

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19847

研究課題名（和文）福島第一原子力発電所周辺の潮間帯で見られた巻貝の生殖の季節性喪失の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis for the loss of seasonality of reproduction found in the marine snail, *Reishia clavigera*, living in the vicinity of the Fukushima daiichi nuclear power plant

研究代表者

森下 文浩（MORISHITA, FUMIHIRO）

広島大学・統合生命科学研究科（理）・助教

研究者番号：20210164

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：炉心溶融事故を起こした福島第一原子力発電所近傍で見られた巻貝（イボニシ）の通年成熟現象の原因を探るため、RNA-Seq解析によりイボニシ脳で発現する約6万個の遺伝子転写産物を特定し、通年成熟に伴う発現変動を解析した。その結果、特定した88種の神経ペプチド前駆体遺伝子のほとんどが有意に発現低下するという通年成熟に特有の現象を見いだした。ヒストンやDNAの化学修飾に関わる酵素遺伝子の一部が発現上昇していたことから、エピゲノム調節系の攪乱と通年成熟の関連が示唆された。また、神経ペプチド遺伝子の発現変動を指標に、巻貝を簡便かつ高感度な環境モニタリングシステムに利用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

巻貝の通年成熟現象は、これまで原因に関する知見がほとんど無く、原発事故との関連性も不明であった。本研究により、何らかの環境因子が遺伝子に傷を付けることなくエピゲノム調節を攪乱することで遺伝子発現を変化させ通年成熟を引き起こした、というエピゲノム攪乱仮説を提唱して研究の方向性を示すことができた。今後、この仮説の検証を通して通年成熟の原因解明と原発事故との関連性の検証、さらにはエピゲノム調節の適正化による通年成熟の解消が期待できる。また、巻貝の遺伝子発現変動を指標にして環境変化を簡便・高感度に検出する新たな環境モニタリングシステムを開発する基盤を提供できた。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanism for the consecutive sexual maturation (CSM) found in a marine snail, *Reishia clavigera*, living near the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant, we examined the changes in gene expression in the CSM snail by the RNA-seq analysis. We identified 88 kinds of neuropeptide-precursor genes from more than 60,000 kinds of gene transcripts in the brain, and found that the expression of neuropeptide precursor gene is down-regulated in CSM snails. We also found the up-regulation of several epigenome-related genes in CSM snails, suggesting that chemical modification of the histone and/or DNA is promoted in CSM snail. We proposed a hypothesis that disturbance of epigenome by unknown environmental factor induced the down-regulation of neuropeptides and CSM. Our results also suggest that modification of gene-expression in this marine snail is applicable for the conventional and sensitive monitoring system for the environmental change by pollution and climate change.

研究分野：動物生理学

キーワード：神経ペプチド エピゲノム トランスクリプトーム 通年成熟 巻貝

1. 研究開始当初の背景

1) 2011年3月に発生した東日本大震災とそれに伴う津波は、福島第一原子力発電所の炉心溶融事故を引き起こし、大量の放射性物質が環境中に漏出した。放射性物質の多くはブルームや河川・地下水などを經由して海に集積され、低レベル放射性物質による海洋の継続的汚染をもたらした。さらに、放射線防護や防潮堤建設のため、約5年間にわたって海中に投入された計10万トンものセメントから漏出した重金属が生物濃縮によって個体群にダメージを与えた懸念もある。このような複合汚染に対して適切に対処するためには、汚染が海の生態系に与える影響を査定する適切なモデル系やマーカーを確立し、汚染の実態を正しく把握することが急務であった。

2) 研究分担者の堀口は、地震や津波の被害を受けた東北地方の太平洋岸では、多くの地域で潮間帯の生態系が震災から5年間で、ほぼ震災前のレベルまで回復していたのに対して、福島第一原子力発電所近傍では生態系が復元されていないこと(文献1)、原発の南側数キロ圏内では、本来、初夏期に生殖腺が成熟して繁殖期を迎えるイボニシ(軟体動物腹足類の巻貝)が、年間を通じて生殖腺の成熟が維持される「**通年成熟**」現象を起こしていることを発見した(文献2)。通年成熟を起こしたイボニシは生殖可能期間が延長されているため、一見すると個体数の回復が促進されるように思われるが、年間を通じて性成熟を維持するためには相当なエネルギーを必要とする一方で、冬期は孵化した幼生の生存が困難であることから、エネルギーコストの割には個体群の回復に繋がらず、むしろ疲弊させていると想定された。実際、原発近傍ではイボニシ個体群の回復は、他の地域より遅れている。

