

研究目的と実施内容

[研究目的]

生命現象の基本となる大量の遺伝子の働きや構造に関する網羅的な研究であるゲノミクスに関連する技術が、近年飛躍的に進歩している。本研究では、ゲノミクスの方法論を用いた毒性影響研究であるトキシコゲノミクスを活用して、新たな環境汚染物質の生体影響および生物影響評価法を開発し、その有効性を検証し、影響評価法の飛躍的効率化や高精度化、およびトキシコゲノミクスによる環境保全のための科学的データの提供を可能とするための研究を行う。

[緊急性・必要性・環境研究における位置づけ]

近年のアレルギー増加の例にみられるように、ヒトの健康は明らかに環境の影響を受けて変化している。その主たる原因は明らかにされていないが、環境中の有害化学物質や大気汚染物質の関与が強く示唆されている。そこで環境汚染物質からヒトの健康を守るために、汚染物質の毒性評価を早急に行い、対策を立てることが必要である。しかし、多種類の環境汚染物質の生体影響を個々に評価するためには莫大な労力が必要であり、実際には影響評価が行われていない多くの化学物質や環境汚染物質が存在する。近年開発され、めざましく進歩しているゲノミクス技術の利用は、従来不可能であった多種類の汚染物質の生体影響評価を可能とすることが期待される。同じく多種類の汚染物質は大気や水、土壌を汚染し、生態系にも深刻な影響を及ぼすことが考えられる。トキシコゲノミクスの活用は、これらの悪影響の検出を大きく効率化し体系化することを可能にするばかりでなく、悪影響が顕在化する以前に影響を検出し予測することをも可能にする

と期待される。本研究では、遺伝子発現変化の解析によってどこまで生体の反応や生物影響を検出できるか等のトキシコゲノミクスの有効性の検証を行い、多種多様な環境汚染物質のヒトや生物への影響の新たな総合的・体系的な評価法確立に寄与することによって、ヒトの健康保持や環境保全への貢献をめざしている。

[実施内容]

全体計画 下記のサブテーマ1、2では、主にそれぞれ実験動物や生物への影響がこれまでの研究で明らかになっている汚染物質を対象として、その影響と遺伝子発現変化との関係を明らかし、遺伝子発現変化から生体・生物影響をどの程度検出・予測可能かの検証を行う。生体影響に関しては、実験動物で得られたデータからヒトへの影響を予測するための基礎的研究を行う。また生物影響に関しては、影響検出指標遺伝子を搭載したアレイの作成などによって、有効な使用法の検討を行う。サブテーマ3では、ダイオキシン応答性遺伝子データベースを作成し、このデータベースやサブテーマ1、2の研究で得られるトキシコゲノミクスの環境研究への応用例を紹介する環境トキシコゲノミクスWebページを立ち上げる。

1) サブテーマ1：トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の健康影響の実験的予測法： 免疫系への影響を中心に、環境汚染物質の生体影響をトキシコゲノミクスの手法を利用して検出・評価する方法を開発するための研究を行う。そのために環境汚染物質の実験動物への曝露によって種々の免疫臓器・免疫細胞で発現が変化する遺伝子群を明らかにし、それらの遺伝子群の中から生体影響と密接に関係して影響評価の指標となるものを選択し、トキシコゲノミクスの有効性を検証する。さらにダイオキシンについては、ヒトと実験動物での影響の違いや種差のメカニズムを検討する。

2) サブテーマ2：トキシコゲノミクスによる生物影響の検出に基づく環境影響評価法： 種々の環境汚染物質が植物に及ぼす影響を、毒性が現れる以前に定量的・定性的に検出するのに適した遺伝子群を選抜してDNAアレイを作成し、大気や水の汚染を生物影響に基づいて検出・評価するための実験系を開発する。また環境汚染物質が土壌や水環境中の微生物群集に及ぼす影響を遺伝子解析によって群集構造として明らかにする方法や、影響評価の指標となる微生物の高感度検出技術の開発を行う。環境汚染物質の作用により魚類に発現する遺伝子を網羅的に解析し、特異的なバイオマーカー開発に資する研究を行う。

