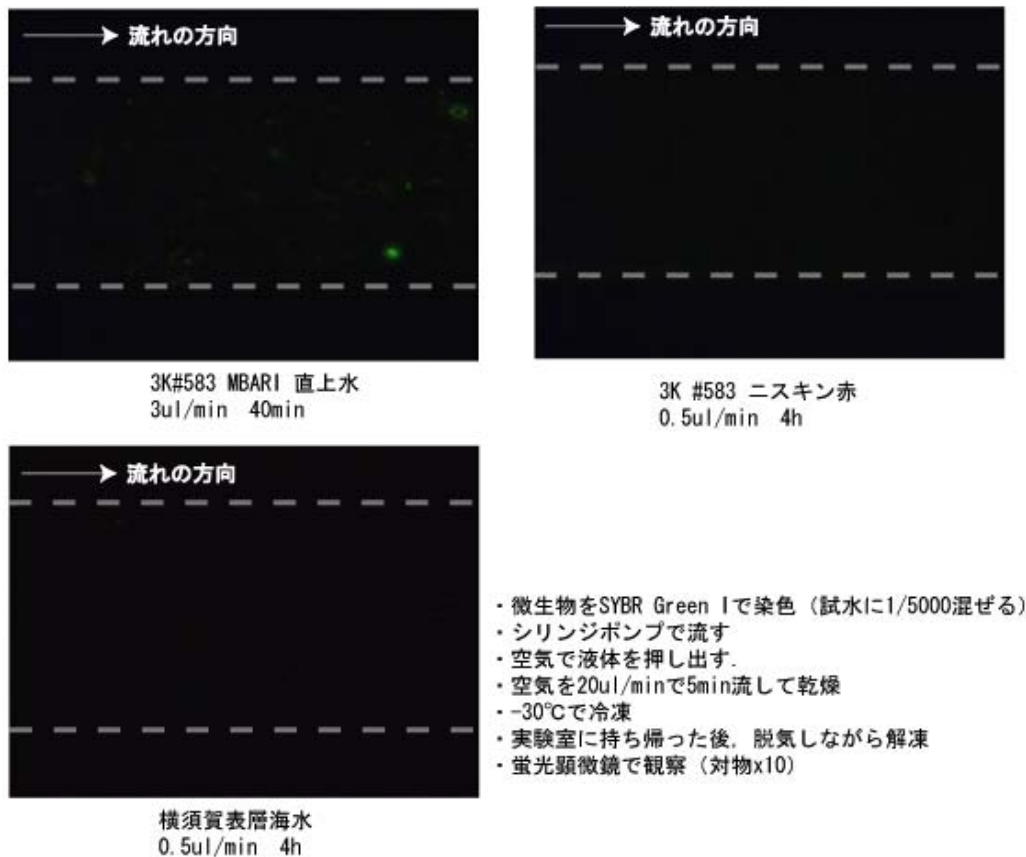


図 5-6 顕微鏡下での観察結果

結果の一部を図 5-6 に示す。MBARI 式の直上水中の微生物は多く付着した。この水には堆積物も多く混在しており、微生物濃度が非常に高くなっていると思われる。また上流から下流まで幅広く付着しており、幅広いせん断力に対応して付着する微生物が存在している、あるいは、浮遊性、付着性などが混在しているため、特定の条件での付着がみられない可能性がある。一方、ニスキンの水で採水された 2 つの試料は、どの流量条件においてもほとんど付着しなかった。ニスキンの水で採水された微生物は、MBARI 式で採水されたものにくらべて、ほとんどが深層水由来と思われる。そのため、ほとんど付着しなかったのは、深層水中の微生物濃度が低いためか、深層水中に含まれる微生物が非常に付着しにくいと考えられる。本実験では付着基盤としてガラスを用いている。これは地殻でもっとも多い材質であるため用いたが、深層水中の微生物についての実験では、付着しやすい別の物質を用いるべきと考えられる。



#### 5-4 現場型化学センサの開発と二酸化炭素液滴の挙動観察

下島公紀（電力中央研究所）、許正憲（JAMSTEC）、小池祐一（セレス）、  
玉井雄一郎、藤井輝夫（東京大学生産技術研究所）

本クルーズの電中研グループの主な目的は以下の2つである。

- ①現場計測用の pH/pCO<sub>2</sub> センサを用いて、二酸化炭素液滴近傍での pH/pCO<sub>2</sub> を計測し、二酸化炭素の溶解に伴う海水の低 pH 化の程度を把握すること
- ②深海における液体二酸化炭素液滴の挙動解析に必要な浮上速度、愉快速度、上昇高さなどのパラメータを明らかにするために、二酸化炭素液滴が浮上する過程で溶解していく状況をハイパードルフィンで観察、追跡可能かの判断を行うことを目的とした。

なお、液滴の挙動解析は以下の項目について検討した。

- 1) ハイパードルフィンによって浮上する二酸化炭素液滴を追跡しながら、その形状変化（液滴サイズやハイドレートの形成など）をハイビジョンカメラを用いて観察し、後の画像解析のため高解像度映像を記録する。
- 2) 追跡は二酸化炭素液滴が消失する深度まで行うが、追跡が困難な場合には二酸化炭素液滴観察ボックスをハイパードルフィンに取り付け、二酸化炭素液滴ボックス内に保持されるよう追跡・浮上する。

以下に、本航海における具体的な測定の方法と結果の概要について述べる。

##### 5-4-1 現場型 pH センサおよび採水による pH 測定

現場型 pH センサは、最大使用水深 6000m の耐圧を有し、測定範囲 0~14 pH、温度範囲 -5°C~100°C 以上、測定精度 ±0.0005pH、応答速度 0.5 秒以内として設計開発したものである。この pH センサは、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) と参照電極として海水の主成分である塩化物イオンに感応する塩化物イオン選択性電極 (CL-ISE) を用いている。その特徴は、応答が極めて速い、初期安定化時間が短い、高感度、耐圧性に優れている等の特徴を有している (図 5-7 参照)。一方、ニスキン採水による pH 測定は、Radiometer ION85 IONANALIZER を用いて密閉型セル内 (1 気圧, 25°C) で電位差測定を行った。それぞれのスケールは、SWS (Seawater Scale) の TRIS と AMP を用いてキャリブレーションを行った。

##### 5-4-2 MicroCTD による水温・塩分・水圧測定

MicroCTD の各センサの仕様において、圧力は、耐圧水深 7000 d B、測定精度 ±10 d B、分解能 0.1 d B、安定度 0.01%/Full scale/月、応答速度 25mSEC で、水温については、測定範囲 -2 から 32°C、測定精度 ±0.005°C、分解能 0.001°C、安定度 0.002/月、応答速度



150mSEC、電気伝導度では、測定範囲 0 から 65mmho/cm、測定精度±0.005mmfo/cm、分解能 0.001mmho/cm、安定度 0.001/月、応答速度 10mSEC で、内蔵記録型で 1M バイトの RAM メモリーを使用し、約 4 万データ以上記録できる。この MicroCTD はオクトパス仕様であるため他のセンサー（例えば pH センサーや濁度計、クロロフィルメーター、酸素計等も結合して使用することができるものである。データ取得に関して、ハイパードルフィン ROV に搭載（水中局）して、測定した（図 5-7 参照）。1 秒間に 6 回の測定という設定でデータを取得し、1dB 毎の平均値としてまとめた。なお、MCTD の仕様は、以下の通りである。

+/-0.0005 S/m Conductivity 、 +/-0.005 - C Temperature 、  
+/-0.05% Full-Scale Pressure、 Salinity Calculation using PSS-78

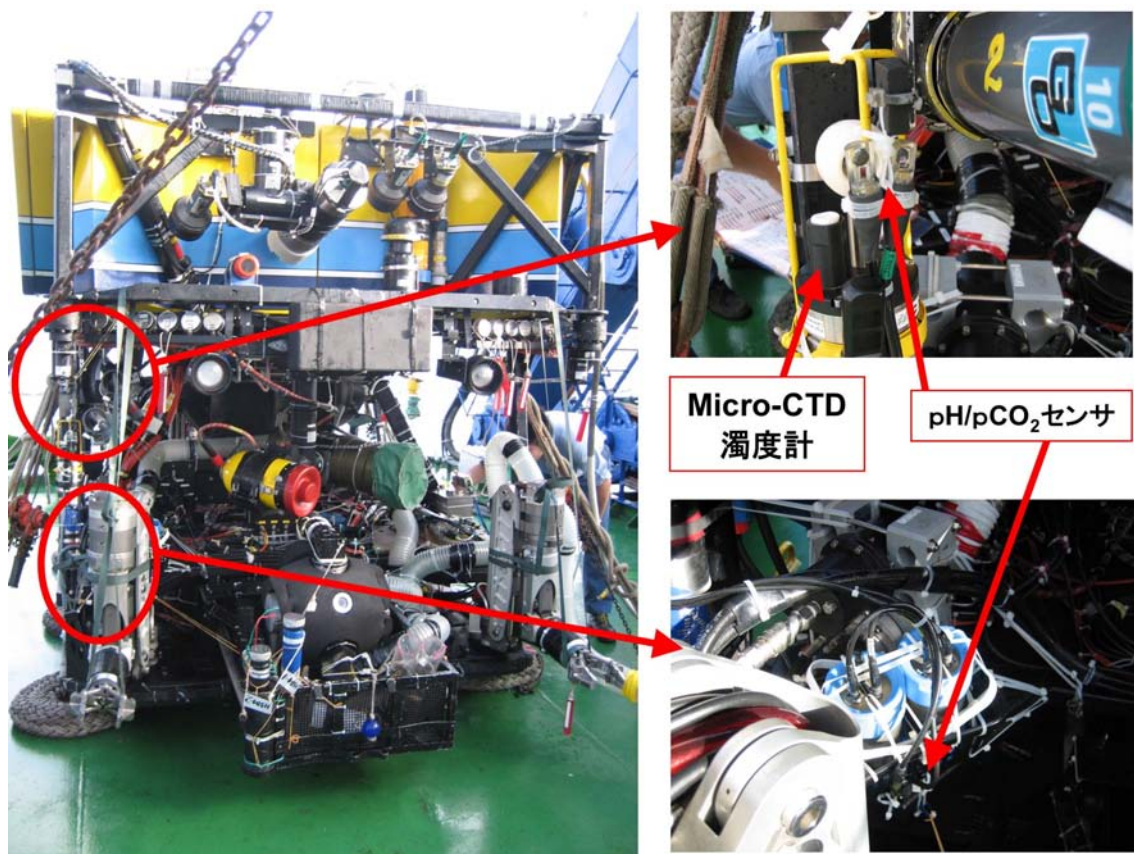


図 5-7 各種センサの搭載状態

#### 5-4-3 濁度計（Turbidity）による測定

濁度計は、水中粒子からの反射から散乱光を検出して測定するものであり、耐圧水深 6000 m である。測定水温範囲 0℃～60℃で、非常にコンパクトであり、高感度を有し、深海

において極端に水温が低い場合には、周囲の光に無反応であるという利点をもつ。上記 MicroCTD に連結して使用し、単独では、使用することができない（図 5-7 参照）。なお、仕様は以下の通りである。

