

(発表題名) 大阪湾圏域の底質環境修復に向けた海産ミミズが有する
有害化学物質削減能力の解明

(氏名) 伊藤克敏

(所属・役職) 水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所・任期付研究員

[研究目的]

大阪湾内沿岸域の底質からは、現在でも高濃度の有害化学物質が検出されており、早急な底質環境修復技術の構築が求められている。これまでに我々は、汚染底質に高い耐性を持つ海産ミミズ（未同定種）が、汚染が進行した底質中に含まれる複数の有害化学物質を削減する能力を合わせ持つことを見出した。

本研究課題では、大阪湾圏域の底質環境修復に向け、海産ミミズが有する汚染底質浄化能力の解明に取り組む。具体的には、大阪湾内から採取した重度の汚染底質を用いて曝露試験を行い、海産ミミズの有害化学物質代謝に関与する遺伝子を次世代シーケンサを用いて網羅的に検索すると共に、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)等の機器分析を用いたメタボローム解析により代謝産物を同定し、代謝経路を包括的に解析する。これらを統合的にまとめ「海産ミミズが有する汚染底質浄化メカニズム」を解明し、底生生物を用いた大阪湾の底質浄化技術の構築を目的とした。

[研究方法]

【汚染底質曝露試験】

「試験対象底質」

試験底質は、2012年9月に大阪湾内大正内港（図1）にてエグマンバージ採泥器を用い採取した。底質試料は、1 mmメッシュの篩で濾した後、試験に供するまで-20℃で保存した。なお、底質試料は曝露試験に供する前に、含水率、強熱減量、酸揮発性硫化物量（AVS）及び多環芳香族炭化水素類（PAHs）を既報に従い測定した。

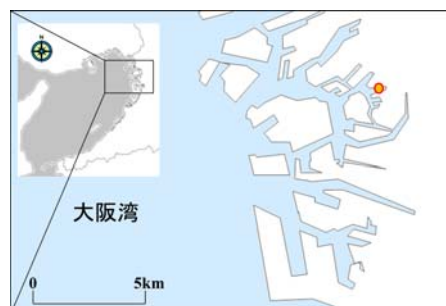


図1 ● : 底質採取地点

「試験対象種」

海産ミミズ(未同定種) (図2) : 小型の貧毛類で、長期飼育が可能な種であり、予備試験の結果から非常に高い1-ニトロナフタレン（石油由来の汚染物質）代謝能を有していることが明らかとなっている。本種は愛媛県南部海域の養殖場底泥中より採取し、研究所で継代飼育中の個体を実験に供した。



図2 高い汚染耐性を持つ海産ミミズ

「曝露試験」

曝露試験には密閉式のガラス円柱容器(420ml)を用い、上記対象底質 86g(乾燥重量)に海産ミミズ 200 個体、及び底質乾燥重量当たり 4 倍量の海水を加え試験区とした。曝露期間中は無給餌とし、20℃、暗条件下で 10 日間曝露試験を実施した。海産ミミズのサンプリングは実験開始前、3 日後、及び曝露試験終了後に実施した。各ミミズサンプルを底質より取り出し、ケイ砂を敷設した海水中で 5-10 分程度水浴した。その後、胃内容物がないことを顕微鏡下で 1 尾ずつ確認した上で液体窒素で急速凍結し、前処理まで -85℃ で保存した。

【次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析】

試験開始前及び 10 日間の曝露試験終了後の海産ミミズサンプルより totalRNA を抽出した。抽出した totalRNA は、イルミナ社 TruSeq RNA Sample Prep Kit を用いてシーケンス用ライブラリ調製を行った後、次世代シーケンサー HiSeq を使用し解析を行った。得られたデータは、情報処理を実施し、検体間比較を行った。

【GC/MS を用いたメタボローム解析】

前処理は Bando et al (2010) に準じて図 3 に示す方法で行った。すなわち、ミミズを入れたチューブに粉碎用ビーズ、抽出用混合溶液 (MeOH/H₂O/CHCl₃) を入れて粉碎し、内部標準 (リビトール) を添加した後、インキュベーション、遠心、濃縮の工程を経て親水性代謝物 (糖、有機酸、アミノ酸等) を乾燥物として抽出した。

乾燥抽出物は、2 段階の誘導体化 (メトキシ化、トリメチルシリル化) を行い (図 4)、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) に図 5 に示す条件で供した。

