

溶存酸素濃度とヒメダカ遺伝子発現プロファイル

(独)産業技術総合研究所 北河恵美子、岩橋均

(株)日本紙パルプ研究所 岸克行

ジーンフロンティア(株)鈴木克典、中村功、河内浩、中園敬介、大澤直騎、一本木智敬、松井淳、大場浩美、林恭行

[背景] 生態毒性試験の一つである魚類急性毒性試験では、魚類を被試験物質に 96 時間暴露して死亡率を測定することにより、魚類に対する被試験物質の毒性を評価する。ヒメダカ(*Oryzias latipes*)を用いた標準的な試験手順の中で溶存酸素濃度に関連する項目では「半止水式又は流水式のいずれで行っても良い」また、「暴露期間中、通気は行わないが、試験溶液中の溶存酸素濃度は飽和濃度の 60% 以上(約 5mg/L 以上)を確保する。被験物質の顕著な消失がなければばっ気を行ってもよい」とされている。通常、半止水式試験では、試験期間中全く通気を行わずに規定濃度以上の溶存酸素を維持する事は困難である。実際、初発溶存酸素濃度が約 8mg/L であっても、通気を行わない場合、24 時間後には約 3mg/L にまで低下してしまう。エアレーションの有無と換水の頻度が遺伝子発現に与える影響に加え、溶存酸素を制限し、低溶存酸素濃度条件で発現誘導される遺伝子について調べた結果について報告する。

[方法及び結果] 試験には(独)国立環境研究所より譲渡され、継代飼育して得られた孵化後約 4-6 ヶ月齢のヒメダカ雌雄を用いた。一日一回全換水、二日に一回全換水、96 時間の試験期間中に一度も換水しない条件とそれぞれについてエアレーション有無の計 6 条件の検討を行った。一方、溶存酸素を低濃度で一定に保つためには、密閉した試験系で実験を行い、試験魚の呼吸による酸素消費と試験容器への酸素供給のバランスを確保しなければならない。5L 容器にヒメダカ雌雄 9 尾ずつを密閉した場合、およそ 10 時間後に溶存酸素が 10%まで減少した。以後溶存酸素濃度が 10%となるように適宜通気し、容器の密閉から 96 時間後に生残魚をサンプリングした。この時死亡魚数は、6/9 尾(オス)、2/9 尾(メス)であった。液体窒素凍結サンプルから RNA を抽出し、TIGR (The Institute for Genomic Research; <http://www.tigr.org/tdb/tgi/olgi/>)の EST 配列を基にした 26,689 のプローブを搭載したヒメダカ DNA マイクロアレイに Cy3 標識 cRNA をハイブリダイゼーションし、遺伝子発現データを得た。遺伝子発現解析は、GeneSpring ver 7.3 (Agilent Technologies)を用いて行った。

通気を行っている場合、溶存酸素濃度は常に 95% 以上を維持していた。これに対して通気を行わない場合、溶存酸素濃度は 35%程度まで落ち込み、換水により酸素濃度は回復した。通気を行わない場合のサンプリング時の溶存酸素濃度はいずれの換水条件においても 35%程度であった。換水及び通気条件を変更した条件間で遺伝子発現強度を比較した時には、いずれの条件間においても有意に発現差の認められる遺伝子は検出されなかった。このことから、生死に関わらない範囲内での試験手順の違いは遺伝子発現パターンに大きな影響を与えない事が確認された。一方、溶存酸素 10%の条件では多くの遺伝子が応答している事が判明した。35%以上の溶存酸素濃度を維持していた条件での遺伝子発現パターンと比較して、オスでもメスでも発現量が増加する遺伝子は 1357、低

下する遺伝子は 979 抽出できた。現在これらの遺伝子群の解析を行っている。