- 出力 0-5.0 VDC、測定間隔 0.1 sec、ノイズ (RMS) < 1 mV
- 波長 880 nm・反応距離 < 5 cm (approx.)・Linearity < 2% deviation 0-750 FTU
- Sensitivity/Range GainSensitivity (mV/FTU)Range

#### 5-4-4 二酸化炭素追跡ボックス

液滴 CO<sub>2</sub> を確実に捕らえ観察するために追跡観察用として強固な材質としてアクリル板を用いた。形状として箱型（高さ 100cm、幅 50×15cm、厚さ 1 cm）を用いた（搭載状態については図 5-8 参照）。

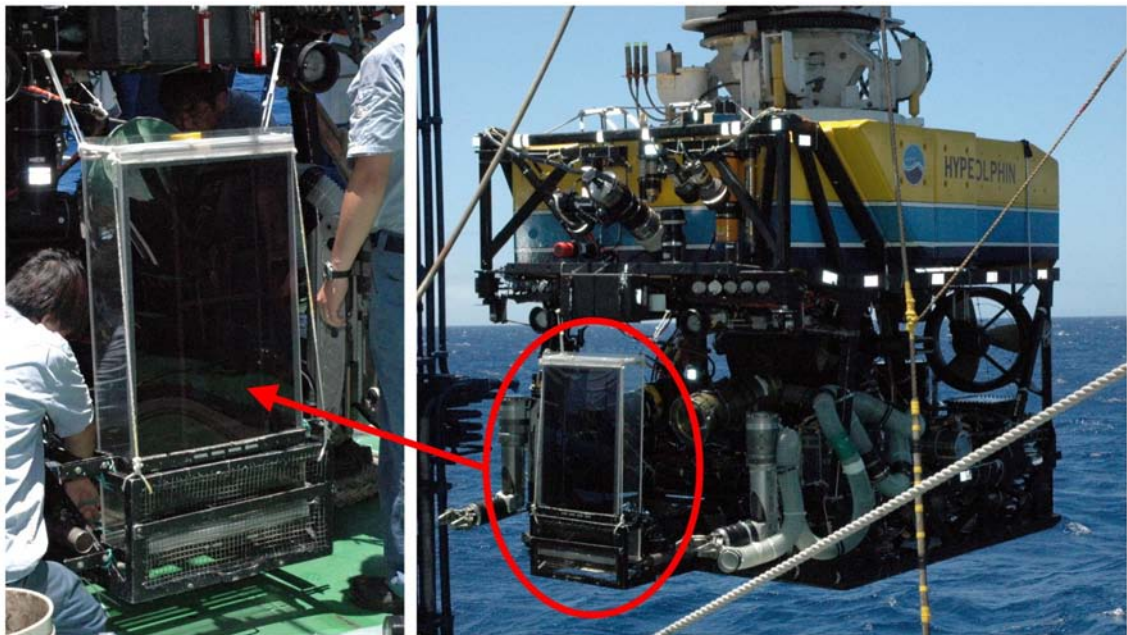


図 5-8 二酸化炭素追跡ボックスの搭載状態

#### 5-4-5 ハイパードルフィンによる計測の結果

Dive#583～#587 における ROV の航跡図および ROV 搭載の CTD および濁度計、pH/pCO<sub>2</sub>、ORP センサの結果をそれぞれ以下の図 5-9～13 に示す。なお、pCO<sub>2</sub> および ORP センサの単位はカウント値で示している。



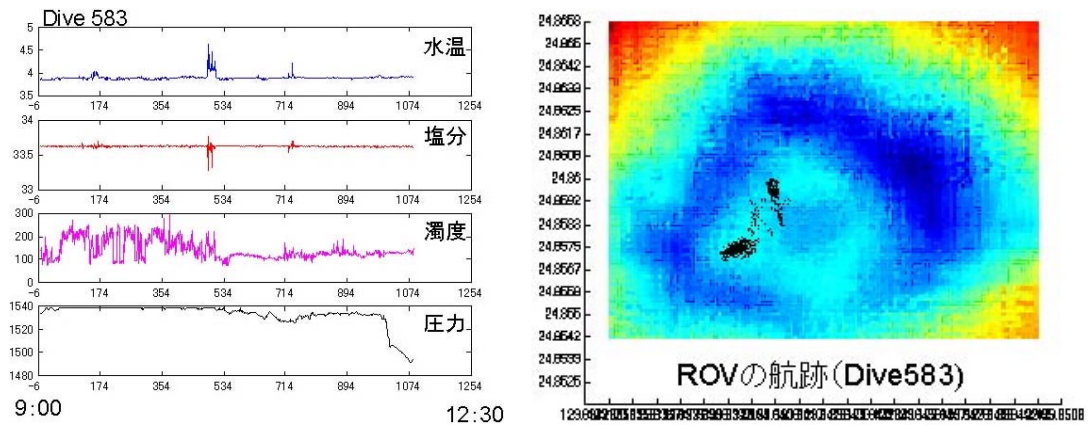


図 5-9 ROV の航跡及び CTD データ (Dive #583)

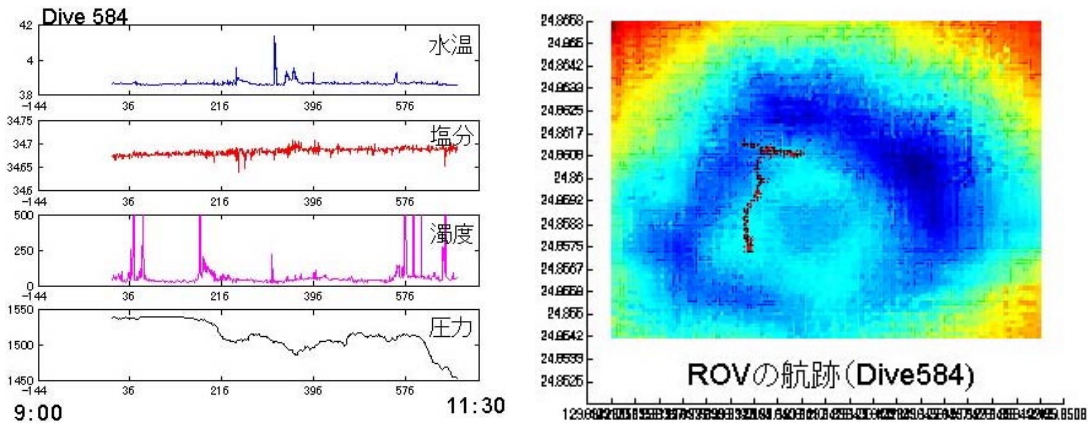


図 5-10 ROV の航跡及び CTD データ (Dive #584)

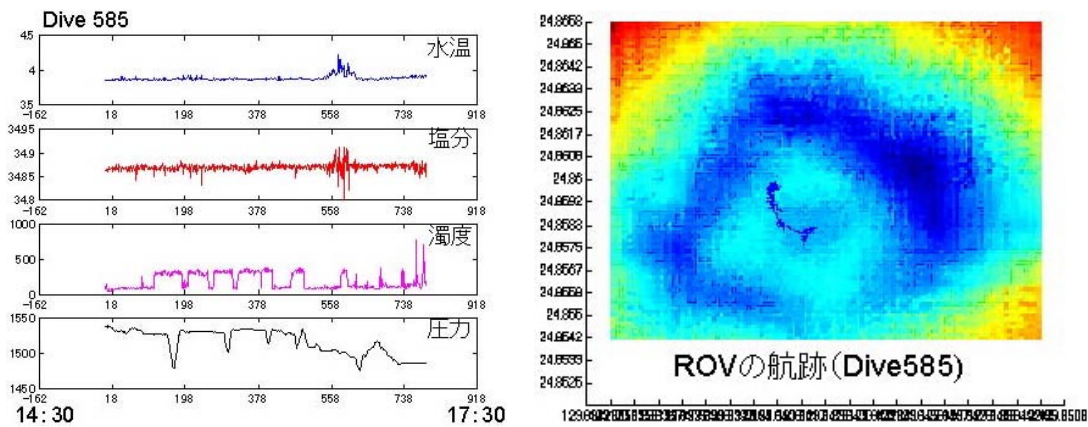


図 5-11 ROV の航跡及び CTD データ (Dive #585)

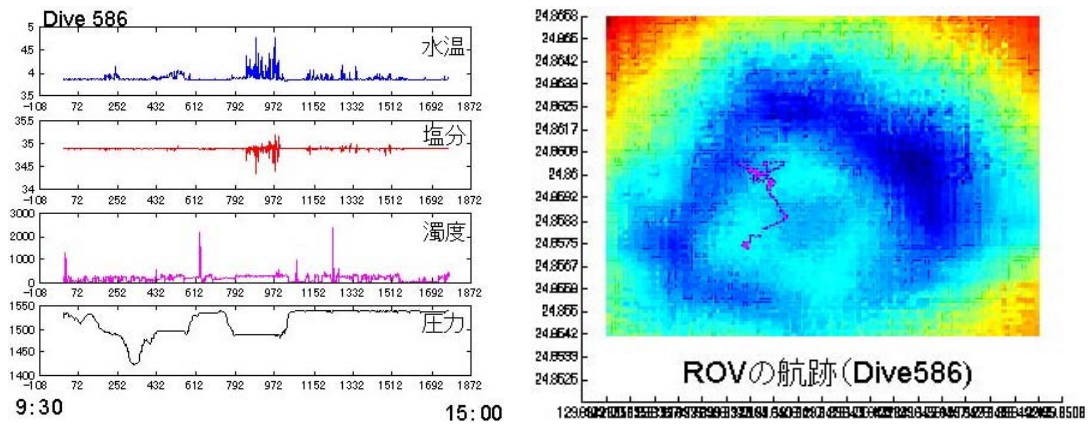


図 5-1 2 ROV の航跡及び CTD データ (Dive #586)

