

ヤマトヒメミミズ再生・生殖幹細胞系を活用した環境バイオセンサー開発

日大生産工(院)

○伊藤 孝

日大生産工

野呂 知加子

1 研究の背景と目的

昨今、地球温暖化および世界的な人口増加による環境悪化、および食料危機が懸念されている。農業や工業廃水等による土壤汚染、地温の上昇およびpHの変化による土壤の環境変化は、安全で安定した食糧生産の障害となる。また、土壤環境は地下水の水質に直結し、農産物への蓄積等も問題となる。土壤環境の悪化は、食糧だけでなく炭酸ガスを吸収する植物全体の成育にも影響し、さらに温室効果が進み温暖化の原因となる。土壤環境と土壤生態系を保全し、生物多様性を保つことは、地球環境全体にとって大きな課題である。こうした課題に立ち向かうためには、生物個体をモニターとした詳細かつ精密な環境観測が必要である。

環境要因の生物影響については、様々なバイオモニタリング試験が行われている。例えば経済協力開発機構 OECD の定める生物毒性試験では、様々な生物について増殖や繁殖試験を行うようになっている。その一つとしてミミズ（大型のフトミミズやツリミミズ）を用いて土壤中の成長や繁殖などを調べる例があるが、マクロレベルの判定法が多く、詳細で高感度の方法が必要とされている。一方、いわゆるバイオセンサーとは、酵素反応などの生化学反応を電気的信号に変換し、対象となる物質を高感度で測定・検出するシステムであり、米国初め世界中での企業で、医療・食品・製薬・環境等に商用化されている。2007

年には世界規模で売り上げが108億ドルに達すると言われた。環境関連では微生物呼吸センサーなどが知られているが、多細胞動物の個体全体としての生体反応を検知し、詳細な分子解析をする様な例は見当たらない。従って、この両者の長所を併せ持つ、個体を指標とした分子レベルの環境バイオセンサーシステム開発が望まれる。

本研究で用いるヤマトヒメミミズ (*Enchytraeus Japonensis*) は、東北農業試験場で見つかった、碎片分離と再生による無性生殖を行うユニークな環形動物である。体長は1cmほどで透明な体と体節構造をもつ。実験室のシャーレ中の寒天上で、通常は18-25°Cで、オートミールを餌として飼育する。体節内の特定の位置が収縮して体が引きちぎられて数片の断片となり（碎片分離）、3日ほどで頭（脳）と肛門が前後に再生し、2週間で元の大きさまで成長して数倍の個体数に増殖することを繰り返す。このミミズの無性生殖子孫は皆同じゲノムを持ったクローンである。無性生殖は人為的に電気刺激により同調的に開始することができる。一方、個体密度のコントロールにより有性生殖も誘導できる（成熟から産卵・発生まで16日程度）ので、遺伝子改変体作製などの発生工学的手法も適用可能である。

本研究は、ヤマトヒメミミズの再生・生殖系を活用して、多細胞動物個体全体の分子反応を指標とした環境バイオセンサーシステムを

Development of the BioSensor for Environment by using *Enchytraeus Japonensis*

Takashi ITO and Chikako YOSHIDA-NORO

開発することを目的とする。従来のマクロレベルのバイオモニタリングと、個々の分子レベル反応を検出するバイオセンサーの両者の利点を併せ持った、全く新しい分子レベルの環境バイオセンサーシステム開発をめざす。

2 材料と方法

本研究では、環境反応を可視化するために、オワンクラゲ由来の GFP (Green Fluorescent Protein ; 緑色蛍光タンパク質) 遺伝子に化学物質反応性プロモーターを連結させたプラスミドを、ヤマトヒメミミズの卵や幹細胞に導入し、化学物質があると光るトランスジェニックミミズを開発する。

その前段階の実験として、通常の GFP 強制発現プラスミドの他、核移行シグナル、ミトコンドリア移行シグナルをもつ GFP プラスミドをヤマトヒメミミズに導入し、導入効率等の検討を行うこととした。そのさらに予備実験として、GFP プラスミドを培養細胞である HepG2 (ヒト肝癌由来細胞株) 細胞に導入することにより、発現の確認を行った。

まず、大腸菌に GFP プラスミドを導入し、増幅を行った。HepG2 へのプラスミド導入は、脂質親和性試薬である Lipofectamine2000 を用いて行った。HepG2 で GFP 発現が確認できた後、微細ガラス針を用いてヤマトヒメミミズにプラスミドを注入した。

また、生きたままの細胞を染色できる CellTracker™色素を用いて HepG2 およびヤマトヒメミミズを染色し、GFP との比較・検討を行った。

3 結果と考察

GFP プラスミドの増幅については、制限酵素(PvuII)により切断し、電気泳動を行ったところ3つのバンドが確認できたことから、GFP プラスミドが増幅できたことが確認できた(Fig1)。HepG2 に導入した GFP 遺伝子

の発現は、蛍光顕微鏡により確認できた。核移行シグナルおよびミトコンドリア移行シグナルをもつ GFP については、その局在が確認できた。ヤマトヒメミミズ個体の背側上部にある体腔に微細ガラス針を用いて GFP 遺伝子を注入し、幹細胞への導入を検討した。

今後の展開としては、強制発現プロモーターを化学物質反応プロモーターに組換え、ヤマトヒメミミズに導入し、重金属や環境ホルモンなどの化学物質を与えて、GFP の発現を誘導する。

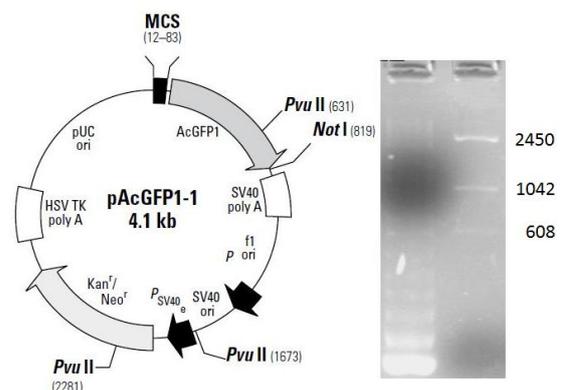


Fig1 GFP プラスミドベクター

「参考文献」

- 1) Chikako Yoshida-Noro, Shin Tochinai, “Stem cell system in asexual and sexual reproduction of *Enchytraeus Japonensis* (Oligochaete, Annelida)” , *Development, Growth&Differentiation*, **52**, 43-55(2010)
- 2) Makoto Takeo, Chikako Yoshida-Noro and Shin Tochinai, “Function analysis of grimp, a novel gene required for mesodermal cell proliferation at an initial stage of regeneration in *Enchytraeus Japonensis* (Enchytraeidae, Oligochaete)” , *THE INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, **54**, 151-160(2010)