

遺伝子導入魚を用いた環境モニタリング手法の開発

Development of Monitoring Method for Aquatic Environment Using Transgenic Zebrafish

天沼喜美子*, 青木 康展
KIMIKO AMANUMA and YASUNOBU AOKI

国立環境研究所・化学物質環境リスク研究センター 〒305-8506 つくば市小野川16-2

* TEL: 029-850-2448 FAX: 029-850-2588

* E-mail: amanuma@nies.go.jp

National Institute for Environmental Studies, Research Center for Environmental Risk, 16-2

Onogawa, Tsukuba 305-8506, Japan

キーワード: 遺伝子導入魚, 変異原性, 環境モニタリング

Key words: transgenic fish, mutagenicity, environmental monitoring

(原稿受付 2005年6月30日/原稿受理 2005年7月19日)

1. はじめに

水はすべての生き物の生命維持に必須であり、水環境の汚染は、そこに棲む水生生物はもちろん、飲料水として利用する多くの生物に有害な影響を及ぼす。汚染による有害性のなかでも変異原性、すなわち“遺伝子に突然変異を誘発する性質”は、発がん性に関連が深いうえ、生殖細胞に起きた突然変異は世代を越えて伝わることもあるため、水環境の変異原性のモニタリングは重要な課題となっている。水の変異原性は、これまで主に微生物の復帰突然変異を利用したエームス試験によって調べられており、変異原性が検出されるケースが少なからずあることが報告されている。微生物に対して変異原性を示す水は、脊椎動物である魚類の遺伝子にも突然変異を起こすのであろうか。魚類は、環境汚染のモニタリングによく使用されており、魚類を個体ごと被検溶液に曝露したときの変異原性を検出できれば、変異原性のモニタリングに有用である。そこで、我々は、変異原性検出遺伝子を導入した遺伝子導入ゼブラフィッシュ(図1)を作製し、魚の個体内で生じる突然変異(in vivo mutagenicity)を解析できる検出方法を開発した²⁾。現在、環境モニタリ

ングへ応用するための第一歩として、典型的な変異原物質を用いた検出系の検証を行っているので紹介したい^{2-4,14)}。

2. 遺伝子導入魚開発の背景

我々が水源として主に利用している地表水には、大量の工業排水や生活排水が流入している。工業排水には水質汚濁防止法による排水基準があり、ヒトに対する毒性をもつ鉛やカドミウムなどの重金属、農薬類などには基準値がもうけられているが、変異原性については基準値が設定されるには至っていない。

水の変異原性の検出は、これまで、主にエームス試験を用いて行われてきた。エームス試験は、サルモネラのヒスチジン要求性突然変異株を用いて被検物質による復帰突然変異を検出する方法である。変異原性(mutagenicity)とは、“遺伝子に突然変異を誘発する性質”であるが、「環境試料に変異原性が検出された」という表現は、ほとんどの場合、エームス試験で陽性と判定されたということである。実際の環境試料中にとどの程度変異原性が検出されているかについては、大江らが、1990年から最近までの世界中からの128報にも及ぶ論文を総説¹⁶⁾にまとめているので参照されたい。この報告によると、地表水サンプルの10~30%にエームス試験を用いた変異原性が検出されている。しかしながら、変異原性を担う物質が何であるか、分析可能な既知の変異原物質では説明できない場合がほとんどである。その理由として、変異原性を示す数多くの物質が低濃度で存在するために、個々の物質としての同定が難しいからであると考えられている。

