

論文の内容の要旨

論文題目 Targeted mutagenesis of the *CYP1A* gene in Javanese medaka, *Oryzias javanicus*, to understand the metabolism of organic pollutants
(有機汚染物質代謝機構解明のためのジャワメダカ *Oryzias javanicus* *CYP1A*遺伝子への選択的変異導入)

氏 名 スハイラ ビンティ ルスニ

本研究では、海洋生物における有機汚染物質の代謝機能を解明するために、海水魚のモデルとして有用なジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) において、有機汚染物質代謝に重要な役割を果たすと考えられているCytochrome P450 1A (*CYP1A*) 遺伝子のcDNA配列の解析、同遺伝子の汚染物質に対する発現応答の解析、同遺伝子のノックアウト系統の作出、そして、作出したノックアウト系統の汚染物質への反応を調べ、有機汚染物質の物質ごとの有害性発現機序の違いを野生型系統とノックアウト系統の比較により明らかにできることを見出した。

人為的化学物質による海洋汚染の有害性は数十年前に顕在化したが、今日においても依然大きな問題であり、とくに発展途上国においては深刻な状況が続いている。様々な汚染物質がこれまで報告されているが、タンカー事故による石油流出や、工業廃水や農業廃水から環境に放出される汚染物質の主要なものは、有機化合物である。なかでも、多環芳香族炭化水素 (PAHs) は、石油起源の成分として、あるいは有機物の燃焼によっても生成し、環境中に広く検出される汚染物質である。

環境中の汚染物質の検出は、主として各種クロマトグラフィーなどの化学分析によって行われる。しかし、化学分析の結果から生物や生態系に対する影響を直接評価することはできない。その点を解決するには、生物を用いる環境評価、すなわち、環境水や化学成分に生物を曝露することで、環境水中の有害成分の存在や、その影響を明らかにするという手法が有効である。生物を用いる環境評価には、メダカやゼブラフィッシュなどの小型淡水魚が従来用いられてきたが、海を対象とする研究において近年注目されている種が、ジャワメダカである。ジャワメダカは、東南アジアに広く分布するメダカの近縁種であるが、メダカ同様

に維持管理が容易であり、かつ淡水より海水を好むため、海水中での汚染物質の影響や代謝機構の研究に最適である。

本研究では、海洋生物の有機汚染物質の代謝機構をより深く理解するために、ジャワメダカの *CYP1A* 遺伝子に注目した。有機汚染物質の代謝は、取り込んだ汚染物質を修飾して毒性の低い物質、あるいは反応や排出が容易な物質に変換する **phase I** と、変換された物質を抱合体化して排出する **phase II** のふたつの段階から構成されるが、*CYP1A* は、**phase I** を担う主要な酵素であることが知られている。

本学位論文は、**General Introduction**、**Chapter 1**～**4**、および **General Discussion** から構成される。**Chapter 1** では、まずマレーシアのペナン産およびインドネシアのスラヴェシ産のジャワメダカを基礎生物学研究所の **National BioResource Project (NBRP) Medaka** から入手し、それぞれから *CYP1A* cDNA を単離し、配列比較を行った。その結果、遠く離れた産地の系統間には、配列の一部に変異があることがわかった。また、主要な発現組織は肝臓であることがわかった。従って、以降の実験には、ペナン産の系統のみを用い、発現の解析は肝臓を主な対象とすることにした。

Chapter 2 では、ペナン産のジャワメダカを用いて、最も構造が単純な PAHs である Phenanthrene と Pyrene をモデル化合物として曝露実験を行い、それぞれの毒性を調べた。その結果、Phenanthrene と Pyrene の半数致死濃度 (LC50) はそれぞれ 3.9 μM (0.7 mg/L) および 2.5 μM (0.5 mg/L) であることがわかった。次に、LC50 よりも低い濃度 (0.8～2.0 μM) での曝露実験を行い、肝臓中の *CYP1A* mRNA 量を定量リアルタイムPCRにより測定したところ、それぞれの物質の濃度と mRNA 量の間に正の相関または相関傾向が認められた。従って、*CYP1A* 遺伝子は、環境中の汚染物質に応答して発現が上昇することがわかった。

