

7. 遺伝子解析手法を用いた環境ストレスの検出技術に関する基礎的研究

水循環研究グループ水質チーム

上席研究員	鈴木 穰
主任研究員	宮島 潔
専門研究員	山下尚之
専門研究員	東谷 忠

1. はじめに

近年、産業活動の拡大発展に伴い、様々な化学物質が広範囲に使用されている。我々の日常生活で消費される医薬品類や合成洗剤などの化学物質は、使用された後に下水道に流れ込むことから、下水処理水からも医薬品類など様々な化学物質の存在が報告されている¹⁻⁴⁾。そのため、下水処理水の放流先河川では、化学物質による水生生物への環境ストレスを生み出している可能性があり、その生物への影響が懸念される。水生生物におけるさまざまな環境ストレスを評価する手法として、生物の応答によってその程度を検出するバイオアッセイが行われているが、従来のバイオアッセイでは、生体における微妙な変化を検出することは困難である。一方、医学分野では、遺伝病の疾病因子を明らかにする研究が進んでおり、近年では、疾病遺伝子の発現状況をもとにした遺伝子診断が行われている。最近になって、この遺伝子解析手法を環境分野に適用して、生物個体への環境ストレスを遺伝子レベルで検出しようとする試みが進められている⁵⁻⁸⁾。

生体における遺伝子発現は、免疫反応に代表される生体防御や、生体の恒常性の維持など、外部環境の変化に対し速やかに起こるものと考えられる。遺伝子レベルで環境ストレスを検出し、その影響の程度を評価する手法を確立することは、今後の新たなバイオアッセイとして期待される。

本研究は、環境ストレスを遺伝子レベルで検出することを目的として、DNAマイクロアレイを用いた化学物質の影響評価について検討した。解析に用いたDNAチップとしては、ラン藻類*Synechocystis*属の遺伝子を搭載したCyano Chipを用い、医薬品類や界面活性剤等の化学物質による生物への影響について、遺伝子レベルで検出することを試みた。

2. 試験方法

2.1 藻類に対する曝露試験

曝露試験の供試藻類としては、ラン藻類*Synechocystis* sp. (PCC6803) を用いた。*Synechocystis* sp. は、ATCC (American Type Culture Collection) より購入し、BG-11 培地により継代培養を行った。培養を行っている*Synechocystis* sp. に対して、除草剤DCMU、抗生物質クラリスロマイシン (CAM)、陰イオン界面活性剤LAS、重金属Znおよび下水処理水 (STPサンプル) に関して、それぞれ曝露試験を実施した。曝露濃度としては、標準物質 (DCMU, CAM, LAS, Zn) については 1mg/L と設定した。また、STPサンプルには、下水処理水を固相抽出カートリッジGL-Pak PLS-2 (GL-Sciences) を用いて濃縮したものを用いた。カートリッジに捕集された成分はメタノールで溶出させ、メタノールをDMSOに置換した後に、*Synechocystis* sp. に曝露させた。STPサンプルの曝露濃度は、下水処理水原水の 10 倍濃縮の濃度とした。曝露試験には 50mL の三角フラスコを用い、曝露時間は 2 時間とした。曝露後は、速やかに濃度 15mg/L のNaHCO₃溶液により藻類の洗浄を行って曝露成分を取り除き、その後凍結保存を行った。また、化学物質による曝露と並行して、化学物質非曝露系のコントロールも同様な処理を行った。

2.2 DNA マイクロアレイを用いた発現遺伝子の解析

化学物質への曝露系および非曝露系の *Synechocystis sp.* 細胞より RNA の抽出を行った。抽出した全 RNA を鋳型として、逆転写反応により Cy3-dUTP (Amersham Bioscience) および Cy5-dUTP (Amersham Bioscience) で標識した蛍光標識 cDNA プローブを作成した。得られた cDNA プローブを精製した後、IntelliGene Cyano CHIP Ver. 2.0 (タカラバイオ) にハイブリダイゼーションを行った。この DNA チップには、*Synechocystis sp.* (PCC6803) のゲノム上に推測されているタンパク質コード領域のうち、ほぼ 95% に相当する約 2950 種類の DNA 断片がスライドガラス上に固定化されている。DNA チップのスポットは、Affymetrix 428 Array Scanner (Affymetrix 社) を用いてスキャニングを行った。Array Scanner によって得られた画像データは、ImaGene ver.4.2 (BioDiscovery 社) によって画像解析を行い、化学物質の曝露による遺伝子発現の解析を行った。