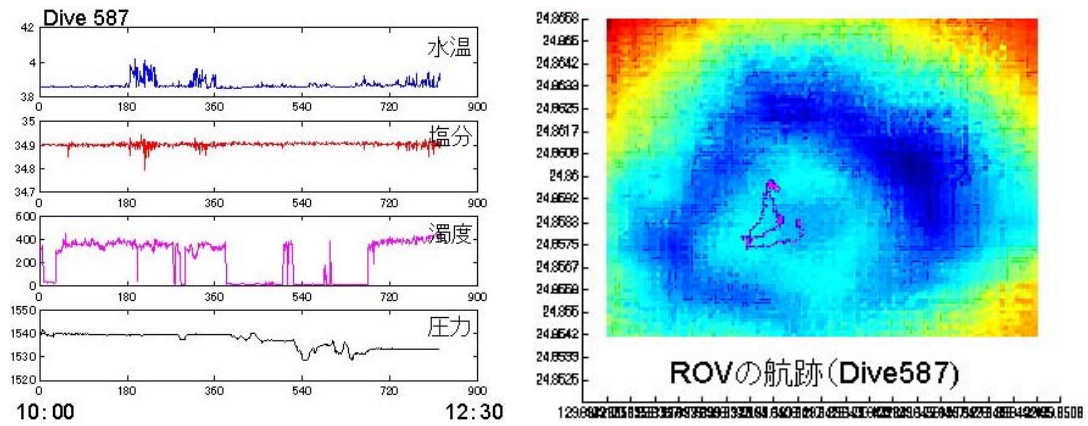
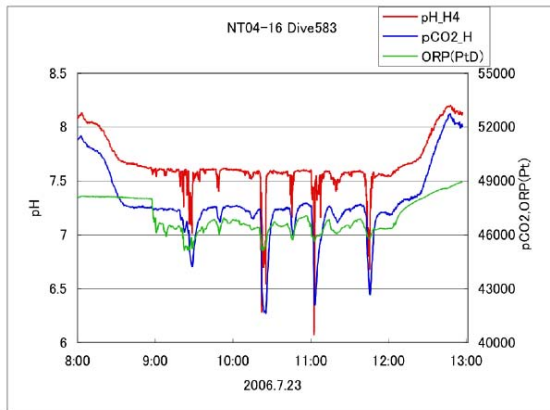
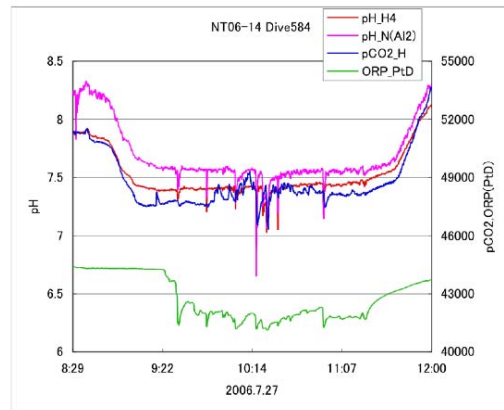


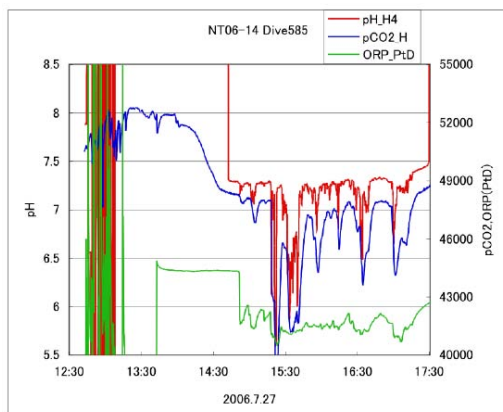
図 5-1 3 ROV の航跡及び CTD データ (Dive #587)



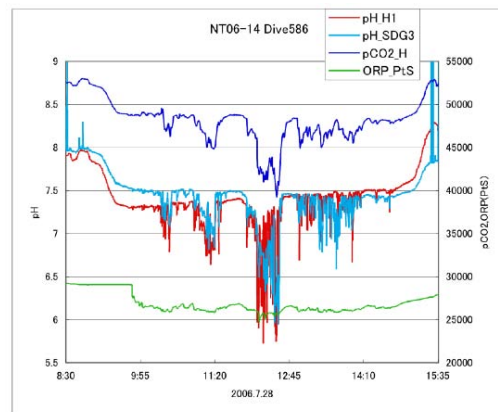
(Dive #583)



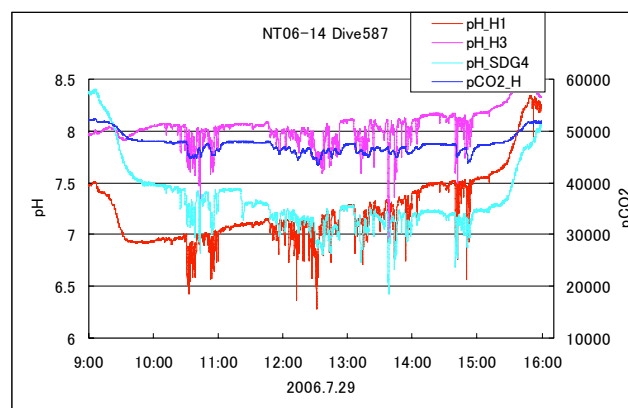
(#Dive584)



(Dive #585)



(#Dive586)



(Dive#587)

図 5-1 4 pH/pCO<sub>2</sub>/ORP データ (Dive#583~#587)

#### 5-4-6 長期設置系による計測結果 (pH/pCO<sub>2</sub> および RMT 温度計)

南沖繩トラフ熱水域鳩間海丘にての熱水生態系の特徴は、海底堆積物層の深部より湧出する還元物質（水素・メタン・硫化水素など）を一時生産のエネルギー源としている点である。この化学合成を起点とする生態系では、海底の水・堆積物境界面での環境条件の変動は、化学合成生態系での生物生産や物質フラックスと密接に関わると考えられる。そのため、水温・pH/pCO<sub>2</sub>の変動を海底面直上において設置、計測し、さらに変動周期をみるため、堆積物中20cmにRMT水温計を突き刺し、計測を行った（図5-15）。

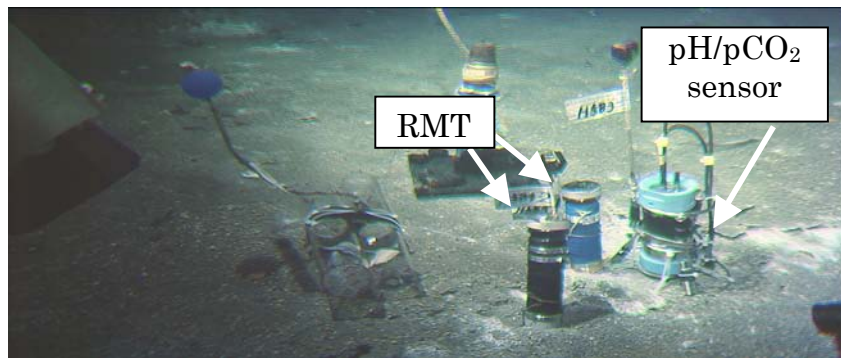


図5-15 長期計測用機器類の設置状況

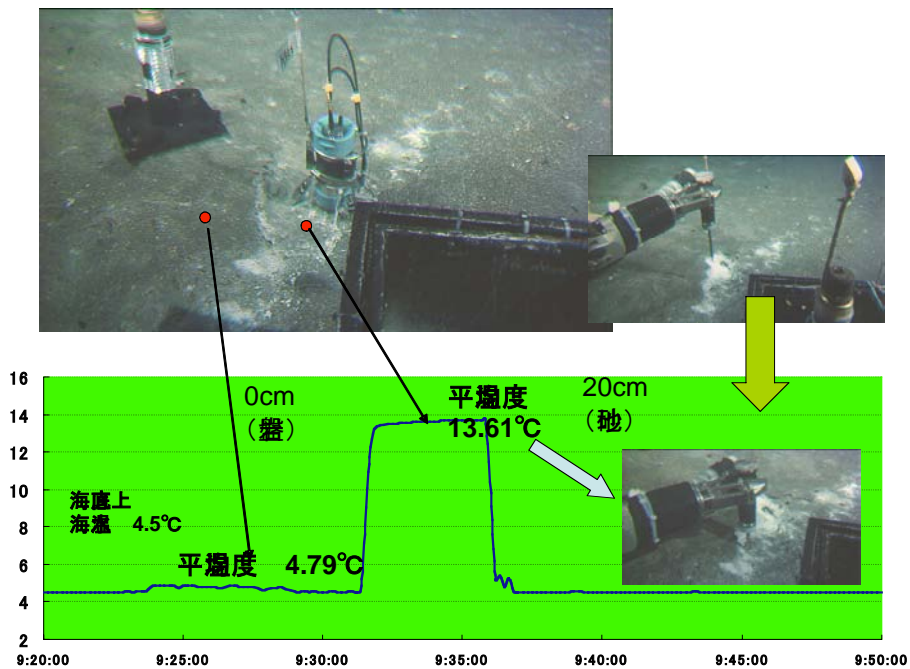


図5-16 地中温度長期計測の結果



RMT 温度計の結果では、堆積物中（20cm 層）では 13.6℃、海底堆積物直上で 4.79℃であり、その差、8.8℃であった。また、右写真中の白色域内では、海底に亀裂が入っており、かなりの深度まで温度計を突き刺すことができるが、白色域でない部分は、岩盤で、突き刺せない状況も確認した。今回は、堆積物中 20cm のみのデータであったが、次回、各堆積物中の各層温度を計測すれば、興味深いデータが得られるであろう（図 5-1 6）。

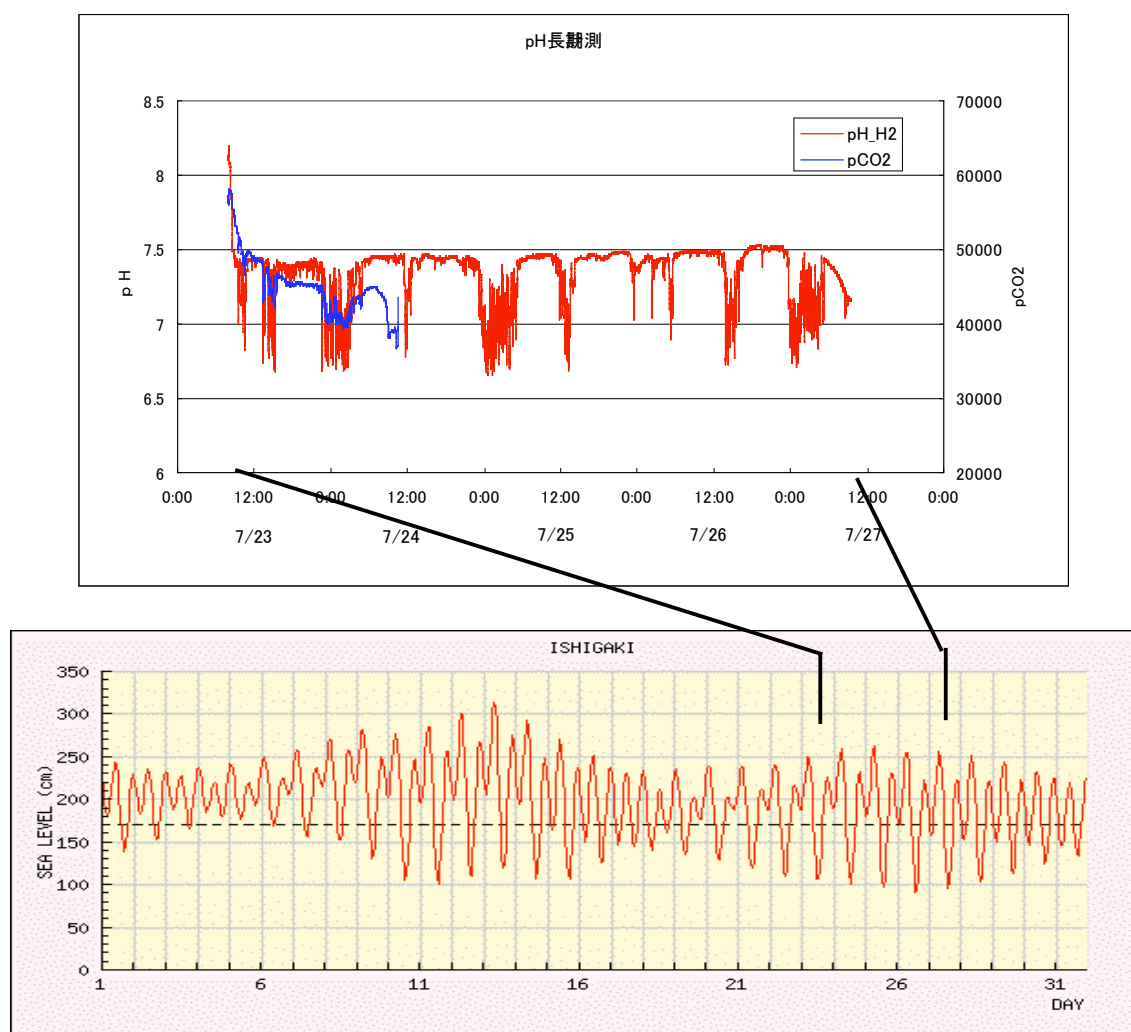


図 5-1 7 pH/pCO<sub>2</sub> の長期計測の結果と石垣島での潮汐の関係

p CO<sub>2</sub> データは電池容量不足により、途中で欠測となったが、pH の時系列分布から、石垣島潮位変動と pH 変動との関連において、低潮位や高潮位時に pH が低下する傾向を捉え、特に高潮位時に pH 低下する時間が長い傾向にあった。この潮位変動によって、堆積物中の低 pH 水の変動状況が左右されている可能性を示唆した（図 5-1 7）。

