

遺伝子解析手法を用いた環境ストレスの検出技術に関する基礎的研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究機関：平14～平18

担当チーム：水質チーム

研究担当者：鈴木 穰、北村友一

【要旨】

遺伝子反応は、生体における遺伝子発現、免疫反応に代表される生体防御や、生体の恒常性の維持など、外部環境の変化に対し速やかに起こるものと考えられる。遺伝子レベルにおいて環境ストレスを検出し、その影響の程度を評価する手法を確立することは、今後の新たなバイオアッセイとして期待されている。

本研究では、バイオアッセイに利用されることが多いヒメダカを試験魚とし、ヒメダカの遺伝子発現抑制に関する基礎的情報を得るため、ヒメダカを急性毒性（シアン暴露）、水温変化および下水処理水のストレスに暴露したときの発現または抑制する遺伝子情報の取得を行った。

その結果、雄雌メダカ混合条件でのシアン暴露による急性毒性試験では、ビテロゲニン I 遺伝子の低下が観察された。水温 16,20,24,28°C で飼育したメダカの遺伝子発現解析を行った結果、飼育水温の違いにより多くの遺伝子が変動することがわかった。24°C を基準にした場合、低水温時(16,20°C)は、代謝系および免疫系の遺伝子が抑制され、細胞骨格系のチューブリン α 遺伝子と発達系の Pax-3 遺伝子の発現が促進された。高水温時(28°C)は、代謝系と免疫系の遺伝子の発現が促進された。下水処理水に雄メダカを曝露した実験では、雄メダカ肝臓中で卵形性に関わる遺伝子（ビテロゲニン I, II、コリオゲニン H, H マイナー, L）の発現が高くなることがわかった。

キーワード: 遺伝子発現、マイクロアレイ、ヒメダカ、環境ストレス、急性毒性、水温、下水処理水

1. はじめに

人間生活の質的向上にともなって、新規の化学物質が用いられることが多くなってきた。とくに、日常生活で消費される医薬品や合成洗剤などは下水道に集中するため、下水処理場の放流先では、水生生物への新たな環境ストレスを生み出している可能性があり、さらには水利用によるヒトへの影響についても危惧される。

水生生物におけるさまざまな環境ストレスを評価する手法として、生物の応答によってその程度を検出するバイオアッセイが行われている。しかしながら、従来のバイオアッセイでは、生体における微妙な変化を検出することは困難であり、慢性毒性や急性毒性などさまざまな環境ストレスに共通して対応できる手法は開発されていない。一方、ヒトを対象とする医学分野では、遺伝病の疾病因子つまり遺伝子を明らかにする研究が進んでおり、近年では、疾病遺伝子の発現状況をもとにした遺伝子診断が行われている。そして最近になって、この遺伝子解析手法を環境分野に適用して、生物個体への環境ストレスを検出する新たなバイオアッセイとして確立しようと研究が進められている¹⁾²⁾。

遺伝子反応は、生体における遺伝子発現、免疫反応に

代表される生体防御や、生体の恒常性の維持など、外部環境の変化に対し速やかに起こるものと考えられる。遺伝子レベルにおいて環境ストレスを検出し、その影響の程度を評価する手法を確立することは、今後の新たなバイオアッセイとして期待される。とくに、慢性毒性および急性毒性のそれぞれに、あるいは両者に共通して対応する遺伝子を使用することができれば、1つのサンプルからさまざまな環境ストレスを検出することの可能な手法になると期待できる。

そこで本研究は、医学分野における遺伝子レベルでの研究手法をもとに、これを環境ストレスの評価に応用するための基礎的検討に着手し、新たなバイオアッセイの一手法を開発することとした。

2. 実験生物の選定

生物の遺伝子情報の解析は、実験動物として一般的な生物種から着手されており、水生生物では魚類のメダカやゼブラフィッシュ、さらには水産有用魚種で顕著に進んでいる。

本研究では、内分泌攪乱作用や毒性試験などさまざまな調査・研究に用いられているメダカを対象とした。メ

ダカは、河川での化学物質による魚類影響を明らかにするため一般的に用いられている魚種であり、実験動物としての研究事例が多く、他の生物に比べメダカ自体についての生物学的知見も多い。

3. 環境ストレスの選定

環境ストレスがメダカのどのような遺伝子を発現させ、または、抑制させるかについて、基礎的なデータを得るために本研究では以下のストレスを選定した。

(1) 急性毒性 (シアン)

急性毒性ストレスとしては、シアン化合物 (KCN) を選定した。シアン化合物は毒性作用が強いため、遺伝子変動が顕著に表れると考えられ、急性毒性の遺伝子発現・抑制の基礎データとなると考えられた。

(2) 水温

水生生物のメダカの活性は、水温と関係すると考えられる。水温とメダカの遺伝子発現・抑制の関係は、暴露実験の際の基礎データとなり、この関係を把握しておくことは重要である。

(3) 下水処理水

下水道の普及により河川水に占める下水処理水の割合が年々増加しており、下水処理水が水生生物に与える影響が懸念されている。そこで下水処理水がメダカにどのようなストレスを与えるかを遺伝子レベルで調査した。

4. 実験方法と実験結果

4.1 急性毒性 (シアン) によるメダカの発現・抑制遺伝子の把握実験

4.1.1 メダカ曝露試験方法

シアンに対するメダカの遺伝子発現の変動を検出するため、曝露方法は半数致死濃度での 96 時間急性毒性試験法を採用した。シアン化合物 (KCN) の濃度は、コイの半数致死濃度である 0.5mg/L と設定した。

生体サンプルは、96 時間の曝露の結果生存した個体の肝臓およびエラとした。肝臓およびエラは、それぞれ代謝および呼吸に関与する組織であり、シアンによって遺伝子変動が生じやすい組織であると同時に、平常時においても細胞分裂の活発な組織である。

96 時間曝露後、生存した個体は、体サイズを測定した後に肝臓およびエラを取り出して、これらを速やかに液体窒素で凍結した。また、曝露途中で死亡した個体についても、死亡を確認した時点で同様の解剖を行った。メダカ曝露試験の試験条件を表-1 に示す。また、シアン曝露群および対照群のメダカについて、解剖時の体サイズを表-2 に示す。

表-1 メダカによるシアン曝露試験の試験条件

試験方法	内容
影響物質	KCN
設定濃度	0.5 mg/L
試験魚	ヒメダカ (d-rR 系統)
曝露方式	半止水式 (24 時間毎全量交換)
試験水槽	2L ガラス製円形水槽
個体数	48 個体 (雌雄各 24 個体)
試験密度	4 個体/L ((♂4+♀4)/水槽×6 水槽)
日長条件	16 時間明-8 時間暗
水温	26°C

表-2 曝露試験に用いたメダカの体サイズ

分類	個体数	全長 (mm)	体重 (mg)
KCN 生存オス	14	27.9±1.3	170.9±25.6
KCN 生存メス	15	28.1±2.2	179.7±52.0
Control オス	10	29.8±1.0	228.6±21.9
Control メス	10	28.4±1.5	195.8±30.3

4.1.2 遺伝子の抽出方法

シアン曝露生存メダカおよび対照(control)メダカから得られた肝臓とエラ組織のサンプルについて、雌雄および臓器ごとに分けて RNA の抽出および精製を行った。なお、RNA の純度については、抽出・精製の各段階における OD(吸光度:optic density)測定を行った。さらに、Agilent 2100 Bioanalyzer によって電気泳動パターンを確認し RNA の分解が進んでいないかの確認も行った。

(1) RNA 抽出法方法

各組織サンプルは、TRizol (Invitrogen 社) 3~6ml を加えてホモジナイズした後、同製品のプロトコールに従い RNA を抽出し、最終的に 50μl の DEPC 処理水に溶解した。抽出した total RNA の一部を用いて、OD260 および OD280 を測定して RNA 濃度を算出した。

肝臓由来の total-RNA は、シアン曝露および対照ともに十分な収量があり、濃度を表す OD260/280 値は期待値 1.7 を上回っていた。しかし、エラ由来の抽出 RNA は、十分な収量が確保できないことが判明した。

(2) mRNA の精製方法

そこで、遺伝子発現・抑制解析の部位は肝臓のみとし、肝臓由来の mRNA の精製には、Oligotex-dT30<Super> mRNA purification kit (Takara) を用いて、製品プロトコールに従って行い、エタノール沈殿・乾燥後、DEPC 処理水 5~10μl に溶解した。得られた mRNA の一部を用いて OD 測定して mRNA 濃度を算出した。各試料とも 3~5μg

の mRNA を得ることができた。次に、雌雄の肝臓由来 mRNA を等量混合して、表-3 に示す 2 つのサンプルを得た。

表-3 遺伝子発現・抑制解析用サンプル

名称	精製 mRNA
メダカ肝臓シアン曝露 Mix	生存オス-肝臓(14匹) 1.5μg
	生存メス-肝臓(15匹) 1.5μg
メダカ肝臓コントロール Mix	Control オス-肝臓(10匹) 1.5μg
	Control メス-肝臓(10匹) 1.5μg

