

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K20075

研究課題名(和文) 汚染物質分解に特化したノトバイオート海産ミミズ作成と内在菌の生物学的機能解析

研究課題名(英文) Preparation of gnotobiotic marine earthworm for pollutant decomposition and analysis of biological functions of endogenous bacteria

研究代表者

伊藤 克敏 (Ito, Katsutoshi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員

研究者番号：80450782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海産ミミズを無菌化した後、化学物質分解菌を定着させるノトバイオート海産ミミズの作成に取り組んだ。無菌化には卵又は親個体からの2つのアプローチで実施した。卵は無菌培地上でふ化させ一定期間無菌的に飼育することに成功した。親個体については各種抗生物質を用い、試験開始から3日後には定量PCRの検出限界とはほぼ同程度まで、菌体の数値が減少した。次に、無菌化した海産ミミズ、分解菌を定着させたノトバイオート海産ミミズを作成し、化学物質分解能や汚染耐性試験を実施した。その結果、汚染物質耐性等の生理機能に大きな違いが生じることが明らかとなり、内在菌の存在が、重要な役割を担っていることが立証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、海産ミミズの有する極めて高い汚染耐性・化学物質分解能に内在菌がどの様に関与しているのか、その一端が明らかになった。また、近年、Nature誌などに取り上げられている常在細菌叢に関する研究にも貢献するなど学術的に意義深い研究である。さらに、将来的には、汚染物質分解に特化したノトバイオート海産ミミズを用いた極めて効果的・革新的なバイオレメディエーション技術が社会に還元されることが十分に期待されるなど、漁場保全学・ベントス学・微生物学の学術分野にも多大なインパクトがあるのみならず、底質のバイオレメディエーションに直結する、実学的要素を備えており、社会的な意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop sterile marine earthworms (*Thalassodrilides* cf. *briani*: Annelida: Clitellata: Naididae) and prepare gnotobiotic marine earthworms with pollutant-degrading bacteria. Two approaches were used to sterilize the eggs and parent earthworms. The eggs were successfully hatched on sterile medium and maintained aseptically for a certain period. Various antibiotics were used to sterilize parent earthworms, after 3 days of the tests, the number of bacterial cells decreased to detection limit levels, as determined using a quantitative PCR method. Sterile and gnotobiotic marine earthworms were prepared and subjected to pollutant decomposition and contamination resistance tests. The results demonstrated that the physiological functions such as resistance to pollutants differ greatly between the two populations of earthworms, proving that the endogenous bacteria play an important role in the process.

研究分野：環境毒性学

キーワード：底質浄化 ション 海産ミミズ ノトバイオート 底質汚染 内在菌 多環芳香族炭化水素 バイオレメディエ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水産資源を効率的・安定的に供給するためには、養殖業や稚仔魚の成育場として重要な機能を担う沿岸環境の保全が不可欠である。しかしながら沿岸域では、漁網防汚剤・船底防汚剤・石油類などによる直接的な汚染の他、陸域での人間活動(産業・生活等)の結果生じた廃水の河川流入による間接的汚染が未だに問題となっている。こうした汚染物質の多くは、有機物粒子などに吸着した形で底質に堆積するため、底質は水域や生物への「二次汚染源」として危惧されている(Eggleton & Thomas, 2004)。海洋生態系保全のためにも、底質に蓄積した有害物質の削減を図ることは喫緊の課題であるといえる。これまでに申請者らは、汚染底質に生息するヒメナイワナイトミズ *Thalassodrilides cf. briani* (図1)が極めて高い有害化学物質分解能(Ito K et al. 2016)及び汚染底質耐性を有することを発見した(Ito M et al. 2016a b)。さらに、海産ミミズは化学物質分解菌が体内に内在させていることなどが明らかになってきた(未発表)。故に、海産ミミズが有する特殊能力に内在菌が極めて重要な役割を担っていることが予想される。しかしながら、汚染物質耐性及び化学物質分解能に内在菌が、どの様に関与しているのか全く明らかになっていない。