原発事故後、数年間は原発近傍でイボニシが採集されなかったことから(文献2)、原発事故により原発近傍のイボニシはほぼ死滅し、事故から数年経過後に周辺から新たに移入してきた集団に通年成熟が発生したと考えられた。そのため、通年成熟を起こしたイボニシが事故直後の高レベルな放射性物質や重金属による重篤な海洋汚染に遭遇したとは考えられず、原発事故との関連性も含めてその原因は不明であった。

3) われわれは、通年成熟が福島第一原発南側数キロ圏内という限定された場所でのみ発生していることから、やはり原発事故に関連する何らかの環境因子がイボニシの遺伝子発現を攪乱させ、その結果、生殖サイクルが乱れて、本来初夏に性成熟するという季節性が失われて通年成熟に至った、という仮説を立てた(図1)。

巻貝を含む多くの動物で、脳で合成・分泌される神経ペプチドが直接的・間接的に生殖の調節に関わることはよく知られている。われわれは環境応答の司令塔であるイボニシ脳において神経ペプチドの発現が変化して神経ペプチド調節系が攪乱されたために通年成熟が発生した、という独自の仮説を立てた。そして、神経ペプチド前駆体遺伝子を含む遺伝子発現が通年成熟によってどのように変化するのかを俯瞰することが通年成熟現象の原因究明にむけた突破口になると考えた。

4) 動物が生殖の季節性を喪失することによって日本の四季が攪乱されることの危険性を理解し、速やかな回復に繋げるため、まず生態系混乱の原因の包括的解明が極めて重要なキーとなる。イボニシにおける通年成熟現象の原因と発生メカニズムを解明することで、低レベル放射性物質による海洋の継続的汚染の実態をより深く理解することができ、さらに、イボニシを環境汚染マーカーとして活用することも可能であろうと思われた。

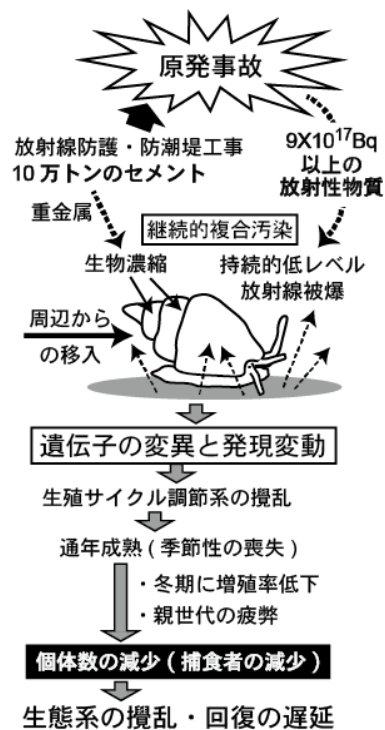


図1. イボニシの生殖の季節性喪失

2. 研究の目的

これまで、イボニシの神経ペプチドの構造と機能に関する知見はごくわずかであり(文献 3,4)、環境応答の司令塔であるイボニシ脳に発現する神経ペプチドの機能異常が通年成熟の発生に関連する、という仮説を検証することは困難であった。そこで、本計画ではまず、次世代シーケンサー(NGS)によりイボニシ脳で発現する遺伝子を網羅的に解析し、1) イボニシの神経ペプチド前駆体遺伝子を網羅的に特定する、2) 特に神経ペプチド前駆体遺伝子を重点的に狙いながら、通年成熟により発現が変動する遺伝子群を特徴付ける、3) 遺伝子の発現が変動した原因遺伝子を特定して、生殖の季節性喪失に関わるシグナル伝達の分子機構を解明する(発現解析)、4)得られる知見をもとに、季節性喪失の簡便モニタリング法を確立する(検出系確立)ことを目指した。

