

ミジンコを用いた内分泌かく乱物質バイオモニタリング系の確立

大阪大学大学院工学研究科 教授

渡辺 肇

watanabe@bio.eng.osaka-u.ac.jp

研究の目的と背景

分析技術の発展により環境中に存在する人為的な化学物質について極微量からの定量が可能になっており、様々な化学物質が実際に環境水、土壌、大気中から検出されてきている。検出感度の向上に伴い、定点調査などでポジティブになる例も少なくない。そこで重要な問題になるのは、検出される量の化学物質がはたして地球環境の負荷になっているか、持続可能な社会発展を阻害する要因になっているか、という点である。特に生態系を含めた環境への影響を考慮した場合、重要なのは単に環境中の化学物質の正確な量ではなく、生物が影響を受けうるレベルか否かの判断である。このためには生物を用いてその応答を解析する必要がある。我々は環境指標生物として利用されているミジンコを対象として環境変化に応答する遺伝子群に着目し、環境中の化学物質の曝露との関連を解析している。こうした中で、環境水中に化学物質や金属が存在する場合、様々な遺伝子の発現が変化することが明らかになってきた。これら遺伝子の発現変化に必要な制御領域を利用し、蛍光を発する遺伝子の発現を制御できれば、簡便に環境変化を可視化するバイオモニタリングが可能となる。そこで本研究では、環境変化により蛍光を発するミジンコを作製し、バイオモニタリングとしての有用性を検討することとした。

研究内容

対象とする生物種としてオオミジンコ(*Daphnia magna*)を選択した。*D. magna*は世界的にも広く環境指標生物として認知され、豊富な毒性データの蓄積、飼育の容易さなど、多くの利点を有している。さらに*D. magna*はゲノムプロジェクトがほぼ終了し、配列も明らかになっており、環境変化を遺伝子応答から解析する上で適した生物種である。

検出対象の化学物質として、ホルモン様活性を有する化学物質に着目し、バイオモニタリングシステムの開発を試みた。環境中の化学物質は様々な活性を有するが、中でも内分泌かく乱作用を持つ化学物質は、内分泌かく乱物質と呼ばれ、生態系に及ぼす影響が懸念されている。本研究では、脱皮ホルモンであるエクジステロイドが環境水に存在すると蛍光を発し、モニタリングを容易にするミジンコの作製を行うこととした。

エクジステロイドの受容体は、エクダイソン受容体(EcR)と USP の2種の核内受容体の複合体であり、ホルモン応答配列はエクジステロイド応答配列 (EcRE) と呼ばれる。エクジステロイドが結合した EcR-USP の複合体は EcRE に結合し下流の遺伝子の転写が活性化される。この EcRE の制御下に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を挿入した。作製したプラスミド DNA をオオミジンコ初期胚に顕微注入した結果、GFP シグナルが検出され、そのシグナルは時間を経るごとに増強した。またこの GFP シグナルは、エクジステロイドのアンタゴニストにより消失することから、観察されるシグナルはエクジステロイド様活性によることが示唆された。またこのプラスミド DNA を顕微注入した初期胚をエクジステロイドを含む水に曝露した場合、GFP のシグナルは有意に増加した。このことから、このレポーター遺伝子は、内在性のエクジステロイド様活性だけでなく、加算的にエクジステロイド活性を検出できることが示された(Asada et al., 2014)。

今後の展開

本研究により環境指標生物として広く利用されてきたミジンコを1つのバイオモニタリング用のツールとして利用できる可能性が開けた。すでに我々が確立した遺伝子工学的手法を展開することにより、効率的にトランスジェニック系統を作製できるようになることが期待できる。本研究では水中のエクジステロイド活性を検出する系の構築を開始したが、今後ヒト型の核内受容体の応答システムなどをミジンコに導入することにより、さらに広範囲の化学物質に関して簡便なバイオモニタリング系の確立が期待できる。

参考文献

Visualization of ecdysteroid activity using a reporter gene in the crustacean, *Daphnia*. Asada M, Kato Y, Matsuura T, Watanabe H. Mar Environ Res. 2014 93:118-22.

