

令和7年度 TC論文

専門性・多様性を求められる技術支援と  
必要なスキル習得について  
～生物系・フィールド系・施設管理・機器分析まで～

東京科学大学 TC カレッジ  
物質分析系 TC コース (バイオ)  
山口 信雄  
広島大学 技術センター 共通機器部門

## 目次

### 第1章 緒論

#### 第1節 技術職員としての履歴、スキル、業績一覧

##### 第1項 学歴・経歴

##### 第2項 臨海実験所での業務内容（2000～2016）

##### 第3項 N-BARD およびコアファシリティ推進室での業務内容（2017～）

##### 第4項 資格

##### 第5項 業績等

#### 第2節 広島大学技術職員組織の変遷

#### 第3節 遠隔地施設におけるフィールド系技術支援とバイオ系研究支援概要

#### 第4節 共通機器部門における機器分析支援概要

#### 第5節 TC 論文の構成

#### 第6節 TC 申請に至る経緯

### 第2章 広島大学理学研究科附属臨海実験所における遠隔地フィールド系技術職員としての支援業務

#### 第1節 施設維持・管理

#### 第2節 船舶管理・運航

#### 第3節 生物採集・飼育

#### 第4節 実習・教育支援

#### 第5節 成果まとめ

### 第3章 臨海実験所における海洋生物研究支援（バナジウム濃縮研究）

#### 第1節 研究支援および自己研鑽としての研究活動（ホヤにおける高濃度バナジウム濃縮機構の研究）

##### 第1項 ホヤについて

##### 第2項 ホヤのバナジウム濃縮の概要

##### 第3項 ホヤ血球の種類とバナジウム濃縮に関わる遺伝子のスクリーニング

##### 第4項 新規 Vanabin の局在解析

##### 第5項 成果まとめ

#### 第2節 エラコにおける高濃度バナジウム濃縮機構の研究

##### 第1項 エラコとバナジウム濃縮について

##### 第2項 エラコのバナジウム結合タンパク質のスクリーニング

##### 第3項 成果まとめ

### 第4章 ホヤにおける接着機構の研究

- 第1節 ホヤの接着とバナジウム濃縮の関連性
- 第2節 被囊のセルロースと被囊細胞について
- 第3節 ホヤ被囊の構造解析（光学顕微鏡レベル）
- 第4節 ホヤ被囊の構造解析（透過型電子顕微鏡レベル）
- 第5節 Cryofilm 法による凍結切片
- 第6節 Cryo-SEM による凍結断面の観察
- 第7節 接着面の元素分析
- 第8節 ホヤの接着突起について
  - 第1項 ホヤ接着突起の人工的な誘導
  - 第2項 ホヤ接着突起構造（光学顕微鏡レベル）
  - 第3項 ホヤ接着突起構造（透過型電子顕微鏡レベル）
  - 第4項 ホヤ接着突起における被囊細胞
  - 第5項 接着中のホヤ接着突起内部構造の変化
  - 第6項 未固定ホヤ接着突起からのバナジウムのイメージング
  - 第7項 接着突起における接着物質探索のための質量顕微鏡観察
  - 第8項 成果まとめ

## 第5章 海産頭索動物ナメクジウオと半索動物ギボシムシの研究支援

- 第1節 ナメクジウオの採集・生態調査支援
- 第2節 ギボシムシの採集・飼育支援
  - 第1項 ヒメギボシムシの採集
  - 第2項 ヒメギボシムシの採卵・採精
  - 第3項 媒精から孵化まで
  - 第4項 初期トルナリア幼生の培養
  - 第5項 トルナリア幼生の餌について
  - 第6項 中～後期トルナリア幼生の培養
  - 第7項 変態期
  - 第8項 着底後の成長と取り扱い
  - 第9項 調子が悪化した幼生及び幼若体の取り扱い、および再生について
  - 第10項 浮遊幼生の長期培養と奇形幼生の出現
  - 第11項 ヒメギボシムシ生息地の確認と新種と思われるギボシムシ
  - 第12項 成果まとめ

## 第6章 広島大学自然科学研究支援開発センター（N-BARD）への異動と機器分析支援業務に対応するためのリスクリング

- 第1節 質量分析計とその運用について

- 第1項 質量分析計 (MALDI TOF MS) 支援
  - 第2項 質量分析技術・知識の習得 (リスクリング)
  - 第3項 新しい質量分析サービス「プロテオミクス前処理」の開発・展開
  - 第4項 質量分析計 (LCMS: 高速液体クロマトグラム質量分析計) 追加
  - 第5項 LCMS 支援の状況 移管前
  - 第6項 LCMS 支援の状況 移管後
  - 第7項 LCMS 支援の詳細 メソッド構築
  - 第8項 LCMS 支援の詳細 溶媒管理
  - 第9項 LCMS 支援の詳細 前処理支援
  - 第10項 LCMS 支援の詳細 装置更新
  - 第11項 質量分析支援のまとめ
- 第2節 フローサイトメーター、その他の装置のためのリスクリング
  - 第3節 N-BARD 改組等に伴う組織再編に関する対応
  - 第4節 コアファシリティ推進室活動について

## 第7章 リスクリングと高度技術者の育成について

- 第1節 技官時代 (独立行政法人化まで) の技術支援の現場と待遇
- 第2節 現在の技術職員としての技術支援の現場と待遇
- 第3節 技術職員のリスクリング
- 第4節 異分野リスクリングの難しさ
- 第5節 リスクリングを実施する際の注意点
- 第6節 学内外におけるリスクリング
- 第7節 今後に求められる技術職員像とその育成
- 第8節 高度技術職員育成に必要な制度と運用
- 第9節 最後に

謝辞

参考文献

成果等一覧

## 第1章 緒論

大学における技術系職員の主たる役割は研究・教育への支援であることは周知の事実である。1877年（明治10年）に東京大学が設立され、その際には技術系の支援をする職員も存在していると思われるが、教員と異なり支援職は表に出ることがないこともあり、当時の技術系職員の仕事がどのようなものであったかも語られることは極めて少ない。筆者が所属していた臨海実験所という組織に限ると、東京大学の臨海実験所に1888年頃から生物採取に協力し、1898年に東京大学に正式に雇用された「三崎の熊さん」こと青木熊吉氏（1864～1940）は最も古い技術系職員の一人と思われる。その功績は数々の海洋生物学研究が青木氏の優れた操船・採集技術無しでは成しえなかったと研究者から高く評価され幾つかの動物の学名に献名されるほどで、現東京大学附属三崎臨海実験所の立地決定にも大きく貢献した人物である。その時代から現代に至るまで、青木氏は世界中の臨海実験所技術系職員のお手本となっている<sup>1)</sup>。

先人の偉業を引き継ぎつつも、明治から大正、昭和、平成、令和と年代を重ねるにつれ、海洋生物の研究環境も大きく様変わりするようになった。具体的には古典的な生態学、分類学から発展してDNAやタンパク質、各種代謝物を研究する広範な生命科学分野等へ広がり、それに伴って研究者も様々な分析技術や機器を用いて研究を行っている。特に1990年後半からは分析機器やコンピューターの発展によりその加速度を増した。研究支援だけでなく教育支援も様々なカリキュラムが整備されるにつれ充実・広域化し、それに沿って技術職員に求められる業務内容やスキルも変化してきた。にもかかわらず大学の法人化前後から人員整理が進められるようになり、結果として少人数、著しい場合は一人で複雑化した広範な業務を効率的に行うことを求められている。このような状況下で技術を伝承するのみならず、時代に対応したスキルをどのように身に付けて習熟するかも極めて重要な課題である。業務の高度化や専門化が進むほど育成は難しくなり、技術職員の流動性は教員や事務員に比べて乏しいため即戦力人材を得ることも難しい。

本論文では筆者がどのように広範囲のスキルを習得したかを叙述することで、今後の技術職員の育成やリスクリングについての一例になることを期待するものである。

## 第1節 技術職員としての履歴、スキル、業績一覧

筆者は西暦 1990 年 4 月に長崎県立諫早高等学校生物工学科に入学した。理由としては当時全国で 4 番目に新設された生物工学科があり、そこでバイオテクノロジーを学んでその分野で職を得たいと考えたためである。高校の間に無菌操作や植物・微生物の培養方法、フィールドでの植物栽培などを学び、特にキク科多年草マーガレットにおけるマイクロプロパゲーション（多芽体形成）の条件検討に貢献した。卒業研究でハーブ類のエッセンシャルオイル生産能を高める育種に挑戦するものの、未熟故の短慮や培養・分析の難しさに直面し、思うようにはいかなかった。ここで現実は甘くないということを実感したことが後々に通じる財産になっているように思う。

1993 年に愛媛大学農学部、1997 年に同大学院に進学して卒論・修論で微生物由来の新規コラゲナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ遺伝子を単離し、組み換え大腸菌を作出して大量生産させるという研究テーマを通じて主に DNA やタンパク質の操作方法と原理を学んだ。その後農林水産省野菜茶業試験場（枕崎）で契約職員勤として 1 年弱勤務し、チャにおける育種研究の現場を学びながら RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism；制限酵素断片長多型）解析に従事した<sup>2,3)</sup>。

2000 年 2 月に広島大学理学部附属臨海実験所に常勤技官（行一）として赴任となり、技術職員としてのキャリアをスタートさせた。臨海実験所では前任の技官（行二）が施設の維持管理、船舶維持管理および操船、生物の飼育と採集業務を行っており、まずはその任を 2 か月間で引き継ぐこととなった。その後実験所長から研究活動への参加を求められ、海産動物ホヤ等における希金属バナジウム濃縮機構の解明に携わることとなった。さらに教育支援活動として海洋生物実習への更なる関与、所属学生への実技指導なども求められることとなった。2004 年の大学法人化に伴い広島大学の技術職員の一元化が行われて技術センターが発足し、理学部の技官から技術センター技術員となったが、業務内容の変更は行われなかった。同年にこれまでの研究成果を博士論文としてまとめ、博士（理学）号を授与された。臨海実験所勤務中に、筆頭著者としての論文 4 報を含めた論文 18 報を執筆・関与し、多数の国内外の学会や研究会で発表し、奨励研究 7 件も獲得した。また各種メディアに海洋生物の画像や動画などを供

出したり、地域の小中高校の教育支援なども行った。その後臨海実験所長の異動に伴う諸事情を経て研究テーマの変更、さらには 2017 年に自然科学研究支援開発センター（Natural Science Center for Basic Research and Development、略称 N-BARD）へ異動して現在に至る。N-BARD では質量分析計 MALDI TOF MS の管理運用に始まり、同じく質量分析計である三連四重極 LCMS やフローサイトメーター、マイクロチップ電気泳動装置、超微弱発光・蛍光イメージングシステムの管理運用を行っている。また、N-BARD の改組に伴う業務やコアファシリティ推進室発足に伴う業務なども行っている。この間に幾つかの委員等を拝命している。技術センター職員としては 2010 年に技術主任、2013 年に技術専門職員（技術班長）、2024 年に技術専門員（技術部門長）を拝命した。上記の筆者の学歴・経歴等は 1~4 項にまとめた。

#### 第 1 項 学歴・経歴

1993 年 3 月	長崎県立諫早農業高等学校生物工学科 卒業
1997 年 3 月	愛媛大学農学部生物資源学科 卒業
1999 年 3 月	愛媛大学大学院農学研究科 修了
1999 年 3 月	農林水産省野菜・茶業試験場（枕崎）非常勤職員（～2000 年 2 月）
2000 年 2 月	広島大学理学部附属臨海実験所 文部技官
2000 年 4 月	広島大学大学院理学研究科附属臨海実験所 文部技官
2001 年 1 月	広島大学大学院理学研究科附属臨海実験所 文部科学技官
2004 年 4 月	国立大学法人広島大学大学院理学研究科附属臨海実験所 技術員
2010 年 10 月	同 技術主任
2013 年 4 月	同 技術専門職員（技術班長）
2017 年 4 月	国立大学法人広島大学自然科学研究支援開発センター（N-BARD）
2024 年 4 月	同 技術専門員（技術部門長）
現在に至る	

## 第2項 臨海実験所での業務内容 (2000～2016)

### 施設維持・管理業務

建物設備管理 (海水ポンプ・タンク管理・修理、宿泊施設管理・清掃、床・トイレ・水道修理)

敷地管理 (草刈り、伐木、溝の堆積物除去)

### 船舶管理・維持

船舶4隻 (あびII・定員23人、SPARUS II・定員12人、VENUS, SEPIA・定員各6人) の運行、船舶検査対応、簡易修理等

船底掃除・塗料塗り替え等)

### 生物採集・飼育

実習や実験に使う生物 (ウニ、ホヤ、ナメクジウオ、ギボシムシ他) の採集、養殖、飼育等

### 研究・教育支援・その他

海洋生物実習 (1～4泊) の学生教育支援 (学生の送迎、布団準備、食事の差配、使用する実験生物の採集・飼育、船舶運航等)

研究者 (外来含む) や所属学生への実験生物提供、手技指導

メディアへの映像などの提供、地域貢献 (小中学生実習)

## 第3項 N-BARD およびコアファシリティ推進室での業務内容 (2017～)

### N-BARD 支援

質量分析計2台 (MALDI TOF MS・AXIMA-QIT, 四重極 LCMS・Acquity TQD)、フローサイトメーター2台 (FACS Aria III, FACSymphony A1)、マイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA)、超高感度 in vivo imager (NightOWL) 支援、料金フォーマット統一・改定、技術職員ミーティング支援等

### コアファシリティ推進室支援

中国地方ファシリティネットワーク支援 (技術職員交流会主催、HP支援等)

コアファシリティマネジメントセンター設立準備支援

#### 第4項 資格

危険物取扱者乙第4類（1990）  
毒物劇物取扱責任者資格（1992）  
国家公務員採用Ⅱ種試験（農学）（1999）  
小型船舶操縦士4級（現2級）（2000）  
博士号取得（広島大学 理学）（2004）  
刈払機取扱作業教育・伐木等（チェーンソー）作業教育（2007）  
巻き上げ機（ウィンチ）特別教育（2012）

#### 第5項 業績等

原著論文：18報（筆頭著者4報、共著14報）  
学会発表：国際学会2件、国内学会等20件以上  
表彰・受賞：3件

日本育種学会論文賞、広島大学永年勤続者表彰、TCカレッジR5年島津製作所賞、  
科学研究費獲得：7件

奨励研究（B）：研究課題13918030 アスキジア科のホヤの養殖と近交系の作成  
（2001年度、240千円）

奨励研究：研究課題15918027 ホヤ受精卵凍結保存技術の開発  
（2003年度、230千円）

奨励研究：研究課題17916012 環形動物から抽出した特異な金属結合タンパク質の  
解析（2005年度、760千円）

奨励研究：研究課題20918016 海産新口動物幼生飼育装置の開発  
（2008年度、580千円）

奨励研究：研究課題23924016 半索動物ヒメギボシムシの完全飼育と国内生息域  
調査（2011年度、600千円）

奨励研究：研究課題26924014 海産動物ホヤの被囊における接着機構の解析  
（2014年度、500千円）

奨励研究：研究課題 15H00451 海産動物ホヤ類がもつ接着物質の探索  
(2015 年度、700 千円)

各種委員会等：

日本質量分析技術者研究会世話人 (2022 年度～現在)  
実験・実習技術研究会実行委員 (2022 年度)  
機器分析技術研究会実行委員 (2024 年度)  
広島大学全学共用機器体制検討 WG (2019～2020 年度)  
広島大学機器別専門家 WG (2021～2022 年度)  
広島大学コアファシリティ推進室委員 (2021 年度～)  
中国地方ファシリティネットワーク委員 (2021 年度～)  
広島大学機器共用検討委員 (2023 年度～)

学外活動

各大学およびナショナルバイオリソースプロジェクト (National Bio-Resource Project, NBRP) へのホヤ類を主とした実験生物供給 (2000～2016 年)  
各種メディアへの海洋生物写真・動画提供 (2010～2015 年)  
地域小中学校海洋生物学実習支援 (2011～2016 年)  
放送大学講師 (海洋生物実習、2014 年)  
日本分析化学会産官学交流カフェ招待講演  
質量分析装置に関する高度技術職員セミナー講師 (東海国立大学機構統括技術センター、2022 年)  
スーパーサイエンスハイスクール講師 (広島大学附属高校、2023 年)

## 第 2 節 広島大学技術職員組織の変遷

筆者は 2000 年 2 月に国立広島大学理学部附属臨海実験所に着任した。この時代はまだ技官と呼ばれていた時代であり、研究室や研究施設等に直接配属され、給与等の扱いは事務官に準じる扱いであった。しかしながら一人職場の技官も多く、部下が付

くようなポジションでもないため、技官の待遇（昇級等）は事務官と比べてかなり不利な立場であった。その点を是正する目的も含め、国立大学の法人化に伴って技官の一部が2004年に技術センターに統合された（図1）。当時としては画期的な組織化であったものの、発足当初は旧来の学部単位の枠組みで括った組織化であったこともあり、情報の入らない僻地勤務の若手としては現実感が無かった。組織化で昇級等の改善がどのように進んだかも、当時は年齢の関係で最も位の低い技術員だったこともあり実感がなかった。次第に技術職員研修会などの組織化によるイベントが行われるようになり、幾度かの組織改編（図2）に伴い理学部所属ではなかった技術職員との交流も増え、メインキャンパスから離れた遠隔地でも多少の情報が入るようになった。

センター化したことで変わったことは「異業種技術職員との交流による技術・提供サービスの向上」「研修費用の確保」「技術職員自身によるマネジメントの必要性」「待遇の公平化」「指揮命令系統の変化」「人員の流動性」などが挙げられる。交流による技術・サービスの提供は、例えば装置や設備の加工が必要になった場合、素人仕事で悩むよりも顔見知りでその分野に精通した技術職員に相談・実施してもらえる体制は心強く、得られる成果も洗練されたものとなる。技術向上に欠かせない研修費用は所属先によっては確保しにくく、場合によっては手弁当で講習や研修に参加しているケースもあった。技術センターでは研修費用が予算化されているため安心して技術向上に努めることができる。待遇も技術職員組織となることで管理職の必要性が認められ、一定の昇級が可能となったが、まだまだ事務員組織との開きは大きい。階級が整うことにより組織マネジメントをする必要も生じ、それらにあまり縁のなかった技術職員が四苦八苦することになる副作用も生じている。最後に、指揮命令系統については、技官時代の指揮命令系統は所属部署の教授が全てという部署が多く、問題がある命令が下されても誰にも相談できず、従うか辞めるかしかなかった。そこに技術センターが「業務依頼申請システム」として業務内容を精査し、適時各職員からヒアリングすることで無理のある、あるいは違法性のある業務命令を組織として検証し、ある程度は是正を申し込むことができるようになった。また、必要な場合には配置転換を技術職員組織として主体的に行うことができ、人材の流動化が可能となった点は従来とは

大きく異なる。ただし異動やリスクリングは本人と周囲に膨大な労力が必要となることから最後の手段と言える。この派遣システムも問題がないわけではなく、技術職員を簡単に「交換・返還」する手段として使われる恐れもある。

上記の様に広島大学において技術職員の組織化に伴い様々な変化が生じてきた。組織化から約 20 年が経つとやや硬直化した感もあり、近年の技術職員組織の変化の波にも対応が遅れる、あるいは冷めた対応となる面は否めない。とはいえ技術職員組織化 20 年の経験の蓄積は全国的に珍しいものであり、近年立ち上がった技術職員組織の参考には十分になりえると思う。

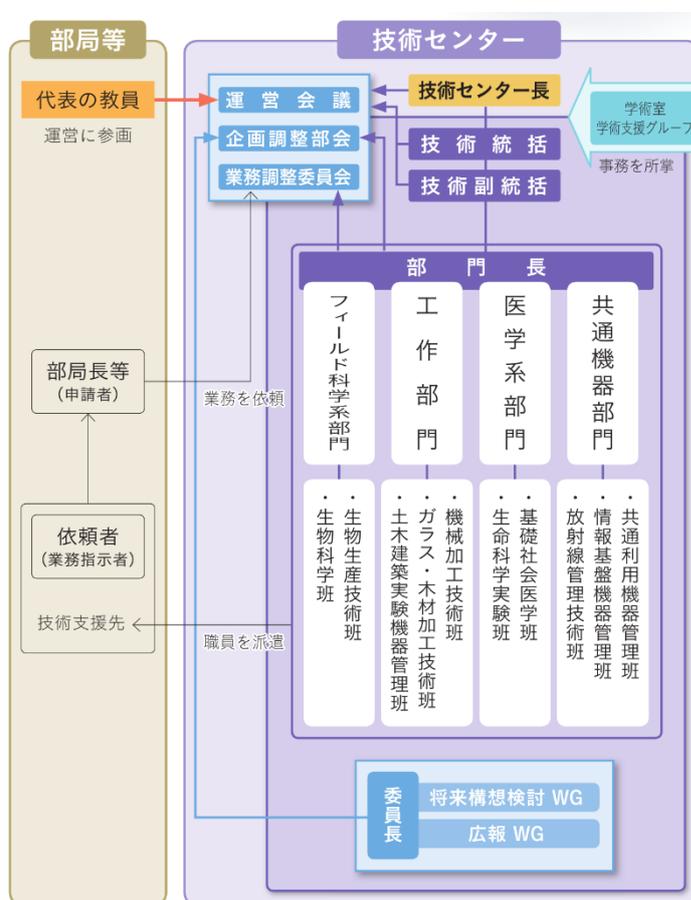


図 1 2024 年当時の広島大学技術センター組織図

技術センター長（教授）の下に技術統括、副統括が管理職として位置し、さらに 4 部門 10 班が配置されており、それぞれに部門長、班長が任じられる。業務は「業務依頼申請システム」によって教員から技術センターに申請が行われ、それに応じて技術職員が派遣される形式となっている。



図2 広島大学技術センター組織の変遷概要と筆者の所属の推移

### 第3節 遠隔地施設における海洋フィールド系支援とバイオ系研究支援概要

日本は島国であり広い領海と長い海岸線を持つ。海を知りたいという欲求は自然に生じるものとなり、そのための学問や拠点が1877年（明治20年）の帝国大学臨海実験所を皮切りとして各地の大学の附属施設として設立された。筆者が技術職員としての最初に任官した広島大学理学部附属臨海実験所（当時の名称、以下向島臨海実験所）は、旧制広島文理科大学附属臨海実験所として1933（昭和8）年6月に広島県御調郡向島西村（現・尾道市向島町の南東側）に開設された歴史ある施設である。なお全国の臨海実験所は基礎生物学的な研究を行う理学部系と、海洋資源の利用を目的とした水産系の実験所に大きく大別され、向島臨海は理学部系の臨海実験所である。配属される技術職員は敷地22,931 m<sup>2</sup>、教育研究棟2棟と宿泊棟1棟（延べ床面積1,556 m<sup>2</sup>）の広大な敷地・建物の維持管理に加え、屋外飼育層や海水ポンプ塔などの特殊施設の維持管理、生物飼育や4隻の船舶の維持管理・運航、さらに海洋生物における研究教育支援など多様な業務を1人で並行して遂行しなければならない。これらの詳細については第2章に記す。

#### 第4節 共通機器部門における機器分析支援概要

2017年より広島大学自然科学研究支援開発センター(N-BARD)に勤務し、主に質量分析計およびプロテオミクス前処理サービスを担当することとなり、現在に至っている。装置としてはマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI; Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)飛行時間型(TOF; Time of Flight)質量分析計(MS)であるAXIMA-QIT(Shimadzu)を2021年まで、トリプル四重極型高速液体クロマトグラム質量分析計(LCMS)であるAcquity TQD(Waters)を2019年より担当している。さらにマイクロチップ電気泳動装置MultiNA(SHIMADZU)を2018年から、超高感度発光・蛍光in vivoイメージングシステムNightOWL II LB983(Belthold)を2019年から、セルソーターFACS Aria III(Becton Dickinson)を2020年から、フローサイトメーターFACS Symphony A1(Becton Dickinson)を2023年から担当している。これらを用いた業務の詳細については第4章第2~3節に詳述する。またN-BARDへの異動に伴い、N-BARDおよび関連組織における業務も行うことになった。この点に関しては第4章第4~5節に詳述する。

#### 第5節 TC論文の構成

本論文では、第1章において25年間の教育・研究支援業務実績をまとめ、第2章では附属臨海実験所における16年間のフィールド系技術職員としての教育支援活動の詳細を、第3章では研究支援活動、自己研鑽についてまとめる。第4章ではN-BARDにおける分析支援業務と組織運営業務について紹介する。第5章ではこれらの支援経験を元に今後の技術職員による支援活動やスキルアップへの私見を述べる。

さらに附属臨海実験所近辺において教育・研究支援ついでに撮影した海洋生物の写真と簡単な説明をsupplement 1として別途掲載する。これらの写真は異動がなければ臨海実験所技術職員としての定年退職時に図鑑として編集するつもりであったが、これを機にまとめておかないと日の目を見ないと思われる。道半ばで中途半端になってしまっているが、この場を借りて世に出すことで読んで頂いた皆様にも極一部ではあるが瀬戸内海の豊かな自然を感じて頂ければ幸いである。

## 第6節 TC申請に至る経緯

筆者が TC を申請するに至った理由としては、コアファシリティ推進室において他大学の共用機器の動向を探る必要が生じ、その際に TC カレッジについて知る機会があったことに端を発する。そのカリキュラム、とりわけバラシキャランに質量分析計の分解があることを知り、好奇心として受講してみたいと思ったのが第一印象であった。大方の分析装置は基本的にメーカー技術者にしか開けることができない仕様であり、感電や故障などのリスクを考えると例え廃棄物品であっても余程の機械マニアでなければ分解しようとは思わない。分解したとしてもほとんどのパーツはよくわからない何かであり、また組み立てるのもシーリングの問題などで不可能に近い。それをまさにメーカーの指導の下で行えるというのは他では得ることのできない経験だと考えた。従って動機の 1/4 は単純な知的好奇心と言える。

さらに全国的な技術職員ネットワークとしての TC カレッジというバスに「広島大学として乗り遅れるのは望ましくない」という事情もあった。そのような状況下で、広島大学の技術職員で KPI、特に科研費獲得の実績を満たし、さらに外に出て担当業務以外の事まで手を出そうという技術職員は残念ながら他にいなかった。待遇が上がるのであれば考えるという返答は幾つかあるものの、そもそも博士号や技術士という世間に広く認知されている称号ですら所持者に大したインセンティブも無いのが技術職員の実情である。博士号ですらそのような扱いであるため TM や TC を取得しても待遇が良くなるという保証は全くない。とはいえ取得者の前例を作らないと議論そのものが始まらず、自分たちの待遇を今より向上させたいなら相応の「新しい」理由を提示できなければ聞き入れてもらえない。状況に迫られてやむなくという動機が 1/4 あるのが正直なところである。

仮に待遇の向上が TM、TC 取得によって行われるとしても、それは私自身が在籍している間に実現することは極めて難しいと考えている。仮に実現してもそこから得られる利は残った任期を考えてさほど大きなものではない。しかし若手・中堅の技術職員にとっては 1 つの目指すポイントが可視化され、メリットも長期間にわたって享受できる。TC 取得の動機が利得に基づくものであったとしても、その過程で得られる

ものは確実に存在し、最終的に学術支援に貢献することに違いはない。先の短い自分よりも将来の世代を担う技術職員のためという動機が1/4と考えている。

残り1/4は自分自身が在りたい姿で在り、自分なりに総括して終えるためである。在りたい姿については第5章で詳述するが、自分はここまでの事を成した、それが単なる自己評価・満足だけでなく他者の目から見ても技術職員として相応しいと認めて頂ければそれに越したことはない。自身の仕事の集大成をまとめるとともに、自分を表す表現型の1つとしてTCを得ておきたいと思ったことが最後の動機である。

## 第2章 広島大学理学研究科附属臨海実験所における遠隔地フィールド系技術職員としての支援業務

広島大学向島臨海実験所は 1933 年から続く歴史ある施設である (図 3)。旧制広島文理科大学の附属施設であったころから、瀬戸内海の多様な生物相を研究することを目的としている。設立当初は助教授と助手各 1 名、雇員 2 名 (技術系職員含む) であったが、技術職員としては最大 3 名を擁した時期もあった。しかしながら筆者が着任当時の技術職員の定員は 1 名のみであり、広大な敷地・設備の維持管理と生物飼育や船舶運航、さらには時代に即した科学的見識・技術を必要とする研究教育支援など多様な業務を並行しながら単独で行わなければならなかった。

研究内容も古典的な生物分類学、生態学から始まり、その初期の成果は向島臨海実験所が発行していた瀬戸内海の生物相 (1963)<sup>4)</sup>及び「日本動物解剖図説」(1971)<sup>5)</sup>等の著書に詳しい。1992 年には道端齊教授が所長となり、分子生物学を取り入れた海洋生物学が精力的に展開された。道端教授は海産動物ホヤにおける希金属バナジウムの濃縮機構を研究されており、筆者も 2000 年 2 月に着任後は技術職員としての旧来の業務である施設維持管理・船舶操船・海洋生物学実習等を支援しながら、研究対象のホヤ採集・養殖・飼育のみならず、分子生物学的技術を用いて同研究に参加することとなった。本章ではこれらの詳細を記すものである。

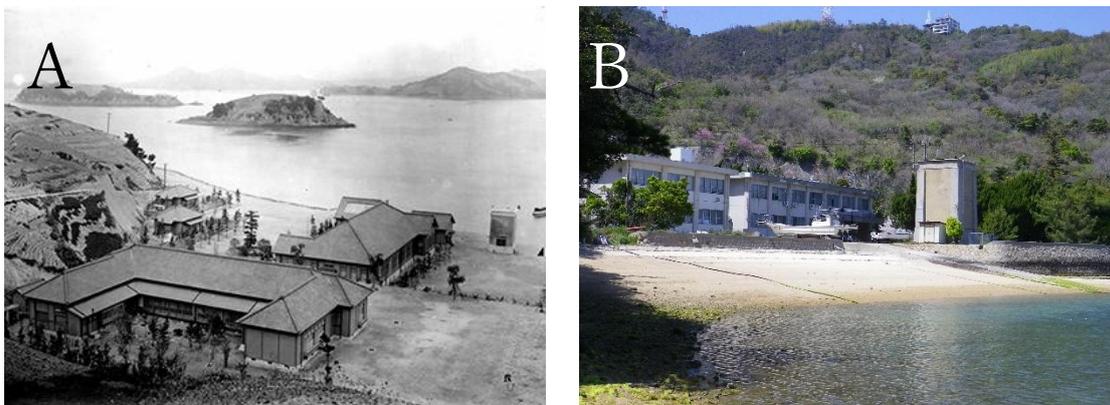


図3 (A) 1950年代 (広島文理科大学) (B) 2015年の広島大学附属向島臨海実験所

## 第1節 施設維持・管理

22,931 m<sup>2</sup>の敷地は全て舗装されているわけではなく芝生や露地もあり、毎年4回程度の除草作業が不可欠となっている。外注ではなく2か月に1度、約1週間かけて技術職員が刈払機で草を刈って敷地内で焼却処分を行うとともに、松枯れなどが生じた際はチェーンソーで伐木・細断して焼却処分を行っていた(図4)。真夏には熱中症手前になることは珍しくない。敷地を囲む用水路は山からの落ち葉や土砂が堆積し、最低年1回はこれらを人力で除去する必要があった。またスズメバチ等の害虫の駆除の等も技術職員の仕事として行われていた(図5)。建物の水道・トイレ、床パネルなどの修繕も簡易なものは技術職員が行っている。施設内外の電気・ガス・水道の配管についても熟知する必要があり、工事などで業者と施工方法などを相談することも多い。



図4 敷地内松枯れの様子



図5 敷地内で除去したスズメバチの巣

さらに海洋生物を扱うため、海水専用の給排水設備を備えていることが臨海実験所の特徴である。海側に海水の取水口と地下タンクを備えた設備があり、揚水用海水ポンプが設置され、そこから建屋屋上等に設置している海水貯水タンクに揚水し、落差で建物内の海水専用蛇口から給水するシステムが一般的である。他の臨海実験所や水族館などでは、100~200mm 径程度の海水取水管を沖合に設置し、海底から少し立ち上げた取水口からポンプで採水している。大量の海水を安定的に供給できるが、取水管は常時海水で満たされているため、年1度は潜水して配管を取り外して内部の付着生物をこそぎ落とす作業が必須で、稀にタコやナマコなどの生物により詰まることも

ある。それに対して向島臨海実験所では他にあまり例のない仕組みを備えている（図6）。概要としては、陸地の海水ポンプ塔に地下タンクを設置し、潮汐によって満潮時にのみタンク内に自動取水する形式である。この方式は干潮時にタンク内の海水を使い切ると給水が途切れてしまう欠点があるが、海に対して斜めに設置された大口径の300mm 取水管が干潮時に大気に暴露されることで付着生物の成長や繁茂が阻害され、はく離した牡蠣殻なども自然に放出される。このことにより海水取水管のメンテナンスが不要となる。また、海水タンク直上にポンプを設置できるため、小型の海水揚水ポンプのみで採水が可能であり、設置・ランニングコストも安価となる。

海水ポンプ塔地下タンクに取り込まれた海水は、電極棒で海水面水位の検知がおこなわれ、一定の水位の範囲内で海水ポンプを自動運転して宿泊棟屋上貯海水高架タンクまで高さ 15m以上揚水している。しかしながら時折は腐食による電極棒の異常や揚水管への海洋生物の侵入による詰まりによる故障が生じたり、それに伴った海水の供給が滞ることで飼育している生物が死亡する等のトラブルが発生する。そのため技術職員は海水ポンプの異常音の聞き分けや、グランドパッキン部の潤滑水量などを指標に適時監視とメンテナンスを行わねばならず、土日や長期休暇中でも一度は海水ポンプを確認することが習慣化する。

高架海水槽からの給水は各実験室の海水用蛇口や屋外大水槽に配水される。大水槽の下流に小型・中型の水槽を設置しており、臨機応変に増減させる。調子が悪い生物は病気の蔓延を防ぐために下流側に配置するなどの処置も可能となる。ただし、送水量は海水取水等地下タンクの容量とその時の海水面高さ（潮位）、研究棟での海水使用量に影響されるため、日に1～2時間程度断水せざるを得ないこともあり、向島臨海実験所では自然状況のみならず実験所自体のアクティビティを把握して供給海水量を調整するセンスが求められる。

A



B

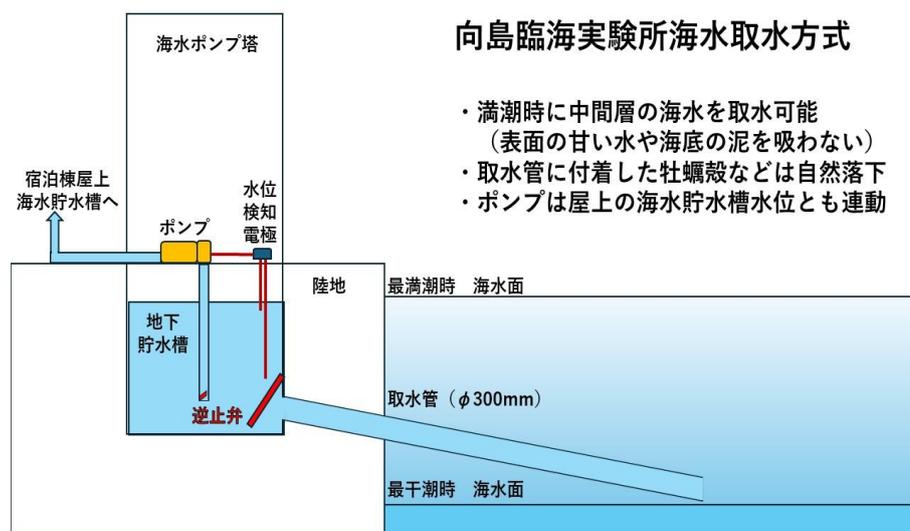


図6 (A) 向島臨海実験所海水取水塔写真 (B) 同構造図と干満水位の関係

## 第2節 船舶管理・運航

海洋生物を研究する際に船舶は必須の設備となり、自然と操船技術も求められる。船上から生物を網やプランクトンネット、採泥器等で採集する場合もあれば、ダイバーをポイントまで運ぶためや、港湾が整備されていない小島や干潮時にのみ出現する洲と呼ばれる場所に研究者や実習生を運ぶ目的で利用される。向島臨海実験所では当時4隻（あびII 定員23名、SPARUSII 定員13名、VENUS 定員6名、SEPIA 定員6名）を保有し、その全てを技術職員1名で管理していた（図7）。船舶は5年に1度の定期検査及びその中間に中間検査が義務付けられており、これをパスさせることも業務となっている。そのために法定備品を適切なコンディションで揃え、船外機や船内外機のエンジンの簡易的な整備や補修なども行う必要がある。

向島臨海では他大学の臨海実験所に比べて船舶の利用頻度は高くないため、小型の

一隻を除いて基本的に陸上保管である。そのため実習や研究等で使用する場合には、航海計画を作成して所長の許可を得てから人数を確保しての船舶の上げ下ろしの作業が必要であった。操船には当時 4 級（現 2 級）の船舶免許が必要とされ、海図を理解して操船する技量、係船するためのロープワークなどについても習熟する必要がある。特に無人島など港湾が整備されていない場所に接舷する場合は接舷場所の状況などを潜水で事前に確認しておくことが望ましい。海図には乗っていない岩場を避けたり、干満によって生じる流れの違いが事故につながるためである。さらに櫓と呼ばれる船の手漕ぎ道具の習熟が向島臨海では求められ、近距離の操船や低速での作業が必要な場合に使われる技能である。筆者は海事に関しては 2 月の海で前任者から 2 週間程度のレクチャーを受けただけで、後は自力で習熟せざるを得なかった。この際に最も助けになったのは国立大学臨海臨湖実験所技官会議（当初の名称）である。同じような業務を行っている各大学の臨海実験所に集まり、その技官から現場で行っている業務を直接見聞きすることができる。この会議で多くの先輩や同輩との交流と助言を得られたことは、単独で職務を行わざるを得ない一人職場ではこの上ない助けとなった。

船舶を取り扱う上で最も大事なことは安全の確保である。特に一般の船舶と異なり、整備されていない天然の地形に合わせて接舷・係留する必要があり、ダイバーなどが周りにいることが前提で操船するなど危険が伴う操船が要求される。実習生を運ぶ場合は不慣れではしゃいでる学生の挙動をコントロールしながら細心の注意の下で操船しなければならない。万が一、天候や現地の状況によって安全を確保できないと思われる場合は船長の権限によって中止することも必要である。稀に実験所長に海象の事を知らない、理解しない人物が就任することがあるため、仮に意見が対立しても安全を確保するために意見を主張し、時に理不尽な命令は拒否するくらいの意志の強さも必要とされる。これを怠った場合、北海道の遊覧船で生じたような悲惨な死亡事故を引き起こす可能性があるため責任重大である。

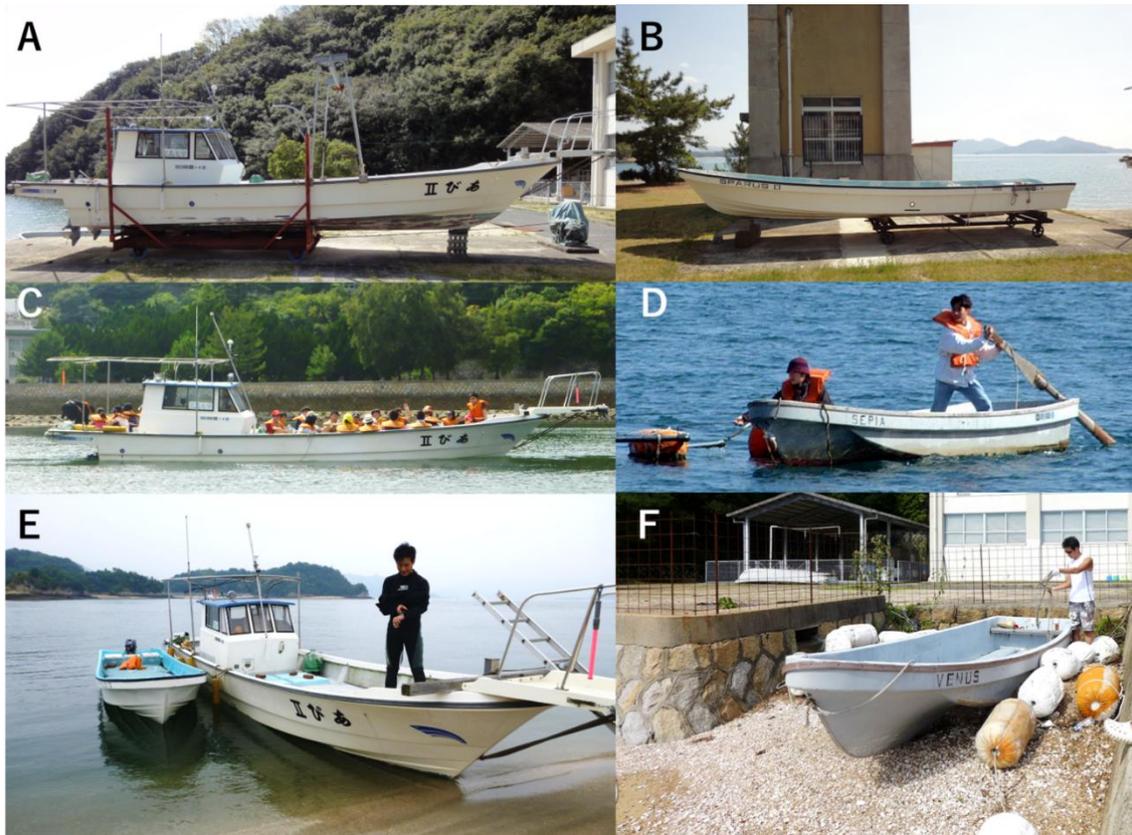


図 7 向島臨海実験所保有船舶 (A) 実習船あび II(定員 23 名) (B) 実習船 SPARUS II(定員 13 名) (C) あび II 利用時の様子 (D) 実習船 SEPIA (定員 6 名) と櫓漕ぎの様子 (E) あび II と SPARUS II 無人島への係船 (F) 実習船 VENUS (定員 6 名)

### 第 3 節 生物採集・飼育

臨海実験所は海洋生物を多く取り扱うため、実験生物は海から採取することが常である。マウスのようなモデル生物と違って生体を購入するということは難しく、飼育も海水で行わねばならないため独自の飼育システムと技術も要求される。自然からの採集だけで供給が困難な場合には養殖を行うこともあるが、生物によっては飼育方法が確立されておらず、経験や手探りで業務を行わざるを得ない。海洋生物の飼育において密閉され定常的かつ無菌的な環境を準備することは困難なため、飼育環境は海水を始め自然の状況に非常に左右されやすいことも難易度を上げる要因である。

2015 年までの向島臨海実験所では後述するスジキレボヤ (*Ascidia sydneiensis samea*)、ナツメボヤ (*A. ahodori*)、バナジウムボヤ (*A. gemmata*)、カタユウレイボ

ヤ (*Ciona intestinalis Ciona robusta or Ciona intestinalis type A*) を必要としていた。スジキレボヤは岩手県大槌町で養殖しているものを年 2 回採集して向島に移送して飼育していた。さらに広島県福山市や岡山県倉敷市児島の漁港に許可を得て手作りの仕掛けを設置し、天然から付着するスジキレボヤ、ナツメボヤを引き上げることも年数回行っていた。バナジウムボヤは見つけることが難しく、さらに付着様式が他のホヤと異なるため採集は極めて困難で、採取後に生存する可能性が限りなく低い。向島実験所内の海水取水等タンク内壁に少数へばりついて生息していることを発見し、必要に応じて採取し、即座に研究に使用する程度の供給のみ可能であった。ホヤは漁港の岸壁などにも生息しているが、採取には潜水が必要で漁船の出入りもあり実際には難しい。スジキレボヤ、ナツメボヤは人工授精・養殖自体は可能であるものの、台風や他の付着生物のとの競合などの影響で安定的に大量に養殖することが難しく、天然からの供給が安定していたこと、近交系の作出の緊急性が低かったことから、小規模な養殖と供給に留まった。養殖期間は約 1~2 年程度であり、後述するカタユウレイボヤとほぼ同じやり方で養殖可能である。

カタユウレイボヤは夏季の海洋生物学実習用に、さらに NBRP において重要な生物とされていたことから他大学からの採集依頼もあり、年間を通じて一定数の養殖を行っていた。かつてはホタテ用の稚貝籠を海中 2~5m 辺りに吊るして天然のカタユウレイボヤを付着させるやり方で養殖していたが、年々付着率が悪くなり、2003 年ごろからは人工授精させたホヤ幼生をプラスチックシャーレ内で飼育して付着させ、それらを 100 円ショップのプラスチック製網籠にステンレス線で連結させて固定し、さらに洗濯ネットをかぶせて海中に 2~5m 辺りに沈めることで安定的な養殖を可能にした (図 8)。当時は夏季にカタユウレイボヤを安定供給できたのは日本全国でも向島臨海実験所だけであり、各大学のユーザーからは非常に喜ばれた。養殖期間は 3~8 カ月程度で、夏季は短期間で成熟・老化するため実験に耐えうるベストな期間は 2 週間程度しかなく、その時期のカタユウレイボヤを見分けて選別し、輸送前に消化管の内容物や生殖腺内容物 (精子・卵) を一度吐かせ、その時の気温などに合わせて輸送の低温に耐えるような順化処置やパッキングを行うには小まめな世話と経験が必要とされた。

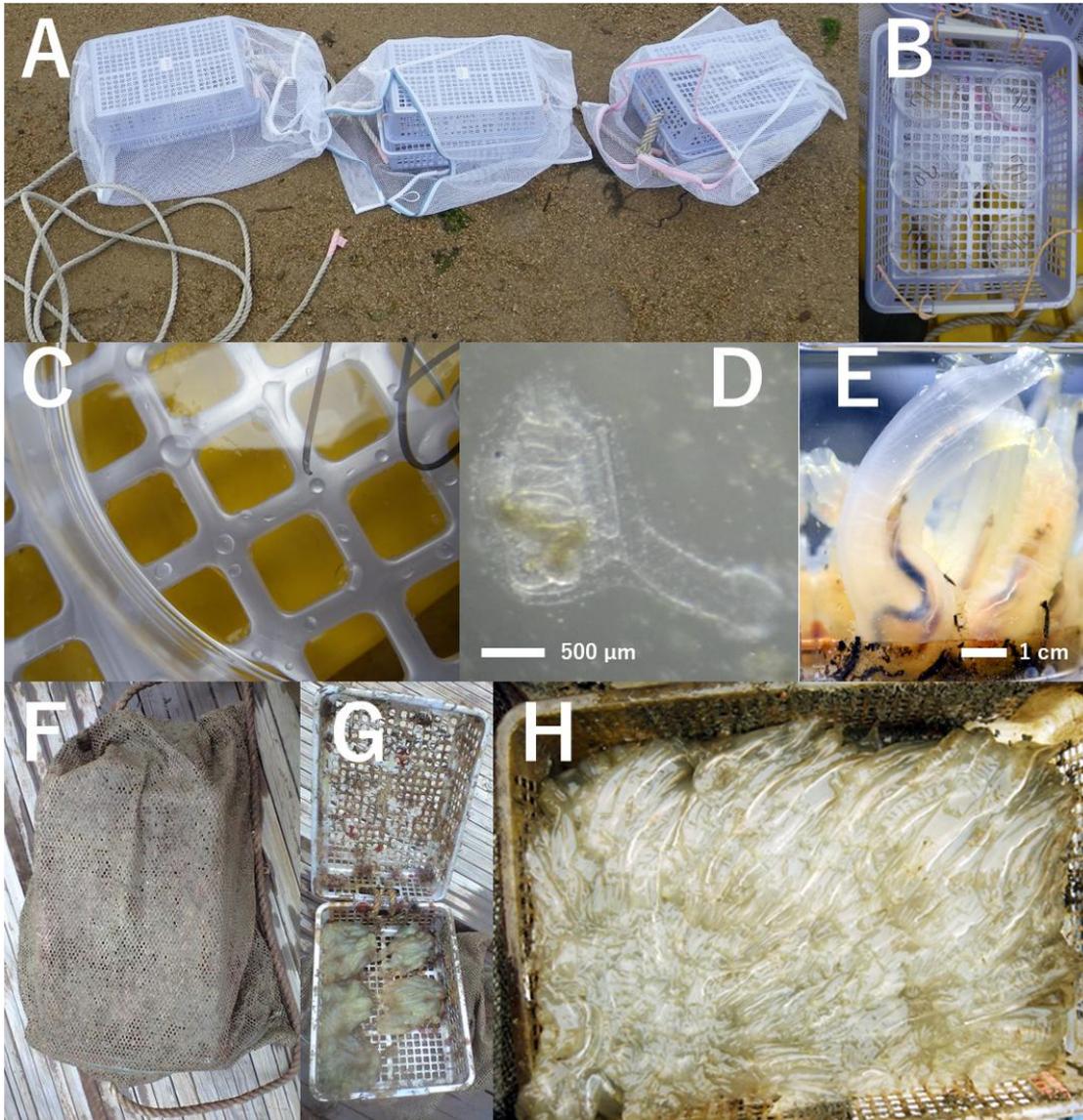


図 8 カタユレイボヤの養殖 (A) 養殖仕掛け全容 (B) 仕掛け内部 (C) 仕掛け内の稚ボヤ付着シャーレ (D) 稚ボヤ (2mm 程度) (E) カタユレイボヤ成体 (F) 養殖後の仕掛け (G) 養殖後の内部 (H) 養殖後の仕掛け (最も調子のよい状態)

ホヤ以外では内外の研究者からの求めに応じて主にシュノーケリングで可能な範囲で採集・提供する。夏の海洋生物学実習では受精卵の透明度が高いサンショウウニが主に求められた。サンショウウニはタンク潜水が必要となるが 2003 年ごろから生息数が激減したため、やや不透明ではあるがムラサキウニを代用とするようになった。周辺海域では卵の径が大きなヨツアナカシパンも採集できることがあるため、これら

も実習に供するため採集・飼育することがあった。それ以外では春には海藻類やウミウシ類（クロミドリガイ、ヒラミルミドリガイ、ヒラミルミドリガイ等）の採集、夏にはウミホタルの採集など、研究者のニーズに応じた採集と短期的な飼育を請け負うことがあった（図 9）。それぞれの生物がどの時期にどの場所に生息しているか、どのように採集・飼育するかは異なっているため、技術職員としてその海域と生物の特性を熟知している必要がある。一人の知見には限りがあるため、他大学の臨海実験所研究者や技術職員などの知恵も借りながら業務を遂行しなければならない。

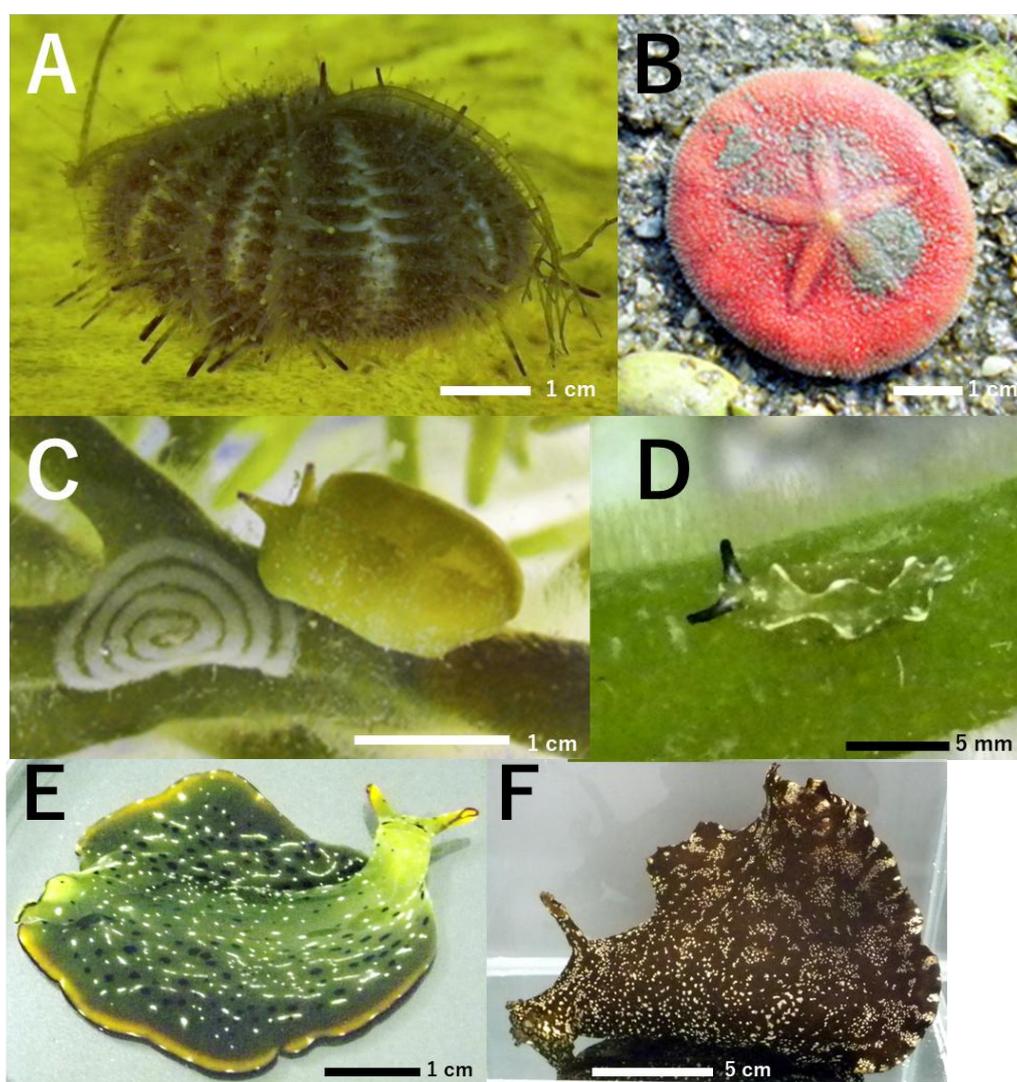


図 9 採集依頼を受けた動物の一例

- (A) サンショウウニ (B) ヨツアナカシパン (C) ヒラミルミドリガイ (D) クロミドリガイ (E) コノハミドリガイ (F) アメフラシ

#### 第4節 実習・教育支援

向島臨海実験所では夏季を中心に多数の海洋生物学実習（理学部海洋生物学実習 A, B, 学校教育学部海洋生物学実習、総合科学部海洋生物学実習、放送大学瀬戸内海向島海洋生物学実習、全国の国公立大学生を対象とした公開臨海実習等）が開催される。それ以外にも近隣の大学の海洋生物学実習や小中高校の実習も要望に応じて実施している。各実習の参加人数は 10~40 名であり、筆者がいた時代は年間最大で 700 人日近い実習生を受け入れているが、その全てに技術職員が全面的な支援を行う。実習の内容は様々であるが、生物採集と同定を軸として、海洋生物を用いた発生生物学、分子生物学も行う。そのため操船技能だけでなく生物学的な知識も必須である。

