

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02261

研究課題名(和文) 海に漂うマイクロプラスチックの生体影響をムール貝のマルチオミクス解析で解明する

研究課題名(英文) Exploring the effects of microplastics drifting in the ocean on living organisms through multi-omics analyses of mussels

研究代表者

井上 広滋 (Inoue, Koji)

東京大学・大気海洋研究所・教授

研究者番号：60323630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロプラスチック(MP)による海洋汚染は世界的な問題となっているが、実際に生物に及ぼす影響は十分にはわかっていない。本研究では、沿岸生態系の優占種であるイガイ類に、MP粒子を実験的に取り込ませる実験系を確立し、まず体内残留時間が粒子サイズにより異なることを発見した。次に、モデルMP粒子および同粒子にPCBを吸着させたものに15日間ムラサキイガイを曝露し、外套膜、生殖腺、消化管についてトランスクリプトーム、メタボローム、心拍数解析を行った。トランスクリプトーム解析において、曝露により発現変動した遺伝子の多くが機能未知遺伝子であったことから、未知の生理反応が起こっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではMP汚染の影響を調べる実験系を、都市近郊に分布し、大量の浮遊粒子を濾過食によって取り込む性質がある一方、食用種でもあるムラサキイガイ(ムール貝)を用いて確立した。この成果を参考にした多くの論文が発表されており、世界のMP影響研究の進展に貢献できた。同種が粒子を取り込む動画も作成し、その発表論文も多くのアクセスを得ている。さらに、MPやPCB-MPに対する生理応答に多くの未知遺伝子が関与することがわかった。これらを正確に理解するには、貝類の遺伝子や代謝に関する情報を今後より充実させる必要がある。比較解析のために解読した近縁のミドリイガイのゲノム配列も世界中で利用されている。

研究成果の概要(英文)：Although marine pollution by microplastics (MPs) is of world-wide concern, its actual effects on marine organisms are not fully understood. In this study, we established an experimental system to make marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) ingest MPs, and found that retention time in the digestive tract is size-dependent. Subsequently, we conducted transcriptome, metabolome, and heart rate analyses on the mantle, digestive tracts, and gonads after exposure of the mussels to model MPs and those absorbed PCBs (PCB-MPs). The results suggested that exposure to MPs and PCB-MPs induce unknown physiological reactions as the many genes that responded to the exposure are unknown genes.

研究分野：分子海洋生物学

キーワード：ムラサキイガイ 海洋汚染 トランスクリプトーム メタボローム マイクロプラスチック イガイ類

1. 研究開始当初の背景

世界の海の沿岸には極めて多くの人口が分布し、その経済活動の結果として、様々な人為的有害物が環境に排出される。それら有害物は海に到達し、そこに棲む生物に取り込まれて様々な有害作用を与え、さらに食物連鎖を通じて上位捕食者に蓄積され、生態系全体に損害を与えるとともに、それら生物を摂食する人間社会にも損害を与える。そのような有害物として近年とくに問題視されているものに、マイクロプラスチックがある。マイクロプラスチックとは、一般に 5 mm 以下のプラスチック粒子を指す。マイクロプラスチックには、プラスチック廃棄物が碎けて微小な粒子となったものと、ヘルスケア製品の添加物などの用途で、小さい粒子として工業的に作られたものが存在する。これらのマイクロプラスチックは海を漂って海の生物に取り込まれ、有害な影響を与えていると考えられる。マイクロプラスチックの影響は、マイクロプラスチックそのものによる物理的影響に加え、有機汚染物質を吸着して生物に取り込まれる科学的影響も考える必要がある。しかし、一般的な化学物質による汚染に比べ、マイクロプラスチックの生物への影響についてはまだ知見が少なかった。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、マイクロプラスチックの海洋生物への生理的影響を解明することである。その一環として、沿岸生態系の主要メンバーであり、バイオマスが大きく、かつ濾過食者として水中の粒子を活発に取り込む性質があるイガイ類、とくに温帯・亜寒帯沿岸に優占するムラサキイガイ (*Mytilus galloprovincialis*) に注目した。ムラサキイガイは、ムール貝として世界中で広く食用に供される種でもある。はじめに、検出が容易な蛍光プラスチック粒子を用いて、実験的に取り込ませる実験系を確立した。次にプラスチック粒子を無処理のまま、あるいは代表的な有機汚染物質である PCB (ポリ塩化ビフェニル) を吸着させた後にそれぞれイガイ類に取り込ませ、その応答をトランスクリプトーム、メタボローム、および心拍数測定により解析した。両者を比較することで、物理的影響と化学的影響の違いが検出できることが期待される。あわせて、実験結果をより深く解釈できるように、イガイ類のゲノム情報についても整備を行った。その際には、比較解析が可能になるように、亜熱帯・熱帯沿岸域の優占種であるミドリイガイ (*Perna viridis*) を対象とした。

