

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310022

研究課題名(和文)南極オゾンホール経由の紫外線がペンギンの目に及ぼす影響のリアルタイム分光分析

研究課題名(英文)Spectroscopic analysis of penguin eyes on the ultra-violet radiation via ozone-hole

## 研究代表者

山本 達之 (Yamamoto, Tatsuyuki)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60230570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：砕氷艦しらせが、H24、25年度の2か年連続して接岸に失敗したために、南極昭和基地周辺でのリアルタイム分光分析の実施を断念せざるを得なかった。このため、夏隊期間中の研究計画のうち、比較的遂行が容易な研究計画は実施されたが、本研究計画遂行の前提となるヘリコプターが、物資輸送に専念することとなったためである。そこで、生体固体の採取を断念して、すでに確保されていた死亡個体解剖学的研究を中心に計画を変更し、アデリーペンギン眼のガングリオン細胞分布の様子と種間差に関する基礎的データを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Icebreaker Shirase failed to arrive Syowa station at 2012 and 2013. By this accident, we could not perform the real-time Raman spectroscopic analysis. This is due to the change of the order of research plans at Antarctica and we could not use helicopters for this research because they were exclusively used for the transportation of staffs essential for the life of Syowa station through winter. We gave up the real-time spectroscopic analysis at Antarctica and performed anatomical study on the eye tissues of Adelie penguins. We succeeded in the basic analysis of ganglion cells of retina of them.

研究分野：分子分光学

キーワード：オゾンホール 紫外線 ペンギン 眼 分光学 ラマン 解剖学

## 1. 研究開始当初の背景

大気中に放出されたフロンガスによるオゾン層破壊が進み、1980年代初頭以降、南極の春先にいわゆるオゾンホールが発生している。オゾンホール面積は、21世紀に入ってから一時的に縮小方向に転じたものの、2003年以降に再び拡大し、その後ほぼ横ばい状態である。この間に、オゾンホール面積は、南極大陸の総面積の2倍に達し、南極に近いオーストラリア大陸南部では、紫外線量増大による、皮膚がんや白内障患者が増加している。南極大陸は「地球環境の窓」と呼ばれ、地球環境の変化が最も端的に現れる地域である。このため、増大した紫外線(特に生体に有害なB領域の紫外線)が生態系に及ぼす影響評価を、現地で行うことは必須急務である。こうした背景の下、研究代表者の山本(達)は、「南極のオゾンホール経由の紫外線により誘起される白内障発生の分子機構(基盤研究(C)平成18~20年度)」、「南極オゾンホール経由の紫外線が動物の眼に及ぼす影響に関する分光学的研究(基盤研究(C)平成21~23年度)などの課題研究を行なった。この間、山本(達)が第49次南極地域観測隊に参加して南極昭和基地で実施した実験により、牛眼の水晶体タンパク質「クリスタリン」のアミノ酸残基のうち、特にトリプトファン(Trp)の破壊が、紫外線誘起に伴う水晶体の白内障様の黄変に密接に関連していることを確かめた。また、牛角膜のコラーゲン分子に人工的に紫外線を照射した結果、南極で紫外線照射した牛角膜試料と極めて類似した構造変化が起こることを明らかにした。これらの結果から、南極のオゾンホール経由の紫外線が解剖学的に摘出した動物眼組織(水晶体、角膜)のタンパク質を変性させる効果があることが明らかになっていた。

## 2. 研究の目的

(1)上記研究はいずれも死亡組織を用いた実験であり、生体の治癒効果を考慮していないことが問題とされた。そこで、オゾンホール発生時の10~2月頃にかけて、産卵・育雛などを行なうアデリーペンギンの眼に対する影響を、前掲の申請課題(平成21~23年)でも解明しようと試みたが困難であった。例えば、南極から日本に持ち帰った、アデリーペンギンの雛の死亡個体(合計4匹)の眼球を、山本(直)(研究分担者)が解剖学的見地から観察したが、紫外線の影響は無かった。若い個体への紫外線の影響は蓄積していなかったためと思われる。一方、ペンギン成体の新鮮な死亡個体を南極の野外で採取することは極めて困難(成体の死亡事故は、主に海上で発生する)なため、至近距離からの写真撮影による観察を行なったが、眼の異常を発見することは出来なかった。人工飼育下でのアデリーペンギンの寿命は20年に達するものの、屋内照明などによる紫外線の眼組織への影響は報告されておらず、ペンギンの白

