

トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の 健康・生物影響評価法の開発に関する研究

(特別研究)

Studies on application of toxicogenomics for risk assessment of environmental pollutants

平成16～18年度

FY 2004～2006

NIES



独立行政法人 国立環境研究所
NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES
<http://www.nies.go.jp/>

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR - 77 - 2007

トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の
健康・生物影響評価法の開発に関する研究

(特別研究)

Studies on application of toxicogenomics for risk assessment of environmental pollutants

平成16～18年度

FY 2004～2006

独立行政法人 国立環境研究所
NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「トキシゲノミクスを利用した環境汚染物質の健康・生物影響評価
法の開発に関する研究」
(期間 平成16～18年度)

特別研究責任者：野原恵子
特別研究幹事：野原恵子
特別研究報告書編集担当：野原恵子

序

本報告書は、平成16～18年度の3年間にわたって実施した特別研究「トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の健康・生物影響評価法の開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

私たちは日々多種多様の化学物質を利用し、その恩恵を受けています。その一方で、環境中に放出された化学物質がヒトの健康や生態系に悪影響を及ぼすことが懸念されています。例えば、近年のアレルギーの急増にみられるように、生活環境の変化がヒトの健康に影響を及ぼしていることは確実と考えられ、その中で環境化学物質の関与が強く示唆されています。このように、環境汚染物質の健康影響は、ヒトの健康を守るために看過できない問題です。同様に、環境汚染物質の動物・植物・微生物に対する影響研究も、健全な環境を維持するために必須の課題です。しかし、影響評価が必要と指摘されながらも、調査研究に手がつけられていない化学物質の数は数千種類にもものぼるといわれています。その主な原因として、従来の方法では一つの物質の生体影響を調べるだけでも多くの時間と経費を必要とし、膨大な数の化学物質の生体・生物影響を調べるのは不可能なことがあげられます。

上記のような現状を打開する技術として期待されるのがトキシコゲノミクスです。20世紀終盤から今日までの間に、ゲノム解読に関する技術や、全ゲノム解読によって得られた知見に基づき、生命現象の理解は飛躍的に進歩しました。その過程で開発された技術の代表例の一つが、全ゲノムの遺伝子発現を簡単に調べることができるDNAチップまたはマイクロアレイとよばれるツールです。このツールを用いることにより、遺伝子発現の変化から生体や生物の反応を網羅的に検出できることが期待されます。さらに、このツールは多種多様の物質の生体・生物影響を系統的・網羅的に検出・予測するためのシステム構築を可能にし、世界中でマイクロアレイデータを集積するいくつかの大型トキシコゲノミクスプロジェクト研究が開始されているところです。しかし、遺伝子発現変化から生体・生物反応をどこまで評価できるかという問いに対する答えはまだ十分に示されていません。

本特別研究では、トキシコゲノミクスを用いて環境汚染物質の生体および生物影響を評価する方法の開発とその有効性の検証を行いました。生体影響に関しては、各種環境化学物質の免疫系への影響について、トキシコゲノミクスが影響経路の検出に極めて有効なことを実証しました。植物・微生物・魚類についても、各種環境汚染物質の影響検出におけるトキシコゲノミクスの有効性を示し、さらに植物および微生物への影響をより簡便に検出するためのアレイの開発を独自に行いました。また、ダイオキシン応答性遺伝子データベースの作成を行い、このデータベースや本研究で得られた成果を広く一般に公開するため、NIESトキシコゲノミクスサイトというWebページを立ち上げました。これらは、環境汚染物質のトキシコゲノミクス研究の有用性を示した先駆的な結果であると思います。皆様にご活用いただければ幸いです。

本研究が向かう最終的なゴールは、トキシコゲノミクスによる体系的な環境影響評価システムを構築し、実際の影響評価法として確立するところにあります。このことを念頭において、さらに研究を積み重ねていく必要があると考えています。最後になりましたが、本研究は研究所の多くのスタッフや所外の方々の多大なご協力とご助言をいただき遂行されました。ここに深く感謝いたします。

平成 19 年12月

独立行政法人 国立環境研究所
理事長 大塚 柳太郎

目 次

1	研究の目的と経緯	1
1.1	研究の背景と経緯	1
1.2	研究の目的	2
1.3	研究の構成	2
2	研究の成果	3
2.1	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評価法の実験的予測法	3
2.1.1	環境汚染物質の免疫系に対する悪影響の遺伝子発現変化からの検出・予測に関する研究	3
2.1.2	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	9
2.1.3	ヒトとマウスにおけるダイオキシン(TCDD)感受性の種差決定因子に関する研究	12
2.2	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	16
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	16
2.2.2	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	21
2.2.2.1	環境微生物DNAマイクロアレイの開発	21
2.2.2.2	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	23
2.2.3	培養可能な微生物遺伝子の網羅的解析による土壌生態系への影響評価法の開発	24
2.2.4	残留性有機汚染物質・PFOA(perfluorooctanoic acid)により 特異的に発現される遺伝子のジーンアレイによる同定	29
2.3	環境研トキシコゲノミクスデータベースの作成	31
2.3.1	ダイオキシン応答性遺伝子データベースの開発	31
2.3.2	NIESトキシコゲノミクスサイトの作成	35
[資 料]		
	研究の組織と研究課題の構成	37
1	研究の組織	37
2	研究課題と担当者	37
	研究成果発表一覧	38
1	誌上発表	38
2	口頭発表	40

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の背景と経緯

近年、ヒトの健康が大きく変化していることが報告されている。顕著な一例としてアレルギーの増加が挙げられよう。花粉症などのアレルギーを持っている人は、ここ50年で5倍以上に増加しており、国民の3人に1人が何らかのアレルギーを有するという報告もある。このような急速な変化は従来の遺伝学で説明される範囲を超えており、近年の生活環境の変化が原因となっていると考えられている。その生活環境の中で何が主たる原因となっているか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も強く示唆されている。このような環境汚染物質の悪影響からヒトの健康を守るためには、種々の汚染物質の毒性を系統的かつ迅速に評価するシステムを構築し、必要に応じた対策を講じることが望まれる。そのために多くの努力がなされているものの、実際に多種多様な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、現実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している。

同様に世界の工業化が進むのに伴って、生態系に影響が及ぶことも必至である。光化学オキシダントの主要成分であるオゾンや酸性雨によって、植物の生育被害が報告されている。各種化学物質による河川の汚染が魚や水生生物に影響を及ぼしている例も報告されている。またまだその実態は十分に明らかにされていないが、トリクロロエチレンなどの有機塩素化合物や水銀、鉛などの重金属による土壌汚染が天然の微生物群集に不可逆的な影響を及ぼす可能性も考えられる。このような生態系の変化は互いに作用しながら深刻な環境悪化につながり、ひいてはヒトの生活環境を脅かす恐れも考えられる。これらの種々の環境汚染物質による生態系への悪影響についても、その影響を迅速に検出・評価するシステムの構築が望まれる。

このようなニーズにこたえる技術として、私たちは近年めざましく進歩したゲノミクス技術に注目をした。ヒトゲノムの全塩基配列解読に関する議論が1980年代後半にアメリカで始まった頃には、夢のような計画であると思われたが、実際に1991年に国際プロジェクトが開始された。そして約10年で29億塩基対の読み取りが終わり2001年に概要版が発表され、2003年にはヒトゲノムの完

全解読が宣言された。このプロジェクトの進行に伴って塩基配列読み取り技術が大きく進歩し、計画は当初の予定より早く終了するという成功を収めている。またこのプロジェクトと同時進行して行われたマウスゲノムの塩基配列の解読についても、すでに完全解読が終了している。その他、アメリカのNational Center for Biotechnology Information (NCBI) のサイトに収録されているゲノムプロジェクトだけでも、2006年現在で哺乳類をはじめとした真核生物については約350、細菌類などの原核生物についてはそれよりも多数のプロジェクトが完了または進行中で、そこで得られた莫大なゲノム情報も同サイトで簡単に閲覧することが可能となっている。

このようなゲノム情報の解読は、関連する技術開発や、また生命現象の理解に革命的な進歩をもたらした。ゲノム情報に基づいた画期的な技術の代表例として、DNAチップまたはマイクロアレイと呼ばれるツールがあげられる。この小さなチップを1枚用いることによって、例えばヒトの全遺伝子22,000個の機能、すなわち遺伝子の発現量を、一度に簡単に測定することが可能となった。この技術を利用することによって、生体反応の系統的・網羅的検出が可能となった。さらに、遺伝子発現を検出することによって生体の反応が顕在化する以前に影響を予測できることが期待される。これらの特徴は、まさに多種多様な環境汚染物質の生体・生物影響を系統的・網羅的に検出・予測するためのシステム構築を可能にするものであることが期待される。すなわちゲノミクス技術を毒性学にとりいれたトキシコゲノミクスを活用することによって、従来不可能であった影響検出・予測システムの構築が可能となることが期待される。

しかし同時に、果たして遺伝子発現でどこまで生体反応を予測できるのか、やはりたんぱく質のレベルを調べなければ反応の予測は不可能であろうという意見も、本特別研究を開始した時点では主張されていた。またDNAチップを利用して何万もの遺伝子発現情報を得たものの、情報量が多すぎて有効な結論を導き出せない、というような話が聞かれる状況も起きている。そこでトキシコゲノミクスのもつ大きな潜在的能力を十分に活用するためには、まずその有効な利用方法を検討し、有効性を検証する研究が必要である。

1.2 研究の目的

上記のような背景から、本研究ではトキシコゲノミクスのもつ大きな可能性を活用して、新たな環境汚染物質の生体および生物影響評価法を開発し、その有効性の検証を行う。この研究の成果によって、多種多様な環境汚染物質の生体・生物影響評価法の飛躍的効率化や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に資することを目的とする。

1.3 研究の構成

本研究では、国立環境研究所の複数の領域においてゲノム研究に携わる研究者が連携し、手法や機器などのリソースを共有し意見交換をしつつ、以下の3つのサブテーマを行う計画である。

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免疫臓器や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として、ヒトと実験動物でのダイオキシ

ンに対する感受性の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、DNAアレイを作成する。このアレイを用いて、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アレイの作成や、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。環境汚染物質の魚類への影響を検出する遺伝子バイオマーカーの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：ダイオキシン曝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、本研究で得られた成果を中心に、トキシコゲノミクスの環境研究への応用例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。

本研究の成果は、今後さらに、環境汚染物質の生体・生物影響の系統的・網羅的評価システム構築を可能とするための重要なステップになると私たちは考えている。

2 研究の成果

2.1 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評価法の実験的予測法

2.1.1 環境汚染物質の免疫系に対する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。同時に胸腺は環境からの影響を受けやすい臓器でもあり、多くの環境化学物質が胸腺を萎縮させる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、同時にT細胞への影響を介して、または異なる経路で、免疫機能抑制作用を示すことが報告されている。そこで胸腺萎縮は、化学物質等の免疫系への悪影響を検出するためのよい指標となると考えられる。実際に、免疫毒性を検出するために胸腺の病理組織検査が行われ、臓器重量や細胞構成の変化から影響検出が行われている。

一方、最近の研究から、多くの環境化学物質が各種の転写因子や核内受容体に作用して、転写すなわち遺伝子発現を変化させることによって生体に影響を及ぼすことが明らかにされつつある。そこで環境汚染物質による胸腺での遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて解析することによって、それぞれの環境汚染物質に特有の影響や作用経路を検出できる可能性が考えられる。特に胸腺は構成細胞の95%以上が胸腺細胞、すなわち未成熟T細胞集団であるという均一性の高い臓器であることから、遺伝子発現変化と影響との対応がわかりやすく、遺伝子発現変化によって影響を検出するという目的に適した臓器であると考えられる。

これまでの胸腺萎縮作用、すなわち胸腺重量や細胞数の減少を指標とした影響検出法では、胸腺に影響がある、すなわち免疫毒性があることは検出できるものの、物質特有の作用経路を推測することは不可能だった。このような物質特有の経路が遺伝子発現変化の網羅的解析から明らかになれば、胸腺での影響にとどまらず、さらに末梢の種々の免疫機能への影響の推測も可能となることが期待される。また影響の遺伝子発現変化による検出は、影響が顕在化する前に、早期に影響を検出できる可能性を示すものである。

そこで本研究では、胸腺萎縮をおこすことが報告されている各種環境汚染物質によるマウス胸腺での遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて網羅的に解析すること

によって、各物質に特有の影響経路や、胸腺萎縮の原因となる遺伝子指標、または影響を鋭敏に検出する影響指標を明らかにするための研究を行った。

(1) 各種環境化学物質による胸腺萎縮作用

胸腺萎縮作用やその他の免疫抑制作用が報告されている環境中の汚染物質として、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)、無機ヒ素（亜ヒ酸）、トリブチルスズ、トリフェニルスズ、メチルジチオカルバメート、perfluorooctane sulfonate (PFOS)、diethylhexyl phthalate (DEHP) について検討を行った。TCDDは環境中に広く分布するダイオキシン類の中で最も毒性が強い化合物で、いわゆるダイオキシンとよばれる化学物質である。無機ヒ素は、インド、パングラデッシュ、中国をはじめとした世界各国で、地下水の無機ヒ素汚染による慢性ヒ素中毒が深刻な環境問題となっている。トリブチルスズ、トリフェニルスズは農・漁業において殺菌剤や防黴剤として使用されており、メチルジチオカルバメートは殺虫剤として多用されている。PFOSは強力な界面活性剤として、また紙や布に撥水性や耐油性を持たせるために、広く工業や生活の中で使用され、DEHPをはじめとしたフタル酸ジエステル類は可塑剤として大量に使われている。

また、無機ヒ素やその他のストレスがグルココルチコイドホルモンを介して胸腺を萎縮させることが報告されていることから、合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン（DEX）についても検討を行った。環境汚染物質のエストロゲン作用が問題となっているが、エストロゲンは胸腺萎縮作用をもつことから、エストロゲンの中の1つである17β-エストラジオール（E2）についても検討を行った。

これらの化学物質について、まず胸腺重量を70-50%程度まで萎縮させる用量を決定し、胸腺重量変化の観察と遺伝子発現解析を行った。実験に用いた用量を表1に示した。またこれらの化学物質によって活性化されることが報告されている転写因子や核内受容体を表1にあわせて記した。

各化学物質投与によって、体重には対照群と比較して顕著な変化は見られなかった。胸腺重量（図1）は、TCDD投与群およびDEX投与群では1、3、7日と経時

的に減少した。メチルジチオカルバメート投与群では1日後に胸腺重量が最小となり、その後3日、7日と回復した。その他の化学物質では、投与3日後に胸腺重量が最小になり、7日後には回復が見られた。胸腺細胞数も、胸腺重量と同様の増減を示した。

各種化学物質によって胸腺重量が1日または3日後に減少することが明らかとなったことから、胸腺重量減少の原因経路を探るために、投与1日後(24時間後)の遺伝子発現変化を調べることとした。胸腺細胞は成熟・分化段階によって主に4つの細胞群、すなわち最も未成熟で胸腺細胞中の3-4%の細胞群であるCD4⁺CD8⁻ダブルネガティブ細胞(DN細胞)、次に成熟度が低く全体の85%程度を占める大きなポピュレーションであるCD4⁺CD8⁺細胞(DP細胞)、およびそれぞれ10%弱または3-4%程度である成熟CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞に分けることができるが、各化学物質投与1日後では細胞構成の大きな変化は認められなかった。すなわち、遺伝子発現変化が、単に細胞構成の変化に由来する恐れを排除できると考えられた。

(2) 各種環境化学物質による胸腺での遺伝子発現変化の解析

マウスに各化学物質を投与し、24時間後に胸腺から全RNAを調製し、1枚のアレイで約39,000の転写産物を解析可能なAffymetrix社のマイクロアレイGeneChip(Mouse Genome 430 2.0アレイ)を用いて遺伝子発現解析を行った。独立の2回の実験で、対照群に対して曝露群で発現が繰り返し2倍以上に上昇、または1/2以下に低下した遺伝子を発現が変動した遺伝子として選択した。選択された遺伝子の数(転写産物の数)を表2に示した。

各種化学物質によって発現が変動した遺伝子について、遺伝子ネットワーク/パスウェイ解析データベースIngenuity Pathway AnalysisおよびKeyMolnetを用いた解析や文献検索等を行うことによって、遺伝子発現データから影響経路や標的細胞群の推定を行った。

1) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

ダイオキシン類は転写因子arylhydrocarbon receptor

表1 本研究に用いた化学物質

化学物質	投与量	活性化されることが報告されている転写因子
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD)	10 µg/kg	arylhydrocarbon receptor (AhR)
亜ヒ酸 (ナトリウム塩)	10 mg/kg	nuclear factor κB (NFκB), nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)
トリブチルスズ (塩化物)	4.0 mg/kg	retinoid X receptor α (RXRα)
トリフェニルスズ (塩化物)	10 mg/kg	peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ)
メチルジチオカルバメート(ナトリウム塩)	200 mg/kg	-
Perfluorooctane sulfonate (PFOS)	30 mg/kg	PPARα
diethylhexyl phthalate (DEHP)	1.0 g/kg	PPARα
デキサメタゾン(DEX)	2.5 mg/kg	glucocorticoid receptor (GR)
-エストラジオール(E2)	3 mg/kg	estrogen receptor (ER)

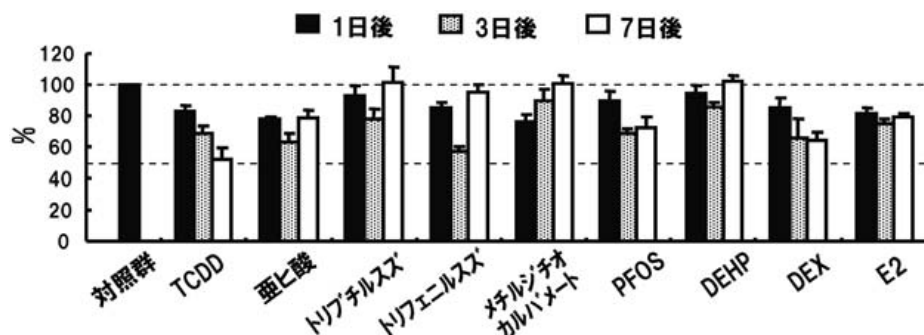


図1 各種化学物質投与による胸腺重量の変化

1群3匹のマウスに各化学物質を投与して胸腺重量を測定した。コーンオイル投与1日後の対照群の平均胸腺重量に対する比率(平均値±標準偏差)で示した。

(AhR)を活性化することによって、主にエンハンサー領域にXRE配列を持つ遺伝子の転写を誘導または調節し、胸腺萎縮や免疫機能の抑制を含むさまざまな悪影響を發揮することが明らかにされている。

ダイオキシン類によるAhRの活性化の結果、種々の臓器や細胞で薬物代謝酵素であるCYP1A1の遺伝子がダイオキシン標的遺伝子として強く誘導される。本研究でもTCDD曝露マウスの胸腺でCYP1A1の発現が大きく増加した。しかし発現上昇した遺伝子数は少なく、他に発現上昇したのはTCDD曝露で胸腺で誘導されることがすでに報告されている*adseverin*と、*CTLA2* および機能不明な因子の遺伝子3種類の、合計6種類のみであった。また発現が減少した遺伝子は*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M*という遺伝子1種類であった。今回発現変動が検出された遺伝子の中には、細胞増殖に関与することが明らかにされている遺伝子はなく、これらの遺伝子の発現変動が胸腺萎縮の原因となるとは考えにくかった。

TCDD曝露による胸腺萎縮の原因としては、TCDDによる胸腺細胞のアポトーシスと細胞周期抑制の2つが示唆されているが、私たちのこれまでの研究ではTCDDが胸腺細胞のアポトーシスを誘導することを否定する結果

表2 化学物質の曝露によって胸腺で発現が2倍以上に上昇した遺伝子と1/2以下に低下した遺伝子(転写産物)の数¹⁾

化学物質	上昇	低下
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD)	6	1
胸腺DN細胞*	71	5
亜ヒ酸	21	126
トリブチルスズ	27	198
トリフェニルスズ	21	247
メチルジチオカルバメート	2	191
Perfluorooctane sulfonate (PFOS)	1	0
diethylhexyl phthalate (DEHP)	1	0
デキサメタゾン (DEX)	30	13
-エストラジオール (E2)	1	1

1) 1群3匹のC57BL/6マウスに化学物質を投与し、24時間後に胸腺を摘出して全RNAを調製した。3匹分のRNAをまとめて1試料とし、GeneChipによる遺伝子発現解析を行った。独立の2回の実験で、対照群に対して曝露群で発現が繰り返し2倍以上に上昇、または1/2以下に低下した遺伝子を選択した。

*TCDD曝露したマウスの胸腺よりダブルネガティブ(DN)細胞を調製し、遺伝子発現解析を行った。

が得られている。一方、ダイオキシンによる細胞周期抑制は、胸腺細胞全体の中のごく小さなポピュレーションであるCD4⁺CD8⁻ダブルネガティブ細胞(DN細胞)の中の特にDN3というポピュレーションへの影響であることが報告されている。DN3細胞は非常に盛んに増殖する細胞群で、この細胞群への影響によって結果的に胸腺細胞が減少することが示唆されている。したがって、ダイオキシンがDN細胞特異的に影響を及ぼすとすると、対照群とTCDD曝露群について胸腺細胞全体と比較したのでは変動が検出できない可能性が考えられた。

そこでさらに、対照群とTCDD曝露群マウスの胸腺からそれぞれDN細胞を調製し、GeneChipを用いて遺伝子発現の比較を行った。その結果、予想通り多くの遺伝子の発現変化が検出され、DN細胞がTCDDの作用の標的であることが示唆された。DN細胞でTCDD曝露によって発現が上昇した遺伝子(転写産物)は71種類で、低下した遺伝子(転写産物)は5種類であった(表2)。これらの遺伝子には、ダイオキシン標的遺伝子の*Cyp1b1*, *adseverin*, *TiPARP*のほか、細胞周期、アポトーシス、細胞接着、受容体その他いろいろなカテゴリーの遺伝子が含まれていた。中でも、T細胞の増殖抑制に重要な役割を果たすことが報告され、また未成熟胸腺細胞の胸腺外移出に関与することが報告されている転写因子である*Klf2*と、その標的遺伝子であることが報告されている *7-integrin*や*Il10R*等の遺伝子の発現上昇が検出された。また同じく未成熟胸腺細胞の胸腺外移出に関与することが報告され、胸腺細胞のアポトーシスに関与することが報告されている*galectin-3*遺伝子の発現上昇が検出された。これらがTCDDによる胸腺萎縮の原因経路であることが強く示唆された。

ダイオキシン類の毒性はAhRの活性化を介することが明らかにされ、毒性メカニズムの研究が盛んに行われてきたが、AhRの下流から毒性発現に至るメカニズムはまったく明らかにされていない。すなわち、AhR活性化によって遺伝子発現が誘導あるいは抑制されて毒性影響につながると考えられるが、その原因遺伝子は明らかにされていない。今回、胸腺全体の遺伝子発現解析ではやはり原因となると考えられる遺伝子を見つけることができなかったが、DN細胞を分離することによってTCDD特異的に影響を受ける経路が明らかとなり、特に主要な原因と考えられる経路が示唆された。今後*Klf2*遺伝子と*galectin-3*遺伝子の発現上昇の胸腺萎縮への関与について

