

メダカDNAマイクロアレイによる環境影響評価システムの研究

—ヒメダカ胚中へのダイオキシン類の浸漬及びマイクロアレイによる発現変動遺伝子の抽出—

半野勝正 横田弘文¹ (1: (財) 化学物質評価研究機構)

1 はじめに

現在、わが国では環境中の重金属類及びダイオキシン類を始めとする有害化学物質の管理は、個々の媒体毎に基準値を設け、化学分析により行われている。しかしながら、全ての化学物質を分析することは時間・労力・コスト的に不可能であり、また、未知物質や複合作用等の影響の把握は特に困難である。近年、この化学分析の欠点を補う評価手法として、化学物質の影響に起因する遺伝子発現を網羅的に解析できるDNAマイクロアレイ技術が開発され、環境の生態毒性評価分野への応用が期待されている。特に、2378-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(2378TCDD)などのダイオキシン類は、魚類に対する毒性が強く、浮腫・血流障害・骨奇形・脳障害等の各種機能障害が報告されている⁽¹⁾。しかし、その作用メカニズムは未解明な部分が多い。本研究では、受精後24時間経過した(24hpf)ヒメダカ胚をダイオキシン類含有水に浸漬し、ダイオキシン類(2378TCDD)の胚中への経時的な浸透濃度変化を調べた。また、ダイオキシン類(2378TCDD及び123478H6CDD)含有水に24時間曝露した胚内の遺伝子発現の変動についてメダカDNAマイクロアレイ試験を用いて調査した。

2 試験方法

2.1 2378TCDDのメダカ胚中浸透濃度

受精後24時間(24hpf)のヒメダカ受精胚を2378TCDD含有水(0.01pg/μL, 3.1nM)に曝露し、経時的に胚を50-100個採取した。経時的に採取した胚を細砕後、「食品中のダイオキシン類及びコプラナーPCBの測定方法暫定ガイドライン」(厚生労働省生活衛生局食品保健課, 平成11年10月)の方法に準拠し、1mol/L水酸化カリウム/エタノール溶液を加え、アルカリ分解・溶媒抽出を行い各種クリーンアップ後GC/MS(JEOL-700)で分析した。

2.2 メダカDNAマイクロアレイ試験

ダイオキシン類(2378TCDD(A2)及び123478H6CDD(D3))各0.01pg/μL(DMSO: 0.1%)の含有水をそれぞれ200μLずつ入れた96well-plateにヒメダカ卵の受精後24時間(24hpf)の胚を1個/セルずつ浸漬し、24時間経過後に約50個ずつ取り出しTotal-RNAを抽出し、マイクロアレイ試験に供した。マイクロアレイ試験は、Agilent社製メダカカスタムマイクロアレイを用いて一色法で行なった。試料は、試験液及びコントロール液共にDMSO: 0.1%含有水溶液に調製した。

3 結果と考察

3.1 2378TCDDのメダカ胚中浸透濃度

受精後24時間経過し、生育良好なヒメダカ胚をTCDD溶液(0.1pg/μL, 3.1nM)に浸せきした場合のヒメダカ受精胚(1個あたり)に浸透するTCDDは、浸せき開始6時間後(受精後30時間: Stage20, 脳・耳分化開始期)まで急激に上昇し、その後24時間後(受精後54時間: Stage25, 血流開始期)までは約30pgであった。その後の48時間は徐々に上昇して最終的には約50pg-2378TCDD/個が浸透する2段階の浸透パターンを示した。受精後100時間以後のStage32以降に血流障害を起こし、ほとんどが死に至る。(図1)

