

環境とゲノミクス技術



技術解説

渡 邊 肇*

Genomics for environmental science

Key Words : Genomics DNA microarray Toxicogenomics Transcriptomics

1. はじめに

近年、産業をはじめとして様々な分野で「環境にやさしい」ということばが聞かれるようになってきている。このことばは地球保全戦略に端を発した「持続可能な発展」にもとづいて広く用いられるようになってきたことばに他ならないが、「環境にやさしい」とはどういうことであろうか。省資源、省エネルギーなどさまざまな項目の中でも1つの重要な観点は、環境への負荷という点であろう。例えば化学物質の場合、生産から利用、消費、廃棄にいたるまでのいわゆるライフサイクルにおいて化学物質は環境中に放出される。この場合、環境への負荷とは化学物質の放出として定義づけられ、この化学物質の放出を極力防ぐことは極めて重要な課題となろう。しかし化学物質の環境への放出を完全に防ぐことは技術的にもコスト的にも困難であるがゆえに、環境への負荷を的確に評価し適正に管理する技術が必要となってくる。環境中の化学物質の多くは環境中の生物に作用してはじめて負荷となりうることから、人間をふくめ生物への負荷を的確に評価することが可能になれば、化学物質の開発や利用に大きく貢献することができる。

従来の化学物質影響は、ヒ素、カドミウム、水銀などに代表されるような比較的均一な化学物質の大量曝露によって引き起こされる影響が懸念されてい

た。したがって化学物質影響に関する試験・評価も急性毒性試験を中心として、発がん性、生殖発生毒性など種々の毒性試験が確立されてきた。しかし、およそ10年前に提示された内分泌かく乱化学物質問題に代表されるように(1)、近年の化学物質に対する懸念はむしろ低用量で多種類の化学物質の影響である。その影響については、従来の毒性試験法の致死量のような明確なエンドポイントではなく、生体システムのかく乱といった概念が生じてきた。こうした広範なエンドポイントは従来の毒性の範疇を超えており、種々の解析法や評価法が模索され、より鋭敏で的確な毒性影響評価が求められるようになってきている。

このような化学物質の影響評価における概念の大きな変化と時期を同じくしてモデル生物を中心としてゲノム情報が急速に蓄積されてきた(2)。特筆すべきは、このゲノムを網羅的に解析する分野としてのゲノミクスの発展であろう。それまでの技術は、遺伝子やその産物などを1つ1つ解析せざるを得なかったが、このゲノミクスにより、可能な限り全ての遺伝子やその産物の状態を網羅的に解析する技術が確立されたといえる(3)。

2. ゲノミクス技術

ゲノミクスは当初、DNAマイクロアレイを用いた転写プロファイルの解析、すなわちトランスクリプトミクスとほぼ同義に用いられていた。しかしその後、プロテオミクス、メタボロミクスなどを包括して定義されるようになってきており、これらを総称してオミクス技術とも呼ばれている。通常、遺伝情報を蓄えているゲノムDNAは、mRNAに変換(転写)されてこのmRNAが細胞質に運ばれ、細胞質にあるタンパク質合成装置によってタンパク質が合成される(翻訳)。このタンパク質は細胞、組織を

* Hajime WATANABE

1963年2月生

現在、大阪大学 大学院工学研究科 生命先端工学 教授 理学博士 分子生物学

TEL : 06-6879-7427

FAX : 06-6879-7428

E-mail : watanabe@bio.eng.osaka-u.ac.jp



構成する重要な構成分子であるだけでなく、様々な物質を合成、代謝する酵素や情報を伝達するための分子としても機能している。したがって、このタンパク質の変化を捉えることは、医学生物学上非常に重要な意義をもっており、プロテオミクスとして現在発展しつつあるが、タンパク質固有の物理化学的特性の多様性と解析法が障害となっている。

