

汚染物質の魚類への影響評価におけるトキシコジェノミクスとその将来性

ティム ウィリアムズ

英国 バーミンガム大学

スライド 1 こんにちは。丁寧なご紹介をありがとうございました。ティム・ウィリアムズです。今回は、バーミンガム大学における我々研究グループの仕事についてお話いたします。

我々は、外来性エストロゲン類を始めとする様々な種類の化学物質による海洋環境の汚染について研究するのに、トキシコジェノミクスを用いています。

スライド 2 我々が海洋環境のモニタリングになぜ関心を持ったのかと言いますと、海洋汚染は漁業、レクリエーション、観光などの産業に被害を及ぼし、生物の多様性を減少させるからです。それゆえに我々には、大規模な被害が引き起こされる前に問題を早期に警告してくれる、感度のよい汚染指標が必要とされます。そうした指標があれば、沿岸環境の管理や産業への影響の監視が行ないやすくなり、生態学的に持続可能な産業の開発を促進し、新規化学物質に伴う問題が捕えやすくなるはずで、トキシコジェノミクスが用いられるのは、法規制プログラムへの適用に際して有用であるという段階ではなく、将来の法規制実施に適したアッセイの開発を目指す段階です。化学物質汚染に対して生体がどのように反応するか、ということ、を、まず最初に考える必要があります。

スライド 3 一般的には、例えば化学物質の濃度が増加するなどして、影響の大きさが増大するにつれ、生体の中には複数のさまざまな反応が見られるようになります。ほとんどの毒性物質においては、生体に何の影響も見られない濃度段階がまず存在し、続いて、適応遺伝子の発現の変化といったストレス反応が現われるようになります。影響がさらに大きくなると、修復可能な損傷が出現してきます。それによって個体に病理変化が引き起こされ場合があります。さらに汚染物質による影響が強まると、例えば個体死や生殖不能が起きてきます。こうした変化が検出できるのならば、それを曝露量や影響のバイオマーカーとして利用することが場合によっては可能です。特に、個体群全体にわたる調査では発見が困難であるような変化をもたらす低レベルでの影響において、これは有用です。

スライド 4 では、バイオマーカーとはいったい何なのでしょう？ひとつの定義によると、生物やその生物の産生物において測定が可能であり、曝露量や損傷の指標もしくは予測因子となる物質、構造、過程のことです。環境モニターに利用される典型的な分子バイオマーカーとしては、外来性エストロゲン類によって誘導されるピテログニンや、多環式芳香族炭化水素類やダイオキシン類によって誘導されるチトクローム P450 1A、重金属によって誘導されるメタロチオネインなどがあります。こうした誘導は、mRNA レベルやタンパク質レベルの増大、もしくはチトクローム P450 の場合には酵素活性によって検出することができます。しかし、環境から動物をサンプリングする際には、化学物質の混合による影響、温度や食物などの環境変化、生体の年齢、繁殖周期段階などといった数々の複雑さが存在します。それゆえに、個々のバイオマーカーでは誤った結果が得られる場合があります。この方法を改良するには、特定の毒性反応に関連する生殖機能変化の識別特徴となるフィンガープリントが得られる従来および新規のバイオマーカーを大規模な範囲で用いることです。外来性エストロゲン汚染の研究においては、遺伝子制御系間でのクロストークが存在しますので、汚染された環境地帯でみられる、多環式芳香族炭化水素類や金属など、複雑な化学物質混合物という状況での研究が必要であると考えられます。

スライド 5 トキシコジェノミクスの定義には、毒性メカニズムの同定と特性解明を目的として、ゲノム科学（ゲノミクス）と生物情報学（バイオインフォマティクス）を統合したもの、というものもあります。この

技術には、遺伝子発現の大きな解析が不可欠であり、サブトラクティブハイブリダイゼーション法、ディフェレンシャルディスプレイ RT-PCR 法、遺伝子発現の連続分析法などの技術が、その核になっています。本日は主に、何千もの遺伝子の発現を同時に評価することが可能な DNA マイクロアッセイについてお話しします。とは言いましても、まず最初は遺伝子を分離する必要があります。現時点では、フグとゼブラフィッシュを対象にした魚類ゲノム配列解明プロジェクトのみが行なわれているだけですが、この生物種はヨーロッパの海の常在種ではないので、ヨーロッパの海のモニタリングには適していません。我々は現行の遺伝子学モデルではない生物種に高速ゲノム技術を応用することを目指しています。さらにその情報を用いることで、特定の汚染物質への反応における遺伝子の発現パターンの特性を明らかにすることを目的にしています。