生物を用いたモニタリングの必要性

- 環境中の化学物質検出頻度の上昇
= 環境の悪化？

実は測定精度の向上

例:ピペラジンの検出状況
水質調査(ng/l)

実施年度	検出頻度	検出下限値
S61	0/30	30,000
H20	12/93	4

生物学的な評価法が追随していない！

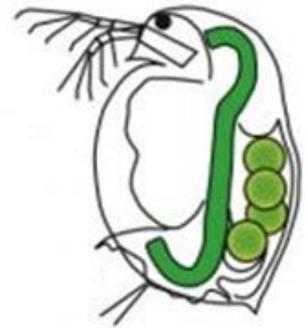
生物に影響のある濃度は？

生物応答から明らかにする必要

化学物質影響の予測にも重要

バイオモニタリングに必要な要件

- 飼育が容易
- 曝露が容易
- 高感度
- モニタリングが容易



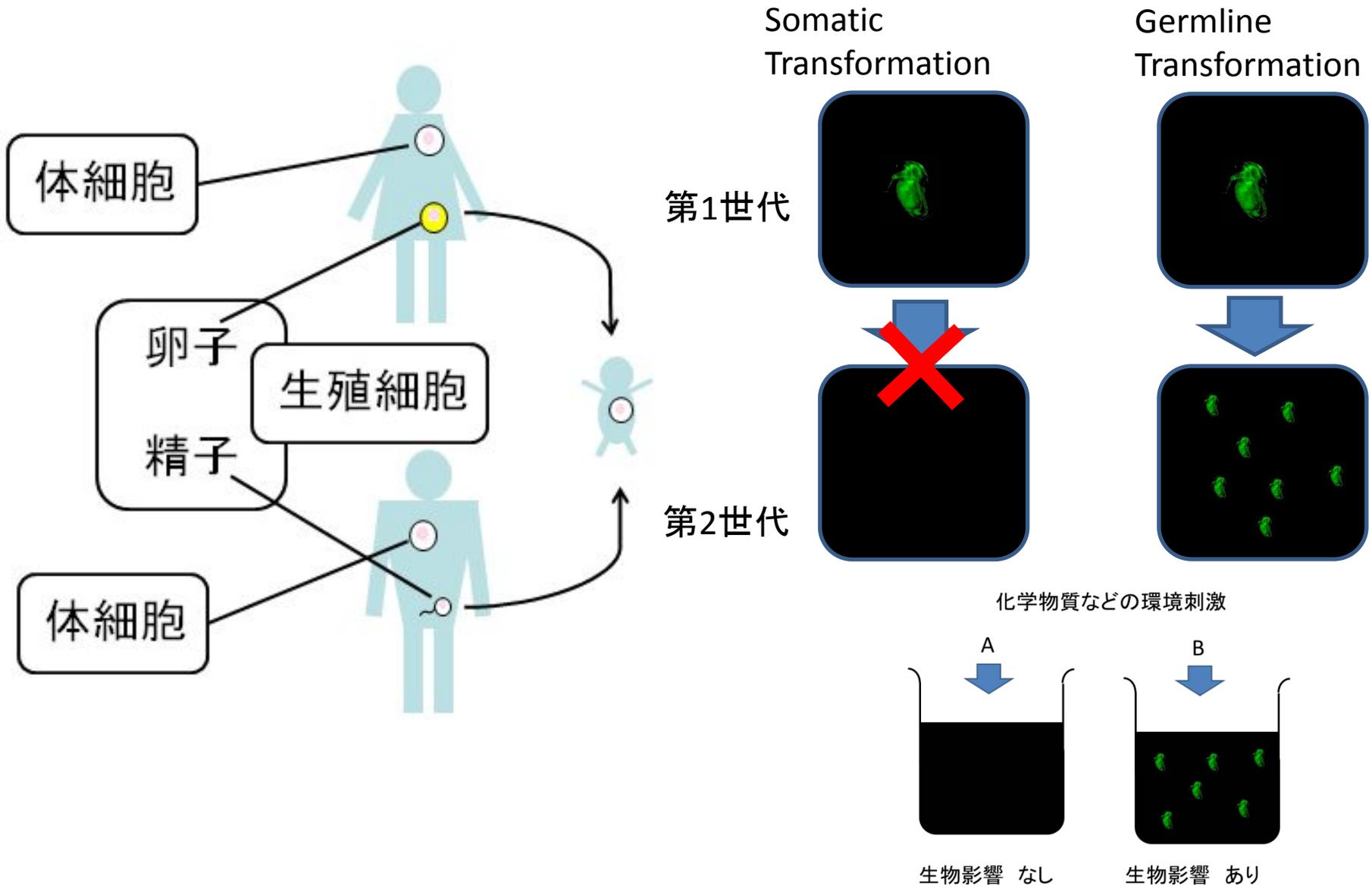
