



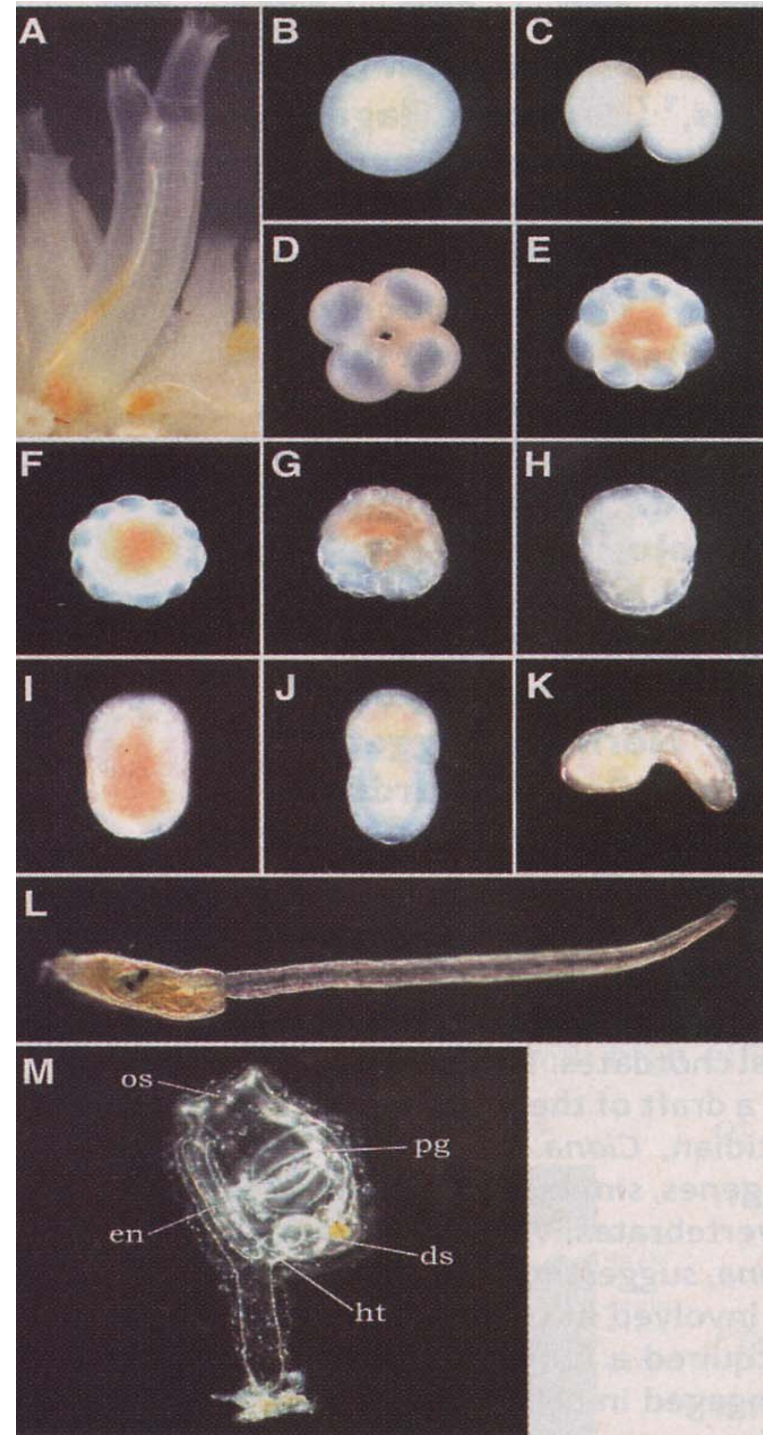
ExTEND公開セミナー2011.12.3

海産無脊椎動物ホヤの
トキシコジェノミクス研究

北海道大学 環境健康科学研究教育センター
安住 薫

Photo by M. Suzuki

ホヤは無脊椎動物から 脊椎動物への移行期の動物



海産実験動物としてのホヤの特徴

1. ホヤは100年以上前から発生学のモデル動物

- ・世界中の海域に棲息・雌雄同体
- ・1匹から大量の卵と精子が採集可
- ・発生様式は脊椎動物と類似



2. ホヤは分子生物学的研究基盤が充実

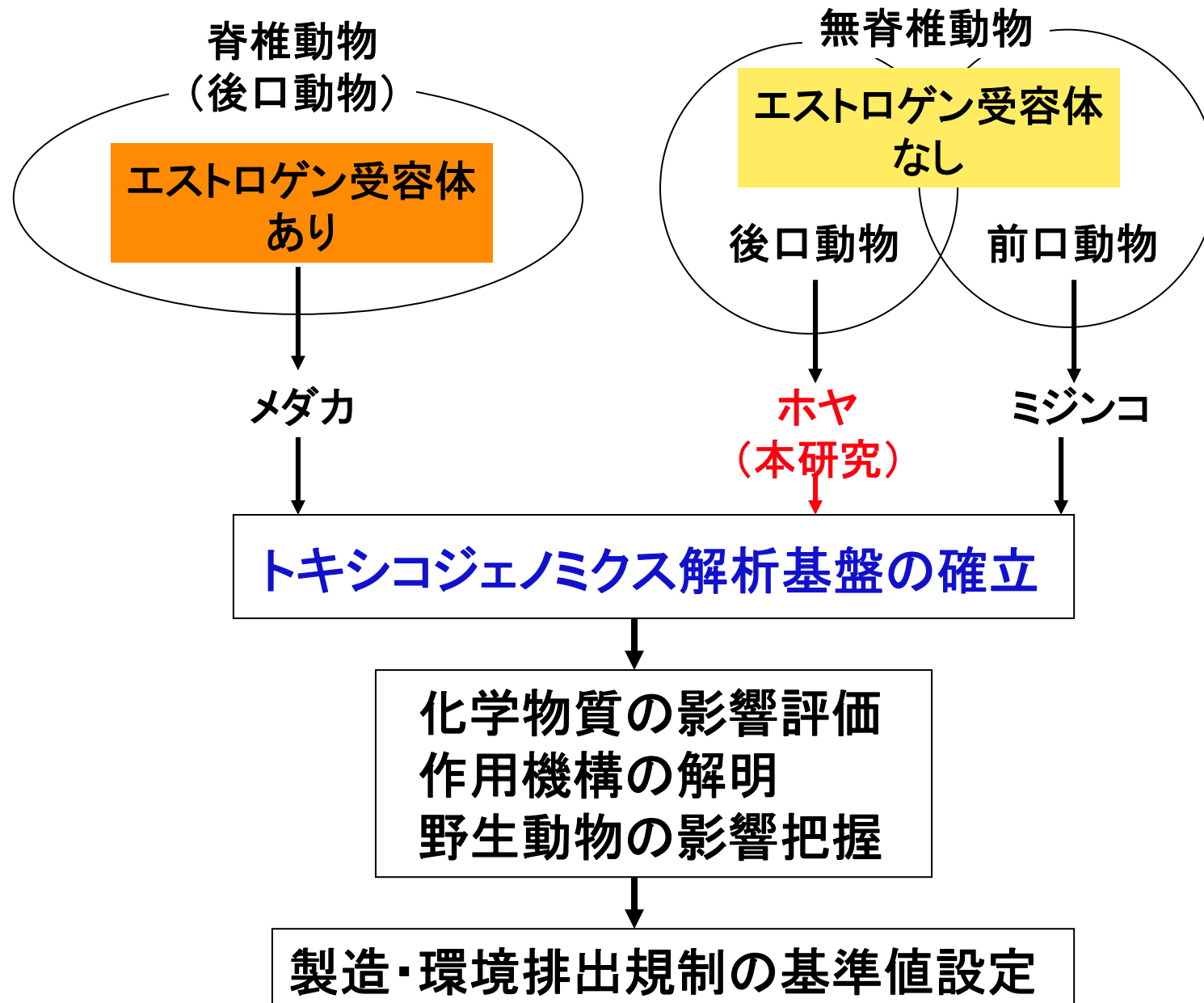
- ・ゲノムの解読, 変異体作製技術
- ・遺伝子発現解析ツール(大規模オリゴDNAマイクロアレイ)

