

石油汚染の生態影響評価と モニタリング技術に関する調査研究

報 告 書

平成 25 年 3 月 31 日

一般社団法人日本海事検定協会
(理化学分析センター)

鹿児島大学 水産学部

要旨

【研究目的】

石油流出事故が起きた場合、その残留性から長期の調査が必要となるものの、どの時点で海洋環境が汚染から回復したかを見極める手段は現時点では確立されていない。

本研究の目的は、①海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響を評価する手法の開発、並びに、②石油残留量のモニタリング技術の開発である。

【研究スケジュール及び経過】

本研究の年度毎のスケジュール（目標）を下記に示す。

| 年度 | ①海洋石油汚染事故後の海洋生態系への影響の評価方法 | ②石油残留量のモニタリング技術 |
|--------|--|---|
| 2012年度 | 流出油の環境残留性について基礎データを得るため、微量の重油を添加した海水を汚濁海岸を模して作成した重油分解装置に貯蔵し、経時的に海水中の油分量、PAHs*及びpH等の変化を調査する。 | 石油が生体内に吸収されると薬物代謝系酵素（CYP）が誘導されることを利用するため、2012年度は実験に使用するジャワメダカのCYP遺伝子の塩基配列を決定した。 |
| 2013年度 | 重油分解装置を改良し、また、試験条件を止水式から換水式に変えて、汚染海水中の油分量等の経時的变化を調査する。また、微生物によって海水中に分散した油分を特定する。更に石油分解菌数を追加することでその影響を調査する。 | CYPに対する特異的DNAプローブを設計し、石油に暴露されたジャワメダカへの影響を調べる。 |
| 2014年度 | 海水中に分散した石油成分を詳細に特定し、それらの生物に対する毒性を評価する。 | CYPが誘導された際に発光する等の外観変化を引き起こすジャワメダカを遺伝子操作技術によって作製する。 |

* PAHs：多環芳香族炭化水素

【2012年度の研究成果】

① 海洋生態系への影響の評価

重油分解装置を作製し、3区分で実験を行った（a 肥料のみ、b 重油+肥料、c 重油のみ）結果、海水中の油分量は肥料を添加することで経時的に上昇が認められた。一方、重油のみの場合、油分量は漸減した。また、重油を添加した区分（b, c）で海水中の低分子PAHあるいはalkPAH（アルキルPAH）が経時的に漸減した。すなわち、これら成分が経時的に分解されたものと考えられる。

しかし、肥料を添加することで海水中の油分が上昇したにも拘らず、PAHs及びalkPAHs濃度が経時的に低下した理由は明らかに出来ていない。ただし、分解試験の後半（30日後以降）に、b区分で徐々に高分子のalkPAHs濃度が上昇した。

さらに、分解液の魚類に対する毒性は実験開始から減少し続けたが、その毒性は非常に低いレベルであった。毒性にalkPAHsが大きく寄与しているものと考えられる。

② 石油残留量のモニタリング技術

ジャワメダカの薬物代謝系酵素であるCYP A, -1B1, -1C1の全長cDNAが得られ、塩基配列を決定した。それぞれの長さは、2439(1590)bp, 1957(1957)bp, 2601(2601)bpであった。

目 次

| | | |
|-------------------------|-------|----|
| はじめに | | 3 |
| 1. 研究結果の概要 | | 5 |
| (1) 流出石油成分の環境残留性 | | 5 |
| (2) 流出油残留成分の生物影響 | | 11 |
| (3) 残留石油成分の生物学的モニタリング手法 | | 14 |
| 3. 今年度明らかになった事項 | | 19 |
| 4. 次年度に向けての課題 | | 19 |

はじめに

本事業は、石油流出事故が起こった場合の海洋生態系への影響評価及びモニタリング技術開発に関する調査研究を鹿児島大学と日本海事検定協会が共同で実施し、その成果を報告書としてまとめ、公表することを目的とする。

国内での石油汚染は、1997年に日本海で起こったナホトカ号重油流出事故が最も記憶に新しいが、それ以降でも数多くの石油流出事故が起こっている。図1は最近の日本沿岸で起こった海洋汚染事故の割合を示したもので、平成23年度には256件／391件(65.5%)が油汚染であったことをはじめとして、毎年度の事故の60%以上が油汚染であったことが分かる。

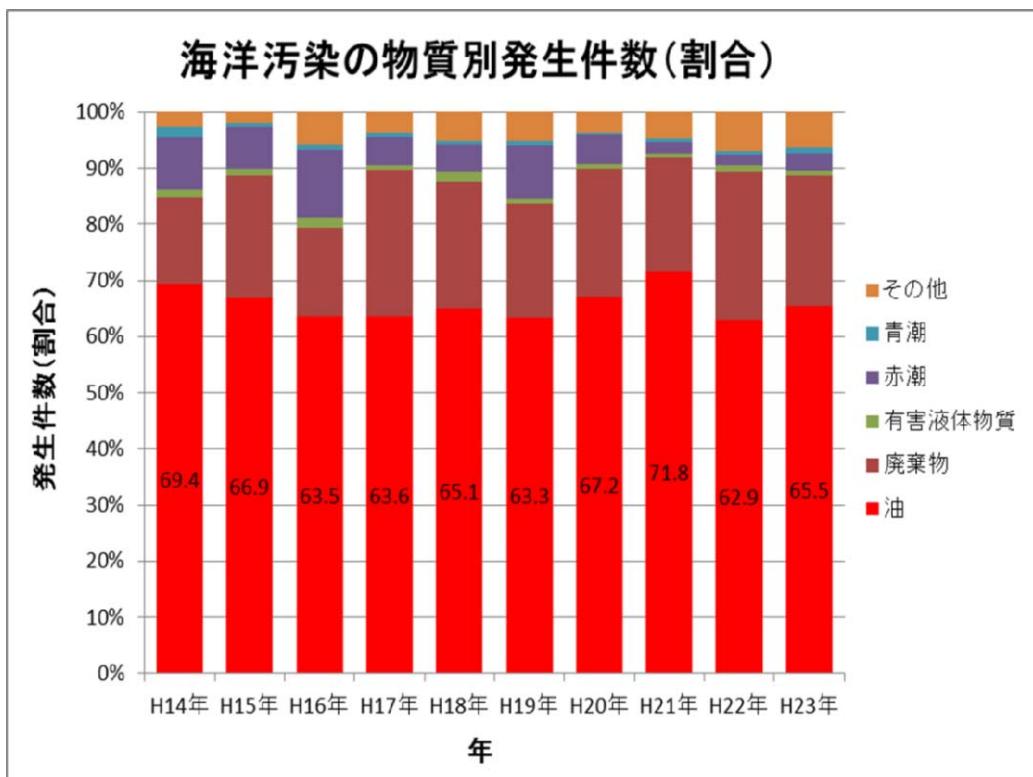


図1 日本沿岸で報告された海洋汚染事故（海上保安庁HPより作成）

さらにナホトカ号事故の際には、日本海を航行するロシア船籍タンカーの老朽化が明らかとなり、今後も石油流出事故の起きることが懸念され続けている。また、2009年の海上技術安全研究所の研究によれば、日本沿岸には燃料油を積んだまま沈没している船舶が2500隻以上あることが報告されており、これらの沈船からの石油流出が今後起こることも懸念されている。

地球温暖化を防止するため、石油の消費量を削減する努力が求められているものの、我

が国を含めて世界での消費量は依然として多い。我が国では中近東を初めとして多くの地域に石油を依存し、海上輸送経路上でのタンカー事故による大規模石油流出のリスクを依然として抱えている。この問題に対する我が国の国際的責務として、石油汚染の未然防止は勿論のこと、汚染事故後の海洋生態系への影響評価及びモニタリング技術開発を行うことが求められる。

しかし、石油流出事故が起こった場合、その残留性から長期の調査が必要となるものの、どの時点で海洋環境が汚染から回復したかを見極める手段は現時点ではない。

本事業は、国内での石油流出事故、我が国への石油搬入経路での流出事故が万一生じた場合の海洋生態系への影響の評価手法、石油汚染からの海洋生態系あるいは海洋環境の回復の評価手法の開発に関する調査研究を行うことにより地球環境の保全に資することとする。

1. 研究結果の概要

(1) 流出石油成分の環境残留性

直径 15cm 程度のガラス円筒にガラスビーズ大 300g を入れ、その上にガラスビーズ小 300g を入れ、これを海水 8L 入れた水槽（水温 27°C）に収容した。（図 2、図 3）各水槽の実験条件は以下の通りであった。

- ①コントロール：重油非添加で肥料添加
- ②重油・肥料添加区：C 重油をガラスビーズ小に 7g 添加し、肥料（オスモコート）5g を添加
- ③重油・肥料非添加区：C 重油をガラスビーズ小に 7g 添加し、肥料は非添加



