

15. 生体の環境汚染物質応答反応を利用した環境汚染評価システムの開発に関する研究

担当機関 経済産業省 独立行政法人 産業技術総合研究所 岩橋 均

重点強化事項 計測 研究期間 平成10年度～平成14年度
研究予算総額 92,604千円

研究の背景と目的

現在、1万種類以上の合成化学物質が環境中に蓄積しているものと推定され、その数は年々増えている。そのため、種々の高度な測定システムで、環境中に存在する化学物質を同定・定量しようとする試みがなされている。しかしながら、どのような高度な技術を用いても、現状では約10%の化学物質を同定できるにすぎない。従って、環境中に存在する未知の化学物質そのものを同定するよりも、環境中に存在する化学物質の毒性を表現できる指標を確立する方が実用的である。現在、環境省等が中心となって、簡易毒性評価試験(バイオアッセイ)を利用した毒性の指標化がなされようとしている。バイオアッセイでは生物個体を用いず動植物細胞や微生物を用いて「化学物質による生物学的応答の変化」を測定し、「毒性」を評価する。当研究所においても、環境汚染が懸念される環境に生息する生物の初期的な生理的变化やモデル生物を当該環境に曝すことによって誘発される初期的な生理的变化について、分子生物学的手法を駆使して検出することにより、環境汚染を生物学的に評価するシステムの開発を行った。

研究の成果

1) モデル生物を指標とした評価法

土壌や環境水さらにはタイプカルチャーを微生物の分離源として、約3千種類の微生物から14種類の化学物質感受性標準微生物を分離した。また、実験室でよく利用されている大腸菌 *Escherichia coli* HB101 株と W3110 株についても標準微生物としてその化学物質感受性を測定した(図1)。その結果、スペクトル全体を見ると同一のものではなく、化学物質それぞれに独特のスペクトルが得られていることが分かった。p-Nonylphenol, Hexachlorophen, Methylmercury chloride, Tributyltin chloride については試験を行った最低濃度においても明らかな生育変化が認められており、検出感度としてもこれらの化学物質については問題がないことが分かる。本課題の目的は微生物の多様な化学物質感受性(生育スペクトル)を指標とした環境中の化学物質の毒性評価や新規化学物質の毒性評価手法にある。前者を対象とした場合は、新規化学物質を調製し、公比2から3の系列で順次希釈し、標準微生物を生育させることにより、生育スペクトルを作成することができる。あらかじめ、多種類の化学物質による生育スペクトルを作成しておけば、新規化学物質のスペクトルが、どのスペクトルに類似しているかを評価することで、その毒性がどの化学物質に近いかを評価することができる。また環境から採取した環境水についても同様に生育スペクトルを作成することで、環境中に含まれる化学物質の毒性がどの化学物質に近い化合物であるかを判断することが可能であると考え(化学物質の推定が可能である)。

一方、DNA マイクロアレイ技術では通常、処理細胞由来標識 cDNA と無処理細胞由来標識 cDNA を 1 枚のアレイ上で競合させることによって発現量の違いを評価する。先ずモデル化学物質として、重金属、農薬天然化学物質を用いてマイクロアレイ解析を行った。表 1 にはカドミウム処理により誘導される遺伝子について、その誘導率の大きいものから順にリストとして示した。また、誘導される遺伝子群を理解するシステム構築のために、パソコン上で MIPS(<http://mips.gsf.de/>) というデータベース上の機能分類に従って、カテゴリ分けを行い、解釈する手法を開発した(表 2)。このシステムを用いると、Cell rescue, defense, cell death and ageing に関連する遺伝子が多数誘導されていることから、カドミウムにより細胞がかなりのストレスを受けていることが分かる(表 2)。またより詳細に評価を行うには、MIPS 上のカテゴリの下層にあるサブカテゴリに分類される遺伝子の機能分類も有効であることを確認した。表 3 には、メタボリズムのカテゴリの下層にあるサブカテゴリに分類される遺伝子数を示した。アミノ酸代謝に関連する遺伝子と窒素や硫黄代謝に関連する遺伝子が多く誘導されていることが分かる。このような解析を行い、結果として、カドミウムの毒性により、含硫アミノ酸代謝が異常に誘導され(SH 化合物の欠乏)、酸化ストレスが誘発、さらに、遺伝子に傷害が起こることが推定されたが、本結果はこれまでに報告されていた、カドミウムの毒性に関する報告をほぼ網羅しており、1 枚のマイクロアレイで大量の毒性情報を入手することが可能であることが確認できた。

