

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22341

研究課題名（和文）地磁気感覚に関与する鉄代謝機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the iron metabolism mechanism for geomagnetic sense

研究代表者

山下 倫明（YAMASHITA, Michiaki）

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・教授

研究者番号：80344323

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：魚類頭部から、平均粒径25-30 nmの鉄ナノ粒子を多数抽出単離した。シングルパーティクルICP-MSを用いて、鉄を含む微粒子を定量分析した結果、ゼブラフィッシュやカタクチイワシ仔魚一個体あたり数個程度であったことから、この鉄微粒子は脳または感覚器などの脳神経系の一部の細胞・組織に由来する新規物質であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この鉄微粒子は脳または感覚器などの脳神経系の一部の細胞・組織に由来する微量な成分であることが推定された。鉄微粒子は酸化鉄およびタンパク質が検出されることから、生体内で鉄と鉄結合タンパク質を含む複合体として生合成され、磁気に反応する微粒子として存在することが推定された。脊椎動物において未解明の地磁気感覚の分子メカニズムの解明に役立てられる。

研究成果の概要（英文）：A large number of iron nanoparticles with an average diameter of 25-30 nm were extracted and isolated from the fish head. After pronase was used to digest proteins at 60 °C, iron nanoparticles can be recovered by adsorption with a magnetic stand. It was possible to purify using the characteristics such as quantitative analysis of iron-containing nanoparticles by single particle ICP-MS revealed that the number of nanoparticles containing iron was about several per larvae of zebrafish and anchovies.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：ナノパーティクル 地磁気感覚 微粒子 新規物質

1. 研究開始当初の背景

生物は磁気を帯びた鉄微粒子をコンパス代わりに使っている可能性が考えられる (Castelvecchi D, 2012)。磁性細菌は、その菌体内に 50~100 nm のマグネタイトの微粒子が 10~20 個ほど連なったマグネトソームを保持している。マグネトソームは、菌体内で磁気を感じ取るコンパスとなっていると推定される (福森・田岡, 2014; 松永, 1991)。磁性細菌におけるマグネトソーム形成に関わる鉄の取り込み、鉄イオンの濃縮およびマグネタイト形成に関わる代謝遺伝子群が明らかにされた。

昆虫、渡り鳥、ウミガメ、サケなどの高等動物が地磁気を感じし、一部の生物は磁気を帯びた微粒子をコンパス代わりに使っている可能性が考えられることから、地磁気感覚を担う感覚器官が脳神経系に存在することが推定されている。一方、魚類ではゼブラフィッシュの行動試験によって磁性感覚を有することが示された。これらの研究から、魚類や他の高等動物においても磁性細菌のようなマグネタイトを脳神経系の細胞内に有しており、磁気感覚を地球上の行動に利用する可能性が考えられることから、電子顕微鏡観察によって見つかっているが、そのような磁性微粒子は物質としてまだ単離同定されていない。

一部の魚類ではゼブラフィッシュの行動試験によって磁性感覚を有することが示された (Shcherbakov et al., 2005)。しかし、魚類や他の高等動物においても磁性細菌のようなマグネタイトを細胞内に保持し、磁気感覚を有しているかどうか不明であった。

