

平成21年 5月10日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：平成18年～20年度

課題番号：18310048

研究課題名（和文）線虫のエコトキシコゲノミクス

研究課題名（英文） Ecotoxicogenomics using *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

富永 伸明 (TOMINAGA NOBUAKI)

有明工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号：30227631

研究成果の概要：毒性・繁殖等の個体レベルの影響評価および DNA マイクロアレイをはじめとした分子レベルの影響評価が可能な生物である線虫をモデル生物として環境化学物質の影響を多様な手法で調査し、得られた影響評価結果を結び付けたエコトキシコゲノミクスの基盤を作ることができた。また、インフォマティクスを駆使することで線虫によって観察された化学物質の生物影響からヒトをはじめとした他の生物に対する影響が推定できる可能性も示すことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：環境生物化学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：エコトキシコゲノミクス, 線虫, *C. elegans*, マイクロアレイ, CYP

## 1. 研究開始当初の背景

化学物質による環境汚染が社会的に深刻な問題となっている。中でも近年になって極微量の化学物質が生物に種々影響を与え、影響を發揮する経路も複雑であることが明らかになってきた。また、環境に存在する化学物質の多様性を考え合わせると環境中に存在する化学物質の影響は生態系に及ぼすインパクトとして評価する必要性が高くなっている。最近、土壌汚染で判明するケースが顕著であるが、汚染が長期にわたって放置されていることがあり、比較的微量ではあるが長期にわたってヒトをはじめとして生物が汚染物質に暴露されている可能性がある

事例が明らかになっている。そのような立場からは、生物に微量汚染物質が与える影響を明らかにし、その影響を早期に知り、対処を行うことが最も重要なこととなる。しかしながら、生態系には多数の生物が存在するため全ての生物における影響を実際に評価することはできない。また、客観的・効果的に評価するために、多様な生物に対する化学物質の影響を分子レベルで研究している例は極めて少ない。そこで、モデル生物での評価結果を多様な生物種に外挿し、予想される影響およびメカニズムを推定することは、化学物質の安全性に対する正しい認識と安全管理という点でも非常に意義があるものと考え

られる。

## 2. 研究の目的

本研究は、化学物質の持つ生態系に対する影響を効率よく、より客観的に評価できるシステムを構築する事を目的とする。すなわち、モデル生物に生物学、分子生物学的性質が最も明らかになっている線虫 (*C. elegans*) を用い、重金属等が及ぼす影響を例として毒性学、生化学、分子生物学的に多角的に明らかにし、毒性発現に対する詳細なメカニズムを解析する手法を確立する。また、バイオインフォマティクスによるヒトを含めた高等生物および生態系の生物に対する化学物質の影響を種間を越えて外挿することを可能にする解析手法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)化学物質の毒性試験—線虫を同調培養し、得られた幼齢線虫を用いて 24, 48 時間後の致死を調査し、急性毒性試験及び行った。また、化学物質暴露による成長速度の遅延、繁殖数の低下を 3 から 5 世代にわたり測定し、評価した。

(2)体内取り込み量測定—種々濃度の PFCs を含む液体培地に 24, 48, 72 時間曝露した線虫を回収し、冷凍した。線虫から、化合物を抽出し、8:2 FTOH は GC-MS, PFOA は LC-MS を用いて体内取り込み量及び含量を計測した。

(3)DNA マイクロアレイによる遺伝子発現測定—大量同調培養した線虫 L2,3 期幼虫に化学物質を経時的に暴露した後、回収し、RNA を抽出した。mRNA を精製後、蛍光ラベル cDNA を作製し、重金属応答遺伝子として同定してきた遺伝子のみを搭載した合成オリゴ DNA マイクロアレイあるいは CYP カスタム DNA マイクロアレイにハイブリダイズし、遺伝子の発現変動を調査した。

(4)二次元電気泳動—前項と同様に暴露した線虫を可溶化し、1次元目に IEF, 2次元目に SDS-PAGE の二次元電気泳動を行い、銀染色した。

(5)エコトキシコロジカルインフォマティクス—遺伝子発現データをデータベース化し、データ群をグラフィカルモデリング、ガウジアンモデリング及び自己組織化マップ等の統計学的なモデリング手法を用いて遺伝子マップを作成した。

## 4. 研究成果

(1)化学物質の毒性試験—新規残留性有機化合物として注目される有機フッ素化合物を

モデル化合物として調査した結果を示す。有機フッ素化合物は、線虫に対して急性毒性を示さないが、繁殖に対しては影響を及ぼすことを明らかにすることができた。中でも、PFOA や PFOS のような酸体が影響は強く、その一方で多くは原料として使用されているアルコール体化合物は相対的に影響が弱いことが分かった(Fig. 1)。特に卵の受精率について注目したところ、PFOA 暴露群は未受精卵の割合が上昇することから、受精率を低下させることがわかり、精子形成に影響を及ぼす可能性が高いことが示唆された(Fig. 2)。

