

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510062

研究課題名(和文)原生動物を用いた水環境モニタリング法の有効性に関する生物学的基盤

研究課題名(英文)Biological basis for the effectiveness of water quality monitoring system using protozoans

研究代表者

洲崎 敏伸 (Suzaki, Toshinobu)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00187692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：水道水は常に農業や工業、そして自然由来の様々な化学物質による汚染の可能性に曝されている。従って、水道水に混入した有害物質を迅速かつ高感度に検出する方法を開発することは安心かつ安全な社会を構築するために重要である。これまでに、この目的のために様々な生物を用いたモニタリングシステムが開発されてきたが、残念ながらそのいずれも満足いく性能を有していない。原生動物には、様々な環境変化に対して鋭敏な応答現象を示すものがある。本研究ではユーグレナを利用し、誘電解析法(インピーダンス法)を用いた新しい水環境のバイオモニタリングシステムの開発を行い、特徴的な誘電特性の変化を感度よく検出できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Public drinking water is vulnerable to contamination from many potential threats including pollution by agricultural, industrial and also naturally occurring chemicals. Therefore, development of effective and prompt methods for detecting harmful chemicals in drinking water is a critical issue for sustaining safety and security of the society. In spite that a variety of different procedure have been proposed for this purpose, none of them is still far from satisfactory. In this research, we have developed a dielectric monitoring system for drinking water using *Euglena gracilis* as a monitoring organism.

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境技術 原生生物 誘電解析 水質検査 ユーグレナ

## 1. 研究開始当初の背景

環境汚染を早い段階で検出してそれを未然に防止することは重要かつ必要であるが、通常の化学分析法は検出に時間がかかり、早期の段階での水質汚染を検出することは難しい。そこで、生物材料を用いた水質モニタリングの試みが、これまでもいくつかなされている。しかし、これらの方法には、(1) 生物材料を準備することに経費と時間がかかる、(2) 運動をモニターするための複雑な装置が必要である、(3) 生物の示す変化を確認するのに少なくとも数十分の時間を要する、(4) 検知感度が低い、(5) 魚類などのような大型の生物体内に取り込まれた有害物質は、特定の臓器・組織に蓄積されることにより、生物体自体の観察可能な変化が生じるまでに時間がかかってしまう、などの難点がある。すなわち、環境汚染をより早い段階で検出するためには、これらの問題点を克服する、高性能(高感度・高速)のバイオモニタリングシステムの開発が求められていた。

いくつかの原生動物の種は、重金属などの水質汚染要因に対してきわめて短時間に鋭敏な反応を示すことが知られている。上水・下水の常時監視システムとして原生動物を用いることができるならば、上記の問題点の多くを解決することができる。さらに、小型で安価なモニタリング装置があれば、様々な水環境の安全性を、社会のニーズに応じて広くアピールすることが可能となる。そこで私たちの研究グループは、これまでに顕微画像解析法と電気生理学的手法を併用した、タイヨウチュウやユーグレナなどの原生動物を利用した新しい環境汚染モニタリングシステムの原理を開発した。また、これらの原生動物は水環境中の有害物質に対してきわめて鋭敏かつ急速な反応を示し、モニタリング生物として有用であることを示した。しかし、毒性発現の生物学的メカニズムは不明である。そこで本研究課題では、装置のさらなる改良と平行して、システムの信頼性を確保するための基礎的研究として、水中の有害物質が原生動物のどの細胞構造や生化学的機能に影響するのかという点についても詳細な検討を加えることとした。

## 2. 研究の目的

本研究グループが開発しているモニタリングシステムは、細胞の基質への接着性の低下と細胞の示すインピーダンス特性の変化を指標として、細胞外液に含まれる物質の有害性を総合的に判定している。これまでの研究により、重金属などの有害物質が与えられると、ハリタイヨウチュウなどの示す細胞接着性は低下する。また、ユーグレナなどでは、インピーダンス特性に顕著な変化が認められる。しかし、これらの現象がどのような仕組みで生じているのかは、今のところ未知である。そこで、本研究は、原生動物を用いた

バイオモニタリングシステムの有用性を実証し、その動作原理を生物学的に解明することを目標とした。そのための具体的な目的は、1) 細胞毒性のメカニズムを細胞生物学的に解明すること、2) 試作中のモニタリングシステムを用いた性能の評価を行うこと、である。

## 3. 研究の方法

原生動物を水質汚染の指標生物として利用し、試験水中における有害物質の有無を即座に確認するためのバイオモニタリングシステムを開発した。モニタリングシステムの構造は、顕微鏡部分と画像解析部分、さらにインピーダンス解析部分からなる。具体的には、光学顕微鏡にあらかじめ原生動物をセットしておいたプラスチックセルを置き、ユーグレナ(*Euglena gracilis*)の様子をデジタルビデオカメラで撮影し、細胞の形状の変化について画像解析を行う。セルには一方から試験水を導入し、他方から排出するように、小型ポンプを用いたフロースルー型のものとした。また、セルには並行板コンデンサー型の白金電極を挿入・装着し、細胞懸濁液全体のインピーダンスを測定した。誘電解析法(インピーダンス法)は、このような細胞各部に対する損傷の度合いを、細胞を破壊することなく生きたままで計測することのできる優れた非侵襲的測定法である。本研究では様々な処理を施したユーグレナ細胞の誘電特性を、新規にデザインした並行板コンデンサー型測定セルを用いて、広帯域インピーダンスアナライザーで測定し、その電気的パラメータの周波数特性を調べた。また、光学顕微鏡観察により得られた形態的パラメータを加味した誘電緩和理論を適用し、細胞のさまざまな部分における電気的特性の変化を評価するためのソフトウェアを作成した。