3) サブテーマ3：環境研トキシコゲノミクスデータベースの作成： ダイオキシン暴露によって発現が変化する遺伝子データを収録し、また各種解析が可能なツールを搭載したダイオキシン応答性遺伝子データベースを作成する。このデータベースや、トキシコゲノミクスの環境研究への応用例等を紹介した環境トキシコゲノミクス Web ページを立ち上げ、一般に公開する。

研究予算

(単位：千円)

	H16	H17	H18
サブテーマ1	12,000	12,000	15,500
サブテーマ2	10,500	10,500	8,000
サブテーマ3	2,500	2,500	1,500
合計	25,000	25,000	25,000

総額 75,000 千円

研究成果の概要

サブテーマ 1 :

1-1. 環境汚染物質の免疫系への悪影響の遺伝子発現変化からの検出・予測に関する研究

胸腺は、重要な免疫細胞であるTリンパ球（T細胞）の分化・成熟の場となる免疫臓器である。また胸腺は環境からの影響を受けやすく、多くの環境化学物質が胸腺萎縮作用をもつことが知られている。胸腺萎縮作用をもつ化学物質の多くは免疫機能抑制作用を示すことが報告されている。そこで、各種環境化学物質による免疫系への悪影響を、トキシコゲノミクスを利用した胸腺の遺伝子発現の網羅的解析から予測する方法の有効性について検討した。

マウスに胸腺萎縮作用を持つことが知られているダイオキシン、無機ヒ素（ NaAsO_2 ）、PFOS、有機スズなどの環境汚染物質や、エストロゲン（E2）、合成グルココルチコイド（GC）ホルモンであるDEXを投与し、胸腺の遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。その結果、各汚染物質やホルモンがそれぞれ異なる経路で胸腺萎縮をおこすことが示唆された。特に無機ヒ素については、リンパ球細胞株での検討を含めて、無機ヒ素が転写因子E2F1の機能を抑制し胸腺T細胞の細胞周期を抑制することによって胸腺萎縮を誘導するという分子経路をあらたに明らかにした。無機ヒ素はGCの分泌を介して胸腺萎縮をおこすことが報告されていたが、本研究の結果では無機ヒ素とGCはそれぞれ異なる経路で胸腺萎縮をおこすことが示唆された。また無機ヒ素は胸腺細胞の主要な細胞群であるDP細胞に影響を及ぼすことがと考えられたが、ダイオキシンは胸腺の中でごく少数の細胞群であるDN細胞に影響を及ぼして胸腺萎縮を誘導することが遺伝子発現解析から示唆された。

これらの結果から、胸腺での遺伝子発現変化の網羅的解析が、環境汚染物質の胸腺および免疫系への悪影響の検出や、影響の分子経路や標的となる細胞群の同定に有効であることが示された。また免疫系への影響が未知の環境汚染物質の影響予測にも有効であることが示唆された。

その他、各種免疫細胞においてダイオキシン曝露によって発現変動する遺伝子を明らかにし、ダイオキシンの影響検出指標となる遺伝子候補を明らかにした。

1-2. ダイオキシンによる細胞増殖抑制の原因遺伝子の探索

T細胞はダイオキシンによる免疫毒性の主要な標的細胞のひとつである。ダイオキシンによる転写因子AhRの活性化によって遺伝子発現が変化しT細胞の増殖抑制がおこることが免疫毒性につながると考えられている。この免疫毒性経路に密接に関与する遺伝子の同定にT細胞株の利用が有効と考えられるが、生体内のT細胞は正常のAhRを発現しているのに対して、これまで調べられたT細胞株はすべてAhRの機能が欠損していた。そこで恒常的活性化型AhRを発現させたT細胞株を作成し、AhRの活性化

によって発現が変化する遺伝子の検索を行った。T細胞株に活性化型AhRを発現させることによってアポトーシスや細胞周期抑制に関係する遺伝子の発現変化が検出された。これらの遺伝子をT細胞株に強制発現させることによって細胞増殖抑制との関係を調べた結果、増殖抑制の原因であることが示唆される遺伝子を明らかにした。