本学を含め各大学の臨海実験所はメインキャンパスから離れた海岸に立地しており、学生が通うことは困難であることが多い。そのため実習生は 2~5 泊程度の泊まり込みで受講するが、その際の宿舎、飲料・食事の手配なども技術職員の仕事として割り当てられることが多く、教員・事務員とも協働しながら実習計画・準備の段階から宿舎や風呂の清掃、布団やシーツなどの準備、賄い調理師の確保や監督などにも追われる（図 10A~C）。近くの自販機は徒歩だと片道十数分、スーパーやコンビニは往復 10km 越えという立地から、実習生が食料品を自由に調達することは難しく、実験所が供する食事に依存するために生活支援は決して侮れない仕事である。

海洋生物学実習中は船舶を運航して近隣の無人島に学生と教員を渡し、現地での生物採集も補助する。この時に安全確保には特に気を遣う。潮の満ち引きに合わせた運航計画を練り、周辺海域の海図や海流を頭に叩き込み、天候や潮位に合わせて船舶を陸地から 8 名程度の人力で海に降ろしておき、当日は安全に船舶を操船しなければならない。台風などの時期にも重なるため、船長として実施するか中止するかの判断も求められる。海が荒れると実習後の船舶陸揚げは不可能で船舶破損の可能性もあり、実際に破損させてしまったこともある。かと言って慎重さに偏ると、採集日に大した波も無いのに出航できないことになって学生や教員の不満が噴出するため、台風の予想図や風向きに神経を尖らせない夏は無かった。出航して現地に到着後は船舶を適切に錨で固定しなければならないが、最干潮の時間帯前後に合わせて投錨するため、実

習の途中で潮の流れが逆転して錨が外れ、船が漂流することもある。船をつける場所の水深や海底の形状にも留意しないと係留中に船が座礁したり、エンジン冷却水取水口から砂や泥、ビニールなどのゴミ等が入ってエンジン故障の原因ともなる。船の状況を監視しつつ、実習生の安全（雷雲の接近や不適切な海域での遊泳や溺れ）にも配慮し、かつ実習生では採取できないであろう生物の採集も技術職員が行わなければならない（図 10D～G）。教員とある程度役割分担はするものの、船舶には真っ先に責任を持たねばならず、心身共に緊張の絶えない時期でもある。

実習の種類、天候によっては船舶を利用せずに近場の海岸における潮間帯で実習生に採集活動をさせることもある。この場合も実習生に付き添いながら、彼らが手の届かない部分でシュノーケリングや投網で採集を行い、安全に生物多様性を感じられるような学習を補助しなければならない。潮間帯は藻類などで滑りやすく、ケガを起しやすい場所であるため、事前説明で滑りやすい場所や、流れがはやく引きずり込まれる海域などを入念に説明するなど安全を確保するための策は十分に施しておかねばならない。その際に「ケガをするかもしれません」というありきたりな言葉は彼らの耳に入らず記憶にも残らないため、「この傾斜部分には藻が生えていて滑りやすく、その下は鋭い牡蠣殻があるため“生肉もみじおろし”になりますよ」というように、ルールを守らなくてはと思わせる伝え方を工夫することもあった。

向島臨海の海洋生物学実習ではプランクトン採集のついでに櫓漕ぎ体験も行った（図 10H～K）。櫓（図 11）は和船と呼ばれる小型の船舶の動力として用いられるもので、櫓（オール）と比べて操船にやや熟練を要するためか一般に知名度は高くない。全長 3m 強の 2 本の材（腕と櫓裾もしくは櫓べら）を少し曲げる形で接合させており、接合部近傍に入れ子と呼ばれる木製部品があり、その中央付近には直径 20～30mm 程度の穴があり、そこに船体側に設置される櫓杭（櫓臍）を挿し込むようになっている。腕の部分には握るための手杭（櫓杵＝ろづく）と呼ばれる突起があり、そこに櫓綱（早緒）と呼ばれるロープを付け、片方は手杭に、片方は船体後方左舷側底面に固定する。この状態で櫓べらを海面に入れ、櫓綱がピンと張った状態にする。この時櫓綱は漕ぎ手の肩より少し下の位置になるよう調整する。この状態から櫓を傾けて櫓べら

が海水面に対して垂直の最も水を掻きやすい角度にして、櫓杭を支点として左右に押したり引いたりすることで推進力とする。構造上バックはできないため、左右どちらかにだけ進むようにしてその場で回転して方向転換をすることになる。操船が難しい上にバックができないことは不便なように思えるが、オールと違って常に進行方向を向いた状態で操船でき、オールよりも少ない力で進むことが櫓漕ぎのメリットである。

海洋生物を用いた分子生物学的がメインとなる実習では教員と TA が主体であり、技術職員は生物の供給が主な仕事になる。一部手が足りない部分は分子生物学的なサポートも行うが、あまり出すぎないようにすることが肝要である。



図 10 海洋生物学実習の様子

- (A) 宿泊棟外観（30 名程度宿泊可能）(B) 宿泊室 (C) 実習最後の食事は野外 BBQ (D) 細の州（干潮時にのみ現れる干潟）への瀬渡しの様子（やや低潮位時）(E) 細の州の最干潮時の様子。場所は D と同じ場所。潮位によって地形が変わり座礁するため、係船位置の調整が重要 (F) 干潮時にのみ出現する細の州での採集の様子 (G) 四十島（岩場の無人島）への着岸の様子。周辺は岩が多いため、着岸ルートを逸れると船舶が破損する (H、I) プランクトン採集の様子 (J、K) 櫓漕ぎ体験の様子

※採集される生物の一部については巻末にも Supplement 1 として写真を示す。

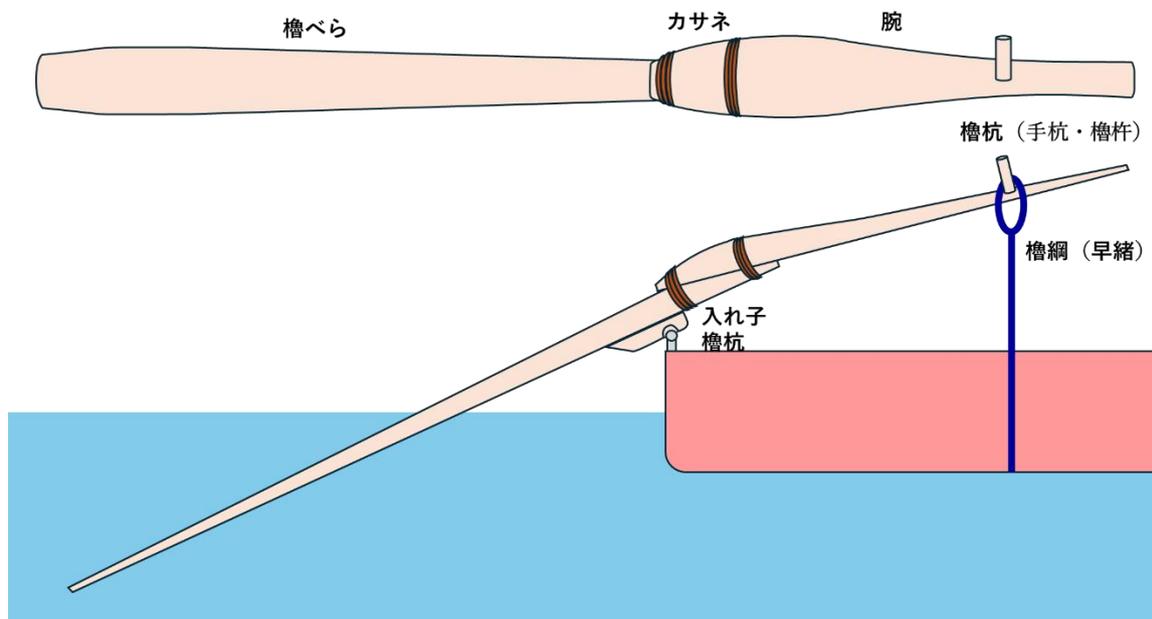


図 11 櫓の構造。全長約 3~4 m で、櫓べらと呼ばれる先端部約 1 m を水面下に入れ、櫓杭をてこの中心として進行方向に対して左右に押したり引いたりすることで進む。

なお、一連の臨海実験所における技術職員としての勤務において、他大学の臨海実験所職員からのアドバイスが大いに有効だったことは先に述べたとおりであるが、本学の生物生産学部（いわゆる農学・水産部）の竹原マリステーションの岩崎貞治技術専門職員との交流も非常に心強いものであった。技術センターによる技術職員の一元化前は全く接点を持つことができなかったが、同センター内で同じ班として再編さ

れてからは話す機会が増え、似たような悩みをお互いに伝えつつ、学内の行事で協力してアウトリーチ活動に取り組むこともできた。やはり技術職員が孤立するよりは、何らかのつながりで連帯できる環境がある方が望ましい。結果として研究支援能力向上のみならず、組織としての一体感や、それから生まれる新しい活動もできるようになった良い事例の一つであると思う。

## 第5節 成果まとめ

16年におよぶ広島大学理学研究科附属臨海実験所（当時の名称）における技術職員としての支援において、カタユレイボヤ、スジキレボヤ、各種棘皮動物、軟体動物、節足動物などの採集・飼育・提供などを多数行った。カタユレイボヤの養殖だけを見ても、推定で年間1,000匹（1シャーレ10匹×6枚×3籠×10本以上）、スジキレボヤ他の採集活動などを含めると10万匹程度の海洋生物を供出してきたことになる。学生実習も本学の定期的な実習だけで推定で年間約500人日（70名×3人日、20名×4人日、40名×5人日）、他大学等の実習なども含めると10,000人日以上は実習生をお世話してきたことになる。前述したとおり身体の危険を伴う活動であることに加え、単に来て実習して帰るだけでなく宿泊や食事も伴う。その負担は大学の一般的な実習と比べてかなり大きい。

これだけの支援活動を大過なく勤め上げることができたのは道端教授、植木准教授、田川准教授を始めとした実験所教職員ならびに当時の学生・地域住民の皆様、そして他大学の臨海実験所技術職員からのご指導・ご協力のおかげであり、例え臆病者と言われても安全を優先するよう手ほどきを頂いた安保前技官からの教えがあつてこそと考えている。

### 第3章 臨海実験所における海洋生物研究支援（バナジウム濃縮研究）

第2章のうち8割程度が前任技術職員の業務範囲で、主に初夏から秋にかけて繁忙期となる。私の代からはさらに一步進めた実習支援内容と、繁忙期以外には実験所における研究支援も求められることになった。実習支援内容の深化としては、海洋生物学実習における採集活動の付き添いだけでなく、生物学、分子生物学的な実習においても教育支援を行うこととなった。具体的には海洋生物の同定、発生実験、タンパク質定量や western hybridization、*in situ* hybridization 等である。研究支援に関しては、その当時の臨海実験所教員の研究テーマに沿って行われた。アスキジア科のホヤ及び環形動物エラコにおけるバナジウム濃縮機構の解明、接着機構の研究、ナメクジウオやギボシムシの生態及び発生に関する研究の支援である。それぞれの詳細については後の章および節で個別に詳述する。

当時は全国の臨海実験所で分子生物学をフォローできる技官はおらず、新しい時代の臨海技官のテストケースとして育成されたようにも思う。当時は研究者の下働きである臨海技官に学は不要で、施設整備、操船・潜水・採集と飼育といった裏方の現場仕事ができればよく、見目好い表の仕事を求めたりする者や、プライドの高い学位持ちは不要という考えが技官自体にも根強かった。私を採用した当時の向島臨海実験所長である道端齊教授は「将来は時代に合わせた能力を持つ技官が必要になる。向島臨海実験所もいつまで存続するか誰にも確約はできない。実験所技官にどこに行っても通用する能力と実績を持たせることは所長の責務である」という見識をお持ちで、それに沿って筆者の分子生物学スキルを伸ばして下さい、科研費獲得や論文執筆なども根気よくご指導を頂いた。特に英語の下手な筆者には原稿が真っ赤になるまでご指導いただき、自身もそれを見て原稿と同じくらい赤面する思いだったことは未だに記憶に残っている。ただしこれらのスキル向上は旧来の技官としての業務を遂行した上での話であり、強制ではなく本人の同意に基づく自己研鑽的な扱いであった。その内容については次節以下に詳述する。

## 第1節 研究支援および自己研鑽としての研究活動（ホヤにおける高濃度バナジウム濃縮機構の研究）

筆者が向島臨海実験所に着任した当時、理学研究科の道端齊教授が所長としてホヤにおけるバナジウム濃縮について精力的に研究しておられた<sup>6~10)</sup>。さらに宇山太郎講師、植木龍也助手（当時）が同じテーマを一緒に研究され、学生が10名程度在籍する遠隔地でありながらも活気ある施設であった。技術職員としては安保徳之文部技官が施設維持管理および船舶運航を担っておられたが、研究にはあまり関与せず実習用の別種ホヤ養殖や生物採集、外来研究者からの採集依頼の対応が主であった。

ホヤという一般にはあまり馴染みのない生物が、海水からバナジウムというレアメタルを選択的に濃縮するという現象は、生物が持つ多様な能力と可能性を示すものである。この海洋からの金属濃縮という能力を解明して応用すれば、海洋に無尽蔵といえるほど溶けている希金属であるバナジウムのみならず、チタン、ガリウムやゲルマニウムといった産業上重要な希金属、金・銀・白金といった貴金属を選択的に回収できる、産業的にも画期的な可能性が開けることになり社会的意義も極めて高い。道端教授はその生物学的な仕組みを知りたいという純粋な知識的欲求に基づいて長年の争点であったバナジウム濃縮細胞（Vanadocyte）を同定し<sup>11)</sup>、さらには宇山講師、植木助手と共にスジキレボヤから Vanabin と呼ばれる特徴的な構造を持つタンパク質をバナジウム結合タンパク質として世界で初めて発見された<sup>12, 13)</sup>。当時 Vanabin は2種発見されており、他にもあるのではないか？という疑問がもたれており、その時点で筆者が配属となった。そこで筆者に与えられたミッションがバナジウム濃縮細胞からの EST (Expressed Sequence Tag) 解析による新規 Vanabin の探索であり、最終的に筆者が新規 Vanabin を2種類発見して2本の筆頭著者論文として報告した<sup>14, 15)</sup>。その詳細については後述するが、まずは聞きなれないホヤという生物とそのバナジウム濃縮の概要を説明し、それから筆者が行った研究の内容と成果を紹介したい。

## 第1項 ホヤについて

ホヤ（海鞘）は海洋生物であり、卵から孵化後のオタマジャクシ幼生期の尾部に脊椎の原形とも言える脊索を持つ。感覚器に頼りながら短い遊泳期を過ごした後に海中の支持体に頭部の付着突起を付着させて変態し、以後は固着生活を送る。中には固着しないまま変態して遊泳生活を送り続けるものもいる。生活様式もユニークで、単体で有性生殖を行う単体ボヤと、群体で有性生殖、無性生殖の両方を行う群体ボヤがある。成体は入水孔と出水孔と呼ばれる口と肛門にあたる部分を持ち、海水中のプランクトンや浮遊する有機物を鰓籠と呼ばれる部分で漉し取って食べる濾過摂食を行う（図 12）。セルロースを合成する唯一の動物であり、体表の被囊は動物性セルロースからなり、そのセルロース合成酵素は細菌より水平伝播したと考えられている。ホヤの生態などについては「ホヤの生物学（佐藤矩行著）」に詳しい<sup>16)</sup>。

ホヤが属する尾索動物は約 2,300 種以上が記載され、脊索を持つことから我々ヒトと同じ脊索動物門に、現在では尾索動物門と脊椎動物門に分類されている（図 13A）。その見かけから「ホヤ貝」とも呼ばれるが、系統学上は我々ヒトと同様に原口が肛門になり、後から別の場所に口が開く新口（後口）動物である。軟体動物である貝類は原口がそのまま口になることから旧口（前口）動物である。尾索動物門での分類はホヤ綱、タリア綱、オタマボヤ綱の 3 綱であったが、近年の分子生物学の発展に伴いタリア綱の分岐が再考されるなど整理中である（図 13B）。外見もバラエティに富んでおり、その一部を図 14～16 に示す。本稿ではわかりやすさも考慮してやや古い分類（腸性目：生殖腺が腸管に沿う、壁性目：生殖腺が体部の鰓籠に沿う）も用いる。

ホヤはわが国では東北地方で食用として知られているが、実際には壁性目のマボヤ（*Halocynthia roretzi*）とアカボヤ（*A. aurantium*）が食されている。外側の固いセルロースの被囊を剥き、内部にある体部（筋膜）を食べる。グリコーゲンを大量に含むため独特な甘みがあり、新鮮なものは刺身やキュウリと酢の物にすると美味であるが、独特の磯臭さや死後すぐに腐臭が出やすいことから好みの別れる食材である。

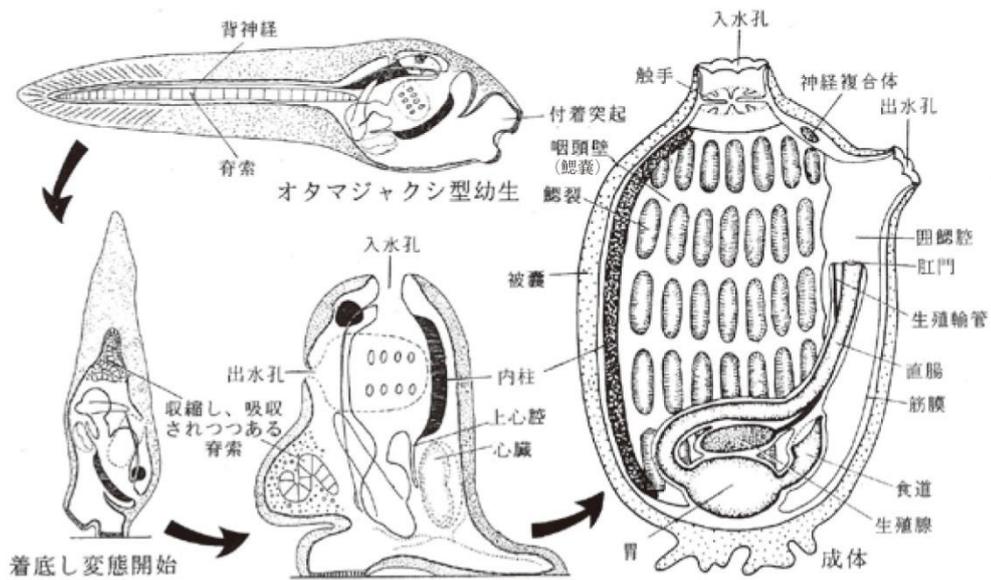


図 12 尾索動物ホヤ体制図およびライフサイクル (ホヤの生物学から持ってくる)

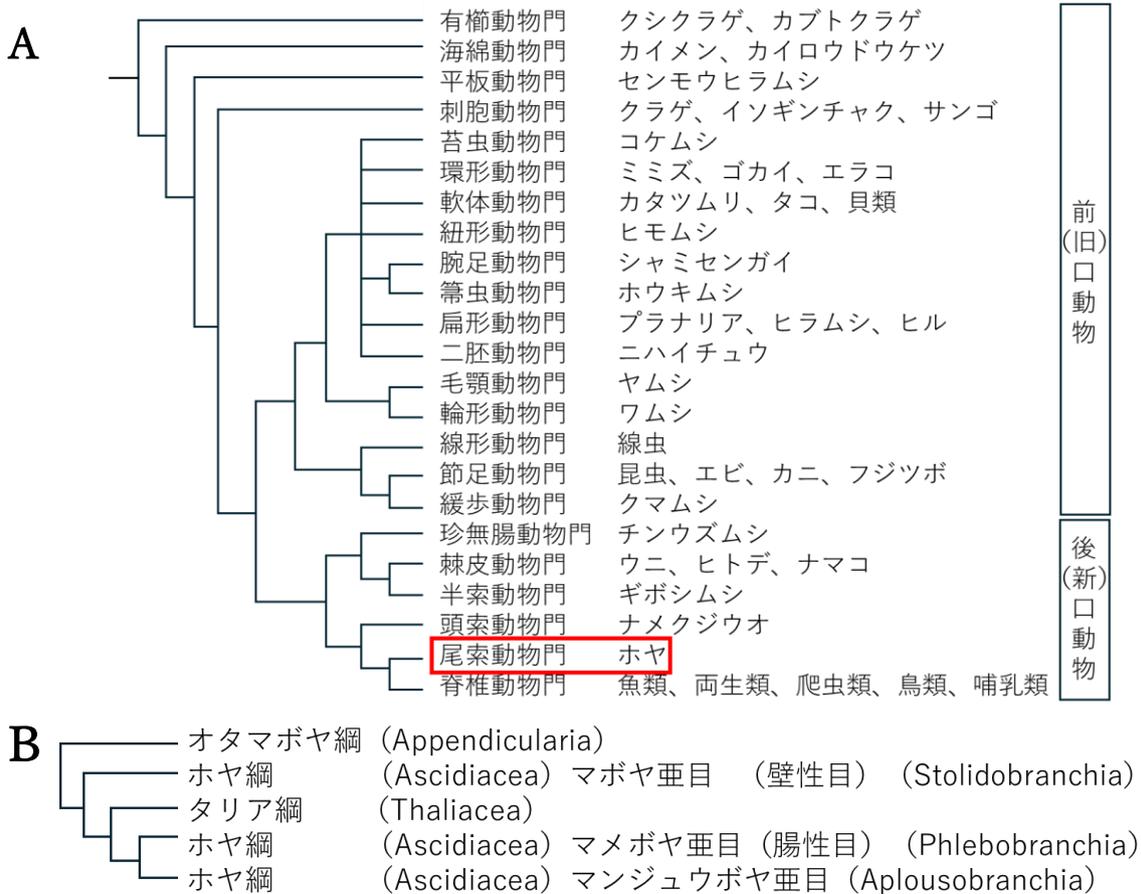


図 13 動物の系統樹

(A) 動物界における分類門とホヤの位置 (赤枠) (B) 尾索動物門内における分類



図 14 壁性目（マボヤ亜目）のホヤ。この目に属するホヤはバナジウムをほぼ濃縮しない (A) マボヤ。東北地方で食用とされる種 (B) 瀬戸内海にはアルビノや中間的な色合いのマボヤが多い (C) シロボヤ (*Styela plicata*)。この種は食用とはされない。

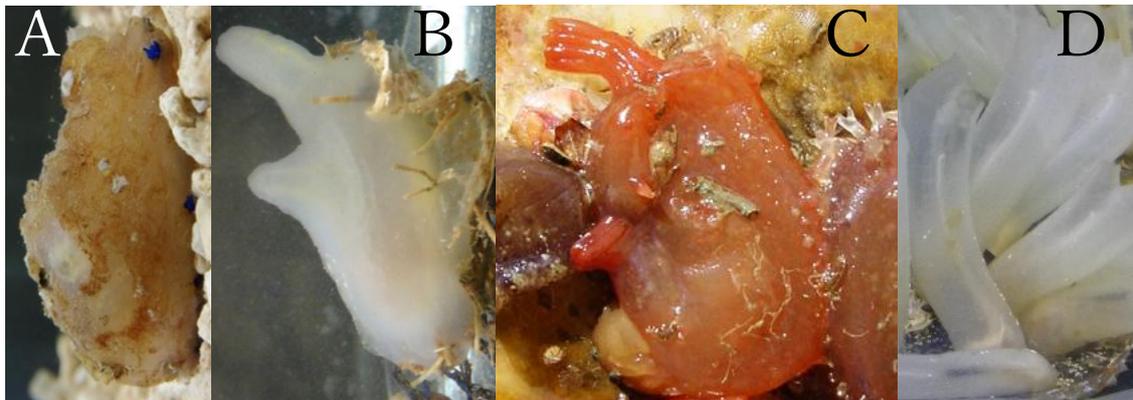


図 15 腸性目（マメボヤ亜目）のホヤ。バナジウムを濃縮する種はこの目に属する (A) 現在最高濃度 (350mM) のバナジウムを濃縮するバナジウムボヤ (B) 60mM のバナジウムを濃縮するナツメボヤ (C) 13mM のバナジウムを濃縮するスジキレボヤ。体色にバリエーション (茶・黄・赤・橙・紫) があるがバナジウム濃度は変わらない。巨大な酸性の液胞を持つジャイアント細胞 (バナジウムは含まない) を持つことが特徴。実験には入手や飼育の難易度の観点からこの種がもっぱら使用される (D) カタユウレイボヤ。0.6mM のバナジウムを濃縮する。コスモポリタンな種でゲノム解析が終了しており NBRP (National Bio Resource Project) の対象となっている。被嚢が柔らかいユウレイボヤという種もある。近年になってこの種に 2 種が包含されていることが提唱されたが、詳細は S1 に記す。この目のホヤは食用とはされない。

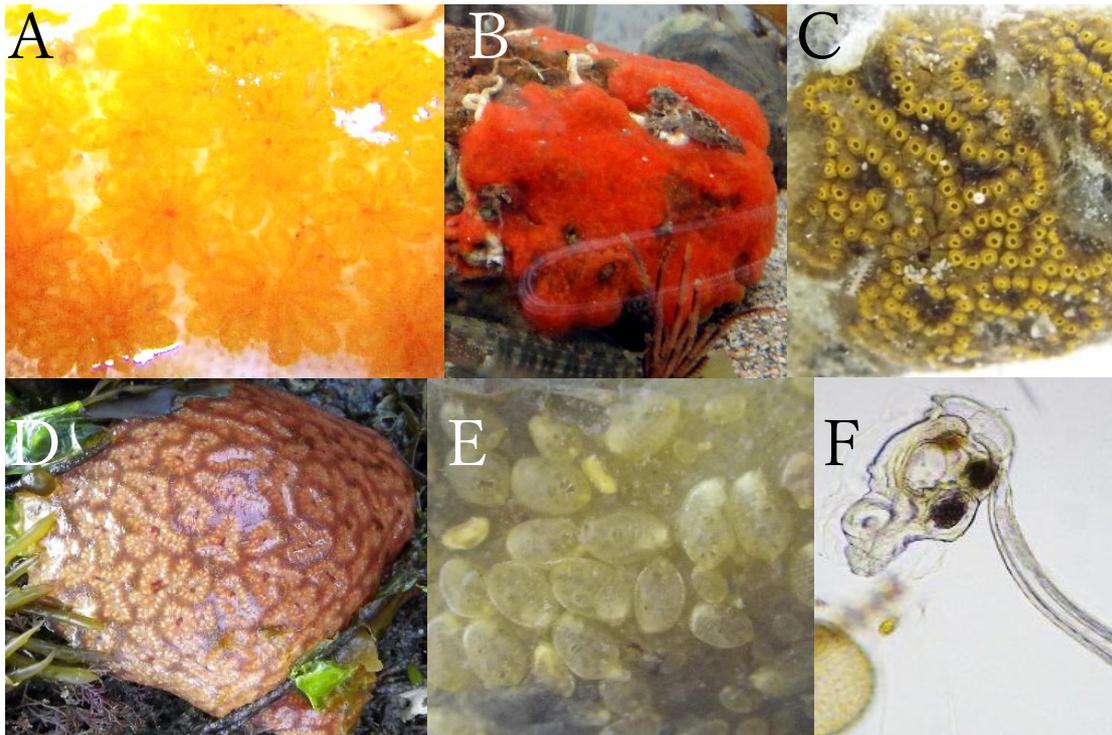


図 16 群体ボヤ 群体ボヤは小さな個体（個虫）が集まった形状をしており、その形状は様々で同定が困難な種が多い。個虫の内部様式は単体ボヤを小さくしたように同じ体制を持つ (A) マンジュウボヤ亜目キクイタボヤの一種 (B、C) マンジュウボヤ亜目イタボヤの一種。群体ボヤは一部の例外を除いてマンジュウボヤ亜目に属する (D) マンジュウボヤの一種 (E) マメボヤの一種。まさに単体ボヤを豆粒の様にスケールダウンさせた感がありわかりやすい (F) オタマボヤの一種。オタマボヤはホヤと同じ尾索動物亜門ではあるが、ホヤ綱ではなくオタマボヤ綱オタマボヤ目に属し、固着生活ではなく浮遊生活を行うプランクトンである。体部全てと尾部が途中まで写真に写っている。この周囲を柔らかなゼリー状に近い被囊が覆っている。プランクトン生活を行うホヤには他にタリア綱のウミタルやサルバ、ヒカリボヤなどがある。これらの浮遊性のホヤは主に外洋性であり、オタマボヤ以外は瀬戸内海ではあまり見かけない。

## 第2項 ホヤのバナジウム濃縮機構の概要

腸性目（マメボヤ亜目）に属するホヤの一部は、血球中にレアメタルの一種であるバナジウムを高濃度かつ高選択的に濃縮するという他の生物に例を見ない特徴を有している。海水中で五価の状態が存在しているバナジウムは、ホヤ生体内で四価を経て三価にまで還元されてバナドサイトと呼ばれるバナジウム濃縮細胞の液胞に濃縮される。そのバナジウム濃度は最大 350 mM に達し、その濃縮係数は海水比で  $10^7$  にまで達する。バナドサイトの液胞中にはバナジウム以外に高濃度の硫酸イオン（バナジウムの 1.5 倍）が含まれ、pH は 1.9 という強い酸性を示す（図 17）。この現象は 1911 年、ドイツ人化学者 M. Henze によって発見され<sup>17)</sup>、当初バナジウムは鉄や銅に次ぐ第 3 の呼吸色素の補欠因子として機能する可能性が示唆された。後日その説は否定され、ホヤに含まれる高濃度のバナジウムの生理機能は未だに不明のままである。現在はバナジウムの還元に伴って細胞内で生じる NADPH を電子供与体としたエネルギー代謝のためという説が道端齊名誉教授により提唱されている<sup>9)</sup>。

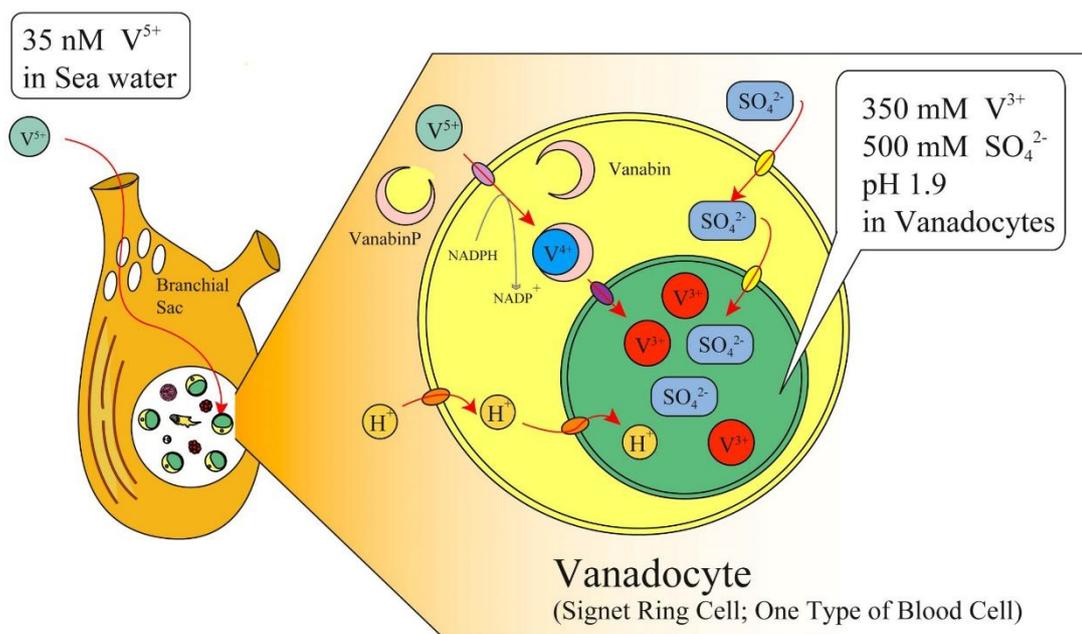


図 17 ホヤにおけるバナジウム濃縮の模式図

### 第3項 ホヤ血球の種類とバナジウム濃縮に関わる遺伝子のスクリーニング

ホヤの血球は形態学的特徴から約 10 種類に区分される。その中でバナジウム濃縮を担う細胞(バナドサイト)は巨大な液胞を持ち、光学顕微鏡では指輪上に見えることからシグネットリング細胞と呼ばれる細胞である。それ以外にも不定形のアメーバ細胞にもバナジウムがあることが示されているが、本論文ではバナドサイトはシグネットリング細胞のみを示す名称として扱う。バナドサイトの細胞質にはペントースリン酸経路の酵素群が局在し、この経路によって生産される NADPH が五価バナジウムを四価に還元する<sup>18, 19)</sup>。液胞膜上には液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase)等が存在し、液胞内を極低 pH に保っている<sup>20~22)</sup>。さらにバナジウム濃縮機構を解明するカギと考えられるバナジウム結合タンパク質(Vanabin1 と Vanabin2)が、バナドサイトの可溶性画分から単離され、その遺伝子配列も得られた。この他の生物に見られない新規タンパク質は 18 個のシステインが特異な{C}-{X2-5}-{C}となるアミノ酸配列モチーフを構成する。組み換えタンパク質を用いた実験で、Vanabin1 と Vanabin 2 は、それぞれ 10~20 原子の四価バナジウムと結合する能力があると推定されている<sup>13)</sup>。

ホヤにおけるバナジウム濃縮にはさらに多くの遺伝子やタンパク質が関わっていると予想されていた。しかしながら、全血球で解析するとバナジウム濃縮に関わらないジャイアント細胞やモルーラ細胞、ピグメント細胞、コンパートメント細胞等の他の情報が混入してしまう<sup>14)</sup>。そこで筆者はスジキレボヤの 10 数種類のホヤの血球の中からバナドサイトのみを分取した上での cDNA ライブラリーの構築を試みた<sup>15)</sup>。当時はセルソーターで浸透圧の高い海洋生物の血球を分離することができない時代であったため、Percoll による密度勾配遠心法を二度繰り返すことにした。その結果 91.1%の純度のバナドサイト画分(図 18)を得ることができ、この集団から cDNA ライブラリーを作成した。純度が若干低い理由は、アメーバ細胞や、バナドサイトに似た異形の細胞(2~3 のバナドサイトが結合したような細胞)が同じ比重で存在していたためであり、これ以上の分離は難しい状態であったためであるが、後にアメーバ細胞もバナジウムを濃縮していると判明していたことから、バナジウム濃縮細胞集団としての純度はより高いものではなかったかと思う。

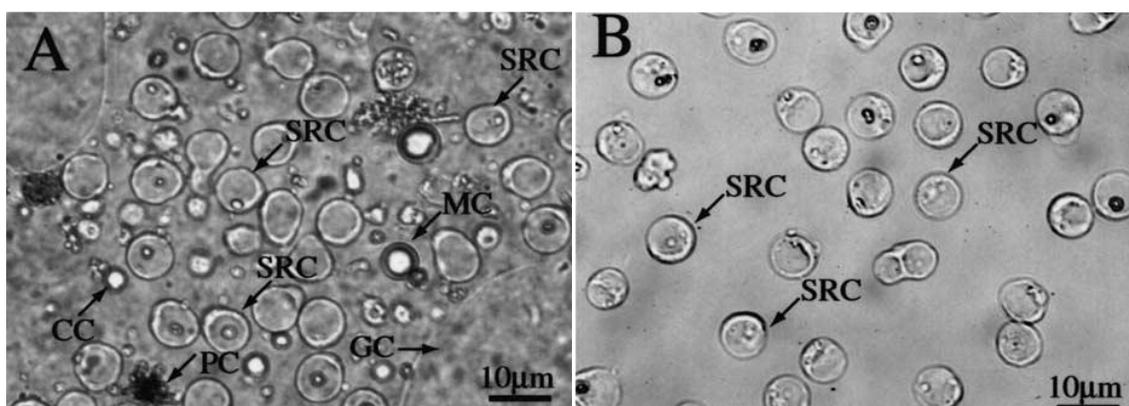


図 18 バナジウム濃縮細胞の分離 (A) 全血球 (ジャイアント細胞除去後)  
(B) パーコールによる密度勾配遠心による精製後の細胞集団

バナドサイトを 6M グアニジン塩酸中で可溶化したのちにトリフルオロ酢酸セシウムによる超遠心で mRNA を抽出・精製し、cDNA ライブラリー作成キット Uni-Zap XR vector を用いてファージミドと呼ばれるベクター (運び屋) に導入した。当時 1 回 5 万円のキットであり、かなり緊張したことを未だに覚えている。そこからさらに pBluescript SK- plasmids に変換して大腸菌に導入して cDNA ライブラリーを作成し、ランダムに選択した 1,000 クローンの 5'末端から得られた約 500bp の塩基配列を SWISSPROT データベースと照合して既知の遺伝子との相同性を比較する EST (Expressed Sequence Tag) 解析を行った。その結果、新規 vanabin である vanabin3 と vanabin4 を新たに得ることができた。これら新規 vanabin にも特徴的な 18 個のシステインからなる {C}-{X2-5}-{C} の vanabin に共通なモチーフが含まれ (図 19)、組み換えタンパク質をバナジウム固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC : Immobilized Metal ion Affinity Chromatography、図 20) に通したところ、Vanabin4 は IMAC において vanabin2 と同程度の結合力を示し、vanabin3 も既知のものに比べて非常に低い結合能を示した (図 21)。vanabin3 は不溶化しやすく、アミノ酸配列も既知 vanabin とはやや異なっていることから、バナジウム濃縮において他の vanabin と異なる役割を持つことが考えられた。なおこのシステイン残基は SS 結合による立体構造構築に寄与し、電荷の高いリジン残基などがバナジウム結合に寄与していると考えられている。

Vanabin 1	1	- - M V <u>S</u> K F T I L <u>L G</u> V <u>V V</u> L M A L S - - V N A Y E S E <u>F</u> <u>D</u> D E T	30
Vanabin 2	1	- - - M <u>S</u> K V I F A L <u>V</u> L <u>V V</u> V L V A C - - I N A T Y V E <u>F</u> <u>E</u> E A Y	29
Vanabin 3	1	M A S K <u>L</u> F L L F L <u>F</u> <u>L G</u> M <u>F</u> V L I A A S D E S F D E E E D <u>F</u> <u>E</u> D E V	34
Vanabin 4	1	M V T K <u>S</u> H I I F F <u>L G</u> M <u>V V</u> V I V G C P A F E K F V S K N <u>E</u> E S V	34
Vanabin 1	31	<u>F E</u> <u>K G</u> - - P <u>G</u> <u>C</u> - - K <u>C</u> Q S V <u>C</u> G E V K K <u>C</u> G V K <u>C</u> F R S <u>C</u> N G D	60
Vanabin 2	30	<u>A P</u> <u>V D</u> - - - <u>C</u> K G Q <u>C</u> T T P <u>C</u> E P L T A <u>C</u> K E K <u>C</u> A E S <u>C</u> E T S	59
Vanabin 3	35	M A Q S Y Y P E <u>C</u> D - - <u>C</u> R Q E <u>C</u> G T F R N <u>C</u> R A T <u>C</u> R A N <u>C</u> G D G	66
Vanabin 4	35	I V <u>D</u> S - - - <u>C</u> K T N <u>C</u> S T E <u>C</u> L P L K N <u>C</u> T E N <u>C</u> T E H <u>C</u> E G L	64
Vanabin 1	61	R <u>D</u> - - - <u>C</u> T K D <u>C</u> A <u>K</u> A K <u>C</u> G K V P N A G D <u>C</u> G H <u>C</u> M L S <u>C</u> E G K	91
Vanabin 2	60	A <u>D</u> K K T <u>C</u> R R N <u>C</u> K <u>K</u> A D <u>C</u> E - - P Q D K V <u>C</u> D A <u>C</u> R M K <u>C</u> H K A	91
Vanabin 3	67	R - - - <u>C</u> R R E <u>C</u> K R T K <u>C</u> I N - - M K S Q <u>C</u> R N <u>C</u> N G D <u>C</u> R E R	94
Vanabin 4	65	S <u>D</u> K K A <u>C</u> H Q N <u>C</u> R <u>K</u> V T <u>C</u> K - - A E D G Q <u>C</u> R A <u>C</u> K K K <u>C</u> K D E	96
Vanabin 1	92	<u>C</u> R A D H <u>C</u> A S A <u>C</u> P G <u>K</u> V S <u>K</u> A P A <u>C</u> L D <u>C</u> M K L N <u>C</u> V - - -	120
Vanabin 2	92	<u>C</u> R A A N <u>C</u> A S E <u>C</u> P K H E H <u>K</u> S D T <u>C</u> R A <u>C</u> M K T N <u>C</u> K - - -	120
Vanabin 3	95	<u>C</u> R S K Y <u>C</u> S K P <u>C</u> Y - <u>K</u> S L K V R K <u>C</u> V R C M V V <u>S</u> C H L R F	125
Vanabin 4	97	<u>C</u> K K A N <u>C</u> K <u>S</u> S <u>C</u> E E <u>K</u> A M <u>K</u> S P A <u>C</u> K S <u>C</u> M E K N <u>C</u> H - - -	125

図 19 EST 解析から得られた Vanabin 3, 4 と既知の Vanabin 1, 2 との amino 酸配列比較。薄灰色の囲みは活性型の Vanabin 配列部分、その内側の囲みは一致する amino 酸配列。特に特徴的な {C}-[X2-5]-{C} モチーフがよく一致している。またリジン (K) やアルギニン (R) のような電荷をもつ amino 酸残基が多いことが特徴

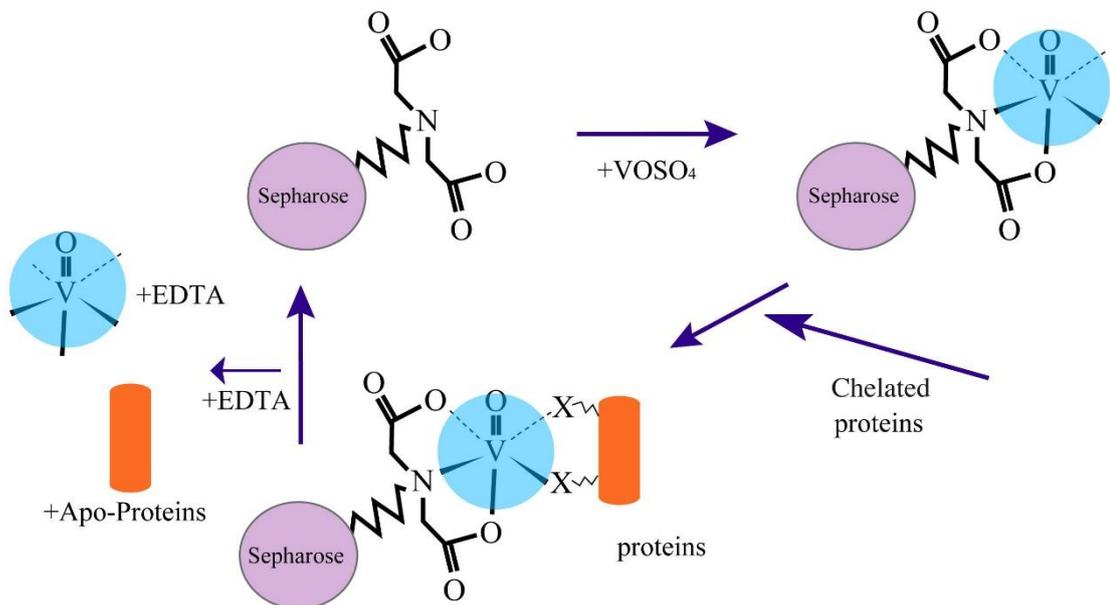


図 20 バナジウム固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) によるタンパク質/バナジウム結合実験概要図。バナジウムがイミノジ酢酸 (IDA) にトラップされ、そこにタンパク質が結合する。バナジウム結合タンパク質は低 pH あるいは EDTA 等のキレーターによって溶出される。

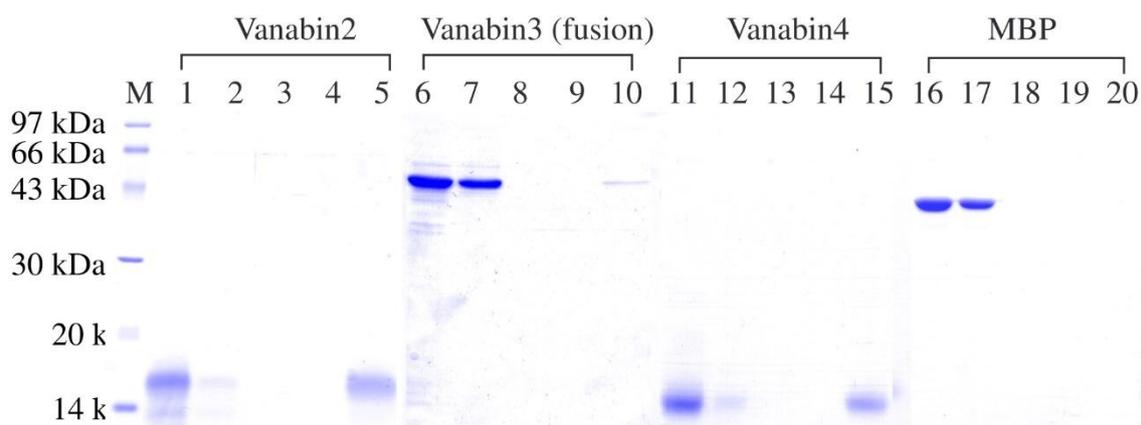


図 21 Vanabin の IMAC によるバナジウム結合能解析

(Lane 5、10、15、20) バナジウム結合能を示すタンパク質画分 (M) 分子量マーカー (1~5) vanabin2 (6-10) vanabin3 (11-15) vanabin4 (16-20) MBP (Maltose binding protein、バナジウム非結合) (1、6、11、16) 結合実験前のタンパク質 (2、7、12、17) 非結合画分 (3、8、13、18) pH 5.5 溶出画分 (4、9、14、19) pH 3.5 溶出画分 (5、10、15、20) 50 mM EDTA 溶出画分 (強結合画分)

さらに EST 解析からはメタロチオネイン、フェリチン、トランスフェリン、水銀還元酵素(Hg reductase)等の金属結合タンパク質に類似性を示す DNA 配列が得られた。それ以外では V-ATPase のサブユニットが 3 種類得られた。V-ATPase はプロトンバナドサイトの液胞中に輸送し、その結果生じるプロトンの電気化学的エネルギーがバナジウム濃縮と共役すると考えられている。さらに興味深いことに、呼吸色素であるヘモシアニンと相同性を示す遺伝子も得られた。ヘモグロビンやミオグロビンなど他の呼吸色素の遺伝子は得られなかった。この結果は別の研究者グループが行っていたカタユレイボヤの EST 解析とゲノム解析の結果とも一致する。ヘモシアニンは銅を補欠因子に持つ呼吸色素であり一般に節足動物や軟体動物などの旧口動物に存在することが知られているが、後口動物であるホヤにヘモシアニンが存在することが示唆されたことは、バナジウムとは無関係だとしても生物学的に興味深い。個人的にはこれらのタンパク質にも興味があったが、Vanabin の解析を優先するためクローニングまでに留まった。関連遺伝子・タンパク質の詳細は参考論文をご参照いただきたい。

#### 第4項 新規 Vanabin の局在解析

EST 解析から複数の Vanabin が存在していることが示されたが、配列が違うということは機能や局在なども異なる可能性が高い。機能や局在の違いを調べるには、まずこれら 4 種の Vanabin タンパク質を識別できなければならない。機能はそれぞれの Vanabin を遺伝子組み換えによって大腸菌内で別々に作製・精製することで推定することができるが、タンパク質の局在を調べるには、抗体による免疫染色が一般的なアプローチとなる。抗体を作成するには、これらの遺伝子組み換え Vanabin を抗原としてマウスに腹腔注射することで免疫し、その血清を用いる。抗体は免疫グロブリンと呼ばれる大きな Y 字型のタンパク質で、外来分子と遭遇した際の適応免疫応答の一環として、リンパ球のうち B 細胞によって産生される。抗体はエピトープと呼ばれる抗原の一部配列（通常 4~6 アミノ酸程度の領域の立体構造）に対する強い親和性を持つ。この手法で作成される抗体はポリクローナル抗体と呼ばれるものであり、様々な B 細胞から産生された多様な抗体の集合体である。3 次元構造が似ているタンパク質では、タンパク質配列が完全に一致しない場合でも抗体が結合してしまう交差反応を示すことが多く、この場合は抗体によるタンパク質の識別が困難になる。今回の Vanabin は配列だけで見るとかなり異なるように見えるが、タンパク質の立体構造に寄与するシステインの 18 個のモチーフが酷似していることから交差反応が懸念され、実際にポリクローナル抗体では Vanabin 全てに反応するため個別識別はできなかった。

そこでモノクローナル抗体の作製に挑戦した。モノクローナル抗体とは 1 つのエピトープにだけ結合する抗体のみを大量生産させたものである。作製法としてはまずマウス脾臓を摘出して B 細胞を含む脾臓細胞をトリプシンで遊離させ、ミエローマ細胞というがん細胞と割合と濃度を調整して混合し、さらに PEG によって細胞膜を不安定化させることで細胞融合を生じさせる。融合した細胞はハイブリドーマと呼ばれ、がん細胞由来の無限に増殖する能力と B 細胞由来の抗体産生能力を併せ持つ。このハイブリドーマを限界希釈して 1 細胞ずつになるように培養シャーレに入れ、1 ハイブリドーマ由来の細胞を増殖させる。ある程度細胞が増えたところで培養液を分取し、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) と呼ばれる抗原抗体反応による抗体

価の検定を行う。ELISA ではマイクロプレートに各 Vanabin を結合させ、抗体を含む培養上清を添加する。Vanabin に結合しない抗体はその後の洗浄で除去され、残った Vanabin 結合抗体には酵素標識した 2 次抗体が結合し、酵素反応によって反応液を変色させる。変色具合をマイクロプレートリーダーで読み取り、抗原への特異性（識別性）と抗体価をもつ培養細胞をスクリーニングする。さらに各 Vanabin タンパク質をナイロンメンブレンに転写して抗体を反応させて検出するウェスタンブロッティング法により、特性と抗体価を再検証した。その結果、4 匹のマウス脾臓から特異性と抗体価の高い 8 種のモノクローナル抗体を作製することに成功した<sup>23)</sup> (図 22、表 2)。

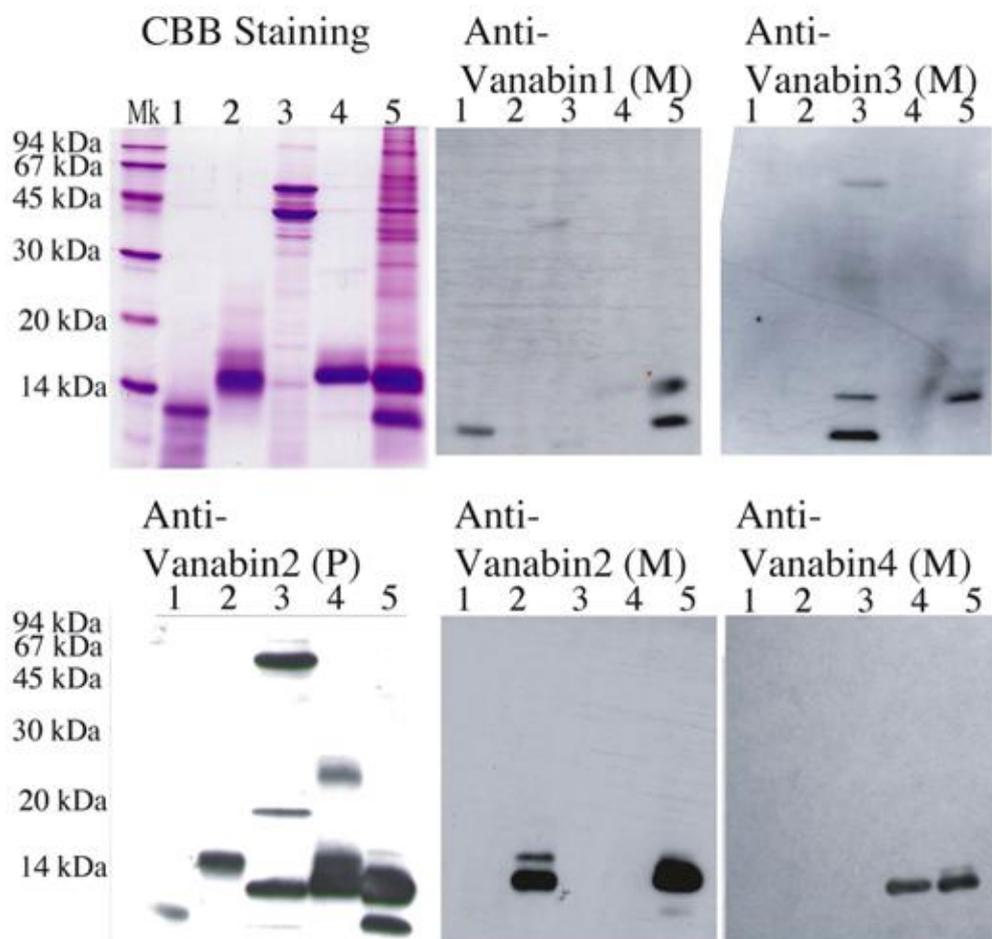


図 22 各種 Vanabin に対する特異的なモノクローナル抗体。Mk: Size Marker, Lane 1: 組み換え Vanabin1 タンパク質、2: 組み換え Vanabin2 タンパク質、3: Vanabin3 タンパク質、4: Vanabin4 タンパク質、5: スジキレボヤ血球タンパク質、M: モノクローナル抗体、P: ポリクローナル抗体