メタボロミクスは、トランスクリプトームやプロテオームと異なり直接的にゲノム情報に依存していないことを特徴としており、生体内の代謝産物をターゲットとして低分子化合物の網羅的な解析を目的としている。Nicholson (ロンドン大学インペリアルカレッジ) によって最初に提唱されたメタボロミクス(4)は、NMRによる分析(5-6)として報告されたが、その後さらにGC-MS(7)やLC-MS(8)、CE-MS(9-10)を利用したプロファイリングなども利用されるようになってきている。生体内の基本的な代謝産物は共通している分子も非常に多いことから、種を超えたデータの取得が可能である点、生体内の状態を直接的に反映しているという点で、他のオミクス技術とは異なった特徴を持つ。

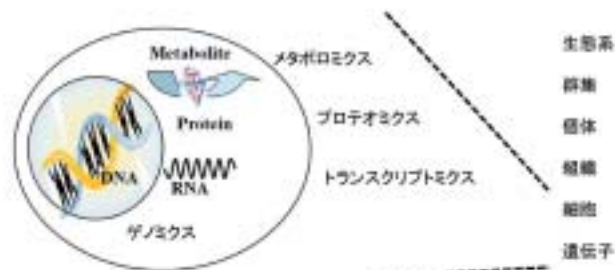


図1 オミクス技術

3. トランスクリプトミクス

トランスクリプトミクスは、細胞や組織内に存在している mRNA について網羅的にその種類と量を測定する技術である。トランスクリプトミクスの中核となる技術として DNA マイクロアレイがある。DNA マイクロアレイ技術はガラスなどの基盤上に多種類の DNA を高密度に固定化し、これに相補的に水素結合する DNA または RNA を検出する方法である。DNA マイクロアレイの基板上には全遺伝子を検出できるように設計された比較的短い(25-60塩基)1本鎖 DNA が高密度に各々の座標上に固

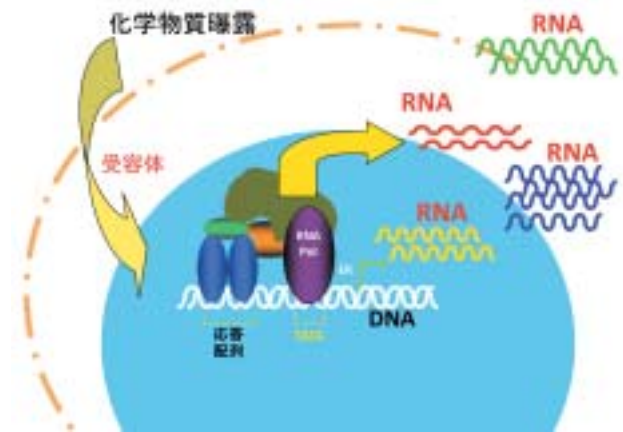


図2 転写レベルの応答

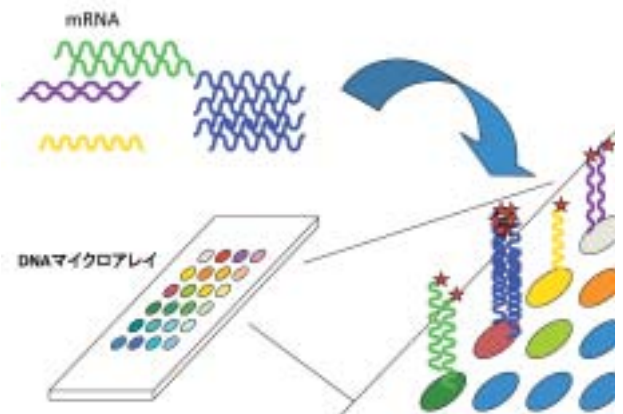


図3 DNA マイクロアレイの概念図

定化されている。細胞や組織からの全 mRNA を蛍光標識した後に、これを DNA マイクロアレイ上の固定化 DNA と反応させることにより、それぞれの遺伝子が固定化された位置で mRNA の量に応じた蛍光を発することになる。この蛍光強度を高性能スキャナを用いて読み取ることにより、個々の遺伝子の発現量を推定する。トランスクリプトミクス解析においては、その検出にあたって相補的な核酸同士の水素結合を利用するという点で、物理化学的に他のオミクス技術よりもはるかに均質な物質を対象としており、技術的にも安定しているために比較的信頼性、再現性の高いデータの取得が可能であり、モデル動物においては数万遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイを比較的安価に入手できるようになりつつある。