魚類では Shcherbakov et al.による磁場の変化に対する行動試験によってゼブラフィッシュやモザンビークティラピアには磁気感覚があることが報告された。Walker らがニジマスで磁気感覚に関するバイオアッセイを行った。この結果、ニジマスには 50 マイクロテスラの差を識別することができる能力があることがわかった。さらに体内の磁性微粒子を探索した結果、鼻腔上皮細胞に 30~50 nm マグネタイトが存在することを見出した。また、Ogura et al.によってサケの上部、下部頭蓋骨、頭蓋骨の後部および頭蓋骨から磁性物質が検出されている。この研究では、サケの頭部を上部頭蓋骨、下部の頭蓋骨、頭蓋骨の一部および脳に分け、次亜塩素酸ナトリウムによって消化した。消化によって生じた脂肪をジエチルエーテルによって溶解させ、その後エーテルで除去した。溶液を遠心分離し、遠心管の上部画分を蒸留水で置き換えることにより残留物を繰り返し洗浄した。これを透過型電子顕微鏡によって磁性微粒子を観察し、エネルギー分散型 X 線分析によって元素を測定した。透過型電子顕微鏡観察の結果、磁性微粒子の色は黒色であったこと、電子密度が高い粒子が確認され、結晶構造を示していたこと、磁気粒子は鎖状になっており 2 列または分岐していること、磁気粒子は薄い膜に覆われていること、粒子の形は一部が球形を示し、大部分が多角形を示していたがわかった。エネルギー分散型 X 線分析によって、内容物の組成を調べたところ、粒径の分布の 53% が 40~80 nm の範囲であったこと、鉄が主要元素でマンガンも微量に含まれていた。さらに中篩骨を含む上部頭蓋骨から多く磁性微粒子が検出された。Mann et al. は、ベニザケの頭蓋骨から篩骨組織を抽出し、ホモジナイザーで粉碎して、磁性物質を取り出し、その結晶構造を高解像型電子顕微鏡 (HRTEM) によって観察すると、電子密度の高い粒子の鎖を示したこと、鎖の長さはまちまちで中央値は 21~25 粒子であったこと、粒子サイズは 25~60 nm で平均は 48 nm であったこと、結晶の間隔がマグネタイトと一致すること、走磁性細菌内のマグネタイト微粒子と同じ八面体構造をしていたことが報告されて

いる。ベニザケやサケの先行研究から高度回遊する大型の魚類は頭蓋骨の篩骨領域に磁気感覚器官が存在する可能性が高いと結論づけている。

1962年にLowenstamがヒザラガイから生物由来の磁鉄鉱を見出した。この実験では、*Chiton tuberculatus*の歯、*Acanthopleura echinatum*の歯、*A.spiniger*の歯の標本を用い、顕微鏡観察とX線回折による元素分析を行った。顕微鏡の観察結果、*Chiton tuberculatus*の歯、*Acanthopleura echinatum*の歯、*A.spiniger*の歯の標本それぞれの外側に黒い鉱物に覆われていることがわかった。この外側の物質をX線回折によって元素分析を行ったところ、外側に存在していた物質がマグネタイトであることが報告された。

2. 研究の目的

これらの先行研究から、魚類や他の動物においても磁性細菌のようなマグネタイトを脳神経系の細胞内に有しており、磁気感覚を地球上の行動に利用する可能性が考えられた。そこで、このような魚類の行動を制御する鉄微粒子を探索し、化学性状を明らかにした。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュ、カタクチイワシ、ギンザケ等の生体組織に粒径25 nmから30 nmの酸化鉄微粒子が存在することを見出し、プロテアーゼ製剤を用いて、生体組織のタンパク質を消化したのち、磁石による吸着によって回収した。

4. 研究成果

(1)

ゼブラフィッシュの受精5日後の仔魚1万個体に対して、0.5% SDS, 10 mM CaCl₂ および2 mg/ml プロナーゼを含む0.1 M Tris HCl (pH 7.5)緩衝液25 mLを添加したのち、乳鉢で固形物が無くなるまでホモジナイズした。また、カタクチイワシ仔魚(体重10 mg, 体長8 mm) 50 gに対して、上述のプロナーゼを含む緩衝液100 mLを添加して、乳鉢を用いてホモジナイズした。一晩、60°Cで加熱して、プロテアーゼ消化によって組織を可溶化した。このホモジネートを10000 x Gで遠心分離して上清をマイクロテストチューブに回収した。ホモジネートを含むマイクロテストチューブを磁気スタンド(バイオラッド社製)に立てて、鉄微粒子を集め、10000×G・10分間の遠心上清をマイクロピペットで除去したのち、磁石に吸着した沈澱物を超純水に懸濁した。この洗浄操作を3回繰り返した。

鉄微粒子懸濁液の濁度は、600 nmにおける濁度を分光光度計を用いて測定した。タンパク質濃度は、プロテインアッセイキット(バイオラッド社)を用いて、ウシ血清アルブミンを標準液として測定した。鉄濃度は、 α -フェナンスロリンを用いて吸光法で測定した。

(2)