エームス試験は、簡便で再現性のよい優れた方法であるが、単細胞生物であるサルモネラと、様々な臓器を備



図1. 遺伝子導入ゼブラフィッシュ。

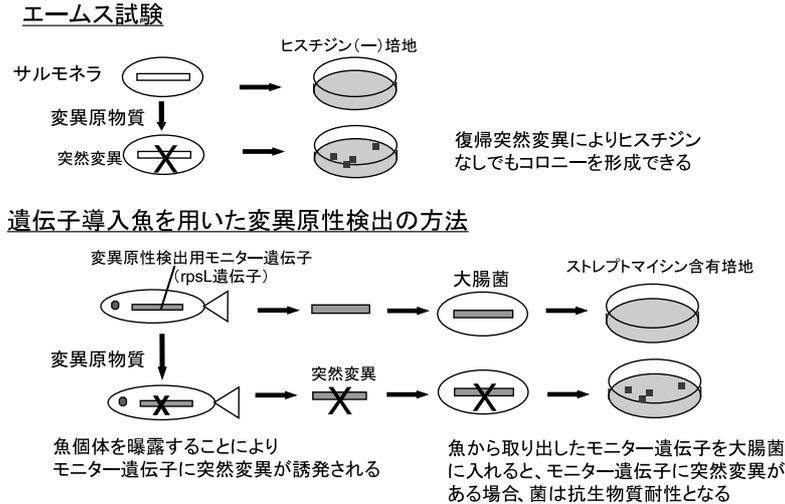


図 2. エームス試験と遺伝子導入魚を用いた変異原性検出法の比較。

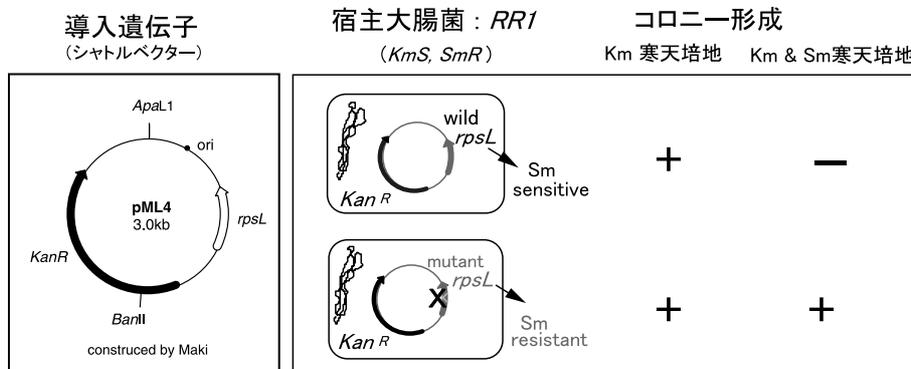
えた脊椎動物としては、大きな隔りがある。また、魚個体を用いて遺伝子障害性 (genotoxicity) を調べる方法としては、小核試験¹¹⁾ やコメットアッセイ¹²⁾ があるが、これらは DNA の切断や染色体異常などのおおまかな傷害を検出する方法であり、誘発された突然変異を定量化し、塩基配列レベルで解析するためには、新たな方法の開発が必要であった。齧歯類を用いてヒトに対する発がん性を調べてきた研究者にとっても微生物を用いるエームス試験と哺乳類とのギャップは大きく、動物個体を用いて化学物質の変異原性を検出できたという強い要望から、1990年前後に変異原性検出用のモニター遺伝子を導入した遺伝子導入マウスが開発された¹³⁾。同じころ、熱帯魚のゼブラフィッシュで遺伝子導入系統が作製可能であることが報告された¹⁷⁾。そこで、我々は変異原性検出用のモニター遺伝子を導入した遺伝子導入魚の作製に着手し³⁾、5年余の歳月を掛けて変異原性検出用の遺伝子導入魚系統の確立に成功した²⁾。この遺伝子導入魚を用いると、魚個体を被検物質溶液に曝露した後に、化学物質の吸収、分布、濃縮、排泄、細胞内での代謝活性化、分解、DNA 修復等を経た結果として、魚の臓器の DNA に生じた突然変異を、エームス試験同様に寒天培地に形

成されたコロニーとして検出できることになる⁶⁻⁹⁾ (図 2)。

3. *rpsL* 遺伝子導入魚を用いた変異原性検出方法²⁾

図 3 に遺伝子導入魚の作製に用いたプラスミド pML4¹¹⁾ を示した。我々の確立した遺伝子導入魚系統では、このプラスミドが同一方向に複数つながって、染色体の一本 (おそらく一カ所) に組み込まれていると考えられる。組み込まれたコピー数はハプロイドゲノムあたり約350で、世代を超えて受け継がれ、我々は既に10世代以上にわたって維持し続けている。変異原性を検出するときには、この組み込まれたプラスミドを、魚のゲノムから取り出して再びプラスミドの形にして大腸菌に導入する。いったん魚に組み込んだものをまた取り出すことから、このようなプラスミドはシャトルベクターとも呼ばれる。

