

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510095

研究課題名（和文） 残留性有機汚染物質の監視と汚染浄化におけるバイオサーファクタントの利用

研究課題名（英文） Use of Biosurfactants for Monitoring and Remediation of Persistent Organic Pollutants

研究代表者

大川 秀郎（OHKAWA HIDEO）

早稲田大学・先端科学・健康医療融合研究機構・研究員

研究者番号：90233048

研究成果の概要（和文）：哺乳類の生体機能の分子機構に基づき、ポリ塩化ビフェニル(PCB)などの簡便な生化学的測定方法を開発した。(1) アリル hidrocarbon 受容体(AhR)の組換え型を介したβ-グルクロニダーゼ(GUS)レポーター遺伝子発現系を導入した組換え体植物タバコとシロイヌナズナを作出して、それら組換え体植物を用いた PCB などの GUS アッセイを確立した。とりわけ、バイオサーファクタントの使用により PCB などの GUS アッセイ感度が向上した。(2) PCB に特異的なモノクローナルおよび組換え型抗体を調製して、それら抗体を用いたコプラナー-PCB 選択的な免疫測定(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)を確立した。

研究成果の概要（英文）：It was attempted to develop convenient polychlorinated biphenyls(PCBs) based on molecular mechanisms of biological functions in mammals. (1) Recombinant aryl hydrocarbon receptor(AhR)-mediated β-glucuronidase(GUS) reporter gene expression systems were each introduced into tobacco and biochemical assays of and *Arabidopsis* plants. The transgenic plants were developed for GUS assays of PCBs. Particularly, the use of biosurfactants improved GUS assay sensitivity of PCBs in the transgenic plants. (2) Monoclonal and recombinant antibodies specific to PCBs were prepared for development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays(ELISAs) of PCBs. The ELISAs selectively detected coplanar PCBs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,500,000	450,000	1,950,000
22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：①環境分析 ②有害化学物質 ③遺伝子組換え植物 ④バイオサーファクタント ⑤バイオモニタリング

1. 研究開始当初の背景：残留性有機汚染物質 (Persistent Organic Pollutants, PCBs)は脂溶性が高く、環境で安定で、水系の底質に集積して、食物連鎖を介して、最上位のヒトを含む哺乳類に生物濃縮される。とりわけ、体内の脂肪組織に高

濃度に蓄積して、母乳などを介して乳児に移行する。POPsのうち、ダイオキシン類、すなわち、ダイオキシン、ダイベンゾフランおよびコプラナーポリ塩化ビフェニル(Co-PCB)の環境汚染が広がっており、とりわけ、日本ではポリ塩化ビフ

ェニル(PCB)による汚染が著しい。ダイオキシン類は高分解能ガスクロマトグラフィ/マススペクトロメトリー(高分解能 GC/MS) を用いて分析されている。高分解能 GC/MS は感度・精度に優れているが、試料の前処理に時間が掛り、効率が悪く、しかも、経費が高い。ダイオキシン類には芳香環に結合する塩素の数と位置の異なる 209 種の同族体が存在する。それらのうち、哺乳類に対して最も高い毒性を示す 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)の毒性を 1 としたときの毒性等価係数(TEF)が 29 種の同族体で決まっている。そこで、高分解能 GC/MS で分析したおのおの同族体の量にそれら同族体の TEF を掛けた値の総和を毒性等量(TEQ)として表す。

2. 研究の目的：ある種のダイオキシン類同族体はヒトを含む哺乳類に毒性を示す。そこで、哺乳類の生体機能の分子機構に基づいた PCB などの簡便な生化学的測定方法の開発を試みた。哺乳類の体内にはアрилヒドロカーボン受容体(AhR)が存在し、ある種のダイオキシン類同族体はリガンドとして特異的に結合し、CYP1A1 遺伝子などを誘導発現する。また、ダイオキシン類同族体の AhR への結合親和性と毒性には相関性が認められる。そこで、AhR を介したβ-グルクロニダーゼ(GUS)レポーター遺伝子発現系を構築して、それを用いた PCB などの GUS アッセイの確立を試みた。それと共に、PCB などに特異的な免疫測定(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)の開発を目指した。
3. 方法：2, 3, 7 研究の, 8-TCDD に対する毒性の感受性の高いモルモット(g)、マウス(m)およびヒト(h)のおのおの AhR 遺伝子に基づいた組換え型 AhR 遺伝子を構築して、それらと共に GUS レポーター遺伝子を導入した組換え体植物タバコおよびシロイヌナズナを作出し、それらの組換え体植物を用いて、遺伝子組換え植物用温室において、バイオサーファクタントなどの存在下で、PCB 同族体などの GUS アッセイを試みた。タバコは組織培養苗を培地または土壌に移植し、また、シロイヌナズナは T4 種子を培地または土壌に播種して、一定期間後に、タバコの葉またはシロイヌナズナ植物全体の GUS 活性をアッセイした。、PCB に特異的なモノクローナルおよび組換え型抗体を調製して、Co-PCB などに選択的な ELISA の開発を試みた。