## 4. 研究成果

ユーグレナを様々な手法により刺激を与え(光刺激・機械的刺激など)細胞の形状を変化させた際に、それに伴う顕著な誘電特性の変化を感度よく検出することができた。また、誘電解析法では低周波領域において必ず電極分極によるアーティファクトが観測されるが、それを効果的に取り除くための新たな計算法を開発し、それが実際のデータに適用できることを確認した。さらに、得られたインピーダンス特性の測定データを、現象論解析および原生動物の細胞形態を反映した理論解析のアルゴリズムを用いて解析した。

次いで、外部から細胞外液を継続的に流入・流出させることができる流路を設けた並行板コンデンサー型測定セルを作製し(図1)、広帯域インピーダンスアナライザーで測定しつつ、電気的パラメータの周波数特性を調べた。その結果、外液中に様々な化学物質を加えることにより生じるユーグレナの細胞形状の変化に加え、いくつかの特徴的な

誘電特性の変化を感度よく検出することができた。また、誘電理論解析を行い、インピーダンス特性の変化を、細胞各部の電気的パラメータの変化として推定するための解析ソフトウェアを作成した。これにより、有害物質の効果をオルガネラレベルでの電気的変化として捉えることが可能となった。



図1. 解析に用いた flow-cell タイプ平行板コンデンサー型測定セル。内容量は 0.39 ml である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Song, C. and Suzaki, T. (2013) Improved preservation of organelles in *Paramecium bursaria* by freeze-substitution with glutaraldehyde and osmium tetroxide. J. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol., 27(1): 1-8. (査読あり)

Li, Y., Kim, O.T.P., Ito, K., Saito, K., Suzaki, T. and Harumoto, T. (2013) A single amino acid substitution alters omnipotent eRF1 of *Dileptus* to *Euplotes*-type dualpotent eRF1: Standard codon usage may be advantageous in raptorial ciliates. Protist, 164: 440-449. (査読あり)

Katsuhisa Yoshida, Miwa Ohnishi, Yoichiro Fukao, Yozo Okazaki, Chihong Song, Fumio Hayashi, Masayuki Fujiwara, Yoichi Nakanishi, Kazuki Saito, Teruo Shimmen, Toshinobu Suzaki, Hidehiro Fukaki, Masayoshi Maeshima, and Tetsuro Mimura. (2013) Studies on vacuolar membrane microdomains isolated from *Arabidopsis* suspension-cultured cells: Local distribution of vacuolar membrane proteins. Plant Cell Physiol, 54 (10): 1571-1584. (査読あり)

井上亘、武蔵孝雄、假谷登、高瀬直寿、安藤元紀、吉村知里、洲崎敏伸 (2012) ハリタイヨウチュウを用いた水質連続監視装置の開発。用水と排水, 54(5): 327-332. (査読あり)

Hisayoshi Nozaki; Yi Yang; Shinichiro

Maruyama; Toshinobu Suzaki. (2011) "A Case Study for Effects of Operational Taxonomic Units from Intracellular Endoparasites and Ciliates on the Eukaryotic Phylogeny: Phylogenetic Position of the Haptophyta in Analyses of Multiple Slowly Evolving Genes". PLoS ONE, <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0050827> (査読あり)

Leila M. Blackman, Mikihiro Arikawa, Shuhei Yamada, Toshinobu Suzaki and Adrienne R. Hardham. (2011) Identification of a mastigoneme protein from *Phytophthora nicotianae*. Protist, 162: 100-114. (査読あり)

Shinichiro Maruyama, Toshinobu Suzaki, Andreas P. M. Weber, John M. Archibald, Hisayoshi Nozaki (2011)

Eukaryote-to-eukaryote gene transfer gives rise to genome mosaicism in euglenids. BMC Evol Biol. 2011, 11:105.

doi:10.1186/1471-2148-11-105 (査読あり)

Sugiura, M., Tanaka, Y., Suzaki, T. and Harumoto, T. (2012) Alternative gene expression in type I and type II cells may enable further nuclear changes during conjugation of *Blepharisma japonicum*. Protist, 163: 204-216.