スキャンされた蛍光強度は、データ間のばらつきを補正するための標準化など(11-12)一連の操作を

経た後にデータ間の比較がなされる。実験結果を有効に解析するためには多変量解析など(13-15)が有用になるが、これらの手法についてはバイオインフォマティクスの対象としても有用であり様々な手法が開発されつつある(16)。これらは単に統計的なアプローチだけでなく、遺伝子機能やゲノム情報をもとに解析する手法なども考案されている(17)。こうした手法を用いることにより、一定の実験条件や疾患に関連した遺伝子セットの抽出が可能となり、関連した遺伝子の機能、制御機構などを明らかにすることにより、全体像を遺伝子レベルから明らかにすることが期待できる。

一般には実験室レベルで様々な疾患のメカニズム解析、治療や予後の評価や毒性評価の解析に用いられるほか、基礎研究にも多用される。

4. 化学物質影響評価へのゲノミクス技術の利用

ゲノミクスは、生命科学の多くの分野に影響を及ぼしてきたが、毒性学の分野においても例外ではなく、毒性学(トキシコロジー)とゲノミクスを融合したトキシコゲノミクスという概念が形成された。毒性のエンドポイントが発現する以前に遺伝子の発現レベルは変化しているために、トキシコゲノミクスを導入することにより網羅的に遺伝子発現を解析すれば、毒性発現に至る以前の兆候を遺伝子の発現レベルの変化として早期に鋭敏にとらえられるという期待がある。またこうした発現レベルが変化する遺伝子の機能を解析することにより、毒性の発現機序を明らかにし毒性の予見に役立てることが期待できる。ゲノミクスがDNAマイクロアレイを用いたトランスクリプトミクスのみならず、プロテオミクス、メタボミクスなどを包括して定義されるようになったのと同様、トキシコゲノミクスに、プロテオミクス、メタボロミクスに基づく毒性学も含まれるようになってきている。

トキシコゲノミクスにおけるトランスクリプトミクスは、主として2つの方向性を有している。1つはトキシコロジーに特徴的なもので、毒性影響を示す際のバイオマーカーの取得である。これは、個々の遺伝子そのものを遺伝子マーカーとして探索する場合と、遺伝子発現プロファイル全体を化学物質のフィンガープリントとしてとらえる場合がある。いずれの場合にも、生体から見た化学物質の影響をゲ

ノミクスに基づいて高感度に検出・評価することを目指しており、リスク評価につなげようとする動きである。

もう1つはトランスクリプトミクスをベースとした毒性影響の発現に至るまでの分子メカニズムの解明である。これは遺伝子レベルでの変化に着目して解析することにより、化学物質影響を遺伝子レベルから解明を目指すものであり、他のオミクステクノロジーを取り込んだアプローチが進みつつある。