4.1.3 DNA マイクロビーズによる遺伝子発現・抑制解析の方法

遺伝子の発現・抑制解析には、DNA マイクロビーズ法を使用した。これは、発現しているほぼすべての遺伝子を網羅的にそれぞれひとつひとつのマイクロビーズ（直径 5 μm）の表面に固定化し、このビーズを利用して 2 種類の遺伝子発現解析を行う技術である。

(1) DNA マイクロビーズの作成

1 個のマイクロビーズには、あらかじめ 1 種類の Anti-tag 配列が固定化されている。Anti-tag 配列は 4 塩基からなるワード 8 種類を 8 個並べたものであり（表-4 参照）、その組合せ数は 8^8 つまり約 1,700 万種類が準備されている。この Anti-tag 配列に相補的な Tag 配列の mRNA 由来の cDNA (complementary DNA ; mRNA を鋳型として逆転写酵素によって合成される相補的一本鎖 DNA) 付加させておくと、Tag と Anti-tag の特異的な結合によって 1 個のマイクロビーズに 1 コピー由来の cDNA が捕獲されたビーズライブラリーを調製することができる。

この DNA マイクロビーズの作成方法の概略は以下のとおりである。

はじめに、解析用サンプルとして調製したメダカ肝臓シアン曝露 Mix とコントロール Mix の mRNA 各 2 μg を用いて、それぞれの cDNA を合成し、マイクロビーズ作製用ベクター (Tag 配列のいずれか 1 個を持つプラスミド約 1,700 万種類) にライゲーションする。このベクターを大腸菌に遺伝子導入、培養後、プラスミドを精製する。プラスミドからマイクロビーズとハイブリダイゼーション可能な cDNA 部位を PCR により増幅し、プライマ配列の除去および一本鎖化する。これを、Anti-tag ビーズと混合し、ハイブリダイゼーションさせ、個々のビーズに対して個々の cDNA を結合させる。

表-5 に、最終的に調整された各サンプルの遺伝子数 (マイクロビーズ数) を示す。

表-4 Anti-tag 配列の 8 つのワード

ワード 1	ワード 2	ワード 3	ワード 4
CATT	CTAA	TCAT	ACTA
ワード 5	ワード 6	ワード 7	ワード 8
TACA	ATCT	TTTC	AAAG

表-5 DNA マイクロビーズ数

メダカ肝臓コントロール Mix	メダカ肝臓シアン曝露 Mix
約 135 万個	約 123 万個

(2) 発現・抑制遺伝子の解析方法

シアン曝露によって変動したメダカ遺伝子の抽出・選択には、セルソーティング技術を用いた。これは、メダカ肝臓シアン曝露 Mix とコントロール Mix の 2 種類の遺伝子を異なる蛍光物質で標識し、4.1.3(1) で作成した DNA マイクロビーズ上で競合ハイブリダイゼーションさせ、セルソーターで解析し、蛍光強度差から既知・未知にかかわらず発現差のある遺伝子を網羅的に分取するものである。さらに、分取したビーズに捕獲されている遺伝子をシーケンシングすることにより、その配列情報を得ることができる。表-6 に、表-3 の各解析用サンプルを標識した蛍光標識色素を示す。

表-6 解析用サンプルと標識蛍光色素

サンプル	蛍光標識色素	
	Fluorescein	Cy5
メダカ肝臓シアン曝露 Mix	×	○
メダカ肝臓コントロール Mix	○	×
シアン曝露 Mix とコントロール Mix の cDNA 等量混合物	○	○

4.1.4 実験結果

図-1 にシアン曝露によるメダカ遺伝子に関する発現変動検出結果を示す。同レベルの発現量を示す遺伝子は $y=x$ の直線上にプロットされ、この直線の下側のプロットは、コントロール Mix で発現しているもののシアン曝露によってその発現が抑制された遺伝子である。図より、シアン曝露およびコントロールで得られたメダカ遺伝子は、ほとんどが同レベルの発現量であると認められるが、発現量が抑制された遺伝子も明瞭に区分できることがわかる。図より明確には分らないがシアン曝露によって発現を促進された遺伝子も認めらる。

発現・抑制遺伝子の塩基配列の情報を得るため、発現遺伝子U1と抑制遺伝子D1をゲート設定した(図-1参照)。そして、U1とD1ゲートのビーズのソーティングを行った。表-7は、U1、D1ゲート内ビーズ数である。

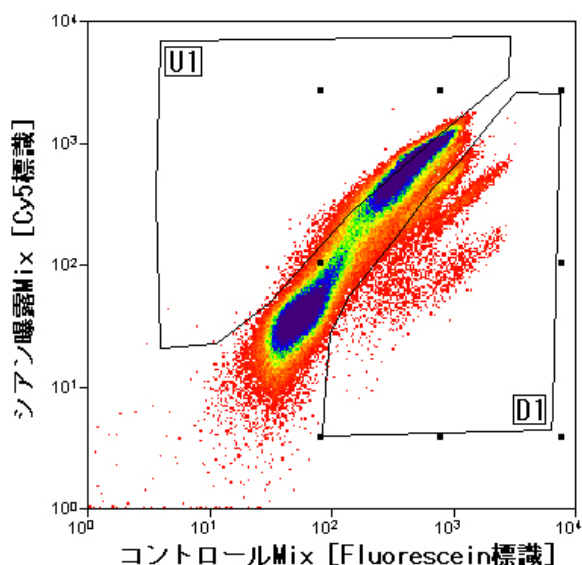


図1 シアン曝露メダカの遺伝子の発現変動

表-7 検出遺伝子数(マイクロビーズ数)とその割合

解析数	U1	D1
149,000	9,762	6767
	6.55%	4.54%

ソーティングされたマイクロビーズからcDNA断片を回収し、PCR、クローニング後、塩基配列を決定し、Phred値15以上で塩基配列300以上のもの(解析クローン数:352クローン)をクラスタリングし、ホモロジー検索を行った。その結果、352クローンが47のクラスターと55クローンのsingletにわけられた。U1、D1ゲート内で、多く現れた遺伝子の上位10遺伝子(ホモロジー検索で相同性が高い遺伝子情報で表示ただし、相同性が低いものも存在する。)を表-8,9に示す。D1において最も発現変動の大きい遺伝子は、ビテロゲニンIやコリオゲニン遺伝子であったが、これらは、卵形成に関わる遺伝子である。このことから、卵形成に関わる遺伝子が、急性毒性ストレスを受けた場合、発現が抑制される可能性があった。

以上、メダカのシアン曝露実験から、急性毒性の際に変動する遺伝子を網羅的に把握したが、これらの遺伝子が、環境ストレスの指標となるかどうかについて、毒性の異なる化学物質の曝露試験からも検討し、データの蓄積を図っていく必要がある。

表-8 U1ゲート内の代表的遺伝子

	データベース名 VERSION DEFINITION
U1	gb AC121982.3 Mus musculus chromosome 6 clone RP24-
	gb AC006458.2 Homo sapiens BAC clone GS1-228E12 fro
	gb AF402815.1 Ictalurus punctatus 40S ribosomal protein
	emb BX005400.8 Zebrafish DNA sequence from clone CH2
	dbj AU301100.1 Cyprinus carpio: cDNA clone: 3-074, expre
	gb AF401581.1 Ictalurus punctatus ribosomal protein L27
	gb AF401558.1 Ictalurus punctatus ribosomal protein L6
	gb AF402827.1 Ictalurus punctatus 40S ribosomal protein
	gb AC012443.8 Homo sapiens BAC clone RP11-17G11 fro
	dbj D13669.1 ORZHSC70 Oryzias latipes mRNA for heat s

表-9 D1ゲート内の代表的遺伝子

	データベース名 VERSION DEFINITION
D1	dbj AB064320.1 Oryzias latipes Ol-vit1 mRNA for vitellog
	dbj D89609.1 Oryzias latipes mRNA for choriogenin H, com
	dbj AB084753.1 Oryzias latipes mitochondrial cytb gene for
	dbj AP004421.1 Oryzias latipes mitochondrial DNA, compl
	gb AC125488.3 Mus musculus chromosome 12 clone RP23
	dbj AB041929.1 Engraulis japonicus mRNA for trypsinog
	dbj AB075198.2 Oryzias latipes wap65 mRNA for warm-te
	emb AJ012191.1 OLA012191 Oryzias latipes mRNA for AT
	gb AC004383.1 AC004383 Human Chromosome X clone b
	dbj AP004421.1 Oryzias latipes mitochondrial DNA, compl

4.2 水温変化によるメダカの発現・抑制遺伝子の把握実験

4.2.1 実験材料と実験方法

(1)メダカマイクロアレイ

水温変化によるメダカ遺伝子の発現・抑制の測定は、EG750(Ecogenomics社製)メダカマイクロアレイを使用した。このマイクロアレイには約750種類のメダカの遺伝子断片(約300~350塩基のDNA)が配置されている。