図 2 石油分解装置（ガラス製）



図3 石油分解装置を組み込んだガラス水槽

①, ②の水槽には、微生物強化海水として、鹿児島市内漁港の底質 1 g と海水 1 L を 1 分程度振とう混合し、1 時間静置して得た上澄みを、ガラス纖維濾紙 (GFC) で濾過して得た抽出液 500mL を添加した。

各水槽には通気を行い、十分な酸素濃度を維持しながら石油成分の分解実験を行い、この間の水質測定を行い、さらに経時的に採取した海水中の油分（クリセンを標準として蛍光光度計で測定）、PAHs, alkPAHs の濃度を測定した。その結果、以下の図4～図9に示す通りの結果が得られた。なお、①, ②および③の平均水温はそれぞれ 26.2, 25.8 および 26.0°C でほとんど差がなかった。溶存酸素濃度 (DO) は、実験開始初期には 4 mg/L を下回ることがあったが、その後はほとんど 6 mg/L を上回ったことから、石油分解に必要な酸素濃度は維持できたものと考えられる。一方、pH は 8 前後で推移したが、C 重油 + 肥料添加区では 30 日程度経過してから 6-6.5 程度で推移した。これは図6に示すとおり、C 重油 + 肥料添加区で NO_3^- および PO_4^{3-} イオン濃度の上昇が認められており、このことが pH 低下の原因の 1 つとなっていると考えられる。