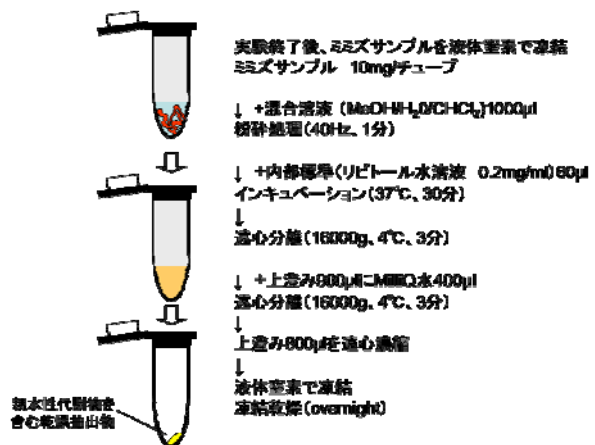


図 3 試料前処理方法

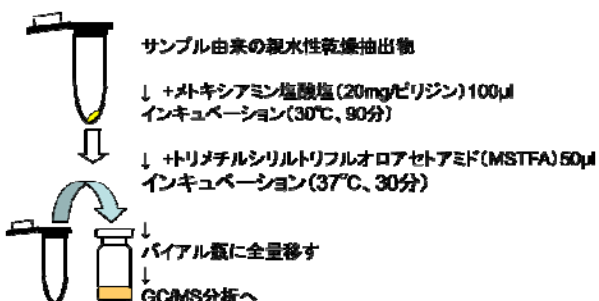


図 4 試料誘導体化方法

メタボロミクス: GC/MS分析

機器: 5975(GC) +6890N(MS) (Agilent社)
カラム: CPSil 8CB(Agilent社)
注入口: 温度230℃、注入量1µl
注入モード: スプリット(1:25)
カラム: 80℃(2分)→15℃/分→330℃(6分)
MS条件: イオン源200℃、四重極150℃

図 5 GC/MS 分析条件

GC/MSにより得られたクロマトグラムは、Met align

(<http://www.wageningenur.nl/en/show/MetAlign-1.htm>)によりデコンボリューションを行ったのち、AIoutput2 (大阪大学大学院工学研究科福崎研究室にて開発：<http://prime.psc.riken.jp>にて公開) 及び National Institute of Standards and Technology (NIST) ライブラリを用い保持時間、クロマトグラムを照合し代謝物の同定を行った。同定された代謝物は、差次的な変化を統計解析し、各代謝物が関与する代謝経路を Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) を用いて包括的に解析した。

[結果と考察]

【底質分析結果】

大阪湾内大正内港より採取した底質試料の分析結果を表 1 に示した。分析の結果、底質中 AVS 量は 11.6mg/g-dry であり、水産用水基準値 0.2mg/g を遙かに超える値であった。さらに、4 種の PAHs 分析の結果、フェナントレン及びピレンの濃度がアメリカ合衆国環境保護庁 (U. S. EPA) が定める基準値を超えていた。

表 1 大阪湾内大正内港底質分析結果

	含水率 (%)	強熱減量 (%)	硫化物濃度 (mg/g-dry)	底質中PAHs濃度 (ng/g-dry)			
				ナフタレン	フェナントレン	ピレン	クリセン
大阪湾大正内港底質サンプル	69.7	13.5	11.6	98	3,414	5,107	2,138

【曝露試験結果】

試験終了後、海産ミミズの生物数を計測した結果、生物数の減少は認められなかった。さらに、試験区を詳細に観察した結果、海産ミミズが構築した坑道 (図 6-b) や攪拌の形跡 (図 6-c) が底質の側面及び表面に認められた。

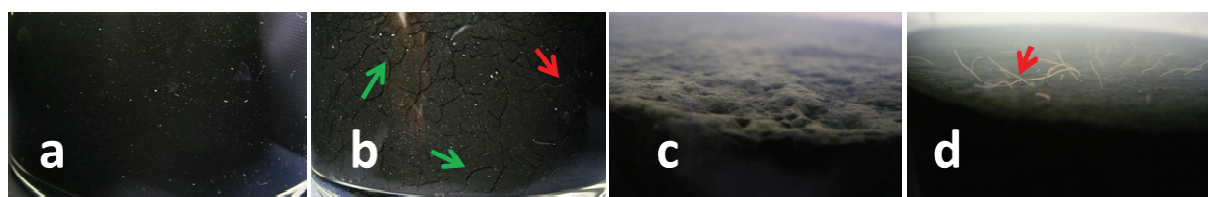


図 6 a: ミミズ非接触区 b,c,d: 曝露試験区 緑: 坑道 赤: 海産ミミズ

【次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析結果】

次世代シーケンサーを用いた解析の結果、曝露開始前及び10日間曝露後のサンプルから、それぞれ1.2億リード及び1.7億リードの塩基配列情報を得た。このうち26万種類の遺伝子断片を用いて発現量の比較解析を行った。その結果、10日間の底質曝露により、10倍以上に発現量が上昇した遺伝子が181種類、10分の1以下に減少した遺伝子が1,785種類それぞれ同定された。最も発現量が増加した遺伝子は、第一相薬物代謝酵素であるチトクロムP450であり、65倍に発現量が増加していた。

