



平成20年10月16日

独立行政法人 放射線医学総合研究所

**放医研が独自開発した遺伝子解析法により、
環境生物トビムシの放射線応答遺伝子の同定に成功**

【概要】

放射線医学総合研究所（米倉義晴理事長）放射線防護研究センター環境放射線影響研究グループの中森泰三博士研究員らは、同研究所で開発された HiCEP（高カバー率遺伝子発現プロファイル解析、ハイセップと発音）※1法を、これまで遺伝子のほとんどわかっていなかった環境生物（トビムシ※2）に適用し、放射線応答遺伝子の同定に成功しました。従来、遺伝子がほとんど明らかにされていない生物では、ストレス※3 応答遺伝子の同定に膨大な労力を必要としました。今回の研究では、HiCEP 法を適用することで、遺伝子がわかっていない生物であってもストレス応答遺伝子を効率的に同定できることが示されました。本研究の成果は、放射線の生物影響の機構解明に寄与すると共に、様々な環境ストレス応答遺伝子の発現を指標にした環境ストレス診断手法の開発につながります。また、HiCEP 法の適用により、トビムシに限らず、あらゆる生物を対象にした環境ストレス診断のための遺伝子の発掘に道が拓けるものと期待されます。本研究の成果は、平成 20 年 9 月 15 日に米国化学会誌 Environmental Science & Technology 誌に掲載されました。

【背景】

人類は古くから、動植物の生態を注意深く観察することによって環境の状態を知り、これを予測しようとしてきました。環境汚染の評価にも、環境の変化に応じて変化する生物の種数や個体数（繁殖率）が指標として用いられてきています。近年、これらの指標に加え、遺伝子発現（遺伝情報に基づいてタンパク質が合成される過程の初期段階）の変化を用いて環境ストレスを読み取ろうとする試みに関心が寄せられています。遺伝子発現を指標とすることで、環境ストレスの検出だけでなく、ストレスの種類ごとに特徴的に起きる遺伝子発現により、個体数や種数に影響が現れるよりも早くどのような環境ストレスであるかということまでわかるようになると期待されているからです。

一方これを可能にするためには、まず生物の遺伝子中でストレスに応答するものを明らかにする必要があります。しかし、遺伝子の全容が明らかにされている生物はヒトやマウスなど非常に限られており、環境汚染評価に用いるものを含め、多くの生物では遺伝子情

報はほとんどわかっていません。そのため、そのような生物の場合、従来はたとえ少数であるとしてもストレス応答遺伝子を同定するためには、まず、膨大な数の遺伝子の塩基配列を決定し、その中からストレス応答性のものを特定する必要がありました。放射線医学総合研究所で開発された HiCEP 法は、一般的に遺伝子発現解析に用いられているマイクロアレイ等とは異なり、遺伝子情報が判っていないどのような生物を用いても網羅的に遺伝子発現を解析することが可能な技術です。この技術により、ストレスに対する遺伝子発現の変動を網羅的に解析した上で、目的とするストレス応答遺伝子を選んで同定するだけで済むようになり、研究の手間と時間が大幅に短縮されることになりました。本研究では環境ストレス要因の一つである放射線を代表的な土壌生物であるトビムシ（図 1）に照射し、それから抽出した遺伝子発現産物の解析に HiCEP 法を適用することで、トビムシ体内の放射線応答遺伝子の同定に成功しました。

【研究手法と成果】

代表的な土壌動物であるトビムシに、有害影響をもたらす線量である 4 および 26 Gy の放射線（Cs-137 線源の γ 線）を照射し（注 1）、照射後のトビムシから抽出した遺伝子発現産物の量的な変動を HiCEP 法で網羅的に解析しました（図 2）。HiCEP 法では、膨大な数のピークから成る波形データが得られます（図 3）。各ピークは各遺伝子に対応し、ピークの高さが遺伝子発現の量を示しています。HiCEP 法により得られる波形データは同一サンプルの解析における再現性が高く、毎回ほぼ同じ波形データを得ることができる一方、少しでも遺伝子発現が異なるサンプル間の差は顕著な波形の違いとして現れます。そのため、異なる線量の放射線を照射したトビムシの遺伝子発現の変動を比較する場合、それぞれの波形データを重ね合わせて比較するだけで、照射線量の増加に伴って発現レベルが上昇する遺伝子の探索ができます。