#### 5-4-7 液滴追跡結果

実際には、液滴観察ボックスなしで、追跡を行いたいが、今回は、ハイパードルフィンで初の試みであったため、最初から、液滴観察ボックスを取り付けての実験を行った。

鳩間海丘は、海底熱水活動由来の液体二酸化炭素が噴出している海域でもある。この海域の熱水活動域は水深 1500m程度で存在し噴出した二酸化炭素は液滴となって浮上する。この二酸化炭素液滴は浮上の過程で徐々に溶解し、やがて消失する。さらに浮上する二酸化炭素液滴の近傍では、溶解した二酸化炭素によって高二酸化炭素濃度・低 pH の環境が発生することが推測される。鳩間海丘での熱水活動地帯で噴出している液体二酸化炭素の挙動観測を行う目的で、このハイパードルフィン (ROV) の前面にアクリル材質のボックス (観察しやすくするため) を取り付け、このボックス内に二酸化炭素の液滴を捉え、液滴浮上と一緒に ROV も浮上し、液滴を追跡する手法の検討を行った。机上での検討の結果、困難が予想されたが、慣れによって追跡可能と判断した。この ROV (ハイパードルフィン) は、TMS 方式でないため、ROV パイロットの操縦と、ウインチの巻上げ、繰出しのタイミングが一致しないと追跡は困難であることが想定されたが、数回のチャレンジにより徐々にタイミングが一致し始め、なんとか追跡可能であると確認できた。

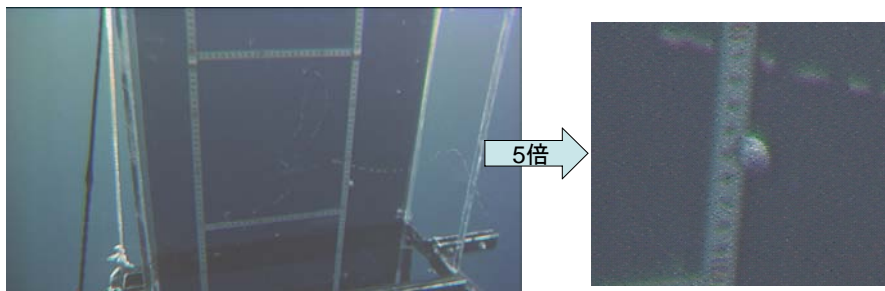
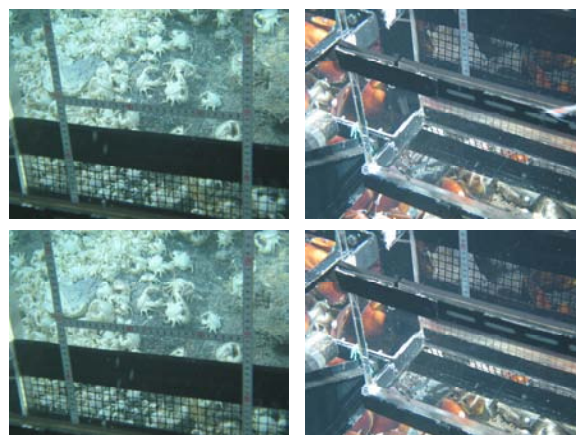


図5-18 ハイビジョンカメラの映像のキャプチャー



SeaMAX デジタル

図5-19 高精度深海デジタルカメラのピクチャー



本調査により、ハイパードルフィン搭載のハイビジョンカメラやデジタルカメラは、高解像度で液滴の形状をより鮮明に映像として記録できることが確認できた（図5-18）。なお、SEA MAX（デジタルカメラ）の方がより鮮明であることも確認したが、デジタルカメラで撮影する場合、カメラアングルを切り替える必要がある。よって追跡する場合には、デジタルカメラ映像を得ることができない難点もあった（図5-19）。

また、海底から、逆氷柱のように、二酸化炭素液滴が浮上し、ある一定量を超えると液滴となって海洋中に放出される様子も確認できた（図5-20）。

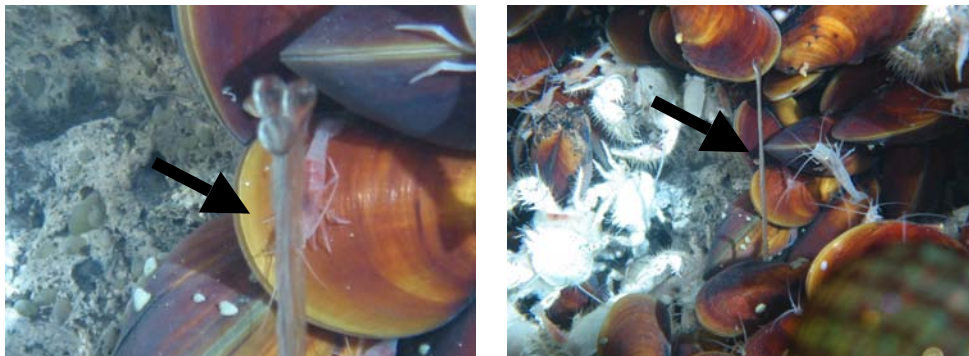


図5-20 二酸化炭素液滴柱の観察

## 5-5 深海生物サンプルに関するストレス蛋白質解析

吉田尊雄 (JAMSTEC)

### 1) 超好熱性古細菌のストレス蛋白質発現を利用した熱水活動推定法の開発

海底の熱水鉱床などの熱水環境には超好熱性の微生物が検出される。その多くは古細菌に属し、超好熱性古細菌と呼ばれている。その中には摂氏 300 度を超える熱水鉱床から噴出する高温水から検出されるものもある。その中でも超好熱性古細菌 *Thermococcus* はかなり普遍的に分布しており、いろいろな熱水域（海底温泉、熱水鉱床、および石油鉱床）から検出、単離されることが明らかになっている。我々の研究から *Thermococcus* のストレス蛋白質の発現が生育温度に依存して変化することがわかってきた。これを利用することで、熱水域で生息する微生物が感じている温度環境を捕らえられることができると考えている。本研究では、現場に生息している超好熱性古細菌 *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する。具体的には、*Thermococcus* が熱水活動の指標としてどの程度使えるのかを評価すると同時に、それを使って熱水の程度を計測する方法の開発につなげる。

本航海では、ニスキン採水器で採取したサンプル水を 0.2 マイクロメートルのフィルターでろ過を行い、フィルター上にサンプル水中の微生物を捕捉した。ろ過後のフィルターを -80℃ に保存した。また、サンプル水に最終濃度 2% となるようにホルマリンを加え、4℃ 保存した。

### 2) パラアルビネラ及びヒバリガイのストレス蛋白質の解析

パラアルビネラは、チムニーの壁に穴を掘って住む環形動物である。生息する穴の温度は、80℃ ちかくになり、真核生物の中で最も高温環境下に生息している。蛋白質は、高熱下では変性してしまい、凝集してしまう。しかし、細胞内は分子シャペロンと呼ばれる蛋白質因子群が存在し、分子同士の凝集を防ぎ、蛋白質の立体構造形成を補助している。分子シャペロンの多くは、熱誘導される蛋白質である。パラアルビネラの熱耐性のメカニズムを調べるために、本調査では、パラアルビネラの個体を採取し、分子シャペロンの遺伝子解析や共生微生物の種類を調べる。また、シンカイヒバリガイはエラ細胞内部に共生細菌と共生している生物である。共生関係がどの程度ストレスを与えるかを調べるために、採取した個体におけるストレス蛋白質の発現を調べる。

## 5-6 深海棲動物の周期性活動の適応進化

竹村明洋、柏木朋美（琉球大学）

各潜航において採取した生物は以下の通りである。

HPD#584（Deep Aquarium にて採集）：

□ソコビクニン（4 個体）：スラップガンで吸引し、Deep Aquarium に收容された。船上で減圧中に Deep Aquarium 内を確認したが、魚を見つけることができなかった。スラップガン作動中に收容個体が吸い出されてしまった可能性があった。

HPD#585（6 連キャニスターにて採集）：

□ウロコムシ（4 個体）：ドライアイスで凍結。琉球大学理学部山崎教授に提供予定。

HPD#586（Deep Aquarium で採集）：

□ビクニン（7 個体）：Deep Aquarium に收容時点で生死は不明。実験室に運び入れたときにはすでに死亡していた。

HPD#587（キャニスターにて採集）

□ウロコムシ（50 個体）：99.5%エタノールに入れた後ドライアイスで凍結。琉球大学理学部山崎教授に提供予定。

□オハラエビ（6 個体）：ドライアイスで凍結。メラトニン合成酵素（aaNAT）のクローニングに使用。

### 【深海棲魚類の活動リズムに関する実験】

ソコビクニンの目、肝臓及び松果体を船上で凍結保存した。また、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 1 2 時間培養した（図 5-2 1）。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。

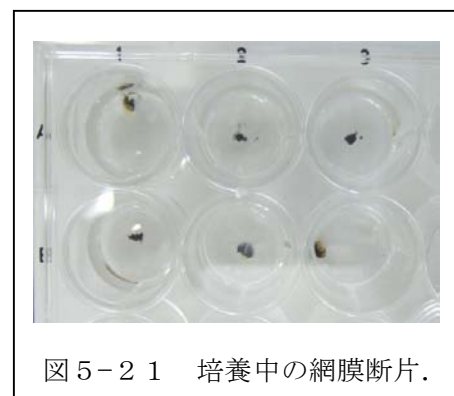


図 5-2 1 培養中の網膜断片。

### 【深海棲魚類の繁殖リズムの把握】

生殖腺（卵巣）及び肝臓は 4%パラフォ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 5-2 2）。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。

#### 【その他】

今回の調査により、鳩間海丘におけるビクニンの資  
源量は多く、採集は比較的容易に行えることが判明

した。Deep Aquarium を船上に回収した時に採集したビクニンの生死が不明である。減圧  
中に時間がかかることを考えると、船上実験としては「生きた個体」を用いた長期飼育実  
験、もしくは「生きた組織」を用いた短期実験のいずれかを魚の状態を考慮して選択的に  
行う必要があると考えられた。



図 5-2 2 ソコビクニンの卵巣  
(矢印).