スライド 6 我々が研究対象にしている生物種はヨーロッパスマガレイ (*Platichthys flesus*) です。この生物種は日本のカレイやヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) にそっくりですが、3分の1ほどの大きさにまでしか成長しません。この魚は西ヨーロッパの沿岸ではありふれた存在であり、汽水域の水底にいる無脊椎動物を捕食しています。汽水域の水底は、人工汚染物質に高度に曝露していることが少なくありません。この魚は、英国の海洋モニタリングプログラムにおける重要な生物種であり、我々のグループを始めとするいろいろな研究者がこれまでに盛んに調査対象にしてきました。ですので、この生物種の cDNA やゲノムライブラリは既に得られています。我々が用いたサンプル魚は漁業水産養殖学センター (CEFAS) のライアンズ博士にご提供いただいたものです。

スライド 7 我々の研究室はイングランド中央のバーミンガムにあり、CEFAS は東海岸にあります。これら 2 ヶ所が我々のサンプル採取場所です。こちらが、サフォーク州のアルデ川汽水域で、農業地帯です。こちらはティン川汽水域で、ニューカッスル市の重工業地帯にあります。

スライド 8 タイン川汽水域は、多くの汚染物質に冒されています。この区域は、我々が基準場所としているアルデ川の 1 万倍もの工業排水と生活排水に曝露しています。多環式芳香族炭化水素による汚染によって、胆汁代謝産物および、遺伝毒性を示す DNA 付加体が高濃度に検出されます。また、相当量の内分泌攪乱化学物質汚染もあります。この表をご覧ください。この表を眺めると分りますように、エストロジオールの大部分は、カレイ類が密に接触する水底堆積物に見つかっています。

スライド 9 我々の水圏毒性学研究の一部は、カレイで知られているストレス反応遺伝子のクローニングに基づいています。我々はこの遺伝子を用いてリポーター遺伝子アッセイと定量的競合 RT-PCR アッセイを行いました。これらの手法は外来性エストロゲン類の検出にも応用できますが、我々としては、アレイ研究に集中して取り組んでいくつもりです。

スライド 10 1 回目のアレイプロジェクトはすでに完了しました。モデル動物でない生物種を用いていますので、遺伝子のクローニングを自分たちでやらなければなりません。我々は特異的なストレス反応遺伝子に注目したミニアレイを用いて、ティン川とアルデ川のカレイの比較を行ないました。我々が現在取り組んでいるのは、サブトラクティブハイブリダイゼーションを用いて遺伝子ターゲットを数多く分離することと、1 万個までの発現遺伝子配列断片 (EST) を無作為に単離することです。

スライド 11 我々が初期に取り組んだアレイプロジェクトにおいては、異なる生物種間で相同な遺伝子配列に基づいた縮重プライマーを作成することをクローニング戦略にしました。続いて、カレイの DNA から得た約 400 塩基対の断片を PCR で増幅し、この配列のクローニングと配列決定を行ないました。

スライド 12 さまざまな範囲のクラスに属する遺伝子の断片がクローニングされました。例えば、チトクローム P450 などの生体内変換酵素、スーパーオキシドジスムターゼなどの酸化ストレス関連タンパク質、熱ショックタンパク質、発がん遺伝子など新規の転写物が総計 120 種類得られました。内分泌関連の遺伝子として

は、透明帯タンパク質 C (ZPC) と膜関連と推定されるプロゲステロン受容体とがありました。ビテロゲニンは分離されませんでした。最近になってカレイからクローニングされましたので、今後のアレイに含める予定でいます。

スライド 13 我々はこれらのクローンを、ベクター上の配列アニールするプライマーで増幅し、高精度ロボットでコーニングのスライドガラス上に配置しました。試験魚および対照魚から cDNA を合成し、それぞれを赤色フルオロフォアの Cy5 または緑色フルオロフォアの Cy3 で標識しました。標識 cDNA を混合し、ハイブリダイゼーションさせ、スポットの強度をアクソンのスキャナーで測定しました。赤の標識と緑の標識の比が、試験魚および対照魚におけるそれぞれの遺伝子の発現の比を表わしています。