3. 研究の方法

ムラサキイガイへの曝露方法の検討

愛知県で養殖されたムラサキイガイを購入し、実験室内の水槽で人工海水に馴致させたものを実験に供した。200 mL ビーカーに 1 個体ずつ入れ、1 μm 、10 μm 、90 μm いずれかのサイズの蛍光ポリスチレン粒子を投与した。その後、各個体をそれぞれ 1.2 L ビーカーの壁面に固定し、直下に試験管を配置して、排出される糞を回収した。糞を界面活性剤処理した後に摩砕し、濾過後にビーズを蛍光顕微鏡で経時的にカウントするとともに、実験終了時に解剖を行い組織中のビーズを計測した。また、投与後の粒子吸収の様子をタイムラプス動画として記録した。

曝露実験

久ノ浜漁港 (福島県いわき市) で採集したムラサキイガイを、実験室内の水槽で人工海水に馴化させた後に実験に用いた。の結果から、大型の粒子ほど排出まで時間がかかることがわかったため、125 μm のポリエチレン粒子を無処理のまま (MP)、あるいは同粒子に環境中から抽出された PCB を吸収させたもの (PCB-MP) を用いて、3 日に 1 回の曝露実験を 5 回、計 15 日間の曝露実験を行った。粒子を投与しない対照区も設定した。PCB 吸着ビーズを投与した後、組織に移行した PCB の測定も行った。

トランスクリプトーム解析

の 3 試験区について、15 日間の粒子曝露後、外套膜、消化管、生殖腺から RNA を抽出し、Illumina Novaseq シーケンサーを用いて配列解読を行った。アダプターや低品質配列を除去した後に Trinity を用いてアセンブリし、参照配列を構築した。アセンブリの評価は BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) により実施した。次に、対照区に対して発現変動した遺伝子を抽出した。また、MP 曝露区と PCB-MP 曝露区で共通して変動した遺伝子や、3 つの組織間で共通して変動した遺伝子の抽出を行った。検出された遺伝子について既存のデータベースに対して相同性検索を行い、遺伝子の同定 (アノテーション) を試みた。

メタボローム解析

の 3 試験区の外套膜、生殖腺組織について 50% アセトニトリル抽出後、蒸発乾固し、限外濾過後、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置 (Agilent CE-TOFMS system) によるメタボローム解析を実施した。

心拍数や行動の解析

125 μm のポリエチレン粒子を投与し、赤外線光プレチスモグラフィー法 (Seo 他 2016; Biology Open 5, 1752-1757) を用いて心拍数変動の測定を試みた。

ゲノム解析

ミドリイガイを神奈川県藤沢市江の島において採集し、ゲノム DNA を抽出後、ライブラリーを作成し、Illumina HiSeq シーケンサーで解読を行った。Platanus (Kajitani 他 2014; Genome Research 24, 1384-1395) によりアセンブリを行った。遺伝子の予測は、RNA データの利用、ホモロジーによる予測、統計的予測を併用して行った。アセンブリおよび遺伝子予測の評価は BUSCO により実施した。

4. 研究成果

ムラサキイガイの曝露実験の予備実験

ムラサキイガイを 3 種の粒径のポリスチレンビーズに曝露したところ、いずれのサイズも活発に取り込むことがわかった。また、どのサイズにおいても、取り込んだ粒子の一部は偽糞として比較的短時間で排出されたが、それ以外の粒子の多くは口から摂食され、消化管を通過し、そのほとんどが糞中に排出された。取り込んだ粒子の 90% が排出されるまでの平均時間を比較すると、1 μm 粒子は約 12 時間であるのに対し 90 μm 粒子は約 85 時間となり、粒子が大きいほど平均残留時間が長い結果となった。しかし、より長期に観察を続けると、90 μm 粒子は 28 日後までに全て体外に排出されるのに対し、1 μm の粒子は、大部分が排出された後も少数は体内にとどまり、40 日後でも数粒が糞中から検出された。すなわち、サイズの小さい粒子は少数ではあるが組織中に何らかの形で長く残留することがわかった。

