New Method for the Assessment of Biological Effect by Surfactants Using Yeast DNA Microarray

Sakiko KURITA^{1*,2}, Sophon SIRISATTHA¹, Emiko KITAGAWA¹,
Yuko MOMOSE¹, Kuniko AKAMA², Yutaka ISHIGAMI³ and Hitoshi IWAHASHI¹

¹ National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, JAPAN)

² Graduate School of Science and Technology, Chiba University
(1-33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-8522 JAPAN)

³ Tokyo Gakuai University
(Koganei, Tokyo 184-8501, JAPAN)

Edited by N. Yamamoto, Lion Corp., and accepted April 5, 2004 (received for review February 23, 2004)

Abstract: Spiculisporic acid (a biosurfactant produced by *Penicillium spiculisporem*) is used in the preparation of detergents, gelation agents, coloring agents for concrete, vesicle forming agents, etc. The effects of biosurfactant and synthetic surfactants (SDS and LAS) were assessed for the first time in this study at the genomic level by yeast DNA microarray bioassay. Hierarchical clustering showed spiculisporic acid to be close to LAS and SDS. The effects of spiculisporic acid on yeast cells would thus appear basically the same as those of LAS and SDS. Gene induction by spiculisporic acid was particularly remarkable in functional categories of “metabolism”, while “cell rescue defense and virulence” and “energy” categories differed from those with SDS and LAS. Thus, spiculisporic acid and SDS might be metabolized via beta-oxidation in two different organelles, mitochondria and peroxisome, respectively. This would explain the low oxidative stress with spiculisporic acid, versus the high oxidative stress with SDS.

Key words: surfactant, microarray, yeast, supiculisporic acid

1 はじめに

生物は種々の界面活性物質を合目的に自家生産し、利用している。このような生物由来の界面活性物質は、胆汁酸、ソープフィッシュのペプチドリピッド（動物由来）、サポニン、ロジン（植物由来）、スピクリスポール酸、ソホロリピッド、サーファクチン、イチュリン（微生物由来）など多岐にわたる。スピクリスポール酸（Fig. 1）（1）は糸状菌が産生する三塩基酸型の長鎖脂肪酸であって、多官能性のために様々の誘導体がファインケミカルズとして利用でき、またそのアルカリ塩は界面活性剤となる（2）。多岐にわたり利用

できることから環境に対する影響を調査し、これまでに安全性（急性毒性、魚毒性、刺激性、変異原性）・生分解性に優れることが示されているが、詳細な影響評価は行われていない（3）。一方、合成界面活性剤は生産量も多く、陰イオン性界面活性剤では、水道水水質基準値 0.2 ppm が設定されており（4）、影響評価に関する研究も多い（5）。

最近になり DNA マイクロアレイ法が開発され、本研究室では酵母の DNA マイクロアレイを化学物質の影響評価を行う手法として用いている。酵母 DNA マイクロアレイは、1 枚のスライドガラス上に酵母の全遺伝子である約 6000 種のプローブが搭載されているもので、化

*Correspondence to: Sakiko KURITA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, JAPAN
E-mail: h06942@kasumi.nibh.jp

学物質添加条件下で培養した酵母と、化学物質非添加条件下で培養した酵母の cDNA を混合させて一枚のマイクロアレイ上で結合させることにより、化学物質の影響評価を遺伝子発現レベルで比較できるものである。既にその有用性が、いくつかの化学物質について報告されている。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) や直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) のような合成界面活性剤についてもその影響が DNA マイクロアレイを用いて報告された (5)。これら合成界面活性剤は、DNA マイクロアレイ解析により、従来から報告されていたように、酵母細胞の膜構造に影響を与えることや酸化ストレスを誘発している事を示す結果を再確認すると共に、解毒機構としては、新たに、能動的排出系である PDR ネットワークが関与していることを示す結果を得ている (5)。そこで今回は、これまでにあまり研究されていない生物由来界面活性剤のモデルとしてスピクリスポール酸が酵母細胞に与える影響を観察すると共に、比較対照として合成界面活性剤である SDS および LAS を用いて、微生物の遺伝子発現レベルでの影響を解析し、DNA マイクロアレイ技術の有用性を検証した。(http://kasumi.nibh.jp/~iwahashi/)

2 実験方法

2.1 試料

スピクリスポール酸は、磐田化学工業(株)より恵与されたもので、(4S, 5S)-4,5-dicarboxy-4-pentadecanolide の構造を持ち、エタノール-水系により精製して使用した (6)。 $C_{17}H_{28}O_6 = 328.54$ として、元素分析の実測値 (計算値) は、C: 62.22 % (62.17 %), H: 8.59 % (8.59 %), O: 29.20 % (29.23 %); mp. 146°C; $[\alpha]_D^{26} = -12.6$ (c = 3.28 g/dl, ethanol) であった。化学構造式を Fig. 1 に示した (1)。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は SIGMA 製、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) は和光純薬工業(株) 製をそのまま用いた。その他の薬品は市販試薬を用いた。

2.2 培養条件

本実験で使用した酵母は、*Saccaromyese cerevisiae* S288C 株 (*suc2 mal gal2 CUP1*) で、25°C の条件下、YPD 液体培地で振とう培養を行った。スピクリスポール酸処理をした酵母は、 $A_{660} = 1.0$ 、すなわち対数増殖期に DMSO に溶解したスピクリスポール酸を添加し、2 時間培養したものを使用した。また、スピクリスポール酸処理をした酵母の比較対照となる酵母は、 $A_{660} = 1.0$ の時にスピクリスポール酸の溶媒である DMSO を同量添加し、2 時間培養したものを使用した。

Fig. 1 Structural Diagram of Supiculisporic Acid. Chemical name of supiculisporic acid is (4S,5S)-4-5-dicarboxy-4-pentadecanolide.