変異原性検出の具体的手順を図 4 に示した。被検溶液への曝露には、胚か成魚を用いる。胚を用いる場合は、遺伝子導入魚を非遺伝子導入魚と掛け合わせて受精卵を得て、これを24時間胚にまで発生させ、約150個を1群として、10 ml の被検物質溶液に入れて曝露する。



$$\text{突然変異頻度 (Mutant frequency)} = \frac{\text{Km \& Sm 培地に生えたコロニー数}}{\text{Km 培地に生えたコロニー数}}$$

図 3. 遺伝子導入魚作製に用いた導入遺伝子と変異原性検出の原理。

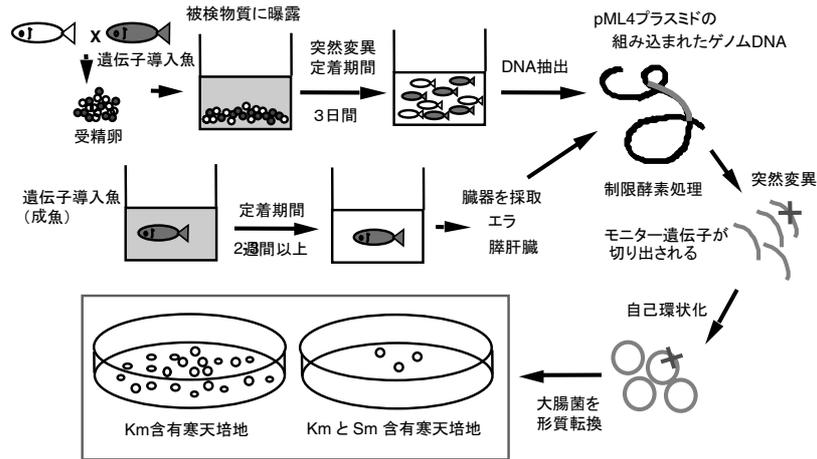


図4. 遺伝子導入魚の胚や成魚を用いた変異原性アッセイの模式図。

成魚の場合は、1匹あたり数 100 ml の溶液中に泳がせて曝露する。曝露後、適切な期間おいてから、胚の場合は150匹をまとめて、成魚の場合は臓器別にあるいは一匹まるごとからゲノム DNA を抽出する。このゲノム DNA を制限酵素処理後、自己環状化すると、魚個体内に組み込まれていた pML4 が、環状プラスミドとして回収される (図4)。

変異原性モニター遺伝子 *rpsL* に生じた突然変異は、図3に示すようにして検出される。*rpsL* 遺伝子は、大腸菌のリボソーム蛋白質の1つをコードしており、カナマイシン (Km) 耐性遺伝子 KanR はこのプラスミドで大腸菌を形質転換するときのマーカー遺伝子である。この pML4 を、Km 感受性かつストレプトマイシン (Sm) 耐性の大腸菌 RR1 に導入することにより、以下のように *rpsL* に生じた突然変異を検出できる。pML4 を大腸菌 RR1 に感染させると、Km 耐性の性質が優性であるため Km を含むプレートにコロニーを形成する。このとき、プラスミド上の変異原性検出モニター遺伝子 *rpsL* 中の突然変異の有無によって Sm に対する感受性が変わる (*rpsL* が正常であると Sm 感受性の性質が優性であるため、RR1 は Sm を含むプレートにコロニーを形成できないが、*rpsL* に突然変異があると、Sm 耐性となって Sm を含むプレートにコロニーを形成する) ため、突然変異を検出できる。突然変異頻度は、Km プレートに生えたコロニー数を分母に、Km & Sm プレートに生えたコロニー数を分子にとった数として算出される。

4. 胚を用いた変異原性の検出

本遺伝子導入魚を用いて変異原性が検出できるか確かめるために、24時間胚に、強力な変異原物質であるエチルニトロソウレア²⁾ や *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG)⁴⁾ を曝露した。すると、図5に示すように濃度依存的に突然変異の頻度が上昇し、変異原性を検出できることが確認された。また、水環境中に存在する変異原物質として知られるベンゾ (a) ピレンなどの曝露によっても突然変異頻度が上昇した^{2,3)}。

