

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580366

研究課題名(和文) ダイオキシン類汚染環境評価のためのファイトモニタリングシステムの構築

研究課題名(英文) Construction of phytomonitoring systems for risk assessment of dioxins polluted environment.

研究代表者

其木 茂則 (SONOKI SHIGENORI)

麻布大学・環境保健学部・教授

研究者番号：50130894

研究成果の概要(和文)：地球規模での環境汚染が深刻化しているダイオキシン類の高精度分析には、ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)という高度な分析機器が最適であるが、本装置は高額である上に高度な操作技術が必要とされる。そこで、GC-MS法の代替法として、ダイオキシン類暴露に発現応答する植物遺伝子に着目して、この遺伝子発現を指標としたダイオキシン類の簡便、安価な汚染モニタリング法の開発につながる基礎研究を行った。

研究成果の概要(英文)：The environmental toxicity of dioxins is becoming more severe especially in Japan. The precise quantitative analysis of pollution levels of dioxins has been performed using a gas chromatograph - mass spectrometry; however, this technique has the disadvantage of a high cost or a highly educated skill. In this study, the development of bioassay system for dioxins using dioxins-response genes found in the plant genome was proposed to investigate its efficiency for risk assessment of dioxins contamination. This bioassay system will be expected to be a good substitution for the instrumental analysis as the first step simple analysis method of dioxins in the environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010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：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境汚染、環境モニタリング

1. 研究開始当初の背景

化学物質の影響が人間より前に野生動物に出現する事例がこれまでに幾つか報

告されている。よって、自然界の生物を調査研究することは、人の健康への環境影響を予見するという観点から重要であ

る。特に、ダイオキシン類をはじめとする有機塩素系化学物質は、生物濃縮により食物連鎖の高次にある人を含めた哺乳類などに、世代を越えて長期間にわたり悪影響を及ぼすと考えられていることから、ダイオキシン類の野生生物への影響を評価することは、人への健康影響を評価する上で重要であると考えられる。このような観点から、我が国では平成10年度より鳥類、魚介類、ほ乳類など野生生物のダイオキシン類汚染状況の本格的な調査を実施してきた。しかし、これまでの生物モニタリング法における実際のダイオキシン類分析には高分解能質量検出器付きガスクロマトグラフ (GC-MS) 法が採用されており、精度、感度の面では最適な分析法ではあるが使用上の様々な制約が生じる。また、酵母、ヒト培養細胞、魚類などを用いたバイオアッセイ法は熟練した技術と特殊な装置が必要となり、また魚類は生育と維持に時間と費用がかかるといった難点がある。このことから、最終的なダイオキシン類分析には高精度な GC-MS 法が必須であるにしても、まず、その環境におけるダイオキシン類汚染の有無、大まかな汚染の程度をもっと低コスト、低環境負荷でかつ簡便な方法でモニタリングできれば、今以上に手軽に、また頻度良くきめの細かいダイオキシン分析が可能となると期待できることから、今回の「ファイトモニタリングシステムの構築」に考えが到った。

これまで、モデル植物としてシロイヌナズナを用い、またダイオキシン類としては毒性の最も強い 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (TCDD) と日本での高濃度汚染が特に指摘されているコプラナーPCBs 同族体、その一つである 3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニール (PCB126) をモデル化合物として用いて、cDNA マイクロアレイ法で PCB126、TCDD 暴露により発現が変動 (促進あるいは抑制) する遺伝子を網羅的に解析した結果、発

現促進遺伝子として約 100 個、発現抑制遺伝子として約 350 個の遺伝子が見出された (S.Sonoki et al., *Organohalogen Compounds* 67, 54-56, 2005)。その発現促進遺伝子の中には、環境汚染化学物質の代謝への関与が指摘されているチトクローム P450 (CYP)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、パーオキシダーゼ (PO) が含まれており、さらに、GST のアイソフォーム At1g17180 について、その発現調節領域 (1,367bp) にレポーター遺伝子を連結させた配列をタバコ培養細胞 BY-2 のゲノムに導入した形質転換体を作成し、これに PCB126 を暴露した所、レポーター遺伝子の発現が観察された。この事は、シロイヌナズナの PCB126 応答性発現促進遺伝子の発現調節領域が、異種植物タバコ培養細胞 BY-2 中でも機能することを示しており、よって形質転換タバコ培養細胞 BY-2 を用いるダイオキシン類ファイトモニタリングキットの開発に繋がるものと期待される。