2.3 酵母 DNA マイクロアレイ

65 度のホットフェノール法により、スピクリスポール酸添加条件下で培養した酵母および、非添加条件下で培養した酵母から Total RNA を抽出し、つづいて、Oligotex — dT30 (TAKARA) を使って、mRNA の精製を行った。次に、スピクリスポール酸添加条件下の mRNA を蛍光色素 Cy3、スピクリスポール酸非添加条件の mRNA を蛍光色素 Cy5 でそれぞれラベルした標識 cDNA を合成し、これらを混合して一枚の DNA マイクロアレイ (Ver.1.1:DNA チップ研究所) にハイブリダイゼーションを行った (7)。処理の終わったマイクロアレイは Scan array4000 (GSI Lumonics) でイメージ画像にし、GenePix (Axon Instruments, Inc. CA, USA) で定量化を行った (7)。

2.4 マイクロアレイデータの数値化と定量化

定量化したデータを Genespring (Silicon genetics) で解析するために、Chip Cleanser ((独)産業技術総合研究所 古賀氏作成) を使用して正規化を行った。Chip Cleanser では、イメージ画像で得られたそれぞれのスポットの蛍光強度からそれぞれのバックグラウンドを差し引くことと、167 個あるネガティブコントロールスポットの蛍光強度の平均値に 2 倍の標準偏差を加えた値より小さい蛍光強度のスポットを切り捨てることで、正確性に欠けるスポットや、非特異的にハイブリダイズしたスポットの排除を行った。それぞれのマイクロアレイの実験を正規化するために、Cy5 の蛍光強度を Cy3 の蛍光強度で割った値の平均値を計算し、全体の平均値として用いた。この方法により正規化したデータを Genespring で解析した。また信頼性を得るために、同条件で 3 回実験を行った。

2.5 階層的クラスター解析

階層的クラスター解析 (Fig. 2) には GeneSpring を使用した (8)。それぞれの化学物質により誘導された遺伝子の類似性は相関係数により求めた。分離率は 1.0 で、最小距離は 0.001 とした。蛍光強度が低い遺伝子を含めると、不正確な結果になる可能性が高いことから、

これまでに蓄積したマイクロアレイデータにおいて、20 種類 (**Fig. 2**) の化学物質による少なくとも 1 種以上の化学物質で、蛍光強度が平均値以上で誘導していた遺伝子 3874 種を選択し、階層的クラスター解析の計算に使用した。

Fig. 2 Hierarchical Clustering of Genome-Wide Expression Profiles in Response to Supiculisporic Acid and Other Chemicals. Yeast cells were treated with different chemicals for two hours as follows: Supiculisporic acid (0.16%), sodium n-dodecyl benzene sulfonate (LAS) (0.02%), sodium dodecyl sulfate (SDS) (0.01%), capsaicin (0.82 mM), gingerol (1.36 mM), Roundup (Japan Monsanto Co. Ltd.)(RU) (1500 times dilution), 2,4,5-trichlorophenol (TCP) (16 μ M), lindane (1.3 mM), 10 μ M Cadmium +1.5 μ M Thiuram (CT), mercuric chloride (Hg) (0.7 mM), cadmium chloride (Cd)(0.3 mM), lead chloride (PB) (2 mM), dimethylsulfoxide(DMSO) (10%, 1.41M), acrolein (0.20 mM), maneb (2 ppm), sodium arsenite (As) (0.3 mM), zineb (2ppm), TPN (10 μ M), thiuram (75 μ M), and PCP (50 μ M). (<http://kasumi.nibh.jp/~iwahashi/>)

3 結果と考察

3.1 スピクリスポール酸処理条件の検討

実験に使用する濃度を決定する為に、スピクリスポール酸の濃度を変えて、酵母の生育に与える影響を調べた結果を **Table 1** に示す。これに基づき、 IC_{50} に相当する 0.16 %の条件で培養した酵母を以下の DNA マイクロアレイの実験に用いることにした。今回の実験結果との比較対象である界面活性剤の SDS は 0.01 %, LAS は 0.02 %の濃度で、これは IC_{50} に相当する条件であることから (<http://kasumi.nibh.jp/~iwahashi/>), IC_{50} で統一することにした。スピクリスポール酸の IC_{50} は SDS の 16 倍, LAS の 8 倍で酵母に対する毒性が低いことを確認した。

