

微生物起源 DNA マイクロアレイを用いた環境ストレスの網羅的解析

DNA Microarray for Monitoring Environmental Stress and Environmental Microorganisms

岩 橋 均

HITOSHI IWAHASHI

産業技術総合研究所・ヒューマンストレスシグナル研究センター 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第6

TEL: 029-861-6059 FAX: 029-861-6066

E-mail: hitoshi.iwahashi@asit.go.jp

Human Stress Signal Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Central-6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

キーワード: DNA マイクロアレイ, 環境ストレス, 発現解析, ポピュレーション解析, 微生物の検出

Key words: DNA microarray, environmental stress, expression profiling, population analysis, detection of microorganisms

(原稿受付 2005年5月30日/原稿受理 2005年7月19日)

1. はじめに

DNA マイクロアレイ (DNA チップ) とは, 1 枚数平方センチメートルのスライドグラス (2.5 cm×8.5 cm) からなる基盤上に, 数百から数万種類の DNA プローブを配置させたものである (図 1)。相同性の高い DNA は, ある条件下で, お互いに解離と結合を繰り返す。同一の 1 次構造を持つ DNA (正確には相補鎖) や相同性のある DNA は結合が可能であるが, 1 次構造が全く異なる DNA は結合することはない。従って, マイクロアレイに搭載されている DNA プローブと相同性の高い DNA は, 数千種類の DNA の中でその相同性の高い DNA プローブを選択して結合する。このことは, DNA マイクロアレイを用いると, ある条件下において, 搭載した DNA プローブと同一のまたは相同性の高い DNA を定量できる可能性を示している。遺伝子の発現解析, 遺伝子の構造解析, 特定 DNA の定量解析などへの利用が期待されており, 既に研究を中心に利用されている。

環境関連分野では, モデル生物を用いた化学物質などの環境ストレス応答の発現解析, モデル生物群を用いた環境ストレス影響のポピュレーション解析, 環境微生物のポピュレーション解析等が検討されている。本論文ではこれらについて, ご紹介し, 可能性と問題点について議論したい。

2. モデル生物を用いた環境ストレス応答の発現解析

環境化学物質等, 環境ストレスは細胞に何らかの影響を与える。この影響が致命的でなければ, 必ず細胞はその影響に適応しようと応答を行うと考えることができる。この応答は細胞への影響に依存するため環境ストレスの影響を反映した応答が期待できる。DNA マイクロ

アレイを用いると, この応答を遺伝子発現レベルで評価することが可能になる。従って, これまでのバイオアッセイとは違い, 環境ストレスの影響を反映した大量の情報入手が出来る^{2,3,6,8,10}。現在, 多種類の生物を起源とする DNA マイクロアレイが市販されており, 受託解析も充実している。真核生物では, 出芽酵母をはじめ, ヒト, ラット, マウス等 (DNA チップ研究所 (<http://www.dna-chip.co.jp/>), タカラバイオ (<http://www.takara-bio.co.jp/>), Agilent (<http://www.agilent.com/about/index.html>) 等) の DNA マイクロアレイが, 入手可能である。また, 10種類以上の真核生物について受託解析が可能になっており (ジーンフロンティア (<http://www.genefrontier.com/index.html>)), 遺伝子 1 次構造に関するデータベースの充実により, 上記以外にも 50種類以上の生物種について, 対応が可能である。一方, 原核微生物では, 大腸菌 DNA マイクロアレイ (タカラバイオ等) が市販されているが, 受託解析が中心であり, ジーンフロンティアでは 200種類以上の菌株について受託解析が可能である。もちろん, データベースを利用すれば, 多種類の生物を起源とする DNA マイクロアレイを各研究室で構築することは可能である。

我々の研究室では, 既に 10種類以上の生物種について, DNA マイクロアレイを用いた発現解析を行っているが, 最も得意としている酵母を用いた DNA マイクロアレイ解析について報告したい。

2.1. 酵母細胞を用いた環境ストレスの影響評価

DNA マイクロアレイ解析を行うと大量の解析結果が得られる。Excel のデータとして, 1 M バイト, 出力すると数百ページになる。Excel 上で, 誘導された遺伝子や抑制された遺伝子を観察することは, 重要であるが, 木を見て森を見ずということになりかねない。そこで,