2. 研究の目的

内分泌かく乱物質としてのダイオキシン類の環境汚染が大きな社会問題となっている。これらダイオキシン類を汚染環境から速やかに除去することが急務であるが、それにはまず汚染濃度を正確に測定する必要がある。そのためには現在までの所、GC-MS を使用する方法が最良であるが、この機器は高価である上に、分析に時間と費用がかかり、また高度な操作技術を要するという難点がある。よって本研究では、この GC-MS 法に代わる簡便なダイオキシン類汚染の一次検出法として、ダイオキシン類暴露によりその発現が促進あるいは抑制される植物遺伝子をダイオキシン類汚染のモニタリング用遺伝子として用いる新規なファイトモニタリングシステムの構築を目指した。具体的には、これまで見出されたダイオキシン類暴露により発現変動するシロイヌナ

ズナ遺伝子を整理し、その中から発現特異性の高いものを選抜し、それら遺伝子の上流領域、いわゆる発現調節領域をクローニングし、その下流にオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)と大腸菌由来のβ-グルクロニダーゼ遺伝子(GUS)をレポーター遺伝子として接続した植物形質転換ベクターを構築する。このベクターを用いて、タバコ培養細胞BY-2を形質転換し、この形質転換体を用いて、in vitroでレポーター遺伝子の発現を指標にしたダイオキシン類検出システムを確立する。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナの育成法。シロイヌナズナの種子を70%エタノール、2%次亜塩素酸ナトリウムを用いて滅菌した後、MS寒天培地(0.44%ムラシゲ・スクーグ培地、1%ショ糖、0.2%ゲルライト、pH 5.7)に播種し、26℃、長日条件下(明期16時間、暗期8時間)で7日間生育させた。7日間生育させた芽生えを液体MS培地150mlに移し替え、これを100rpmで振盪しながら26℃、長日条件下でさらに9日間生育させた。

(2) ダイオキシン類曝露と総RNA抽出。PCB126、TCDD、ビフェニルをそれぞれ終濃度5ng/mlでシロイヌナズナ液体MS培地に添加し、2時間および48時間曝露後、RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)で総RNAを抽出した。

(3) cDNA調製とリアルタイムRT-PCR。総RNA(50ng以上)を鋳型として、oligo-dTプライマー、dNTP Mixtureを基質にして、逆転写酵素 Super Script III RTを用いて50℃で60分間、70℃で15分間反応させcDNAを調製した。リアルタイムRT-PCRにはサイバークリーン法を用いた。cDNAを鋳型にして、SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)、プライマーを加えた後、7500 Fast Real time PCR (Applied Biosystems)を用いて、95℃ 5秒、60℃ 40秒、を1サイクルの反応条件として、40サイクル反応で定量を行った。

(4) ダイオキシン類曝露による発現促進性遺伝子のプロモーター領域のクローニング。ラムダファージゲノムの大腸菌ゲノムへの「組込み」と「切り出し」にかかわる部位特異的組換え反応を基礎とした Gateway テクノロジー (Invitrogen) を用いた。

① シロイヌナズナゲノムのPCR。シロイヌナズナDNAを鋳型として、Gateway テクノロジー用プライマー、Prime Star DNA ポリメラーゼを加えたのち、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用いてPCRを行った。反応条件は98℃で3分間を1サイクル行い、98℃で10秒間の熱変性、55℃で5秒間のアニーリング反応、72℃で10秒間の伸長反応、これらを1サイクルとしてこのサイクルを35サイクル行った。最後に72℃で1分間の伸長反応を1サイクル行った。

② DNAフラグメント抽出。①で得たPCR産物をアガロースゲルにて電気泳動を行い、目的のバンドの部分のみをカッターナイフの刃で切り取り、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いてDNAフラグメントの抽出を行った。