(2)雄メダカの水温影響試験

水温24°Cで飼育している5ヶ月齢の雄ヒメダカを、流水式の各試験水槽に收容し、飼育水温を1日に0.5~1.0°Cずつ、水槽内に設置した投げ込み式クーラー/ヒーターを用いて、低下または上昇させ、9日目までに飼育水温を16、20、24、28°Cとした。なお、水温は下水処理水の水温を想定し16°C~28°Cとした。その後、11日目まで設定水温で飼育し、各水槽9個体ずつ雄ヒメダカを取り上げ、マイクロアレイによる遺伝子発現解析に用いた。水温は磁気記録式温度計Thermo Recorder TR-81(T AND D社製)を水

表-10 メダカ水温影響試験の条件

暴露方式	流水式
換水率	約5換水/日以上
試験区	16°C、20°C、24°C、28°C
暴露期間	11日（うち9日間は馴化期間）
暴露雄メダカ数	各水槽9匹（5カ月齢）
照明	16時間明/8時間暗
給餌	アルテミア孵化幼生を1回/日
RNA抽出部位	肝臓
遺伝子解析検体数	9サンプル

槽内に設置し測定、記録した。試験条件を表-10に記す。

(3)RNA抽出とマイクロアレイ用試薬およびその操作

RNA抽出部位は肝臓とし、肝臓からのRNAの抽出は、RNeasy mini Kit(Qiagen社製)を使用した。抽出したRNAは、Amino Allyl MessageAmp II Kit(Ambion社製)を用い、RNAを増幅した後Cy5で標識した。Cy5で標識したRNAは、メダカマイクロアレイEG750に展開し、60°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、マイクロアレイと結合しなかったRNAを洗い流した後、Affymetrix 428 Array Scanner(Affymetrix社製)で各遺伝子が配置されている各スポットの蛍光強度を読みとった。

(4)マイクロアレイデータ解析方法

スキャナーで読み取った蛍光強度の画像データを、画像データ数値化ソフトImaGene ver.6(BioDiscovery社製)を用いて数値データ化した。得られた数値データは、遺伝子データ解析ソフトGeneSight ver.4(BioDiscovery社製)を用いて、正規化やQuality Controlといったデータの整理を行い、統計解析を行った。各水温間の比較には、一元配置分散分析(ANOVA Test)を行い有意水準5%($p < 0.05$)で有意な差が見られた遺伝子のみを用いた。

4.2.2 実験結果

(1)水温

試験期間中の水温変化を図-2に示す。急激な水温変化は見られず、水温低下、上昇中に魚体にかかる大きなストレスは最小限に抑えられたと考えられる。

(2)遺伝子解析結果

試験前の飼育水温である24°Cの個体と、各水温で飼育した個体の遺伝子発現比を比較し、各水温間で有意差が見られた遺伝子は439遺伝子であった。これらの遺伝子のうち発現比が2倍以上、増加または減少した遺伝子をリストアップした。各水温との比較結果を表-11に記す。なお、蛍光強度が低い(遺伝子の発現レベルが低い)遺伝子はノイズと区別がつきにくく、測定値の信頼性が低いことから、比較する両データともに蛍光強度比が $\log_2(-5)$ 以下の遺伝子は比較に用いなかった。また、特に発現比の

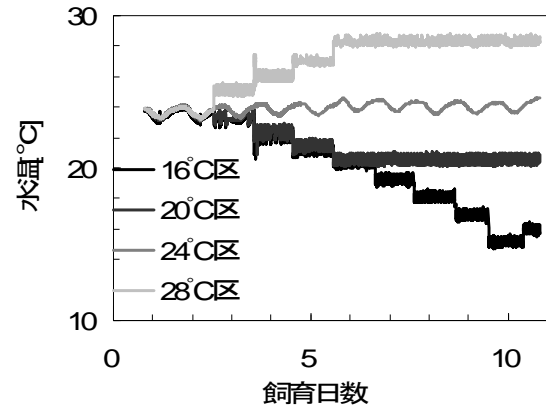


図-2 水温経日変化

変化が大きかった遺伝子として、3倍以上、増加または減少した遺伝子を表-12に示す。アノテーション(遺伝子配列情報に付けられた生物学的な機能等の情報)の付いた遺伝子に注目すると、水温低下により、代謝系(metabolism)に関わる遺伝子と、免疫系(immune)に関わる遺伝子の発現が強く抑制され、細胞骨格(cytoskeleton)に関わる遺伝子と、発達(developmental)に関わる遺伝子の発現が強く促進されることがわかった。また、水温上昇により代謝系と免疫系の遺伝子の発現は促進されることがわかった。

4.2.3 考察

(1)水温変化による免疫系遺伝子の発現変化

炎症反応の惹起、病原体の溶解など生体防御に重要な役割を果たす補体の1つであるC4遺伝子(Orla C4)とB因子様遺伝子(Bf/C2)³⁾は、水温低下により大きく発現抑制された。また、ヘルパーT細胞中で免疫促進に働き、エストロゲン受容体の機能の調整にも関わるエストロゲン受容体結合シクロフィリン遺伝子(estrogen receptor-binding cyclophilin)⁴⁾と類似の遺伝子は、水温上昇により大きく発現促進された。

水温変化によりニジマスの免疫能に変化が生じることは知られており、冬季の低水温時に血漿中抗体量が減少することが報告されている。ただ抗体量と水温の関係性を否定する報告もあるため、免疫能の季節変動に対する水温の影響は明らかとはなっていない⁵⁾。また、季節により変動するステロイドホルモン量と免疫能の変化についてもニジマス、キンギョ、コイで調べられ、魚種により応答性に違いがあったと報告されている⁵⁾もののメダカについては明らかとなっていない。

しかし、自然条件で行った上記の実験とは異なり、本研究では、水温、光照射周期、給餌量、水質を制御し、さらに雄魚のみを使用し雌魚による影響を排除したことから、水温低下と免疫系遺伝子の発現抑制の関連性はあると考えられる。

表-11 発現比が2倍以上 減少または増加した遺伝子

機能	遺伝子名	16°C	20°C	28°C
immune	Orla C4	0.25	0.20	2.36
	cDNA clone OLC02.11d similar to pir A46579 estrogen receptor-binding Bf/C2	1.25	0.46	3.43
	cytochrome P450 1A	0.61	0.47	1.43
metabolism	cDNA clone NGY15.03e similar to pir JC4157 cytochrome P450 2D, endoplasmic reticulum - dog	0.45	0.43	0.46
	cDNA clone D2C37 similar to Fundulus heteroclitus cytochrome P450 2N1	0.32	0.36	0.74
	cytochrom P450 3A40	0.41	0.38	1.86
	cDNA clone DA11 similar to Haplochromis xenognathus glucose 6 phosphatase	0.39	0.36	2.15
	cDNA clone OLC03.12g similar to pir JQ1144 H+-transporting ATP synthase (EC 3.6.1.34) chain b precursor,	0.54	0.37	0.76
	cDNA clone OLC57.10d similar to pir S22348 H+-transporting ATP synthase (EC 3.6.1.34) delta chain precursor - human	0.32	0.35	2.37
	cDNA clone DB11 similar to Mouse hepatic lipase, gi:6680264	1.50	1.24	2.95
	cDNA clone OLB23.07a similar to lanosterol synthase (EC 5.4.99.7) (human)	0.34	0.49	1.08
	transferrin	1.24	0.51	3.32
	cDNA clone OLC13.06d similar to pir A00022 CCBN cytochrome C - skipjack	0.52	0.48	1.29
	GnRH-R2 gene for gonadotropin-releasing hormone receptor 2	2.20	0.57	1.56
	OIGPCR-alpha G protein coupled	0.44	0.38	1.10
	germ cell-less protein (gel)	1.11	0.47	2.88
	partial cold-shock domain protein (mfYP2)	1.36	0.56	2.25
	nuc./prot. binding	SMC1 alpha	0.40	0.45
cDNA clone OLB25.03b similar to eukaryotic translation initiation factor EIF3-p48 subunit (fission yeast)		1.16	0.43	2.85
cDNA clone OLB22.05g similar to translation elongation factor EF-1 gamma (African clawed frog)		0.53	0.45	1.29
cellular nucleic acid binding protein		0.61	0.39	0.55
annexin max2		0.75	0.56	2.53
signal transduction	annexin max4	0.65	0.50	2.13
	OLG2 membrane guanylyl cyclase	0.97	0.65	2.38
	Gi2 alpha subunit	1.16	0.42	2.16
	cDNA clone OLB31.08d similar to adenylylase kinase (EC 2.7.4.3) 2,	0.81	0.58	2.30
	cDNA clone OLB32.06d similar to pir I49365 protein tyrosine phosphatase - cyclin B2	1.92	0.95	2.60
cell cycle	p53	0.99	0.41	1.72
	cDNA clone OLD14.08f similar to pir A56635 tubulin alpha chain, brain-specific isotype (clone pTUB5) - chum	0.93	0.45	2.11
cytoskelton	partial dachshund protein (dach)	0.67	0.57	2.33
	Tra2b transformer-2b	3.90	1.05	1.48
developmental	Pax-3	0.78	0.44	2.98
	cDNA clone MF01FSA050G01 5' (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1?, Mus musculus)	1.50	0.78	2.68
	cDNA clone OLE05.09f similar to pir A00921 KQHUP plasma kallikrein (EC 3.4.21.34) precursor - human	4.30	0.72	1.31
	Gb adult alpha-type globin	0.46	0.41	1.60
	cDNA clone 1061 sequence	0.51	0.49	0.69
	cDNA clone MF015DA011k03 5'	0.81	0.36	1.06
	cDNA clone MF01FFA006k13 5'	1.36	0.66	3.32
	cDNA clone MF01FSA008O22 5'	0.74	0.63	0.49
	cDNA clone MF01FSA008O22 5'	2.28	0.55	1.38
	cDNA clone MF01FSA029M08 3'	0.29	0.42	0.44
	cDNA clone MF01FSA029M08 5'	2.70	1.67	1.49
	cDNA clone MF01FSA032B13 5'	2.37	0.67	1.25
	cDNA clone MF01FSA032G07 5'	0.18	0.34	0.91
	cDNA clone MF01FSA032G07 5'	0.93	0.48	1.55
	cDNA clone MF01SSA038B03 5'	1.05	0.34	1.09
	cDNA clone MF01SSA063B10 5'	1.39	0.39	1.18
	cDNA clone MF01SSA123H06 3'	1.65	0.84	2.15
	cDNA clone MF01SSA133F04 5'	0.72	0.36	0.69
	cDNA clone MF01SSA159F10 5'	0.73	0.27	0.72
	cDNA clone MF01SSB002K19 5'	1.43	0.41	1.93

