

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04139

研究課題名(和文) 環境化学物質曝露の影響を次世代に伝える精子 small RNA の解明

研究課題名(英文) Identification of sperm small RNAs involved in multigenerational health effects of environmental chemicals

研究代表者

野原 恵子 (NOHARA, Keiko)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・フェロー

研究者番号：50160271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期に無機ヒ素曝露を受けたC3Hマウス雄(F1)の子(F2)で肝腫瘍が増加するという実験系において、次世代影響への関与が報告されているF1精子のsmall RNAの解析を行った。small RNA seqデータ解析用パイプラインの構築と次世代シーケンシングによるsmall RNA解析、およびmiRNAのマイクロアレイ解析を実施した。その結果、ヒ素群F1精子においてsmall RNA中含量が変化するpiRNA、tRNAフラグメント、miRNAを明らかにした。これらの変化は、精子のレトロトランスポゾン抑制の阻害や、精子または受精卵の発生への影響を示唆し、次世代影響につながる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境因子の世代を越えた健康影響が懸念されているが、その悪影響を防止するためにはメカニズムを含めた現象の理解が不可欠である。胎児期曝露の影響が次世代に受け継がれるメカニズムとして、近年精子のsmall RNAの関与が報告され、今後の課題となっている。本研究ではヒ素の胎児期曝露が精子small RNAに及ぼす影響の全体像を次世代シーケンシング法やマイクロアレイ法で示し、メカニズムの一端を明らかにした。このような研究を積みかさねて各種の環境因子の影響を把握することによって、現在の環境による次世代・継世代におよぶ悪影響の防止が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have reported involvement of sperm small RNAs in paternal transmission of environmental impacts to the later generations. We investigated small RNA changes of mice (F1) gestationally exposed to arsenic in the model where the F2 mice show higher hepatic tumor incidence. We have developed a pipeline for analyzing small RNAs and performed next-generation sequencing (small RNA seq) for F1 sperm RNAs to detect changes induced by gestational arsenic exposure. miRNAs were also investigated by a microarray method. We have identified changes in small RNAs including piRNAs, tRNA fragments and miRNAs in the sperm of arsenic exposed F1 mice. The results suggested adverse effects through small RNA changes on the retrotransposon activities and development of sperm/gametes, which potentially leads to next generation effects.

研究分野：衛生学

キーワード：次世代影響 精子 small RNA seq 無機ヒ素 妊娠期曝露 piRNA miRNA tRNA fragment

1. 研究開始当初の背景

環境化学物質の健康影響については、高感受性期である胎児期の曝露による、すぐには顕在化しない影響への懸念が増加している。特に、次世代やそれ以降の世代まで悪影響が及ぶ可能性が指摘されているが(Perera & Herbstman,2011)、その詳細はまだほとんど不明である。

化学物質の次世代影響については、特に動物実験で雄親から子に影響が伝わる例が多く報告され、精子ゲノムの DNA メチル化と精子中わずかに残るヒストンへの修飾の2つのエピジェネティック修飾が関与するメカニズムが示唆されていた。その他のエピジェネティック因子として、最近精子中にごく少量保持されている small RNA 中の micro RNA(miRNA)や tRNA フラグメント(tRF)が受精の際に精子から卵に持ち込まれ、受精卵に雄親が獲得した形質を伝えるという全く新しいメカニズムが報告された(Gap et al. 2014, Chen et al. 2016, Sharma et al. 2016 他)。

申請者らは、雄が肝腫瘍を発症しやすい系統である C3H マウスにおいて、母親(F0)の妊娠中に環境化学物質である無機ヒ素を飲水投与すると、雄の仔(F1)を介して孫世代(F2)の雄で肝腫瘍が増加することを明らかにした (Nohara et al. 2016)。すなわち F1精子が F2 にヒ素曝露の影響を伝えることが示唆され、この現象にヒ素群 F1 精子のエピジェネティック変化が関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

成熟後の精子は完全な長さの ribosomal RNA (rRNA)をほとんど含まず、1精子中に数~数十 fg 程度と微量の small RNA を含むことが報告されている。本研究では、マウス精子から精製 RNA を得、胎児期ヒ素曝露を受けた F1 精子で存在量が変化する small RNA を明らかにすることによって、無機ヒ素曝露の影響が精子を介して次の世代に伝わる新規分子メカニズムの一端を解明することを目指した。