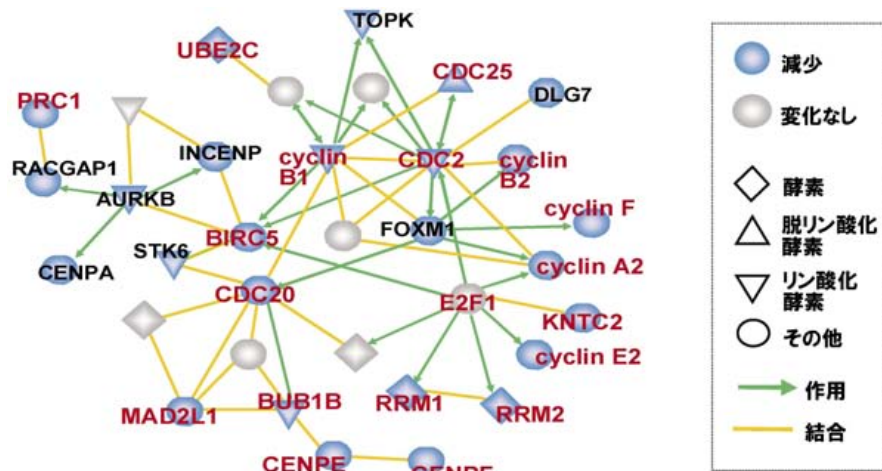


図2 亜ヒ酸で発現が低下した遺伝子群ネットワーク
赤字は細胞周期進行に關する遺伝子

検討し、AhR下流の胸腺萎縮誘導経路を明らかにしたいと考えている。

2) 亜ヒ酸

亜ヒ酸投与マウスの胸腺では、対照群と比較して21種類の遺伝子（転写産物）の発現が増加し、126種類の遺伝子（転写産物）の発現が減少した（表2）。これらの発現変動した遺伝子について、影響パスウェイ解析ソフトを用いてパスウェイ解析を行った。その結果、亜ヒ酸曝露が転写因子E2F1、およびE2F1によって発現制御される細胞周期進行に必要な遺伝子群の発現を低下させることが明らかとなった（図2）。なお、GeneChipで低下が検出された遺伝子発現について、10種類を選んでRT-PCR法による確認を行ったところ、GeneChipの結果と一致することが確認された（図3）。

そこで胸腺細胞の細胞周期をフローサイトメトリーによって測定したところ、亜ヒ酸曝露で実際に細胞周期の抑制が検出された。胸腺で細胞分裂し増殖している細胞

の約90%は胸腺で成熟中のCD4⁺CD8⁺細胞（DP細胞）というポピュレーションで、残りの10%以下が最も未成熟なCD4⁺CD8⁻細胞（DN細胞）の中のDN3細胞である。亜ヒ酸曝露したマウス胸腺では、DN細胞の中のDN1からDN4の4つのポピュレーションの細胞比は変化しないことから、上述のTCDDの場合とは異なり、ヒ素で細胞周期抑制をおこすのはDP細胞であることも示唆された。

遺伝子発現変化から、亜ヒ酸で胸腺において転写因子E2F1が感度高く影響を受けることが示され、細胞周期抑制も検出された。これらの変化が実際に細胞数の減少につながるか、またE2F1の機能が実際に抑制されているかどうかを、さらに細胞株を用いて確認する研究を行った。

マウスBリンパ球株A20細胞は、2-10 μM亜ヒ酸の24時間曝露によってE2F1やその下流の細胞周期進行に必要な遺伝子の発現低下（図4A）、および細胞周期抑制を示し（図4B）、胸腺細胞へのヒ素曝露の影響を再現するよい実験系であることが明らかとなった。この細胞株では2-10 μMのヒ素曝露で顕著な細胞増殖の抑制、すなわち細胞数増加の抑制が認められた（図4C）。アポトーシスは検出されなかった。すなわち、ヒ素がE2Fファミリーを介した細胞周期抑制によって細胞数を減少させることが確認された。

最近、肝細胞株などで無機ヒ素がNrf2を活性化することが報告されているが、胸腺ではNrf2の標的遺伝子であるHO-1などの発現誘導は観察されなかった。以上の結果から、免疫細胞ではヒ素はE2Fを介した細胞増殖抑制

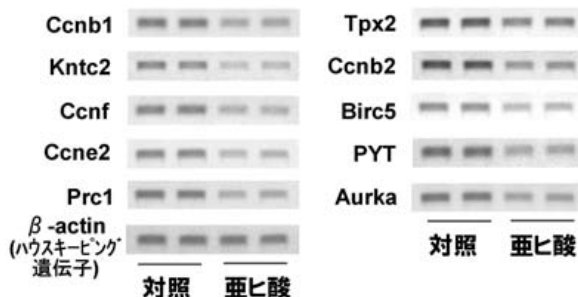


図3 RT-PCRによる遺伝子発現変化の確認

によって胸腺萎縮を誘導するという影響経路を明らかにした。

3) トリフェニルスズ, トリブチルスズ, メチルジチオカルバメート

トリフェニルスズ, トリブチルスズ, メチルジチオカルバメート投与したマウスの胸腺では, それぞれ247, 198, 191遺伝子 (転写産物) の発現低下が観察された。その中にはヒ素曝露で低下した細胞周期関連の遺伝子が数多く含まれていることが明らかとなり, これらの3つの化合物が無機ヒ素と同様にE2Fの系を介して細胞周期抑制をおこし, これが胸腺萎縮の原因となることが示唆された。

一方, 最近の*in vitro*実験系を用いた研究では, トリフェニルスズとトリブチルスズがそれぞれ核内受容体であるperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) とretinoid X receptor (RXR) のアゴニストとなることが報告されている。本研究では, トリフェニルスズ曝露で21遺伝子 (転写産物) の発現上昇が観察され, その中にはPPARの標的遺伝子である*Cd36*, *angiopoietin-like 4 (Angptl4)*, *fatty acid binding protein 3 (Fabp3)*が含まれていた。このことから, トリフェニルスズはマウス胸腺においてもPPARのアゴニストとして働くことが示唆された。PPARのアゴニストがリンパ球でアポトーシスを誘導することが報告されていることから, PPARの活性化によるアポトーシスもトリフェニルスズによる胸腺萎縮に関与する可能性が考えられた。免疫細胞に

おけるPPARの役割についてはまだ十分に明らかにされていないことから, トリフェニルスズ, トリブチルスズのPPARの活性化を介した作用に関しては, 今後さらに検討が必要であろう。

4) perfluorooctane sulfonate (PFOS), diethylhexyl phthalate (DEHP)

DEHPは核内受容体であるperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) を, またPFOSはPPARやPPAR/を活性化することが報告されているが, 本研究ではPFOSまたはDEHP曝露ではそれぞれわずかに*parathyroid hormone (PTH)* 1遺伝子が発現上昇したのみであった。また今回の研究で, ヒ素曝露でも*PTH*の発現上昇が観察された。*PTH*は免疫系に影響を及ぼすことが報告されているが, これまで胸腺萎縮との関連や細胞増殖における役割は報告されていない。今回観察された*PTH*の発現上昇が胸腺萎縮に関与するかどうかについて, 今後検討が必要である。

なお, *PTH*がPPARやPPAR/の標的遺伝子であるという報告はないことから, *PTH*の発現上昇がPPARやPPAR/の活性化を介した結果とは考えにくかった。また, PFOSが細胞表面の電荷を変化させることなどが報告されており, 今回PFOSおよびDEHPで誘導された胸腺萎縮については, 遺伝子発現変化を介するよりもむしろ生化学的な変化を介した結果である可能性も考えられた。

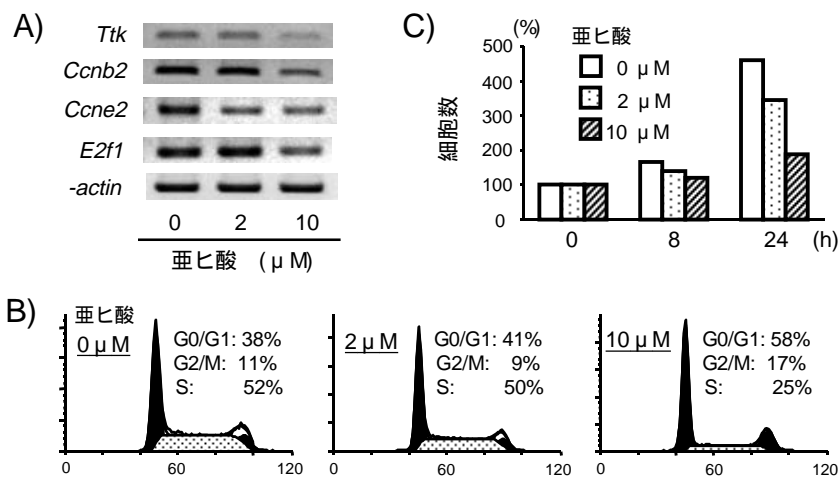


図4 マウスリンパ球株A20細胞への亜ヒ酸曝露の影響

A) 曝露24時間後, 細胞周期の進行に必要な因子の遺伝子発現が低下した。B) 曝露24時間後, 細胞周期抑制が観察された。C) 細胞数増加の抑制も観察された。

5) デキサメタゾン (DEX)

グルココルチコイド (GC) や合成グルココルチコイドであるDEXは、核内受容体であるグルココルチコイドレセプター (GR) と結合することによって胸腺萎縮を誘導すると考えられている。DEX投与マウスの胸腺では、対照群と比較して30種類の遺伝子 (転写産物) の発現が増加し、13種類の遺伝子 (転写産物) の発現が減少した。影響パスウェイ解析ソフトによる解析の結果、GCによる胸腺萎縮の原因となることが報告されているGC-induced leucine zipper (GILZ) に関連する遺伝子群の発現が上昇していることが示された (図5)。GILZがどのように胸腺萎縮を起こすかはまだ明らかにされていないが、DEX投与によってGILZの発現が上昇し胸腺萎縮を誘導することが示唆された。

6) エストラジオール (E2)

エストロゲンは、胸腺の発達やTリンパ球産生に影響を及ぼすことが知られている。特に妊娠によって血液中のエストロゲン濃度は大きく上昇し、実験動物ではこの時期に胸腺萎縮がおこることが観察されている。エストロゲンによる胸腺萎縮の生理学的な意義は明らかではないが、胎児を異物として攻撃しないための母親の免疫寛容に関与することも示唆されている。

本研究では、E2曝露で変動した遺伝子数はごく少なく、*palate, lung, and nasal epithelium carcinoma associated* という遺伝子1種類が上昇し、機能不明の遺伝子1種類が低下したのみであった。

エストロゲンは核内受容体であるエストロゲンレセプター (ER) を活性化して作用を発揮すると考えられるが、エストロゲンによる胸腺萎縮の原因となる遺伝子は

不明である。エストロゲンによる胸腺萎縮については、最近3つのメカニズムが示唆された。すなわち骨髄細胞中の胸腺細胞前駆細胞の減少、胸腺細胞中最も未成熟なDN細胞数の減少、およびDN細胞の増殖抑制である。胸腺細胞の中でDN細胞が特異的に影響を受けるとすると、ダイオキシンの場合と同様に胸腺細胞全体の遺伝子発現解析では対照群と曝露群の差は検出されない可能性が考えられる。そこでエストロゲンによる遺伝子発現から胸腺萎縮にいたる経路については、ダイオキシンの場合と同様に、DN細胞を分離して遺伝子発現変化を調べることによって胸腺萎縮の原因遺伝子を見つけられる可能性が考えられた。

(3) 胸腺での遺伝子発現解析研究のまとめと今後の展望

胸腺はいろいろなストレスや化学物質の曝露によって影響を受けやすく、胸腺萎縮をおこすことが知られていた。しかし、それぞれの物質が同じ経路、たとえばGCの分泌を介して胸腺萎縮をおこすのか、またはそれぞれに異なる経路で胸腺萎縮をおこすのかについてや、具体的な影響経路は不明の部分が多かった。それは従来の生化学的手法では、簡便なスクリーニングが難しかったためと考えられる。本研究では、種々の化学物質による胸腺萎縮について遺伝子発現の網羅的解析を行うことによって、各物質の影響経路について多くの情報が得られることが明らかとなった。本研究の成果に、私たちが先に同様の実験系で行ったメチル水銀の結果を加えて、図6に示した。

本研究では、無機ヒ素が胸腺で転写因子E2Fの作用を介して、DP細胞の細胞周期を抑制することによって胸腺萎縮をおこすことが示唆された。実際に胸腺細胞で細

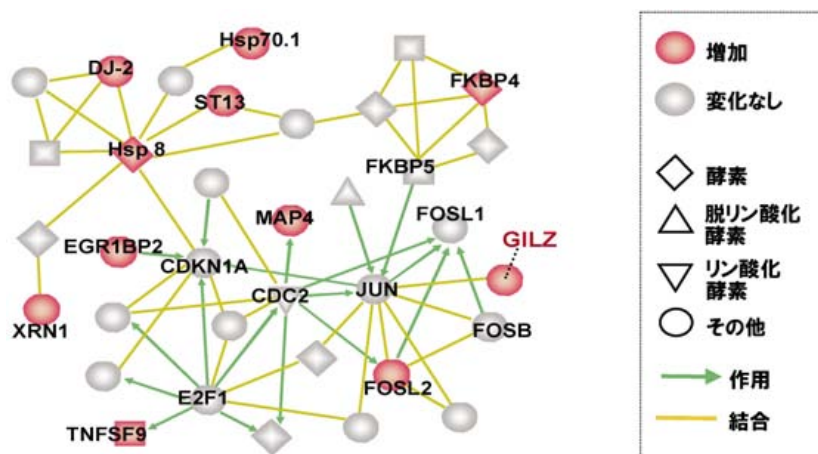


図5 デキサメタゾン (DEX)で発現が低下した遺伝子群ネットワーク

胞周期の抑制がおこっていることも測定された。またメチルジチオカルバメートやトリフェニルスズでも同じ経路によって胸腺萎縮がおこることが示唆された。

合成GCであるDEXでは、胸腺萎縮の原因となることが報告されていた*GILZ*の発現上昇が検出され、これがGC依存性の胸腺萎縮のマーカーとなると考えられた。

またダイオキシンとE2は、それぞれ転写因子AhRまたは核内受容体ERを活性化するが、本研究でダイオキシンとE2によって胸腺全体で発現変動が検出される遺伝子の数はごく少なかった。この原因は、ダイオキシンとE2はいずれもごく小さなポピュレーションであるDN細胞の中のDN3細胞の遺伝子発現に特異的に影響を及ぼすためであり、すなわちDN3細胞が両化学物質の標的細胞であることが示唆された。

なおダイオキシン曝露については、DN細胞を分離して遺伝子発現変化の網羅的解析を行ったところ、胸腺萎縮と密接に関係すると考えられる*Klf2*および*galectin-3*の発現上昇が明らかとなった。

PFOSおよびDEHPでは1遺伝子の変動が検出されたのみで、胸腺萎縮との関連は明らかにならなかった。また私たちは先に、メチル水銀曝露では1遺伝子、*CYP2E1*の発現上昇が認められることを観察している。*CYP2E1*を介した酸化傷害が胸腺萎縮につながる可能性が考えられるが、今後の検討が必要である。またこれらの化学物質についても、ダイオキシンやE2と同様に胸腺細胞の中のごくわずかなポピュレーションに影響を及ぼすことから胸腺細胞全体の解析では影響が検出できない可能性も考えられるが、むしろ遺伝子発現変化を介さず、直接たんぱく質に影響を及ぼして作用する可能性が考えられた。

マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析が一般的になり始めた2000年頃には、遺伝子発現を見ても細胞

内でおこっていることはわからないだろう、ゲノミクスよりはプロテオミクスを行うべきである、と予測する意見も多く聞かれた。しかし上に述べたように本研究では、トキシコゲノミクスが各化学物質に特異的な影響経路や標的細胞に関する情報を得るために大いに有効な手法であることが示された。近年いろいろな化学物質が各種転写因子や核内受容体に作用することが明らかにされたことも、影響の原因経路を探る目的で遺伝子発現の網羅的解析を行うことの妥当性を支持している。また各種転写因子・核内受容体の標的遺伝子が次々と明らかにされていることも、結果を解析する上での助けとなっている。影響経路に関する一次スクリーニングの手段として、ゲノミクスはプロテオミクスよりもはるかに簡便に行えることも大きな利点である。

本研究では、種々の化学物質がそれぞれ特異的な経路で胸腺萎縮を誘導する可能性が明らかとなった。この結果をもとに、さらにたんぱくレベルの検討や関連経路に関する検討を行うことによって、各化学物質が胸腺萎縮を誘導する経路が明らかになることが期待される。単に発現が変動したというだけでは、その遺伝子が目的とする変化を検出するための指標となりうるのかどうかの確証を得ることができない。それに対して、本研究が目的としたように、影響との関連が明らかな遺伝子指標を用いることによって、より確実性をもって遺伝子発現から影響予測を行うことが可能となると考えられる。

2.1.2 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

ダイオキシン類は、体内に入るとAhR (aryl hydrocarbon receptor) という転写因子に結合してこれを活性化し、転写すなわち遺伝子発現を変化させることによって毒性を発揮する。このメカニズムは動物の種によらず共



図6 各種化学物質による胸腺萎縮の誘導経路

通であるが、ダイオキシン類の毒性に対する感受性は、動物の種によって大きく異なることが知られている。

その感受性差の主な原因として、動物種によってAhRの構造が少しずつ異なり、AhRとダイオキシン類の親和性が異なることがあげられる。例えばダイオキシン類に対して高親和性のAhRをもつC57BL/6という系統のマウスでは、ダイオキシン類の投与によって標的遺伝子が強く誘導され、毒性も強くあらわれる。これに対してダイオキシン類に低親和性のAhRをもつDBA/2という系統のマウスでは、ダイオキシン類による標的遺伝子の誘導は弱く、毒性も現れにくい。一方ヒトは、AhRの構造やそのダイオキシン親和性がDBA/2マウスと類似していることから、ダイオキシン類に対する感受性もDBA/2マウスと同程度と予想されている。しかし実際のヒトのダイオキシン感受性については不明な点が多い。

ダイオキシン感受性の動物種差は、動物実験で得られた結果からヒトへの影響を推測し、ダイオキシン類のヒトへの悪影響を予防するために必須の知見である。私たちはこれまで、ダイオキシン類の毒性の標的の一つである免疫系に対する影響について、実験動物を用いて研究を行ってきた。ダイオキシン類の免疫系に対する悪影響は、リンパ球のAhRの活性化を介して発現することが明らかにされている。そこでヒトと実験動物のリンパ球のダイオキシン反応性を比較することによって、ヒトと実験動物の免疫機能への影響の目安が得られると考えられ

る。このことから本研究では、ダイオキシン類に高親和性のAhRをもつことが報告されているC57BL/6マウスとSDラット、低親和性のAhRをもつDBA/2マウス、およびヒトの血液リンパ球を用いて、ダイオキシン類感受性の種差の比較検討を行った。

ヒトや各動物のリンパ球のダイオキシン感受性の比較は、ダイオキシン類によるAhRの活性化によって感度高く誘導される標的遺伝子である*CYP1A1*の誘導量を測定することによって行うこととした。そのためにヒト、マウス、ラットの*CYP1A1* mRNAでお互いに100%相同な領域にPCRプライマーを設計し、同じ効率でPCR測定できるプライマーを作成した。ハウスキーピング遺伝子についても、同様に各動物で同じ効率で測定ができるプライマーを作成した。ヒトおよび各動物の血液よりリンパ球を調製し、最も毒性の強いダイオキシンである2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)存在下培養した後、RNAを調製し、*CYP1A1*やハウスキーピング遺伝子のmRNAについて、RT-PCRまたはリアルタイムPCRで測定を行った。

TCDDによる*CYP1A1* mRNA誘導の時間的変化を調べた結果、DBA/2マウスとSDラットでは2時間で、C57BL/6マウスとヒトでは6-8時間で最大となることがわかった(図7)。次に、これらの誘導が最大になる時間で、各動物の*CYP1A1* mRNA誘導のTCDD用量依存性を測定した。図8Aに示すように、ヒト、DBA/2マウス、SDラットの

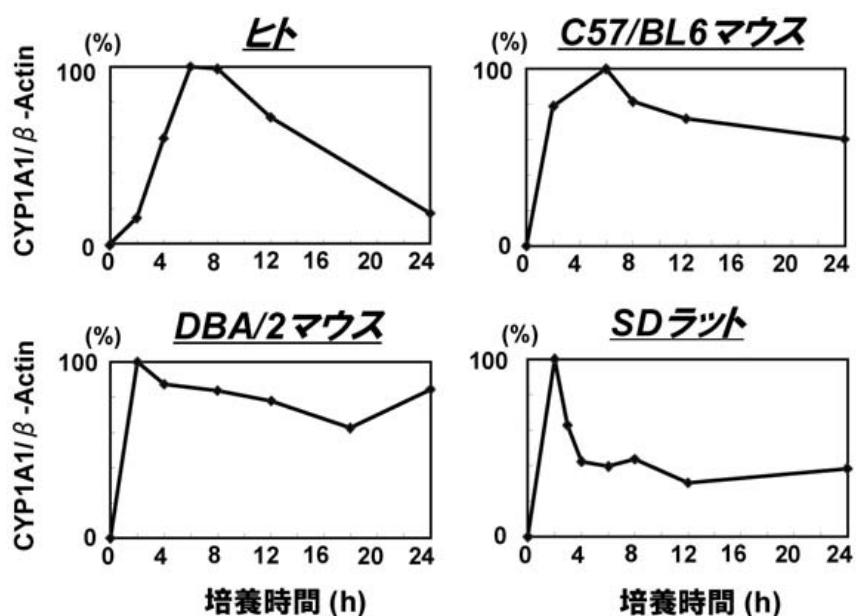


図7 *CYP1A1* mRNA誘導のタイムコース
ヒトおよび各動物のリンパ球を10 nM TCDD存在下培養し、経時的にRNAを調製した。*CYP1A1* mRNA量はRT-PCRによって測定し、ハウスキーピング遺伝子である β -actinの量で補正した。