胚を用いた検出系には、発生異常を観察できる、曝露容量が少なくすむなどの利点がある。また、同じ遺伝

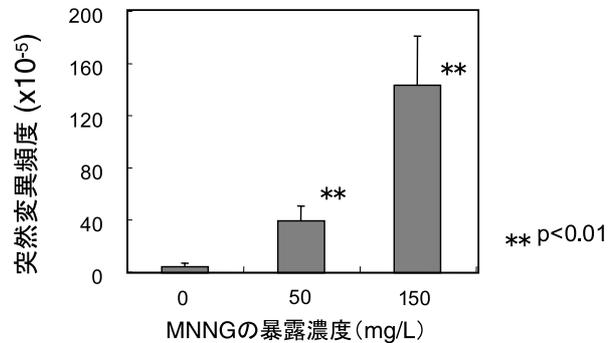


図5. MNNG 曝露によって遺伝子導入魚の胚に誘発された突然変異の頻度。受精後24時間の胚に1時間曝露後、3日目に変異原性の検出を行った。

子導入魚から何度も採卵できることも、胚を用いる大きな利点である。しかしながら、胚から稚魚への飼育維持には手間がかかることから、長期曝露にはあまり適していない。一方で、成魚は飼育維持が容易なので、化学物質の低濃度、長期曝露に適しており、本遺伝子導入魚の環境サンプルへの応用に有用であると考えられる。そこで、つぎに、成魚を用いた変異原性検出の検討を行った。

5. 成魚を用いた検出系の検討

成魚は重さにして 0.2~0.5 g 程度であるが、臓器ごとに採取することも可能である。臓器としては、エラと膵肝臓を採取することとした。エラは、水中の酸素を取り込むために多量の水をかん水しており、水中の変異原物質を取り込んだり、濃縮したりしていると考えられる。化学物質の代謝を担う肝臓は、ゼブラフィッシュでは膵臓と肝臓が肉眼では見分けることができない膵肝臓という一つの器官として存在しているため、膵肝臓として採取した。また、個体全体をホモジュナイズして検出することも試みている。

変異原物質としては、まず、胚の実験にも用いた発癌物質 MNNG を用いた。MNNG は、アルキル化剤で、

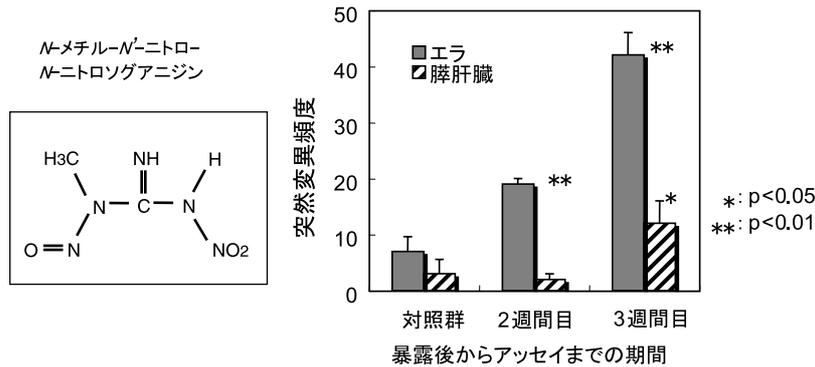


図 6. MNNG 暴露によって遺伝子導入魚のエラと臍肝臓に誘発された突然変異の頻度。
成魚を 15 mg/L の MNNG に 2 時間暴露後、2 週間目と 3 週間目にエラと臍肝臓を採取し変異原性の検出を行った。

DNA のグアニンに付加体を形成し、DNA の複製を経て G:C 塩基対から A:T 塩基対への置換を引き起こすことが知られている。遺伝子導入魚の成魚を MNNG 溶液に曝露し、2 週間目に突然変異頻度の検出を行ったところ、濃度依存的な突然変異頻度上昇が観察された⁴⁾。