1-3. ヒト、マウス、ラットリンパ球における遺伝子発現を指標としたダイオキシン感受性の比較

ダイオキシンに対する動物種差は、主に各動物種のAhRとダイオキシンとの親和性によって決まり、ヒトは比較的感受性が低いと考えられている。ヒトと実験動物のダイオキシン感受性を直接比較するために、活性化AhRによって誘導される代表的な遺伝子であるCYP1A1について、ヒト、マウス、ラットでそのmRNAを同一の効率で増幅できるPCRプライマーを設計し、また各動物の血液リンパ球でダイオキシンによるCYP1A1発現量を測定するための至適条件を明らかにした。この実験系を用いてCYP1A1発現量を比較した結果、ヒトのリンパ球では、ダイオキシンに対する感受性が高いと考えられている。C57BL/6マウスやSDラットよりも発現量が高いことが明らかとなった。すなわち、ヒトのリンパ球はダイオキシンに対する感受性が高いことが示唆された。また、リンパ球にはAhRの親和性以外にダイオキシン反応性を決定する因子があり、影響の種差を考える上で考慮すべきであることが示唆された。

1-4. ヒトとマウスにおけるダイオキシン感受性の種差決定因子に関する研究

実験動物のデータをヒトへ外挿するための基礎資料とするため、ダイオキシンに対するヒトと実験動物の感受性に影響を与える因子として、AhR-ダイオキシン親和性以外の因子を明らかにすることを目的として研究を行った。ダイオキシン親和性のAhRを発現するC57BL/6マウス由来の肝臓ガン細胞Hepa1c1c7と、ダイオキシンと低親和性のAhRを発現するヒト由来の肝臓ガン細胞HepG2でのダイオキシンによるCYP1A1 mRNA誘導量は、ダイオキシン曝露4時間以降ではHepa1c1c7とHepG2とでほぼ等しくなり、ダイオキシンとAhRの親和性に対応しなかった。この原因として、核内に移行したAhRの分解速度がHepG2よりHepa1c1c7で速く、Hepa1c1c7でのCYP1A1 mRNA誘導の抑制に関与していることが示唆された。また、ヒストン脱アセチル化酵素の一種であるHDAC1のCYP1A1プロモーター領域への結合タイムコースが異なることもCYP1A1 mRNA誘導を調節している要因の1つであることが示唆され、これらがヒトとマウスのダイオキシン感受性の決定に重要な因子であると考えられた。

サブテーマ2 :

2-1. DNAアレイを用いた植物への環境ストレス影響評価手法の開発

4種類の環境ストレスに特異的に応答する遺伝子を単離し、特異性の高い植物の環境診断用のDNAアレイの作製を試みた。シロイヌナズナにおいてオゾン(0.2 ppm)、紫外線(290~315 nm)、酸性雨(人工酸性雨、pH5)、SO₂(1 ppm)の各ストレスに対して特異的に発現する遺伝子を単離する目的でこれらのストレスを1時間及び6時間与えた植物からtotal RNAを単離し、Affimetrix社のGene Chip Arabidopsis ATH1 Genome Arrayを用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、各ストレスで対象区に比べ発現量が1時間で3倍以上増加し、且つその増加が6時間目まで続いた遺伝子を多数単離することが出来た。そのうち、それぞれのストレス特異的に発現上昇する遺伝子がオゾン、紫外線、酸性雨、SO₂暴露により15個、76個、9個、31個あることが明らかになった

次にこれらの遺伝子が本当に各ストレス特異的に発現応答するのかについての検証を行った。シロイヌナズナからcDNAを単離し、93種類の遺伝子を得ることができた。これらを用いてサブセットcDNAマイクロアレイの作製を行った。その結果、オゾン、酸性雨、SO₂、紫外線に対し、それぞれ10個、7個、19個、25個の遺伝子の発現が特異的に起こっていることが確認できた。

次にこれらの遺伝子を用いて植物へのストレス診断ができるかどうかの検証を行った。各ストレスで特異的に発現増加すると考えられる遺伝子のうち、ストレス処理していない植物(コントロール)に対して発現上昇の割合が高い上位4種類(紫外線は3種類)の遺伝子をピックアップしてミニマイクロアレイを作製した。その結果、オゾンで1種類、SO₂で2種類、紫外線で2種類の遺伝子が明らかに特異的に応答する遺伝子があることが判った。違うロットのサンプルでもほぼ全て問題なく使用できることから今回作製したミニマイクロアレイは少なくともオゾン、SO₂、紫外線ストレスを区別できる事が判った。