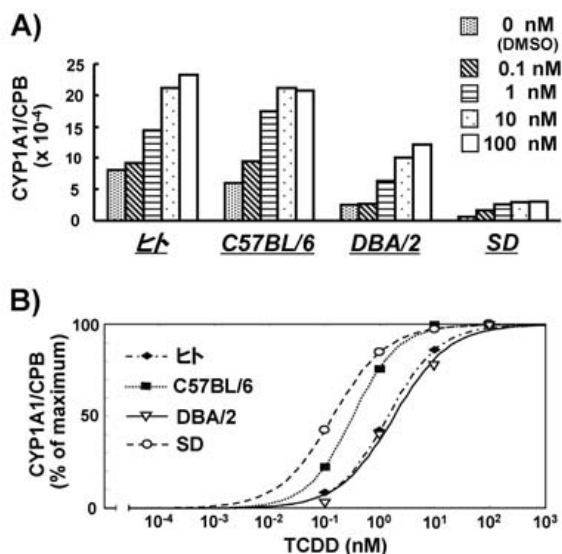


図8 *CYP1A1* mRNA誘導のTCDD用量依存性
ヒトおよび各動物のリンパ球を0 - 100 nM TCDD存在下培養後、RNAを調製した。培養時間は図7の実験から、*CYP1A1* mRNAの誘導が最大となる時間（ヒト，C57BL/6マウス，6時間；DBA/2マウス，SDラット，2時間）とした。*CYP1A1* mRNA量はRT-PCRによって測定し，ハウスキーピング遺伝子である *cyclophilin B* (*CPB*)の量で補正した。

リンパ球ではTCDD 100 nMまで用量依存的に発現が増加した。またC57BL/6マウスでは10 nMで発現が最大となった。図8Bの用量反応曲線から EC_{50} 値を求めると，SDラット (0.14 nM)，C57BL/6マウス (0.33 nM)，ヒト (1.43 nM)，DBA/2マウス (1.85 nM) の順で，これまでに報告されているそれぞれのAhRのTCDDとの親和性の強さと対応していることがわかった。

次に非喫煙者の女性，非喫煙者の男性，喫煙者の男性，それぞれ3名ずつのリンパ球を用いて，10 nM TCDDによる*CYP1A1* mRNA誘導量を測定した（図9）。血液から調製したばかりのリンパ球では，*CYP1A1* mRNAはほとんど検出されなかった。一方TCDD溶液の調製に用いた溶媒であるdimethyl sulfoxide (DMSO)のみを加えて培養したリンパ球では*CYP1A1*の誘導が検出されたが，10 nM TCDD存在下培養することによってさらに*CYP1A1* mRNAの強い誘導が認められた。

またヒトとその他の動物のリンパ球の*CYP1A1* mRNA量の比較を行った。図10にヒトおよび各動物のリンパ球の*CYP1A1* mRNA量の平均値を示した。この測定の結果，

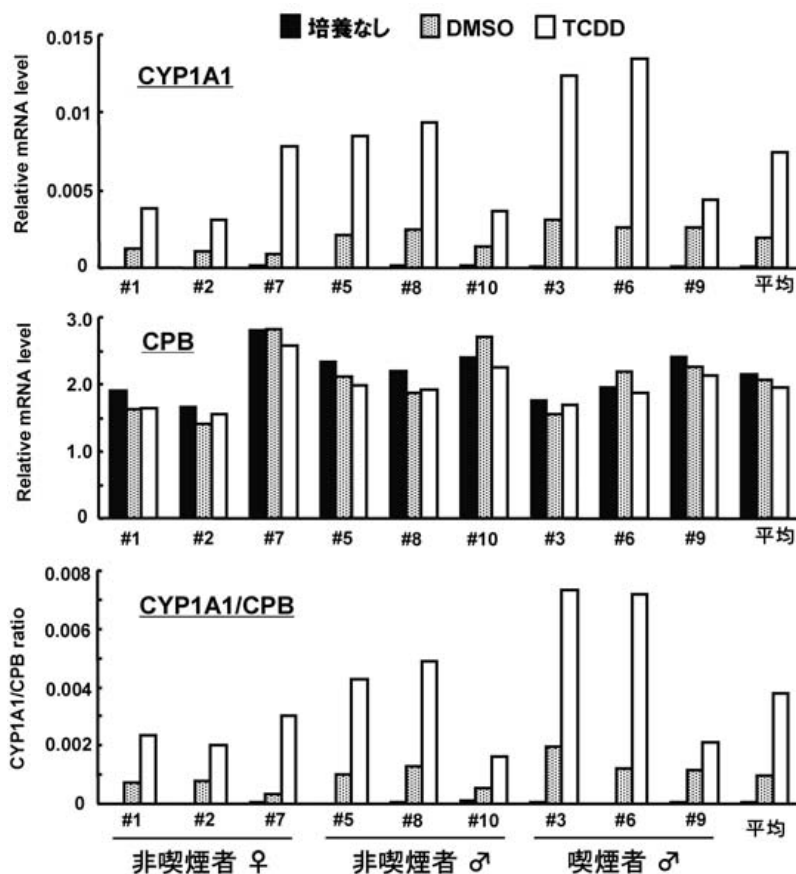


図9 ヒトリンパ球の*CYP1A1* mRNA誘導量
非喫煙者（男性，女性）または喫煙者（男性）の血液からリンパ球を調製し，培養前，およびdimethyl sulfoxide (DMSO) または10 nM TCDD存在下6時間培養した後にRNAを調製した。*CYP1A1*とハウスキーピング遺伝子である *CPB*の量をリアルタイムPCRで測定した。

ヒトのリンパ球ではダイオキシン感受性が低いであろうという予想に反して、ダイオキシン類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CYP1A1 mRNAの発現量が高いことが明らかとなった。

以上の結果から、ヒトのリンパ球ではダイオキシン類による遺伝子発現変化が強くおこり、ダイオキシンによる影響が強くなる可能性が示唆された。この結果から、ヒトの免疫系に対するダイオキシン類の影響には注意が必要であろうと考えられた。またリンパ球には、AhRとダイオキシン類と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と考えられた。

2.1.3 ヒトとマウスにおけるダイオキシン (TCDD) 感受性の種差決定因子に関する研究

AhR (aryl hydrocarbon receptor) は、リガンド活性化型の転写因子であり、TCDDによる毒性発現を仲介する。TCDDによる毒性の発現と、TCDDによるAhR依存的な標的遺伝子の発現は、よく対応しており、TCDDによるAhR依存的な遺伝子発現には以下のようなメカニズムが

提案されている。TCDDがAhRに結合すると、AhRが活性化されて核内に移行し、ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) とよばれる分子と複合体を形成する。その後、AhR/ARNT複合体は、たとえばCYP1A1のようなAhR依存的に発現が誘導する標的遺伝子のエンハンサー領域に存在するXRE (xenobiotic responsive element) 配列に結合することで、標的遺伝子の発現を誘導または調節すると考えられている。最近の研究から、ユビキチン/プロテアソーム系での分解によるAhR量の減少や、ヒストンのアセチル化やクロマチン構造のリモデリングも、AhR依存的な遺伝子発現に関与することが示されている。

前節で述べたように、AhR依存的な遺伝子発現誘導は、動物種によって大きく異なることが知られている。これまでの研究から、TCDDによるAhR依存的な遺伝子発現の動物種特異性の主な原因は、TCDDとAhRの親和性であると考えられていた。しかしながら、TCDDとAhRの親和性以外の因子がAhR依存的な遺伝子発現誘導決定に大きく関与していることが前節(2.1.2)で示された。AhRパスウェイに関する様々な因子として、AhRの核輸

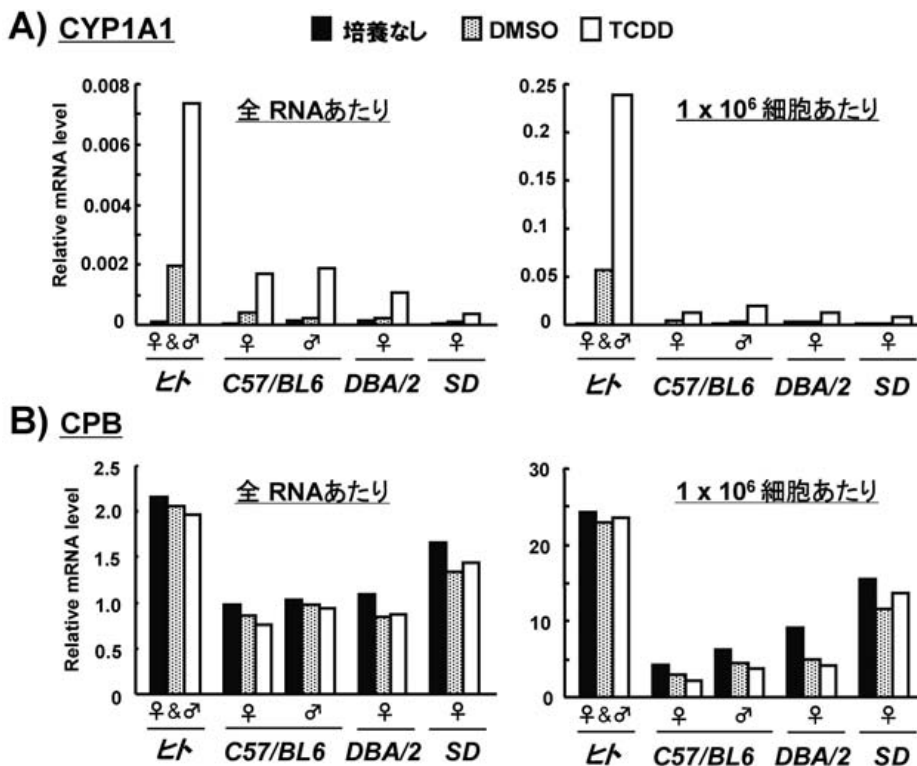


図10 ヒトと実験動物リンパ球のCYP1A1 mRNA誘導量の比較
ヒトおよび各動物の血液からリンパ球を調製し、培養前、およびdimethyl sulfoxide (DMSO) または10 nM TCDD存在下培養後、RNAを調製した。培養時間はCYP1A1 mRNA誘導が最大となる時間(ヒト, C57BL/6マウス, 6時間; DBA/2マウス, SDラット, 2時間)とした。CYP1A1およびハウスキーピング遺伝子であるCPBのmRNA量はリアルタイムPCRによって測定した。ヒトのmRNA量は図2に示した平均値を用いた。

送や、前述したようにクロマチンのリモデリング、AhR量の減少があげられる。しかし、これらの因子が、マウスとヒトにおいて、AhR依存的な遺伝子発現メカニズムに対してどのように異なる働き方をするのかは不明である。AhR依存的な遺伝子発現の動物種特異性の解明は、動物実験で得られた結果からヒトへの影響を推測し、TCDDのヒトへの悪影響を予防するために非常に重要な知見を与えると考えられる。

そこで本研究では、TCDDとAhRの親和性以外のAhR依存的な遺伝子発現における動物種特異性に関する因子を特定するために、AhR依存的に発現が誘導される*CYP1A1*遺伝子を指標にして、マウスとヒトにおけるTCDDによるAhR活性化パスウェイについて調べた。マウスとヒトのモデル細胞として、TCDDとの親和性が高いAhRを発現するC57BL/6マウス由来の肝臓ガン細胞株であるHepa1c1c7と、TCDDとの親和性が低いAhRを発現するヒト由来の肝臓ガン細胞株であるHepG2を用いた。

(1) *CYP1A1* mRNA誘導タイムコースの比較

Hepa1c1c7とHepG2における*CYP1A1* mRNA誘導がTCDDとAhRの親和性と対応するならば、TCDDとの親和性が高いAhRを発現するHepa1c1c7のほうが、*CYP1A1* mRNAを多く発現すると考えられる。そこでまず、Hepa1c1c7とHepG2において、TCDDによる*CYP1A1* mRNA誘導タイムコースを比較した。10 nM TCDD存在下でHepa1c1c7とHepG2を培養し、0~24時間後にRNAを抽出した。逆転写後、マウスとヒトで100%相同な領域を増幅させるプライマーを用い、リアルタイムPCRによ

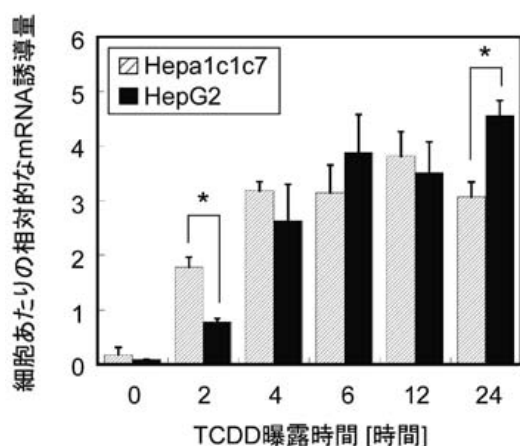


図11 Hepa1c1c7とHepG2におけるTCDDによる*CYP1A1* mRNA誘導タイムコース
Hepa1c1c7とHepG2を10 nM TCDD存在下で培養し、経時的にRNAを調製した。*CYP1A1* mRNA量はリアルタイムPCRによって測定した。

り*CYP1A1* mRNA誘導量を測定した(図11)。TCDD曝露2時間ではTCDDとAhRの親和性に対応してHepa1c1c7のほうが*CYP1A1* mRNA誘導量が多かった。しかし、TCDD曝露4時間以降になると、私たちの予想に反して、HepG2とHepa1c1c7でほぼ同程度の*CYP1A1* mRNA誘導量を示し、TCDDとAhRの親和性には対応しなかった。したがって、TCDD曝露4時間以降、Hepa1c1c7とHepG2におけるAhR依存的な遺伝子発現誘導には、TCDDとAhRの親和性以外のメカニズムが存在することが示唆された。

(2) 核内AhR量タイムコースの比較

AhR量は、*CYP1A1* mRNA誘導量と対応することが報告されている。そこで、Hepa1c1c7とHepG2においてTCDD曝露4時間以降で*CYP1A1* mRNA誘導量がTCDDとAhRの親和性に対応しなかった原因を調べるために、Hepa1c1c7とHepG2の核内AhR量タイムコースをウエスタンブロッティングにより調べた(図12)。Hepa1c1c7において、核内AhR量はTCDD曝露1.5時間で約8倍に増加し、4時間で60%まで減少し、その後24時間まで変化しなかった。一方、HepG2においては、核内AhRはTCDD曝露1.5時間で約2倍に増加し、24時間までほとんど減少しなかった。したがって、Hepa1c1c7における*CYP1A1* mRNA誘導が、TCDD曝露4時間以降でHepG2と同程度まで減少した原因として、Hepa1c1c7の核内AhR量がTCDD曝露後4時間で急激に減少したことが関係していると考えられた。

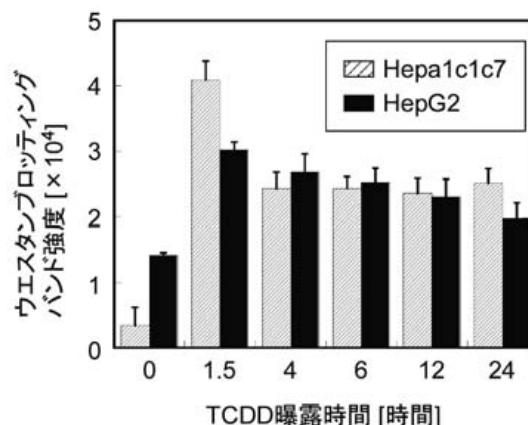


図12 Hepa1c1c7とHepG2における核内AhR量の比較
Hepa1c1c7とHepG2を10 nM TCDD存在下で培養し、経時的に核画分タンパク質を調製した。Hepa1c1c7核画分(3 μg)とHepG2核画分(4.5 μg)をSDS-PAGEで分離し、AhR抗体でウエスタンブロッティングを行った。

(3) Hepa1c1c7とHepG2における*CYP1A1*プロモーター領域へのAhRとRNAポリメラーゼIIの結合タイムコース

核移行したAhRの機能的な役割を調べるために、Hepa1c1c7とHepG2における*CYP1A1*プロモーター領域へのAhRの結合タイムコースをクロマチン免疫沈降法により測定した。Hepa1c1c7では、TCDD曝露により*CYP1A1*プロモーター領域へのAhRの結合が増加し、曝露1.5時間で最大となった(図13)。これは、Hepa1c1c7において核内AhR量がTCDD曝露1.5時間で大きく増加したことによく対応した。一方で、HepG2では、*CYP1A1*プロモーター領域へのAhRの結合は、TCDD曝露後ゆっくりと増加し、曝露4-6時間で最大となった。また、mRNAの合成に深く関与するRNAポリメラーゼIIの*CYP1A1*プロモーター領域への結合タイムコースもクロマチン免疫沈降法

により測定した(図14)。Hepa1c1c7において、*CYP1A1*プロモーター領域へのRNAポリメラーゼIIの結合はTCDD曝露1.5時間で最大になったが、HepG2においては、4-12時間まで結合が持続した。したがって、Hepa1c1c7とHepG2で観測されたTCDDとAhRの親和性に対応しない*CYP1A1* mRNA誘導は、核内AhR量の減少量の違いだけが原因ではなく、AhR及びRNAポリメラーゼIIの*CYP1A1*プロモーター領域への結合タイムコースの違いにも原因があることが示唆された。

(4) *CYP1A1*プロモーター領域へのAhR及びRNAポリメラーゼIIの結合におけるヒストン脱アセチル化酵素の関与

Hepa1c1c7とHepG2において、*CYP1A1*プロモーター領域へのAhR及びRNAポリメラーゼIIの結合タイムコース

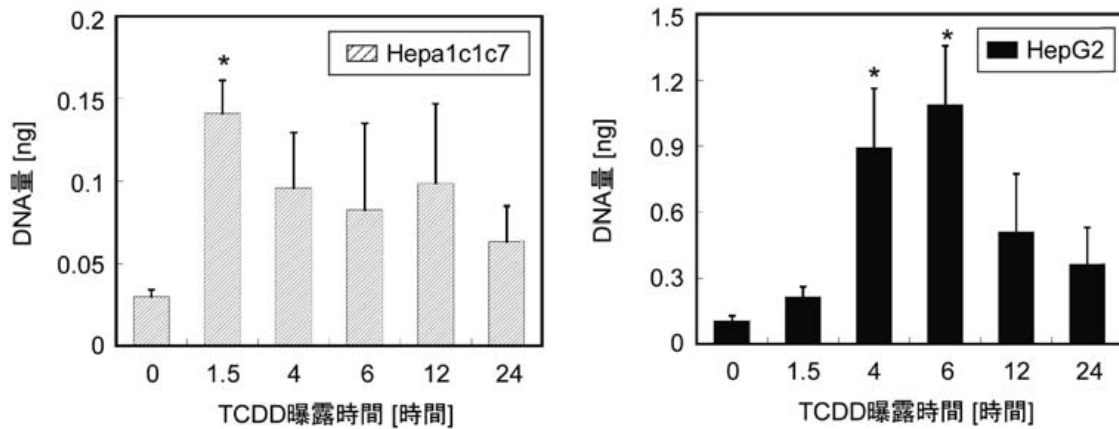


図13 Hepa1c1c7とHepG2における*CYP1A1*プロモーター領域へのAhRの結合タイムコース
Hepa1c1c7とHepG2を10 nM TCDD存在下で培養し、経時的に細胞を回収し、AhR抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。クロマチン免疫沈降のサンプルを、リアルタイムPCRにより評価した。スタンダードにはHepa1c1c7あるいはHepG2から調製したゲノムDNAを用いた。

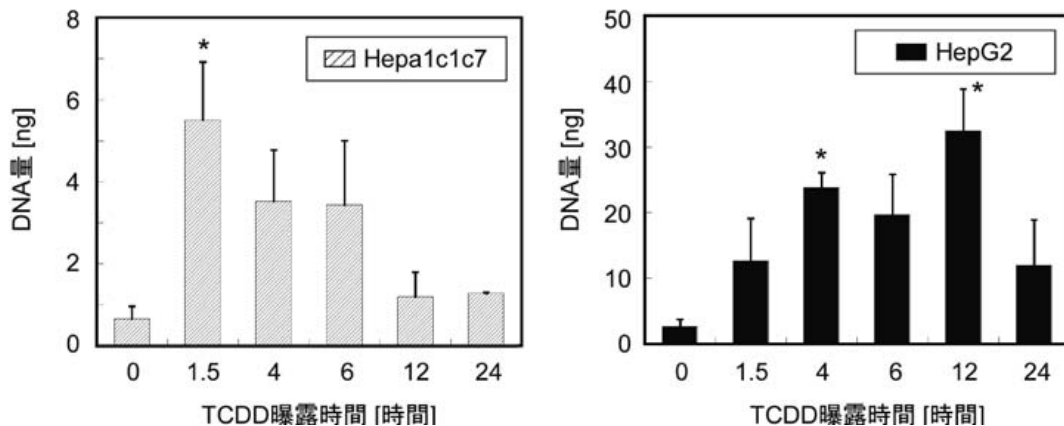


図14 Hepa1c1c7とHepG2における*CYP1A1*プロモーター領域へのRNAポリメラーゼIIの結合タイムコース
Hepa1c1c7とHepG2を10 nM TCDD存在下で培養し、経時的に細胞を回収し、RNAポリメラーゼII抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。クロマチン免疫沈降のサンプルを、リアルタイムPCRにより評価した。スタンダードにはHepa1c1c7あるいはHepG2から調製したゲノムDNAを用いた。

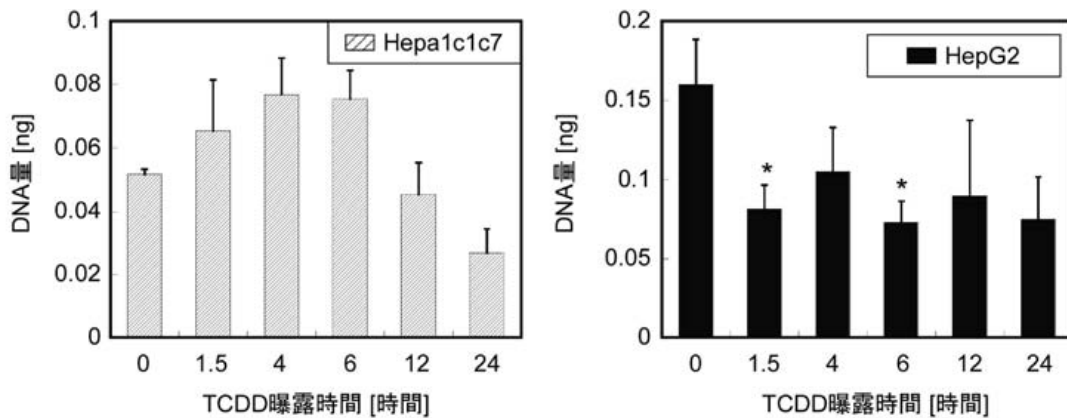


図15 Hepa1c1c7とHepG2におけるCYP1A1プロモーター領域へのHDAC1の結合タイムコース
Hepa1c1c7とHepG2を10 nM TCDD存在下で培養し、経時的に細胞を回収し、HDAC1抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。クロマチン免疫沈降のサンプルを、リアルタイムPCRにより評価した。スタンダードにはHepa1c1c7あるいはHepG2から調製したゲノムDNAを用いた。

