

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712017

研究課題名(和文) 海産生物の種横断的な有害物質耐性・分解機構 - 汚染底質中の生物群に環境修復術を学ぶ

研究課題名(英文) Damage tolerance and decomposition mechanism of marine organisms across species - Learning environmental remediation for organisms in contaminated sediment

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) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の実施により、汚染耐性生物が、有機汚濁に対して耐性があるだけでは無く、有害化学物質に対しても高い耐性・分解能を有することが明らかとなった。また、その分解機構には、薬物代謝酵素の関与が示唆された。実環境中の汚染底質を用いた浄化試験においては、生物種および組み合わせの違いにより浄化能が異なることが明らかとなった。よって、環境浄化を効率よく実施するためには、その環境の汚染実態に合わせた生物種を用い、単一の生物種では無く、複数の汚染耐性生物の組み合わせにより、実施することが重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：By conducting this research, it became clear that contamination-resistant organisms are not only resistant to organic pollution, but also have high resistance and resolution against harmful chemical substances. It was suggested that drug metabolizing enzymes are involved in their degradation mechanism. In a purification test using contaminated sediments in the natural environment, it became clear that the purification ability varies depending on the species and combination. Therefore, in order to carry out environmental remediation efficiently, it is important to use not only a single biological species adapted to the actual pollution situation of the environment, but a combination of pollution-resistant organisms.

研究分野：環境毒性学

キーワード：汚染耐性生物 バイオレメディエーション ヒメナイウンイトミミズ アベハゼ コノハエビ 多環芳
香族炭化水素 有害化学物質 環境修復技術

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(図1)。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「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。



図1. 沿岸地域の環境汚染

○これまでの底質環境修復の問題点：

大規模な底質浄化技術の実例としては、「浚渫」や「覆砂」などの物理的処理が挙げられるが、コストパフォーマンスや生態系への影響等が問題視されている。こうした背景の下、生物の分解能力を利用したバイオレメディエーション技術が注目されている(Perelo, 2010)。しかしながら、過去の研究で対象とされてきたバイオレメディエーションの担い手は、培養可能な「微生物（細菌等）」が主体であり、環境中での持続的な有効性を実証するには到っていないのが現状である。

○本研究の着想に到った経緯：

これまで我々の研究グループでは、バイオレメディエーション技術の担い手として汚染に対して耐性を持つ環形動物に注目し、その有用性および底質浄化の作用機作に関する研究を行ってきた(Ito et al., 2011)。その結果、環形動物は生息域に適應した酵素活性および種間で異なる汚染耐性を保持し、汚染に対して高い耐性を有する種は汚染底質に含まれる有害化学物質を分解する能力を併せ持つことを立証してきた。汚染底質には、環形動物以外にも甲殻類および魚類などの生息が確認されている。しかし、いずれも生息種の範囲は限定的である。【具体的には、甲

殻類：コノハエビ、および魚類：アベハゼが汚濁指標種として知られている。汚濁指標種とは、その生物を確認するだけで、その環境は汚染されていると判断が下される生物指標種。】このことから、これらの汚染耐性生物種には種横断的な特殊機能が備わっている可能性が強く示唆される。汚染底質に対して耐性を有する生物はその環境に適應した代謝機構を保持していると考えられ、その代謝能は、永続的かつ環境に負荷をかけない環境修復技術に応用できるものと期待される。

2. 研究の目的

沿岸域は本来、種々の海産生物の稚仔を育む場（ゆりかご）として、海洋生態学的にきわめて重要な役割を担う。しかしながら近年、有害化学物質による局所的な底質汚染が深刻な問題となっており、早急な環境修復技術の構築が求められている。これまでに我々の研究グループでは、汚染底質に生息するヒメナイワナイトミミズが極めて高い有害化学物質分解能を有することを発見し、他の汚染耐性生物にも同様の機能が備わっている可能性を指摘するに到った。本研究では、複数の汚染耐性生物の有害化学物質分解能を検討するとともに、種横断的な分解機構についてトランスクリプトーム解析等を用いて精査をすることで、汚染耐性生物から、底質浄化のノウハウを学び、汚染耐性生物の底質浄化能を最大限活用した革新的な環境修復技術の構築を目指すことを目的とした。底質に蓄積された有害化学物質の削減を図ることを目的とした当研究課題は、水産物の安心・安全性確保および沿岸域の生態系保全のためにも非常に重要である。