3.2 階層的クラスター解析を用いた各化学物質処理による遺伝子発現の比較

mRNA の発現プロファイルを、他の化学物質と比べる為に階層的クラスター解析を行った (**Fig. 2**) (8)。対照化学物質としては農薬、重金属、天然化合物、などを利用した (<http://kasumi.nibh.jp/~iwahashi/>)。その結果、3 種類の界面活性剤は、比較的近い枝で結ばれており、発現プロファイルが似ていると判断されている。なかでも、SDS と LAS は枝の距離が近いことから、遺伝子の発現プロファイルがよく似ていると判断されている。また、ジンジャオールやカプサイシン (9) ととも近似しているのがわかる。以上の結果は、その化学構造から推定できる生体に対する影響の類似性を示しており、DNA マイクロアレイ法が、界面活性剤等の化学物質の影響評価に利用できる可能性を示している。さらに、スピクリスポール酸による生体への影響を、スピクリスポール酸、SDS、LAS によって誘導された遺伝子を比較しながら解析することにした。

Table 1 The Effect of Supiculisporic Acid on the Growth of Yeast Cells.

%	0	0.08	0.16	0.25
0 hour	1.0	1.0	1.0	1.0
2 hours	1.7	1.6	1.4	1.2

A stock solution of supiculisporic acid (1M in DMSO) was added to the YPD medium before inoculation with the final concentrations of 0%, 0.08%, 0.16%, 0.25%. Growth was monitored as the absorbance at 660 nm.

3.3 スピクリスポール酸, SDS, LAS の処理によって高く発現した遺伝子とその共通性

今回解析したスピクリスポール酸, 既に報告されている SDS, LAS でそれぞれ誘導, または抑制された遺伝子の数をベンダイアグラム (Fig. 3) で重ね合わせた。スピクリスポール酸非添加条件下で培養した酵母の mRNA に比べ, スピクリスポール酸添加条件下で培養した酵母の mRNA が, 3 回の実験中 2 回以上の実験で 2 倍以上発現していたものを誘導遺伝子, 同様に 0.5 倍以下のものを抑制遺伝子とした (8)。誘導された遺伝子は約 6000 種中, 既報のように SDS では 333 種, LAS では 176 種, 一方, スピクリスポール酸では 376 種であり, そのうち 3 種の界面活性剤で共通して誘導された遺伝子は 20 種であった。SDS と LAS で共通して誘導されている遺伝子は 117 種, SDS とスピクリスポール酸では 50 種, LAS とスピクリスポール酸では 31 種であった。抑制された遺伝子は SDS で 131 種, LAS では 51 種, スピクリスポール酸で 355 種であり, 3 種で共通して抑制された遺伝子は 1 種であった。スピクリスポール酸は LAS と SDS に比べて, 共通する遺伝子が半分以下であった。スピクリスポール酸と SDS, あるいはスピクリスポール酸と LAS で共通して誘導された遺伝子数は, SDS と LAS で共通して誘導された遺伝子数と比べて少ないことから, バイオサーファクタントであるスピクリスポール酸と陰イオン性界面活性剤では, 細胞に対する影響が異なることが考えられる。

3 種類の界面活性剤でそれぞれ強く誘導してされていた, 上位 20 種の遺伝子を Table 2 に示す。Table 2 中に下線で示したものは上位 20 種の遺伝子中, 2 種類以上の界面活性剤で共通して誘導された遺伝子である。既報のように SDS と LAS は, 上位 20 種の中だけでも半数以上の遺伝子が共通して誘導されていたが, スピ

Fig. 3 Venn Diagram of the Number of Overlapping and Non-Overlapping Induced and Reduced Gene. The left side of venn diagraam shows induced genes treated with surfactants. The right side of venn diagraam shows repressd genes treated with surfactants.SA, Supiculisporic acid.

クリスポール酸は, SDS, または LAS に共通した遺伝子が上位 20 種中, 2 種だけであった。Fig. 2 に示したクラスター解析では同じ枝に分類されているが, 細胞に対する作用はスピクリスポール酸と SDS, LAS では異なることが Table 2 から示されており, DNA マイクロアレイの有効性を示す結果でもある。

3.4 誘導遺伝子および抑制遺伝子の機能的分類と遺伝子産物の局在性

遺伝子にはそれぞれ機能があり, 誘導された遺伝子の機能を解析することで化学物質の生体に対する影響を評価することができる。タンパク質のデータベースである MIPS (<http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/yeast/>) では, 酵母の各遺伝子を「エネルギー」, 「細胞の救出」, 「防御系」などの機能別に分類し, 19 のカテゴリーを作っている。それぞれのカテゴリーに属するサブカテゴリーまで併せると, 259 ものカテゴリーがあり, 機能別に遺伝子を分類するのに便利である。そこで, 3 種の界面活性剤で誘導された遺伝子を MIPS のカテゴリーに従って分類した結果を Fig. 4 に示した。スピクリスポール酸では「エネルギー」, 「輸送促進」,

Table 2 The List of Significantly Induced Genes by the Treatment with Each Detergent.