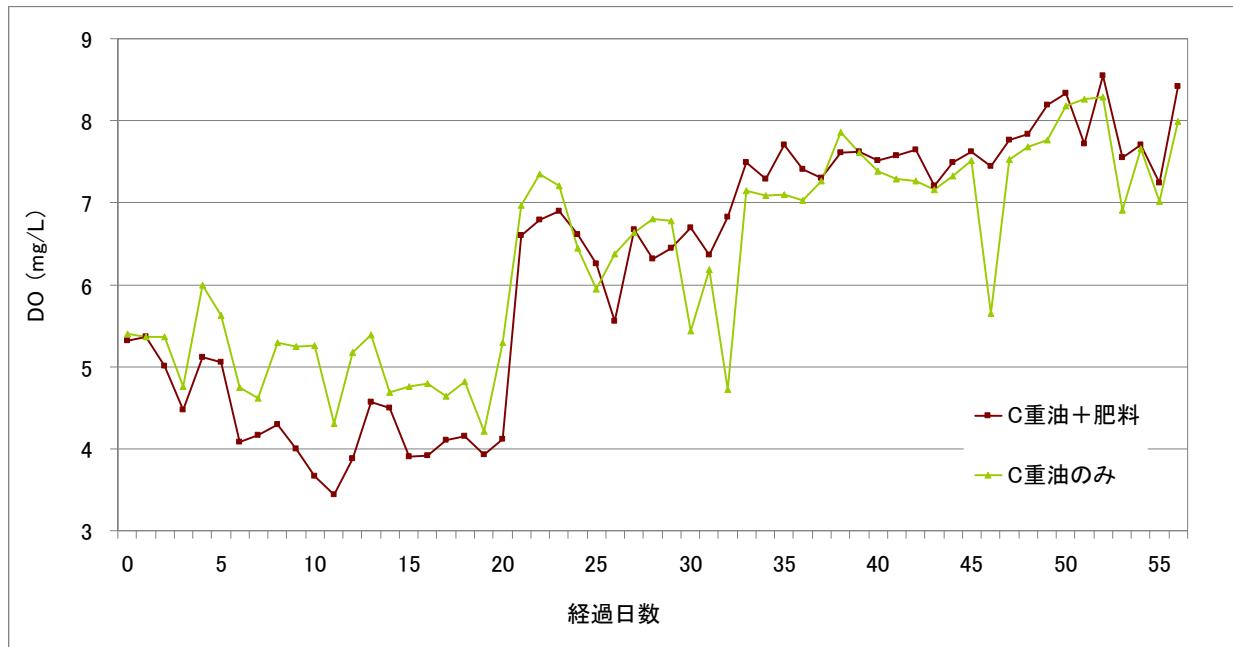


図4 実験区②および③試験海水DOの経日変化

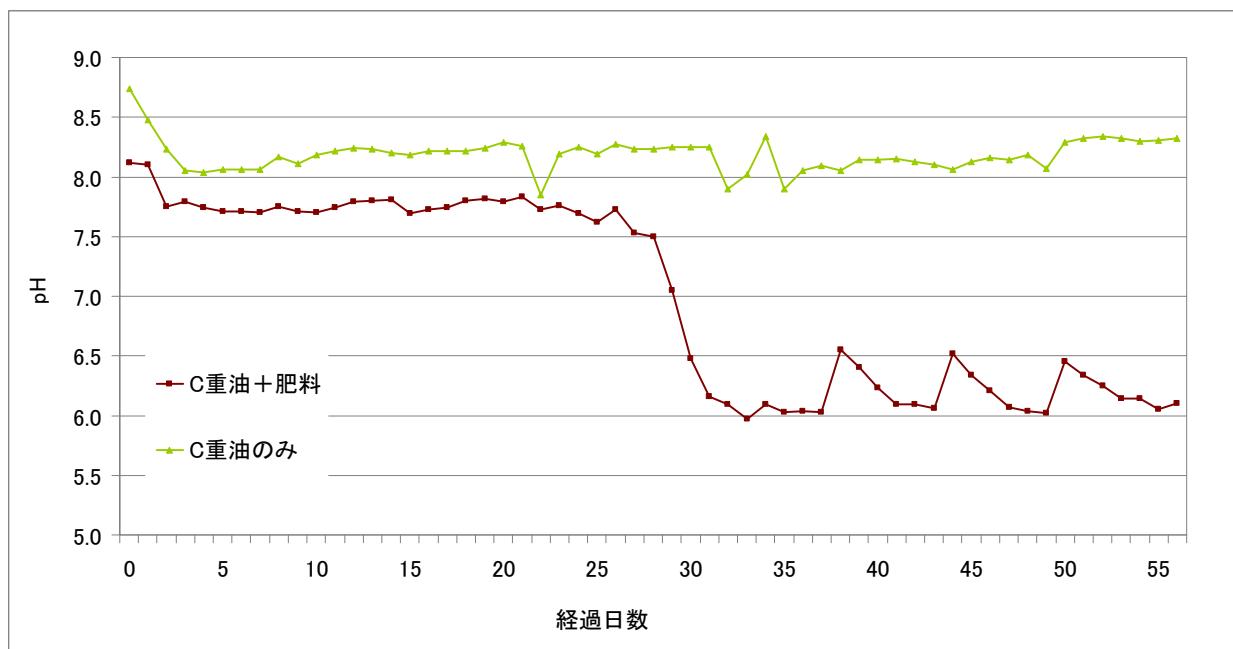


図5 実験区②および③試験海水pHの経日変化

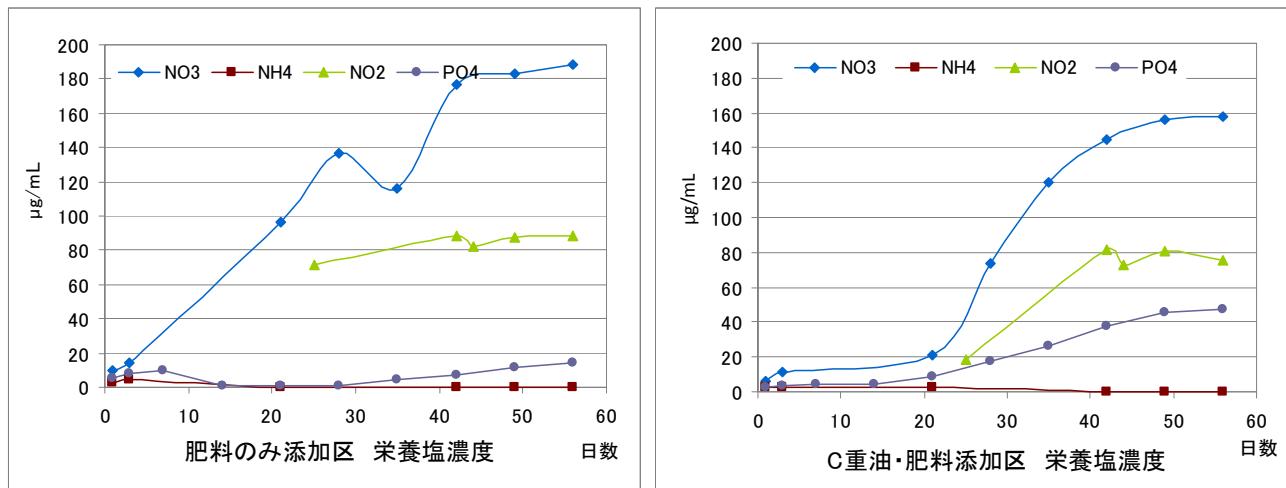


図6 実験区②および③試験海水栄養塩類濃度の変化

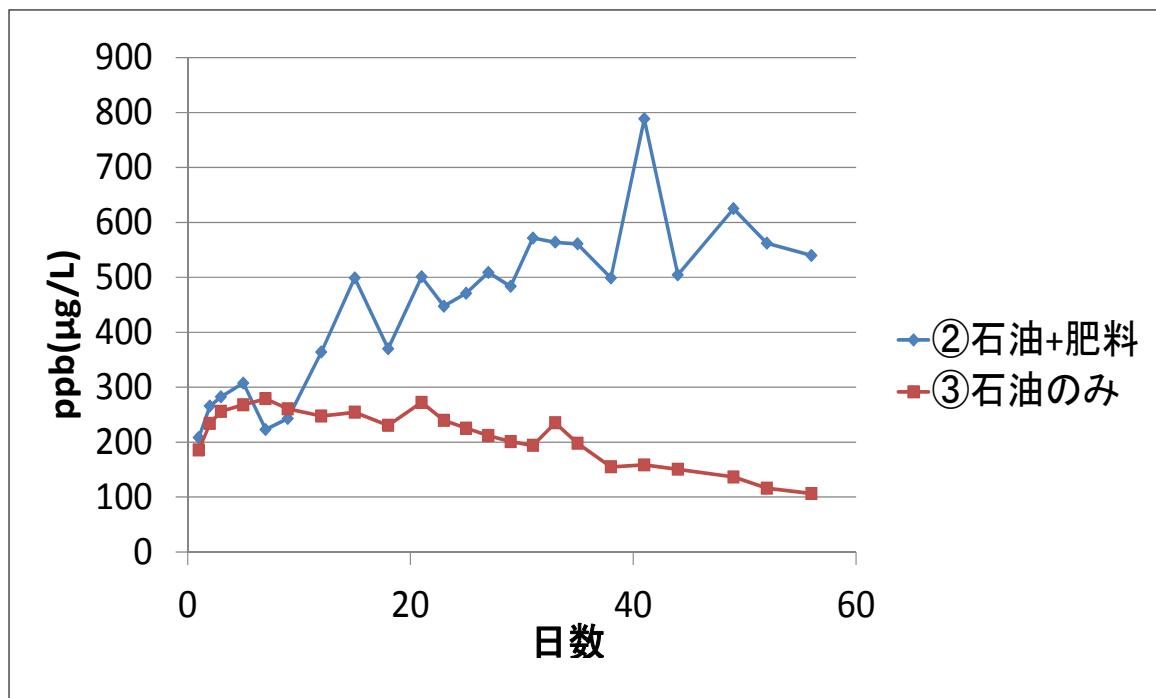


図7 海水中油分の経日変化

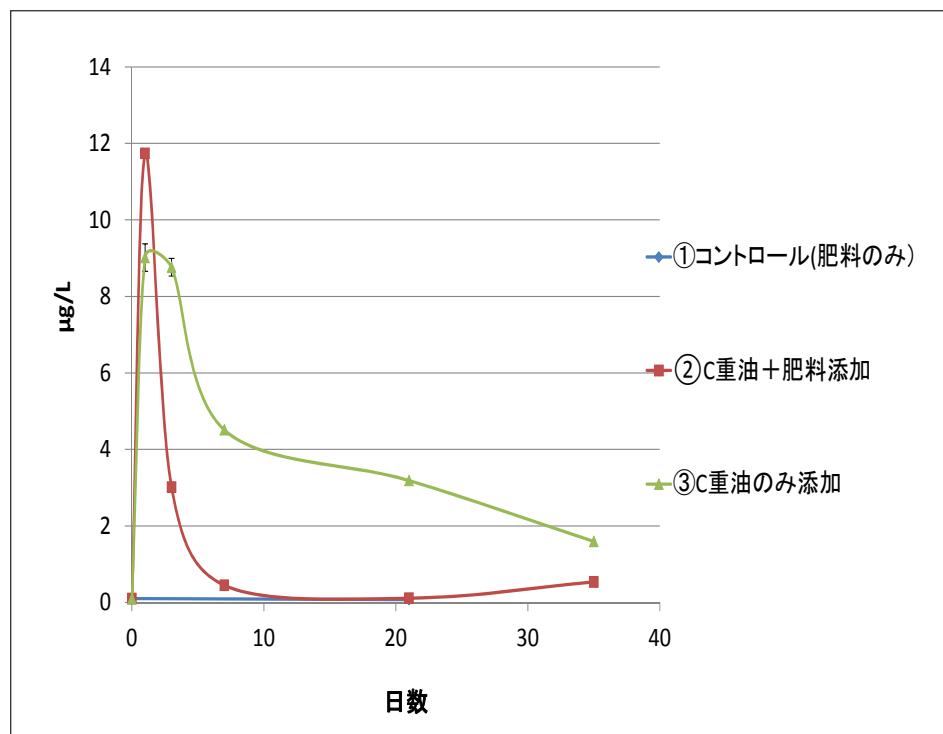


図8 海水 Σ PAHs 濃度の経日変化

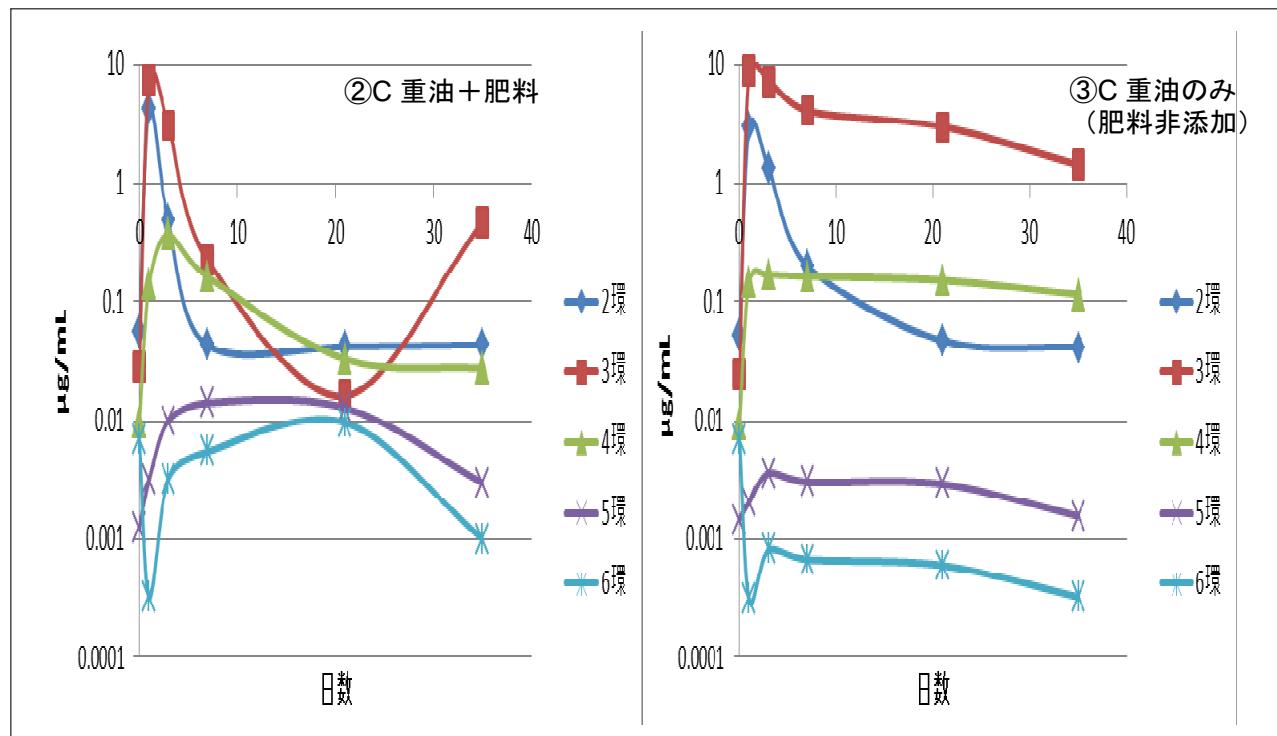


図9 海水 Σ PAHs (環数別) 濃度の経日変化

海水中油分は、分解試験開始後20日程度まで上昇し続け、その後、500～600 g/Lで推移した。（図7）一方、海水中PAHs濃度を見ると、開始直後の濃度上昇の後、速やかな濃度低下が観察された。濃度低下が最も著しいのは、肥料添加区で、石油分解菌による石油成分生分解が、肥料添加により亢進されたことがうかがえる。（図8）しかし、図9に示すとおり、PAHsの濃度低下の大半は、2、3環PAHsの濃度低下に負っていることが認められており、高分子側のPAHsがあまり微生物によって分解されていないことがうかがえた。一方、以下の図10にalkPAHs濃度の変化を示した。肥料非添加区では開始直後に上昇した濃度がその後も維持されていたが、肥料添加区では開始直後の濃度上昇の後、一端微生物分解による濃度低下が観察され、21日後から上昇に転じた。