Antigen	Name of Monoclonal Antibody			
Vanabin1	V1-2C06			
Vanabin2	V2-3A01	V2-3B03	V2-3D03	V2-3G03
Vanabin3	V3-1E03	V3-2F05		
Vanabin4	V4-1F10			

表2 作成された抗 Vanabin モノクローナル抗体一覧表

これらのモノクローナル抗体を用いてホヤ血球に対して免疫染色を行った。具体的にはホヤ血球をスライドガラスに滴下して付着させた後に 4%パラホルムアルデヒドで固定し、メタノール脱脂で細胞膜に穴をあけてモノクローナル抗体及び二次抗体を反応させた状態で封入する。そのプレパラートを速やかに共焦点レーザー顕微鏡により観察して二次抗体の蛍光を検出した。その結果 Vanabin1, 2, 3 はバナドサイトの細胞質に、Vanabin4 は同じくバナドサイトの細胞膜上に局在していることが示された (図 23)。しかしながら抗 Vanabin4 モノクローナル抗体をウェスタンブロッティングすると、細胞膜マーカーである WGA (wheat germ agglutinin, 細胞膜に局在する 170kDa のタンパク質の糖鎖に反応) と同じ画分に反応せず、他の Vanabin と同じように細胞質画分に反応した (図 24)。同じ抗体を用いて免疫染色した場合は確かに細胞膜上の WGA 抗体と同じ位置に結合 (図 25) することから、Vanabin 4 は膜タンパク質の様に細胞膜に埋まっているのではなく、膜タンパク質に対して緩く結合している可能性が示唆された。細胞を分画する際、液胞が破裂することで硫酸性の強い液体に接するため、この緩やかな膜とタンパク質の結合が外れるのではないかと推測している。このことはバナジウムを血漿中から細胞質そして液胞へと輸送する際に、Vanabin ファミリー間で受け渡しをしている可能性を示唆する。

なお、一連の実験で免疫までの作業は臨海実験所で行い、そこからの共焦点レーザー顕微鏡で観察は岡山大学で行った。当時の広島大学では該当装置の利用が学部内で属人化していた面があり、なかなか公平な利用が難しい状況であったためである。1 ユーザーとして共用装置の利用体制が重要であることを認識したが、後日自分が共用装置を担当するときにユーザー側の視点を意識するための良い経験となったと思う。

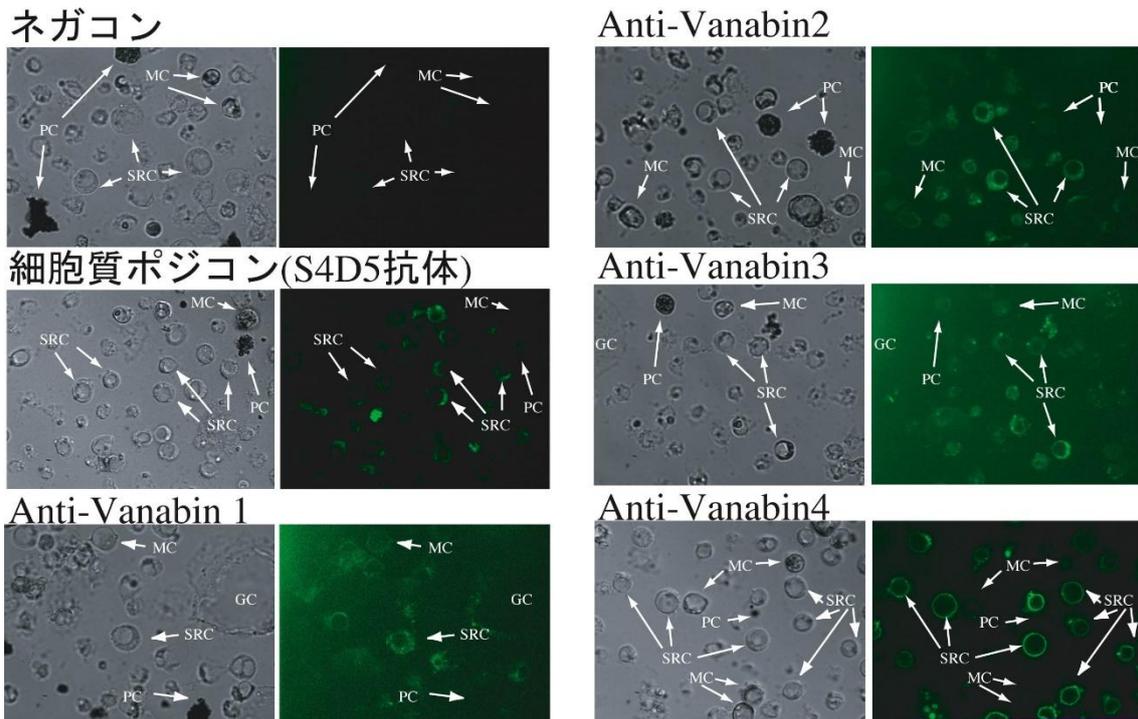


図 23 各種 Vanabin に対して作成したモノクローナル抗体による免疫染色。

Vanabin1~3 は細胞質に、Vanabin4 は細胞膜に局在している様子が見える。

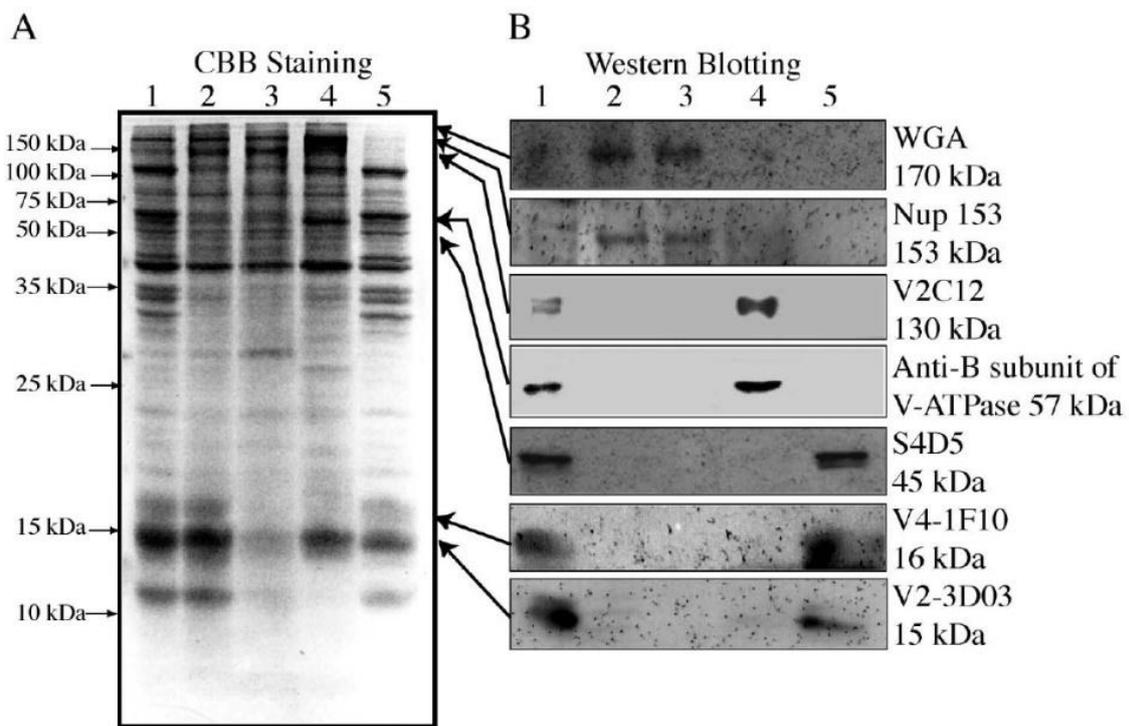


図 24 ウェスタンブロッティングによる各細胞画分への抗 Vanabin 抗体の反応

Lane 1: 血球ホモジェネート (全画分)、2: 細胞膜画分、3: 核画分、4: 液胞膜画分、5: 細胞質画分、WGA: 細胞膜マーカー、Nup153: 核マーカー、V2C2 and V-ATPase: 液胞膜マーカー、S4D5: 細胞質マーカー、V4-1F10: 抗 Vanabin4 モノクローナル抗体、V2-3D03: 抗 Vanabin2 モノクローナル抗体

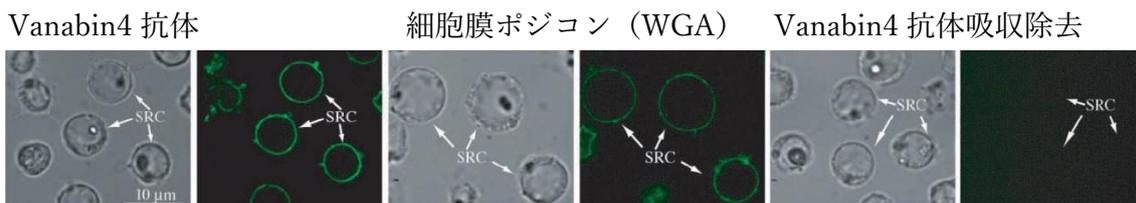


図 25 Anti-Vanabin4 抗体の局在再確認。Vanabin4 抗体は細胞膜に反応する WGA と同じ局在を示す。

## 第 5 項 成果まとめ

本活動においては、2 種の新規 Vanabin をスジキレボヤから発見し、そのバナジウム結合能とモノクローナル抗体作製によりバナドサイト内の局在を明らかにした。一連の研究支援活動における成果として、幾編かの共著論文支援<sup>24~28</sup>、国際学会を含めた多数の学会・技術研究会発表を行い、さらに 2 件の科研費を獲得（課題番号 13918030、15918027）、3 報の筆頭著者<sup>14, 15, 23</sup>としての査読付き英論文がアクセプトされた。これらの結果を博士論文にまとめて博士号（理学）が授与された。技術的にも様々な遺伝子工学、タンパク質工学、生化学的な手法を身に付けることができた。特にモノクローナル抗体作製およびスクリーニングは丸 1 年かけた仕事であり、その成果は複数の Vanabin が存在する理由への考察に多少は寄与したと考えている。博士号取得は高校、大学、そして職場で学んだ能力が結実したものであり、2 足の草鞋による相応の苦労もあったが、成長と達成感に満ちた日々だった。

## 第2節 エラコにおける高濃度バナジウム濃縮機構の研究

### 第1項 エラコとバナジウム濃縮について

ホヤ以外にバナジウムを濃縮している海洋生物として、環形動物門多毛綱定在目ケヤリ科エラコ(*Pseudopotamilla ocellata*) が知られている。エラコは皮状(キチン質)の棲管と呼ばれる砂を表面に付けた袋状の構造に1匹ずつ入っており、この棲管が絡み合って密集した状態で海中の岩などに群体として固着している。エラコ本体はゴカイ様の胴体をしており、その先端に細い紐状の鰓糸が密集した鰓冠と呼ばれる構造を持つ。北日本の海岸に生息し、主に釣り餌として利用されるため釣具店などから生きた状態で購入することも可能である。釣り餌としては茹でて塩漬けにした塩エラコというものもあり、自動販売機で売られていることもある。また一部地域では塩茹でや塩辛にして食される。

このエラコの頭部の房状の鰓冠上皮液胞にも50mM程度のバナジウムと1.5倍量の硫酸イオンが濃縮されることが知られている<sup>29, 30)</sup>(図26)。エラコは動物の分類上は旧口動物である環形動物門に属し、ホヤや我々ヒトを含む新口動物とは分類学的に遠く離れた動物であるにもかかわらず、ホヤとエラコだけがバナジウムを特定の細胞の液胞に硫酸イオンとともに高濃度に濃縮していることは極めて不思議な現象である。

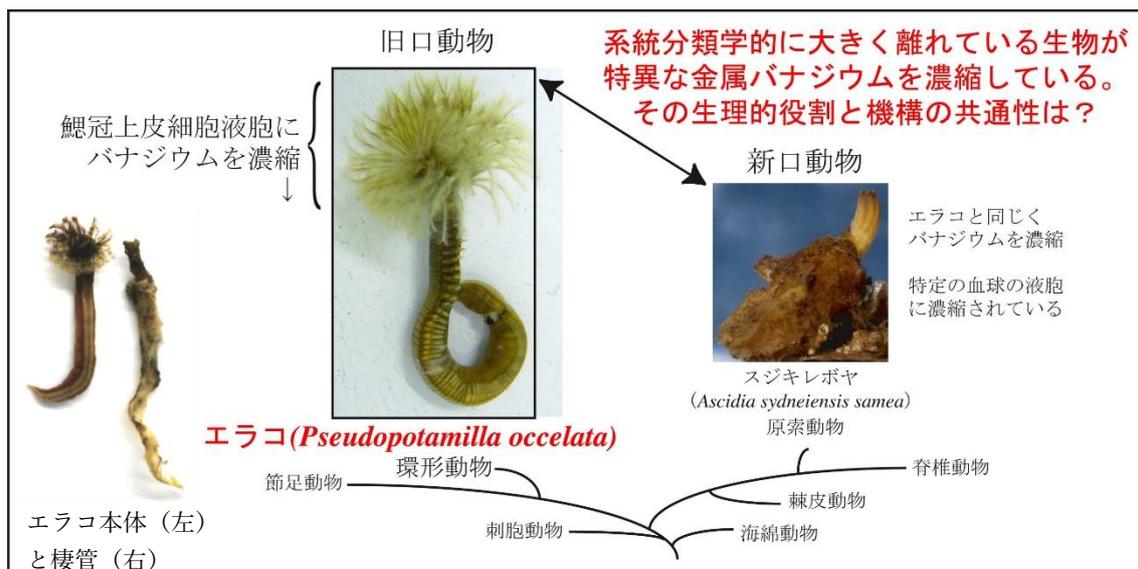


図26 エラコとホヤの系統学的な位置及びバナジウム濃縮部位

## 第2項 エラコバナジウム結合タンパク質のスクリーニング

エラコバナジウム濃縮については、化学的なアプローチからのバナジウムの局在や化学種などの推定しか行われておらず、遺伝子やタンパク質などの分子生物学的な解析はほとんど行われていなかった。先行研究における Vanabin のポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果からは Vanabin 様のタンパク質が存在することは示唆されていたが、不思議とホヤの時と同じ IMAC 法ではバナジウム結合タンパク質は単離されず、前述の論文で抗体が反応しているタンパク質が Vanabin と同じような{C}-{X2-5}-{C}モチーフを持っているかを検証できないままであった。

エラコからバナジウム結合タンパク質を抽出できないかと依頼を受け、様々な条件でエラコ鰓冠をホモジナイズして、ホヤ同様に IMAC によるバナジウム結合性を指標としたタンパク質のスクリーニングを行ったところ、pH 6.5 の条件で約 18kDa のタンパク質がバナジウム結合能を示し（図 27A）、これが過去の報告にある抗 Vanabin 抗体に反応する Vanabin 様のタンパク質ではないかと考え、このバンドに焦点を当てて解析することとした。

エラコバナジウム結合タンパク質を SDS-PAGE ゲルから切り出してタンパク質を抽出、マウスに免疫してポリクローナル抗体を作成した。この抗体をエラコ鰓冠から作成した cDNA ライブラリーに対してイムノスクリーニングを行うことで該当タンパク質の同定を試みた。その結果 Vanabin ではなく Nucleoside Diphosphate Kinase (NDK) が同定され、その配列は他の生物の NDK と高い相同性を示した<sup>31)</sup>（図 28）。NDK は Vanabin の基本モチーフである{C}-{X2-5}-{C}を持たないが、組み換えタンパク質でもバナジウムと結合能を持つこと（図 27B）およびキナーゼ活性が示された（図 29）。免疫染色によりエラコの鰓冠表皮に局在することも確認された（図 30）。

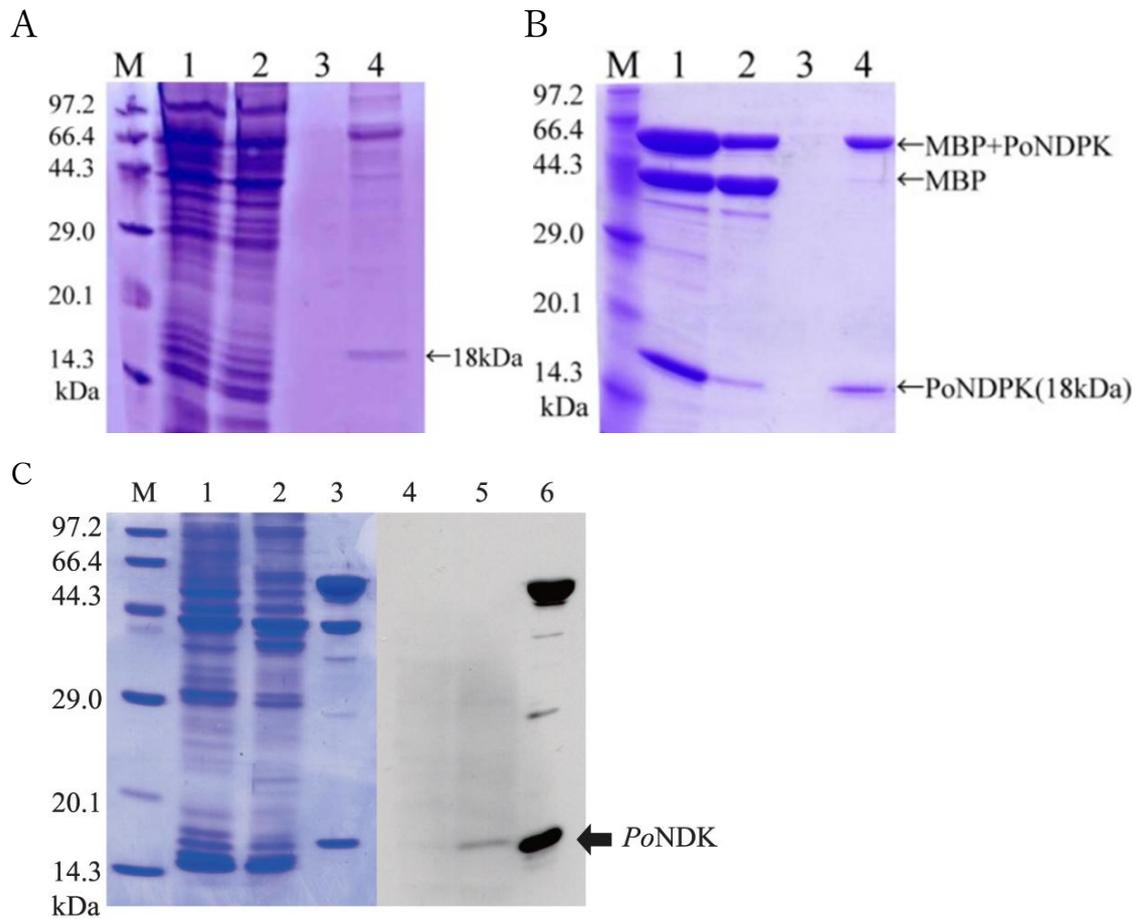


図 27 エラコバナジウム結合タンパク質解析

(A) エラコ鰓冠からの IMAC によるバナジウム結合タンパク質の抽出。M: Marker, 1: エラコ鰓冠ホモジェネート、2: IMAC フロースルー (非結合画分)、3: 洗浄画分、4: EDTA 抽出画分 (バナジウム結合タンパク質)

(B) *PoNDK* (*P. ocellata* Nucleoside Diphosphate Kinase) 組み換えタンパク質のバナジウム結合能確認実験。1: *PoNDK* 発現大腸菌タンパク質、2: IMAC フロースルー (非結合画分)、3: 洗浄画分、4: EDTA 抽出画分 (バナジウム結合タンパク質)

(C) エラコ抽出物に対するウェスタンブロッティングによる局在解析 M: サイズマーカー、1: エラコ胴部タンパク質、2: エラコ鰓冠タンパク質、3: *PoNDK*-MBP タンパク質と、切り離された *PoNDK*、4~6: 1~3 に対する *PoNDK* 抗体を用いたウェスタンブロッティング結果



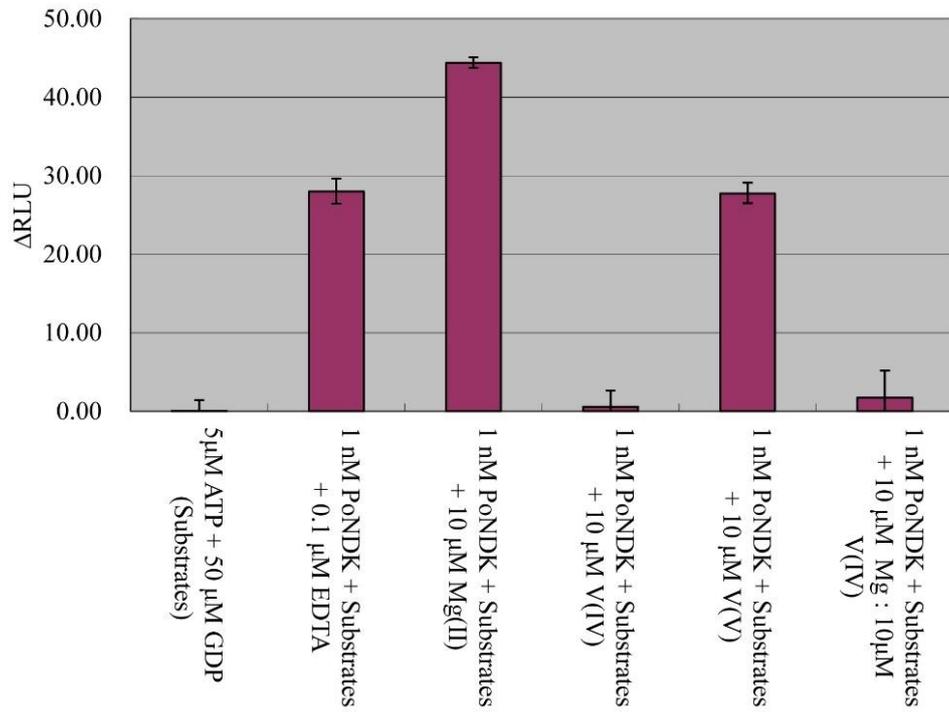


図 29 エラコ NDK 組み換えタンパク質によるキナーゼ活性測定。Mg(II)により活性化し、V(IV)により強く阻害される。V(V)は活性に影響を与えなかった。



図 30 抗エラコ NDK 交代によるエラコ鰓冠部の免疫染色 (A、C) 抗体無し (B、D) 抗 NDK による染色。バナジウムが局在する鰓冠上皮細胞に NDK も局在する。

### 第3項 成果まとめ

NDK はハウスキーピング（あらゆる細胞中に共通して一定量発現する）遺伝子であり多機能なタンパク質であるとされているが、Vanabin の様に特殊なものではない。他の生物に類を見ない高濃度バナジウム濃縮という現象とは辻褃の合わないように思えるが、このことは同じくハウスキーピング遺伝子のペントースリン酸経路遺伝子群がホヤのバナドサイトに局在していることと似ている。つまりエラコ NDK のみでバナジウム濃縮や代謝を生じるのではなく、Vanabin のような他の生物にない別のファクターがあって初めてバナジウム濃縮関連イベントが生じるのであり、エラコの NDK はホヤのペントースリン酸経路同様にバナジウムの酸化還元電位を利用して ATP や NADPH を介するエネルギー代謝の一環として活用されていることが推定される。またある化学種のバナジウムイオンはリン酸イオンとイオン半径が近似していて生体内での挙動も似ているとされており、実際に生体内ではリン酸の多い骨にバナジウムも多く、バナジウムがリン酸代謝物に関わる酵素のインヒビターとして知られている。このことからバナジウムとリン酸やリン酸化合物とは密接な関係があり、エラコからバナジウム結合タンパク質として NDK が得られたことと矛盾するものではないと考えることができる。

ホヤと同じ手法では Vanabin タンパク質が得られず NDK が得られたことは、新口動物であるホヤと旧口動物であるエラコではバナジウムの濃縮および代謝システムが異なる可能性が示唆される。エラコのバナジウム濃縮機構と意義を解明するには、鯉冠だけでなく消化管などを含めた広範囲なバナジウム結合タンパク質の探索や、バナジウムに結合しうる低分子化合物の探索や局在解析が必要であるが、残念ながら臨海実験所長の異動により続けることができなかった。本件では 1 件の科研費（課題番号 17916012）を獲得し、1 報の筆頭著者論文<sup>31)</sup>がアクセプトされた。

## 第4章 ホヤにおける接着機構の研究

海産無脊椎動物であるホヤ類は、体部全体をしなやかで弾力性がある皮状あるいは寒天状の被囊という組織で覆われている。この被囊の主成分はセルロースであり、ホヤは唯一セルロースを合成する動物としても知られている<sup>16)</sup>。被囊の色彩や形状、強度などは種ごとに大きく異なってバラエティに富んでいるが、第一の役割は外界から体内への異物の侵入を妨げる物理的な防御機構である。ホヤの種類にもよるが、マボヤやナツメボヤ、群体ボヤの様に体表への付着生物をほとんど視認できない種も多い。他の生物や物質を被囊で接着させない一方、ホヤ自身は基質（岩石・コンクリート等）に対して被囊で接着している。この非接着と接着という相反する機能を被囊という組織が合わせ持っていることになる。

ホヤの基質による最初の接着は、幼生の頭部先端にある付着突起により行われる。ホヤ幼生は孵化後に正の走行性を示して太陽（水面）の方に向けて泳ぎ、やがて負の走光性を示して海底の岩などに付着する。この付着がシグナルとなって変態が開始される。この付着突起には接着物質があると推定されているが、それがどのような物質であるかは未だに不明である。

### 第1節 ホヤの接着とバナジウム濃縮の関連性

本研究は筆者が成体ホヤにおける海中の基質に対する接着面積が種によって、特に腸性目のバナジウム濃縮の程度によってパターンがあるように感じたことにも端を発する。図31に見られるように、バナジウム濃度とその接着範囲には正の相関関係がみられる。血中バナジウム濃度が低いユウレイボヤ（0.6 mM）は本体下部の狭い範囲の被囊を介して接着し、スジキレボヤ（13 mM）、ナツメボヤ（60 mM）、バナジウムボヤ（350 mM）とバナジウム濃度が上がるにつれ接着範囲が広がる（図31）。壁性目のバナジウムを濃縮しないホヤ類はユウレイボヤに似た狭い範囲の接着か、マボヤにみられる仮根と呼ばれる被囊が変形した根状の組織で支持体に絡みつくようにしながら接着する。筆者はこの様式の違いに着目し、接着部位およびその近辺のバナジウム濃度や、接着の様式を調べることにした。

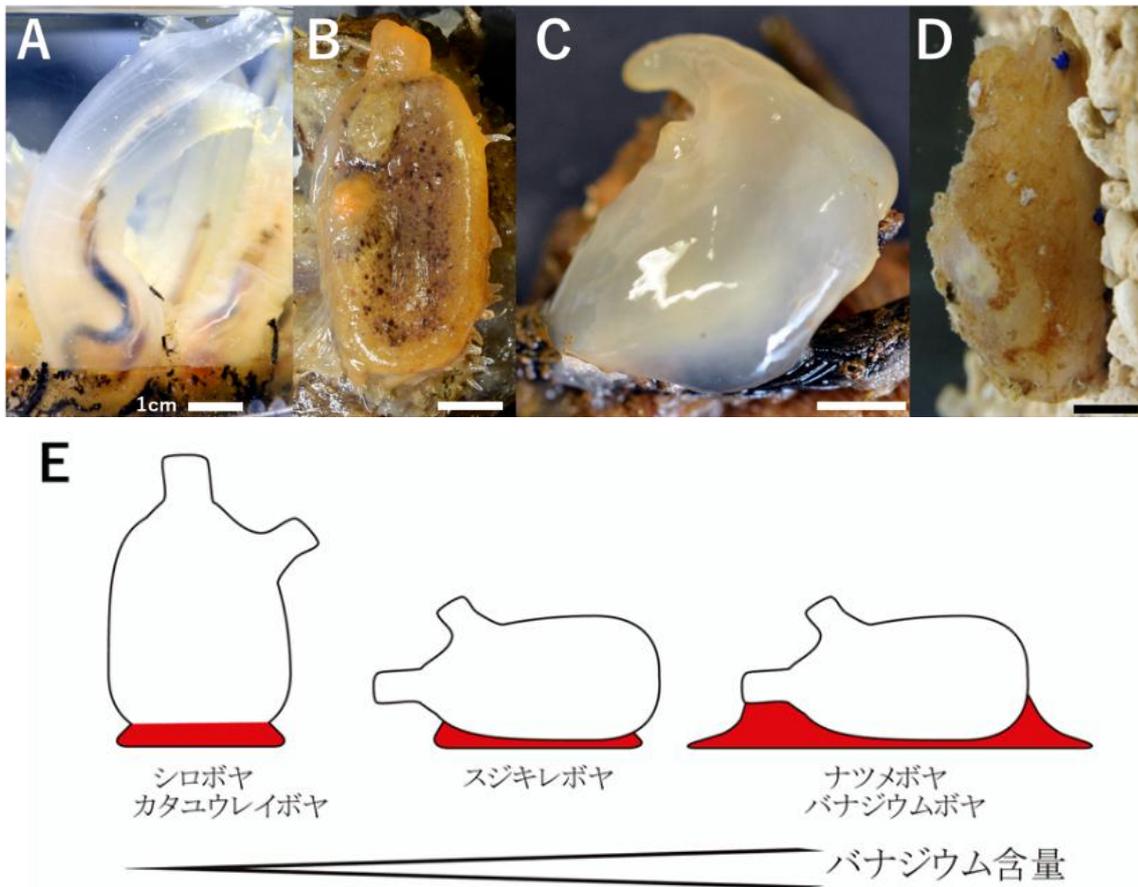


図 31 ホヤの種類とバナジウム含量、接着様式の関係

(A) カタユウレイボヤ(*Ciona intestinalis*) (B) スジキレボヤ(*Ascidia sydneiensis samea*) (C) ナツメボヤ(*A. ahodori*) (D) バナジウムボヤ(*A. gemmata*) (E) ホヤの種類と接着様式模式図

## 第 2 節 被囊のセルロースと被囊細胞について

ホヤはセルロースを合成する唯一の動物である。セルロース合成とバナジウム濃縮に対する関係性は示唆されていないが、動物性セルロースはホヤのみが持つ極めて珍しい特徴であり、生物学的にも一般的な興味をひかれる部分でもあると思われる。また、筆者も関連研究にほんのわずかではあるが貢献してきたと考えているため、横道に逸れる形ではあるが簡単に解説する。

被囊内部にはツニシンと呼ばれる動物性セルロースからなるマイクロフィブリルが存

在し、このセルロースはほぼ I  $\beta$  型であり<sup>32)</sup>、表皮細胞被囊側表面の細胞膜上において直線状の TCs (terminal complexes, 合成酵素複合体) により太い高結晶性のセルロースマイクロフィブリルとして合成される<sup>33)</sup>。ホヤのセルロースマイクロフィブリルはランダムな方向に網目のように伸びており、植物のように一定の方向性を持って整列しないとされている。他の生物のセルロースと比べると結晶型の違いだけでなく、TCs を構成する顆粒に大小 2 種があり、繊維の断面の形が平行四辺形となるといった違いも見受けられる<sup>34)</sup>。

ホヤのセルロース合成には CesA という遺伝子の産物が関わると考えられており、この遺伝子の機能が失われるとカタユウレイボヤでは変態の異常を引き起こし、変態イベントの一部(体軸の回転)を行いながらも尾部吸収と付着ができずに泳ぎ続ける変異体 swimming juvenile (泳ぐ幼若体の意)を生じる<sup>35)</sup>。この変異体において、被囊中のセルロース量は激減していることから、CesA はホヤのセルロース合成酵素であると結論付けられた。この遺伝子の起源を探ることで、セルロースがどのような経緯でホヤにもたらされたかを探ることができるが、分子系統学的手法による解析結果からはやや複雑なヒントがもたらされた。この遺伝子はセルロース「合成」酵素領域のみならずセルロース「分解」酵素に似た領域も保持しており、それらの起源は同一ではなく、セルロース分解酵素領域は *Streptomyces* 属のものに近く、セルロース合成酵素領域はシアノバクテリアの同酵素に近いという推論が導き出された<sup>36)</sup>。統計的にやや不確実な部分があるが、別々の細菌から水平遺伝によってそれぞれの領域がもたらされ、後に一つの遺伝子として融合した可能性が考えられている。この研究は筑波大学白浜臨海実験所の笹倉教授によって行われたが、この時期に筆者がカタユウレイボヤを定期的に送り届けており、向島臨海実験所への謝辞が掲載されていることから多少の貢献はできたのではないかと思う。

被囊はセルロースだけで構成されるのではなく、被囊細胞と呼ばれる複数の形態を持つ細胞も存在する<sup>37, 38)</sup>。種によっては微小骨片を含むこともある。各々の被囊細胞の役割や細胞系譜はいまだ未解明の部分が多いが、食細胞や硫酸イオンを濃縮しているブラッダー細胞、セルロースを合成するグロメルロサイト、共生藻(原核緑藻プロ

クロロン) を保持する細胞や発光細胞 (*Clavelina miniata*) 等では研究が進んでいる<sup>39~43)</sup>。被囊細胞はある程度自由に被囊内を動き回ることができ、細菌等の感染によって炎症様反応が生じた場合は体内の血球が被囊に入り込んで食作用を行うことで生体防御反応を高めることも知られている<sup>44)</sup>。

さらに余談ではあるが、ホヤは体部を食用としているのみならず、被囊さえも食用とされることがある。九州(福岡)でハルトボヤの被囊を味噌漬けとして<sup>45)</sup>、東北ではスポヤの被囊内層を塩蔵して保存し、塩抜き後に味噌や梅酢、酢醤油で食べたとされている<sup>46)</sup>。さらに工業的な利用としてはスピーカー(Scepter 1001, ONKYO)の振動板の材料として使われ1993年に発売されており、柔らかい低音域が特徴とされていた。また近年では東北大学においてマボヤセルロースナノファイバーを炭化させ、燃料電池、金属空気電池やグリーン水素を製造するための水電解システム用電極触媒として活用する取り組みも進められている<sup>47)</sup>。他にもマボヤ被囊からのL-乳酸生産<sup>48)</sup>や、代替プラスチック材料としての研究も進められている。

### 第3節 ホヤ被囊の構造解析(光学顕微鏡レベル)

自然の海から採集してきたホヤは基質に強固に接着しており、剥がすと接着面が破壊される。さらに薄切しようとするとも被囊中に混入、或いは表面に付着している砂や石灰質によってミクロトームやガラスナイフの刃が痛み、薄切面が無数のナイフマークで乱れてしまう。そこで薄切可能な柔らかい基質にホヤを人工的に付着・接着させて飼育して新たにきれいな接着面を再生させ、微細構造を壊さないように基質ごと薄切する手法を試みた。基質としてはDNAやRNAを転写する際に使用するニトロセルロースメンブレンやナイロンメンブレン、一般的なチャック袋として使われるポリエチレン等を試した。それらの基質を敷いたシャーレに剥がした成体のホヤの接着面を輪ゴムで軽く押し付けるように保持し、2週間ほど飼育して再接着を試みた(図21)。また接着面を再生させるのではなく、6月の産卵期にナツメボヤ・スジキレボヤから採卵して発生させたオタマジャクシ幼生を、同じく基質を敷いたシャーレに入れて付着させ、ろ過海水で飼育下して成長させたものも用いた(図32)。それらのホヤの接着

部（腹側）と非接着部（背側）の被囊約 1cm 四方程度を基質ごとカミソリで切り取り、固定液（4% パラホルムアルデヒド, 0.5 M NaCl, 0.1 M MOPS pH7.5）中で一晩固定してエタノールシリーズで脱水した。その後パラフィンに包埋してマイクロトームで 4~8  $\mu\text{m}$  に薄切した。薄切片はスライドグラスに乗せて脱パラフィン処理を行ってから HE（ヘマトキシリン・エオシン）染色を行った。薄切および染色方法は一般的な手法に従ったため省略する。

HE 染色切片観察の結果、被囊の厚さは非接着面で薄い傾向が見られた（図 22A, C）。それとは逆に接着面では外界との境界に厚みのある層がある（図 22B, D）。特にナツメボヤにおいてエオシン染色性が高い物質が分泌されたように見える（図 22B）。この接着面の境界近くには小さな細胞、あるいは顆粒が集合している様子が確認された。また、被囊内には幅 50  $\mu\text{m}$  程のブラッダー細胞と呼ばれる液胞が大部分を占める細胞が高い頻度で見受けられるが、この細胞は非接着面の外界側に特に偏って存在する（図 33A, B）。この液胞中には硫酸イオンが多く含まれていることが知られており、他生物からの防御に寄与すると考えられている 6)。ブラッダー細胞以外の被囊細胞の種類は光学顕微鏡の倍率では識別できなかった。ホヤ類の被囊は HE 染色での識別性に乏しいため、光学顕微鏡での細胞識別には適切な染色方法を検討する必要がある。



図 32 基質に付着させたナツメボヤ (A) メンブレンに接着 (B) ポリエチレンフィルムに接着。接着面（腹側）から撮影。矢印は被囊内の血管（あるいは神経管）と思われる管状構造。

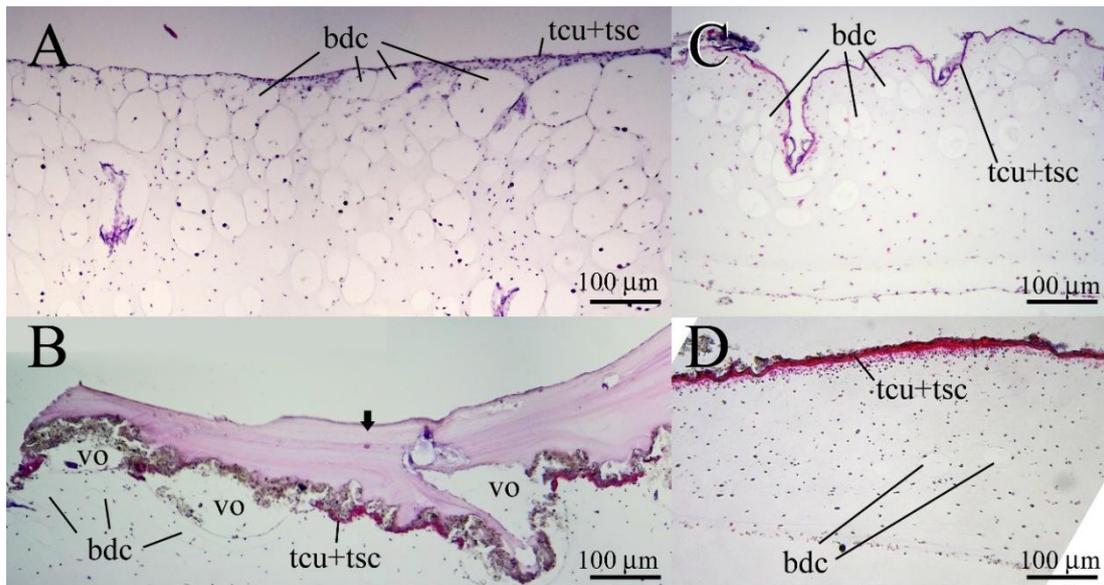


図 33 基質から丁寧にはがしたホヤ類の被囊接着面および非接着面の HE 染色像

(A) ナツメボヤ非接着面 (背側) (B) ナツメボヤ接着面 (腹側) (C) スジキレボヤ非接着面 (背側) (D) スジキレボヤ接着面 (腹側) bdc; Bladder cells (ブレッダー細胞)、tcu; tunic cuticle (被囊キューティクル)、tsc; tunic sub cuticle (被囊サブキューティクル)、vo; void space (空隙)

#### 第 4 節 ホヤ被囊の構造解析 (透過型電子顕微鏡レベル)

光学顕微鏡レベルでは各被囊細胞の様子や接着面の微細構造が良くわからないため、電子顕微鏡での観察を試みた。観察材料はナイロンメンブレンに付着させて生育させた 7~10 mm 程度の小型のスジキレボヤとナツメボヤを丸ごと使用した。接着部位を無理に剥がさないように基質ごと 4%グルタルアルデヒドで固定し、小池香苗契約技術職員の全面的な協力を得ながら一般的な手法に基づきエタノールシリーズで脱水後に EPON 812 樹脂包埋、メンブレンごと超薄切してトルイジンブルー染色、酢酸ウラニル電子染色等を行い透過型電子顕微鏡 (JEM-1400, JEOL) により観察した (図 34)。

電子顕微鏡観察の結果、接着面と非接着面を比較すると、接着面には厚さ 100 nm 程の電子密度 (染色性) の高い層が観察される (図 35)。接着面近傍では何かを分泌しているような管 (図 36A) や複数の液胞を持つアメーバ細胞のような構造 (図 36B)、さらに何かを被囊外に放出した後のような画像が見られた (図 36C)。

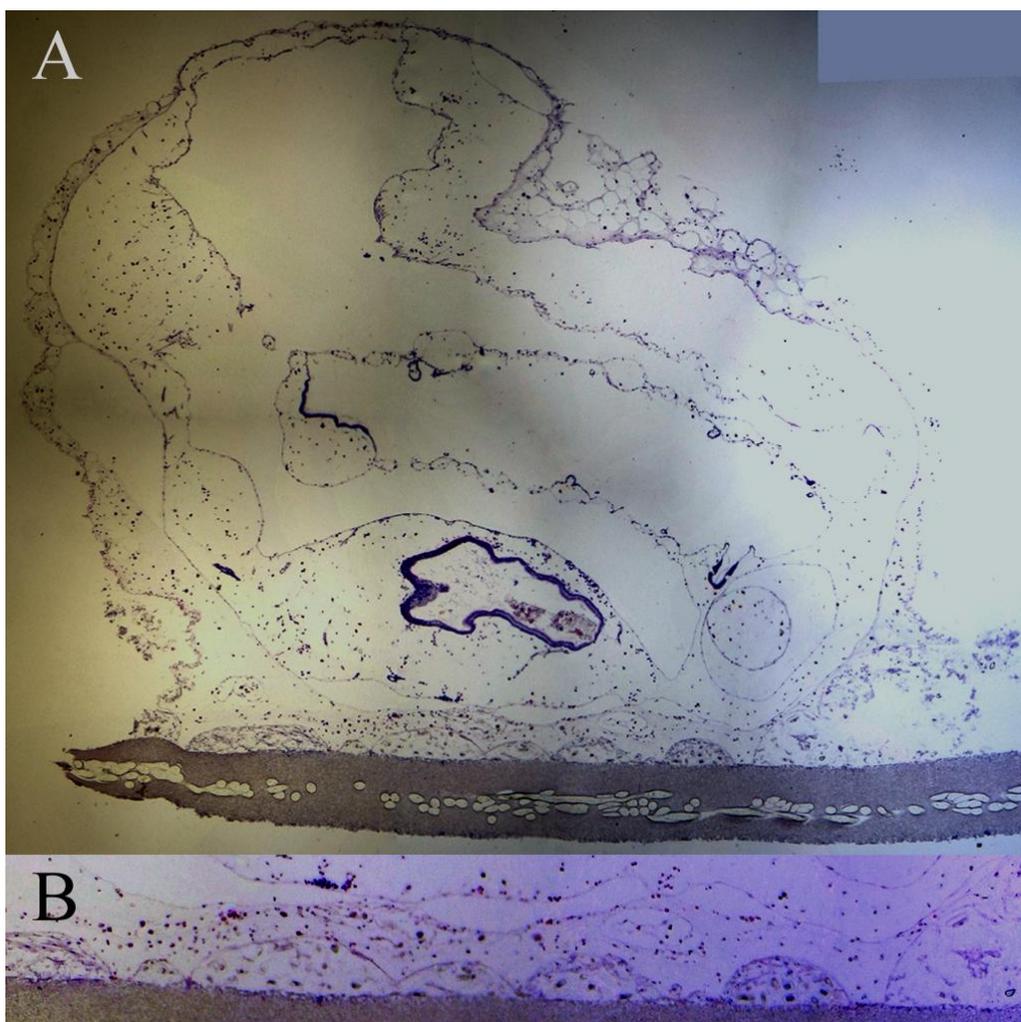


図 34 メンブレン上で生育させたナツメボヤのトルイジンブルー染色画像。同じサンプル由来の切片を電気顕微鏡でも観察した (A) 横断面 (B) 接着部位拡大

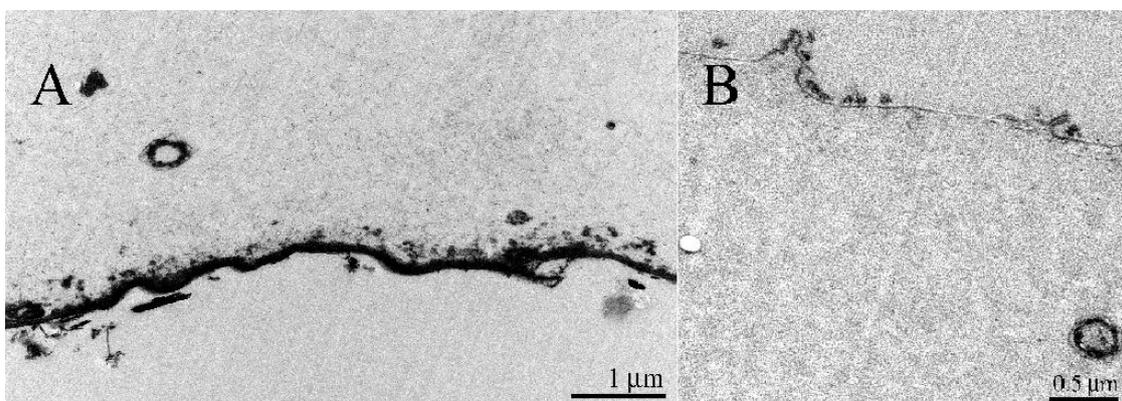


図 35 ナツメボヤ接着面および非接着面の比較  
(A) 接着面 (上側が体部、下側が基質) (B) 非接着面 (上側が海水、下側が体部)

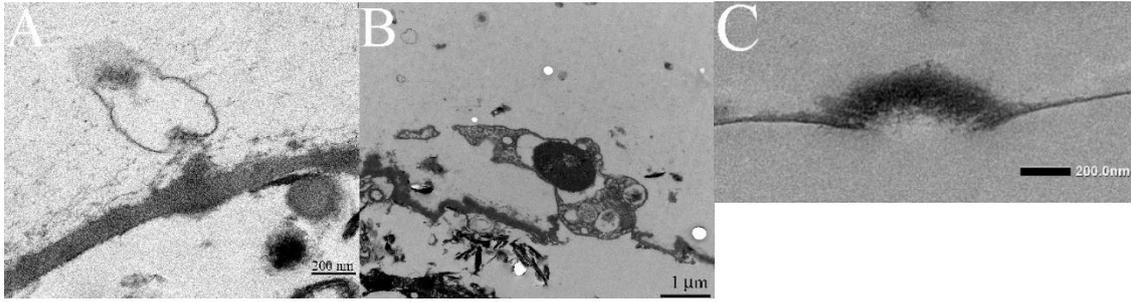


図 36 ホヤ類の接着部位における構造体

(A) スジキレボヤ接着部位 (B、C) ナツメボヤ接着部位

接着面にフォーカスして電子顕微鏡で観察すると、様々な構造や被囊細胞が見られた。接着面は基質に対して均一にべったりと接着しているのではなく、橋梁のような構造で接着していることが分かる (図 37A、B の矢印部分)。接着面近くには顆粒のような構造 (図 37C、D) が比較的密集しているように見え、さらには被囊と基質の間にやや電子密度 (染色性) が中程度の構造で満たされており、おそらくは分泌され固化した後の接着物質と考えられる (図 37D 黒矢印)。さらに接着面付近には微小管のようにも見える構造が密集し (図 37E、I、J)、被囊の外にポツポツと電子密度 (染色性) が高めの構造が並び (図 37F、白△部)、被囊の最内側も電子密度 (染色性) が高めの構造が見られる (図 37G)。接着面近くで接着に関わっていない被囊部分の厚みは薄い部分が多く (図 237H)、ホヤ表皮細胞と被囊の最外面は同程度の電子密度 (染色性) があると想定される。この電子密度 (染色性) が電子染色の選択性に寄るものなのか、あるいは実際に金属のような電子密度が高い物質が集積されているのかは今のところよくわからない。この辺りは染色を工夫する必要がある。セルロースマイクロフィブリルについては、TEM では白く抜けた画像となってしまった。各構造とセルロースマイクロフィブリルの位置・配向関係を把握するためにも染色方法は要検討である。

被囊細胞については実に多様なものが見られる (図 37K~R)。中にはバナドサイトに似たような巨大な液胞を持つものが見られるが、透過型電子顕微鏡画像だけでは審議を判断できず、固定しているためにバナジウムも流失しており別の方法を考える必要に迫られた。

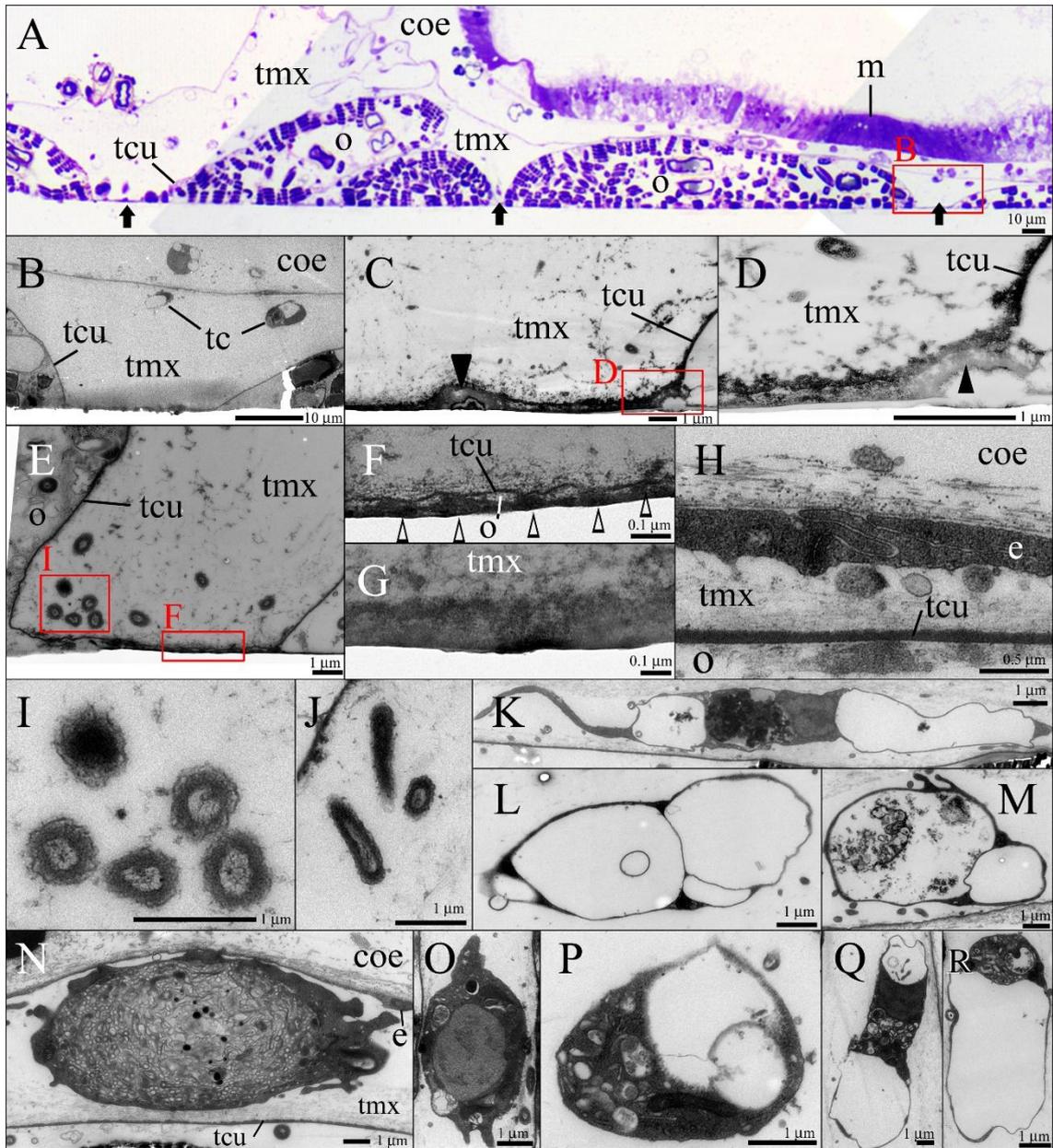


図 37 ナイロンメンブレン上で生育させたナツメボヤの顕微鏡写真。

(A) トルイジンブルー染色した接着部位画像。一面に満遍なく接着せず黒矢印の部分でスポット的に接着している (B~C) 被囊接着部拡大、顆粒のような構造や各種被囊細胞がみられる (D) 接着部 C をさらに拡大したもの。被囊近傍に接着物質らしきものがうっすらと染色されている (E) 接着部における被囊細胞あるいは微小管と思われしき構造 (F) 接着部 E の一部を拡大したもの。白矢印は被囊部分でもさらにコントラストが高い部分が連続的に見られている (G) 接着部近傍の拡大。0.1~0.2  $\mu\text{m}$ 程度