3. 研究の方法

汚染耐性生物の種横断的な有害化学物質耐性・分解機構を解明するため、以下の項目に取り組む。

(1) 汚染耐性生物の有害化学物質耐性・分解能の検討

「試験対象種」

・環形動物 ヒメナイワナイトミミズ *Thalassodrilides cf. briani* (図2a)：小型の貧毛類で、長期飼育が可能な種であり、先の実験結果から非常に高い1-ニトロナフタレン分解能を有していることが明らかとなっている。実環境中の汚染底質に対して、汚濁指標種であるイトゴカイよりも高い耐性を示す。

・甲殻類 コノハエビ *Nebalia bipes* (図2b)：汚濁指標種であり、水質や水温の変化に大きな抵抗力を示す。汚染域において高いバイオマスを占める。

・魚類 アベハゼ *Mugilogobius abei* (図2c)：汚濁指標種であり、他の魚類が生息できないような環境でも生息が可能であり、アンモニアを尿素に変える能力を持つことから、汚染に抵抗があると考えられている。

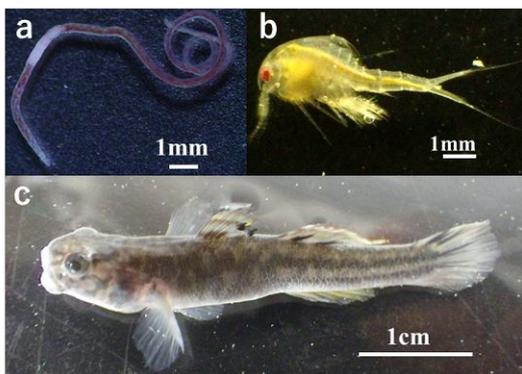


図2. 試験対象種 a: 海産貧毛類ヒメナイワ
ンイトミミズ *Thalassodrilides cf. briani*, b: 甲
殻類 コノハエビ *Nebalia bipes*, c: 魚類 ア
ベハゼ *Mugilobius abei*

「被験物質」

・多環芳香族炭化水素類(PAHs): 代表的な環境汚染物質の一つで、石油類に含まれ、発癌性、変異原性および催奇形性が報告されている。大阪湾の一部の底質からは、アメリカ合衆国環境保護庁が定める基準(50%の生物に悪影響を与える濃度)を遥かに超える濃度で検出される。

・トリブチルスズ(TBT): 主に船底防汚剤として使用されてきたが、海産生物に及ぼす毒性の強さから使用が規制された物質。しかしながら、未だに沿岸域の一部の底質から高濃度で検出され、問題となっている。

汚染耐性生物を用いた有害化学物質耐性・分解試験

上記試験生物を用いて PAHs の一つフェナントレン(Phe)に対する急性毒性値を求め、既存の報告と比較して汚染耐性生物の有害化学物質に対する耐性能を検討した。分解能については、試験開始前の被験物質濃度および、試験後の試験水および生体中の被験物質濃度を測定し、汚染耐性生物の有害化学物質分解能を検討した。

(2) 汚染耐性生物の種横断的な有害化学物質耐性・分解機構の解明

最も分解が促進された有害化学物質である Phe を曝露した汚染耐性生物から、遺伝子を抽出し、有害化学物質耐性・分解に関わる因子を網羅的に解析した。具体的には、魚類アベハゼに Phe を曝露し、曝露した個体および、曝露していない個体の肝臓から遺伝子をそれぞれ抽出し、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) で解析を行った。各サンプルとも1.1億Readsを解析し、遺伝子ごとの発現量を算出し、検体間比較を行い、Phe曝露により発現量が増加する遺伝子を網羅的に明らかにした。遺伝子解析については、ヒメナイワニイトミミズにおいて有害化学物質分解への関与の可能性が検出された薬物代謝酵素第一相系を重点的に解析を進めた。