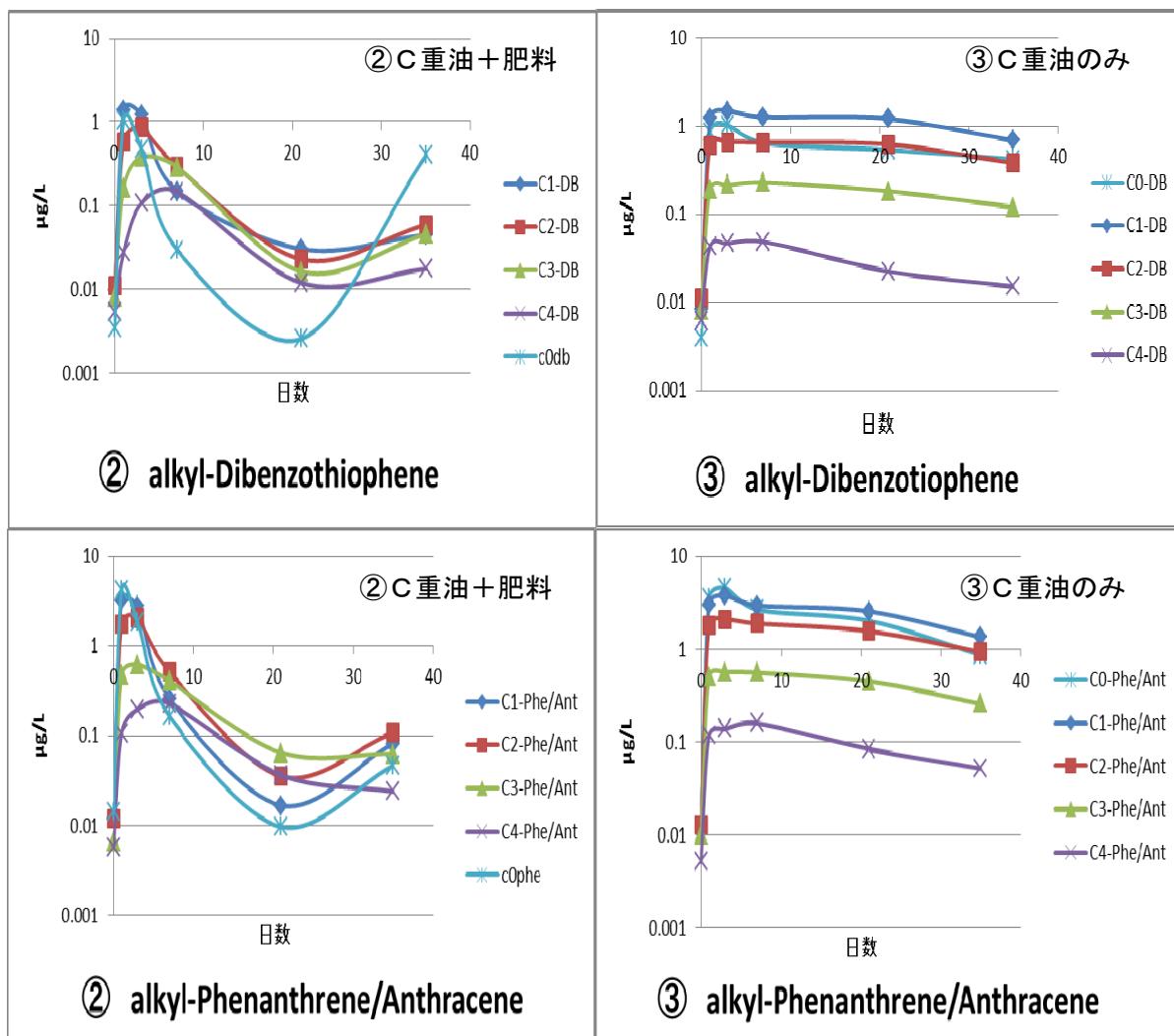


図10 海水ΣalkPAHs濃度の経日変化

(2) 流出油残留成分の生物影響

昨年度までに、石油成分をアルカン分画、PAHs および alkPAHs 分画、その他の分画に分け、ジャワメダカを用いて急性毒性試験を実施したところ、PAHs および alkPAHs 分画に最も強い毒性のあることが判明した。そこで、今年度はジャワメダカに対する数種類の PAHs、alkPAHs の急性毒性値からすべての PAHs および alkPAHs の毒性値を推定した。一方、C 重油水溶性画分を調製し、その魚毒性を実測するとともに、水溶性画分中の PAHs および alkPAHs 濃度を実測し、それぞれの水中濃度を、それぞれの半数致死濃度 (LC50) で除して毒性当量 (Toxic Unit, TU) を求め、毒性値の推定を行った。その結果、すべての PAHs および alkPAHs 濃度に基づく総 TU 値と死亡率は以下の通りであった。

表 1 C 重油水溶性画分中 PAHs 及び alkPAHs 濃度に基づく Toxic Unit とジャワメダカ死亡率

| 項目 | 第 1 回 | 第 2 回 | 第 3 回 |
|-------------------------------|-------|-------|-------|
| Σ PAH, alkPAHs (ng/mL) | 403 | 112 | 287 |
| Toxic Unit | 497 | 114 | 350 |
| 死亡率 (%) | 90 | 0 | 60 |

理想的には Toxic Unit が 1.0 で死亡率 50% となるが、本研究の結果では TU1.461 で死亡率 60% となっており、TU による死亡率推定が比較的よくできていると考えられる。

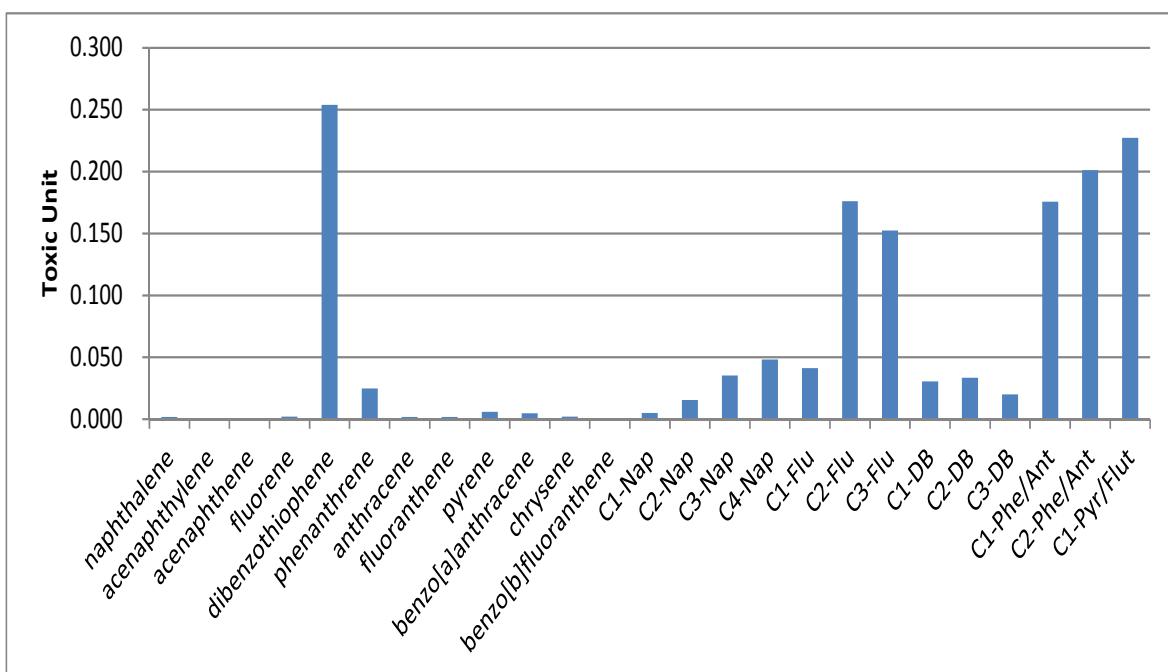


図 11 C 重油水溶性画分中の各 PAH および alkPAH のジャワメダカに対する TU 値

図 11 に示すとおり、PAHs に比較して alkPAHs の TU が大きいことが分かる。PAHs では唯一ジベンゾチオフェンが大きな TU 値を示した。なお、 Σ TU 値に占める alkPAHs の割合は 80~90% であり、水溶性画分の大半が alkPAHs の毒性起因していることが明らかとなつた。