バイオモニタリング用ツールとしてのミジンコ

Daphnia magna: オオミジンコ

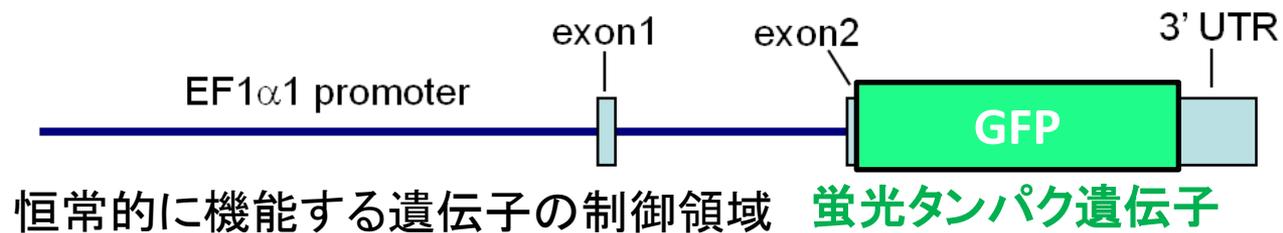
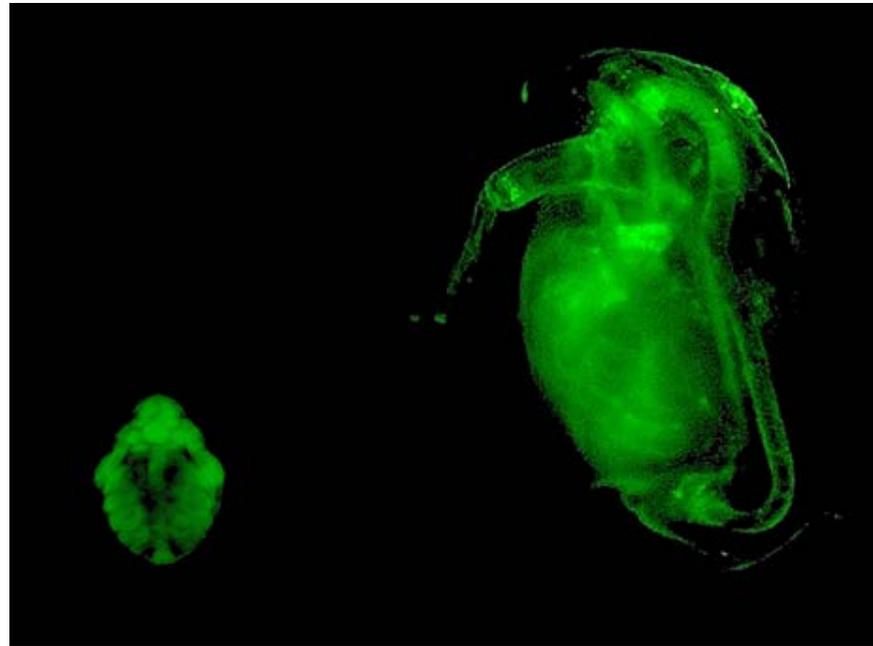


- 1) 飼育と取り扱いが容易
- 2) 増殖が速い
約5日で成熟、その後3日毎に産卵
- 3) 通常は単為生殖を行う
遺伝的に均一の個体を得られる
- 4) 体が透明である
解剖せずに、体の中の器官を観察できる
- 5) *In vitro* による発生が可能
発生過程を顕微鏡下で観察できる
- 6) ゲノムデータベースを利用可能
- 7) RNAiにより遺伝子機能解析が可能
- 8) 遺伝子導入が可能

