

～ ムラサキイガイ接着糸に対する機能阻害の検証 ～

☆経緯

- 私たちは身近な海の生き物の生態や命の仕組みを研究テーマに設定（ミズクラゲを対象に選ぶ）
- 東京農工大学 特許 [2010. 1. 28 公開]「細胞接着阻害活性を有するクラゲ抽出画分」について、SSH生徒研究活動のために知的財産部より使用許諾を得る
- 2011年度 ミズクラゲ抽出画分が金魚鱗の表皮細胞増殖を阻害することを確認
- 2012年度 ミズクラゲ抽出画分がブラナリアの再生芽細胞の増殖を阻害することを確認
ミズクラゲ抽出画分がムラサキイガイの足糸の接着を忌避させる可能性を確認

☆目的

昨年度までの研究で、くらげ由来（抽出）タンパク質に細胞接着阻害作用があることの検証を行った。そして、ムラサキイガイの水中接着（接着タンパク質による）についても選択的に忌避する可能性を発見した。これについて、さらに検証を試みた。

☆仮説

クラゲ抽出画分の塩可溶性タンパク質は、ムラサキイガイ足糸の接着忌避に関与している。

☆方法

I. [クラゲ抽出画分の塩可溶性タンパク質溶液の採取]

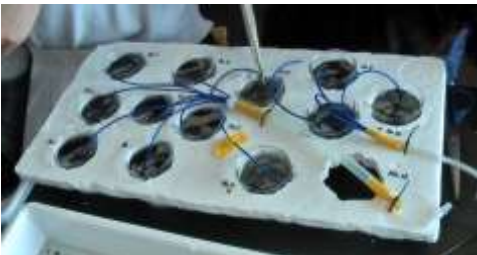
- ※ 2年次グループとの共同作業
- ① ミズクラゲ 507.54 グラムをリン酸バッファ(pH 7.8)溶液の入ったバットに移した。
- ② これにプロテアーゼ阻害剤として
0.4M－EDTA 溶液 5.0mL
0.1M－PMSF 1.0mL
0.2M－NEM 1.0mL を添加した。
- ③ 氷水を入れた水槽の中でバットを冷却（4℃前後）しながらカッターナイフを用いてミズクラゲの破碎処理をおこなった
- ④ 破碎処理したクラゲ溶液の塩分をデジタル塩分計で測定し、塩分濃度が1 MになるようにNaClを添加し溶解した。（塩析の操作）
- ⑤ この破碎処理したクラゲ溶液を、常温で10分ほど遠心分離機（3000 rpm）にかけて、上澄み（A）を採取した。
- ⑥ この上澄み溶液の塩分をデジタル塩分計で測定し、塩分濃度が5Mになるように、NaClを添加し溶解した。この溶液をさらに－4℃で10分間、低温高速遠心分離機（14000 rpm）にかけて、上澄み（B）を採取した。（塩析の操作）
- ⑦ この上澄み（B）[電解質可溶タンパク質を含む]を、医療用セロハンチューブを用いて透析を行った。透析には大量のイオン交換水を使用した。（脱塩作業）
透析操作の途中で、この溶液を採取して、紫外可視分光光度計を使って190nm～1100nmの波長範囲でスキャンし、分光曲線でモニターしながら、タンパク質に含まれるペプチド結合特有の280nm前後の吸収ピークだけが検出される状態になるまで、透析操作を繰り返した。
塩分濃度、約1.2%（参考：海水の塩分濃度は約3.6%）
- ⑧ ミズクラゲから抽出した細胞接着阻害成分（画分）が含むとされる溶液を得た。
[以降、「クラゲ水」と呼ぶことにする。]

☆結果

	サンゴ忌避	ゼオライト忌避	接着タンパク付着みられず
NO. 2	○	○	ビーカーへの付着
NO. 3	△	○	ビーカーへの付着
NO. 4	○	○	ビーカーへの付着
NO. 5	○	○	ビーカーへの付着
NO. 6	○	○	ビーカーへの付着
NO. 7	△	○	ビーカーへの付着
NO. 8	○	○	ビーカーへの付着
NO. 9	○	○	ビーカーへの付着
NO. 10	○	○	ビーカーへの付着
NO. 11	サンゴに隣接し、接着	ゼオライトとは接着確認とれず	ビーカー側面 2個体約40ヶ所
NO. 12	サンゴとも接着（1個体）	ゼオライトと接着	ビーカー側面 1個体約37ヶ所
NO. 13	サンゴに隣接し、接着	ゼオライトと接着確認	
NO. 14	サンゴに隣接し、接着	ゼオライトと接着	
NO. 15	サンゴに隣接し、接着	ゼオライトと接着確認	