「(1) 流出石油成分の環境残留性」のすべての重油分解海水中 PAHs および alkPAHs 分析結果から計算した分解液のジャワメダカ稚魚に対する Σ TU は図 12 に示す通りであった。当初の Σ TU は 0.15~0.2 と比較的大きかったが、経日的に減少し、56 日目には肥料添加あるいは非添加区ともその値が 0.02 程度となった。しかし、図 13 に示したようにその毒性のほとんどは、図 11 と同様に alkPAHs によるものであることは明らかである。なお、図中赤枠で囲んだ部分を注目すると、alkPAHs の TU 値が 35, 56 日目と徐々に上昇したことが分かる。分解時間あるいは重油の量によってはさらに大きな TU 値となることも考えられる。

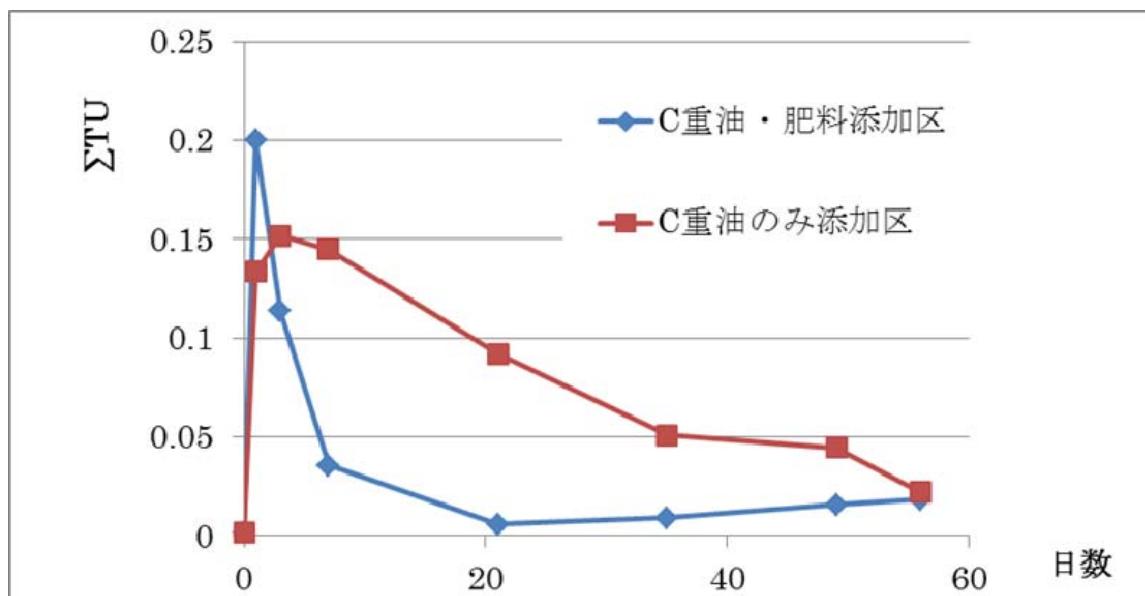


図 12 重油分解液の Σ TU 経日変化

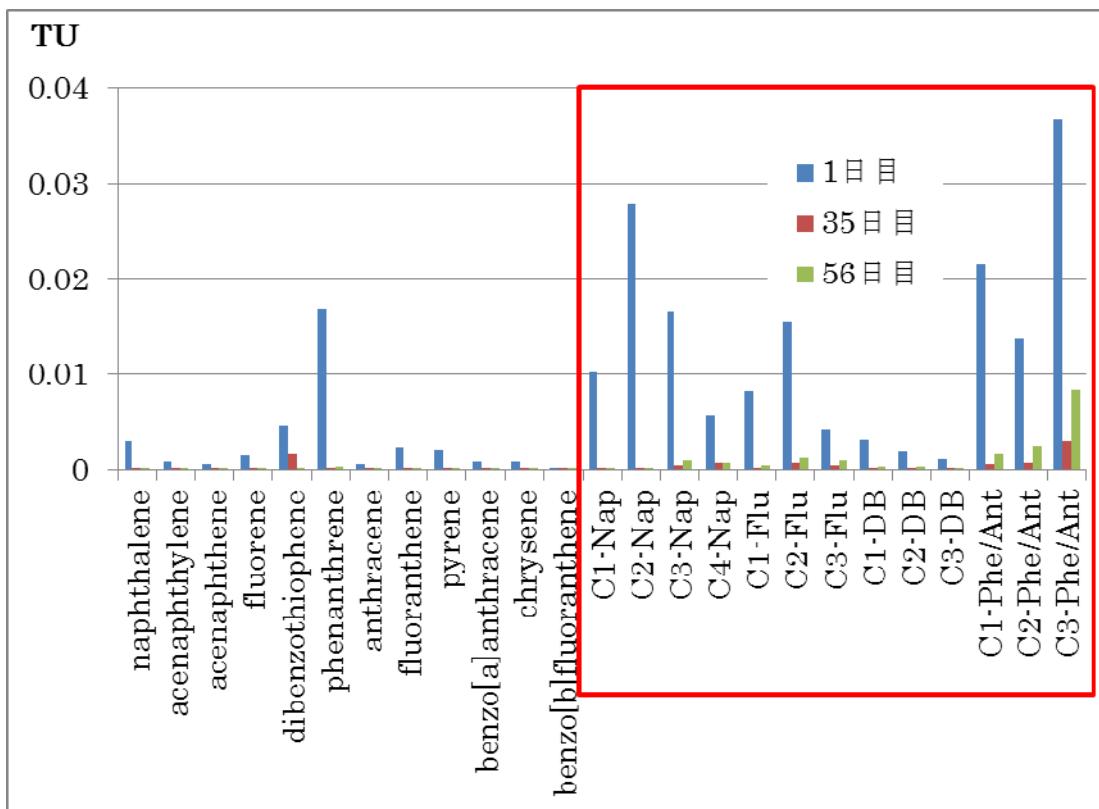


図 13 個別 TU の経日変化

(3) 残留石油成分の生物学的モニタリング手法

石油成分が生物体内に吸収されると、薬物代謝系酵素であるシトクロム P450 (CYP) が誘導される。魚体内での CYP の誘導は、分子生物学的手法によって高感度で検知・測定することができるので、流出油が残留する海水中で飼育したジャワメダカにおける CYP の誘導を測定し、流出油の残留をモニタリングする。P450 には多くの分子種が存在するが、その中でも特に石油成分による誘導を受ける可能性が高いと考えられる CYP1 ファミリーの中の 1A (陸上動物では 1A1 と呼ばれる), 1B1, 1C1 を研究対象とし、各石油成分がこれらの複数の遺伝子に対して与える影響の違いについても調べることを計画している。

今年度は、ジャワメダカの CYP1A, -1B1, -1C1 の cDNA のクローニングに成功し、全塩基配列を決定した。得られた塩基配列を用いてそれぞれの CYP に対する特異的 DNA プローブを設計することが可能となった。特異的 DNA プローブは、石油成分に暴露されたジャワメダカへの影響を、個々の CYP 遺伝子について調べるのに有用である。

ジャワメダカ (成魚) 6~8 匹を、500 ppb β ナフトフラボン (誘導剤) に暴露し、24 時間後に肝臓を取り出した。この肝臓のホモジネートより poly(A)⁺RNA を調製して cDNA を合成した。当研究室で得られているウナギ、コイ、ティラピアなどの CYP 塩基配列を基にして CYP1A, -1B1, -1C1 用の degenerate プライマーを設計して DNA 断片を増幅し、5' および 3' RACE 法によって全長 cDNA を得た。