(3) 実環境中汚染底質浄化試験

実環境での底質浄化手法の確立に向け、PAHs等に高濃度で汚染された実環境中汚染底質を用い、汚染耐性生物による底質浄化試験を行った。汚染底質は、広島県廿日市市にて、異なる3地点から採取し、最もPAHs濃度の高い底質を用いた。汚染耐性生物には、貧毛類ヒメナイワニイトミミズ、甲殻類コノハエビ、魚類アベハゼおよび、汚染底質中に多数の生息を観察した多毛類コケゴカイを新たに加えた。試験開始および試験終了後に汚染底質から有害化学物質を抽出した。また、当初の計画に加え、複数種の汚染耐性生物の複合的な浄化能力についても検討すると共に、次世代シーケンサーを用いた微生物菌叢解析も加えて実施した。

4. 研究成果

(1) 汚染耐性生物の有害化学物質耐性・分解能の検討

多環芳香族炭化水素類 (PAHs)

汚染耐性生物が有害化学物質耐性・削減能を有しているのかを代表的な環境汚染物質の一つであるPAHsを被験物質として実験を実施した。汚染耐性生物(環形動物ヒメナイワニイトミミズ、甲殻類コノハエビ、魚類アベハゼ)を沿岸域にて採取し、PAHsの一つであるフェナントレン(Phe)に対する急性毒性試験を実施した。設定濃度の値から96時間半数致死濃度は、それぞれ2,380 μ g/L、800 μ g/Lおよび3,080 μ g/Lであった。これらの値を既存の同一生物群、環形動物 *Nereis arenaceodentata* 51 μ g/L、甲殻類オオミジンコ *Daphnia magna* 100 μ g/L、魚類シーブスヘッドミノ *Cyprinodon variegatus* 478 μ g/L と比較した結果、汚染耐性生物は約8倍から50倍Pheに対する感受性が低いことが明らかとなった(図3)。また、Phe削減能を検討した結果、ヒメナイワニイトミミズ、コノハエビ、アベハゼは24時間で試験水中のPhe濃度を、生物を入れていない試験区と比較して、それぞれ20%、4%、3%に削減した。以上の結果から、汚染耐性生物は高い有害化学物質耐性・削減能を有していることが明らかとなった。

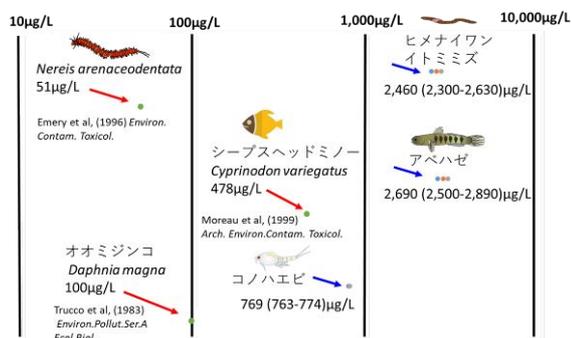


図3. フェナントレンに対する急性毒性試験結果(96時間半数致死濃度)の生物群ごとの比較

→ : 既存の毒性試験結果
→ : 本課題での結果

トリブチルスズ(TBT)

TBTに対する汚染耐性生物の有する分解能を、試験開始前の被験物質濃度および、試験後の被験物質濃度を測定し、検討した。その結果、Pheの分解能はコノハエビ > アベハゼ > ヒメナイワナイトミミズの順で高かったが、TBTはヒメナイワナイトミミズ > コノハエビ > アベハゼの順で分解能が高く、化学物資の種類の違いにより、生物の有する分解能が異なることが明らかとなった。