開発における問題点 生殖系列細胞への遺伝子導入



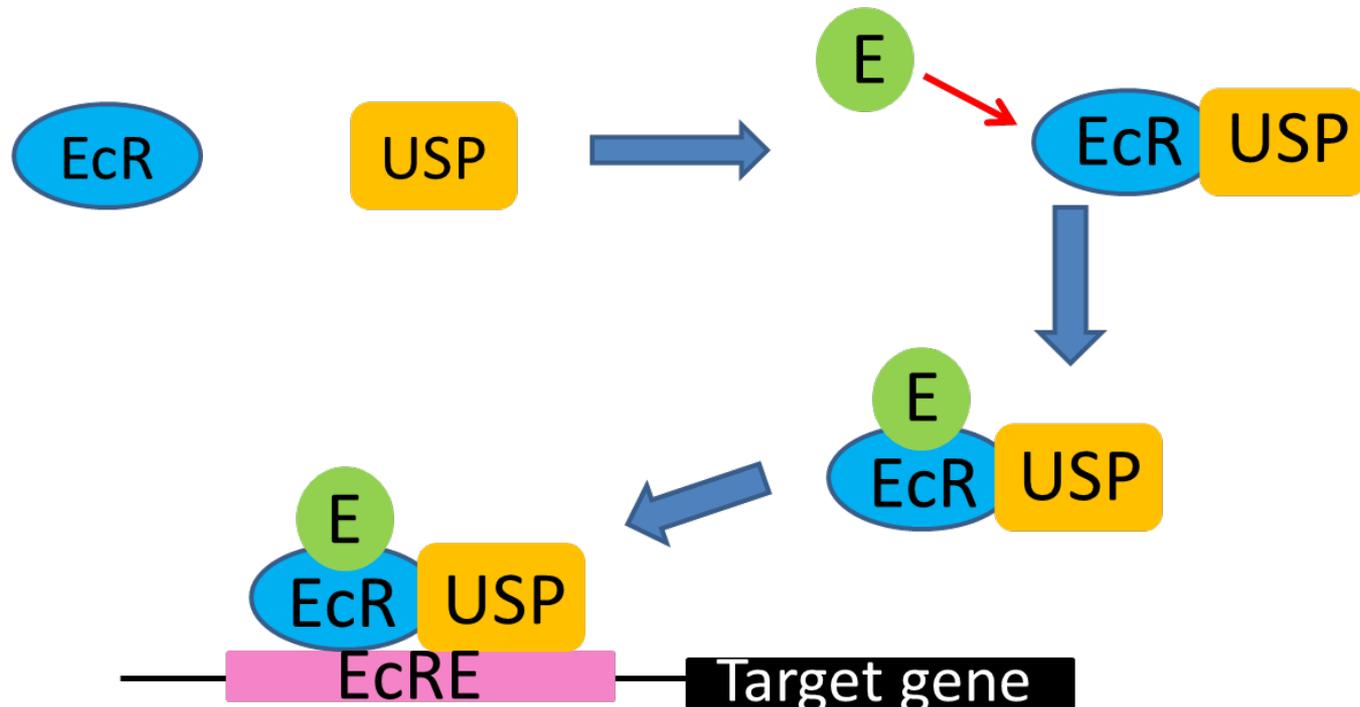
遺伝子工学的手法による改変 外来遺伝子の導入と発現に成功



エクジステロイド様化学物質に 対する生物応答