3. 研究の方法

3 - 1) 対照群および妊娠期ヒ素曝露群 F1 精子の採取と RNA 精製

妊娠 8 日から 18 日に無機ヒ素 (亜ヒ酸ナトリウム 85ppm) を含む水を自由摂取した C3H マウス雌から生まれたヒ素群 F1 雄、および通常の水を摂取した雌から生まれた対照群 F1 雄 (17-19 週令) の精巣上体尾部より精子を採取した。精子をミネラルオイル中に作った HTF 培地の液滴中でインキュベートして液滴壁面で動いている精子を採取し、体細胞リシスバッファー処理 (Sharma U et al. Science 2016) によって体細胞をのぞき、精製精子を得た。miRNeasy mini (Qiagen) を用いて RNA を調製し、miRNeasy micro (Qiagen) で濃縮した。独立に 2 回実験を行い、各群 3-6 匹または 7-9 匹の精子をあわせて RNA 1 サンプルを調製した。

3 - 2) Small RNA seq データ解析用パイプラインの構築と評価

Small RNA-seq データを包括的に解析できる SPORTS1.1 ソフトウェアパッケージ (<https://github.com/junchaoshi/sports1.1>; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29730207/>) を所属機関のデータ解析用 PC クラスタに導入し、既知 miRNA 定量解析・新規 miRNA 探索・GENCODE アノテーションを利用した miRNA 以外の small RNA の分類、および PC クラスタ上での計算処理による多検体一括解析を可能とした。マウス 9.5 日胚および胎盤由来 RNA から small RNA-seq 用ライブラリーの調製、シーケンスを行い、このデータを用いて構築したパイプラインの

評価を行った。

3 - 3) F1 精子 small RNA-seq 解析

精子 RNA 各群 3 サンプルについて、5'および 3'末端へのアダプター付加、逆転写、PCR 増幅、size selection によって small RNA-seq 用ライブラリーを調製し、次世代シーケンサー(illumina MiSeq/HiSeq2500)で 50bp single read でのシーケンスを行った。データの clean up 後、解析用パイプラインを用いて、piRNA、tRNA フラグメント (tRF) または miRNA とアノテーションが付加されたリード、およびそれぞれの small RNA についてのデータベースである piRNadb、GtRNadb および miRBase に収録された配列のリードをカウントした。

3 - 4) F1 精子 piRNA 解析

small RNA-seq 解析で piRNA とアノテーションされた配列について、対照群 3 サンプル、ヒ素群 3 サンプルの計 6 サンプルに共通に検出された配列を選び、piRNA の総リード数に対する RPM (read per million) 値を算出した。対照群とヒ素群で Student t-test で有意差(P<0.05)のあるものを変化した piRNA とした。

3 - 5) F1 精子 tRF 解析

small RNA-seq 解析で tRF とアノテーションされた配列について、対照群 3 サンプル、ヒ素群 3 サンプルの計 6 サンプルに共通に検出された配列を選び、tRF の総リード数に対する RPM 値を算出した。対照群とヒ素群で Student t-test で有意差(P<0.05)があるものを変化した tRF とした。

3 - 6) F1 精子の miRNA マイクロアレイ解析

精子 RNA 各群 5 サンプルについて、フィルジェン株式会社にて GeneChip miRNA 4.0 Array (Affymetrix)を用いてマイクロアレイ解析を実施した。ヒ素群と対照群で Normalized expression value で有意差 (Student t-test, p<0.05)があるものを変化した miRNA とした。マイクロアレイの結果の検証には、RNA を Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Clontech)で逆転写し、Mir-X miRNA qRT-PCR Green Kit (Clontech) を使って real-time PCR を行った。

4 . 研究成果

4 - 1) Small RNA seq データ解析用パイプラインの構築と評価

マウス 9.5 日胚 (9.5E) および胎盤 (9.5P) 由来 RNA から small RNA-seq 用ライブラリーの調製、シーケンスを行い、SPORTS1.1 による smallRNA アノテーションを試行した。9.5E サンプルからは 353,441 リード(635 種類)、9.5P サンプルからは 620,971 リード (764 種類) の miRNA が検出できた。マウス胎盤での高レベル発現が報告されている mmu-mir-322 などマーカー miRNA の挙動などより、SPORTS1.1 により miRNA を含む複数の smallRNA カテゴリー(rRNA, tRNA, RNY, piRNA など) の発現レベル定量とアノテーションが可能であると判断した。

4 - 2) F1 精子 small RNA-seq 解析

対照群およびヒ素群F1から精子を採取し体細胞リシスを行って体細胞を除いた後RNA調製を行い、リボソームRNAの混入のないRNA画分を得ることができた。各群3サンプルについて small RNA seqライブラリーを作製してシーケンスを行い、解析パイプラインで解析した。

6サンプルについてそれぞれ約1500万readsを取得し、アダプターとQ-value < 20のリードを除き、更に15bp未満の配列・46bp以上の配列を除いてclean reads 1316万~854万を得、small RNA アノテーションパイプラインであるSPORTS1.1を用いてアノテーションを付した。piRNA、tRF