その結果、ジャワメダカ CYP A, -1B1, -1C1 の全長 cDNA が得られ、塩基配列を決定した結果、それぞれの長さは、2439(1590) bp, 1957(1957) bp, 2601(2601) bp であった (括弧内はアミノ酸をコードする ORF の長さ)。CYP1A の、1B1 および 1C1 との演繹アミノ酸配列における類似性は、それぞれ 34.8%, 35.4% であり、塩基配列がかなり異なっているため、それぞれの CYP に対する特異的 DNA プローブを設計することは難しくない。

| | | | |
|------|---|--|------|
| -141 | GAGACATCAACAG-TGCTAATTCTCACTATCACTCAAGT | GAGAACAGCTACCTCTTGATT | -76 |
| TGGC | AAACCACTCCAAGTTTCTTCTTCTCACTGAGGTTAACCA | TGACCCCTGGCTACAGTGTG | -1 |
| ATG | GCATTAATGATACTGCCATTCATCGGCTCTGTCACTG | GGAGCTTGTG | 75 |
| M | A L M I L P F I G P L S V L E G L I A L A | T V C | 25 |
| TTG | GTTTATCTGCTCCTCAAGCATTAAACAAGAGATCCC | GGGGCCCTCGTCGGCAGCCGG | 150 |
| L | V Y L L K H F N K E I P G G L R R Q P G P | T P | 50 |
| CTG | CCCATTCATTCCGAATCTGCCAGAGCTTACCTGACCC | TCACTGAGCTT | 225 |
| L | P I I G N L L E L G S R P Y L S L T E M S | K R F | 75 |
| GG | GACGCTTCCAAATCCAGATCGGCATGGCTCCCGTCTG | AGTGGCAACCAAACCGTTGACAGG | 300 |
| G | D V F Q I Q I G M R P V V V L S G N E T V | R Q A | 100 |
| CTC | ATTAAACAACGGAGACGACTTTCCGGCAGGCTGATTG | TATAGCTCCAGTCATCAATGACGCCAAGAGC | 375 |
| L | I K Q G D D F S G R P D L Y S F Q F I N D | G K S | 125 |
| CTG | GCTTCACCAACAGATCAACAGGCTTGGGGGGGG | CAGAAAACTGGCTACAGTCTCTTC | 450 |
| L | A F S T D Q A G V W R A R R K L A Y S A | L R S F | 150 |
| TCA | ACGCTAGAGGGCAGCAATCAGAACATACTCATG | CATGCTGGAGGAACACATCTGCAAAAGAGACAGACTAC | 525 |
| S | S L E G S N A E Y S C M L E E H I C K E | T E Y L | 175 |
| ATC | AGACAGATTAACAAACTAATGCCAGACAGAACCC | AAATTCGACCCCTATCGATA | 600 |
| I | R E I K V M Q T E G K F D P Y R Y I V V | S V A | 200 |
| AAC | CGTTATCTGCGCATGCTTCGGACGGCGTATGAC | CAACATGACCCAGCTGGCTTGCCCTGTAACCTC | 675 |
| N | V I C G M C F G R Y D H H D Q E L V G L | W N L | 225 |
| AGT | CAACATTTGCTCAAGCAACAGCCAAACCCACCCG | ACTTCATCCCCGCCCCGCACTATACCCAAAC | 750 |
| S | E D F V Q A T G N G N P A D F I P A L Q Y | L P N | 250 |
| AAA | ACAATGAAAAAGTTGTTGACATCAACACCGCTTC | AAACACTTTGTCAGAAGATCCTCAGCGACCACTAT | 825 |
| K | T M K K F V D I N N R F N N F V Q K I | V S E H Y | 275 |
| GGCA | ACTTATAAAAGCAACACCGTACATTACAGACTCTT | ATGACTCTGACGACACAAACACTCGAT | 900 |
| A | T Y N K D N I R D I T D S L I D H C E D | R K L D | 300 |
| GAA | AAATTCCAACATCCAGATGTCAACAGAAAGCTG | TGTCGCATCGTAATGATCTCTTGGACAGGTTTCGAC | 975 |
| E | N S N I Q M S D E K V V G I V N D L F G | A C F D | 325 |
| ACA | AACTCTACTGCTCTGCTTGGTCACTGGCTTACCTG | GACATAGAAAAGAGACTTTTGAA | 1050 |
| T | I S T A L S W S V G Y L V A H P D I E K | R L F E | 350 |
| GA | ACTTAAGGAAACATCGGCCCTGGACCGAAATCT | ACCCATGCTGATAAAACACCTACACCTCTCGAGG | 1125 |
| E | L K E N I G L D R N P T M S D R N N L C | P L L E A | 375 |
| TTT | ATTTGGAGATCTTCGCCATTCTCATTCACCAAT | CCACACTGCTCAACAAAGACACATCT | 1200 |
| F | I L E I F R H S S F L P F T I P H C S T | K D T S | 400 |
| CTG | AAATGGTTACTATATCCCTAACACATGCTCTCAT | CAACCACTGTCAGCAGATAAACATGACCCGAAACTG | 1275 |
| L | N G Y Y I P K D T C V F I N Q W Q I N H | D P K L | 425 |
| TGG | CAGGATCCATCCTTTAACACAGATCGTTC | CTGACATGAGCTAACCGCTAGAACGGA | 1350 |
| W | Q D P S S F N P D R F L N E D G T E V | W N R L E G | 450 |
| GAG | AAAGTGTGCTGGCTTGGTC | TCGGAAAGCCACGTTGCAATTGGGAGGTAC | 1425 |
| E | K V L A F G L G K R R C I G E V I A R | N E V F L | 475 |
| TTT | TTGGCAATCATGATTCAAGAAATGAGATTGAG | AACTGCTTACGGACTTATGGACTTGACCCAGACTAC | 1500 |
| F | L A I M I Q R L R F E V P G E P M D L | T P E Y | 500 |
| GGC | CTTACCATGAACCAAAAGCTGCCACGTTAGAC | CATCACTGCGCTCAAAAGCATGGACACTGAAGCTGTT | 1575 |
| G | L T M K Q R C H V R A S L R S K G W T | L K L F | 525 |
| ATA | ATGACCATTTATGACTTTGAGTCAGCACATG | TGACATTAGGAAAGAAACTAACTCTAAATCTG | 1650 |
| I | M H H L * | | 530 |
| TG | TGAGATTCAATGCCATTACAGCAATTGAA | CCAGTAAACAGATTGGCTCAATGAAACTGGTAGGAAG | 1725 |
| TG | TCAGGAAATCTGCAATCCCTGGTTGCTCAATCAAC | GTTCTGCTTATAACCGATGCTTGAAGGC | 1800 |
| CCCC | AAAGGGAAATGCTGTTCAATGCCAACAGCTCA | AAAACCAACAGACCAAGCACAAAAAGCTTGT | 1875 |
| TCA | TTGAGACAAAAACATCTTACCTAAATTAAC | ACCACTGCAACCTATTGTTGCTA | 1950 |
| GTT | GCTGCAAGACTCTGAAACTAACAGATAATTACT | CGTCAAGCTAGTTCTTATATATATGCTAGATATC | 2025 |
| AAAC | ACTGAAACTACATTTTATCCAAAAATGCTGATTT | CTCCGATATGCAAGATCTCTATTTTAAAGAAAT | 2100 |
| GTT | TTTATGATAACATGGAAATGTA | CTTGTTATAATTCTTGAAATACCTTCTGTA | 2175 |
| CAG | GGCATTTTAAATGACAGTTGATGTTTAAAGGG | CTTAAATAAACGTATGCTTTGTTATCACTTGAGA | 2250 |
| TTT | TCATGACGCTTTAAAACAGAAATACGGAAACT | CGCTGAAACAAAAAA | 2325 |
| AAA | | AAAAA | 2328 |

