

線虫を利用した環境有害物質の生体影響評価システムの 開発

Development of novel bioassay system for evaluation of environmental toxic materials
using *C. elegans*

豊橋技術科学大学工学部・エコロジー工学系 助教授 浴 俊彦

Toshihiko Eki, Ph.D.

Associate Professor, Department of Ecological Engineering, Toyohashi University of
Technology

潜在的に環境汚染の原因となる有害物質の検出・評価を目的として、モデル生物である線虫を用いた研究を行った。線虫はヒトと同様の多細胞生物であるにも関わらず、実験的に容易に寿命の測定ができるという優れた特長を持っている。本研究では、生物の生死を指標とする従来型の評価法に代わりうる、線虫の発生や寿命への影響を指標にした新規な有害性評価法の確立を目的とした。有害物質を含む寒天培地で飼育した線虫集団の生存曲線に基づいて寿命の評価を行った結果、重金属（銅、カドミウム）や洗剤による顕著な発生遅延と寿命の短縮が観察され、本法が重金属や界面活性剤の有害性評価に適用可能であることが示された。一方、変異原性物質（アルキル化剤）に対しては、低中濃度域で寿命への短縮効果は軽微であった。そこで変異原性物質の有害性検出感度の向上を目的に、feeding RNA 干渉(RNAi)法による DNA 修復遺伝子群の機能抑制に関する検討を行い、線虫寿命への影響評価を同時に進めた。今後、RNAi を利用した実験系の改良を進めることで検出感度と特異性を向上できると考えられる。

I studied on a novel assay system for detecting toxicity of reagents using nematode *C. elegans*. The nematode is a representative multicellular organism like human, and we can easily measure a lifespan of nematode to allow us to study experimentally any factors affecting a lifespan of organism. In this study, I tried to establish a novel assay system based on monitoring influence of toxic materials in nematode lifespan and development, which can be replaced to current live-or-death-based toxicity tests. The lifespan of nematodes cultured with heavy metals (copper, cadmium), or detergent was significantly reduced and development of lava was inhibited in a concentration dependent manner, suggesting that this system may be applied for detection of contaminated heavy metals and detergents. On the other hand,

reduction of lifespan of nematode treated by alkylating reagent (i.e., mutagen) was not so significant. Thus, I am applying the feeding RNA interference (RNAi) technology to reduce DNA repair activity, which could make the nematode more sensitive to DNA damages and the system more sensitive and specific to mutagen.

【研究目的】

環境汚染を防止するための重要な予防的手段の一つとして、効率的な化合物の有害性評価法の導入が期待されている。また産業界においては欧州を中心に製品に用いられる化学物質の有害性を厳密に問う機運が高まっている。物質の有害性評価には、これまでバクテリアやミジンコなど水棲生物の生死を基準とした評価法が適用され、そこから導かれた数値LD50（50%致死量）などが有害性の指標として利用されてきた。しかしながらこのような急性毒性による生死判定試験のみでは、現在、社会的に懸念されている複合的で長期（年単位）に渡る生物影響を本当に評価できているか疑問が残る。そのためにはマウスなどを用いた評価試験が考えられるが、年単位の時間と多大なコストが必要であり、テストできる化合物の数は限定される。また動物愛護の観点からも問題がある。そこで本研究では寿命の測定が容易で遺伝子操作も可能な多細胞生物である線虫(*C. elegans*)を材料に選び、その個体寿命に及ぼす影響（寿命の短縮）を新たな指標とする有害性評価法の開発を目指した。

