

## ミミズの魅力と可能性は無限大

赤澤 真一

### はじめに

ミミズと言われて何を思い浮かべるだろうか? 「ヌメヌメとして気持ち悪い」「釣りの餌」「土壌の肥沃化に貢献する生物」などであろうか。このうち、土壌の肥沃化を思い浮かべるきっかけとなる研究を行ったのが、Darwinである。Darwinは進化論で有名であるが、ミミズが土壌形成に及ぼす影響についても研究し、“Worms”<sup>1)</sup>にその詳細を記している。Darwinはイギリスで生まれ活躍していたことから、今日でも土壌・環境に関するミミズの研究はヨーロッパで盛んである(2009年にはDarwin生誕200周年祭も開催された)。一方で、ミミズは“地龍”と呼ばれ、ミミズ乾燥粉末は、古来、解熱作用がある漢方として特にアジアで利用されており今日でも親しまれている。したがって、漢方という医学面での研究はアジアが進んでおり、16世紀のLi(中国)までその歴史はさかのぼる。

このように、ミミズは歴史的側面から東洋は医薬面、西洋は土壌・環境面に着目した研究と、分野が分かれており興味深い。本稿では、まずミミズの特徴について解説し、環境・医学両面で活躍するミミズの機能性について、筆者が取り組んでいる研究も交えながら紹介したい。

### ミミズの特徴

ミミズは環形動物門貧毛綱に属し、4億年以上前から

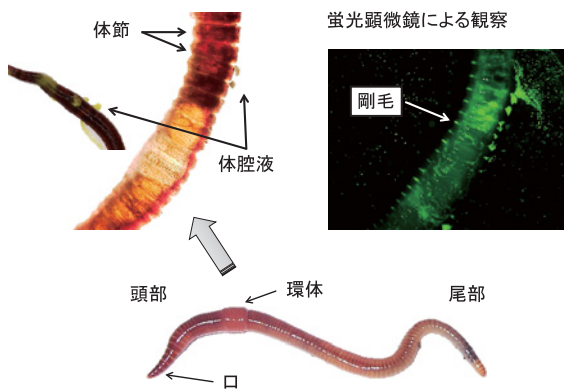


図1. シマミミズの概観

生息しており、3000種以上存在しているといわれている(文献によりかなり幅がある)。一般的な特徴として、体節に区切られており、成熟体には環体がある。剛毛によって動き回り、分泌液を出し、口や心臓、血管、各種臓器を有する(図1)。したがって、消化系酵素を数多く有し、その機能性が盛んに研究されている(後述)。また、多くのミミズは卵を産んで子孫を残すということをご存じだろうか? コンポスト作製などによく利用されるシマミミズ *Eisenia fetida* は、卵胞を環体から産み落とし、最適化された飼育条件では約4年半生存できる<sup>2)</sup>。ライフサイクルを図2に示した。

### ミミズの分類

ところで、生物の分類には、遺伝子情報が有用であるが、ミミズの遺伝子情報は不足しており、現状では形態学的な分類とセットで行う必要がある。遺伝子を活用した分類により、分類が変更された微生物があるように、ミミズも両分類法の進展により分類が変更(*Pheretima* から *Metaphire* など)されたものもある。また、*Eisenia* spp. は世界的に分布し、そのコンポスト作製能力や旺盛な繁殖力から広く養殖されている。経済協力開発機構(OECD)は、特に *E. fetida* と *E. andrei* を土壌汚染の生物毒性試験のモデル生物に指定しているが、*E. fetida* を *E. foetida* と記載している文献も散見され、混乱が生じていた(当初は筆者も別種だと混同していた)。しかも、この2種は形態解析だけでは区別が付きにくく、遺伝子解析とセットで同定する必要があるが、ミミズの遺伝子情

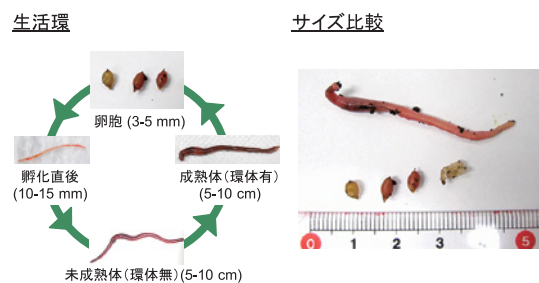


図2. *Eisenia fetida* の生活環

\* 著者紹介 長岡工業高等専門学校物質工学科(准教授) E-mail: s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp

報による同定においては18S rRNA解析もあれば、COI領域での解析もある。一体どうすればよいのだろうか？近年、これらの分類においてはCOIでの解析が推奨されたことから<sup>3)</sup>、筆者らの研究室でもこの分類法に従い、日本のいくつかの養殖場におけるミミズを形態学および遺伝学的に同定した<sup>4)</sup>。さらに、採取地により同じミミズでも酵素活性が異なることが報告されていたが、ミミズには株名がついていないものが多く研究の支障となっていた。そこで、筆者らは今後の研究のために株名を付与して研究を進めることを提唱している<sup>4)</sup>。