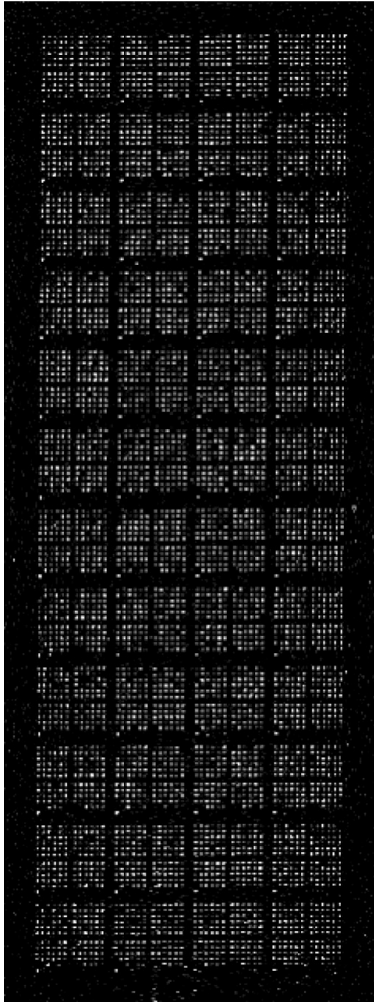


図1. 酵母発現解析用 DNA マイクロアレイのイメージ図。
酵母 DNA マイクロアレイには約6000種の ORF がスタン
プされている。実際には、モノクロの映像が2種類得られ
るだけであるが、Cy3 を赤色、Cy5 を緑色にして再構成し
た図である。色の強いスポット程発現量が多い。

遺伝子発現プロファイルのクラスター解析や、誘導遺伝子の機能分類などを通して、できるだけ森を見る努力をしている。これまでに我々の研究室では、1000枚以上の酵母 DNA マイクロアレイを用いて、環境ストレスの影響評価を行ってきた。その一部はホームページ上で公開している (<http://kasumi.nibh.jp/~iwahashi/>)。本解説では、ラウンドアップの解析例をご紹介します¹¹⁾。

2.1.1. ラウンドアップ処理による、遺伝子発現のクラスター解析

ラウンドアップは glyphosate を主成分として、界面活性剤を含むモンサント社の製品名である¹¹⁾。世界各地で除草剤として利用されている。酵母に対する IC50 は、2000~2500倍希釈、1500倍希釈でほぼ生育を阻害した。そこで、1500倍を処理濃度を選択して、影響の評価を行った¹¹⁾。前述のように、当研究室では各種化学物質や物理的ストレス処理後の遺伝子発現プロファイルを蓄積している。そこで、蓄積した発現プロファイルを用いてクラスター解析を行い、ラウンドアップ処理がどの環境ストレスに類似しているかを求めた(図2)。クラスター解析の基本は、相関性に基づくものであり、ユーグリッ

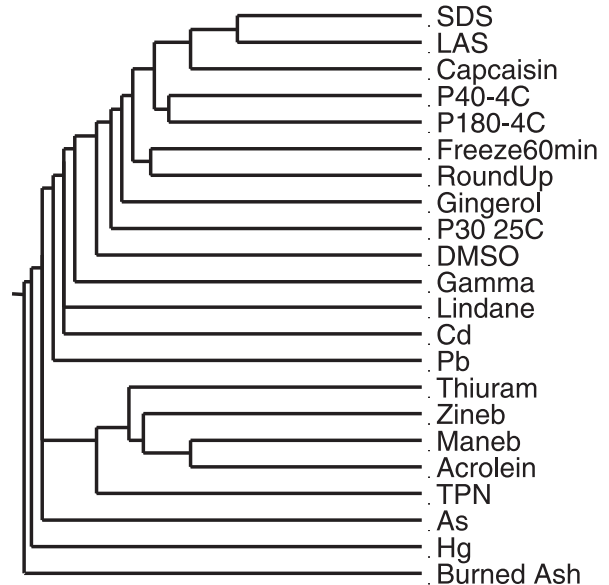


図2. ラウンドアップ処理後遺伝子発現のクラスター解析。
各処理条件については、出典元参照 (Environmental Science 11: 313-323 (2004) より転載)。各種ストレス後の遺伝子発現プロファイルを基に、各種ストレス応答の類似性を分類系統樹の様に表現している。

ド距離、コサイン係数、Pearson 相関係数などを用いて計算をすることが可能である。当室では、GeneSpring というソフトを用いており、スタンダードコリレーション、Pearson 相関係数などを用いることが可能である。図2に示したものは、スタンダードコリレーションを用いた計算結果であるが、Pearson 相関係数を用いることもある。どの計算方法を用いるのが最適であるかという点は議論の余地が大いにあるところであるが、当室では、生物学的に理解できる結果が得られればそれだけでよいと考えている。例えば、界面活性剤で類似の影響を与えらると思える LAS と SDS 処理は類似であるという計算結果が出なければ、その計算は使えないと判断する。Thiuram, Maneb, Zineb も同様に、同族の殺菌剤であり計算の指標に使える。

図2からラウンドアップ処理は、凍結融解処理⁹⁾に最も類似しているという結果が得られた。また、界面活性剤 (LAS, SDS)¹²⁾ や植物抽出油 (Capsaicin, Gingerol)⁴⁾にも類似しているが、殺菌剤等の農薬³⁾、重金属類⁶⁾とは影響が異なる可能性を示している。この結果から、ラウンドアップに含まれる、glyphosate が酵母細胞の増殖を抑えているのではなく、安定剤として共存している界面活性剤が増殖阻害の原因であることが推察される。実際に、glyphosate を酵母細胞に与えたが、生育阻害は認められなかった¹¹⁾。界面活性剤については入手ができず、確認はできていない。