注) 黒色:2倍以上発現促進、灰色:2倍以上発現抑制

表-12 発現比が3倍以上 減少または増加した遺伝子

機能	遺伝子名	16°C	20°C	28°C
metabolism	cDNA clone NGY15.03e similar to pir JC4157 cytochrome P450 2D, endoplasmic reticulum - dog	0.32	0.36	0.74
	cDNA clone OLC03.12g similar to pir JQ1144 H+-transporting ATP synthase (EC 3.6.1.34) chain b precursor, mitochondrial -human	0.32	0.35	2.37
	cDNA clone OLB23.07a similar to lanosterol synthase (EC 5.4.99.7)	1.24	0.51	3.32
immune	cDNA clone OLC02.11d similar to pir A46579 estrogen receptor-binding cyclophilin - bovine	1.25	0.46	3.43
	Orla C4	0.25	0.20	2.36
developmental	cDNA clone MF01FSA008O22 5'	0.29	0.42	0.44
	cDNA clone MF01FSA032B13 5'	0.18	0.34	0.91
	cDNA clone MF01SSA159F10 5'	0.73	0.27	0.72
	cDNA clone 1061 sequence	1.36	0.66	3.32
cytoskelton	cDNA clone OLD14.08f similar to pir A56635 tubulin alpha chain, brain-specific isotype (clone pTUB5) - chum salmon	3.90	1.05	1.48
	Pax-3	4.30	0.72	1.31

注) 黒色:3倍以上発現促進、灰色:3倍以上発現抑制

(2)水温変化による代謝系遺伝子の発現変化

①薬物代謝

薬物代謝に関わるシトクロムP450酵素系遺伝子である、P450 1A 遺伝子、P450 2D 類似遺伝子、P450 2N1 類似遺伝子、P450 3A40 遺伝子は水温低下により発現抑制された。

②脂質代謝

脂質代謝(脂質を加水分解する)を行う酵素(hepatic lipase)の類似遺伝子は水温低下により発現が抑制され、コレステロール生合成の中間体であるラノステロールをスクアレンから合成する際に働く酵素(lanosterol synthase)⁶⁾の類似遺伝子は水温上昇により発現が大きく促進された。

③糖代謝

糖代謝のうち、グリコーゲンから作られたグルコース-6-リン酸をグルコースへと変換する酵素(glucose 6 phosphatase)⁷⁾の類似遺伝子は、水温低下により発現が抑制される傾向が見られた。また、糖代謝に関連する ATP(アデノシン三リン酸)を、ADP(アデノシン二リン酸)から合成する際に働く酵素の前駆物質(H⁺ - transporting ATP synthase chain b precursor および delta chain precursor)⁸⁾の類似遺伝子は、水温上昇により発現が促進され、chain b precursor 類似遺伝子は水温低下により発現が大きく抑制された。

④その他

鉄代謝(鉄の輸送)を行い、細菌の増殖に必要な鉄の利用を妨げる働きもするトランスフェリン遺伝子(transferrin)⁹⁾は、水温低下により発現が抑制される傾向が見られた。一方で、代謝系で電子伝達に関わる cytochrome C¹⁰⁾の類似遺伝子は他の遺伝子とは異なり、水温低下によ

り発現が促進された。

代謝系の遺伝子は、水温変化により 11 種の遺伝子で発現変化が見られ、そのうち 10 種の遺伝子において、低水温で発現抑制、高水温で発現促進される傾向が見られた。

魚類は変温動物であり、水温の変動により生体膜の流動性、酵素活性は大きく影響を受け、ミクロソーム膜に存在する薬物代謝酵素である P450 の活性も膜の流動性に影響を受けると考えられている¹¹⁾。また脂質や糖質の代謝も水温に影響され、水温の低下は摂取した脂質、糖質を貯蔵する方向に向かわせると考えられる。本研究の結果は、これらの現象を反映しているといえる。

(3)水温変化による生殖系の遺伝子の発現変化

精子形成に関わる生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの受容体遺伝子(GnRH-R2)¹²⁾は、水温低下により発現が抑制され、精子成熟を誘起するプロゲステロンに関連する遺伝子(alpha G protein coupled progestin)¹²⁾は、水温上昇により発現が促進された。また、ショウジョウバエの生殖細胞で、性分化の初期に重要な役割を果たすことが知られている germ cell-less protein 遺伝子¹³⁾は、雄メダカの肝臓中でも水温上昇により発現促進された。

生殖系の遺伝子は、変動の程度、変動した遺伝子数ともに少ないが低水温で発現抑制、高水温で発現促進される傾向が見られた。

多くの魚類は周期的に生殖活動を行っており、水温や光周期などに強く影響されることが知られている¹⁴⁾。メダカの精子形成にも年周期的変化があることがわかっている¹⁵⁾。このため、生殖活動に適さない低水温時に、関連の深い内分泌系の遺伝子が発現抑制され、生殖活動に適した高水温時に発現促進されることが考えられる。本研究の結果はこれらの現象を反映しているといえる。

(4)その他の遺伝子の発現変化

カルシウムおよびリン脂質に結合するタンパク質で、チャンネル形成、膜溶解、小胞輸送、ホスホリパーゼ A2 活性化などに関与しているアネキシン遺伝子(annexin max2, annexin max4)¹⁶⁾や、細胞内の情報伝達等に関わる cGMP の生成反応の触媒となるグアニル シクラーゼ(membrane guanylyl cyclase)¹⁷⁾遺伝子等の、情報伝達に関連する遺伝子は、水温上昇で発現が促進される傾向が見られた。

また、タンパク質合成時に mRNA の翻訳を行うリボソームに結合し翻訳を開始させる因子(eukaryotic translation initiation factor EIF3-p48 subunit)¹⁸⁾の類似遺伝子、リボソームに作用しペプチド鎖を伸長させる因子(translation elongation factor EF-1 gamma)¹⁸⁾の類似遺伝子、転写活性化因子、転写促進因子、翻訳促進因子として作用する Y ボ

ックスタンパク質(mfYp2)¹⁹⁾遺伝子、細胞の減数分裂時に作用するコヒーシタンパク質(SMC1 alpha)²⁰⁾遺伝子といった、核酸やタンパク質に結合して作用する遺伝子でも水温低下で発現抑制、水温上昇で発現促進が見られた。

さらに、細胞周期の制御に関わるサイクリン B(cyclin B2)²¹⁾遺伝子や、細胞増殖を制御する p53 遺伝子²¹⁾でも、水温上昇により発現促進が見られ、ヘモグロビンの構成成分であるグロビン (adult alpha-type globin) 遺伝子では水温低下により発現抑制が見られた。

これまで挙げたほとんどの遺伝子は、水温低下により遺伝子発現が抑制されるものや、水温上昇により遺伝子発現が促進されるものであった。しかし細胞骨格の 1 つである微小管を形成するチューブリン α (tubulin alpha chain)²²⁾の類似遺伝子や、発生過程で形態形成の制御を行うホメオボックス遺伝子の 1 つである Pax-3²³⁾遺伝子などでは、水温低下により遺伝子の発現が促進された。