内障は稀である。しかし、オゾンホール経由の紫外線がペンギン眼に分子レベルで影響を与えるというこれまでに想定していなかった可能性は、十分な検討がされておらず、申請者らは、紫外線の生態環境への影響を危惧している。そこで、持ち運びが可能なラマン散乱分光装置(ポータブルラマン)を、南極昭和基地周辺のアデリーペンギン営巣地に持ち込み、ペンギン眼の角膜や水晶体のラマンスペクトルを、リアルタイムで現地測定し、タンパク質異常を分子レベルで捉えることを目指す。

(2)眼組織に紫外線を照射すると、大部分は角膜で吸収されるが、一部は水晶体に達する。我々が、南極で牛水晶体への紫外線照射実験を行なった結果、Trp残基のラマンシグナルが選択的に消失し、その他のアミノ酸残基は比較的保たれていることが世界で初めて明らかになった。老人性白内障では、システイン残基のS-Hが酸化され、S-S架橋構造に変化することにより、水晶体タンパク質「クリスタリン」の変性を進行させるが、紫外線による変性は、分子機構が全く異なっていた。また、紫外線照射した牛角膜のFT-IRスペクトル測定により、各膜コラーゲン分子分解の進行程度を、アミドⅠ/アミドⅡ赤外吸収バンド比から見積もることが可能で、南極の紫外線の4週間曝露の影響は、科学研究用の一般的な人工紫外線光源を、5cmの至近距離から同じく4週間曝露した場合と同程度であることを明らかにした。これら成果は、紫外線が眼に与える影響に関する研究として、学術的に高く評価されたが、組織が生体で無いことが問題とされた。

本研究の学術的な特色と独創的な点は、生きた状態のペンギン眼のラマン散乱スペクトルを、現地そのまま測定・解析する点にある。今まで、このような試みが計画されたことはなく、本研究課題が世界初の試みである。分光学的手法を用いることで、従来は分からなかった分子レベルでの変化が明らかになると期待される。紫外線の影響は、組織の深さに応じて、最初は角膜に、次に水晶体に表れるが、同じ組織でも、深さによって紫外線の影響が異なることが予想される。そこで我々は、南極でペンギンを用いた実験を試みる前に、牛眼角膜のラマンスペクトルを、深さ別に測定することができるかどうか確かめた本申請課題の研究分担者の安藤は、南極昭和基地での実験を想定して蛍光発光の妨害に強い、近赤外光の785nmのレーザ光源を用いて行なった実験で、1660cm<sup>-1</sup>に、コラーゲン由来のアミドⅠバンドを捉えることに成功した。同様の測定が、南極昭和基地周辺のペンギン営巣地で行なわれた場合、本研究により世界に先駆けて、紫外線の影響を分子レベルで確かめることができる。

また、ペンギンの白内障の症例報告は、これまでほとんど無かったため、ペンギン眼への紫外線の影響を解剖学的に行なった例は

無い。唯一の関連報告例が、ジェンツーペンギンの網膜に関するもの(名古屋大学大学院名誉教授、宗宮博士らによる未発表データ)で、しかもこれは紫外線の影響の観点からのものでは無かった。そこで、我々は、山本(直)を研究分担者として、アデリーペンギン、ニワトリへの紫外線の影響を解剖学的な観点から行なうもとした。これら研究テーマも新奇かつ独創的なものであり、紫外線の生態系への影響評価として重要な知見を提供すると予測された。

### 3. 研究の方法

本申請課題は、平成 24 年度～26 年度で行った。ポータブルラマン装置を用いた実験は、本研究計画の核で、山本(達)を中心として計画し、秋吉、伊村、工藤(連携研究者)、田邊優貴子(東京大学大学院新領域創成科学研究科・特別研究員;研究協力者)の協力により平成 25 年度に南極昭和基地付近で行なう計画であった。牛眼のラマン散乱スペクトルの予備実験は、安藤(研究分担者)によって既に実施済みで、本研究計画で計画している眼のタンパク質のラマンスペクトルの深さ依存測定が可能であることが分かっている。山本(達)と安藤が、平成 24 年度予算で購入予定の、ポータブルラマン装置を用いて、ニワトリをモデル動物としてラマン測定の訓練を、南極での実験を想定して実施する。その後、平成 25 年度に、名古屋港水族館の協力を得て、アデリーペンギンを用いた測定実験を行ない、最終的に昭和基地周辺の営業地でラマン測定を実施する。解剖学的研究は、山本(直)(研究分担者)と秋吉(連携研究者)が昭和基地周辺で採取したアデリーペンギンの死亡個体とニワトリ試料によって実施する。

