

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22934

研究課題名(和文)環境RNAを用いたモデル生物を対象とした環境毒性への生物応答の解析

研究課題名(英文) Analysis of biological responses to toxicity in model organisms using environmental RNA.

研究代表者

土居 秀幸 (Hideyuki, Doi)

兵庫県立大学・シミュレーション学研究所・准教授

研究者番号：80608505

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)：本研究では、“環境RNAにより生物の遺伝子発現反応を連続測定できる革新的技術”を確立し、毒性への生物応答を継続的に捉えるために応用することを目的に研究を行なった。標準試験生物であり、全ゲノムの記載があるオオミジンコの生態毒性試験において、環境RNAを回収、シークエンス解析する手法を開発した。オオミジンコを銅に暴露したボトルにて飼育し、水中と生体からはRNAを抽出した。そのRNAについて微量RNAシークエンスにてRNAseqを行った。その結果、生体からのRNAseqの結果と比較したところ、また、銅の毒性の有無によって、特に水中のRNAにおいて両条件で遺伝子発現に違いが見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した、環境RNAの解析では試験個体を分析に供するため、生きたまま連続的に関連遺伝子の発現量を追うことが不可能である。この問題を解決することができれば、現行の生態毒性試験で生物の生死や成長、増殖などの挙動を追うと同時に、関連遺伝子の発現量の変化をとらえることが可能となる。そこで、本研究では、水中において存在している“環境RNA”を用いて、遺伝子発現を解析する革新的手法を開発した。この“環境RNA”により生物の遺伝子発現反応を連続測定できる革新的技術”を確立により、毒性への生物応答を継続的に捉えるために応用することができると考えらえる。

研究成果の概要(英文)：We conducted this project to establish an innovative technology for continuous measurement of gene expression responses of organisms using environmental RNA (eRNA), especially for applying to capture biological responses to toxicity over time. We developed a novel method to collect and sequence environmental RNA for using *Daphnia magna*, a toxic-standard test organism whose whole genome has been published. *Daphnia magna* was reared in a bottle exposed to dissolved copper, and the RNA was extracted from the water and the organism. The RNAseq was performed by RNA sequencing for ultra-low RNA concentration. The results were compared with RNAseq from the organisms, and the differences and similarities in gene expressions were observed in the eRNA extracted from the water, depending on the presence or absence of copper toxicity.

研究分野：生態学

キーワード：環境RNA 環境DNA 毒性 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

有害化学物質に対する生物の生態的応答を根本から理解するには、その応答に関連するタンパク質産生に関わる遺伝子の発現を調べるとともに、現行の評価エンドポイント(個体の生死や行動、繁殖)に関わる情報を同時に取得することが重要である。現在では、超並列(次世代)シーケンサなどの技術の発達で、メッセンジャーRNA(mRNA)を同時並列に解析(RNAseqによるトランスクリプトーム解析)することで、どのような遺伝子が発現しているかを明らかにできるようになってきた。この技術はすでに、生態学や環境毒性学分野で応用されている。しかし、mRNAの解析では試験個体を分析に供するため、生きたまま連続的に関連遺伝子の発現量を追うことが不可能である。この問題を解決することができれば、現行の生態毒性試験で生物の生死や成長、増殖などの挙動を追うと同時に、関連遺伝子の発現量の変化をとらえることが可能となる。そこで、本研究では、水中において存在している“環境RNA”を用いて、遺伝子発現を解析する革新的手法を開発する。“環境RNA”により生物の遺伝子発現反応を連続測定できる革新的技術”を確立し、毒性への生物応答を継時的に捉えるために応用する。

2. 研究の目的

本研究では、水中において存在している“環境RNA”を取集し、RNAシーケンサ(RNAseq)により遺伝子発現を解析する革新的手法を開発する。“環境RNA”により生物の遺伝子発現反応を連続測定できる革新的技術”を確立し、毒性への生物応答を継時的に捉えるために応用することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

標準試験生物であり、全ゲノムの記載があるオオミジンコの生態毒性試験において、環境RNAを回収、シーケンサ解析する手法を開発した。オオミジンコを銅に曝露したボトルと曝露しないボトルに入れたものを作って飼育実験を行った(図1)。その48時間後、水中からはカードリッジフィルターを用いて水を濾過しRNA抽出キットなどを用いて抽出した。またその生体からも抽出を行なった。また様々な予備実験からこれらの処理は採水後迅速に行わなければRNAの回収が著しく少なくなることがわかった。そのRNAについて微量RNAシーケンサの実験を行い、HiSeqにてRNAseqを行った。

ミジンコ(*Daphnia magna*)
モデル生物 毒性試験生物



total 銅(Cu) = 9.1 µg/L

48-h EC50 = 1.9 µg/L
(この水質条件で、D. magnaの
1齢仔虫に対するCuの半数影響濃度)

図1 飼育実験の概要。

4. 研究成果

1) 手法開発

本研究では、水中からはステリベクスカードリッジフィルターを用いて水を濾過しRNA抽出キットなどを用いて抽出した。この手法はこれまでも行われてきた(未発表)のものであるが、その手法が十分実用できることを明らかにした。抽出しRNA量を定量する実験を繰り返し、様々な予備実験を行なった結果、これらの水からのRNA抽出の処理については、採水濾過後に即時迅速に行わなければRNAの回収が著しく少なくなることがわかった。概ね今回の実験には3時間程度を抽出までに要した。このことから、実験の迅速性がRNA回収に大きな影響を与えるため、さらに早く実験できようようなプロトコルの開発が必要である。