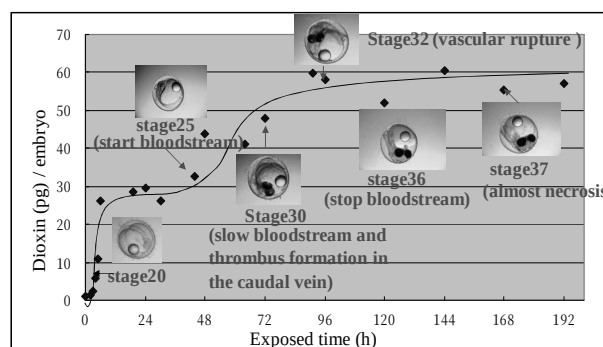


図1 2378TCDDのメダカ胚への浸透状況

3.2 メダカDNAマイクロアレイ試験

2378TCDD(A2)と123478H6CDD(D3)の両方で発現変動した遺伝子はダイオキシン暴露に関連性の高い遺伝子であることが推察される。そこで、A2と

D3 それぞれで2倍以上もしくは0.5倍以下の発現変動を示した遺伝子群（表1）の中から、両者に共通した遺伝子を調査した結果、305 遺伝子が抽出された（図2）。

表1 2378TCDD 及び 123478H6CDD における発現変動遺伝子

Isomer	TEF	解析有効遺伝子	2倍以上発現上昇	0.5倍以下発現低下	発現変動遺伝子
2378TCDD	1	27,880	1,411	113	1,524
123478H6CDD	0.1	27,601	585	362	947

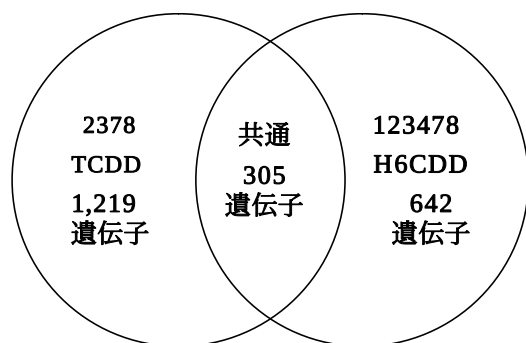


図2 A2 及び D3 の発現変動遺伝子の関係（ベン図）

3.3 2378TCDD 及び 123478H6CDD の共通発現変動遺伝子の特徴

共通して発現変動した 305 遺伝子の中から、発現変動の大きい上位 20 遺伝子についてアノテーション情報を付与すると共に、A2 及び D3 の共通性について調べた（表2～5）。その結果、発現上昇遺伝子の上位（A2 では1位、D3 では2位）にダイオキシンのマーカーである CYP1A1 遺伝子が位置しており、メダカ胚においても A2 及び D3 共に AhR を介した CYP1A1 の誘導が生じている可能性が示唆された。発現減少遺伝子に関しては、1 位の Gene-A（現在、この遺伝子についての機能解析中）が A2 及び D3 共に 100 倍以上の発現抑制を示しており、非常に高感度な新規バイオマーカー候補と考えられた。A2 及び D3 の共通性に関しては、発現上昇遺伝子については上位 20 遺伝子の中で共通のものが3 遺伝子しかなく、共通性は低い結果であった。一方、発現量が低下した遺伝子では、上位 20 遺伝子中 13 遺伝子が共通であったことから、A2 及び D3 暴露で共通のメカニズムが誘導されている可能性が示唆された。

3.4 特定遺伝子の発現量

ダイオキシン暴露で特徴的な発現変動を示すと

考えられる 2 遺伝子（AhR, Ependymin）について、マイクロアレイのデータから発現量の変化を解析した（表6）。マイクロアレイには3種類の AhR 遺伝子と2種類の Ependymin 関連遺伝子が搭載されていたが、A2 及び D3 共に 1.5 倍以上発現上昇した遺伝子はみられなかった。逆に、D3 において Ependymin 関連遺伝子の発現減少が観察された。

表6 メダカ胚の AhR 及び Ependymin 遺伝子の発現量変化

遺伝子名	遺伝子 ID	発現比	
		A2	D3
AHR1 alpha, ahr3	NP418465	1.281	0.730
AHR1 beta, ahr2	NP418466	1.280	1.040
AHR1 alpha, ahr1	NP418467	0.932	0.967
Ependymin related protein 1	TC46721	1.153	0.621
Ependymin related protein 1	TC52973	1.064	0.547

3.5 A2 及び D3 の共通発現変動遺伝子のネットワーク解析

共通して発現変動した 305 遺伝子について、遺伝子間の相互作用を解明するために遺伝子ネットワーク解析ソフト（IPA; Ingenuity Pathways Analysis）を用いて解析した。解析の準備として 305 遺伝子についてヒト相同遺伝子を blastx 検索し、106 遺伝子が相同性の高い遺伝子として選定された。これら 106 遺伝子に関してネットワーク解析を行った結果、最も関連性の高いネットワークは AhR シグナルであり、特に CYP1A1 関連遺伝子の発現増加、カスパーゼ関連遺伝子の発現増加が見出された。これらの結果から、A2 及び D3 に暴露されたメダカ胚では、CYP1A1 を介した代謝誘導が起こっているのと同時にカスパーゼ経路の活性化によるアポトーシスが生じ、血流障害等の機能障害に陥る可能性が示唆された。（図3）

