

環境汚染物質のモニタリングに関する研究
- 土壌中の環境ホルモンを直接検出するための試み -
生態環境科学専攻 環境分子生物学講座
博士課程 3年 津田 賢一（指導教官：山崎 健一）

背景

内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）は環境において安定かつ長期に残留する性質をもち、生態系や人の健康に悪影響を及ぼすことが心配されている。大気、水質、土壌、農畜水産物などの汚染の拡大は深刻な問題であり、生殖機能にも障害をもたらすので人類の存続に関わる大問題である。この問題の解決に関する新しい技術開発は緊急に取り組むべき重要課題である。

土壌中の環境ホルモンのモニタリングの現状にはいくつかの問題点がある。物質によって抽出法は様々であり、高価な機械の使用、さらに抽出溶媒などによる二次汚染の発生があげられる。生物機能に基づく新技術開発は二次汚染発生リスクが少なく、パブリックアクセプタンスを得やすいと考えられる。そこで、図1のように、植物を用いて土壌から直接環境ホルモンを吸収し検出できるセンサーの開発を試みる。植物は根が発達しており、極低濃度の化学物質を吸収して蓄積することができると考えられる。

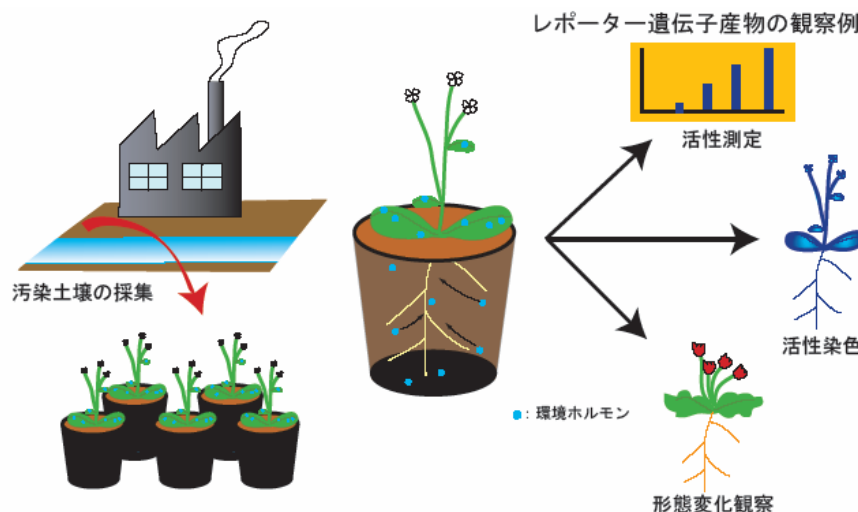


図1 遺伝子組み換え植物を用いた汚染土壌からの環境ホルモン検出の模式図

方法

女性ホルモン様物質が哺乳類の体内に取り込まれると、細胞内のエストロゲンレセプター(ER)と結合して核内に移行し、ERはある種の遺伝子の5'上流に存在するエストロゲン応答エレメントに結合して、それらの遺伝子の発現を誘導する。また、この遺伝子発現誘導にはリガンド結合型ERと特異的に結合する転写コアクチベーターの存在が重要である。このようにERを介した遺伝子誘導発現系が主に女性ホルモン様物質による内分泌攪乱に関連していると考えられている。即ち、女性ホルモン様物質は極微量で影響を与えることから、ERは女性ホルモン様物質に対する極めて感度の高いセンサーである。従って、これらの遺伝子を植物に導入することにより、環境ホルモンを検出するシステムを構築する。

図2と図3に示したように、エフェクター遺伝子としてヒトのエストロゲン受容体とその転写コアクチベーターであるTIF2 (Transcriptional intermediary factor 2)、同時にこれらに应答するレポーター

として、受容体が結合するシス配列とその下流に GUS (β -glucuronidase) 遺伝子をアグロバクテリウムを用いてシロイヌナズナに導入した。得られた遺伝子導入個体はエストロゲンを含む培地で育てられ、これらの植物体のレポーター活性を調べることでエストロゲンの検出を試みた。