	SA		SDS		LAS
TIR1	8.6	HSP12	9.3	<u>RTA1</u>	13.6
YHM1	8.3	<u>POX1</u>	9.2	<u>YLR346C</u>	12.3
YNL194C	7.2	<u>RTA1</u>	8.8	<u>INO1</u>	10.4
PRM7	5.8	<u>YPL088W</u>	8.2	<u>YPL088W</u>	9.7
HEM13	5.7	<u>ECI1</u>	8.1	<u>MET30</u>	7.5
YDL037C	5.5	<u>YMR107W</u>	8.0	YLL056C	6.9
YOR049C	5.5	<u>YLR346C</u>	7.6	<u>DIA1</u>	6.9
OPI3	5.0	<u>YHR138C</u>	7.1	CMK2	5.5
YOL162W	4.9	<u>YNL211C</u>	6.9	<u>YHR138C</u>	5.0
DAN1	4.7	YOR385W	6.3	<u>YLR046C</u>	5.0
<u>PDR15</u>	4.7	<u>DIA1</u>	6.2	YGR212W	5.0
AGP1	4.7	<u>PDR15</u>	5.9	YOR152C	4.9
YGR131W	4.6	<u>MET30</u>	5.7	<u>PHO89</u>	4.9
YDL123W	4.6	<u>YHR140W</u>	5.5	<u>YLR008C</u>	4.9
YER188W	4.5	<u>GRE2</u>	5.4	YHR054C	4.6
YER067W	4.5	<u>YFL027C</u>	5.2	<u>GRE2</u>	4.6
BIO2	4.4	<u>YLR046C</u>	5.2	<u>YNL211C</u>	4.5
YNL024C	4.4	MSC1	5.1	YLR414C	4.4
<u>INO1</u>	4.3	YLR327C	5.1	SMP1	4.4
YIR035C	4.3	PBI2	5.1	YER130C	4.2

Gene name with line shows commonly induced genes.

「代謝系」、一方、既報のように SDS では「エネルギー」、「細胞の救出、防御系」、「代謝系」、LAS では「細胞の救出、防御系」、「細胞環境における相互関係の調節に分類されている遺伝子」、「エネルギー」が高い割合で誘導されている。スピクリスポール酸で「輸送促進系」の遺伝子が多く誘導されていたのが特徴的であった。また、抑制遺伝子をカテゴリーに従って分類したところ (Fig. 5)、スピクリスポール酸では「タンパク質合成系」、「細胞間の伝達や情報伝達の機構に関する遺伝子」、「未分類遺伝子」、SDS では「細胞組織の調節系」、「転写系」、「タンパク質合成系」、LAS では「輸送促進」、「細胞組織の調節系」、「タンパク質合成系」が高い割合で抑制されていた。

界面活性剤は細胞膜に影響を与えることが広く知られていることから、スピクリスポール酸、SDS、LAS で誘導された遺伝子産物が細胞内オルガネラのどこに局在しているかを、MIPS のデータベースを基に分類した (Fig. 6)。スピクリスポール酸では、「ミクロソーム」、「細胞壁」、SDS では「ミクロソーム」、「ペルオキシソーム」、LAS では「ペルオキシソーム」、「液胞」に多く局在していることが分かった。さらに Table 3 に細胞膜に局在する遺伝子産物を示した。細胞膜に関与する遺伝子数は、誘導遺伝子で 3 種類の界面活性剤とも同程度であった。しかし、既報のように SDS と LAS

では同じ遺伝子が誘導されていたのに比べ、スピクリスポール酸で誘導された遺伝子はそのほとんどが、他の 2 種類の界面活性剤と異なる遺伝子であった。SDS と LAS では「解毒系」に関与する遺伝子が誘導されていたのに対して、スピクリスポール酸では「輸送系」に関与する遺伝子の誘導がみられた。3 種類の界面活性剤とも、細胞膜に関係する遺伝子が誘導されていたが、膜に対する影響は違うものとする。これらの結果も、スピクリスポール酸と陰イオン性界面活性剤による生体影響が異なることを示している。

スピクリスポール酸で特徴的であった、「輸送促進」のカテゴリーの遺伝子をさらに細かく見るために、「輸送促進」に属するサブカテゴリーで分類した結果を Fig. 7 に示す。スピクリスポール酸で高い割合で誘導されているサブカテゴリーの上位 5 項目では、SDS、LAS による誘導がほとんど見られなかった。逆に、SDS によって高く誘導されているサブカテゴリーでは、スピクリスポール酸による誘導率は低かった。また、スピクリスポール酸は「輸送促進」のカテゴリーに関する遺伝子が 35 種誘導されていたのに対し、SDS では 16 種、LAS では 10 種と少なかった。

3.5 エネルギーに関する誘導遺伝子

3 種の界面活性剤で共通して高い割合で誘導されてい

Fig. 4 Characterization of Induced Genes by the Functional Categories. X-axis indicate percent of induced genes (number of induced genes / number of genes in each subcategory $\times 100$).

Fig. 5 Characterization of Repressed Genes by the Functional Categories. X-axis indicate percent of induced genes (number of induced genes / number of genes in each subcategory $\times 100$).

Fig. 6 Characterization of Induced Genes by the Functional Categories of "Localization". X-axis indicate percent of induced genes (number of induced genes / number of genes in each subcategory $\times 100$).

Table 3 The List of Induced Genes that Products are Localized in Plasma Membrane.