③ Gateway テクノロジーによるエンタリークローンの作成と大腸菌の形質転換。Invitrogen社のマニュアルに従い、attB配列が付与したDNA断片とattP配列を持つドナーベクター(pDONRベクター221)間でBP Clonase IIを用いて、25℃、16時間反応でBP組み換え反応を行い、エンタリークローンを作製した。この反応溶液を大腸菌コンピテントセルDH10B-FT (GIBCO)に加えて30分間氷上に放置し、42℃で40秒間熱処理を行った後、2分間再び氷上に放置した。次にSOC培地(2%バクトトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.05%NaCl、0.02M MgCl₂・6H₂O、0.02M グルコース)を加え、37℃で1時間インキュベーションを行った。この溶液を終濃度100μg/mlのカナマイシン含有のLB寒天培地に白金耳を用いてプレート全体に均一に塗抹し、37℃で16時間インキュベーションを行い、形質転換体を獲得した。

④ Gateway テクノロジーによる植物形質転換

用クローンの作成と大腸菌の形質転換。 図1に示したように、③で調製した attL 配列を持つエントリークローンと、attR 配列を持つデスティネーションベクター (pHGWS7.0) 間で LR Clonase を用いて、25 °C、16 時間反応で LR 組み換え反応を行い、植物形質転換用クローンを作製した。この反応溶液を大腸菌コンピテントセル DH10B-FT(GIBCO)に加えて 30 分間氷上に放置し、42°Cで 40 秒間熱処理を行った後、2 分間再び氷上に放置した。次に SOC 培地を加え、37 °Cで 1 時間インキュベートを行った。この溶液を終濃度 100 μ g/ml のスペクチノマイシン含有の LB 寒天培地に白金耳を用いてプレート全体に均一に塗抹し、37 °Cで 16 時間インキュベートを行い、形質転換体を獲得した。

(5) アグロバクテリウム法によるタバコ培養細胞 BY-2 の形質転換。

①植物形質転換用クローンによるアグロバクテリウムの形質転換。 Agrobacterium tumefaciens LBA4404 Electro-Cells(コンピテントセル)と (4) ④で調製した植物形質転換用クローンを氷上で緩やかに混和した後、Gene Pulser II (Bio-Rad)を用いたエレクトロポレーション法により、植物形質転換用ベクターを A. tumefaciens LBA4404 内に導入した。エレクトロポレーションキュベットには 0.1 cm キュベットを用い、Gene Pulser II のパルス条件を 25 μ F、200 Ω 、2.5 kV に設定した。パルス終了後の混合液の入った 0.1 cm エレクトロポレーションキュベットに SOC 培地を加えて緩やかに混和した後、26 °Cで 2 時間振とう培養を行った。振とう培養後、スペクチノマイシン(100 μ g/ml)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml)を加えた LB 寒天培地に播種し、26 °Cで 48 時間培養を行い、アグロバクテリウムの形質転換体を獲得した。

②タバコ培養細胞 BY-2 の形質転換体の作出。 4 日間培養したタバコ培養細胞 BY-2 にスペクチノマイシン(100 μ g/ml)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml)含有 LB 液体培地で 2 日間振とう培養したアグロバクテリウム形質転換体 (A_{660nm} = ca. 0.3) を加え、さらに 2 日間

振とう培養を行った。この 2 日間振とう培養を行ったタバコ培養細胞 BY-2 を、ハイグロマイシン (100 μ g/ml)、クラフォラン (500 μ g/ml)を加えた液体 LSD 培地で十分に洗浄した後、同様の抗生物質入り LSD 培地(50 ml)に移し、さらに 26 °Cで 5 日間振とう培養を行った。5 日間振とう培養後タバコ培養細胞 BY-2 を回収し、適量に希釈した後、ハイグロマイシン(100 μ g/ml)、クラフォラン (500 μ g/ml)を加えた LSD 寒天培地に播種した。26 °Cで 3 週間から 1 ヶ月間培養することで、タバコ培養細胞 BY-2 の形質転換体が獲得できた。

③タバコ BY-2 形質転換体ゲノムへのプロモーター領域導入の確認。 タバコ BY-2 形質転換体からのゲノム DNA 抽出には DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を使用した。タバコ BY-2 形質転換体のゲノム DNA を鋳型として、Gateway テクノロジー用プライマー、Prime Star DNA ポリメラーゼを加えたのち、GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems)を用いて PCR を行った。反応条件は 98 °Cで 3 分間を 1 サイクル行い、98 °Cで 10 秒間の熱変性、60 °Cで 5 秒間のアニーリング反応、72 °Cで 10 秒間の伸長反応、これらを 1 サイクルとしてこのサイクルを 35 サイクル行った。最後に 72 °Cで 1 分間の伸長反応を 1 サイクル行った。この PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認した。

