

《報 文》

カドミウム、農薬のカイコのHSP-70遺伝子発現への影響について

関村利朗

中部大学応用生物学部 応用生物化学科

1. はじめに

本研究は、食品危害物質である重金属や農薬が生物に与える影響を個体レベルと遺伝子レベルで実証する基礎的研究である。特に、平成14年度に始まった中部大学バイオサイエンス研究センターのプロジェクト「ゲノミックス、プロテオミックス及びエフェクトミックスによる食の安全性評価システム開発のための基礎的研究」における私のプロジェクト研究課題「昆虫を使った食品危害物質の評価」で目指していることは、次の2点である。

- (i) 危害物質がチョウ・ガの幼虫・親、次世代以降の個体に与える影響を科学的に評価する。
- (ii) 見つかった新規な作用を基に、チョウ・ガを危害物質評価のためのバイオマーカーとして使うシステム構築の可能性を探る。

過去2年間のチョウとカイコを使った実験では、主に、カドミウム (Cd) が、個体の成長速度、成長に伴う体重変化、生存率にどのような影響をあたえるのか、また、腹部、胸部、羽など各器官へのCdの相対蓄積量の評価など個体レベルでの影響評価を行ってきた (文献1, 2)。今回の研究の特徴と成果はこれまでとは異なっている。第一に遺伝子レベルでの影響評価が可能となった点であり、第二にインジェクターによる危害物質の注入実験を行った点である。第三として危害物質としてカドミウムのほかに2種類の農薬 (オキシシン銅、アセフェート) を加え合計3種類について実験した点に加え、インジェクターを使った実験では、危害物質の濃度を0.01ppm~1.0ppmと一般に基準値とされる濃度に比べて低くした点である。これらの結果には、過去2年間とは異なる種類の有意な情報が含まれており、今後の研究につながる結果が得られたものと考えている。

2. 実験方法

2. 1 HSP70遺伝子発現への影響

細胞内においてポリペプチドが機能をもったタンパク質になったり、或いは新生ポリペプチドがオルガネラ内に移入されるためには、その折りたたみや移入を助ける補助因子が必要とされる。この因子はある種のタンパク質群からなり、自らはその構造体の構成要因ではなく、ポリペプチドの立体構造形成を介助、巻き戻している。このような一時的に不安定な状態にあるポリペプチドに結合し、適切な折りたたみへと介添えをしていくのが、分子シャペロンと総称されているタンパク質群である。HSP70と呼ばれるタンパク質群は細胞質と核に存在し、熱ショック、重金属、有害化学物質、電気ショック、圧力・磁気力など様々なストレスから細胞を保護する細胞防御機構の中心的な役割を担う分子シャペロンの一種であると考えられている。

以下では、3種類の食品危害物質：カドミウム、農薬のオキシシン銅、アセフェートのカイコのHSP70遺伝子発現への影響を測定する方法と結果について述べる。

[材料]

カイコの飼育には、ソーセージ状の市販の人工飼料 (シルクメイト2S (日本農産工業) を用いた、混ぜ物のない人工飼料で育てたカイコをコントロールとし、カドミウム、農薬のオキシシン銅、アセフェートを人工飼料に加え、それぞれ20ppmの濃度にした飼料で終齢幼虫まで育てたカイコを実験材料として用いた。

[Total RNAの抽出]

液体窒素で凍結させたカイコの幼虫を乳鉢で粉碎し、チューブ内のTRIzol溶液に入れ、よく混合させてから、10分間室温でインキュベートしたのち、4℃で10分間遠心して溶け残りを沈殿させ、

キーワード：カイコ、HSP70遺伝子発現、カドミウム、農薬、アセフェート、オキシシン銅

受 理 日：2006年1月31日受理

3. 結果

3. 1 遺伝子発現比較結果

Scion Imageを利用して、電気泳動結果のバンドを数値化し比較を行った。

各バンドの内訳は次のとおりである。各数字は、

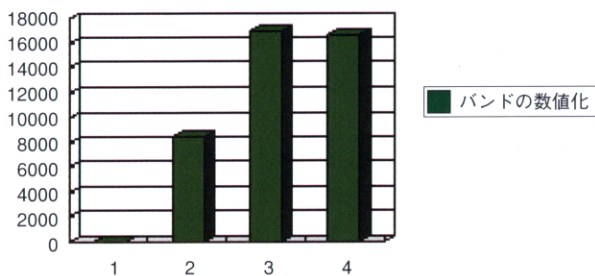
- ①コントロール
- ②オキシ銅を与えた個体
- ③アセフェートを与えた個体
- ④カドミウムを与えた個体
- ⑤, ⑥, ⑦, ⑧は, ①, ②, ③, ④のTotalRNA量の半分量である。