4. 研究成果：(1)組換え型 AhR を介した GUS レポーター遺伝子発現系を導入した組換え体植物による PCB 同族体の GUS アッセイ 組換え型 gAhR, mAhR および hAhR のおのおのを介した GUS レポーター遺伝子発現系を導入した組換え体植物タバコを作出して、PCB 同族体の GUS アッセイを比較した。その結果、gAhR が最も高い GUS 活性を示し、次いで、mAhR の GUS 活性が高く、hAhR の GUS 活性が最も低かった。そこで、組換え型 gAhR を介した GUS 遺伝子発現系をシロイヌナズナに導入して、組換え体シロイヌナズナを用いて、PCB 同族体の GUS アッセイを試みた。その結果、PCB126(TEF:0.1)は GUS 誘導活性を示したが、PCB80(TEF:0)は GUS 活性を誘導せず、PCB126 の GUS 活性誘導を抑制した。すなわち、PCB 同族体は TEF 依存的 GUS 誘導活性を示すことが判明し、PCB126 はアゴニストとして、また、PCB80 はアンタゴニストとして AhR に作用すると考えられる。さらに、バイオサーファクタント MEL-B の存在下では PCB126 による GUS 誘導活性が高くなり、アッセイ感度が向上することが判明した。MEL-B は PCB 同族体とミセルを形成して根からの受動拡散による取込みを促進したと考えられる。一方、POPs のうちの、有機塩素系殺虫剤デルドリンなどは AhR に対してアンタゴニストとして作用すること、また、有害重金属カドミウム(Cd)などは PCB 同族体の GUS 誘導活性を向上することなどから、これらの共汚染をアッセイすることができる。なお、組換え型 mAhR を介した GUS 遺伝子発現系を導入した組換え体植物タバコを遺伝子組換え植物用温室内において、ダイオキシン類実汚染土壌に栽培することにより、環境基準値 1,000pgTEQ をアッセイすることができた。なお、本遺伝子組換え体植物タバコおよびシロイヌナズナを用いた PCB 同族体の GUS アッセイは試料の前処理、すなわち、抽出、クリーンアップなどの操作をすることなく、多種・多様な多数の試料の簡便なスクリーニングに適している。また、本方法による GUS アッセイの結果は哺乳類における AhR への作用機構を反映している。組換え体植物タバコは組織培養苗の調整に時間が掛るが、葉の GUS 活性の測定でアッセイできる。それに比べて、組換え体植物シロイヌナズナは T4 種子を用いて、短期間に、一度に多数のアッセイをすることができる。