の違いに關与する分子を決定するため、ヒストンのアセチル化に關与する因子に着目した。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、核内レセプター依存的な転写調節、つまり、ヒストンを脱アセチル化しクロマチンを安定化させる (クロマチンのリモデリング) ことにより転写を抑制するメカニズムにおいて重要である。11種類のHDACの存在が確認されているが、その中の1つであるHDAC1がAhRの活性化によるクロマチンリモデリングに關与していることが知られている。そこで、Hepa1c1c7とHepG2においてHDAC1のCYP1A1プロモーター領域への結合タイムコースを調べた (図15)。HepG2においては、TCDD曝露後HDAC1のCYP1A1プロモーター領域への結合は減少した。一方、Hepa1c1c7においては、TCDD曝露後HDAC1のCYP1A1プロモーター領域への結合は減少しなかった。これらの結果から、Hepa1c1c7のAhRの活性化に伴い、CYP1A1プロモーター領域へのHDAC1の結合が減少しないことがCYP1A1プロモーター領域へのAhR及びRNAポリメラーゼIIのリクルートの抑制に關与し、その結果として、Hepa1c1c7のCYP1A1 mRNA誘導がHepG2と同程度になったと考えられる。HDACインヒビターであるtrichostatinA (TSA) で細胞を処理すると、TCDD曝露4~6時間でもHepa1c1c7のほうがHepG2より多くのCYP1A1 mRNAを誘導した (図16)。この結果は、Hepa1c1c7においてHDAC1のCYP1A1プロモーター領域への結合が減少しないことが、Hepa1c1c7とHepG2におけるCYP1A1 mRNA誘導に關与していることを支持している。

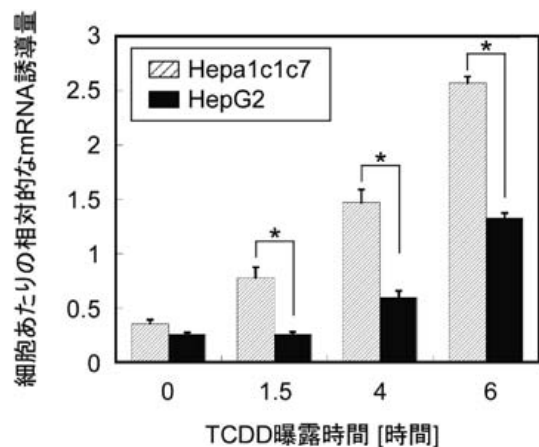


図16 Hepa1c1c7とHepG2におけるTCDDによるCYP1A1 mRNA誘導へのTSAの影響
Hepa1c1c7とHepG2を10 nM TCDDと0.5 μM TSAの存在下で培養し、経時的にRNAを調製した。CYP1A1 mRNA量はリアルタイムPCRによって測定した。

(5) Hepa1c1c7とHepG2におけるCYP1A1 mRNAの安定性 mRNAの分解速度の違いも、TCDDとAhRの親和性に対応しないCYP1A1 mRNA誘導の原因であると考えられた。そこで、TCDDで4時間曝露後、転写阻害剤であるアクチノマイシンD存在下で0~3時間培養し、各時間で残存しているCYP1A1 mRNAの量をリアルタイムPCRで測定し、Hepa1c1c7とHepG2のCYP1A1 mRNAの半減期を算出した。その結果、CYP1A1 mRNAの半減期は、Hepa1c1c7で3.1時間、HepG2で4.4時間となり、Hepa1c1c7のCYP1A1 mRNAの半減期が短いことがわかった (図17)。この結果も、TCDD曝露4時間以降でTCDDとAhRの親和性に従わないCYP1A1 mRNA誘導量の原因に關与していると考えられる。

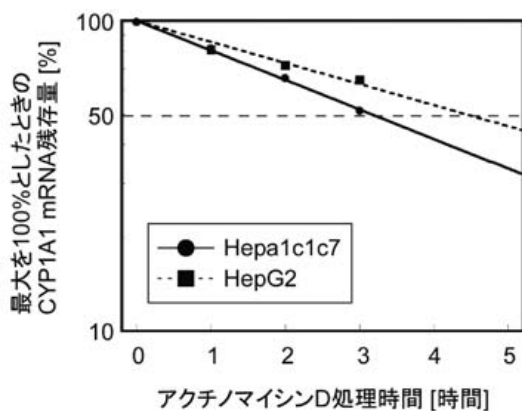


図17 TCDD曝露後のHepa1c1c7とHepG2におけるCYP1A1 mRNA減少量の比較
Hepa1c1c7とHepG2を10 nM TCDD存在下で4時間培養した。その後培地を取り替え、5 μg/mlのアクチノマイシンDで処理し、経時的にRNAを調製した。CYP1A1 mRNA量はリアルタイムPCRによって測定した。

以上の結果から、Hepa1c1c7とHepG2におけるAhR依存的遺伝子発現調節メカニズムの相違には、核内AhR量のタイムコース、HDAC1のCYP1A1プロモーター領域への結合タイムコース、CYP1A1 mRNAの安定性、の3つの因子が関係していることが示唆された。したがって、動物実験で得られた結果からヒトへの影響を推測する場合、AhRとTCDDとの親和性以外に上記3つの因子を考慮することが重要であると考えられた。

2.2 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

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

野生植物は外的環境から様々な影響を受けている。環境の変化は人類が地球上に現れる前は穏やかな変化をしていたと考えられるが、人類の出現後、特に産業革命後の200年は人為的活動の結果発生する環境汚染物質により急激な環境変化を生み出してきた。このような急激な環境変化により近年植物の生育に影響が出るようになってきた。

例えば光化学オキシダントの主要成分であるオゾンは先進国のみならず最近では発展途上国に於いても最も主要な大気汚染物質であり、これにより野生植物及び作物の生育に顕著な影響が見られるようになってきている。また、フロンガスによるオゾン層の破壊により地球表面に到達する紫外線の量は年々増加しており、これにより植物の生育阻害が起こることが懸念されている。酸性雨は葉の

表面のワックス層を剥ぎ取るため、結果的に植物は乾燥や紫外線に対する耐性が低下し、やがて個体の枯死を招く。さらに、酸性雨により酸性化した土壌ではアルミニウムやマンガンなどが溶出しやすくなり、これによりヨーロッパでは樹木の根の生育が阻害されているという報告がある。これら以外にも植物は塩、乾燥、重金属、強光、高・低温などの様々なストレスに曝されている。

一方植物はこれらのストレスに対して様々な防御機構を発達させているが、これらのストレスの影響が植物の防御反応の閾値を超えてしまうと植物の健全な生育を阻害し、やがて個体の枯死を引き起こす。したがって、このような生育阻害がどのような環境ストレスにより引き起こされたのかを個体への影響が現れる前に正確に知ることは、農作物の管理や野生植物の保全に大きく寄与すると考えられる。

環境ストレスの予測的診断法としてこれまでに特定のストレスに対して感受性の高い植物（指標植物）を利用する方法が開発され、実際に使われてきた。例えばタバコの栽培品種であるBel-W3系統やクローバーのNCS系統は大気中にオゾンが他の植物では影響の見られない位の低濃度に存在する場合でも葉に可視的な障害が現れることが知られている。この性質を利用して、他の植物にオゾン被害が現れる前に指標植物に現れる葉の可視的な障害を見ることによりオゾンによる植物への被害を事前に診断することが考えられ、実際に利用されてきた。ところがこれらの指標植物における葉の可視障害の形成は葉の成熟度、生育環境、水や肥料などにより影響を受けるため確実な指標とするには不十分である。

植物は異なる環境ストレスに曝された場合にそれぞれのストレス種に特異的な生理反応を示すことが知られており、さらにこれらの生理反応の少なくとも一部は様々な遺伝子の発現により引き起こされていると考えられる。したがって、環境ストレスにより誘導される遺伝子の発現は、個体の枯死に先立って起こるといえる。さらに最近ではDNAアレイ法と呼ばれる多くの遺伝子の発現を一度に見ることが出来る方法が開発されている。そこで本研究では環境ストレスを受けている植物での遺伝子発現プロファイルをDNAアレイ法により比較し、そのプロファイルの違いから、植物の生育に影響を及ぼす環境ストレスの種類を遺伝子発現レベルで診断する手法の開発を試みた。

(1) 植物の育成及び環境ストレス処理

植物材料としてシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のCol-0系統を用いた。種子をロックウールに播き、国立環境研究所・環境調節実験棟内の植物育成チャンパーで2週間育成させた。植物の栽培は、気温25℃、湿度50～60%、100 μmolphotons/m²/sの光を一日14時間当てることにより行った。植物へのストレス曝露は播種後2週間目に行った。

植物へのオゾン曝露は、国立環境研究所・環境調節実験棟内のオゾン曝露チャンパーで行った。オゾン曝露チャンパー内は、気温25℃、湿度70%、100 μmolphotons/m²/sの光条件に設定した。この条件下で200 ppbのオゾンを植物に1～6時間曝露した。

植物への紫外線照射は、気温25℃、湿度70%、100 μmolphotons/m²/sの光条件下で行った。この環境下で290 nm以下の波長の光をフィルターで除いた約1.4 W/m²の紫外線を植物に照射した。なお、対照区の紫外線の強さは約2.5 mW/m²であった。紫外線は1～6時間植物に照射した。

酸性雨曝露は人口酸性雨を植物に噴霧することにより行った。人口酸性雨は、硫酸：硝酸：塩酸を4:2:1で混合し、これをpH 5.5にしたものを用いた。これを植物に噴霧し、1～6時間植物育成チャンパーに静置した。

植物へのSO₂曝露は、国立環境研究所・環境調節実験棟内のオゾン曝露チャンパーで行った。オゾン曝露チャンパー内は、気温25℃、湿度70%、100 μmolphotons/m²/sの光条件に設定した。この条件下で1 ppmのSO₂を植物に1～6時間曝露した。

以上のように環境ストレス処理を行った植物、及び無処理区の植物を採取し、-80度に保存した。

(2) 各ストレスに特異的に発現応答する遺伝子の単離

上述した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を単離した。RNAの単離は、

採取した植物試料100 mgからRNeasy Plant mini kit (Qiagen) を用いて行った。こうして単離したRNAを用いて、Affimetrix社のGene Chip Arabidopsis ATH1 Genome Array (22810遺伝子をカバー) を用いてマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析には20 μgのtotal RNAを用いた。このRNAからBioArray High Yield RNA transcript labeling kitを用いてビオチンで標識されたcRNAを合成した。これをGene Chip Arabidopsis ATH1 Genome Arrayとハイブリダイズさせ、シグナルを読み取った。読み取った各遺伝子のシグナルは全シグナルの総和に対する相対値で表すことにより標準化を行った。

その結果、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がオゾン、紫外線、酸性雨、SO₂曝露によりそれぞれ214個、196個、169個、291個単離することが出来た(表3)。

これらの遺伝子のいくつかは異なるストレスで重複して発現上昇をするため、次にこれらの候補から個々のストレスに特異的に発現上昇する遺伝子の抽出を試みた。その結果、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曝露により15個、76個、9個、31個あることが明らかになった(図18)。

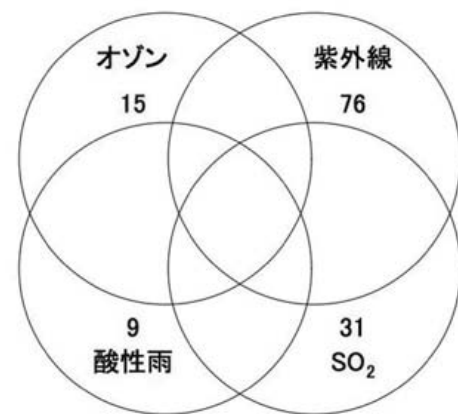


図18 4種類のストレスに特異的に応答する遺伝子の数。各ストレスにおいて特異的に発現する遺伝子の数をベン図で表している。

表3 GeneChipを用いた各ストレスに対する応答遺伝子の解析結果

	応答無し(個)	6時間目に上昇(個)	1時間目のみ上昇(個)	1時間で上昇し6時間まで続く(個)
オゾン	10,256	740	464	214
紫外線	11,961	934	257	196
酸性雨	14,440	121	340	169
SO ₂	12,831	573	84	291

(3) サブセットDNAマクロアレイの作製

Gene Chip Arabidopsis ATH1 Genome Arrayを用いることにより4種類のストレスに特異的に発現応答する遺伝子を全部で131種類(オゾン, 紫外線, 酸性雨, SO₂曝露に対しそれぞれ15個, 76個, 9個, 31個) 同定することができた。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。

まずこれらの遺伝子のcDNAをシロイヌナズナから単離し, これらをスポットしたサブセットcDNAマクロアレイを作製した。cDNAマクロアレイは各遺伝子に対応するDNA断片をPCRで増幅し, それらをMultiPin Blotter (ATTO) でナイロン膜上にスポットすることにより作製した。

シロイヌナズナからcDNAを単離したところ, 全部で93種類(オゾン, 紫外線, 酸性雨, SO₂曝露に対しそれぞれ10個, 51個, 9個, 23個) の遺伝子を得ることができた。そこでこれらを用いてサブセットcDNAマクロアレイの作製を行った(図19)。

(4) 同定された遺伝子のストレス応答特異性の検証

次にサブセットcDNAマクロアレイを用いて各ストレスに対する発現の特異性の解析を行った。オゾン, 紫外線, 酸性雨, SO₂曝露を6時間行ったサンプルから単離

したtotal RNAを逆転写酵素により放射性同位元素で標識したものをプローブとして用い, これを作製したサブセットcDNAマクロアレイにハイブリダイズさせた。得られた各スポットのシグナルをArrayVision (Amersham Bioscience) で解析を行い, 対照区の結果と比較することにより各遺伝子のストレス曝露による発現増加を調べた。その結果, 酸性雨及びSO₂曝露に対して特異的に応答する遺伝子は全て特異性の高い発現をすることが確認された(図20)。

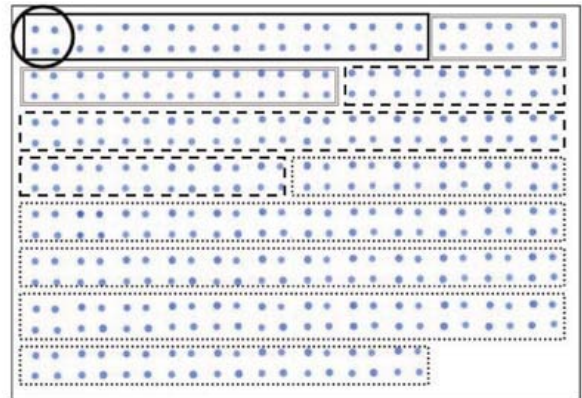


図19 サブセットcDNAマクロアレイ

実線で囲んだ領域には酸性雨, 2重線で囲んだ領域にはオゾン, 点線(大)で囲んだ領域にはSO₂, 点線(小)で囲んだ領域には紫外線に特異的に発現応答すると予想される遺伝子がスポットしてある。1種類の遺伝子につき4つのcDNAがスポットしてある(黒丸)。

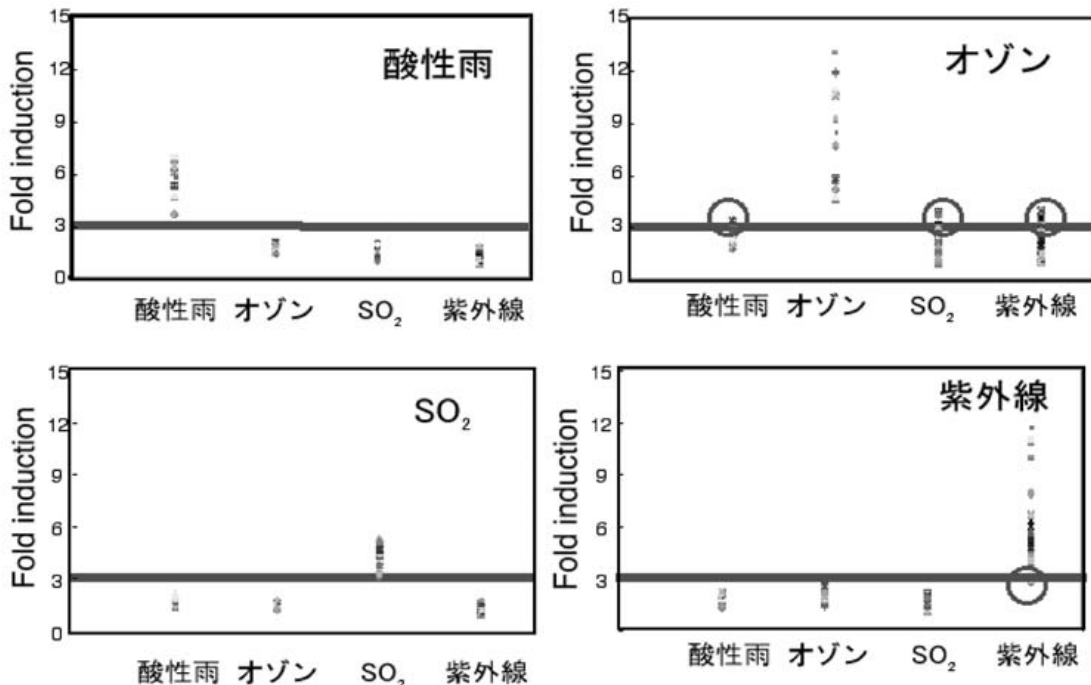


図20 サブセットcDNAマクロアレイによるストレス特異性の検証 1

グラフはサブセットマクロアレイを用いて4種類のストレスによる各遺伝子発現の増加割合を示す。遺伝子の発現増加はGeneChipの結果より予想されたストレス特異性により分類した。各点はそれぞれのストレス特異的な遺伝子を示す。各グラフの横線は3倍以上の発現上昇の閾値を示す。この実験により発現特異性が無いことが示された遺伝子を丸で囲んだ。

一方、オゾンに特異的に応答すると予想された遺伝子の中には他のストレスでも発現上昇が見られるものが含まれていた。また紫外線に特異的に応答すると予想された遺伝子の中には応答性が確認できないものが含まれていた。

さらに同じサブセットcDNAマクロアレイを用いて他のストレス：低温（4℃で12時間栽培）、高温（35℃で12時間栽培）、塩ストレス（250mMの塩化ナトリウムを12

時間吸収）、乾燥ストレス（植物を根から切り離し地上部を濾紙上に6時間放置、約20%の水分が消失）、を与えた植物から単離したRNAを用いて特異性の解析を行った。尚これらのストレスを与えた植物では見た目の葉への損傷などは見あたらなかった。その結果、酸性雨及び紫外線に特異的に発現増加すると考えられていたいくつかの遺伝子が、低温ストレスに対しても応答することが明らかになった（図21）。

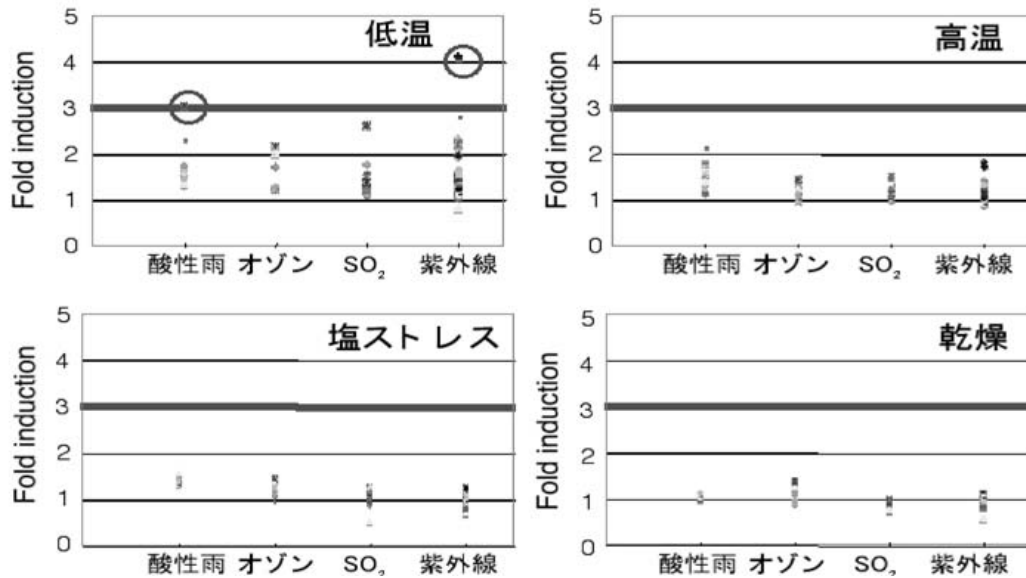


図21 サブセットcDNAマクロアレイによるストレス特異性の検証2
 グラフはサブセットマクロアレイを用いて4種類のストレスによる各遺伝子発現の増加割合を示す。遺伝子の発現増加はGeneChipの結果より予想されたストレス特異性により分類した。各点はそれぞれのストレス特異的な遺伝子を示す。各グラフの横線は3倍以上の発現上昇の閾値を示す。この実験により発現特異性が無いことが示された遺伝子を丸で囲んだ。

表4 サブセットcDNAマクロアレイを用いた発現特異性の検証結果のまとめ

	マイクロアレイで特異的に増加した遺伝子数	実際にクローニングできた遺伝子数	サブセットマクロアレイで特異性が確認できた遺伝子数
オゾン	15	10	10
酸性雨	9	9	7
SO ₂	31	23	19
紫外線	76	51	25

表5 ミニマクロアレイの作製に用いた遺伝子とそのスポット位置

	1	2	3	4
酸性雨 (A)	At5g26620	At5g38000	At5g48850	At3g49580
オゾン (B)	At1g34750	At1g70140	At2g17120	At3g21230
SO ₂ (C)	At5g16980	At3g48360	At2g36770	At5g16970
紫外線 (D)	At3g22840	At3g21560	At4g14690	EF1

遺伝子名はAGIコードに基づいて記載している。スポットの位置は行がA~Dで、列が1~4の番号で示してある。例えばAt5g26620はA-1になる。また右下にはコントロール遺伝子としてElongation Factor 1 (EF1) をスポットした。

以上の結果をまとめると、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サブセットマイクロアレイによる検証により確認することができた(表4)。

(5) ストレス診断ミニアレイの開発

こうして4種類のストレスに対して特異的に発現応答する遺伝子がいくつか単離できたため(表4)、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。

具体的には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クロアレイを作製した。作製に用いた遺伝子を以下に示す(表5)。ミニマクロアレイの作製方法はサブセットマイクロアレイと同様に行った。

次に作製したミニマクロアレイを用いて新たに植物にストレス処理を行い、単離したtotal RNAを用いて遺伝子発現による診断が可能かどうかを検証した。ストレス処理、RNAの抽出及びハイブリダイゼーションの条件は上述したとおりである。

その結果、酸性雨で誘導される遺伝子は今回の実験に用いたサンプルでは応答が見られなかった。一方、オゾン、SO₂、紫外線で誘導される遺伝子は応答しないものもあったが、それぞれオゾン(B1, B2, B3)、SO₂(C2, C3, C4)、紫外線(D1, D3)で明らかに特異的に応答する遺伝子があることが判った(図22)。

異なる時期にサンプリングを行った植物サンプルから抽出したRNAでもこのミニマクロアレイが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。

