

学位論文題名

Toxicogenomics Using Yeast DNA Microarray

(酵母 DNA マイクロアレイを用いたトキシコゲノミクス)

学位論文内容の要旨

ゲノム研究と生物情報科学の発展により、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析が可能となった。遺伝子発現パターンの変化はその生物のおかれている生理学的条件の変化を意味し、生物あるいは細胞を有毒物質や環境変化に曝露することによって惹起される遺伝子発現応答を観察・測定することにより、その毒性や環境が生物に及ぼすストレスを迅速かつ容易に解析することが可能となった。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は有用で且つ最も研究成果が蓄積されたモデル真核生物である。酵母ゲノミクスの優位性は個々の遺伝子に関する機能情報の豊富さにあり、酵母 DNA マイクロアレイを用いた毒性評価に関する膨大な情報が蓄積されつつある。本研究では、金属イオン、アルコール、アルデヒド及びその他の化学物質に対する遺伝子発現応答を解析することにより、酵母トキシコゲノミクスの適応性・有用性について検討を行った。

1) 酵母 DNA マイクロアレイを用いたトキシコゲノミクスの概括

主に理化学分析とバイオアッセイからなる従来からの毒性学についての問題点を概観し、DNA マイクロアレイを用いたトキシコゲノミクスが、どのような新規性を持って毒性学の進展に貢献するかを考察した。また、酵母 *S. cerevisiae* が有する特徴・利点を紹介し、発現解析に使用する意義について述べた。DNA マイクロアレイを用いた研究法についてまとめ、様々な金属イオン毒性に対する研究例を紹介するとともに、本研究で取り上げた銅毒性についての酵母を用いた遺伝子発現解析研究を概説した。本研究で取り上げたメタノール及びホルムアルデヒド毒性に関する遺伝子発現解析を紹介し、アルコール及びアルデヒド毒性が酵母の遺伝子発現に及ぼす影響を考察した。更にその他化合物の酵母遺伝子発現解析研究事例を紹介し、発現解析で明らかになった様々な事実について検討するとともにトキシコゲノミクスの将来性についても考察した。

2) 酵母 DNA マイクロアレイを用いた銅の毒性解析

金属イオン毒性の代表として銅イオンに対する遺伝子発現解析を行った。銅の毒性においてはメタロチオネインやメタロチオネイン様蛋白質の遺伝子発現が最も上昇しており、銅イオン取り込み系蛋白質の遺伝子発現が最も抑制されていた。Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) の分類法で発現上昇した遺伝子の機能解析を行ったところ、「メチオニン代謝」に分類される遺伝子群が多く誘導されており、発現上昇の結果新たに合成されたメチオニンはグルタチオン等の含硫生体内抗酸化物質の合成に供給されているものと推定した。「脂質、脂肪酸、イソプレノイド代謝」に分類される遺伝子群も多く

誘導されていたため、細胞膜に起きた傷害修復のための発現変化であると推定した。更に「酸化ストレス応答」や「DNA 修復」に分類される遺伝子群も誘導されていたため、銅の毒性の大きな部分は酸化的なストレスであると考えられ、細胞膜や DNA が傷害を受けていると判断した。

3) 酵母に対するメタノールおよびホルムアルデヒドの DNA マイクロアレイを用いた毒性評価

分子構造が最も単純な C1 有機化合物であるメタノール（以下 MeOH）とホルムアルデヒド（以下 FA）の毒性評価を行った。MeOH による誘導遺伝子の機能解析および発現産物局在性の解析から細胞膜が傷害されていることが推定された。FA に関する発現解析では、抑制遺伝子中の 1/3 以上が「蛋白質合成」に関与する遺伝子であり誘導遺伝子中 11.6% が「蛋白質の結末」に分類されており、酵母は蛋白質の変性を感知して蛋白合成を止めるとともに、蛋白質の分解・修復系遺伝子を強く誘導したと推定した。また、DNA 修復系の遺伝子群も誘導されていた。FA では *ALD2* および *ALD3*（アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子）の発現が約 8 倍～10 倍上昇するとともに、グルタチオン依存性ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子が約 8.3 倍と強く誘導されており、FA の解毒にはグルタチオンが大きな役割を果たしていることが示唆された。MeOH 曝露酵母では、脱水素酵素の発現上昇は 2 倍未満に抑えて MeOH から FA への代謝はゆっくり進行させ、急激な FA 濃度上昇を抑制しつつ解毒していることが推定された。発現解析データの階層的クラスター解析からも遺伝子発現プロファイルはクラスターを形成せず、MeOH と FA の毒性は異なるものとして分類された。これらのことから MeOH は細胞膜への影響が大きく、FA の毒性は蛋白質を変性し、DNA を傷害していた。