II. [イガイの接着忌避 検証実験]

- ① 60cm 水槽の水面に発泡スチロール板を筏のように浮かべ、ムラサキイガイとサンゴおよびゼオライトを入れる100mL ビーカーを設置するための十数個の穴をあけた。
- ② エアレーションを施すために、電気用のリード線から銅線の芯を引き抜き、ビニール被覆だけを取り出し、これを束ねてエアープンプに接続してエアを送るビニールパイプとして利用した。
- ③ 塩分濃度1.2%のクラゲ水を200mL ビーカーに2分し、サンゴとゼオライトを各々のビーカーに入れて、一晚浸した。
- ④ 翌日の午後に、本校から直線300 mの岸壁にて、ムラサキイガイを採取した。
その日のうちに、No. 1～No. 10の100mL ビーカーに、クラゲ水に浸したゼオライトとサンゴを各ビーカーごとに均等量を入れて、人工海水を満たした。次に、個体の大きさや数をほぼ均等になるようムラサキイガイを入れて、にエアレーションを施してした。
- ⑤ これを、人工海水で満たした60cm水槽の水面に発泡スチロール板ごと浮かべて、寒流装置を用いて、水温20℃を維持した。（実験時期が6月であったことから、水槽の冷却を行った。）
- ⑥ 3日後（72時間後）に水槽から発泡スチロール板ご引き揚げて、結果の確認作業を行った。



ムラサキイガイの入ったビーカーの上にネットを貼って、ビーカー外への逃亡防止のため固定した。

各ビーカー中に配置したムラサキイガイは、各個体の固定に最適な場所に移動して足糸を伸ばす。10個のビーカー中、1個はイガイが死亡。残り9個のビーカー中のイガイは、殆どすべての個体が、ビーカー壁面または底面に極めて多数の足糸を伸ばし、サンゴおよびゼオライトへの足糸接着は、あまり見受けられなかった。また、殆どの個体がビーカー壁面に接触するよう移動していた。No. 11と12は、対照実験用で、クラゲ水に浸していないサンゴとゼオライトについて実験を行ったものである。

なお再度、対照実験として、クラゲ抽出画分に浸していないサンゴ・ゼオライトを敷き詰めた6個のビーカーにイガイを入れて、一晚20℃の恒温水槽中に放置し、調べたところ、すべてのイガイがサンゴ・ゼオライト・ビーカー全てに明確な複数の足糸を伸ばして接着していた。

No. 13～14



☆考察

現状では統計的に検証結果とするには、データ数が少ないが、ムラサキイガイが接着タンパク系（足糸）を伸ばす時、明らかに選択的に忌避している。この原因としてサンゴやゼオライトに吸着したクラゲ抽出画分が、イガイの足糸（接着たんぱく質）の接着を阻害している可能性が高いと考えられる。

☆ 参考文献 東京農工大学 特許 [2010. 1.28 公開]「細胞接着阻害活性を有するクラゲ抽出画分」について、SSH生徒研究活動のために知的財産部より使用許諾を得る

4. 結果

各ビーカー中に配置したムラサキイガイは、各個体の固定に最適な場所に移動して足糸を伸ばす。10個のビーカー中、1個はイガイが死亡。残り9個のビーカー中のイガイは、殆どすべての個体が、ビーカー壁面または底面に極めて多数の足糸を伸ばし、サンゴおよびゼオライトへの足糸接着は、あまり見受けられなかった。また、殆どの個体がビーカー壁面に接触するよう移動していた。対照実験として、クラゲ抽出画分に浸していないサンゴ・ゼオライトを敷き詰めた6個のビーカーにイガイを入れて、一晚20℃の恒温水槽中に放置し、調べたところ、すべてのイガイがサンゴ・ゼオライト・ビーカー全てに明確な複数の足糸を伸ばして接着していた。クラゲ抽出画分の分子量測定結果は現在、評価中である。

5. 考察

現状では統計的に検証結果とするには、データ数が少ないが、ムラサキイガイが接着タンパク系(足糸)を伸ばす時、明らかに選択的に忌避している。この原因としてサンゴやゼオライトに吸着したクラゲ抽出画分が、イガイの足糸(接着たんぱく質)の接着を阻害している可能性が高いと考えられる。