次に今回作製したミニマクロアレイを用いて他のストレスでこのアレイが反応するのか、つまりストレス特異性について検証を行った。検証を行ったサンプルは以下のように調製した。植物にそれぞれ、塩ストレス(250mMの塩化ナトリウムを12時間吸収)、乾燥ストレス(植物を根から切り離し地上部を濾紙上に6時間放置、約20%の水分が消失)を与え、そのサンプルから調製したtotal RNAを用いてマクロアレイ解析を行った。尚これらのストレスを与えた植物では見た目の葉への損傷な

どは見あたらなかった。その結果塩ストレスでC2の遺伝子が、乾燥ストレスでB1, B2の遺伝子が応答することが判った(図23)。

以上のことから最終的に今回作製したミニマクロアレイにスポットされている遺伝子のうち、オゾンの検出にはB3 (At2g17120)、SO₂の検出にはC3, C4 (At2g36770, At5g16970)、紫外線の検出にはD1, D3 (At3g22840, At4g14690)が使えることが明らかになった。

(6) まとめと今後の展望

本特別研究において、シロイヌナズナで少なくともオゾン、SO₂、紫外線の3種類の環境ストレスに特異的に応答する遺伝子を単離することが出来た。

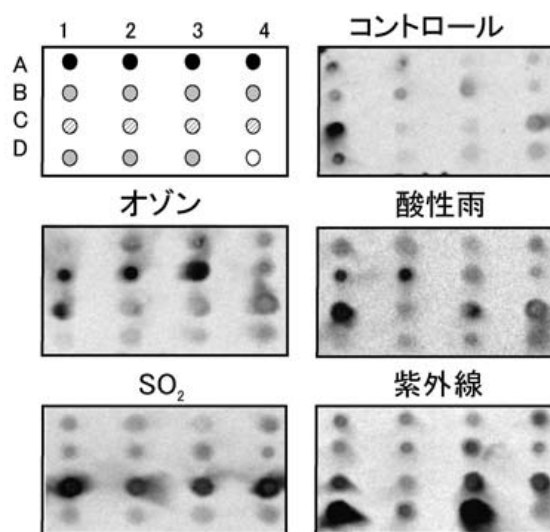


図22 ミニマクロアレイによるストレス診断1
ミニマクロアレイを用いた様々なストレスにおける遺伝子発現パターンを示す。酸性雨誘導性遺伝子、オゾン誘導性遺伝子、SO₂誘導性遺伝子、紫外線誘導性遺伝子、コントロール遺伝子 (*Elongation Factor*)

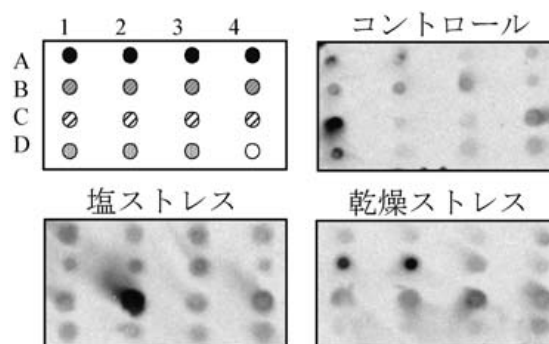


図23 ミニマクロアレイによるストレス診断2
ミニマクロアレイを用いた様々なストレスにおける遺伝子発現パターンを示す。酸性雨誘導性遺伝子、オゾン誘導性遺伝子、SO₂誘導性遺伝子、紫外線誘導性遺伝子、コントロール遺伝子 (*Elongation Factor*)

これまでもシロイヌナズナにおいて植物ホルモン及び環境ストレスに応答する事が知られている32種類の遺伝子をマイクロアレイ化し、これを用いてストレスモニタリングができるかどうかの検討を行っており、そのマイクロアレイパターン(蛍光の発色パターン)から乾燥、傷害とオゾンの間では区別することができることを示している。また約12,000種類のプローブ遺伝子を載せたcDNAマイクロアレイを用いてオゾン応答性遺伝子を205種類単離し、これらの内オゾンにより発現が増加する157種類の遺伝子をスポットした小スケールのマイクロアレイ膜(サブセットマイクロアレイ)を作成し、このマイクロアレイに対して7種類の異なる環境ストレス応答性を調べた。最終的にはそれぞれのストレスを区別するのに必要最小限な12種類のプローブ遺伝子を選抜し、これらを載せたミニマイクロアレイによりオゾンを含む7種類の環境ストレスで異なる遺伝子発現パターン(シグナルの数、種類)を検出することができることを示した。

これらの結果は、遺伝子発現による植物の環境ストレス診断が可能であることを示唆しているが、残念ながらストレス診断を行う場合にはミニアレイ中の遺伝子群の発現パターン(組み合わせ)により判断するしかなかった。従ってこれらの遺伝子では今後調べるストレスの増加、あるいは各ストレスのdoseの違いに対応することが困難になることが予想された。

一方、本研究では少なくともオゾン、SO₂及び紫外線に特異的に発現応答する遺伝子の単離に成功した。これにより遺伝子発現による植物の環境ストレス診断の精度が上昇することが期待される。しかしながら、本研究で単離されたシロイヌナズナへの4種類の環境ストレスに対して特異的に応答する遺伝子について、異なるストレス強度(時間・濃度)に対する応答性についての解析がなされていない。今後はこれらの遺伝子がストレス強度を変えた時に発現応答するのか(定性性)、またはその発現量がストレス強度に比例するのか(定量性)、について検討していきたいと考えている。また、将来的な発展事項としては、この手法をモデル植物のシロイヌナズナだけでなく他の植物に応用していく事も視野に入れている。現在、日本全国で普遍的に栽培されているアサガオを用いてこの手法が応用できるかどうかについて研究を開始している。また、海外との共同研究でシロイヌナズナのマイクロアレイを用いて、オゾン及び酸性雨のマツへの影響評価が可能かどうかについての検証を行う予

定である。

2.2.2 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

2.2.2.1 環境微生物DNAマイクロアレイの開発

自然環境中の微生物動態を把握するためには、その群集組成や多様性などを明らかにする必要がある。しかしながら、天然の微生物群集には培地では増殖しない細菌が多く存在することが知られている。そこで、培養できない微生物を調べるため、細胞内に多数存在するrRNAを利用した研究が多く行われてきた。そして、現在はrRNAを標的としたDNAマイクロアレイが、天然の微生物の群集組成や動態を簡易迅速に分析する技術として注目されている。しかし、このように適用する場合、一塩基の違いを認識する必要があることから、そのシグナル強度(感度)と特異性が非常に重要で、ハイブリダイゼーションと洗浄条件の決定は実験系を立ち上げるための重要なステップとなる。

そこで本研究では、幅広い環境微生物を対象としたDNAマイクロアレイを作製し、標的微生物由来のrRNAを用いて操作条件の検討を行い、それぞれのプローブのハイブリダイゼーション特性を評価した。さらに、それらの知見を踏まえ、クローニングによりその群集組成が明らかとなった活性汚泥試料をDNAマイクロアレイに供試し、群集構造解析への適用を試みた。

(1) DNAマイクロアレイの作成と操作条件の最適化

微生物群集を広く網羅できるように、過去にrRNAに基づく微生物定量技術に利用されてきた遺伝子プローブを搭載したDNAマイクロアレイを作成した。

ハイブリダイゼーションやアレイの洗浄等の操作技術の最適化のために2種の微生物(*Pseudomonas stutzeri*, *Streptomyces flavidovirens*)を用い、ハイブリダイゼーションのホルムアミド濃度と洗浄バッファのNaCl濃度(4, 46, 215 mM)について検討を行った。その結果、20%ホルムアミド、NaCl濃度46 mMにおいて陽性シグナルの数が最大となり、かつ陽性と偽陽性シグナルの強度の差も最大となったので、これを最適洗浄条件とした。

次に、この条件を用いて16種類の純菌から直接抽出したrRNAをDNAマイクロアレイにハイブリダイズすることで、プローブの評価を行なった。その結果、多くのプローブからは再現性のある明瞭なシグナルパターンが得

られたが（陽性）、一部のプローブは最適な条件下においても機能していないことが判明した（偽陰性、偽陽性）（表6）。このように純菌を用いたプローブの評価により、主要なプローブに関して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より正確に評価す

表6 プローブ評価の概要

Signal	Probe
Positive	UNIV1390, UNIV910, EUK502, EUB338, EUB927, HGC69A, LGC353b, BET42a, GAM42a
False negative	GPOS1192, CF319a, ALF968
False positive	CF319a, ARCH915

るための重要な知見を得ることができた。

(2) 微生物群集構造解析への適用

DNAマイクロアレイの環境試料への適用として、図24に示した細菌群集組成比の活性汚泥（運転21、130日目）をDNAマイクロアレイに供試した。

その結果、UNIV1390、EUB338、GAM42aなどのプローブからシグナルが検出され、さらにGAM42aプローブにおいては、21日目に比べて明らかに強度の高いシグナルが130日目に得られた（図25）。これは、*Gammaproteobacteria*の優占化というクローニングの結果を反映していると考えられ、微生物群集構造解析を可能

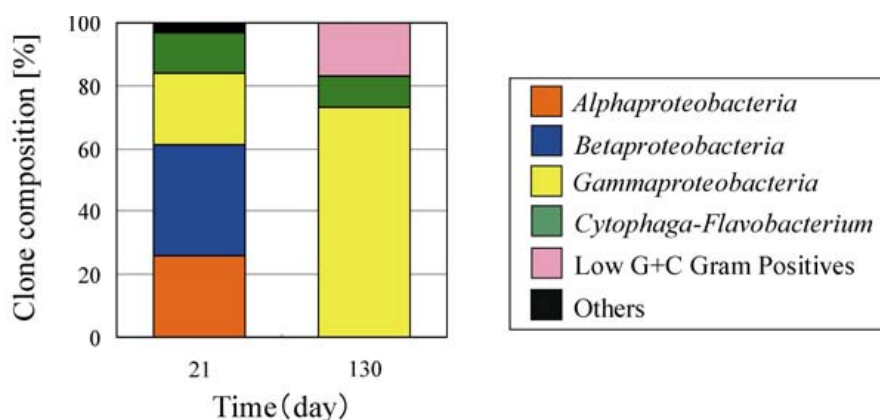


図24 活性汚泥試料中の細菌群集組成の変化
リアクターの運転の21日目と130日目の細菌群集組成を示す。

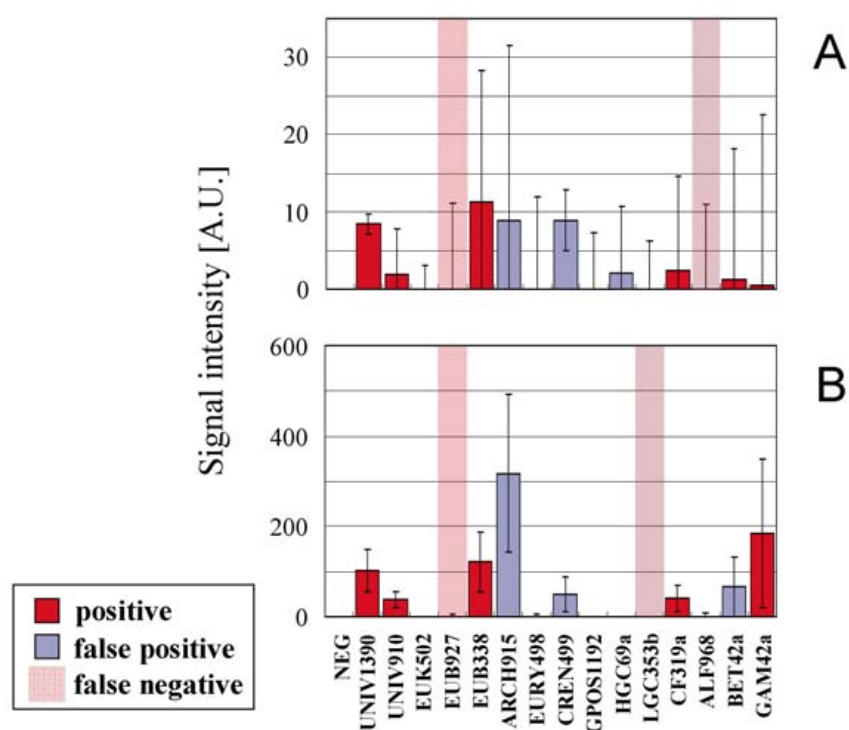


図25 DNAマイクロアレイによる活性汚泥試料中の細菌群集組成解析
(A) 21日目 (B) 130日目エラーバーは標準偏差 (n = 4)

とするDNAマイクロアレイが作成できた。しかしながら、クローニングの結果に反して検出されない微生物群も存在したため、本DNAマイクロアレイの環境試料への適用に関しては、更なる検討が必要であると考えられた。

2.2.2.2 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

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩(LAS)は最も多く使用されている合成界面活性剤である。そして、その生産量の多さと、毒性からLASはPRTR(環境汚染物質排出移動登録)法第一種指定化学物質に分類されている。2002年度のPRTRデータによるとLASの環境中への排出量は約2万トンであり、その大部分は家庭の洗剤使用によるもので、LASは日常的に水環境中へ大量に放出され広範囲に分布している。

LASは水環境中で微生物により分解を受けることが知られている。しかしながら、その経路やどのような微生物が分解に関与するかについては不明な部分も多い。

LASの微生物による分解は純菌レベルでも調べられているが、菌種によって大きく異なるようである。とりわけ、窒素循環において、アンモニアを亜硝酸へと酸化する重要な役割を果たしているアンモニア酸化細菌、*Nitrosomonas europaea*のLASに対する感受性が高いことが報告されているが、その感受性のメカニズムについては全く明らかにされていない。

そこで、本研究では、LASに対する*N. europaea*の挙動をmRNAレベルで解明するために、全ゲノム塩基配列に基づく2,461遺伝子が搭載されたDNAマイクロアレイを用いて解析を行った。

(1) アンモニア酸化細菌へのLASの影響評価

N. europaea (NBRC14298) を2系純粋培養し、亜硝酸濃度と菌数を測定した。一つの系については7日目にLASを終濃度10 mg/Lで添加した。このLAS濃度は、*N. europaea*に対しての50%効果濃度に相当する。そして、9日目にLASを添加した系と添加していないコントロール系から菌体を回収し、抽出したRNAを用いてDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。発現が確認された遺伝子についてSYBR Greenを用いたリアルタイムPCRで定量し、2系の発現比を求めた。

2系の亜硝酸と菌数の測定結果より、LAS添加系ではLASが*N. europaea*に対して亜硝酸と菌数の増加の停滞を引き起こすことが確認された。LASの添加により1416 ± 13個の遺伝子の発現量が増大し、1044 ± 13個の遺伝子の発現量が低下した。これらの遺伝子のうち、29 ± 4の遺伝子はLASの添加により有意に発現量が増加した。特にアンモニア酸化、細胞膜、ストレス応答に関する遺伝子等がLAS添加後に強く発現していることが明らかになった(図26)。

次に、DNAマイクロアレイでLASにより遺伝子発現が活発化した遺伝子をリアルタイムPCRで定量した結果、

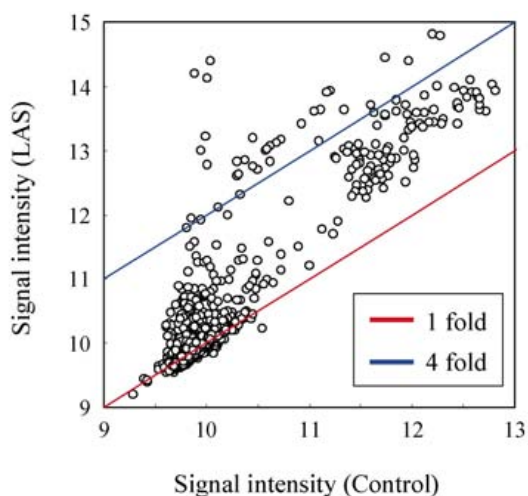


図26 LAS添加区と無添加区の遺伝子発現プロファイル
赤線はLAS添加区と無添加区の発現強度の比率が1:1の関係を青線はLAS添加区と無添加区の比率が4:1の関係を示す。

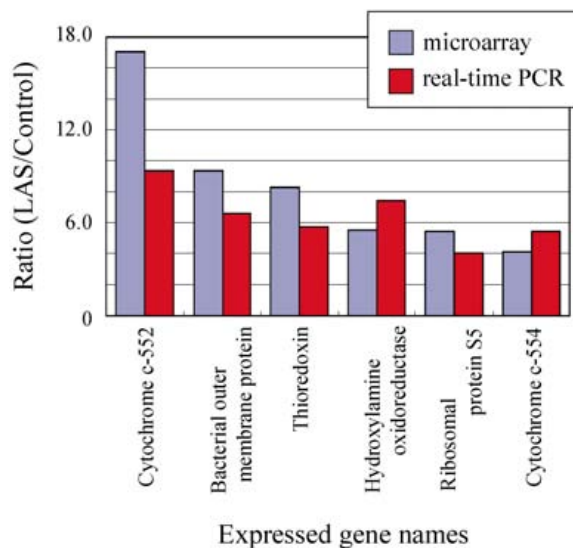


図27 DNAマイクロアレイとリアルタイムPCRによる遺伝子発現比較

やはり発現量が増加していた(図27)。ヒドロキシルアミン酸化還元酵素やチトクロームc-552やc-554などのアンモニアの酸化に関わる遺伝子の発現が目立った。

(2) LAS添加によるダメージからの菌体の回復

以上の遺伝子発現実験をもとにして、LAS添加によるダメージからの菌体の回復について推察した。まず、*N. europaea*はLASの添加により細胞膜の損傷を受ける。それに従い増殖の停滞と亜硝酸生成の低下が起こる。しかし翌日には、アンモニア酸化、細胞膜形成に関する遺伝子が活発に発現し、代謝エネルギーの獲得および細胞膜の再形成が行われ、LASによるダメージからの回復が図られると考察された。

よって*N. europaea*のLASに対する感受性の高さの原因はその細胞膜やペリプラズムに位置している酵素や電子伝達系が障害を受け、それによりエネルギー生産ができなくなるという物理的な障害からではないかと推察された。このような知見は、アンモニア酸化細菌の環境化学有害物質に対する高い感受性を利用した蛍光たんぱく質遺伝子導入株による環境評価試験において、役立つものと思われる。

2.2.3 培養可能な微生物遺伝子の網羅的解析による土壌生態系への影響評価法の開発

太古の昔から自然の生態系は、物質循環やエネルギーの流れなどの調和を保ちながら、環境の平衡状態を維持している。しかしながら近年、工業化の発展にともないトリクロロエチレン(TCE)やテトラクロロエチレン(PCE)などの揮発性有機塩素化合物、水銀や鉛などの重金属類、難分解性物質のポリ塩素化ビフェニル

(PCB)やダイオキシン類など、様々な化学物質が環境中に放出・排出され、環境汚染が大きな問題となっている。これら有毒性や難分解性の物質は、環境中に蓄積して自然の生態系を破壊したり、生体内で濃縮して発ガン性およびホルモン様作用を示したりするものがあり、環境や生物に悪影響を与える原因になっている。

汚染環境中では汚染物質を分解・利用できる、あるいは逆に活性が減少する等の汚染物質に応答する微生物が特徴的に存在するのではないかと考えられる。これまでにTCE分解菌、PCE分解菌、PCB分解菌あるいはダイオキシン類の分解菌等多くの分解菌が分離され、分解代謝メカニズムなど詳細に研究されている。一方、それら汚染物質が土壌中の微生物群集に及ぼす影響の知見は少ない。近年の研究として、コルタールの成分であるクレオソート油や多環芳香族化水素(PAHs)の影響、石油汚染の影響、殺虫剤であるヘキサクロロシクロヘキサンで汚染した土壌への影響、PCBで汚染した植物根圏土壌への影響が報告されているが、ほかの多くの化学物質による基礎的知見の多くは未だ明らかにされていない。そこで本研究では、汚染物質として重金属からは有毒性の強い塩化第二水銀($HgCl_2$)を、有機塩素化合物からは発ガン性の指摘されているTCEを選び、両汚染物質が土壌中の微生物群集に及ぼす影響の解明を試みた。

(1) 汚染物質の土壌微生物数に及ぼす影響

広口ピンのマイクロコズムに塩化第二水銀の汚染として0, 1, 10 ppmになるように2 mg/ml $HgCl_2$ 溶液を添加した。69 ml容バイアルピンのマイクロコズムにTCEの汚染として0, 10, 100 ppmになるように1,100 mg/l TCE飽和溶液を添加し、20 日の暗所に静置した。それぞれの汚

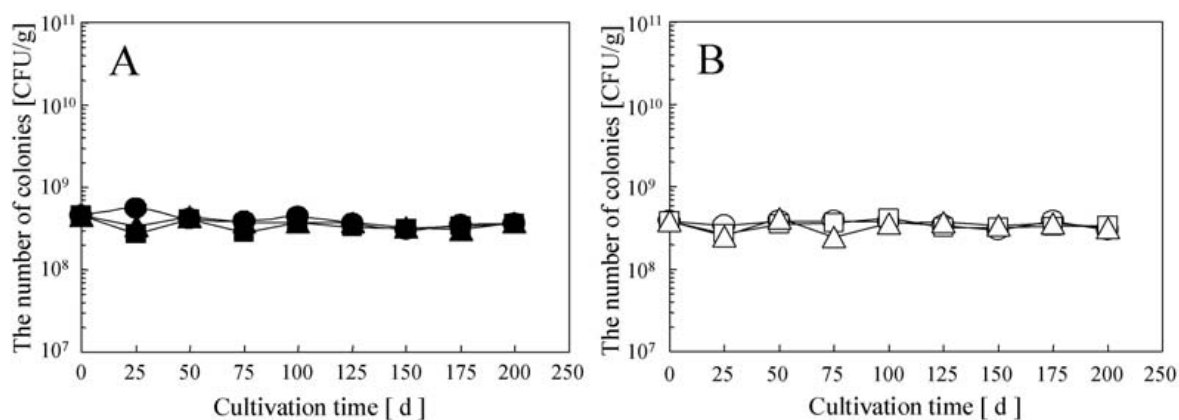


図28 塩化第二水銀およびTCEで汚染した土壌中に存在する微生物数の変化

(A) ; 0 ppm, ; 1 ppm, ; 10 ppm

(B) ; 0 ppm, ; 10 ppm, ; 100 ppm

染土壌を定期的にサンプリングし、土壌サンプルとした。

土壌中の微生物数は、生細胞や死細胞さらに鉱物粒子との識別が困難なため、正確な数は分かっていないが、一般に土壌 1 gあたり数十億 [cells/g]ほど存在すると考えられている。まず、塩化第二水銀およびTCEで汚染した土壌に存在する微生物数の変化を明らかにするため、低栄養源培地のR2A培地を用いた平板培養法により、微生物の数を測定した(図28 A,B)。汚染物質の違いによる微生物数の変化はみられず、両者で同等であった。それぞれの汚染物質の添加濃度による影響もなく、微生物数は汚染物質無添加の系と同じだった。TCEの場合、汚染濃度10 ppmおよび100 ppmでは低濃度すぎるため微生物に影響を及ぼさなかった、など考えられる。またJenkinsonらは、土壌中で死滅した菌体が生きている微生物によって急速に分解されることを報告している。もしかしたら、他の微生物が増殖して見かけ上の総数が一定になったのかもしれない。さらに平板培養を行うことで、