## 5-7 深海性魚類の側眼及び松果体の光受容能

保 智己、大久保磨美（奈良女子大）

各潜航において採取した生物は以下の通りである。

### HPD#584 :

□ソコビクニンの一種（未同定）

ソコビクニン4個体をスラップガンで吸引し、Deep Aquarium に收容した。船上での減圧中において、Deep Aquarium 内にソコビクニンを確認できなかった。スラップガン作動中に Deep Aquarium の吸引口から捕獲個体が吸い出されたと思われる。

### HPD#586 :

□ソコビクニンの一種

ソコビクニン7個体をスラップガンで捕獲、Deep Aquarium に收容したが、実験室に搬入した際にはすでに死亡していた。7個体のうち体長を測定した5個体の結果は次のとおりである。14.5cm、16cm、16.8cm、17.3cm、18cm であった。測定していない1個体は種同定のために使用し、1個体は他の個体に比べ、小型であったが、尾部の損傷が大きく体長の測定が不可能であった。体長を測定した5個体と小型個体の側眼と脳（松果体を含む）の一部は琉球大の実験に用い、他は下記の実験に用いた。

### HPD#587（キャニスターにて採集）:

視覚器（複眼）の構造を調べるために、オハラエビ5個体（死亡個体）の頭部を電子顕微鏡用試料として2.5%グルタルアルデヒド/海水で固定し、6個体（死亡個体）を光学顕微鏡用試料として10%ホルマリン固定液で固定した。同じく、ゴエモンコシオリエビの眼柄先端を観察するために、3個体を10%ホルマリン固定液で固定した。

#### 【光受容細胞に関する組織学的解析】

免疫組織化学用固定液（ザンボニー固定液；光学顕微鏡対応）で側眼及び脳を固定した（図5-23）。昨年度の実験からソコビクニンの側眼には桿体視細胞のみが存在することが明らかとなっている。網膜視細胞には桿体と錐体が存在する。前者は暗所視に後者は明所視に関与する。ソコビクニンの桿体は他のカサゴ目の魚類に比べて非常に大きな外節（光



図5-23 ソコビクニンからの組織採集。

受容部位)を有している。そこで今回の光学顕微鏡用の試料では共焦点レーザー顕微鏡を用い、ソコビクニンの桿体視細胞の詳細な構造を明らかにする。さらに視覚能力と光受容能を類推するために二次ニューロンについての解析も行う。松果体には桿体型の光受容細胞は存在していなかったが、今回の試料では他の桿体視細胞の指標を用いて、再度確認する。電子顕微鏡用固定液(2.5%グルタルアルデヒド固定液)で側眼及び脳を固定した。

#### 【網膜神経節細胞に関する組織学的解析】

昨年度の実験から側眼網膜の視細胞は桿体のみであるが、非常に発達していることが明らかとなった。そこで側眼から脳へ情報を伝達する神経節細胞について調べることにした。これによって光情報の収斂の程度が判明すれば、ソコビクニンの側眼の光受容器官としての能力について類推することが可能となる。実験方法としては、摘出眼球の視神経断端から神経トレーサーを取り込ませ、4℃で一晩リンゲル液中でインキュベーションし、29日午前中に固定液で固定した。奈良女子大学へ持ち帰った後、トレーサーの可視化を行い、神経節細胞を標識する。

#### 【側眼の光受容能に関する電気生理学的実験】

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(図5-24)。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。



#### 【その他】

側眼と脳を摘出後、消化管内容物を確認したが、その際に調べた4個体のうち全ての個体から数多くのオハラエビが確認された。また1個体からはゴエモンコシオリエビも確認された。このことからソコビクニンは鳩間海丘の生物群集において、食物連鎖の比較的上位に位置するものと思われる。

## 5-8 ウロコムシの環境適応機構に関する研究

山崎秀雄、山田明徳、緒方泰介（琉球大学）

本クルーズにおける主な目的は、自由生活型ウロコムシを採取し、疣足付近に付着しているバクテリアを分子生物学的に検出するとともにそのバクテリアの系統・機能・ウロコムシとの関係を明らかにすることである。また、シンカイヒバリガイとオハラエビも採取し、共生バクテリアの解析（オハラエビ）と硫化水素生成活性の測定（シンカイヒバリガイ）を行う。これらの目的に従い、ハイパードルフィンによって鳩間調査海域から採取された下記生物サンプルについて、船上ラボにてそれぞれに適切な処理をおこなった。

### 【ヘイトウシンカイヒバリガイ 7 個体】

7 個体すべてについて、写真撮影、殻長、殻高、殻幅の計測の後、貝を解剖し、エラ、外套膜、足、その他の組織にわけて分取し、それぞれを $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した（図 5-2 5）。



図 5-2 5 今回採集したシンカイヒバリガイの写真

### 【ヘイトウシンカイヒバリガイ 41 個体】

飼育用に 41 個体を、冷海水で保存（江ノ島水族館、北田）。

### 【ヘイトウシンカイヒバリガイ貝殻 4 個体】

貝殻の年輪解析と元素分析を実施する予定（JAMSTEC 山本・小俣）。

### 【ヘイトウシンカイヒバリガイ 1 個体】

殻長、殻高、殻幅の計測の後、貝を解剖し、エラ、外套膜、足、その他の組織にわけて分取し、それぞれを $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。エラの一部は光学顕微鏡用、電子顕微鏡用に固定した。共生細菌の遺伝子発現解析を実施する予定（JAMSTEC 吉田）。



【ウロコムシ（シンカイヒバリガイ共生型 8 個体と自由生活型 20 個体）】（図 5-2 6）

写真撮影後、シンカイヒバリガイ共生型 3 個体と自由生活型 6 個体を 10%ホルマリン液で固定した（種同定用）。シンカイヒバリガイ共生型 2 個体と自由生活型 7 個体を 99.5%エタノールに入れ $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した（核酸抽出用）。シンカイヒバリガイ共生型 2 個体と自由生活型 7 個体を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、エタノールにて脱水し $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した（FISH 用）。これらのサンプルは琉球大学遺伝子実験センター（山田）に持ち帰り、上述の実験を行う予定である。

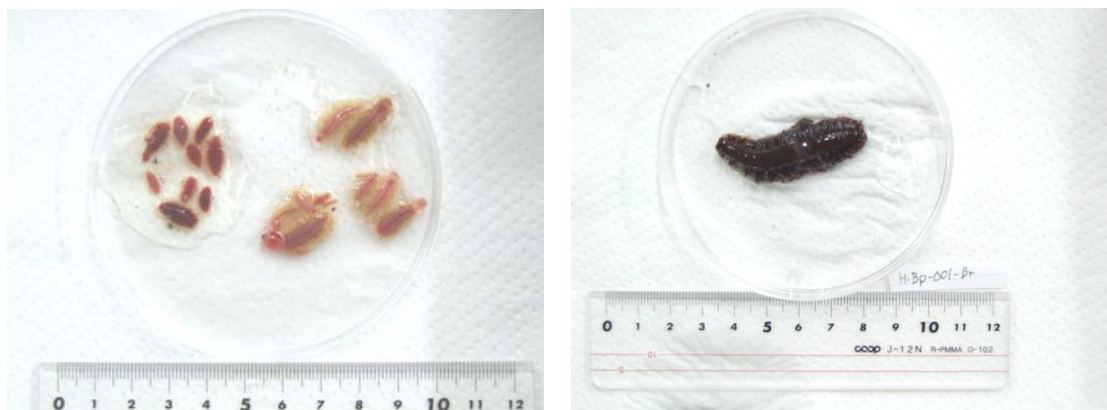


図 5-2 6 今回採集したウロコムシ。左：自由生活型ウロコムシ、右：シンカイヒバリガイ共生型ウロコムシ

【オハラエビ 65 個体】（図 5-2 7）

約 50 個体程度に関しては個体ごとに個別に分けて、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。これらのサンプルは琉球大学理学部（今井研）にて集団遺伝学的解析を行う予定である。約 5 個体は $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。これらのサンプルは琉球大学瀬底実験所（竹村研）にて生理学の実験に用いられる予定である。3 個体に関しては、甲皮を剥がした後、胸部と尾部に切り分けそれぞれをエタノールに入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。また、3 個体に関しては、同様な処理をした後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、エタノールにて脱水し $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。これらの 6 個体分のサンプルは、琉球大学遺伝子実験センター（山田）に持ち帰り、共生微生物の分子系統解析やハイブリ実験を行う予定である。





図5-27 今回採集したオハラエビ。

**【オハラエビ 12個体】**

12個体を深海性エビの殻物質キチンの解析用に使用予定（JAMSTEC, 三輪）。

**【オハラエビ 6個体】**

生残個体6個体を、冷海水で保存（江ノ島水族館、北田）。その後、水族館にて熱水生物の長期飼育条件等の検討に使用予定。

**【ゴエモンコシオリエビ 46個体】**

個体ごとに個別に分けて、 $-80$ 度Cで凍結保存した。琉球大学理学部（今井研）に持ち帰り、集団遺伝学的実験に用いられる予定である。

**【シンカイコシオリエビ 7個体】**

生残個体7個体を、冷海水で保存（江ノ島水族館、北田）。その後、水族館にて熱水生物の長期飼育条件等の検討に使用予定。

## 5-9 深海底の化学合成生態系研究：現場計測と生物試料の採集

山本啓之 (JAMSTEC)

南沖縄トラフ熱水域の鳩間海丘、琉球海溝に北斜面にある黒島海丘にて生態系の特徴は、海底堆積物層の深部より湧出する還元物質（水素、メタン、硫化水素など）を一次生産のエネルギー源としている点である。この化学合成を起点する生態系では、海底の水・堆積物境界面から近底層へと物質が広がり、豊富な生物群集が維持されている。水・堆積物境界面での環境条件の変動は、化学合成生態系での生物生産や物質フラックスと密接に関わると考えられる。

- ・現場計測：古島靖夫 (JAMSTEC)、下島公紀 (電力中央研究所)、前田義明、小池祐一 (セレス)

水温、pH、pCO<sub>2</sub> の変動を海底面において計測し、変動周期を解析する (5-4 参照)。

### 【試料提供による研究課題】

- ・シンカイヒバリガイ貝殻の年輪解析と元素分析 (小俣珠乃 JAMSTEC)

貝殻には成長にともなう年輪様構造が形成されている。この年輪と構成元素の比率を計測して、成長と環境条件の履歴を調べる。

- ・白色堆積物の微生物調査 (中川達功 日本大学)