カタユレイボヤ
Ciona intestinalis

3. ホヤは海洋汚染の指標動物となれる

- ・無脊椎動物と脊椎動物の両方の特性
- ・固着動物で泳ぎ回らない
- ・産業国近海では排出される汚染化学物質に常時暴露

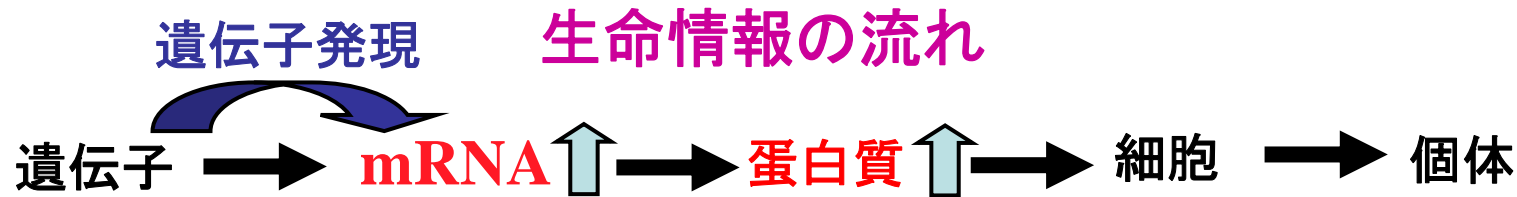
ホヤの解析系の有用性



ExTEND研究課題

- (1) ホヤのトキシコジェノミクス解析基盤の確立と
環境化学物質、重金属の影響評価
- (2) 有機スズの作用機構の解析
- (3) 日本沿岸のホヤ生態調査(アンケート形式)

DNAマイクロアレイを用いた大規模遺伝子発現解析



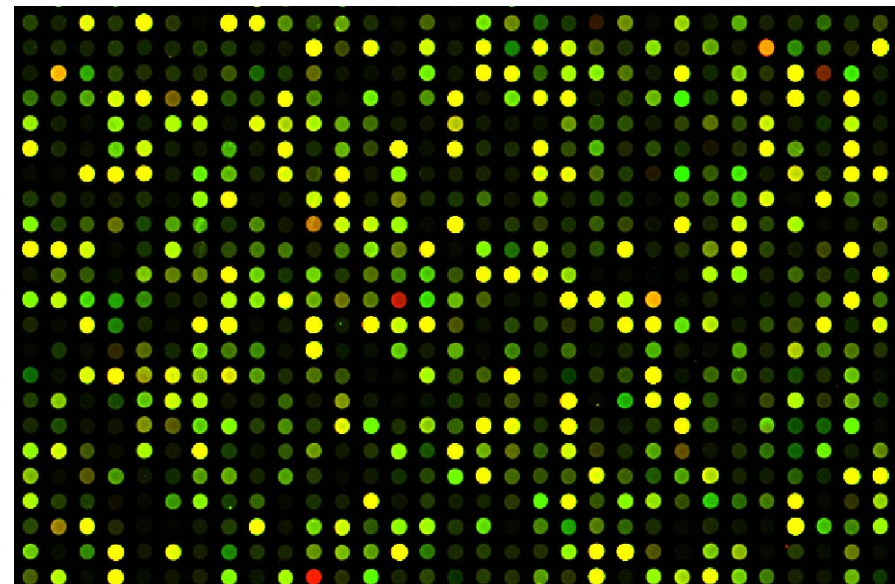
DNAマイクロアレイ(DNAチップ):
多数(数百~数万)の遺伝子断片を1枚の
スライドガラスに貼付けたもの
→細胞や組織のmRNAの種類と量を
網羅的に検出するツール



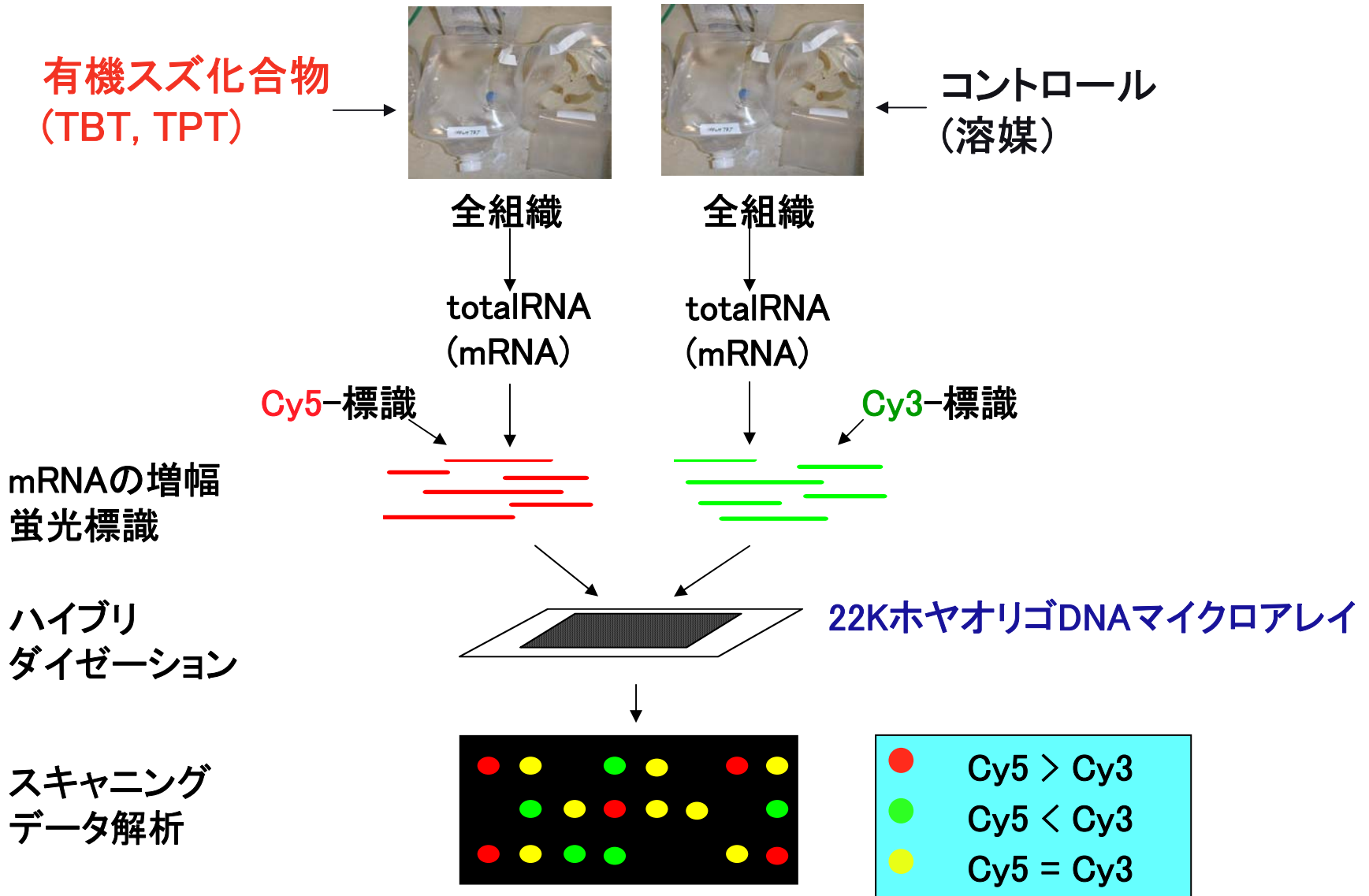
ホヤオリゴDNAマイクロアレイ (アジレント社製)