コントラストがやや高めの部分が接着部側に存在 (H) 被囊と筋膜、細胞膜と体腔が極めて狭い範囲で見られる場所。細胞同士を繋げるタイトジャンクション様の構造が見られる (I, J) 被囊内の微小管らしき構造 (K~R) 各種被囊細胞。名称などは定まったものがないため、ここでは分類を避ける。coe: coelom(体腔)、tmx: tunic matrix (被囊基質)、tcu: tunic cuticle、m: mantle(筋膜)、e: epithelial cells (上皮細胞)、o; out of the ascidian body(体外)、tc: tunic cell(被囊細胞)、bc: blood cell(血球)

### 第5節 Cryofilm 法による凍結切片

ホヤ被囊による接着と元素の関係を見るためには、元素が抜け出ていない状態の切片を得る必要がある。しかしながらホルマリン等による化学固定やエタノール等による脱水を行うと可溶性の元素は細胞外に流れ出てしまう。そこで「あるがままの状態」を分析するために、未固定のまま液体窒素でホヤ被囊を凍結させ、クライオスタットによる凍結切片の作製を試みた。しかしながら未固定の海水を含むサンプルでは凍結切片がシャーベット状に崩壊するため、Cryofilm (Leica)を用いて作製を試みた。フィルム貼り付けで薄切は可能となったが、やはり切断面が崩れやすく、フィルム片への接着時の温度管理、薄切片の凍結状態の維持と乾燥にも難があった。さらに海水に含まれる塩が試料表面で結晶化して微細構造観察を妨げる問題もあり、本法は断念した。

### 第6節 Cryo-SEM による凍結切断面の観察

未固定サンプルの解析を行う別の手法として、小型の成体を生のまま液体窒素で凍結後に Cryo-FE(Field Emission)-SEM(Scanning Electron Microscope)である JSM-7800F (日本電子)の真空チャンバー内で割って断面を観察する凍結切断法を用いた。実際にはサンプルを1 cm程度の試料台の上に乗せて保定し、チャンバー内での切断後に断面を上に向けなければならない。そのため、予め切断面が上に向くようにサンプルを保定・凍結してからチャンバーに入れ、真横からメスを当てて切断することとした。既存の試料台はそのような用途に適していないため、アルミ製試料台の加工を本学学校工場の石飛技術専門員および野口技術専門職員に相談・お願いした。いくつか

の試作品を試し、最終的に図 38 のように穴あけ加工したものが最も安定して作業することができた。この凹部分に OCT コンパウンドを流し込み、そこにホヤを半分程度埋め込んでから液体窒素にて凍結させるとホヤを保定できるようになる。JSM-7800F の操作では福場郁子技術職員のご協力を頂いた。その断面の全体像を図 39 に示す。この手法でホヤを丸ごと凍結切断すると切断時にそれなりの力が必要でひび割れが生じ、断面も荒くなってしまう。そこで切断にはできるだけ小さなサイズのナツメボヤ成体を用いることとした。断面にはプラチナ蒸着を施して伝導性を持たせ、SEM 観察を可能にした。

これらを観察すると、電子顕微鏡像とは異なり被囊部分には明瞭なセルロースミクロフィブリル構造が確認できた (図 40A)。さらに被囊とナイロンメンブレンの接着が密であること、TEM 像で見られたように 5  $\mu\text{m}$  程度の球状の物体も被囊内に確認された。また、接着面側で接着していない (浮いている) 部分の薄い被囊部分に血球のようなものが詰まっている被囊内血管と思わしき袋状の構造が見えた (図 40B 中央部赤矢印)。

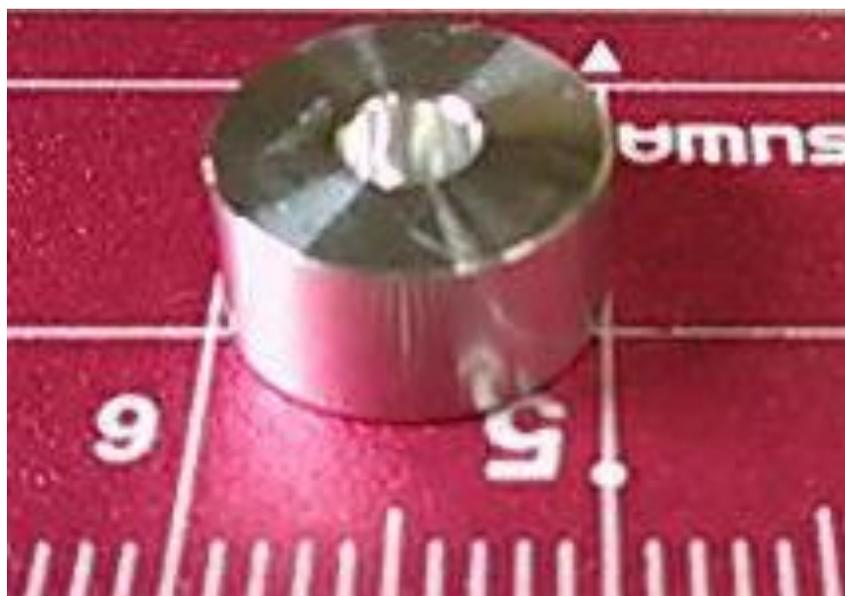


図 38 FE-SEM 試料台の金属加工。ホヤ被囊を埋め込んで固定するために中央に幅 2~3 mm 程度で深さ 3~4 mm 程度の穴を開けて頂いた。

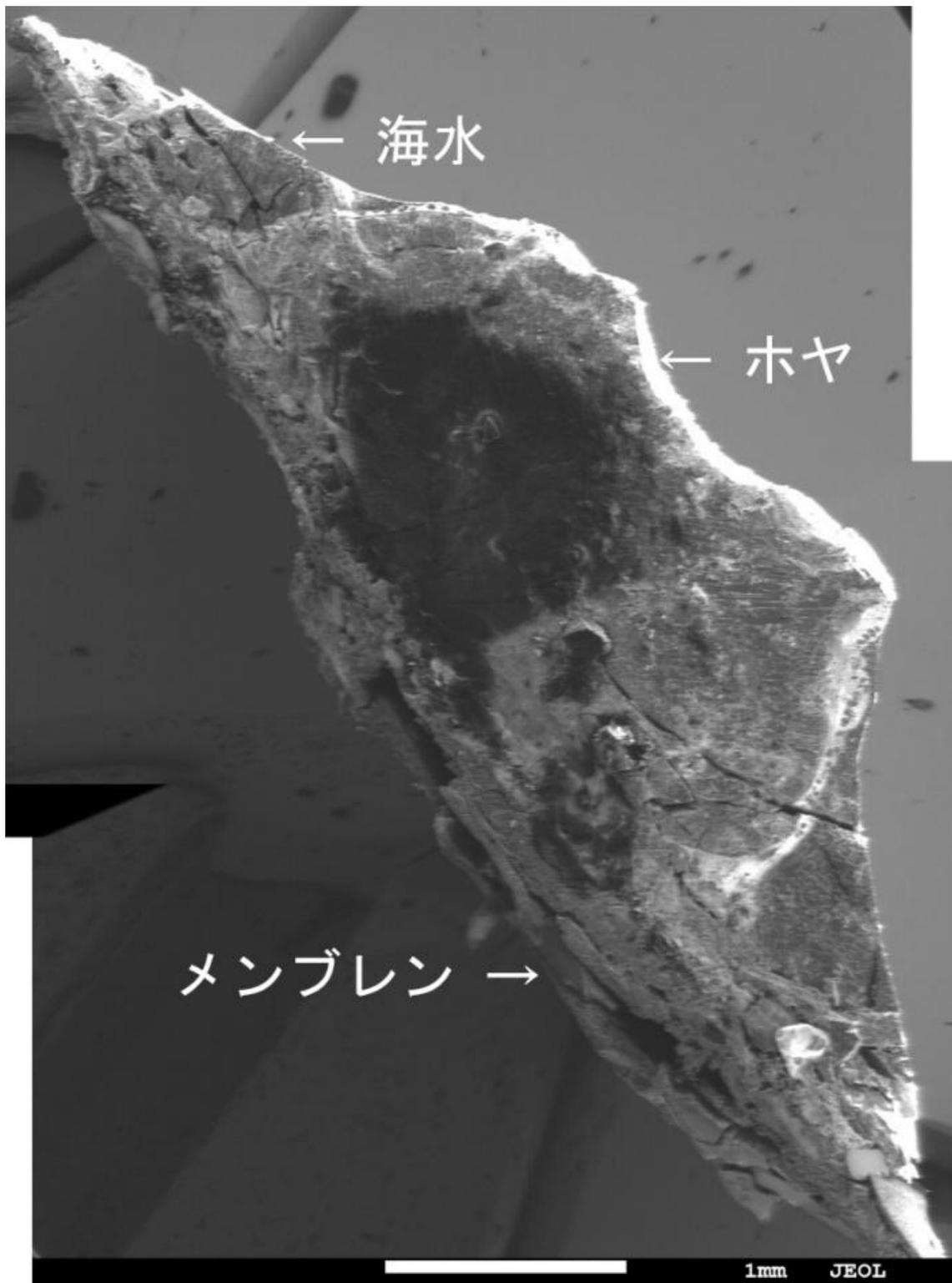


図 39 凍結割断した小型のナツメボヤ成体。割断はできたもののあちこちにひび割れが見られ、割断面もやや粗い。

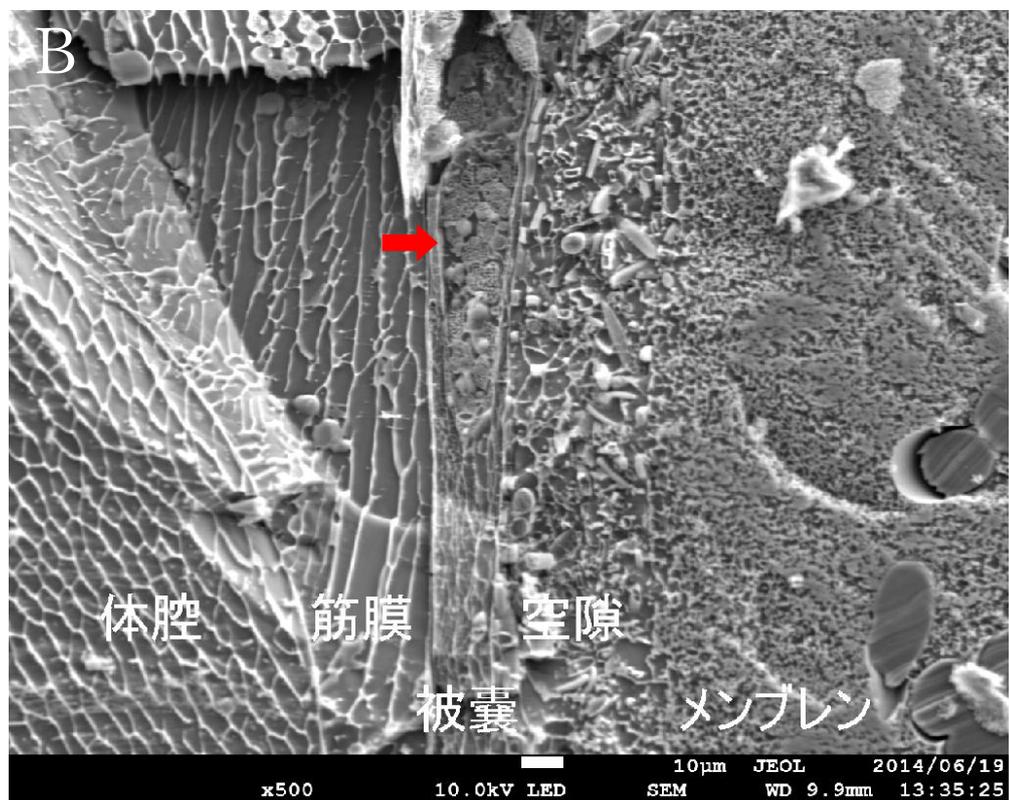
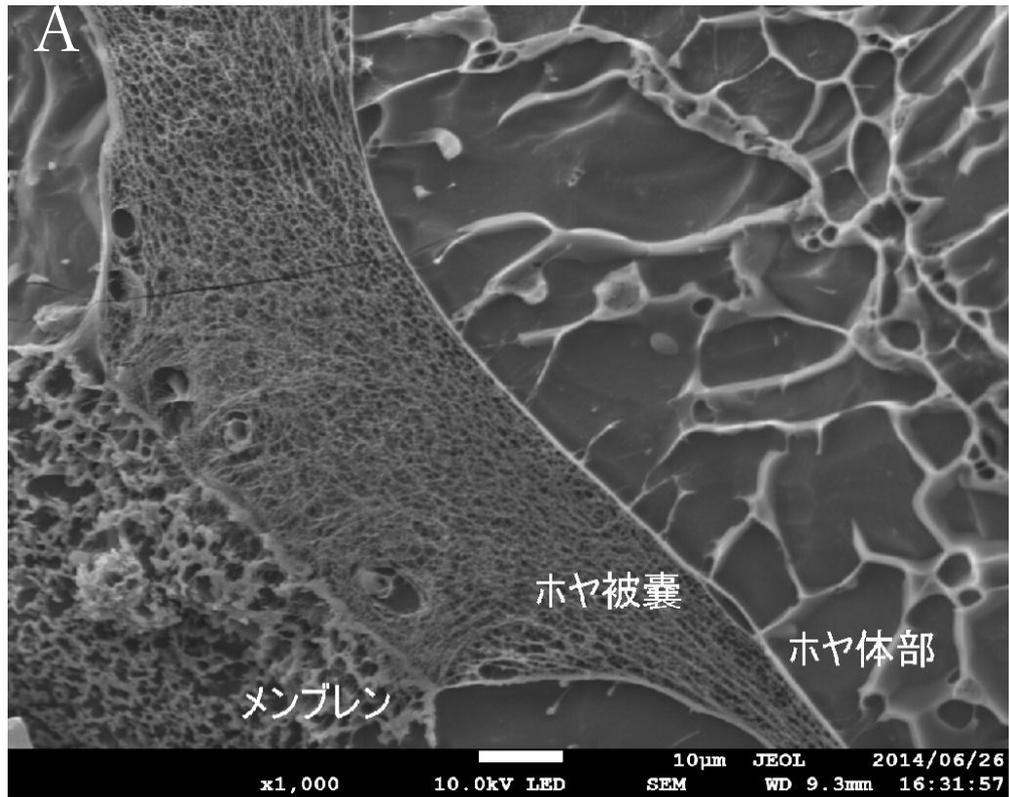


図 40 凍結切断した小型のナツメボヤ成体断面

(A) メンブレン接着部 (B) 近傍のメンブレンから少し浮いた接着面 (腹) 側の被囊

## 第7節 接着面の元素分析

接着面の TEM 像および SEM 像だけではバナジウムの有無が分からないため、JSM-7800F 付属のエネルギー分散型 X 線分光 (EDS: Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) 装置で元素分析を行った。まず、確実にバナジウムがあるとわかっているナツメボヤ血球を試料台に塗布して同様に凍結処理等 (割断はせず) を行ってから EDS で観察した結果、図 41 の様にシグネットリング細胞にのみバナジウムとカウンターイオンである硫黄のシグナルが得られ、60mM あれば十分に検出できることが確認でされた。

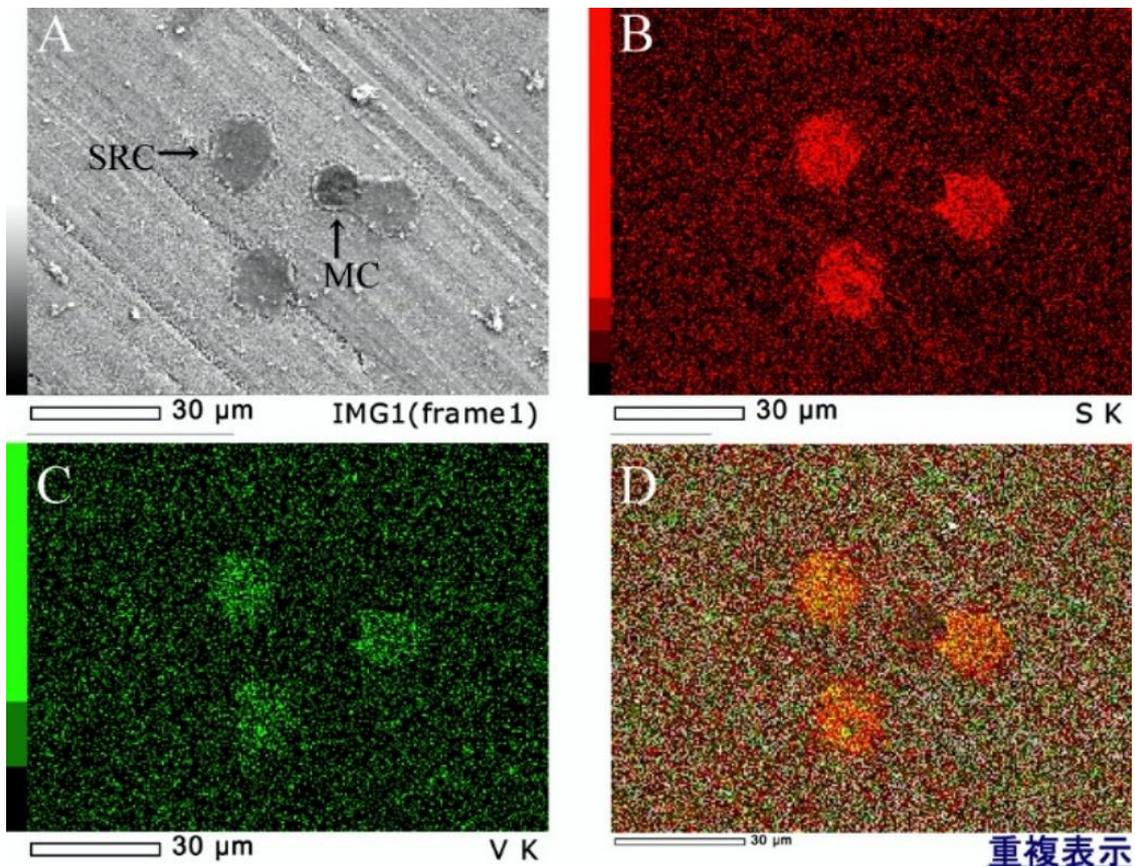


図 41 ナツメボヤ血球の EDS 解析

(A) FE-SEM 像、SRC: signet ring cell(vanadocyte), MC: morula cell (B) EDS 像 (硫黄 S 由来の K 線) (C) EDS 像 (バナジウム V 由来の K 線) (D) EDS 像 (SK と VK をマージしたもの)

次にナツメボヤ接着面被囊の凍結断面を EDS 観察すると、図 42 のような接着面には特にバナジウムが高濃度に存在する様子は見られなかった。ただし検出限界を下回るバナジウムの沈着の可能性までは否定できない。

根気よくバナジウムのシグナルが得られる場所を探したところ、図 43 の接着面側の薄い被囊内にある被囊血管と思わしき細長い袋状の構造の内部に、長さ 10~15  $\mu\text{m}$ 、幅 6~8  $\mu\text{m}$  のラグビーボール状の構造体があり、その部位にバナジウムと硫黄が検出された。今回検出されたバナジウムを含む構造はシグネットリング細胞とは形状がやや異なるように見受けられるが、大きさは大体位一致する。もう少し観察例を増やしたかったが、Cryo-SEM の利用料が 1 時間 5000 円を超える高額であったことや、次の産卵シーズンを待つ間に異動となったため、これ以上の解析は遂行できなかった。

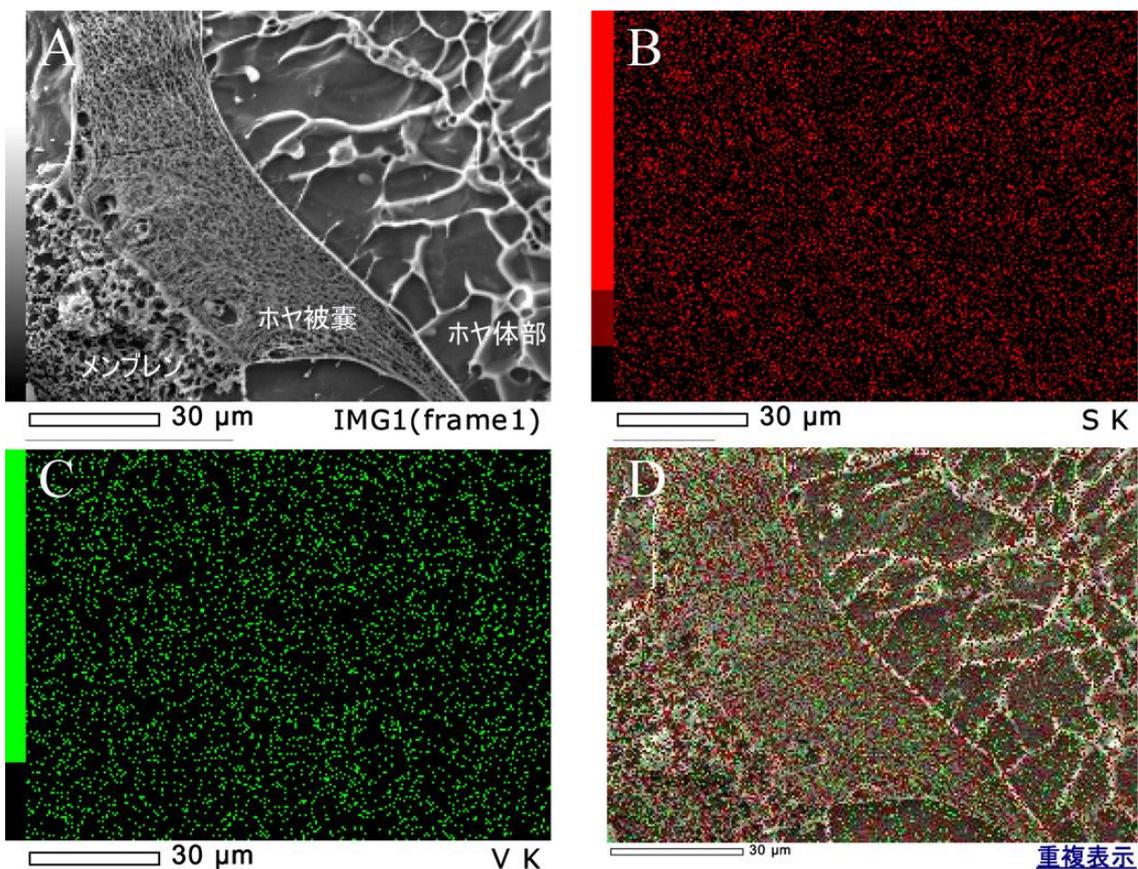


図 42 被囊接着部の EDS 解析 1

(A) FE-SEM 像 (B) EDS 像 (硫黄 S 由来の K 線) (C) EDS 像 (バナジウム V 由来の K 線) (D) EDS 像 (SK と VK をマージしたもの)

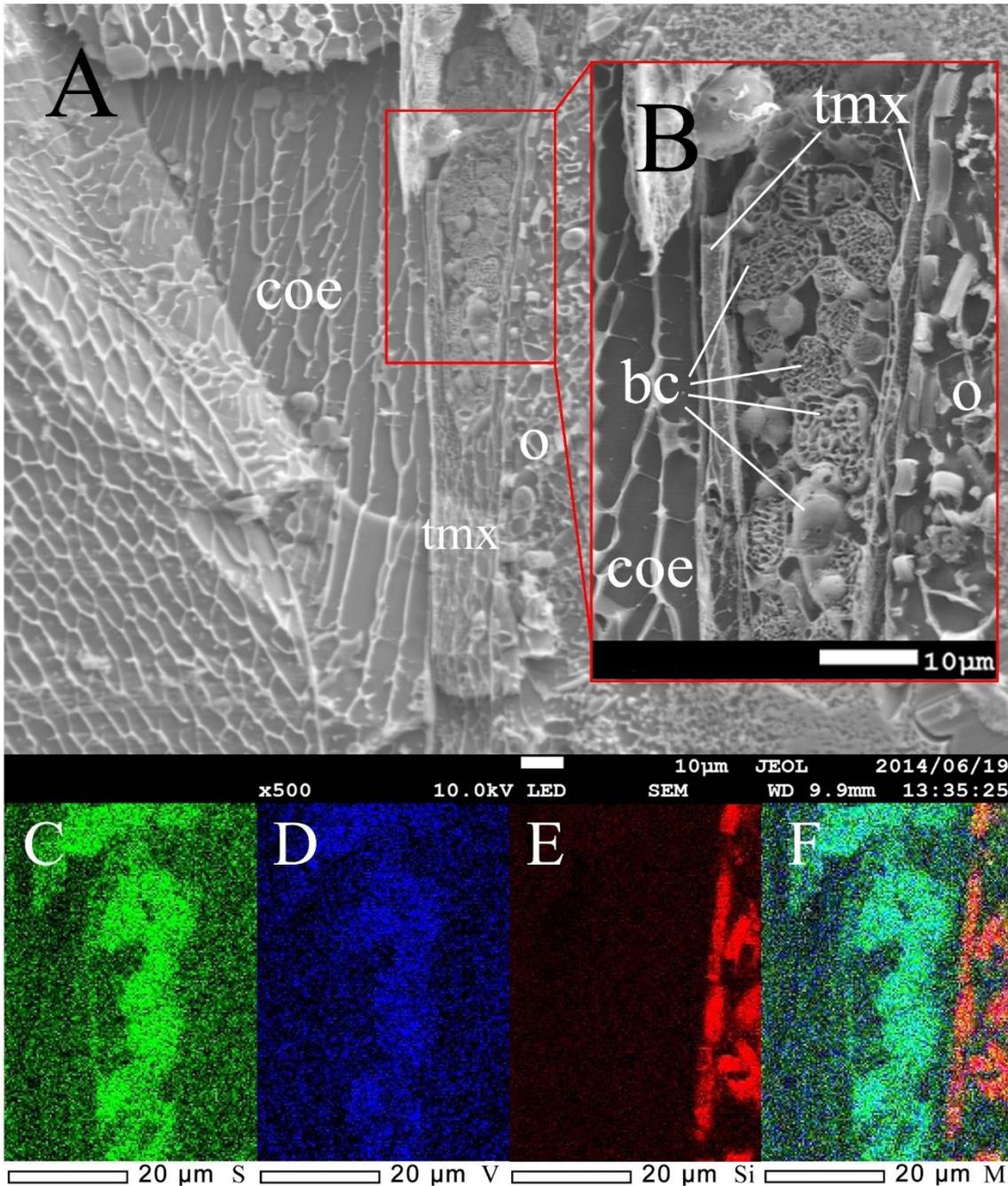


図 43 被囊接着部の EDS 解析 2

(A) FE-SEM 像 (B) FE-SEM 像 (拡大) (C) EDS 像 (硫黄 S) (D) EDS 像 (バナジウム V) (E) EDS 像 (珪藻殻主成分であるケイ素 Si 由来) (F) EDS 像 (S、V、Si をマージしたもの) coe: 体腔、tmx: 被囊基質、o: 体外、bc: blood cell(血球)

## 第 8 節 ホヤの接着突起について

ホヤは前述の通り、幼生期の浮遊生活の最後に頭部先端の付着突起によって基質に固着する。付着突起には接着剤のようなものが分泌されているとされるが、その組成は不明である。その後は幼若体被囊が触手状に伸びて接着範囲を広げることまでは知られているが、成体の接着範囲の広げ方はあまり報告されていない。10 年以上にわたる筆者のホヤの飼育経験、特に一度基質から剥がした後の観察から、剥がした成体の付着面から小さな突起状のものが生え始め、それが基質への再接着に寄与していることに気が付いた。その大きさ（長さ）は種によって異なるが、径は約 1 mm 程度で色は成熟した被囊に比べて透明に近い。形は柱状であるが、先端あるいは途中で二又、三又に分枝することもある。接着済の個体でも接着面付近から突起が出現しており、接着面を広げることの特化していると思われた（図 44）。似た構造にマボヤの仮根とがあるが、仮根は基質に絡みついた後も仮根としての形状を保っており、被囊と同じような構造に変化することはない。筆者はこの突起を付着突起（Adhesive papilla）や仮根（root）と区別するため接着突起（Adhesive projection）と名付けた。

接着突起の内部には数  $\mu\text{m}$  程度の小さな細胞あるいは顆粒が見受けられる。付着突起は幼生頭部にしか存在しないが、接着突起は接着面（腹側）から複数出現する。機能面の比較としては、ほぼ瞬時に接着する付着突起に対して接着突起による再接着は数日以上時間を要する。実際に触っても特にベタベタするような感触はない。

ホヤの接着とバナジウムとの関係を探るには、季節に左右されず比較的量が多く採れる接着突起は極めて都合が良い。ただし種によって接着突起の大きさや数は異なる。バナジウム濃度が高いバナジウムボヤはそもそも採取数や飼育が難しく、ナツメボヤも剥離後の生存率があまり良くなく、接着突起も 1mm 未満のかなり短いものしか形成しない。ゲノム解析が終了していたカタユウレイボヤはバナジウム濃度が低いうえに寿命が短く、接着突起の形成は若いホヤがほとんどであることからやや難があった。これらの事から目立った接着突起を形成しやすく、剥離後の生存率も比較的良好なスジキレボヤにフォーカスして接着突起の解析を行うことにした。

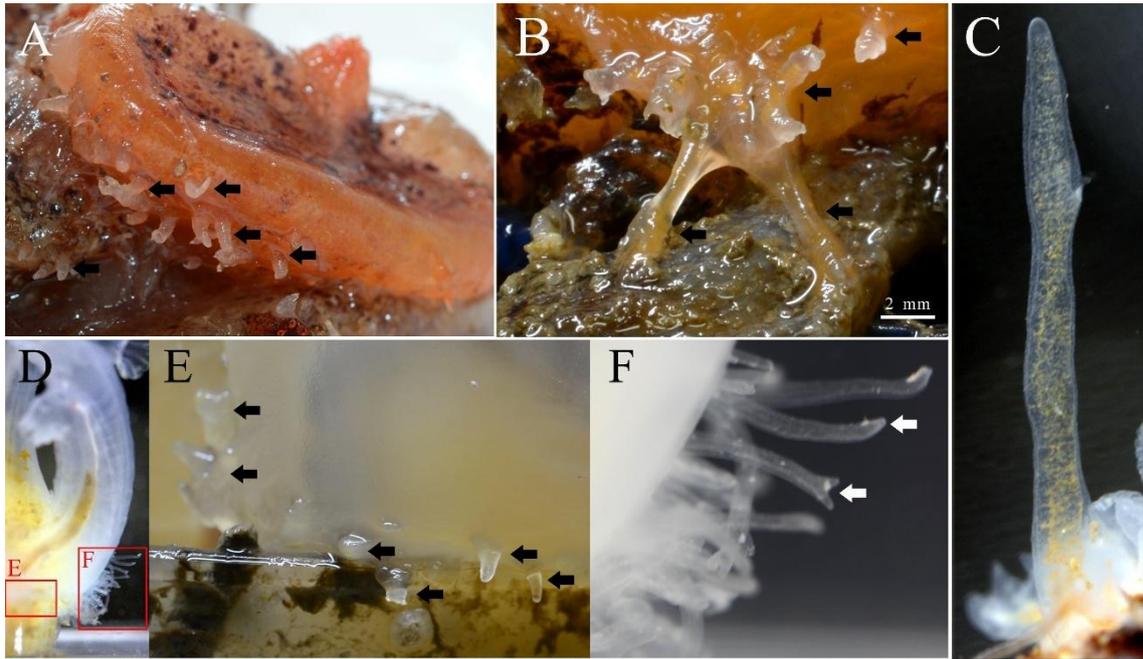


図 44 スジキレボヤとカタユウレイボヤの接着突起

(A~C) スジキレボヤの接着突起 (D~F) カタユウレイボヤの接着突起

### 第 1 項 ホヤ接着突起の人工的な誘導

スジキレボヤ接着突起は解析に都合が良いものではあるが、天然のスジキレボヤに接着突起が必ずあるわけではなく、あったとしても砂や他の生物などの様々な付着物が付いてしまっている状態であることがほとんどである。剥離後の被囊腹側に接着突起が生じやすいが、それでも必ず理想的な大きさの接着突起が出るわけではなく、突起を伸ばす前に近隣の基質やホヤ同士でくっつくことが多い。

そこで腹側の被囊を切除し、輪ゴムとシャーレで傷口ができるだけ物体に接触しないように緩く保定した状態でストレプトマイシン海水中にて培養した。この際には後述するギボシムシ幼生の経験が非常に役に立った。海水温にもよるが、約 5 日後に小さな接着突起が多数形成され、以後 1mm/日の早さで約 10~15mm 程度まで伸長した (図 45)。この手法の利点は接着突起が大量に得られるだけでなく、余分な付着物の影響がない、まさに接着しようとしている若い接着突起を同期的に得られることである。

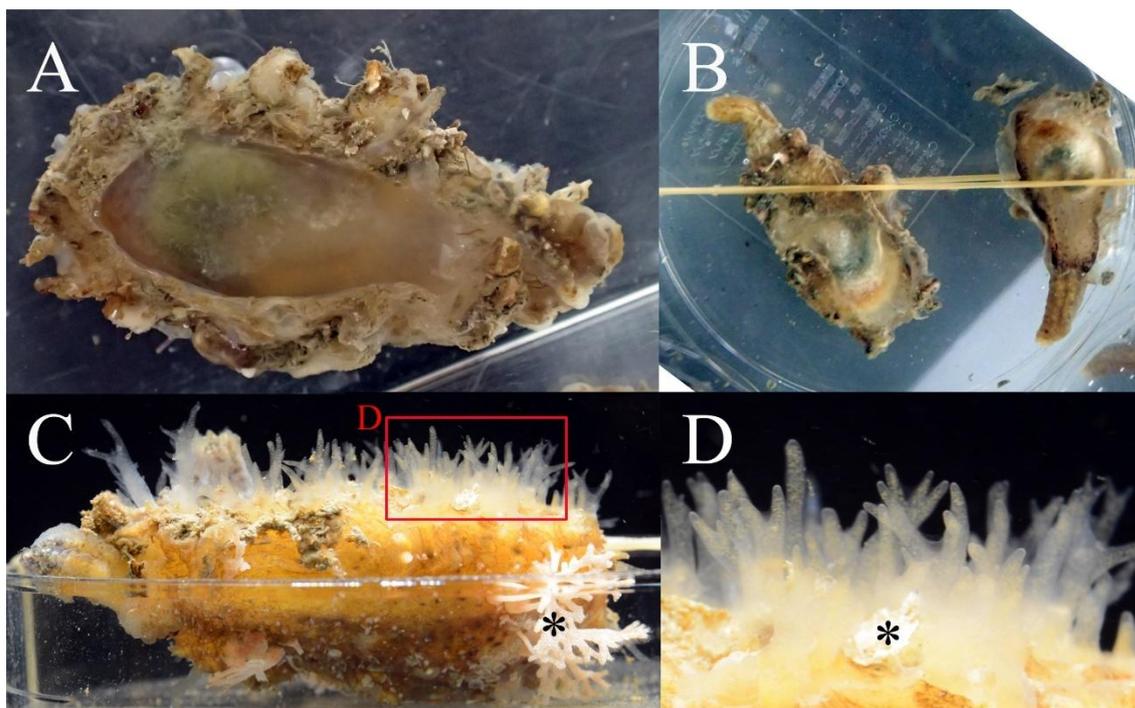


図 45 スジキレボヤにおける接着突起の人工的な誘導

(A) スジキレボヤ接着面（腹側）の被嚢を切除したもの (B) A を輪ゴムで緩く固定、  
 (C) 被嚢切除部から生成した接着突起 (D) 再生した接着突起拡大、\* は手前の被嚢  
 の付着物（貝殻の破片）

## 第 2 項 ホヤ接着突起構造（光学顕微鏡レベル）

ホヤ接着突起の構造を調べるため、まずは光学顕微鏡レベルでの観察を行った。手法はホヤ被嚢の HE 染色と同様に行い、試料として天然のスジキレボヤから採取した接着突起（図 46A, B, I~K、生成後ある程度日にちが経ったと推測されるもの）、被嚢切除後に伸長してきた若い接着突起（図 35C~H）を用いた。図 35A の接着突起縦断面において、中央には被嚢血管ともいえる管状構造 (tv: tunic vessel) があり、被嚢血管壁 (tw: tunic vessel wall) の上皮細胞らしき細胞の核がヘマトキシリンで紫色に強く染色されている。その周囲を被嚢基質 (tmx: tunic matrix) が覆っている。被嚢基質内は極薄くエオシンで薄赤色に染色され、被嚢基質内のタンパク質などが染色されているものと思われる。ところどころに被嚢細胞の核と思われるものが紫に染色されている。巨大な硫酸性の液胞を持つブラッダー細胞 (bdc: bladder cell) は 30~50  $\mu\text{m}$  前

後の色が抜けた楕円形として観察される。最外面は被囊キューティクル (tcu: tunic cuticle) であり、赤色とエオシン染色性が強い部分となる。このエオシン染色性は強弱があり、図 46I~K に見られるように付着物がある周辺で特に強く、その周辺は他の被囊外面に比べて被囊細胞が密集しているように見える。このことは被囊の接着には被囊細胞とエオシン染色性の物質が関与している可能性を示唆する。同様の観察を人工的に誘導した若い接着突起で行ったところ、図 35C の様にエオシン染色性の高い部位がまだ被囊キューティクルに蓄積しておらず、特に先端側では被囊基質内に充満しているような観察像が得られた。この先端を拡大すると、被囊血管の先端から被囊側に細胞が移動しているかのような像が得られた (図 46D)。被囊細胞は被囊内でゆっくりと動き回ることができると言われているが、これらが被囊血管内、あるいは上皮から被囊内に供給されている様子をとらえているものと思われる。この細胞は最外面近くまで移動しているように見え、特に最先端の最外層では接着突起の中間や根元に比べて被囊細胞の密度は高い。このエオシン染色性物質のリッチさと被囊細胞の活性から、接着突起の先端は活動性が高く、接着に備えていることが示唆される。逆に最先端側ではあまりブラッダー細胞が見られず、根元側に行くにしたがって硫酸性のブラッダー細胞が増えることから、生体防御としての機能は後から発現しているのかもしれない。残念ながらブラッダー細胞以外の血管内細胞や被囊血管上皮細胞、被囊の内側と外側にある被囊細胞を明確に識別するには情報が不足しており、それぞれの細胞の性質と役割、細胞系譜等の研究も必要になるものと思われる。さらに様々なパターンの横断面や縦断面を観察すると、接着突起には図 47 の様に共通する 8 層構造が見られる。各層の詳細については電子顕微鏡画像と共に詳述する。このような知見は成熟した被囊や仮根においては報告があるが、今回の接着突起の様に成長や器官形成段階に沿った違いを捕らえているものは私の知る限り初めてのものと思う。

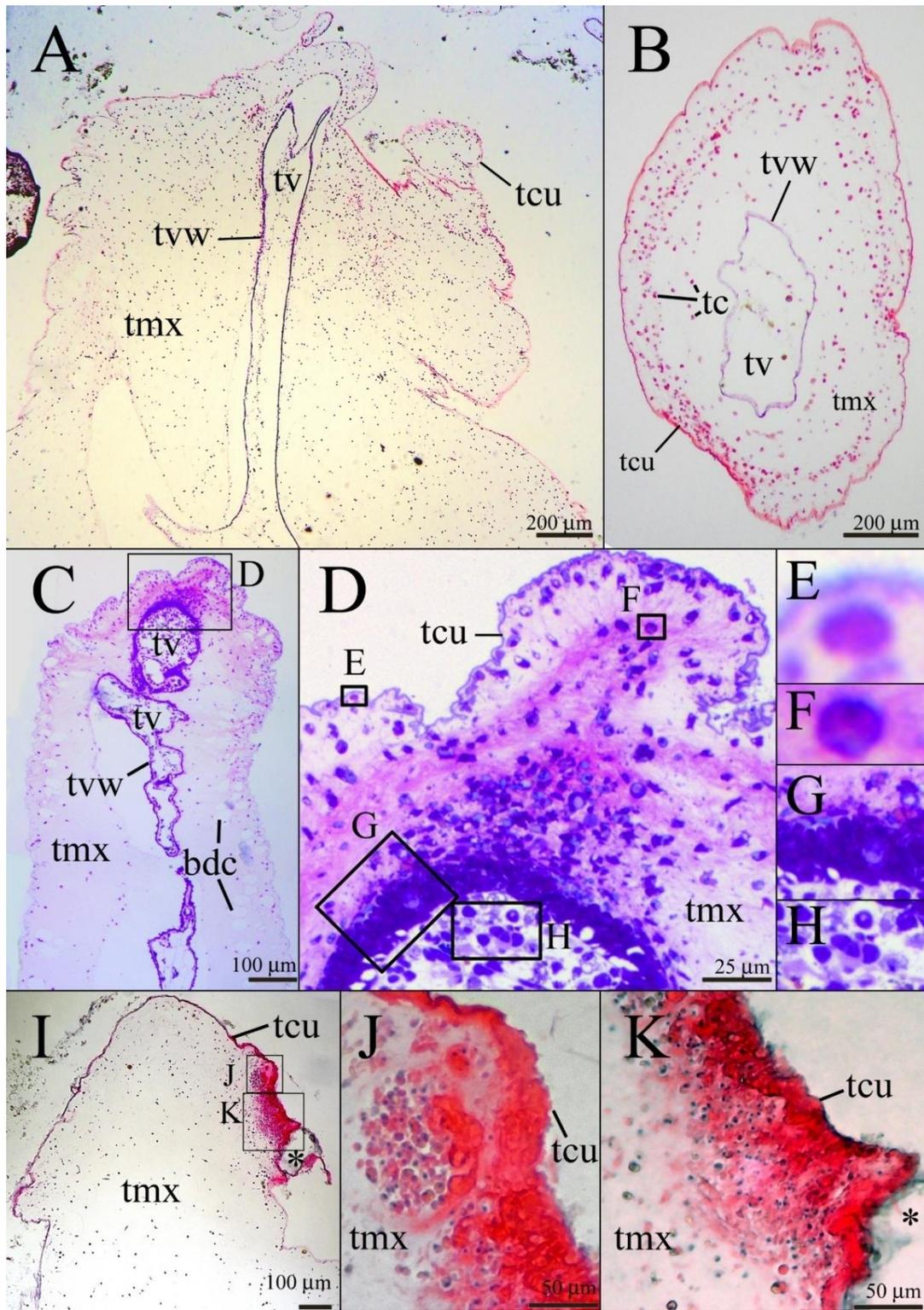


図 46 接着突起の内部構造 (A) 接着突起縦断面 (B) 横断面 (C) 若い接着突起横断面 (D) 先端部拡大 (E~H) 先端部の一部をさらに拡大 (I) 砂粒らしきものを付着させた接着突起縦断面 (J, K) 接着部分拡大。略語は本文中にて説明。

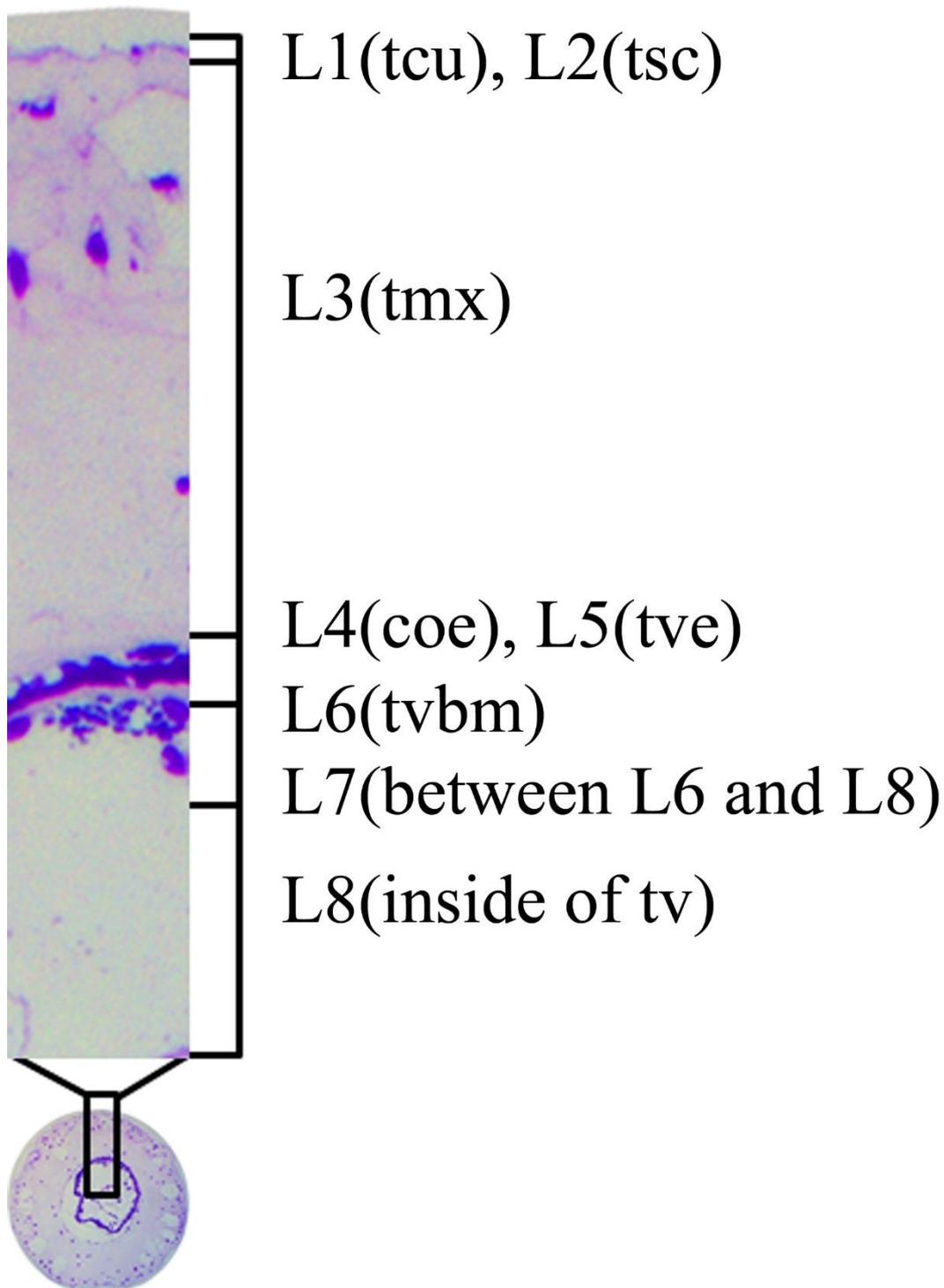


図 47 接着突起の層構造 (L1) 被囊最外皮 (L2) 被囊外皮 (L3) 被囊基質 (L4) 体腔 (L5) 被囊血管上皮 (L6) 被囊血管基質膜 (L7) L6 と L8 の間隙。細胞が張り付いているような部位 (L8) 被囊血管内部

### 第3項 ホヤ接着突起構造（透過型電子顕微鏡レベル）

ホヤ接着突起の最外層を電子顕微鏡で観察すると、低倍率ではそれほど大きな違いが見られないが（図 48A）、倍率を上げると L1 と L2、L3 の最外層における電子染色性の差がはっきりとする（図 48B）。特に最外層の L1 はかなりギザギザした構造となっている。接着突起先端側から同様に超薄切片を作製して観察すると、集合している被囊細胞がよりはっきりと観察でき、セルロースのマイクロフィブリルと思われるもやもやとした繊維状に見えるもの（図 48D 矢印）が高密度に観察できる。後者は通常の電子染色だけではあまりはっきり見えないが、あえて接着突起丸ごとの状態で HE 染色を施してから超薄切片を作製し、電子染色を重ねるとわかりやすいコントラストが付いた。そのためやや変則的ではあるが、以後この方法も併用しながら接着突起の構造を観察した。ただし接着突起最先端以外ではこの方法でもあまりセルロースマイクロフィブリルらしきものが可視化できないことから、セルロースを直接染色しているのではなく、その周囲あるいは共存する別の物資が染色されている可能性が高い。

接着突起最先端部分の被囊最外部分（L1～L2）を拡大すると、より細かい突起状のものが並んでおり、この構造は先端部分で特に顕著なものである（図 48E、F）。このことから接着突起の最先端は他の部分とはかなり異なる特徴を有していることが分かる。接着突起最先端部表面の走査顕微鏡画像も撮影して比較しようとしたが、後述する凍結切断によるバナジウム分布解析を微細構造の確認より優先したことと、筆者の異動のため断念せざるを得なかった。

さらに接着突起最先端部表面では他の部位に比べて明らかに細胞や顆粒のようなものが L1/L2 に近い L3 層に多く存在し、血管上皮最先端から L1 層に向けて細胞が移動しているようにも見える（図 48C、D）。前述した通り被囊細胞が被囊内を動くという話もあるが、そのような事象を捉えるのにも活性が高く透明に近い接着突起の誘導は極めて有益である。被囊細胞の種類や形態については別途詳述する。タイムラプス撮影などができる装置が充実している近年なら、バナジウムとは切り離して被囊細胞の動態や接着機構に関してさらに良い知見が得られたのではないかと思う。

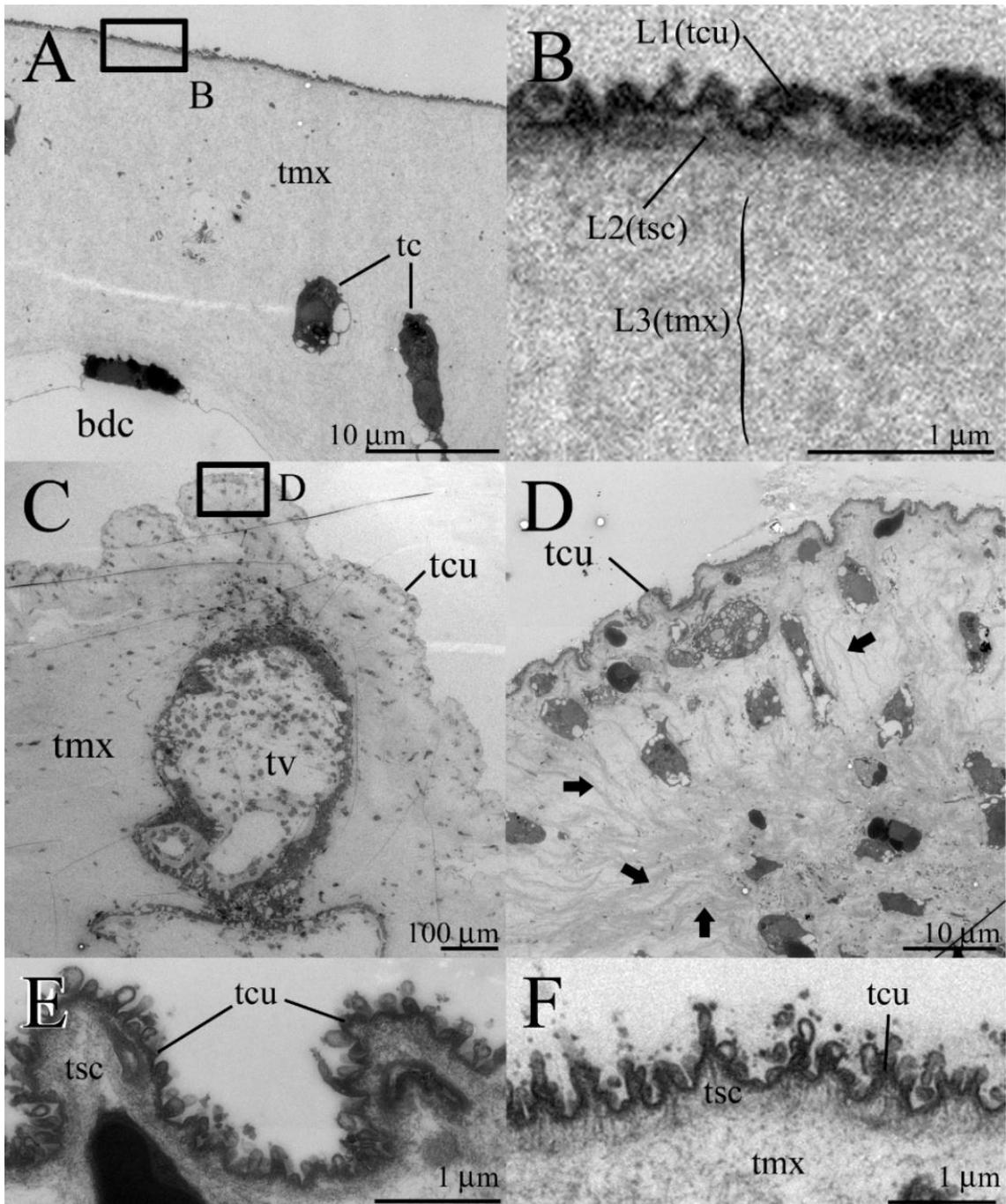


図 48 若い接着突起被囊部分の透過型電子顕微鏡画像 (A)接着突起中ほどの外部寄りの部分 (L1~3) (B)A の最外層部分の拡大(C)ホヤ接着突起最先端(D)最先端部拡大、(E, F)最先端部最外面の拡大

tmx : 被囊基質、 bdc : ブラッダー細胞、 tc : 被囊細胞、 tcu : 被囊キューティクル、 tsc : 被囊サブキューティクル、 tv : 被囊血管

図 49 は誘導した若い接着突起の内部構造 (L3~L7) を観察したものである。先端部以外はほぼ図 49A のような構造をしており、L7 層には電子染色性の高い 100~300 nm 程度の顆粒が多く見られ、同じ層にある細胞から産出されているようにも見受けられる(図 49B)。血管内部である L8 層との境界には膜のようなものが見られる(図 49B 矢印)。L6 層はセルロースの L3 層よりもやや染色性が高く、異なる素材で構成されていると思われる。L5 層は血管上皮細胞でほぼ 1 列のシート状となっている。上皮細胞の色が異なるように見受けられるが、これについてはよくわからない。L4 層の体腔に繋がるような空隙部分は突起の根元に近いほど広く、先端に近づくにつれ狭くなり、最先端では L4 の層がほぼ無く、直ぐに L3 のセルロースマイクロフィブリルが充満する層となる。

