

The Self-fertilizing Fish *Kryptolebias marmoratus* and the Copepod *Tigriopus japonicus* as Experimental Models for Environmental Genomics

李 在 晟

現在までに内分泌かく乱物質による水生動物への影響に関して多くの生物学的な研究がなされている。しかし、特定の生物機能に対する影響を調べた例が殆どであり、生物種の生活史すべてにおいて網羅的かつ分子レベルでの知見は少ない。本研究では、水生生物における内分泌かく乱物質 (endocrine-disrupting chemicals: EDCs) および重金属等の化学物質が水生生物に及ぼす影響を評価する為、モデル生物種として魚類とカイアシ類を用いた。実験に用いた魚類は、マングローブ・キリフィッシュ (*Kryptolebias marmoratus* (2004年までは *Rivulus marmoratus*, リブルス科) 以下、キリフィッシュと略す)、カイアシ類は、チグリオプス (*Tigriopus japonicus*) である。以下にそれぞれの生物種の研究内容を記す。

キリフィッシュを用いた研究内容

キリフィッシュは機能的雌雄同体魚で、脊椎動物で唯一自家受精する生物として知られている。この特異性により本生物種は、生物学、生理学、発生生物学、およびゲノム科学の分野で研究が行われ、環境ゲノミクスや分子発がん研究に応用されてきた。また、キリフィッシュはいくつかの内分泌かく乱物質に感受性を示すことが知られているため、内分泌かく乱物質などの環境化学物質に対する作用機序を解明することを目的として生態毒理学の分野でも応用が進められている。

本研究では、キリフィッシュの内分泌かく乱物質の影響を分子生物学的な手法により評価するため、本生物種の全ゲノム塩基配列解析を実施した。この解析には、①発現遺伝子配列断片の解析、②遺伝子発現の差異を検出する逆転写 PCR、③次世代シーケンサーによる塩基配列解析、を行った。これらから得られた遺伝子配列より、卵膜の構成タンパク質の前駆体であるコリオジェニン (*Chg*) 遺伝子の内分泌かく乱物質に対する発現量の変化を詳細に解析した。雌雄同体魚であるキリフィッシュから *ChgH* および *ChgL* の2つの遺伝子をクローニングし、リアルタイム PCR を用いて内分泌かく乱物質に対する発現量の変化を調べた。これらの遺伝子は胚発生期において、ステージ1 (2 dpf) では低発現で、ステージ4 (12 dpf) もしくはステージ5 (孵化後5時間) で最も高い発現量であった。17 β -エストラジオール (E2)、ビスフェノール A、4-n-ノニルフェノールへの暴露に対して両 *Chg* の発現量は増加した。4-tert-オクチルフェノールは *ChgH* にのみ調節作用を示した。また、エストロゲン受容体の拮抗薬であるタモキシフェンに対しては両 *Chg* の発現量は変化しなかった。これらの結果より、キリフィッシュの *Chg* 遺伝子はエストロゲンに付随してその発現量が増加することからエストロゲン遺伝子の代替バイオマーカーとして環境水中の内分泌かく乱物質の影響調査に *Chg* 遺伝子が利用可能であることを見出した。

カイアシ類チグリオプスに関する研究内容

海洋生態系を対象として、環境汚染物質の影響評価試験を行う上で、無脊椎動物の重要な役割を支持する証拠が増加している。そして、毒性試験のモデル生物として、生態学的に有用で試験材料としても適した無脊椎動物の探索に膨大な労力が向けられて来た。ハルパクチクス目のカイアシ類であるチグリオプスは、この候補として有用な特徴を有している。一般にカイアシ類は広く海洋に分布しており、生態学上重要な生物群である。海洋の食物連鎖における本生物種の地位は、特にエネルギー移行に関して非常に重要である。また、カイアシ類は食物連鎖全体の水の汚染物質の輸送においても重要な役割を担っている。

本研究においてチグリオプスの EST 解析を行い約 26,000 の EST を得た。これらより約 6000 遺伝子を用いて Oligo DNA チップを作成し、Cu (10・g/L) に対するチグリオプスの影響をマイクロアレイで解析した。この結果、2313 遺伝子は発現量が増加し、3150 遺伝子は低下した。Cu により特に発現量が増加した遺伝子は cytochrome P450 類であり、逆に成長と発生に関与する遺伝子は低下した。これらの発現量の増減は、リアルタイム PCR で検証した。また、微量な金属に対する 10 種類の GST 遺伝子の発現量の変化を調べた結果、金属イオンに対して GST-*Sigma* の発現量が一番増大した。これにより、金属に対するバイオマーカーとして GST 遺伝子が有用であることを見出した。さらに、重金属と内分泌かく乱物質に対する Hsp70 遺伝子の応答を調べた。Cu、Ag、Zn およびビスフェノール A に対して Hsp70 の発現量は増大し、4-ノニルフェノール、4-tert-オクチルフェノールでは低下した。この Hsp70 の機能を調べるため、本遺伝子で大腸菌を形質転換し、熱耐性試験を行った。この結果、形質転換した大腸菌は熱耐性を示した。また、Hsp70 のプロモーター配列を解析した結果、生体異物応答配列を含んでいることが推定された。これらの結果より、チグリオプスの Hsp70 遺伝子は熱ストレスだけではなく、様々な環境ストレスに対して応答することで生体防御に関与していることが示唆された。遺伝子の発現等の解析だけでなく、本生物のゲノム配列を約 574 Mbp 解析し、約 11,000 の遺伝子 (E-value > 0.1; length > 200) 機能を推定した。

本研究では、これまで例のない海洋生物の大規模な遺伝子解析と全染色体塩基配列解析を行った。さらにこれらの膨大な塩基配列データを用いて内分泌かく乱物質や重金属などの化学物質に対する生物の応答を遺伝子レベルで詳細に明らかで、今後これらの成果を基にこれまで不明であった多くの海洋生物の網羅的なストレス応答研究が加速的に実施することが可能となった。