一方で、化学物質影響の評価においてゲノミクスを導入する際の問題も生じている。上記のようにゲノミクス技術により遺伝子の網羅的な解析が可能となったものの、実際の化学物質影響との関連が必ずしも明確に解析されていない点である。対象とする実験動物に化学物質を曝露しトランスクリプトミクス解析を行うと、何らかの遺伝子発現状態の変化が見られる場合が多い。ところがこの遺伝子発現状態の変化と実際の化学物質影響は必ずしも直接関係しているとは限らない。例えば化学物質の曝露では一般的に解毒関連の遺伝子発現に誘導がかかり、重金属の曝露では重金属解毒に関連する遺伝子の誘導がかかる。しかしこれらの遺伝子発現の誘導は、曝露の指標とはなるものの悪影響の直接的な指標となる変化ではない。特定の遺伝子群の発現変化から悪影響までの機序を明らかにすることは、オミクス技術とは別のアプローチが必要な場合が多く時間もかかることからなおざりにされている報告も見られるが、今後データが蓄積していく中で、実際の化学物質の評価にどのように利用していくのかは重要な課題である。すなわちトランスクリプトームが変化した場合、その遺伝子機能の解析やその変化を担っている遺伝子発現制御因子の理解を通して化学物質曝露から影響までの一連のパスウェイの解明が重要となる。酵母の場合、さまざまな遺伝子欠損変異株を用いて化学物質影響の遺伝子発現プロファイルと比較することにより責任遺伝子の探索を行い、一定の成績を得ている(18)。マウスなどにおいては、こうした欠損変異体の利用は通常困難であるが、化学物質の受け手となる生体分子の同定と解析はゲノミクスに限らず優先すべき課題である。

従来トキシコロジーでは、通常のアレイデータに加え、毒性試験固有のデータセットが生じる。これには、化学物質の致死量をはじめ体重や組織重量、

血圧や血液成分、病理組織学的な知見などが相当する。これはいわゆるフェノミクスともいべきパラメーターの1つでもあるが、現在急速に増加しつつあるトキシコゲノミクスからのデータをこれら従来のトキシコロジーからのエンドポイントと積極的に関連付け理解を進めることも重要な課題となっている (phenotype anchoring)。これにより、従来のトキシコロジーとゲノミクスの関連付けが期待され、単なるバイオマーカーの探索よりもさらに進んだ毒性の評価と理解が可能になると思われる。

5. 環境影響評価へのゲノミクス技術の利用

化学物質影響が懸念される生物種に対しても、その考え方が大きく変化しつつある。従来は、ヒトに対する化学物質影響の評価が中心であり、ラットをはじめとする実験動物は単にヒトへの毒性評価のためのモデル動物として評価され、ヒトへの外挿が問題となっていた。しかし、近年になり地球環境の保護、生態系の保全などが重要な課題となり、化学物質影響についても単にヒトへの影響だけでなく、環境中の生物に対する影響を考慮する必要が生じてきた。日本においても遅ればせながら、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法)」が平成16年度に改正され、環境指標となる動植物への影響に着目した審査・規制制度が導入された。これらの生物への影響評価は、一般に増殖阻害濃度、半数致死濃度を重要なパラメーターとしているが、こうした数値は、対象となる生物種が異なるとその関連性を見出すことが困難であり、その作用機序についても情報を得ることができない。こうした中で、トキシコゲノミクスと同様、バイオマーカーの探索、毒性の発現機序の解析を目的として、環境毒性学 (エコトキシコロジー) にゲノミクスを導入したエコトキシコゲノミクスが生じた (19-21)。エコトキシコゲノミクスもトキシコゲノミクス同様に、トランスクリプトミクスのみならず、プロテオミクス、メタボロミクスを包括しているが、これら環境中の生物においてゲノミクス的なアプローチを行う際に最も障害となるのは、ゲノム情報の欠如である。モデル生物のゲノム情報は急速に明らかにされてきているのに対して、その他の生物のゲノム情報は未だ限りがある。ナショナルプロジェクトのレベルでのゲノム情報の収集に関しては、サンガーセンター

(<http://www.sanger.ac.uk/>) や The Institute for Genomic Research (TIGR) (<http://www.tigr.org/index.shtml>) などのゲノムセンターがモデル生物や病原菌などを中心に配列解析を進めデータベース化してきたが、米国においては、Department of Energy の Joint Genome Institute が中心となって非常に多岐にわたる生物種のゲノム配列、EST 配列の取得を行っている。これは、系統樹を構成する広範な生物種を対象としており、これらの情報が充実することで、より多様な生物種に対してゲノミクス的なアプローチが可能になると思われる (http://genome.jgi-psf.org/tre_home.html)。さらに遺伝子のアノテーションの問題は残るものの次世代シーケンサーの利用によりゲノミクスのアプローチはさらに進展すると思われる。

