

課題名	RF-0908 南西諸島のマングースの水銀濃縮解明に関する研究
課題代表者名	渡邊 泉（東京農工大学 大学院農学研究院 環境毒性学研究室）
研究実施期間	平成21～22年度
累計予算額	22,230千円（うち22年度 10,530千円） 予算額は、間接経費を含む。
研究体制	<p>(1) 水銀濃縮機序解析ツールとして不可欠なマングース由来細胞の安定供給をめざす戦略 （琉球大学）</p> <p>(2) 水銀濃縮機構の解析と重金属解毒系遺伝子の発現評価系の作製と個体での発現評価 （鹿児島大学）</p> <p>(3) 食物網を通じた水銀取込み・排泄に関する研究 （東京農工大学）</p>
研究概要	<p>1. はじめに</p> <p>水銀は世界的にも地球環境汚染物質と位置付けられているが、現在も各種素材に使用されている。また化石燃料の燃焼などに伴って排出され、活発な産業地域からの越境汚染も無視できないレベルである。高い生物濃縮性と毒性から、生態系のダメージに関する周到なモニタリングと対策が不可欠である。野生動物の中には水銀を濃縮する種が存在するが、そのメカニズムは未解明な部分が多い。食料となる生物を含めた自然界での水銀濃縮が問題となっている近年では、水銀の生体内代謝機序（分解・蓄積・排泄・耐性など）を解明することは重要な課題のひとつである。問題解決へのアプローチとして、これまでに生態系を含む環境中の水銀分布解析が精力的に行われた。しかしながら、個体内での蓄積・排泄メカニズムは依然不明な点が多く、現実的な解決法に繋げるためには<i>in vivo</i>あるいは細胞を使った<i>in vitro</i>での解析など革新的な視点からの研究は欠かせない。</p> <p>我が国において貴重な固有種を有する南西諸島の生態系は二つの脅威にさらされている。一つは有害物質の越境汚染の可能性であり、もう一つは移入種による攪乱である。後者の代表種マングースは水銀を海生動物レベルに濃縮する唯一の陸上哺乳類である。その水銀濃縮メカニズムの解明は以下の点で極めて緊急性が高いテーマといえる。つまり、濃縮現象には蓄積メカニズムと解毒メカニズムという2つの機序が働いていると考えられ、野生動物の水銀蓄積を評価する際、その両方を正確に評価することで種に特異なリスクを明らかにできると考えられる。さらに、どのようにして水銀が濃縮されるか、環境・生態系全体を通じたメカニズムを解明することで、水銀のソースにまでおよび包括的な生態系保全に寄与できる可能性がある。つまり、南西諸島の生態系における水銀の流れを明確にすることで、化学物質の影響を考慮した、新たな視点による保全対策が可能となる</p> <p>2. 研究目的</p> <p>南西諸島で分布拡大を続ける外来種マングースは、肝臓に水銀を高濃度で濃縮する陸上哺乳類である。本種の濃縮現象はこれまで海生の哺乳類や鳥類にみられていたが、詳細な実験の困難さから、メカニズムは明らかとなっていない。野生動物の水銀蓄積によるリスクの評価のためにも、メカニズムの解明が待たれる。本研究は、その解明を生化学的なアプローチとして「水銀濃縮機序解析ツールとして不可欠なマングース由来細胞の安定供給をめざす戦略」で、マングースの初代肝細胞の培養法確立と、不死化細胞の検討、つぎに「水銀濃縮機構の解析と重金属解毒系遺伝子の発現評価系の作製と個体での発現評価」で、肝臓での水銀の吸収・排泄、さらに発現する酵素などタンパク質の解析を目的とした。さらに、実際環境下における水銀の摂取に着目した生態学的アプローチとして「食物網を通じた水銀取込みに関する研究」で、異なる生態系から得られたマングースの、餌生物まで含めた解析を行うことも目的とした。メカニズム解明のためのツールとして、水銀だけでなく、水銀と関係して生物蓄積することが考えられる25種の微量元素分析も行い、蓄積植物を用いた水銀発生源・分布の解明も目的とした。</p>

3. 研究の方法

(1) 水銀濃縮機序解析ツールとして不可欠なマンガース由来細胞の安定供給をめざす戦略

1) 初代培養肝細胞

臓器は多様な細胞で構成されるため、初代培養細胞を扱う際には目的の細胞が回収されているかどうか、確認することが重要である。そこで、肝細胞に特徴的なPAS染色によるグリコーゲン顆粒（肝臓の実質細胞である証明となる）の存在に加え、電子顕微鏡による微形態観察を行う。また、回収した初代培養肝細胞が生物学的特性を保存したまま培養しうる期間について、継代、凍結保存による影響を観察し、細胞供与の可能性について考察する。

