

珪藻タンパク質のプロテオーム解析を用いた 除草剤の有害性評価

九州大学大学院農学研究院 島崎 洋平

【背景と目的】珪藻は光合成を行うだけでなく魚貝類の餌料となることから、化学物質の生態系への影響を評価する上で欠くことのできない生物である。特に除草剤には残留性が高いものが少なくなく、生態系へのリスクは非常に高い。しかし、室内試験における影響評価指標は増殖速度などの現象面が中心であり、藻類は魚類などに比べて生化学や分子生物学的手法による毒性学的知見の集積が著しく遅れている。近年、化学物質の毒性をいち早く検出するために、その毒性機構情報が重要になってきている。単細胞藻類においても単に生死などの現象面だけでなく、化学物質の作用機構を調べることは貴重な情報となり、今後益々重要になることが予想される。一方で、2004年に真核単細胞藻類として初めて海産珪藻 *Thalassiosira pseudonana* (CCMP1335株)のゲノム解読が終了し (Science, vol306:p79-86,2004)、プロテオーム解析が容易になった。プロテオーム解析は可溶化できる多種のタンパク質の発現変動を、同時に評価できる手法であるため、毒性の発現機構の解析やバイオマーカーの探索を行う際に非常に強力なツールとなる。しかし、単細胞藻類を用いたトキシコプロテオミクスの手法は殆ど行われていない。一方、*Thalassiosira*属珪藻は日本の沿岸域で広く一般的に見られる代表的な珪藻類である。また、海外の研究で古くから本種の生理学的データは蓄積されているため、毒性学におけるモデル生物として期待できる。そこで本研究では、海産珪藻 *Thalassiosira pseudonana* を供試生物として、除草剤ベンチオカーブの暴露による細胞内タンパク質の変動を、プロテオーム解析を用いて網羅的に解析し、毒性発現機構を明らかにすると同時に、農薬汚染の指標となるタンパク質マーカーを探索することを目的とした。

【方法】ベンチオカーブに対する本種の感受性を調べるために、*T. pseudonana*の増殖速度を指標とした72時間急性毒性試験(0、0.0781、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、5 mg/L、n=5)を行った。得られた結果を基に、二種類の暴露試験(試験1:暴露濃度2.5 mg/L、暴露期間24時間;試験2:暴露濃度0.625 mg/L、暴露期間72時間)を行った。試験は全て水温25°C、塩分30、光強度200 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ および12時間明:12時間暗の光条件下で行い、一日に一回攪拌した。また、試験液は助剤を使用せずに海水培地(改変SWM-3)に直接被検物質を溶解して作製した。それぞれの暴露試験終了直後に珪藻細胞を回収し、タンパク質を抽出後、二次元電気泳動を行い、蛍光染色によりタンパク質スポットを検出した。二次元泳動像解析ソフトを用いて対照区および暴露区のタンパク質スポットの発現

量の変動を比較した。

【結果】72時間急性毒性試験の結果、最小影響濃度および最大無影響濃度はそれぞれ0.313および0.156 mg/Lであった。また、増殖に対するEC50値は1.25から2.5 mg/Lの間に存在することが明らかとなった。2.5 mg/Lではクロロフィル蛍光値は暴露開始時の 5.67 ± 0.18 から72時間後には 5.88 ± 5.01 とほぼ横ばいであり、5連のうち4連のクロロフィル蛍光値が減少していた。また、5 mg/Lでは暴露開始時の 6.10 ± 0.18 から72時間後には -0.158 ± 0.443 と検出限界値付近にまで減少していた。

次に、タンパク質発現解析試験を行った。露終了後に各試験(n=3)の対照区と暴露区における*T. pseudonana*細胞のタンパク質発現の変動を観察したその結果、対照および暴露区いずれにおいても100個以上の明確なスポットが得られたが、3連全てに共通して変動(2倍以上もしくは0.5倍未満)したタンパク質スポットは観察されなかった。

【考察】環境省生態影響試験報告によれば緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* のベンチオカーブに対する72時間ECr50値は0.092 mg/Lである。培地や試験条件などの違いはあるものの、本試験で用いた珪藻 *T. pseudonana* のベンチオカーブに対する感受性は緑藻よりもかなり低いことが考えられた。

今回の実験で変動するタンパク質が検出できなかった。二次元電気泳動法によるプロテオーム解析は、生体内での生命活動の主な実行因子であるタンパク質の変動を直接観察でき、また繰り返しの実験が比較的容易である点などに利点がある。しかし、解析の対象となるのはタンパク質スポットとして染色像で確認できる分子種に限られるため、遺伝子解析に比べて解析可能な分子種が少なくなる傾向が考えられる。この点を変動タンパク質が検出できなかった一因であると考えられた。

一方、急性毒性試験の結果からベンチオカーブは本種に対して増殖阻害や致死作用を有していることは明らかであり、何らかの細胞内変化を引き起こしている可能性が高い。今回、増殖阻害に焦点をあてて解析を行った。しかし5 mg/Lでは強い致死作用が観察されたため、5 mg/L以上のベンチオカーブを本種に暴露してタンパク質変動を解析中であり、それらの経過およびより詳細な解析結果などを含めて発表させて頂く予定である。