#### (1)ニワトリへの紫外線照射実験とラマン散乱スペクトル測定

ポータブルラマン装置は、受光部が光ファイバによって、小型分光器に接続され、5 時間以上稼動する内臓電池によって動作する持ち運び可能な小型分光器である。操作は、付属のノートパソコンによって行なう。電源は充電が可能であり、昭和基地野外でも、発電機により常時充電可能である。

平成 24 年度は、この装置を用いて、鳥類であるニワトリをペンギンのモデル動物とした予備実験を行なった。

安藤(研究分担者)は、ポータブルラマン装置と同等の測定条件を想定して、光ファイバを用いて牛眼試料の角膜を 0～2.4mm まで、各々の深さで別々にラマンスペクトルの測定が可能であることを、すでに確かめていた。ラマン分光法は、振動分光法の一種で、FT-IR 法が主に、タンパク質主鎖の構造変化に敏感であるのに対して、側鎖の構造変化に敏感な分光法である。本研究で想定されるタンパク質の変化は、芳香族アミノ酸(Trp, Tyr, Phe)に集中的に起こる可能性が高いため、ラマン

分光法を解析に用いた。主鎖の構造変化をアミド Ⅰ, Ⅱ により、側鎖の変化を 800～1200cm<sup>-1</sup> の各シグナルの強度変化から見積もる。本実験により、紫外線の影響を調べるのに最適な角膜の深さを見積もる。

#### 2)解剖学的実験(山本(直)(研究分担者)と秋吉が担当)

ペンギン眼の網膜、角膜、水晶体の各部位の組織異常の有無を、解剖学的に精査する。試料は、本研究計画期間内に、南極地域観測隊が、昭和基地周辺で採取したペンギン死亡個体を用いる。ペンギン個体を固定後、摘出した右眼球から網膜の伸展標本を作成し、Nissl 染色を行なう。網膜の複数の領域において神経節細胞層内(GCL; ganglion cell layer)のGCの面積を計測し、本種のGC面積の頻度分布を調べる。亜集団が存在した場合はそれらを区別して計数し、亜集団ごとの分布様式を調査する。

#### アデリーペンギンの眼のラマン散乱スペクトル測定

昭和基地周辺で、ペンギンの生体を捕獲する。ペンギン捕獲には、塩ビ管を加工して作成した専用の捕獲装置を用いる。ペンギンを二人一組で追い込み、網で捕らえた後に、この捕獲装置に固定し、速やかに麻酔を行なう。名古屋港水族館では、これら一連の作業を南極で速やかに実施することができるように、連続して二日間の訓練を計画している。麻酔は、南極地域観測隊の医療隊員の指導の下、最小限の量を使用する。

ラマン散乱スペクトル測定は、10mW 以下の低出力で、30 分以内に終了させる。平成 24 年度の予備実験で得た、紫外線の影響評価に最も有効な深さの角膜のラマン散乱スペクトル測定を実施する。

### 4. 研究成果

砕氷艦しらせが、H24、25 年度の 2 か年連続して接岸に失敗したために、南極昭和基地周辺でのリアルタイム分光分析の実施を断念せざるを得なかった。これは、南極地域観測隊夏隊員の最重要使命が、越冬隊員の安全な越冬観測の成立であるためである。このため、夏隊期間中の研究計画のうち、比較的遂行が容易な研究計画は実施されたが、本研究計画遂行の前提となるヘリコプターが、物資輸送に専念することとなったためである。非常に残念ではあるが、生体固体の採取を断念して、すでに確保されていた死亡個体解剖学的研究を中心に計画を変更した。

#### (1)ペンギン眼の解剖学的研究成果

紫外線がペンギン眼に与える影響を精査するための基礎的データを集積するために、アデリーペンギン眼の網膜を調べた。材料として第 51 次南極地域観測隊隊員がラングホブデ半島袋浦湾で採集したアデリーペンギンの死亡幼鳥を 1 個体を使用した。固定