(6) タバコ BY-2 形質転換体の PCB126 暴露によるレポーター遺伝子発現。

①形質転換体の PCB126 暴露法。 液体培養細胞暴露方法は、ハイグロマイシン (100 μ g/ml)、クラフォラン (500 μ g/ml) 含有 LSD 培地に超音波振動をかけながら PCB126 を 5ng/ml または 10ng/ml になるように加え、これに 3 ~ 4 日培養のタバコ BY-2 形質転換体を加えて、26°Cで振とう培養を行った。個体培養細胞暴露方法は、ハイグロマイシン (100 μ g/ml)、クラフォラン (500 μ g/ml) 含有 LSD 培地に PCB126 を 5ng/ml または 10ng/ml になるように加え、その後、140°C、2 時間乾熱滅菌したガラス製のシャーレに約

30ml ずつ撒いて、PCB126 入りの固形培地を作成しておき、これに継体培養しているタバコ BY-2 形質転換体のカルス断片を置いて 26°C で培養を行った。

②レポーター遺伝子発現の検出。

液体培養細胞暴露試験の場合は、PCB126 を暴露させたタバコ BY-2 形質転換体懸濁液 1ml をエッペンドルフチューブに取り出し、1,000rpm、5 分間の遠心で上澄みを除いた後、GUS 染色用バッファー溶液 950 μ l、X-Gluc (5-ブromo-4-クロロ-3-インドールグルクロニド(10.4mg/1ml)) 50 μ l、10%のトリトン X 10 μ l を細胞が浸るように加えて、37°C で静置し、24 時間から 1 週間肉眼で GUS 発色観察を行った。個体培養細胞暴露試験の場合は、PCB126 暴露させたカルス断片をエッペンドルフチューブに移し、液体培養細胞暴露試験と同様の GUS 染色用混合溶液を加え、37°C で静置し、24 時間から 1 週間肉眼で GUS 発色観察を行った。GUS 染色用バッファー溶液の調製方法は、1 mol/L のリン酸バッファー (pH7.0) 2ml、EDTA 溶液 (0.25 mol/L pH7.0) 0.8ml、フェリシアンカリウム (mw=329.25) 3.3mg、フェロシアンカリウム (mw=422.39) 4.2mg をそれぞれ混合し、19ml になるように蒸留水であわせた後、950 μ l ずつフィルター滅菌しエッペンドルフチューブ内で -20°C で保存した。

4. 研究成果

(1) PCB126 暴露による発現促進遺伝子の獲得。 リアルタイム RT-PCR により、ピフェニル曝露に比べ PCB126 曝露により、発現が 2 倍以上上昇した遺伝子が、次の 6 種類獲得できた。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (At1g17180、At1g78340)、ミロシナーゼ結合タンパク質 1 (At1g52040)、S-アデノシルメチオニン依存性メチル基転移酵素 (At3g11480)、ラノステロール シンターゼ 1 (At3g45130)、植物ディフェンシン 1.2 (At5g44420)。

(2) 発現促進遺伝子のプロモーター領域のクローニング。 (1) に示した PCB126 曝露

により発現が促進する 6 種類の遺伝子のそれぞれについて、プロモーター領域をシロイヌナズナゲノム DNA データベース (<http://www.arabidopsis.org/>) から決定した。次に、それぞれのプロモーターについて、長さの異なる 3 種類の領域をクローニングする目的でそれぞれ Gateway テクノロジー用プライマーを調製した。これらのプライマーを用いてシロイヌナズナ野生株のゲノム DNA を鋳型にして、Invitrogen 社の Gateway テクノロジーに従い、最終的に植物形質転換用ベクターが 6 種類すべての遺伝子のプロモーター領域について獲得できた。さらに、タバコ培養細胞 BY-2 の形質転換体作出のため、*A. tumefaciens* LBA4404 にそれぞれの植物形質転換用ベクターがエレクトロポレーション法で導入できた。