2-2. 環境微生物DNAマイクロアレイの開発とDNAマイクロアレイを用いた有害化学物質の影響評価

2-2-1. 微生物群集構造解析用DNAマイクロアレイの作成

今回作製した微生物群集構造解析用DNAマイクロアレイを用いることで、PCRによる遺伝子増幅なしで、直接抽出した細菌由来のrRNAを検出することができた。DNAマイクロアレイの最適操作条件を検討し、この条件で、16種類の純菌から抽出したrRNAを用いた解析を行った。その結果から、作成したDNAマイクロアレイ上のプローブのハイブリダイゼーション特性が明らかになり、得られたシグナルを正確に評価するための知見を得ることができた。続いて細菌群集構造が16S rRNAクローンライブラリー解析によって決定されている貴金属回収工場排水由来の活性汚泥試料を用いて、DNAマイクロアレイの微生物群集構造解析への適用を試みた。その結果、クローンライブラリー解析から存在が確認されている微生物グループをDNAマイクロ

アレイで検出することが可能であった。以上の検討の結果、今回作成したアレイの有用性を確認できた。

2-2-2. DNA マイクロアレイを用いたアンモニア酸化細菌への直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) の影響評価

アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas europaea* の全ゲノム配列が解読され、網羅的な遺伝子発現解析を DNA マイクロアレイで行うことが可能となった。そこで、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) に対する *N. europaea* の挙動を mRNA レベルで解明することを目的として研究を行った。DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析により、LAS 添加後、約 30 種類の遺伝子が発現強度を増大させた。その中で特にアンモニア酸化、細胞膜形成、ストレス応答に関係のある遺伝子が強く発現した。さらにリアルタイム PCR により、DNA マイクロアレイで発現が確認された遺伝子の発現量を定量し、LAS 添加による発現量の増大を確認した。これらのことから、*N. europaea* は 10 mg/L の LAS を添加すると、細胞膜が破壊され、増殖および亜硝酸の生成が停滞し、2 日後にはアンモニア酸化、細胞膜形成に関する遺伝子が発現し、代謝エネルギーの獲得および細胞膜の形成が行われ、LAS によるダメージの回復を図ると考えられた。

2-3. 培養可能な微生物遺伝子の網羅的解析による土壤生態系への影響評価法の開発

有害化学物質の土壤環境への影響を評価するうえで、微生物生態系の解析は非常に重要であるが、多くの有害化学物質が土壤中の微生物群集に及ぼす影響の知見は未だに少ない。そこで、重金属類の塩化第二水銀および揮発性有機塩素化合物のトリクロロエチレン (TCE) で汚染した土壤マイクロコズムを用いて両汚染物質が土壤微生物群集に及ぼす影響を明らかにするとともに、培養可能な微生物に注目した汚染土壤の影響評価法の開発を試みた。

まず、塩化第二水銀および TCE で汚染した土壤中に存在する微生物の数を測定した。その結果、両者の微生物数はそれぞれの汚染濃度の違いによる影響もなく経時的に一定だった。次に、汚染土壤に存在する全微生物群集 (土壤サンプル) とその培養可能な微生物群集 (Plate Wash サンプル) への影響を明らかにするため、PCR-DGGE 解析を行った。さらに、多次元尺度法を用いた統計処理により微生物群集の変動を解析した。その結果、塩化第二水銀および TCE 汚染の影響による、土壤サンプルの微生物群集の変動は経時的に小さかったが、Plate Wash サンプルでは約 0-50 日目の期間に微生物群集は大きく変動していることが認められた。土壤サンプルでは確認しにくかった両汚染物質の影響が、Plate Wash サンプルを用いることで初めて明確になり、本解析法の有効性が示唆された。

次いで、DGGE ゲルからバンドを切り出して特徴的な微生物群集の系統解析および同

定を行った。塩化第二水銀汚染により、微生物群集の系統は4門に分類され (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*)、塩化第二水銀の及ぼす影響は微生物系統(門)で異なることが示唆された。汚染土壌に存在する特徴的な微生物として *Duganella violaceinigra*, *Lysobacter koreensis*, *Bacillus panaciterrae*が同定された。一方TCE汚染では、微生物群集の系統は3門に分類されたが (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*)、TCEの及ぼす影響と微生物系統との間に相関関係は認められなかった。汚染土壌に存在する特徴的な微生物として *Paenibacillus kobensis*, *Paenibacillus curdlanolyticus*, *Paenibacillus wynnii*, *Sphingomonas herbicidovorans*が同定された。これら特徴的な微生物群集は各汚染物質の分解代謝に関与していると考えられた。