後、摘出した右眼球から網膜の伸展標本を作成し、Nissl 染色を行った。網膜の複数の領域において神経節細胞層内 (GCL; ganglion cell layer) の GC の面積を計測し、本種の GC 面積の頻度分布を調べた。亜集団が存在した場合はそれらを区別して計数し、亜集団ごとの分布様式を調査した。空間分解能 (SRP; spatial resolving power) は Coimbra et al. (2012) に従い算出した。

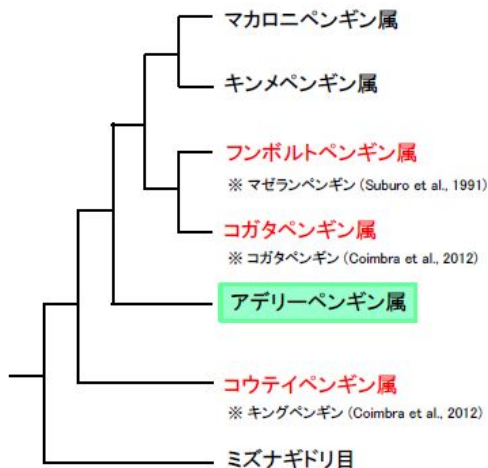


図 1. アデリーペンギンの系統関係

神経節細胞内の GC の細胞体の面積を測定した結果、大小 2 タイプの細胞集団の存在が示唆された (図 2)。

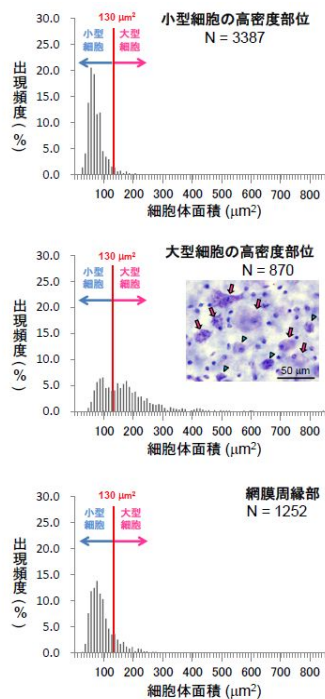


図 2. アデリーペンギンにおける GC 細胞体面積の頻度分布。写真は大型細胞の高密度部以内に見られた大小の亜集団を示す。矢印：大型細胞，矢頭：小型細胞

大小の細胞群を区別して網膜での分布様式を調べたところ、それぞれの細胞群で異なっていた。小型細胞群が、視神経円盤の背側に帯状に広がる (horizontal streak) のに対して、大型細胞群は側頭部と吻側部の 2 か所にスポット状の高密度部位があった (図 3)。

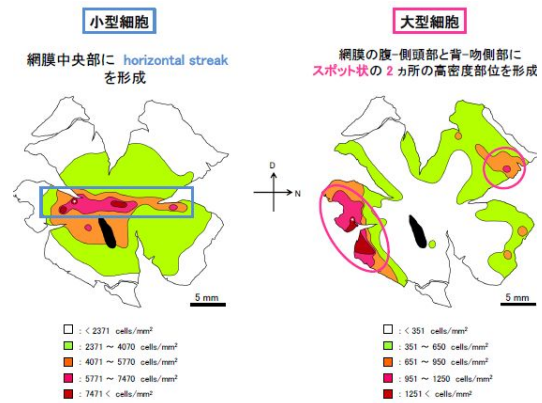


図 3. アデリーペンギン幼鳥の GC の分布様式。白星は最高密度部位を、黒色の斑紋は視神経円盤およびペクテンを示す。D = 背側, N = 吻側, 最高密度: 小型細胞 = 9312 個/mm<sup>2</sup>, 大型細胞 = 1584 個/mm<sup>2</sup>

小型細胞: 従来の研究から、ペンギン類の GC の高密度領域は、horizontal streak を形成することが判明していた。脊椎動物において、GC の小型細胞は一般的に色覚や形態視を司ると考えられている。そのため小型細胞によってつくられる horizontal streak はペンギン類が陸上で休むもしくは水中で餌を探す際に、眼を動かすことなく側方向を高解像度で幅広く見るのに適していると考えられる。

< 大型細胞 >

本種とマゼランペンギンでは 2 か所、一方キングペンギンとコガタペンギンでは 1 か所の大型細胞の高密度部位が認められた。GC の大型細胞は、脊椎動物では一般に視覚対象の動きの検出に重要であると考えられている。そのため大型細胞によって形成されるスポット状の高密度部位は陸上で休んでいる間や水中で餌を探す際に、特定の領域 (前方や後方、またはその両方) における外敵 (および餌: 生体の場合) の動きの検知に利用されている可能性がある。