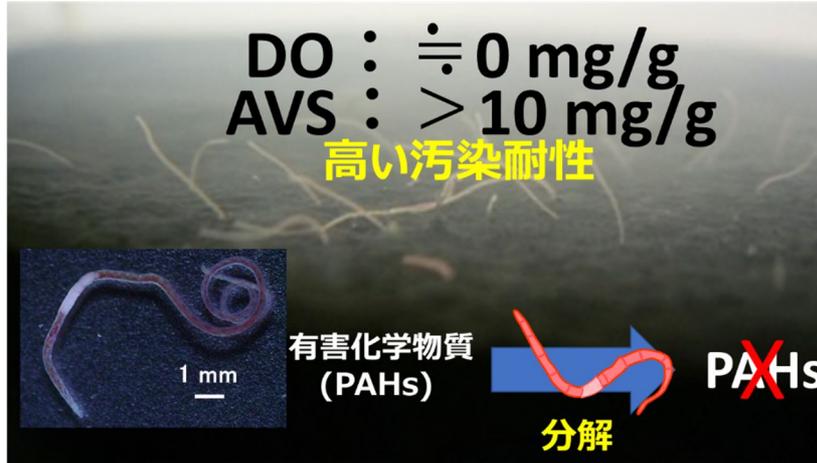


図1 ヒメナイワナイトミズ *Thalassodrilides cf. briani*  
AVS : >10mg/g、溶存酸素 : 0mg/L、の重汚染底質にも生育可能

### 2. 研究の目的

本研究では、無菌化した海産ミミズを作成し、無菌化していない個体とで、化学物質分解能や汚染耐性等、生理機能にどのような違いが生じるのかを明らかにする。さらに、化学物質分解菌を、無菌ミミズに定着させたノトバイオート海産ミミズを作成し、各種汚染化学物質に即した分解菌を定着させ、汚染物質分解に特化したノトバイオート海産ミミズを用いた極めて効果的・革新的な底質浄化法の開発を最終的な目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)生物

愛媛県南宇和郡愛南町福浦湾、魚類海面養殖場の水深 40m の地点にて、海産貧毛類のヒメナイワナイトミズ *Thalassodrilides cf. briani* (Torii et al. 2016) (以下海産ミミズと略記)を採取した。採取した海産ミミズを、瀬戸内海区水産研究所内に設置した海水かけ流し水槽にて、20 で一定期間馴致後、各種実験に供した。

#### (2)海産ミミズからの微生物 DNA 抽出の検討

海産ミミズからの内在性微生物 DNA の抽出には、ISOGEN (ニッポンジーン)、ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep™ (Zymo Research)、E. Z. N. A. Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) の 3 種類の抽出キットを用い、プロトコールに従い微生物 DNA を抽出した。DNA 量の測定は、CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) を用い、16S rRNA 遺伝子を定量 PCR 法にて測定した。

#### (3)海産ミミズの無菌化(図2)

無菌化海産ミミズの作成には、卵及び親個体からの 2 つのアプローチで実施した。卵からの無菌化は、Mikami (2016) を参考にし、卵をよく殺菌した後、滅菌した液体培地でふ化させ、無菌状態で飼育し作成する方法を用いた。親個体の無菌化は、Matthies (1999) を参考にし、各種抗生物質 (Ampicillin, Carbenicillin, Kanamycin) で滅菌化した培地で飼育し、内在菌を除去する方法を用いた。

#### 無菌海産ミミズ作成プロセス



図2 海産ミミズの無菌化試験の概要

#### (4) ノトバイオート海産ミミズ作成

作成した無菌海産ミミズに3種類の異なる化学物質分解菌(N株、M株、T株：分解菌の詳細は差し控える)の定着を試みた。具体的には、無菌した海産ミミズに、予め培養した化学物質分解菌を人工海水で希釈し、無菌した海産ミミズの飼育水槽に一定量加えた。

#### (5) 毒性試験

##### ① 耐性試験 多環芳香族炭化水素類 (PAHs)

作成した無菌海産ミミズ、ノトバイオート海産ミミズ、及び天然海産ミミズを用い、有害化学物質の耐性試験を実施した。被験物質は、代表的な沿岸域における底質汚染物質である PAHs を用いた。期間は5日間、20のインキュベータ内で実施した。

##### 減衰試験 フェナントレン (Phe)

作成した無菌海産ミミズ、ノトバイオート海産ミミズ、及び天然海産ミミズを用い、有害化学物質の耐性試験を実施した。被験物質は、PAHの一種であるフェナントレン(Phe)を用いた。曝露濃度は300 µg/L、期間は4日間、20のインキュベータ内で実施した。

#### (6) 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

作成した無菌海産ミミズ、ノトバイオート海産ミミズ、及び天然海産ミミズを一定期間化学物質に曝露し試験終了後、海産ミミズから ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を実施し、各種処理により差次的に発現する遺伝子の網羅解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 海産ミミズからの微生物 DNA 抽出の検討結果

ISOGEN (ニッポンジーン)、ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep™ (Zymo Research)、E. Z. N. A. Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) の3種類の抽出キットを用い、プロトコールに従い海産ミミズから内在性微生物 DNA を抽出し、定量 PCR 法にて微生物量を測定した。その結果、海産ミミズ内在菌に関しては、E. Z. N. A. Tissue DNA Kit が最も効率よく、DNA を抽出できることが明らかとなった。よって、以下の実験の微生物量の定量には、E. Z. N. A. Tissue DNA Kit にて抽出された DNA を用いた。

