

土壌重金属環境をモニターする環境バイオセンサー・ヤマトヒメミミズの開発

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

最近日本では、東日本大震災後の津波による重金属汚染や福島原発事故による放射性セシウム土壌汚染が問題となっている。東北地方には、明治から昭和にかけて様々な鉱山が集中していた。鉱山から流れ出した重金属類などの有害物質が海に流れ出し、海底に堆積していたと考えられる。それらが津波により陸地に上がった事で、土壌環境の汚染が問題視されている。土壌環境は地下水の水質に直結し、重金属を含んだ地下水を農作物に利用することで人体への影響が懸念されている。

土壌環境の保全と整備には、土壌生物個体をモニターとした環境観測が必要である。ミミズは土壌の番人と言われ、経済協力開発機構 OECD などの環境バイオモニタリングにおいて、土壌環境の指標バイオマーカーとして利用されている。一方、ミミズは重金属を食べると言われ、重金属結合タンパク質メタロチオネイン(MT)などにより、土壌中の重金属を補足する仕組みが発達している。

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)を用いて土壌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、対象となる物質を感度高く測定・検出するシステムである。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 1 cm 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℃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、ヤマトヒメミミズを用い、メタ

Development of the Eco-Bio Sensor *Enchytraeus Japonensis* : Monitoring
of Heavy Metal in the Soil.

Takashi ITO and Chikako YOSHIDA-NORO

ロチオネイン遺伝子プロモーターとクラゲ蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein : 緑色蛍光タンパク質) を利用して、環境反応をイメージング検出できる遺伝子個体、すなわち光る重金属センサーミミズを開発することを目指している。

2 実験方法

メタロチオネイン(MT)は、ミミズを含む多様な生物に存在する、金属結合や酸化ストレス応答に関連するタンパク質である。その発現は、転写レベルで制御されており、MREと呼ばれる配列が、すべてのMTプロモーターに存在し、ここに金属と結合したMTF-1などの転写因子が結合して、転写を活性化する。これまでにミミズのMTについて、いくつかの分子生物的研究が行われ、重金属による発現の仕組みとゲノム上の制御配列、カドミウムと親和性の高いサブタイプ(CRP)の存在などが明らかになっている。

本研究では、同じヒメミミズ属の遺伝子配列情報をもとに、ヤマトヒメミミズのMTプロモーターを特定し、これとクラゲ蛍光タンパク質 GFP を繋いだベクターを設計した。このプラスミドをヤマトヒメミミズの卵や幹細胞に導入し、重金属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の卵にプラスミドを注入した。

3 結果および考察

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(Fig.1A)。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(Fig.1B、C)。また、サンゴ由来の赤色蛍光タンパク質の遺伝子発現も確認できた(Fig.1D)。ヤマトヒメミミズの卵に微細ガラス針を用いて GFP 遺伝子を注入し、導入を検討した。

今後の展開としては、メタロチオネイン遺伝子プロモーターと GFP 遺伝子を繋ぎ、ヤマトヒメミミズに導入し、重金属を与えて、GFP の発現を誘導する。

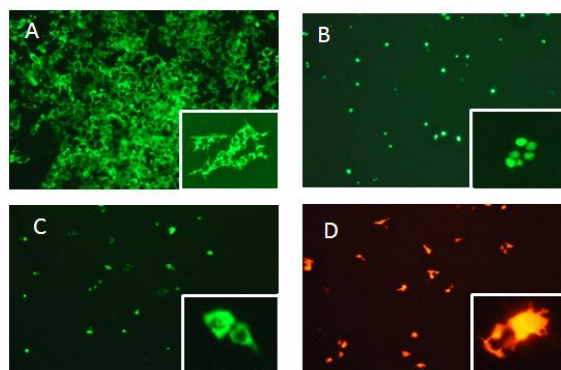


Fig.1 HepG2 での GFP 発現

「参考文献」

- 1) Chikako Yoshida-Noro, Shin Tochinali, *Development, Growth & Differentiation*, **52**, 43-55(2010)
- 2) Hans-Peter Schmitt-Wrede, Heike Koewius, Steffen Tschuschke, Hartmut Greven, Frank Wunderlich, *Biochimica et Biophysica*, **1680**, 24-33(2004)