Gene Name	SA	SDS	LAS	Description
AGP1	<u>4.7</u>	0.6	0.6	Amino acid permease
HNMI	<u>3.3</u>	0.7	0.6	Transporter for choline and nitrogen mustard
HXT4	<u>3.2</u>	1.3	1.0	High-affinity glucose transporter
GAL2	<u>3.0</u>	0.8	0.7	Galactose permease
HSP30	<u>2.9</u>	0.7	0.7	Protein induced by heat shock
ITR1	<u>2.9</u>	1.6	—	Myo-inositol transporter
HXT6	<u>2.6</u>	<u>2.3</u>	1.0	Hexose transporter
YOR1	<u>2.5</u>	<u>2.9</u>	<u>3.9</u>	ABC transporter
HXT2	<u>2.4</u>	1.6	1.2	High affinity hexose transporter-2
MAL31	<u>2.4</u>	0.8	0.8	Maltose permease
HXT12	<u>2.1</u>	1.5	1.3	Hexose permease
HXT9	<u>2.1</u>	1.1	1.6	Hexose permease
MEP2	<u>2.1</u>	0.9	1.0	Ammonia transport protein
PLB1	1.9	1.9	<u>3.7</u>	Phospholipase B (lypophospholipase)
YPS1	1.9	<u>2.9</u>	<u>3.2</u>	GPI-anchored aspartic protease
YPS3	1.8	1.5	<u>2.4</u>	GPI-anchored aspartic protease
GSC2	1.8	<u>2.5</u>	<u>3.5</u>	Catalytic component of 1,3-beta-D-glucan synthase subunit
HXT3	1.6	<u>2.1</u>	1.3	Low-affinity glucose transporter
PMP3	1.6	<u>2.3</u>	1.2	Hypothetical transmembrane protein
PDR5	1.3	<u>3.2</u>	<u>3.2</u>	Multidrug resistance transporter
HXT7	1.2	<u>2.3</u>	1.1	Hexose transporter
PST1	1.0	<u>2.1</u>	<u>2.6</u>	The gene product has been detected among the proteins secreted by regenerating protoplasts
CHS1	0.9	<u>2.8</u>	<u>3.1</u>	Chitin synthase 1

The number with line shows genes induced by the detergent treatment

た遺伝子が分類されていた、「エネルギー系」のカテゴリの遺伝子をさらに細かく見るために、「エネルギー系」に属するサブカテゴリで分類した結果を **Fig. 8** に示す。スピクリスポール酸では「発酵」に関わる遺伝子が最も多く誘導されていたが、SDS と LAS では「脂肪酸の酸化」に関わる遺伝子が多く誘導されていた。エネルギー生成の最終段階である、酸化的リン酸化反応の代謝経路に注目すると、SDS で酸化的リン酸化に関わる遺伝子である *COX4*, *COX5B*, *COX8*, *COX12*, *QCR8*, *QCR7* が誘導されていた (10)。これら *COX* 系の遺伝子は、ミトコンドリアにおける電子伝達系で O_2 による還元型シトクロム c の酸化を触媒する、複合体Ⅳのマトリックス側で機能している (10)。同様に *QCR* 系の遺伝子は、シトクロム c による還元型 CoQ の触媒をする、複合体Ⅲで機能していることが示されている (10)。一方、スピクリスポール酸では *SDHI* が顕著に誘導されていた。*SDHI* は、CoQ による $FADH_2$ の酸化を触媒する複合体Ⅱで機能する遺伝子である (10)。SDS では、NADH の酸化を触媒する、酸化的リン酸化反応に関わる遺伝子が誘導されるのに対して、

スピクリスポール酸では、 $FADH_2$ の酸化を触媒する、酸化的リン酸化反応に関わる遺伝子が誘導されていた (**Fig. 9**)。

3.6 代謝系に関する遺伝子

3 種類の界面活性剤で共通して強く誘導していた遺伝子が属する、「代謝系」のカテゴリを細かく見ることにした (**Fig. 10**)。スピクリスポール酸では、「リン酸代謝系」の遺伝子が最も高い割合で誘導されていた。既報のように SDS, LAS では「脂質、脂肪酸とイソブレン系の代謝」に関わる遺伝子が最も高い割合で誘導されていた。各界面活性剤で誘導された遺伝子が属するサブカテゴリが異なることから、それぞれの界面活性剤により誘導された遺伝子で「代謝系」に分類された遺伝子を **Table 4**, **Table 5** に示した。「代謝系」に分類される、スピクリスポール酸による誘導遺伝子を基準に 3 種類の界面活性剤の発現レベルを比較すると、SDS, LAS で処理した遺伝子はほとんど誘導されていなかった (**Table 4**)。さらに、SDS による誘導遺伝子を基準に 3 種類の界面活性剤の発現レベルを比較

Fig. 7 Characterization of Induced Genes by the Functional Categories of "Transport facilitation". X-axis indicate percent of induced genes (number of induced genes / number of genes in each subcategory $\times 100$).

Fig. 8 Characterization of Induced Genes by the Functional Categories of "Energy". X-axis indicate percent of induced genes (number of induced genes / number of genes in each subcategory $\times 100$).