### ミミズが有する消化系酵素群

次に、ミミズが有する各種機能性酵素について紹介したい。1920年にKeilinらはいくつかのミミズからカゼイン、ゼラチン、アルブミンを分解するプロテアーゼを見いだし<sup>5)</sup>、1951年にTraceyはバイオマスを分解できるセルラーゼやキチナーゼの存在を報告している<sup>6)</sup>。他にもアミラーゼやリパーゼの存在も報告されており、これらの酵素は消化系酵素として我々の健康にも有用であるだけでなく、バイオマス資化にも有効である。近年は特にバイオリファイナリーの推進が叫ばれ、バイオマスの利活用が望まれている。そこで、本分野に関連する酵素についてまず紹介する。

アミラーゼはもっとも重要な糖化酵素の一つである。Uedaらは*E. fetida*に存在する二つのアミラーゼを同定し、これらの酵素は10°Cという低温でもデンプンに作用する低温耐性酵素であることを報告し、低エネルギーバイオマス資化の可能性を報告している<sup>7)</sup>。

もう一つの主要な糖化酵素としてセルラーゼがあげられる。セルロースは地球上に豊富に存在するバイオマス資源であり、食糧と競合しないことから有望な資源とされている。しかしながら、分解が困難であることからより強力な酵素が求められており、さまざまな生物におけるセルラーゼが盛んに研究されている。

*E. fetida*におけるセルラーゼの一種であるエンドグルカナーゼは、アミラーゼと同様低温で高活性であることが報告されており<sup>7)</sup>、2013年にはArimoriらによって立体構造も明らかにされている<sup>8)</sup>。

筆者らも*E. fetida* Wakiにおけるエンドグルカナーゼ(*EfEG1*)について詳細に研究しており、*EfEG1*の比活性は非常に高く、粗酵素溶液を用いた小麦フスマの糖化において、グルコースを良好に産出可能であることなどを明らかにしている<sup>4)</sup>。

さて、それではこれらの酵素は一体どこに存在しているのだろうか？表1は*E. fetida* Wakiにおける各種酵素活性の分布状況を調べたものである。図3と併せて見比べると、Segment 2がもっとも多くの酵素を有しており、活性も強いことがわかる。これはこの部分にミミズの各種臓器が存在していることに由来すると考えられる<sup>4)</sup>。実際、近年Nozakiらは*Pheretima (Metaphire) hilgendorfi*におけるエンドグルカナーゼ(*phhEG*)が腸に存在することを報告し微生物由来ではないことを証明している<sup>9)</sup>。

リパーゼに関しては、2005年にNakajimaらがアカミミズ*Lumbricus rubellus*における血栓分解酵素として当初見いだされたIsozyme Cが、リパーゼ活性を有していたことを報告している<sup>10)</sup>。

表1. *E. fetida* Waki各領域より抽出した粗酵素液のプレートアッセイ

Substrate	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	Segment 5
CMC	++	+++	++	+	+
Lichenan	++	++	++	+	+
Laminarin	++	++	++	-	-
Birchwood xylan	++	+++	++	-	-
Oat spelt xylan	++	+++	++	-	-
Xyloglucan	-	-	-	-	-
AZCL-β-glucan	+++	+++	+++	-	-
AZCL-β-1,3-glucan	-	+++	-	-	-
AZCL-amylose	++	+++	++	-	-
AZCL-arabanan	-	-	-	-	-
AZCL-galactan	-	-	-	-	-
AZCL-mannan	++	+++	+++	-	-
AZCL-xylan	-	-	-	-	-

Protein content of each sample was 9.51 μg. Activity: +++, clear or colored circle diameter > 10 mm; ++, diameter 5–10 mm; +, diameter under 5 mm; -, not detected.

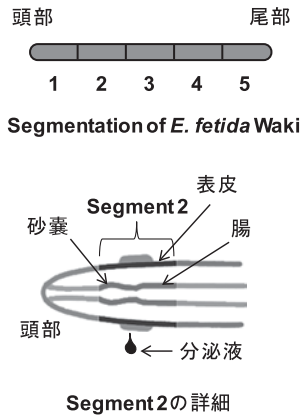


図3. 頭部領域の構造

### ミミズが有する血栓分解酵素

ミミズは古来、熱沈痛の漢方として用いられていたが、医学分野で大いに注目されるきっかけとなったのが、血栓分解酵素の発見である。血栓は一度できると脳梗塞や心筋梗塞など重篤な疾患につながることから、血栓溶解作用を持つ酵素や物質は医学的に重要な意味を持つ。ミミズにおける血栓分解酵素は、19世紀末にFrédéricqがその存在を示し<sup>11)</sup>、1991年にMiharaらが*L. rubellus*における血栓分解酵素の詳細を報告し、ルンブルキナーゼと名づけている<sup>12)</sup>。その後、他のミミズについても調査され、*L. rubellus*だけではなく、*E. fetida*の酵素についても盛んに研究されている。