その接着突起最先端では血管上皮細胞が一層ではなく重層化している様子が見える(図 49C)。さらに拡大すると最先端側ではゴルジ体や多くの小さめの液胞あるいは顆粒らしき構造が多く密集して観察され、かなり活発にタンパク質等の生産・修飾・輸送が行われているように見受けられる。その表面側では微絨毛のような構造が他の部位よりも多く観察され、中には不定形の細胞質のようなものが放出されているかに見える画像も得られた(図 49D)。また細胞質として血管上皮から遊離しようとしていかに見える画像もしばしば得られた。この微絨毛や液胞、離れていく細胞が何をしているのかは極めて興味深いものの、この画像だけで接着性への寄与を論じるには不十分であり、幾つかの被嚢細胞の記録を取った後は、バナジウムとの関係を調べることを優先することにした。なお、TEM 画像からバナジウムを検出することはできなかった。理由としては固定・洗浄・包埋の過程において水溶性の物質は試料から抜けてしまう。未固定凍結切片からの解析も試みたが、切片がシャーベット状に碎けやすいことや、切片をスライドガラスに接着させる際に「溶かして融着」させることが常法であり、その際にバナジウムが拡散されてしまうためか十分なシグナルを得ることはできなかった。

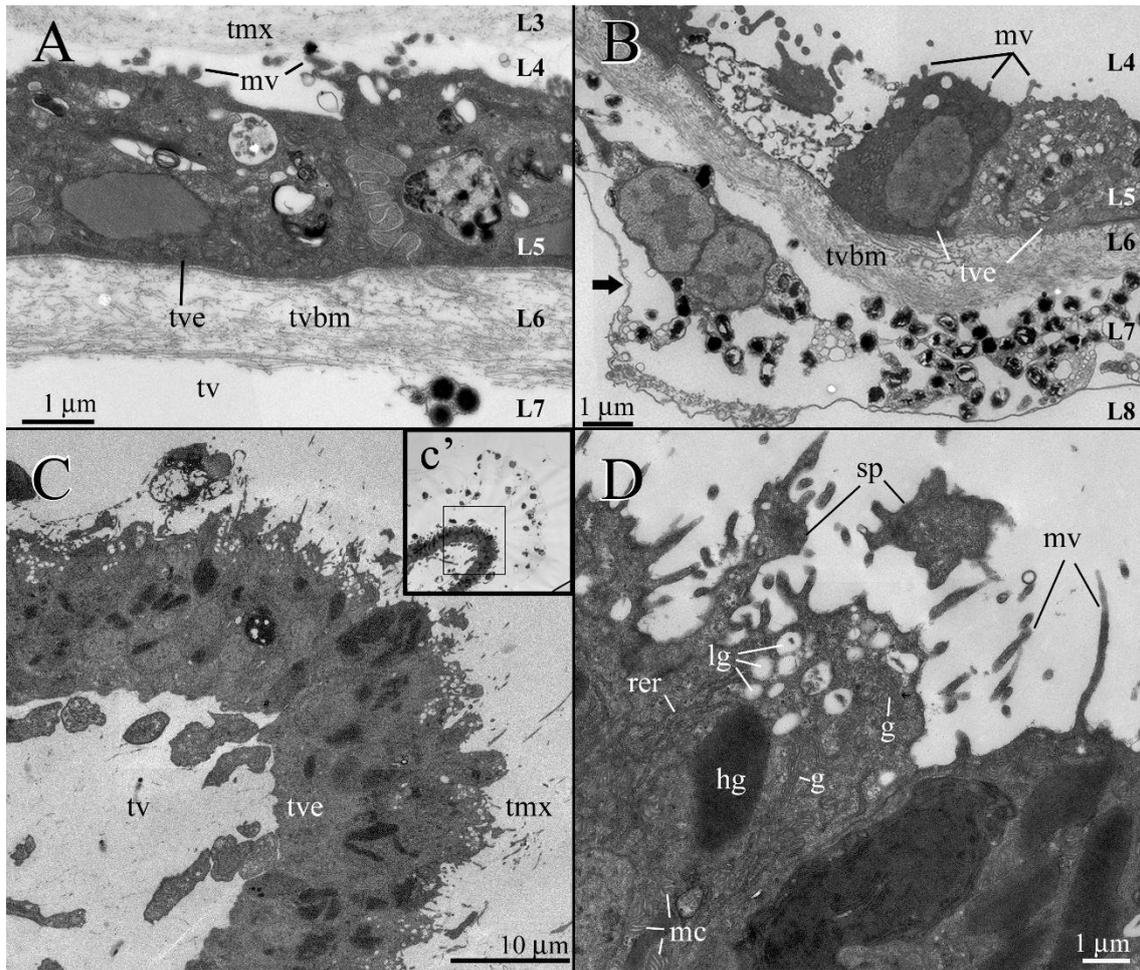


図 49 若い接着突起内部の透過型電子顕微鏡画像

(A) 接着突起中央付近の L3~L7 部分拡大 (B) L4~L8 部分拡大。矢印は L7 と L8 を隔てる膜状構造 (C) 接着突起最先端部の内部構造拡大 (D) 接着突起における血管上皮細胞 (L5) の拡大画像

tmx : 被囊基質、mv : microvilli (微絨毛)、tve : 被囊血管上皮細胞、tvb : 被囊血管基質膜、tv : 血管、sp : shapeless mass of protoplasm (不定形原形質の塊)、rer : rough endoplasmic reticulum (粗面小胞体)、lg : Low electron dense granules (低電子密度の顆粒もしくは液胞)、hg : 高電子密度の顆粒、g : golgi apparatus (ゴルジ体)、mc : ミトコンドリア

#### 第4項 ホヤ接着突起における被囊細胞

ホヤ類被囊に顕著に見られる被囊細胞としては、光学顕微鏡では大型の液胞を持つブレッダー細胞以外は識別が困難であったが、電子顕微鏡では図50の様に様々な細胞の形態が分かりやすく視覚化された。電子顕微鏡画像だけでは被囊の接着性に関与している細胞を判断することはできないが、バラエティに富む顆粒や液胞らしき構造が観察されることは興味深い。バナジウムが海水中での接着に寄与しないとしても、これらの細胞から海水中で機能する接着剤を探索することは可能と考えられる。

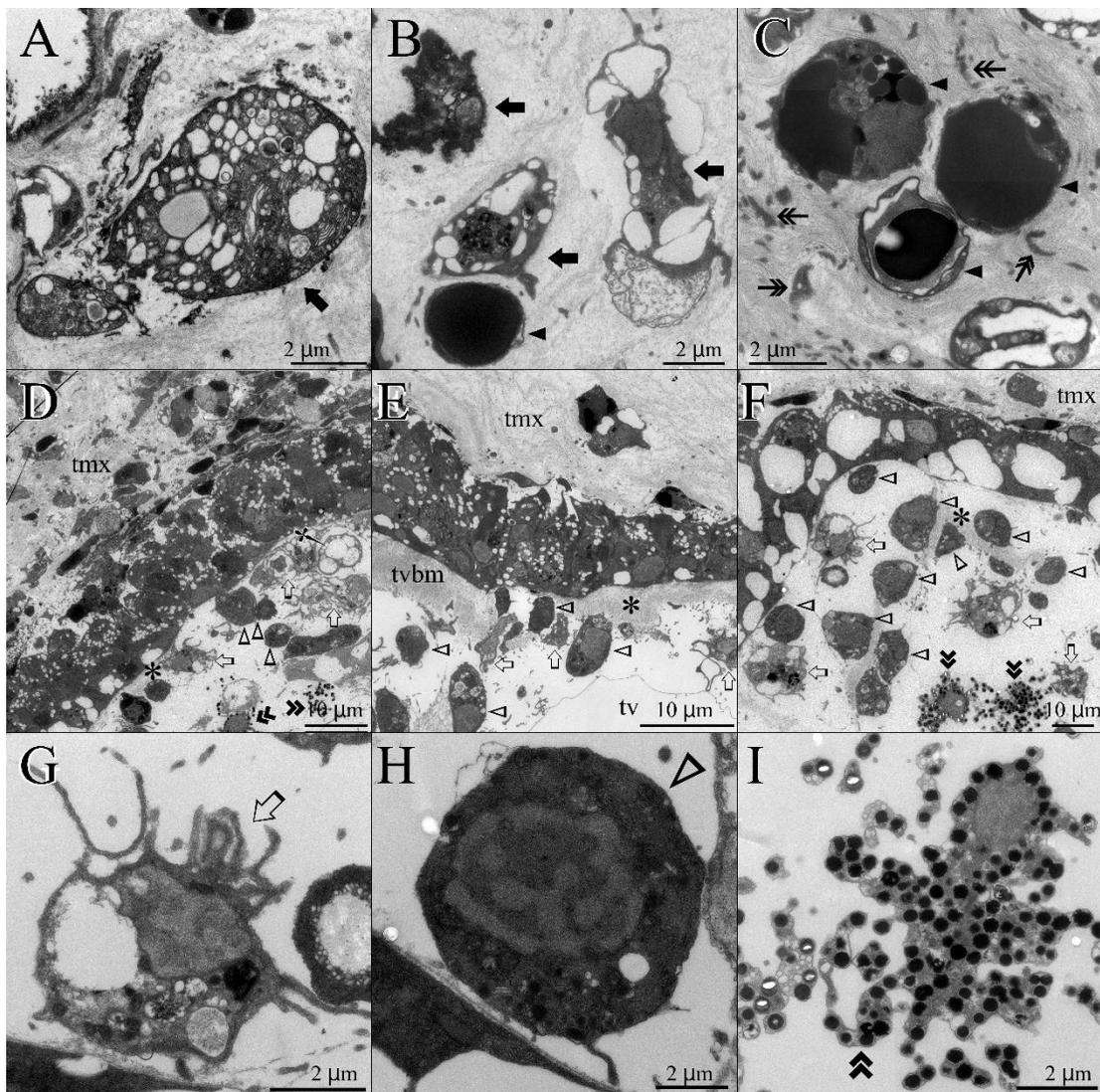


図50 スジキレボヤ接着突起における様々な被囊細胞

(A、B) 電子密度の低い顆粒あるいは液胞を持つアメーバ細胞 (黒矢印→)

(C) 電子密度の高い顆粒あるいは液胞を持つミトコンドリアとゴルジ体が豊富な顆粒細胞 (黒矢じり▲)、微絨毛 (→) (D~F) 血管上皮細胞付近の被囊細胞 (G) 仮足を持つアメーバ細胞 (白矢印⇔) (H) ヘモブラスト (群体ボヤにおいて未分化の血球とされる細胞) 様血球 (白矢じり△) (I) ピグメント (色素) 様細胞 (<<)

## 第5項 接着中のホヤ接着突起内部構造の変化

前述の誘導した若い接着突起を剥離させやすいビニールに48時間密着させて接着を誘導して、内部構造を非接着時および接着後の接着側と非接着側で比較した。その結果が図51である。A~Fは接着した部分の中間部分、G~Kは接着した部分の血管先端部分の横断面を透過型電子顕微鏡で観察したものである。この両者に共通するのは、非接着部側では血管上皮細胞の活動が活発であるように見え(図51C)、接着部側(接着後)ではそれらが落ち着いた「凧」のような状態に見える(図51D)。そして図40H~Iでは血管から接着面に向けて被囊細胞が移動している様な状況が観察されている。接着側の被囊表面側では被囊細胞がべったりと張り付いているような像が観察されることから(図51E、F、J、K)、被囊細胞は被囊血管上皮から被囊内を移動して接着面に辿り着いて何らかの役割を果たしていることが推察できる。被囊細胞の種類としてはアメーバ状の細胞が多くみられるようであり、ホヤ血球としてのアメーバ細胞ではバナジウムが含まれることが知られている。さらに群体ボヤにおいてヘモブラスト(未分化血球)とされる細胞に似ている被囊細胞も多いが、これらが経常的に似ているシグネットリング細胞あるいはその系譜に繋がる血球である可能性も考えられる。これらのことから、接着に関してバナジウムが関わる可能性は十分にあると考えられる。そのため未固定状態の接着突起からバナジウムの検出およびイメージングするため、凍結切断とEDSによる観察を行った。

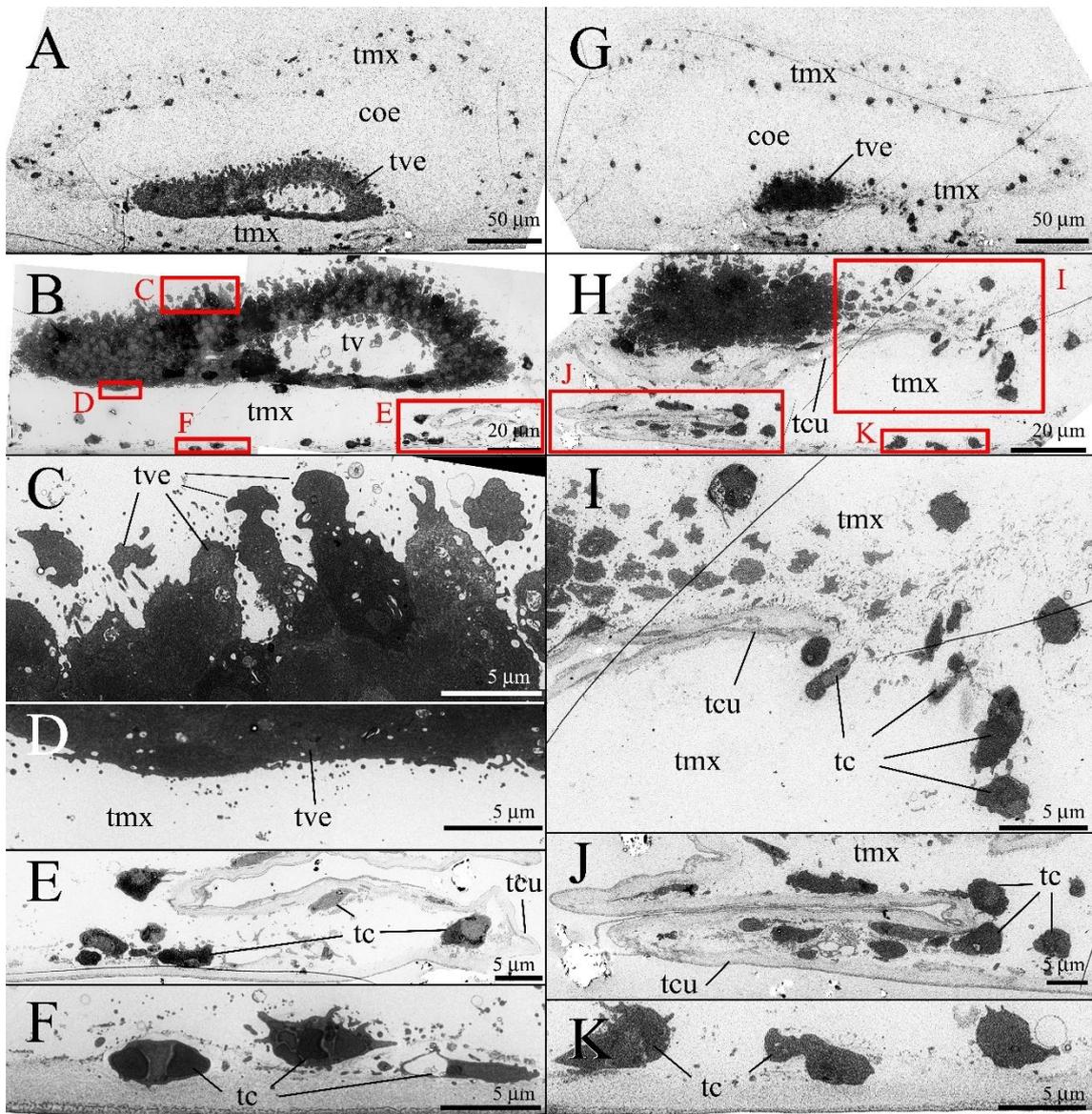


図 51 スジキレボヤ接着突起における様々な被囊細胞

(A~F) 接着誘導 48 時間後の接着突起中ほどの横断面 (A) 横断面全体図 (B) 接着及び血管周辺 (C) 非接着側血管上皮細胞 (D) 接着側血管上皮細胞 (E, F) 接着面付近の被囊細胞及び顆粒 (G~K) 接着誘導 48 時間後の接着突起先端部の横断面、(G) 横断面全体図 (H) 移動していると思われる被囊細胞 (I) 移動被囊細胞拡大 (J, K) 接着面付近の被囊細胞及び顆粒 tmx: 被囊基質、coe: 体腔、tve: 被囊血管上皮、tv: 血管、tc: 被囊細胞、tcu: 被囊キューティクル

## 第6項 未固定ホヤ接着突起からのバナジウムイメージング

接着突起からバナジウム及びバナジウム濃縮細胞を検出するため、5~7 mm 程度の接着突起の凍結断面を観察することとした。手法としては SEM 試料台中央に作った窪みに粘度の高い CMC セルロースを満たし、そこにホヤ被囊から切り出した直後の接着突起の下部だけを埋め込んで液体窒素中で凍結した。これによりホヤ被囊突起先端が上を向いた状態で凍結・保定された状態となる。これを速やかに FE-SEM の切断チャンバー内に導入してメスの刃を当てて接着突起を切断し、Pt をコートしてから FE-SEM 観察ならびに EDS 観察を行った。

その結果、図 52 のように接着突起最先端の血管内部である被囊血管基質膜 (tvsm) 直下の切断された血球から硫酸イオン由来の硫黄とバナジウムを併せ持つバナジウム濃縮細胞が検出された。このことは前述のホヤ幼若体における被囊内血管と思われる場所にバナジウム濃縮細胞が存在していることと同様の現象である。さらにブラッダー細胞と思われる硫黄リッチな構造が検出された (図 53)。被囊ではバナジウムよりも硫酸イオンによる生体防御の方がホヤにとっては重要である可能性も考えられた。もう少し観察数を増やしつつ、接着直後の切断面も作成して観察したかったが、異動のため途中で断念せざるを得ず、その時点で存在するデータだけで論文を執筆せざるをえなかったのは極めて残念であった。

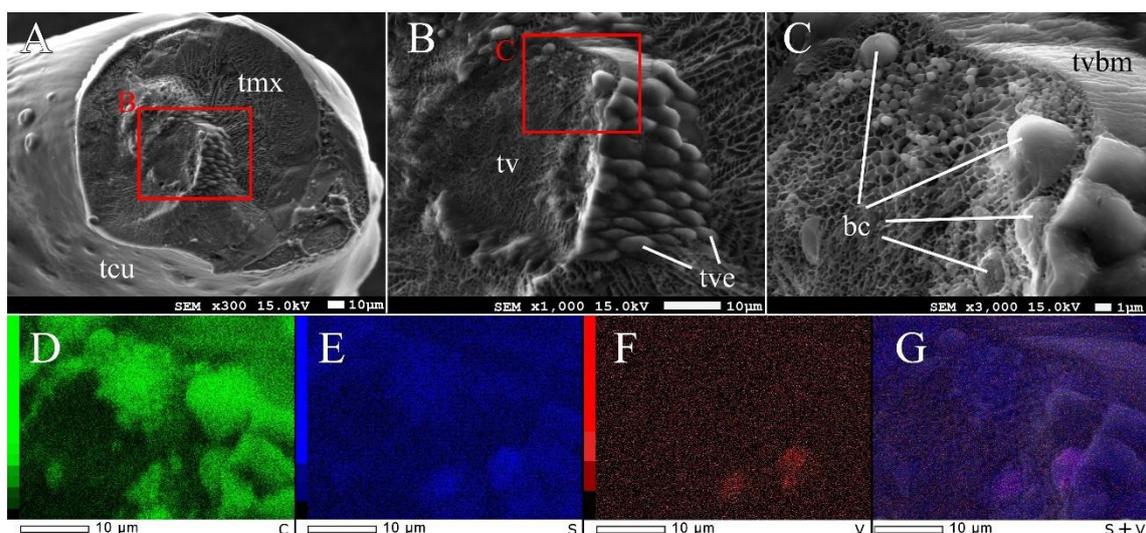


図 52 接着突起先端部におけるバナジウム濃縮細胞の検出

(A) 接着突起断面全体図、(B) 被囊血管最先端部分の被囊が外れ、血管内部の半分が割断されて内部が見えている様子、(C) 被囊血管基質膜直下に見える血球と思われしき細胞、(D) Cにおける炭素 C の EDS 像、(E) 硫黄 S の EDS 像、(F) バナジウム V の EDS 像、(G) SEM 像と S、V の EDS 像のマージ

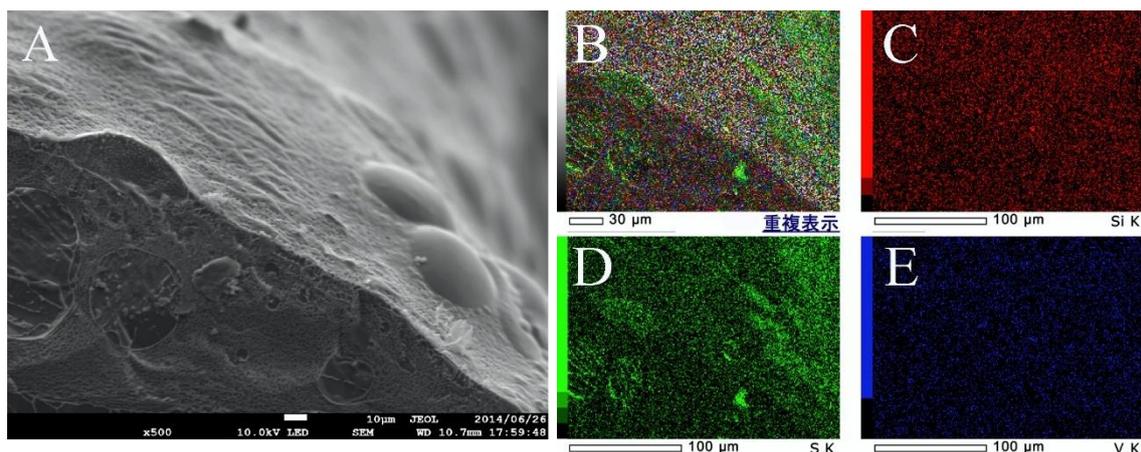


図 53 接着突起中ほどにおける膀胱細胞

(A) 接着突起の SEM 像 (B) SEM 像と各種 EDS 像をマージしたもの (C) ケイ素 (Si) の EDS 像 (D) 硫黄 S の EDS 像 (E) バナジウム V の EDS 像

### 第 7 項 接着突起における接着物質探索のための質量顕微鏡観察

接着突起のイメージングにおいて、その形態や元素分析だけでなく、質量顕微鏡 iMScope (Shimadzu) を用いたイメージングも行っていった。これはバナジウムが検出限界を下回って存在している場合や、バナジウムが関与していない場合でも接着物質を探索するためである。質量顕微鏡はサンプルの光学画像を取得後、5 μm サンプルのスポットごとにレーザーを照射して範囲内の物質をイオン化して飛行時間型の質量分析を行い、これらのデータをマージして質量分析の結果と顕微鏡画像の重ね合わせを行うものである。

試料の接着突起を 2%カルボキシメチルセルロース (CMC) に全体を包埋後速やかに液体窒素で凍結し、クライオスタットで 10 μm 厚に薄切して ITO コートスライドガラスに溶着させた。バナジウムは可溶性のため溶着の段階で拡散するが、水中接着

剤は不溶性であると思われるため、ひとまずこの方法で観察を進めることにした。この部分の手技に関しては、小池香苗契約技術専門員のご指導でサンプルを作製することができた。そのスライドガラスを iMLayer (Shimadzu) にいれて CHCA を蒸着させたものを iMScope に導入し、 $m/z$  500 までのシグナルを取得した。その中から ROI (Region of Interest、関心領域) 分析により、ホヤ被囊部位にのみ存在する化合物や、血管上皮細胞と被囊に立地に存在する化合物を絞り込んだ。その結果、8 つの  $m/z$  184.0680、185.1300、191.0575、195.0870、196.0880、207.0770、228.0000、335.1050 の分子を候補として選出することができた (図 54)。iMScope での測定に関しては、N-BARD の原田隆範特任助教への依頼測定という形で実施させていただいた。ただし当時は質量分析に関する知識や経験が不足していたことと、異動による研究中断のため、これらの化合物の構造決定には至らなかった。

多少なりと質量分析の知識を身に付けた現時点で省みても、特定や構造決定はかなりの難易度になると思われる。理由としては、ここで挙げた  $m/z$  は分解能が低い初期型の iMScope からのデータであり、精密質量を取ったとまでは言えず組成推定は現実的ではないためである。さらに未知の物質が相手ではスペクトルデータベースサーチでも合致するものは得られにくい。構造解析には MSMS と呼ばれる構造情報を含むスペクトルを吟味して構造の一部を推定して繋ぎ合わせる作業や、NMR 等での解析情報も必要であることが想定される。結果として、あの時点で欲張らずに一区切りにして論文にできて良かったのだと思う。

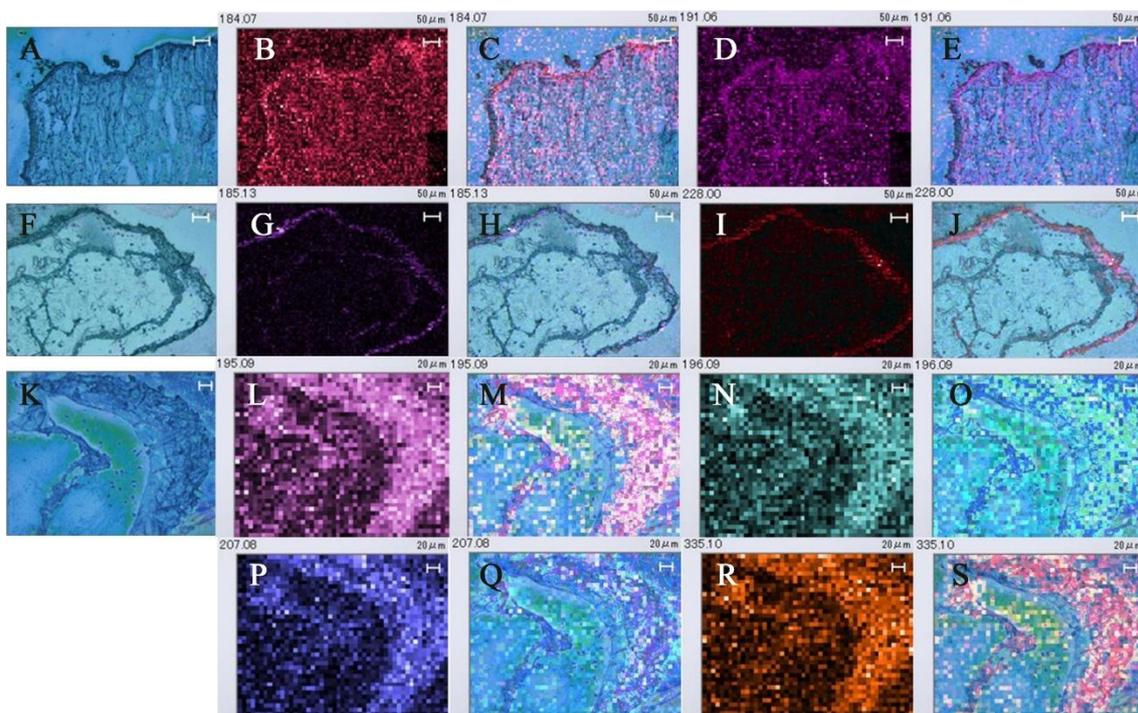


図 54 質量顕微鏡 iMScope 初期型によるホヤ接着突起のイメージング

(A、F、K) 接着突起切片光学顕微鏡画像 (B)  $m/z$  184.07 の抽出 MS イメージング  
 (C) A と B をマージしたもの。以下抽出 MS イメージングと光学顕微鏡マージ画像  
 (D、E)  $m/z$  191.06 (G、H)  $m/z$  185.13 (I、J)  $m/z$  228.00 (L、M)  $m/z$  195.09  
 (N、O)  $m/z$  196.09 (P、Q)  $m/z$  207.08 (R、S)  $m/z$  335.10

## 第 8 項 成果まとめ

残念ながらホヤの接着物質とバナジウムの直接的な関係までは知見が届かなかったが、ホヤが接着突起を介してどのように接着範囲を広げるか、その際にホヤ被嚢内でどのような変化があるか、その近傍までバナジウム濃縮細胞が存在していることを示すことができた。本件に関して 2 件の奨励研究（課題番号 26924014、15H00451）を獲得し、和文雑誌論文<sup>49)</sup>と査読付き英論文<sup>50)</sup>がそれぞれ 1 報ずつアクセプトされた。

さらに TEM、SEM、質量分析計およびそれらを担当する技術系職員と関わることもできた。この時に機器分析担当者の専門性とサポート力が研究に必要不可欠ということを実感していたことが、後の N-BARD における機器分析業務での取り組み方に大きな影響を与えた。

## 第5章 海産頭索動物ナメクジウオと半索動物ギボシムシの研究支援

### 第1節 ナメクジウオの採集・生態調査支援

少々話を遡って 2006 年から臨海実験所長が変わり、研究対象が頭索動物ナメクジウオとなった。ナメクジウオは貝殻混じりの荒い砂を含む海底を生息地として好み、我々ヒトに至る新口動物の進化を考える上で非常に必要な位置にある海洋生物である。かつてナメクジウオは瀬戸内海に広く生息し、特に近隣の広島県三原市沖の能地堆および周辺の有竜島（うりゅうとう）では大規模な生息地があったとされている。しかしながら高度経済成長期にコンクリートの骨材としての海砂が乱獲され能地堆は消失し、その他の瀬戸内海の類似環境も失われたことから、生息地が急速に狭まっていた。そこで向島臨海実験所近辺の生息状況を調べ、かつ実験動物としての採集地を得るために周辺海域の探索を行うこととなった。同時にその食性も濾過食であること以外はあまり知られておらず、これらの生態を探ることも必要であった。

採集には海底の砂ごと大量に採取する大型ドレッジが必要だが、当時の実験所船舶には未装備であり、さらに能地堆は大型タンカーや客船が多数航行する航路として設定されている海域である。このような大型船の引き波が立つ海域で小型調査船の船体が傾くほどの重量物を引き上げることは極度の危険を伴う。能地堆が消失していることは海図からも明らかで、小型の採集装置での調査から始め、生息が確認されたのちに装備を整えることを提案したが、当時の新任所長には全く聞き入れられなかった。他教員からの援護を受けて試しに小型装置で現地調査したところ、海図通り能地堆には砂が無く岩盤が露出していた。代わりに航路から外れた安全な海域で小規模な砂地堆を見つけナメクジウオの採取にも成功したが、なぜか能地堆での大規模採取に固執されたため以後の調査は行われなかった。

食性の調査についても、消化・未消化の識別を含めた腸管内容物の前後における DNA 解析を提案したが、腸管後方の消化済み部分における SEM 観察だけで論じようと言われた。装置も他大学の半ば放置されている旧式のフィルム撮影型で何の説明もサポートも練習の機会も無く、少数のフィルム撮影で成果を出すよう求められた。当時 SEM 経験のない筆者には極めて困難であり、十分な成果を得ることができなかった。

## 第2節 ギボシムシの採集・飼育支援

ナメクジウオの研究支援活動に限界を感じたため、田川訓史准教授の研究対象であるギボシムシの支援活動に軸を移すことになった。ギボシムシは半索動物門腸鳃類に分類される動物で、図 13 を振り返るとわかるようにホヤ、ナメクジウオと同じく我々ヒトに連なる新口動物への進化を考える上で極めて重要な生物であり、ゲノム解析も行われている<sup>51-53</sup>。大きさは様々であるが、図 55 の様に淡黄色から黄色、褐色を呈するひも状の独特のヨード臭を放つ粘液を出す雌雄異体の海洋生物であり、サンゴ砂や柔らかい泥中に生息する。先端の吻と呼ばれる部位が欄干の擬宝珠に似ていることからギボシムシと呼ばれている。

田川准教授はギボシムシが発生学的に我々ヒトに繋がる重要な生物であり、脊椎に繋がる脊索の相同器官と考えられていた口盲管、神経索と背腹の関係、左右相称のボディプランの維持など発生学的な問題や、千切れても2つのギボシムシになるほどの再生能力に対して、分子生物学的な手法を元に研究されている<sup>54</sup>。



図 55 ヒメギボシムシ外観。左側が前方（吻）、右側が後方（肛門）。中央の黒い部分は肝盲囊、その少し前方に生殖翼（写真は生殖層が発達）と鰓裂（この画像では見えない）がある。生殖翼と吻の間は襟と呼ばれる構造であり、その内部に口がある。

ギボシムシの発生過程は卵から受精卵からトルナリア幼生（ミユラー期、ハイダー期、メチニコフ期、クローン期、シュペンゲル期、アガシー期）を経て幼若体に変態・着底して生体となる間接発生種と、受精卵から直接幼若体となる直接発生種に分類される。研究対象となっているヒメギボシムシ（*Ptychodera flava*）は前者であり、成体の採集・採卵が他種に比べて比較的容易で、当時ゲノム解析が進んでいたというメリットがあったが、国内での採集記録は少ない上に幼生の期間が6~9カ月あり、卵から完全変態までの一貫した飼育記録は世界的にも存在しなかった<sup>55)</sup>。そのため発生学的な研究に必要な後期幼生は海洋からの採集に頼るしかなく、特に変態期の幼生は速やかに形態が変化するため扱いが難しい。何よりヒメギボシムシは外洋に面した温帯以南の浅瀬のサンゴ砂中に生息するため、瀬戸内海での採集は不可能である。

そこで筆者はヒメギボシムシの研究を支援するため、和歌山県東牟婁郡串本町、沖縄県本部町備瀬の生息地を再確認して産卵直前のヒメギボシムシを採取して夜間（暗中）のヒートショック法により人工的に放精・抱卵させ、受精卵を得た。それを自作の攪拌型飼育装置と抗生物質入りのミリポア濾過海水、培養珪藻の飼料などで飼育し、世界で初めて人工飼育下で全ての生育ステージを経て成体まで完全変態させた<sup>56)</sup>。また、国内で幾つかの新たなヒメギボシムシ生息地を発見し、新種の可能性がある個体も採取した。産卵後のヒメギボシムシも向島臨海実験所内で継続して飼育し、再生過程の研究にも提供した。これらの支援活動において2件の奨励研究が採択された。それらの詳細について以下に述べる。

## 第1項 ヒメギボシムシの採集

ヒメギボシムシの採集は基本的にサンゴ砂のある遠浅の沿岸でシュノーケリングにより最干潮時に行うため、最干潮時の潮位の日時に左右される。基本的に沖縄では海水温が25°Cを下回る頃に放精・放卵するため、生殖層の発達した個体を得るためにはその直前の10月初旬から中旬に採集することが望ましい。採集時間は2~3時間程度であり、採集方法は海底のサンゴ砂を手でゆっくり扇ぎながら吹き飛ばしてヒメギボシムシを探すものである。ギボシムシの種によっては生息する穴の上に糞塊というも

のを作るが、本種は糞塊を作らないため、周囲の海底を手当たり次第搜索ということになる。淡黄色のギボシムシが見つかったらすぐに採集はせず、採集後の事を考えた準備を行う。まずは砂中の温度を測定してから生息地近くの砂と海底近くの海水を採取する。その砂は海中で 1~2mm 角のふるいにかけて大きな砂や他の生物をできるだけ除去し、海水とともに中サイズのジップロックに入れる。その準備を終えた後にギボシムシの全身が露出するまで海底の砂を扇ぎ続け、海中に出てきたヒメギボシムシを優しく掬って先程用意したジップロックに雌雄別に入れる。この時健康なヒメギボシムシの体色は淡黄色から黄色で表面に燐光がある。褐色のものは弱っているため採取しない。生殖期のヒメギボシムシを得るためには、生殖翼が黄色あるいは黄白色に肥厚した個体を厳選する。採取時に砂中から指で引っ張り出そうとすると容易に胴体が千切れるため根気が必要である。ヒメギボシムシの体部は極めて軟弱で腸管には尖ったサンゴ砂が充満しており、さらには体表には粘液を出しているため、軍手はヒメギボシムシが粘着して切れやすくなるため不向きである。そのため採集にはニトリル性の表面がつるつるした素材のものでなくてはならない。ただし近くにガンガゼやイモガイ、ゴンズイのような毒棘を持つ生物もおり、薄手のグローブは危険である。

採集したヒメギボシムシはなるべく温度を上げ下げしないよう心がけ、さらには暗くすることでも放精・放卵することがあるので光をある程度入れるようにして海水とサンゴ砂ごとジップロックに入れた状態で輸送する。近隣の実験所（沖縄では琉球大学瀬底臨海実験所）や近隣のホテルなどに持ち込み、現地で媒精までさせて幼生や受精卵の状態でも輸送することもある。

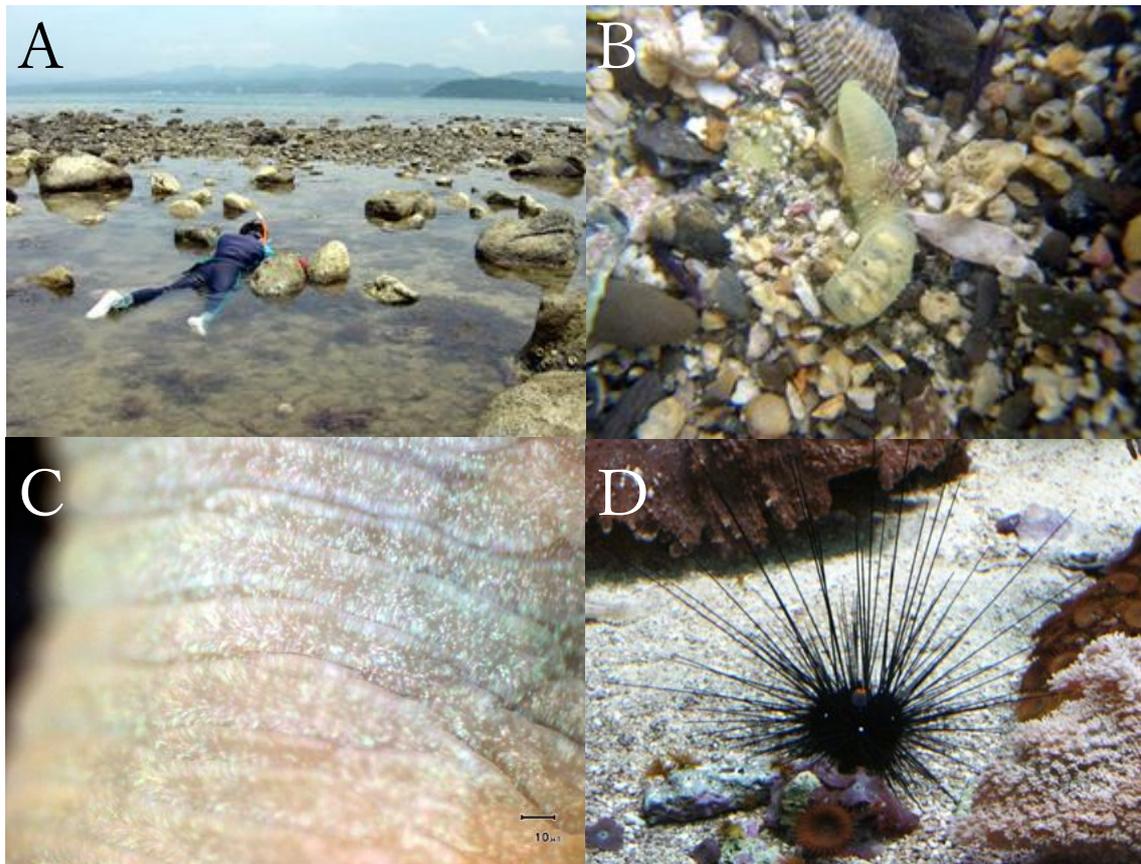


図 56 和歌山県東牟婁郡串本町におけるヒメギボシムシ採集の様子

(A) 最干潮時におけるシュノーケリングによる採集 (B) 海底の砂から砂を扇ぎ飛ばして露出させたヒメギボシムシ (C) ヒメギボシムシ表皮における虹色の構造色 (D) 現地に多く生息しているガンガゼ。油断していると毒棘が刺さるため注意が必要。

## 第 2 項 ヒメギボシムシの採卵・採精

採卵・採精のためには、図 57 の箱型のプラスチック容器に砂を底から 1~2 cm 程入れ、個体の大きさにもよるが 100 cm<sup>2</sup> に 1~3 匹になるようヒメギボシムシを入れる。海水は容器の半分~2/3 位まで入れる。採集地の海水温とほぼ同じ温度 (25°C以下)、自然光での光量変化が得られる環境でヒメギボシムシと砂を入れた容器を静置しておくことが望ましい。日が暮れる頃に + 5°C に予熱した海水 (30°C未満) と同じく + 5°C に保った水を入れた蓋付きの発泡スチロール箱を準備する。できるだけ揺らさないように大型のピペットや注射器などで容器から海水を抜き、替わりに + 5°C の海水を静か

に入れ、容器を+ 5°Cに保った発泡スチロールの箱で保持する。その後蓋をして遮光するが、可能なら部屋全体も暗くする。15 分後に温海水を交換、新たに用意した温水の箱に入れ、温度が下がるのを防ぐ。この海水交換時の温度・暗刺激で産卵・放精するが、海水交換は 2 回までとし、それでも放卵しなければ翌日以降に試す。ただし諦めて寝る頃に放卵したりすることがあるので注意する。放精・放卵は砂から吻と生殖翼部分を出し入れしながら海水中に放出する。



図 57 ヒメギボシムシ採集及び産卵時の一時的な飼育に使う容器

#### (1) 放精した場合

なるべく精子が拡散していないうちにピペットで吸い取ってチューブ等に入れる。精子が無駄に動かないようにできるだけ海水と混じっていない状態が望ましい。ヒメギボシムシ本体に触らなければ放精中に採取しても構わない。翌日以降にも使う場合は冷蔵庫に入れて冷やすと 1~3 日ほど使用可能。

#### (2) 放卵した場合

精子と違って粘液に包まれた状態で拡散しにくいいため、放卵中は全部噴ききるまで

待ち、卵を径の太いピペットでシャーレなどに移す。卵は 75  $\mu\text{m}$  メッシュを使って 22~25°C のストレプトマイシン海水で洗浄する。現地の海水を 0.45  $\mu\text{m}$  ミリポアフィルターでろ過し、ストレプトマイシンを 50 mg/l となるよう添加したものをを用いる。

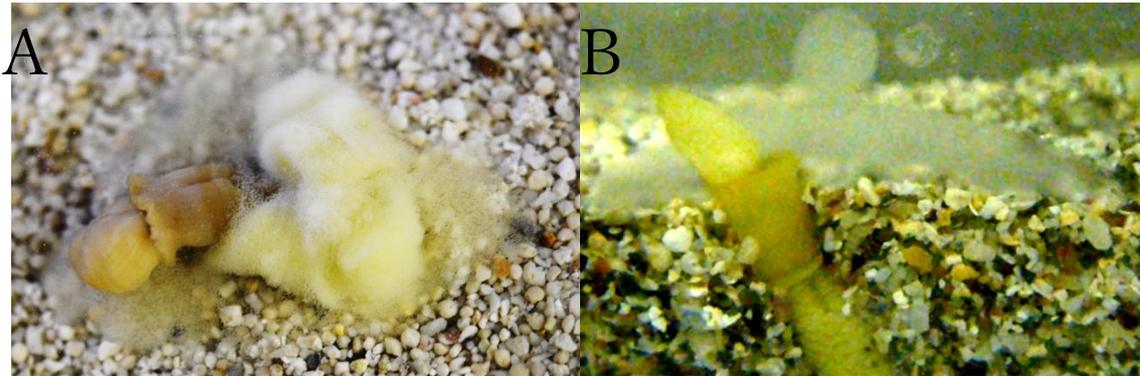


図 58 夜間のヒートショック法によるヒメギボシムシの放卵 (A) と放精 (B)

### 第3項 媒精から孵化まで

媒精のための容器 (図 59A) に 22~24°C のストレプトマイシン海水を半分程度入れ、採取した卵を懸濁しておく。授精のための精子は直前に適度に希釈し、顕微鏡で必ず精子の状態を確認する。希釈倍率は海水が少し濁る程度で、そこまで濃くなければ厳密でなくても良い。精子の動きが悪い場合は精子懸濁液に 1N の水酸化ナトリウムを 1 滴入れてアルカリ性になると活性化して受精可能になる。精子の状態を確認したら、精子懸濁液を 5~10 滴ほど滴下して 22~24°C 程度で静置して媒精する。

媒精 1 時間後に 75  $\mu\text{m}$  メッシュと新しいストレプトマイシン海水で卵を洗い、不要な精子を除去する。以後も用いるストレプトマイシン海水は必ず温度を合わせる。容器は底の広い培養シャーレ等を利用する。蓋は酸素供給のため閉めないが、エアコンなどの風が直接吹き込まないように容器の向きには注意する必要がある。その後受精卵を 24 時間毎洗浄し、ストレプトマイシン海水も入れ替える。48~72 hr でハッチアウトしたトルナリア幼生は遊泳して海面に上がってくるため、卵殻や未受精卵と分けるため直前に 500 ml ビーカーに移して水位を上げておく。

トルナリアは *tornare* (回る) から来た言葉で、その名の通り幼生は繊毛の運動によ

り体を回転させながら海中を遊泳する。水流が無い場合は幼生が容器に擦れ続けることで衰弱して死に至るため、幼生を常に浮遊させるための攪拌が必要である。孵化後に遊泳して浮上してきた幼生は、先端をカットして傷付けないよう熱で丸めた径の太いピペットで吸いとり別々の容器に移す。集めた幼生はロート状にした 75  $\mu\text{m}$  メッシュに乗せてからストレプトマイシン海水で優しく洗浄する。

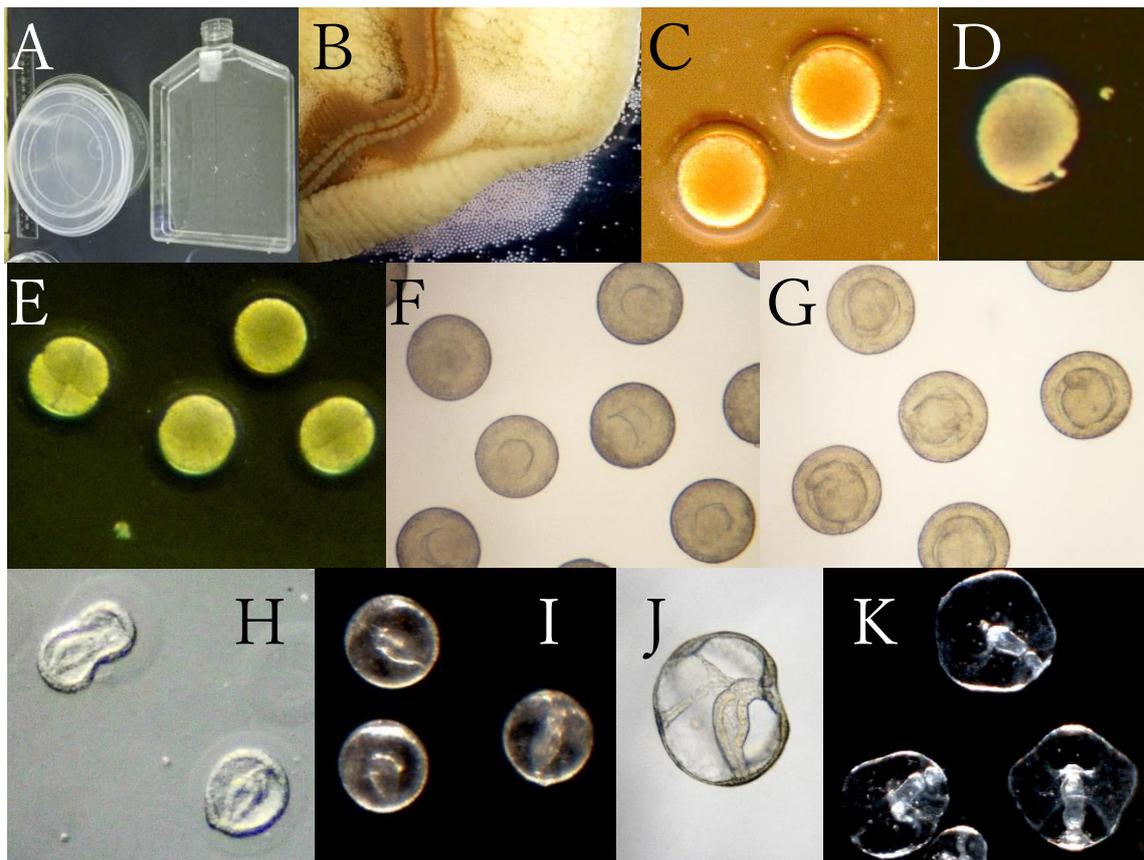


図 59 授精時に使用する容器と受精から発生初期の様子

- (A) 授精時に使用する丸タッパーとハッチアウト後の培養に使う培養シャーレ
- (B) 産卵直後の卵 (C) 受精卵 (授精膜が上がったところ) (D) 極体放出 (E) 4細胞期 (F) 初期原腸胚 (G) 後期原腸胚 (H) ハッチアウトの瞬間 (I) ハッチアウト直後の初期ミュラー期幼生 (J) 中期ミュラー期幼生 (K) 中期ミュラー期幼生

#### 第4項 初期トルナリア幼生の培養

採取したトルナリア幼生（初期ミューラー期、図 60A）5,000～10,000 個体を 500 ml の餌入りストレプトマイシン海水に懸濁し、培養シャーレを縦置きしたものにエアレーションをして攪拌する（図 60D）。エアはガラスピペットをシリコンチューブに直結したもので送り込む。図 60 では視覚的に分かりやすいようにガラスピペットに色付きチップを取り付けている。当初ピペットの先端は底面から浮かせるようにしてしたが、着底していても問題ない。エアの流量は幼生がシャーレの底に溜まらない程度の水流を作るよう調整するが、最低限より少し多めに設定しておいた方が、何らかの理由でポンプ出力が落ちた場合に滞留せずに済む。シャーレは直接加熱せず、22℃のプールに入れて間接的に間接的に保温し、さらにエアコンも使用してエアが海水温を変動させないように注意する（図 60E）。プールには市販の温度設定が可能な水槽用ヒーターを温度の差が生じない様にシャーレの近くを避け水層底面に配置する。

この培養装置では孵化後 4 週間程度で 1mm 前後のメチニコフ期幼生（図 60C）まで培養することができ、この時期以降は 5 リットルの水槽に移す。あまり幼生が大きくなりすぎると対流を起こさせるエアの量が多く必要となり、壁面に擦れることによるダメージが大きくなるためか、生育不良や個体数の減少が生じた。もう少し早い段階でも移すこともできるが、スペースと海水、給餌量等の観点からこの時期とした。

ミューラー期（図 60 J、K）は全体に丸っこく肛門付近も丸みを帯びていて、全身の繊毛を使って回転及び遊泳を行う。その後に背面から吻体腔と呼ばれる空間が胃の上側まで伸びて、ハイダー期にはその構造がはっきりと見える（図 60A、B）。ハイダー期には胃と腸がくっきりと分かれているのが見え、肛門付近の底面に繊毛環と呼ばれる長めの繊毛が生え揃う部位が形成され、より遊泳力が高まるような構造となる。さらに頭部から口のあたりから頭部や胴部周りにかけても繊毛帯が形成され、体表を多く粘液にトラップされた餌を効率よく口に運ぶための構造が顕著になる。初期メチニコフ期には底面が広くフラットになって肛門が中心からやや後方に移動し、体部の繊毛帯はよりはっきりとした溝状の構造になる。

