

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

研究課題名	複合汚染に対する微生物遺伝子応答の網羅解析による新規毒性影響評価技術の開発
研究機関・部局・職名	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・特命准教授
氏名	濱村 奈津子

**【研究目的】**

環境中に排出される化学物質の人間や生態系に及ぼす被害は、急速に複雑化・多様化している。環境汚染の全体像を把握し適切なリスク評価を行うには、多様な化学物質の現場生態系に及ぼす複合的な影響を検出し、未知の有害物質の毒性を予測する新技術が必要である。また、複合汚染ではDNA損傷による長期的影響（遺伝毒性）が懸念されることから、短期暴露に対する迅速な応答反応の検出から、遺伝子レベルでの長期的な毒性影響を予測する方法の開発が求められる。そこで本研究では、今後特に複合汚染による被害の深刻化が懸念されているアジア諸国に焦点をあてて、複合汚染物質暴露に対する微生物生態系の遺伝子応答と遺伝子損傷の網羅的解析診断結果から、複合汚染の生態系に及ぼす遺伝毒性影響を予測する新規評価手法の開発を目的とし、以下の3つのサブテーマ：1)複合汚染環境における汚染実態と汚染環境適応微生物群集の総合的解析、2)複合汚染暴露によって変化する遺伝子発現応答の機能ゲノミクスによる網羅的解析、3)環境微生物群集における遺伝子損傷の網羅的検出結果と指標マーカー発現解析に基づく遺伝毒性予測、に沿って研究を遂行することとした。

**【総合評価】**

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

**【所見】**

① 総合所見

東日本大地震の影響等による研究の遅れが見受けられたが、当初の遅れをとりもどし、順当に成果を出している。汚染物質濃度に対する検出方法の検討など、おそらく当初予想していなかった困難にも直面しており、実験方法や分析法方を見直すことで、着実に成果を上げている。重要な基礎的知見を明らかにし、且つ研究目的である「複合汚染の生態系に及ぼす遺伝毒性影響を予測する新規評価手法の開発」に資する成果を得ている。環境試料からモデル試料系への止むを得ない移行の上展開された部

分もあり、中間評価時点では、確立された新手法で実際に環境中の評価ができるかどうか懸念も示されていたが、実際の汚染環境試料への応用を実施し、本課題で確立した手法は環境試料へと応用可能であることを実証するとともに、汚染の毒性影響を微生物群集のゲノムから直接検出することが有効であることを示した。本研究課題の目的を達成したと評価できる。

今後さらに対象となる環境試料への適用を進めながら、より広範な応用性と精度の向上が図られることが期待される。研究成果の発信も量・質とともに、概ね順調といえる。

当初計画していたウェブでのデータベース・ツールや成果発信についても、さらに積極的に進めて、充実させて欲しい。本研究の特色として、環境汚染の深刻化が懸念されるアジア諸国との連携が上げられる。鉱山開発が急速に進んでいるモンゴルでの共同研究体制の構築と国際的な環境影響評価ネットワーク強化への貢献は、特記すべき成果と言えよう。環境問題に関するアジア諸国との連携は、今後とも拡充・発展させて欲しい。

また、本研究課題で単離された微生物の中には、レアメタルとして産業価値があるアンチモンやセレンなどを代謝する微生物も含まれ、それらの性状、レアメタル回収技術や環境浄化技術に有用な知見も得られている。この面でも、共同研究の枠を広げる等により、優れた成果に発展させてほしい。

## ② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(  全て達成された ・  一部達成された ・  達成されなかった )

本研究課題においては、目的達成にむけて、具体的に以下の3つのサブテーマを設けて研究を展開した。

- (1) 複合汚染環境における汚染実態と汚染環境適応微生物群集の総合的解析、
- (2) 複合汚染暴露によって変化する遺伝子発現応答の機能ゲノミクスによる網羅的解析、
- (3) 環境微生物群集における遺伝子損傷の網羅的検出結果と指標マーカー発現解析に基づく遺伝毒性予測、