すると (Table 5), SDS と LAS では同じ遺伝子が誘導されていたが, スピクリスポール酸では共通して誘導されている遺伝子がほとんどなかった。Table 4 および Table 5 から, 同じカテゴリーの遺伝子が共通して高い割合で誘導されていても, 誘導されている遺伝子は異なることが分かり, 代謝に対する影響という点においても, スピクリスポール酸と SDS, LAS では相違があることが推察された。

3・7 脂肪酸代謝

Fig. 10 において, SDS, LAS では, 「脂肪酸代謝」に関わる遺伝子が高い割合で誘導されていることを確認したことから, KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>) のデータベースを元に脂肪酸代謝の経路について解析した。脂肪酸代謝に関わる遺伝子で SDS 処理により誘導された遺伝子は *POXI*, *POT1*, *FAA2*, *FOX2*, *ALD4*, *ADH5* であった (10)。これらの遺伝子は全てペルオキシソームに局在しており, SDS により引き起こされる脂肪酸代謝はペルオキシソーム

Fig. 9 Oxidative Phosphorylation Pathway. Induced genes by SDS treatment suggests the oxidation through NADH of complex I, complex III, complex IV. Induced genes by supiculisporic acid treatment suggests the oxidation through FADH₂ of complex II, complex III and complex IV. The induced genes by SDS and supiculisporic acid was show by common name with bold type.

内での β 酸化であることが推察される。ペルオキシソームにおける β 酸化は、C₈ 以上の長鎖脂肪酸を短くして、ミトコンドリアでの β 酸化で分解しやすくするために起こる (10)。LAS では *POX1* と *POT1* が誘導されており、SDS ほどではないがペルオキシソームによる β 酸化が行われていると考えることができる。一方、スピクリスポール酸では、ペルオキシソームに局在する遺伝子は *POX1* のみであった。しかし、SDS と共に、他の脂肪酸代謝に関わり、ミトコンドリアに局在する *ALD4* と *ADH5* は強く誘導されていた。このことから、SDS と LAS ではペルオキシソームで β 酸化を受けていることが推察されたが、スピクリスポール酸では主として、ミトコンドリアで β 酸化を受けていると考えることができる。

3・8 細胞の救出・防御・毒性に関する遺伝子

「細胞の救出・防御・毒性」のカテゴリーに含まれる遺伝子は SDS、LAS で最も高い割合で誘導されており、スピクリスポール酸でも比較的高い割合で誘導されていた。そこで、「細胞の救出・防御・毒性」のカテゴリーに分類される遺伝子のうち、それぞれの界面活性剤で強く誘導された遺伝子から 10 種ずつを併せて **Table 6** に示した。SA では低温ショック系の遺伝子である *TIR1*、*TIR2* が強く誘導されているのに対して、既報のように SDS では酸化ストレス系の遺伝子である *GRX1*、*GPX1*、*TTR1*、*HYR1*、*CTT1*、*GTT2* が誘導されていた (10)。また、LAS においても、酸化ストレス系の遺伝子である *GRX1*、*GTT1* が誘導されていた。3・7 で述べたように、SDS と LAS ではペルオキシソームで脂肪酸の酸化を受けていると考えることができる。この β 酸化に関与する *POX1* 産物によって起こる反応生

Fig. 10 Characterization of Induced Genes by the Functional Categories of “Metabolism”. X-axis indicate percent of induced genes (number of induced genes / number of genes in each subcategory $\times 100$).

Table 4 The List of Genes in the Category of “Metabolism” Induced by Supiculisporic Acid Treatment.

Gene Name	SA	SDS	LAS	Description
HEM13	<u>5.7</u>	0.7	0.7	Coproporphyrinogen III oxidase
YDL037C	<u>5.5</u>	0.4	0.9	Strong similarity to glucan 1,4-alpha-glucosidase
OPI3	<u>5.0</u>	<u>2.5</u>	<u>3.1</u>	Methylene-fatty-acyl-phospholipid synthase
AGP1	<u>4.7</u>	0.6	0.6	Amino acid permease
BIO2	<u>4.4</u>	0.7	0.8	Biotin synthase
INO1	<u>4.3</u>	1.7	<u>10.4</u>	L-myo-inositol-1-phosphate synthase
YIR035C	<u>4.3</u>	0.9	1.2	Similarity to human corticosteroid 11-beta-dehydrogenase
CHO1	<u>4.1</u>	<u>3.2</u>	1.7	Phosphatidylserine synthase
OLE1	<u>4.0</u>	1.7	1.1	Delta-9-fatty acid desaturase
ELO1	<u>3.9</u>	1.9	0.9	Elongation enzyme 1
POX1	<u>3.9</u>	<u>9.2</u>	<u>3.0</u>	Fatty-acyl coenzyme A oxidase
SUC2	<u>3.9</u>	1.4	1.2	Invertase (sucrose hydrolyzing enzyme)
ADH5	<u>3.9</u>	<u>2.0</u>	1.4	Alcohol dehydrogenase isoenzyme V
MIR1	<u>3.8</u>	0.7	1.0	Mitochondrial phosphate transport protein. (MCF)
MAL33	<u>3.7</u>	1.0	0.8	MAL-activator protein
APT2	<u>3.7</u>	0.7	1.1	Adenine Phosphoribosyltransferase
HXK1	<u>3.6</u>	<u>2.2</u>	1.4	Hexokinase I (PI) (also called Hexokinase A)
YFL057C	<u>3.6</u>	1.3	1.6	Strong similarity to aryl-alcohol dehydrogenases
TIP1	<u>3.6</u>	0.4	0.5	Cell wall mannoprotein
TES1	<u>3.5</u>	1.5	1.5	Peroxisomal acyl-CoA thioesterase

The number with line is induced genes treated with detergents.