またはmiRNAとアノテーションが付加されたリードを、各サンプルそれぞれ約126万~250万、132万~251万、および32,000~69,000 reads取得した。さらに各small RNAのデータベースと照合し、それぞれ一致したリード、piRNAdb-piRNA 34万~55万、GtRNAdb-tRNA 129万~241万、miRBase-miRNA 32,000~68,000 reads を取得した。これらのデータをもとに以下のpiRNAおよびtRFの解析を行った。

4 - 3) 妊娠期ヒ素曝露によって F1 精子で存在量が変化する piRNA の small RNA seq 解析

piRNA database に収録された piRNA について、piRNA とアノテーションされた総リード数に対する RPM (read per million) 値を算出し、一般的な piRNA の塩基長である 23~31 塩基の piRNA の中で対照群とヒ素群で有意差のあるものを検索した。その結果、ヒ素群で減少するものが多数あることがわかった。一方または両方で RPM 値の平均値 > 20 と存在量が多いものでは、ヒ素群で増加したものが 3、減少したものが 27 種類であった。

piRNA の生成経路として、プライマリ 経路によるものは主として T から始まるが(泉、泊 2018)、今回変化した 30 種類中最初の塩基が T である piRNA は 25 個(83%)で、すでに報告されているマウス精巢の piRNA と同程度であった。特にヒ素群で発現が低下する piRNA 27 種類のうち 26 種類で 1 番目の塩基は T であった。またレトロトランスポゾン由来でピンポン経路によって生成され、レトロトランスポゾンの DNA メチル化に関与する piRNA は 10A バイアスが報告されている。本研究では 10 番目の塩基が A である piRNA は 30 種類中 6 種類(20%)で、いずれもヒ素群で減少する piRNA だった。

piRNA は 2 番目から 21 番目の塩基と相補的な配列をもつトランスポゾン RNA を切断する(Reuter et al. 2011)。そこで特に転移活性をもつレトロトランスポゾン LINE の L1MdA, L1MdT, L1MdG サブファミリーと LTR の IAP サブファミリーの配列と、今回変化した 30 種類の piRNA の 2 - 21 番目の塩基との相補性を検討したところ、piRNA の 1 種類のみが 637 種類のレトロトランスポゾン IAPez-int に含まれる配列と相補性を示した。

以上の解析より、妊娠期無機ヒ素曝露を受けた仔の精子において存在量が減少する piRNA が多種類見つかったことから、妊娠期のヒ素曝露が F1 精子の piRNA を減少させレトロトランスポゾン抑制を阻害する方向に関与する可能性が示唆された。

4 - 4) 妊娠期ヒ素曝露によって F1 精子で存在量が変化する tRNA フラグメント(tRF) の small RNA seq による解析

GtRNAdb に収録された tRF が 3567 検出され、127(96 が増加、31 が減少)が有意に変化していた。このうち、tRF の総リード数に対する RPM 値がいずれかの群または両方の群で 10 以上のものは 44(33 が増加、11 が減少)だった。検出された tRF のほとんどは機能が未解明であるが、機能が報告されている tRF として、特にヒストン H3K9 メチル化促進に関わる tRNA-Glu-CTC_5_end が低下していた。このことから tRNA-Glu-CTC_5_end の低下を介したヒストン H3K9 のメチル化低下によってレトロトランスポゾンの発現が増加する可能性が見出された。

4 - 5) 妊娠期ヒ素曝露によって F1 精子で存在量が変化する miRNA のマイクロアレイ解析

4 - 5 - 1 : マイクロアレイ解析

対照群とヒ素群各 3 サンプルについて Small RNA seq で取得された miRNA は read 数が少なく、各サンプルの RPM 値のばらつきが大きかった。そこで miRNA については対照群とヒ素群各 5 サンプルをマイクロアレイで解析した。

Normalized expression value で 2 群間に有意差があるものが 34 個、その中ですべてのプローブの判定が true、両方またはいずれかの群の平均値が 20 以上、平均値の差が 1.2 倍以上のものを選抜すると、miR-34c-5p および miR-8101 の 2 種類がヒ素群で低下するのが検出された。

4 - 5 - 2 : real-time PCR による検証

miR-34c-5p および miR-8101 の発現量を real-time PCR で検証するためにプライマーと測定条件を検討した。miR-34c-5p については良好な PCR ピークが得られたが、miR-8101 に関しては単一の PCR ピークが得られる条件が確立できず、PCR による検証ができなかった。