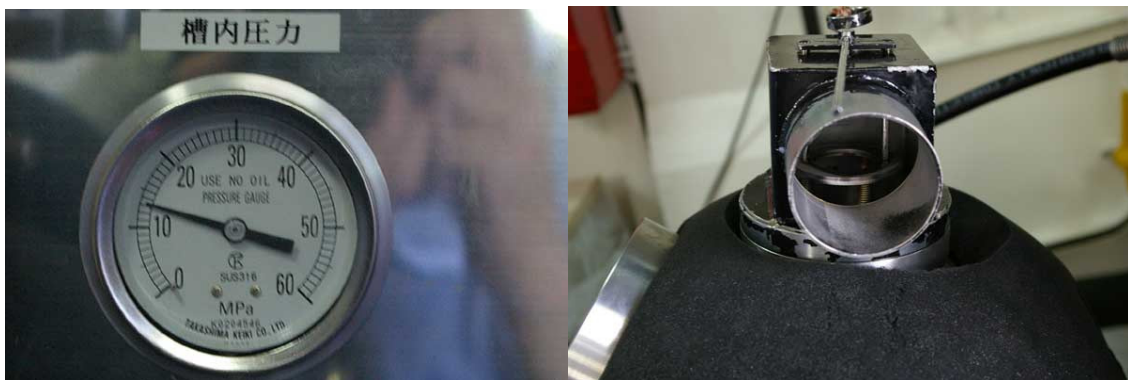
特異な白色堆積物の微生物相を調べる。特に、アンモニア酸化・硝化細菌の生息分布を解析する。

- ・ゴエモンコシオリエビと共生細菌 (土田真二 JAMSTEC)

### 5-10 保圧式生物採集装置（ディープアクアリウム）の開発

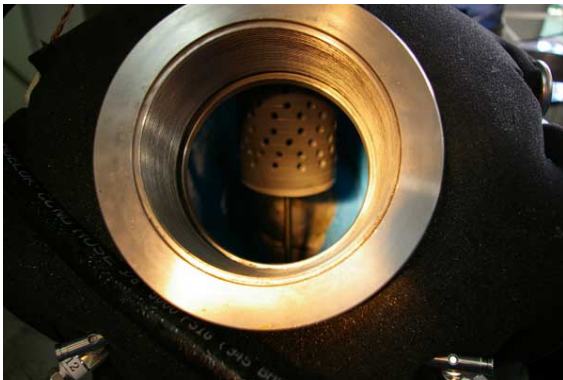
三輪哲也、林純子（JAMSTEC）

27日のサンプリングで、鳩間海山周辺に遊泳するビクニンを4匹吸引捕獲した。揚収後の保圧アクアリウムタンク内部の圧力は13MPaを示していた。しかしながら、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、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(図5-28)。



1) タンク内部の圧力表示

2) アクアリウム排水口周辺部



3) 設置した塩ビ籠

図5-28 ディープアクアリウムにおける排水口部の改良

28日のサンプリングでは、7匹の遊泳するビクニンを吸引捕獲した。捕獲後、船上に保圧タンクを回収したが、昨日は魚を通過させてしまった排出口で、吸引流速に変化が生じたためか、Oリングが外れていた。これが原因となって内側の弁が閉まらずに保圧タンク内の圧力が保持できなかったため、大気圧になってしまった。そのため、魚はほぼショ

ック状態に陥った。ディープアクアリウムに接続し、再加圧（13 MPa）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。水温は6-8℃の範囲で保持した。3時間後、大気圧に減圧し、魚をとりだした。とりだした魚はビクニンの仲間であり、竹村・保らの生物実験に供した（5-6、5-7参照）。



1) 閉鎖不良を生じた弁

2) 減圧時のビクニン



3) アクアリウムから取り出す前のビクニン

4) 回収されたビクニン

図5-29 捕獲した魚の再加圧、減圧、回収作業

### 5-1 1 深海生物の長期飼育について

北田 貢（新江ノ島水族館）

深海調査船等を使用し観察される生物の生態はその生物の一生にとってわずかな間であり、これらは長期的に飼育を行なうことにより調査船では見ることのできない間の生態を水槽内にて長期的に観察することが可能になる。

新江ノ島水族館では、これまで深海調査船および無人探査機により採集された熱水噴出域生物、冷湧水域生物、鯨骨生物群集の飼育展示を行っている。これらは化学合成生態系生物に対し硫化ナトリウムの添加、二酸化炭素添加による pH の制御、窒素による溶存酸素の制御を基本的に行っており長期的に飼育が可能となった成果も得られている。特に熱水生物に関しては、熱水システムの開発により熱水生物が長期的に飼育できるようになりまた現場に近い環境により生物の行動・生態を観察することができている。本調査で採集された生物も次の環境下で飼育を行ない観察し、長期飼育、繁殖を試みる。

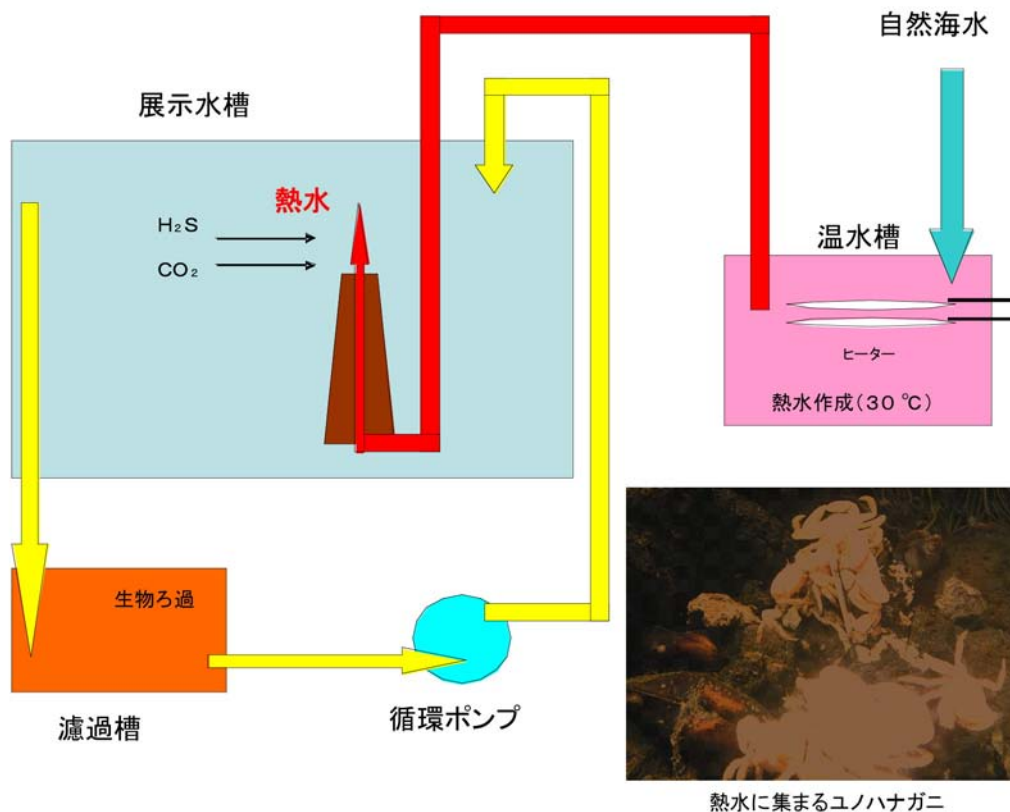


図5-30 熱水システム

従来、生物を飼育する際には生物の生息していた水温・pH・DOを水槽内にて再現し生物を飼育していたが熱水噴出域生物には現場環境に近づける為、熱水という要素が必要で

はないかと考え作成した。これは、通常の飼育水槽の他に温水槽を設けてヒーターを取り付け海水を温める。温めた海水はゆっくりと本水槽内の擬熱水噴出域より出る。また、この熱水に硫化水素を混ぜ、噴出域に二酸化炭素を添加し水槽内にてバクテリアを増やすことも行っている。これにより小笠原にて採集されたユノハナガニにおいては水槽内で熱水がない状態では散在し群集を作らないのに対し、熱水を加えた場合ではユノハナガニが一つの熱に群がる様子が確認された（水温10℃に対し熱水30℃）。この行動は沖縄にて採集されるオハラエビでも確認された（水温4℃に対し熱水30℃）。しかしゴエモンコシオリエビでは熱水という要素に対し群れを作らなかった。ゴエモンコシオリエビは腹の毛でバクテリアを増やし食べているが、本種は餌が作れる環境であれば特に熱には関係がないと思われる（水温4℃に対し熱水30℃）。

## 6. 将来の研究計画

### 6-1 マイクロ現場遺伝子解析システム (IISA-Gene) の開発

本航海では、#586, #587 潜航においてシステムの動作確認を行うと同時に、合計4回の解析操作を実施することができた。現場解析後のサンプル溶液は回収可能であるため、冷凍保存したものを東京のラボに持ち帰り、後日、詳細な解析を行う予定である。また、従来手法との比較のため、ニスキン採水器によってサンプリングした海水についても解析を行い、IISA-Geneによる解析結果を評価する。なお、モンタレー水族館研究所 (MBARI) と進めている国際共同研究のため、遺伝子解析の前処理操作のテストに採取したサンプル海水を使用する予定である。一方、本航海においても、通信トラブルや光ファイバの不具合など、システムの改良に向けて数多くの重要な知見を得ることができた。今後は、特に船上での準備作業の簡素化や搭載状態での動作確認機能などに配慮して、システムの完成度を高める計画である。

### 6-2 現場型 ATP 計測システムの開発

本航海において採取した海水サンプルのうち、冷凍、冷蔵状態でラボへ搬送したのについて解析を行ったところ、船上分析との間で大きく異なる結果が得られた。このことは、現場での解析の必要性を強く示唆するものである。今後は、これらの知見ならびにサンプルそのものを活用しながら、現場型 ATP 計測システムの開発を進める予定である。

### 6-3 深層水および熱水中に含まれる微生物の付着力測定法の開発

本航海で得られた知見に基づいて実験室内におけるモデル実験系の構築をさらに進め、微生物付着機構の解明と付着制御の方法について検討を行う。

### 6-4 現場型化学センサの開発と二酸化炭素液滴の挙動観察

本航海で得られたデータについて、温度影響などに関わる必要な補正を行うなどして、引き続きセンサの改良を進める。また二酸化炭素液滴の追跡観察については、今回の調査によって、その可能性が示されたので、今後は定量的なサイズ計測等も含め、液滴の浮上、溶解、消失に関わるプロセスを詳細に調べる方法について検討を行う。

### 6-5 深海生物サンプルに関するストレス蛋白質解析

#### 1) 超好熱古細菌について

本航海において採取した試料は、JAMSTEC の研究室に搬送し、後日、フィルターから

DNA 抽出を行い、*Thermococcus* の定量的 PCR や FISH などによりサンプル水中における *Thermococcus* の存在量を調べる。また、*Thermococcus* のストレス蛋白質の遺伝子クローニングを試みる。