非モデル生物を対象としたトランスクリプトミクスについては、ゲノム情報の取得やアノテーションという問題が存在するものの、技術的には確立されてきていることから、信頼性の高いデータを取得することが期待できる。環境中の化学物質影響をゲノミクスで実際に評価する可能性については、Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) や Environmental Protection Agency (EPA) をはじめとして多くの国や機関で関心が持たれ、対象となる生物種や手法について討議されている。

化学物質の環境への影響や生態系への影響を評価しようとする場合、対象となる生物種は非常に多岐にわたる。ゲノミクス的なアプローチを展開するには、ランドマークとなるような適切な生物種を選択しアプローチを行うことが必要であろう。また種々の生物を用いたトランスクリプトミクスは、生態系全体に対する化学物質の負荷を評価する上でも重要であるのみならず、異種生物間で共通に存在している遺伝子ネットワークの発見など (22) 基礎生物学的な貢献も大きい。さらには生物種間の共通性、相違点などを明らかにすることにより、ヒトをはじめとする他種の生物への外挿も可能となり、リスク評価などにも利用できる可能性がある。

一方でエコトキシコゲノミクスでは、フィールドを含め多くの生物種が対象となりうるが、対象とする生物種については十分な注意が必要であろう。ラットなどにおいても遺伝的背景により化学物質に対

する応答性が大きく異なることが知られているが(21)、遺伝的背景が明確でない非モデル生物については、遺伝子発現の差が特定の遺伝的集団によるものなのか、実際の曝露に起因するものなのかを明確にする必要があり、取得したデータの十分な解釈が必要となる。

6. 今後の課題と展望

化学物質曝露影響をオミクス技術によって解析した場合には、莫大なデータを解析し意味づけをする(データマイニング)ためにバイオインフォマティクスの比重は非常に大きい。化学物質曝露によるオミクスのデータ解析から目指しているものは大きく次のものがある。(1)環境中の毒性物質曝露に対するバイオマーカーの探索(2)曝露から悪影響までの生物学的な作用機序の解析(3)環境などからの曝露と疾患の関連(4)環境毒性物質などの生物影響に関するデータベース化。これらは、化学物質曝露により生じたトランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスの変化から意味づけをする(データマイニング)点で、バイオインフォマティクスが重要な働きをする。さらに作用機序の解明、疾患との関連については、さらにその化学物質自体の物理化学的特性や吸収(Absorption)、分布(Distribution)、代謝(Metabolism)、排泄(Excretion)(ADMEs)の情報化学物質など従来のトキシコロジーからの知見を有機的に結合させたデータベース化が必要であり、システムバイオロジーを包括したアプローチが重要であろう。

従来は、*in silico*の毒性評価では定量構造活性相関(quantitative structure-activity relationship: QSAR)が中心であった。しかし、ゲノミクスにもとづく影響評価では、種々の情報を統合したバーチャル組織を究極的には目指しており、新たな評価系の構築が望まれている。これは毒性影響評価の迅速化、実験動物の保護の観点などからも重要な課題である。また環境影響を考慮した場合には、バーチャル環境指標動物といった概念が必要になるであろう。

予防的な観点からはトキシコゲノミクスの利用により、より早期に鋭敏な悪影響の評価が期待される。しかし一方で、曝露する化学物質が低濃度になれば、バックグラウンドの変動との差の検出が困難になり、より早期になればエンドポイントとの関連性が不明

確になる。こうした問題を解決するためには、より高精度の手法の開発のみならず、時間軸を考慮したアプローチが必要となる。例えば、近年問題になってきているものの1つに胎児期や小児期の曝露影響があげられる。これは、胎児期、小児期における曝露影響が成熟したときに現れるのではないかという懸念である。こうした問題は、単に曝露した時点のゲノミクスのプロファイルを取得しているだけでは不十分であろう。後生的なゲノムの変化が化学物質によりどのように誘起されるかといったエピゲノミクスからのアプローチも必要になる。