これらの遺伝子が具体的にどのように作用しているのかは不明であるが、低温耐性等に関わっている可能性も考えられる²²⁾。

このように水温変化により多くの遺伝子の変動したが、比較的大きく変動したのは、水温低下時に発現抑制された代謝系および免疫系の遺伝子と、発現促進されたチューブリン α 遺伝子と Pax-3 遺伝子であった。

水温変化による遺伝子発現の変化は、生体内の複雑な相互作用のうえで生じ、様々な生体反応に影響を及ぼすことが示唆された。下水処理水や河川水中の化学物質の魚類影響を調査する際に、遺伝子レベルでの評価は、早い段階で現れる影響を把握できるため、非常に有効な手法であると考えられる。しかし、本研究結果からわかるように、試験条件を一定に保たないと、化学物質に曝露されたことによる影響かどうか判断できなくなることが予想される。特に内分泌系に直接的または間接的に作用する遺伝子も変動していたことから、下水処理水や河川水中の化学物質が雄魚の雌性化に及ぼす影響を調査する場合には、水温を一定に制御したうえで曝露試験を行う必要があると考えられる。

4.3 下水曝露によるメダカの発現・抑制遺伝子の把握実験

4.3.1 実験材料と実験方法

(1)メダカマイクロアレイ

メダカ用マイクロアレイは、4.2 実験と同様 EG750 (Ecogenomics社製)を使用した。

(2)RNA抽出とマイクロアレイ用試薬およびその操作

RNA抽出とマイクロアレイ用試薬およびその操作方法

は、4.2実験と同様とした。

(3)雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析

下水処理水に雄メダカを曝露したとき、メダカの肝臓中で卵形成に関わるビテロゲニンという蛋白質を誘導することが報告²⁴⁾されている。これは主に下水中の女性ホルモンによるものと考えられるが、この雄メダカの雌性化現象も遺伝子レベルで検出できるかどうか調査するため、下水への曝露実験では雄メダカを使用することとした。雄メダカの下水への曝露実験の前に雄メダカと雌メダカの遺伝子の発現の違いを確認しておく必要があると考え、脱塩素水で飼育している約3ヶ月齢の雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析を行った。

本実験では雄、雌それぞれ3匹を1検体とし4.2.1に記した方法でマイクロアレイの処理を行った。

(4)下水への雄メダカ曝露実験

下水への曝露実験では、実下水で運転（好氣的固形物滞留時間7日、活性汚泥浮遊物質濃度約1300mg/L、処理水中溶存有機炭素濃度約10mg/L）している活性汚泥処理パイロットプラントの処理水とエアレーションタンク（以下AT）2槽目の上澄水にメダカを曝露した。実験装置の概要を図-3に、メダカの曝露条件を表-13に記す。RNAの抽出およびマイクロアレイの前処理は4.2.1に示した方法で行った。マイクロアレイによる遺伝子発現解析は半定量的であることから、マイクロアレイで遺伝子発現が高いと判定された遺伝子については、より定量能の高いリアルタイムPCR法で遺伝子発現の定量化も試みた。さら

表-13 メダカ曝露実験の条件

曝露方式	流水式
換水率	約1換水/日以上
試験区	処理水とエアレーションタンク2槽目
曝露期間	2、7、14日
曝露雄メダカ数	各水槽約100匹（約3カ月齢）
試験水温	26°C
照明	16時間明/8時間暗
給餌	3回/1日
RNA抽出部位	肝臓
遺伝子解析検体数	3サンプル（3匹分の肝臓を1サンプル）
肝臓中ビテロゲニン蛋白質測定	5または10匹 (ELISA法:Medaka Vitellogenin ELISA System)

に、遺伝子発現と蛋白質発現の関係を把握するため、遺伝子発現解析用メダカとは別の個体ではあるが、各条件につき5または10匹のメダカの肝臓中ビテロゲニン蛋白質の測定を行った。

また、曝露開始後0、2、7、14日後に両曝露水槽中の女性ホルモンであるエストロン(E1)と17β-エストラジオール(E2)濃度および遺伝子組み換え酵母によるエストロゲン活性の測定も行った。

4.3.2 実験結果

(1)雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析結果

雄メダカと雌メダカのマイクロアレイ画像から蛍光強度を読みとり数値化し、この数値化データを元に雄メダ

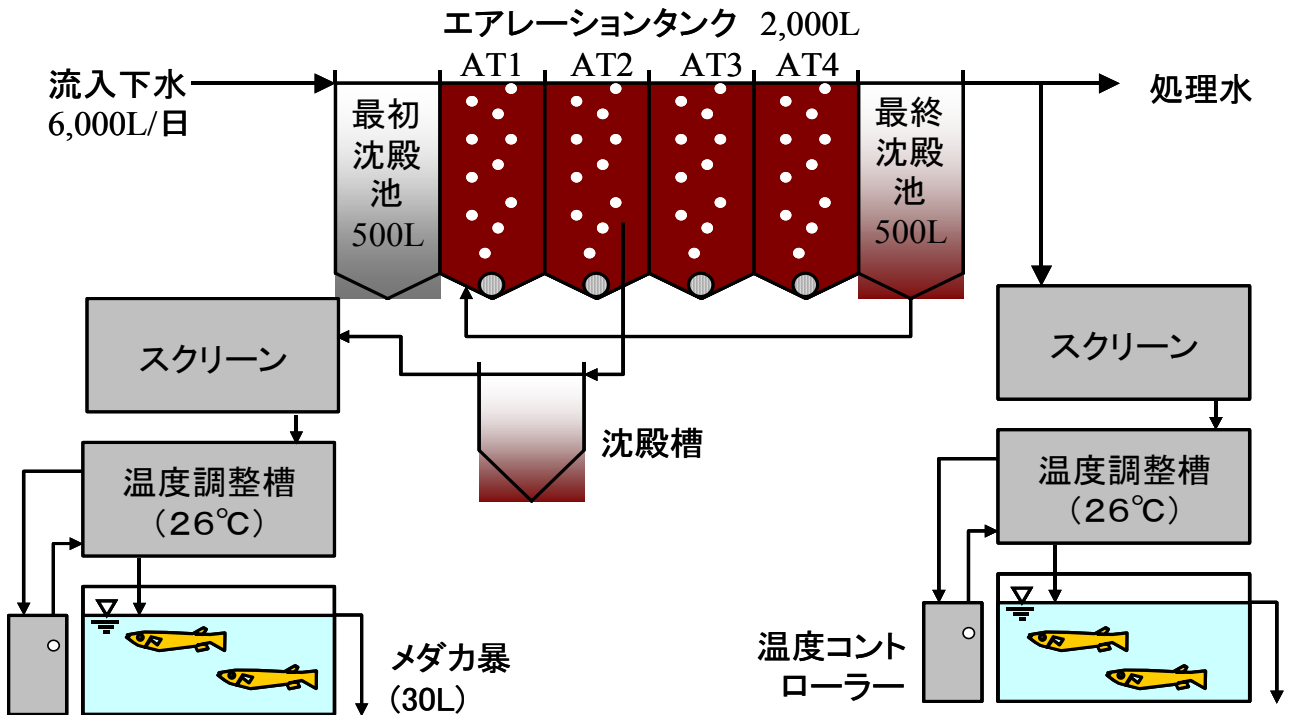


図-3 活性汚泥処理装置とメダカ曝露装置の概要

表-14 雌メダカ肝臓中で雄メダカの2倍以上発現している遺伝子

遺伝子名	倍率(雌/雄)
ビテロゲニン I	75.9
エストロゲンレセプター α	33.6
コリオゲニンH マイナ	6.27
コリオゲニンH	3.69
partial cold-shock domain protein	3.26
ビテロゲニン II	2.70
HOXA9B	2.30
コリオゲニンL	2.07

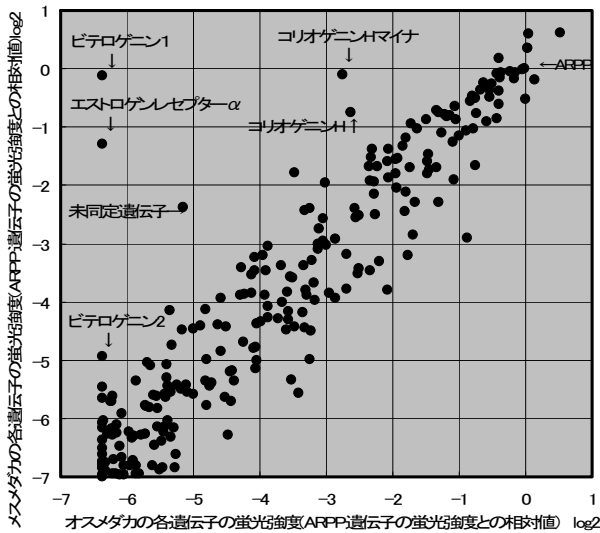


図-4 雄メダカと雌メダカの発現遺伝子の散布図

カと雌メダカで散布図を作成すると図4が得られる。図4は、雄雌共通の遺伝子で遺伝子発現の変動が少ないと考えられているAcidic Ribosomal PhosphoProtein(ARPP)遺伝子の発現を1とする相対強度で整理している。横軸と縦軸は \log_2 スケールで示しており、すなわち、0,-1,-2,-3は1,1/2,1/4,1/8となる。なお、蛍光強度がバックグラウンド以下となる低発現遺伝子は、倍率を算出するため、バックグラウンドの標準偏差の約2倍のかさ上げ処理を行った。