10.1016/j.protis.2011.07.007 (査読あり) [IF1999=2.214],

Ohtsuka, S., Horiguchi, T., Hanamura, Y., Yamaguchi, A., Shimomura, M., Suzaki, T., Ishiguro, K., Hanaoka, H., Yamada, K. and Ohtani, S. (2011) Symbiosis of planktonic copepods and mysids with epibionts and parasites in the North Pacific: diversity and interactions. In: "New Frontiers in Crustacean Biology" (A. Asakura, ed., Brill, Leiden, The Netherlands), 1-14. (査読あり)

[学会発表](計15件)

Chihong Song, Hyunsuk Jung, Jaekyung Hyun and Suzaki, T. (2013) Improved preservation of organelles in *Paramecium bursaria* by freeze-substitution with glutaraldehyde and osmium tetroxide. Annual Meeting of the Korean Society of Microscopy, Yonsei Engineering Research Park, Yonsei University, Seoul, Korea, Jun 13-14, 2013.

Chihong Song, Sangmi Jun, Hyunsuk Jung, Jaekyung Hyun and Toshinobu Suzaki (2013) Changes in cell wall properties of symbiotic zoochlorella during symbiosis in *Paramecium bursaria*. 25th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (KSMCB2013), COEX, Gangnam, Seoul, Oct. 9-11, 2013.

Ohtsuka, S., Kanazawa, A., Ando, M. and Suzaki, T. (2012) The life cycle and

ultrastructure of the histophagous apistome ciliate *Vampyrophrya pelagica* on marine planktonic copepods. 2012 ASLO Aquatic Sciences Meeting, Lake Biwa, Shiga, Japan, 8-13 July, 2012.

Song, C. and Suzaki, T. (2012) Intracellular Symbiosis of *Chlorella* in *Paramecium bursaria* with Possible Involvement of Mitochondrial Dynamics. The Korean Association of Biological Sciences. Chungnam National University, Korea, 16-17 July, 2012.

Ohtsuka, S., Kanazawa, A., Ando, M. and Suzaki, T. (2011) The life cycle and ultrastructure of the histophagous apistome ciliate *Vampyrophrya pelagica* on marine planktonic copepods. 11th International Conference on Copepoda. Mérida, Mexico, 10-15 July, 2011.

Kanazawa, A., Suzaki, T., Ando, M. and Ohtsuka, S. (2011) Metamorphosis of the apistome ciliate *Vampyrophrya pelagica* with dynamic changes of cytoplasmic organelles during host infection. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Nagoya, Japan, 31 May-5 June, 2011.

Suzaki, T. and Song, C. (2011) Intracellular symbiosis of *Chlorella* in *Paramecium bursaria* with possible involvement of mitochondrial dynamics. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Nagoya, Japan, 31 May-5 June, 2011.

Hayakawa, M. M. and Suzaki, T. (2011) Comparison of morphology and surface characteristics of zoochlorella in various host organisms including protozoans and invertebrates. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Nagoya, Japan, 31 May-5 June, 2011.

Takeuchi, K., Suetomo, Y. and Suzaki, T. (2011) IP39, the integral membrane protein of euglenoid flagellates. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Nagoya, Japan, 31 May-5 June, 2011.

Yoshimi, H., Saito, A. and Suzaki, T. (2011) Isolation and characterization of mastigonemes and contractile cytoplasm from a gliding euglenoid flagellate *Peranema trichophorum*. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. Nagoya, Japan, 31 May-5 June, 2011.

Suzaki, T. (2011) Cell aggregation of the ciliate *Euplotes aediculatus* in a starved condition. 1st Asian Congress of Protistology. Jeju, Korea, 3-6 Oct., 2011.

Hayakawa, M. M. and Suzaki, T. (2011) The

ultrastructure and evolution of "symchlorosomes" created by the lateral transfer of zoochlorellae. 1st Asian Congress of Protistology. Jeju, Korea, 3-6 Oct., 2011.

Song, C. and Suzaki, T. (2011) Intracellular symbiosis of *Chlorella* in *Paramecium bursaria* with possible involvement of mitochondrial dynamics. 1st Asian Congress of Protistology. Jeju, Korea, 3-6 Oct., 2011.

Yoshimi, H., Saito, A. and Suzaki, T. (2011) Role of mastigonemes in gliding motility of the euglenoid flagellate *Peranema trichophorum*. 1st Asian Congress of Protistology. Jeju, Korea, 3-6 Oct., 2011.

Yoshimura, C., Ando, M. and Suzaki, T. (2011) Development of a bio-monitoring system with the heliozoon *Raphidiophrys contractilis* for detecting toxicants in aquatic environment. 1st Asian Congress of Protistology. Jeju, Korea, 3-6 Oct., 2011.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計1件)

名称：セシウム汚染土壌粒子を含む土壌または水系の処理方法  
発明者：洲崎敏伸・吉村知里  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特許願 2012-252102  
出願年月日：2012年11月16日  
国内外の別：国内

取得状況(計1件)

名称：水質検査装置および方法  
発明者：洲崎敏伸・吉村知里・大村現  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特許第 5017647 号  
取得年月日：2012年6月22日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

洲崎 敏伸 (SUZAKI, Toshinobu)  
神戸大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：00187692

### (2) 研究分担者

吉村 知里 (YOSHIMURA, Chisato)  
神戸大学・環境管理センター・助教  
研究者番号：60362761

安藤 元紀 (ANDO, Motonori)

岡山大学・大学院教育学研究科・教授  
研究者番号：20222789

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：