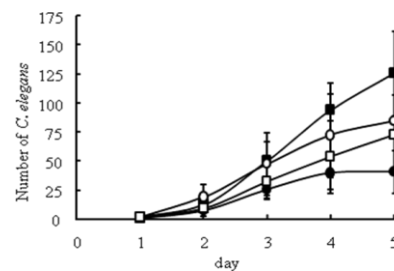


Fig. 1 Effect of 100  $\mu$ M PFCs treatment on the fecundity of number of *C. elegans* at the 3rd generation

■ : Control, □ : 6:2 FTOH, ○ : 8:2 FTOH, ● : PFOA

\* : The result of difference in  $p < 0.05$  probability for the Control of the 3rd generation

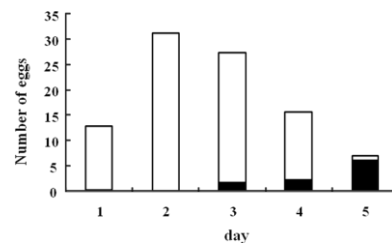


Fig. 2 Fertilized eggs and no fertilized eggs number of 100  $\mu$ M PFOA treated *C. elegans* at the 3rd generation

□ : fertilized eggs, ■ : non-fertilized eggs

(2)体内動態—線虫に対する有機フッ素化合物の取り込みについて検討を行った。その結果、これら化合物は線虫体内に取り込まれ、さらにアルコール体はカルボキシル体に代謝変換されており、哺乳類と同様に代謝されることを明らかにすることができた。

(3)DNA マイクロアレイによる遺伝子発現変動測定—遺伝子発現変動について DNA マイクロアレイを用いて調査した。重金属において、多くの遺伝子の発現変動が確認されていたが、発現変動遺伝子を選択して解析することで、高感度に検出可能であることが示唆さ

れた。また、変動遺伝子の中に CYP 遺伝子ファミリーの特定遺伝子の発現変動が認められた。CYP は広く異物代謝にかかわる酵素であり、生物中に広く同定されていることから、多くの生物影響を推定するためには有効なバイオマーカーになると考えた。そこで、線虫 CYP 遺伝子カスタム DNA マイクロアレイを用い、化学物質の生物影響を評価することにしたところ、ヒト CYP のサブタイプ特異的誘導剤は、線虫の CYP サブタイプも特異的に発現誘導をもたらすことが分かった。例えば、3-メチルコラントレン(3-MC)は、線虫 CYP の 35 サブタイプの分子種の発現を大きく、また、13, 33, 34, 36 分子種も誘導することが分かった(Table 1)。

PFOS およびテロマーアルコールによって線虫で誘導される CYP 分子種は CYP13A のサブファミリーであることが分かり、PFOS によって最も多くの遺伝子の発現が誘導された。誘導された CYP13A ファミリーは、ヒト CYP3A4 誘導剤リファンピシリンでも誘導されることから、線虫とヒト CYP 分子種の化学物質による発現誘導の応答性に相関性がある可能性は高い。体内動態調査で、取り込まれたテロマーアルコールは、体内でカルボキシル体に代謝されたことが確認できたことから、化合物が CYP によって代謝されていることは確実であり、線虫におけるデータが他の生物に対する影響と共通性が高いことを示すことができた。

Table 1. Result of 3-MC exposure

CYP1A inducer 3-MC		5.0 mg/L 24hr exposure	
Gene name	Cy5/Cy3	Gene name	Cy5/Cy3
CYP13A1	4.79	CYP33E3	2.43
CYP13A3	8.17	CYP34A1	7.19
CYP13A4	2.20	CYP34A4	2.47
CYP13A5	6.90	CYP34A5	5.95
CYP13A7	8.92	CYP34A7	4.75
CYP13A10	4.14	CYP34A8	2.43
CYP13A12	5.53	CYP34A9	5.86
CYP13B1	3.32	CYP35A1	12.03
CYP14A4	2.25	CYP35A2	12.84
CYP14A5	3.85	CYP35A3	8.31
CYP25A4	5.08	CYP35A4	12.70
CYP29A2	5.59	CYP35A5	8.01
CYP29A3	3.30	CYP35B1	2.62
CYP29A4	2.31	CYP35B2	4.63
CYP31A4	4.73	CYP35B3	2.70
CYP33C1	6.46	CYP35C1	15.38
CYP33C4	4.19	CYP35D1	3.16
CYP33C10	8.01	CYP36A1	7.54
CYP33D1	2.34	CYP37B1	5.62
CYP33E2	4.13	CYP43A	3.56

(4)エコトキシコロジーカルインフォマティクス—上述のマイクロアレイのデータを利用して、インフォマティクスの開発を行った。重金属データをクラスター解析することで、