結論と補足: アデリーペンギンの GC は亜集団 (小型・大型) ごとに異なる分布パターンを示した。ペンギン類の GC の分布様式は系統間で比較的良好に保存されていることが分かった。研究計画当初に予想できなかった、厚い南極氷に阻まれて、リアルタイム分光分析は断念せざるを得なかったが、南極紫外線が生物に与える影響に関して、今後も調査を試みる必要がある。

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 22 件)

- 1 Tatsuro Nishida, Tomohiro Kaino, Ryo Ikarashi, Daisuke Nakata, Keiji Terao, Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi, Makoto Kawamukai and Tatsuyuki Yamamoto, The effect of coenzyme Q10 included by  $\beta$ -cyclodextrin on the growth of fission yeast studied by microscope Raman spectroscopy, J. Mol. Struct., 査読有, Vol.1048, 2013, 375-381  
DOI : 10.1016/j.molstruc.2013.05.066
- 2 山本達之、鈴木秀彦、南極観測における分光学の活用、分光研究, 査読有, 62 巻、2013、74-84  
DOI 無  
DOI:10.2108/zsj.30.42
- 3 Tatsuyuki Yamamoto, Hideo Akiyoshi, Keisuke Yoshikiyo, Tetsuya Takahashi, Yukiko Tanabe, Sakae Kudoh, Satoshi Imura, Naoyuki Yamamoto, A spectroscopic study on the effect of ultra-violet solar radiation at Antarctica on the human skin fibroblast cells, Geoscience Frontiers, 査読有, Vol. 4, 2013, 647-65  
DOI : 10.1016/j.gsf.2012.07.004
- 4 Kato T., Yamada Y., Yamamoto N., Ascending gustatory pathways to the telencephalon in goldfish, J Comp. Neurol., 査読有, Vol.520, 2012, 2475-2499  
DOI: 10.1002/cne.23049
- 5 Chuan-Keng Huang, Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi and Shinsuke Shigeto, Disentangling Dynamic Changes of Multiple Cellular Components during the Yeast Cell Cycle by in Vivo Multivariate Raman Imaging, Anal. Chem., 査読有, Vol.84, 2012, 5661-5668  
DOI : 10.1021/ac300834f

[学会発表](計 92 件)

- 1 BIOMEDICAL APPLICATIONS OF RAMAN SPECTROSCOPY - Medical Diagnosis - , T. Yamamoto, M. Kawamukai, Y. Kinoshita, A. Nagai, and H. Hamaguchi, 2nd Symposium on Weak Molecular Interaction, 学習院大学(東京都豊島区), Mar, 4-6, 2015
- 2 山本直之. 魚の感覚上行路: 大脳新皮質は存在するのか? 第 2 回理工学研究部テニユアトラックセミナー, 富山大学(富山県富山市) 2015 年 3 月 5 日

[図書](計 6 件)

山本達之、ラマン分光法 4.2 章 生命科学分野 (p.109 - 126) 講談社サイエンティ

フィク、2015、205

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 共鳴ラマン分光法を利用した生体組織内好酸球の検出方法、組織内好酸球浸潤性疾患の検査方法、及び生体組織内好酸球の検出装置

発明者: 山本達之、木下芳一、大嶋直樹、瀧口宏夫、安藤正浩

権利者: 島根大学、分光科学研究所

種類: 発明

番号: 特願 2015-015612

出願年月日: 2015 年 1 月 29 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 達之 (YAMAMOTO Tatsuyuki)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号: 60230570

(2) 研究分担者

山本 直之 (YAMAMOTO Naoyuki)

名古屋大学大学院・生命農学研究科・教授

研究者番号: 80256974

(3) 研究分担者

安藤 正浩 (ANDO Masahiro)

早稲田大学・位置研究所・助教

研究者番号: 50620803

(4) 連携研究者

秋吉 英雄 (AKIYOSHI Hideo)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号: 20150360

(5) 連携研究者

伊村 智 (IMURA Satoshi)

国立極地研究所・教授

研究者番号: 90221788

(6) 連携研究者

工藤 栄 (KUDO Sakae)

国立極地研究所・准教授  
研究者番号：40221931