トキシコゲノミクスは非常に有力な毒性影響評価ツールとして期待できるが、毒性影響のどこまでを解析・評価できるかは未知の部分も多い。問題点を解決しながら、データを蓄積、解釈することによって、新たな知見が得られるものと思われる。トランスジェニックマウスやノックアウトマウスは、遺伝子レベルで変調をかけることにより、遺伝子の機能を探ることができた。一方で、化学物質曝露の場合は、生体内の標的に関連した遺伝子の発現に変動をきたす。トキシコゲノミクスを体系的に発展させることにより、単に化学物質影響評価のための新しい切り口となるのみならず、生体システムの解明などにも大きく寄与できると思われる。

- (1) McLachlan J. A., *Endocr Rev.* **22**, 319 (2001)
- (2) Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O., *Science.* **270**, 467 (1995)
- (3) Lockhart D. J., Dong H., Byrne M. C., Follettie M. T., Gallo M. V., Chee M. S., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H., Brown E. L., *Nat Biotechnol.* **14**, 1675 (1996)
- (4) Nicholson J. K., Lindon J. C., Holmes E., *Xenobiotica*, **29**, 1181 (1999)
- (5) Reo N. V., *Drug Chem Toxicol*, **25**, 375 (2002)
- (6) Viant M. R., *Biochem Biophys Res Commun*, **310**, 943 (2003)
- (7) Halket J. M., Przyborowska A., Stein S. E., Mallard W. G., Down S., Chalmers R. A., *Rapid Commun Mass Spectrom*, **13**, 279 (1999)
- (8) Ito T., van Kuilenburg A. B., Bootsma A. H., Haasnoot A. J., van Cruchten A., Wada Y., van Gennip A. H., *Clin Chem*, **46**, 445 (2000)

- (9) Soga T., Ohashi Y., Ueno Y., Naraoka H., Tomita M., Nishioka T., *J Proteome Res*, **2**, 488 (2003)
- (10) Tolstikov V. V., Lommen A., Nakanishi K., Tanaka N., Fiehn O., *Anal Chem*, **75**, 6737 (2003)
- (11) Irizarry R.A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y.D., Antonellis K. J., Scherf U., Speed T. P., *Biostatistics*, **4**, 249 (2003)
- (12) Kim S.Y., Lee J.W., Bae J.S., *BMC Bioinformatics*, **7**, 134 (2006)
- (13) Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., Botstein D., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14863 (1998)
- (14) Tamayo P., Slonim D., Mesirov J., Zhu Q., Kitareewan S., Dmitrovsky E., Lander E. S., Golub T. R., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2907 (1999)
- (15) Kim D.W., Lee K.H., Lee D., *Bioinformatics*, **21**, 1927 (2005)
- (16) Draghici S., *Data analysis tools for DNA microarrays. Mathematical Biology and Medicine Series*. 2003, London: Chapman & Hall/CRC.
- (17) Subramanian A., Tamayo P., Mootha V. K., Mukherjee S., Ebert B. L., Gillette M. A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J. P., *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 15545 (2005)
- (18) Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD, Bennett HA, Coffey E, Dai H, He YD, Kidd MJ, King AM, Meyer MR, Slade D, Lum PY, Stepaniants SB, Shoemaker DD, Gachotte D, Chakraburttty K, Simon J, Bard M, Friend SH. *Cell* **102**, 109 (2000)
- (19) Snape J. R., Maund S. J., Pickford D. B., Hutchinson T. H., *Aquat Toxicol*, **67**, 143 (2004)
- (20) Miracle A.L., Ankley G.T., *Reprod Toxicol*, **19**, 321 (2005)
- (21) Iguchi T., Watanabe H., Katsu Y., *Environ Health Perspect*, **114** Suppl 1, 101 (2006)
- (22) Stuart J. M., Segal E., Koller D., Kim S. K., *Science*, **302**, 249 (2003)