このようにして、発現している約 2 万の遺伝子の中から放射線応答性のある遺伝子を複数同定することに成功しました。これらの中には、新規遺伝子である可能性が高いものや、ヒトやマウスでは放射線による発現変動が知られていないものも見つかりました。

トビムシは、化学物質等の環境毒性評価や環境モニタリングに用いられる動物ですが、これまで遺伝子に関する情報はほとんどわかっていませんでした。今回の研究は、対象生物の遺伝子情報がわかっていなくても網羅的な遺伝子発現の解析を可能とする HiCEP 法の利点を最大限に活かした成果で、同様の遺伝子スクリーニングが、今回用いたトビムシに限らず、あらゆる生物をサンプルとして使用できることを示しました。

今回の成果は、放射線生物影響の機構解明に寄与するだけでなく、環境ストレスの生物への遺伝子レベルでの影響を迅速に検出できることを示したことにより、今後の環境生物を利用した環境汚染状況監視システムの開発・発展に繋がることが期待されます。



図1 トビムシ (オオフォルソムトビムシ *Folsomia candida*)

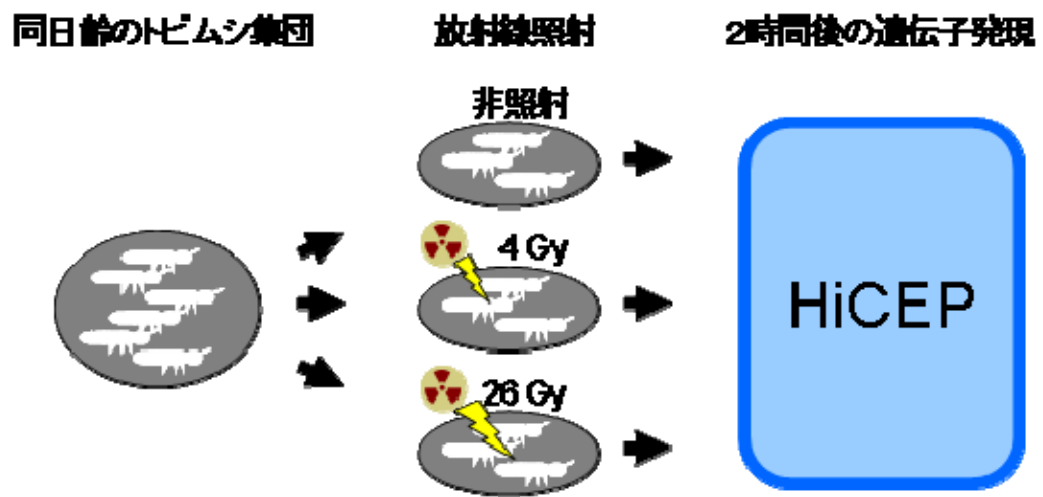


図2 実験方法

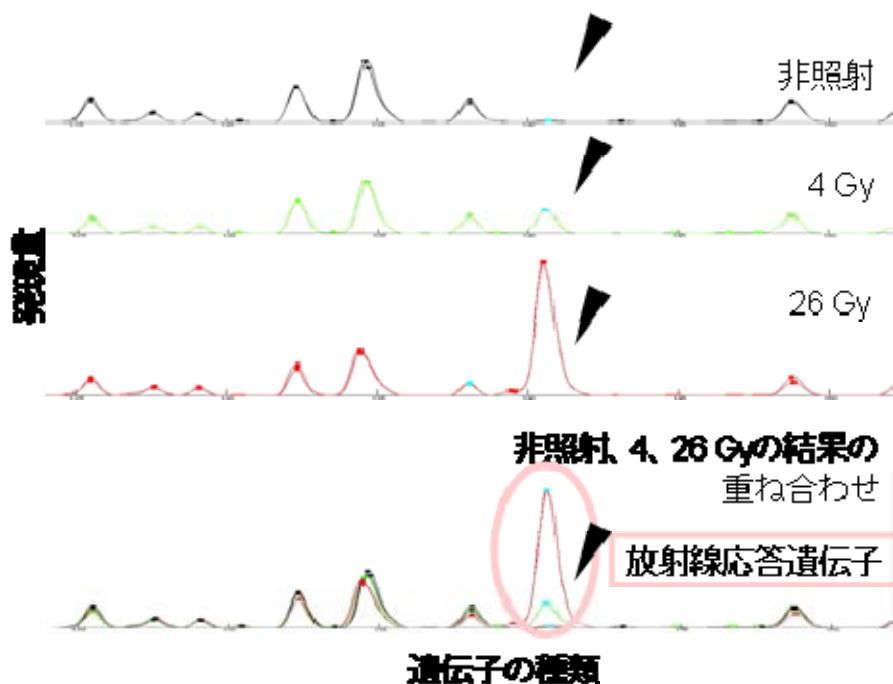


図3 HiCEP 法によるトビムシにおける放射線応答遺伝子の探索例

【今後の展開】

今回の研究から、HiCEP 法により生物のストレス応答遺伝子の同定が効率的に出来ることが分かりました。今後はさらに他の環境ストレスに応答する遺伝子の同定を進め、様々な環境ストレスを同時にモニタリングしていけるシステムを開発していく予定です。生物のストレス応答遺伝子の発現を指標にすることで、物理化学的手法では同時測定が困難な様々な環境ストレス要因を一度に測定し診断する「遺伝子発現による環境ストレスの診断」も可能になると期待されます。また、HiCEP 法の適用により、トビムシに限らず、それぞれの環境に適したあらゆる生物を対象にした環境ストレス診断のための遺伝子の発掘に道が拓けることが期待されます。