【GC/MS を用いたメタボローム解析結果】

代謝物同定を行った結果、計 43 種類の代謝物が同定された。そのうち、10 日間の大阪湾底質曝露により有意に変動した代謝物は 29 種類であった。主成分分析の結果、大阪湾底質曝露の有無、曝露日数により明瞭なグループに分かれ、総体的に代謝物の大きな変動が見られた (図 7)。

大阪湾底質曝露により代表的な代謝物が関与する代謝経路を同定した結果、薬物代謝に関わる代謝経路 (グルタチオン代謝) に関与するアミノ酸の変動が見られた。また、クエン酸回路において、大阪湾底質に曝露されたことによる顕著な変動が見られた (図 8)。さらに、顕著な嫌気的特性を持つ大阪湾底質に曝露されると嫌気呼吸にシフトして乳酸が増加することが予想されたが、曝露前後で乳酸の増加は見られなかった。大阪湾の底質は海産ミミズにとっては嫌気的なストレスを与えるほどではないのかもしれない。

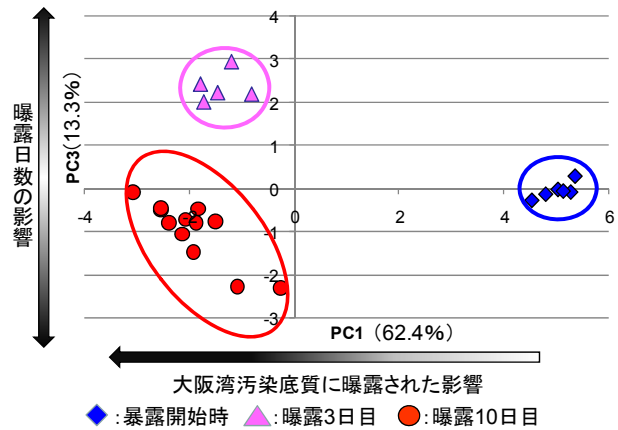


図-7 大阪湾汚染底質に曝露した海産ミミズ代謝物の主成分分析

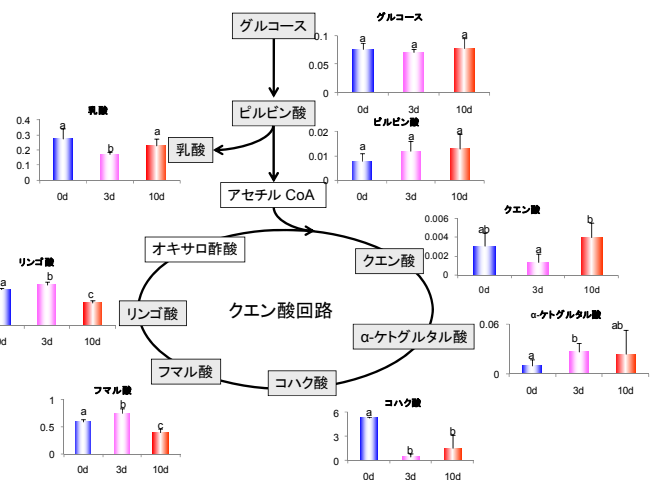


図-8 大阪湾汚染底質に曝露した海産ミミズ代謝物の変動(解糖系~TCA回路) 各棒グラフ上の異なる英数字は統計的に有意な差があることを示す。

【結論】 以上の結果から、海産ミミズは体内代謝物を調節しながらも極限汚染海域に順応していると予想された。さらに、薬物代謝酵素系を活性化することで、体外に化学物質を排出する過程において、有害化学物質の代謝が促進されたのではないかと考えられた。今後、他のベントスとの比較・汚染状況の異なる底質との比較ができればその調節能の解明により近づくものと期待される。

【参考文献】 Bando et al (2010) GC-MS-based metabolomics reveals mechanism of action for hydrazine induced hepatotoxicity in rats *J. Appl. Toxicol.* 31:524-535