4) 酵母 DNA マイクロアレイを用いたジンクピリチオンの毒性評価

ふけ予防シャンプーや生物付着防止船底塗装に含まれているジンクピリチオン（以下 Zpt）の毒性については催奇形性を示唆する実験結果もあり、また不明な点があった。酵母を用いて網羅的発現解析を行ったところ、誘導遺伝子の多くは鉄イオン取り込み系蛋白質の遺伝子であり、抑制遺伝子の多くはチトクロム合成に関与する蛋白質の遺伝子であった。これら結果から酵母が強い鉄欠乏を起こしていると推定した。このことを確認するため、Zpt を含む培地に鉄を添加したところ、酵母の増殖は顕著に回復した。また、DNA 修復系遺伝子発現はあまり変化がなかったため、変異原性や発癌性については可能性が低いことが示唆された。これらのことは、従来不明であった Zpt の毒性の解明に大きく寄与したものと判断した。

以上、酵母 DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を用いた毒性解析・評価は、比較的簡易で短時間の実験により、どのような生体影響があるかまで推定・評価することが可能な技術であることを示した。従来の毒性解析とは異なり、遺伝子発現解析では、細胞膜、DNA など複数のターゲットを有する毒性についても一度に評価することが可能であった。また、Zpt のごとく毒性未知の物質・新規物質の毒性評価についても有用であることを示した。ここで注目すべき点は、真核微生物である酵母を用いてこのような研究が為されたことである。すなわち、酵母はヒトを含む真核生物のモデル生物であるため、得られた結果をヒトに外挿することが可能である。さらに酵母は取り扱いが容易で実験の再現性も得やすい微生物であり、最も研究の進んだ真核生物の一つである。このため、約 6,000 ある酵母 ORF のうち 75% 以上が機能既知あるいは機能推定が行われている蛋白質をコー

ドしている。ヒト細胞を含む他の生物種では、発現変動を示した ORF のうち多くが機能未知で、毒性解析・評価がそれ以上進まないという例も少なくない。これらの点で、酵母を用いて行った当論文のトキシコゲノミクスとしての意義は大きく、多くの情報をもたらしたものとする。更に、銅、MeOH、FA、及び Zpt の実験結果が Gene Expression Omnibus Database (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) にそれぞれ GSE9231, GSE9229, GSE9230, GSE9223 として公開されているため、今後の毒性解析のみならず、25% が未だ機能未知の酵母遺伝子の機能解析の分野においても活用可能な情報を蓄積できたものとする。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 田 篤
副 査 客員教授 鎌 形 洋 一
副 査 准教授 和 田 大

学 位 論 文 題 名

Toxicogenomics Using Yeast DNA Microarray

(酵母 DNA マイクロアレイを用いたトキシコゲノミクス)

本論文は、英文 166 ページ、図 16、表 18、5 章からなり、参考論文 4 編が付されている。

遺伝子発現パターンの変化はその生物のおかれている生理学的条件の変化を意味する。生物あるいは細胞を毒物や環境変化に曝露することによって惹起される遺伝子発現応答を観察・測定することにより、そのストレスが生物に及ぼす影響を迅速かつ容易に解析することが可能となった。本研究では、金属イオン、アルコール、アルデヒド及びその他の化学物質に対する遺伝子発現応答を酵母 DNA マイクロアレイを用いて解析することにより、酵母トキシコゲノミクスの適応性・有用性について検討を行っている。