3. 結果および考察

3.1 抽出 RNA の分析

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析に先立ち、*Synechocystis sp.* 細胞より抽出された RNA の品質をチェックするため、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies 社) によりキャピラリー電気泳動を実施して RNA の測定を行った。Agilent 2100 Bioanalyzer は、約 5cm 画の小型チップ上で核酸の電気泳動と検出を同時に行うことが可能な装置である。本来実施されてきたアガロースゲル電気泳動と比較して、必要な RNA が少量で済むことや分析の作業が大幅に簡略化できるという利点がある。*Synechocystis sp.* 細胞から抽出された RNA の分析結果を図-1 に示す。図-1 には、非曝露系のコントロールと抗生物質 CAM、重金属 Zn で曝露した場合の RNA 測定結果をそれぞれ示す。

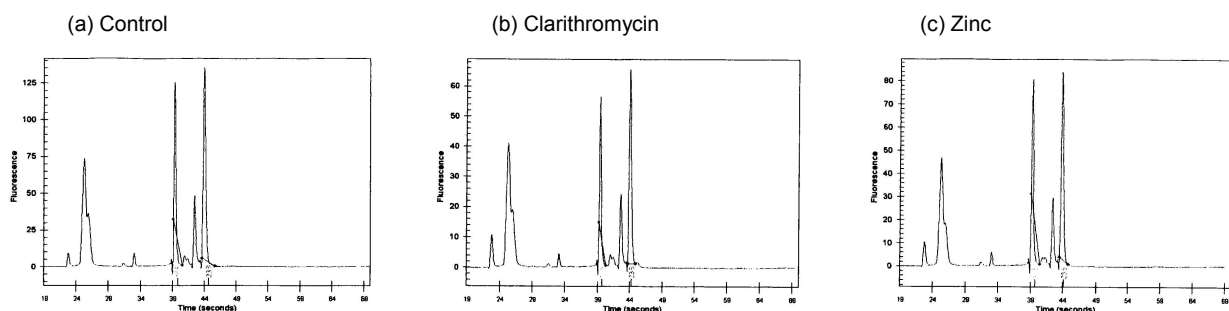


図-1 *Synechocystis sp.* 細胞から抽出された RNA の分析結果

図-1 より、*Synechocystis sp.* 細胞から抽出された RNA に関する分析の結果、原核生物の 16s および 23s リボソーム RNA のピークが検出されており、RNA の分解はあまり進んでいないことが分かる。抽出された RNA の分解が進んでいた場合には、分解物に由来したバックグラウンドが大きくなるが、図-1 では 2 本の明瞭なピークが検出されている。このことから、本試験で得られた RNA について、DNA マイクロアレイによる解析が可能であるものと考えられた。

3.2 Cyano CHIP を用いた遺伝子発現解析

ラン藻類 *Synechocystis sp.* に対して、除草剤 DCMU、抗生物質クラリスロマイシン、陰イオン界面活性剤 LAS、重金属 Zn および下水処理水 (STP サンプル) をそれぞれ曝露した場合における Cyano CHIP を用いた遺伝子発現解析の結果を図-2 に示す。図-2 において、X 軸の Cy3 シグナルは対照群 (コントロー

ル), Y 軸の Cy5 シグナルは実験群の強度をそれぞれ示している。また, 図中には, Cy3 と Cy5 のシグナル比が 1 : 1 のラインと, 2 : 1 もしくは 1 : 2 の場合の理論値をラインとして示している。