#### (2) 海産ミミズの無菌化

無菌化海産ミミズの作成に卵及び親個体からの2つのアプローチで実施した。研究所実験水槽で一定期間飼育し、成熟個体から卵を採取した。採取した卵は無菌培地上でふ化させ一定期間無菌的に飼育することに成功した(図3)。親個体の無菌化については、各種抗生物質を滅菌処理した活性炭ろ過海水に添加し、乾熱滅菌した珪砂を入れたガラス容器内において海産ミミズの無菌化試験を実施した。経時的に海産ミミズのサンプリングを行い、微生物 DNA を上記手法を用いて抽出後、定量 PCR 法にて細菌の 16s rRNA 遺伝子を定量した。試験の結果、試験開始から24時間後には、16s rRNA 量は、10%まで減少し、3日後には定量 PCR の検出限界とほぼ同程度の値まで、数値が減少した。この結果から、抗生物質を用いることで、海産ミミズの内在菌数を極めて低レベルまで減少させることが可能であることが明らかとなった(図4)。

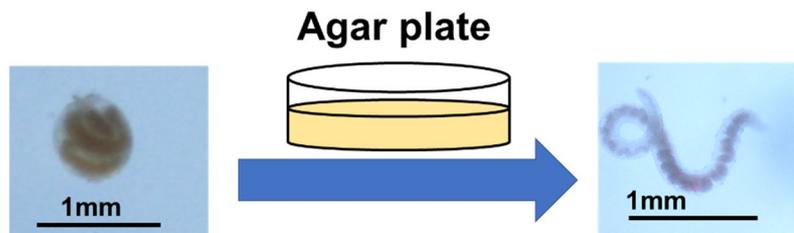


図3 無菌的にふ化させた海産ミミズ

#### Number of copies/mg specimen (Oligochaeta)

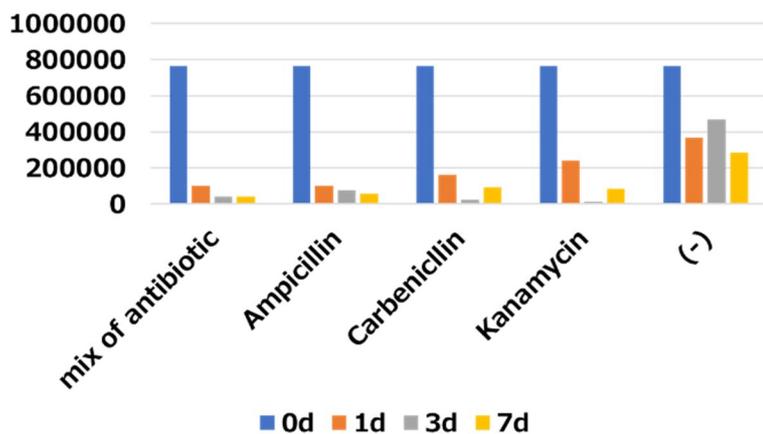


図4 各種抗生物質処理をした海産ミミズにおける内在菌微生物量の経時的変化

### (3) ノトバイオート海産ミミズ作成

作成した無菌海産ミミズに化学物質分解菌の定着を試みた。その結果、海産ミミズに定着する分解菌の量は、経時的に増加することが明らかとなった。

### (4) 毒性試験結果

無菌海産ミミズ、化学物質分解菌を定着させたノトバイオート海産ミミズ、及び天然海産ミミズを用い化学物質耐性試験（多環芳香族炭化水素）を行った。その結果、無菌海産ミミズは、天然海産ミミズに比べ、化学物質耐性が低いこと、さらに、定着させた分解菌の違いにより、化学物質耐性及び分解能力に差があることが明らかとなった。この結果から、海産ミミズの化学物質耐性には、内在菌が極めて重要な役割を担っていることが明らかとなった。

### (5) トランスクリプトーム解析結果

無菌海産ミミズ、ノトバイオート海産ミミズ、及び天然海産ミミズに化学物質を曝露し、差次的に発現する遺伝子を次世代シーケンサーを用いて網羅解析を行った。その結果、各群に差次的に発現する遺伝子が多く存在していることが明らかとなった。得られた結果を精査することで、生物を用いた環境浄化技術向上に繋がると考えられる。

### References

Eggleton J, Thomas K.(2004). A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environ Int.* 30: 973-980.

Matthies, C., Griebhammer, A., Schmittroth, M., and Drake, H. (1999). Evidence for involvement of gut-associated denitrifying bacteria in emission of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) by earthworms obtained for garden and forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3599-3604.