エクダイソン応答配列(EcRE)は明らかになっている。

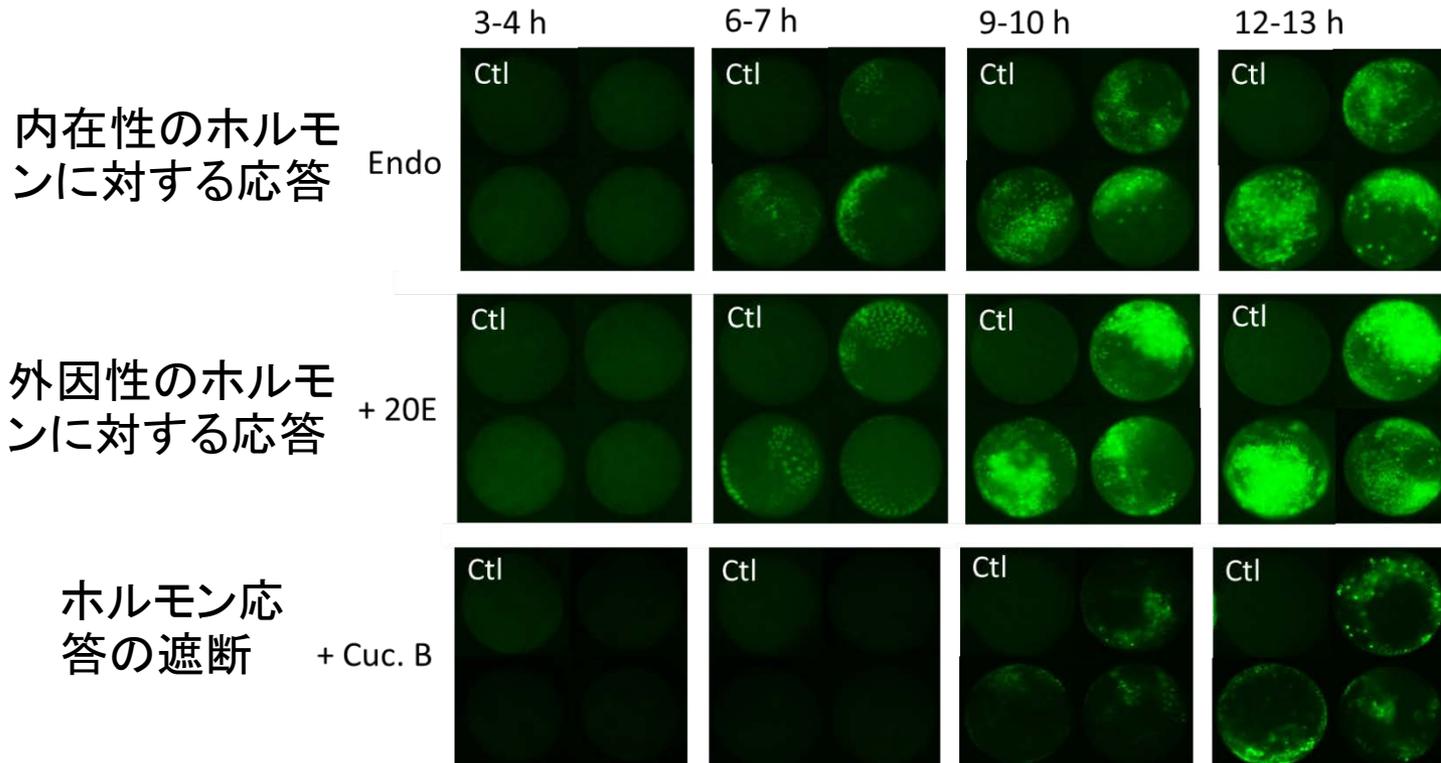
培養細胞系ではEcREがDaphniaのエクダイソン受容体と結合し、応答することを確認している。