- ・22Kスポット/1アレイ/1枚
→ 22Kx2/4アレイ/1枚
- ・ホヤ全遺伝子の70%をカバー
- ・海産動物で唯一

CRESTプロジェクト
代表:京大佐藤矩行教授



有機スズ暴露ホヤのDNAマイクロアレイ解析

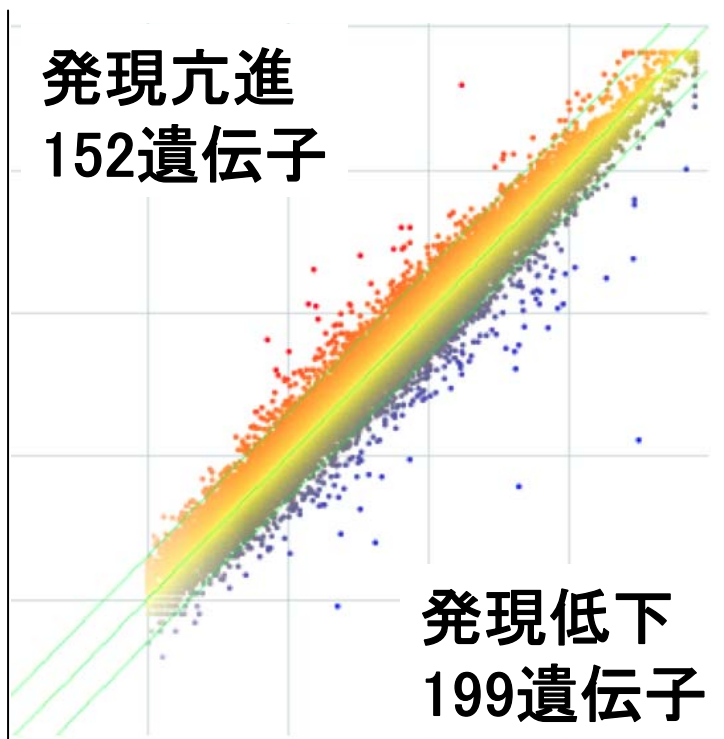


有機スズ感受性のホヤ遺伝子の探索

有機スズ暴露
(50 nM TPT, 24h)

アレイ搭載遺伝子のアノテーション情報

暴露ホヤ (Cy5)



暴露なしホヤ (Cy3)

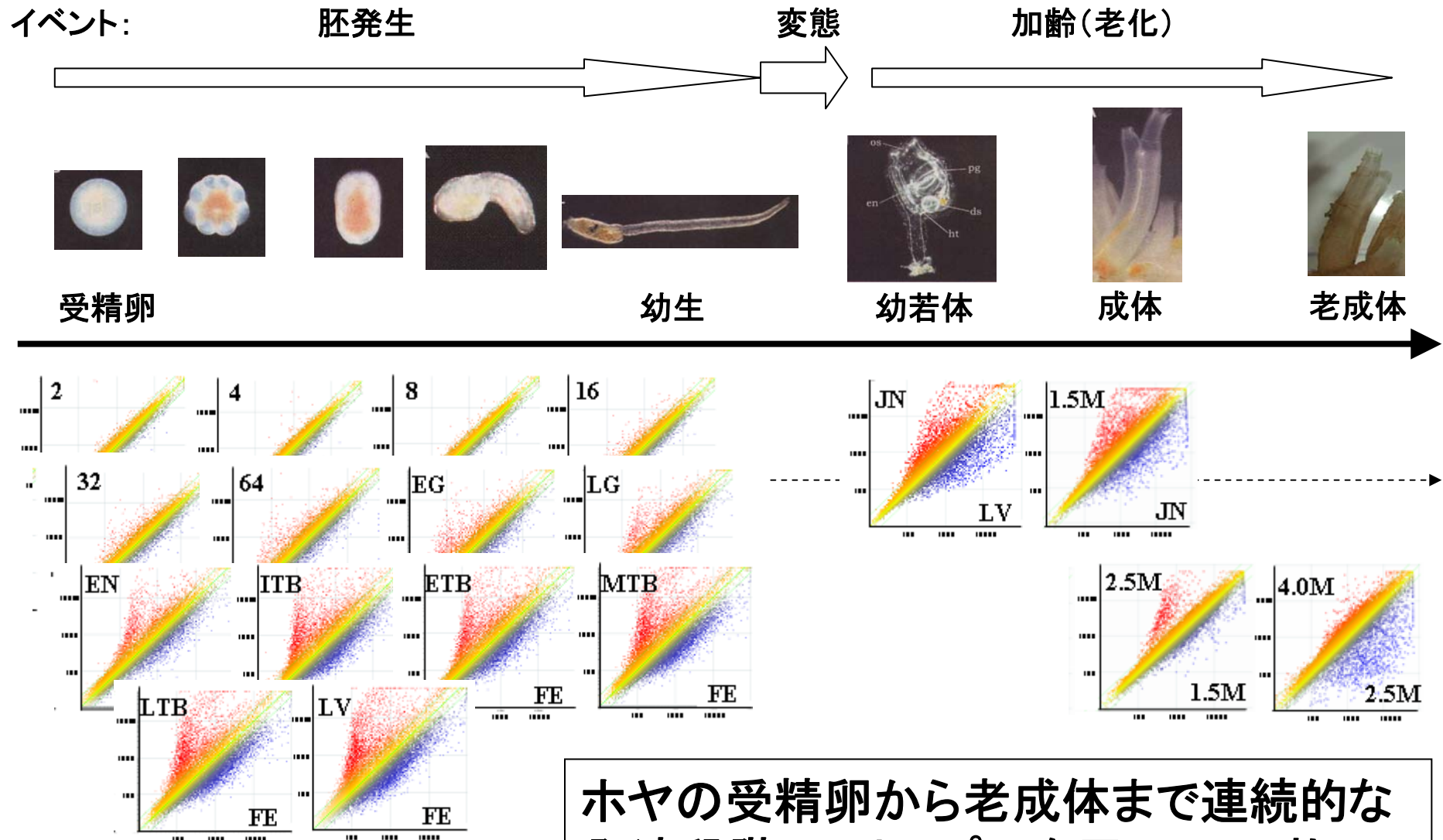
GAL-ID	EST clone	CLSTR-ID	5-CLSTR-JGI	5-JGI-annotation	3-CLSTR-JGI	3-JGI-annotation	eggs(2 cleavir g
745	rciad102b20_con	CLSTR16842	ci0100137209	Best Hit:hsa:114882 OSBPL8; oxysterol bi	ci0100134355	Best Hit:	0 0
746	rciad071i15_com	CLSTR04104	ci0100131862	Best Hit:IP:IP00114298.1 SWISS-PROT:P	ci0100131862	Best Hit:IP:I	1 0
747	rcign067j10_com	CLSTR01971	ci0100153973	Best Hit:pfa:PF07_0058 hypothetical protein	(model%: 93, hit%: 14, score: 1		1 0
748	rcibd012d24_con	CLSTR35236	ci0100146393	Best Hit:IP:IP00057813.3 REFSEQ_XP:XP	ci0100146393	Best Hit:IP:I	0 0
749	rcits041d01_com	CLSTR00416	ci0100142838	Best Hit:gi 6010435 gb AAF01135.1 erythr	ci0100142838	Best Hit:gi 6	23 18
750	rcitb081a09_corr	CLSTR06925	ci0100134907	Best Hit:hsa:117143 STAF42; SPT3-associ	ci0100135717	Best Hit:hsa:	1 2
751	rcieg097h07_con	CLSTR36939	ci0100142171	Best Hit:IP:IP00107186.1 TREMBL:Q9BWC	ci0100142171	Best Hit:IP:I	1 0
752	cieg019d17_20	CLSTR03667	ci0100150195	Best Hit:IP:IP00160481.1 REFSEQ_XP:XP	ci0100150195	Best Hit:IP:I	4 1
753	rcieg031e05_con	CLSTR11809	ci0100130977	Best Hit:IP:IP00169434.1 TREMBL:O7513	ci0100130977	Best Hit:IP:I	9 1
754	rcicl057i17_com	CLSTR00789	ci0100131501	Best Hit:hsa:84749 MGC10702; hypothetic	ci0100131501	Best Hit:hsa:	0 3
755	cieg081g19	CLSTR01703	ci0100151510	Best Hit:spo:SPBC31F10.15c F-type H+ <i>t</i> -c	ci0100151510	Best Hit:spo:	11 3
756	rcilv026b24_com	CLSTR02566	ci0100146223	Best Hit:Q9W3R9 (Q9W3R9) CG1677 protein	(model%: 71, hit%: 18, score: 10		0 0
757	cieg011h04_20	CLSTR07188	ci0100132488	Best Hit:IP:IP00100011.1 REFSEQ_NP:NP	ci0100135906	Best Hit:hsa:	1 2
758	cign045o19	CLSTR11184	ci0100151854	Best Hit:gi 7106477 dbj BAA92182.1 cadherin	[Ciona intestinalis] (model%: 1		1 3
759	cieg035d18	CLSTR03058	ci0100131099	Best Hit:Q9VYF3 (Q9VYF3) CG1770 protei	ci0100131099	Best Hit:Q9V	5 1
760	rcibd058l22_com	CLSTR00457	ci0100130534	Best Hit:hsa:1659 DDX8; DEAD/H (Asp-G	ci0100130534	Best Hit:hsa:	0 0
761							0 1
762							0 0
763							4 5
764							0 0
765							3 1
766							3 0
767							0 1
768							0 0
769							2 3
770							0 0
771	rcicl059b15_com	CLSTR10146	ci0100139680	Best Hit:hsa:10479 SLC9A6; solute carrier	ci0100139680	Best Hit:hsa:	0 4
772	citb028m03	CLSTR00832					0 0
773	ciad061d23_20	CLSTR09924	ci0100140285	Best Hit:gi 22761282 dbj BAC11525.1 unna	ci0100140285	Best Hit:gi 2	6 1
774	rcigd042g07_corr	CLSTR07554	ci0100142166	Best Hit:IP:IP00080897.1 TREMBL:Q9P25	ci0100142166	Best Hit:IP:I	1 2
775	rcibd083i01_com	CLSTR02119	ci0100131586	Best Hit:IP:IP00116160.1 REFSEQ_NP:NP	ci0100131586	Best Hit:IP:I	0 0
776	rcieg048e06_con	CLSTR12079	ci0100134528	Best Hit:hsa:79001 IMAGE3455200; hypott	ci0100134528	Best Hit:hsa:	2 1
777	rcigd042f11_com	CLSTR12694	ci0100151149	Best Hit:hsa:55832 TIP120A; TBP-interac	ci0100151149	Best Hit:hsa:	3 0