3. 研究の方法

福島県大熊町夫沢で通年成熟イボニシ(雌雄各3個体)を、茨城県ひたちなか市平磯で正常イボニシ(雌4個体、雄3個体)を、それぞれ採集し、脳(食道環神経節と内臓神経節)を摘出して、それぞれの脳から個別に Total RNA を抽出した。市販のキットを使って、抽出した total RNA から平均鎖長約 400bp のイルミナ解析用 cDNA ライブラリーを調製した。雌個体から調製した7個のライブラリーと雄個体から調製した計6このライブラリーをそれぞれ混合し、イルミナ HiSeq X による 150bp, pair-end, 5 億リードの解析条件での2回の解析を業者委託した。

イボニシはゲノム解読が完了していない非モデル動物であるため、2回の解析で得られた Shirt read DNA 塩基配列を合わせて Trinity, Corset などのアプリケーションを用いて連結して約6万個の遺伝子転写産物モデルを作製し、データベースを利用した相同性検索により特徴付けした。このモデルを reference として Shirt read DNA 配列を対応付けし、各遺伝子の発現量を定量した。また、既知の神経ペプチド前駆体遺伝子との相同性をもとに遺伝子転写産物モデルの中からイボニシ神経ペプチド前駆体遺伝子の塩基配列を取得し、前駆体タンパク質のアミノ酸配列の推定、定量的 PCR 増幅に用いるプライマーの設計・調製を行った。これと並行して、前駆体遺伝子の塩基配列の確認のため、前駆体遺伝子の全長を PCR 増幅するためのプライマーも設計し、イボニシ中枢神経節由来の完全長 cDNA ライブラリーを鋳型に PCR 増幅して前駆体遺伝子の分子クローニングを試みた。

一方、前駆体にコードされたペプチドが翻訳後修飾によって生理機能を持つ成熟型ペプチドに変換されていることを確かめるため、熱酸抽出法でイボニシの単一神経節からペプチド抽出物を調製し、C₁₈-ZipTip(ミリポア社)で粗精製したのち、広島大学の NanoLC-Orbitrap-MS/MS 質量分析計でイボニシ神経節に含まれるペプチドの配列分析を行った。

4. 研究成果

1) 神経ペプチド前駆体の特定と正常イボニシにおける発現比較

イボニシ脳から調製したイルミナ解析用 cDNA の解析により、約3億8千万個の Shirt-read DNA 塩基配列を得た。イボニシはゲノム配列が解読されていないので、Trinity と Corset で Shirt-read DNA をアセンブルし約6万個の遺伝子転写産物モデルを作製し、GenBank などのデータベースを対象に相同性検索してモデルを特徴付けた。また、MA-plot や軟体動物の Core-gene set (Mollusca_odb10)に対する相同性などから、モデルの正確性を確認した。次に、このモデルに対して Shirt-read DNA 塩基配列を貼り付け、正常イボニシと通年成熟イボニシの間で発現量が変動している遺伝子を GO-enrichment 解析によって探索したところ、通年成熟で発現が低下した遺伝子群の中に神経ペプチド前駆体遺伝子が有意に濃縮されていることが明らかとなり、神経ペプチド調節系の攪乱を示唆する結果となった。

神経ペプチド前駆体遺伝子の発現変動をより詳細に解析するため、まず、イボニシの遺伝子転写産物モデルの塩基配列をアミノ酸配列に置き換えてイボニシ脳に発現するタンパク質のデータベースを作成した。次に、既知の軟体動物・節足動物の神経ペプチド前駆体のアミノ酸配列を元にこのデータベースを対象に相同性検索を行い、イボニシ神経ペプチド前駆体を88種同定

した。

同定した前駆体遺伝子の塩基配列を確認するため、同定した前駆体遺伝子の塩基配列を元に PCR プライマーを作製し、イボニシ脳由来の完全長 cDNA ライブラリーを鋳型に PCR 増幅して前駆体遺伝子の分子クローニングを試みた。現在までに 75 種の前駆体について前駆体タンパク質コード領域の全長または一部配列のクローニングに成功しており、クローニングで得た前駆体の塩基配列と遺伝子転写産物モデルの塩基配列の平均一致度は約 95% であった。