(2) 汚染耐性生物の種横断的な有害化学物質耐性・分解機構の解明

アベハゼ肝臓に発現している17万種類の遺伝子断片を用いたトランスクリプトーム解析の結果、Phe曝露により約7万の遺伝子の発現量が上昇した。発現量が顕著に増加した遺伝子には、薬物代謝に重要な第一相薬物代謝酵素であるチトクロムP450、硫酸転移酵素、およびセリンαピルビン酸転移酵素等が含まれていた。以上の結果から、アベハゼは、チトクロムP450等の代謝酵素系を活性化し、体内に取り込んだPheを代謝し、体外に排出していることが示唆された。この結果は、ヒメナイワナイトミミズを汚染底質に曝露した際に得られた、これまでの結果と同様であった。

(3) 実環境中汚染底質浄化試験

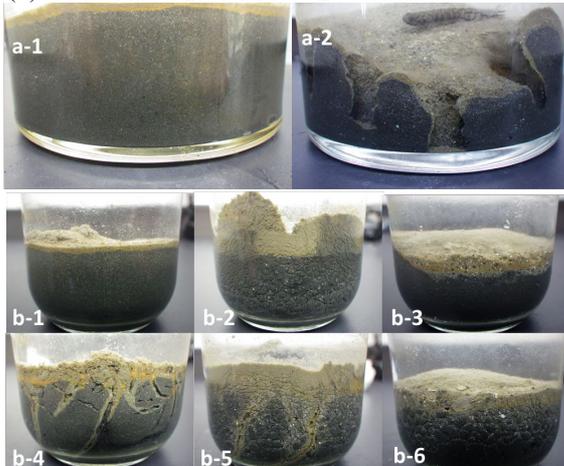


図4 底質浄化試験終了時の各試験区の写真
a-1: 生物非投与区 a-2: アベハゼ区
b-1: 生物非投与区 b-2: ヒメナイワナイトミミズ区 b-3: コノハエビ区 b-4: コケゴカイ区 b-5: ヒメナイワナイトミミズ+コケゴカイ混合区 b-6: ヒメナイワナイトミミズ+コノハエビ混合区

図4に実環境中汚染底質を用いた底質浄化試験終了時(50日後)の各試験区の写真を示した。なお、アベハゼは、他の汚染耐性生物に比べ、サイズが大きいいため、異なる大きさのガラス容器を用いた。試験終了時の各試験区の観察から、生物の違いにより底質の攪拌作用が異なることが明らかとなった。アベハゼは、底質に巣穴を構築する様子が観察され、底質の構造を最も変化させた(図4 a-2)。底質中の有機物含量の指標である強熱減量を測定

した結果、アベハゼ区は生物非投与区に比べ低い値を示し、アベハゼの底質攪拌作用により、有機物の分解が促進したことを示唆する結果が得られた。ヒメナイワナイトミミズを投与した区は、細かな坑道が形成され、底質表面には、実験開始時よりも黒色の底質よりも灰色になった酸化層の形成が認められた(図4 b-2)。コノハエビは、表層のみの攪拌効果であり、底層にはほとんど影響を及ぼさないことが示唆された(図4 b-3)。コケゴカイは、ヒメナイワナイトミミズ(1mg程度)よりも20倍程度サイズが大きいため、ヒメナイワナイトミミズの形成する坑道よりも大きな坑道が観察された(図4 b-4)。底質中のPAHs濃度を分析し、生物非投与区と比べた結果、最もPAHs削減効果が高かったのは汚染耐性生物のヒメナイワナイトミミズであり次いで、コノハエビであった。コケゴカイおよびアベハゼについては今回の実験では、底質中のPAHs削減効果は、ほとんど認められなかった。一方、混合試験区においては、ヒメナイワナイトミミズ+コケゴカイ区が、ヒメナイワナイトミミズ+コノハエビ区に比べ優位にPAH削減効果が高く、また一部のPHAは、ヒメナイワナイトミミズおよびコケゴカイと混合することで、削減効果がより高くなった。底質中の16SrRNA遺伝子の次世代シーケンサー解析の結果、微生物群集は生物単一種よりも複数種を組み合わせることによって、独自の菌叢へとより変化していることが明らかとなった。