4 結論

- 1)2378TCDD のメダカ胚中への浸透は、2段階の浸透パターンを示し、最終的には 50pg/個が浸透する。
- 2)2378TCDD と 123478H6CDD に 24 時間曝露させた胚での両方で共通に発現変動した遺伝子は 305 遺伝子であった。
- 3)2378TCDD 及び 123478H6CDD の共通性に関しては、発現上昇遺伝子については上位 20 遺伝子の中で共通のものが3 遺伝子しかなく、共通性は

低い結果であった。一方、発現量が低下した遺伝子では、上位 20 遺伝子中 13 遺伝子が共通であったことから、2378TCDD 及び 123478HxCDD 暴露で共通のメカニズムが誘導されている可能性が示唆された。

- 4) ネットワーク解析を行った結果、最も関連性が高いネットワークは AhR シグナルであり、特に CYP1A1 関連遺伝子の発現増加、カスパーゼ関連遺伝子の発現増加が見出された。

今後、各種化学物質含有環境水に曝露させたメダカ胚において特異的な発現変動を見せる遺伝子を抽出し、環境評価のためのバイオマーカーとしての実用化への検討をしていく予定である。

5 参考文献

- 1) Wisk, J.D., Cooper, K.R., (1990). Comparison of the Toxicity of several Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran in embryos of the Japanese MEDAKA (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*. **20**, p361-377.
- 2) K, Hanno., S, Oda., H, Mitani., (2008) Accumulation of Dioxin-isomers and their Effect on Expression of AhRs and CYP1A in early developmental stage embryos of Medaka (*Oryzias latipes*). SETAC NORTH AMERICA 29 Th, Tampa, MP47.
- 3) 半野勝正, 尾田正二, 三谷啓志, (2007) 水中曝露時のメダカ卵中ダイオキシン類濃度の経時変化と AHRs, Ependymin 及び CYP1A の発現について, 第 10 回環境ホルモン学会要旨集, PD-4, p136.
- 4) 半野勝正, 横田弘文, (2008) ダイオキシン類に浸漬したヒメダカ胚のマイクロアレイによる発現変動遺伝子の抽出, 第 14 回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 講演要旨集, 0-4, p41.

6 用語の説明

マイクロアレイ：スライドガラス等に DNA の部分配列を高密度に配置・固定したものに分析試料から抽出した cDNA を反応させ（ハイブリダイゼーション）、発現する遺伝子を網羅的に検出する方法。

CYP1A1：シトクロムタンパク質, cytochrome P450

AhR：アリール炭化水素受容体, aryl hydrocarbon receptor

カスパーゼ：caspase, 細胞にアポトーシスを起こさせるシグナル伝達経路を構成する一群のタンパク質分解酵素。

アポトーシス：apoptosis, 多細胞生物の体を構成する細胞の死に方の一種で、個体をより良い状態に保つために積極的に引き起こされる、管理・調節された細胞死。

A study of Environmental Toxic Evaluation Method using Medaka (*Oryzias latipes*) DNA microarray

Katsumasa HANNO, Hirofumi YOKOTA

Abstract

Early life stages are generally most sensitive to toxic effects. Our knowledge on the action of manmade chemicals on the developing vertebrate embryo is, however, rather limited. We addressed the ecotoxicogenomic response of genes in the medaka (*Oryzias latipes*) embryos in a systematic manner by asking whether distinct chemicals would induce specific transcriptional profiles. We exposed Medaka embryos in the early developmental stage to Dioxins (2378TCDD and 123478 HxCDD) respectively for 24 hours, and after exposure, the gene expression profiles were analyzed using the medaka (*Oryzias latipes*) customized microarray.

Keywords: メダカ medaka (*Oryzias latipes*), 胚 embryo, ダイオキシン類 dioxin, マイクロアレイ microarray, 環境生態毒性 ecotoxicogenomic