2.1.2. ラウンドアップ処理によって誘導される遺伝子の特徴

クラスター解析は、ある環境ストレスがどの環境ストレスに類似しているかを判断する上で有効であるが、その内容を理解するには、不十分である。もちろん、DNA マイクロアレイの解析結果を眺めながら考察することは重要であるが、やはり手がかりはほしい。そこ

表 1. ラウンドアップ処理によって誘導された遺伝子の機能別分類。
(Environmental Science 11: 313-323 (2004) より転載)

Functional category	Up-regulated		Down-regulated		Total ORFs
	Number	(%)*	Number	(%)	
CELL CYCLE AND DNA PROCESSING	25	4.0	54	8.6	628
CELL FATE	20	4.7	33	7.7	427
CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	39	14.0	16	5.8	278
CELLULAR COMMUNICATION	2	3.4	3	5.1	59
CELLULAR TRANSPORT, et al.	43	8.7	26	5.3	495
CONTROL OF CELLULAR ORGANIZATION	24	11.5	19	9.1	209
ENERGY	69	27.4	7	2.8	252
METABOLISM	156	14.6	76	7.1	1066
PROTEIN ACTIVITY REGULATION	0	0.0	1	7.7	13
PROTEIN FATE	45	7.6	24	4.0	595
PROTEIN SYNTHESIS	19	5.3	100	27.9	359
REGULATION OF CELLULAR ENVIRONMENT	19	9.5	10	5.0	199
SUBCELLULAR LOCALIZATION	177	7.8	224	9.9	2258
TRANSCRIPTION	30	3.9	63	8.2	771
TRANSPORT FACILITATION	32	10.2	17	5.4	313
TRANSPOSABLE ELEMENTS, et al.	0	0.0	0	0.0	116
CLASSIFICATION NOT YET CLEAR-CUT	17	14.8	11	9.6	115
UNCLASSIFIED PROTEINS	206	8.6	161	6.7	2399

* (%)=(Number of Up-or Down-regulated ORFs)/(Number of ORFs in the category)×100

で、MIPS (Munich International Center for Protein Sequence, <http://www.mipsbiochem.mpg.de/>) という酵母遺伝子の機能分類を行っており、データベースを利用してどのような機能が誘導されているかで、環境ストレスの

理解を図っている。上記データベースでは、遺伝子を機能毎に分類しており、20種類近い機能別カテゴリーとそのサブカテゴリーを設けている。誘導された遺伝子をデータベースに当てはめることで、どのような機能が主

表 2. ラウンドアップによって誘導された遺伝子の内、「ENERGY」と「METABOLISM」に分類される遺伝子の詳細機能分類。
(Environmental Science 11: 313-323 (2004) より転載)

CATEGORY	Number	%	Total
Subcategory			
ENERGY	69	27.4	252
membrane-associated energy conservation	1	50.0	2
fermentation	9	27.3	33
glycolysis and gluconeogenesis	6	17.1	35
glyoxylate cycle	1	16.7	6
metabolism of energy reserves (glycogen, trehalose)	13	35.1	37
oxidation of fatty acids	5	71.4	7
pentose-phosphate pathway	4	44.4	9
respiration	21	23.9	88
tricarboxylic-acid pathway	6	24.0	25
other energy generation activities	4	25.0	16
METABOLISM	156	14.6	1066
amino acid metabolism	22	10.8	204
C-compound and carbohydrate metabolism	76	18.3	415
lipid, fatty-acid and isoprenoid metabolism	31	14.6	213
vitamins, cofactors, and prosthetic groups	0	0.0	86
nitrogen and sulfur metabolism	9	13.4	67
nucleotide metabolism	15	10.1	148
phosphate metabolism	4	12.1	33
secondary metabolism	0	0.0	5

表 3. 誘導遺伝子産物の細胞内局在性。
(Environmental Science 11: 313–323 (2004) より転載)

Organelle	Number	%	Total
cell wall	5	13.2	38
centrosome	0	0.0	31
cytoplasm	47	8.5	554
cytoskeleton	3	2.8	108
endoplasmic reticulum	14	8.9	157
endosome	2	16.7	12
extracellular /secretion proteins	1	5.0	20
golgi	4	4.9	82
intracellular transport vesicles	3	7.1	42
mitochondrion	56	15.3	366
nucleus	22	2.8	774
peroxisome	17	43.6	39
plasma membrane	10	6.9	145
prokaryotic cell membrane	0	0.0	1
vacuole or lysosome	5	8.5	59
other subcellular localisation	1	12.5	8

