

氏 名	は せ がわ こう いち 長 谷 川 浩 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1675 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 地 域 環 境 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Cellular and molecular characterization of acrylamide actions in the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> (アクリルアミドが線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> におよぼす作用の分子および細胞学的特性評価)
論文調査委員	(主 査) 教 授 二 井 一 禎 教 授 東 順 一 教 授 西 岡 孝 明

論 文 内 容 の 要 旨

2002年の春、国立スウェーデン食品局 (the Swedish National Food Administration : NFA) と Stockholm 大学により、パンやポテトチップスなど炭水化物を主な原料とし高温によって調理される食品から、アクリルアミドが大量に検出されたという発表がなされた。その後、食品の加熱調理時において、還元糖とアスパラギンとのメイラード反応によるアクリルアミド生成が報告されている。アクリルアミドは、化学繊維、接着剤、塗料、下水処理時の凝集剤、そして化粧品の材料など、身近に使われている重要な高分子化合物であり、ポリマーには毒性がないとされている。しかし、そのモノマーには毒性があり、動物を用いた実験から、神経毒性、体細胞および生殖細胞への変異原性、さらに発癌性のあることが指摘されている。したがって、これまで産業有害物質として認識されていたものが、ふだん口にする様々な食品中に、しかも大量に検出されるという報告は世界中の人々の関心の的となった。本論文は、モデル生物であり、個体レベルでの毒性試験法が確立されている線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて、アクリルアミドの生物への影響評価をおこない、アクリルアミドの検出法の開発、さらにはアクリルアミドの毒性を解毒・緩和する候補となる食品のスクリーニング法の開発をおこなった。これらの研究に関する主な内容は、以下のとおりである。

第1章では、様々なアクリルアミド濃度下で線虫を培養したときの、1. 産卵数、2. 成長、3. 寿命、4. 次世代に与える影響について調べた。産卵数、成長および次世代への影響については、500 mg/L よりも低い濃度の場合には悪い影響はあらわれなかったが、寿命への影響については興味深い結果を得ることができた。すなわち、世界保健機関 (WHO) と米国環境保護局 (US EPA) による飲料水中のアクリルアミド許容基準値 0.5 µg/L を含む微量濃度 (0.5 µg/L から 50 µg/L) で線虫寿命が短縮し、中濃度 (500 µg/L から 50 mg/L) ではその現象が見られなくなり、さらに高濃度 (500 mg/L) になると再び寿命短縮が起こった。このように、アクリルアミド濃度と線虫寿命との間には二相性関係が存在した。

第2章ではDNAマイクロアレイを用いて、アクリルアミド処理による線虫の遺伝子発現変化について調べた。微量濃度 (0.5 µg/L) のアクリルアミドでも発現が変化する遺伝子が存在すること、また、主にグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、UDP-グルクロン酸転位酵素 (UGT)、短鎖脱水素酵素 (SDR) などの解毒酵素によってアクリルアミドが代謝されていることが明らかとなった。とくにGSTによる解毒代謝の役割が大きいものと考えられたので、アクリルアミド処理によって発現が上昇するGST遺伝子18種類を同定した。さらに、二次元電気泳動とMS (MALDI-TOF MS) 分析によって、高濃度 (500 mg/L) アクリルアミド存在下におけるタンパク質発現解析をおこなった。発現が増加するタンパク質スポットを同定した結果、アクリルアミド代謝にGSTが重要であることが確認できた。線虫体内におけるこれらGSTの発現パターンを調べたところ、アクリルアミド処理時にのみ発現するものもあれば、恒常的に発現しているものもあり、また発現部位も様々であった。このように、同じGSTをコードしていながらそれぞれ多様な発現特性を示すことが明らかになった。

第3章では、DNAマイクロアレイおよび二次元電気泳動の結果からもっとも増幅率の高い解毒酵素遺伝子を選び、そのプロモーターに *gfp* (green fluorescence protein) レポーター遺伝子を結合させ、これを線虫に組み込むことでGFP蛍光を発する線虫を作製した。この組み換え体線虫は、アクリルアミド処理時間および濃度に応答してGFP蛍光を発するので、これをバイオセンサーとすることによって、アクリルアミドの検出が可能となった。さらに、このバイオセンサーを利用することで、その他の広範囲な食品危害物質（クロロプロパノール類）や環境汚染物質（メチル水銀）などの検出にも応用できることを確認した。

第4章では、第3章で作製したバイオセンサーを用い、GST-4発現の有無を検出することによりアクリルアミドの害作用を抑える身近な食品の探索法を開発した。バイオセンサーをアクリルアミド処理すると、GFP蛍光は時間とともに増加する。そこで、アクリルアミド処理時に様々な食品を加えてGFP蛍光の増減を観察した。その結果、緑茶粉末を加えた場合、GFP蛍光の増加を抑えることが明らかになった。したがって、緑茶粉末をアクリルアミドの解毒または緩和食品の候補として挙げることができた。