培地成分や培養条件に適した微生物だけが共通してコロニー形成している、生育の速いコロニーから物理的・化学的な影響を受けてコロニー形成できない微生物

がいる、増殖の極めて遅い微生物がいる、などの要因が挙げられる。

(2) PCR - DGGEによる微生物群集に及ぼす影響の解析

塩化第二水銀およびTCEで汚染した土壌に存在する微生物の数は経時的に一定であったが、培養できない微生物を含めた全微生物群集(土壌サンプル)および培養可能な微生物群集(Plate washサンプル)の群集構造は、汚染物質の影響を受けて変化しているのではないかと予想した。

R2A平板培地での培養後、Plateに滅菌水3 ml加えて、プラスチック白金耳で表面のコロニーを掻き取って混合し、コロニー懸濁溶液を回収した。これをPlate washサンプルとした。土壌およびPlate washサンプルからそれぞれ抽出したTotal DNA溶液を用い、微生物の群集構造を解析するために16S rRNA遺伝子を標的としたPCR-DGGEを試みた。

図 29 A, Bに塩化第二水銀とTCEの土壌サンプルでの結果を示した。塩化第二水銀およびTCEで汚染した土壌サンプルでは、汚染物質の影響によるバンド数の極端な

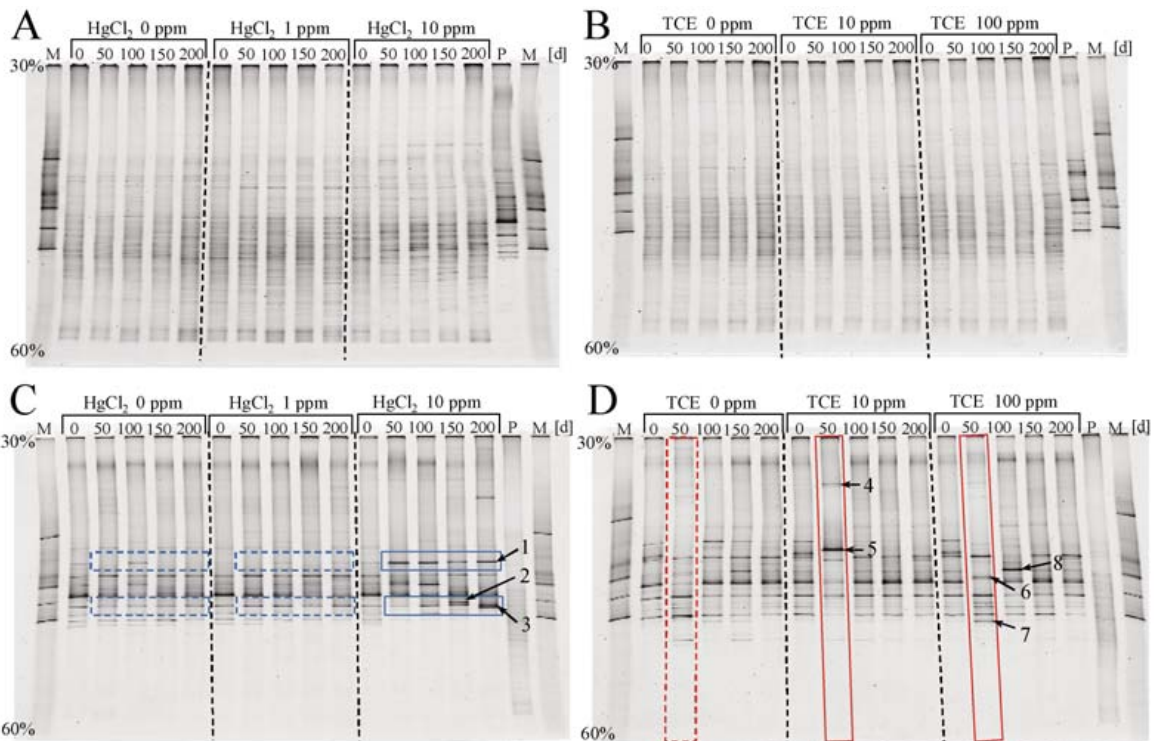


図29 塩化第二水銀およびTCEで汚染した土壌中に存在する全微生物群集と、その培養可能な微生物群集のDGGE解析
AとBには直接土壌(全微生物群集;土壌サンプル)から、CとDにはR2A平板培地に生じたコロニー群(培養可能な微生物群; Plate washサンプル)から抽出したDNAを用いてPCR-DGGEを行い、それぞれの群集構造を示した。AとCに塩化第二水銀の、BとDにTCEの結果をそれぞれ示した。MはMarker、AおよびBのPはPositive controlとしてPlate wash サンプル、CとDのPはPositive controlとして土壌サンプルを示した。

減少や消滅は認められず、多数のバンドが出現していた。さらに両者のバンドパターンは類似していた。また汚染物質の処理濃度による影響も小さく、バンドパターンは汚染物質無接種系のそれと類似していた。

一方、培養可能な微生物群集であるPlate washサンプルでは、土壌サンプルよりもバンド数は少なく、塩化第二水銀およびTCEの汚染によるバンドパターンの違いが示された(図29 C,D)。塩化第二水銀において、汚染濃度0 ppmと1 ppmのバンドパターンは類似していたが、汚染濃度10 ppmでは試験期間とともに太いバンド(1と2番)や特徴的なバンド(3番)が出現していた。また、汚染濃度0 ppm(0, 100 d)および汚染濃度1 ppm(0, 100 d)でバンド1は出現していたが、両汚染濃度(50, 150 d)においてバンド1の確認は困難であった。一方、汚染濃度10 ppmではバンド1は常に出現しており(0-200 d)、特徴的なバンドパターンを示した。もしかしたら、これら特徴的なバンド(1-3番)の微生物は培養可能な水銀耐性菌かもしれない。

TCEのPlate washサンプルでは、汚染濃度0 ppmと比較して汚染濃度10 ppmと100 ppmとともに50日目のバンドパターンが大きく変化していた。特に汚染濃度10 ppmで太いバンド(4と5番)が出現し、汚染濃度100 ppmには特徴的なバンド(6と7番)が認められた。さらに汚染濃度100 ppmの100日目でも太いバンド(8番)が出現していた。また、汚染濃度0 ppmにおいて、バンド5(100 d)およびバンド7, 8(150 d)はそれぞれ確認できるが、特にバンドパターンの変化の大きい50 dに注目すると、バンド4, 5(汚染濃度10 ppm, 50 d)およびバンド6, 7(汚染濃度100 ppm, 50 d)のそれぞれは、汚染濃度0 ppm(50 d)で確認できなかった。また、バンド8(汚染濃度100 ppm, 100 d)も同様に汚染濃度0 ppm(100 d)で確認できなかった。これらバンドの微生物は培養可能なので、もしTCE分解菌であるなら非常に興味深い。

金属汚染した土壌のDGGEパターンの違いは小さく、微生物群集は金属汚染で大きな影響を受けないことが報告されている。土壌中には圧倒的に多種類の微生物が存在しているため(4,000種以上)、同一のバンド中に複数種の微生物が含まれてしまうことが知られている。よって私たちは、現状において土壌サンプルを用いたDGGE解析から、バンドパターンおよびバンドの濃さによる定量的および定性的な考察を述べることはとても困難である。さらに土壌サンプルの場合、バンドパターンの変化

が小さく示されてしまうのではないだろうか。我々は土壌サンプルでは微生物の種類が多すぎるため、見かけ上変化の生じにくいサンプルだと考えている。以上の結果から、土壌サンプルでは明らかにならなかった汚染物質の影響が、培養可能な微生物群集を解析することで、初めて明確になり、Plate washサンプルの有効性が示された。

次に、DGGEバンドパターンで示した微生物群集の変動を明確にするため、多次元尺度法による統計処理を試みた。微生物はrRNA遺伝子のコピーを多数持っているため、DGGEパターンに存在する微生物の数(バンドの濃さ)を説明するには注意が必要である。従って本研究では、微生物の数よりもむしろ微生物の種類に注目してバンドパターンの解析を行った。

全微生物群集由来である土壌サンプルにおいて、それぞれのスポットは比較的近い位置で変動しており、汚染濃度の違いによるスポットの大きな変化は認められなかった(図30 A, B)。我々は土壌サンプルのDGGEパターン(図29A, B)が極めて類似しているにもかかわらず、多次元尺度法のHgCl₂(0, 1, 10 ppm)およびTCE(0, 10, 100 ppm)の0日目のスポット間が離れていることや、多次元尺度法が相対的なグラフであることから、グラフ内の非常に小さな変動を大きく示しているのではないだろうか、と考えている。

一方、培養可能な微生物群集由来であるPlate washサンプルでは特徴的な変化が示された。塩化第二水銀において(図30 C)、汚染濃度0 ppmおよび1 ppmのスポットの位置は比較的近く存在していたが、汚染濃度10 ppmでは全体的に離れて変動していた。特に0-50日目のスポットの変動が大きく、微生物群集の特徴的な変化が示唆された。TCEでは(図30 D)、汚染濃度0 ppmのスポットの動きは経時的に小さかったのに対し、汚染濃度10 ppmおよび100 ppmのスポットは0-50日目で大きく変動していた。さらに、それぞれのスポットの位置が逆方向にプロットされているため、汚染濃度10 ppmおよび100 ppmに存在する群集構造の違いが示唆された。

そこで、微生物群集の経時的な変化をさらに詳しく検討するためPlate washサンプルに注目し、両汚染物質の汚染濃度ごと別々に多次元尺度法を試みた(図31および図32)。

図31に塩化第二水銀の土壌およびPlate washサンプルの結果を示した。DGGEの結果と同様に、土壌サンプル

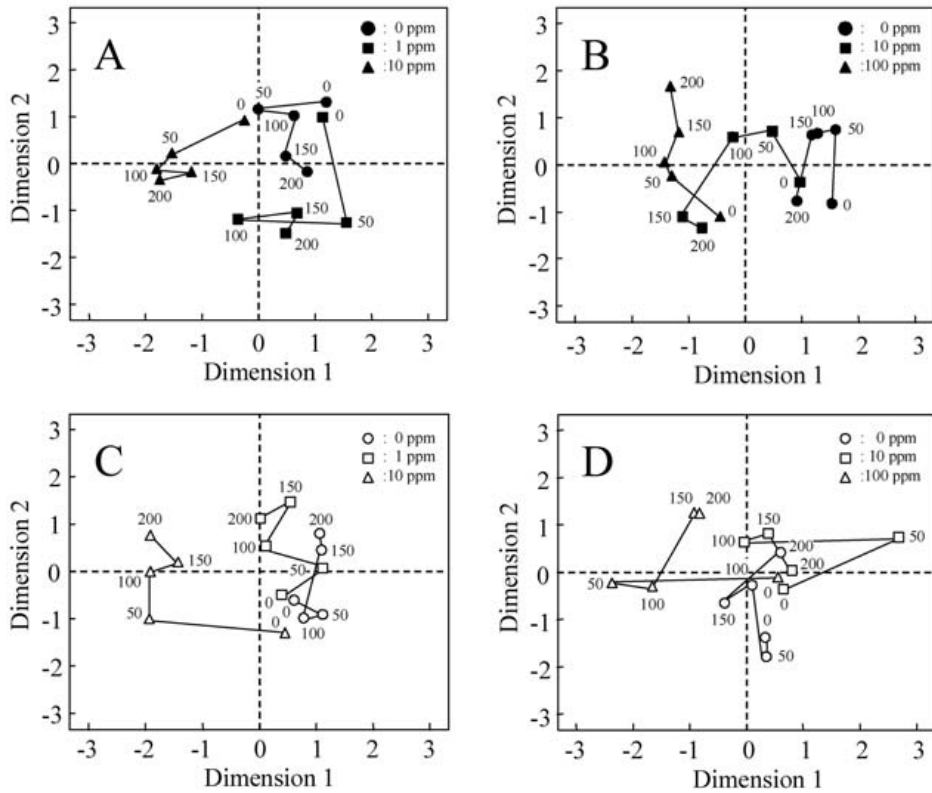


図30 多次元尺度法による，塩化第二水銀およびTCEで汚染した土壌およびそのPlate washサンプルに存在する微生物群集の相対的な変動

AとBに土壌サンプル（全微生物群集）の，CとDにはPlate washサンプル（培養可能な微生物群集）の結果を示した。AおよびCに塩化第二水銀（○；0 ppm，□；1 ppm，△；10 ppm）の，BおよびDにTCE（○；0 ppm，□；10 ppm，△；100 ppm）の結果を示した。スポットの横の数値は，それぞれサンプリング日を示した。

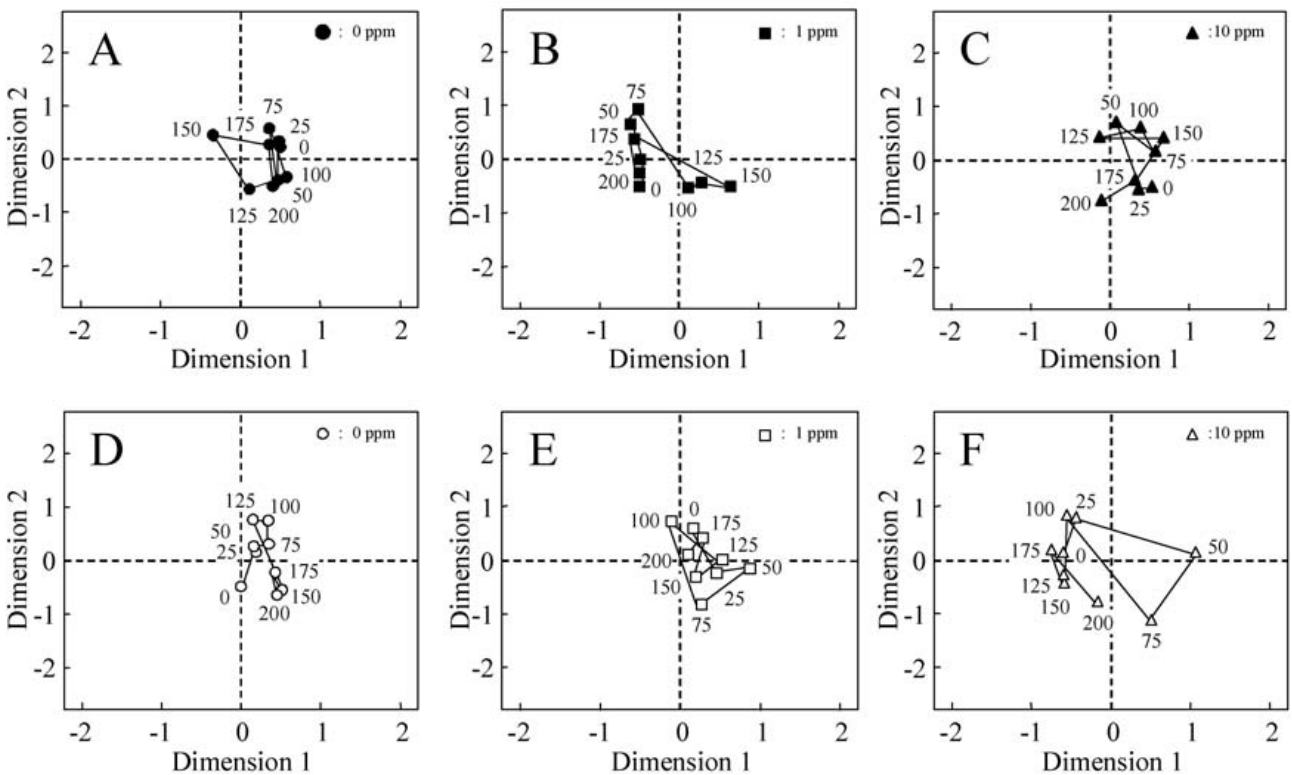


図31 多次元尺度法による，塩化第二水銀で汚染した土壌およびそのPlate washサンプルに存在する微生物群集の相対的な変動 A（○；0 ppm），B（□；1 ppm），C（△；10 ppm）は土壌サンプルの，D（○；0 ppm），E（□；1 ppm），F（△；10 ppm）には Plate washサンプルの結果を示した。スポットの横の数値は，それぞれサンプリング日を示した。

では汚染濃度0 ppm, 1 ppm, 10 ppmのスポットの動きは小さく, それぞれの微生物群集は類似していることが示された(図 31 A,B,C)。汚染濃度1 ppmにおいて75-100日目と150-175日目の変化は大きい, 全体的に類似した群集構造であることが示されている。また, Plate washサンプルの汚染濃度0 ppmおよび1 ppmでもスポットの動きは小さく, 全体的に集合していた(図 31 D,E)。しかしながら, 汚染濃度10 ppmでは図 30 Cと同様に, スポットは25-100日目の間で大きく変動し, この期間で微生物群集が特徴的に変化していることが示された(図 31 F)。

図 32にTCEの土壌およびPlate washサンプルの結果を示した。土壌サンプルの場合, 塩化第二水銀と同様にスポットの変動は小さく, 類似した微生物群集であることが示された(図 32 A,B,C)。一方, Plate washサンプルの汚染濃度10 ppmと100 ppmの両方で, スポットは0-75日目の間で大きく変動しており, 図 30Dの結果と一致していた(図 32 E,F)。しかしながら, 汚染濃度0 ppmでも25日目のスポットが大きく動いていた(図 32 D)。この原因として, 揮発性のTCEを添加したマイクロコズムは, 十分に密閉して作製されたため, その密閉の影響が出ているのではないかと考えている。もし25日目の結果を

差し引いたとしても, 10 ppmおよび100 ppmの0-75日までのスポットの動きが大きいことには変わりなく, この期間にそれぞれの群集構造が大きく変化していることが示されている。以上の結果から, 塩化第二水銀およびTCEの土壌微生物に及ぼす影響は, 変化の大きい50日ごろのPlate washサンプルを解析することで明確になることが明らかになった。

(3) Plate washサンプルを用いたDGGE解析の有効性の検討

培養可能な微生物群集であるPlate washサンプルのPCR-DGGE解析の有効性を確認するために多次元尺度法によりその再現性を評価した。汚染物質が無添加で多種類の微生物が存在すると思われる0 ppmの土壌マイクロコズムから, 独立して3回サンプリングを行い, Plate培養(それぞれ3枚づつ)した後, PCR-DGGEおよび多次元尺度法を用いて解析した(図 33 A,B)。

その結果, DGGE解析ではサンプルごとのバンドの濃さに多少の違いはあるが, バンドパターンは極めて類似し, 高い再現性を示した。また多次元尺度法による統計処理では, スポット同士が完全に重なるものは無かったものの, すべてのスポットは一ヶ所に集中しており, 全

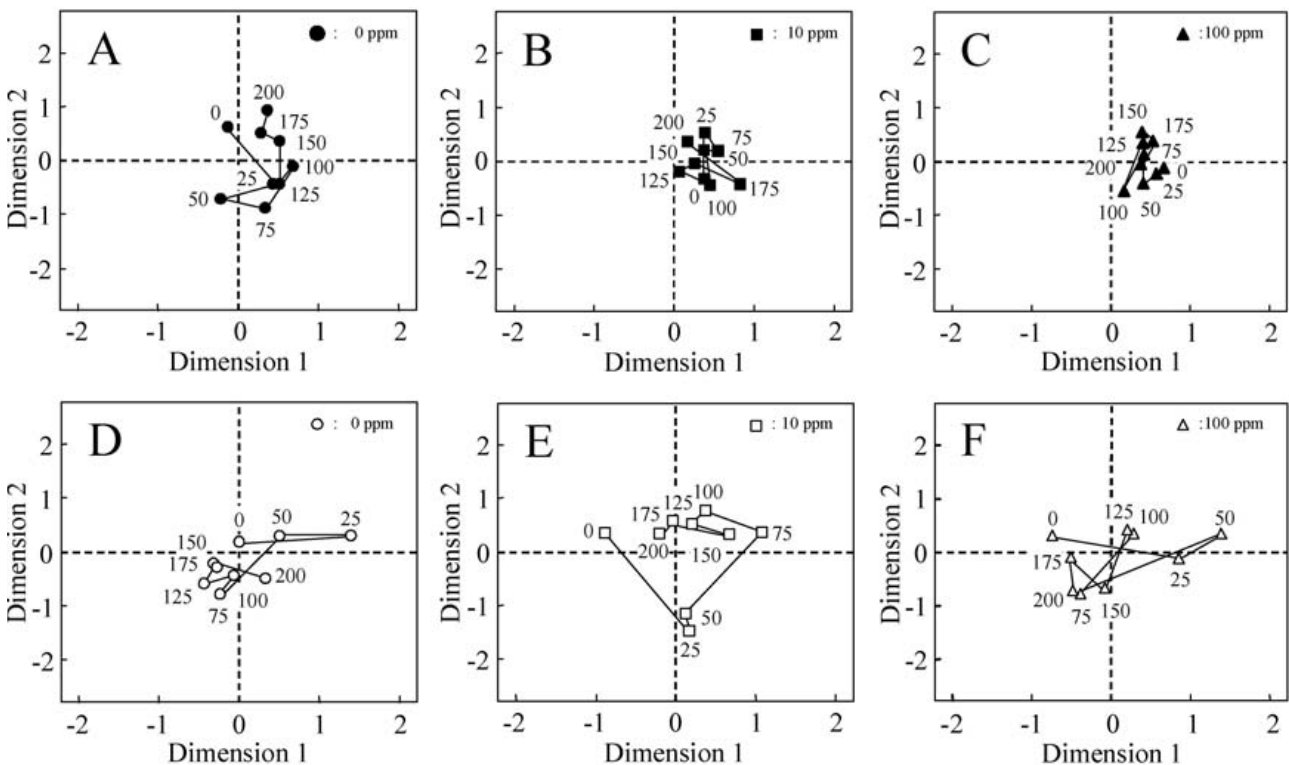


図32 多次元尺度法による, TCEで汚染した土壌およびそのPlate washサンプルに存在する微生物群集の相対的な変動 A (; 0 ppm), B (; 10 ppm), C (; 100 ppm) は土壌サンプルの, 下段のD (; 0 ppm), E (; 10 ppm), F (; 100 ppm) にはPlate washサンプルの結果を示した。スポットの横の数値は, それぞれサンプリング日を示した。

サンプルの微生物群集は類似していることが示された。

Plate wash PCR-DGGE法では平板培地上で生育できる微生物数に制限されるため、その再現性に注意が必要であるが、本解析結果からは非常に高い再現性が確認された。培養微生物の遺伝子を網羅的に解析する本方法では、サンプル内の全ての微生物は培養可能である。従って、有害化学物質等の環境ストレスにตอบสนองする微生物を分離し、その応答メカニズムについてさらに詳細な研究を進めることが可能であり、大変有効な手法であるといえる。