変異原物質により形成された付加体はミスペアを形成するが、細胞のもつ DNA 修復機構によって修復されるが、修復できなかったものだけが、DNA 複製を経て突然変異として定着する。よって、化学物質曝露のあと、適切な期間をおいてから変異原性の検出をすることが重要で、この突然変異の定着期間のことを expression time あるいは fixation time と呼ぶ。MNNG に曝露した魚について、定着期間の効果を調べるために、曝露後 2 週間目と 3 週間目に魚を採取して変異原性の検出を行ったところ、3 週間目のほうが、突然変異頻度が高かった (図 6)。

つぎに、MNNG とは異なった機構で突然変異を誘発するアクリジンマスタードの一種 6-Chloro-9-[3-(2-chloroethylamino)-propylamino]-2-methoxyacridine (ICR-191) を用いて、成魚で突然変異が検出できるか検討した¹⁴⁾。ICR-191 は、二本鎖 DNA の中にインターカレーションして塩基挿入を起こす変異原物質として知られており、エームス試験ではフレームシフト型変異を誘発する陽対照物質として使用されている。遺伝子導入魚の成魚を ICR-191 溶液に曝露し、2 週間後と 3 週間後に突然変異頻度の検出を行ったところ、エラと臍肝臓のいずれにおいても、2 週間後のサンプルだけに、有意に突然変異頻

度の上昇が観察された。よって、ICR-191 の場合も、適切な expression time をとることにより、その変異原性を魚類で検出できることが示された (図 7)¹⁴⁾。3 週間目に突然変異頻度が対照群と同程度に下がってしまう理由については、細胞の代謝回転による可能性や、突然変異の定着が魚個体内で起こっていなかった可能性が考えられるが、今後の検討が必要である¹⁴⁾。

6. 誘発された突然変異の解析

本遺伝子導入魚を用いた変異原性検出系の特徴は、変異原性モニター遺伝子 *rpsL* の塩基配列を調べることにより、誘発された突然変異のタイプを知ることができることである。図 8 は、MNNG あるいは ICR-191 によってエラに誘発された突然変異をタイプ別に示したものの (突然変異のスペクトル) である。MNNG では、G:C から A:T への塩基置換が大部分を占めており⁴⁾、ICR-191 では、G:C 塩基対の挿入が大半を占めていた¹⁴⁾。これらの突然変異は、それぞれ MNNG あるいは ICR-191 の突然変異誘発機構に特徴的であり、この結果から、成魚を用いて化学物質に特徴的な突然変異を調べられることが明らかになった。さらに興味深いことに、どちらの化学物質の場合も、*rpsL* 上に突然変異の起こりやすいホットスポットが観察された^{4,14)}。このような突然変異スペクトルやホットスポットの解析は、未知試料中の変異原物質の性質を知る上で手がかりになる可能性があり、今

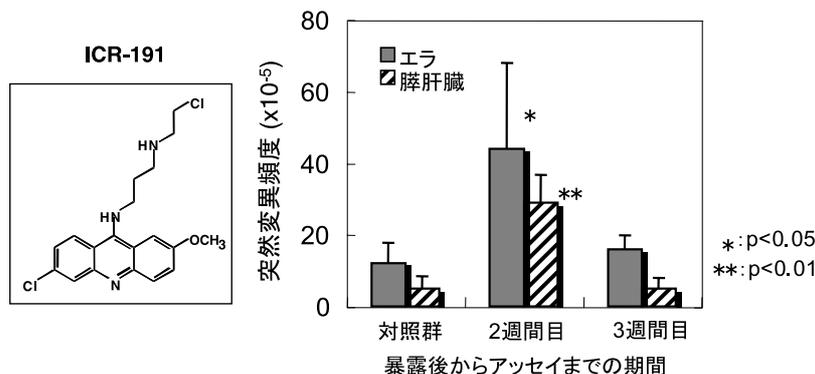


図 7. ICR-191 暴露によって遺伝子導入魚のエラと臍肝臓に誘発された突然変異の頻度。
成魚を 1 μ M の ICR-191 に 18 時間暴露後、2 週間目と 3 週間目にエラと臍肝臓を採取し変異原性の検出を行った。