【研究経過】

産卵期にある線虫（野生型 Bristol N2 株）をアルカリ・ブリーチ法により同調した線虫の幼虫集団を得た。線虫の培養は NGM 寒天培地を含む 6cm 径のディッシュをパラフィルムで封じて使用した。2xYT 培地で培養した大腸菌 OP50 株を遠心で濃縮し、培地の中心付近に円状に滴下したものを線虫の餌として与え、20 度で無菌的に飼育を行った。試薬を添加する場合は、寒天培地に終濃度になるようにあらかじめ加えた。有害試薬の濃度が高くなると飼育中の線虫がディッシュ外に逃げってしまうため、餌の周囲を結晶化したパルミチン酸で囲むことで線虫の逃亡を抑制した。なおパルミチン酸による線虫寿命への影響はないことは確認済みである。寿命測定のための飼育には大腸菌を塗布し、25 μ M 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR)を添加した NGM 培地を使用した。FUdR は線虫の産卵を抑制し、寿命測定の妨害となる子孫線虫の混入を抑えるために使用した (FUdR による寿命への影響はない)。飼育中の集団について、継時的（一日おき）に実体顕微鏡により観察することで各線虫個体の生死を判定し、線虫集団の生存曲線を描くことで行った。各濃度グループあたり 30 匹から 70 匹の線虫

を用いた（ディッシュあたり約 10 匹）。
 生死は運動性の喪失により判断したが、
 形態的にも容易に判別可能である（死ぬ
 と透明になる）。

発生への影響評価については以下の手
 順で行った。すなわち、産卵期に入った
 線虫を 24 時間、各濃度の試薬と大腸菌を
 含む NGM 寒天培地にて飼育した後、新し
 い寒天培地に移して 8 時間飼育し、受精
 卵を産卵させた。その後、受精卵から発
 生した子孫線虫群の体長を継時的に測定
 することで、線虫の発生・成長のモニタ
 ーを行った。本研究では、環境汚染およ
 び生物学的影響の観点から重要と考えら
 れる重金属類、界面活性剤および変異原
 性物質をテスト物質として評価を行った。
 重金属として銅とカドミウムを、界面活
 性剤として市販の洗剤、また変異原性物
 質として代表的なアルキル化剤である
 methyl methanesulfonate (MMS)を用いた。

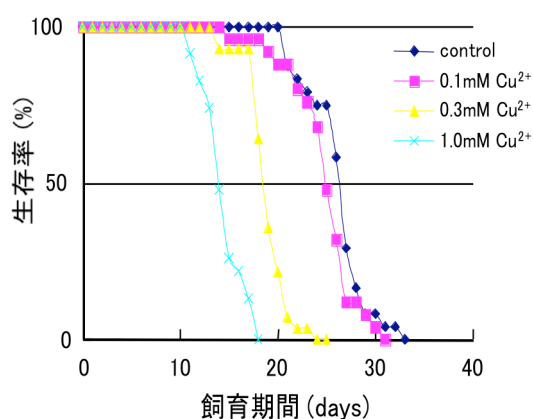


図1 銅イオンによる寿命への影響評価

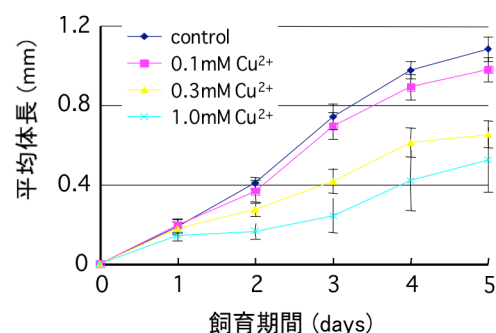


図2 銅イオンによる発生への影響評価

銅イオン（硫酸銅）による線虫の寿命
 短縮および成長阻害が 0.1mM 以上の濃度
 域で観察された（図 1, 2）。阻害の程度は
 濃度依存的であり、二種類のアッセイ系
 においてパラレルであることが判明した。
 データは示さないが、カドミウムにおい
 ても同様の結果を得た。また主要な水環
 境汚染の原因である洗剤でも同様の顕著
 な寿命短縮効果が認められた（図 3）。