Table 5 The List of Genes in the Category of “Metabolism” Induced by SDS Treatment.

Gene Name	SA	SDS	LAS	Description
HSP12	0.8	<u>9.3</u>	1.6	12 kDa heat shock protein
POX1	<u>3.9</u>	<u>9.2</u>	<u>3.0</u>	Fatty-acyl coenzyme A oxidase
YPL088W	1.7	<u>8.2</u>	<u>9.7</u>	Strong similarity to aryl-alcohol dehydrogenase
ECI1	1.6	<u>8.1</u>	<u>4.0</u>	Peroxisomal d3,d2-enoyl-CoA isomerase
MET30	1.6	<u>5.7</u>	<u>7.5</u>	Met30p contains five copies of WD40 motif
GRE2	1.4	<u>5.4</u>	<u>4.6</u>	Putative reductase
YGR043C	1.8	<u>4.8</u>	1.5	Strong similarity to transaldolase
PHO89	0.9	<u>4.3</u>	<u>4.9</u>	Na ⁺ -coupled phosphate transport protein
DLD1	1.2	<u>4.0</u>	<u>2.5</u>	D-lactate ferriocytochrome c oxidoreductase
PDR16	1.1	<u>3.9</u>	<u>4.0</u>	Homologous to Pdr17p and Sec14p
RIB5	0.9	<u>3.8</u>	<u>3.2</u>	Riboflavin synthase alpha-chain
GPM2	0.7	<u>3.7</u>	1.9	Phosphoglycerate mutase, involved in glycolysis
PXA1	1.8	<u>3.5</u>	1.5	ABC family long-chain fatty acid transporter
YBR056W	0.6	<u>3.4</u>	<u>2.5</u>	Homolog to glucan-1,3-glucosidase 2
ARA1	0.5	<u>3.4</u>	<u>2.1</u>	D-arabinose dehydrogenase
PUT1	1.2	<u>3.4</u>	<u>2.0</u>	Proline oxidase
JEN1	<u>2.7</u>	<u>3.3</u>	1.6	Carboxylic acid transporter protein homolog
CHO1	<u>4.1</u>	<u>3.2</u>	1.7	Phosphatidylserine synthase
PDR5	1.3	<u>3.2</u>	<u>3.2</u>	Multidrug resistance transporter
LSC2	0.9	<u>3.1</u>	1.9	Succinate-CoA ligase (ADP-forming)

The number with line is induced genes treated with detergents.

Table 6 The List of Genes in the Category of “Cell Rescue, Defense and virulence” Induced by Each Detergents Treatment.

Gene Name	SA	SDS	LAS	Description
TIR1	<u>8.6</u>	0.7	1.0	Cold-shock induced protein of the Srp1p
TIR2	<u>4.2</u>	0.7	1.3	Induced by cold shock
YBR293W	<u>4.0</u>	1.4	1.0	Probable multidrug resistance protein
ADH5	<u>3.9</u>	<u>2.0</u>	1.4	Alcohol dehydrogenase isoenzyme V
YER187W	<u>3.8</u>	0.8	1.0	Similar to killer toxin
TIP1	<u>3.6</u>	0.4	0.5	Cell wall mannoprotein
SRL1	<u>3.3</u>	0.8	1.1	Suppressor of rad53 lethality
AZR1	<u>3.2</u>	1.2	<u>3.8</u>	Small molecule transport/MFS-MDR
GTT2	<u>3.0</u>	<u>2.1</u>	1.9	Glutathione transferase
CTT1	<u>3.0</u>	<u>2.0</u>	0.9	Cytoplasmic catalase T
GTT1	1.8	1.9	<u>2.7</u>	Glutathione transferase
HYR1	1.8	<u>2.7</u>	1.7	Putative glutathione-peroxidase
TTR1	1.8	<u>2.9</u>	1.4	Glutaredoxin
YOR273C	1.5	<u>2.9</u>	<u>3.4</u>	Similarity to resistance proteins
RTA1	1.4	<u>8.8</u>	<u>13.6</u>	Involved in 7-amincholesterol resistance
PDR5	1.3	<u>3.2</u>	<u>3.2</u>	Multidrug resistance transporter
MAC1	1.2	<u>3.3</u>	<u>2.7</u>	Metal-binding transcriptional activator
GPX1	1.2	<u>3.1</u>	1.8	Glutathione peroxidase paralogue
YLL057C	1.1	1.3	<u>3.0</u>	Similarity to <i>E.coli</i> dioxygenase
YLR046C	1.1	<u>5.2</u>	<u>5.0</u>	Strong similarity to Rta1p and Rtm1p protein
ATX1	0.9	<u>2.4</u>	<u>2.9</u>	Putative copper binding/homeostasis protein
YSR3	0.8	<u>2.4</u>	<u>3.5</u>	DHS-1-P phosphatase
HSP12	0.8	<u>9.3</u>	1.6	12 kDa heat shock protein
GRX1	0.7	<u>4.5</u>	<u>2.6</u>	Glutaredoxin

The number with line is induced genes treated with detergents.