塩基配列情報から機能が推定
できる遺伝子は搭載遺伝子
(約1万個)の半分以下

遺伝子リストを眺めても影響の予測は困難

→塩基配列情報以外のホヤ遺伝子の特徴づけが必要

ホヤの一生における遺伝子発現変動の解析

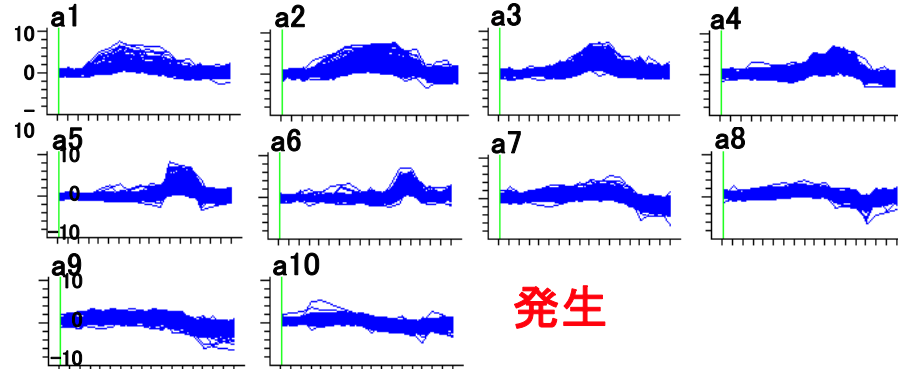


ホヤの受精卵から老成体まで連続的な
発達段階19サンプルを用いて36枚
(n=2)のDNAマイクロアレイ解析を実施

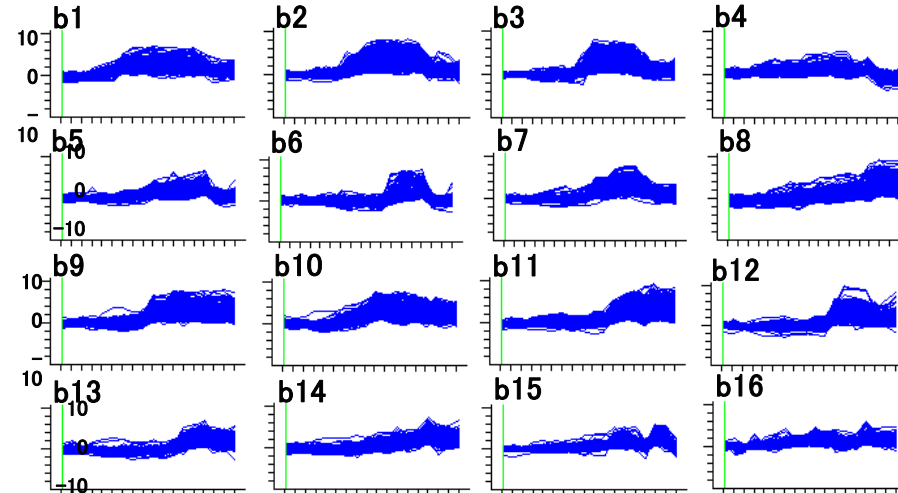
「安住式ホヤ遺伝子分類法」

10,415遺伝子を5カテゴリー
49サブクラスターに分類

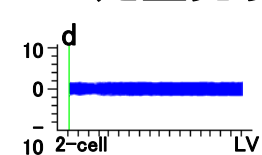
A. 胚特異的遺伝子: 1,357個 (13.0%)