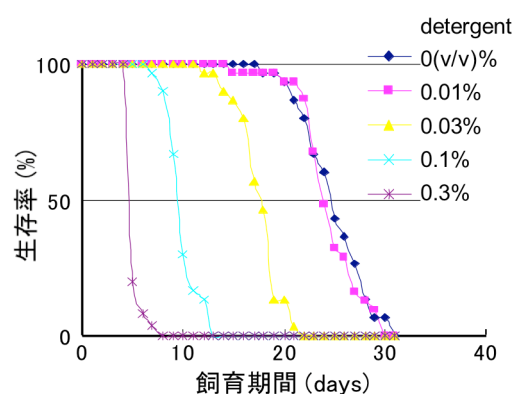


図3 洗剤による寿命への影響評価

一方、アルキル化剤(MMS)による寿命短
 縮効果は 0.1%(w/v) 以上の濃度域で認め
 られた（図 4）。低中濃度域においては、
 成長阻害効果を含め殆ど影響は認められ
 なかった。

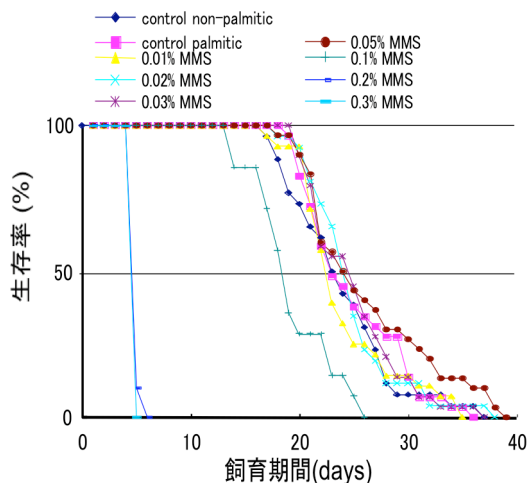


図4 アルキル化剤による寿命への影響評価

現在、変異原性物質の検出感度を向上させる目的で、RNAi 法を用いた本アッセイ系の改良を進めている。RNAi 法により DNA 修復遺伝子機能を抑制することで、変異原性物質に対する感受性や特異性を高めることが期待できる。継続的に給餌 (feeding) を介して線虫に RNAi を誘導できる feeding RNAi 法を適用することで、長期間にわたり遺伝子機能抑制状態を達成できると考えられた。そこで寿命支配遺伝子である *daf-16* 遺伝子と *daf-2* 遺伝子に対する feeding RNAi 処理線虫の寿命測定実験を行った結果、各々寿命が半分に短縮あるいは 1.3 倍に延長したことから、本実験系により期待通りの遺伝子機能抑制効果を達成できることが実証された。現在、DNA 修復遺伝子群の機能抑制線虫を用いて寿命測定実験を進めている。本研究では、寿命測定実験とは別の原理に基づく評価法として、ストレス応答プロモータの支配下にある GFP 発現線虫を用いた有害性評価法の検討も並行して行った。しかし、期待通りのストレス (熱

ショックなど) による発現誘導は検出されたが、応答の特異性は低く、プロモータの種類を検討が必要と考えられた。

【研究成果】

線虫個体の寿命および発生・成長に与える影響を指標とした有害物質の評価法の検討を行った結果、本法が重金属や界面活性剤の有害性評価に適用できることが実証された。また feeding RNAi 法を併用することで、本系で比較的検出の困難な有害物質に対しても検出感度と特異性を向上できる可能性が示された。

【今後の課題と発展】

(1)本系を様々な有害物質 (農薬、有機溶剤、排ガス成分など) に適用できるか、あるいは複合的な有害性の評価に適用可能か検討すること、(2)RNAi 法と組み合わせた実験系の感度と特異性の向上を進めること、以上の二点が今後の課題である。

【発表論文リスト】

(国内学会発表)

1. 中村正晴, 大懸俊康, 安藤瑠美, 和田茜, 林 理恵, 花岡文雄, 浴 俊彦「線虫のゲノム安定化に関与する新規ヘリカーゼ様遺伝子の機能解析」日本分子生物学会第 27 回年会 (神戸) 2004 年 12 月
2. 原田浩明, 林 理恵, 市川康平, 浴 俊彦「ゲノム傷害による線虫の個体寿命に及ぼす影響に関する研究」日本薬学会第 125 回年会 (東京) 2005 年 3 月