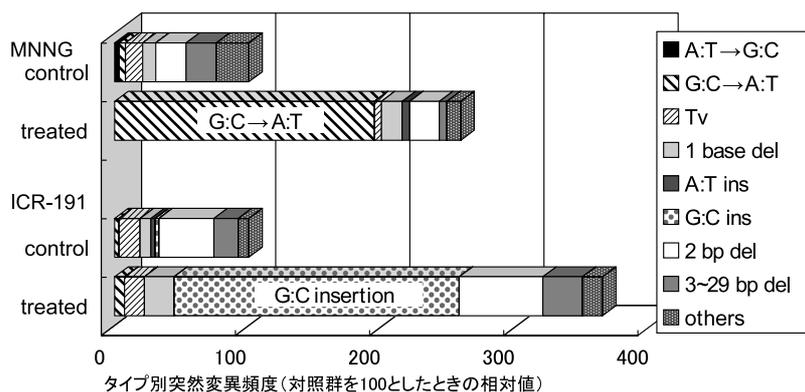


図 8. MNNG や ICR-191 暴露によって遺伝子導入魚のエラに誘発された突然変異のスペクトル。

図 6, 図 7 において, 薬剤暴露によって誘発された突然変異 (2 週間目) のタイプを, 対照群の突然変異頻度を 100 とした相対値で表した。変異原性モニター遺伝子 (*rpsL*) の塩基配列を調べることで突然変異のタイプを決定した。Tv, トランスポゾン: G:C→T:A, G:C→C:G, A:T→C:G, A:T→T:A の合計。ins: insertion, 挿入。del: deletion, 欠失。

後, さらに多くの化学物質について *rpsL* ゼブラフィッシュを用いてスペクトルやホットスポットの情報を集めていきたいと考えている。

7. 遺伝子導入魚類を用いた変異原性検出の現状と今後

我々の遺伝子導入魚作製の論文が *Nature Biotechnology* に掲載された同じ年 (2000年), 以前から交流のあったジョージア大学の Winn 博士も変異原性検出用の遺伝子導入メダカ作製を報告した¹⁸⁾。彼らのメダカには, 変異原性検出用の BigBlue マウスに導入されたものと同じラムダファージがシャトルベクターとして組み込まれている。現在, 変異原性検出が可能な遺伝子導入魚は, 我々の遺伝子導入ゼブラフィッシュと, Winn 博士の遺伝子導入メダカの 2 系統のみである。これらを用いて変異原性検出が行われた化学物質は, 学会報告も含めてまだ, エチルニトロソウレア^{2,18)}, ベンゾ (a) ピレン^{2,3)}, MeIQx^{2,3)}, ジメチルニトロソアミン¹⁹⁾, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone (MX)¹⁰⁾, methylazoxymethanol acetate¹⁰⁾, MNNG⁴⁾, ICR-191¹⁴⁾ の 8 物質である。

これらのなかで, 水環境に特徴的な変異原物質 MX について, 遺伝子導入魚を用いて興味深い結果が得られているので少し詳しく触れたい。MX はフミン質を含む水を塩素消毒したときに生成する消毒副生成物で, エームス試験で強い変異原性を示すことから, 有害性が問題になっている化学物質である。我々が遺伝子導入ゼブラフィッシュの胚を用いて予備実験を行ったところ, 変異原性は, ほとんど観察されなかった (未発表)。Geter らも Winn 博士の開発した遺伝子導入メダカに暴露したところ, 肝臓において有意な変異原性は示さなかったと報告している¹⁰⁾。他の臓器でも陰性なのか検討の余地はあるし, 曝露条件や expression time の検討によって, 魚類でも陽性の結果が得られる可能性は否定できないが, MX に関する我々や Geter らの結果は, 微生物を用いたエームス試験では得ることのできない, 魚個体を用いる検出法ならではの結果を示す一例かもしれない。ちなみに, 遺伝子導入マウスを使った実験でも, 変異原性は検出されていない¹³⁾。

遺伝子導入魚を用いた変異原性の検出は, まだ緒についたばかりである。今後, さらに多くの化学物質, 特に水環境中に存在する有害物質について, 変異原性の検出を行いつつ, 曝露条件や expression time の検討をしていく必要がある。また, 多種多様な変異原物質が, その各々は低濃度で存在している実際の環境を考えると, 低濃度長期曝露や複合曝露による検出の検討を行っていく必要がある。実際の水環境のモニタリングにおいては, 変異原性のない毒物質による魚への影響をどうするかも重要な課題である。我々の開発した遺伝子導入魚が, 少しでも環境保全に役に立つことを願って, 今後も研究を進めるつもりである。