表2 2378T4CDD(A2)暴露で発現量が上昇した上位 20 遺伝子

No	Systematic Name	コントロールに 対する発現比	アノテーション	D3での 順位	備考
1	TC47939	49.18	UP Q7T2Z2_ORYLA (Q7T2Z2) Cytochrome P450 1A, complete	2	D3暴露で上昇した上位20遺伝子に存在
2	TC43702	7.567	weakly similar to UP Q07427_CARAU (Q07427) Keratin	233	
3	TC51478	4.962	similar to RF XP_686684.1 68405583 XM_681592 similar to gammaM2b-crystallin {Danio rerio} (exp=-1; wgp=0; cg=0)	273	
4	AU167677	4.807	-	111	
5	TC57978	4.628	similar to UP Q6P002_BRARE (Q6P002) Zgc:110319 protein (Fragment), partial (78%)	31	
6	TC45984	4.484	similar to UP Q5XTP3_BRARE (Q5XTP3) GammaM2b-crystallin (Crygm2b protein), complete	270	
7	TC43868	4.41	homologue to UP Q2HX57_CYPKA (Q2HX57) Myosin heavy chain embryonic type 2	266	
8	D89297	4.366	similar to GP 4803842 dbj BAA77558.1 Mhc class I A {Oryzias latipes}, partial (48%)	19	D3暴露で上昇した上位20遺伝子に存在
9	AU168854	4.362	-	177	
10	TC45699	4.295	similar to RF XP_685920.1 68360342 XM_680828 similar to syntaxin binding protein 1 {Danio rerio} (exp=-1; wgp=0; cg=0)	232	
11	TC60117	4.12	RF XP_532280.2 73974096 XM_532280 similar to Serine/threonine-protein kinase 3 (STE20-like kinase MST2) (MST-2)	198	
12	BJ732829	4.086	-	112	
13	TC50063	4.084	similar to GB AAA49206.1 213052 CYICRYGS gamma-s-crystallin {Cyprinus carpio} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (98%)	249	
14	TC49125	3.892	similar to UP Q5XTP3_BRARE (Q5XTP3) GammaM2b-crystallin (Crygm2b protein), partial (95%)	257	
15	TC53294	3.793	similar to GB CAA39414 gamma m3 crystallin {Cyprinus carpio} (exp=-1; wgp=0; cg=0)	298	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
16	TC47488	3.766	homologue to UP Q8JH39_OREMO (Q8JH39) Muscle-type creatine kinase CKM1	239	
17	AU168616	3.751	-	137	
18	AM152320	3.698	-	243	
19	TC51125	3.693	homologue to RF XP_708916.1 68360600 XM_703824 myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle {Danio rerio} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (10%)	225	
20	TC44907	3.649	similar to UP Q3GQJ5_9GAMM (Q3GQJ5) Thiolase , partial (5%)	159	

表3 2378T4CDD(A2)暴露で発現量が減少した上位20遺伝子

No	Systematic Name	コントロールに対する発現比	アノテーション	ライブラリー臓器	D3での順位	備考
1	Gene-A	0.01	-	eye	1	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
2	AM148810	0.179	-	-	269	
3	TC47993	0.181	similar to UP Q7SXT2_BRARE (Q7SXT2) Tetraspanin 7	whole embryo	13	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
4	Gene-B	0.218	-	eye	3	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
5	BJ898743	0.219	-	-	6	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
6	TC56621	0.239	-	whole embryo	54	
7	AU167966	0.24	similar to GP 7301740 gb AAF56852.1 CG1401-PA {Drosophila melanogaster}, partial (3%)	brain	5	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
8	BJ003907	0.253	similar to bA22I24.2.1 (GTP binding protein 2) {Homo sapiens}, partial (12%)	whole embryo	7	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
9	AM151374	0.255	-	-	38	
10	TC62452	0.262	homologue to UP Q6GM38_XENLA (Q6GM38) MGC84000 protein	-	37	
11	TC52391	0.266	similar to RF XP_688101.1 68383333 XM_683009 similar to FLJ20171 protein {Danio rerio} (exp=-1; wgp=0; cg=0)	whole embryo, liver	10	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
12	TC61125	0.281	homologue to (Q670I2) CP readthrough protein, partial (2%)	whole embryo	9	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
13	AM154918	0.284	-	-	25	
14	AM137924	0.289	-	-	17	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
15	NP1395910	0.289	-	-	41	
16	AM141813	0.29	-	-	14	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
17	TC59956	0.295	similar to unknown {Haloarcula marismortui ATCC 43049} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (6%)	whole embryo	12	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
18	BJ711052	0.302	-	whole embryo	29	
19	TC45081	0.316	weakly similar to similar to Ryanodine receptor 2 (Cardiac muscle-type ryanodine receptor) (RyR2) (RYR-2), partial (0%)	-	2	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在
20	AU168131	0.328	-	brain	16	D3暴露で減少した上位20遺伝子に存在