現在我々は、塩化第二水銀およびTCEで汚染した土壤のPlate washサンプルのPCR-DGGEから、特徴的なバンドの微生物群集を同定・単離を試みている。今後、それぞれの汚染物質に対する微生物の応答メカニズムの解析を行い、特徴的な微生物を指標とした汚染土壤の評価法の開発を目指すとともに、いわゆるバイオレメディエーションによる環境浄化にもこれら微生物群集の応用可能性を探っていきたい。

2.2.4 残留性有機汚染物質・PFOA (perfluorooctanoic acid) により特異的に発現される遺伝子のジーンアレイによる同定 生物濃縮性が高く、また生分解性が低い化学物質は残

留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants, POPs) と呼ばれている。有害性をもつPOPによる環境汚染の広がり、生態系やひいては人の健康影響を広範に引き起こすことが知られている。典型的なPOPはダイオキシン類であり、汚染の広がりを防ぎ、さらに人への健康影響を防止する様々な対策が取られている。その一方、新規のPOP候補化合物も見出されるに至っている。その典型がPFOA (perfluorooctanoic acid) やPFOS (perfluorooctansulfonate) などの高フッ素化脂肪酸同族体であり、すでに環境中ばかりでなく、ヒト血清中での検出例も報告されている。PFOAやPFOSは実験的に肝毒性を示すことが知られているが、その毒性発現機構は必ずしも十分に明らかにされていない。そのような中で、PFOAはげっ歯類でパーオキシゾーム増殖因子受容体 (PPAR, peroxysome proliferator activated receptor) に結合し、パーオキシゾーム増殖因子 (PP, peroxysome proliferator) 活性を示すことが知られている。PP活性を示す幾つかのプラスチック可塑剤、農薬などは、齧歯類の実験において、酵素誘導、肝臓DNA合成、肝臓肥大、肝臓ガンの誘発などの作用をもつことが明らかにされているが、PFOAは水環境中で検出される例が知られていることから、魚類に対しても同様の作用を示し生態毒性を発揮することが懸念される。しかしその検討は充分に行われて

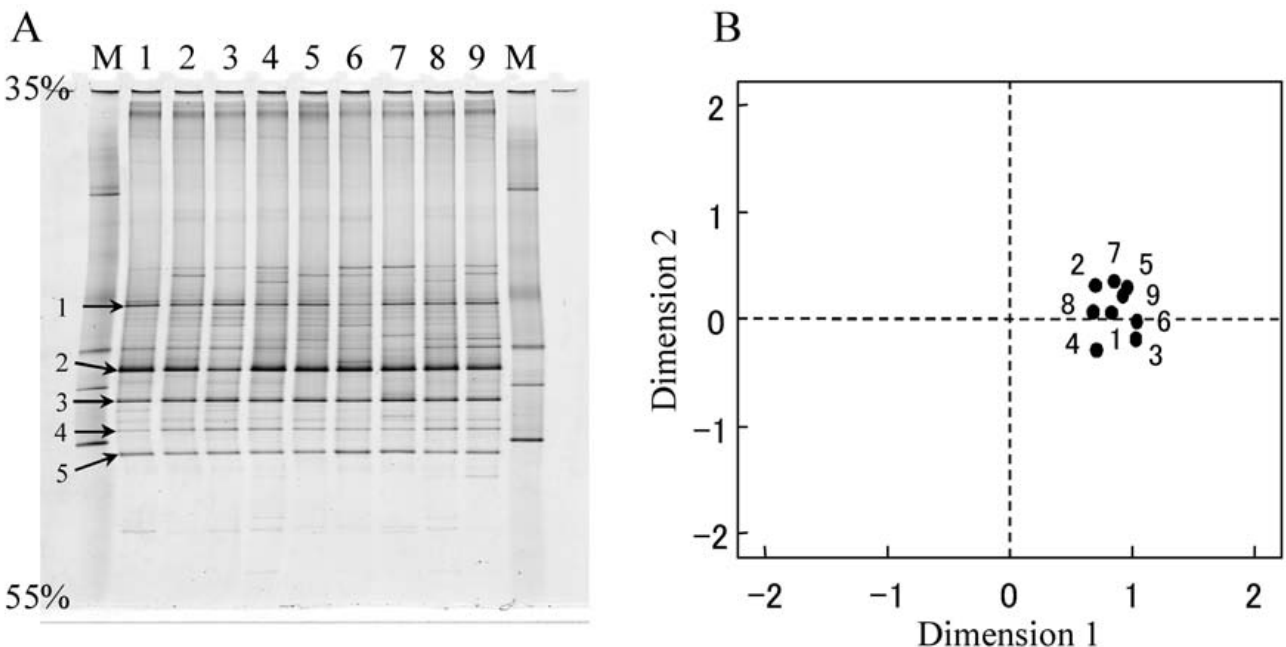


図33 Plate wash サンプルを用いたPCR-DGGEと多次元尺度法による解析の再現性
汚染物質が無添加の土壤マイクロコズムから、独立して3回サンプリングを行い、それぞれ3枚づつPlate培養を試みた (Total 9 plates)。Plate培養のあと、それぞれをPCR-DGGEおよび多次元尺度法で解析した。MはMarker、スポット横の数値はサンプル番号を示した。

いない。PFOA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は、PFOA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PFOA曝露のバイオマーカーが見出せるとも期待された。

本研究では、PFOAとその同族体perfluorohexanoic acid (PFHA)、およびPOPsの陽性対照として典型的なダイオキシン類である3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl (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することとした。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) 既に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、などである。

(1) 実験方法

化学物質への曝露は、1群5匹のオスのメダカ(体長2-3 cm)をPFOA(17 µg/l)、PFHA(17 µg/l)あるいは

PenCB(30 µg/l)を含む0.1%人工海水500 ml中(各化合物を含むDMSO溶液を150 µl添加)で飼育して行った。対照群はDMSOのみを含む人工海水中で飼育し、通常は曝露群2群、対照群2群を設定した。また、曝露中は給餌を行わなかった。72時間の曝露終了後、氷冷下で解剖して臍肝臓を摘出し、1群5匹の臍肝臓をまとめてQuiagen lipid tissue kitで総RNAを抽出した。遺伝子発現パターンはNimbleGen systemのメダカアレイ(NANDEMO ARRAY; 26,687 genes/array, 7 probes/gene, 60 mers/probe)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。

(2) 結果

PFOA曝露を4回実施した結果、下記(表7)の*Glutathione transferase*, *UDP-glucuronosyltransferase*などの薬物代謝酵素、*cytochrome P450 3A40*等のモノオキシゲナーゼのほか、糖代謝酵素である*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*などと相同性のある遺伝子がPFOAで誘導

表7 PFOA曝露により発現が増加した遺伝子

weakly similar to UP Q9W711 (Q9W711) <i>UDP-glucuronosyltransferase</i> , partial (95%)
similar to GB CAA63430.1 2344812 HSDRG1 Drg1 {Homo sapiens;}, partial (38%)
weakly similar to UP P79149 (P79149) Pinin, partial (3%)
similar to SP P05153 PPCC_CHICK <i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> , cytosolic [GTP] (Phosphoenolpyruvate carboxylase)
similar to SP P08217 EL2A_HUMAN Elastase 2A precursor. {Homo sapiens;}, partial (6%)
homologue to SP P43091 HEM1_OPSTA 5-aminolevulinic acid synthase, nonspecific, mitochondrial precursor (Delta-)
similar to UP CAA74929 (CAA74929) DNA-directed RNA polymerase (Fragment), partial (5%)
similar to UP Q92103 (Q92103) <i>Glutathione S-transferase</i> , partial (96%)
similar to UP CAE53395 (CAE53395) <i>Microsomal glutathione S-transferase</i> (Fragment), partial (59%)
weakly similar to SP Q9R0T4 CAD1_RAT Epithelial-cadherin precursor (E-cadherin) (Uvomorulin) (Cadherin-1). {Rattus}
similar to UP Q8K4Y7 (Q8K4Y7) Apyrase, partial (86%)
SP Q98T91 C340_ORYLA <i>Cytochrome P450 3A40</i> . {Oryzias latipes;}, complete
similar to UP Q9PVH9 (Q9PVH9) <i>Cytochrome P450 2N2</i> , partial (11%)
weakly similar to GB AAC42063.1 847653 RATCSADC cysteine sulfinic acid
similar to GP 6650758 gb A <i>cytochrome P450 2P3</i> {Fundulus heteroclitus;}, partial (6%)
similar to GP 19569597 g multidrug resistance-associated protein Mrp2 {Raja erinacea}

表8 PFOA曝露により発現が抑制された遺伝子

weakly similar to SP O46409 APA4_PIG Apolipoprotein A-IV precursor (Apo-AIV). {Sus scrofa;}, partial (7%)
similar to UP Q7ZZK3 (Q7ZZK3) Glycogen phosphorylase, partial (38%)
weakly similar to GP 1322373 dbj PAS-4 {Bos taurus;}, partial (9%)

されることが認められた。また，表8で示す *Apolipoprotein A-IV*と相同の遺伝子の発現が抑制された。

一方，PFHAへの曝露で表9の遺伝子発現が認められたものの，上記の遺伝子発現は *Glutathione S-transferase*を除いて認められず，表7の遺伝子発現はPFOA曝露に特徴的な現象であることがわかった。また，PFHAへの曝露で誘導される遺伝子には筋肉に誘導されるタンパク質の遺伝子が多く興味を持たれた。また，表2のPFOAの作用で抑制される遺伝子はPFHAによっても抑制された。

また，PenCBの作用により，*UDP-glucuronosyltransferase*と *Pinin*と相同の遺伝子の発現が認められたが（表10下線），他のPFOAにより発現する遺伝子は，PenCBの作用では発現しなかった。PenCBの作用により誘導される遺伝子は表10の通りであり，*UDP-glucuronosyltransferase* 以外には *CYP1A*などダイオキシン類により特異的に見られる遺伝子の誘導は検出されなかった。その理由は不明であるが，アレイの構成上の問題であるかも知れ

ない。

(3) 考察

PFOAの作用により，表7で示す幾つかの遺伝子が発現することが明らかになった。これらの遺伝子発現はPFHAやダイオキシン類では認められず，PFOAに特異的であった。しかしながら，メダカへのPFOA曝露では，PPの作用によりゲッ歯類で発現する脂質代謝酵素 (*Acox1, Cyp4a10, Cyp4a14, Fabp4, Per11a*) の発現は認められず，PFOA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。

これらPFOAにより誘導される遺伝子産物が，PFOA曝露の特異的バイオマーカーになるか否かは更なる検討が必要である。

2.3 環境研トキシコゲノミクスデータベースの作成

2.3.1 ダイオキシン応答性遺伝子データベースの開発

このサブテーマでは，本研究課題で主に対象とするダ

表9 PFHA曝露により発現が増加した遺伝子

SP P53480 ACTC_FUGRU Actin, alpha cardiac. {Takifugu rubripes;}, complete
similar to UP Q9QXH3 (Q9QXH3) Alpha-interferon inducible protein (Fragment), partial (83%)
similar to UP Q7ZSY4 (Q7ZSY4) Cardiac troponin T, partial (73%)
similar to UP Q801M3 (Q801M3) Myosin light chain 2 Mlc2a, complete
weakly similar to UP Q8BM12 (Q8BM12) Integrin alpha-10 precursor homolog (Fragment), partial (9%)
weakly similar to UP Q7QLE3 (Q7QLE3) AgCP13033, partial (28%)
similar to PIR S01843 MOCHLC myosin alkali light chain 3, cardiac and slow skeletal
weakly similar to UP Q92103 (Q92103) Glutathione S-transferase, partial (73%)
similar to UP Q9DGI1 (Q9DGI1) Myoglobin, complete
similar to PIR A32730 MOHU myosin alkali light chain 4 embryonic and atrial-human, partial (47%)

表10 PenCB曝露により発現が増加した遺伝子

homologue to UP Q8JH38 (Q8JH38) Muscle-type creatine kinase CKM2, complete
weakly similar to UP Q9W711 (Q9W711) <u>UDP-glucuronosyltransferase</u> , partial (95%)
weakly similar to UP P79149 (P79149) <u>Pinin</u> , partial (3%)
similar to UP AAN64588 (AAN64588) Mitogen-activated protein kinase 6, partial (6%)
GB AAH45094.1 27924246 BC045094 psmd14-prov protein {Xenopus laevis;}, complete
similar to UP Q9QXH3 (Q9QXH3) Alpha-interferon inducible protein (Fragment), partial (83%)
similar to SP Q13907 IDI1_HUMAN Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase 1 (IPP isomerase1) (Isopentenyl pyrophosphate)
weakly similar to UP Q7QTS4 (Q7QTS4) GLP_191_32543_34384, partial (6%)
similar to SP Q07973 CP24_HUMAN Cytochrome P450 24A1, mitochondrial precursor (P450-CC24) (Vitamin D(3) 24-)
weakly similar to GP 11761266 db matrix metalloproteinase {Oncorhynchus mykiss}, partial (41%)

イオキシソール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簡易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。

本データベースは、国立環境研究所ホームページにそのサイトを持つ公式公開データベースである。外部研究者の所有するマイクロアレイデータを随時受け付けアップロードする体制にある。データベースのトップには、EXPERIMENT, GENE, CURVE, COMPARISON, ELEMENT, DISTRIBUTIONと言う6つのツールがモジュールとして組み込まれており、閲覧者はこのモジュール毎に検索をかけることができる。

(1) モジュールEXPERIMENTをキーとするデータ参照機能

閲覧者が本データベースに存在する実験系にどのようなものがあるのか検索し、そのサマリーを知りたい場合に使用するツールである。たとえば、どのような化合物を使用したのか、どのような系統の動物を用いたのか、どのような組織や細胞を解析したのかという点から検索をかける場合に使用する場合を想定している。また各検索結果画面からは他の機能への遷移ができる。

検索入力用：

1. EXPERIMENT-検索入力画面

検索結果出力用：

2. EXPERIMENT-検索結果表示画面

3. EXPERIMENT-実験系情報ファイル

実験情報：

4. EXPERIMENT-比較結果データ図 (Scatter plot)

5. EXPERIMENT-変動遺伝子分類表

6. EXPERIMENT-変動遺伝子分類図 (ベン図)

(2) モジュールGENEをキーとするデータ参照機能

閲覧者が特定の遺伝子 (遺伝子群) に興味があり、その遺伝子 (遺伝子群) が変動した実験系の情報を知りたい場合に使用するツールである。複数の遺伝子について遺伝子やタンパク名、公共データベースIDから本データベース内に存在する遺伝子を検索し、検索した遺伝子のうち、単独遺伝子またはすべての組合せでともに変動した実験系を検索したい場合を想定している。

検索入力用：

1. GENE-検索入力画面

検索結果：

2. GENE-検索結果表示画面

実験情報：

3. GENE-実験系情報ファイル

(3) モジュールCURVEをキーとするデータ参照機能

同一条件の実験内で変動する特定の遺伝子が、化合物の用量や投与時間によってどのようなレベルで変化するか、あるいはそれら変化が異なる動物間でどのような異なるのかをグラフ化して提示するツールである。サブモジュールとして、以下の6種をもち、各サブモジュールから同一の検索方法でグラフを導き出す。

Dose response：

用量反応関係の取れる実験を抽出。

Time course：

経時変化の取れる実験を抽出。

Strain difference of dose response：

異なる系統間で用量反応関係の取れる実験を抽出。

Strain difference of time course：

異なる系統間で経時変化の取れる実験を抽出。

Tissue difference of dose response：

異なる組織間で用量反応関係の取れる実験を抽出。

Tissue difference of time course：

異なる組織間で経時変化の取れる実験を抽出。

検索入力用：

1. CURVE-検索用画面

検索結果：

2. CURVE-検索結果表示画面

出力データ：

3. CURVE-データ図(グラフ)(図34)

(4) モジュールCOMPARISONをキーとするデータ参照機能

複数の比較実験で共通して変動する、あるいは単独して変動する遺伝子がいくつ存在するのか検索し、それら遺伝子の情報を個別に得る場合に使用するツールである。変動のレベルや各サンプル間のシグナルを閲覧者が設定することで変動する遺伝子の意味づけを自由に操作できる機構をもつ。サブモジュールとして、以下の3種

をもち、各サブモジュールから変動レベル別分類表、変動レベル別分類ベン図、分類遺伝子一覧表を導き出す。

Two-comparisons：

2つの比較実験間の比較行う。

Three-comparisons：

3つの比較実験間の比較行う。

Over 4-comparisons：

4つ以上の比較実験間の比較行う。

検索入力用：

1. COMPARISON-検索用画面

検索結果：

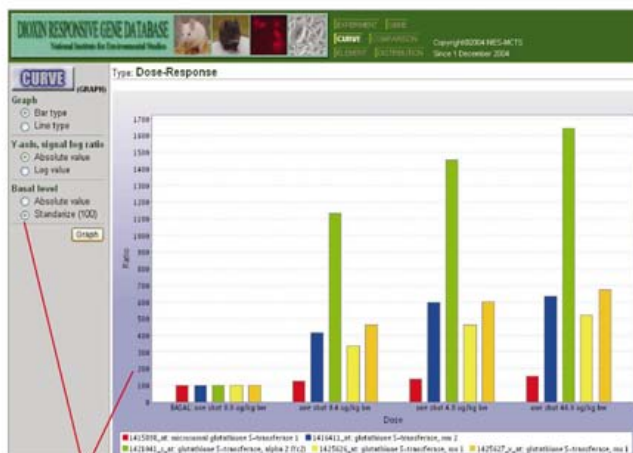
2. COMPARISON-検索結果および絞り込み画面

出力データ：

3. COMPARISON-変動差別遺伝子分類表

4. COMPARISON-変動差別遺伝子分類図(ベン図)(図35)

グラフ画像(シグナル絶対値標記)



シグナル相対値: 対照群(Basal assay)のシグナルを100とする。

グラフオプションの変更

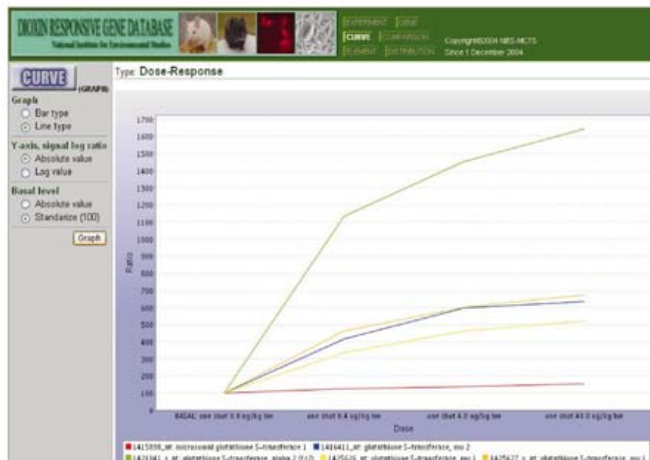


図34 目的遺伝子の化合物による用量依存的発現変動をサイト上でグラフ化した例

(5) モジュールELEMENT参照機能

検索したい遺伝子のゲノム配列内に特定のエレメント (XRE) が存在するか知りたい場合、または、単一の比較実験内で変動した遺伝子群、あるいは任意に選別した遺伝子群で、エレメント (XRE) が存在しているものをXREの存在する領域別に分類したい場合に使用するツールである。サブモジュールとして、以下の2種をもち、各サブモジュールからゲノム構造情報、ゲノムシーケンス情報、エレメント保有性別分類表、エレメント保有性別分類ベン図、分類遺伝子一覧表を導き出す。

Genome structure :

各遺伝子のエクソン/イントロン構造を提示。

Element property :

変動遺伝子群におけるXRE数に関するゲノム上共通

性を提示。

検索入力用 :

1. ELEMENT-検索用画面

検索結果 :

2. ELEMENT-検索結果表示画面

出力データ :

3. ELEMENT-ゲノム構造図表示画面
4. ELEMENT-ゲノムシーケンス表示画面
5. ELEMENT-エレメント特性別遺伝子分類表

(6) モジュールDISTRIBUTIONをキーとするデータ参照機能

ダイオキシン類曝露とは関係なく、本データベースに存在する異なる組織間や異なる系統間あるいは細胞間で

2つの比較実験の間の比較解析画面:ベン図&表

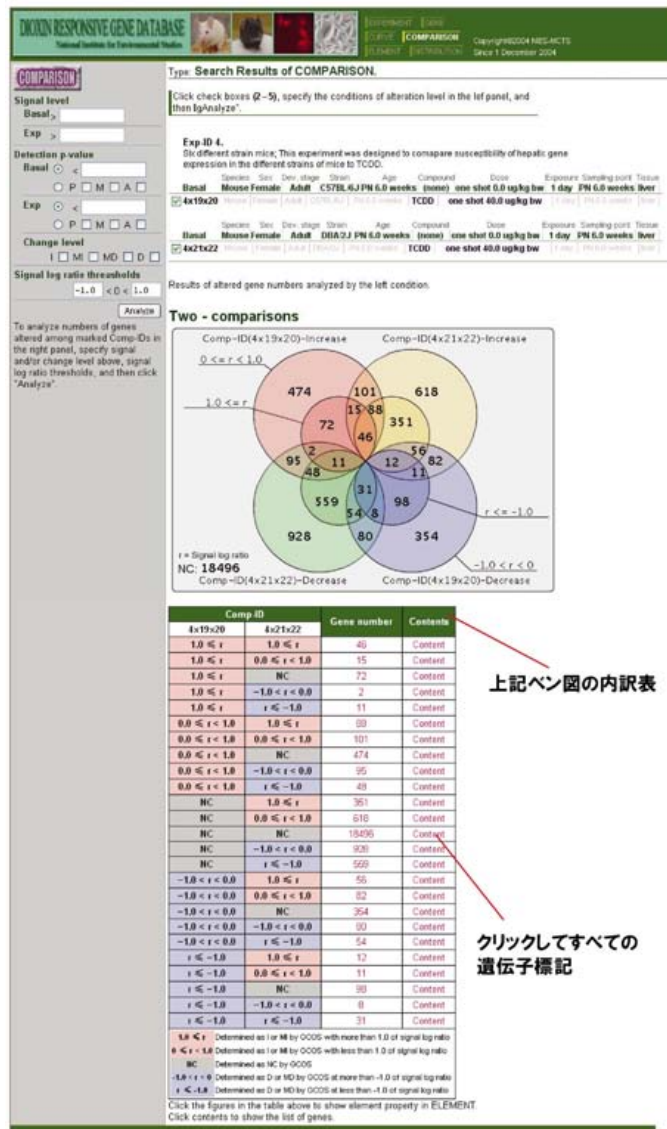


図35 2つの比較実験においてともに変動した遺伝子数をベン図に表示し、そのコンテンツに遷移するための検索結果画面例

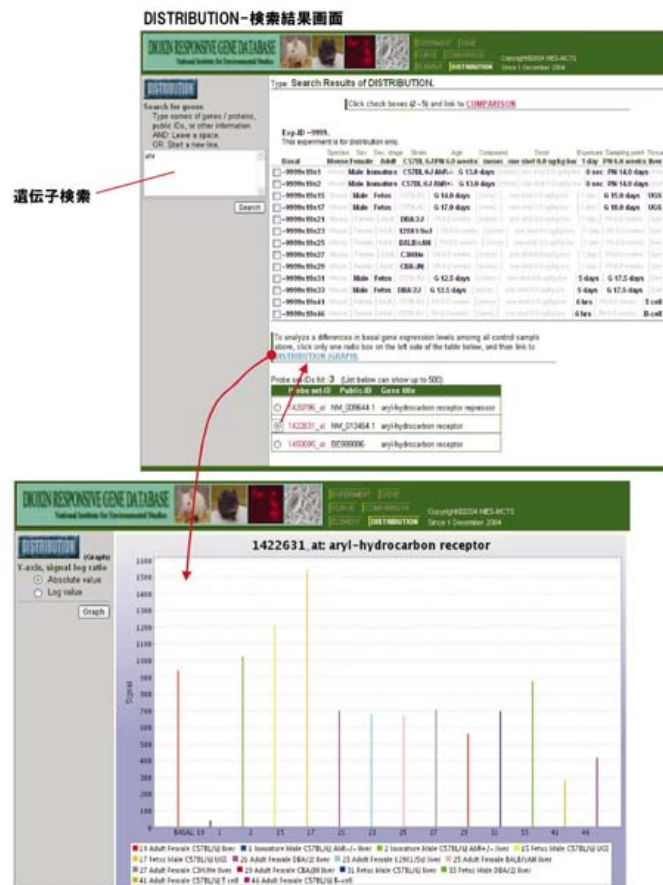


図36 目的遺伝子の臓器別細胞別の基底レベル発現量を表示した例

基底レベル（未処置対照群）での遺伝子発現レベルの差の情報を導き出したい場合に使用するツールである。

検索入力用：

1. DISTRIBUTION-検索用入力画面

検索結果：

2. DISTRIBUTION-検索結果表示画面
3. DISTRIBUTION-グラフオプション

出力データ：

4. DISTRIBUTION-データ図（グラフ）(図36)

今回開発した我々のデータベースはマイクロアレイデータベースの中でも、化合物による各動物、臓器、細胞の反応性を集積している点で、公開データベースとしては世界で初めてのものと言える。今後、環境汚染物質に特化した形で、外部研究者の多様なマイクロアレイ情報をさらに収集し、データ量を増加させる必要がある。平成16年度にリリース1として上記機能が搭載できるプロトタイプを作成して、国立環境研究所ホームページより公開した。そこではAffymetrix社製マイクロアレイのMouse Expression Array 430Aのみを対象とした。現在、