(1) HSP70 (fbpv1, 2) 32サイクル
(電気泳動の結果)



バンド幅の数値化の結果：左端のマーカを除いて左から①33 ②8438 ③16926 ④16644

下図はバンド幅の数値化をグラフ化したもの

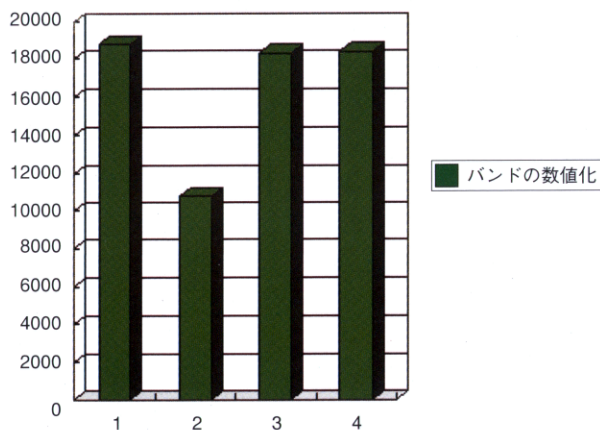


(2) HSP70 (ovs1, 2)
(電気泳動の結果)

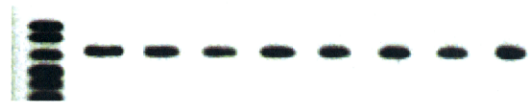


バンド幅の数値化の結果：左から ①18828 ②10763 ③18301 ④18398

下図はバンド幅の数値化をグラフにしたもの



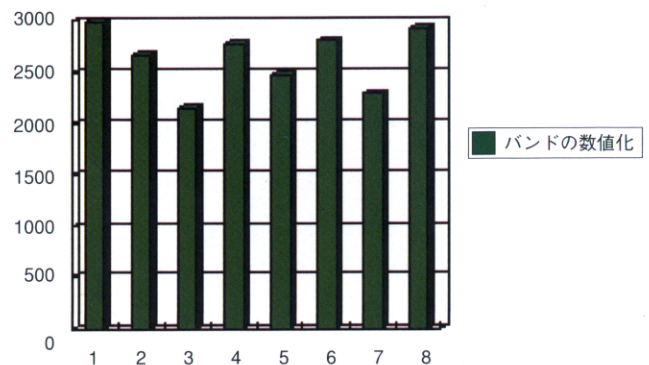
(3) β -チューブリン (br1250) 38サイクル
(電気泳動の結果)



バンド幅の数値化の結果：左端のマーカを除いて左から

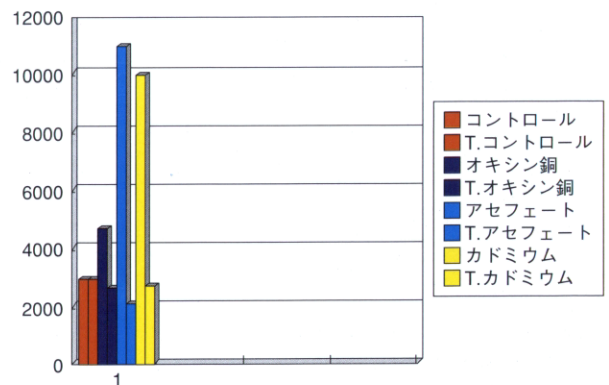
- ①2991.00 ②2663.00 ③2143.00 ④2778.00
- ⑤2471.00 ⑥2802.00 ⑦2285.00 ⑧2923.00