『まとめ』

本研究の実施により、汚染耐性生物が、有機汚濁に対して耐性があるだけでは無く、有害化学物質に対しても高い耐性・分解能を有することが明らかとなった。また、その分解機構には、薬物代謝酵素の関与が示唆された。実環境中の汚染底質を用いた浄化試験においては、生物種および組み合わせの違いにより浄化能が異なることが明らかとなった。よって、汚染耐性生物の浄化能を活用した浄化法として、海水中の有害化学物質の削減には、アベハゼおよびコノハエビを用い、底質浄化にはヒメナイワナイトミミズを用い、さらにその効果を高めるためには、大型のゴカイと混合することで削減効果が高められると考えられる。本研究結果を活用し、環境中の汚染耐性生物のバイオマスから、実環境中の底質中有害化学物質浄化期間の算定への利用が期待される。今後は、他の汚染耐性生物に関して、浄化試験を実施すると共に、浄化機構についてより詳細に検討し、生物を利用した環境浄化法の効率化に取り組む予定である。

得られた成果は、第45回UJNR水産増養殖専門部会シンポジウムにて発表を行い、アメリカ国立海洋気象局(NOAA)らの研究者と広く情報交換を行うと共に、FMラジオ等で研究を紹介するなど、市民の方々に向けて広く情報を配信した。

<引用文献>

Eggleton J, Thomas KV、 A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events、 Environment International、 30、 2004、 973-980

Perelo LW、 Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments、 Journal of Hazardous Materials、 177、 2010、 81-89

Ito K. Nozaki M. Ohta T. Miura C. Tozawa Y. Miura T. Differences of two polychaete species reflected in enzyme activities、 Marine Biology、 158、 2011、 1211-1221

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

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、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ミズ Thalassodrilides cf. briani の季節変動および飼育条件に関する研究、ベントス学会誌、査読有、掲載決定、2018

Anna Z. Urbisz, Lukasz Chajec, Mana Ito, Katsutoshi Ito、 The ovary organization in the marine limnodriloidin Thalassodrilides cf. briani (Annelida: Clitellata: Naididae) resembles the ovary of freshwater tubificins、 Zoology、 査読有、 in press、 2018

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.05.004>

Mana Ito、Katsutoshi Ito、Kohei Ohta、Takeshi Hano、Toshimitsu Onduka、Kazuhiko Mochida、 Kazunori Fujii、 Evaluation of bioremediation potential of three benthic annelids in organically、 polluted marine sediment、 Chemosphere、 査読有、 163、 2016、 392-399

DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.046

Mana Ito、Katsutoshi Ito、Kohei Ohta、Takeshi Hano、Toshimitsu Onduka、Kazuhiko Mochida、 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、 査読有、 109、 2016、 344-349

DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.05.055

Takaaki Torii, Christer Erseus, Svante Martinsson, Mana Ito、 Morphological and

Genetic Characterization of the First Species of Thalassodrilides (Annelida: Clitellata: Naididae: Limnodriloidinae) from Japan、 Species Diversity、 査読有、 163、 2016、 392-399
DOI: 10.12782/sd.21.2.117

Shinri Tomioka , Tomohiko Kondoh , Waka Sato-Okoshi, Katsutoshi Ito、 Keiichi Kakui、 Hiroshi Kajihara、 Cosmopolitan or Cryptic Species? A Case Study of Capitella teleta (Annelida: Capitellidae)、 Zoological Science、 査読有、 33、 2016、 545-554

DOI: 10.2108/zs160059

Katsutoshi Ito、Mana Ito、Toshimitsu Onduka、Kohei Ohta、Takaaki Torii、Takeshi Hano、Kazuhiko Mochida、Nobuyuki Ohkubo、 Takeshi Miura、 Kazunori Fujii、 Differences in the ability of two marine annelid species, Thalassodrilides sp. and Perinereis nuntia, to detoxify 1-nitronaphthalene、 Chemosphere、 査読有、 151、 2016、 339-344

DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.026

[学会発表](計 11件)