化学物質はセンシングできることを示すことができた。また、グラフィカルガウジアンモデリング法をいくつかの既知代謝経路遺伝子群に対して適用したところ、化学物質特異的な遺伝子発現の相関がみられることがわかり、これらの手法をマイクロアレイデータに適用することで高感度に化学物質のセンシングが可能であることを示すことができた。

一方、線虫から得られた化学物質の生物影響を環境中の多様な生物の影響に外挿の可能性について Torus 自己組織化マップ法を適用し、検討した。Fig. 3 に CYP 遺伝子ファミリーのヒト CYP サブタイプ特異的誘導剤による線虫 CYP ファミリーサブタイプの遺伝子の発現変動データをもとにしたマップおよび既報のヒトの CYP ファミリーの発現変動データをもとにしたマップを示す。多次元解析を平面マップに変換することが可能になり、それぞれ特異的な発現上昇あるいは減少を示す CYP 分子種の島が存在することが分かった。このことは、線虫とヒトの間に類似挙動を示す CYP 分子種が存在することを明確にするものである。このことは、これら遺伝子発現変動マップの相関を明らかにすることで、線虫の化学物質暴露による CYP ファミリー分子種の発現変動データからヒトの CYP ファミリー分子種の変動が推定できる可能性があることを示唆するものである。

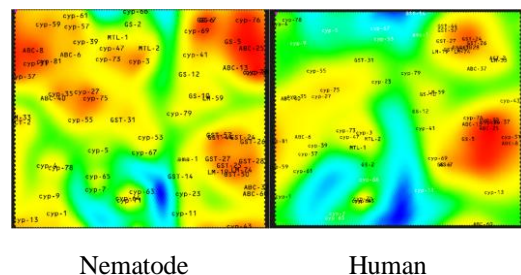


Fig. 3 Gene expression maps of *C. elegans* and human by using Torus self-organization mapping method.

(5)まとめ—線虫は、毒性・繁殖等の個体レベルの影響評価および DNA マイクロアレイをはじめとした分子レベルの影響評価が可能な生物である。本研究課題では、線虫をモデル生物として環境化学物質の影響を多様な手法で調査し、得られた影響評価結果を有機的に結び付けることができ、線虫をモデルとしたエコトキシコゲノミクスの基盤を作ることができた。また、インフォマティクスを駆使することで線虫のデータをもとにヒトをはじめとした他の生物に対する影響が外挿できる可能性も示すことができた。さらに、データの蓄積および多様な生物に対するより正確な相関性を見出し、それを容易に結び付けるインフォマティクスの開発を行うこ

とで、多様な生物に対する環境化学物質の影響を評価する容易な方法へ発展させることができる」と期待され、社会の安全・安心に寄与するものと考えられる。

#### 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 6 件)

N. Tominaga et. al., Sensing of heavy metals using *Caenorhabditis elegans* DNA microarray, Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry-Biological Responses to Chemical Pollutants, 2008, 155-161

N. Tominaga, Development of ecotoxicogenomics using *Caenorhabditis elegans*, Molecular & Cellular Toxicology, 3(4), 2007, 34

T. Matsuno et. al., Graphical Gaussian modeling for gene association structures based on expression deviation patterns induced by various chemical stimuli, IEICE Trans. Inf. & Syst., E89-D(4), 2006, 1563-1574.

〔学会発表〕(計 11 件)

井口 綾子 他, 線虫 *C. elegans* における有機フッ素化合物及びテロマーアルコールの影響, 第 11 回日本環境ホルモン学会研究発表会, 12/2008, 東京

R. Furukawa et. al., Comparison of toxicities of perfluorooctanoic acid and perfluorodecanol using various biological effect on nematode *C. elegans*, 環境トキシコロジーシンポジウム, 熊本

N. Tominaga et. al., Ecotoxicological usage of *Caenorhabditis elegans* DNA microarray, International Symposium on Biological responses to Chemical pollutants, 3/7/2008, 松山

N. Tominaga et. al., Effects of organophosphorus pesticides on reproduction of nematode *C. elegans*, 日本環境ホルモン学会第 10 回研究発表会, 12/10/2007, 大宮

古川 累 他, Telomer alcohol の線虫 *C. elegans* による生物影響評価, 日本環境毒性学会, 9/15/2007, 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

富永 伸明 (TOMINAGA NOBUAKI)

有明工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号: 30227631

##### (2) 研究分担者

松野 哲也 (MATSUNO TETSUYA)

有明工業高等専門学校・電子情報工学科・准教授

研究者番号: 80243921

有菌 幸司 (ARIZONO KOJI)

熊本県立大学・環境共生学部・教授

研究者番号: 70128148

高良 真也 (KOHRA SHINYA)

長崎大学・環境科学部・教授

研究者番号: 40225389

##### (3) 連携研究者

無