雌メダカ肝臓中で、雄メダカの2倍以上発現している遺伝子を表-14に示す。その結果、卵黄前駆物質の形成に関わる遺伝子であるビテロゲニン I, II、卵膜前駆物質の形成に関わる遺伝子であるコリオゲニンH,Hマイナー,L、エストロゲンレセプター遺伝子の発現が高いことが確認できる。雌特有の遺伝子は、主に卵形成に関わる遺伝子であることがわかる。

(2)下水への雄メダカ暴露実験の結果

図-5は、0日目コントロールとし処理水とAT上澄水にそれぞれに1週間暴露したときの雄メダカの各遺伝子発現の散布図である(7日間暴露のみ掲載)。本図は4.3.2と同様にARPP遺伝子での補正とバックグラウンド以下の低発現遺伝子のかさ上げ処理を行っている。表-15は、処理水とAT上澄水に2日,7日,14日間暴露したとき、0日目より遺伝子発現量が3倍以上、1/3以下になった遺伝子でかつ統計的有意(ANOVA検定で $p<0.001$)であったものを列挙したものである。

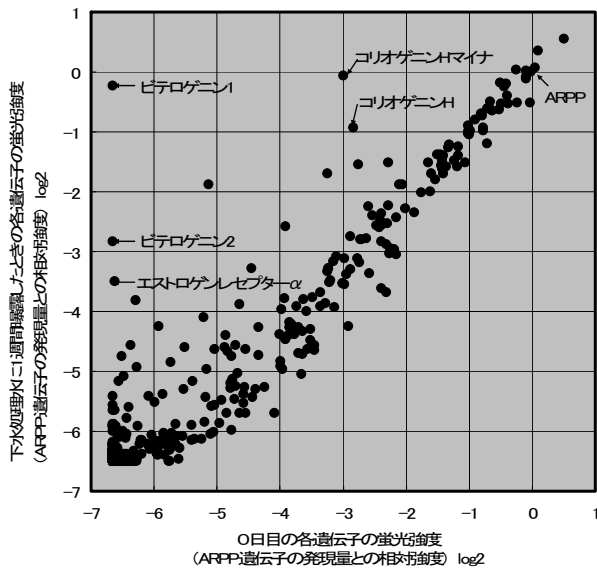
処理水とAT上澄水に暴露したいずれの場合でも雌特有の遺伝子であるビテロゲニン I, II、コリオゲニンH,H

マイナー、エストロゲンレセプター遺伝子の発現が高く、なることがわかる。ただし、処理水に14日間暴露した場合は、これらの遺伝子の発現量は低下していた。

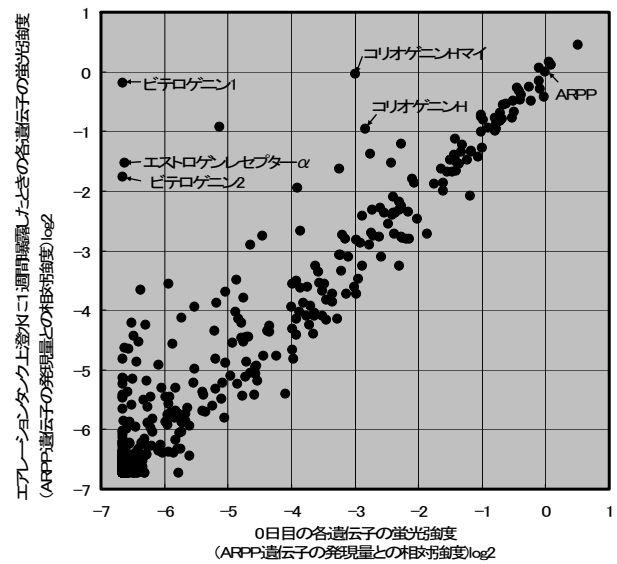
処理水とAT上澄水に暴露したときの発現が増加する遺伝子数を比較すると、曝露期間7日間以上で、AT上澄水に暴露した方が、処理水に暴露した場合よりも発現量が増加する遺伝子数が多いことが確認できた。その中には、卵形成に関わる遺伝子の他に未同定の遺伝子も多く含まれていた。

図-6,7に各暴露水槽中のE1,E2濃度とエストロゲン活性およびビテロゲニン I, II、コリオゲニンH,Hマイナー、エストロゲンレセプター遺伝子のリアルタイムPCRの結果を示す。表-16は、リアルタイムPCRで使用したプライマーとプローブの塩基配列である。リアルタイムPCRによる各遺伝子の定量においてもARPP遺伝子の発現量との相対値を求めた後、0日目コントロールとの倍率を算出した。なお、ビテロゲニン IおよびIIは、0日目コントロールの発現量が検出限界以下であった。ここでは倍率を算出するため、0日目コントロールのビテロゲニン IおよびII遺伝子発現量を、リアルタイムPCRで35サイクル(検出限界付近のサイクル数)で遺伝子が検出されたと仮定し算出した。

処理水とAT暴露水槽中のE1濃度は、曝露期間中一定ではなく、それぞれ、0日目115, 99.1ng/L、2日目24.1, 37.1ng/L、7日目17.6, 8.85ng/L、14日目0.82, 9.57ng/Lとなり、低下傾向であった。このときのエストロゲン活性の値はE1濃度と同じ傾向を示していた。卵形成に関わる遺伝子の発現量をみると、処理水に14日間暴露したメダカで、ビテロゲニン I, II、コリオゲニンH, Hマイナー、エストロゲンレセプター遺伝子の発現が低下しており、E1濃度と同じ傾向を示している。AT上澄水に暴露した方では、14日目に遺伝子発現量の低下は見られなかった。E1濃度10ng/L以上で卵形成遺伝子が発現していることがわかる。図-6より、肝臓中ビテロゲニン蛋白質濃度は、E1濃度、エストロゲン活性値と連動しないことがわかる。



下水処理水1週間暴露



AT上澄水1週間暴露

図-5 0日目の発現遺伝子と処理水およびエアレーションタンク上澄水に1週間曝露したときの雄メダカの発現遺伝子の散布図

表-15 コントロールの3倍以上、0.3以下でANOVA検定により $p < 0.001$ と判定された遺伝子

曝露 日数	処理水			エアレーションタンク		
	遺伝子名	アクセション番号	倍率	遺伝子名	アクセション番号	倍率
2日	ビテロゲニン1	AB064320	92.3	ビテロゲニン1	AB064320	109.2
	ビテロゲニン2	AB074891	14.8	ビテロゲニン2	AB074891	32.3
	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.6	エストロゲンレセプターα	AB033491	28.0
	エストロゲンレセプターα	AB033491	4.3	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.8
	コリオゲニンH	D89609	4.2	コリオゲニンH	D89609	3.9
	コリオゲニンL	AF5000194	3.2	コリオゲニンL	AF500194	3.1
7日	ビテロゲニン1	AB064320	85.3	ビテロゲニン1	AB064320	88.3
	ビテロゲニン2	AB074891	14.1	エストロゲンレセプターα	AB033491	33.9
	エストロゲンレセプターα	AB033491	8.7	ビテロゲニン2	AB074891	29.5
	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.5	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.7
	コリオゲニンH	D89609	3.7	<i>cDNA similar to aspartate transaminase precursor, mitochondrial - pig</i>	AU177265	6.5
				<i>cDNA similar to H+-transporting ATP synthase beta chain precursor, mitochondrial - bovine</i>	AU177340	5.2
				<i>cDNA similar to H+-transporting ATP synthase alpha chain - mouse</i>	AU176589	4.9
				<i>cDNA similar to TR:O75804 O75804 KI-1/57 INTRACELLULAR ANTIGEN</i>	AV668414	3.9
				<i>cDNA similar to translation initiation factor eIF-2 gamma chain (human)</i>	AV669804	3.8
				コリオゲニンH	D89609	3.7
			<i>cDNA similar to eukaryotic translation initiation factor EIF3-p48 subunit (fission yeast)</i>	AU177788	3.2	
			コリオゲニンL	AF500194	3.0	
14日	ビテロゲニン1	AB064320	37.0	ビテロゲニン1	AB064320	93.2
	<i>cDNA to similar to cytochrome P450 2D10 - mouse</i>	AU176875	4.2	エストロゲンレセプターα	AB033491	36.8
	<i>cDNA similar to Brain cDNA library Ictalurus punctatus cDNA 5</i>	AU180750	3.0	ビテロゲニン2	AB074891	31.7
	transposon Tol2 transposase	AB031079	0.2	<i>cDNA similar to aspartate transaminase, mitochondrial - pig</i>	AU177265	7.9
				コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.7
				<i>cDNA similar to H+-transporting ATP synthase alpha chain - mouse</i>	AU176589	5.3
				<i>cDNA similar to H+-transporting ATP synthase beta chain precursor, mitochondrial - bovine</i>	AU177340	4.9
				<i>cDNA clone MF01FSA032M17 5</i>	BJ704342	4.2
				<i>cDNA similar to eukaryotic translation initiation factor EIF3-p48 subunit (fission yeast)</i>	AV670601	4.0
				<i>cDNA similar to cytochrome P450 2C4 - rabbit</i>	AU176982	3.9
				<i>cDNA similar to TR:O75804 O75804 KI-1/57 INTRACELLULAR ANTIGEN</i>	AV668414	3.8
				コリオゲニンH	D89609	3.7
				<i>cDNA similar to translation initiation factor eIF-2 gamma chain (human)</i>	AV669804	3.6
				<i>cDNA clone MF01SSA123H06 3</i>	BJ022493	0.3