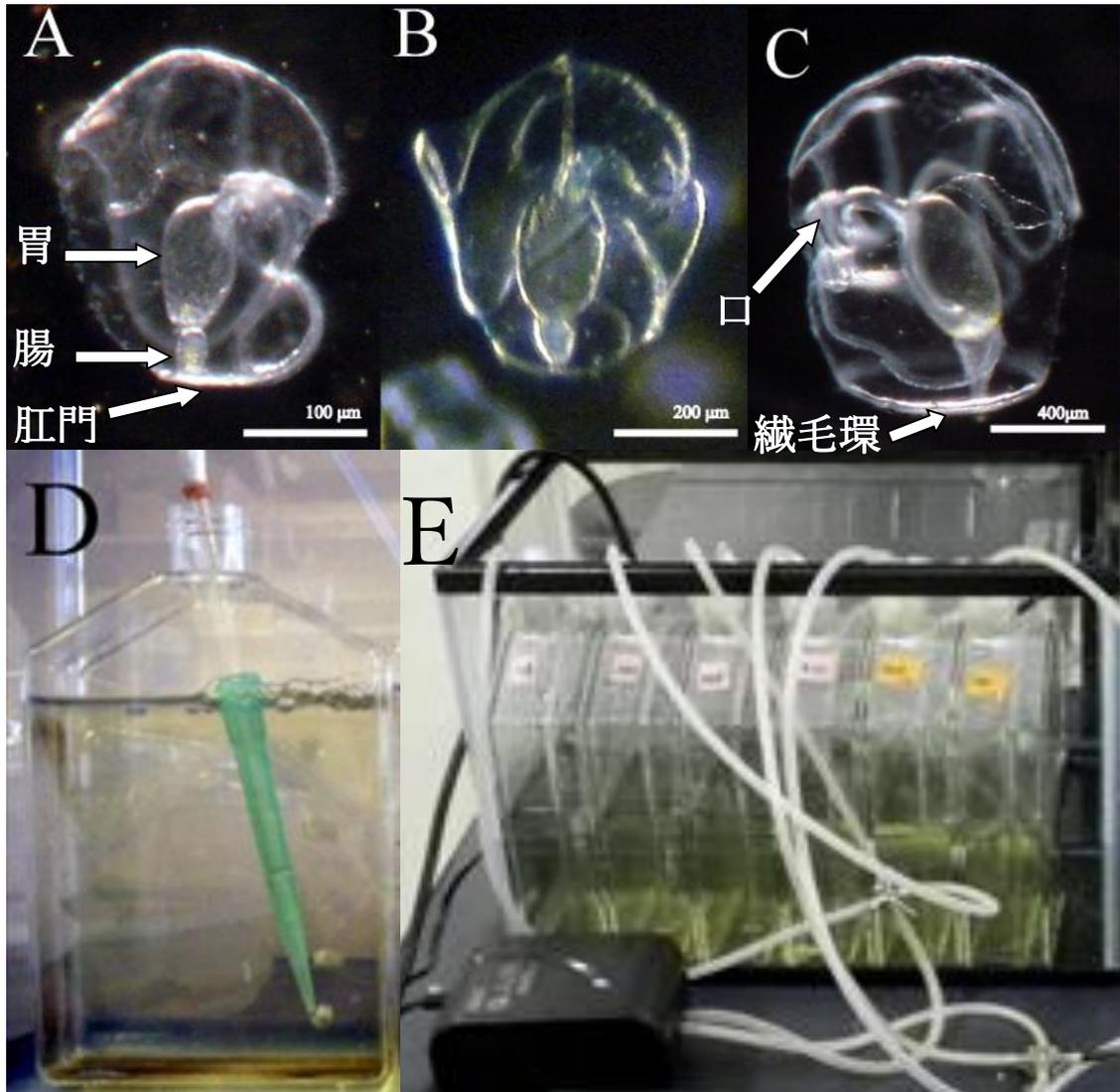


図 60 初期トルナリア幼生飼育の様子 (A) ハイダー期 (受精 9 日後) (B) ハイダー期 (12 日後) (C) メチニコフ期 (25 日後) (D) 初期トルナリア幼生用培養シャーレセット (E) 培養シャーレ加温及びエア供給の様子

#### 第 5 項 トルナリア幼生の餌について

飼育中のストレプトマイシン海水は 3~4 日に一度交換するが、その際に培養した珪藻を海水に対して 1%添加する。さらにサプリメントとしてマリンデラックス (H&S Co.,Ltd., Germany) を  $50 \mu\text{l/l}$  の濃度で添加して幼生の餌とする。餌となる珪藻は *Chaetoceros calcitrance*, *Isocrysis sp.*, *Rhodomonus sp.* の培養液 ( $\text{OD}_{600} = 1.5 \sim 2.5$ ) を直前に等量混合したものを使用する。培養方法は以下の通り。

- ① シリコン栓の中央とその横に計 2 つの穴をあけ、ガラス管を加工したものを差し込み、エアの出入り口を作る。
- ② 作りたての濾過海水 900ml を 1000ml 三角フラスコに入れ、オートクレーブする。栓はアルミホイルに包んで滅菌する。古い濾過海水はバクテリアなどの繁殖で成分が変わっている恐れがあるため使用しない。
- ③ オートクレーブ後に室温まで温度を下げてから蓋を取り付け、5%ケイ酸ナトリウム溶液を 1ml 加え、エアレーションで 1 時間攪拌して溶解させる。この時の温度が高いとケイ酸ナトリウムがうまく溶けず、後々に針状になって析出し、幼生を傷める。また、オートクレーブ前にケイ酸ナトリウムを入れても同様に析出することがあるため、必ず後から溶解させる。
- ④ 50mg のストレプトマイシンと藻類培養液 KW21 を 1ml 添加する。
- ⑤ 10~25ml の培養した珪藻を新しい培養液に入れ、継代培養を行う。
- ⑥ 20°C~25°Cで常時エアレーションと照明下（上下から蛍光灯 4 本）で培養
- ⑦ 2~3 週間程度で濃度が最大になった時に餌及び継代用として使用する。通常は OD600=1.5~2.5 程度となる。古い培養液（表面に細かい泡が消えずに残るもの）は幼生の調子を悪化させるため使用してはならない



図 61 培養中の珪藻の様子。

左側が餌に適した濃度にまで増殖した珪藻培養液

## 第6項 中～後期トルナリア幼生の培養

1 mm 以上の大型幼生に関しては、5 リットルの水槽に攪拌用の羽根とそれを動かすシンクロナスモーター（日本電産サーボ社製 D-12・30rpm）を付けた培養装置を自作して用いた（図 62）。通常のモーターでは回転数が早すぎることから、低速で稼働するシンクロナスモーターを使う。飼育水槽の蓋に中心に穴をあけて下駄をはかせた木片を固定し、そこにシンクロナスモーターを固定する。モーターの駆動部にチップを加工した接続部品を取り付け、アクリル棒とペットボトルから切り出した羽を装着する。下駄はシンクロナスモーターを蒸気及び結露から守るために必要である。

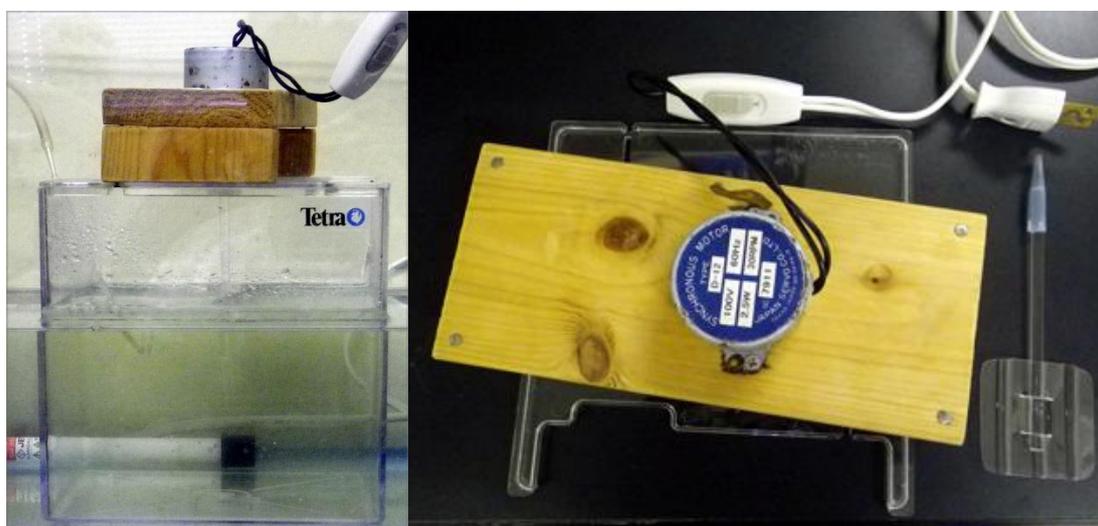


図 62 中～後期トルナリア幼生培養用飼育ケージ

(A) 全体像 (B) シンクロナスモーターおよび回転羽一式

メチニコフ期以降はサイズの増加とともに、様々な体表及び内部の構造が変化する。クローン期（図 63A、B）には口に連なる溝がより深くなるとともに、直線的だった構造が波打つようになり、より表面積を増すための構造となる。体表の透明度が下がって見えるのは、おそらく体表の繊毛が発達するためと思われる。これらの期間が最も長く、中期を経て後期クローン期（図 63C～H）には溝部分近傍の波打つ構造がひだ状の一次葉、さらに二次葉と呼ばれる突起状の構造（青矢印）に変化する。吻体腔（赤矢印）の内部側はやや大きくなり、頭頂部側にも伸長し始める。

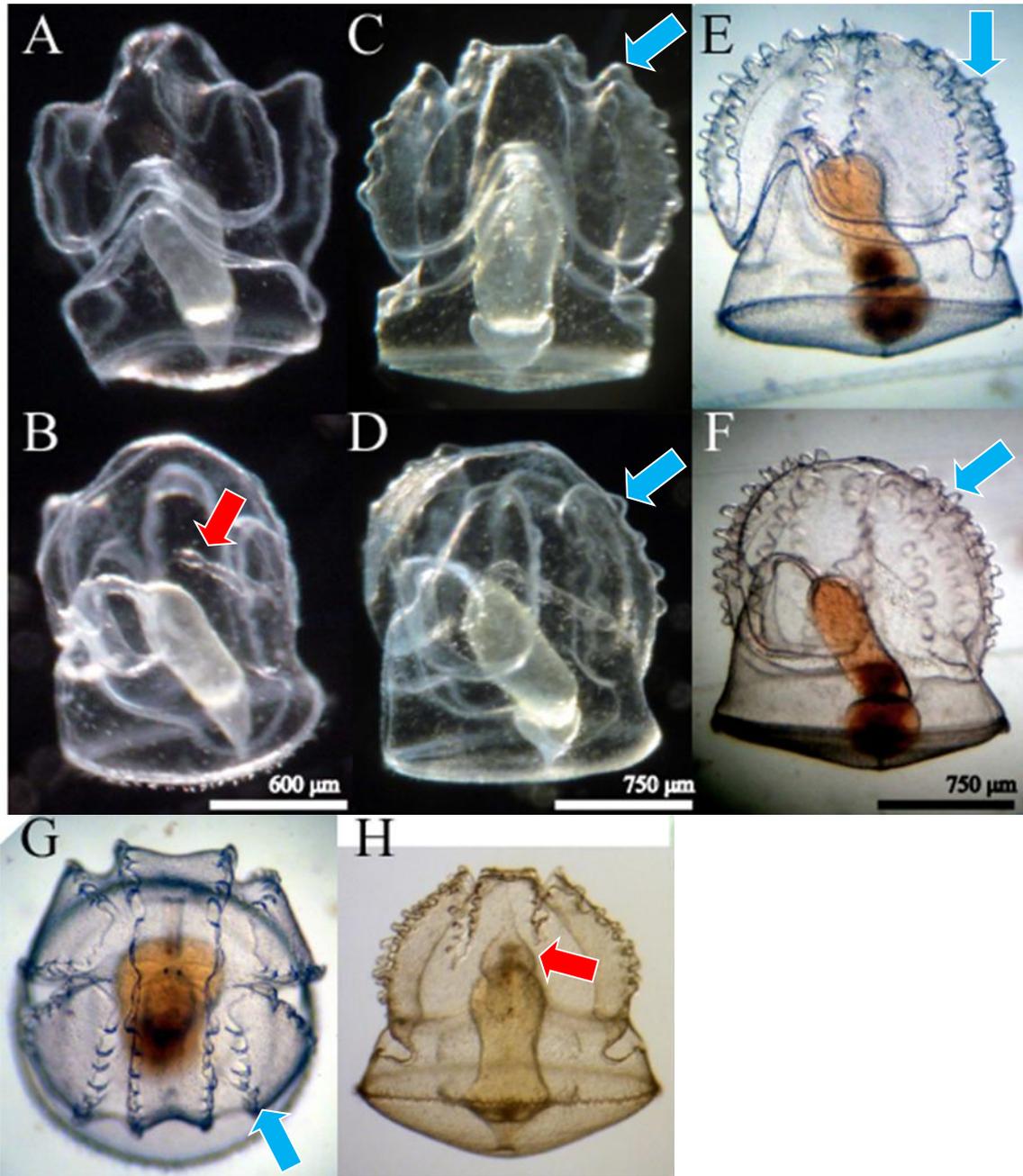


図 63 中～後期トルナリア幼生写真 (A、B) 初期クローン期 (C、D) 中期クローン期、(E～H) 後期クローン期。吻体腔は赤矢印、一次・二次葉は青矢印

後期クローン期からは吻体腔の変化が顕著になる。シュペンゲル期 (図 64A、B) に入ると吻体腔内部側が膨らみ始め、初期アガシー期 (図 64C、D) には頭頂部に接するまで膨らみ、筋膜の筋が見えるようになる。胃の周りにも体腔のようなものが見

え始める。後期アガシー期（図 64E、F）には表面のひだや二次葉はなだらかになり、肛門がやや突出する。アガシー期からは数日で様子が変わり、やがて変態期に入る。ヒメギボシムシではここまでに孵化から約 3~9 カ月を要する。

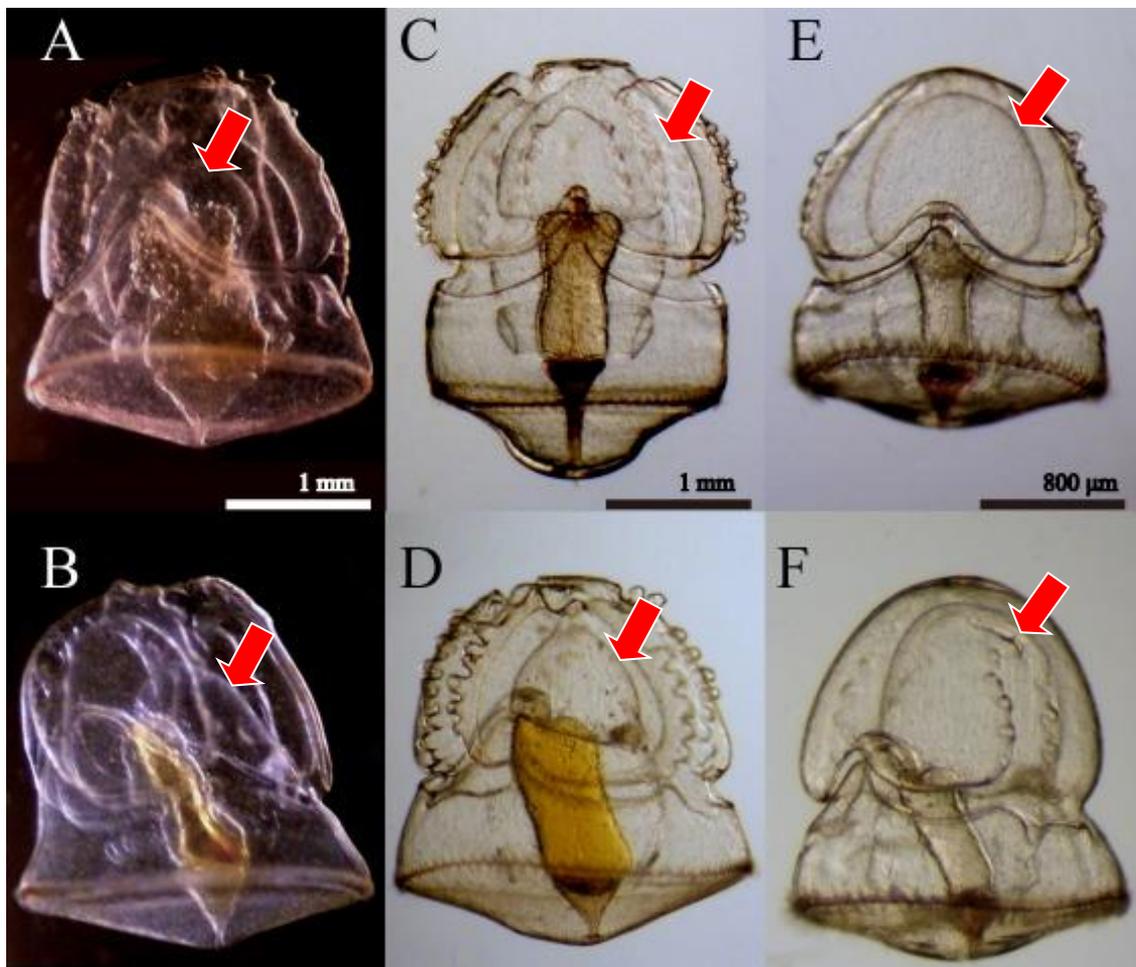


図 64 後期トルナリア幼生写真 (A、B) シュベングル期幼生、(C、D) 初期アガシー期幼生 (E、F)、後期アガシー期幼生。赤矢印は吻体腔。

## 第 7 項 変態期

トルナリア幼生が変態期に入ると図 65 の様に極めて速やかに形状が変化する。数時間~1 日程度の間吻体腔が肥大化して内部から幼生頭部を突き破って筋運動を伴う吻となる。口からは収縮して独楽状になり、側面には幼生底部にあった繊毛環が位置する。口は吻と独楽状の胴体部の中間に位置する。その後繊毛環が抜け落ちて砂の上に着底し、吻や胴体の伸長に伴って腸管が伸長する。変態直後は吻部が吸着するよ

うになるが体幹部は吸着しないため、これまでの水槽で飼育を続けると体幹部が水流で引っ張られて切れてしまうため、隔離・静置しなければならない。そのため後期アガシー期の幼生を集めて砂を薄く引いた 90mm シャーレに移す。砂があると変態が誘導されやすい。この時に用いる砂は粒径約 0.5 mm 程度のサンゴ砂が適しており、Leaf Corp 社の No. 34 Coral パウダーを使用した。サンゴ砂は海水で良く洗ってからオートクレーブし、その後ストレプトマイシン海水でリンスした後に用いた。ある程度成長した変態した幼若体は 1L の水槽に 1~5 匹以内になるよう調整する。餌は浮遊幼生期と同じで、培養温度も幼生期と変える必要はない。プランクトン（浮遊生物）であった幼生時には浮遊していた珪藻を食べていたが、幼若体以降はベントス（底生生物）となり砂に付着・堆積した珪藻や有機物を砂ごと食べる食性へ変化する。

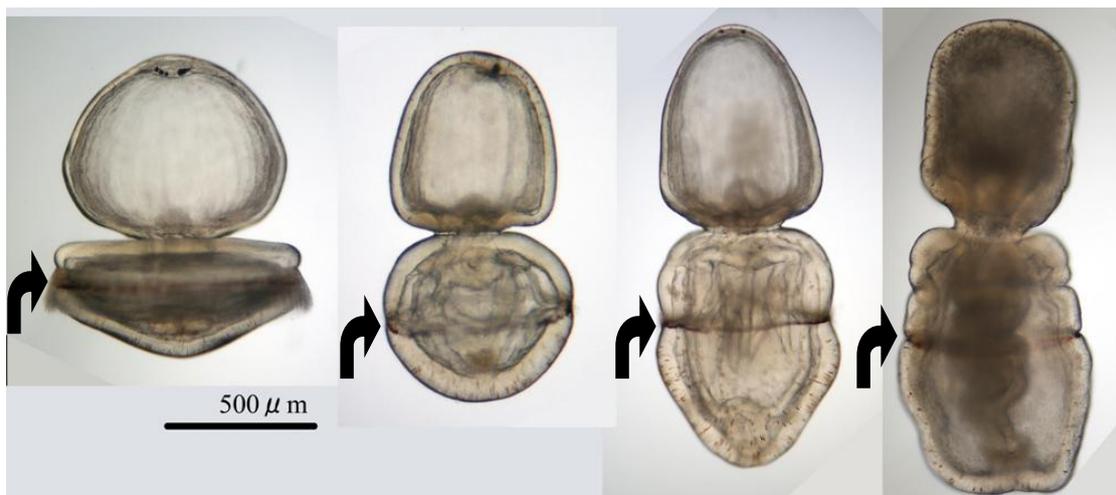


図 65 変態期から幼若体への変化。左から右に時系列が進む。黒矢印は繊毛環（跡）

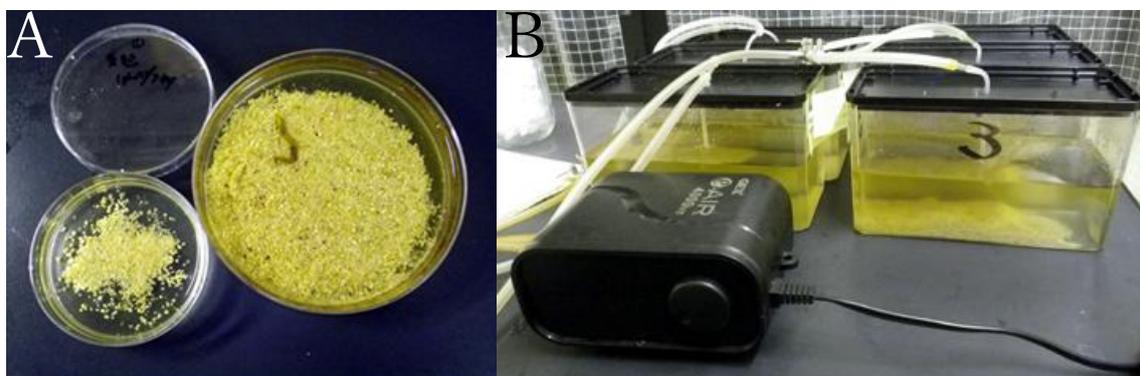


図 66 変態期及び着底直後の培養水槽 (A) シャーレ内で着底誘導、直後の飼育 (B) ある程度成長した幼若固体用飼育水槽

## 第8項 着底後の成長と取り扱い

着底直後は吻や内臓がやや黄色味がかっており、それ以外の部分はほぼ半透明である。2～3日ほどで全体的に黄色になり、口の近傍に襟と呼ばれる構造（赤矢印）が形成され、前体（吻）、中体（襟）、後体（体幹部）の基本構造が整う。内部構造も襟神経索が発達し始めていると思われる。変態後1週間程度で鰓孔（青矢印）と肝盲囊（緑矢印）が形成される（図67）。

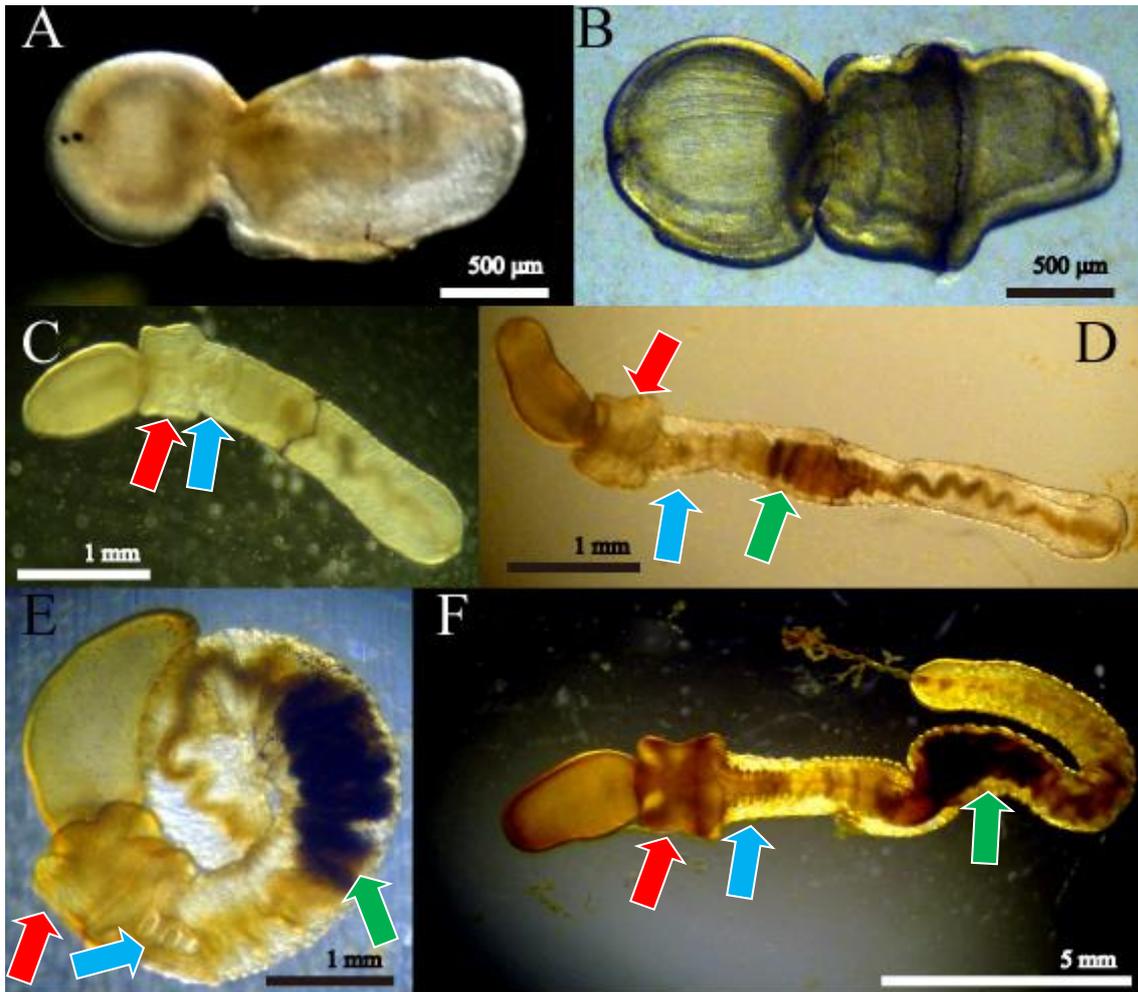


図67 着底後のヒメギボシムシ幼若個体

(A、B) 変態1日後 (C) 変態3日後 (D) 変態9日後 (E) 変態3週間後 (F) 変態約1年後

変態して着底すると吻を動かして砂に潜るようになる。この時のサンゴ砂は No. 34 Coral パウダーとやや大きめの No. 36 Coral スモールを混ぜて使用する。これより大きいと幼若体が砂を飲み込めず、小さいと砂の間隙に海水が入り込まず嫌氣的になり腐りやすくなる。個体が大きくなるに従ってパウダーの量を減らしていき、最終的には No. 36 Coral スモールのみとする。砂は厚さ 1 cm 程度を飼育槽の底面積 2/3 程度敷き、成長に伴って砂の量を増やしていく。最初は砂を入れすぎると幼若体の搜索に苦勞する。飼育温度はエアコンで調整した室温で十分であるが、18~28°Cの範疇に納まるようにする。

餌は幼生期と同じものを与えるが、量は多めに与える。目安として 90 mm シャーレに幼若体 1 匹を入れた場合は 30 ml のストレプトマイシン海水と 1 ml の珪藻培養液及び 10 µl のマリンデラックスを与えた。成長するにつれて量を増やしてゆくが、珪藻培養液の量は 5 ml までとする。1 リットル水槽の場合は 700 ml のストレプトマイシン海水と 20 ml の珪藻培養液、100 µl のマリンデラックスを加える。これらの餌が沈澱あるいは砂に吸着したものをデトリタス（沈殿・堆積物）食者となった成体のギボシムシが砂ごと飲み込んで消化する。ただし、現時点でのやり方では自然界に比べて栄養源が限定的であり、成長が遅くならざるを得ない。市販の幾つかの海洋生物用の餌を粉末にして混ぜ込んでみたが、ヒメギボシムシの調子が悪くなる（色が茶褐色になり大きさが縮む）ことがほとんどであった。天然の砂や海水をそのまま入れると内部に潜む様々な生物によってヒメギボシムシが捕食されてしまうため、人工飼育下で正常な成長を促す方法は要検討である。

水換えはストレプトマイシン海水を週 2 回のペースで行う。交換する割合は 9 割程度で、水を換える前にヒメギボシムシの体部が千切れない程度に砂をゆっくりとピペッティングしてほぐし、砂中のゴミ等を浮遊させてから海水を交換する。水槽は月に 1、2 度きれいなものと交換する。海水のろ過は最初の 1~2 ヶ月はミリポアろ過を行うが、その後はろ紙によるろ過でも問題はない。ストレプトマイシンの添加をやめるべきかどうか迷ったが、バクテリアやカビなどによる病気などの知見がなく、海水も生息地のものではなく飼育地のものになるため、念のため添加を継続した。

平均的な成長速度を求めることは、体部の著しい伸縮や個体差が大きいだけでなく、水換え時の刺激や自切で体部が切れやすいため難しい。早ければ着底後 3 ヶ月で体長 3~5 cm に達する個体もある。体部が切れた場合は両端共に再生するため特に処置は必要としない。この新口動物では珍しい高い再生能力はギボシムシの特徴の一つであり、その再生能力・機構も研究の大きなテーマとなっている。

生殖巣の成熟・精子や卵の放出は確認できていないが、着底後 1 年程度で生殖翼の肥厚を観察できるようになった(図 68)。生殖巣はエオシンで強く染色される傾向がある。肥厚した生殖層は固定後に脆くなるため、パラホルムアルデヒド単体ではなくピクリン酸を含む固定液が無難である。

これらのことから、もう少し栄養条件を改善できれば、屋内でのライフサイクルを回すことも可能になると考えている。ただし市販の海生動物用の餌などを磨り潰して与えると調子が悪くなる傾向が見られたため、餌の選定は非常に難しい。

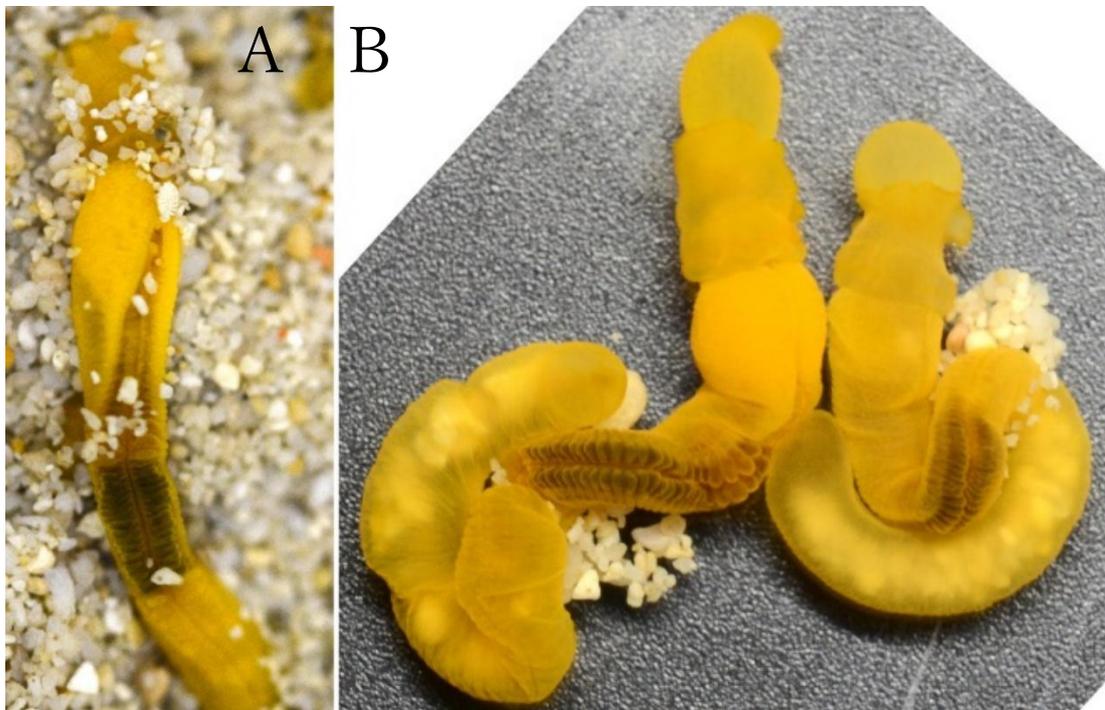


図 68 人口飼育下のヒメギボシムシ生殖翼の肥厚 (全長 5 cm 程度)

(A) 肥厚した生殖翼 (腹側) (B) 左側の個体は生殖翼が肥厚、右側は未肥厚

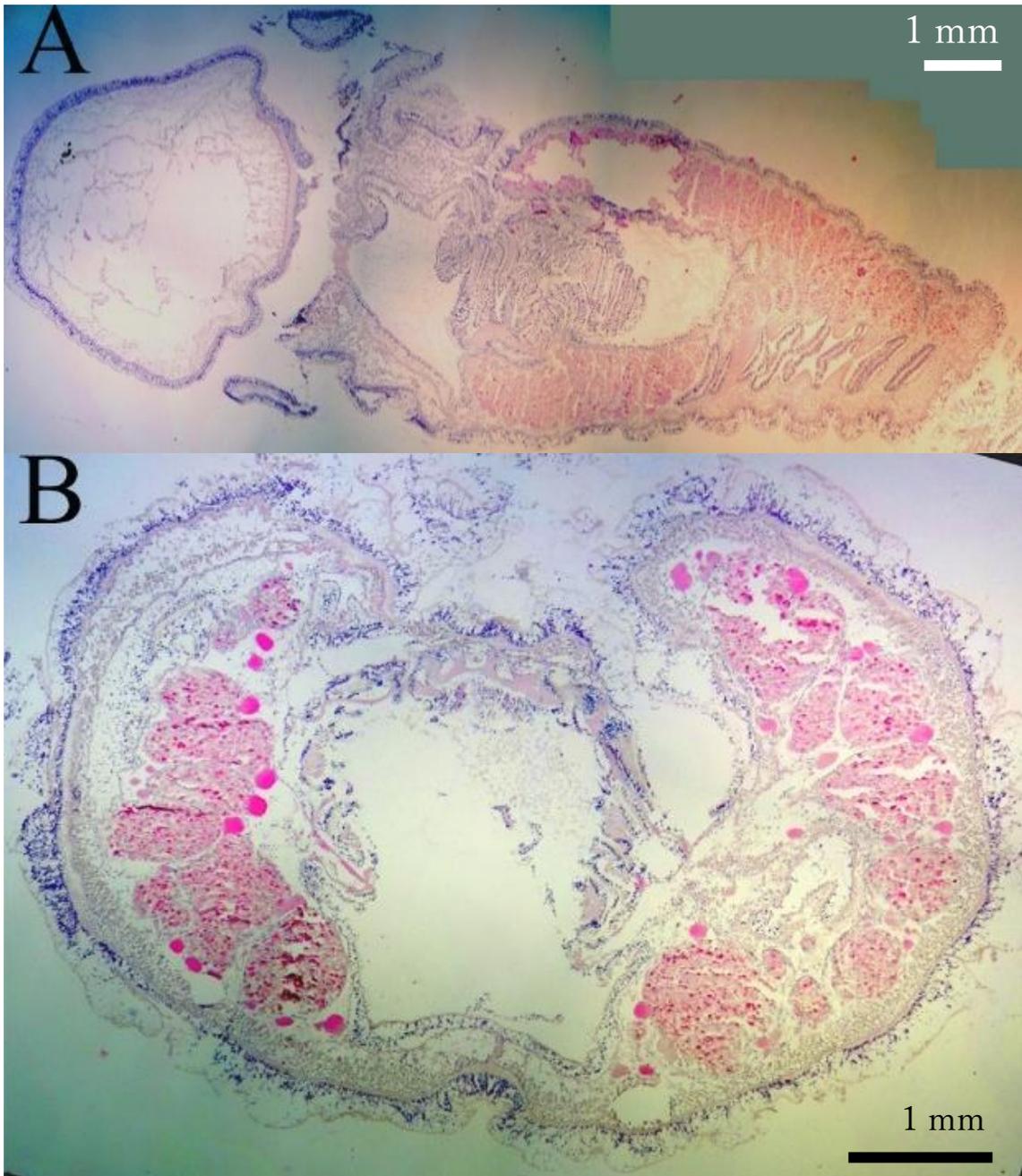


図 69 人口飼育下で肥厚したヒメギボシムシ生殖翼切片の HE 染色像

(A) 吻、襟、鰓穴、生殖翼付近の縦断面。腹側が上。

(B) 横断面。背側が上。エオシンで赤く染まる部分が生殖層。

## 第9項 調子が悪化した幼生及び幼若体の取り扱い、および再生について

ヒメギボシムシは他のギボシムシと比べて変態まで長期間培養する必要があるため、その時々海水や珪藻の状態によって幼生のコンディションが悪化することが多い。原因としては攪拌時に他個体や容器などへ接触する事や古い餌を与えた場合、飼育温度の変化や海水の質の変化などであるが、特に個体のサイズが大きくなる後期メチニコフ期からその状況が生じやすい。この場合、幼生は1次、2次葉がなくなって丸く小さくなり初期メチニコフ期、あるいはハイダー期に逆戻りしたような状態となる。この場合は速やかに新しい培養海水に移して初期メチニコフ期と同様の培養方法に戻す。大小の幼生が混在する場合は1 mm以上の大きなものだけを選び分けて飼育水槽も分ける。元の状態に戻るために1~2カ月を要することがあるが、2~3割の幼生は復調する。気温や海水の質が変化する1月から3月にかけて調子を崩しやすく、その後復調した幼生は8月頃に変態しやすい傾向がある。

変態後の幼若体や小型の生体の状態で調子が悪くなると、体色が鮮やかなレモンイエローから褐色を帯びた色合いとなり不透明感が増す。このステージで不調になる理由は温度変化や餌であることが多い。特に餌は魚類の飼育に使う動物性タンパク質を含む粉末飼料を与えると調子を崩しやすく、適切な餌の選定には至っていない。海藻を磨り潰したものを与えてみても良い結果は得られなかった。添加する海藻の種類にもよるのかもしれないが、生息地の環境を鑑みると砂の隙間に海水が十分通る様な水の流れを疑似的に構築する必要があると感じている。調子が悪くなった場合には珪藻のみで飼育すると元の体色に戻るが、3~6ヶ月の長い期間を要した。

また、調子や体表の色としては問題ない様に見える時でも体部が途中で切れてしまうことがある。自切しているのか、砂を消化中に伸縮することで腸管が傷つき、そこから切れている可能性も考えられる。この場合は傷口が塞がった後に再生して吻あるいは肛門が形成され、2つの個体として改めて成長を始める。この様子については参考論文に詳しいのでそちらを参照されたい<sup>54)</sup>。

## 第 10 項 浮遊幼生の長期培養と奇形幼生の出現

ヒメギボシムシ幼生は最大 2 年程度浮遊幼生のまま生存することができる。しかし長期にわたり培養すると奇形の幼生が出やすくなり、幼生の下部がスカート状に広がるものや下方に突出するもの、著しく萎縮したものが現れる。甚だしいものは内部器官が複数出現するケースもある(図 70)。成体のギボシムシが高い再生能力を有することから、幼生の段階でも再生能力をイレギュラーに発現している可能性も考えられる。器官の複製という観点から考えると非常に興味深い。

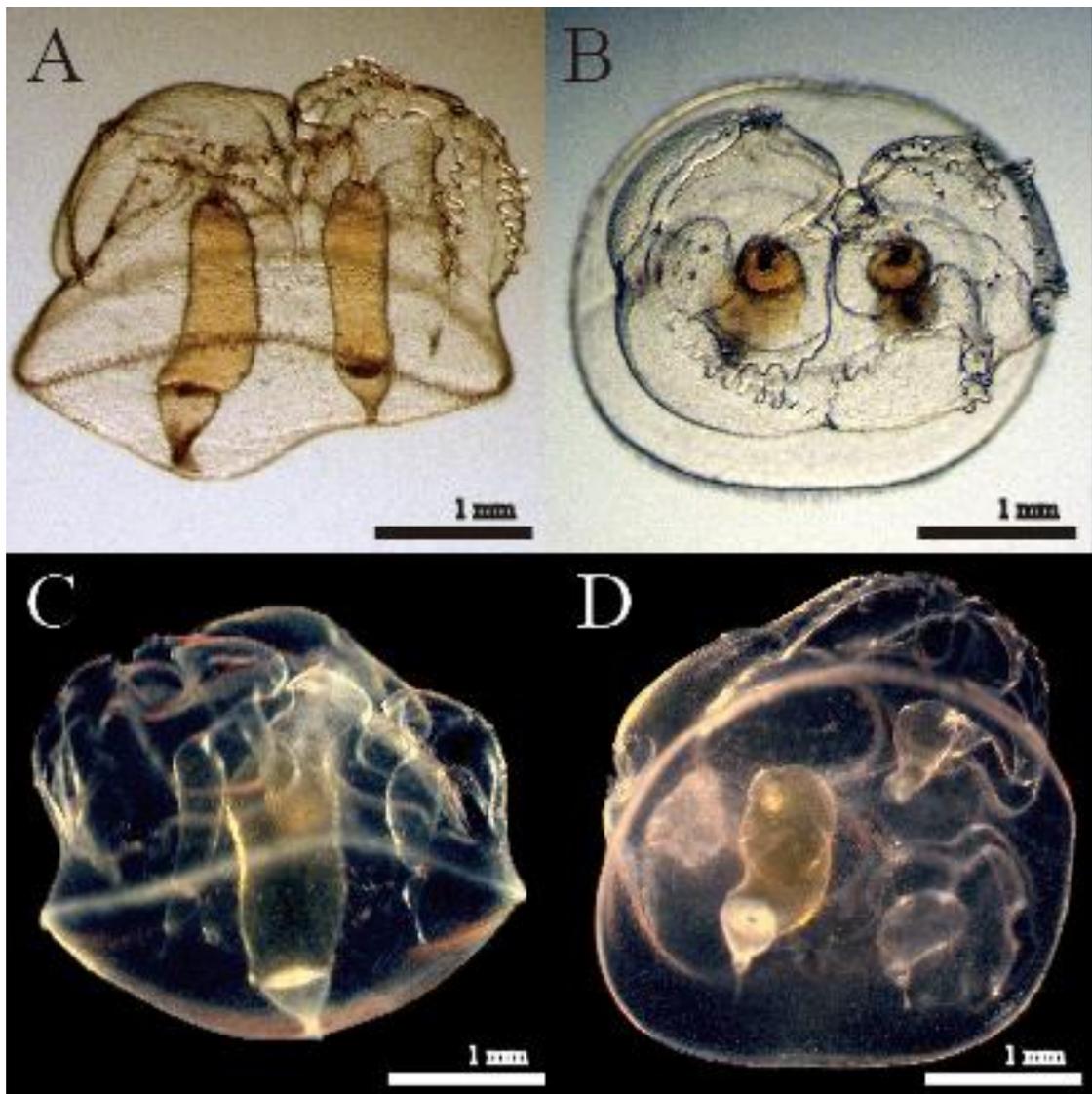


図 70 内部構造を複数持つ奇形トルナリア幼生

(A、B) 結合双生 (C、D) 結合三生

## 第 11 項 ヒメギボシムシ生息地の確認と新種と思われるギボシムシ

国内で最も古いヒメギボシムシの生息地の報告論文は 1977 年の和歌山県串本町沿岸におけるものである<sup>57)</sup> (1894 年に小笠原父島で採集されたヒメギボシムシと思われる標本が存在するとの報告もある)。そこで和歌山県串本町で論文の情報を頼りに生息地を探索したところ、確かに生息はしていたが個体数はそれほど多く見られなかった。探索範囲を拡大したところ、原著とは少し違う場所で高密度に生息する場所を発見した。湧水が流れ込む辺りのやや砂礫のタイドプール（潮だまり）に最も高密度に生息していたが、やや軟弱で切れやすい個体が多かった。同じ地点でもう少し沖に行くと丈夫なヒメギボシムシが散在しているため塩濃度の影響が考えられる。場所によってはオスしか採取できなかったが、この辺りは要検証である。

奨励研究の助成により他の生息地調査が可能になったため、まずは串本から西の四国南岸を広範囲に探索した所、土佐清水市滝串付近で岩盤層の上に溜まった貝交じりの荒めの砂を含むタイドプール中にヒメギボシムシを少数発見した。九州地方まで探索範囲を拡大したかったが、予算と時間、体力の関係上断念せざるを得なかった。

また、琉球大学瀬底臨海実験所近くの沖縄県国頭郡本部町備瀬付近にヒメギボシムシらしきものが多数生息しているという情報があり、実際にヒメギボシムシが生息していることを確認した。さらに沖縄本島南部沿岸地域を探索したところ、南城市玉城付近にハネナシギボシムシ属の新種の可能性がある白めのギボシムシを採集した (図 71)。残念ながらこの後は採集に行く機会がなく、非常に残念に思っている。また、それ以外の場所でもワダツミギボシムシらしきものを採集したが、後々 DNA やタンパク質を調査できるよう 70% エタノールで固定・保管しようとしたころドロドロに溶けてしまった。その前に写真に収めなかったことや、頑張ってもう一体採取してホルマリン固定しなかったことを悔やんだが、こう言った失敗も一つの体験、知見である思う。

なお学外でのフィールド活動では相応の危険・トラブルが想定される。実際にウミヘビに眼前まで迫られたりガンガゼに刺されることもあった。さらに地元の漁師や活動団体に不審者（密猟者）として疑われたため、職員証を提示して対応することで事なきを得ることもあった。



図 71 沖縄県南城市玉城付近で  
採集したハネナシギボシムシ属と  
考えられる白いギボシムシ

## 第 12 項 成果まとめ

ヒメギボシムシの研究支援に関しては、主に生体の採集・維持管理、分子生物学的に利用可能な幼生の供給、変態までの飼育方法とライフサイクル確立を行った。前述した通り、ギボシムシ類は間接発生種と直接発生種があり、前者は発生期間が短いため全ステージを研究室内で追うことができるが、生体の採集が困難なことが多く、数もそれほど採集できない。後者に属するヒメギボシムシは成体の採集が容易であるという大きな利点がありながらも、発生期間が長いために全ステージを研究室内で追うことができる例は世界的にも無かった。そのため研究も初期発生のみで留まるケースが多く、後期発生はプランクトンネットを用いた採集によるため物理的な刺激による影響が避けられず、極めて短い変態期を経時的に追うことも極めて難しかった。発生および再生をテーマとするラボを支援するにあたり、長期的かつ安定した飼育技術の確立と提供が急務となっていた。そのためホヤの時と異なり、技術支援は生体の取り扱いに注力し、分子生物学的な部分は教員、研究員、学生に委ねることになった。

異動のためライフサイクルを完全に回すには今一步の時間が足りなかったが、多数の成体および幼生を採集・飼育して研究及び実習に供給し、さらに変態期を経た幼若体までのヒメギボシムシの飼育方法を世界で初めて確立することができた。

この研究支援活動において、日本動物学会を含む多数の研究発表を行い、2 件の奨励研究（課題番号 20918016、23924016）を獲得した。

## 第6章 自然科学研究支援開発センター (N-BARD) への異動と機器分析支援

### 業務に対応するためのリスクリング

2017年に諸事情により N-BARD へと異動することになった。当時は東広島地区の分析系技術職員は化学・物質系を専門とする職員が機器分析棟と呼ばれる建屋に6名、生物系の技術職員が遺伝子実験棟に3名配属されていた。うち遺伝子実験棟に1名欠員が出たため、その後任として配属された。本章では N-BARD で担当することになった装置や関連する業務について述べる。

### 第1節 質量分析計とその運用について

最初に担当することになった装置が質量分析計である。質量分析計は原子や分子をイオン化して電荷を持たせて電場あるいは磁場的な力で運動させる。その運動が質量と比例することから質量を分析することができる装置である。開発初期は原子の精密質量や同位体の測定に始まり、低分子化合物の構造解析や定量に発展し、現在ではタンパク質等の巨大物質の測定も可能となっている。測定に必要なサンプルの量は pmol, fmol といった微量でも良く、そのため応用範囲は物理や化学のみならず生物学、医学、薬学、材料工学、考古学、宇宙科学にまで広範囲に及ぶ。質量分析の手法や機器、解析用 PC やソフトウェアも 20 世紀末から急速に発展し、現在も日々新たな装置や分析手法が開発されている。そのため質量分析計の無い理学系の大学というものは考えられないほどである。

しかしながら装置としては大型・高価格なものになりがちであり、極めてデリケートな装置でもあるため、熟練した研究者や技術者による取り扱いが極めて重要である。歴史的な経緯から技術者は化学系が多くを占めており、後から急速に発展した生物系のサンプル解析に対応するにはまた別のスキルや知識が要求されるため、難易度の高いスキルアップか、ある程度の方業が必要な状況となっている。筆者は生物系の出身であるため、本学東広島キャンパスの化学系質量分析スペシャリストと協働して主に生物系サンプルのための質量分析支援を行うこととなった。

## 第1項 質量分析計 (MALDI TOF MS) 支援

質量分析計のイオン化と分析部には様々な種類があり、その組み合わせによって多種多様な質量分析計が存在する。その中でも幾つかメジャーな組み合わせがあり、そのうちの 하나가 MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization: マトリックス支援レーザー脱離イオン化) TOF (Time Of Flight: 飛行時間型) MS (Mass spectrometer: 質量分析計) である。MALDI を簡単に説明するとサンプルにマトリクスと呼ばれるレーザーのエネルギーを吸収してサンプルの分子に受け渡す試薬を加えて乾燥させ混晶とし、これにレーザーを当ててサンプルをイオン化するものである (図 72A)。ToF の仕組みは真空中での物体の移動は与えられる力が一定であれば、質量の大きな分子ほど遅く、小さい分子ほど早く飛ぶ、という原理から一定距離間の分子の飛行時間を質量に換算するものである (図 72B)。筆者が最初に担当したのがまさに MALDI の開発でノーベル賞を受賞した田中耕一博士を擁する島津製作所の AXIMA-QIT (図 72C) であった。この装置では理解しやすい一価のプロトン付加イオン  $[M+H]^+$  あるいはプロトン脱離イオン  $[M-H]^-$  が見えやすく、操作画面もシンプルであるため、質量分析の基礎を学ぶのに極めて有効であった。

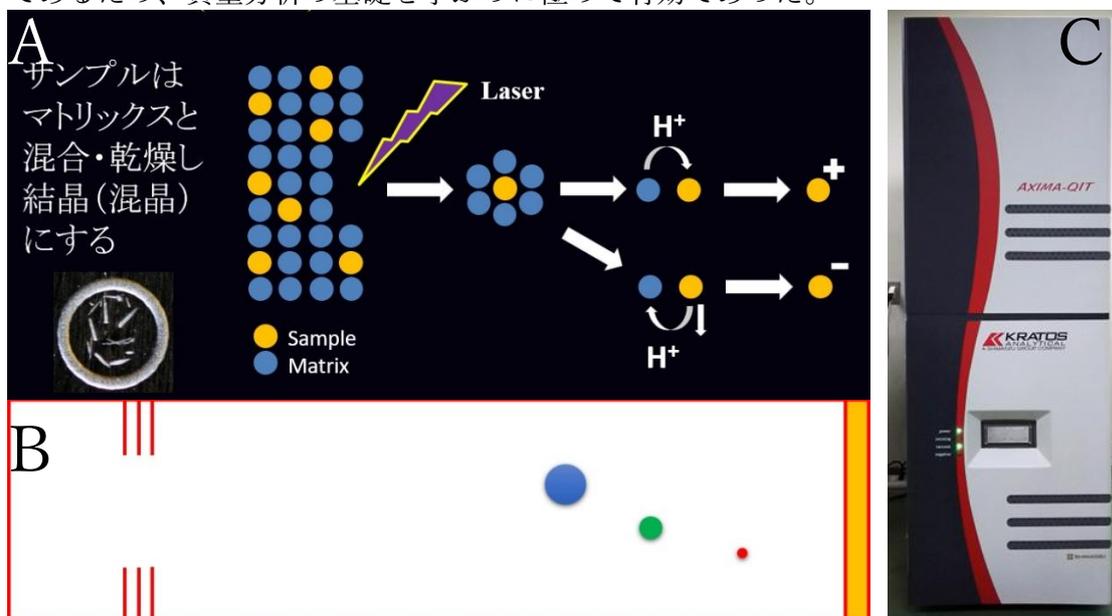


図 72 MALDI TOF 型質量分析計の仕組み (A) MALDI によるイオン化の概略 (B) TOF の仕組み (C) 島津製作所製 MALDI TOF 型質量分析計 AXIMA-QIT

## 第2項 質量分析技術・知識の習得（リスクリング）

技術習得にあたり最初に組織として行うのは前任者からの技術伝承である。1週間程度のレクチャーを前任者から受けたものの、マニュアルにある簡単な装置起動や測定をできるようになるのが精一杯であった。同じキャンパスに質量分析技術者はもう1名在籍しているものの、派遣先のN-BARDの組織体制は当時機器分析棟と遺伝子実験棟で別組織となっており、諸事情で2組織間の技術的交流はたとえ技術職員個人間で問題なかったとしても難しい状況であり、前任者もその点で苦勞していた。そのため装置のマニュアルや島津製作所HP内のテクニカルサポート、各種参考書籍を紐解きつつ、メーカー技術者の指導を受けながら独学せざるを得なかった。技術習得にはBSAやカゼインという一般的かつ安価な試薬が使えたことが救いだった。

この時に大変お世話になったのは、装置メーカーの島津製作所と質量分析技術者研究会（当時は関西地区質量分析技術者研究会）、そして質量分析学会が主催する研修会や会合だった。メーカーには操作のイロハから様々なトラブル（あるいは筆者の勘違い）についてきめ細やかなサポートを頂き、これが無ければ装置担当者を辞めるだけでなく技術職員の職を辞すことになっていたかもしれず、感謝してもしきれない。後者の質量分析技術者研究会は常に初学者向けに門戸を開き、定期的に基礎的なところから学習・交流する機会が設けられており、この会への参加無くしては質量分析への理解と対応が著しく遅れたことは想像に難くない。前職の臨海実験所でもそうであったが、学内で同じ業務を行う技術職員がいない場合は、全国規模の同系統の技術者の集まりに参加し、そこから知識や技術の継承を得ることは大変有意義である。技術職員ネットワークの重要性は技術職員となって以降、常に感じている。また質量分析学会の研修や会合はややコストが高めなもの、基礎からみっちり勉強することができて大変ありがたかった。ただ自身で何か質量分析関連の研究をして発表あるいは論文を書くという事は難しい状況であったため、自費を投じてまでの学会加入には踏み切れなかった。技術職員の学会年会費及び参加をサポートする制度が国策として充実すれば、より一層の科学技術支援発展に繋がると思われるが、現状そうでないことは残念なことに思っている。

### 第3項 新しい質量分析サービス「プロテオミクス前処理」の開発・展開

質量分析に関するリスクリングを行いつつ、やはり現場におけるサービスは研究者からのニーズを満たすものでなくてはならないと考えた。当時の広島大学における質量分析サービスでは化学系の技術職員がスペシャリストとして配置されていたため化学系の分析のニーズは十分に満たされていたが、生物系、特にプロテオミクスの前処理における支援までは手が回っていなかった。