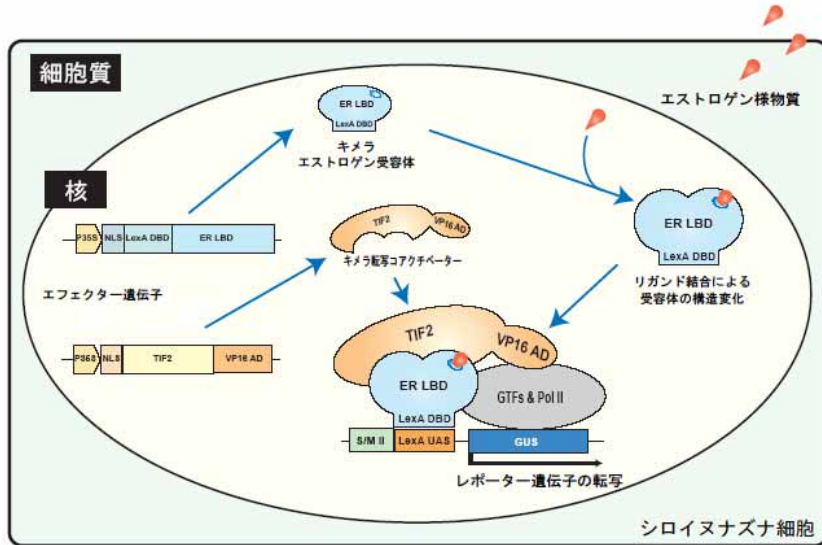


図2 エストロゲン様物質検出の原理

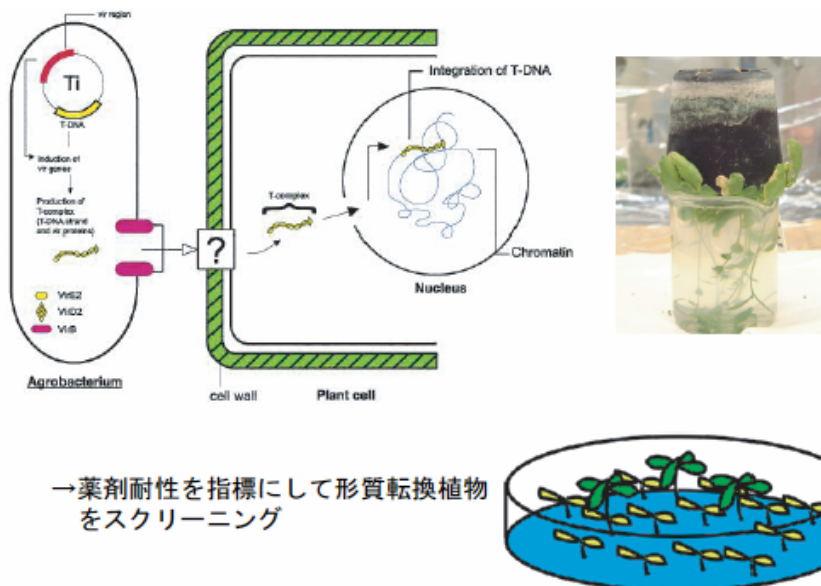


図3 シロイヌナズナへの遺伝子導入法

結果

エフェクター遺伝子とレポーター遺伝子が導入された植物個体は薬剤耐性の遺伝子も同時に保持しているため、形質転換植物は薬剤を用いて選抜された。約 15000 種子のスクリーニングの結果、薬剤耐性を示す植物個体が 3 個体得られた。これらの植物体からリーフディスクを作製し、それらをエストロゲンを含む溶液で処理した後、レポーター遺伝子の発現を調べた。その結果、図 4 に示したように 0.3-30 ppb の 17β -estradiol (E2) を含む溶液で処理した葉で顕著にレポーター遺伝子の発現が見られ (青く染色されている場所が GUS 遺伝子が発現している) 本システムが低濃度エストロゲンに応答することが示された。

