

博士論文 (要約)

Application of gene expression profiling by cDNA-AFLP to  
sediment toxicity evaluation with an estuarine amphipod

(汽水産端脚類を用いた底質毒性評価への  
cDNA-AFLP による遺伝子発現プロファイリングの適用)

Kyoshiro HIKI

日置 恭史郎

## 論文の内容の要約

論文題目 Application of gene expression profiling by cDNA-AFLP to sediment toxicity evaluation with an estuarine amphipod  
(汽水産端脚類を用いた底質毒性評価へのcDNA-AFLPによる遺伝子発現プロファイリングの適用)

氏 名 日置 恭史郎

本論文は「汽水産端脚類を用いた底質毒性評価への cDNA-AFLP による遺伝子発現プロファイリングの適用」と題し、全 7 章から構成されている。

第 1 章では、論文の背景および研究目的、論文の構成を述べた。

環境底質には多様な有害物質が蓄積し、生態系へ悪影響を及ぼすと懸念されている。底質汚染が単一の物質により生じることが稀で、多くの場合複数の物質によって複合的に進行する。汚染対策のためには悪影響の要因となる物質を特定するのが望ましいが、致死や成長阻害をエンドポイントに用いた sediment toxicity identification evaluation (TIE) などの従来手法では毒性要因の多くは特定されてこなかった。そのため近年は、従来のエンドポイントに比べ環境要因との関連がより強い遺伝子発現を用いた手法が注目されている。とりわけ特定の有害物質に特異的に発現変動を示す曝露のバイオマーカーは、複数組み合わせられて利用されることによって毒性要因の特定を可能にすると期待されている。

近年、次世代シーケンシング (Next generation sequencing, NGS) 技術の進展により迅速に大量の遺伝子発現データを取得できるようになった。しかし新規あるいは低発現のバイオマーカーを探索するには、NGS は依然として高価でありデータ解析の手間を要する。また多くの遺伝子発現解析に用いられているマイクロアレイでは、塩基配列の不明な新規のマーカーを探索することは難しい。

本論文は、マイクロアレイと異なる発現プロファイリング手法として cDNA-amplified fragment length polymorphism (AFLP) に着目した。cDNA-AFLP は制限酵素による切断と PCR による増幅を基礎とした手法であり、多数の PCR プライマーを用いれば新規および低発現遺伝子の検出に使用できる。そのため cDNA-AFLP とシーケンシング技術を組み合わせることにより、事前に配列情報のない新規のバイオマーカー遺伝子を発見できると考えられる。しかし cDNA-AFLP を生態毒性研究に応用した例は少ない。そこで本論文は、cDNA-AFLP を配列情報のない曝露のバイオマーカー探索の手法として確立し、底質

毒性評価へ適用することを目的として、汽水産端脚類であるニホンドロソコエビ (*Grandidierella japonica*) を用いた研究をおこなった。

第2章では、上記の背景を踏まえて関連する既往の知見を整理した。

第3章では、本論文における実験手法とデータ解析手法をまとめた。

第4章では参照物質として溶存態の塩化銅、硫酸亜鉛、ニコチンを選び、各物質に曝露させた際の試験生物の cDNA-AFLP プロファイリングをおこなった。各物質に対して特異的な発現応答が得られることを期待して、既往研究に従い曝露濃度は4日間 LC50 濃度の 1/4 および 1/10 という低濃度を選択した。cDNA-AFLP は制限酵素 *EcoRI* と *MseI*、選択的プライマー12組を用いて実施した。結果、各物質への1日間の曝露によって発現変動した座位 (moderated t 検定および fold change により判断) を12個から53個取得した。1/4 および 1/10 LC50 の両濃度で発現変動した座位は、ニコチン曝露に対して8座位見つけ出すことができ、これら8座位はニコチン曝露のバイオマーカーとして使用できる可能性が示された。さらに、これらの8座位は銅と亜鉛への曝露によって発現変動しなかった。これらの結果は、ニコチン曝露のバイオマーカー候補である8座位は銅と亜鉛への曝露による偽陽性を生じない有用なマーカー遺伝子である可能性を支持している。

底生生物の遺伝子発現に影響を及ぼす要因は、化学物質曝露のみではない。周囲の底質の粒子径分布や密度などの要因が遺伝子発現に影響を及ぼすことが知られている。もし化学物質曝露だけでなく底質の物理的な性状によっても影響される遺伝子であれば、曝露ストレスへの特異性は低く、毒性要因の推定のためのバイオマーカーとして使用することは望ましくない。

そこで第5章では、第4章で得られた曝露物質に関連する座位が曝露底質の物理的な性状によって発現変動するかどうかを調べた。底質試料は、粒子径分布や粒子密度、有機含有量などが異なる6種類の急性致死毒性を示さない東京湾沿岸域底質を用いた。6種の底質試料への曝露によって発現変動した AFLP 座位は各試料に対して9個から62個ずつ取得できたが、第4章で得られた曝露物質関連座位はそれらの座位とほぼ重複していなかった (重複率: 0-7%)。したがって曝露物質関連座位の多くは、底質の物理的な性状による影響を受けないバイオマーカーとしての頑健性を有していると考えられた。

第6章では、急性毒性を示す環境試料を対象にして、4章で得られた曝露のバイオマーカー候補の座位が環境試料へ適用可能であるかどうかを調べた。環境試料は、底質汚染の起源の一つであり、銅、亜鉛やニコチンを含む高速道路塵埃を用いた。

まず道路塵埃試料の特性を把握するために、sediment TIE で10日間曝露試験を実施した。

結果、陽イオン交換樹脂 SIR-300 を添加した系よりも炭素系吸着剤 XAD-4 を添加した系で有意に致死率および成長阻害が低減され、有機系物質による毒性の寄与が示唆された。さらに sediment TIE における曝露試験中の溶存態濃度の分析結果から、亜鉛、銅と遊離アンモニアよりもニコチンの道路塵埃毒性への寄与が大きいことが明らかになった。ただしニコチンのみを曝露した追加実験を実施したところ、道路塵埃曝露系で検出された溶存態ニコチン濃度では有意な致死影響は見られなかった。したがって、溶存態ニコチン以外の他の未測定物質や測定物質間の複合影響が道路塵埃の急性毒性に寄与していると示唆された。

次に道路塵埃および XAD-4 処理済みの道路塵埃に 1 日間曝露させた個体の cDNA-AFLP 解析を実施した。道路塵埃および XAD-4 処理済みの道路塵埃への曝露によって発現変動した AFLP 座位はそれぞれ 30 個および 13 個取得できたが、両者で共通の座位は 1 つもなく、道路塵埃曝露が試験個体に及ぼす遺伝子発現への影響は XAD-4 添加によって変化したことが確認できた。また、4 章で得られたニコチン曝露のバイオマーカー候補である座位のコントロール条件に対する発現変動は、全 8 座位中 7 座位において、ニコチン曝露と道路塵埃曝露とで統計的な有意差が見られなかった。この結果から、これらの座位はニコチン以外の複数の化学物質を含む環境試料であってもニコチン曝露のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

第 7 章は総括および課題、今後の展望である。

以上のように、本論文での汽水産端脚類を用いた検討により、cDNA-AFLP は塩基配列情報のない試験生物における曝露のバイオマーカーを探索することができ、さらに探索されたマーカーは環境試料へ適用可能であることが示唆された。