精製した鉄微粒子の紫外吸収スペクトルを測定した。鉄微粒子は、260 nmに吸収極大が認められた。紫外吸収およびタンパク質による染色が検出されたことから精製された鉄微粒子はタンパク質を含んでおり、タンパク質と酸化鉄の複合体であることが推定された。ゼブラフィッシュを解剖して組織別に鉄微粒子を精製した。その結果、精製した鉄微粒子の濁度、鉄濃度およびタンパク質濃度を測定した(表1)。これらのことから、鉄微粒子はゼブラフィッシュの脳から抽出精製できたことから、鉄微粒子は脳神経系に由来することがわかった。

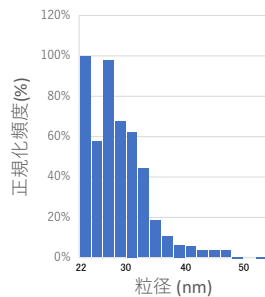
(3)

ゼブラフィッシュ仔魚1万尾およびカタクチイワシ仔魚50 gから(1)に記載の方法によって、それぞれ精製された鉄微粒子の粒度分布は誘導結合プラズマ質量分析計(アジレントICP-MS7900)を用いて、表2の測定条件で鉄-56を検出した。図2のように、平均粒径は25 nm~30 nmであった。粒度分布の測定結果を表3に示した。精製単離された希釈前の鉄微粒子の濃度はゼブラフィッシュ仔魚 2.8×10^9 個/Lであり、ゼブラフィッシュ仔魚は1万尾を分析に用いたことから、一尾につき、平均4.5個の鉄微粒子が存在することが算出された。カタクチイワシ鉄微粒子を走査型電子顕微鏡2万倍を用いて、形態観察した結果、鉄微粒子は中心部に空洞のあるドーナツ状の形状をしていた。これらのことから、魚類は平均粒径25 nm~30 nmの鉄微粒子を有していた。鉄含有分子として新規の化学構造であると考えられる。

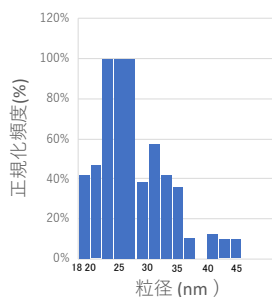
ベニザケやサケなどの先行研究で電子顕微鏡観察の結果見つかっているマグネタイトと考えられる微粒子が魚類の脳神経系に数個から十数個存在しており、プロテアーゼ消化によって抽出することができた。鉄微粒子は動物の脳神経系の地磁気センサーとして機能していることが推定される。

試料名	パーティクル数	パーティクル濃度 (パーティクル数/L)	最頻粒径 (nm)	濃度 (ng/L)	定量濃度 (ppb)
Fe 30 nm 20 ppt	2678	145905300	30	23.17	0.021
Fe 30 nm 20 ppt	1438	78346460	30	13.07	0.013
ゼブラフィッシュ 1000倍希釈	49	2669664	25	0.10	0.004
ゼブラフィッシュ 200倍希釈	212	11550382	25	3.56	0.006
ゼブラフィッシュ 100倍希釈	516	28113194	25	3.97	0.007
ゼブラフィッシュ 20倍希釈	1939	105642411	30	6.50	0.015
カタクチイワシ 1000倍希釈	23	1253108	25	0.06	0.004
カタクチイワシ 200倍希釈	129	7028299	25	1.96	0.006
カタクチイワシ 100倍希釈	163	8880718	30	1.44	0.007
カタクチイワシ 20倍希釈	1212	66033317	25	4.38	0.013

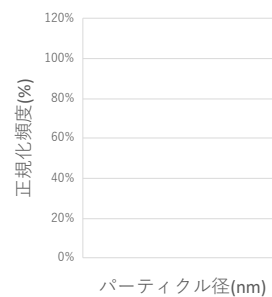
カタクチイワシ仔魚由来鉄微粒子
200倍希釈



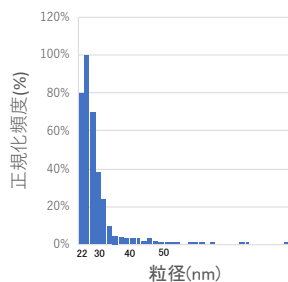
カタクチイワシ仔魚由来鉄微粒子
200倍希釈



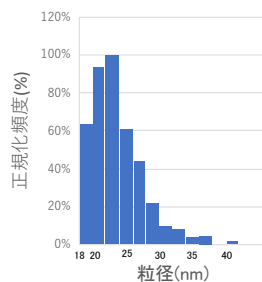
溶媒(超純水)