さらに詳細なエストロゲンへの応答を調べるために、これらの形質転換植物体から回収された種子を用いた。各種濃度の E2 を含む寒天培地にこれらの種子を播種し、5 日間明条件で育てた後、レポーター遺伝子の活性を調べた。その結果、図 5 に示したように 3 ppt-30 ppb の範囲においてコントロールに比べ顕著なレポーター活性が検出された。また、300 ppt をピークに、濃度依存的にレポーター活性の上昇が見られるが、それよりも高濃度になると活性が下がっていく傾向が観察された。さらに期間を延長して 10 日間エストロゲン存在下で育てた形質転換植物のレポーター活性も調べたが、大きな違いは観察されなかった。このことはこの遺伝子導入シロイヌナズナはかなり早い育成段階でエストロゲン応答が飽和に達していることを意味しており、エストロゲン検出のための必要日数は 5 日以下であるといえる。また土壌中に含まれるエストロゲンを検出することも試みた。その結果、図 6 に示したように、100 ppm の E2 を含む土で育てた形質転換植物よりレポーター遺伝子の活性が検出された。

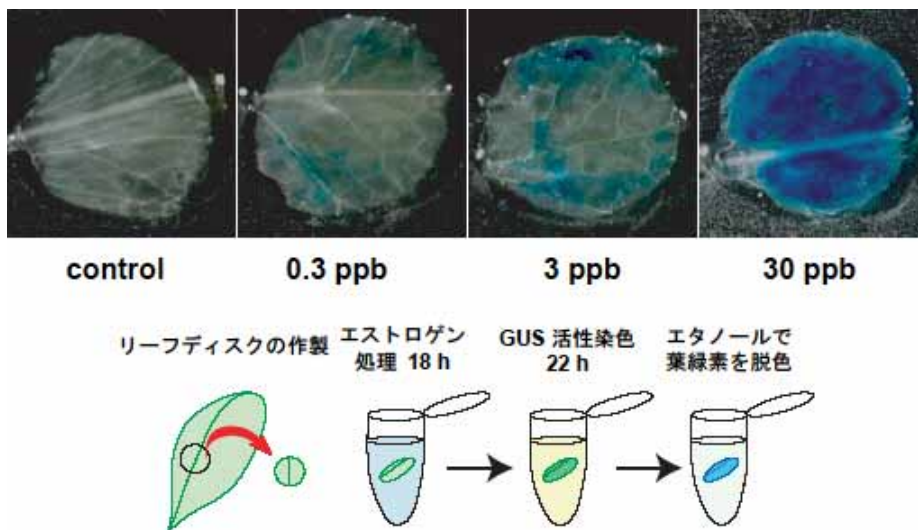


図 4 形質転換シロイヌナズナ葉(第一世代)のエストロゲン応答性の観察

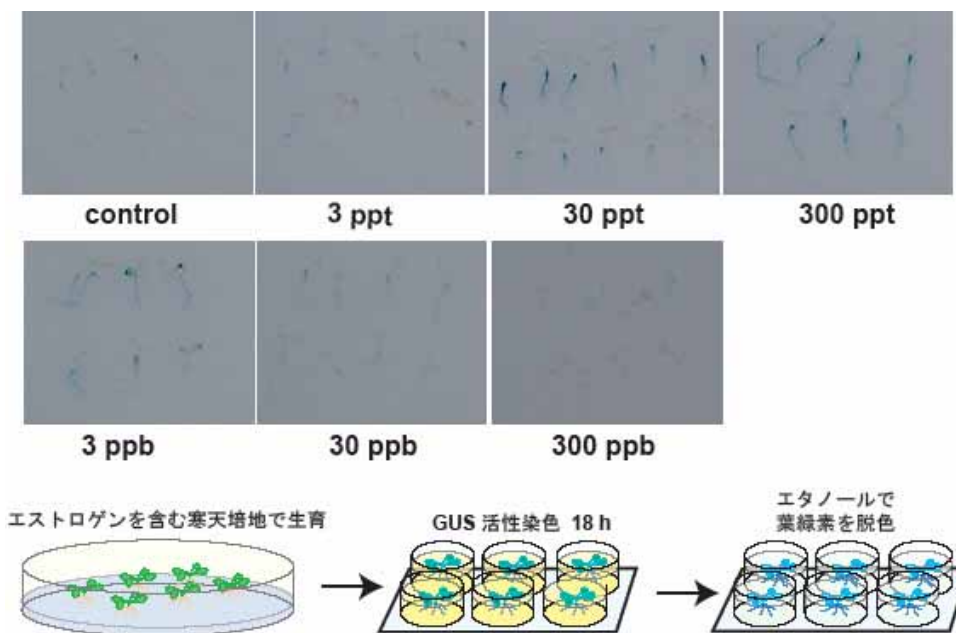


図 5 形質転換シロイヌナズナ芽生え(第二世代)のエストロゲン応答性の観察(播種後 5 日目)

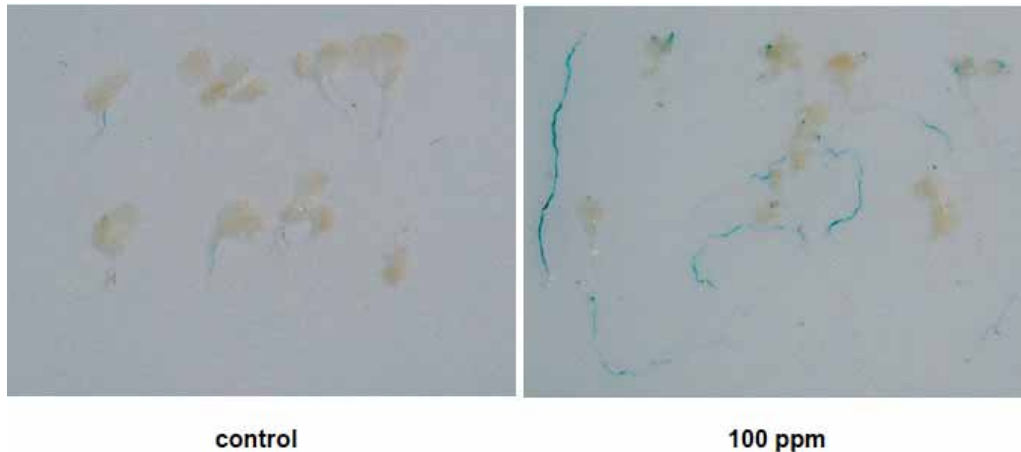