2) 初代培養線維芽細胞

マンガース線維芽細胞を他機関へ供与することを目的として、線維芽細胞の継代や凍結による影響を細胞形態、細胞増殖能をもとに検討する。継代は通法に従い、対数増殖期の細胞について顕微鏡下での形態観察、CellTiter 96 AQ Non-Radioactive Cell Proliferation assay (Promega #G3581)を用いた細胞増殖能解析を行う。

3) 不死化細胞作製

我々が遺伝子配列を決定し、クローニングした2種類のマンガース *Tert* 遺伝子断片を哺乳類細胞内で発現可能な pEF/GW-51/lacZ ベクターに組換え、マンガース不死化関連遺伝子 (*Tert*) 発現ベクターを構築する。pEF/GW-51/lacZ ベクターは Human elongation factor 1 由来プロモーター、哺乳類細胞内で発現する抗生物質耐性遺伝子として Blasticidin 耐性遺伝子が組み込まれている。

次に構築したマンガース *Tert* 遺伝子発現ベクターをマンガース線維芽細胞に一過性に導入し、*Tert* 遺伝子発現の経時的变化を観察する。遺伝子導入にはマイクロポレーション（電気穿孔）法を用いる。導入後、24時間、48時間、72時間で回収した細胞から、total RNAを抽出し、RT-PCR法にて遺伝子発現変化を解析する。

構築したマンガース *Tert* 遺伝子発現ベクターを用いて、マンガース線維芽細胞にマンガース *Tert* 遺伝子を一過性に発現させることを確認した後、Blasticidin含有培地で長期的に生存する細胞をクローニングし、長期培養後でのマンガース *Tert* 遺伝子の発現、細胞形態を検討する。Blasticidin耐性細胞の形態観察は顕微鏡で行い、遺伝子発現についてはRT-PCR法にて行う。

(2) 水銀濃縮機構の解析と重金属解毒系遺伝子の発現評価系の作製と個体での発現評価

1) マングースおよびラット肝初代培養細胞の金属取り込み・排泄試験

山本、柳らの方法に従って、マンガースおよびラット初代培養肝細胞を調製し、細胞数の半分が死滅する際の重金属濃度を IC_{50} （50%が致死の重金属濃度）として算出し、各細胞の重金属に対する感受性とした。同時に水銀暴露された細胞を回収し、細胞内に取り込まれた水銀量、および培養液から水銀を除いて時間ごとに回収した細胞から水銀量を定量した値を水銀排泄量として解析した。細胞は凍結乾燥して細かく粉碎した後、超音波分解し、水銀は微量水銀測定装置 (CV-AAS) を用いて、セレンは ICP-MS を用いて測定した。

2) マングース肝細胞の重金属暴露時の遺伝子発現変化

マンガース gamma-glutamylcysteine synthetase の触媒ユニット (GCS) と Glutathione reductase (GSR) の mRNA を検出するプライマーの作製は現在既知となっているネコの遺伝子配列を元にして、プライマーを設計した。マンガース線維芽細胞に由来する cDNA を鋳型として、GCS および GSR のプライマーセットによって増幅された DNA 断片のシーケンス反応を行ない、得られた一次構造についてネコ GCS は Gene No. ENSFCAT00000014356 より、同様に GSR については ENSFCAT00000001476 と相同性検索を行ない、マンガース GCS と GSR を同定した。1) に示す条件で培養した細胞について GCS、GR および TRX2 の発現変化を解析した。

(3) 食物網を通じた水銀取り込み・排泄に関する研究

沖縄島北部森林地帯である通称やんばる及び恩納村南部、鹿児島本土という異なる3つの生態系よりマンガース及び餌生物など構成生物を採取し、分析に用いた。総水銀濃度は還元気化原子吸光度法を用い、また、水銀の起源推定や特徴解析に用いた他の微量元素濃度は ICP-MS を用い測定を行った。くわえて、水銀の摂取経路および負荷源の特定、さらに沖縄島での分布を解明するため、重金属類の蓄積種として報告されているコセンダングサを採取し、供試した。化学分析は、動物試料のものを改変して行った。