また、これらの前駆体にコードされる神経ペプチドのおよそ半分を質量分析によりイボニシ脳から同定できたことから、前駆体にコードされる神経ペプチドの多くは実際に翻訳後修飾を経て成熟型ペプチドとなっていると推定された。

2) 通年成熟に伴う神経ペプチド前駆体の発現変動

RNA-Seq 解析データを元に、ヒートマップ解析により 88 種の神経ペプチド前駆体の発現レベルを調べたところ、雌雄共に、ほとんどの前駆体の発現が通年成熟イボニシにおいて正常イボニシより低下しており(図 2)、雄では 22 種、雌 36 種の神経ペプチド前駆体遺伝子の発現が統計的に有意に低下していた。このように、あたかも神経ペプチド前駆体遺伝子を狙い撃ちしたような全般的な発現はこれまで報告がなく、通年成熟に特有の現象と思われた。

3) 神経ペプチド前駆体遺伝子の一斉発現低下のメカニズム

通年成熟イボニシで神経ペプチド前駆体遺伝子の発現が押し並べて低下していたことから、通年成熟イボニシでは遺伝子発現調節機構が正常に機能していない可能性が考えられた。そこで、ホルモンなどに応答して遺伝子発現を調節するエストロゲン受容体などの核内受容体の発現変動を調べたが、有意に変動しているものは見つからなかった。しかし、ヒストンや DNA の化学修飾(アセチル化、メチル化)に関わる酵素遺伝子群の中に、通年成熟イボニシで発現が有意に上昇しているものが見つかった。これらのことから、通年成熟イボニシではヒストンや DNA の化学修飾が亢進していることが想定され、エピゲノム調節の攪乱によって神経ペプチド前駆体遺伝子の発現が持続的に低下している可能性が示唆された。以上の研究成果は文献 5 として公表した。

4) 考察

本研究計画では、動物の生殖の調節に重要な役割を担う神経ペプチド調節系の攪乱が通年成熟の原因とする独自の仮説を立て、RNA-Seq 解析による網羅的遺伝子発現解析によってその検証を試みた。その結果、通年成熟によってほとんどの神経ペプチド前駆体遺伝子の発現が一斉に低下するという奇異な現象を見いだすことができた。発現が低下していた神経ペプチドのいくつかは、生殖関連器官の運動の調節など、生殖活動に関与するものが含まれており(文献 3, 4)、通年成熟イボニシでは生殖活動が何らかの変調を来している、と推定される。

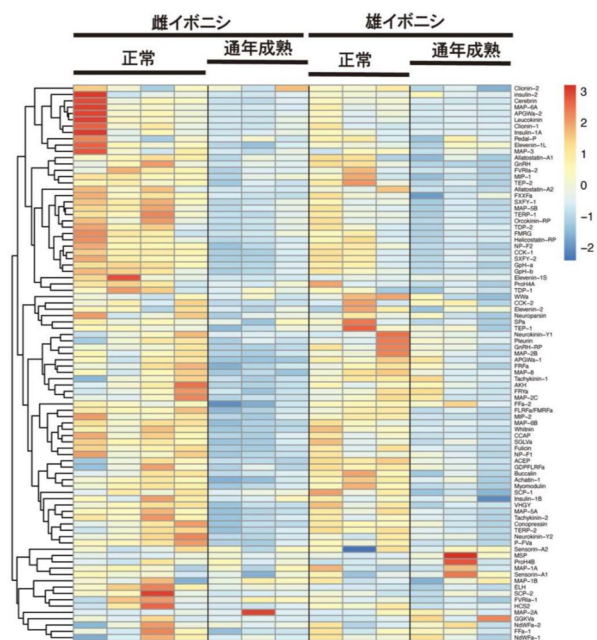


図 2. 神経ペプチド遺伝子の発現量を示すヒートマップ図

正常イボニシと通年成熟イボニシから調製した cDNA ライブラリーにおける 88 種の神経ペプチド遺伝子の発現量を、発現量が平均値より高かったものは赤で、低かったものは青で示した。雌雄ともに正常個体に比べて通年成熟個体から調製した cDNA ライブラリーの方が神経ペプチド遺伝子の発現が下がっていることが分かる。文献 5 から一部改変して引用。