注1)本研究は、実際の環境中よりも高い線量の放射線を実験的に照射したものであり、現在、環境中でトビムシがこのような線量の放射線を受けているということではありません。尚、本研究で用いた 4 Gy と 26 Gy の放射線はトビムシの繁殖をそれぞれ 10%および 50%阻害する線量に相当します。

用語解説

※¹ HiCEP (高カバー率遺伝子発現プロファイル解析；ハイセップと発音)

安倍真澄博士（独立行政法人放射線医学総合研究所）らによって発明された技術です。原理は、遺伝子発現の際に作られるメッセンジャーRNA（mRNA）分子から人工的に合成した DNA 分子（cDNA）を、制限酵素（DNA の特定の塩基配列を認識して切断する酵素）で切断し、切断されて残った cDNA 分子の長さで遺伝子の種類の違いを区別し、定量するものです（図4）。各遺伝子は cDNA 分子の長により区別されるので、遺伝子情報のわかっていない生物にも適用できます。HiCEP 法は、技術改良によってこれに分解能・検出感度・再現性を補い、遺伝子発現の比較定量を可能にした方法です。細胞内の全転写産物の 70～80%を網羅する「高いカバー率」が達成されることから、High-Coverage Expression Profiling、HiCEP と名付けられました。

最近、膨大な塩基配列の解読をこなすことで、いろいろな生物種の遺伝子発現解析やゲノム解読を可能にする次世代シーケンサーに期待されています。何万種と存在する地球上生物すべてのゲノムを解読することは、世界的規模でいずれは行なわれるかもしれません。しかし、HiCEP 法は、効率的に有用な遺伝子資源を得ることができる利点があり、たいへん有力な方法です。