(2)PCB 特異的モノクローナルおよび組換え型抗体を用いた Co- PCB 選択的

ELISA Co-PCB 同族体に由来するハブテン抱合体をマウスに免疫することにより、PCP 特異的モノクローナル抗体の2種を取得した。これら2種のモノクローナル抗体を用いてPCB同族体のELISAを確立した。一方、2種の抗体産生細胞から相当する抗体遺伝子を取得して、単鎖可変領域抗体(組換え型抗体)を作製した。これらの組換え型抗体を用いてPCB同族体のELISAを確立した。いずれのELISAもCo-PCBを選択的に測定できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① K. Nishi, I-N. Kim, T. Tai, T. Sugahara, H. Takeyama and H. Ohkawa, Immunochromatographic assay of cadmium levels in oysters, *talanta*, 査読有、2012 in press.
- ② K. Gion, H. Inui, Y. Utani, S. Kodama and H. Ohkawa, Assays of PCB congeners and organochlorine insecticides with the transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants carrying recombinant guinea pig AhR and GUS reporter genes, *J. Environ. Sci. Health B*, 査読有、47, 599-607, 2012
- ③ H. Inui, K. Gion, Y. Utani, T. Wakai, S. Kodama, H. Eun, Y. Kim and H. Ohkawa, Assays of dioxins and dioxin-like compounds in actually contaminated soils using transgenic tobacco plants carrying a recombinant mouse aryl hydrocarbon receptor-mediated β -glucuronidase reporter gene expression system, *J. Environ. Sci. Health B*, 査読有、47, 59-65, 2012
- ④ H. Inui, T. Takeuchi, A. Uesugi, F. Doi, M. Takai, K. Nishi, S. Miyake and H. Ohkawa, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Monoclonal and Single-Chain Variable Fragment Antibodies Selective to Coplanar Polychlorinated Biphenyls, *J. Agric. Food Chem.*, 査読有、60, 1605-1612, 2012
- ⑤ S. Shimazu, H. Inui and H. Ohkawa, Phytomonitoring and Phytoremediation of Agrochemicals and Related Compounds Based on Recombinant Cytochrome P450s and Aryl Hydrocarbon Receptors (AhRs), *J. Agric. Food Chem.*, 査読有、59, 2870-2875, 2011
- ⑥ S. Shimazu, M. Ohta, H. Inui, Y. Nanasato, H. Ashida, and H. Ohkawa,

Effects of biosurfactants on assays of PCB congeners in transgenic *Arabidopsis* carrying a recombinant guinea pig AhR-mediated GUS reporter gene expression system, *J. Environ. Sci. Health B*, 査読有、45, 750-756, 2010

- ⑦ S. Shimazu, Y. Kawabata, A. Inayoshi, H. Inui, H. Ashida and H. Ohkawa, Recombinant human AhR-mediated GUS reporter gene assays for PCB congeners in transgenic tobacco plants in comparison with recombinant mouse and guinea pig AhRs, *J. Environ. Sci. Health B*, 査読有、45, 741-749, 2010

[学会発表] (計5件)

- ① 嶋津小百合、太田雅也、大川秀郎、芦田均、組換え体シロイヌナズナを用いたPCB同族体と重金属の共汚染のファイトモニタリング、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学、京都市
- ② S. Shimazu, M. Ohta, H. Inui, H. Ashida and H. Ohkawa, Assay of PCB congeners in transgenic *Arabidopsis* plants with recombinant guinea pig AhR-mediated GUS reporter gene system, PACIFICHEM 2010, December 15-20, 2010, Honolulu, Hawaii, USA
- ③ S. Shimazu, Y. Kiyoshi, M. Masahiko and H. Ohkawa, Immunochromatography of cadmium in environmental water, PACIFICHEM 2010, December 15-20, 2010, Honolulu, Hawaii, USA
- ④ H. Ohkawa, Phytoremediation and Phytomonitoring Based on Recombinant P450s and AhRs, 10th P450 Biodiversity and Biotechnology, October 3-7, 2010, Woods Hole, USA
- ⑤ H. Ohkawa, Phytomonitoring and phytoremediation of agrochemicals and related compounds based on recombinant P450s and AhRs, American Chemical Society 239th National Meeting and Exposition, March 21-25, 2010, San Francisco, California, USA

[図書] (計1件)

- ① 大川秀郎、乾秀之、嶋津小百合、残留農薬のファイトレメディエーションとポリ塩化ビフェニル(PCB)などのファイトモニタリング、P. 92-99、植物機能のポテンシャルを活かした環境保全・浄化技術、監修 池道彦、平田和正、シーエムシー出版、2011

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大川 秀郎 (OHKAWA HIDEO)

早稲田大学・先端科学・健康医療融合研究機構・研究員

研究者番号：90233048

(2) 研究分担者

太田 雅也 (OHTA MASAYA)

福山大学・生命工学部・教授

研究者番号：00203802

(3) 連携研究者

竹山 春子 (TAKEYAMA HAROKO)

早稲田大学・理工学術院先進理工学部・教授

研究者番号：60262234