(3) タバコ培養細胞 BY-2 形質転換体の作出。 これまでのところ、At1g17180 と At3g11480 のそれぞれ長さの異なる 3 種類のプロモーター領域導入形質転換体が出来ている。

①At1g17180 プロモーター領域導入形質転換体。 長さがそれぞれ 1,367bp(F1)、932bp(F2)、429bp(F3) のプロモーター領域を導入した形質転換体が、*A. tumefaciens* 感染法で複数個体獲得できた。さらに、それぞれの形質転換体から調製したゲノム DNA を鋳型にして、プロモーター領域、レポーター遺伝子である GFP、GUS、およびハイグロマイシン耐性遺伝子が確認できた。

②At3g11480 プロモーター領域導入形質転換体。 長さがそれぞれ 2,172bp(F1)、1,145bp(F2)、609bp(F3) のプロモーター領域を導入した形質転換体が、*A. tumefaciens* 感染法で複数個体獲得できた。さらに、At3g11480_F3 形質転換体から調製したゲノム DNA を鋳型にして、プロモーター領域、レポーター遺伝子である GFP、GUS、およびハイグロマイシン耐性遺伝子が確認できた。

(4) At1g17180 プロモーター領域導入タバコ培養細胞 BY-2 形質転換体の PCB126 曝露による GUS 発現。

At1g17180_F2、At1g17180_F3 の形質転換

体では約 70 個体と多くの個体にて GUS 発現



試験を行ったが、PCB126 暴露させた場合とコントロールで共に発色してしまう個体、共に発色しない個体、あるいは固形培養では PCB126 暴露させた個体のみ発色したが液体培養で暴露実験をすると共に発色してしまう個体など、多くの形質転換体において GUS 発現が安定しなかった。しかし、図 1 に示した様に、At1g17180_F3 のプロモーター領域が導入された形質転換体個体の中に PCB126 暴露させた場合のみに GUS 発現が認められる

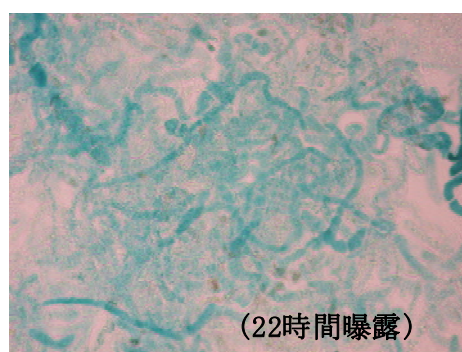
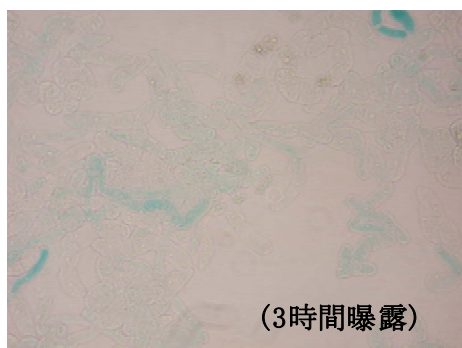


図2. PCB126曝露によるAt1g17180_F3形質転換細胞のGUS発現性の経時的変化

形質転換体が獲得できた。このことは、PCB126 によって At1g17180_F3 のプロモーターが働くことによる GUS の発現が認められたと考えられる。しかしながら、GUS 発現した At1g17180_F3 形質転換細胞を顕微鏡下で観察した結果、図 2 に示すように、経時的に発色細胞の割合が増加するものの、細胞間で発色性に大きなバラツキが見られた。

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)

[学会発表] (計 1 件)

Sonoki, S. and Hisamatsu, S.

Bioassay system for polychlorinated biphenyls using polychlorinated biphenyls-response genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*

Plant Biology 2009, 2009年7月20日, アメリカ合衆国 ホノルル市

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ダイオキシン類汚染のスクリーニング用 DNA アレイ及びスクリーニング方法、並びにダイオキシン類モニター用遺伝子及び植物形質転換用プラスミドベクター

発明者: 其木 茂則

権利者: 学校法人麻布獣医学園

種類: 特許

番号: 特願 2005-231551

出願年月日: 平成 17 年 8 月 10 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

其木 茂則 (SONOKI SHIGENORI)

麻布大学・生命・環境科学部・教授

研究者番号: 50130894