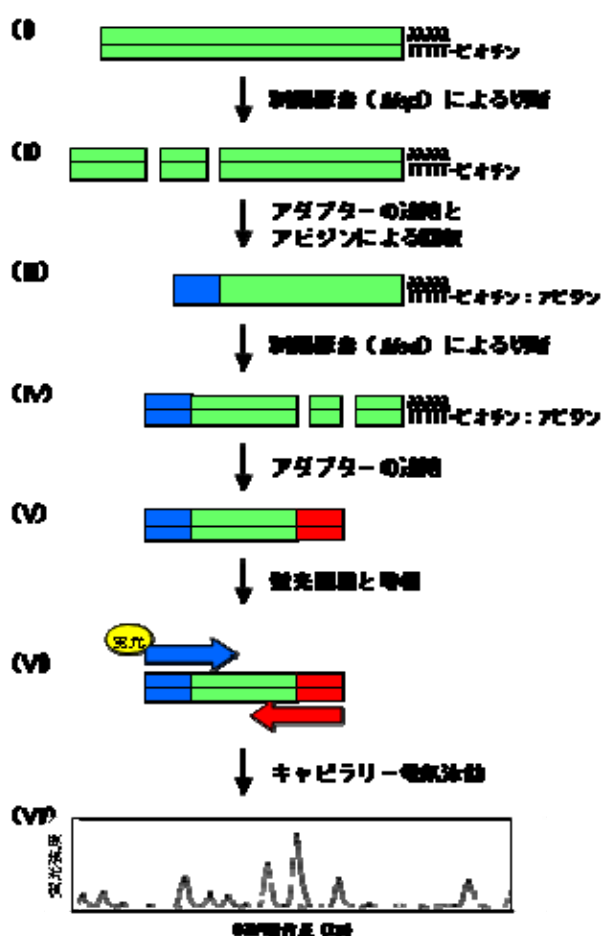


図4 HiCEP 解析の概略（ステップ I-VII）

(I) サンプルから RNA を抽出し、ビオチンを付加したオリゴ dT プライマー（真核生物の mRNA に付加されるポリアデニンと結合する DNA 鎖）を用いて RNA から二本鎖の相補的 DNA（complementary DNA: cDNA；緑色棒）を合成する。(II) 二本鎖 cDNA を制限酵素（DNA の特定の塩基配列を認識して切断する酵素；MspI）によって切断する。(III) 切断によって生じる DNA 断片の末端にアダプター（青色棒）を結合し、ポリアデニン側の断片のみをアビジン（ビオチンに対し親和性を持つ）を用いて回収する。(IV) 回収した DNA 断片を別の制限酵素（MseI）で切断する。(V) 切断によって生じる DNA 断片の新たな末端に別のアダプター（赤色棒）を結合する。このようにして、両末端に異なるアダプターを有する DNA 断片が各遺伝子につき 1 種類得られる。(VI) これらの DNA 断片をポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction: PCR）という方法で増幅すると同時に蛍光標識する。このとき、数万種の DNA 断片を 256 のグループに分ける工夫がなされており、これにより後の遺伝子の区別が容易になる。(VII) これらの増幅産物中の DNA 断片を、キャピラリー電気泳動にて長さごとに分離し、蛍光強度により発現量を検出する。各遺伝子は DNA 断片長により区別されるので、解析前に塩基配列データを必要としない。そのため、遺伝子情報のわかっていない環境生物にも適用可能である。Fukumura et al. *Nucleic Acids Research* 31, e94 (2003) を改変。

※² トビムシ

昆虫に近縁な、体長 1 mm 前後の翅の無い六本脚の節足動物です。陸上生態系のほとんどの土壤に生息しており、菌類やバクテリア、センチュウなどの微小生物を摂食し、アリやクモ、カエル、トリなどの多様な捕食生物のエサとなっています。トビムシは分布が広く、土壤にごく普通に見出されることから、環境汚染の評価に国際的に用いられています。例えば、国際標準化機構（International Organization for Standardization: ISO）によりトビムシを用いた化学物質の毒性試験方法が示されており、現在では、その試験方法をガイドライン化し、経済協力開発機構（Organization for Economic Cooperation and Development: OECD）に申請するための取り組みも始まっています。

※³ ストレス

ストレスとは、外的な要因によって引き起こされる生物の内的な状態のことです。ストレスによって誘発される生物内の変化の一連をストレス応答と言い、それに関わる遺伝子をストレス応答遺伝子と言います。ストレスの中でも土壤汚染などの環境要因によって引き起こされるストレスは環境ストレスと呼ばれています。

(問い合わせ先)

独立行政法人 放射線医学総合研究所

企画部 広報課

TEL : 043-206-3026 FAX : 043-206-4062

E-mail : info@nirs.go.jp

(研究に関すること)

独立行政法人 放射線医学総合研究所

放射線防護研究センター 環境放射線影響研究グループ

中森 泰三 博士研究員

TEL : 043-206-3158

E-mail : taizo@fml.nirs.go.jp