さらに、化学物質処理した酵母の発現遺伝子を評価することで毒性を視覚化する手法の開発を行った。マイクロアレイを用いて得られる各遺伝子の発現プロファイルは化学物質の毒性を反映したものと考えることができる。この発現プロファイルを比較すれば、化学物質の分類が可能になるのではないかと考えた。図 2 に、我々のホームページで公開している結果を用いて、階層的クラスタ解析(GeneSpring)によって得られた分類を示した。右のバーコードは 6, 0 0 0 種類の遺伝子の発現量を色の強弱で示しており、左の線は、生物分類の系統樹の様なものと理解してほしい。LAS と SDS は共に界面活性剤であり、同じクラスタ内に存在することから、似たものであると判定されている。次に近いのがカプサイシンで、親油性の化合物であることから、界面活性剤と同様に細胞膜に傷害を与える、という点では傷害が似ていることは納得できる。一方、重金属であるカドミウムはこれら化学物質とは異なる毒性を示すものと理解できる。図 2 に示した結果は全ての遺伝子を平等に計算対象にしているが、化学物質によって変動する遺伝子は限られており、よく変動する遺伝子だけを選択することや、ある化学物質には特異的に誘導される遺伝子がある場合は計算上重み付けを行うことによって、より正確な分類が可能になるのではないかと考えている。分類が可能になるということは、未知の化学物質(環境水)をこの分類に当てはめることで、化学物質の推定が可能になることを示している。

上記システムを用いて、実際に、環境試料 1 0 種類程度についても本システムを適用し、利用が可能であることを確認した。例えば、焼却灰を例にして上げると、当該処理により、発酵に関与する遺伝子(嫌気状態で誘導される)と呼吸に関与する遺伝子(好気状態で誘導される)が共に高い割合で誘導されていることを認めた。この結果は明らかに正常な細胞では矛盾することであり、細胞自体のシグナル伝達系などが攪乱されている可能性を示している。また、メタロチオネイン、グルタレドキシシン、グルタチオン、カタラーゼの様な、抗酸化作用に特異的な遺伝子の誘導が顕著に認められ、さらに、遺伝子の修復に関与する遺伝子群の誘導についても、ラド系、レック系等有名な遺伝子修復系の誘導が認められ

ており、焼却灰の変異原物質としての毒性を確認することができた。以上のように、DNA マイクロアレイ技術について、環境サンプルへの適用を検討したところ、現時点の技術においても充分有効であることが確認することができた。今後の普及が待たれるところである。

2) 環境に生息する生物を指標とした評価法

環境に生息する生物を指標とした評価法では主として2次元電気泳動像を蓄積することで評価への利用を考えた。杉を用いた酸性雨の影響評価では、通常条件では蛋白質に相当するスポットが多数存在するのに対して、低 pH 条件では、その検出できる蛋白質に相当するスポットが減少する事を観察した。この結果は、酸性条件において、杉はその蛋白質含量または含有蛋白質の種類を減少させることを示している。従って、杉が酸性雨状態に曝されているか否かを判断するには、2次元電気泳動のような手法を用いて、その蛋白質含有パターンを解析する手法が利用できることを示している。また、稲については、夏期には必ず我が国において普遍的に存在する植物であることから、環境に生息する植物として充分利用できる可能性がある。そこで、稲の2次元電気泳動(図3)についても環境化学物質添加後の映像を実験室レベルで蓄積した。さらに、実際に甫場で生育した稲についても2次元電気泳動で観察を行った。その結果、甫場においても異常生育していると考えられる稲サンプルについては、2次元電気泳動によりその発現パターンに変動が認められることを確認した。