サブテーマ(1)及び(2)の複合汚染環境の解析に関して、無機化合物の複合汚染(ヒ素・重金属等)とともに、有機及び無機汚染物質による複合汚染マイクロコズム及び環境サンプル(炭鉱等)の解析を予定通りに遂行した。さらにH25年度は、複合汚染暴露に対する迅速な応答を感知するメタトランスクリプトーム解析に加え、より長期的な細胞の応答が検出できるプロテオーム解析も取り入れることで、時間変動も考慮した指標マーカーの特定もさらに進め、所期の目標よりもさらに応用性のある結果が得られた。

サブテーマ(3)のアダクトミクス解析は連携研究者の Kanaly 准教授(横浜市立大)と連携して行い、まずH23・H24年度は単離株や集積培養系を用いて汚染物質暴露サンプルのDNAアダクトミクス解析により指標マーカーとなる付加体群のデータベースを構築した。さらに、H25年度中に予定していた集積培養系の解析結果から、本手法の有効性が確認されたため、中間評価のコメントを踏まえ、さらに本手法を最終目

的である実際の汚染環境試料へと応用を実施した。その結果、本課題で確立した手法は環境試料へと応用可能であり、汚染の毒性影響を微生物群集のゲノムから直接検出するのに有効であることが示され、所期の目的が達成された。

### ③ 研究の成果

- ・これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が  
(ある ・ ない)
- ・ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が  
(創出された ・ 創出されなかった)
- ・当初の目的の他に得られた成果が (ある ・ ない)

以下に3つのサブテーマごとの成果をまとめる：

1) 複合汚染環境解析：リサイクル処理施設や鉱山周辺など汚染が懸念される環境サンプルを分析した所、高濃度の鉛やヒ素等の重金属、また炭鉱では重金属の他に芳香族などの有機系汚染物質による複合汚染が検出された。特に高濃度の汚染が検出された以下の試料を解析に用いた：リサイクル処理場（ベトナム：鉛、重金属類）、鉱山跡地（モンゴル：ヒ素、重金属類、芳香族炭化水素等）、塩湖（モンゴル：ヒ素、セレン、重金属類、硝酸）。これらの汚染環境試料から、猛毒のヒ素やレアメタルを生物変換する新規細菌の分離にも成功した。これら微生物の生物変換機能は、環境浄化技術やレアメタル回収技術への応用など、今後のグリーン・テクノロジーへの微生物利用に向けた波及効果も期待できる。

さらに本研究の特色として、今後特に環境汚染による被害の深刻化が懸念されるアジア諸国との連携の強化が上げられる。本研究では、愛媛大学ですでに実績のある東南アジア諸国の他、鉱山開発が急速に進んでいるモンゴルとの共同研究体制を新たに構築した。

2) 機能ゲノミクス解析：次世代シーケンサー（NGS）によるメタトランスクリプトーム手法を検討するとともに、指標マーカーを含む遺伝子発現の網羅的検出を定量的に解析する手法を確立した。また、大量な配列データを解析するバイオインフォマティクスツールも開発し、基本解析を行うパイプラインツールを HP で公開している (<http://hamamuralab.com/pages/display/pipeline>)。このような、汚染土壌試料から抽出した環境 DNA・RNA を直接的に解析する新規手法は、従来のモデル生物を利用した汚染物質に対する影響評価の手法と比べて、実際の汚染現場における多様な微生物群集の応答を直接検出できる点で新規性が高い。本手法により、汚染物質暴露した環境サンプルにおける遺伝子発現変動を調べた所、暴露後にまず汚染物質に特異的な解毒・耐性機構や代謝に関与する機能群が発現し、その後より一般的なストレス応答へと発現プロファイルが経時的に推移することが示された（図 1）。機能遺伝子群の発現は暴露条件を反映して迅速に応答するため、現場環境の毒性影響をリアルタイムで検出するのに適している。これらの機能遺伝子群は、より長期的な細胞の応答が検出できるプロテオーム解析でも発現が誘導されており、また環境中に優占している微生物種にかかわらず共通の応答パターンを示すことから、複合汚染物質の同定や毒性の評価に有用な指標マーカーとなり得ることが確認された。