成物は、 H_2O_2 であることが知られており、SDS と LAS において酸化ストレス系の遺伝子が誘導されたことと一致する。

4 まとめ

スピクリスポール酸と SDS および LAS による、酵母 DNA マイクロアレイのデータ解析を比較した結果、以下のことが明らかになった。

1) 階層的クラスター解析により、他の化学物質の遺伝子発現プロファイルと比較したところ、スピクリスポール酸と SDS, LAS の遺伝子発現プロファイルは類似していた。しかし、強く誘導された遺伝子を比較すると、既報のように SDS と LAS では類似していたが、スピクリスポール酸では異なる結果を示していた。さらに、誘導遺伝子を MIPS のカテゴリーで機能別に分類した結果、高い割合で誘導されたカテゴリーは類似していたが、カテゴリーに分類された誘導遺伝子を解析したところ、SDS と LAS では類似しており、スピク

リススポール酸では異なることが推察された。以上のことから、スピクリスポール酸は SDS と LAS とは生体に対する影響が異なることが示唆された。また、DNA マイクロアレイを用いた解析では、少なくともスピクリスポール酸と SDS, LAS を生体影響という観点で区別できることが示された。

2) スピクリスポール酸と SDS の代謝という点に着目して解析した結果、①脂肪酸代謝に関与する遺伝子の局在性において、SDS ではペルオキシソームに局在する遺伝子が多く誘導されていたが、スピクリスポール酸ではミトコンドリアに局在する遺伝子が多かった。②酸化的リン酸化では、SDS で、NADH の酸化を触媒する反応系に関わる遺伝子が誘導されるのに対して、スピクリスポール酸では、 $FADH_2$ の酸化を触媒する反応系に関わる遺伝子が誘導されていた。③ SDS ではミトコンドリアの β 酸化系の遺伝子も誘導されていたが、主としてペルオキシソームの β 酸化系が強く誘導されていた。スピクリスポール酸では、主としてミトコン

ドリアの β 酸化系が誘導されていた。④ SDS では酸化ストレスが顕著に発生していた。これらのことから、SDS ではペルオキシソームを中心として代謝され、 H_2O_2 を介した酸化ストレスを強く誘導するが、スピクリスポール酸では、ミトコンドリアを中心として代謝され、酸化ストレスはほとんど発生していないと考えられる。これは、SDS のアルキル鎖の長さがスピクリスポール酸のアルキル鎖の長さよりも長いことと関係しており、界面活性剤による酸化ストレスの誘導は、アルキル鎖の長さが影響していることが示唆された。しかしながら、親水基の影響について、今回は検討していないため、今後の検討課題である。

以上の結果は、DNA マイクロアレイ技術が、各種化学物質の生体影響を評価する上で、有効である可能性を示しており、本法が界面活性剤の安全性および毒性の新しい評価・解析手法として普及することを期待したい。

謝 辞

本研究の一部は、NEDO 民間基盤技術研究試験研究“環境化学物質の簡易型化学物質推定・毒性評価システムの開発”の委託先であるダイキン環境研究所からの再委託により実施している。

Reference

1. Y. ISHIGAMI, Properties and Special functions of Biosurfactants, *Hyomen*, Vol. **27**, 457-472 (1989).
2. Y. ISHIGAMI, Recent Advance of R&D of Biosurfactants, *Hyomen*, Vol. **35**, 515-523 (1997).
3. M. OSMAN, Y. ISHIGAMI, K. FURUSAWA and H. HOLMSEN, Multicarboxylic Biosurfactants as a Model for Designing Hard Water and High Salt Tolerance, *J. Jpn Oil Chem. Soc.*, Vol. **46**, 741-746 (1997).
4. Suidousui suishitsu kijyun ichiran (Kijyun46koumoku).
5. S. SIRISATTHA, Y. MOMOSE, E. KITAGAWA and H. IWAHASHI, Toxicity of Anionic Detergents by *Saccharomyces cerevisiae* Microarray Analysis, *Water Res.*, Vol. **38**, 61-70 (2004).
6. Y. ISHIGAMI, S. YAMAZAKI and Y. GAMA, Surface Active Properties of Polycarboxylic Biosurfactant from Spiculisporic acid, *Kankyou gijyutsu kenkyujyo houkoku*, Vol. **80**, No. 6, pp. 223-230 (1985).
7. H. IWAHASHI, Microarray, DNACHIP-KOREKARA NO GIJYUTU-, *KANKYOU GIJYUTSU*, Vol. **31**, No. 9, 679-685 (2002).
8. Y. MOMOSE and H. IWAHASHI, Bioassay of Cadmium Using a DNA Microarray: Genome-Wide Expression Patterns of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. **20**, 2353-2360 (2001).
9. S. KURITA, E. KITAGAWA, C. KIM, Y. MOMOSE and H. IWAHASHI, Studies on the Antimicrobial Mechanisms of Capsaicin Using Yeast DNA Microarray, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. **66**(3), 532-536 (2002).
10. D. VOET and J. VOET, *Voet Biochemistry* (JYOU) (GE), Vol. **1**, 1 (1992).