EcR : Ecdysone Receptor USP : Ultraspiracle E : Ecdysone

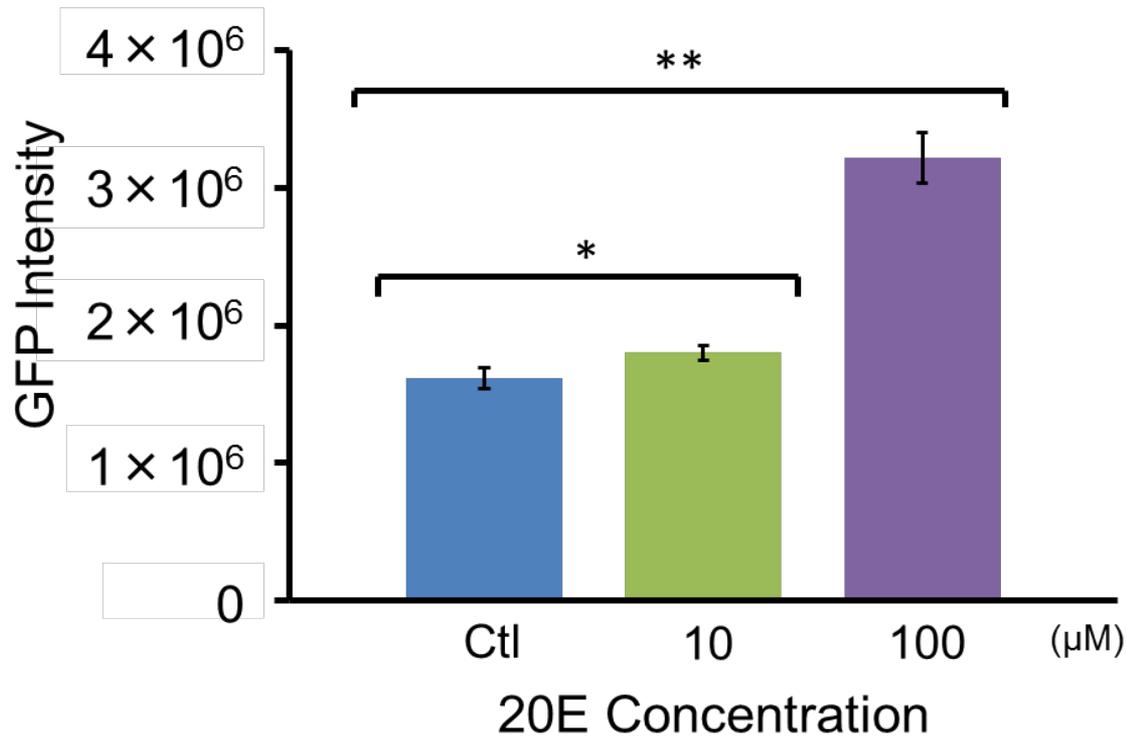
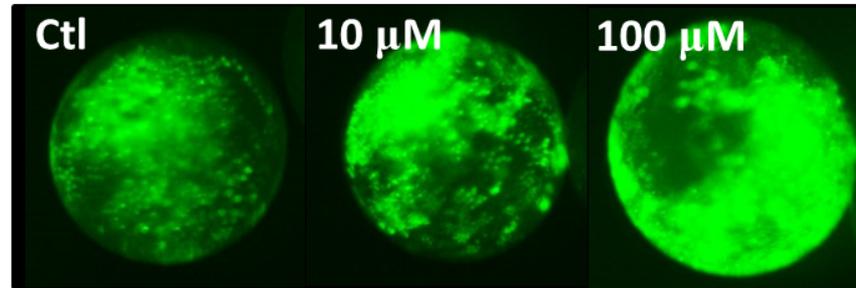
EcRE : Ecdysone response element