3) DNA 付加体解析及び複合汚染の毒性影響評価：DNA 付加体解析（アダクトミク

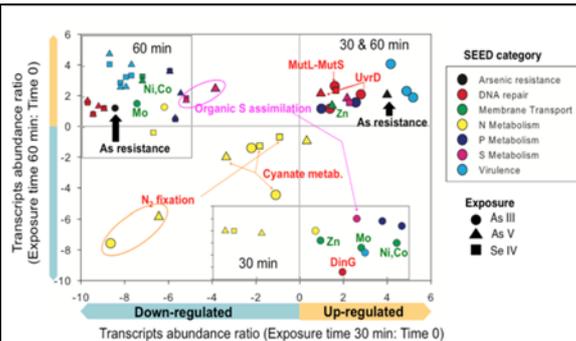


図1. 複合汚染試料における遺伝子発現応答の時間変動。毒性に対する耐性機構が誘導されている。

解析により指標マーカーとなる付加体群を同定した。これら指標付加体群へと検出範囲を限定することで、分析に必要なDNA量を低減することが可能となった。本解析ではDNA損傷を示す特異的付加体等も検出できており、手法の有効性が確認された。

本研究で確立したメタトランスクリプトーム解析とアダクトミクス解析を組み合わせることで、汚染の毒性影響を直接ゲノムから検出する有効性を検討した。まず、集積培養系を用いた暴露実験の解析結果では、DNA損傷を示唆する付加体群が検出され、さらに遺伝子発現解析では汚染物質に対する耐性機構の他にDNA修復や酸化ストレス応答に関与する遺伝子群の誘導が検出された。本結果は、微生物群集の遺伝子からDNA損傷を直接検出し、汚染物質による遺伝毒性と群集の遺伝子発現応答

を網羅的解析によって結びつけた点で極めて新規性が高い。

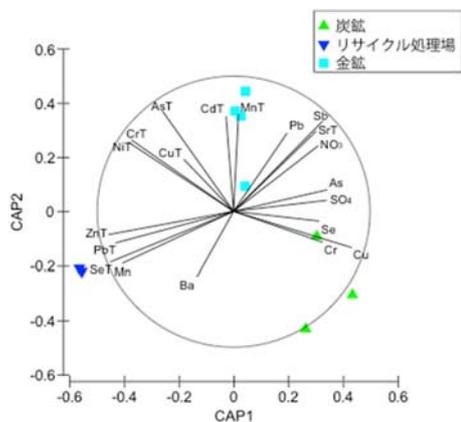


図2. 環境試料の複合汚染物質に対する遺伝子発現応答パターンの解析 (Canonical ordination for the differentially expressed functional categories. Vector overlay of Pearson rank correlations of pollutant conc. With CAP axes >0.50)

さらに、本手法を最終目的である実際の汚染現場サンプルの解析へと応用を試みた。その結果、遺伝子機能群の発現応答パターンは現場の汚染状況を反映しており、複合汚染物質の同定や毒性の評価に有用な指標マーカーとなり得る事が示された(図2)。また、全体的な付加体形成パターンからも、複合汚染物質の毒性影響が示された。

以上より、本課題の目的としていた「環境中遺伝子の応答と遺伝子損傷の解析を組み合わせた網羅的遺伝毒性検出手法」が確立でき、現場環境試料を用いた実証においても、マーカー遺伝子群の迅速な反応から複合汚染による毒性影響の検出、そして長期的な遺伝毒性の予測に資する一定の成果が得られた。本手法をさらに発展させていくために、今後より多くの環境サンプル解析と実験系を用いた指標データベースの充実を進め、より長期的そして多様な汚染暴露にも対応する指標マーカーの検討等が有効であると考えられる。

**研究成果や開発した技術の先進性・優位性：**

- NGS を利用した環境遺伝子発現応答の網羅的解析技術の確立：環境サンプルに含まれる全遺伝子の発現応答を網羅的そして定量的に解析する手法、さらに、大量なデータを解析するインフォマティクスツールを確立した。本手法は注目度も高