1) 酵母 DNA マイクロアレイを用いたトキシコゲノミクスの概括

主に理化学分析とバイオアッセイからなる従来からの毒性学についての問題点を概観し、トキシコゲノミクスがどのような新規性を持って毒性学の進展に貢献するかを考察した。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が有する特徴・利点を紹介し、発現解析に使用する意義について述べた。様々な金属イオン毒性に対する研究例を紹介するとともに、銅の毒性についての遺伝子発現解析研究を概説した。本研究で取り上げたメタノール及びホルムアルデヒド毒性に関する遺伝子発現解析を紹介し、アルコールおよびアルデヒドが酵母の遺伝子発現に及ぼす影響を考察した。更にその他の化合物の酵母遺伝子発現解析研究事例を紹介し、発現解析で明らかになった様々な事実について検討するとともに、トキシコゲノミクスの将来性についても考察している。

2) 酵母 DNA マイクロアレイを用いた銅の毒性解析

金属イオン毒性の代表として銅イオンに対する網羅的遺伝子発現解析を行い、銅によりメタロチオネインやメタロチオネイン様蛋白質の遺伝子発現が最も上昇し、銅イオン取り込み系蛋白質の遺伝子発現が最も抑制されていることを明らかにした。発現上昇遺伝子の機能解析を行ったところ、「メチオニン代謝」に分類される遺伝子群が多く発現上昇してお

り、合成されたメチオニンやグルタチオン等の含硫生体内抗酸化物質の合成に供給されているものと推定した。「脂質、脂肪酸、イソプレノイド代謝」に分類される遺伝子群も多く発現上昇していたため、細胞膜に起きた傷害の修復系遺伝子が誘導されたと推定した。更に「酸化ストレス応答」や「DNA 修復」に分類される遺伝子群も誘導されており、銅毒性の大部分は酸化的なストレスであると推定、膜や DNA を傷害していると考察した。

3) 酵母に対するメタノールおよびホルムアルデヒドの DNA マイクロアレイを用いた毒性評価

分子構造が最も単純な C1 有機化合物であるメタノール（以下 MeOH）とホルムアルデヒド（以下 FA）の毒性評価を行った。MeOH による誘導遺伝子の機能解析および発現産物局在性の解析から、細胞膜が傷害されていることが推定された。FA に関する発現解析では、酵母の蛋白質が変性されたため蛋白質合成を止めるとともに、蛋白質の分解・修復系遺伝子を誘導していることが推定された。また、DNA 修復系の遺伝子群も発現上昇していた。更に FA の解毒にはグルタチオンが大きな役割を果たしていることが示唆された。また、MeOH 曝露酵母では、脱水素反応による急激な FA 濃度上昇を抑制しつつ解毒していることが推定された。階層的クラスター解析においてそれぞれの遺伝子発現プロファイルはクラスターを形成せず、MeOH と FA の毒性は異なるものに分類されている。

4) 酵母 DNA マイクロアレイを用いたジンクピリチオンの毒性評価

ふけ予防シャンプーなどに含まれているジンクピリチオン（以下 Zpt）の毒性については催奇形性を示唆する報告もあり、まだ不明な点があった。酵母を用いて網羅的発現解析を行ったところ、発現上昇遺伝子の多くは鉄イオン取り込み系蛋白質の遺伝子であり、発現抑制遺伝子の多くはチトクロム合成に関与する蛋白質の遺伝子であった。これらの結果から酵母が強い鉄欠乏を起こしていると推定した。このことを確認するため Zpt を含む培地に鉄を添加したところ、酵母の増殖は顕著に回復した。また、DNA 修復系遺伝子発現はあまり変化がなかったため、変異原性や発癌性については可能性が低いことが示唆された。従来不明であった Zpt の毒性の解明に大きく寄与したものと判断している。

以上、酵母 DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は、比較的簡易で短時間の実験により、ヒトを含めた真核生物に対する様々なタイプの毒物について推定・評価することが可能な技術であることを示した。すなわち本法によれば、網羅的解析の利点を生かして複数のターゲットを有する毒物についても評価することが可能であり、また毒性未知の物質・新規物質の毒性予測も可能である。以上の成果は、生命科学や毒物学のみならず、健康・環境科学等の基礎・応用両面において多大な貢献が期待できる。

よって審査員一同は、八十川大輔氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。