B. 発生胚中期—成体遺伝子: 2,070個 (19.9%)

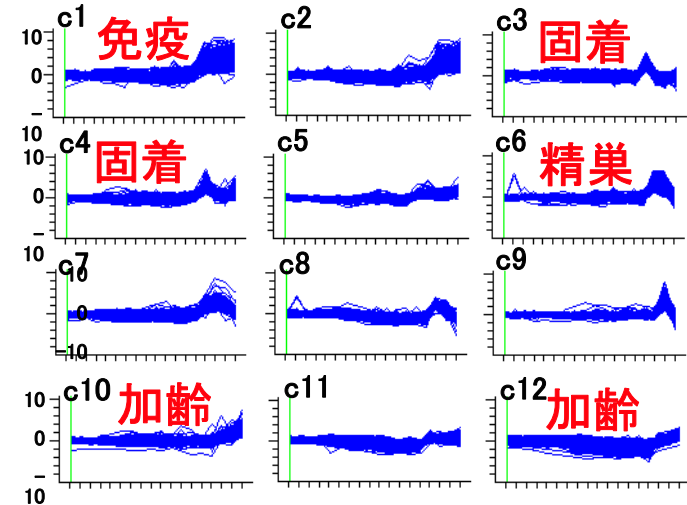


D. 一定量発現遺伝子: 1,301個 (12.5%)

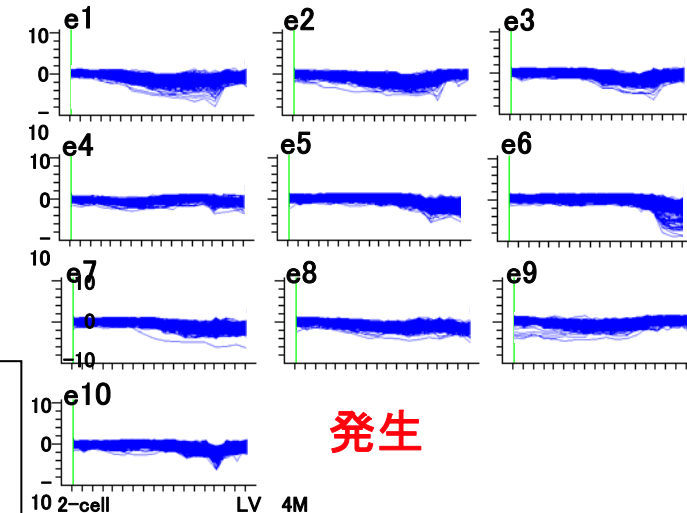


各サブクラスターには発現時期や
機能が類似の遺伝子が集まっている

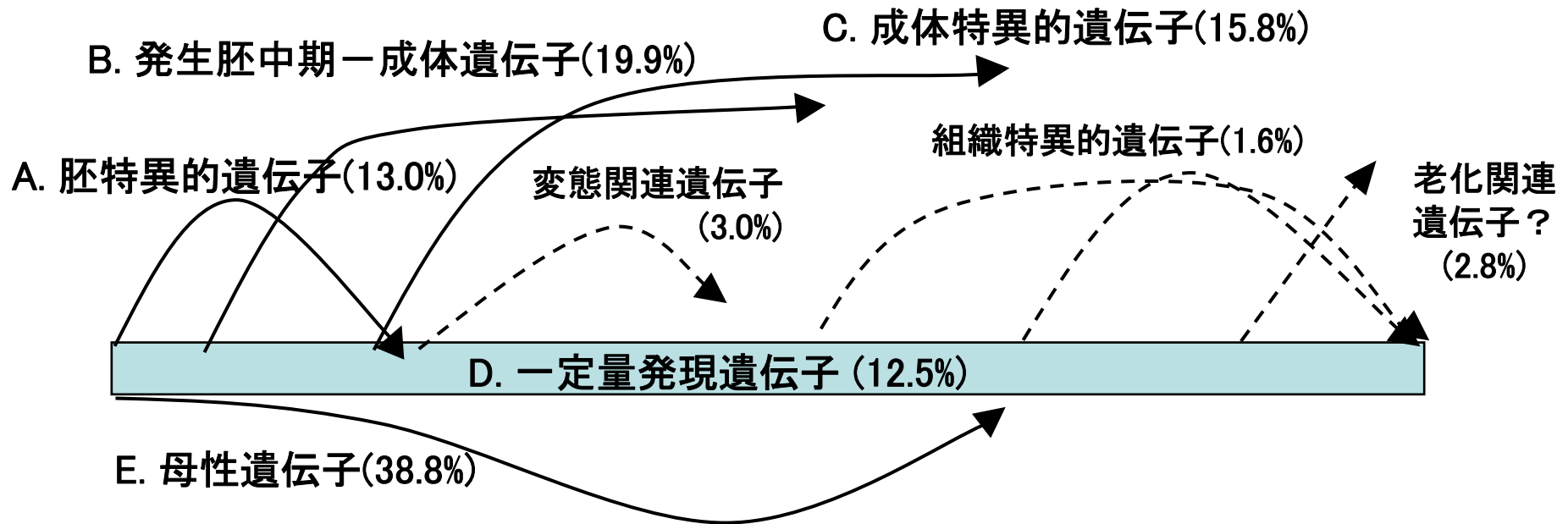
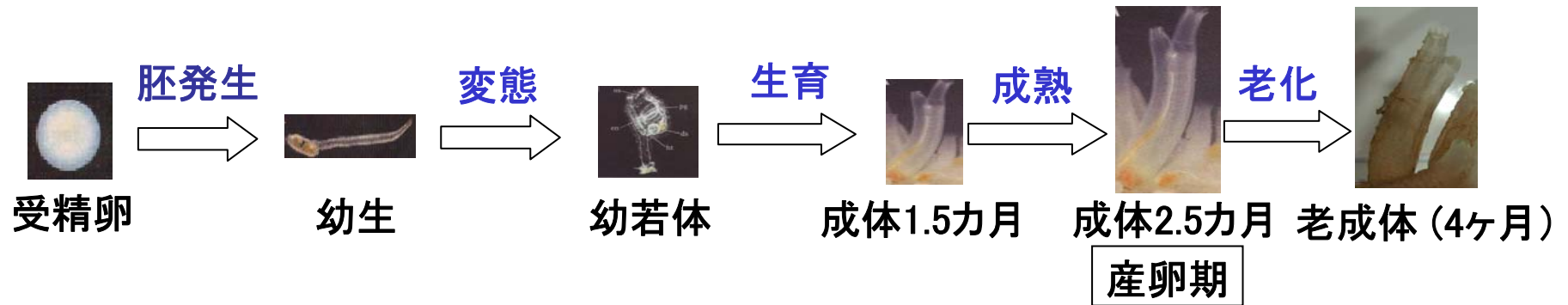
C. 成体特異的遺伝子: 1,646個 (15.8%)