表 4 123478H6CDD(D3)暴露で発現量が上昇した上位20遺伝子

No	Systematic Name	コントロールに 対する発現比	アノテーション	A2での 順位	備考
1	AM154512	15.19	-	178	
2	TC47939	14.52	UP Q7T2Z2_ORYLA (Q7T2Z2) Cytochrome P450 1A, complete	1	A2暴露で上昇した上位20遺伝子に存在
3	AM148503	5.208	-	145	
4	AU177266	4.632	-	55	
5	AU169567	4.403	similar to bA76K19.1 (IMOGEN 38) {Homo sapiens}, partial (11%)	195	
6	AM154335	3.991	-	99	
7	BJ910426	3.924	-	85	
8	AM139964	3.884	-	232	
9	BJ014222	3.845	-	223	
10	TC58184	3.829	UP Q3HKL4_RHOS4 (Q3HKL4) Transcriptional repressor, ModE, partial (5%)	198	
11	AM156092	3.653	-	56	
12	AU171028	3.648	weakly similar to GP 14579225 gb AAK69171.1 carnitine palmitoyltransferase I {Sus scrofa}, partial (27%)	83	
13	AM144125	3.634	-	187	
14	BJ731723	3.571	-	134	
15	BJ006841	3.539	similar to SP P22063 AXO1_RAT Contactin 2 precursor (Axonin-1) (Axonal glycoprotein TAG-1) (Transient axonal glycoprotein 1), partial (1%)	31	
16	AU178950	3.479	homologue to SP P23640 RB27_RAT Ras-related protein Rab-27a (RAB-27) (GTP-binding protein Ram) (Ram p25). [Rat] {Rattus norvegicus}, partial (53%)	41	
17	TC56512	3.422	homologue to UP Q5RH13_BRARE (Q5RH13) Partner of paired b	156	
18	AM144830	3.417	-	181	
19	D89297	3.394	similar to GP 4803842 dbj BAA77558.1 Mhc class I A {Oryzias latipes}, partial (48%)	8	A2暴露で上昇した上位20遺伝子に存在
20	TC50227	3.338	similar to UP Q6NYL2_BRARE (Q6NYL2) Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	81	

表5 123478H6CDD(D3)暴露で発現量が減少した上位20遺伝子

No	Systematic Name	コントロールに対する発現比	アノテーション	ライブラリー臓器	A2での順位	備考
1	Gene-A	0.01	-	eye	1	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
2	TC45081	0.114	weakly similar to similar to Ryanodine receptor 2 (Cardiac muscle-type ryanodine receptor) (RyR2) (RyR-2), partial (0%)	-	19	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
3	Gene-B	0.131	-	eye	4	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
4	TC53191	0.137	weakly similar to UP Q9PW81_CHICK (Q9PW81) Erythroid-specific folate receptor	whole embryo	43	
5	AU167966	0.148	similar to GP 7301740 gb AAF56852.1 CG1401-PA {Drosophila melanogaster}, partial (3%)	brain	7	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
6	BJ898743	0.157	-	-	5	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
7	BJ003907	0.177	similar to bA22I24.2.1 (GTP binding protein 2) {Homo sapiens}, partial (12%)	whole embryo	8	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
8	TC53294	0.179	similar to GB CAA39414 gamma m3 crystallin {Cyprinus carpio} (exp=-1; wgp=0; cg=0)	whole embryo, eye	291	A2暴露で上昇した上位20遺伝子に存在
9	TC61125	0.18	homologue to (Q670I2) CP readthrough protein, partial (2%)	whole embryo	12	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
10	TC52391	0.192	similar to RF XP_688101.1 68383333 XM_683009 similar to FLJ20171 protein {Danio rerio} (exp=-1; wgp=0; cg=0)	whole embryo, liver	11	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
11	BJ027804	0.197	-	whole embryo	21	
12	TC59956	0.198	similar to unknown {Haloarcula marismortui ATCC 43049} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (6%)	whole embryo	17	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
13	TC47993	0.199	similar to UP Q7SXT2_BRARE (Q7SXT2) Tetraspanin 7	whole embryo	3	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
14	AM141813	0.212	-	-	16	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
15	AU171077	0.226	-	brain	24	
16	AU168131	0.232	-	brain	20	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
17	AM137924	0.256	-	-	14	A2暴露で減少した上位20遺伝子に存在
18	TC50965	0.262	similar to UP Q5XTP3_BRARE (Q5XTP3) GammaM2b-crystallin (Crygm2b protein), partial (97%)	whole embryo	272	
19	TC54260	0.262	homologue to UP Q9W5Z9_FUGRU (Q9W5Z9) BAW, partial (24%)	brain, whole embryo	22	
20	BJ733523	0.27	-	whole embryo	38	