## 2) パラアルビネラ及びシンカイヒガリガイについて

採取した個体から、DNA 及び RNA を抽出し、個体に存在するバクテリア、アーキア特異的 16S rDNA を調べる。また、RNA を抽出して cDNA ライブラリーを作成して、ストレス蛋白質の遺伝子クローニング及び発現解析を試みる。

## 6-6 深海棲動物の周期性活動の適応進化

凍結保存したソコビクニンの目、肝臓及び松果体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 として保存する。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。その後浅海棲の近縁種との間で比較を行う。なお、遺伝子解析に関しては済州国立大学生物学科 (金世宰教授及び朴智権博士) との共同研究である。

一方、採集した魚類の種同定を行うため、ソコビクニン 1 尾については完全個体をホルマリン固定し、国立科学博物館 (予定) に種の同定を依頼する。

## 6-7 深海性魚類の側眼及び松果体の光受容能

光受容細胞に関する組織学的解析のため、電子顕微鏡用固定液で固定した側眼視細胞については、電子顕微鏡を用いて微細構造を調べる。松果体に関しては松果体細胞の外節 (光受容細胞の光受容部位) の有無を明らかにする。

また、網膜神経節細胞に関する組織学的解析のため、船上での作業によって神経トレーサーを取り込ませた組織を奈良女子大学へ持ち帰った後、トレーサーの可視化を行い、神経節細胞を標識する。

通常、洞窟などの暗黒に棲息する魚類では側眼は退化し、側線からの水流の情報で障害物を避けている。ソコビクニンでは側眼は有しているが、棲息環境には光が全く無いと考えられることから、側線が発達している可能性もあることから側線の状態を調べるために、眼と脳を摘出した個体の一部を凍結して、持ち帰り、光学顕微鏡によって側線部の観察を行う予定である。

## 6-8 ウロコムシの環境適応機構に関する研究

凍結保存したヘイトウシンカイヒバリガイについては、琉球大学理学部 (山崎研) に持ち



帰り、硫化水素の生成活性の測定を行う予定である。

飼育用に 41 個体を、冷海水で保存したヘイトウシンカイヒバリガイ 41 個体については、新江ノ島水族館にて熱水生物の長期飼育条件等の検討に使用予定である。

#### 6-9 深海底の化学合成生態系研究：現場計測と生物試料の採集

航海にて採集した深海生物の一部は、共同研究施設である新江ノ島水族館にて飼育すると同時に、深海研究の普及広報・教育を目的に館内での展示に使用する。また、名護市の国際海洋環境情報センターにおいても同じ目的で飼育展示を実施する。

#### 6-10 保圧式生物採集装置（ディープアクアリウム）の開発

生物の組織のうち一部は、組織培養実験に展開するため、クリーンベンチ内で切り出し、研究室での培養実験に展開するための Try をする予定である。

また、採取したゴエモンコシオリエビおよびオハラエビは、テクノヒル㈱ならびにクラスターテクノロジー㈱【いずれもキチン・キトサン分析の専門会社】とともに、殻成分の分析を行う予定である。

#### 6-11 深海生物の長期飼育について

本航海にて採集された生物は 4℃の水槽に対し 40℃の熱水環境下で飼育を行ないゴエモンコシオリエビ・熱水ゴカイ・シンカイヒバリガイ・オハラエビの行動観察、長期飼育を試みる。

## 7. まとめ

本航海は、マイクロデバイス技術を応用した新しい計測システムを開発し、これを用いて熱水地帯の複合的な計測を行うこと、ならびに深海に棲息する生物の生理的機能の探求を通して生物の環境適応を明らかにすることを当初の目的としたものである。結果として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はじめとして、各種センサ類を実海域に展開し、長期計測を含む計測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点で、満足のいく成果があがったものと考ええる。また、魚類ならびに無脊椎動物類についても、一部機器の不具合によって完全な生個体が得られなかった部分もあるが、その後の実験に供することが可能な多数のサンプルを採集できたことは、もう一つの大きな成果である。今後、今回得られたデータの解析ならびにサンプルを用いた実験が新たな知見の獲得につながるとともに、将来の深海調査における新しい計測手法の確立へと発展することを期待したい。

## Appendix

(別紙)

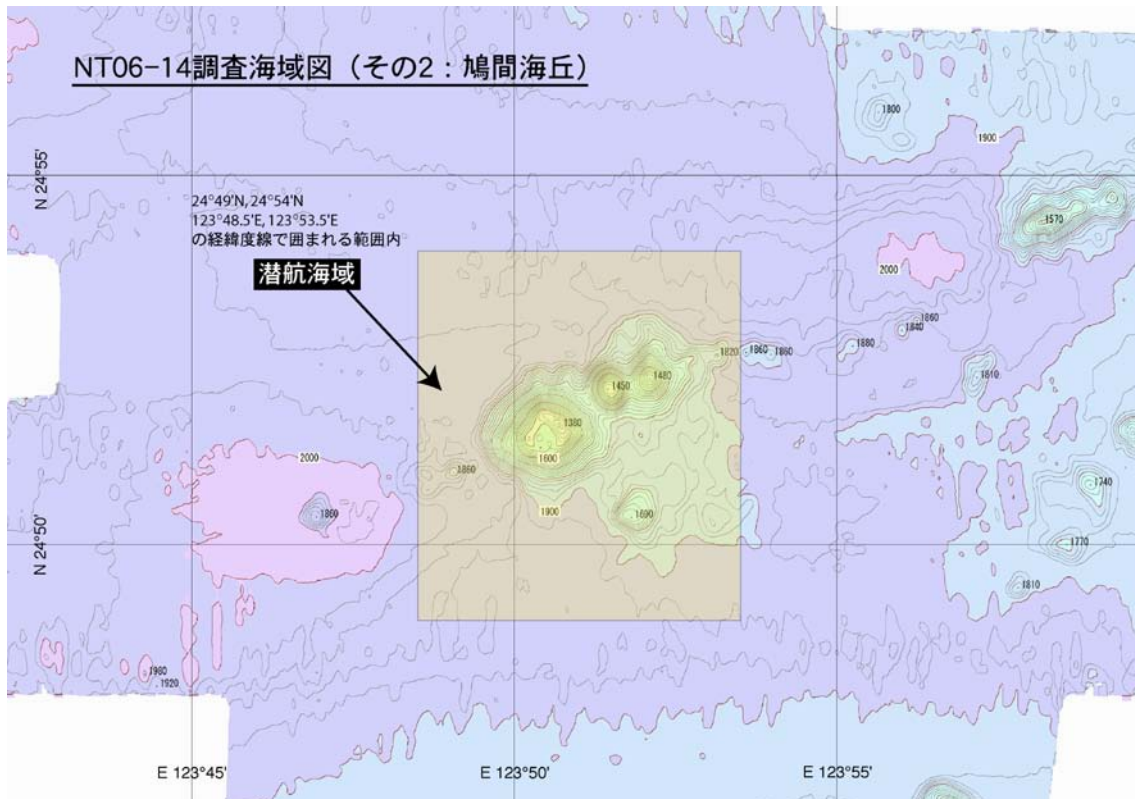
5：採取サンプルのインベントリ情報

6：持ち込み機器による観測\_\_インベントリ情報

## NT06-14調査海域図（その1：全体図）



## NT06-14調査海域図（その2：鳩間海丘）



## NT06-14 Ship Log, Hatoma Knoll, Off-Ishigaki Island, Southern part of Okinawa Trough

Shipboard Log & Ship Track			Remarks	Position/Weather/Wind/Sea condition (Noon)
Date	Time	Description		
22Jul06	18:00	研究者乗船		07/22 12:00 (JST)
	19:00	石垣港F岸壁離岸	出航	24-20N, 124-09E
	18:40-19:20	調査潜航ミーティング		Blue sky
	19:20-20:00	船内生活レクチャー		SSE (Light breeze)
	22:00	調査海域着		Sea Calm
	22:07	XBT計測		
23Jul06	7:00	HPD作動確認		07/23 12:00 (JST)
	8:02	Dive #583 潜航開始		24-51N, 123-50E
	9:01	着底	24-51.443N, 123-50.393E, D=1523m	Blue sky
	12:02	離底	24-51.495N, 123-50.457E, D=1484m	NNE-2 (Light breeze)
	12:50	浮上		Sea Smooth
	13:03	HPD揚収完了		
	13:03	揚収完了後、沖縄本島名護湾向け発航	台風5号による荒天が予想されるため	
24Jul06	13:00	名護湾着、投錨	台風避泊	07/24 12:00 (JST)
				26-27N, 127-39E
				Blue sky
				SSE-5 (Fresh breeze) Sea Slight
25Jul06	10:10-10:25	研究者下船; 交通艇	台風避泊	07/25 12:00 (JST)
		岡本拓士 (東京大学生産研究所)、 山崎秀雄、山田明德、緒方泰介 (琉球大学)		26-35N, 127-58E
				Blue sky
				SE-5 (Fresh breeze) Sea Slight
26Jul06	05:30-05:45	研究者乗船; 交通艇		07/26 12:00 (JST)
	5:45	抜錨		26-00N, 127-07E
	6:00	調査海域 (鳩間海丘) 向け発航		Blue sky
				SE-5 (Fresh breeze) Sea Moderate
27Jul06	5:30	調査海域着 (鳩間海丘)		07/27 12:00 (JST)
	5:36	XBT計測		24-51N, 123-50E
	8:36	Dive #584 潜航開始		Blue sky
	9:24	着底	24-51.448N, 123-50.374E, D=1528m	SSE-5 (Fresh breeze)
	11:17	離底	24-51.688N, 123-50.367E, D=1443m	Sea Moderate
	12:13	浮上		
	12:19	HPD揚収完了		
	13:56	Dive #585 潜航開始		
	14:57	着底	24-51.540N, 123-50.431E, D=1527m	
	17:09	離底	24-51.468N, 123-50.508E, D=1477m	
	17:53	浮上		
18:13	HPD揚収完了	揚収完了後、漂泊開始		
28Jul06	8:32	Dive #586 潜航開始		07/28 12:00 (JST)
	9:48	着底	24-51.569N, 123-50.433E, D=1523m	24-52N, 123-50E
	14:44	離底	24-51.445N, 123-50.381E, D=1528m	Blue sky
	15:33	浮上		SE-4 (Gentle breeze)
	15:46	HPD揚収完了	揚収完了後、漂泊開始	Sea Calm
29Jul06	9:02	Dive #587 潜航開始		07/29 12:00 (JST)
	10:00	着底	24-51.441N, 123-50.384E, D=1530m	24-51N, 123-50E
	15:06	離底	24-51.503N, 123-50.501E, D=1486m	Blue sky
	15:53	浮上		SE-3 (Gentle breeze)
	14:08	HPD揚収完了		Sea Smooth
	16:15	石垣港向け発航		
	19:15	投錨	仮泊、名蔵湾	
30Jul06	6:45	抜錨	NT06-14終了	
	8:00	石垣港着岸		