エクダイソンに対するレポーター遺伝子の応答

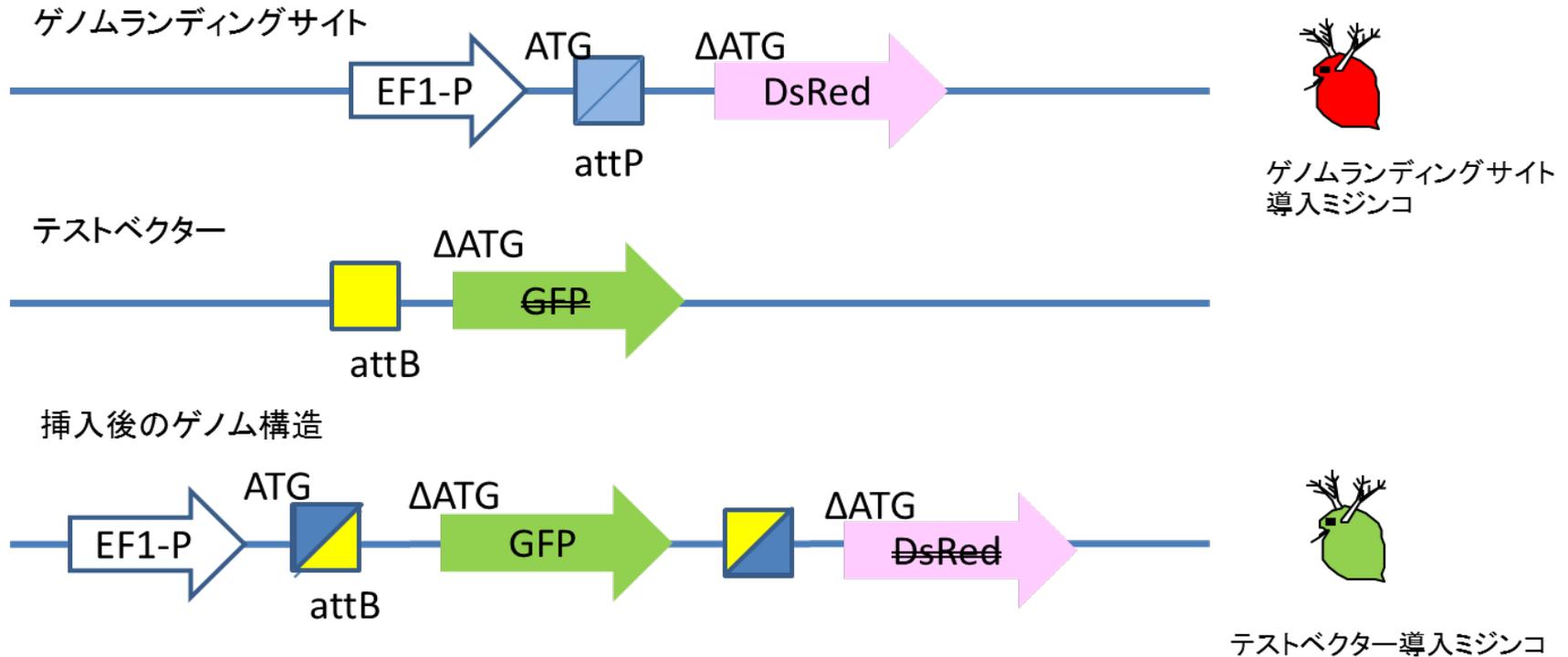


レポーター遺伝子を発生胚に注入 内在性、外来性のエクダイソンを検出
アンタゴニスト (Cuc. B) では応答が消失

レポーター遺伝子は環境水中の ホルモン濃度依存的に発光



遺伝子導入法の効率化



EF1-P: 伸長因子1-プロモーター

DsRed: 赤色蛍光タンパク質コーディング領域

GFP: 緑色蛍光タンパク質コーディング領域

attB, attP: インテグラーゼ認識配列

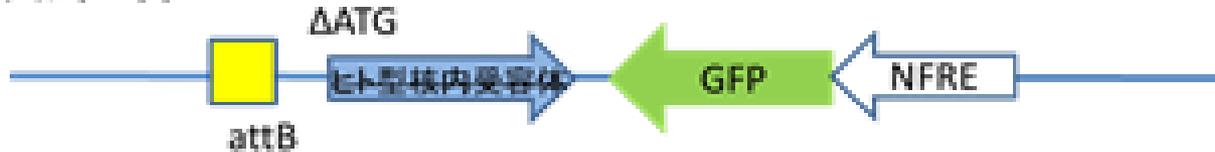
att配列をATGコドンをはさみインフレームになるようにし、挿入されると下流の遺伝子が発現するようにデザイン