E. 母性遺伝子(卵に発現している遺伝子): 4,041個 (38.8%)



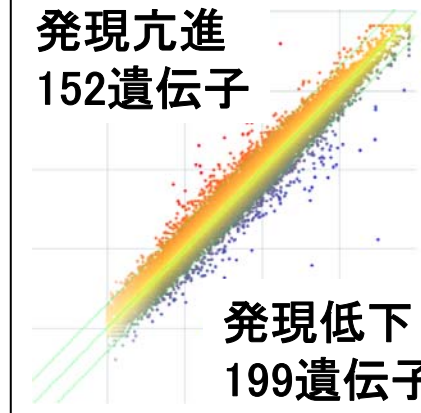
ホヤの一生における遺伝子発現の全体像



各遺伝子は発現が増加するライフステージで重要な機能を担っている

有機スズ暴露

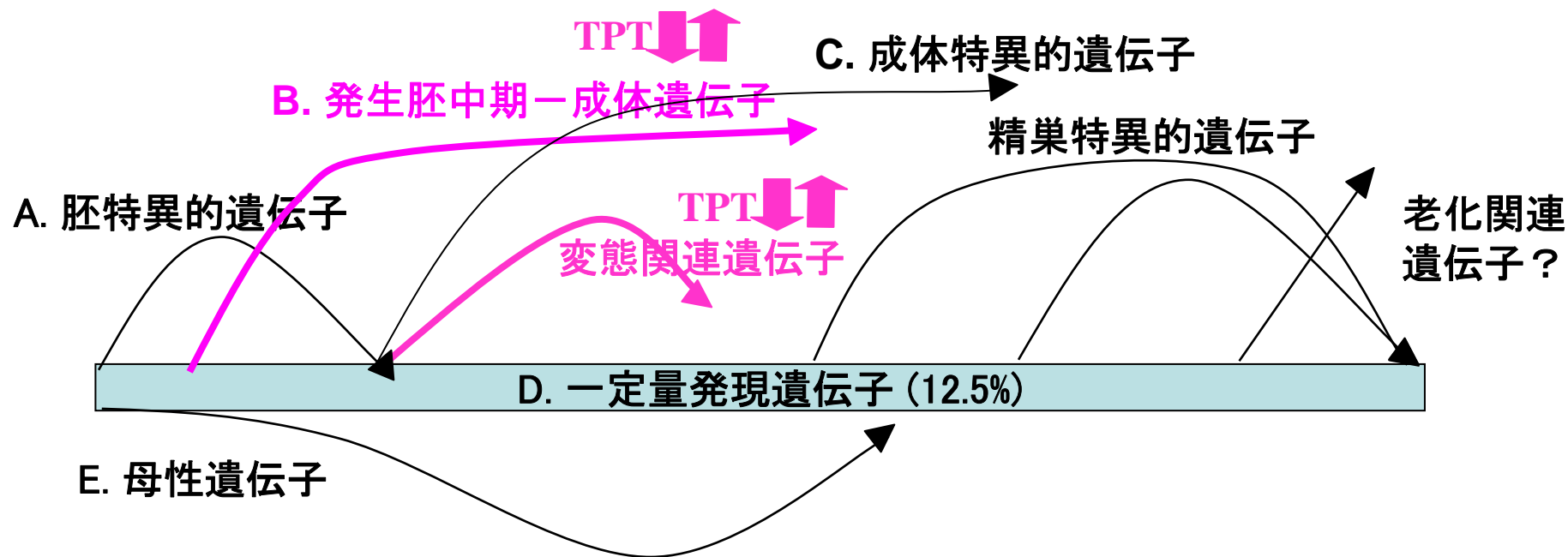
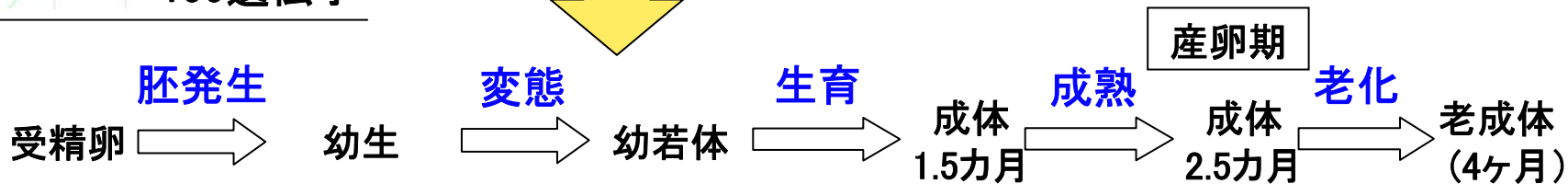
発現亢進
152遺伝子