下図はバンド幅の数値化をグラフ化したもの

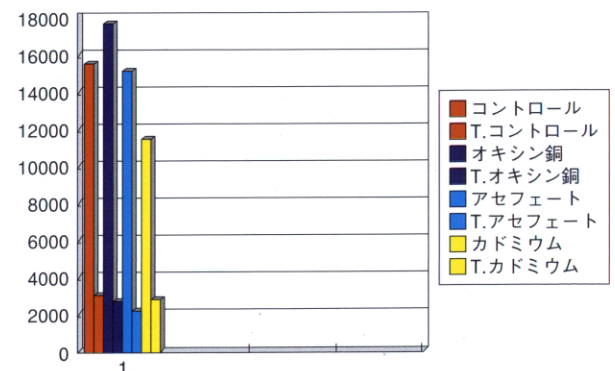


HSP70遺伝子発現の結果のまとめ

1) fbpv1, 2の平均とチューブリンの比較



2) ovs1, 2の平均とチューブリンの比較

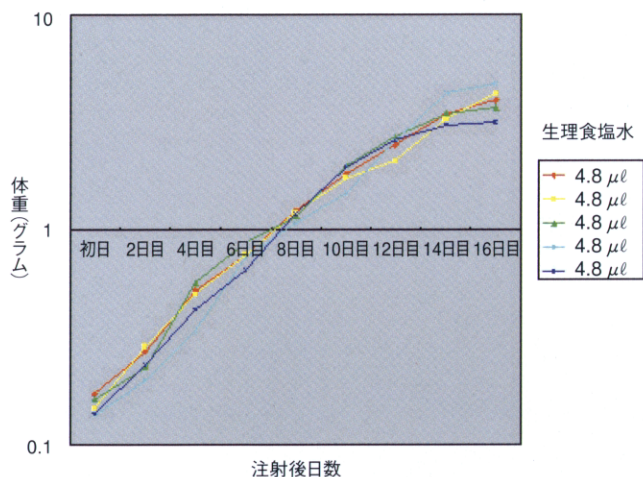


チューブリンの結果は各棒グラフの中で、右側のものを指す。(図でTはチューブリンの略)