Mikami Y, Fukushima A, Kuwada-Kusunose T, Sakurai T, Kitano T, Komiyama Y, Iwase T, Komiyama K (2015) Whole transcriptome analysis using next-generation sequencing of sterile-cultured *Eisenia andrei* for immune system research. *PLoS One* 10(2):e0118587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118587>

Ito, K. Ito, M. Onduka, T. Ohta, K. Torii, T. Hano, T. Mochida, K. Okubo, N. Miura, T. Fujii, K. (2016). Differences in the ability of two marine annelid species, *Thalassodrilides* sp. and *Perinereis nuntia*, to detoxify 1-nitronaphthalene. *Chemosphere*, 151: 339-344.

Ito, M. Ito, K. Ohta, K. Hano, T. Onduka, T. Mochida, K. (2016a). Transcription of a novel P450 gene varies with some factors (pollutant exposure, temperature, time, and body region) in a marine oligochaete (*Thalassodrilides* sp.). *Marine Pollution Bulletin*, 109: 344-349.

Ito, M. Ito, K. Ohta, K. Hano, T. Onduka, T. Mochida, K. Fujii, K. (2016b). Evaluation of bioremediation potential of three benthic annelids in organically polluted marine sediment. *Chemosphere*, 163: 392-399.

Torii, T. Erséus, C. Martinsson, S. Ito, M. (2016). Morphological and Genetic Characterization of the First Species of *Thalassodrilides* (Annelida: Clitellata: Naididae: Limnodriloidinae) from Japan. *Species Diversity*, 21: 117-125.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katsutoshi Ito, Mana Ito, Takeshi Hano, Toshimitsu Onduka, Kazuhiko Mochida, Nobuaki Shono, Ryuhei Nakamura	4. 巻 49
2. 論文標題 Marine sediment conservation using benthic organisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bull. Jap. Fish. Res. Edu. Agen.	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊藤 克敏, 伊藤 真奈, 太田 耕平, 羽野 健志, 大久保 信幸, 持田 和彦	4. 巻 73
2. 論文標題 愛媛県福浦湾魚類養殖場下に生息する海産貧毛類ヒメナイワナイトミズThalassodrilides cf. brianiの季節変動および飼育条件に関する研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本ベントス学会誌	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.5179/benthos.73.57">https://doi.org/10.5179/benthos.73.57</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Urbisz AZ, Chajec L, Ito M, Ito K.	4. 巻 128
2. 論文標題 The ovary organization in the marine limnodriloidin <i>Thalassodrilides cf. briani</i> (Annelida: Clitellata: Naididae) resembles the ovary of freshwater tubificins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 zoology	6. 最初と最後の頁 16-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.05.004">https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.05.004</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Anna Z. Urbisz, Lukasz Chajec, Mana Ito, Katsutoshi Ito and Piotr Swiatek
2. 発表標題 The ovary of <i>Thalassodrilides cf. briani</i> (Clitellata: Naididae: Limnodriloidinae) as the example of a multicellular germ-line cyst with a common cytoplasm
3. 学会等名 14th International Symposium on Aquatic Oligochaeta (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mana Ito, Katsutoshi Ito, Takeshi Hano, Motoharu Uchida
2. 発表標題 Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine sediment by interaction between oligochaete, <i>Thalassodrilides cf. briani</i> and microorganisms.
3. 学会等名 14th International Symposium on Aquatic Oligochaeta (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsutoshi Ito, Mana Ito, Kohei Ohta
2. 発表標題 Sterilization of marine oligochaete <i>Thalassodrilides cf. briani</i> (Clitellata: Naididae)
3. 学会等名 14th International Symposium on Aquatic Oligochaeta (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 克敏・伊藤 真奈・持田 和彦・庄野 暢晃・中村 龍平
2. 発表標題 環境電位を指標にした底質浄化に関する研究
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsutoshi Ito, Mana Ito, Takeshi Hano, Toshimitsu Onduka, Kazuhiko Mochida, Ryuhei Nakamura, Nobuaki Shono
2. 発表標題 Marine sediment conservation using benthic organisms
3. 学会等名 45th Scientific Symposium of the UJNR Aquaculture Panel (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤 真奈・梅澤 明夫・川市 智史・中村 龍平・伊藤 克敏
2. 発表標題 海産ミミズによる海洋底質の環境電位変動に伴う微生物群集構造の解析
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<ul style="list-style-type: none"> <li>・漁場環境の恒常性を保つ底質管理 環形動物による浄化とORP監視のススメ (2019)アクアネット12月号 特集生質の下はどうなってるの? p22-25</li> <li>・FMラジオ出演 ECOしま専科</li> </ul>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	太田 耕平  (Ohta Kohei)  (10585764)	九州大学・農学研究院・准教授    (17102)	
研究分担者	伊藤 真奈  (Ito Mana)  (60735900)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・研究員    (82708)	