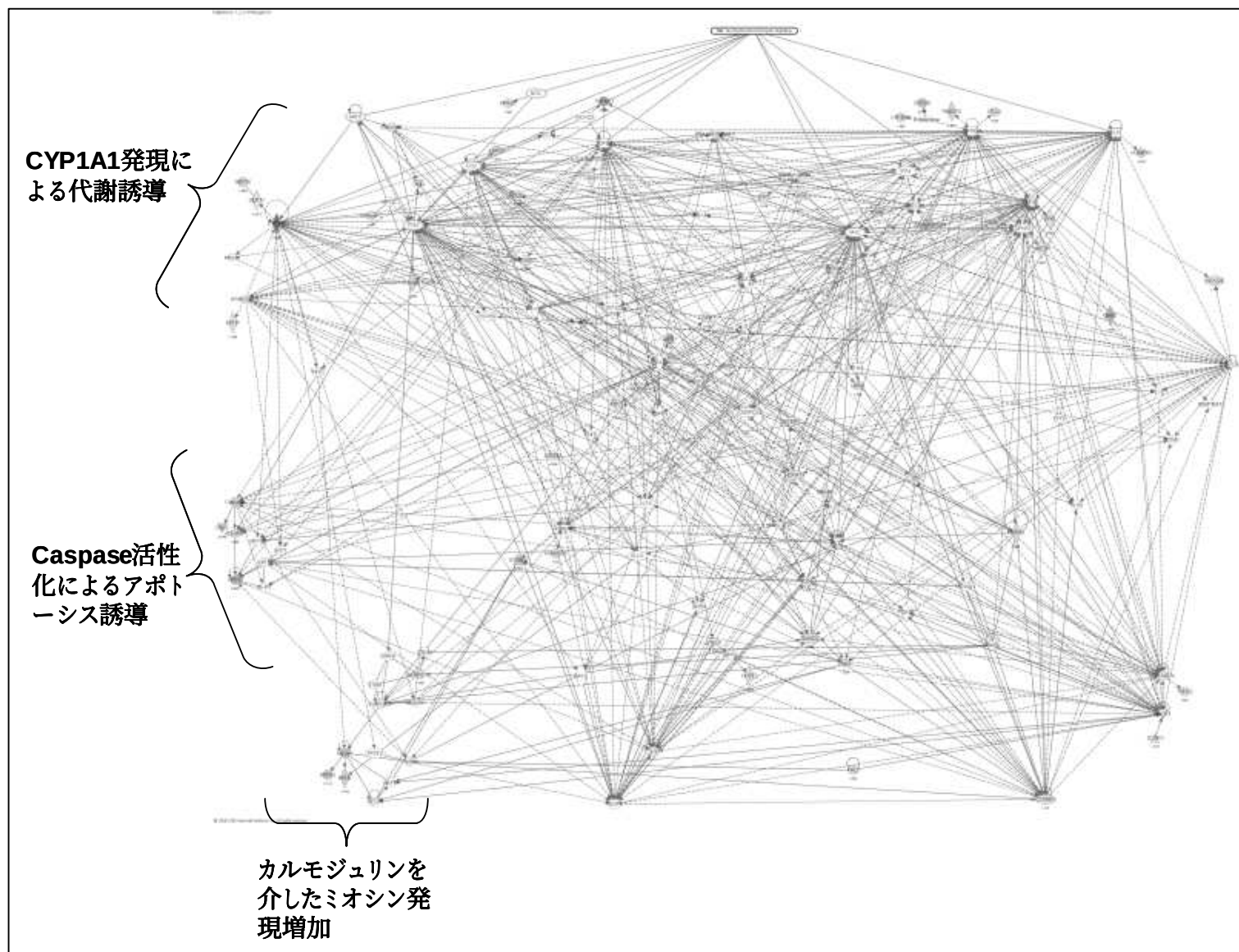


図3 選定 106 遺伝子による遺伝子ネットワーク解析結果.

水色の太線は AhR シグナル下流の遺伝子を示す。赤色は発現上昇を緑色は発現低下した遺伝子を示す。
無色は 106 遺伝子に含まれていない遺伝子を示す。