研究のまとめ

平成10年度から5年間をかけて、モデル生物を指標とした評価法としては、微生物の化学物質感受性を指標とした環境影響評価手法とDNA マイクロアレイ技術を利用した環境影響評価手法の開発を行った。研究開発期間中に分子生物学の分野では画期的なDNA マイクロアレイ技術が開発された。本課題においても中間評価を経て本技術の導入を図れたことは大きな成果であったと考える。環境に生息する生物を指標とした評価法では、実験室レベルでは、環境影響を評価できるシステムを開発することができたが、実環境に生息する生物に対する適用の成功例を示すことはできなかった。今後、より広範に環境に生育する植物の採取と観察データの蓄積が必要であると考ええる。

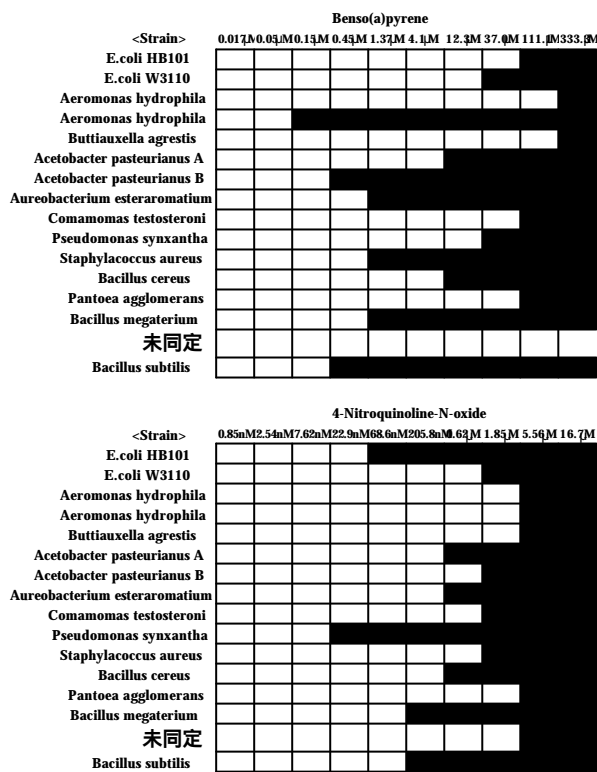


図1 化学物質感受性微生物の化学物質に対する感受性

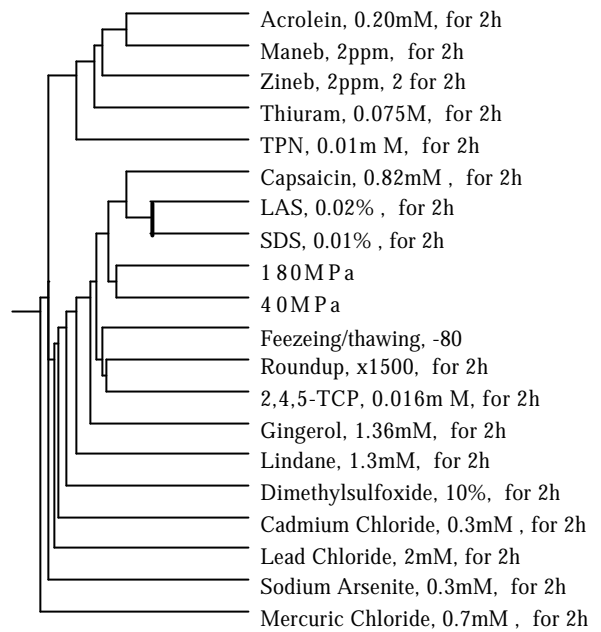


図2 化学物質のクラスター解析

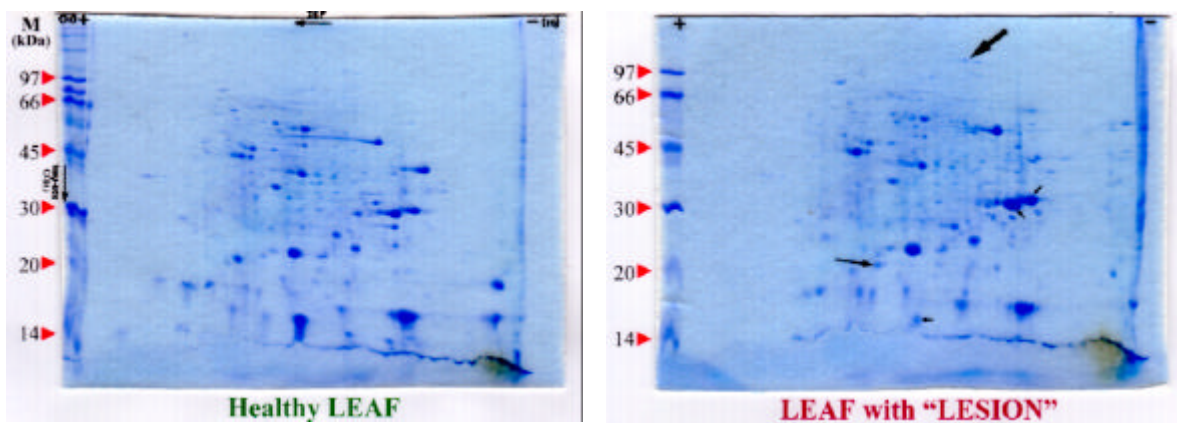


図3 稲の2次元電気泳動（左が正常）

表1 SDSによつて高発現

遺伝子誘導 記号	誘導 倍率	遺伝子	遺伝子の
YGL205W	9.1	POX1	fatty-acyl coenzyme A oxidase
YFL014W	8.8	HSP12	12 kDa heat shock protein
YGR213C	8.5	RTA1	involved in 7-amincholesterol resistance
YPL088W	8.3		similarity to aryl-alcohol dehydrogenases
YLR284C	8.1	EHD1	Peroxisomal enoyl-CoA hydratase
YMR107W	8.1		hypothetical protein
YLR346C	7.8		weak similarity to YGR035c
YHR138C	7.1		hypothetical protein
YNL211C	6.8		hypothetical protein
YMR316W	6.4	DIA1	may be involved in invasive growth
	5.9		strong similarity to YMR316w
	5.8		regulation of sulfur assimilation
	5.6		resistance transporter
	5.6		induced by osmotic stress
	5.5		meiotic homologous
	5.4		strong similarity to Rta1p and Rtm1p protein
YLR327C	5.3		strong similarity to Stf2p
YFL027C	5.2		weak similarity to P. falciparum Pfmdr2 protein
YNL015W	5.2	PBI2	Proteinase inhibitor I2B (PBI2)
YLR008C	4.9		similarity to hypothetical protein YNL328c
YGR043C	4.8		strong similarity to transaldolase
YAR027W	4.7		similar to YAR028w, YCR007c, and YGL051w
	4.6		to hypothetical protein YDR003w
	4.6		kDa transmembrane
	4.6		activating protein (GAP)