ゼブラフィッシュ 仔魚由来鉄微粒子
20倍希釈



ゼブラフィッシュ 仔魚由来鉄微粒子
200倍希釈



鉄標準粒子 Fe₃O₄ 30 nm

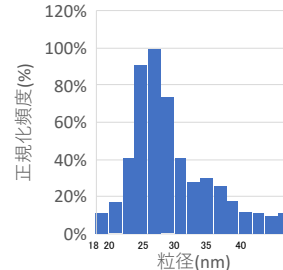


図2 ゼブラフィッシュおよびカタクチイワシ仔魚から検出された鉄微粒子の粒度分布
ゼブラフィッシュおよびカタクチイワシ仔魚から生成された鉄微粒子を超純水で20から1000倍に希釈してから、ICP-MSによって鉄微粒子を分析した結果、鉄微粒子が検出された。その最頻粒径は、ゼブラフィッシュおよびカタクチイワシともに25~30 nmであった。分析用溶媒の超純水には鉄微粒子は検出されなかった。分析用の30 nm鉄標準粒子は最頻粒径が30 nmであった。

引用文献

- Castelvecchi D, Gather the wind. *Sci. Am.* 306, 48-53 (2012)
- 福森・田岡, 磁性細菌オルガネラ「マグネトソーム」の構造機能相関の解明 *生物物理* 54(1), 011-014 (2014)
- 松永, 微生物における磁性鉄微粒子. *鉄と鋼* 77, 1991
- Shcherbakov et al.: Magnetosensation in zebrafish. *Curr Biol*, 15, 161-162 (2005)
- Ogura M, Kato M, Arai N, Sasada T, Sakai Y: Magnetic particle chum salmon (*Oncorhynchus Keta*): Extraction and transmission electron microscopy. *Can J Zool*, 70, 874-877 (1991)
- Mann S: Ultrastructure, morphology and organization of biogenic magnetite from sockeye salmon, *Oncorhynchus Nerka*: *J Exp Biol*, 140, 35-49 (1988)
- Walker MM, Kirschvink JL, Chang SB, Dizon AE: A candidate magnetic sense organ in the yellowfin tuna, *Thunnus albacares*. *Science*, 224, 751-753 (1984)
- Walker MM, Quinn TP, Kirschvink JL, Groot C: Production of single-domain magnetite throughout life by sockeye salmon, *Oncorhynchus Nerka*: *J Exp Biol*, 140, 51-61 (1988)
- Walker MM, Carol ED, Cordula VH, Patricia MP, John CM, Clin RG: Structure and function of the vertebrate magnetic sense. *Nature*, 390, 371-376 (1997)
- Lowenstam HA: Goethite in Radular teeth of Recent Marine Gastropods. *Science*, 137, 279-280 (1962)
- 敷雅春, 山本幸市: 1,10-フェナントロリンとテトラブロモフェノール フタレインエチルエステルを用いる鉄(II)のキトサン共沈濃縮-吸光光度定量. *分析化学* 55, 727-732 (2006)
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254 (1976)
- 花岡健二郎: 蛍光標識試薬, *Drug Delivery System* 32—5, 2017
- 松井 康人: ナノ粒子の物性と細胞への侵入量との関係性 *Eurozoru Kenkyu*, 32(3), 157-161(2017)
- 大西俊一: *生化学*. 60. 409-423 (1988)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中直之, 柳瀬有希, 本多穰宇, 野田竜雅, 松岡ゆかり, 伊藤真由, 田中秀樹, 植田ひまわり, 木下佳奈, 濱中崇, 大谷宗資, 山下倫明, 世古卓也, 今村伸太郎, 中野かずみ, 島村佳典, 宮下和彦
2. 発表標題 ゼブラフィッシュおよびカタクチイワシ仔魚からの磁性微粒子の単離
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大谷宗資, 山下倫明
2. 発表標題 魚類の脳に由来する鉄微粒子の検出 地磁気感覚への関与を探る
3. 学会等名 第22回マリンバイオテクノロジー学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大谷宗資, 藤田菜保, 濱中崇, 下川祐太郎, 山下倫明
2. 発表標題 ICP-MSによるヘモグロビンおよびミオグロビンの測定法
3. 学会等名 マリンバイオテクノロジー学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------