プロテオミクスとはタンパク質の網羅的な研究を指す言葉であり、当初は生物組織から抽出したタンパク質を二次元電気泳動と呼ばれる手法で分子量と等電点の2軸で分離し、スポット上に現れる単離されたタンパク質をPVDF (Polyvinylidene Fluoride) 膜に転写した後に一つずつ切り出し、N末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーで解読後、そこから Degenerate primer (アミノ酸から予測される20残基前後のDNA配列を全て混合したもの) を作成し、C末端側のポリA鎖DNA間とのPCR (Polymerase Chain Reaction) によって該当の遺伝子を増幅する。さらにその遺伝子をクローニング (大腸菌に発現させて大量に得る) して抗原となるタンパク質を作成させ、それを精製して抗原としてマウスに免疫して抗体を作成し、最初の2次元電気泳動に対してウェスタンブロッティング (電気泳動したタンパク質をPVDF膜に転写し、それに抗体を反応させて抗原を特定すること) を行うことで初めてタンパク質の同定と配列解析がなされるというものであった。それには約半年から一年程度と長い時間が必要であり、様々なテクニックを要するものであった。

この作業が質量分析技術の発展に伴い、2~3日で電気泳動後のゲルから直接タンパク質を質量分析計で測定・解析することが可能になった。具体的にはゲルあるいは液内の還元・アルキル化してトリプシン消化することで規則的な切断パターン (リジンとアルギニン残基のカルボキシ基側のペプチド結合を特異的に切断) を持つペプチド鎖にして抽出・脱塩し、質量分析計に導入する。質量分析計内ではペプチド鎖 (Precursor) の質量をまず測定し、そこからアルゴンを衝突させたり電子を移動させて開裂させる (Fragmentation) ことによってバラバラにして測定する。この precursor と fragment の組み合わせと、公共データベースに格納されているタンパク

質配列からトリプシン消化断片と Fragmentation をシミュレートしたもの (*in silico* digestion) をソフトウェア上でマッチングさせ、一定の一致を見たものを該当タンパク質として同定するものである (図 73)。当初は 1 つずつタンパク質を単離・分析する必要があったが、質量分析計本体とソフトウェアの発展によって現在では数千のタンパク質混合溶液から SDS-PAGE を介さずとも一度に同定することができるほどに発展しており、生物学における強力なツールとなっている。

ところが質量分析と一言で言っても、生物系の研究者と化学系の装置担当者ではベースとなる常識が大きく異なっている。例えば生物系研究者はリン酸化合物を大量に含む PBS などのバッファーを恒常的に使い、タンパク質可溶化のために界面活性剤である SDS や Tween を使い、PEG 等を多く含む試薬キットを使うことが一般的であるが、これらの物質は質量分析において、故障や汚染を引き起こすため忌避すべきものである。そして「精製した」という言葉は化学系では「純粋にその物質 (タンパク質) だけ」という意味になるが、生物系では「そのタンパク質だけ (ただし Buffer の成分は不問)」となりがちである。このように同じ言葉でも意味合いが異なってしまうがそれぞれが常識として浸透しているため、異分野から参入すると Buffer 組成が問題となること自体に気が付かない。そのため「塩や界面活性剤、PEG 等を含まないサンプルを準備してください」と言われたとき、生物系ユーザーはどのように調製すべきか困惑することになり、その答えを化学系の技術者では提供することが難しい。それ以外にも一般的な生物系の留意事項と質量分析における留意事項には異なる部分が少なくないため、安易に調製するとデータが取れないだけでなく装置の深刻な汚染を引き起こすことになる。

幸い筆者には以前の学生時代と臨海実験所勤務時代にタンパク質の取り扱いには 20 年弱の経験があったため、それらを安全に橋渡しするべくプロテオミクス前処理サービスを展開することにした。これにより依頼者は分子生物学的に一般的な調製法で準備したタンパク質を持ち込むだけで質量分析による解析ができるようになった。その後 AXIMA-QIT が故障して復旧を断念することになったが、このプロテオミクス前処理サービスは今も続いている。N-BARD 改組に伴う機器共用分析部門の発足による



いることから定性に役立つこと、多種の化合物が混在していると化合物間でのイオン化の競合が生じるため、それによる感度低下や定量性低下を避けるためである。担体の性質によって様々な種類の化合物を分離できることから多様なカラムが存在するが、どのカラムを選ぶかという事も初学者にはハードルが高く、アシストが必要な場面が多い。さらにカラムは 10 万円をこえることがほとんどであり、ちょっと試しに買って試すには金額的なハードルも高い。そこで代表的な C18 と呼ばれる逆相（疎水的なものを結合させる）カラムと HILIC という順相（親水的なものを結合させる）カラムを準備してレンタルサービスを開始した。現在は親水性化合物測定の需要が増しており、より分離性能が高い BEHAmide というカラムも購入して Orbitrap 等の別の質量分析計でも活用できるようにレンタルサービスを充実させている。

こうして分離された化合物を質量分析計本体（図 74 赤枠）に導入し、ESI（Electro-Spray Ionization）という手法でイオン化する（図 76A）。これは内径 100  $\mu\text{m}$  前後の極微小ステンレス管にサンプルを通しつつ高電圧をかけ、その先端からイオンをスプレー状に発生させることのできる仕組みである。同時に 200~500°C の高温をかけて溶媒を飛ばす。イオン化の仕組みには ESI 以外にもいくつかあるが、本稿では割愛する。生成されたイオンを電気的に内部に誘導し、さらに四重極と呼ばれる特殊な電磁場を形成する真空の分析部で質量を測定する（図 76B）。四重極の原理は複雑なため詳細な説明は割愛するが、特定の質量を通すことができる電磁場を作り出すことにより、それ以外の質量を持つ物質は弾かれる。この電磁場を変動させることによって一定の範囲内の質量を持つ物質をスキャンすることも可能であり、通過したイオンを検出器で検出する。この四重極ではあまり質量の測定範囲は広くなく（1~2000 程度）、分解能（検出されるスペクトルのピーク幅、高いと質量の小数点以下の桁数が増える）も高くないが、感度と定量性、ダイナミックレンジ（検出感度範囲）に優れ、装置として堅牢で安価であることから一般的な LCMS として多用されるシステムである。本装置は四重極を 3 つ備えていることから三連四重極あるいはタンデム四重極（MSMS）と呼ばれるシステムである（図 76C）。

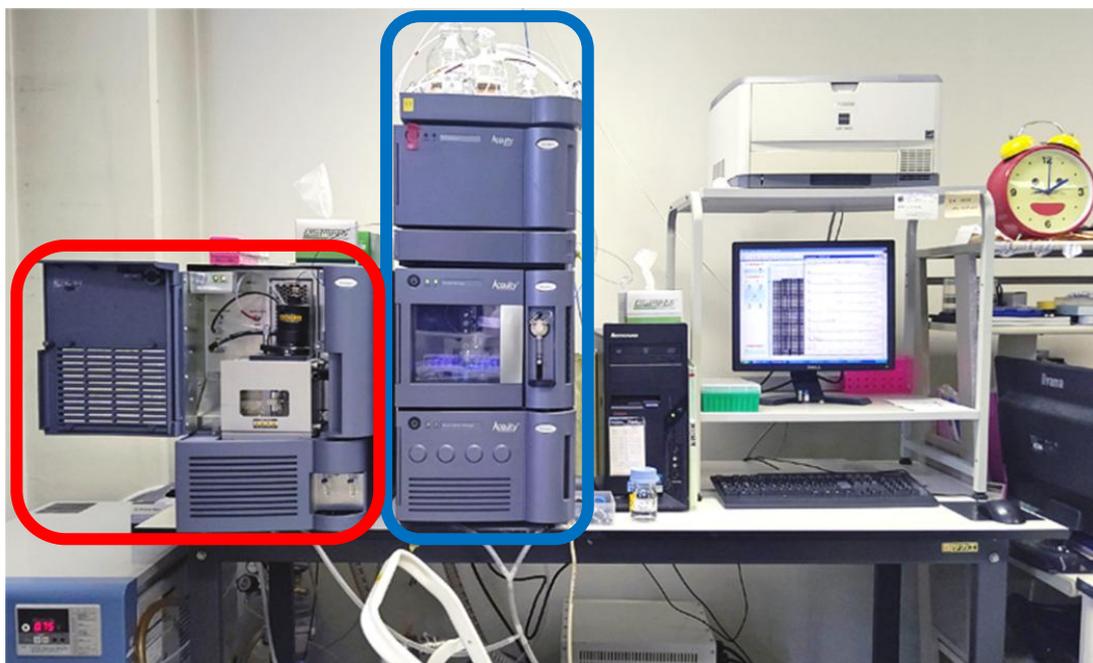


図 74 担当している Waters 社製 LCMS (Acquity TQD)

赤枠が質量分析計本体、青枠が LC 部分。これ以外に PC、窒素発生装置、真空ポンプなどが付随する。



図 75 LCMS で使われるカラム (Waters 社 HP より転載)

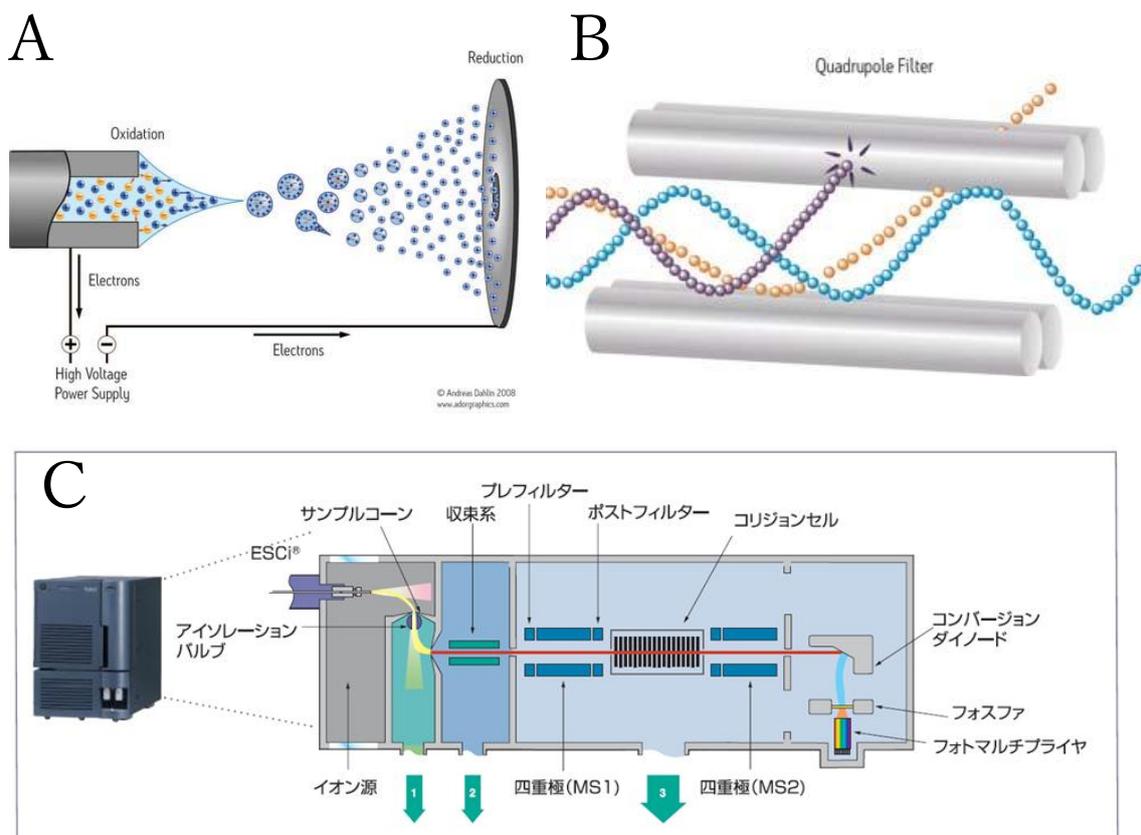


図 76 Waters TQD のイオン化部および分析部概要図 (A) イオン化部 (ESI) によるエレクトロスプレー模式図、(B) 四重極におけるイオンの挙動模式図、(C) TQD 三連四重極型質量分析計内部概要図 (Waters 社 HP より転載)

## 第 5 項 LCMS 支援の状況 移管前

2019 年に本学生物生産学部棟にあるトリプル四重極 LCMS の管理を学部から全学共用として移管することを打診され、本装置も担当することとなった。移管前は学部教員が装置の管理をされていたが、ご多忙なため装置管理は最初の取り扱い説明とトラブル後の対応が主となっていた。装置やカラムの洗浄方法もユーザーごとに異なっていたため洗浄が不十分であり、装置内部での汚れ詰まりによる圧力異常が度々生じていた。さらに導入してはいけない物質 (イオンペア剤) や前処理が不十分なサンプルをあまり適切でないメソッドで測定している様子も散見された。その結果、極度の汚れによる強いゴーストピークが常に検出される状態となっていて、一部化合物の測定で不適切なデータになる状況や、十分な感度で測定できていない状況があった。

また不運なことにメインユーザーの学部では質量分析の講義が十分でなく、質量分析計を用いる実習も無いため、学生側も基本原理等を十分理解できていなかった。

さらに設置されていた部屋も管理が十分でないため埃っぽく、温度も不安定で夏季には節電のためかクーラーが十分に効いておらず、時には冷房電源が切られていることがあり、室温が 35°Cを超える状況もあった。後に判明したことだが、この時に埃が通気口を塞いでいて、かつ室温が高い場合には装置自体も高温となり、測定値がずれる現象が起きていたことが判明した。室温を下げてでも装置本体の温度はそう簡単には変わらず、季節的に測定値が変動することは本来望ましくない。測定室の室温は経済性やイデオロギー、居住性を基準にするのではなく、装置のコンディションを第一に運用しなければならないが、施設の管理権限がないと難しい面がある。

## 第 6 項 LCMS 支援の状況 移管後

問題を解決するために既設棟の改修工事に乗じて筆者の常駐する遺伝子実験棟に物理的に移設していただき、清浄な環境下で十分に温度管理を行うことで測定が安定するようになった。さらに新規利用者講習を 1 日かけて行い、測定前後の洗浄は全て管理者が行うこととした。ユーザーごとに異なる（不適切な）利用と洗い方をされていることが流路詰まりとノイズの大きな原因となるためである。さらに洗い方も利用後に 100%有機溶媒を流すと、残存している成分が析出・不溶化して詰まる場合もあるため、最初に 50%メタノールでしばらく洗い流し、それから 25%刻みで 5~100%の各種有機溶媒で洗浄する方法により、流路が詰まるトラブルがほぼ解消された。

ゴーストピークに関してはイオンペア剤の使用を禁止し、ソルベントフィルターと呼ばれる移動相の入り口のフィルターを排除した。フィルターに染み付いたイオンペア剤が大きく影響したためである。その上で数カ月かけて洗浄を続けることでようやくゴーストピークの無い清浄な状態とすることができた。イオンペア剤を利用していたユーザーからはこれまで同様の化合物の分離ができなくなるため不満の声が上がったが、他の利用者の測定を妨害している例を示して共用機器としては好ましくない状態であること、イオンペア剤を使わずカラムを変更することで目的のピークが分離す

る条件を一緒に検討したことでご納得を頂いた。さらにメソッド構築やカラム、移動相等の選定、サンプル前処理の助言も積極的に行うことにした。きっかけは幾つかあり、その詳細を次項以降に述べる。

## 第7項 LCMS 支援の詳細 メソッド構築

LCMS を用いて化合物の定量を行う場合、まずは化合物がイオン化する条件、主に電圧関係の調整が必須である。ユーザーのパラメーターを見ていくと、変えるべきでない数値が変えられ、変える（合わせる）べきところがあっていないことが散見された。これらを適正な値にすると感度が数倍増加した。他にも例えば特定の化合物を検出するために MRM (Multiple Reaction Monitoring) という測定方法が良く用いられるが、これは最初にプリカーサーイオンの値を指定してその質量をもつ物質だけ最初の四重極を通過させ、2 番目の四重極（コリジョンセル）でアルゴンと衝突させて分子を開裂させ、3 番目の四重極で開裂したフラグメントを選抜して検出するものである。この時にプリカーサーおよびフラグメントイオンの数値を適切に設定しなければならないが、マススペクトルの読み方が適切でない場合はややズレた数値として設定してしまうことがある。本装置の解析ソフトウェアである Masslynx では、デフォルトとしてピークの中央値ではなく最も高い所の  $m/z$  値をスムージングなしで表示する（図 77）。このクセを理解していないとややズレた値で設定してしまうことになる。さらに画面上ではリアルタイムにピークが表示されるが、ソフトウェア上での拡大時にややスケールがズレる変な癖（バグ？）がある。そのため一定期間のデータを取得して積算・平均化して出力したピークを拡大して検証しなければならない。これらをもとに設定を適切な値に変更することで感度が上昇するケースも見られた。

また定量には標準曲線が欠かせないが、濃度範囲の設定が不適切で濃すぎる標準溶液を注入することで直線性やピーク形状が悪くなるだけでなく、その後のサンプル測定時にも大きな残存ピークが出てくるキャリーオーバーが見られたり、標準液の pH が適切でないため経時的に分解していたり（図 78）、ガラスに吸着しやすい化合物のため低濃度領域の直線性が非常に悪いケースなども見られた。

また、LCMS では LC 部分で化合物を分離し、その分離度合いはカラムと移動相の組み合わせによって決定される。この時にどのカラムとどの移動相を選択するかは類似文献の読み込みによって目星をつけることができるが、論文には記述されない（省略されがちな）ことも多く、この辺りをフォローする必要もある。例えば図 79 はある親水性化合物を順相の HIIC カラムで分離したときのクロマトグラムであるが、A ではピークが割れ不自然な形状となっている。ぱっと見では 2~3 つの化合物が分離できていないように見えるが、これは B と全く同じサンプルで一つの化合物由来のピークである。原因は A ではサンプルを溶出力の強い 50%メタノールに溶解しており、B は溶出力の弱い 75%アセトニトリルで溶解している。溶出力が強い溶媒でカラムに注入した場合、一部はカラムに十分に保持されず早い時間に一部が検出される。初期移動相と同程度、あるいは弱い溶出力の溶媒ではカラムに十分に保持され、きれいな形状のシングルピークとして検出される。両者ともにピークの面積値を元にしたサンプル間の比較ができないわけではないが、前者をみるとデータだけではなく研究そのものに疑いを持たれてもやむを得ないと思われる。「正しいデータは美しい」という言葉があるが、やはり理に適った美しいデータが望ましいと信じる。ただし、データ処理では「無理やり」美しく加工することも可能である。例えば前述の割れたピークに過剰なスムージング処理をかければ一見普通のシングルピークに見える状態に加工できなくはない。経験を積みれば妙に幅の広いピークになっていることから過剰なスムージングを看破できるようになるが、これがクロマトグラムではなく数値だけだと正しくピーク的面積をアサインして計算できているかの検証ができず、本人のみならず指導教員も間違いに気が付かない恐れがある。そのため測定データの出力も以前は数値だけだったが、必ず該当ピークのクロマトグラムを付属させるようにした。

これらの経験に基づく検討を全てユーザーに求めることは酷なことである。特に初期設定は初心者の学生がぶつかる分厚い壁であり、うまく行かずに時間を浪費している場合もあった。そこで正しいデータの見方を伝えつつ適切な設定を出し、感度よく速やかに本来のサンプルを測定できるようメソッド構築のサポートを充実させるように心がけている。

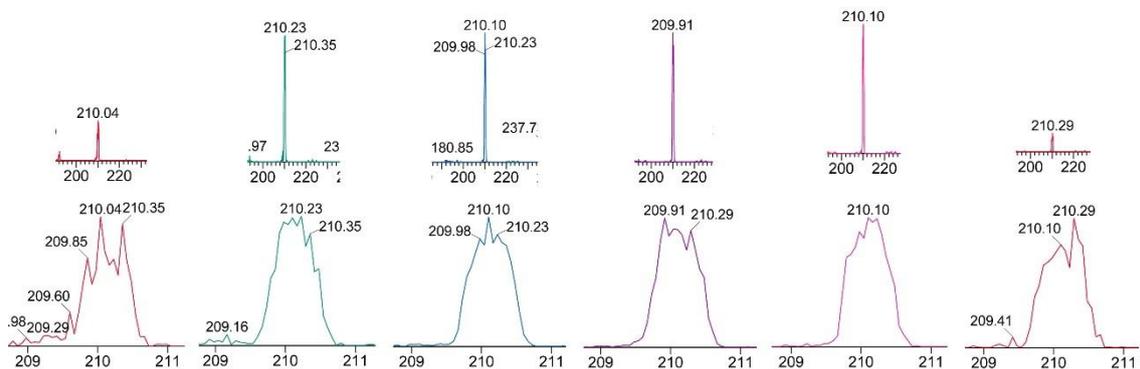


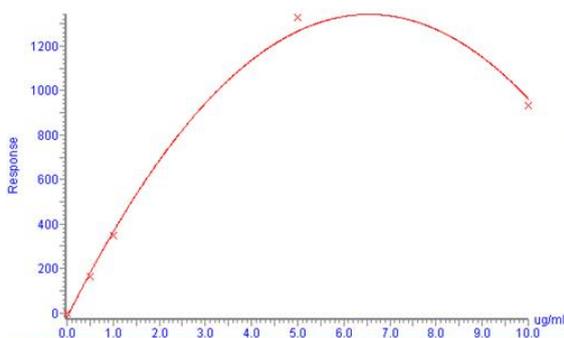
図 77 マススペクトルにおけるピークの  $m/z$  ラベル値と実際の中央値のズレ

(上段) マススペクトル全体を見る時の縮小した状態でのピークの見え方と値付け。

(下段) 上段のピークを拡大したもの。上段でラベルされた値 ( $m/z$  209.9~210.3) は決して中央値ではないことが分かる。何度かスペクトルを取得した上で適切なスムージングをかけるなどして比較し、妥当な中央値 ( $m/z$  210.1) をピークの値をメソッドに組み込まなければ感度が減少することがある。

A

Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.993854$   
 Calibration curve:  $-31.8055 * x^2 + 416.182 * x + -19.7982$   
 Response type: External Std, Area  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



B

Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999935$   
 Calibration curve:  $3.90646e-005 * x^2 + 2.92872 * x + -0.928989$   
 Response type: External Std, Area  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

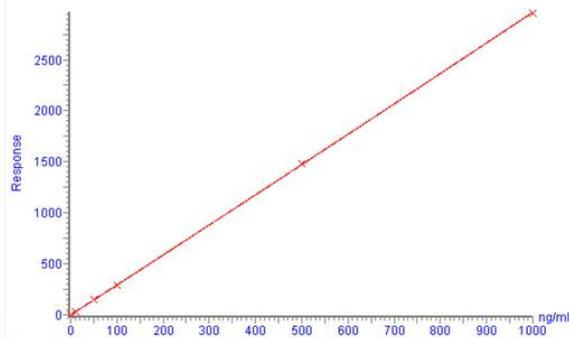


図 78 分解しやすい化合物の標準曲線 (pH を上げなければ溶解しないが、そのままにすると経時的に分解されてしまう。溶解後は酸性にすると安定化)

(A) 分解されやすいアルカリ性の溶媒で保存、初期移動相 (酸性) で希釈したもの。高濃度側はアルカリ性のため化合物が分解。(B) 化合物を溶解後速やかに酸性にし、同じ条件で希釈したもの

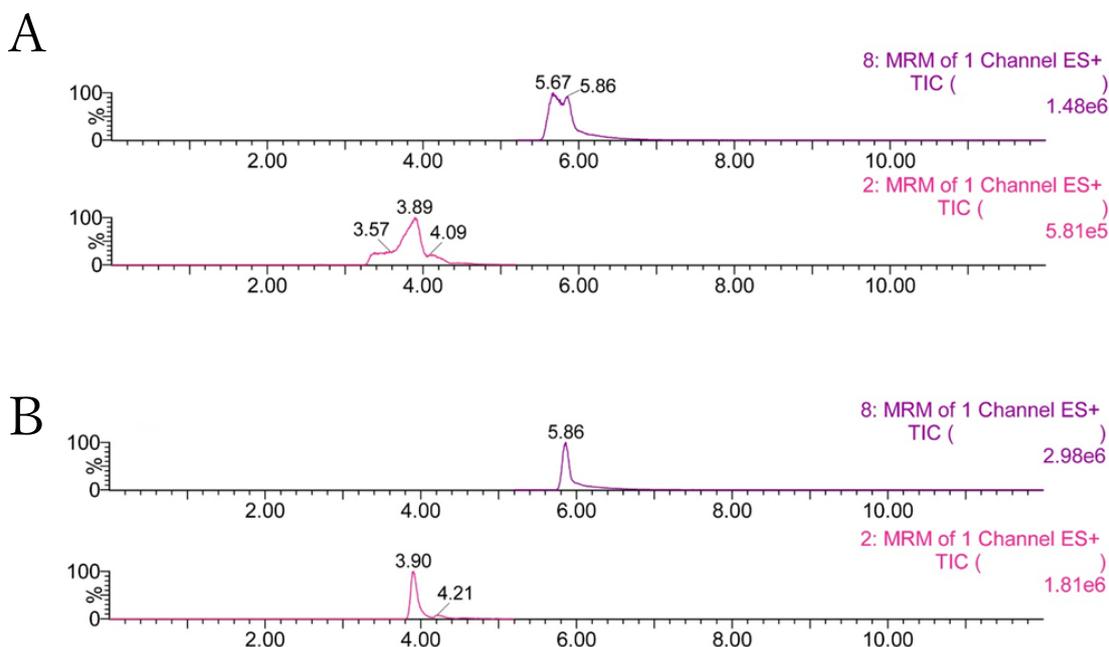


図 79 LCMS におけるサンプル溶媒の違いによるピークの変位

(A) サンプルを 50%メタノール（溶出力強）に溶解、(B) 75%アセトニトリル（溶出力弱）に溶解。サンプル溶媒以外の各種条件は A, B 共に全く同じ。

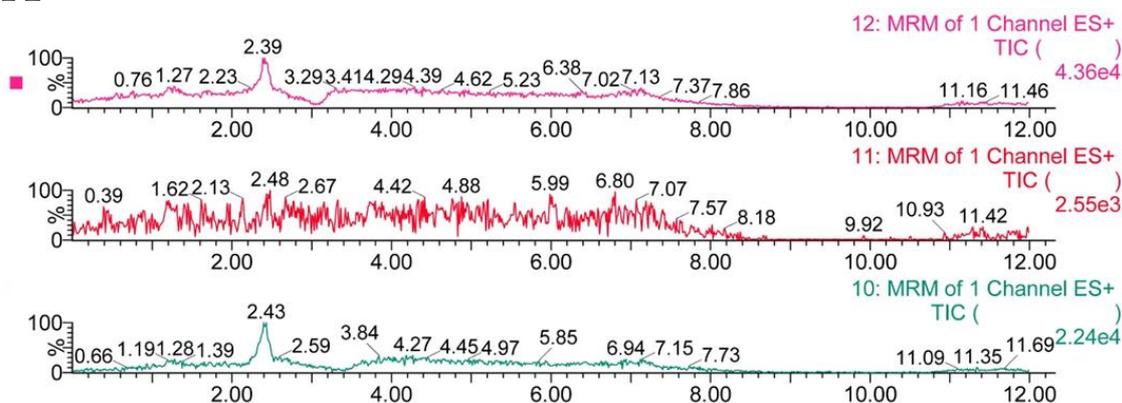
## 第 8 項 LCMS 支援の詳細 溶媒管理

正しいメソッドを構築していても、時に妙な圧力上昇やイオン化部の極端な汚染、異常なベースラインが生じることがある。その結果、低濃度領域で十分な感度が得られなかったり、クロマトグラム上でのピークの変位などが発生していた。そこでユーザーの持ち込む溶媒を確認してみると、やたらと浮遊物の多い溶媒を持ち込んでいたり、グレードの低い安い有機溶媒を利用しているケースが見られた。さらに水もイオン交換水やそれをオートクレーブしたものを持ち込んでいた。MilliQ 水もラボ（装置や建物）によって同じ 18.2MΩを示すものでもバックグラウンドがかなり異なった。また、溶媒を入れる瓶やメスシリンダーも前歴のわからない”汚い”瓶を使い回しており、十分に洗えていなかったり、洗剤などが残留したものを使用していた。溶媒は LCMS グレードのものを使用すること、器具は質量分析専用にして洗剤は使わず有機溶媒で超音波洗浄すること、調製した溶媒等を継ぎ足すのではなく古いものは一度全て捨てて新しい溶媒で共洗いすること、LCMS 用の超純水を購入するか当日採水した

MilliQ 水をフレッシュな状態で使用するといった細かいところを指導したところ、かなりの改善が見られた (図 80)。さらにサンプルを入れるバイアルも高額であるため洗浄して使い回したいという希望が強く、洗浄が不十分だと残存した濃い標準溶液が前歴にあると、その物質を含まないはずのサンプルでもかなりのピークが検出される事例もあった。基本的にバイアルは使い捨てることを推奨し、どうしても再利用する場合は徹底的に洗浄することを求めたところ、これらのトラブルもほぼ見られなくなった。それでもピークがズレることがあり、ユーザーの使用している状態を見ていると、逆相カラムを使用時に水 100%の状態のカラムへの送液を止めていることがあった。この状況では「C18 が寝る」あるいは「Dewetting」と呼ばれる現象が起き、カラム内で化合物が十分に保持されずピークが前倒しにズレることになる。そのため間違っても水 100%を送液しないよう、移動相には元々10%の有機溶媒を入れておくことを推奨することで再発しなくなった。

ただし良かったことばかりでもなく、正しいデータを出すために必要なことであっても細かに確認を取りながら進めようとする「細々と鬱陶しい」「負担が大きい」「自分にとって間違っていない程度のデータが欲しいのであって、正確さはそれほど求めていない」と疎まれることもあった。そのため相手によっては敢えてトラブルが起きることを予見しても、安全上の問題にならなければ無理に注意して防ごうとしない、あるいは装置を監視しておきトラブルが生じ始めたところで測定を強制終了させ、問題報告後にフォロー・再測定することもある。一度問題が生じ、どのような損失、後のユーザーに悪影響が出るかを実感頂くと、その後の管理に理解を頂きやすくなる。

A



B

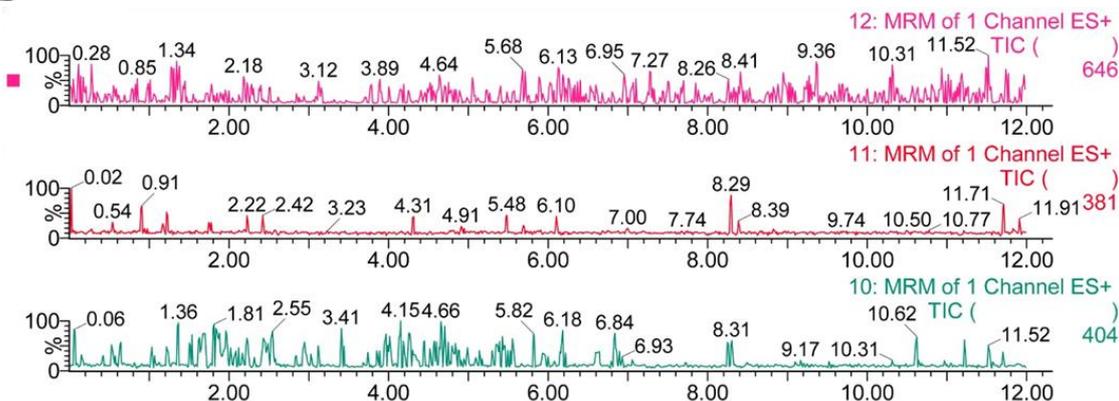


図 80 LCMS における溶媒の重要性

(A) 不適切な（汚れた）溶媒を移動相に用いた場合のマスクロマトグラム。全体的にベースラインが高く（数万）、ブランクにもかかわらず変なピークが出現。

(B) 正常な溶媒に変更した直後のブランク。ベースラインが低く（数十～数百）、ノイズ程度しか見られない。洗浄すればさらにノイズは減る。

## 第 9 項 LCMS 支援の詳細 前処理支援

前述の支援でユーザーの利便性は向上しつつトラブルをある程度抑えることができるようになってきたが、それでも圧力異常の不具合や感度不足、データのばらつきなどの不安定性といったトラブルは一部生じることがあった。装置側の問題ではないという確証が取れた後にユーザーからの聞き取りを行うと、LCMS 用試料の調製に問題があるケースもあった。生物試料からの低分子化合物の検出では、細胞片やタンパク質の除去が必須である。この時に一般的にはアセトニトリルやメタノールによる沈殿法で除タンパクを行うが、その時の有機溶媒比率が適切ではなかったり、温度管理が不適切である場合がある。その場合は沈殿処理・フィルターろ過後は透明であったのに、装置内の低温サンプル室に入れてしばらくすると析出・白濁する。あるいは前述の通り酸性でなければ安定しない物質であるのに中性あるいはアルカリ性の状態で抽出・保存を行っているケースもあった。ユーザー、特に不慣れな学生さんの手技を見ていると、揮発性有機溶媒を扱う際のピペットマンの扱いが適切ではないために結果にバラツキが生じていることも多い。大学によっては「ピペットマン検定」なるもの

を実施して教育すると共にデータの正確性を担保する試みを行われているとも聞く。この辺りの問題を把握するために、できるだけユーザーの測定対象物を把握して自分でもその特性を調べておき、測定データだけでなくハンドリングの様子や測定後のサンプルを確認することも行っている。

最も効果的なのは初めての測定系を立ち上げる時に学生だけでなく指導教員を含めて実験系を打ち合わせて調製プロトコルを練り、一度はその手技を確認することである。大学や研究所によっては調製の段階から受注してデータを解析して返却することで、そのあたりの問題をオペレーターがまとめて解決することもあるが、教育という面では必ずしも適切ではないこと、さらにオペレーター側としても一人で多数の装置を抱えているとそこまでの支援は難しいというのが現状であるように思う。

## 第 10 項 LCMS 支援の詳細 装置更新

基本的に装置が新しくなればなるほど性能は向上する。スループットの向上に加えてソフトウェアも充実して解析できる内容も深化する。しかしながら操作は煩雑になり、膨大なデータの海に溺れることになるため、装置が高度化・多様化すると逆に選択に困るという事もある。従来装置更新では特定のユーザーの声の大きさに偏った機種が選定されることもあり、全体的な研究力向上からは少しずれた選択がなされることがある。様々な分野のユーザーの要望に応じていると、自ずと全体的な需要とそれを満たす方向性が見えてくる。さらに他大学の類似装置担当者や機器メーカーとの交流も一般的なユーザーよりは広いことが多い。中立の立場で専門的な視野をもつ技術職員は、次世代の全学共用機器を選定するには適した人材であると考えている。現在広島大学では装置更新計画策定時に多くの技術職員が関わる体制が取られ、合議によって決定・実施されるようになっている。

本節で取り扱った装置も老朽化・陳腐化しているため、次世代装置導入を計画している。その際に全学におけるこれまでのユーザーの状況、これからの研究のトレンド、利用や大規模データの取得・解析しやすさも考慮した装置更新を計画・主導した。その結果、令和 7 年度末に島津製作所の LCMS-8060RX とメソッドパッケージを導入す

ることが決定している。質量分析計本体の能力は各メーカーとも非常に魅力的で甲乙付け難く、選考は困難を極めた。本学において四重極 LCMS 後継機に求められる能力は何かと考えた際、やはりユーザー目線での使いやすさ、手法や結果のわかりやすさであると思われた。その点においてサンプルの前処理、カラムや移動相の選択、プリインストールされた測定メソッド、解析及び統計処理の一元化など、初心者から熟練者まで強力にサポートできるメソッドパッケージは非常に魅力的であり、学内のコンペティションでも好評で、質量分析計を使ったことがないユーザーが最も興味を示したことから、新規ユーザーの開拓に貢献できると考えて選定した。

#### 第 11 項 質量分析支援のまとめ

MALDI 型質量分析計は故障と陳腐化のため運用を停止したが、それまでの間に質量分析の基礎や構造解析のためのマスシフト則<sup>58)</sup>を習得することができ、研究支援に繋げることができた<sup>59)</sup>。さらにオプションとして開始したプロテオーム前処理サービスは Orbitrap 型高性能質量分析計とコラボして学内外の需要に応えるものとして定着、好評を得ている。LCMS については、以前は学科保有の装置のため他学部からの利用の敷居が高かったが、全学共用装置として専属のオペレーターが付くことで、他学部を含めた新規ラボの利用参入と成果が増えている<sup>60)</sup>。既存のユーザーに対しても安定して装置が正常な状態で使えることを保証し、より高感度かつ安定的に測定できる状況を提供できるようになった。その結果、共用装置としての更新協議が可能となり、次世代の四重極型 LCMS の導入にも繋がった。前述の Orbitrap 型質量分析計は非常に高性能な装置であり、高度な解析が可能なソフトウェアも導入され非常に強力な研究ツールであるが、ランニングコストが高く、その準備や操作・解析は難解かつ得られるデータも膨大で初心者には扱いの難しい装置でもある。この装置に一極集中するとマシンタイムの奪い合いになって研究のボトルネックになるだけでなく、マシンも担当者も疲弊し、万が一システムがダウンすると全ての研究が止まってしまう。そこでより安価に、簡易に、かつ分かりやすいデータを出力できる新型四重極 LCMS 及びメソッドパッケージを組み合わせた Hi-Lo Mix 的なサービスを提供することにより、

利用を分散させることや新規ユーザーへの敷居を下げつつ、高度な解析にもスムーズに誘導できる支援体制が構築できるようになると期待される。

これらの支援を通じて感じたことは、異動前の仕事で少しだけ質量分析計を使ったことがあったとはいえ、一利用者と装置担当者として習熟することのギャップは大きく、自分が質量分析を十分に理解できていなかった事である。さらに利用者のデータに対して信頼性を担保するのは容易ではなく、装置が正しく動きさえすればよいという事だけではないことも痛感した。筆者はかつてユーザーとしての立場で、現在は装置担当者としての立場として現場を経験した。そのためユーザーがどういう不満を持つか、担当者として何を考えるかを合わせた視点を持つことができた。ユーザーとしては「この装置でできること、手元のサンプルからデータと解釈を労なく速やかにわかりやすく得たい。細かいことや正しさの保証はプロにお任せしたい」、担当者としては「装置に入れるまでのサンプルの状態や性質はユーザー側に担保してもらいたい。装置として正しく動く状況とそこから得られる生データの正確性までは保証するが、その研究分野の専門家ではない以上は解釈までは踏み込めない（踏み込みたくない）。他のユーザーや別装置のケアもあるので労力が取れない」となる。どちらにも理があり、切実な要望であると思う。このユーザー・管理者の両方からの視点があったからこそ、どのように支援活動を展開すべきか、さらには機種更新においてどのような装置を導入すべきかにおいて明確な指針を持つことができたのではないかと思う。

さらに、今後の最先端研究を支えるには高性能な装置、潤沢な資金と人材、知識と技術だけでなく、ユーザーと装置担当者、あるいは装置担当者同士のコミュニケーションとお互いへのリスペクトに基づく信頼関係が重要であると実感している。結局、研究者と技術者の「人としての成熟度と社交性」も良好でなければ最大限の成果が得られないと実感している。改めて装置ユーザーの皆様、並びに Orbitrap 担当の網本智子契約専門職員に心からの感謝を申し上げたい。

## 第2節 フローサイトメーター、その他の装置のためのリスクリング

筆者が常駐している遺伝子実験棟では他にも多くの分析装置があり、DNA シーケンサーや電子顕微鏡は他の熟練の担当者が付いている。ただ契約技術職員であるために時間的な制限もあり、その範囲を広げるのは難しい状態であった。筆者は常勤の技術職員で比較的勤務体系の融通が利くことから、専属にするほど利用頻度が高くないマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA (Shimadzu、図 81) や超高感度発光・蛍光 in vivo イメージングシステム NightOWL II LB983 (Belthold、図 82) を並行して担当することになった。

さらにセルソーターFACSAriaIII (BD、図 83A) が 2019 年に納入された際に担当することとなった。フローサイトメーターは単離された細胞の蛍光を測定するもので、解析だけのアナライザーと、特定の細胞を選んで回収することができるソーターに分けられる。これまで直接取り扱ったことがない装置のために習熟には少々時間を要した。蛍光ビーズを使った練習はある程度理解は進んだが、実際の細胞サンプルは散乱光プロットで偏光フィルターを含めた適切な設定をするコツがわかりにくい。にもかかわらず細胞サンプルを自分で準備しようとする、手元に CO<sub>2</sub> インキュベーターや培地などが無いため非常にハードルが高く、自分や他の生物から血球を得るための採血をするわけにもいかず、そのような設備や試料を独自に用意するための予算も整備されていない。個人的にもあまりモデル生物の血球を扱ったことが無い、表面抗原に関する知識も十分ではない。OJT と聞けば聞こえはいいが、実際に先生方のサンプルを非効率に消費しながら経験を積むことは非常に心苦しい事であった。さらに医学系キャンパスではフローサイトメーターの需要が高いため装置に接する機会も十分に担保できるが、理学・農学系のキャンパスではフローサイトメーター、特に細胞を分取するセルソーターの需要は少ない。月に 1 件という時期もあるため、習熟にはかなりハードルが高かった。その後フローサイトメーターFACSymphony A1 (BD、図 83B) も 2022 年に納入されたが、AriaIII の経験のおかげで非常にスムーズに習熟ができた。その装置や関連分野の専門家ではないところからスタートする場合には、習熟するに必要な経験を過度に緊張せず積める体制が非常に重要である。

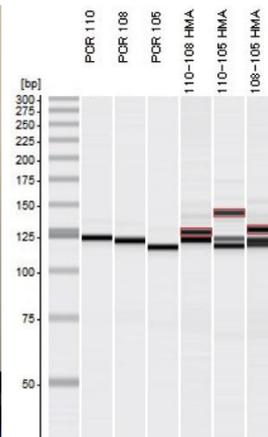
**A****B**

図 81 マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA (島津製作所) (A) 装置外観、  
 (B) 遺伝子組み換え体におけるヘテロ 2 本鎖移動度分析 (島津 HP より転載) 一般的なアガロースゲル電気泳動より高分解能の分離が得られるため、僅かな塩基数の違いや DNA の修飾、遺伝子組み換え体のヘテロ 2 本鎖の検出などに用いられる。

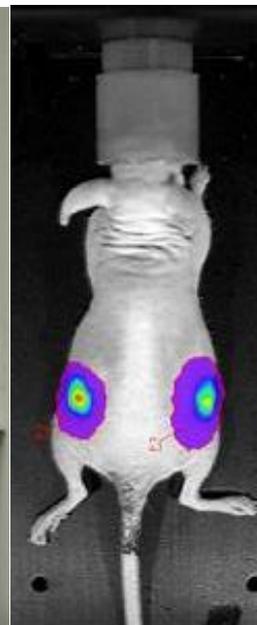
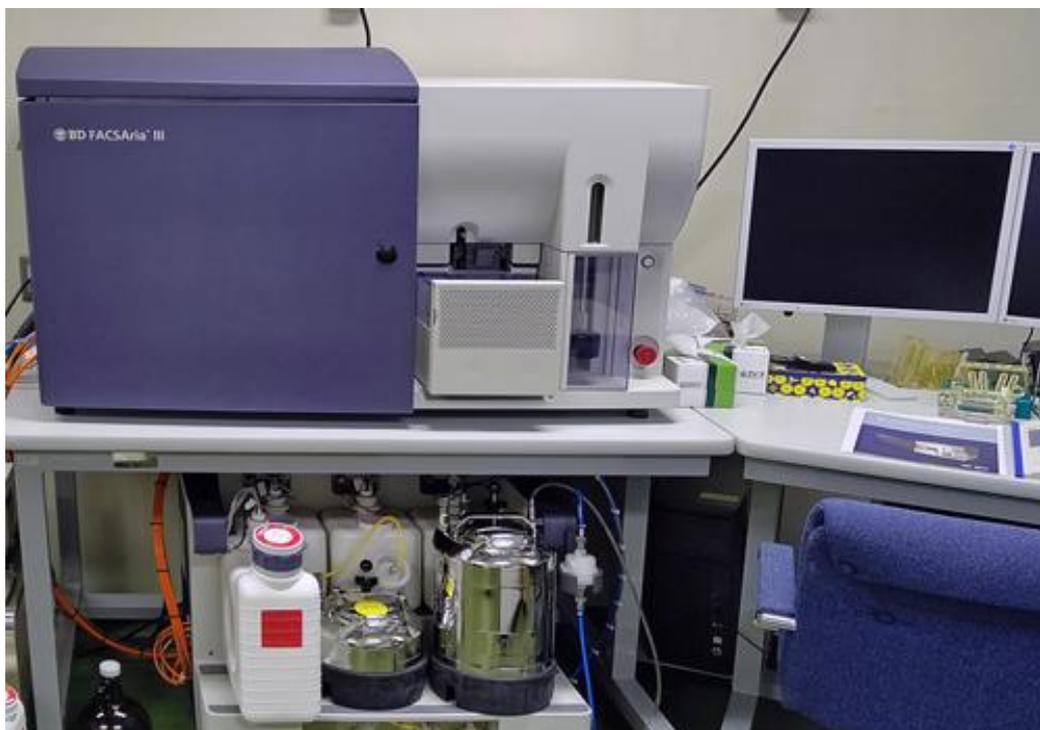
**A****B**

図 82 超高感度 in vivo イメージング装置 NightOWL II  
 (A) 装置外観、(B) マウスにおける発光部位の検出 (Berthold 社 HP より転載)。  
 マウス等の小動物を解剖することなく体内の発光を検出可能。

A



B

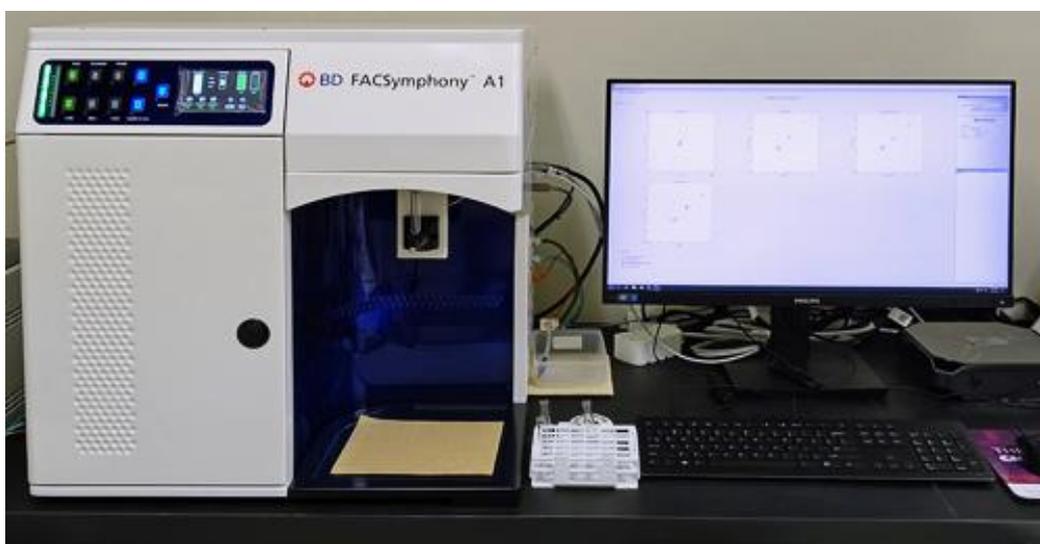


図 83 管理しているフローサイトメーター

(A) セルソーターFACSAriaIII、(B) セルアナライザーFACSymphonyA1

### 第3節 N-BARD 改組等に伴う組織再編に関する対応

2019年10月に配属先のN-BARDが改組され、新たに機器共用・分析部門が設立された。これまで複数の部門で独自運用していた全学共用分析機器を一元管理することで、効率的かつ平等な運用・更新を行い、ユーザーが利用しやすい環境を作ることを目的とした部門である。具体的には共用分析機器を建屋（旧部門）毎に管理・広報・運用するのではなく、種別毎にNMR、X線回析、質量分析計、電子顕微鏡、DNAシーケンサー、フローサイトメーター、共焦点レーザー顕微鏡、その他、という8分類の「ユニット」として機能的にまとめ、それぞれに教員、技術職員を配置されることとなった（図84）。装置の料金や更新計画などを全学ユニットで話し合うことで効率的かつ公平な利用体制にかなり近づいている。この再編により各部門で囲われていた技術職員が形式上は機能的にひとまとめになったものの、旧来の枠は依然として物理（距離）的・心理的に残る。また本学では機器分析系の技術職員はそれぞれが独自に担当機器を持ち、集団で機能する農場や工場の技術職員と違ってお互いの領分に手や口を出す文化があまり無い。そのような風土もあって組織として紙上で統合されたというだけでは速やかな一体的な運用には移行しえなかった。

当時の機器共用・分析部門長のご尽力により、まずは教員を含めた全体会合が開かれて諸問題を話し合い、その中で全機器統一の料金計算フォーマットが提案され、その立案・検証に筆者も協力した。次に部門内の技術職員が一堂に会する場がなかったため、オンラインでの部門ミーティングを提案・企画し、初期は2か月に1回開催してそれぞれの現場で生じている問題を全員で協議・解決するための場を設けた。ある程度諸問題が落ち着いた現在も、年2~3回程度で継続している。また、新しい部門のHPの運用も建屋毎の代表者を通じて共同で行っている。さらに利用者が行う機器利用登録方式がバラバラでしかも紙ベースであったため、部門として統一の利用登録システムを主導して立案・外注し、実運用に至っている。このシステムからユーザーの意見を集めたり、利用者や利用実績（論文）の情報をWebから速やかに得られるようになってきている。また弊学に新たに赴任された先生方に対して新任教員研修プログラムが行われているが、その一部として筆者がまとめたN-BARD機器共用分析部門紹介動

画が取り入れられるなど全学的な組織として貢献している。

これらの体制改革をするにあたり、筆者が生粋の機器分析系技術職員ではなく、ある意味で外様の中途参入でしがらみが少なく、それでいて技術職員としては中堅的な存在であったことが、ある意味では良い方に働いたのではないかと考えている。

**広島大学自然科学研究支援開発センター  
機器共用・分析部門（機器共用・分析部）**

ホーム HOME | 利用可能機器 EQUIPMENTS | 利用方法 SERVICE | 講習会等 LECTURE | 職員 STAFF | コアファシリティ CORE FACILITY | 問合せ・要望 CONTACT

**部門紹介動画**

自然科学研究支援開発センター（N-BARD）機器共用・分析部門の紹介動画はこちらです

**機器・共用分析部 利用登録**

機器・共用分析部の装置を利用される方は、利用登録が必須です。

[利用登録ページはこちら](#)

- ※ 利用登録はラボ単位で行い、毎年度末に実績報告兼更新が必要となっております。
- ※ 東広島遺伝子実験棟（東広島動物実験施設含む）を利用の場合は、別途施設利用申請が必要です。  
[遺伝子実験施設利用申請はこちら](#)
- ※ (商)生命医科学部の利用登録も兼ねております。生命医科学部の機器一覧など詳細はこちらよりご確認ください。
- ※ 施設および装置を利用してデータを取得し投稿される論文等には「謝辞」に利用の旨とIDを記して下さい。  
(文例は利用方法の最後の方をご覧ください)

**更新情報・お知らせ**

2025/5/26	共用開始：6/2 高性能クライオスタット（ライカCM3050S）の共用を開始(商) (案内文) 機器ページ準備中のため、資料はこちらからダウンロードください <b>NEW</b>
2025/5/19	開催案内：5/27 Olinkプロテオミクスセミナー(商・オンライン) (ポスター) <b>NEW</b>
2025/4/28	開催案内：5/19 高性能クライオスタット（ライカCM3050S）の利用説明会&個別講習会(商) (ポスター) <b>NEW</b>
2025/4/25	開催案内：機器利用講習会・説明会のご案内（東広島・機器分析J棟）(講習会・説明会詳細) (講習会申込書 東広島・J棟) (NMR講習会申込書 東広島・J棟) <b>NEW</b>
2025/4/25	開催案内：5/12-14 細胞外フラックスアナライザー seahorse XP Pro 導入セミナー&操作説明会(商)(ポスター)

» 過去の更新情報・お知らせ

**利用可能機器**

- 核磁気共鳴装置(NMR)  
物質の構造を原子レベルで解析
- X線回折装置(XRD)  
結晶の構造を原子レベルで解析
- 質量分析計(MS)  
物質の質量測定/物質の同定
- 電子顕微鏡  
物質や生体試料の微細構造の解析
- DNAシーケンサー  
核酸配列の解析/網羅的遺伝子発現解析
- フローサイトメーター  
細胞種の解析/細胞の分離
- 共焦点レーザー顕微鏡  
生体試料・細胞の詳細観察・撮影
- その他汎用機器  
他アツのカテゴリーに入らない分析汎用機器

**共通機器関連リンク**

図 84 機器共用・分析部門 HP 旧 3 部門ごとに分かれていた全学共用機器を一元化し、機器分類（ユニット、右側赤枠）ごとにわかりやすく案内できるようになった。

#### 第4節 コアファシリティ推進室活動について

2021 年から広島大学も先端研究基盤共用促進支援プログラム「コアファシリティ構築支援プログラム」の採択を受け、全学共用機器利用環境の向上に向けた取り組みを進めることとなった。前述の機器共用・分析部門の再編に関わったこともあり、コアファシリティ推進室にも参画して部門再編と機器の共用化推進をさらに行うようになった。コアファシリティ推進室長の呼びかけにより中国地方 5 大学で技術職員のネットワークを構築する事となり、そのスタートアップから関与した。推進室長のセッティングで各大学の理事・コアファシリティ担当教員、技術職員と面談する機会が設けられ、地域の機器分析関連技術職員を中心とした交流についての状況は整えられたため、まずは広島大学から岡山大学に新任の技術職員を短期派遣して元素分析の技術指導を受けてもらって大学を超えた技術伝承の前例を作り、さらに 2023 年 11 月に広島大学において第 1 回中国地方ファシリティネットワーク交流会をハイブリッド形式で開催した。交流会では各大学のコアファシリティ組織及び技術職員組織に関する現況をお互いに報告し、今後も交流を続けることで合意がなされた。さらに中国地方ファシリティネットワークの HP を作成し、そこに各大学のコアファシリティ及びバイオネットワークのリンクをまとめ、どの大学に分析依頼すれば適切かわからない場合に対応すべく、5 大学の担当者全てに連絡が届くような問い合わせフォームを搭載した。将来的にはより広範囲に技術者が技と知識を伝承しあうだけでなく、より適切な依頼分析先の紹介ができ、各大学毎に特色ある研究設備投資へと結びつくような技術職員の緩やかなネットワーク形成と、それを生かした各大学における大型資金獲得の要因になればと願っている。そのためにも技術職員と教員、事務員が協働して動ける仕組みとその維持が不可欠であると考えている。