4. 結果及び考察

4. 1 結果

(1) 水銀濃縮機序解析ツールとして不可欠なマンガース由来細胞の安定供給をめざす戦略

1) 初代培養肝細胞

マングース肝臓より回収した細胞は、光学顕微鏡観察により肝細胞様の形態を示し、グリコーゲン顆粒を豊富に保有していることが示された。さらに、超微形態観察により、核小体が明瞭な円形の核を1~2個有し、細胞胞体内に消耗色素を含んでいることが判明した。また微絨毛を備え、豊富なミトコンドリアや小胞体を有していた。これらの超微形態的特徴は肝組織の肝細胞超微形態と一致し、回収した細胞は肝細胞と考えて矛盾のない結果が得られた。また、ミトコンドリアの変性、ライソゾームの増加が認められないことから、Viabilityは高いと判断される。一方、初代培養肝細胞は培養開始後1週間頃よりPAS染色性が低下することが判明した。

2) 初代培養線維芽細胞

マングース耳部より回収した初代培養線維芽細胞は約2ヶ月間、6回の継代を経ても線維芽細胞の形態を保持していた。この間、細胞はほぼ同等の増殖活性を有することが判明した。また、細胞形態、細胞増殖能は凍結による影響を受けず、凍結輸送も問題ないことが確認された。そこで、凍結細胞をロット管理し、凍結日、性別、継代数、細胞数(～ 1.0×10^6 cells)、マングース個体を捕獲した時の情報とともに他機関に供与できるシステムを確立した。

3) 不死化細胞作製

Human elongation factor 1由来プロモーター、哺乳類細胞内で発現する抗生物質耐性遺伝子としてBlasticidin耐性遺伝子が組み込まれているpEF/GW-51/lacZベクターに、マングース *Tert* 遺伝子断片を挿入、発現ベクターを構築した。この発現ベクターを、すでに *Tert* 遺伝子発現が失われているマングース線維芽細胞に導入したところ、24時間後から *Tert* 遺伝子の発現がRT-PCR法により確認された。

次に、マングース *Tert* 遺伝子発現ベクターを導入後、長期にわたりBlasticidin耐性を示す細胞のクローニングを試みた。増幅過程で死滅、または増殖停止に至る細胞クローンが多く見られたものの、Blasticidin耐性細胞8クローンのうち、7クローンの細胞形態は紡錘形で、線維芽細胞と矛盾のない形態を呈していた。さらに、5クローンについてはRT-PCR法にて *Tert* 遺伝子の発現が確認された。ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現量と比較すると、Blasticidin耐性細胞での *Tert* 遺伝子発現は一過性発現に比較してかなり弱いことが判明し、結果的に *Tert* 遺伝子の発現が低いレベルで保持された細胞が選択的に残ったと推測される。

(2) 水銀濃縮機構の解析と重金属解毒系遺伝子の発現評価系の作製と個体での発現評価

1) マングースおよびラット肝初代培養細胞の金属取り込み・排泄試験

マングースおよびラットの肝細胞のメチル水銀、塩化水銀、セレンに対する感受性を示した。その結果、ラットとマングースにおけるMTTアッセイ(24h)によるメチル水銀、 HgCl_2 については顕著な差が見られなかった。しかしながら Na_2SeO_3 の IC_{50} 値はラットの方が耐性が高く、用いた薬剤濃度では IC_{50} を算出できなかった。ラットは $150 \mu\text{M}$ 以上の高い値を示したことから、セレンについてはマングースよりラットの方が耐性が高いことがわかった。検体となったマングースの肝臓中(捕獲時の)総水銀濃度とその検体に由来する肝細胞のメチル水銀とセレンの IC_{50} との相関を調べたところ、肝臓中総水銀濃度が高くなるとメチル水銀に対する耐性度もそれに相関して上がるという結果が得られた。一方、セレンに対する耐性度は個体の水銀の蓄積量に負に相関していた。

またメチル水銀の細胞内動態を調べるために、取り込み・排泄試験を行なった。その結果、ラットでは時間経過に依存して取り込み量は増加し、約2時間でプラトーに達する。これに対して、高蓄積(総水銀レベルは $29.1(\mu\text{g g}^{-1} \text{DW})$)を示したマングースについて、取り込み試験を行なったところ、ラットに比較して優位に高い値で水銀が取り込まれ、2時間を超えても取り込み量が上昇していることが分かった。

2) マングース肝細胞の重金属暴露時の遺伝子発現変化

マングース3検体から得た肝細胞を24時間培養後、 $2 \mu\text{M}$ のメチル水銀を加えて30分おきに回収した細胞について、GCS、GR、TRX2の発現変化を観察した。補正はアクチンにより行なった。水銀暴露から2時間後まで(検体1は4時間)の発現変化を検討したが、いずれの遺伝子もメチル水銀負荷によって発現が変化しなかった。