登録できるアレイの種類をマウス、ヒト、ラットに拡張し、さらに登録できるアレイもAffymetrix社のみならず、他社製、あるいはインハウスアレイに関してもEnsembl-IDを配列しているものであれば登録可能なシステムに改良中である。

2.3.2 NIESトキシコゲノミクスサイトの作成

本特別研究で得られた成果を中心に、環境汚染物質の生体・生物影響研究におけるトキシコゲノミクスの利用例やその有効性をインターネットで紹介するためのサイトを作成し、国立環境研究所ホームページにサイトをもつ公式ホームページとして公開した（図37）。

現在の主なコンテンツは、「トキシコゲノミクスの利用と有用性」と「トキシコゲノミクスデータベース」である。「トキシコゲノミクスの利用と有用性」には、1、トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の免疫毒性評価法、2、植物への環境ストレス影響評価法、3、rRNAを標的とした環境微生物DNAマイクロアレイの開発、4、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

NIESトキシゲノミクスサイト

本サイトは、環境研究におけるトキシゲノミクスの利用例や、国立環境研究所 (NIES) で作成したトキシゲノミクスデータベースを紹介しています。



Produced by
国立環境研究所環境健康研究領域
分子細胞毒性研究室



[ホームページ]
国立環境研究所
環境健康研究領域
分子細胞毒性研究室

図37 NIESトキシゲノミクスサイトのトップページ

響評価, 5, 化学物質による環境微生物への影響, の5つの記事を掲載した。また「トキシゲノミクスデータベース」には, 前節で述べたダイオキシン応答性遺伝子データベースを掲載している。他には, トキシゲノミクス研究を進める上で有用な情報を提供している世界各国のサイトを紹介したリンク集を掲載した。

環境汚染物質の生体影響と生物影響の両方に関して, 遺伝子発現変化からの研究成果をまとめて紹介するサイ

トはこれまで作られていないと思われる。本研究で作成したNIESトキシゲノミクスサイトは, 環境汚染物質の生体・生物影響研究において, 新たにトキシゲノミクスに関する情報を提供する, 国立環境研究所ならではのサイトとして有用であると考えられる。また, 今後は新たな研究成果やデータを随時付け加え, さらに内容を充実させることによって有用性の高いサイトへと発展させていきたいと考えている。

[資 料]

研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織

[A 研究担当者]

環境健康研究領域

分子細胞毒性研究室

野原恵子

鈴木武博

伊藤智彦

NIESポスドクフェロー

Castle Jill Funatake

NIESアシスタントフェロー

粟生佳奈

アシスタントスタッフ

宮本芳美

アシスタントスタッフ

村井 景

アシスタントスタッフ

松本みちよ

アシスタントスタッフ

今泉 慧

生物圏環境研究領域

生理生態研究室

佐治 光

生態遺伝研究室

玉置雅紀

水圏環境研究領域

水環境質研究室

岩崎一弘

アシスタントスタッフ

米良信昭

[B 客員研究員]

青木康展

(前: 化学物質環境リスク研究センター) (平成16~17年度)

(内閣府)

(平成18年度)

大迫誠一郎

(前: 環境健康研究領域)

(平成16年度)

(東京大学大学院医学研究科)

(平成17~18年度)

浦川秀敏

(前: 水圏環境研究領域)

(平成16年度)

(東京大学海洋研究所)

(平成17~18年度)

2 研究課題と担当者 (*客員研究員)

(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評価法の実験的予測

野原恵子, 鈴木武博, 伊藤智彦, 粟生佳奈, 宮本芳美, 村井 景, 松本みちよ, 今泉 慧, Castle Jill Funatake

(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

佐治 光, 玉置雅紀, 岩崎一弘, 浦川秀敏*, 青木康展*

(3) 環境研トキシコゲノミクスデータベースの作成

野原恵子, 鈴木武博, 大迫誠一郎*, 玉置雅紀, 岩崎一弘, 浦川秀敏*, 松本みちよ

研究成果発表一覧

1 誌上发表

発表者・題目・掲載誌・巻(号)・頁・刊年

- 岩崎一弘, 矢木修身 : 遺伝子組換え微生物の第一種使用における安全性評価, J. Environ. Biotechnol., 6(1): 7-15, 2006
- Mera N., Iwasaki K. : Use of plate-wash samples to evaluate bacterial population dynamics in mercury- and trichloroethylene-contaminated soils, J. Environ. Biotechnol., 6(2): 115-122, 2006
- Kelly J. J., Siripong S., McCormack J., Janus L. R., Urakawa H., El Fantroussi S., Noble P. A., Sappelsa L., Rittmann B. E., Stahl D. A. : DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples. Water Res., 39 : 3229-3238, 2005
- Eyes L., Smoot J. C., Smoot L. M., Bugli C., Urakawa H., McMurry Z., Siripong S., El Fantroussi S., Lambert P., Agathos S. N., and Stahl D. A. : Discrimination of shifts in a soil microbial community associated with TNT-contamination using a functional ANOVA of 16S rRNA hybridized to oligonucleotide microarrays. Environmental Science and Technology 40 : 5867-5873, 2006.
- Iwai S., Kurisu F., Urakawa H., Yagi O., Furumai H. : Development of a 60-mer oligonucleotide microarray on the basis of benzene monooxygenase gene diversity, Appl. Microbiol. Biotech., 75: 929-939, 2007
- Urakawa H., Matsumoto J., Hoshino T., Tsuneda S. : Direct profiling of rRNA in saline wastewater treatment samples using an oligonucleotide microarray, Microb. Environ., 22: 116-122, 2007
- Tamaoki M., Matsuyama T., Nakajima N., Aono M., Kubo A., Saji H. : A method for diagnosis of plant environmental stresses by gene expression profiling using a cDNA macroarray, Environ. Pollut., 131 (1) : 137-145, 2004
- 玉置雅紀 : DNAアレイ法を用いた遺伝子発現プロファイリングによる植物の環境ストレスモニタリング手法の開発, J. Environ. Biotech., 5 (1) : 23-30, 2005
- Tamaoki M. : Isolation of O₃-response genes from *Arabidopsis thaliana* using cDNA macroarray, Meth. Mol. Biol. (in press)
- Ito T., Tsukumo S., Suzuki N., Motohashi H., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y., Mimura J., Lin T-M., Peterson R. E., Tohyama C., Nohara K. : A constitutively active arylhydrocarbon receptor induces growth inhibition of Jurkat T cells through changes in the expression of genes related to apoptosis and cell cycle arrest, J. Biol.Chem., 279 : 25204-25210, 2004
- Pan X., Inouye K., Ito T., Nagai H., Takeuchi Y., Miyabara Y., Tohyama C., Nohara K. : Evaluation of relative potencies of PCB126 and PCB169 for the immunotoxicities in ovalbumin (OVA)-immunized mice, Toxicology, 204 : 51-60, 2004
- Nagai H., Takei T., Tohyama C., Kubo M., Abe R., Nohara K. : Search for the target genes involved in the suppression of antibody production by TCDD in C57BL/6 mice, Int. Immunopharmacol., 5 : 331-343, 2005
- Nohara K., Pan X., Tsukumo S., Hida A., Ito T., Nagai H., Inouye K., Motohashi H., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y., Tohyama C. : Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes, J. Immunol., 174 : 2770-2777, 2005
- Inouye K., Pan X., Imai N., Ito T., Takei T., Tohyama C., Nohara K. : T cell-derived IL-5 production is a sensitive target of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), Chemosphere, 60 : 907-913, 2005
- Nagai H., Kubo M., Abe R., Yamamoto M., Nohara K. : Constitutive activation of the aryl hydrocarbon receptor in T-lineage cells induces thymus involution independently of the Fas/Fas ligand signaling pathway, Int. Immunopharmacol., 6 : 279-286, 2006
- Ito T., Nagai H., Lin T-M., Peterson R.E., Tohyama C., Kobayashi T., Nohara K. : Organic chemicals adsorbed onto diesel exhaust particles directly alter the differentiation of fetal thymocytes through arylhydrocarbon receptor but not oxidative stress responses, J. Immunotoxicol., 3 : 21-30, 2006
- Kawakami T., Ishimura R., Nohara K., Takeda K., Tohyama C., Ohsako S. : Differential susceptibilities of Holtzman and Sprague-Dawley rats to fetal death and placental dysfunction induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) despite the identical primary structure of the aryl hydrocarbon receptor, Toxicol. Appl. Pharmacol., 212 : 224-236, 2006
- Ishimura R., Kawakami T., Ohsako S., Nohara K., Tohyama C. : Suppressive effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on vascular remodeling that takes place in the normal labyrinth zone of rat placenta during late gestation, Toxicol. Sci., 91 : 265-274, 2006
- Nohara K., Ao K., Miyamoto Y., Ito T., Suzuki T., Toyoshiba H., Tohyama C. : Comparison of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)-induced CYP1A1 gene expression profile in lymphocytes from mice, rats, and humans: Most potent induction in humans, Toxicology, 225 : 204-213, 2006

Ohtake F., Baba A., Takada I., Okada M., Iwasaki K., Miki H., Takahashi S., Kouzmenko A., Nohara K., Chiba T., Fujii-Kuriyama Y., Kato S.: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase, *Nature*, 446: 562-566, 2007

Suzuki T., Nohara K. : Regulatory factors involved in species-specific modulation of arylhydrocarbon receptor (AhR)-dependent gene expression in humans and mice, *J. Biochem.*, 142: 443-452, 2007

Nohara K., Ao K., Miyamoto Y., Suzuki T., Imaizumi S., Tateishi Y., Omura S., Tohyama C., Kobayashi T. : Arsenite-induced thymus atrophy is mediated by cell cycle arrest :A characteristic down-regulation of E2F-related genes revealed by a microarray approach, *Toxicol. Sci.*, (in press)

[著書・総説等]

矢木修身, 岩崎一弘, 来栖太 : 原位置バイオレメディエーション技術を用いた揮発性有機塩素化合物汚染土壌・地下水の浄化, 環境バイオテクノロジー学会単行本「環境バイオでなにができるのか」, 環境バイオテクノロジー学会編, 1-10, 2006

岩崎一弘, 矢木修身 : 遺伝子組換え微生物の第一種使用における安全性評価, 環境バイオテクノロジー学会単行本「環境バイオでなにができるのか」, 環境バイオテクノロジー学会編, 183-191, 2006

玉置雅紀 : 遺伝子情報と環境, 新農業気象・環境学, 朝倉書店, 134-141, 2005

野原恵子 : 142 ダイオキシン, 予防医学事典, 朝倉書店, 325-326, 2005

野原恵子 : ダイオキシンによる免疫細胞での転写因子AhRの活性化と免疫毒性, *ファルマシア* 42, 700-704, 2006

2 口頭発表

発表者・題目・学会等名称・開催都市名・年月

原田貴浩, 岩崎一弘, 内山裕夫, 村上達也, 岡田光正, 矢木修身: 遺伝子組換え微生物の微生物多様性への影響評価, 日本農芸化学会年度(平成17年度)大会, 2005.3

岩崎一弘, 大橋美保, 中杉奈央, 矢木修身: 不法投棄汚染修復サイトの微生物群集構造解析, 環境バイオテクノロジー学会2005年度大会, 2005.6

米良信昭, 岩崎一弘: 塩化第二水銀およびトリクロロエチレンの及ぼす土壤微生物生態系への影響評価, 環境バイオテクノロジー学会2005年度大会, 2005.6

岩崎一弘, 原田貴浩, 内山裕夫, 矢木修身: 微生物多様性に及ぼす組換え微生物の影響, 第21回日本微生物生態学会, 2005.10

Iwasaki K., Nakasugi N., Yagi O.: Biotreatability study for evaluating the potential of bioremediation at illegal dumping site, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies PACIFICHEM 2005, 2005.12

岩崎一弘, 山岡紘子, 中嶋睦安, 矢木修身: 培養可能な微生物群集の遺伝子解析による組換え微生物の影響評価, 第40回日本水環境学会年会, 2006.3

岩崎一弘, 原田貴浩, 内山裕夫, 矢木修身: 遺伝子組換え *Pseudomonas* 属細菌による微生物多様性への影響評価に関する研究, 日本農芸化学会2006年度(平成18年度)大会, 2006.3

Iwasaki K., Yagi O.: Evaluation of the impact of genetically engineered microorganisms on microbial biodiversity, International Symposium on Environmental Biotechnology Leipzig 2006, 2006.6

岩崎一弘, 矢木修身: バイオレメディエーションの動向と重金属への適用, 環境資源工学会 第13回重金属等土壤汚染の現状と処理技術, 2006.9

松本純平, 浦川秀敏, 常田聡: 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, 第8回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」, 2005.3

Urakawa H., Matsumoto J., Tsuneda S.: DNA microarray-transcriptional profiling of *Nitrosomonas europaea* in response to linear alkylbenzene sulfonates, 11th International Symposium on Microbial Ecology, 2006.8

岩井祥子, 栗栖太, 春日郁朗, 古米弘明, 浦川秀敏, 八木修身: 土壤中のベンゼン酸化酵素遺伝子解析を目的としたマイクロアレイの開発, 第42回水環境学会シンポジウム, 2006.9

岩井祥子, 栗栖太, 春日郁朗, 古米弘明, 浦川秀敏, 八木修身: オリゴヌクレオチドマイクロアレイによる土壤中のベンゼン酸化酵素遺伝子解析, 第22回日本微生物生態学会, 2006.10

岩井祥子, 栗栖太, 春日郁朗, 古米弘明, 浦川秀敏, 八木修身: マイクロアレイによる土壤中ベンゼン酸化酵素遺伝子の網羅的検出, 第10回水環境学会年会, 2007.3

Iwai S., Kurisu F., Urakawa H., Kasuga I., Yagi O., Furumai H.: An oligonucleotide microarray for analysis of benzene oxygenase genes in soils, General meeting for American Society for Microbiology, 2007. 5

玉置雅紀: DNAアレイを用いた遺伝子発現プロファイルによる植物の環境ストレスモニタリング手法の開発, 環境バイオテクノロジー学会第22回シンポジウム, 2004.7

玉置雅紀, 松山崇, 中嶋信美, 青野光子, 久保明弘, 佐治光: DNAアレイ法を用いた植物の環境ストレス診断手法の開発, 日本植物学会第68回大会, 2004.9

Tamaoki M., Matsuyama T., Nakajima N., Aono M., Kubo A., Saji H.: A novel method for diagnosis of plant environmental stresses using a cDNA macroarray, The 6th International Symposium on Plant Responses to Air Pollution and Global Changes, 2004.10

高橋隼人, 玉置雅紀, 中嶋信美, 久保明弘, 青野光子, 鎌田博, 佐治光: シロイヌナズナにおける *GST3* 遺伝子の初期応答機構の解析, 日本植物生理学会2005年度年会, 2005.3

Tamaoki M., Takahashi H., Nakajima N., Aono M., Kubo A., Saji H.: Analysis of early response for Glutathione S-transferase 3 (*AtGST3*) expression in *Arabidopsis thaliana*, Plant Biology 2005, 2005.7

Yoshida S., Tamaoki M., Ogawa D., Aono M., Kubo A., Saji H., Kamada H., Nakajima N.: Protective action of salicylic acid and ethylene against ozone-induced leaf injury in *Arabidopsis*, 8th International Congress of Plant Molecular Biology, 2006.8

Nohara K., Ito T., Tohyama C.: Activation of arylhydrocarbon receptor (AhR) in T lineage cells inhibits cellular growth, DIOXIN 2004, 2004.9

- Sato C., Nohara K., Matsuda T., Kitajima K. : Involvement of the disialic acid-containing glycoprotein in mouse T cell activation, 第77回日本生化学会大会, 2004.10
- 伊藤智彦, 九十九伸一, 山本雅之, 本橋ほづみ, 鈴木教郎, 藤井義明, 三村純正, 遠山千春, 野原恵子: 活性化AhRによるT細胞への影響の分子メカニズム, フォーラム2004: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2004.10
- 野原恵子, 宮本芳美, 粟生佳奈, 伊藤智彦, 遠山千春: 血液リンパ球におけるAhレセプター依存性遺伝子発現誘導の動物種差の検討, 第27回日本分子生物学会年会, 2004.12
- 伊藤智彦, 長井治子, 遠山千春, 小林隆弘, 野原恵子: トキシコゲノミクスを利用したディーゼル排気微粒子の毒性メカニズムの解明, 第27回日本分子生物学会年会, 2004.12
- 長井治子, 遠山千春, 久保允人, 安部良, 野原恵子: TCDDによる抗体産生抑制の原因遺伝子の探索, 第27回日本分子生物学会年会, 2004.12
- 伊藤智彦, 遠山千春, 野原恵子: 活性化AhRによるT細胞増殖抑制へのXREの関与, 第4回分子予防環境医学研究会, 2004.12
- Ito T., Nagai H., Lin T., Peterson R. E., Tohyama C., Kobayashi T., Nohara K. : Gene expression changes in fetal thymus exposed to organic compounds extracted from diesel exhaust particles, Society of Toxicology: 2005 annual meeting, 2005.3
- Nohara K., Miyamoto Y., Ao K., Ito T., Tohyama C. : Comparison of the TCDD-induced CYP1A1 gene expression profile in lymphocytes from mice, rats and humans, Society of Toxicology: 2005 annual meeting, 2005.3
- 野原恵子, 長井治子, 伊藤智彦: ダイオキシンによる免疫毒性とアポトーシス, 第14回日本アポトーシス研究会学術集会, 2005.7
- 野原恵子: トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の免疫毒性評価法, 第12回日本免疫毒性学会学術大会, 2005.9
- 長井治子, 伊藤智彦, 遠山千春, 久保允人, 安部良, 野原恵子: ダイオキシン類による免疫細胞特異的な遺伝子発現変化, 第12回日本免疫毒性学会学術大会, 2005.9
- 野原恵子, 粟生佳奈, 宮本芳美, 鈴木武博, 松本みちよ, 遠山千春, 小林隆弘, 伊藤智彦: 胸腺萎縮を誘導する化学物質の作用経路の遺伝子発現変化からの探索, 第28回日本分子生物学会年会, 2005.12
- 高本沙代子, 伊藤智彦, 竹内陽子, 米元純三, 野原恵子: ダイオキシンに対する反応性の臓器特異性の検討, 第28回日本分子生物学会年会, 2005.12
- 長井治子, 久保允人, 安部良, 山本雅之, 野原恵子: 胸腺細胞のArylhydrocarbon receptorの活性化はFas/Fasリガンド非依存的に胸腺萎縮を誘導する, 第28回日本分子生物学会年会, 2005.12
- Nohara K., Ao K., Miyamoto Y., Tohyama C., Kobayashi T., Sato H., Ito T. : Distinctive gene expression patterns in thymuses exposed to atrophy-inducing chemicals, Society of Toxicology: 2006 annual meeting, 2006.3
- Ito T., Nohara K. : Search for genes involved in the growth inhibition of Jurkat T cells by a constitutively active arylhydrocarbon receptor, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006.6
- 鈴木武博, 野原恵子: TCDDによる動物種特異的毒性発現調節メカニズムに関する研究, シンポジウム「内・外環境と生物応答」, 2006.7
- 野原恵子, 粟生佳奈, 宮本芳美, 伊藤智彦, 井上薫, 潘小青, 本橋ほづみ, 山本雅之, 遠山千春: T細胞でのダイオキシン受容体(AhR)活性化が免疫反応に及ぼす作用の解明: T細胞特異的恒常的活性化型AhR Tgマウスを用いた解析, 第13回日本免疫毒性学会学術大会, 2006.9
- 伊藤智彦, 野原恵子: ダイオキシン曝露による胸腺DN細胞への遺伝子レベルでの影響, 第13回日本免疫毒性学会学術大会, 2006.9
- 野原恵子, 粟生佳奈, 宮本芳美, 伊藤智彦, 鈴木武博, 今泉慧, 田神一美, 遠山千春, 小林隆弘: ヒ素の免疫細胞特異的な作用メカニズム, 第6回分子予防環境医学研究会, 2006.12
- 鈴木武博, 野原恵子: ヒストンアセチル化に着目したマウスとヒトにおけるAhR依存的遺伝子発現調節のメカニズム, 第6回分子予防環境医学研究会, 2006.12
- Nohara K. : Activation of the transcription factor AhR in T cells causes suppression of the immunization-induced increase in splenocytes but does not suppress Th2-cytokine production, 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 2006.12

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告
SR - 77 - 2007

平成19年12月28日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会
発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川16番2
電話 029-850-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 朝日印刷株式会社
〒309-1117 茨城県筑西市向川澄82-1

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

December 2007

無断転載を禁じます