く、多岐に渡る分野への応用が期待されている新技術である。

- 環境汚染現場の毒性影響を直接ゲノムから検出した新規性の高い知見：本研究で得られた成果は、環境微生物群集の遺伝子から DNA 損傷を直接検出し、汚染物質による遺伝毒性と、それに対する微生物生態系の応答を網羅的解析によって結びつけた点で極めて新規性が高い。
- より自然環境に沿った影響評価を可能にする新規手法：従来のモデル生物を利用した汚染物質に対する影響評価の手法と比べて、本課題では実際の現場環境の DNA・RNA を用いることで、より自然に沿った生態系への影響を直接検出することを可能にした。

#### ブレイクスルーと呼ばれる成果：

- 本研究で得られた成果は、上記のように先進性、優位性が高く、より自然に近い環境に沿った影響評価を開発したもので、現場への適応において有効性も示されていることから、複合汚染の評価においてブレイクスルーを果たしていると評価できる。

#### 当初の目的の他に得られた成果：

- 新規微生物資源・有用機能の発掘：本課題の成果として、先進国型汚染物質として問題となっておりまたレアメタルとして産業価値も高いアンチモンやセレン等を代謝する新規微生物が単離同定された。また、有機系発がん物質を分解する菌や分解経路に関する新規知見も得られている。これらの生物変換機能はレアメタル回収技術や環境浄化技術への利用も期待される。
- 国際連携による環境影響評価ネットワーク：本研究では今後特に環境汚染による被害の深刻化が懸念されるアジア諸国との連携を重視しており、愛媛大学ですでに実績のある東南アジア諸国の他、今回新たに鉱山開発が急速に進んでいるモンゴルでの共同研究体制を構築した。本研究の成果は資源開発による環境や生物多様性への影響評価として注目され、補助事業者は 2012 年にモンゴル大学で行われた国際シンポジウムで招待講演を行っており、国際的な環境影響評価ネットワーク強化に貢献するとともに、動植物のみならず微生物多様性への影響や資源利用に向けて有用な基礎情報を提供した。

#### ④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が  
(見込まれる ・ 見込まれない)

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が  
(見込まれる ・ 見込まれない)

- 生態毒性評価・遺伝ゲノム学分野への寄与：これまでの化学物質毒性評価は、数種のモデル生物の応答に基づいたものがほとんどであった。本研究では実際の現場環境における生態系の機能応答や遺伝毒性を遺伝子レベルで総合的に検出することで、より自然に即した評価を実現した。
- 自然界の微生物機能解明へ向けた技術的寄与：本研究で確立した網羅的遺伝子応

答解析手法は、多岐に渡る分野への応用が期待されている。本手法により、これまでブラックボックスであった自然界の生態系機能における微生物の寄与の解明につながり、さらに微生物機能を利用した土壌肥沃化や炭素安定化技術、環境変動による物質循環の影響予測などの新たな環境技術開発への貢献も期待できる。

- ビッグデータ時代における環境ゲノム資源探索への寄与：現在飛躍的に取得データ量の増えている環境ゲノムには、機能が未同定の遺伝子が多く含まれている。本研究で得られた環境遺伝子発現データベースから未同定遺伝子群の機能予測につながることを期待され、今後さらに広い分野でのゲノム解析に応用できる解析手法としても寄与できる。また、本研究ではアジア諸国との連携により環境ゲノムデータの取得に関しても貢献している。
- 微生物有用機能の利用への寄与：本研究で汚染環境から同定されたレアメタルを生物変換する新規微生物によるレアメタル回収技術や、有機系発がん性汚染物質分解菌を利用した環境浄化技術など、環境技術開発への微生物利用に向けた波及効果が期待される。

環境化学分野でのアジア連携強化：本研究の波及効果として、環境汚染が問題となっているアジア（ベトナムやモンゴル）をフィールドとした研究の実施により、環境化学分野における共同研究を通じたアジア連携強化や地域大学としての特性を生かしたネットワーク作りへも寄与している。