ヒト型核内受容体の導入

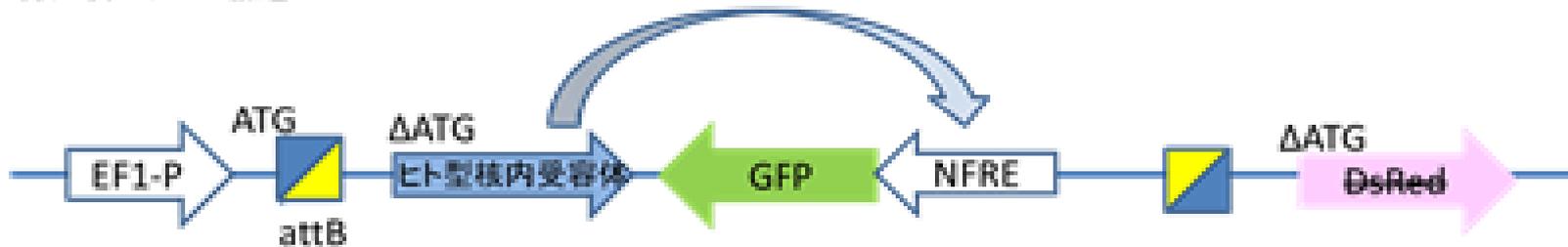
ゲノムランディングサイト



ターゲティングベクター



挿入後のゲノム構造

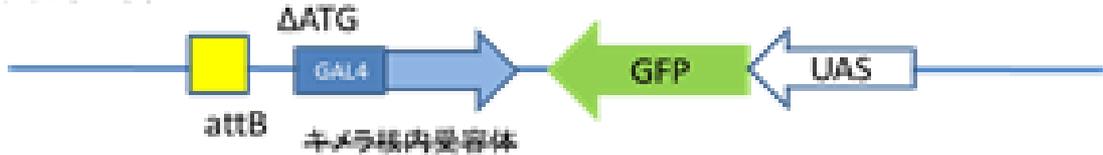


ヒト型キメラ核内受容体の導入

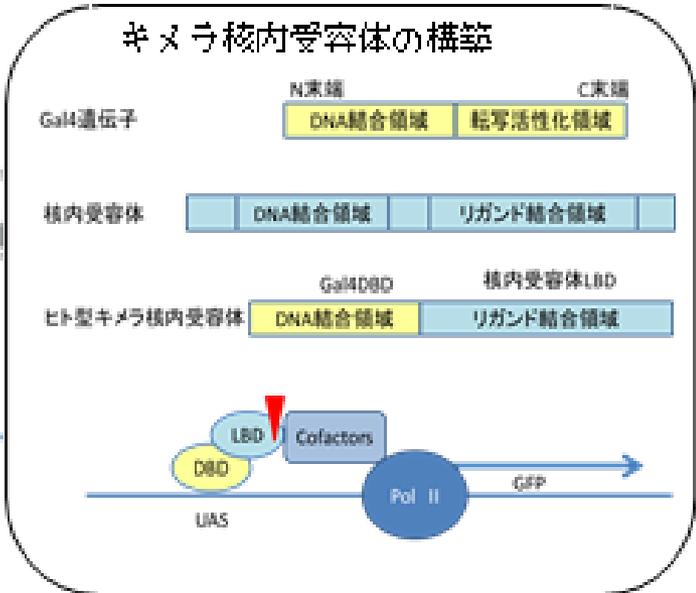
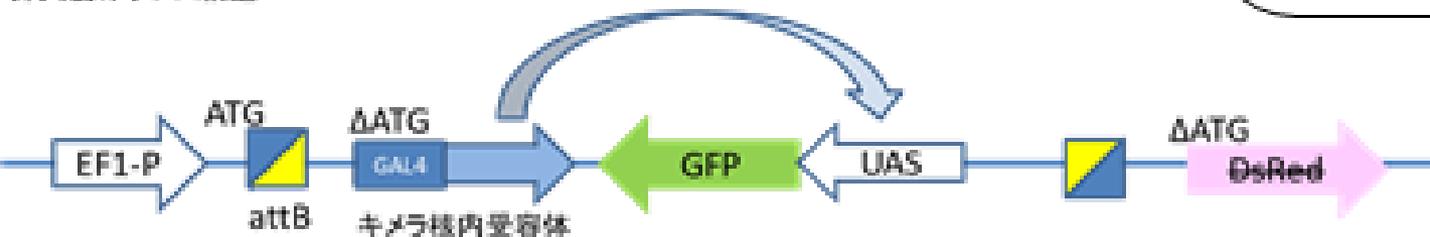
ゲノムランディングサイト



ターゲティングベクター



挿入後のゲノム構造



UAS: Gal4認識配列