注) 斜体は未同定遺伝子

曝露日数2,7日で処理水とAT上澄水に曝露したメダカの遺伝子発現量を比較すると、遺伝子の種類により倍率は異なるが、AT上澄水に曝露した方が高くなっている。例えば、AT上澄水に7日間曝露したメダカのビテロゲニンI遺伝子の発現は、同条件で処理水に曝露したものの7倍となっている。このとき、肝臓中のビテロゲニン蛋白質もAT上澄水に曝露した方が、処理水に曝露したものより50倍程度高い値を示した。

4.3.3 考察

雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析から雌メダカ特

有の遺伝子は卵形性に関わる遺伝子であることがわかった。今回の実験では、雄メダカの雌性化の検出も試みたため、雄メダカを使用したが、雌メダカを使用した方がより高感度に水質を評価できる場合もあると考えられることから、様々な物質で雄メダカと雌メダカの感受性の違いを明らかにしていく必要がある。

表-16 リアルタイム PCR で使用したプライマーとプローブの塩基配列

遺伝子名(アクセション番号)	フォワードプライマー	リバースプライマー	TaqManプローブ	参考文献
エストロゲンレセプター- α	aatcgctcccgggttctatatca	cgaccctccatactgaaggaca	FAM-atctcggaggcagaatcgagagtcgga-BHQ	4)
ピテロゲニン1	tctgtgttgccaagaccaaag	tccatcagttctcactccaatctc	FAM-cttctttgttgagctgctgctgatgtct-BHQ	4)
ピテロゲニン2(AB074891)	gggctgattctgtctcttctct	ggctgaattctggggtgaag	FAM-cccttggctgccaaccaactg-BHQ	今回設計
コリオゲニンH	cggatagtcctcttccattgc	tttgacactgccattggc	FAM-agcttggaccctcaagtgtactgca-BHQ	4)
コリオゲニンHマイナ(AB025967)	tgttcctcagtgaggattgct	agggatccactggaactaacggt	FAM-attaatggctgccaacatcgacgatcg-BHQ	今回設計
ARPP(AU179751)	ctttgtcttcaccaaaggaggatct	cgagctgctgcaggatctctgctggc-BHQ	FAM-actgaagtcaggatctgctgctggc-BHQ	今回設計

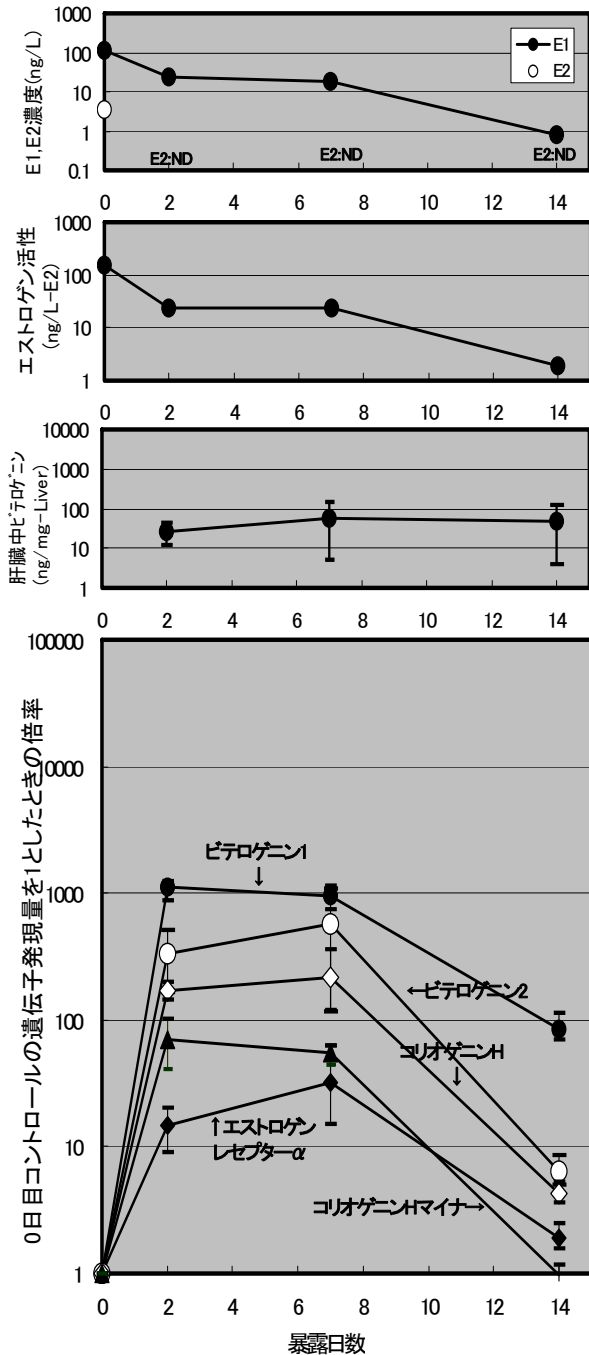


図-6 処理水暴露水槽中の E1,E2 濃度、エストロゲン活性値、肝臓中ピテロゲニン濃度、リアルタイム PCR で測定した各遺伝子の発現倍率の経日変化 (bar は最大、最小値)

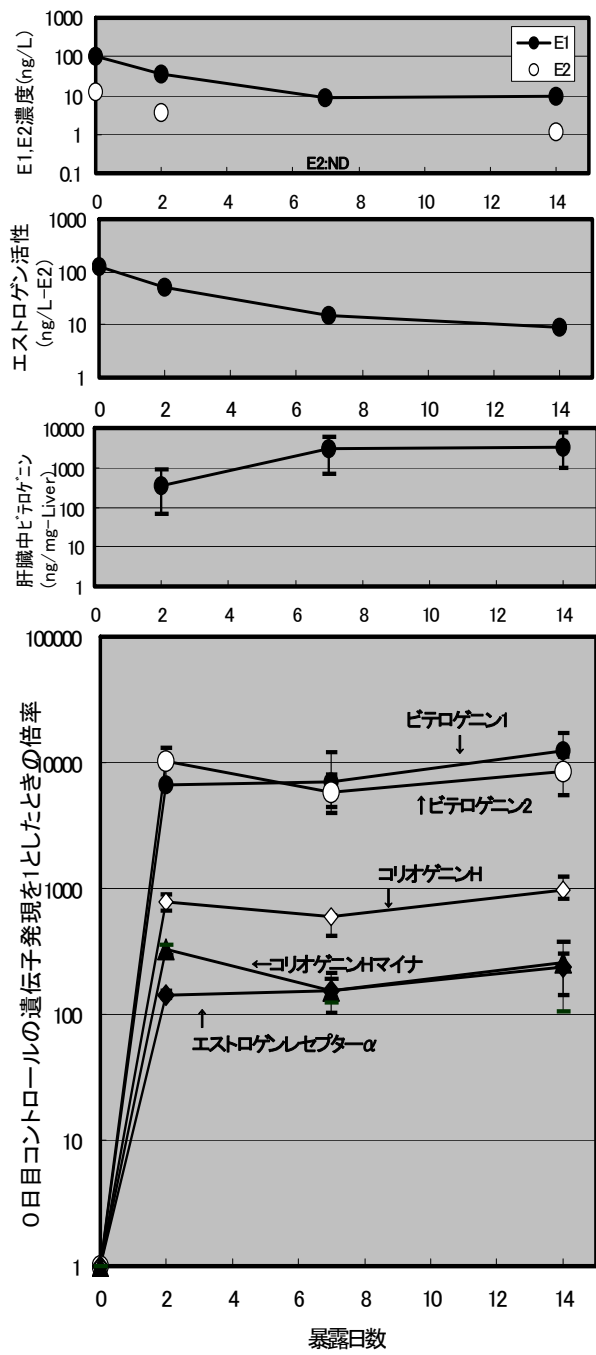


図-7 AT 暴露水槽中の E1,E2 濃度、エストロゲン活性値、肝臓中ピテロゲニン濃度、リアルタイム PCR で測定した各遺伝子の発現倍率の経日変化 (bar は最大、最小値)