に誘導されているかを理解することか可能になる。当研究室では、専用のエクセルを作成し、機能分類を自動に行っている。表 1 には、ラウンドアップ処理によって 2 倍以上に誘導された遺伝子と 0.5 倍以下に抑制された遺伝子の機能別分類を示した。ここで、2 倍以上に誘導された遺伝子と 0.5 倍以下に抑制された遺伝子の選択理由であるが、残念ながら理論的根拠はない。実験的には、我々の条件に於いて、ストレスを付与しない条件の実験を 3 回行い、その平均値を取れば、2 倍以上に誘導される遺伝子はごく希であることを確認しているだけである⁹⁾。ただし、これは未処理の条件であり、環境ストレス処理を行えば、当然結果のばらつきが増えたと考えられる。「2 倍以上が誘導された遺伝子であるとする」という表現ではなく、「2 倍以上に誘導された遺伝子」という表現が限界と考える。

表 1 がラウンドアップ処理によって、「2 倍以上に誘導された遺伝子」を機能分類した例である¹¹⁾。「ENERGY」や「METABOLISM」に分類されている遺伝子の数が多く誘導されていることが理解できる。またその機能分類遺伝子内の誘導割合も多いことが理解できる。一方、抑制されている機能としては「PROTEIN SYNTHESIS」が圧倒的である。環境ストレス下では、酵母の生育が抑えられていることから、タンパク質の合成速度が低下するのは当然の結果である。抑制されている遺伝子から「PROTEIN SYNTHESIS」を観察することで、実験条件の生育に与える影響を推定することは可能である。しかしながら、生育阻害という普遍的な影響が抑制される遺伝子に反映されるため、有益な情報を抽出することは困難である。

「ENERGY」や「METABOLISM」に分類されるサブカテゴリーとラウンドアップによって誘導された遺伝子数を示したものが表 2 である。「ENERGY」のカテゴリー内では、「Respiration」のサブカテゴリーに属する遺伝子の誘導数が多く、「Oxidation of fatty acids」のサブカテゴリーでは、誘導されている遺伝子の割合が高いことが観察された。「METABOLISM」のカテゴリーでは、「C-compound and isoprenoid metabolism」「Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism」のサブカテゴリーに属する遺伝子数と割合の多いことが理解できる。誘導された遺伝子産物の細胞内局在性も有益な情報を与えてくれることが多い。表 3 には誘導された遺伝子産物の細胞内局在性を示した。「Mitochondrion」「Peroxisome」に局在する遺伝子産物が顕著であることが理解できる。

以上のような結果から、ラウンドアップ処理で、界面活性剤の分解を開始していることが推察できる。しかしながら、この分解が単に炭素源の利用を目的にしたものか、解毒を目的にしたものであるかの判断は、現在我々にはできない。上記サブカテゴリーに分類される遺伝子を観察していくと、細胞膜に障害が生じた場合に誘導される事が多い *OPI3* や *RTA1* 等の遺伝子の誘導が認められている¹¹⁾。これらを根拠として、細胞膜に障害が生

表 4. 誘導遺伝子で「Detoxification」に分類される遺伝子。

Gene	Name	Fold	Description or function
YGR088W	CTT1	6.6	Cytoplasmic catalase T
YOR031W	CRS5	6.0	Metallothionein-like protein
YDR453C		5.2	Similar to thiol-specific antioxidant proteins
YIR038C	GTT1	4.6	Glutathione transferase
YCL035C	GRX1	3.7	Glutaredoxin
YLL060C	GTT2	3.6	Glutathione transferase
YBL064C		3.4	Similar to thiol-specific antioxidant enzymes
YDR256C	CTA1	3.3	Catalase A
YNL241C	ZWF1	2.7	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
YDR513W	TTR1	2.7	Glutaredoxin
YJR104C	SOD1	2.6	Cu, Zn superoxide dismutase
YBR145W	ADH5	2.5	Alcohol dehydrogenase isoenzyme V
YFL050C	ALR2	2.4	(putative) ion transporter
YCR083W	TRX3	2.4	Mitochondrial thioredoxin
YHR008C	SOD2	2.2	Manganese superoxide dismutase
YOR153W	PDR5	2.1	Multidrug resistance transporter