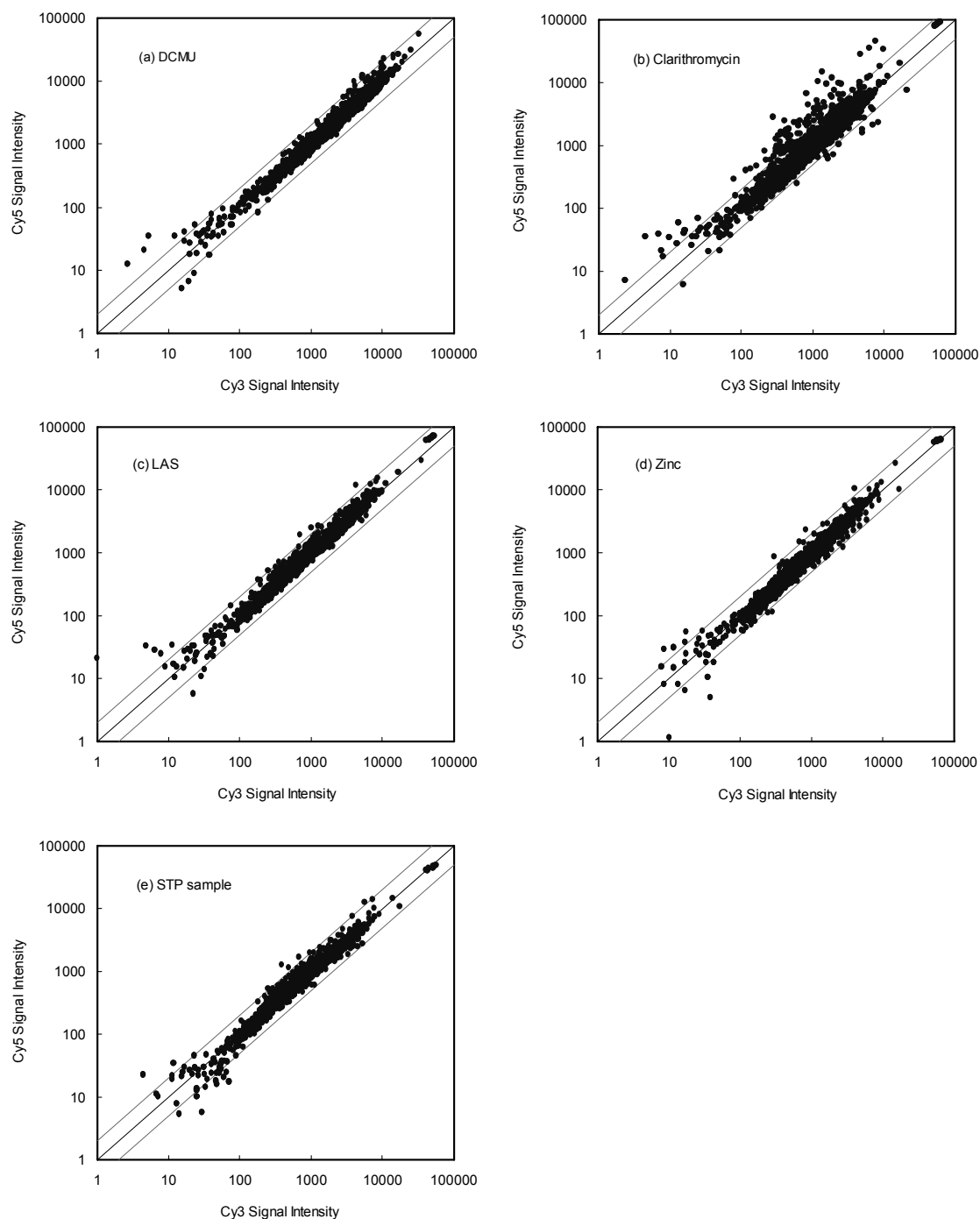


図-2 DNAチップを用いた *Synechocystis sp.* の遺伝子発現解析

本実験において, 対照群と実験群の遺伝子発現が同じである場合には, 1 : 1 のライン上に収束分布するはずであり, 図-2 において多くのプロットが 1 : 1 のライン付近に分布している。2 : 1 と 1 : 2 のライン間の領域には, 99%の確率でシグナルのバラツキ範囲と見なすことができ, 対照群と実験群のシグナルのプロットがこの範囲外にある場合には, 有意な発現差であると見なすことができる。図-2 において, DCMU, LAS, Zn, STP サンプルに関しては, 蛍光シグナルが小さいプロットを除いて, ほとんどのプ

ロットが 2 : 1 と 1 : 2 のライン間領域に入るという結果が得られた。このことから、これらの化学物質について本研究で行った条件では、遺伝子レベルで見た場合、ラン藻類 *Synechocystis sp.* に対して影響を与えないものと推察される。一方、抗生物質であるクラリスロマイシンに関しては、2 : 1 と 1 : 2 のライン間領域外のプロットも多く見られた。図-2 より Cy5 シグナル（実験群）の値が大きくなっているプロットが多いことから、クラリスロマイシンの曝露によって、いくつかの遺伝子発現が高まったと考えられる。クラリスロマイシンの曝露によって発現量に差が見られた遺伝子については、遺伝子の種類等について今後検討する必要があると考えられる。

4. まとめ

本研究は、環境ストレスを遺伝子レベルで検出することを目的として、DNA マイクロアレイを用いた化学物質の影響評価について検討した。解析に用いた DNA チップとしては、ラン藻類 *Synechocystis* 属の遺伝子を搭載した Cyano Chip を用い、医薬品類や界面活性剤等の化学物質による生物への影響について、遺伝子レベルで検出することを試みた。

Synechocystis sp. 細胞から抽出された RNA について分析を行った結果、原核生物の 16s および 23s リボソーム RNA の 2 本の明瞭なピークが検出され、DNA マイクロアレイに必要な RNA が分解されずに抽出されていることが確認された。また、ラン藻類 *Synechocystis sp.* に対して、除草剤 DCMU、抗生物質クラリスロマイシン、陰イオン界面活性剤 LAS、重金属 Zn および下水処理水（STP サンプル）を曝露し、DNA チップを用いて発現遺伝子の解析を行ったところ、DCMU、LAS、Zn、STP サンプルに関しては、あまり発現遺伝子の変動は見られなかった。一方、抗生物質クラリスロマイシンに関しては、実験群のサンプルに関して蛍光シグナルが大きくなるプロットが多く観察され、クラリスロマイシンの曝露によって、ラン藻類 *Synechocystis sp.* の遺伝子発現が高まることが推察された。

＜参考文献＞

- 1) Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M.: Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1549-1558, 1998
- 2) Boyd, G.R., Reemtsma, H., Grimm, D.A., Mitra, S.: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada, *Sci. Total Environ.*, 311, 135-149, 2003
- 3) Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P.: Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere*, 50, 1319-1330, 2003
- 4) Zuehlke, S., Duennbier, U., Heberer, T.: Determination of polar drug residues in sewage and surface water applying liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 76, 6548-6554, 2004
- 5) Momose, Y., Iwahashi, H.: Bioassay of cadmium using a DNA microarray: genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium, *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 2353-2360, 2001
- 6) Kitagawa, E., Momose, Y., Iwahashi, H.: Correlation of the structures of agricultural fungicides to gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to toxic doses, *Environ. Sci. Technol.*, 37, 2788-2793, 2003
- 7) Sirisattha, S., Momose, Y., Kitagawa, E., Iwahashi, H.: Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis, *Water Res.*, 38, 61-70, 2004
- 8) Sirisattha, S., Momose, Y., Kitagawa, E., Iwahashi, H.: Genomic profile of roundup treatment of yeast using DNA microarray analysis, *Environ. Sci.*, 11, 313-323, 2004