伊藤 克敏、伊藤 真奈、持田 和彦、庄野 暢晃、中村 龍平、環境電位を指標にした底質浄化に関する研究、平成 30 年度日本水産学会春季大会、2018

Katsutoshi Ito、Mana Ito、Takeshi Hano、Toshimitsu Onduka、Kazuhiko Mochida、 Ryuhei Nakamura、 Nobuaki Shono、 Marine sediment conservation using benthic organisms、 45th Scientific Symposium of the UJNR Aquaculture Panel、 2017

伊藤 真奈、梅澤 明夫、川市 智史、庄野 暢晃、中村 龍平、伊藤 克敏、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、環境微生物学会合同大会 2017、2017

伊藤 克敏、羽野 健志、伊藤 真奈、隠塚 俊満、大久保 信幸、河野 久美子、持田 和彦、汚染耐性魚アベハゼ Mugilogobius abei の PAH 分解能に関する研究、第 22 回 日本環境毒性学会、2016

Mana Ito、Katsutoshi Ito、Takeshi Hano、 Motoharu Uchida、 Kazuhiko Mochida、 Cooperation of oligochaete, Thalassodrilides cf. briani with indigenous microorganisms in an essential factor for degradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediment、 XVII ICSZ- International Colloquium on Soil Zoology、 2016

Katsutoshi Ito、Mana Ito、Kohei Ohta、Toshimitsu Onduka、Takeshi Hano、Nobuyuki

Ohkubo, Kazuhiko Mochida, Research on the seasonal variation of biomass of marine oligochaeta *Thalassodrilides* sp. with high pollution tolerance in Fukuura Bay, Japan and its efficient culture condition、13th International Symposium on Aquatic Oligochaeta、2015

Mana Ito, Katsutoshi Ito, Kazuki Ito, Kohei Ohta, Toshimitsu Onduka, Takeshi Hano, Nobuyuki Ohkubo, Kazuhiko Mochida、Marine oligochaete, *Thalassodrilides* sp.; a potential candidate for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated sediment、13th International Symposium on Aquatic Oligochaeta、2015

伊藤 克敏, 羽野 健志, 伊藤 真奈, 太田 耕平, 河野 久美子, 大久保 信幸, 持田 和彦、汚染耐性生物を用いた底質浄化に関する研究 -有機汚濁耐性生物は化学物質に耐性を持つのか? -、平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016

伊藤 真奈, 伊藤 一輝, 伊藤 克敏, 太田 耕平, 隠塚 俊満, 羽野 健志, 大久保 信幸, 持田 和彦、海産ミミズ添加による汚染底質中の多環芳香族炭化水素類の減衰と微生物群集の変化、平成 27 年度日本水産学会春季大会、2015

伊藤 真奈, 伊藤 克敏, 太田 耕平, 隠塚 俊満, 羽野 健志, 大久保 信幸, 伊藤 一輝, 持田 和彦、海産ミミズの汚染物質分解に関わる 酵素遺伝子の発現量解析、平成 27 年度 日本水産学会春季大会、2015

伊藤 克敏, 太田 耕平, 大久保 信幸, 羽野 健志, 伊藤 真奈, 隠塚 俊満, 三浦 猛, 持田 和彦、健全底質の移設による底質浄化法の現場適応に向けた検討、平成 26 年度 日本水産学会秋季大会、2014

〔その他〕

伊藤 克敏, 羽野 健志、海産ミミズを用いた環境浄化に向けた取り組み、FM ラジオ ECO しま専科、2014

6. 研究組織

(1) 研究代表

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

(2) 連携研究者

伊藤 真奈 (ITO Mana)
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、任期付研究員
研究者番号：60735900

太田 耕平 (OHTA Kohei)
九州大学、農学研究院、准教授
研究者番号：10585764

羽野 健志 (HANO Takeshi)
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：30621057

隠塚 俊満 (Onduka Toshimitsu)
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：00371972

大久保 信幸 (OHKUBO Nobuyuki)
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：50371787

持田 和彦 (MOCHIDA Kazuhiko)
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、グループ長
研究者番号：00371964

河野 久美子 (KONO Kumiko)
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：10371973

桑原 隆治 (KUWAHARA Ryuji)
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、環境保全研究センター長
研究者番号：10416026