(3) 食物網を通じた水銀取り込み・排泄に関する研究

やんばる及び恩納村南部、鹿児島本土で採取されたマングースは、水銀を含む微量元素蓄積において、特徴的なパターンを示した。とくに、水銀はやんばる以外の2地点で低かった。一方で、餌生物は恩納村南部でやんばるよりも高濃度で、くわえてカドミウムや鉛、ヒ素のレベルも高かった。とくに、恩納村南部のマングースのカドミウム・レベルは、これまで確認された高次動物の中でも非常に高いレベルといえた。水銀の負荷源特定を目的としたコセンダングサを供試した分布解析の結果、やんばるでは塩屋湾周辺、沖縄島では本部半島のセメント工場周辺に、高濃度の水銀レベル

が認められた。さらに、沖縄島全体で、比較的高レベルの鉛、ヒ素、アンチモンおよびカドミウムの存在が明らかとなった。

4. 2 考察

マングースの初代培養肝細胞に関する研究では、超微形態観察により回収した細胞が、生物活性が保持された肝細胞であり、*in vitro*実験に有用であると結論された。ただし、培養開始後1週間頃より生物学的細胞特性が失われていくと推定されるので、初代培養肝細胞は短期間の実験に用いるのが適当と考える。初代培養線維芽細胞では、マングース耳部より回収した初代培養線維芽細胞が約2ヶ月間、増殖活性能を減弱することなく*in vitro*で培養可能であること、さらに生物学的特性は凍結による影響を受けず、凍結輸送が可能なことから、実験を計画するにあたって、細胞数に関する制約、実験場所についての制約、実験期間における制約等が緩和されると想定される。多くの研究者に、ロット管理された同質の細胞を提供できることにより、本細胞を使用した多面的な研究推進に貢献することが期待される。不死化細胞作製では、構築したマングース *Tert* 遺伝子発現ベクターをマングース線維芽細胞に導入し、長期にわたってBlasticidin耐性を示し、かつ *Tert* 遺伝子を発現する細胞をクローニングすることができた。このことは、本発現ベクターを用いて、各種のマングース組織由来の体細胞から不死化細胞を樹立できる可能性を強く示唆するものである。

マングースおよびラット肝初代培養細胞の金属取り込みおよび排泄試験では、ラットは安定した重金属感受性を示すが、マングースはその生育環境が様々であり個体差が認められた。しかしながら水銀蓄積が高い個体では、その培養細胞も水銀の毒性に感受性が低いこと、水銀の取り込み量も高いことなどから、マングース肝細胞そのものが水銀耐性に寄与しているような性格を持つと考えられた。マングース肝細胞の重金属暴露時の遺伝子発現変化では、GCS、GR、TRX2遺伝子はメチル水銀負荷によって発現が変化しなかった。マングース肝細胞ではこれらの遺伝子は水銀負荷によって生じるストレスに応答性はなかったと考えられた。

マングースの水銀摂取に着目した生態学的アプローチから、やんばると恩納村南部、鹿児島本土では、水銀を含み特徴的な微量元素の蓄積パターンが存在することが明らかとなった。とくに、恩納村南部のマングース及び餌生物の分析から、きわめて高濃度のカドミウムや鉛、ヒ素が検出されたことは、この地域に、これら強毒性元素による汚染が存在していることを示唆した。また、マングースで高く、餌生物で低かった水銀レベルから、やんばるおよび奄美のマングースでみられていた水銀の濃縮現象は、両地域の豊かな生態系、つまり、長い食物連鎖がもたらしたものであると結論付けられた。このことは、マングースが、両生態系の貴重な希少種を捕食している可能性を裏付けるものともいえ、生態系の豊かさ（食物網の長さ）が、こと水銀に関しては、高次生物のリスクを引き上げるという現象を示唆した。さらに、これまでの沖縄島での実績から、マングースの侵入が、その地域の生物多様性を引き下げることが報告されており、このことは、マングースの水銀リスクを低減させることを予想させる。早急かつ徹底的なマングース対策が望まれる。