スライド 14 このスライドは、我々が行なったアレイの 1 つをスキャンしたものです。大部分の遺伝子は発現に差が無く、黄色に見えます。発現に差があるものは、赤か緑に見えます。

スライド 15 このスライドは、アレイの結果の典型的な組み合わせを示したものです。タイン川でアップレギュレーションされた遺伝子は赤やオレンジになり、タイン川でダウンレギュレーションされた遺伝子は緑になります。こうしたものの一部に私は注目しました。汚染への反応の中で転写がアップレギュレーションされたものとしては、透明帯タンパク質 C (ZPC)、NADP - メナジオン酸化還元酵素 (NMO)、グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PDH)、 δ - アミノレブリン酸合成酵素 (δ -ALAS)、メタロチオネイン (MTT)、さらにいくつかの未知の転写物がありました。転写がダウンレギュレーションされたものとしては、 γ - フィブリノゲン (γ FIB) と α - 2HS グリコプロテイン (α 2HSGP) がありました。

スライド 16 ここには、2つの地域間で異なる発現を示す遺伝子の例の一部を示しました。汚染条件においてアップレギュレーションされたものは、ZPC (これについては次のスライドで詳しく述べます)、炭化水素系の汚染物質で誘導されると思われる NMO、ヘム合成における中心的酵素である δ - アミノレブリン酸合成酵素、重金属汚染の指標として昔から知られているメタロチオネインがあります。もっとも興味深いと思えるのは、まだ同定されていない遺伝子断片がいくつかあったことです。これらの遺伝子断片は汚染に対する新規の反応を示している可能性があります。タイン川でダウンレギュレーションされた遺伝子としては、反応の急性期にはダウンレギュレーションされることがすでに分かっている α - 2HS グリコプロテインと、外来性エストロゲン類を含む広範な汚染物質で影響を受ける γ - フィブリノゲンがあります。

スライド 17 これら遺伝子の中で、内分泌攪乱化学物質の研究にもっとも関連性のあるものは、透明帯タンパク質 C です。この遺伝子は ZP3 とか ZRP と呼ばれ、卵被膜タンパク質の多遺伝子ファミリーに属しており、脊椎動物を通じて保存されています。しかし、哺乳類と硬骨魚類の卵母細胞には構造的に差がありますので、精子の認識において、哺乳類のタンパク質と同じような働きを持つとはあまり考えられません。これらのタンパク質は、エストロゲン様汚染物質に対する感度のよいバイオマーカーになるのではという提唱が、多くの研究者からなされてきました。魚類においては、この遺伝子には複数の重複があるようであり、ZP タンパク質の発現は種によって肝臓または卵巣で起こります。我々が得た遺伝子断片には高度に保存されている領域が含まれていましたので、我々が得た観察結果は、ある 1 つの特異的な転写物によるのではなく、同じ遺伝子群が異なる制御を受けたためであるという解釈のほうが可能性があります。バーミンガム大学のヒューズ博士の協力の下で我々は、カレイの肝臓および卵巣で産生されている可能性のある種々の転写物を調べ、特異的な転写物のそれぞれに特化したプローブの開発を計画しています。このスライドは、関心が持たれる特定の遺伝子がアレイからどのようにして引き出され、その遺伝子が詳細に研究され、モニタリングに応用できるようになる様子を示したものです。

スライド 18 我々の現在の仕事は、アレイプロジェクトの大幅な拡充と、ゲノム科学的手法をタンパク質科学 (プロテオミクス) に結び付けることです。このプロジェクトは EU が助成しており、「汚染物質による沿岸

影響の生体モニタリングへのゲノム科学的ツール」すなわち GENIPOL と呼ばれています。バーミンガム大学、スコットランドのスターリング大学、デンマークのオーデンセ大学、イスラエルのハイファ大学からの人員によってコンソーシアムが構成されています。我々は、これまでに分離された個々の遺伝子をサブトラクティブハイブリダイゼーションに基づいて得られた遺伝子に関連付け、カレイの cDNA から得られた莫大な数の発現遺伝子配列断片を無作為に単離する作業を現在行なっています。発現の様子が異なる遺伝子の同定を行なうアレイに、これらのクローンを用いることになるでしょう。