Chapter 3 では、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9) システムを用いて、ペナン系統のジャワメダカの *CYP1A* 遺伝子のノックアウト系統の確立を試みた。標的配列に結合する single guide RNA (sgRNA) を、配列のミスマッチを避けるために **Chapter 1** で検出された配列変異部位を避けて設計し、Cas9 RNA とともに受精卵に顕微注入を行った。注入を行った卵について、当該配列をPCRで増幅し、Heteroduplex Mobility Assay (HMA) を行って、変異導入の成功を確認した。注入した卵を成魚まで飼育し、相互に交配してF1世代を得た。F1世代では挿入、欠失、置換など様々なタイプの変異が検出されたが、そのなかからタンパク質のフレームシフトが起こる4塩基欠失をもつ個体を選抜し、野生型個体と交配してF2を得た。F2のなかから配列変異を持つ個体を選抜し、相互に交配することで、F3世代を得た。その際、その遺伝子型の分析を簡便に行うために、野生型および変異型の配列に特異的なPCRプライマーを設計し、ひれから抽出したDNAに対してPCRとアガロース電気泳動を行い、増幅配列の有無を確認することで、遺伝子型がわかるように工夫した。その結果、F3世代において、初めて変異を両方の染色体に持つホモ型変異体 (ノックアウト個体) が得られたが、ホモ型

変異体が得られる確率は低く、とくにオスのホモ型変異体は全く得られなかった。

ホモ型変異体を育てるためには、ホモ型変異体をふ化後なるべく早く選抜し、ヘテロ型変異体や、変異のない野生型とは別に飼育することが必要と考えられた。しかし、従来の尾びれを切り取ってDNAを抽出する方法では、尾びれの採取が可能な大きさに育つまで遺伝子型が判定できなかった。その問題を解決するために、本研究では「環境DNA」手法を用いて、各個体を個別の容器に入れ、その飼育水からDNAを抽出し、PCRを行うことで遺伝子型を分析する方法を考案した。それにより、各個体にひれ切除に伴うダメージを与えることなく、発生後期の胚や、稚魚の時期に遺伝子型を判定できるようになった。この方法でホモ型変異体を稚魚期に選別し、注意深く飼育することで、雌雄両方のホモ型変異体をF4、F5世代で得ることができた。

Chapter 4では、前章で確立したホモ型、ヘテロ型の*CYP1A*遺伝子変異個体、および野生型個体を用い、モデル化合物であるPhenanthreneとPyreneへの曝露実験を行った。有機汚染物質代謝の重要な因子であるCYP1Aを欠く個体では、汚染物質の代謝能力が低下するため、汚染物質の影響が鋭敏に検出できると期待された。実際、Pyreneに曝露した場合、死亡個体や遊泳行動の異常はホモ型変異体に最も早く現れ、野生型個体が最も影響が少ない結果となった。一方、Phenanthreneへの曝露実験では、結果は全く逆になった。すなわち、曝露の影響は野生型個体に最も早くかつ強く現れ、ホモ型変異個体には曝露の影響は殆ど認められなかった。また、曝露実験後、解剖を行って内臓の観察を行うと、肝臓の組織の崩壊が野生型個体やヘテロ型変異体において見られたのに対し、ホモ型変異体では顕著な影響は認められなかった。加えて、phase IIで生じた抱合体が集まる胆のうについても、野生型個体やヘテロ型変異体では変色と肥大が見られたのに対し、ホモ型変異体では顕著な変化は認められなかった。これらの結果は、Pyreneは、その物質そのものの有害性が高く、CYP1Aが作用することで生じる代謝物質は元の物質より有毒性が低いのに対し、Phenanthreneは、その物質そのものの有害性は極めて低く、CYP1Aが作用して生じる代謝物のほうが有害性が高いことを示唆する。すなわち、有害性が認められる様々な物質において、それぞれの作用機序は一律ではなく、CYP1Aにより有害性の高い物質に変換されることで有毒性が発揮される物質も存在することがわかった。以上のように、本研究で確立した*CYP1A*遺伝子ノックアウト系統は、有機汚染物質全般に対して鋭敏なアッセイ系統にはならなかったが、有害物質への曝露の効果を野生型系統と比較することにより、毒性物質の作用が元の化合物そのものの作用なのか、代謝によって変換された化合物の作用によるのかを区別することができることがわかった。本研究で確立した*CYP1A*遺伝子ノックアウト系統は、汚染物質の有毒性の機序や、魚類の汚染物質代謝のメカニズムをより深い理解く理解するために有用であると考えられる。