曝露実験

上記の結果を踏まえ、生体影響解析のための曝露条件を決定した。大きい粒子の大部分が 3 日後にはまだ体内にあることを考慮し、125 μm のポリエチレン粒子に対する曝露を 3 日間隔で 5 回行うことにした。これにより、15 日間以上、体内に粒子が留まっている状況を作った。生殖腺の分析により、PCB 吸着粒子 (PCB-MP) から生殖腺へと PCB が移行していることも確認できた。なお、今回実施した曝露条件では、MP および PCB-MP 何れに曝露した個体も、行動の異常や斃死は認められなかった。

トランスクリプトーム解析

15 日後に外套膜、消化管、生殖腺組織を採取し、トランスクリプトーム解析を行った。発現変動遺伝子数は、各組織 2 桁程度であったが、そのうち、アノテーションできたものは半数以下、つまり、発現変動した遺伝子の多くが機能未知遺伝子であった。このことは、イガイ類あるいは貝類の遺伝子に関する情報の不足を意味しており、イガイ類の遺伝子に関する情報を今後より増やしていく必要がある。また、各組織において、MP 曝露区と PCB-MP 曝露区で共通で変動した遺伝子は限られていた。このことは、物理的影響と化学的影響は大きく異なることを示唆する。

メタボローム解析

の 3 試験区について、外套膜、生殖腺組織について CE-TOFMS によるメタボローム解析を実施した。変動する代謝物質は検出されたが、アノテーションされた発現変動遺伝子数が十分でないため、遺伝子発現変動との関係について現在継続解析中である。

心拍数や行動の解析

ムラサキイガイの殻上にセンサーを接着し、心拍の検出を試みたところ、心拍が検出可能であることがわかった。125 μm のポリエチレン粒子を投与し、心拍数変動の測定を行った。得られた波形について、現在も継続解析中である。

ミドリイガイゲノム解析

BUSCO によるアセンブリの評価の結果、Metazoa ライブラリに対して約 97% の検出率であった。また、遺伝子アノテーションの結果は、99.4% となり、高精度の予測を行うことができた。得られた結果は、最近発表されたムラサキイガイのゲノム情報 (Gerdol 他 2020; Genome Biology 21, 275) や、その他のイガイ類のゲノム情報 (Inoue 他 2021; Fisheries Science 87, 761-771 参照) と比較解析することで、今後イガイ類の遺伝子応答を考察するための有力な手掛かりとなることが期待される。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Azusa Kinjo, Kaoruko Mizukawa, Hideshige Takada, Koji Inoue	4. 巻 149
2. 論文標題 Size-dependent elimination of ingested microplastics in the Mediterranean mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Marine Pollution Bulletin	6. 最初と最後の頁 110512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.marpolbul.2019.110512	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 Inoue Koji, Yoshioka Yuki, Tanaka Hiroyuki, Kinjo Azusa, Sassa Mieko, Ueda Ikuo, Shinzato Chuya, Toyoda Atsushi, Itoh Takehiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Genomics and transcriptomics of the green mussel explain the durability of its byssus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84948-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Koji, Onitsuka Yuri, Koito Tomoko	4. 巻 87
2. 論文標題 Mussel biology: from the byssus to ecology and physiology, including microplastic ingestion and deep-sea adaptations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 761 ~ 771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-021-01550-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上広滋・善岡祐輝・田中裕之・金城梓・佐々三依子・植田育男・新里宙也・豊田敦・伊藤武彦
2. 発表標題 ミドリイガイ全ゲノム配列の解明と足系関連遺伝子の探索
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小島 茂明 (Kojima Shigeaki) (20242175)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授 (12601)	
研究分担者	水川 薫子 (Mizukawa Kaoruko) (50636868)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教 (12605)	
研究分担者	新里 宙也 (Shinzato Chuya) (70524726)	東京大学・大気海洋研究所・准教授 (12601)	

	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
研究協力者	金城 梓 (Azusa Kinjo)	東京大学・大気海洋研究所・特任研究員 (12601)	
研究協力者	瀬尾 絵理子 (Seo Eriko)	東京大学・大気海洋研究所・特任研究員 (12601)	
研究協力者	佐々 三依子 (Sassa Mieko)	東京大学・大気海洋研究所・特任研究員 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	鬼束 由梨 (Onitsuka Yuri)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・大学院学生 (12601)	
研究協力者	高木 俊幸 (Takagi Toshiyuki)	東京大学・大気海洋研究所・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関