図 14 ジャワメダカ CYP1A cDNA の塩基配列および演繹アミノ酸配列

| | | |
|--|---------------------------------|-----|
| -106 | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGG | -76 |
| AGAGTGAACCGCGTCACGCTTAAAGCGTTTCTCAGTTGGTGTCTGAACCACAGCAGTTACATTAA | -1 | |
| ATGGTCATGGATGTGGCACGGACAGTCTGGCGCAGGAGCTCAGGAACCTCCTGGTACCTCCGTGGCTCTG | 75 | |
| M V M D V A R D S S G A G A L R N L L V T S V A L | 25 | |
| CTGCTCGCCCTCCACCTGTGGCTGTGGCTCCGCCGGCGCTCAGTCTCCGGCTCCGGTCCGGTGGCTGGCG | 150 | |
| L L A L H L W L W L R R R S T L R L P G P F A W P | 50 | |
| CTCATCGGGAACGCTCGCAGCTCGTAGCGCCCTCACCTGTACTTTACCGCCTGGTGGAGAAAATACGGCAAC | 225 | |
| L I G N A A A Q L G S A P H L Y F T R L V R K Y G N | 75 | |
| GTCTTCCAGATCCAGCTGGCTCGCGGGCTAGTGGTGTGACAGGGGACGCCATCCGCCAGGCCTGGTGAAG | 300 | |
| V F Q I Q L G S R A V V V L N G D A I R Q A L V K | 100 | |
| CGGGGGCCAGACTTCGCCGGCAGACCCGACTTCACCTCCCTCGCTCATCGCTAACGGGACAGCCTGGCCTTC | 375 | |
| R G P D F A G R P D F T S F R F I A N G D S L A F | 125 | |
| AGCACAGTCTCGGACTGGTGGAAAGACTCACCGCAGGGTCGCGACTCCACCGTGCATGTTCTCCACGGGAAC | 450 | |
| S T V S D W W K T H R R V A H S T V R M F S T G N | 150 | |
| CCGCAAACCAAGAAGACTTTGAGCAGCACGTGCTCTGAATTCAAGAGAGCTGCTGGGCTGTTCTGGCTAAA | 525 | |
| P Q T K K T F E Q H V L S E F R E L L G L F V A K | 175 | |
| ACCCGCGAGATGCAGTTCTCCAGCCATGGTTACCTGGTGTCCACGGCAACGTGATGAGCGCGGTCTGC | 600 | |
| T R E M Q F F Q P M A Y L V V S T A N V M S A V C | 200 | |
| TTCGGGAAGAGGTACTCTACGACGATGAGGAGTTCCGGCAGGTGGTCGGCAGGAACGAGCAGTCAACCCAGACC | 675 | |
| F G K R Y S Y D D E E F R Q V V G R N E Q F T Q T | 225 | |
| GTGGGCGGGGGAGCATCGTGGACGTGATGCCCTGGCTCCAGTATTCACCCAAACCCATCAAGACGATCTTGAC | 750 | |
| V G A G S I V D V M P W L Q Y F P N P I K T I F D | 250 | |
| AACTTCAAGAAGCTAACAGGGAGTTAACCGACTTTATCCACGATAAGGGTGGAAACACAGGAAAAGCATGGAG | 825 | |
| N F K K L N R E F T D F I H D K V V E H R K S M E | 275 | |
| TCCAAGAGCATCAGAGACATGACTGACGCTTCATTGTGGCTCTGGACCACCTCCGAGACAAACGGGGCTTTG | 900 | |
| S K S I R D M T D A F I V A L D H L R D K T G A L | 300 | |
| GTGGGAAAGACTACGGTGTATCCACGGTTGGAGACATATTGGTCAAGTCAAGACACCCCTGTCAACTGCCATG | 975 | |
| V E K D Y V V S T V G D I F G A S Q D T L S T A M | 325 | |
| CAATGGATCATCCTGTTCTGTCAAGTACCTCTGAGATGCAAGCGCTCTGAGAAGGGTGGACAGAGTGGTG | 1050 | |
| Q W I I L V L V K Y P E M Q R R L Q K E V D R V V | 350 | |
| GGTCACAGCGCCTTCCCTCTATTGAGGACCAGCCCCAGCTGCCGTACCTCATGGCTTCCCTACGAAGTCATG | 1125 | |
| G H E R L P S I E D Q P Q L P Y L M A F L Y E V M | 375 | |
| CGCTTCACCAGCTCGTCCCTCACCATCCCCACTGCACTGTAACCGACACCTCCGTATGAGCTACACCATC | 1200 | |
| R F T S F V P L T I P H C T V T D T S V M S Y T I | 400 | |
| CCCAAGAACACCGTCATCTCGTCAACCACTGGCCATCAACCAAGACCCCCAGCATGTGGTCCCACCCGACACC | 1275 | |
| P K N T V I F V N Q W S I N H D P S M W S H P D T | 425 | |
| TTTGACCTCTGGCGCTCTGGACCGCAGAGGGGAAGCTGAACAAGGACTTAATCAGCAACGTGCTCATCCTCT | 1350 | |
| F D P E R F L D A E G K L N K D L I S N V L I L S | 450 | |
| CTGGGGAAAGCGCGCTGCATTGGGGAGGAGCTGCCAAACTGCAGCTGTTCTCTGGCTTGTGACACAC | 1425 | |
| L G K R R C I G E E L S K L Q L F L F V A L I A H | 475 | |
| CAGTGCACATCACCGCACACCCAGAGAGGCCGCCACCTGGAGTCCACTACGGTCTGACACTGAACACCTCAC | 1500 | |
| Q C D I T A H P E S P P T L E S H Y G L T L K P H | 500 | |
| GCTTATGTCATAGCAGTGTGCTACGCCACGCCACAGCAGCCCTGTGAGGGTTGAAGGTCAGCTACCAAA | 1575 | |
| A Y V I A V S L R H A A T A A L * | 516 | |
| CACCAAGCGGAAATAAAACTCAGAAAGACTTAAACATGAAGGCTGAAGGATCAGTGCCTTCTCTTTAAAAATCT | 1650 | |
| ATTATATAACAGAAACCTCAAGCTAACGTCTGTATTGATTATTTGAAACGATTATTTGATTGATCCTTGA | 1725 | |
| CTTGTACTGGAAGTCTTTCATTCTGCTCATCCAAAGCTCAAACGTCAGTGTGAGTCATTTGAGTCATGGAAGTTGT | 1800 | |
| AACTTTATAACAAACACTATCTATTAAATAACAAACAGTGTCAAGTGTAAAAA | 1817 | |
| AAA | | |