2-4. PPAR結合性化学物質の魚類への影響の遺伝子発現解析からの探索

PFOR (パーフルオロオクタン酸) などの高フッ素化脂肪酸は生分解性が低いため、その生態影響が懸念されている。PFORはげっ歯類でパーオキシゾーム増殖因子受容体 (PPAR) に結合し、パーオキシゾーム増殖因子 (PP) 活性を示すが、魚類に対しての作用の検討は充分に行われていない。PFORとその同族体が魚類においてどのような遺伝子を発現するかを明らかにすることによって、PFORの生態毒性のメカニズムを解明するために必要な知見が得られ、また、環境からの曝露のバイオマーカーが見出せることが期待される。

本研究では、PFORとその同族体パーフルオロヘキサン酸 (PFHA)、および陽性対照として 3,4,5,3',4'-ペンタクロロビフェニル (PenCB) を曝露したメダカに発現される遺伝子を、DNAアレイを用いて同定した。メダカを採用した理由は、1) 化審法の生態毒性試験の試験動物であること、2) わが国固有の生態系を代表する魚類であること、3) 既の実験動物として馴化されておりゲノムプロジェクトも進んでいること、である。

1群5匹のオスのメダカをPFOR、PFHAあるいはPenCBを含む人工海水中で飼育した。曝露終了後、氷冷下で解剖し腓肝臓とエラを摘出し5匹の腓肝臓をまとめて総RNAを抽出し、遺伝子発現パターンをNimbleGen systemのメダカアレイ (NANDEMO ARRAY) を用いて解析した。対照群に比べて、1.5倍以上の遺伝子発現が認められた場合を陽性反応とした。

解析の結果、PFOR曝露では、PFHA やPenCB では発現しない特徴的な遺伝子発現が認められ、PFOR曝露の特異的なバイオマーカー候補となる遺伝子が明らかとなった。またメダカへのPFOR曝露では、PPの作用によりげっ歯類で発現する脂質代謝酵素の発現は認められず、PFORのメダカへの作用様式がげっ歯類とは異なることが示唆された。

サブテーマ3 :

ダイオキシン応答性遺伝子データベースは、ダイオキシン類曝露による遺伝子発現変動解析を集積し、外部閲覧者が容易に実験データを検索できるシステムを公開データベースとして構築することを目的とした。開発のコンセプトとして、単に2つのマイクロアレイ比較結果ファイルを格納するだけでなく、以下のような多岐にわたる体系的データマイニング機能を搭載したソフトウェア化を目指した。1) 格納された解析結果がどのような目的の実験のなかで実施されたのか詳細を容易に検索できる。2) 今後データが大幅に拡大した場合、使用した化合物の種類や用量、実験動物あるいは細胞株によって実験系の検索が行える。3) 興味のある遺伝子の変動した実験系について、遺伝子の一般的名称や複数の公共データベースIDによって検索できる。4) 異なる実験系で実施された比較解析結果間をマルチプルに比較検討できる。5) 用量反応関係を検討できる実験系を抽出し、遺伝子ごとの用量反応関係を瞬時にグラフ化できる。6) 各遺伝子のゲノム情報のマスターデータベースを準備し、シスエレメントのゲノム内位置情報を提示できる。7) 存在する特異エレメントのゲノム内位置情報を多数の遺伝子間で比較したデータを提示できる。8) 登録された各遺伝子に関して、データベース内に集積してくる対象臓器や細胞株間の発現レベルを比較したグラフを提示できる。これらの機能を実現するため、6種のモジュール(EXPERIMENT、GENE、CURVE、COMPARISON、ELEMENT、DISTRIBUTION)を設け、ユーザフレンドリな環境を構築した。本データベースプロトタイプは、平成17年12月に国立環境研究所ホームページより公開した。

またこのダイオキシン応答性遺伝子データベースや、本研究で行ったトキシコゲノミクス環境研究への応用例を広く公開するためのWebページ「NIEストキシコゲノミクスサイト」を作成した。