一方、当初は生殖腺の成熟を促す神経ペプチド遺伝子の過剰発現による過剰なペプチドの作用が通年成熟の原因と推定していたが、実際にはほとんどの発現が低下していた。このことから、孵化した幼生の生存に不適な冬期に生殖腺の発達を抑制していた神経ペプチドの発現が低下しているため、一度成熟すると冬期になっても生殖腺が退縮せず、性成熟を維持し続けている、といったシナリオが考えられる。

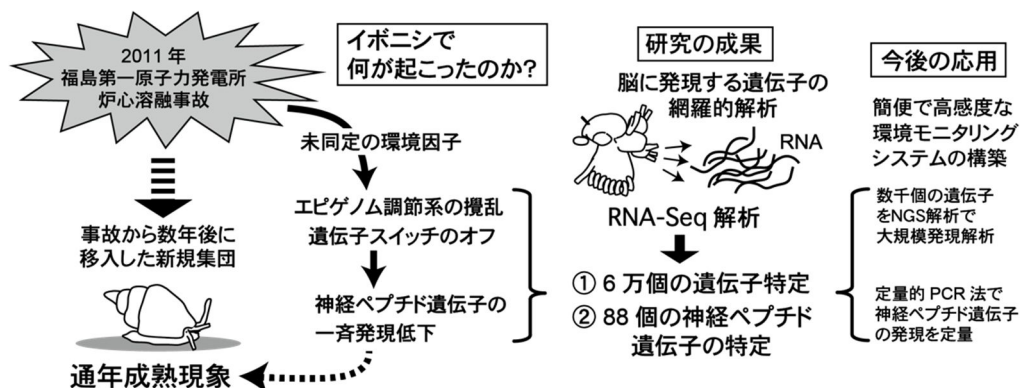


図3. 本研究のまとめと考察

また、神経ペプチド前駆体遺伝子の一斉発現低下の原因として、エピゲノム調節の攪乱が推定された(図3)。エピゲノム調節では化学修飾によってヒストンとDNAの相互作用が強化されると転写調節因子が結合できなくなり、持続的に遺伝子発現が抑制される。原発事故に関連する何らかの環境因子がイボニシのエピゲノム調節系を攪乱して遺伝子発現を持続的に抑制した結果、通年成熟が引き起こされた、というエピゲノム攪乱仮説はイボニシの通年成熟の発生メカニズムを合理的に説明できる。本研究によって、これまで全く不明であった通年成熟現象の原因究明に向けた一つの方向性を示すことができたので、今後、イボニシのエピゲノム調節機構や神経ペプチド前駆体遺伝子の発現調節機構の検証、神経ペプチドの生理作用の解析によって通年成熟の原因解明と原因物質の特定が進むと期待できる。また、環境因子が遺伝子そのものに傷を付けることなく、エピゲノム調節を攪乱することで通年成熟を引き起こしたのなら、エピゲノム調節関連酵素を標的とした抗がん剤を通年成熟イボニシに処方することで通年成熟を解消できる可能性がある。

今回の一連の研究で、イボニシは環境応答として神経ペプチド前駆体遺伝子の発現が大きく変動することがわかった。イボニシは、これまでも有機スズによる海洋汚染に対して鋭敏に応答したことから、有機スズ汚染のモニタリングに活用された経緯があり、環境変化・環境汚染に敏感に応答する動物と考えられる。神経ペプチド前駆体遺伝子を中心としたイボニシの遺伝子発現変動を定量的PCR法などで測定することで、環境変化を簡便かつ高感度に検出できる可能性があり、将来的に、環境モニタリングシステムへの応用という実用的な成果も期待できる。