2) 比較実験結果

本研究で開発する環境RNAを用いた解析と、生物から直接取り出したRNAを用いた従来のRNAseq解析との比較を行った。その結果、水中の環境RNAも微量分析であれば十分解析可能なだけの

RNA が回収できていることがわかった。また微量分析を用いても RNA のリードなどに大きな影響はなくこれまでのシーケンス法と同様に解析が可能であることが示唆された。

さらに生体からの RNAseq の結果と比較したところ、水中ではマッピングできた RNA が 27-40%ほどと少なく、RNA の劣化や微生物など他の生物由来の RNA が多くシーケンスされた（図 2）。見出される遺伝子は水中と生体では大きく異なっていたが、多く検出された RNA については、生体で検出されたものと、概ね似通っていることが明らかとなった（図 3）。また、全体では大きな違いはなかったが、個別の遺伝子を見ていくと、実験での銅による毒性の有無によって、特に水中の RNA において両条件で遺伝子発現に違いが見られた。このことから、環境 RNA を用いることで生物を生かしたまま毒性への反応としての遺伝子発現を見れる可能性が示唆された。





| | Total fragments ② | Matched fragments ② |
|---|-------------------|---------------------|
|  | 15324366 | 4139403 (27%) |
|  | 13757443 | 12414813 (90.2%) |
|  銅 | 16583187 | 6681382 (40.3%) |
|  銅 | 18982244 | 16711368 (88%) |

図 2 マッピングの結果

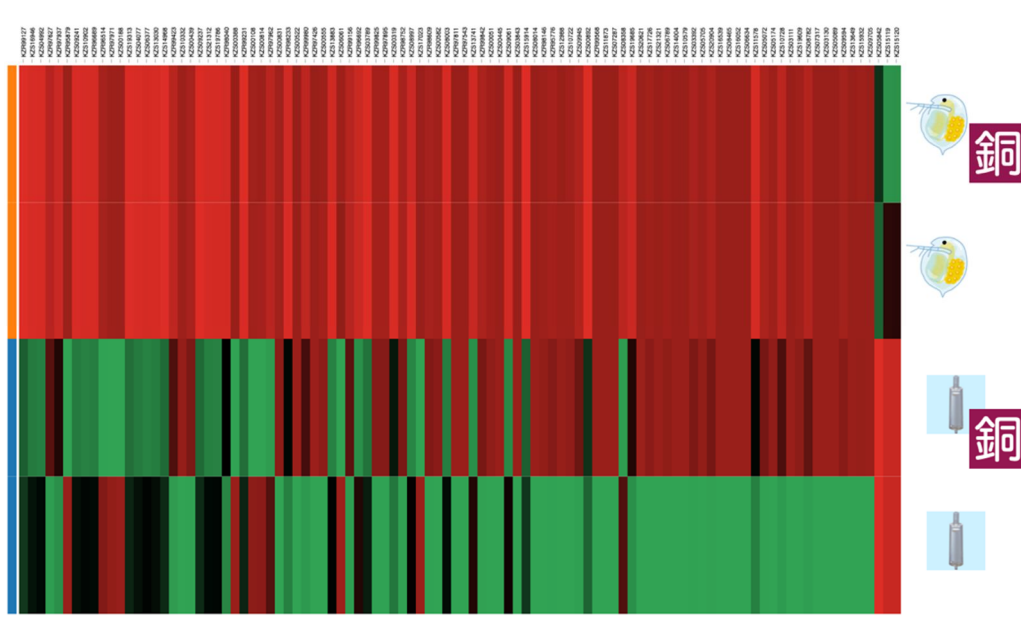


図 3 ヒートマップによる遺伝子発現類似度

従来の毒性学研究における mRNA の解析では、試験個体を分析に供するため、生きたまま連続的に関連遺伝子の発現量を追うことが不可能である。この問題を解決することができれば、現行の生態毒性試験で生物の生死や成長、増殖などの挙動を追うと同時に、関連遺伝子の発現量の変化をとらえることが可能となる。そこで、本研究では、水中において存在している“環境 RNA”を用いて、遺伝子発現を解析する革新的手法を開発した。この手法を確立することにより、これまで別々に行われていた遺伝子レベルでの影響評価と個体レベルでの評価を統合し、生物応答の継時的な変化をより正確に捉えることができるようになる。

以上のように、本研究が当初目的としていた研究成果を上げることができた。なお、本報告書公開までに発表できていない結果については逐次学術論文として発表・公開する予定である。本研究で萌芽的に開発できた手法をさらに応用すべく、今後も環境 RNA による毒性試験、さらにはその野外や飼育環境への応用を検討する研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Uchii Kimiko, Doi Hideyuki, Okahashi Teruyuki, Katano Izumi, Yamanaka Hiroki, Sakata Masayuki K., Minamoto Toshifumi | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 Comparison of inhibition resistance among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Environmental DNA | 6. 最初と最後の頁 359 ~ 367 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.37 | 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 - |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Tsuji Satsuki, Takahara Teruhiko, Doi Hideyuki, Shibata Naoki, Yamanaka Hiroki | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis?A review of methods for collection, extraction, and detection | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Environmental DNA | 6. 最初と最後の頁 99 ~ 108 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.21 | 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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 | 坂本 正樹 (Sakamoto Masaki) (20580070) | 富山県立大学・工学部・准教授 (23201) | |

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 |
|---------|---------|