表 5. 誘導遺伝子で「DNA processing」に分類される遺伝子。

Gene	Name	Fold	Description or function
YLR178C	TFS1	8.8	Suppressor of a cdc25 mutation
YGL158W	RCK1	4.5	Serine/threonine protein kinase
YKR046C		4.0	Hypothetical protein
YOR028C	CIN5	3.9	bZIP protein
YGR044C	RME1	3.4	Zinc finger protein
YDR055W	PST1	3.2	The gene product for regenerating protoplasts
YKL193C	SDS22	2.6	Glc7p regulatory subunit
YNL025C	SSN8	2.6	C-type cyclin
YGR132C	PHB1	2.4	Mitochondrial protein, prohibitin homolog
YHR004C	NEM1	2.4	Nuclear envelope morphology
YER066W		2.3	Strong similarity to cell division control protein Cdc4p
YHL024W	RIM4	2.2	RNA-binding protein of the RRM class
YJL141C	YAK1	2.2	Serine-threonine protein kinase
YGR231C	PHB2	2.2	Mitochondrial protein, prohibitin homolog
YOR208W	PTP2	2.1	Protein tyrosine phosphatase
YNL196C	SLZ1	2.0	Sporulation-specific protein
YIR024C	GIF1	2.0	Involved in cell cycle control
YER179W	DMC1	2.0	Meiosis-specific protein related to RecA and Rad51p.
YPL140C	MKK2	2.0	Protein kinase

じており、解毒を目的とした分解が生じているものと推定するのが限界である。

影響評価をする際に、その阻害機構とは別に有益な情報を供給してくれるサブカテゴリーがある。例えば、「Detoxification」や「DNA processing」に分類される遺伝子群である。「Detoxification」に分類され、ラウンドアップ処理で高く誘導されていた遺伝子を表 4 に示したが、酸化ストレス防御に関連する遺伝子が多く観察されており、酵母細胞は酸化ストレス状態にあることが推察できる。また、「DNA processing」(表 5) に分類される遺伝子群の誘導もある程度観察されており、変異原性を否定することはできない。残念ながら現時点では、誘導遺伝子の種類やその誘導率と変異原性を定量的に評価することは不可能であり、表 5 からは「変異原性を否定することはできない」という評価を下すのが限界となる。

2.2. DNA マイクロアレイ解析の注意点

前述のように、当研究室では既に10種類以上の生物種について、DNA マイクロアレイを用いた発現解析を行っているが、すべての生物種について、良好な結果が得られているわけではない。我々の経験から、その原因は DNA マイクロアレイにあるのではなく、その生物種または細胞種にあると考えている。ある細胞について化学物質の影響評価を行ったところ、全く再現性が得られなかった事がある。当然、DNA マイクロアレイを疑ったが、同一チューブの RNA を用いると、再現性が認められた。しかし、異なる日に調製した同一条件と考えられる細胞に化学物質を与えることなく、発現解析を行ったが、この時点で既に再現性を認めることができなかった。細胞の培養は、その専門家をお願いしたので、培養方法が悪いとは考えられない。また、その細胞と同一の生物種で株の異なるものについて、その細胞の専門家が細胞を調製したが、結果は同じであった。これまでの経

験では、生物個体を用いた場合が最も再現性に優れており、微生物、培養細胞と続く。

酵母細胞を用いた、DNA マイクロアレイについては、その再現性について検討を行っているが、ORF をプローブとした DNA マイクロアレイでは、対数増殖期後期で、同一チューブを起源とすると、相関係数が0.9程度、異なる日に調製しても0.8程度にはなる⁹⁾。一方、化学物質で処理すると、当然この数値は低下するが、化学物質によっても異なる。オリゴヌクレオチドをプローブとすると、かなり相関係数は良くなるが、影響評価を目的とした場合、相関係数の善し悪しは、その評価対象(生物種と環境ストレス)に依存すると考えている。いずれにしても、最低限未処理または対照細胞で、異なるロットについて、その再現性を確認しておかないと信頼できる結果は得られない。

影響評価を行う処理条件についても、議論のあるところである。我々は可能な限り生育阻害を起こす条件で実験をしている。また、その目安としては IC50 を基準としている。これは、「生育に明らかに影響がある条件で影響を評価しなければならない」という考えと「生育阻害実験には厳密な再現性は期待できない」という考えから来ている。まず、生育に影響のない条件で影響を評価することが理解できない。また10%程度しか阻害しない条件では、再現性が信頼できない。IC50 を目安にすると、50%という数値の再現性は期待できないとしても、生育阻害はしているだろうという期待から目安にしている。実際には、数段階の濃度や強さを設け、処理後に生菌数を計測し、死滅しない程度の処理条件で、より厳しい処理条件から解析をしている。時には mRNA を調製できないことがある。その際は、処理条件を緩くして、再実験を行っている。もちろん以上は、影響評価を行う際の我々の条件である。ある環境ストレスのバイオマーカーを選択する事を目的とした場合等は、できるだ

け生育に影響のない条件を用いることはあり得る。

3. モデル生物を用いた環境ストレス影響のポピュレーション解析

環境ストレス、特に環境汚染などの評価を行う場合、生物群集の変遷を追うことは、汚染評価の基本である。以前に比べて魚類が増えたか減ったかという観察は環境汚染の指標として有効である。最近では、同一種の魚貝類や植物の中でも、ポピュレーションの変動を遺伝子の多型で評価を行おうという研究例も見られる^{7,13)}。汚染に強い多型の特定を試みたり、多型の複雑さで評価をしようという試みである。DNA マイクロアレイはポピュレーション解析に利用することが可能で、このような用途にも利用することができる。ここでは、酵母のバーコードマイクロアレイとバーコード標識遺伝子破壊株の環境ストレス評価への利用の可能性について述べたい。