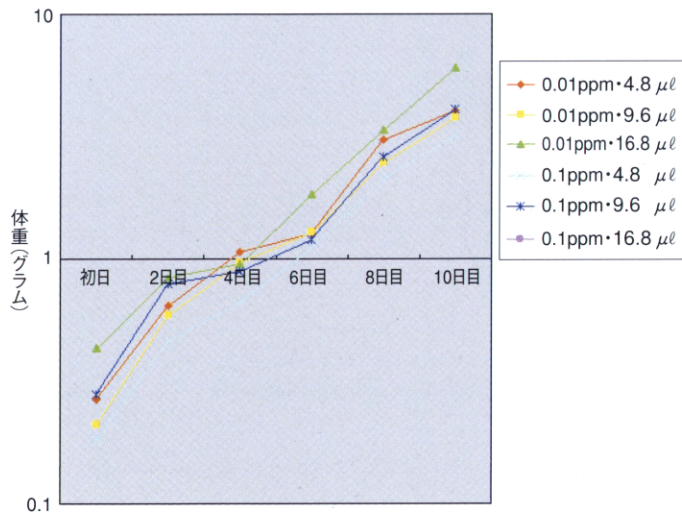
3. 2 インジェクターによる注入実験の結果

(1) カイコの体重変化を示すグラフ

以下の2つのグラフで縦軸はカイコ幼虫の体重を、横軸は注入後の日数を表す。また、各色付きの線は注入量 (μl 単位) を変えて測定した結果を表す。



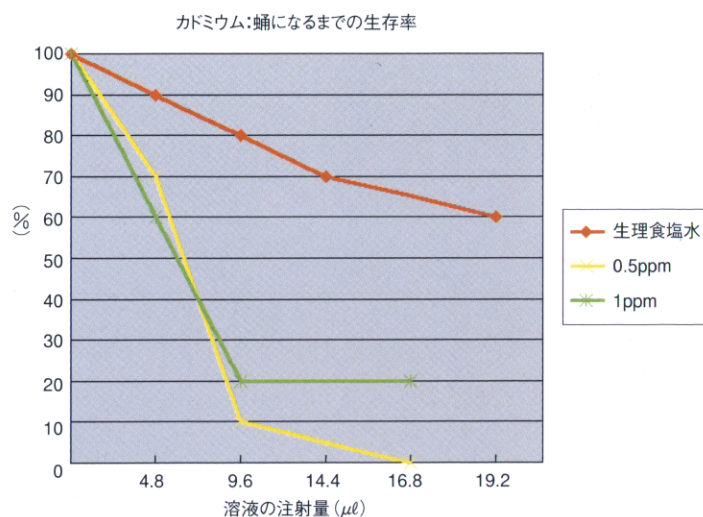
上図はコントロールとして生理食塩水を注入した時の体重変化を表す。なおControl2は生理食塩水を注入せず、注射針を刺しただけのものを表す



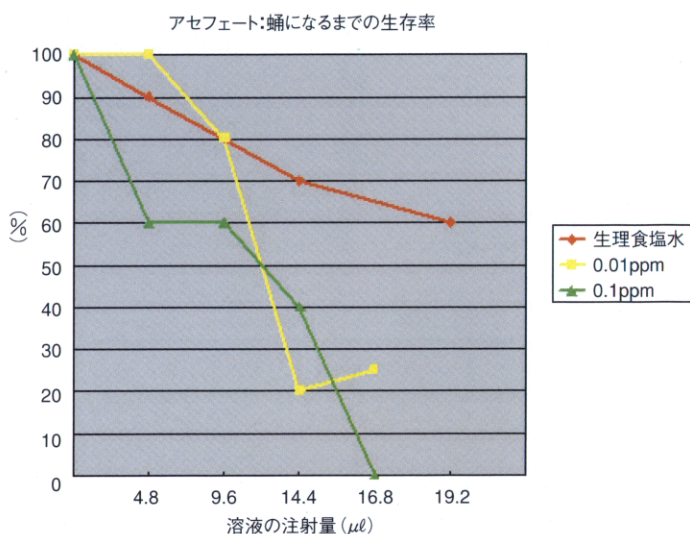
上図は農薬のアセフェートを注入した時の体重変化を表す。図中のグラフの特徴は注入後2日目から6日目まで体重変化率が急に鈍くなることである。

(2) 危害物質注入後に蛹になるまでの生存率

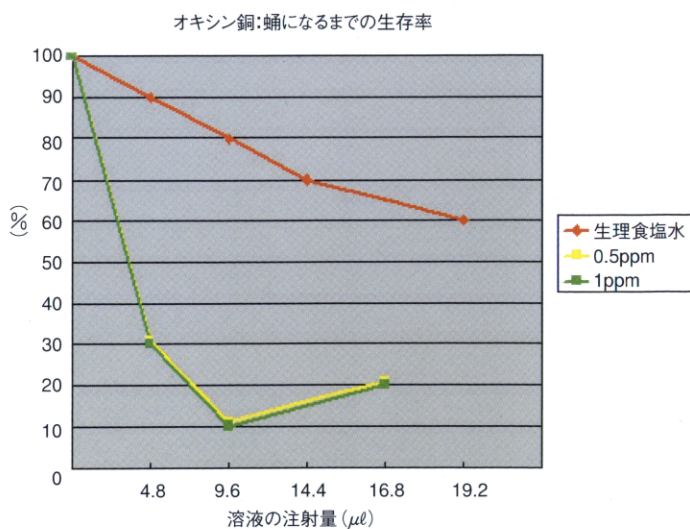
下の2つのグラフは、一定濃度 (0.01ppm~1.0ppm) の危害物質注入量 (4.8 μl ~19.2 μl) に対するカイコ幼虫から蛹になるまでの生存率を表す。縦軸は生存率 (%) を表し、横軸は注入量を表す。また、赤色線はコントロールとして生理食塩水、他の色は各濃度ごとの結果を示す。