Participants aboard  
Research Group

名前	Name	役職	連絡先(e-mail)	乗船期間
	所属	部署	連絡先(電話)	
	住所		連絡先(FAX)	
藤井 輝夫	Teruo FUJII	助教授		7/22-7/30
	東京大学	生産技術研究所 マイクロメカトロニクス国際研究センター		
竹村 明洋	Akihiro TAKEMURA	助教授		7/26-7/30
	琉球大学	熱帯生物圏研究センター		
山本 啓之	Hiroyuki YAMAMOTO	グループリーダー		7/22-7/30
	海洋研究開発機構	極限環境生物圏研究センター		
三輪 哲也	Tetsuya MIWA	グループリーダー		7/22-7/30
	海洋研究開発機構	極限環境生物圏研究センター		
吉田 尊雄	Takao YOSHIDA	研究員		7/22-7/30
	海洋研究開発機構	極限環境生物圏研究センター 海洋生態・環境研究プログラム		
林 純子	Junko HAYASHI	研究員		7/26-7/30
	海洋研究開発機構	極限環境生物圏研究センター 海洋生態・環境研究プログラム		
福場 辰洋	Tatsuhiko FUKUBA	助手		7/22-7/30
	東京大学	生産技術研究所 海中工学研究センター		
宮地 輝光	Akimitsu MIYAJI	学術研究支援員		7/22-7/30
	東京大学	生産技術研究所 海中工学研究センター		
玉井 雄一郎	Yuichiro TAMAI	大学院生		7/22-7/30
	東京大学	生産技術研究所 海中工学研究センター		
福沢 範行	Noriyuki FUKUZAWA	大学院生		7/22-7/30
	東京大学	生産技術研究所 海中工学研究センター		
岡本 拓士	Takuji OKAMOTO	博士研究員		7/22-7/25
	東京大学	生産技術研究所 海中工学研究センター		
前田 義明	Yoshiaki MAEDA	主任研究員		7/22-7/30
	株式会社 セレス	環境調査部		
小池 祐一	Yuichi KOIKE	主任研究員		7/22-7/30
	株式会社 セレス	機器分析グループ		
山崎 秀雄	Hideo YAMASAKI	教授		7/22-7/25
	琉球大学	理学部海洋自然科学科		
山田 明德	Akinori YAMADA	COE研究員		7/22-7/25
	琉球大学	理工学研究科		
緒方 泰介	Taisuke OGATA	大学院生		7/22-7/25
	琉球大学	理工学研究科		
柏木 朋美	Tomomi KASHIWAGI	大学院生		7/26-7/30
	琉球大学	理工学研究科		
保 智己	Tomomi TAMOTSU	助教授		7/26-7/30
	奈良女子大学	大学院人間文化研究科		
大久保 磨美	Mami OOKUBO	大学院生		7/26-7/30
	奈良女子大学	大学院人間文化研究科		
北田 貢	Mitsugu KITADA	係員		7/22-7/30
	新江ノ島水族館	展示飼育グループ		
栗原 梢	Kozue KURIHARA	観測技術員		7/22-7/30
	日本海洋事業(株)	海洋科学部		

Participants aboard

Hyper Dolphin Operation Team

運航長 千葉 和宏  
二等潜技士 植木 光弘  
二等潜技士 近藤 友栄  
三等潜技士 千葉 勝志  
三等潜技士 菊谷 茂  
三等潜技士 竹ノ内 純  
三等潜技士 木戸 哲平  
三等潜技士 大西 琢磨

Natsushima Crew

船長	請藏 栄孝	機関長	地頭菌 達男
一等航海士	青木 高文	一等機関士	船江 幸司
二等航海士	加藤 宏幸	二等機関士	小谷 誠
三等航海士	古川 優貴	三等機関士	森 雄司

甲板長	尾田 芳包	操機長	小林 誠
甲板手	久保田 隆夫	機関手	福原 猛
甲板手	渡口 忠彦	機関手	丸田 良次
甲板手	庄子 欣也	機関手	船渡 啓太
甲板手	地本 強	機関員	三砂 聡太
甲板手	鹿摩 敬二		
甲板員	永井 大誠		

電子長	高橋 正始	司厨長	高島 薫
二等電子士	伊藤 英洋	司厨手	佐々木 末人
三等電子士	竹内 悠介	司厨手	鎌田 英俊
		司厨手	立木 幸雄
		司厨手	畠山 太志

## 採取サンプルのインベントリ情報

試料名	使用機器	採取日時(UTC)	採取場所	分取量	使用目的	精度管理情報	担当者	写真	備考
海水	ニスキン式採水器	2006/7/23/00:48	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	1000ml	化学分析, 微生物分析	なし	藤井輝夫	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/23/03:00	緯度: 24-51.500 N 経度: 123-50.457 E 深度: 1481 m	1000ml	化学分析, 微生物分析	なし	藤井輝夫	なし	
堆積物	M式採泥器	2006/7/23/00:42	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	100ml	微生物分析	なし	藤井輝夫	なし	
堆積物	M式採泥器	2006/7/23/00:42	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	100ml	微生物分析	なし	山本啓之	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/23/00:48	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	500ml	微生物分析	なし	吉田尊雄	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/23/03:00	緯度: 24-51.500 N 経度: 123-50.457 E 深度: 1481 m	500ml	微生物分析	なし	吉田尊雄	なし	
生物(シンカイヒバリガイ)	マニピュレーター	2006/7/23/00:56	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	1個体	遺伝子解析	なし	吉田尊雄	なし	
生物(シンカイヒバリガイ)	マニピュレーター	2006/7/23/00:56	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	7個体	生化学分析用	なし	山崎秀雄	なし	貝殻(4個体)は元素分析
生物(オハラエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/23/00:56	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	65個体	遺伝子解析用	なし	山崎秀雄	なし	
生物(ゴエモンシオリエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/23/00:56	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	46個体	遺伝子解析用	なし	山崎秀雄	なし	
生物(ウロコムシ)	吸引式生物採取器	2006/7/23/00:56	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	28個体	遺伝子解析用	なし	山崎秀雄	なし	
生物(シンカイヒバリガイ)	吸引式生物採取器	2006/7/23/00:56	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	39個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(シンカイシオリエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/23/00:56	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	3個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(オハラエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/23/00:56	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	2個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(ゴエモンシオリエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/23/00:56	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	5個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/23/00:48	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	150ml	化学分析	なし	小池祐一	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/23/03:00	緯度: 24-51.500 N 経度: 123-50.457 E 深度: 1481 m	150ml	化学分析	なし	小池祐一	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/27/09:36	緯度: 24-51.443 N 経度: 123-50.378 E 深度: 1529 m	1000ml	化学分析・微生物解析用	なし	藤井輝夫	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/27/10:15	緯度: 24-51.569 N 経度: 123-50.394 E 深度: 1496 m	1000ml	化学分析・微生物解析用	なし	藤井輝夫	なし	
生物(ゴエモンシオリエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/27/17:08	緯度: 24-51.468 N 経度: 123-50.508 E 深度: 1477 m	27個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(オハラエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/27/17:08	緯度: 24-51.468 N 経度: 123-50.508 E 深度: 1477 m	44個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/27/09:36	緯度: 24-51.443 N 経度: 123-50.378 E 深度: 1529 m	1000ml	微生物解析用	なし	吉田尊雄	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/27/10:15	緯度: 24-51.569 N 経度: 123-50.394 E 深度: 1496 m	1000ml	微生物解析用	なし	吉田尊雄	なし	
生物(オハラエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/23/00:56	緯度: 24-51.432 N 経度: 123-50.349 E 深度: 1528 m	12個体	化学分析	なし	三輪哲也	なし	
生物(ゴエモンシオリエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/27/17:08	緯度: 24-51.468 N 経度: 123-50.508 E 深度: 1477 m	23個体	化学分析	なし	三輪哲也	なし	



海水	ニスキン式採水器	2006/7/28/09:51	緯度: 24-51.579 N 経度: 123-50.438 E 深度: 1519 m	700ml	化学分析・微生物解析用	なし	藤井輝夫	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/28/12:31	緯度: 24-51.507 N 経度: 123-50.469 E 深度: 1477 m	700ml	化学分析・微生物解析用	なし	藤井輝夫	なし	
生物(ゴエモンシオリエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/28/13:11	緯度: 24-51.445 N 経度: 123-50.381 E 深度: 1528 m	1個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(シンカイヒバリガイ)	吸引式生物採取器	2006/7/28/13:11	緯度: 24-51.445 N 経度: 123-50.381 E 深度: 1528 m	7個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(ゴカイ)	吸引式生物採取器	2006/7/28/13:11	緯度: 24-51.445 N 経度: 123-50.381 E 深度: 1528 m	5個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
岩石片	マニピュレーター	2006/7/28/13:11	緯度: 24-51.445 N 経度: 123-50.381 E 深度: 1528 m	5個	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(ゴカイ)	吸引式生物採取器	2006/7/28/13:11	緯度: 24-51.445 N 経度: 123-50.381 E 深度: 1528 m	4個体	遺伝子解析用	なし	吉田尊雄	なし	
生物(ゴカイ)	吸引式生物採取器	2006/7/29/10:14	緯度: 24-51.458 N 経度: 123-50.392 E 深度: 1529 m	20個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(ゴエモンシオリエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/29/12:51	緯度: 24-51.579 N 経度: 123-50.438 E 深度: 1523 m	30個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(オハラエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/29/12:51	緯度: 24-51.579 N 経度: 123-50.438 E 深度: 1523 m	10個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(ゴエモンシオリエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/29/14:04	緯度: 24-51.512 N 経度: 123-50.457 E 深度: 1490 m	50個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(シンカイヒバリガイ)	吸引式生物採取器	2006/7/29/14:04	緯度: 24-51.512 N 経度: 123-50.457 E 深度: 1490 m	7個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(ゴエモンシオリエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/29/14:55	緯度: 24-51.503 N 経度: 123-50.501 E 深度: 1889 m	110個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(オハラエビ)	吸引式生物採取器	2006/7/29/14:55	緯度: 24-51.503 N 経度: 123-50.501 E 深度: 1889 m	20個体	飼育	なし	北田 貴	なし	
生物(ゴカイ)	吸引式生物採取器	2006/7/29/10:14	緯度: 24-51.458 N 経度: 123-50.392 E 深度: 1529 m	9個体	遺伝子解析用	なし	吉田尊雄	なし	
海水	ニスキン式採水器	2006/7/29/14:08	緯度: 24-51.478 N 経度: 123-50.428 E 深度: 1518 m	1000ml	微生物解析用	なし	吉田尊雄	なし	

持ち込み機器による観測

観測項目	使用機器名/型式	精度管理情報	担当者	備考
pH	pHsensor/自作(Ver.3)		2 小池祐一	
pCO2	pCO2sensor/自作(Ver.3)		2 小池祐一	
ORP	ORPsensor/自作(Ver.3)		2 小池祐一	
CTD	FSI社製(Micro-CTD)		3 前田義明	
濁度計	SeaPoint社製		3 前田義明	
Mark V (水温計)	アレック電子社製		3 山本啓之(前田義明)	
RMT(水温計:槍)			3 山本啓之(前田義明)	
液滴ボックス	自作(CO2液滴観察ボックス (500W×150D×1000H))		— 前田義明	