これらの活動は一旦令和 7 年度で一区切りとなるが、その先に技術センターと N-BARD を包括した大幅な改組が予定されている。その中で TC カレッジを大いに参考とした広島大学独自の高度技術者認定制度を立ち上げ、それに基づいたインセンティブ制度の構築とモチベーション向上による若手・中堅技術職員の育成に繋げる計画を構想している。この取り組みが広島大学の研究力強化に繋がると期待している。

## 第7章 リスキリングと高度技術者の育成について

これまで述べた通り、筆者は高校で農学と植物系の生物工学、大学で微生物を用いた遺伝子工学を学び、それを元に広島大学附属臨海実験所で海洋生物による希少金属濃縮機構および接着機構の研究を行ってきた。元のベースは農学系ではあるが、生物に共通な遺伝子・タンパク質等の知識・技術を軸に海洋生物の取り扱いをするべくリスキリングを行ってきたことになる。さらに施設維持管理、船舶運航、生物採集・飼育・養殖、実習支援などの活動を通じて様々なスキルを習得してきた。異動に伴い機器分析を軸とした業務となり、関連装置・分野におけるリスキリングをユーザーとしてではなく管理者側として行う事となった。組織改組や組織内部での立ち位置の変化に沿ってマネジメント的な仕事も求められつつある。

自身の25年を超える自身の経験を振り返りつつ、知り得た諸先輩方の技術職員人生も踏まえ、単なる自身のリスキリングや業績の記録ではなく私見を記述することで今後の高度技術職員の育成に繋がるTC論文となれば幸いである。

### 第1節 技官時代（独立行政法人化まで）の技術支援の現場と待遇

独法化前、事務官がホワイトカラー的な業務を行うのに対して技官は肉体労働や特殊技能を必要とされるブルーカラー的な業務を行うことが多かった。そのため採用は国家公務員試験を経る方式よりも、面談と簡易な試験のみで中学・高校を卒業した周辺領域の民間人からの選考採用という方式が少なくなかった。事務官は事務組織という巨大な箱の中での定期的な配置換えにより様々な領域を経験し、引継ぎ（リスキリング）もシステム化され、待遇も大きな組織の中で保証されていた。一方技官は教官個人や研究室、施設の元に1名から数名程度が配属され異動することなく一定の領域においてのスペシャリストとなる傾向が強かったように思われる。技官は一定範囲の技術を磨いて職務を果たすスタイルであることから、その習熟には技術的な適正と相応の訓練が必要となる。個人的な感覚で言えば一つの技能・職種である程度のレベルに達するには10年ほど必要のように感じている。一定の基準に達した後も同じ業務に従事することで安定化や高度化・効率化が重視されたことや、適切に異動できる仕組

みと受け入れ先が乏しかったことから、わざわざ技能をリセットまでして流動性を確保することについては殆ど重要視されなかった。職域も非常に広範囲に及び、様々なタイプの業務や取り組み方が存在する。その結果「きれい」「汚い」「報われる」「報われない」「専門的」「雑用的」といった職場環境の違いも生じた。業務やスキルも属人化しやすく、その伝承もシステム化されにくい傾向があった。能力向上や待遇も教官や施設長個人の影響力に寄る部分が大きく、平等性や均一性に欠けていた。特に少人数単位であったがために高い職位につくことが想定されておらず、事務組織の傍系的な扱いに留まり低い職位で頭打ちであることが多かった。こういった待遇の低い国家公務員という環境で、技官は教官や事務官とは異なる一匹狼あるいは少数の職人集団的な存在となり、コンプライアンスが厳しくなく英語力も無理に求められない時代において、ある意味では牧歌的な一面もあった。

業務・技術の内容においては、昔の機械・装置は現在に比べるとシンプルであり、コンピューター制御もそれほど発達していなかった。そのため個人の力量によるものが極めて大きく、一意専心で磨いた能力は時に絶大な効果を発揮した。また現在ほどの全自動化やハイスループット化もされていないため相応のマンパワーと習熟が必要であり、業務遂行にはある程度の人数や時間が必要であった。そのなかで技術の属人化もある程度は分散し、技術伝承もその中で行われていた。

技官が高度化する環境は業務指示を行う教官や施設長個人の資質に委ねられた。その結果として超高度人材に成長することもあれば、単なる下働きとして低い境遇に甘んじ続けざるを得ない場合もあった。教官に待遇を大幅に改善する権力が備わっていることは稀で、高度化した成果は技官の待遇向上というよりは本人達の自己満足に収斂しがちであった。高度化の原動力も個人の意思・意欲・善意といったものに端を発し、「職人技として身に着けておこう」「この仕事をしてもらっても給料は上がらないが、あの先生（学生さん）のためなら一肌脱ぐか」といった良い意味での職人氣質が研究の現場を下支えしており「技術職員は情で動く」と言われる由縁でもあった。その心意気は素晴らしいものであるが、高度な仕事をして報われるシステムや、高度人材になるための組織的な支援体制の不備は極めて憂慮される事態であった。

## 第2節 現在の技術職員としての技術支援の現場と待遇

近年の機器、特に IT 技術の進歩に伴い、様々な実験・研究が可能となってきた。それに伴い技術の高度化・広範化が求められ PC 音痴ではいられない時代となった。道具の高度化に伴って効率化される一方で複雑化や細分化も発生し、一人で複数の原理の異なる高額な装置を同時担当しつつ多分野への適応も必要になっている。自身の経験に当てはめれば、かつて質量分析と言えれば主に低分子有機化合物単体の解析に用いられるものであったが、今ではプロテオミクス、メタボロミクス、マルチオミクスといった生物学的な分野からの多検体の網羅的解析への対応も求められるようになってきている。それに関連して生体サンプルの知識・取り扱いだけでなく統計学やコンピューター解析等の技能も必要とされている。装置利用に伴う法的な規制も年々強まり、守るべきルールも複雑化していることから業務の複雑性は増す一方である。さらにフローサイトメーターなどの全く異なる装置の担当業務も年々増えている。

さらにコミュニケーション能力の要求レベルも上がっている。国際化に伴い英語力が技術職員にも求められ、最新の知見を得る場合のみならず留学生の対応として英会話も必須能力となりつつある。現に筆者が担当する装置ユーザーの 1~3 割は日本語を十分に解しない留学生や教員である。そして学内の仕事だけを行えばよかった時代と異なり、学外からの利用を増やして大学の収入を増やす要求も強まり、そのために学外との交渉までする必要が生じている。さらに技術職員の待遇を平等化するために組織化が行われた結果として、マネジメント能力まで求められている。職人として自身の技術だけを黙々と磨けばよいという状況ではなくなっている。

求められる能力や業務が高度化・多様化しているが人員は削減され続け、技術の伝承に必要な人数や時間も無くなっている。教員も我々以上に様々なタスクに追われフォローする余裕はない。そこで常勤のみならず非常勤・契約職員の形態でプロジェクト単位での予算で短期雇用して急場を凌ごうとするが、高度な技術を要する条件にフィットする人材は低待遇では簡単に得られない。さらに従事者は自由度が少ない環境で不安に苛まれながら OJT という都合の良い言葉の元で高度なサービスと成果を要求される。その結果として待遇の格差が拡大するだけでなく、十分な技術・知識を持た

ない人材の育成に長い時間を要す、あるいは短期間に離職されてしまって再募集という悪いサイクルも発生している。常勤職員の待遇も如何に実績を上げようとも事務系職員に比するレベルには届かず、組織化に伴う業務や負担の増加はプレイヤーマネージャーとならざるを得ない一部のベテラン職員に重くのしかかっている。それらが現場での意欲低下や管理職に就くことの忌避にも繋がっている。

### 第3節 技術職員のリスクリング

リスクリングは仕事に必要なスキルや知識を新たに習得・再構築することを指すが、この言葉が流行り始めたのは2018年の世界経済フォーラム年次会議からとされており日本でも2020年頃から盛んに使われるようになった。業務の効率化や分野融合による新しい価値の創造、労働者のキャリアアップなどのメリットにフォーカスしたものであった。代表例として挙げられるのがDX（デジタルトランスフォーメーション）化と絡めた情報技術への習熟や国際化に対応するための語学力向上である。これらは全労働者が直面している課題であり、おそらく大勢を占めていたであろう日本語しか話せないPC音痴の職人型技術職員にも大きなインパクトを与えた。

それ以外にも技術職員は基本的に配属される部署において求められる技術・知識を追求するものであり、特定の分野における専門性を獲得して磨く職人的なものがベースとなる。その中で時代的な背景に伴い廃れる、あるいは発展する技術に対して日常的に連続性のある細かなリスクリングをすることとなる。これらは連続的な知識・技術・経験に基づいて積み重ねるものであり、いうなれば「今の道の先にあるもの」として上積みの形で研鑽することが可能である。中途採用などで類似分野から移籍する場合もこれに近いものと思われる。既存の仕事を行いながらのため多少の負担は増えるものの、現在の実績の上に積み重ねるやり方であれば心身の負担をコントロール可能な範疇に収めやすく、メリットの最大化とデメリットの最小化を図ることができる。これまで多大な労力をかけて築いたきたものが年々通用しなくなることは、技術者に対して相応のインパクトを与えるが、基礎を十分に修めていれば発展形をより深く知ることができ、場合によっては古い枯れた技術やその複合が求められることもある。

#### 第4節 異分野リスクリングの難しさ

前述のリスクリングは、今取り組んでいる分野から連続的・発展的に行うリスクリングである。一方で異分野への異動を伴うリスクリングの場合は、職人人生の途中でこれまでの経歴から切り離されて全く異なる知識・技術体系を0あるいはそれに近いところから始めることになる。筆者は2017年から生物学分野から化学系機器分析へのリスクリングを行ったが、当然のことながら実績がすぐに上がるわけではなく、ユーザーはこちらの事情とは無関係に高度な（時に無茶な）要求を持ち込んでくる。そのため自分の技能水準や装置故障等のトラブル予防・対応に不安を抱えたまま業務に臨むこととなった。部署やサービスが新しい、あるいは元々不人気な場合は、逆に仕事が来ないことによる焦りも抱える。時にはこれまでの知識や経験が逆に足を引っ張ることもあった。

これらのデメリットの多い状況から自身の気力と能力で這い上がらねばならず、心身の負担は相応に高いものとなる。熟練者が同じ学内や職場にいて十分なケアを受けることができれば一定程度緩和されるが、それでも研鑽を積んだ者に追いつくことは並大抵ではなく、リスクリングの場合は同世代あるいは下の世代の後塵を拝することになる。以前の職歴で相応のキャリアを積んでいればいるほど、その立場のギャップに耐えがたい思いを抱き、やる気を失うこともありうる。類似の職種がおらず技術的なケアが現場で受けられない場合のリスクリングはさらに困難となる。

その代わり新たに異分野の能力を身に付けることができれば、それぞれの分野の理解だけでなく、それらが融合した分野を開拓することができる。このメリットは純粹培養では得られない類のものであるため、違う形での技術・知識・視野を備えた人材としての成長を遂げることができる。その育成法に対する考えは後の節にて詳述する。

#### 第5節 リスクリングを実施する際の注意点

リスクリングを行う際には技術的な背景だけでなく、心理面を含めたその人物が置かれている状況も十分に考慮する必要がある。ポジティブで自発的な意思を持って実施する場合はまだよいが、事情によっては筆者のケースのように本人の意に沿わない

形で別分野の業務に異動することもありうる。異動前後の経緯や分野との隔たりによっては喪失感などを始めとした精神的苦痛を伴った状態のため不安定でセンシティブな状態でのリスクリングとなる。同じ技術の育成・伝承でも新人育成とは異なる難しさが生じることを想定しなければならない。仕事は辛くて当たり前、言われたことは黙って根性で乗り越えるものという古い価値観からの押し付けでは新人教育同様にリスクリングも成り立たないと考える。精神的不安定さからの一時的な感情には寛容に接し、これまでの技術や功績を否定することなく5年後、10年後の将来を見越した粘り強く寄り添う対応が必要であると思う。

リスクリングする側の技術職員には通常以上に前向きな姿勢が必要となってくる。とはいえ前向きになれと言われてそう簡単になれるものではない。心の整理をする時間と、リスクリングの意義と必要性を十分に理解し、リスクリングした場合の自分としなかった場合の自分の両方を想像することも必要である。ただしこれには思う以上に精神的な力が必要になる。自身にそのための活力を満したのち、どちらにハンドルを切ってアクセルを踏むかを自分自身で決定した方が良いと思われる。その活力を得る場は仕事に限定する必要はない。家庭や友人、趣味といった私生活から得る方が気分を転換しやすく、ある意味で純粋な仕事人間よりも健全かもしれない。自分自身の経験を振り返っても、異動とリスクリングが必要になった際には昼夜を問わず仕事をして多少なりと功績を残してきた分の思いが逆に枷となり後ろ向きにしかなれなかった。家族の生活を守り、自分が楽しいと思える事柄を再確認してそれらを維持するためと割り切り、様々なシミュレーションを重ねてもダメだった場合に退職後どうするかまで考えて初めてリスクリングに取り組むために前を向いた。色々な意味での割り切りや開き直りも必要であると思う。

リスクリングによって人材の流動性や柔軟性、高度化などのメリットがあることは一見すると素晴らしいことではあるが、同時に生じているデメリットが一定の水位を超えると、当人が離職を決断する、あるいは「静かな退職」状態となるに十分な理由となりえる。このデメリットに対して組織としてどう備えて対応するかを事前に想定し、当人の状況を注視しつつ十分にケアできる体制を整えることは必要であるように

思う。これらのケアを軽視して良い面だけを見ていたずらにリスクリングを美化・推進すると、却って組織や個人をかき乱すだけになりかねない。筆者の場合もそれまでの時間と場所を与えていただき、時に支えつつ無聊を慰めてくれた家族や技術センター、N-BARD の皆様のご理解を得られたことが大きい。周囲の理解と協力はリスクリングに欠かすことができない。

## 第6節 学内外におけるリスクリング

実際の技術伝承を学内で行うことができる場合は同じ設備で同じ業務を行えるため比較的スムーズに習熟が進む。ただし新人教育と違って分野こそ異なれど双方にそれなりの経験があり、仕事に対する考え方も確立している。お互いを社会人・技術者として尊重する姿勢をいつも以上に意識する必要がある。教える側は「教えてやる」ではなく「仲間として迎え入れる」、教わる側もお互いの立場や年齢を超えて謙虚に教わる姿勢が必要と思う。中立的でカウンセラー的な役割を持たせた職員や組織に入ってもらうことも効果的であると思う。ただし第三者の介入は当事者から言い出しにくいものであるので、組織的として予め用意して「通常の仕組み」として適用すると抵抗感が少なく受け入れられるのではないかと思う。

学内で同種の技術者がいない、あるいは伝承が難しい場合は学外の同種の技術者集団やネットワークに頼る方が良い。筆者の例を出すと、臨海実験所業務は全国臨海・臨湖実験所技術者会議での年会や、日本質量分析技術者研究会が極めて有効であった。前者では金沢大学能登臨海実験所に1週間程度研修させて頂き、ベテランの故又多政博技術専門職員に臨海の技術職員として心構えや体験しなければわからない様々な技術を教えて頂き、後者では誰にも聞けないような初歩的なことから、文献や書籍では説明されないような細かなことまでベテランの質量分析技術者や装置・試薬メーカーの技術者に無料で教わることができた。同じ技術者同士、ツボを押さえた育成・技術伝承をして頂けることは非常に心強く、時に技術以外の相談にも応じて頂けた。そのため学内での技術伝承が可能であったとしても、学外のこうしたネットワークに積極的に参加させる意義は極めて高い。

## 第7節 今後に求められる技術職員像とその育成

これまで述べたとおり、現在求められている技術職員像は高度に専門化された技術者というだけでなく、さらに幅広い分野でマルチタスクな業務においてITを活用しつつ多言語で遂行できる者である。その上で専門分野をさらに高度化する者、周辺領域における流行りの技術をいち早く習得して次々に融合・展開する者、そのバランスを取る者とそれぞれの分野や個人の特性に沿って成長する。業務の成果としても教員の補助に留まらず、研究のパートナーとして相応しいレベルの仕事も求められ、その成果として論文の謝辞に留まらず共著者として一層の責任ある仕事をすることも求められている。さらに技術者としてのみならず、組織運営や教育に関する能力をも要求されるようになってきている。そのためにも常にリスクリングが求められ続けている。

全てを備えた人物が即戦力として得られることは稀であり、基本は技能を十分に保有していない新人を育成するということになる。しかしながら該当技能を持つ熟練構成員が学内でスマートに伝承・育成できるシステムが整っているとは限らない。むしろ人員不足で一人の技術職員しかいないことは珍しくなく、かぶせ採用による引継ぎさえ十分にできない場合も多い。さらに教える側と教えられる側に様々なギャップが存在する。数多く苦勞してきた古い世代の技術職員が思いやりで現実を知らせて免疫を持たせようとしたことが新人にとっては副反応として発現し、将来に希望を持たなくなりネガティブになったり転職を考えるケースもある。例えば、給料や地位は長年勤めても功績を上げてても大して上がらない、やりたいことがやれる職種ではなく裁量の範囲はほぼ無いか非常に狭い、所詮は将棋の歩（しかも成れない）という現実をみせることは「将来性がない」「受け身で程々に働けば十分、頑張れば頑張るだけコスパが悪い」という結論に落ち着きがちである。

さらに技術職員の特徴として多様な職場がある分、成果が出やすい部署と出にくい部署、ブルーカラー労働的な部署とホワイトカラー労働的な部署があるという事実が厳然として存在している。そのため表に出せる成果や達成感、業務における疲労や危険性に差が生じる。この覆しがたい環境の差を慮らずに評価や育成を行うことは組織の冷却化や崩壊に繋がりがちである。しかしながら、一見成果を出しにくい雑用ばかり

に見える職種でも、全国と同系統の技術職員を見渡すと様々な工夫や努力により成果を出していたり、地道な積み重ねをわかりやすく数値化するなどして評価に繋げているケースも見受けられる。中にはリスクリングを行うことで様々な分野に精通するケースも見られる。技術職員本人が視野を広げて各種技術ネットワークからその成功例を学ぶことはもちろん、配属先や技術職員組織も技術職員がそのような上質な成果を上げて可視化できるような環境を整えることも重要となる。ただし本人と組織には相応の負荷がかかり面倒で気苦労の多いことに他ならず、その過程において様々な障害を克服する必要性が出てくる。本人がこれらを回避して堅実な道を選ぶことは責められないが、組織がこれらの負荷を回避するためにアクティブな職員を「出る杭」と見做してしまうと、角を矯めて牛を殺すことになりかねないので注意が必要である。

## 第8節 高度技術職員育成に必要な制度と運用

技術職員が高度化するに際し、現時点では個人の努力と研修旅費に対する支援制度が大勢を占めていると思われる。それを元に第3節のような努力がなされているが、全国的に見ても支援制度は不十分であり、高度化した場合のインセンティブ制度はさらに整っていないのが現状であると思われる。高度化と多様化を同時に求められつつも十分な支援も待遇も無く、それでいて不活性化しやすい状況は残る中で、既に技術支援の現場は摩耗して半ば諦めの境地に至っているのが現実ではないだろうか。これまで文科省や大学、教員から大上段に語られた夢は空の彼方の物であり、その果実は技術職員の手元に得られるものではなかった。そのように長く過ごした技術職員やその組織を活性化させるにあたり、新たなミッションを追加して先行させることは一層の疲労や諦念を招くと思われる。そのため、まずこれまでの貢献を再検証・認定して待遇を向上させることにより長年高度技術を提供してきたベテランを慰労し、中堅や若手の目標を可視化する制度が必要と考える。

現在、広島大学では高度技術職員認定制度構築を目指しており、筆者も上記の趣旨をもとにしたインセンティブ制度構築に携わることとなった。技術職員の職種の広さが技術・貢献度検証や制度設計を困難にしてしまうが、できる限り広範囲の技術職員

に高度化するチャンスがあって適切に報われるシステムを目指している。技術・知識の検証には博士号や技術士、TC・TM等の既存称号や資格、論文発表や技術報告、科研費獲得も大きく加味する予定である。様々な視点からの評価を可能として高度人材の育成を促すのみならず、既存の技術職員活動の活発化や外部資金導入促進、さらには即戦力級の高度人材が広島大学を選ぶ動機づけとなることも狙いとしている。可能であれば、技術開発を行うための自由な予算を技術職員に直接付与することや、一定期間技術職員の身分を保証しつつポストドクのような形で研究に携わらせ、より深く研究の現場を体験する案なども提案したいと考えている。そして高度な成果を上げた場合には前述のインセンティブ制度に直接結びつけることでより有効な制度となりうると目論んでいる。

運用に関しては、これまでの緊縮財政や組織や人事システムの硬直化、過去の悪い事例から生じた過剰な締め付けがデメリットの回避に終始したことで人材育成を阻み、さらに若い人材が伸び伸びと新しいことに挑戦する余地を失わせている。例えば奨励研究に対して「労働（時間）として認めない」「万が一の場合に責任を誰が取るのか」「普段の業務がおろそかになるのでは」というものである。そして成果が出ても「科研費を取ろうが学会発表や論文を出そうが評価としては参考程度」「どうせ安月給は変わらないのだから無駄に努力しなくても」「ガツガツしていて悪目立ちする」などと冷や水を浴びせるような意見がでてくるような環境をそのままにしておいて、高度化せよ外部資金を獲得せよと言っても無理がある。きちんと成果を出せる環境を整備して評価し、それにインセンティブを与えることは不平等ではなく正当な報酬であること、評価軸を多数用意して誰もが相応に努力すれば手が届く内容となるように適時調整することが必要である。マイナス面だけをフレームアップして現状から変えないことを善しとして停滞するよりは、多少の不備があったとしてもプラスの面が増えることを目指した闊達な運用が望ましいと考える。仮に達成報酬だけが目当てのポイント稼ぎがあったとしても、その過程で得られる技術や能力は必ずや研究・教育の現場に還元されるものであり、技術職員の可能性を延ばしつつ、大学のみならず社会に有益な効果をもたらすものと考えている。

## 第9節 最後に

諸先輩方が長年築き上げてきた功績により、大学や国の研究力を高めて発展させる際の大きな要素の一つであることが注目されるようになってきた。そのなかで技術職員として成長しよう、高度化しようと思うための熱をどのように熾し、形作って継承するかは大きな課題である。前述したように現時点では技術職員として高度化する際の実動力は個人の意思によるが、これは「どのような自分になりたいかという夢や目標」の具現化と思っている。個人的な考えとして人は将来を見限ってしまうと夢を諦めたり目標を追わなくなると思っている。どのような形や大きさや数であれ、それらがあればこそ将来のためにももうひと踏ん張りしようという気概も出てくるのではないだろうか。これに関しては私の恩師がそのまた恩師から受け継ぎ、我々に教えて下さった言葉である “Dreaming is a driving force to realize your dreams” にエッセンスが凝縮されていると感じているので、これを本論の最後に最も大事なこととしてご紹介したい。

将来に希望をもって成長するためのシステムの一つとして TC カレッジ制度が広く普及して評価され、幅広い分野の技術職員の能力や技術向上が行われるのみならず、TC・TM 取得者が所属組織での待遇向上や幸せを得られることを願ってやまない。そしてその個々が見る夢を叶えて束ね、後の世代に継承・発展させることが技術職員組織やネットワークには可能であると信ずる。その先駆けとして自身も TC としてふさわしい知識・技術・見識・希望を持って周囲や後進に接し、ささやかな目標と報われる仕組みを広島大学に作ることで、技術職員にも良い未来があるということを見せることができると願っている。

## 謝辞

本 TC 論文は 2000 年から 2016 年に広島大学理学研究科附属臨海実験所、2017 年から同自然科学研究支援開発センター (N-BARD) において行った研究および研究教育支援、組織運営、社会貢献の内容をまとめたものです。大変多くの方々からのご指導とお力添えを賜り、これまでの活動及び本論文執筆を行うことができました。

本学附属臨海実験所での研究および研究教育支援、社会貢献を行う場を与えて下さり、厳しくも温かい指導を頂きました道端齊教授 (以下在籍時の職位)、植木龍也准教授、そして田川訓史准教授には言葉で表せないほどの感謝を申し上げます。お三方のご指導で研究や支援活動のいろはを教えて頂いただけでなく、博士号や奨励研究の採択を得ることができ、研究に携わる者としても楽しく充実した日々を過ごすことができました。また当時の学生の皆様にも大変お世話になりました。海技や施設維持の面では前任者である故安保徳之技官や故又多政博技術専門職員を始めとした全国臨海・臨湖実験所センター技術職員会議の皆様の温かいご指導、ご助言のおかげで海の素人だった私でも海難事故などを起こすことなく、無事に勤め上げることができました。

異動後の本学 N-BARD 遺伝子実験部門では筆者を迎え入れてくださいました田中伸和教授、北村憲司准教授、彦坂智恵契約技能員、小池香苗契約専門職員、川田裕美事務員、後に組織改編後の機器共用分析部門を率いられました楯真一教授、池上浩司教授、吉田拓人教授にも厚く御礼申し上げます。質量分析技術の向上では、本学の網本智子契約専門職員を始め、大阪大学三宅里佳特任研究員を始めとした全国質量分析技術者研究会の皆様の皆様のおかげで、一人では習熟しがたい質量分析の知識、技術についてご指導やご助言を頂き、現場での仕事を行う上で大変心強い支えとなりました。さらに矢中規之教授を始めとした装置ユーザーの皆様にも様々なご指導を賜りまして、改めて感謝申し上げます。

本学技術職員組織である技術センターの歴代センター長を勤められた藤久保昌彦教授、山本陽介教授、故早川愼二郎教授、水田勉教授、松木一弘教授にもこの場を借りて御礼申し上げます。さらに岩谷秀秋技術統括、向井一夫技術統括、勇木義則技術統括、村上義博技術統括、石佐古早実技術統括、塩路恒夫技術統括、坂下英樹技術統括、

ならびに技術センター職員、N-BARD 職員の皆様、学術・未来共創科学研究本部の皆様にも御礼申し上げます。

本学に着任する以前にご指導頂きました旧農林水産省野菜・茶業試験場（枕崎）の武田善行所長、田中淳一博士を始めとした所員の皆様、愛媛大学農学研究科高田棟吉教授、長崎県立諫早高等学校生物工学科の坂口浩教諭を始めとした教員の皆様、在籍時の学友の皆様にも御礼申し上げます。

そして東京科学大学の江端新吾カレッジ長、裕見吉朗主任技術専門員、高田綾子氏を始めとした TC カレッジの皆様には入学以来、単位取得や本論文発表に至るまで多大なるご尽力を頂きましてありがとうございました。

最後に、現職に至るまでの勉学の機会を与えて下さった父鳥羽尾、母良子、弟貴宏と、長年に渡って心身を支えてくれた妻信子と子供達に心からの感謝を申し上げます。

## 参考文献

- 1) 「三崎の熊さん」『20世紀ニッポン異能・偉才100人』  
佐伯修  
朝日新聞社. 1993, 70-71  
ISBN 978-4022740175
- 2) 耐虫性, 耐寒性チャ品種‘さやまかおり’の花粉親は現存しない可能性が高い  
田中 淳一, 山口 信雄, 中村 順行, 育種学研究"(2001), 1, 3-48  
<https://doi.org/10.1270/jsbbr.3.43>
- 3) Construction of a high-density reference linkage map of tea (*Camellia sinensis*)  
F. Taniguchi, K. Furukawa, S. Ota-Metoku, N. Yamaguchi, T Ujihara, I Kono, H.  
Fukuoka, J. Tanaka  
Breeding Science. 2012, 62, 3, 263-273  
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.62.263>
- 4) 瀬戸内海の生物相  
稲葉明彦 (編集)  
向島臨海実験所創立 30 周年記念出版, 1963
- 5) 日本動物解剖図説  
広島大学生物学会編  
森北出版(1971)
- 6) Molecular biological approaches to the accumulation and reduction of vanadium by  
ascidians  
H. Michibata, N. Yamaguchi, T. Uyama, T. Ueki  
Coordination Chemistry Reviews. 2003, 237, 1-2, 41-51  
[https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00278-3](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00278-3)
- 7) Genes and Proteins Involved in Vanadium Accumulation by Ascidians  
H. Michibata, M. Yoshinaga, M. Yoshihara, N. Kawakami, N. Yamaguchi, T. Ueki  
ACS Symposium Series. 2007, 974, 19, 264-280

<https://doi.org/10.1021/bk-2007-0974.ch019>

- 8) Vanadium: Biochemical and Molecular Biological Approaches  
Editors: H. Michibata  
Springer. 2012, 51-71  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-0913-3\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-0913-3_3)
- 9) 海水からの 1000 万倍濃縮-ホヤの金属代謝  
植木龍也・山口信雄  
実験医学増刊 驚愕の代謝システム. 2014, 32, 15, 123-129  
ISBN 978-4-7581-0341-1
- 10) Vanadium accumulation in ascidians: A system overview  
T. Ueki, N. Yamaguchi, Y. Isago, H. Tanahashi  
Coordination Chemistry Reviews. 2015, 301-302,300-308  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.09.007>
- 11) Separation of vanadocytes: Determination and characterization of vanadium ion in the separated blood cells of the ascidian, *Ascidia ahodori*  
H. Michibata, J. Hirata, M. Uesaka, T. Numakunai, H. Sakurai  
Journal of Experimental Zoology. 1987, 244, 33-38  
<https://doi.org/10.1002/jez.1402440105>
- 12) Identification of a vanadium-associated protein from the vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*  
T. Kanda, Y. Nose, J. Wuchiyama, T. Uyama, Y. Moriyama H. Michibata  
Zoological Science. 1997, 14:37-42  
<https://doi.org/10.2108/zsj.14.37>
- 13) Vanadium-binding proteins (vanabins) from a vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*  
T.Ueki, T.Adachi, S.Kawano, M. Aoshima, N. Yamaguchi, K. Kanamori, H. Michibata

- Biochim Biophys Acta. 2003, 1626:43–50  
[https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(03\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(03)00036-8)
- 14) Expressed Sequence Tag Analysis of Blood Cells in the Vanadium-Rich Ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*—A Survey of Genes for Metal Accumulation  
N. Yamaguchi, A. Togi, T. Ueki, T. Uyama, H. Michibata  
Zoological Science. 2002, 19, 1001-1008  
<https://doi.org/10.2108/zsj.19.1001>
- 15) Expressed Sequence Tag Analysis of Vanadocytes in a Vanadium-Rich Ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*  
N. Yamaguchi, K. Kamino, T. Ueki, H. Michibata  
Marine Biotechnology. 2004, 6, 165-174  
<https://doi.org/10.1007/s10126-003-0024-6>
- 16) ホヤの生物学  
佐藤 矩行 (編集)  
東京大学出版会. 1998  
<https://ndlsearch.ndl.go.jp/books/R100000002-I000001339788>
- 17) Untersuchungen über das Blut der Ascidien I. Mitteilung. Die Vanadiumverbindungen der Blutkörperchen  
M. Henze  
Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem. 1911, 72:494–501  
<https://scispace.com/pdf/untersuchungen-uber-das-blut-der-ascidien-i-mitteilung-die-2ym61qgbkm.pdf>
- 18) Glucose-6-phosphate dehydrogenase in the pentose phosphate pathway is localized in vanadocytes of vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*  
T. Uyama, K. Yamamoto, K. Kanamori, H. Michibata  
Zoological Science. 1998, 15:441–446  
[https://doi.org/10.2108/0289-0003\(1998\)15\[441:GDITPP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2108/0289-0003(1998)15[441:GDITPP]2.0.CO;2)

- 19) Exclusive expression of transketolase in the vanadocytes of the vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*  
T. Ueki, T. Uyama, K. Yamamoto, K. Kanamori, H. Michibata  
Biochim Biophys Acta. 2000, 1494:83–90  
[https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00222-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00222-0)
- 20) Isolation of cDNAs encoding subunits A and B of the vacuolartype ATPase from the vanadium-rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*  
T. Ueki, T. Uyama, K. Kanamori, H. Michibata  
Zoological Science. 1998, 15:823–829  
<https://doi.org/10.2108/zsj.15.823>
- 21) Subunit C of the vacuolar-type ATPase from the vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea* rescued the pH sensitivity of yeast vma5 mutants  
T. Ueki, T. Uyama, K. Kanamori, H. Michibata  
Marine Biotechnology. 2001, 3:316–321  
<https://doi.org/10.1007/s1012601-0054-x>
- 22) Chloride channel in vanadocytes of a vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis samea*  
T. Ueki, N. Yamaguchi, H. Michibata  
Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2003, 136, 1, 91-98  
[https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00175-1](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00175-1)
- 23) Localization of Vanabins, Vanadium-Binding Proteins, in the Blood Cells of the Vanadium-Rich Ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*  
N. Yamaguchi, Y. Amakawa, H. Yamada, T. Ueki, H. Michibata  
Zoological Science. 2006, 23, 10, 909-915  
<https://doi.org/10.2108/zsj.23.909>
- 24) Bioaccumulation of Copper Ions by Escherichia coli Expressing Vanabin Genes from

- the Vanadium-Rich Ascidian *Ascidia sydneiensis samea*  
T. Ueki, Y. Sakamoto, N. Yamaguchi, H. Michibata  
ASM Journals Applied and Environmental Microbiology. 2003, 69, 11, 6442–6446  
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6442-6446.2003>
- 25) Novel vanadium-binding proteins (Vanabin) from the cDNA library of the ascidian,  
*Ciona intestinalis*  
S. Trivedi, T. Ueki, N. Yamaguchi, H. Michibata  
Biochim Biophys Acta. 2003, 1630: 64–70  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.11.001>
- 26) VanabinP, a novel vanadium-binding protein in the blood plasma of an ascidian,  
*Ascidia sydneiensis samea*  
M. Yoshihara, T. Ueki, T. Watanabe, N. Yamaguchi, K. Kamino, H. Michibata  
Biochim Biophys Acta. 2005, 1730, 3, 206-214  
<https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.07.002>
- 27) Glutathione transferases with vanadium-binding activity isolated from the vanadium-  
rich ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*  
M. Yoshinaga, T. Ueki, N. Yamaguchi, K. Kamino, H. Michibata  
Biochim Biophys Acta. 2006, 1760: 495–503  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.05.007>
- 28) Characterization of a novel vanadium-binding protein (VBP-129) from blood plasma of  
the vanadium-rich ascidian *Ascidiasydneiensis samea*  
M. Yoshihara, T. Ueki, N. Yamaguchi, K. Kamino, H. Michibata  
Biochim Biophys Acta. 2008, 1780: 256–263  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.11.001>
- 29) Discovery of a new vanadium accumulator, the fan worm *Pseudopotamilla ocellata*  
T. Ishii, I. Nakai, C. Numako, K. Okoshi, T. Otake  
Naturwissenschaften. 1993, 80: 268–270

<https://doi.org/10.1007/bf01135909>

- 30) Intracellular localization of vanadium in the fan worm *Pseudopotamilla ocellata*  
T. Ishii, T. Otake, M. Nakahara, R. Nakamura  
Marine Biology. 1994, 121: 143–151  
<https://doi.org/10.1007/BF00349483>
- 31) Vanadium-Binding Ability of Nucleoside Diphosphate Kinase from the Vanadium-Rich Fan Worm, *Pseudopotamilla ocellata*  
N. Yamaguchi, M. Yoshinaga, K. Kamino, T. Ueki  
Zoological Science. 2016, 33, 3, 266-271  
<https://doi.org/10.2108/zs150188>
- 32) Microstructural analysis of microfibrils of bacterial cellulose  
F. Horii, H. Yamamoto, A. Hirai,  
Macromol. Symp. 1997, 120: 197-205  
<https://doi.org/10.1002/masy.19971200120>
- 33) Cellulose synthesizing terminal complexes in the ascidians  
S. Kimura and T. Itoh  
Cellulose. 2004, 11: 377-383  
<https://doi.org/10.1023/B:CELL.0000046414.72903.334>
- 34) セルロースの辞典  
奥田一雄, 空閑重則,  
朝倉書店. 2000  
ISBN 978-4-254-47044-4
- 35) Transposon - mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in the ascidian *Ciona intestinalis*  
Y. Sasakura, K. Nakashima, S. Awazu, T. Matsuoka, A. Nakayama, J. Azuma, N. Satoh  
PNAS. 2005, 102: 15134-15139  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0503640102>
- 36) The evolutionary origin of animal cellulose synthase  
K. Nakashima, L. Yamada, Y. Satou, J. Azuma, N. Satoh  
Development Genes and Evolution. 2004, 214: 81-88  
<https://doi.org/10.1007/s00427-003-0379-8>
- 37) Ascidian tunic cells: morphology and functional diversity of free cells outside the epidermis

- E. Hirose  
Invertebrate Biology. 2009, 128: 83–96  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2008.00153.x>
- 38) ホヤ被囊の構造と機能  
広瀬裕一  
ニューサイエンス社, 月刊細胞. 1993, 25: 383-386  
<https://doi.org/10.11501/1729412>
- 39) Properties of Tunic Acid in the Ascidian *Phallusia nigra* (Asciidiidae, Phlebobranchia)  
E. Hirose, H. Yamashiro, Y. Mori  
Zoological Science. 2001, 18:309-314  
<http://dx.doi.org/10.2108/zsj.18.309>
- 40) ホヤで見られる新しいセルロース合成の場  
木村聡, 伊東隆夫  
電子顕微鏡. 1996, 31(1), 59-61  
<https://doi.org/10.11410/kenbikyo1950.31.59>
- 41) Evidence for the role of the glomerulocyte in cellulose synthesis in the tunicate, *Metandrocarpa uedai*  
S. Kimura and T. Itoh  
Protoplasma. 1995, 186:24-33  
<https://doi.org/10.1007/BF01276931>
- 42) Intracellular Symbiosis of a Photosynthetic Prokaryote, *Prochloron* sp., in a Colonial Ascidian  
E. Hirose, T Maruyama, L Cheng, R.A. Lewin  
Invertebrate Biology. 1996, 115: 343-348  
<https://doi.org/10.2307/3227023>
- 43) The intrinsic origin of bioluminescence in the ascidian, *Clavelina miniata*  
M. Aoki, K. Hashimoto, H. Watanabe  
Biol Bull. 1989, 176: 57-62  
<https://doi.org/10.2307/1541889>
- 44) Localization of antimicrobial peptides in the tunic of *Ciona intestinalis* (Asciidiacea, Tunicata) and their involvement in local inflammatory-like reactions  
M.A. DiBel, H. Fedders, G. De Leo, M. Leippe  
Results in Immunology. 2011, 1: 70–75  
<https://doi.org/10.1016/j.rinim.2011.09.001>
- 45) ハルトボヤ被囊の食用例  
南里寛治, 小河淳一, 西川輝昭

- 南紀生物. 1992, 34: 135  
<https://nagoya.repo.nii.ac.jp/record/2000168/files/66.pdf>
- 46) 物産雑説  
田中芳男  
東京大学総合研究博物館所蔵, 第 34 冊, 64~67  
<https://da.dl.itc.u-tokyo.ac.jp/portal/assets/ae625e8a-71b9-5061-3731-9fbacc56318a?pos=64>
- 47) Bifunctional rare metal-free electrocatalysts synthesized entirely from biomass resources  
H. Yabu, K. Ishibashi, M.S. Grewal, Y. Matsuo, N. Shoji, K. Ito  
Science and Technology of Advanced Materials. 2022, 23, 1, 31-40  
<https://doi.org/10.1080/14686996.2021.2020597>
- 48) マボヤの被囊に含まれるセルロースからの L-乳酸の生産  
柳澤 満則  
環境技術.2021, 50, 3, 150-155  
[https://doi.org/10.5956/jriet.50.3\\_150](https://doi.org/10.5956/jriet.50.3_150)
- 49) 海産動物の接着機構の研究－接着物質の探索と応用展開－  
植木龍也, 山口信雄, 紙野圭  
オレオサイエンス. 2016, 16, 11, 511-518  
<https://doi.org/10.5650/oleoscience.16.511>
- 50) Structural and Mass Spectrometric Imaging Analyses of Adhered Tunic and Adhesive Projections of Solitary Ascidians  
T. Ueki, K. Koike, I. Fukuba, N. Yamaguchi  
Zoological Science. 2018, 35, 6 535-547  
<https://doi.org/10.2108/zs180051>
- 51) ギボシムシ 海砂泥地に潜む面白い新口動物群  
田川訓史  
化学と生物.2017, 55(5): 308-310  
<https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.55.308>
- 52) 動物系統分類学第 8 巻下 半索動物/原索動物  
石川 優  
中山書店. 1986  
<https://www.nakayamashoten.jp/taikei/zoology/ebook.html>
- 53) Hemichordate genomes and deuterostome origins  
O. Simakov, T. Kawashima, F. Marlétaz, J. Jenkins, R. Koyanagi, T. Mitros, K. Hisata, J. Bredeson, E. Shoguchi, F. Gyoja, J.X. Yue, Y.C. Chen, R.M. Freeman Jr., A. Sasaki, T. Hikosaka-Katayama, A. Sato, M. Fujie, K.W. Baughman, J. Levine, P. Gonzalez, C.

- Cameron, J. Fritzenwanker, A.M. Pani, H. Goto, M. Kanda, N. Arakaki, S. Yamasaki, J. Qu, A. Cree, Y. Ding, H.H. Dinh, S. Dugan, M. Holder, S.N. Jhangiani, C.L. Kovar, S.L. Lee, L.R. Lewis, D. Morton, L.V. Nazareth, G. Okwuonu, J. Santibanez, R. Chen, S. Richards, D.M. Muzny, L. Peshkin, M. Wu, T. Humphreys, Y.H. Su, N. Putnam, J. Schmutz, A. Fujiyama, Jr.K. Yu, K. Tagawa, K.C. Worley, R.A. Gibbs, M.W. Kirschner, C.J. Lowe, N. Satoh, D.S. Rokhsar, J. Gerhart  
Nature. 2015, 527, 459-465  
<https://doi.org/10.1038/nature16150>
- 54) Ancestral Stem Cell Reprogramming Genes Active in Hemichordate Regeneration  
T. Humphreys, K. Weiser, A. Arimoto, A. Sasaki, G. Uenishi, B. Fujimoto, T. Kawashima, K. Taparra, J. Molnar, N. Satoh, Y. Marikawa, K. Tagawa  
Frontiers in Ecology and Evolution. 2022, 10, 1-11  
<https://doi.org/10.3389/fevo.2022.769433>
- 55) Spawning and Early Development of the Hawaiian Acorn Worm (Hemichordate), *Ptychodera flava*  
K Tagawa, A Nishino, T Humphreys, N Satoh  
Zoological Science. 1998, 15:85-91  
<https://doi.org/10.2108/zsj.15.85>
- 56) ヒメギボシムシ飼育マニュアル  
山口信雄  
臨海・臨湖. 2014, 31, 15~23  
<https://www.research.kobe-u.ac.jp/rcis-kurcis/station/rinkairinko/rinkairinko31.pdf>
- 57) Preliminary report on the biology of the enteropneus, *Ptychodera flava* E SCHSCHOLTZ, in the vicinity of Kushimoto, Japan  
T. Nishikawa,  
Publ. Seto Mar. Biol. Lab. 1977, 23,393-419  
<https://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/server/api/core/bitstreams/5ad07032-6efd-4258-80b4-4735f6d83d42/content>
- 58) 有機イオンの構造とフラグメンテーション—マスシフト則成立の背景とその後の展開— Structure and m/z of Singly Charged Even-Electron Fragment Ions in Organic Mass Spectrometry“: A Rule of Mass Shift” Revisited  
中田尚男  
J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 2015, 63, 1, 31-43  
<https://doi.org/10.5702/massspec.14-62>
- 59) Production of Agrocinoipine A by *Ipomoea batatas* Agrocinoipine Synthase in

Transgenic Tobacco and Its Effect on the Rhizosphere Microbial Community  
A. Tanaka, M.H. Ryder, T. Suzuki, K. Uesaka, N. Yamaguchi, T. Amimoto, M.  
Otani, O. Nakayachi, K. Arakawa, N. Tanaka, D. Takemoto  
Molecular Plant-Microbe Interactions. 2022, 35, 1, 73-84  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-05-21-0114-R>

60) Exogenous riboflavin (vitamin B2) application enhances salinity tolerance through  
the activation of its biosynthesis in rice seedlings under salinity stress  
K. Jiadkong, A.N. Fauzia, N. Yamaguchi, A. Ueda  
Plant Science. 2024, 339, 111929  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111929>

## 成果等一覧

科学研究費採択 7 件(研究代表者)

- 1) アスキニア科のホヤの養殖と近交系の作成  
奨励研究 (B) 240 千円 研究課題/領域番号 13918030, 2001 年  
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-13918030>
- 2) ホヤ受精卵凍結保存技術の開発  
奨励研究 (B) 230 千円 研究課題/領域番号 15918027, 2003 年  
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15918027>
- 3) 環形動物から抽出した特異な金属結合タンパク質の解析  
奨励研究 760 千円 研究課題/領域番号 1791601, 2005 年  
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-17916012>
- 4) 海産新口動物幼生飼育装置の開発  
奨励研究 580 千円 研究課題/領域番号 20918016, 2008 年  
<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-20918016>
- 5) 半索動物ヒメギボシムシの完全飼育と国内生息域調査  
奨励研究 600 千円 研究課題/領域番号 23924016, 2011 年

<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-23924016>

6) 海産動物ホヤの被囊における接着機構の解析

奨励研究 500 千円 研究課題/領域番号 26924014, 2014 年

<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-26924014>

7) 海産動物ホヤ類がもつ接着物質の探索

奨励研究 700 千円 研究課題/領域番号 15H00451, 2018 年

<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PROJECT-15H00451>

学会発表（筆者発表分のみ）

1) バナジウムを濃縮するスジキレボヤ血球の EST 解析

山口信雄, 植木龍也, 宇山太郎, 道端齊

マリンバイオテクノロジー学会, 2001.5.25~26

2) バナジウムを濃縮するスジキレボヤ血球の EST 解析

山口信雄, 植木龍也, 宇山太郎, 道端齊

日本動物学会 7 2 回大会, 2001.10.6-10.8

3) バナジウムを濃縮するスジキレボヤの金属濃縮関連遺伝子の探索:バナドサイトの EST 解析

山口信雄, 紙野圭, 植木龍也, 宇山太郎, 道端齊

日本動物学会 7 3 回大会, 2002.9.24-9.27

4) バナジウムを濃縮するスジキレボヤの金属濃縮関連遺伝子の解析

山口信雄, 紙野圭, 植木龍也, 道端齊

日本動物学会 7 4 回大会, 2003.9.17-9.19

5) A Survey of Genes for Metal Accumulation in the Vanadium-Rich Ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*: EST Analysis of Vanadocytes

Nobuo Yamaguchi, Kei Kamino K, Tatsuya Ueki, Hitoshi Michibata

Marine Biotechnology Conference 2003, 2003.09.21-27

6) ヒメギボシムシの実験室内飼育成功：卵から幼生変態まで

山口信雄, 田川訓史

日本動物学会 82 回大会, 2011.09.21~23

- 7) ホヤ被囊接着部の解析～ホヤ被囊とバナジウム、硫黄の関係について～

山口信雄, 福場郁子, 小池香苗, 前田誠, 植木龍也

日本動物学会 85 回大会, 2014.09.11-13

- 8) ホヤ被囊接着突起の解析

山口信雄, 福場郁子, 小池香苗, 植木龍也

日本動物学会 86 回大会, 2015.9.17-19

- 9) 試料調製サービスの開発による受託解析の拡充と確実化

山口信雄

日本分析化学会, 2022.09.14

技術研究会発表（筆者発表分のみ）

- 1) ホヤ受精卵凍結保存技術の開発

第 4 回課題報告型技術シンポジウム（生理学技術研究会）2003.02.21

- 2) 海産動物スジキレボヤの特異な金属濃縮関連遺伝子・タンパク質解析における工夫

第 17 回生物学技術研究会 2005.02.17

- 3) 海産動物由来の特異な金属結合タンパク質の解析

第 18 回生物学技術研究会 2006.02.16

- 4) 半索動物ヒメギボシムシのモデル動物化への試み

第 22 回生物学技術研究会 2010.02.18

- 5) ヒメギボシムシの実験室内飼育成功：卵から幼生変態まで

第 24 回生物学技術研究会 2012.02.16

- 6) 環形動物エラコより抽出したバナジウム結合タンパク質の解析

第 25 回生物学技術研究会 2013.02.21

- 7) 海産動物ホヤの被囊における接着機構の解析

～ホヤはどのようにくっついているのか～

- 第 26 回生物学技術研究会 2014.02.20
- 8) ホヤ被囊接着突起の解析  
第 28 回生物学技術研究会 2016.02.19
- 9) SDS-PAGE ゲルからのタンパク質(ペプチド)抽出における特殊例  
第 31 回生物学技術研究会 2019.02.14
- 10) 四重極 LCMS の共用管理・運用について  
(装置初心者への気配りや装置のリカバリー)  
第 30 回機器・分析技術研究会 2024.9.5
- 11) 中国地方ファシリティネットワークの紹介  
第 30 回機器・分析技術研究会 2024.9.5
- 12) 四重極 LCMS の共用管理・運用について  
(装置初心者への気配りや装置のリカバリー)  
第 36 回生物学技術研究会 2024.02.15

#### 外部講師

- 1) 放送大学「瀬戸内海向島海洋生物学実習」2014～2016
- 2) 尾道市立高見小学校課外活動「海洋生物採集・飼育」「高見っ子版ロビンソンクルーソー」等 2011-2016  
※ 平成 15 年度トム・ソーヤースクール企画コンテスト最優秀賞
- 3) 東海国立大学機構統括技術センター 質量分析装置に関する高度技術職員セミナー  
「生物試料における質量分析の基礎～主にタンパク質解析のために」2022.02.04
- 4) 広島大学附属高校スーパーサイエンスハイスクール事業 AS 科学探究 I 「SDS-PAGE 実習および質量分析基礎概論」 2023.03.22

#### その他成果一覧

- 1) テレビ朝日「ナニコレ珍百景」2010.06.30 テレビ放映  
【珍百景 No.6 5 6】「謎のラーメン」ウミソウメン写真・動画提供

- 2) 中国新聞社 中国新聞面掲載 2011.01.24  
「命のゆりかご 瀬戸内の多様な生態系 8」ウミサボテン紹介、撮影協力
- 3) NHK「お好みワイドひろしま」2011.05.13 テレビ放映  
ウミサボテン紹介、地元小学校海洋実習風景撮影協力
- 4) NHK「おはよう日本」2011.05.21 テレビ放映  
ウミサボテン紹介、地元小学校海洋実習風景撮影協力
- 5) PHP 出版社 書籍「たまご大図鑑」ISBN 978-4-569-78248-5, 2012.07.13  
アメフラシ、ウミウシ等の卵塊写真提供
- 6) 中国新聞社 書籍「命のゆりかごー瀬戸内の多様な生態系」2012.10.01  
ISBN-13 978-4885173851, ゴンズイ、ウミサボテン紹介、撮影協力
- 7) 広島ケーブルテレビ「ふれあいチャンネル」いのちのゆりかご第2話ゴンズイ  
テレビ放映 2012.11.10-16, ゴンズイ撮影協力
- 8) 学研プラス 書籍「世界の不思議生物 FILE」ISBN-13:978-4054056985,  
2013.6.18 ウミサボテン写真提供・説明文編集
- 9) 日本テレビ「ザ・鉄腕! Dash!」2013.07.14 テレビ放映  
アメフラシ写真・動画提供
- 10) テレビ朝日「くりいむクイズ ミラクル9」2014.07.30 テレビ放映  
ウミサボテン写真・動画提供
- 11) テレビ朝日「いきなり黄金伝説」2015.7.2 テレビ放映  
お猿だらけの無人島を観光地化計画 3時間スペシャル, ムカデメリベ捕食動画提供
- 12) 広島ホームテレビ「Jステーション」 夏に潜む危険 2015.07.24 テレビ放映  
アカエイ、ゴンズイ、ウミケムシ、スナイソギンチャク撮影協力、写真提供
- 13) 広島大学総合博物館 書籍編集「東広島キャンパスの自然観察 ペーパーバック」  
2022.04.18, ISBN-13 978-4802092418"

#### 資格等

- 1) 危険物取扱者乙第4類, 1990
- 2) 毒物劇物取扱責任者資格, 1992

- 3) 小型船舶操縦士 4 級(現 2 級), 2000
- 4) 博士号 (広島大学 理学) ,2004
- 5) 刈払機取扱作業者教育・伐木等 (チェーンソー) 作業者教育, 2007
- 6) 巻き上げ機(ウィンチ)特別教育, 2012

#### 受賞歴

- 1) 日本育種学会 日本育種学会論文賞 第 23 号 平成 25 年 (2013 年)  
Construction of a high-density reference linkage map of tea (*Camellia sinensis*)  
Fumiya Taniguchi, Kazumi Furukawa, Sakura Ota-Metoku, Nobuo Yamaguchi,  
Tomomi Ujihara, Izumi Kono, Hiroyuki Fukuoka, Junichi Tanaka  
Breeding Science. 2012, 62, 3, 263-273  
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.62.263>
- 2) 広島大学職員永年勤続者表彰 (2020 年)
- 3) TC カレッジ 技術・研究支援発表会 株式会社島津製作所賞 2023.9.28