図 15 ジャワメダカ CYP1B1cDNA の塩基配列および演繹アミノ酸配列

| | | |
|---|--|------|
| -216 | GGGCACCTAACGCTTAAATCTTATGAAGGGACAAACTGATGACAGGAAACGTATCACAATGATT | -151 |
| TTATCAATACTCCATTAGATATCAAAGTATTTTCTTATTGATATTGATGCGTCACCTTTCTTCAGATC | -76 | |
| TATTAATTAAATTTAGATAGTTCTAGTATTCTTAAGGGAAAGAGCAGCAGACTTCCATCACT | -1 | |
| ATGGCACTTGACTCTGAGTTGGCTGAAGGGCAGCAGCATCAGGGACTGGAGCAGACAGTCCATCCGGCT | 75 | |
| M A L D S E F G V K G S S I I R E W S G Q V H P A | 25 | |
| TTGGTGGCCTCCTGGTTCTGCTGCCCTGGAAGCCTGCCCTGTGGTCAGGAACCTCCGGCTCAAGAGGAGA | 150 | |
| L V A S L V F L F C L E A C L W V R N L R L K R R | 50 | |
| CTCCGGGACCTTCGCGCTGGCCGGTGGCAACGCCATGCAGCTGGCCAGATGCCATCACCTCAGC | 225 | |
| L P G P F A W P V V G N A M Q L G Q M P H I T F S | 75 | |
| AAGCTGCCAAGAAGTATGGCAACGTGTACCAGATAAGACTGGGTTGCAGCAGCTGGTGTGGCTGAACGGAGAC | 300 | |
| K L A K K Y G N V Y Q I R L G C S D V V V L N G D | 100 | |
| CGGGCGATCCGCGAGGCTCGTCCAGCACAGCATAGAGTTGCAGGCAGACCGAACCTTGTGCTCCAGATG | 375 | |
| R A I R E A L V Q H S I E F A G R P N F V S F Q M | 125 | |
| ATCTCTGGAGGGCAGGAGTTGACGTTACCAATTACAGCCAACAGTGGAAAGCACACAGGAAACTTGTCTAGTC | 450 | |
| I S G G R S L T F T N Y S Q Q W K A H R K L A Q S | 150 | |
| ACCCCTAGAGCGTTCTCTGCAAACAGCCAGACAAAAAGACCTTGAGCAGCACATTATAGATGAGGCCACA | 525 | |
| T L R A F S S A N S Q T K K T F E Q H I I D E A T | 175 | |
| GAGCTGGTGCAGGGTATTTGCAGCGGGCTAAACGGACAGTGTGTTTACCCATCTACGAGCTGAAAGTGGCA | 600 | |
| E L V R V F L Q R G S N G Q C F Y P S H E L K V A | 200 | |
| GCTGCGAACATCATGTGCGCTCTGCTTGGATGAGATATGGACACATGACTGGAGTTCACACCCCTCTG | 675 | |
| A N I M C A L C F G M R Y G H N D L E F T T L L Q | 225 | |
| CAGAGGCTGGACAAGTTGGAGAGACAGTAGGGGCAGGAAGTTGGTGGATGTATGCCCTGGCTGAAATCTTC | 750 | |
| Q R L D K F G E T V G A G S L V D V M P W L K S F | 250 | |
| CCGAACCCAGTCGCGAGTCTACGAAAACCTCAACGAGGAGTTTCACCTTCATCACAGATAAG | 825 | |
| P N P V R S L Y E N F K N L N E E F F T F I T D K | 275 | |
| GTGGTACAGCACAGAGACTGTTAACCCCGAAGTGACCCGAGACATAAGCAGCCATCATCAATGTGATTGAG | 900 | |
| V V Q H R E S F N P E V T R D I S D A I I N V I E | 300 | |
| CACGGAGAGGACACGCAAGCTGAGCAAGGATTGTTGACTGACCGTCAGAGATCTGATTGGAGCCGGTCAAGAC | 975 | |
| H G E D S K L S K D F V E S T V T D L I G A G Q D | 325 | |
| ACCACGTCCACGTTCATGCAGTGGATTATTCCCTCTGGTCAAGTATCCAGACAGTGCAGCCAAGCTGCAGCAG | 1050 | |
| T T S T F M Q W I I L L L V K Y P D V Q A K L Q Q | 350 | |
| CTCATCGACAGAGTGGTGGGCAGGGACAGGTTGCCCTCAGGAGACAGACCCAACTGGCGCTCTGGACGCC | 1125 | |
| L I D R V V G R D R L P S T E D R P N L A L L D A | 375 | |
| TTCATCTACGAGACCATGCGCTCACCAAGCTCGTCCCCGTCAACCATCCCCACTCCACCTCTGACGTCACC | 1200 | |
| F I Y E T M R F T S F V P V T I P H S T T S D V T | 400 | |
| ATTGGAAAGCCTCACATCCCTAAGGACACCGTCGTCTCATCAACCAGTTCTCGTCAACCACGACCCGCTGAAG | 1275 | |
| I G S L H I P K D T V V F I N Q F S V N H D P L K | 425 | |
| TGGAAGGAGCCGCACGTGTTGATCCAGCGCCTTGACGAAAGGGGGGCTGGACAGGACAGAACCAAC | 1350 | |
| W K E P H V F D P A R F L D E S G G L D K D R T N | 450 | |
| AGCGTGATGATTTCTCCACAGGTAACGGCGCTGCATCGCGACCGAGATGCCAAGGTGCAGGTGTTTGTTC | 1425 | |
| S V M I F S T K R R C I G D Q I A K V Q V F L F | 475 | |
| ACTGCACTTCTGCTGACCGTGCAGTTGAGAGTCAGCCCTCAGAGCCCTCACTCGACTGCTCTACGGT | 1500 | |
| T A V L L H Q C S F E S D P S E P L T L D C S Y G | 500 | |
| CTAGCACTGAAACCCCTCAGATAACGGCATTAGCACCAAGCTGAGGGAGAGTTGCTAGACAAGACTCTCTGAA | 1575 | |
| L A L K P L R Y G I S T K L R G E L L D K T S P E | 525 | |
| TGAGCAGCATGCCTCGTACTGTGACTCTAGGACACACTTAAATAACAGCATCAATACCTGCA | 1650 | |
| * | | |
| CTTAACGTAAAATCATATTAAACAGAAATATTAAACAGTATAGTCTGTTGCAATCTCAGAAATTGATTATAT | 1725 | |
| TTTGTGTGATTTCTGTTGAGCGTGTGCTTAATAAAATGATTTAAACTACTATAACCATATGTAA | 1800 | |
| GATCACGTGAATGTTAAAGTCATTGATGTTCTCATTTGTTGTAATATATTCTTACTGTGCTGCCGA | 1875 | |
| AGTCATAGTTCAAGGAAAAAGTAATTAAAGTAATTAAAGTCAATCTAGTACTGACTTAAGCATAA | 1950 | |
| GAACCGATGAAACAGCAGGATGACGAAAAGAAAACAAATGAAGGGATTCTTGGGACCAAGAAACTCTCAA | 2025 | |
| ACTTGAGTTACTGTACGAGGACTGCAGCTACCCCCATGCATGCCAACCCATCTCAGCAGTCCAACAGAGCACA | 2100 | |
| TGTGCAGCTAGTCTCTCACTCGTGAAGCTCTCCAAACCATGTTTACAGGAACCTTTTTTTTTTTTT | 2175 | |
| TTTTTATTGATGTCACTACACTCAAGATTGATGTTATGCCAAGAAACGTGTTTCTGTTGTTGAG | 2250 | |
| GCAAAAAAAAAGAAAGGAATTAACCTGCTGTTCTGAATGATAAAAGTAAAGTGTGCTTGGAAATTCACTG | 2325 | |
| AGATTAAACATGAAGAAAAATAAGCTGTTAAACAAATAAGTAAAGTATAAAAGTGTGTTTGTATAA | 2400 | |
| AAAAAAAAA | 2408 | |

図 16 ジャワメダカ CYP1C1 cDNA の塩基配列および演繹アミノ酸配列

表2 ジャワメダカ CYP1 遺伝子の cDNA

| | 全長 cDNA (bp) | 5' 非翻訳領域 (bp) | 翻訳領域 (bp) | 3' 非翻訳領域 (bp) | アミノ酸 (残基) |
|--------|-----------------|------------------|--------------|------------------|--------------|
| CYP1A | 2439 | 141 | 1590 | 708 | 530 |
| CYP1B1 | 1957 | 106 | 1548 | 303 | 516 |
| CYP1C1 | 2601 | 216 | 1575 | 810 | 525 |

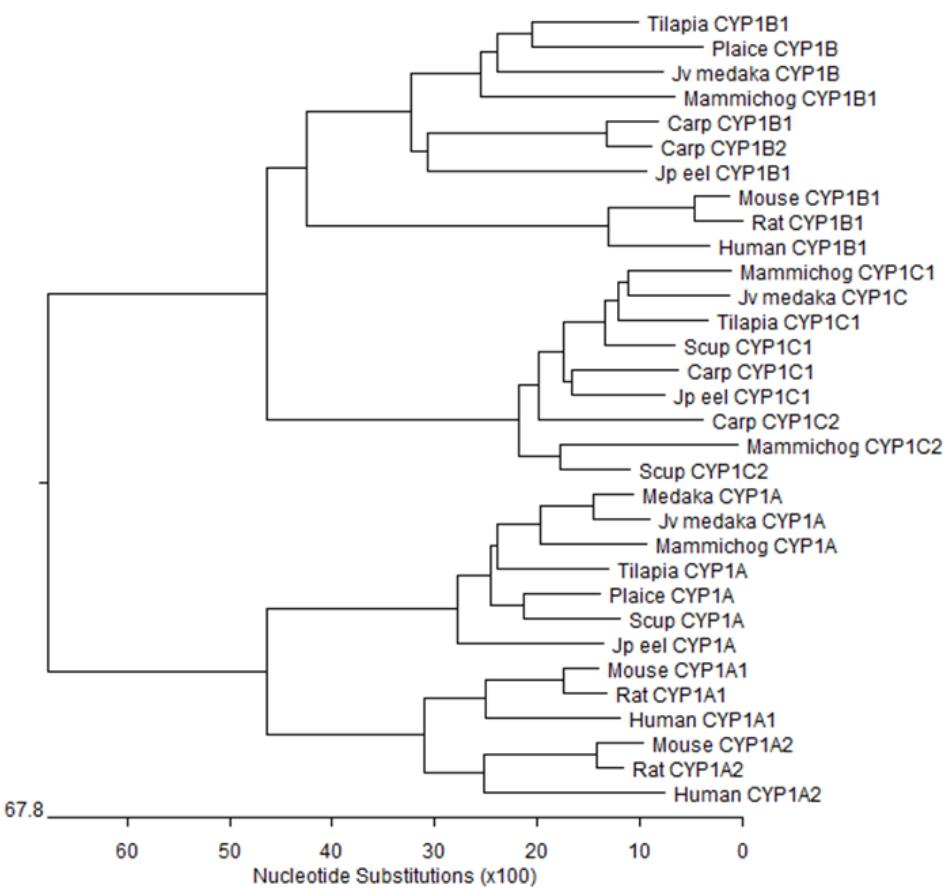


図 17 演繹アミノ酸配列による CYP1 ファミリー遺伝子分子進化系統樹

2. 今年度明らかになった事項

今年度の本研究から、以下の点が明らかとなった。

- ・作成した小型ガラス水槽を用いて C 重油分解試験を実施したところ、肥料添加により明らかな油分上昇が認められた。
- ・分解液中の PAH および alkPAH を個別に分析すると、低分子の PAH あるいは alkPAH の濃度低下が認められたことから、これらが分解されているものと考えられる。
- ・油分上昇が観察されたにもかかわらず、PAHs および alkPAHs 濃度の低下が認められた理由は明らかではない。
- ・分解試験の後半に、C 重油 + 肥料添加区で徐々に高分子の alkPAHs 濃度の上昇が認められた。
- ・分解液の魚類に対する毒性は、実験開始から減少時続け、その毒性は非常に低いレベルであった。毒性には alkPAHs が大きく寄与したと考えられる。
- ・ジャワメダカ CYP A, -1B1, -1C1 の全長 cDNA が得られ、塩基配列を決定した結果、それぞれの長さは、2439(1590) bp, 1957(1957) bp, 2601(2601) bp であった。

3. 次年度に向けての課題

流出石油成分の環境残留性および流出油残留成分の生物影響については、今年度の石油添加量が少量であったことから、その添加量を大幅に増やすとともに、試験装置の改良を行い、海水の毎日換水を行う実験を計画している。

以上