図6 形質転換シロイヌナズナ芽生え(第二世代)のエストロゲン応答性の観察(土壌に播種後10日目)

考察・展望

今回作製されたエストロゲン様物質検出のためのシステムは少なくとも3 pptのE2を検出することができることが明らかになった。これはバイオセンサーとして実用に耐えうる感度を備えており、環境ホルモンセンサーとして使用されることが期待される。しかし、3 ppb以上の高濃度のE2が存在するとレポーターの活性が徐々に低下することが観察されたことは、環境ホルモンセンサーとしての欠点であると考えられる。今後原因の調査とともに改良を加える必要があるだろう。また今回調べたのはE2についてだが、他のエストロゲン作用をもつ環境ホルモンも同様に検出できると考えられる。

今後のさらなる課題としては以下のようなことが考えられる。

- ・ 本システムの検出感度を0.1 ppt程度の感度まで上昇させる。
- ・ 存在するエストロゲン量を同定できるシステムを確立する。
- ・ 土壌から直接検出するための方法を改良し確立する。
- ・ さらに簡便なレポーターシステムを開発する。

達成度

「エストロゲンレセプター(ER)をエフェクター、GUS (-glucuronidase)やGFP (green fluorescent protein)遺伝子などをレポーターとしてシロイヌナズナに組み込む。女性ホルモン様物質を添加した寒天培地にこの形質転換植物を植え、応答したレポーターの発現で環境ホルモンを検出する。このシステムでのモデル系を構築する。」

上記の内容が目標であったので、本研究の結果は十分に目標を達成したといえる。