3.1. 酵母のバーコード標識遺伝子破壊株とバーコード DNA マイクロアレイ

酵母細胞は、比較的遺伝子破壊が容易な生物種である。通常は薬剤耐性遺伝子と50塩基程度の目的遺伝子の相同配列を両端に付与しておけば、簡単に破壊が可能である。すべて PCR を基本に設計できる。酵母には約6000種類の遺伝子が知られており、これら遺伝子破壊のプロジェクトが数年前に終了している (<http://mp.invitrogen.com/>)。当該プロジェクトでは、単に遺伝子を破壊するだけでなく、各破壊遺伝子の両端に、20塩基の標識配列（バーコード）とその標識の増幅用配列を組み込んだ遺伝子破壊株を作成している (<http://mp.invitrogen.com/>)。従って、標識配列を指標に、6000種類の各遺伝子破壊株を特定することが可能である。DNA マイクロアレイを用いると、6000種類の混在した遺伝子破壊株プールから各遺伝子破壊株を半定量することが可能である。6000種類の遺伝子破壊株、6000種類の遺伝子破壊株のプール、標識配列遺伝子は市販されており (<http://mp.invitrogen.com/>)、入手は容易である。我々はこれらを手し、バーコード DNA マイクロアレイは市販の標識配列遺伝子を用いて作成した。

3.2. 酵母の連続培養とモデル化学物質の暴露

酵母の連続培養は容易である。攪拌している酵母の培養液に一定量の新しい培養液を加え、加えた量を抜き取れば、数ヶ月は安定に連続培養が可能となる¹⁴⁾。バーコード標識酵母の連続培養では、G418 を加えておくため、雑菌の汚染はほとんどおこらない。加える培養液は環境水をベースに調製すれば、環境水を連続的に酵母細胞に暴露していることになる。6000種類の遺伝子破壊株を一定期間モデル化学物質に暴露した後に、バーコード DNA マイクロアレイ (図3) でポピュレーションを解析すればその化学物質に強い遺伝子破壊株と弱い遺伝子破壊株を特定することも可能となる。我々の研究室では既に数百種類の化学物質を酵母細胞に暴露しており、酵母に対する遺伝子発現への影響で化学物質を分類している。この化学物質の中から代表的な化学物質を選択し、バーコード酵母に暴露し、化学物質のタイプ毎に強い株

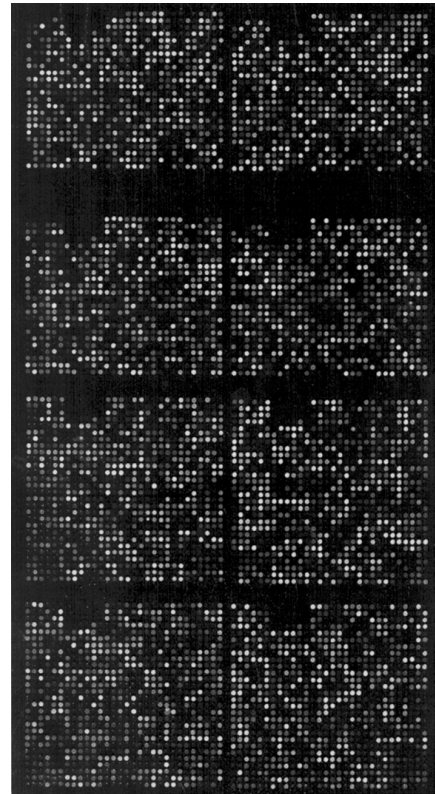


図3. バーコード酵母検出用 DNA マイクロアレイのイメージ図。

バーコード酵母検出用 DNA には約6000種のバーコードがスタンプされている。図1と同様に、Cy3 を赤色、Cy5 を緑色にして再構成した図である。色の強いスポット程、該当する遺伝子破壊株の数が多。

と弱い株の選択をすることは可能となる。しかしながら、6000種類の遺伝子破壊株のうち、生育可能な株は4000種類程度にすぎない。また、化学物質に弱い株は、生育の遅い株がほとんどであり、利用は難しいと考えている。従って、我々は化学物質耐性株を指標とした実験系の構築を目指している。また、その耐性も当然であるが、強いもの程再現性があることから、可能な限り耐性が顕著な株を選択するようにしている。これまでに、10種類程度の化学物質を用いて指標株を選択してきたが、現時点で利用できる遺伝子破壊株は6000種類の内約400種類に限られている。現在はこの約400種類の選択株で新たなプールを作成し、環境水や化学物質にこのプールを暴露し再現性の確認を行っている。また、バーコード遺伝子の増幅に PCR を用いているため、定量性に向け、半定量的な判定になる。さらに、挿入した遺伝子の欠落が頻繁に起こり、数ヶ月の酵母の培養が終了した時点ではバーコード酵母はほとんど存在しなくなる。現時点で明らかにいえることは、化学物質等の環境ストレスを付加すると、急速にそのポピュレーションの多様性が減少するという結果だけであり、今後の課題は多く残されている。