重金属類の蓄積植物であるコセンダングサを用いた水銀及び関連する微量元素の分布把握の結果、やんばるでは塩屋湾周辺に水銀を含めた重金属の汚染が存在する可能性が示唆された。塩屋湾周辺は、比較的人為活動の少ないやんばるにおいては特徴的に、埋め立てなど開発が行われている。これらの活動が、重金属レベルを引き上げている可能性が推察され、今後も、注意深いモニタリングが必要であろう。沖縄島全体でみると本部半島のセメント工場周辺で、高濃度の水銀が確認されたことから、これまでも指摘されているようにセメント工場が水銀の発生源になっている可能性が、この地域においても支持された。今後は、石炭燃焼にともなう負荷の増大が懸念されている越境大気汚染を併せて、寄与率の解明などが待たれる。くわえて、沖縄島全体に、鉛やアンチモン、ヒ素、カドミウムといった強毒性の重金属類による汚染の存在が疑われ、この、水銀以外の新たな重金属汚染に関しても詳細な究明が待たれる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまで水銀の生体内代謝機序に関しては、適当な実験ツールがなかったために *in vitro* 実験に基づく検証が困難であった。本研究で細胞供給システムを確立したこと、不死化細胞樹立への展望が具体化されたことで、*in vitro* 実験が可能となった。これらの細胞系を用いた実験は、これまで精力的に行われてきた自然界における水銀分布比較解析を補強し、水銀濃縮機序解明へ貢献することが期待できる。

マングース初代培養肝細胞を用いた *in vitro* の重金属負荷試験によって得られるデータは野生動物の摂食行動・生活環境をも反映しうることを示した。一方、海洋性哺乳類のセレンの蓄積量は水

銀の蓄積量と正に相関するが、マングース肝細胞についてはセレンの耐性度と個体の水銀の蓄積量は負に相関した。このことから、水銀高蓄積を示す個体には、とくにセレン類似の分子化合物を駆除剤として使用することで、駆除対策に応用できる可能性がみいだされたと考えられた。

マングースの水銀摂取に着目した生態学的アプローチでは、これまで奄美大島とやんばるのマングースでみられていた水銀濃縮が、ただ単に環境中のレベルに依存したものではなく、それぞれの生態系の豊かさ、つまり食物連鎖の長さに起因していることを明らかにした。このことは、胃内容物の研究で明らかにされた「マングースが両生態系の希少な動物を捕食している」ことの裏付けともなりえ、豊かな生態系が、水銀に関しては負荷が生じた場合、高次生物のリスクを上昇させることを示唆している。一方で、これまでの研究はマングースの侵入が、その生態系の多様性を引き下げることが指摘されており、分布の拡大は結果的にマングースの水銀リスクを引き下げることが導く。以上のことから、早急かつ徹底的なマングースの駆除対策が求められる。くわえて、これまでやんばるの希少種ヤンバルクイナがカドミウムを高濃度で蓄積している事実を明らかにしてきたが、沖縄島中部付近のマングースはカドミウムにくわえ鉛やヒ素も高濃度蓄積していた。蓄積植物を用いた分布解析の結果、やんばるでは塩屋湾、沖縄島では本部半島のセメント工場に水銀の高レベルを明らかにし、さらに鉛、ヒ素、アンチモン、カドミウムに関しては、奄美大島と沖縄島に潜在的な汚染の可能性が示唆された。

(2) 環境政策への貢献

本研究の成果は、生物の水銀蓄積のメカニズム解析・リスク評価に、新しい有効なツールとしてのマングース細胞提供を可能とし、さらに、水銀を含めた毒性元素汚染の南西諸島における存在を明らかにしたものである。今後は、学会発表や学術雑誌への投稿を通じ、成果の広報・普及に努める。

6. 研究者略歴

課題代表者：渡邊 泉

1971年生まれ，愛媛大学農学部卒業，博士（農学），現在東京農工大学准教授

研究参画者

(1)：柳 久美子

1968生まれ，徳島大学大学院歯学研究科修了，博士（歯学），徳島大学歯学部助手，
現在琉球大学大学院医学研究科助教

(2)：山本雅達

1972生まれ，福岡大学薬学部卒業，現在鹿児島大学大学院医歯学総合研究科助教

(3)：渡邊 泉（同上）

7. 成果発表状況（本研究課題に係る論文発表状況。）

(1)査読付き論文

1) 渡邊 泉，宝来佐和子，小川大輔，中島周三，船越公威，平野昂規，小倉 剛：人間と環境，
36, 3, 208-220 (2010)

“沖縄県恩納村南部，鹿児島市喜入およびやんばるで捕獲されたマングース *Herpestes
auropunctatus* の微量元素蓄積”

2) 渡邊 泉，秋山太一，佐野翔一：地球化学，45, 1, 29-42 (2011)

“沖縄島北部やんばる地域の生態系における水銀分布と他元素との関係”

3) 鈴木大輔，尾崎宏和，渡邊 泉：人間と環境，37, 2, in press (2011)

“コセンダングサ *Bidens pilosa* L. を指標生物として用いた沖縄島における微量元素分布”

(2)査読付論文に準ずる成果発表（「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可）

記載すべき事項はない。