

## 廃棄物処理等科学研究費補助金 総合研究報告書概要版

研究課題名 = 遺伝子工学的手法による残留ダイオキシン類の低減化法の開発に関する研究

研究期間 (西暦) = 2000-2003

研究年度 (西暦) = 2000-2002

代表研究者名 = 齋藤 健 (北海道大学)

共同研究者名 = 蔵崎正明 (北海道大学)、藤田博美 (北海道大学)、伊藤敬三 (株式会社フロンティアサイエンス)

研究目的 = 近年、内分泌攪乱化学物質の一種であるダイオキシン類による環境汚染は、ヒトの発癌性の増加および催奇形成の原因と考えられており、さらに世代を超えた影響をもたらす恐れがあることから、深刻な社会問題になりつつある。そのため、ダイオキシンに高感受性である胎児や乳幼児への安全性を確保する観点から、今後一層ダイオキシン類による生態系の汚染状況を詳細に把握し、環境中濃度の低減を図ることが現在、最も重要な課題とされている。本研究では、ダイオキシンに感受性の細胞株を樹立し、この細胞株を利用したダイオキシン類のレポーター遺伝子アッセイシステムを構築し、さらにダイオキシン類の毒性を修飾・分解する可能性のある遺伝子組換え蛋白質をクローニングし、その有効な発現系を構築することを本開発の目的とした。

方法 = ダイオキシン誘導体に応答するレポーター遺伝子ベクターを構築するために、その感受性を決定するプロモーター配列の構造の決定を行ない、プロモーター配列を分子生物学的手法を用いて構築した。そのプロモーターとしての活性をゲルシフト法により評価し、有効であったプロモーター配列の下流にレポーター遺伝子を結合したベクターを構築した。このベクターを導入した細胞がダイオキシンに応答してシグナルを出すことを確認した。最適な導入細胞を選択するために種々の哺乳動物由来細胞をダイオキシン活性物質で処理し、そこから核抽出液を調整し、ゲルシフト法により、ダイオキシン感受性を検索した。またパーマネント細胞樹立のための選択マーカー発現遺伝子を検討する等、本測定系の有効性を高め、かつ実用化が可能か否かについての試行をくりかえした。さらに、恒常的にこの系の利用が可能ないようにダイオキシン感受性細胞株にダイオキシン応答性レポーター遺伝子ベクターを導入したパーマネント細胞株を樹立し、樹立細胞株の性質を検討し、ダイオキシン誘導体等の処理による、応答性を評価を再び行ない、ダイオキシン誘導体に高感受性であった樹立細胞株につき、その有効性を評価した。

ダイオキシン分解系構築のために、枯草菌DNAアレイを行ない、ダイオキシン誘導体に関与すると推定される枯草菌から選択した酵素遺伝子2種およびダイオキシン分解能がある白色腐朽菌から選択した酵素遺伝子(マンガンペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼ)および大腸菌由来のビフェニルオキシゲナーゼ酵素遺伝子は大腸菌由来の発現ベクターに組み換え、蛋白を発現させる系の構築を行なった。大腸菌内の酵素遺伝子の発現は2 mg/mlのテトラサイクリン10  $\mu$ lで誘導した。培養後、菌体を遠心により回収し、StrepTactinのクロマトグラフィーに供した。溶出された精製標品はダイオキシン等の分解アッセイおよび定法に従ったポリアクリルアミド電気泳動に供した。ダイオキシン等の分解アッセイは、ダイオキシン誘導体(ダイオキシン活性物質)の分解特性について比較検討した。まず、精製したそれぞれの発現タンパク質に、ダイオキシン活性物質として2,3,7,8-TCDD, 3,3',4,4',5-PCB, Benzopyreneを添加した。これをダイオキシン活性物質のみを加えたものを陰性コントロールとして、今回完成させたダイオキシン測定系を活用して、分解・修飾活性を調べた。

結果と考察 = 本研究を通じて、ダイオキシンレポーター遺伝子の構築およびその遺伝子を導入したパーマネント株樹立は全て完了した。

ダイオキシン感受性細胞株であるマウス肝癌細胞株に構築したダイオキシン応答性レポーター遺伝子ベクターを導入した。一方、ダイオキシン非感受性細胞株であるチャイニーズハムスターオバリー(CHO)細胞株では、ダイオキシン受容体核トランスロケーターを共発現する必要があった。またこれらの株について、ダイオキシン様活性物質を添加して、本アッセイ系への適応性を調べた。その結果、ダイオキシン様活性物質4種のいずれも本測定法で検出可能であることが分かった。