汚染物質に起因する反応と非特異的な反応とを鑑別することが不可欠であると強く考えられます。バイオマーカーとして有用なクローンはリアルタイム PCR アッセイに利用することができ、それによってミニアレイが可能になります。我々は、そのミニアレイ法を用いてヨーロッパ中のたくさんのサンプル採取地から得たカレイを試験したいと考えています。この方法に並行して、2次元ポリアクリルアミドゲルを用いて、異なる制御を受けるタンパク質群を同定していきます。我々は、これらのタンパク質を利用して、固定酵素免疫測定法 (ELISA) 用の抗体を高め、ルーチン的なモニタリングに適した簡便なアッセイを開発しようと思っています。我々は、カレイの研究で得られた知見を、地中海の魚であるストリップドシーブリーム (*Lithognathus mormyrus*) に応用することを考えています。この魚は、ヨーロッパの沿岸部全体のモニタリングを可能にしてくれます。我々は予備研究を完了し、今、我々の研究の規模と範囲の拡大に取りかかろうとしているところです。このプロジェクトでは、これら様々な情報源に由来する莫大な量のデータを統合することが、おそらくはもっとも困難な点になるでしょう。

スライド 19 今回の講演に招聘していただいたことを安達一彦氏、井上達氏、キャサリン・キャメロン氏にお礼申し上げます。また、今回の訪問に尽力下さった日本環境省および「内分泌攪乱化学物質に関する日英共同研究」にお礼を申し上げます。

また、魚のサンプルについてブレット・ライアン氏に、ゲノム科学に関する助言についてアントニー・ジョーンズ氏とスティーブ・ミンチン氏に、有用なクローンについてカール・ゲンズベルグ氏とターニャ・フランクリン氏、ジャエ・ソン・リー氏に、そしてこれらのプログラムをまとめていただいたケヴィン・チップマン教授にお礼を申し上げます。

質疑応答

ブルンバーグ：ウィリアムズ先生、ありがとうございます。質問をいくつかお受けしましょう。

質問：それら炭化水素受容体は、ほとんどの場合でダウンレギュレーションされているのですか？

ウィリアムズ：我々はこのアレイにアリル炭化水素受容体を含めました。しかしそれには大きな反応は見られませんでした。私は、弱いアップレギュレーションではないかと思いますが、アレイ試験の有意性で通常用いられる 2 倍カットオフ値を下回ってはいませんでした。

ダストン：コメントします。あなたの実験でのストレスを加えた魚のメタロチオネインは、おっしゃるとおりアップレギュレーションですが、それは重金属曝露を示していると思われます。また、より一般的な急性反応を示しているとも考えられます。少なくとも哺乳類においては、メタロチオネインの誘導は、急性期の反応物質としてかなり一般的であります。血清中の急性期反応物質のダウンレギュレーションが観察されているので、今回のもそれでしょう。あなたが測定された急性期反応物質がその他にもあるかどうかを調べることは興味深いと思います。このアレイを、一般的なストレスから個々の毒性を区別するのに有用な遺伝子セットとして、用いることができると思いますか？

ウィリアムズ：ええ、メタロチオネインについてはおっしゃるとおりでしょう。これら遺伝子の大部分においては、その異なるレギュレーションについての説明は一通りではないでしょう。それゆえに我々は、これらの生物種を用いた技術研究や室内研究の中で、単一の曝露を用いることで、その可能性を検討したいと考えています。我々が採用している処理法は幅広く、アレイの反応を集約させたいと思っています。それが、このような疑問に対する答えのきっかけになるでしょう。

ブルンバーグ：他に質問はありませんか？

質問：メタロチオネインなどのタンパク質の誘導はチェックしましたか？

ウィリアムズ：いいえ。それはこのプロジェクトの次の段階、プロテオミクスの研究段階で行う予定です。

質問：化学物質、金属、溶剤などなどによる水の汚染についてはチェックしましたか？

ウィリアムズ：金属類も含めた広範囲の物質を用いる予定です。

質問：特に有機スズ化合物についての分析結果を知りたいです。

ウィリアムズ：ええ。有機スズ、すなわち TBT もこの研究に含める予定になっています。

ブルンバーグ：ウィリアムズ先生、たいへんありがとうございました。