今回の下水に雄メダカを曝露した実験から雄メダカ肝臓中で卵形性に関わる遺伝子の発現が高くなることがわかった。AT上澄水ではE2が検出されているものの、7日目までの両曝露水槽中のエストロゲン活性値は、ほぼ同じであったにもかかわらず、AT上澄水中に曝露した場合の方が卵形性遺伝子発現が高くなる傾向が得られた。これは、メダカ体内に取り込まれる女性ホルモン量が多かったためと考えられるが、その理由には、以下が推測されるものの明らかではない。曝露水中の溶存酸素濃度を測定していなかったが、AT上澄水は、処理水よりも溶存酸素濃度は低くなっていたと考えられる。AT上澄水中のメダカはより多くの酸素を取り込むため、エラを通る水量が増加したため、結果として体内に取り込まれる女性ホルモン量が多くなった。あるいは、AT上澄水には女性ホルモンの取り込みを促進する物質が含まれている。

今回の肝臓中のビテロゲニン蛋白質の測定結果から、蛋白質の発現では、週間単位での大凡の水質の履歴が判断でき、遺伝子の発現からは、数日単位で水質を評価できるものと考えられる。今後は、水質と遺伝子の応答速度についても明らかにしていく必要がある。

AT上澄水に曝露したメダカは、処理水に曝露したものより、発現量が増加する遺伝子の数が多くなったが、化学物質の影響が溶存酸素の影響かは明らかでない。今後、溶存酸素の高い条件と低い条件での遺伝子発現解析を行う必要がある。

今回の処理水とAT上澄水中のエストロン濃度と卵形成に関わる遺伝子の発現の関係から、エストロゲン活性約10ng/L-E2が卵形成に関わる遺伝子発現の閾値であると考えられる。

5 まとめ

以下に本実験結果をまとめる。

- 1)シアンに曝露したメダカ(雄雌混合)で最も発現変動の大きい遺伝子は、ビテロゲニンIやコリオゲニン遺伝子であった。これらの遺伝子は、シアン曝露により抑制された。
- 2) 飼育水温の違いにより多くの遺伝子が変動することがわかった。24°Cを基準にした場合、低水温時(16, 20°C)は、代謝系および免疫系の遺伝子が抑制され、細胞骨格系のチューブリン α 遺伝子と発達系のPax-3遺伝子の発現が促進された。高水温時(28°C)は、代謝系と免疫系の遺伝子の発現が促進された。
- 3)エアレーションタンク上澄水に曝露したメダカは、処理水に曝露したものより発現量が高くなる遺伝子の数が増加した。

4)エアレーションタンク上澄水および処理水に雄メダカを曝露すると卵形成に関わるビテロゲニンI,II、コリオゲニンH,Hマイナー、エストロゲンレセプター α 遺伝子の発現が増加する。これらの遺伝子は曝露後2日目から検出でき、水中のエストロン濃度と連動して動いている可能性がある。

今後は、溶存酸素濃度や給餌の頻度と発現遺伝子の種類についての知見を収集し、信頼性の高い試験条件を確立する必要がある。さらに、純物質でのメダカの曝露試験から、発現または抑制される遺伝子データを収集し、現場での水質モニタリングに反映させて行きたいと考えている。

参考文献

- 1)Sirisattha,S., Momose,Y., Kitagawa,E., Iwahashi,H.:Toxicity of anionic detergents determined by Saccharomyces cerevisiae microarray analysis, Water Res.,38,61-70,2004
- 2)Momose,Y., Iwahashi,H.:Bioassay of cadmium using a DNA microarray:genome-wide expression patterns of Saccharomyces cerevisiae response to cadmium, Environ. Toxicol.chem.,76,6548-6554,2004
- 3)矢野友紀・中尾実樹:硬骨魚類の補体の特性,「魚類の免疫系」(渡辺翼 編), 恒星社厚生閣, pp50-61, 2003
- 4)Thomas Ratajczak, Amerigo Carrello, Peter J. Mark, Beverley J. Warner, Richard J. Simpson, Robert L. Moritz, Anthony K. House: The Cyclophilin Component of the Unactivated Estrogen Receptor Contains a Tetratricopeptide Repeat Domain and Shares Identity with p59(FKBP59), J. Biol. Chem, 268(18), pp13187-13192, 1993
- 5)鈴木穰:生殖内分泌系による魚類免疫系の制御,「魚類の免疫系」(渡辺翼 編), 恒星社厚生閣, pp50-61, 2003
- 6)会田勝美:代謝-脂質代謝,「魚類生理学の基礎」(会田勝美 編), 恒星社厚生閣, pp207-211, 2002
- 7)会田勝美:代謝-糖質代謝,「魚類生理学の基礎」(会田勝美 編), 恒星社厚生閣, pp204-207, 2002
- 8)Ralf Birkenhager, Michael Hoppert, Gabriele Deckers-Hebestreit, Frank Mayer Karlheinz Altendorf: The F₀ complex of the *Escherichia coli* ATP synthase investigation by electron spectroscopic imaging and immunoelectron microscopy, Eur. J. Biochem., 230, pp58-67, 1995
- 9)鈴木穰:生体防御-自然免疫,「魚類生理学の基礎」(会田勝美 編), 恒星社厚生閣, pp234-242, 2002
- 10)山本泰彦・照井教文・長谷川淳・三本木至宏・内山進・小林祐次・五十嵐泰夫:電子伝達タンパク質シトクロムc

の熱安定性と機能調節の分子機構 生命現象の化学的理解を目指して, 化学と生物, 41(3), pp190-197, 2003

11) 藤田正一: 魚類のP450 酵素系, 「P450 の分子生物学」(大村恒雄・石村巽・藤井義明 編), 講談社サイエンティフィック, pp167-182, 2005

12) 小林牧人・足立伸次: 生殖-生殖内分泌, 「魚類生理学の基礎」(会田勝美 編), 恒星社厚生閣, pp171-175, 2002

13) Stefan Scholz, H. Domaschke, A. Kanamori, K. Ostermann, G. Rödel, H.O. Gutzeit: Germ cell-less expression in medaka (*Oryzias latipes*), Mol. Reprod. Dev., 67(1), pp15-18, 2004

14) 小林牧人・足立伸次: 生殖-環境と生殖, 「魚類生理学の基礎」(会田勝美 編), 恒星社厚生閣, pp176-179, 2002

15) 岩松鷹司: 生殖-精巣の発達, 「新版メダカ学全書」, 大学教育出版, pp233-236, 2006

16) Steven A. Farber, Robert A. De Rose, Eric S. Olson, Marnie E. Halpern: The Zebrafish Annexin Gene Family, Genome Res. 13, pp1082-1096, 2003

17) Takehiro Yamamoto Norio Suzuki: Promoter activity of the 5'-flanking regions of medaka fish soluble guanylate cyclase α 1 and β 1 subunit genes, Biochem. J., 361, pp337-345, 2002

18) 田村隆明・村松正實: タンパク質の合成-ペプチド鎖伸長の分子機構, 「基礎分子生物学 第2版」, 東京化学同人, pp101-103, 2004

19) Zeng-Ajush E, Hornung U, Burgdorf C, Lutjens G, Shan Z, Schartl M, Haaf T: Isolation and characterization of cold-shock domain protein genes, *Oryzias latipes* Y-box protein 2 (OlaYP2) and Fugu rubripes Y-box protein 1 (FruYP1), in medakafish and pufferfish, Gene, 296(1-2), pp111-119, 2002

20) Jibak Lee, Toshiharu Iwai, Takehiro Yokota Masakane Yamashita: Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis, J. Cell Sci., 116, pp2781-2790, 2003

21) 田村隆明・村松正實: 真核細胞の維持・調節機構-細胞周期の制御, 「基礎分子生物学 第2版」, 東京化学同人, pp187-191, 2004

22) H. William Detrich, Sandra K. Parker, Robley C. Williams, Jr., Eva Nogales, Kenneth H. Downing: Cold Adaptation of Microtubule Assembly and Dynamics, 275(47), pp37038-37047, 2000

23) Robert G. Harris, Edward White, Emma S. Phillips, Karen A. Lillycrop: The Expression of the Developmentally Regulated Proto-oncogene *Pax-3* Is Modulated by N-Myc, J. Biol. Chem,

277(38), pp34815-34825, 2002

24) 国土技術政策総合研究所, 土木研究所: 平成16年度下水道関係調査研究年次報告書集, 国土技術政策総合研究所資料, 土木研究所資料, pp. 243-252, 平成17年