血栓分解のメカニズムとして、いくつかの経路が提唱されているが、血栓を直接分解する経路、血栓を間接的に分解する経路に大きく分けられる(図4)。ミミズ血栓分解酵素はこのどちらの活性も有することが報告されている<sup>12)</sup>。*L. rubellus*には6種のアイソザイムが見いだされており、分子量は23,000~30,000であり、熱安定性が高いことが特徴である。さらに、これらのアイソザイムのいくつかは室温放置で少なくとも5年以上血栓分解活性を有するという驚くべき安定性を有し、高い有機溶媒耐性も有していることが報告されている<sup>12-14)</sup>。*E. fetida*には7-8種類アイソザイムが見いだされているが、こちらも*L. rubellus*同様に高活性であることがわかっている<sup>15,16)</sup>。さらに、Miharaらは*L. rubellus*の乾燥粉末を人と動物に経口投与したところ、血栓分解効果が認められたと報告している<sup>17)</sup>。また、ルンブルキナーゼの抗血栓作用について、Hwangらは人工血管にこれらの酵素を塗布または結合させ、その抗血栓作用について検討している。その結果、酵素を共有結合させたものについては移植後4週間経過した後も血栓の形成は認められ

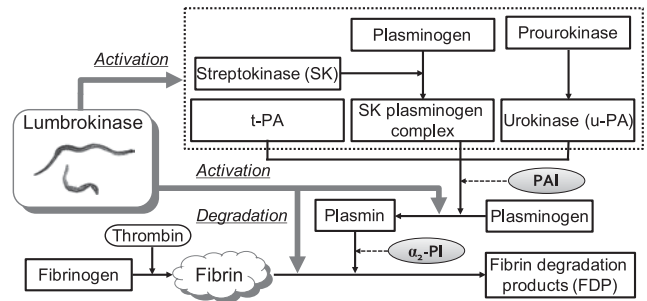


図4. 血栓分解機構とルンブルキナーゼの作用。血栓分解酵素 lumbrokinase は血栓 (fibrin) を直接分解するだけでなく、さまざまなアクチベーターを活性化し間接的に分解することが報告されている。

なかったと報告している<sup>18)</sup>。

### ミミズ健康食品の開発と多様な機能性

ミミズ乾燥粉末中の血栓分解酵素は、非常に安定であることから、サプリメントの開発が行われるようになり、広くアジアで販売されるようになった。しかしながら、当初の製法は工程の最後に熱で殺菌する必要があったことから活性の低下が避けられなかった。そこで、筆者らは圧力を活用した新規製法を開発し<sup>19)</sup>、国内外で特許を取得し<sup>20,21)</sup>、上市することに成功した(図5)。同製法により開発したサプリメントは、動物への有効性も確かめられ<sup>22)</sup>、医療費抑制につながる予防医療に少しは貢献できたのではと考えている。

ミミズ粗酵素溶液中には、血栓分解作用だけでなく、抗ガン・抗腫瘍作用があることも報告されている<sup>23,24)</sup>。どうしてミミズはこのような多様な機能性酵素・物質を有しているのか? 血栓分解酵素の生理学的な機能は? これらを解き明かすには遺伝子導入・破壊など遺伝子工学ツールの充実が不可欠である。しかしながらミミズはこの分野で他の生物と比べ大きく後れている。

### 遺伝工学ツールの開発と「スーパーミミズ」の誕生!?

前述の通り、本稿で紹介している比較的大きなミミズに関しては形質転換技術が確立されていなかった。そこで、筆者らはOECDが生物毒性試験のモデル生物と認め、容易に入手できる*E. fetida*を用いた遺伝子工学的手法の開発に着手した。本ミミズで遺伝子工学的手法を開発すれば、OECDのモデル生物として研究が加速されるだけでなく、微生物~高等動物をつなぐ新たなモデル生物ともなり得る。さらに、ミミズは翻訳後修飾も行うことから、バイオ医薬品を生産できる可能性があると考え、本研究に取り組んだ。