4. 環境微生物のポピュレーション解析

DNA マイクロアレイを用いると、ある条件下におい

て、「搭載した DNA プローブと同一のまたは相同性の高い DNA を定量できる」という考えから、DNA マイクロアレイを用いた環境微生物のポピュレーション解析に期待が集まっている(た)。環境中に存在する生物的ストレス(病原菌など)を網羅的に解析しようという試みである。しかしながら、環境微生物のゲノムシーケンスが終了しているわけではない。また、これまでに分離された微生物は全微生物の1%以下であるといわれている。さらに、環境中に存在する遺伝子の1次構造はそのほとんどが未知であり既知の遺伝子そのものの全体に占める比率さえ不明である。搭載されたプローブと結合する遺伝子が、目的とした微生物種である保証はなく、その信頼性がどの程度かという事さえ推定できないのが現状である。このような状況では、DNA マイクロアレイを用いて、環境微生物のポピュレーション解析を行うことは、現時点で理論上不可能であると言わざるを得ない。

一方、特定微生物の検出や、ある程度の特定微生物存在量を推定することが可能な場合がある。特定微生物の検出では、モデル実験に限定すると、その微生物が存在しない場合は存在しないと判定することは可能である。PCR 反応などで特定微生物の遺伝子増幅が可能であることが確認されていれば、DNA マイクロアレイを用いると特定微生物が存在しない場合で、特定微生物に対するプローブが蛍光を示さなければ、その特定微生物は存在しないと判定することができる。モデル実験では、1桁の微生物数まで検出が可能であるが、環境サンプルに、直接これを当てはめることはできない。その原因は、現時点で良い遺伝子増幅標識法が存在しないためである。実際の環境サンプルに特定微生物を加えても1桁の微生物数を検出できることはほとんど無い。通常環境サンプルでは、1万個程度の微生物が存在しないと検出することはできない。原因は明確ではないが、環境サンプルに含まれる不純物が PCR 反応を阻害するからであると我々は考えている。環境サンプルではないが、臨床サンプルで、PCR 反応の不確実さは報告されている。例え

ば、結核菌に対する信頼性の報告がある。彼らは喀痰を、PCR 法と培養法で、比較検討している。結核と診断された患者の検体208件のうち、PCR で陽性であったものは144件で、培養で陽性であったものは144件であった。144件のうち、両者共陽性のものは133件、PCR 陽性で培養陰性は11件、PCR 陰性で培養陽性は11件と報告されている。この結果だと、PCR 法培養法では優劣がつけられないとなる。

特定微生物存在量を推定することは、目的の微生物が存在する可能性が生態学的に高い場合や有害物質に汚染されており他種の微生物の存在量が少ない場合はある程度は可能である。例えば、ある化学物質に汚染されている環境では、その化学物質に耐性の微生物やその化合物を資化できる微生物が優占種であると考えられ、当該微生物のプローブに示される蛍光は、その微生物の存在量を反映したものであることの推定は可能であると我々は考えている。この際のプローブであるが、オリゴヌクレオチド(数十塩基)、PCR 等で増幅した特定領域の DNA (数百塩基以上)、ゲノム DNA 等が候補となる。環境試料の増幅方法にもよるが、オリゴヌクレオチドをプローブとした場合、プローブによるばらつきは大きいものの、感度的には最も良い結果が得られている(図4)。

繰り返しになるが、DNA マイクロアレイを用いて、環境微生物のポピュレーション解析を行うことは、現時点で理論上不可能であると言わざるを得ない。ここで強調したいのは、「現時点で」ということで、これまでの定法に従ってプローブを設計し、DNA マイクロアレイを作成しても、不可能であるという事である。著者は、「環境微生物のポピュレーション解析」は可能になると考えている。PCR を使わず、環境サンプルの遺伝子を増幅標識する手法の開発、新しいプローブ選択法の開発、新しいプローブの素材開発などを経れば、「環境微生物のポピュレーション解析」が限定されたものから、より広範囲に広がるものと考えている。