上図はカドミウム濃度が0.5ppmと1.0ppmのときの生存率を表す。



上図はアセフェート濃度が0.01ppmと0.1ppmのときの生存率を示す。



上図はオキシシン銅濃度が0.5ppmと1.0ppmのときの生存率を表す。

4. 結果とその検討

これまで得られた結果は大きく次の2点，すなわち，(1) HSP70遺伝子発現と，(2) インジェクションによる体重と生存率変化，にまとめることが出来る．

①遺伝子発現を比較してみてわかったこと

プライマー別バンド数値化平均値比較グラフをみると，HSP70タンパクのfbpv1，2領域プライマーでは，コントロール，オキシシン銅，アセフェート，カドミウムに関して，コントロール以外の遺伝子発現の平均値は高くなっていることがわかる．オキシシン銅，アセフェート，カドミウムを人工飼料に混ぜることにより，これら物質をカイコの身体がストレスと感じ，自らの身体を守るために，細胞防御機構であるHSP70タンパクを増加させたのではないかと考えられる．これは危害物質含有の人工飼料を食べたカイコの成長率がよくないという外見的な変化とも一致する．なお，比較のために導入したチュープリンは，予想通り同じような値であり，危害物質の影響をほとんど受けないことがわかった．

一方，HSP70，ovs1，2領域プライマーでは，コントロールよりもカドミウムの方が平均値が低く，他の農薬でもあまり大きな変化がみられないことから，ovs1，2の領域では，重金属や農薬によるHSP70タンパクへの影響があまりみられなかったのではないかと考えられる．

②体重変化，生存率をグラフ化してわかったこと

体重変化については，コントロールである生理食塩水を注入したカイコは，注入量に関わらず注射針を刺しただけの場合とほぼ同じきれいな成長曲線を描いていることがわかる．しかし，危害物質（本論文では農薬アセフェートのみを図示）を注入したカイコは，注入後2日目～6日目の間，明らかに成長率が下がっていることがわかる．この変化は危害物質の影響であるものと考えられる．

次に，生存率への影響については，一般に基準濃度とされる1ppmより低濃度(0.01ppm~1.0ppm)の危害物質であっても，その影響がでることが明らかになった．その他，危害物質の影響により成長途中で死亡したカイコの外見的な特徴も明らかになった．オキシシン銅については，注射痕の回りだけが黒くなり，アセフェートについては，体全

体が黒化して死亡する個体が多くみられた．これらの点については，今後実験個体数を増やし定量化を必要があると考えている．

5. 考察と今後の課題

- 1) 今回の実験により，カイコを使った食品危害物質の遺伝子レベルでの評価技術の開発のきっかけが出来たものと考ええる．しかし，今回は人工飼料に高濃度20ppmの危害物質を混ぜ，飼育した(2週間~20日)カイコの幼虫を使った．プロジェクト研究において，バイオマーカーとして求められているものは，低濃度(0.01ppm~1.0ppm)，短期間(長くて2~3日以内)という条件である．この課題の解決のヒントが，インジェクションを使ったカイコの体重変化実験のグラフにある．低濃度(0.01ppm~1.0ppm)の危害物質を注入後2~3日間で特に成長率が下がっている．インジェクション実験使用のカイコを使って遺伝子発現の増加を見つけないことが出来れば，目標の技術開発につながると思われる．
- 2) 今回の実験は，カドミウム，オキシシン銅，アセフェートの3種類の危害物質について行い，一定の成果を挙げることができた．今後，プロジェクトの中間評価の際，指摘された亜鉛などの他の金属をはじめ，他の農薬，環境ホルモン等に評価対象物質を拡大してみることも一つの方向であると考えられる．

謝辞

本研究は文部科学省ハイテク・リサーチ・センター整備事業の援助を受けて行われた．記して謝意を表します．なお，今回の実験については卒研生の山田奈美，桜井雄介の両君に最後まで熱心の実験を遂行してもらいました．また，京都大学大学院生(D1)の長谷川浩一氏には遺伝子に関する情報・実験技術など大変お世話になりました．ここに併せて感謝致します．

参考文献

- 1) 関村利朗：食草に含まれる重金属が蝶の成長に与える影響について，中部大学応用生物学部紀要 第3巻，pp.23-29，(2004)
- 2) 関村利朗：重金属が蚕の成長と寿命に与える影響について，中部大学応用生物学部紀要 第4巻，pp.15-20，(2005)