文献

1. Horiguchi, T., et al (2016) Decline in intertidal biota after the 2011 Great East Japan Earthquake and Tsunami and the Fukushima nuclear disaster: field observations. *Sci. Rep.*, 6:20416, doi: 10.1038/srep20416
2. Horiguchi, T., et al (2021) Consecutive sexual maturation observed in a rock shell population in the vicinity of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant, Japan. *Sci. Rep.*, 11:560, doi: 10.1038/s41598-020-80686-3
3. Morishita, F., et al (2006) Novel excitatory neuropeptides isolated from a prosobranch gastropod, *Thais clavigera*: The molluscan counterpart of the annelidan GGNG peptides. *Peptides*, 27:483-492, doi: 10.1016/j.peptides.2005.06.026.
4. Morishita, F., (2020) Identification of neuropeptides in gastropod mollusks. - Classical and brand-new approaches -. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 456:012001. doi: 10.1088/1755-1315/456/1/012001.
5. Morishita, F., et al. (2023) Concomitant downregulation of neuropeptide genes in a marine snail with consecutive sexual maturation after a nuclear disaster in Japan. *Front. Endocrinol.*, 14:1129666, doi: 10.3389/fendo.2023.1129666.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morishita, F., Horiguchi, T., Akuta, H., Ueki, T., Imamura, T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Concomitant downregulation of neuropeptide genes in a marine snail with consecutive sexual maturation after a nuclear disaster in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1129666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2023.1129666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森下文浩、堀口敏宏、植木龍也、今村拓也
2. 発表標題 福島第一原発周辺沿岸で生殖の季節性を失った巻貝の神経節に発現する遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 公益社団法人 日本動物学会 第92回 オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下文浩、堀口敏宏、植木龍也、今村拓也
2. 発表標題 福島第一原発近海で通年成熟現象を起こした巻貝(イボニシ)の中樞神経系における遺伝子変動の網羅的解析
3. 学会等名 第45回 日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム オンライン金沢大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下文浩、堀口敏宏、植木龍也、今村拓也
2. 発表標題 福島第一原発周辺で生殖の季節性を喪失した巻貝の中樞神経系における神経ペプチド前駆体の発現解
3. 学会等名 中国・四国動物生理シンポジウム2021 オンライン広島大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下文浩、堀口敏宏、飽田寛人、植木龍也、今村拓也
2. 発表標題 福島第一原発周辺の潮間帯で通年成熟現象を起こしたイボニシにおける神経ペプチド前駆体遺伝子の発現変動
3. 学会等名 2022年度 生物系三学会中国四国地区合同大会 オンライン島根大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下文浩、堀口敏宏、飽田寛人、植木龍也、今村拓也
2. 発表標題 生殖の季節性を失った巻貝(イボニシ)の神経節における遺伝子の発現変動
3. 学会等名 公益社団法人日本動物学会 第93回 早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下文浩、堀口敏宏、飽田寛人、植木龍也、今村拓也
2. 発表標題 福島第一原発近傍で通年成熟現象を起こした巻貝の脳における神経ペプチド前駆体遺伝子発現の一斉低下
3. 学会等名 第46回日本比較内分泌学会及びシンポジウム 東京大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下文浩、堀口敏宏、飽田寛人、植木龍也、今村拓也
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析からみたイボニシの通年成熟現象
3. 学会等名 中国・四国動物生理シンポジウム2022 山口大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下文浩、堀口敏宏、飽田寛人、植木龍也、今村拓也
2. 発表標題 福島第一原子力発電所近傍で生殖の季節性を喪失した巻貝の中樞神経節における神経ペプチド前駆体のconcomitantな発現低下。
3. 学会等名 第27回 日本生殖内分泌学会学術集会 広島大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

令和5年3月9日に「福島第一原発近傍で観察された巻貝の生殖異常のメカニズム解明 神経ペプチド遺伝子の発現低下と発現調節スイッチの異常による可能性」というタイトルでプレスリリースを行い、令和5年3月10日付け 中国新聞 朝刊、令和5年4月5日付け 日本経済新聞 電子版、令和5年6月1日付け 朝日新聞 朝刊 に記事が掲載された。

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今村 拓也 (Imamura Takuya) (90390682)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・教授 (15401)	
研究分担者	堀口 敏宏 (Horiguchi Toshihiro) (30260186)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・室長 (82101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------