次にこれら株のパーマネント化と測定感度の向上を図った。Hepa-1細胞株では、樹立株40クローンについて調べたところ32クローンで、一方CHO細胞株においては樹立株11クローンのうち5クローンでゲノムへの取り込みが認められた。ゲノムへの取り込みが確認された細胞株につき、RT-PCRを行い目的遺伝子が実際に転写されているかどうかを確認した。その結果、Hepa-1細胞株、CHO細胞株のいずれの細胞株でも、導入した遺伝子が発現していることが確認された。またこれら樹立細胞のダイオキシン類への応答を調べたところ、調べた全ての樹立細胞株で、3-メチルコランスレンに応答した。その応答はHepa-1細胞株の方がCHO細胞株より高かった。またHepa-1細胞株においても、樹立株によって応答能が2-3倍の差が認められた。用いたシャーレ間での測定誤差は、0.75 - 1.2以内におさまった。

次に、最も高感度であったHepa-1株クローンについてダイオキシン類測定感度を詳細に検討した。いずれの化合物においても濃度依存的な検量曲線が得られた。それぞれの化合物の測定感度は大きく異なり、TCDDでは100fMから5pMまで、PCBでは100pMから10nMまで、3-メチルコランスレンでは、10nMから10 $\mu$ Mまで、ベンツピレンでは500nMから5 $\mu$ Mまでの範囲で測定可能であった。また細胞の増殖状態が良好な時には

、検出感度は更に1オーダー上昇する事も観察された。従ってTCDDの測定感度については、当初の目標値である1nMを大きく上回る検出系を構築することができた。この測定感度は、廃棄物焼却炉等の特定施設の基準値を十分にクリアするのみならず、環境検体を測定するためにも十分である（環境基準値：大気環境中0.6pgTEQ/m<sup>3</sup>以下、水環境中 1pgTEQ/L以下、土壌環境中 1000pgTEQ/g以下）ため、全ての環境検体に適応可能と考えられた。

ダイオキシン分解系の構築はその酵素遺伝子をクローニングし大腸菌発現系を構築する業務全てが完了した。まずダイオキシン類分解酵素を得るために枯草菌を2,3-ジクロロダイオキシンで処理し、全RNAを調整した。この全RNAの逆転写反応物をプローブにして、枯草菌全遺伝子がスポットされているDNAマイクロアレイを行ない、その発現の変化を比較検討した。ダイオキシン誘導体処理により発現誘導がかかった遺伝子群を詳細に検討し、2つの酵素がダイオキシン分解する可能性があると考えられた。そこでこの2種の遺伝子を2株の枯草菌からクローニングし、その全DNA塩基配列を決定した。その結果、Cの酵素については報告されているものと同じクローン（CN）および全配列のうち17残基に変異が生じている変異型酵素Cクローン（CM）、酵素Sについては報告されているものと同じクローン（S）の3クローンを得、そのそれぞれの大腸菌発現系を構築した。また、白色腐朽菌からのマンガンペルオキシダーゼおよびリグニンペルオキシダーゼ、および大腸菌からのビフェニルオキシゲナーゼ酵素遺伝子のクローニングはRNAおよびゲノム遺伝子の双方から行ない、計10種類のクローンを得、上記と同様、大腸菌発現系の構築を行なった。

次に大腸菌発現酵素精製標品のダイオキシン類の分解・修飾活性を調べた。今回酵素（CN）、その変異体（CM）、酵素（S）の2,3,7,8-TCDD分解・修飾能について検討したところ、CMでは反応2日目にその活性の上昇、7日目には、0.7にまで減少していた。またCNでも同様の傾向があったが、変異体より顕著ではなかった。Sは、ほとんど分解能を示さなかった。次に、3,3',4,4',5-PCB、BenzopyreneはCNとCMで2,3,7,8-TCDDと同様の挙動を示した。またSでは5、7日後に多少の活性の低下が認められた。また、それぞれの酵素遺伝子発現ベクターのトランスフォーマントの培養抽出物でも、同様の結果が得られた。

結論 = 本研究開発の実施により、ダイオキシン誘導体の生体毒性を一括して簡便・迅速に検出・測定できるバイオアッセイ系を構築することができた。本法では最も毒性が強い2,3,7,8-TCDDでは100fMからの検出が可能であり、当初の目標値（1nM）をクリアした。

一方、ダイオキシン誘導体を生化学的に分解・不活化する手法を確立する目的で、枯草菌および白色腐朽菌からダイオキシン分解に關与する遺伝子のクローニングをし、この候補遺伝子の発現産物のダイオキシン類分解能を、今回開発したレポーター遺伝子アッセイを用いて行なった。その結果、程度の差はあったが、分解・修飾能が認められた。

これらの結果を総括すると、本研究開発により、分子生物学的手法を用いてダイオキシン誘導体をバイオアッセイ法にて検出・測定できる系の構築およびダイオキシン分解・修飾に関与する酵素遺伝子の発現系の構築を完了し、バイオレメディエーション系開発への筋道をつけることができた。