表2 カドミウムによって誘導される遺伝子のカテゴリー分類

カテゴリー名	誘導 遺伝子数	誘導率 (%)	カテゴリー 内遺伝子数
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING	60	9.6	628
CELL FATE	40	9.4	427
CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	64	23.0	278
CELLULAR COMMUNICATION	7	11.9	59
CELLULAR TRANSPORT	48	9.7	495
CLASSIFICATION NOT YET CLEAR-CUT	16	13.9	115
CONTROL OF CELLULAR ORGANIZATION	15	7.2	209
ENERGY	40	15.9	252
METABOLISM	159	14.9	1066
PROTEIN ACTIVITY REGULATION	1	7.7	13
PROTEIN FATE	56	9.4	595
PROTEIN SYNTHESIS	6	1.7	359
PROTEIN WITH BINDING FUNCTION	0	0.0	4
CELLULAR ENVIRONMENT	30	15.1	199
SUBCELLULAR LOCALISATION	213	9.4	2258
TRANSCRIPTION	67	8.7	771
TRANSPORT FACILITATION	52	16.6	313
TRANSPOSABLE ELEMENTS AND PLASMID PROTEINS	2	1.7	116
UNCLASSIFIED PROTEINS	261	10.9	2399

備考 誘導率 = (誘導遺伝子数) / (サブカテゴリー内遺伝子数) × 100

表3 カドミウムによって誘導される遺伝子のサブカテゴリー分類

サブカテゴリー名	誘導 遺伝子数	誘導率 (%)	サブカテゴリー 内遺伝子数
Amino acid	43	21.1	204
C-compound and carbohydrate	62	14.9	415
Lipid, fatty-acid and isoprenoid	28	13.1	213
Vitamins, cofactors, prosthetic groups	9	10.5	86
Nitrogen and sulfur	16	23.9	67
Nucleotide	10	6.8	148
Phosphate	5	15.2	33
Secondary metabolism	0	0.0	5

備考 誘導率 = (誘導遺伝子数) / (サブカテゴリー内遺伝子数) × 100

研究発表

発表題目	掲載紙/学会等	発表年月	発表者
(誌上発表) Multiple-end-point bioassay using microorganisms.	Biotech. Biop. Eng. 5, 400-406	12.5	岩橋
Bioassay of cadmium using a DNA microarray:	Environ. Tox. and Chem. 20, 2353-2360	13.10	百瀬、岩橋
Studies on the antimicrobial mechanisms of capsaicin using yeast DNA microarray	Bios. Biotechnol. Biochem. 66 532-536	14.3	栗田、北河、金、百瀬、岩橋
The effects of the pesticide thiuram DNA microarray for the assessment of aromatic compound's chronic effect in the industrial wastewater.	Environ. Science and Tech. 36 3908-3915	14.7	北河、高橋、百瀬、岩橋
Rice MAPKs Biochem.	Env. Monit. Assess.	(in press)	金、金、岩橋
	Biophy. Res. Com.	(in press)	Agrawal、岩橋 Rakwal
指標微生物とDNAチップを用いた化学物質の毒性評価	化学・バイオつくば財団ニュース 44号	12.9	岩橋
DNAチップを利用した化学物質のバイオアッセイ	バイオサイエンスとバイオインダストリー 58,27-30	12.10	岩橋
マイクロアレイ技術を利用した化学物質の毒性評価(その実状)	バイオアッセイ研究会 News Letter 12-16	13.1	岩橋
DNA マイクロアレイを用いた環境化学物質の推定・毒性評価と水処理施設評価への適用	水処理技術 43 15-20	14.7	岩橋
マイクロアレイ、DNAチップ----- -これからの技術	環境技術 31, 679-685	14.8	岩橋
マイクロアレイを用いた環境ストレスの影響評価	「地球環境と放射線：生態系への影響を考える」研成社	印刷中	岩橋

工業所有権

特許棟の名称	請願年月日	公告番号	公告期日	登録番号
化学物質の微生物学的同定方法	12.2.29			2000-052470
化学物質の毒性評価及び同定方法	12.4.7			2000-105907
毒性物質の検出方法	14.3.5			2002-58189
毒性物質の検出方法	14.3.5			200258190
DNA マイクロアレイ法を用いる毒性物質の同定方法	15.2.21			2003-045007