- 総合的なリスク削減対策へ向けて有用な基礎情報の提供：現在、環境汚染は規模の拡大や汚染物質の複雑化・多様化が進んでおり、持続的発展が可能な社会の実現には、これら複合的な汚染の生態系へ及ぼす影響をより総合的に評価する技術が必要である。本研究の成果として、現場生態系に及ぼす毒性影響を遺伝子レベルで直接定量的に検出できる手法が確立され、このような化学物質の複合的な影響に基づく毒性評価手法は、より総合的なリスク削減対策へ有用な基礎情報を提供する事が期待でき、その学術的・社会的意義は大きい。
- 環境汚染が自然生態系に及ぼす長期的毒性リスクの予測：本課題では、汚染物質による遺伝毒性を現場環境の微生物応答の網羅的解析によって直接ゲノムから検出することに成功しており、汚染による長期的な毒性影響を予測する上で新規性の高い知見が得られている。今後更に多様な環境のデータを蓄積していくことで、未知の汚染物質を含む複合汚染が生態系に及ぼす毒性リスク予測につながることを期待できる。
- 有用微生物資源発掘への寄与：本研究で同定された新規有用微生物や代謝機能をはじめ、汚染環境の網羅的解析データベースには未発掘の遺伝子や微生物情報が多く含まれており、有用遺伝子の探索による環境浄化やレアメタル回収技術への生物変換利用等、微生物資源を利用した新しい環境技術開発を通じたグリーン・イノベーションへのさらなる貢献が見込まれる。
- 国際連携による環境影響評価ネットワーク強化：本研究では今後特に環境汚染による被害の深刻化が懸念されるアジア諸国との連携を重視している。モンゴルの鉱山地域における本研究の結果は、資源開発による環境や生物多様性への影響評価として注目され、本研究者は 2012 年にモンゴル大学で行われた国際シンポジ

ウムでの講演を依頼されるなど、国際的な環境影響評価ネットワーク強化に貢献している。さらに、特に今後日本とモンゴル（を含むアジア諸国）の連携は政治経済にとどまらず学術面でも重視されていることから、今後も汚染状況や環境影響に関する基礎情報の発信とともに、微生物や遺伝子資源調査においても共同研究の要望を受けており今後もさらに発展が見込まれる。

#### ⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが（行われた ・ 行われなかった）

所期の目的を果たしていること、指摘事項に適切に対応していることなどから、研究計画、実施体制とも適切であった。また、本研究を展開する傍ら、所属大学および学会における女性研究者支援や女子理系選択支援、に積極的に貢献しており、本研究課題遂行に限らず、女性研究者ネットワークを立ち上げるとともに所属学会の男女共同参画委員を務めるなど、広い意味でもマネジメントは優れていたと判断される。助成金の活用も適切に行われている。

研究成果の発信についても、下記のとおり適切に行われている。また、国民との科学・技術対話についても、積極的に取り組んでいる。

雑誌論文： 合計 12 件（査読あり 10 件、査読なし 1 件、査読あり未掲載 1 件）

会議発表： 合計 33 件（専門家向け 26 件、一般向け 7 件）

図書： 合計 2 件

一般雑誌等： 合計 3 件

知的財産権の出願： 0 件

国民との科学・技術対話の取り組み： 合計 7 件

##### 【その他：発信の取り組み】

- 研究室のホームページを通して、研究活動や成果発表の発信を随時行なっている：<http://hamamuralab.com>

愛媛大学の学報トピックスで本課題について取り上げられた：[https://www.ehime-u.ac.jp/information/about/publicity/newsletter/detail.html?new\\_rec=7909](https://www.ehime-u.ac.jp/information/about/publicity/newsletter/detail.html?new_rec=7909)

女性研究者の活躍促進：本研究成果の直接的な貢献ではないが、本補助事業での採択による研究実績が評価され学術研究の場で女性研究者として取り上げられる機会が増えたこともあり、自らロールモデルとなるべく、所属大学および学会における女性研究者支援や女子理系選択支援に積極的に貢献している。特に所属学会（微生物生態学会）では、発起人として 2012 年に女性研究者ネットワークを立ち上げるとともに男女共同参画活動も開始し、現在学会の男女共同参画委員を務めている。