発現低下
199遺伝子

発現が変動した遺伝子を「安住式ホヤ遺伝子分類法」で分類

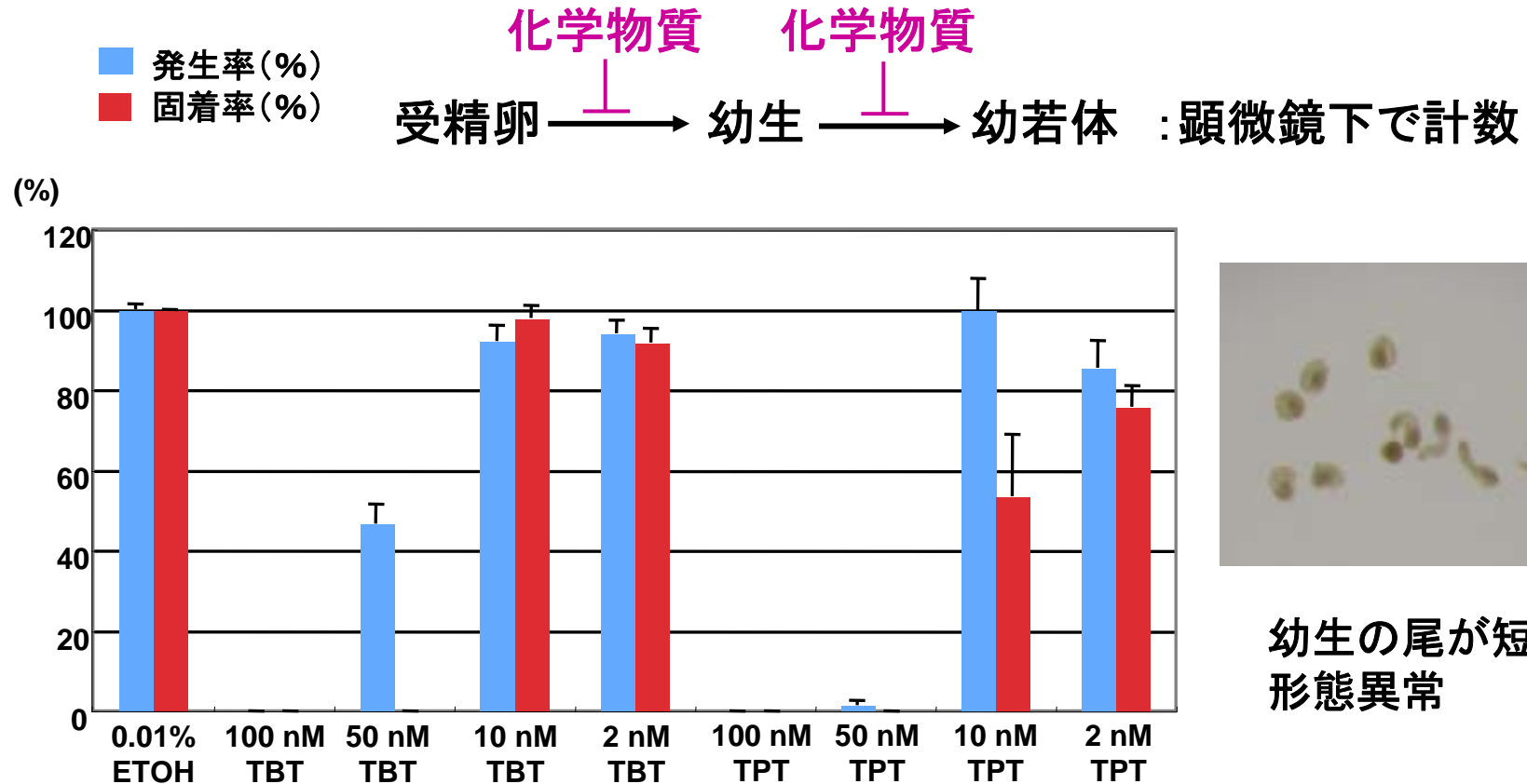
有機スズ感受性 遺伝子カテゴリー の同定



有機スズが影響を及ぼすホヤの生体機能の予測

有機スズ → 胚発生・変態・(免疫機能)
に異常を引き起こす

アレイデータから予測された影響の実験的検証



■有機スズはホヤの胚発生および固着(変態)を阻害する
→遺伝子発現の解析結果から予測した影響と一致

ホヤ受精卵を用いた大量バイオアッセイ系の開発



産卵期のカタユレイボヤ

卵巣

輸精管

精巣

輸卵管

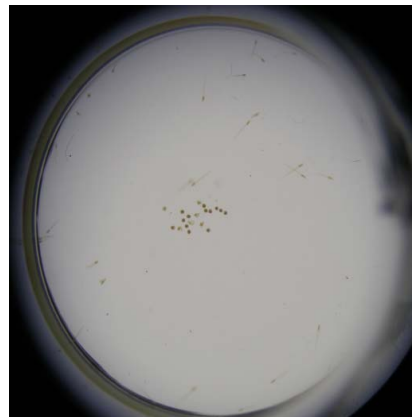
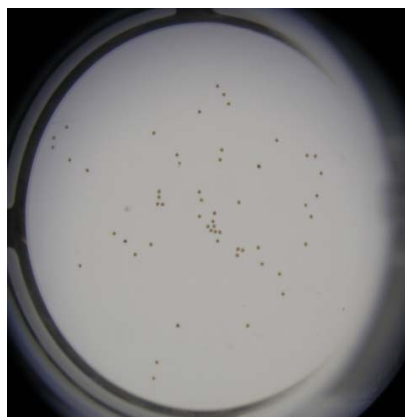
1個体から3,000~5,000個の卵が入手可能



媒精直後(0h)

ふ化幼生(24h)

固着幼若体(3d)

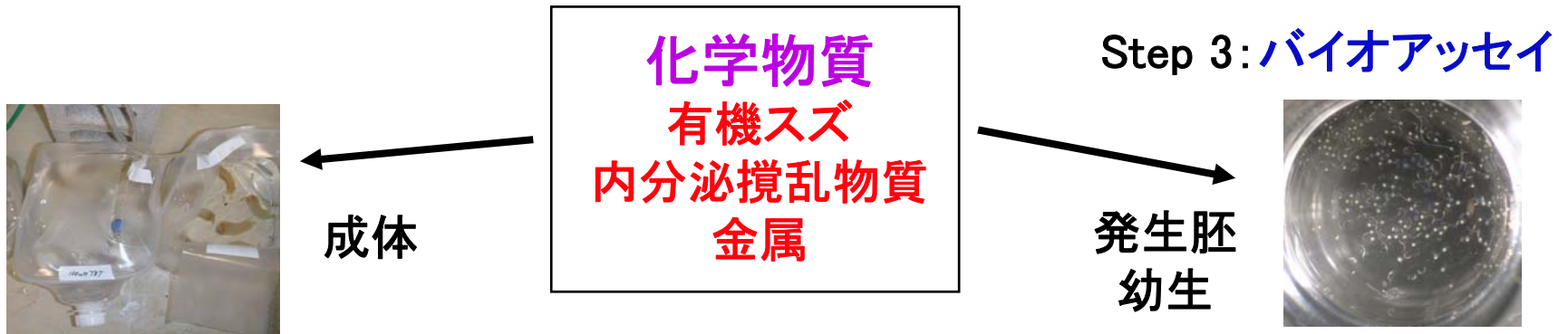


60-80個の受精卵/1mL海水/1ウェル(12穴or24穴プラスチックプレート)

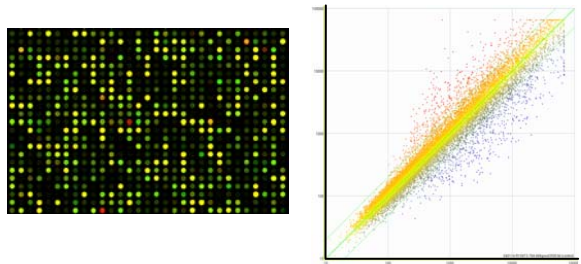
各ウェルの受精卵、幼生、幼若体の顕微鏡画像を保存→後日計数する

→1週間に10,000個の卵を用いた発生、固着阻害実験が可能になった

ホヤの遺伝子発現を指標にした化学物質等の ユニークな影響評価系



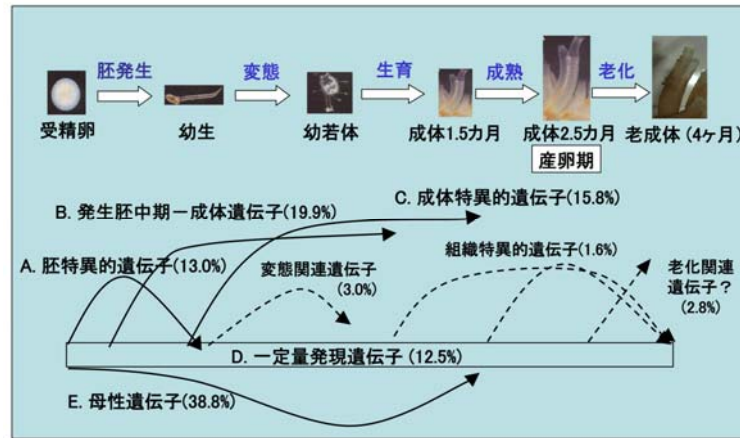
Step 1: アレイ解析 (Array analysis)



影響を受ける遺伝子の検出
海洋汚染のマーカー遺伝子の同定

スクリーニング (Screening) / 予測の検証 (Validation of prediction)

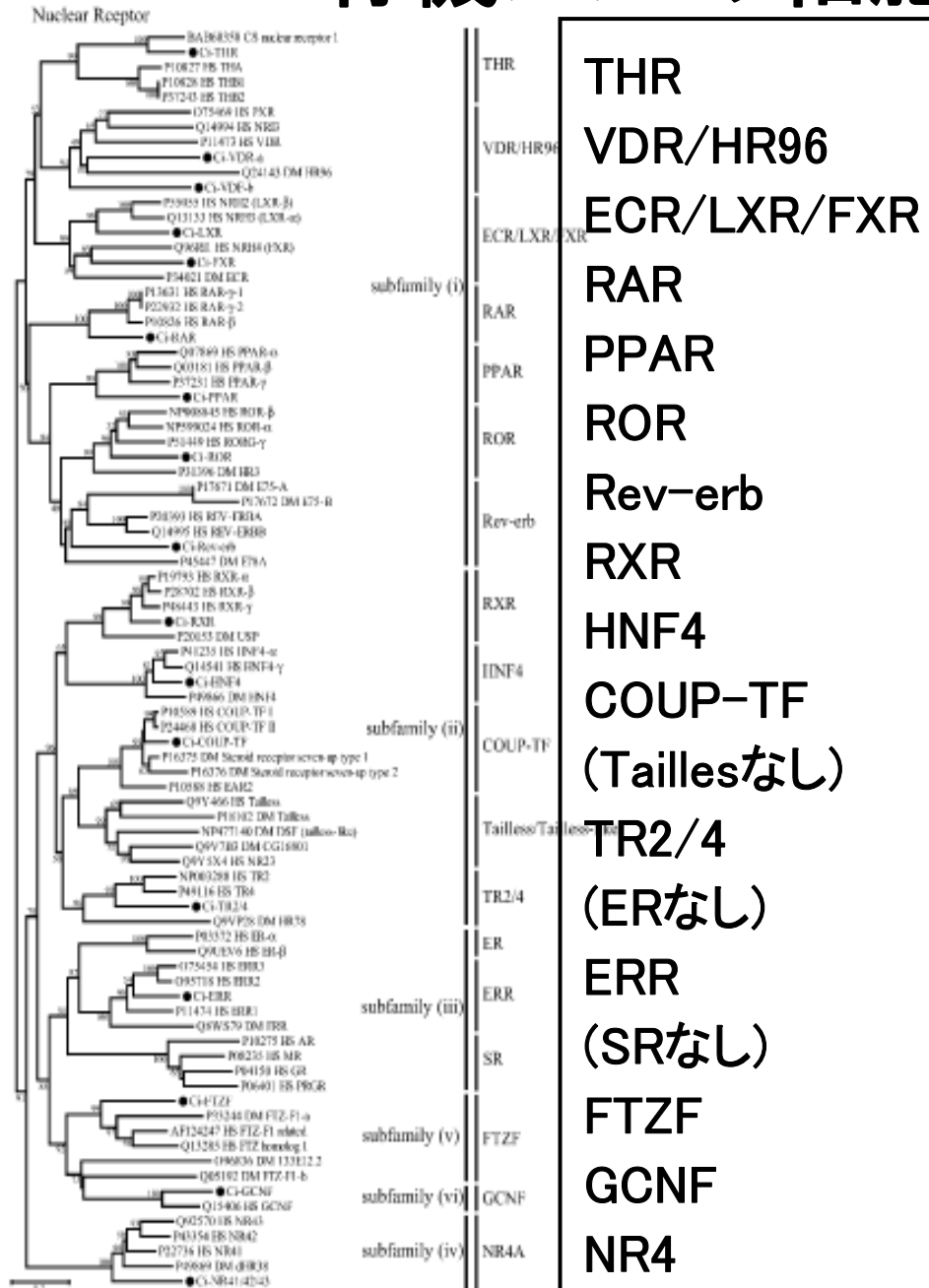
Step 2: 安住式ホヤ遺伝子分類法
(各遺伝子が働くライフステージの情報)