図5. ミミズを原料としたサプリメントの開発（企業との共同開発商品）

当面の目標として遺伝子導入法の開発に主眼を置いた。研究に取り組み始めて1年が経過したころ、韓国のKimらがまったく別のミミズであったが形質転換の特許を出願したことがわかった<sup>25)</sup>。当時、かなりショックを受けたことを鮮明に覚えている。しかしながら、種族や生殖方法も異なり日本では入手困難であったことから、諦めずに、研究を続けていくことにした（実は同じようなことが博士課程時代にもあり、まさにデジャブのようであった）。その結果、特許出願を果たし、晴れて科研費（挑戦的萌芽15K14713）にも採択され、昨年の生物工学会で初の学会発表を実施するに至った<sup>26)</sup>。その結果、多くの見学者に来ていただき、予想以上に反響があった。これには筆者、学生ともども大いに驚き、嬉しかったことを覚えている（お陰様でこちらに寄稿することができた）。まだまだ形質転換効率は高いとはいえないが、この1年で当初の倍に達し、現在これら一連の成果を鋭意まとめているところである。

現在は、まったく新しいコンセプトでの形質転換法の開発にもチャレンジしており、さらなる効率の向上を図るとともに、バイオ医薬品が生産可能か検討している。

ミミズは重金属除去能力も高く、土壌・水源汚染改善の観点からそのメカニズムが注目されている<sup>27)</sup>。遺伝子工学的手法はこれらの解明にも不可欠であり、潜在的な応用分野は広い。本技術の進展により、土壌環境の改善や人の健康増進・予防医療にまで貢献する「スーパーミミズ」が近い将来誕生するかもしれない。

### おわりに

最後に述べた研究は数年もの間何も成果が出なかった。このようなテーマに果敢にチャレンジしてくれた高

専の学生に感謝したい。

ミミズは想像以上に多様な機能を持っており、これらの機能を解き明かすには遺伝子工学ツールの充実化が必須である。また、筆者らは少し大きめの新たなモデル動物にもなるのではないかと考えている。今後も遺伝子工学ツールの開発に精力的に取り組み、ミミズの機能性について多面的に解明していきたい。

### 謝 辞

研究の一部は、JSPS科研費15K14713、科学技術振興機構研究成果最適展開支援事業（JST A-STEP）231Z03721およびAS251Z02531Lなどの助成を受けて実施した。

### 文 献

- 1) Darwin, C.: *The Formation of Vegetable Mould, through the Action of Worms, with Observations on their Habits*, John Murray, London, UK (1881).
- 2) Edwards, C. A. and Bohlen, P. J.: *Biology and ecology of earthworms*, Springer Science & Business Media (1996).
- 3) Römbke J. et al.: *Appl. Soil Ecol.* **104**, 3 (2016).
- 4) Akazawa, S. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 55 (2016).
- 5) Keilin, D.: *Q. J. Microsc. Sci.* **2**, 33 (1920).
- 6) Tracey, M. V.: *Nature*, **167**, 776 (1951).
- 7) Ueda, M. et al.: *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **150**, 125 (2008).
- 8) Arimori, T. et al.: *J Synchrotron Radiat.*, **20**, 884 (2013).
- 9) Nozaki, M. et al.: *Soil. Biol. Biochem.*, **41**, 762 (2009).
- 10) Nakajima, N. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2009 (2005).
- 11) Frédéricq, L. et al.: *Archiv. Zool. Expériment. Générale*, **7**, 391 (1879).
- 12) Mihara, H. et al.: *Jpn. J. Physiol.*, **41**, 461 (1991).
- 13) Nakajima, N. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 1726 (1993).
- 14) Nakajima, N. et al.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **23**, 191 (2003).
- 15) Wang, F. et al.: *Biotechnol. Lett.* **25**, 1105 (2003).
- 16) Wu, J. X. et al.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **40**, 399 (2007).
- 17) Mihara, H. et al.: *Recent Advan. Thromb. Fibrinol.*, **287** (1990).
- 18) Hwang, C. et al.: *J. Cardiovasc. Surg.*, **43**, 891 (2002).
- 19) 渡邊俊則ら: *Food style* **21**, **18**, 19 (2014).
- 20) Akazawa, S., Wakimoto, S., and Watanabe, T.: *Japan. Patent*, 5548931 (2014).
- 21) Akazawa, S., Wakimoto, S., and Watanabe, T.: *U.S.A. Patent*, US9089581 (2015).
- 22) Akazawa, S. et al.: *The 6th Federation of Asian Small Animal Veterinary Associations Congress. Taipei, Taiwan* (2015).
- 23) Zhang, F. and Wang, K.: *J. Fourth Military Med. Univ.*, **8**, 224 (1987).
- 24) Zeng, X. et al.: *J. Shanxi Med. Univ.*, **18**, 81 (1995).
- 25) Kim, H. K. et al.: *U.S.A. Pat. Appl. Pub. No. US2012/0123100A1* (2012).
- 26) 赤澤真一: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 95 (2015).
- 27) Stürzenbaum, S. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, **276**, 34013 (2001).