

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 スハイラ ビンティ ルスニ

人為的化学物質による海洋環境汚染は、今日においても重大な問題であり続けている。汚染物質の多くは有機化合物であり、その代表的なものが多環芳香族炭化水素（PAHs）である。これらの汚染物質の検出や有害性の評価において、生物を用いる評価法、すなわち、環境水や化学成分に生物を曝露し、生体への影響を明らかにする手法は有効な手段のひとつである。

本研究では、有機汚染物質の海洋生物への生体影響や代謝機構をより深く理解するために、飼育が容易な海水魚モデルとして近年利用され始めているジャワメダカ（*Oryzias javanicus*）を研究対象に選び、その汚染物質代謝酵素 Cytochrome P450 1A（CYP1A）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から入手し、それぞれの *CYP1A* cDNA の配列比較を行った。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。

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。まず Phenanthrene と Pyrene の半数致死濃度（LC₅₀）を求め、次にそれより低い濃度（0.8～2.0 μM）での曝露実験を行い、それぞれの物質の濃度と肝臓中の *CYP1A* mRNA 量には正の相関または相関傾向があることを示した。

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、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。注入を行った個体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、F3 世代でホモ変異体（ノックアウト個体）を得た。しかし、ホモ変異体はヘテロ変異体や野生型個体よりも生存率が低く、十分な数の個体は得られなかった。そこで、変異個体を容易に検出できる PCR プライマーを設計するとともに、「環境 DNA 分析」の手法を応用して、飼育水からの PCR により卵や稚魚の時期に変異個体を検出する方法を考案した。これらの方法により、ホモ型変異体を生活史の早い段階で選抜することが可能になり、選抜し

たホモ変異体を注意深く飼育することにより、F4、F5 世代において多数の個体を得ることに成功した。

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、Phenanthrene と Pyrene への曝露実験を行った。*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、あるいは内臓組織の異常はホモ型変異体に強く現れ、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。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、そのものの有害性は低く、むしろ CYP1A が作用して生じる代謝物の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 の作用により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を利用することで、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できることがわかった。

本研究により、魚類の *CYP1A* 遺伝子の機能に関する理解が深められ、かつ、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く理解するために有用であると考えられる。また、変異系統作出の段階で考案した変異体スクリーニング技術は、今後ゲノム編集技術を用いる種々の研究において広く活用されることが期待される。

なお、本論文第1章、2章は佐々三依子、竹花佑介、木下政人、井上広滋との共同研究であるが、いずれも論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断される。

よって本論文は博士（環境学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 1,926 字