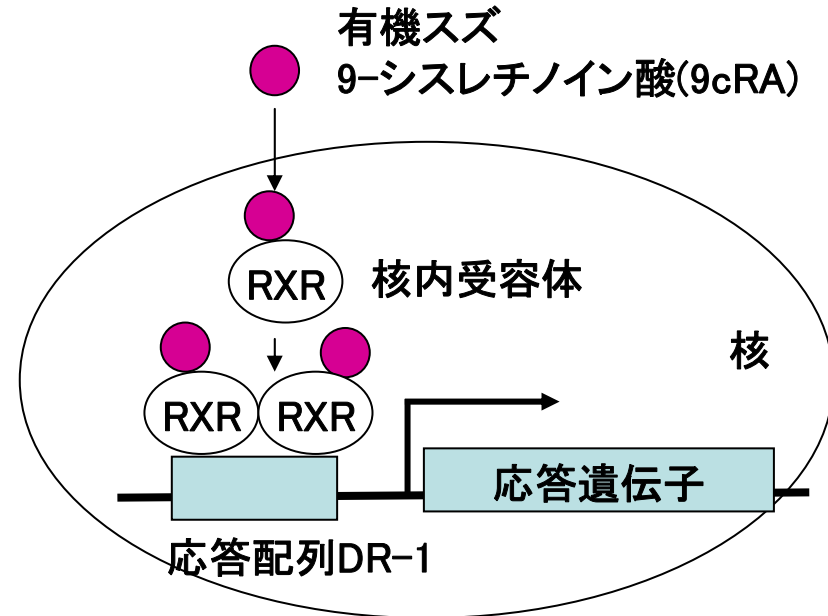
影響を予測 (Predict impact)

胚発生、変態、組織形成などに対する影響の有無が予測できる

有機スズの細胞内受容体の探索



ホヤの核内受容体



■ 仮説: ホヤにも核内受容体 RXRを介した有機スズの作用機構がある?

日本沿岸に生息するホヤの生態調査

マボヤ (韓国病気マボヤ)



日本沿岸に生息する代表的な3種類のホヤについて、以下の情報を収集する目的で(社)日本動物学会会員(約3000名)にWebアンケートを実施した。(2009年9月)



カタユレイボヤ
(ゲノム解読)



ヤワラカユレイボヤ
(ゲノム解読)

1. 生息場所
2. 生息密度(個体数)
3. 産卵時期
4. 病気や奇形の異常
5. 個体数の変動
6. その他の情報
7. 左記以外のホヤについての情報

日本沿岸のホヤ生態調査アンケートにご協力をお願い

平素よりお世話になっています。私たちは現在、ホヤを指標動物として海洋汚染を検出する方法を開発しています。このたび環境省の試験研究の一環として日本沿岸におけるホヤの生態調査を行なうことになりました。

産業用排水や生活排水の流入、あるいは気候の変動等により、日本沿岸域の海洋環境も変化しています。巻貝の一種イボニシでは低濃度の有機スズ（船舶塗料）に暴露されるとメスにオスの生殖組織が形成されることが知られていますが、昨今の日本沿岸域では、オスの生殖組織をもつメスのイボニシが全国規模で広く観察されています。また、近年、食用として養殖されているマボヤにおいて被囊が軟化する病気（被囊軟化症）が発生しています。この病気の原因はまだ不明ですが、病気の蔓延には海洋環境の悪化も指摘されています。そのような背景を踏まえて、日本沿岸の海洋環境の変化が野生ホヤ（養殖ホヤも含む）の生態にどのような影響を及ぼしているのかを知る一助として、このたび、Webアンケートを用いた聞き取り調査とその情報に基づく実地調査を行なうことを企画しました。

アンケートで回答いただく内容は以下の項目です。

1. ホヤの種類
2. 生息地域・規模など
3. 病気・奇形について
4. 生息数の変動

上記の趣旨をご理解いただき、できるだけ多くの方々に情報を提供していただければ幸いです。アンケートはWeb上で回答できるようになっています。お忙しい中大変恐縮ですが、ご協力いただけますようどうかよろしくお願いいたします。

アンケート回答〆切日：平成21年9月30日

(アンケートに関するお問い合わせやご意見がございましたら[安住](#)までご連絡下さい。)

平成21年9月1日 北大大学院薬学研究院 安住 薫



[<回答欄のページ>](#)

http://sorindb.sap.u-tokai.ac.jp/anketo_hoya/anketotop.html

Webアンケートの調査結果によりましては現地での実地調査も考えております。差し支えなければ、情報提供者のお名前、ご所属、ご連絡先をお知らせください。

お名前
ご所属 (〇〇大学〇〇学部等)
ご連絡先 @



[アンケート入力画面](#)

[トップページに戻る](#)

まとめ

- (1) ホヤ大規模オリゴDNAマイクロアレイを用いたホヤのトキシコジェノミクス解析基盤を確立した。
- (2) ホヤ受精卵と幼生を用いた発生・変態阻害の大量スクリーニング系を開発した。
- (3) 有機スズ、金属、内分泌攪乱物質曝露ホヤの遺伝子発現プロファイルと胚発生・変態阻害データが得られた。
- (4) ホヤの有機スズ応答遺伝子および有機スズ汚染モニタリングマーカー遺伝子候補を見出した。

今後の課題

- (1) 各種環境化学物質・金属に応答するホヤ遺伝子の
詳細な解析
- (2) 日本沿岸の野生ホヤの有機スズ、重金属汚染の
実態解明

海産動物とヒトの共存をめざして

海産動物

生息環境の悪化
有害物質の蓄積
→ 個体数の減少
→ 病気や奇形



食料の供給



人間の生活・
社会活動

開発事業・
汚染物質の排出