第5章では、ストレス応答経路上の既知遺伝子と、アクリルアミドによって発現誘導されるGSTとの関係を、RNAi (RNA interference) 法により調べた。その結果、アクリルアミドによるGSTの発現誘導は、転写因子SKN-1によって制御されていることが明らかになった。このSKN-1は、哺乳類でGST発現制御に関与することが知られているNF-E2関連因子Nrf1およびNrf2の線虫における相同遺伝子である。しかし、線虫 *C. elegans* の場合、体壁筋での発現にはSKN-1が関与していないことがわかり、GSTのアクリルアミド応答は、線虫組織ごとに別々の因子により制御されている可能性が示唆された。

以上の5つの章で明らかになった事実から、毒性物質のみならず様々な化学物質を検出し、評価することを可能にする全く新しい方法を提案することができた。

論文審査の結果の要旨

大腸菌 O157, サーズウイルス (SARS Virus), 牛海綿脳症 (BSE) あるいはトリインフルエンザウイルスなど食生活を脅かす病原体が登場したり、また2006年より食品中に残留する農薬などの基準に係るポジティブリスト制度が施行されたりするなど、食品の安全性への社会的関心は年を追って高まっている。2002年春には、国立スウェーデン食品局 (the Swedish National Food Administration : NFA) と Stockholm 大学が、パンやポテトチップスなど炭水化物を主な原料とし、高温により調理される食品から、アクリルアミドが大量に検出されたという発表をしている。本論文では、モデル生物である線虫、*Caenorhabditis elegans* を用いて、近年食品危害物質として重要視されているアクリルアミドの毒性について個体および分子レベルでの評価をおこない、アクリルアミドを検出する方法を開発するとともに、アクリルアミドの毒性を解毒あるいは緩和する食品をスクリーニングする方法の開発をした。さらにアクリルアミドによって誘導されるGST発現に関わる遺伝子を、逆遺伝学的手法により発見した。評価すべき点は以下のとおりである。

1. 世界保健機関 (WHO) と米国環境保護局 (US EPA) によって設定されている飲料水中のアクリルアミド許容基準値は $0.5\mu\text{g/L}$ であるが、この微量濃度でも線虫寿命に影響を与え、その寿命を短縮することが明らかになった。また、アクリルアミドの濃度と線虫寿命の関係を調べ、微量濃度 ($0.5\mu\text{g/L}$ から $50\mu\text{g/L}$) で線虫寿命が減少するが、中濃度 ($500\mu\text{g/L}$ から 50mg/L) ではその現象が見られなくなり、高濃度 (500mg/L) で再び減少するという、二相性が見られることを明らかにした。

2. DNAマイクロアレイ解析により、線虫体内ではグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST), UDP-グルクロン酸転位酵素 (UGT), 短鎖脱水素酵素 (SDR) などの解毒酵素によってアクリルアミドが代謝されていることを示した。さらに二次元電気泳動と MS (MALDI-TOF MS) 分析によって、アクリルアミド代謝にGSTが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

3. DNAマイクロアレイおよび二次元電気泳動によって明らかになった、アクリルアミド代謝に重要であると考えられる8種類のGSTについて、個体内における発現パターンを明らかにするとともに、同じGSTであっても個々のGSTごとに多様な発現パターンを示すことを明らかにした。さらに、アクリルアミド代謝に重要であると考えられる他の解毒酵素

UGT-13 (UGT), F55E10.6 (SDR), C55A6.7 (SDR) についても線虫個体内における発現パターンを解明した。

4. レポーター遺伝子である *gfp* (Green Fluorescence Protein) と *gst-4* プロモーターとの融合遺伝子を組み込んだ線虫は、これをバイオセンサーとすることにより、アクリルアミドだけでなくその他の広範囲な食品危害物質 (クロロプロパノール類) や環境汚染物質 (メチル水銀) の検出にも応用可能であることを示した。

5. バイオセンサーを用い、GST-4 の発現の有無を検出することにより、緑茶粉末にはアクリルアミドの害作用を解毒または緩和する機能のあることを明らかにした。

6. RNAi 法を用いることで、アクリルアミドによる GST-4 の発現誘導は、線虫の組織によって、転写因子 SKN-1 により制御されている場合と制御されていない場合があることが明らかになった。すなわち、SKN-1 は線虫体壁筋での GST-4 発現には関与していないが、その他の組織には関与していることが明らかになり、GST-4 のアクリルアミド応答は、線虫の組織ごとに別々の因子により制御されている可能性が示された。

以上のように、モデル実験動物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を利用することで、アクリルアミドが動物の生活史上の各発育過程や寿命に与える影響について解析する方法を確立し、この物質が動物の寿命に与える興味深いいくつかの事実を発見した。また、全ゲノムおよび全タンパクを対象とし、アクリルアミドの解毒代謝に関わる酵素を網羅的に分析する方法を駆使することにより、それら酵素のひとつである GST-4 の発現制御に関わる分子を新たに発見した。このように、本論文では生きた線虫個体そのものがもつ毒性物質に対する応答反応を利用した新規性に富む鋭敏な毒物検出法が開発された。これらの業績は、毒性学、食品衛生学、応用動物学、微生物環境制御学などに寄与するところが大い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年12月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。