5. おわりに

DNA マイクロアレイ関連技術は誕生して、10年以上になる。しかしながら、当初の期待に比して成果が得られておらず、普及も進んでいない。これは DNA マイクロアレイとその関連機器の価格が高いことが第一の原因であると考えられる。普及が進まなければ価格も下がらない。一方、研究者にも責任はある。学会等では「無駄使いの研究だ」「マイクロアレイのデータは当てにならない」「投資に比して結果が少ない」等という批判をよく耳にする。ごもっともである。DNA マイクロアレイを用いると何が可能でどのような限界があるのかを理解して、説明をして、研究を進めるべきであろうと考えている。DNA マイクロアレイ技術は、日々進歩しており、周辺試薬も当初に比べれば、格段に進歩している。また、その限界も明確になってきており、現時点で、利用できる研究と利用できない研究が、明らかになってきていると考える。利用できる研究ではより積極的な利用に期待したい。

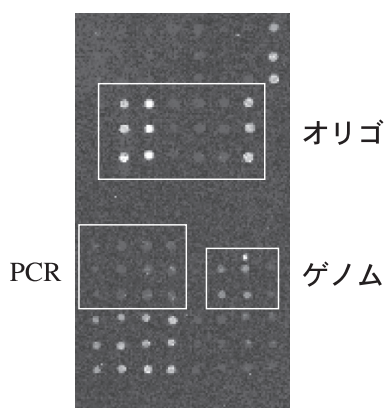


図4. 微生物検出用 DNA マイクロアレイのイメージ図。
本マイクロアレイには、特定微生物の、16S-23S 間 ITS 領域をターゲットと想定して、そのオリゴヌクレオチド(数十塩基)、PCR で増幅した 16S-23S 間 ITS 領域の DNA (数百塩基以上)、ゲノム DNA をプローブとしてスタンプしている。(カラー図は <http://www.jseb.jp/jeb/5-1/iwabashi/fig4.jpg> に掲載)

文 献

- 1) Iinuma, Y., S. Ichiyama, S. Yamori, J. Oohama, N. Takagi, Y. Hasegawa, K. Shimokata, and N. Nakashima. 1998. Diagnostic value of the Amplicor PCR assay for initial diagnosis and assessment of treatment response for pulmonary tuberculosis. *Microbiol. Immunol.* 42: 281–287.
- 2) Kitagawa, E., J. Takahashi, Y. Momose, and H. Iwahashi. 2002. The effects of the pesticide thiuram: Genome-wide screening of indicator genes by yeast DNA microarray. *Env.Sci. Tech.* 36: 3908–3915.
- 3) Kitagawa, E., Y. Momose, and H. Iwahashi. 2003. Correlation of the structures of agricultural fungicides to gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to toxic doses. *Env. Sci. Tech.* 15: 2788–2793.
- 4) Kurita, S., E. Kitagawa, C.H. Kim, Y. Momose, and H. Iwahashi. 2002. Studies on the antimicrobial mechanisms of capsaicin using yeast DNA microarray. *Bios. Biot. Biochem.* 66: 532–536.
- 5) Mizukami, S., Y. Suzuki, E. Kitagawa, and H. Iwahashi. 2004. Standardization of cDNA microarray technology for toxicogenomics; essential data for initiating cDNA microarray studies. *Chem-Bio Informatics J.* 4: 38–55.
- 6) Momose, Y., and H. Iwahashi. 2001. Bioassay of cadmium using a DNA microarray: Genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium. *Env. Tox. Chem.* 20: 2353–2360.
- 7) Mukherjee, S., S. Mukherjee, P. Bhattacharyya, and A.K. Duttagupta. 2004. Heavy metal levels and esterase variations between metal-exposed and unexposed duckweed *Lemna minor*: field and laboratory studies. *Env. Internat.* 30: 811–814.
- 8) Murata, Y., T. Watanabe, M. Sato, Y. Momose, T. Nakahara, S. Oka, and H. Iwahashi. 2003. DMSO exposure facilitates phospholipid biosynthesis and cellular membrane proliferation in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 278: 33185–33193.
- 9) Odani, M., Y. Komatsu, S. Oka, and H. Iwahashi. 2003. Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray. *Cryobiol.* 47: 155–164.
- 10) Parveen, M., K. Hasan, J. Takahashi, Y. Murata, E. Kitagawa, O. Kodama, and H. Iwahashi. 2004. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *J. Antimicro. Chemot.* 54: 46–55.
- 11) Sirisattha, S., Y. Momose, E. Kitagawa, and H. Iwahashi. 2004. Genomic profile of Roundup treatment of yeast using DNA microarray analysis. *Environ. Sci.* 11: 313–323.
- 12) Sirisattha, S., Y. Momose, E. Kitagawa, and H. Iwahashi. 2004. Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Res.* 38: 61–71.
- 13) Yap, C.K., S.G. Tan, A. Ismail, and H. Omar. 2004. Allozyme polymorphisms and heavy metal levels in the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) collected from contaminated and uncontaminated sites in Malaysia. *Env. Internat.* 30: 39–46.
- 14) 中田幸夫, 范 紅, 岩橋 均. 2005. 酵母細胞を指標とした環境水長期暴露試験装置の開発. *水処理技術.* 46: 115–118.