文 献

- 1) Al-Sabti, K., and C.D. Metcalfe. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 345: 121-135.
- 2) Amanuma, K., H. Takeda, H. Amanuma, and Y. Aoki. 2000. Transgenic zebrafish for detecting mutations caused by compounds in aquatic environments. *Nat. Biotech.* 18: 62-65.
- 3) Amanuma, K., S. Tone, H. Saito, T. Shigeoka, and Y. Aoki. 2002. Mutational spectra of benzo[a]pyrene and MeIQx in *rpsL* transgenic zebrafish embryos. *Mutat. Res.* 513: 83-92.
- 4) Amanuma, K., T. Nakamura, and Y. Aoki. 2004. MNNG-induced mutations in the adult gill and hepatopancreas and in embryos of *rpsL* transgenic zebrafish. *Mutat. Res.* 556: 151-161.
- 5) 天沼喜美子, 浜田康夫, 武田洋幸. 1995. ゼブラフィッシュにおける外来遺伝子導入系. 蛋白質核酸酵素. 40: 2257-2264.
- 6) 天沼喜美子, 青木康展. 1996. 変異原物質検出用トランスジェニックゼブラフィッシュの開発. 水環境学会誌. 19: 780-784.
- 7) 天沼喜美子, 青木康展. 2000. 水環境中の有害物質検出へのトランスジェニックゼブラフィッシュの応用. 蛋白質核酸酵素. 45: 2973-2981.
- 8) 青木康展, 天沼喜美子. 2000. 動物個体を用いた環境汚染物質のバイオアッセイ—環境変異原物質を検出するための遺伝子導入ゼブラフィッシュの開発—ぶんせき別冊 4: 199-204.
- 9) 青木康展, 天沼喜美子. 2000. 環境水中の変異原物質をいかにして検出するか—遺伝子導入ゼブラフィッシュを用いた環境測定. 化学と生物. 38: 642-644.
- 10) Geter, D.R., R.N. Winn, J.W. Fournie, M.B. Norris, A.B.

- DeAngelo, and W.E. Hawkins. 2004. MX[3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone], adriking-water carcinogen, does not induce mutations in the liver of cII transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*. 67: 373–383.
- 11) Gondo, Y., Y. Shioyama, K. Nakao, and M. Katsuki. 1996. A novel positive detection system of in vivo mutations in *rpsL* (*strA*) transgenic mice. *Mutat. Res.* 360: 1–14.
 - 12) Mitchelmore, C.L., and J.K. Chipman. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.* 399: 135–147.
 - 13) Nakajima, M., M. Kikuchi, S. Masumori, J. Tanaka, S. Inagaki, Y. Furuya, A. Nishikawa, and N. Kinae. 2001. Genetic response of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone (MX) in several in vivo mutagenicity tests. *Mutat. Res.* 483, Suppl. 1: S84.
 - 14) Nakamura, T., K. Amanuma, and Y. Aoki. 2005. Frameshift mutations induced by the acridine mustard ICR-191 in embryos and in the adult gill and hepatopancreas of *rpsL* transgenic zebrafish. *Mutat. Res.* in press.
 - 15) Nohmi, T., T. Suzuki, and K. Masumura. 2000. Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays. *Mutat. Res.* 455: 191–215.
 - 16) Ohe, T., T. Watanabe, and K. Wakabayashi. 2004. Mutagen in surface waters: a review. *Mutat. Res.* 567: 109–149.
 - 17) Stuart, G.W., J.V. McMurray, and M. Westerfield. 1988. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 103: 403–412.
 - 18) Winn, R.N., M.B. Norris, K.J. Brayer, C. Torres, and S.L. Muller. 2000. Detection of mutations in transgenic fish carrying a bacteriophage lambda *cII* transgene target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 12655–12660.
 - 19) Winn, R.N., M. Norris, S. Muller, C. Torres, and K. Brayer. 2001. Bacteriophage λ and plasmid pUR288 transgenic fish models for detecting in vivo mutations. *Mar. Biotechnol.* 3(supplement) :S185–S195.