次に real-time PCR で normalization を行う際の内部標準を検討した。ヒトの精子の miRNA の定量にはこれまで snoRNA U6 を用いている例が多かったが、U6 はばらつきが大きく不適切という研究が最近報告された(Corral-Vazquez et al. 2017)。そこで、マイクロアレイ解析で対照群とヒ素群各 5 サンプルの normalize 後の発現量の平均値がいずれか/両方の群で 1000 以上、両群の平均値の比が 1.2 倍以内のものを内部標準の候補とした。その条件を満たす miRNA 18 種類についてプライマーを作製して real-time PCR を行った結果、3 種類で良好なピークが得られた。

それらの miRNA の発現量を平均したものを内部標準として、対照群とヒ素群のマウス精子 RNA 各 3 サンプルについて miR-34c-5p の測定を行ったところ、マイクロアレイの結果と良く一致した結果が得られた。

精子の miRNA が受精卵に持ち込まれて機能することが報告されているが、miR-34c はマウスの精子形成 (Comazetto et al. 2014、Wang et al. 2018) や、受精卵において第一分割に必要なこと (Liu et al. 2012) が報告されている。ヒ素群精子において miR-34c-5p が減少することによって、精子形成や次世代の受精卵の発達に影響が及ぶ可能性が示された。

4 - 6) まとめ

対照群および妊娠期ヒ素曝露群マウスの F1 精子より精製 RNA を得、Small RNA seq データ解析用パイプラインの構築と small RNA seq 解析およびマイクロアレイ解析を実施した。筆者らは同一の曝露モデルで、妊娠期ヒ素曝露によって F1 精子のレトロトランスポソンの転写調節領域において低メチル化 CpG が増加するという影響を見いだしている (論文投稿中)。レトロトランスポソンの低メチル化は転移活性の増加などにつながり、精子や受精後の配偶子の分化や発生に悪影響を及ぼすことが報告されている。一方本研究において、妊娠期ヒ素曝露が F1 精子において、レトロトランスポソンの抑制に働く piRNA の組成を変化させることを見いだした。主としてプライマリー経路で生成される piRNA の減少が検出され、妊娠期ヒ素曝露が F1 精子のレトロトランスポソンの抑制を阻害する可能性が示唆された。また tRF 解析ではヒストン H3K9 のメチル化に関与する分子種の減少、miRNA については精子または受精卵の発生に関与する分子種の減少が検出された。本研究の結果は、これらの small RNA の変化が DNA メチル化やヒストン修飾とともに精子を介して次世代に影響をもたらす可能性を明らかにした。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Barouki R, Melen;n E, Herceg Z, Beckers J, Chen J, Karagas M, Puga A, Xia Y, Chadwick L, Yan W, Audouze K, Slama R, Heindel J, Grandjean P, Kawamoto T, Nohara K.	4. 巻 114
2. 論文標題 Epigenetics as a mechanism linking developmental exposures to long-term toxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environ Int	6. 最初と最後の頁 77-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envint.2018.02.014	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野原恵子
2. 発表標題 妊娠期化学物質曝露の多世代影響
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野原恵子
2. 発表標題 妊娠期無機ヒ素曝露の多世代影響とエピジェネティクス
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野原恵子、岡村和幸、鈴木武博、中林一彦、秦健一郎
2. 発表標題 妊娠期無機ヒ素曝露による孫世代（F2）の肝腫瘍増加に關与する仔世代（F1）精子のエピゲノム変化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野原恵子,岡村和幸,鈴木武博
2. 発表標題 妊娠期ヒ素曝露による多世代影響の伝搬とフェノタイプ発現のメカニズムの探索
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野原恵子
2. 発表標題 妊娠期化学物質曝露の多世代影響
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野原恵子
2. 発表標題 妊娠期無機ヒ素曝露の多世代影響とエピジェネティクス
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野原恵子,岡村和幸,鈴木武博,中林一彦,秦健一郎
2. 発表標題 妊娠期無機ヒ素曝露による孫世代(F2)の肝腫瘍増加に關与する仔世代(F1)精子のエピゲノム変化
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野原恵子
2. 発表標題 無機ヒ素の妊娠期曝露が仔の精子エピゲノム変化を介して次世代に影響を伝えるメカニズムの探索
3. 学会等名 日本毒性学会生体金属部会主催メタルバイオサイエンス研究会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木武博, 野原恵子
2. 発表標題 妊娠期ヒ素曝露によるマウス精巣でのエピジェネティック変化の検討
3. 学会等名 日本毒性学会生体金属部会主催メタルバイオサイエンス研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木武博, 岡村和幸, 野原恵子
2. 発表標題 妊娠期ヒ素曝露を受けたF1精子由来のF2初期胚における遺伝子発現変化の検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡村和幸, 中林一彦, 石渡啓介, 鈴木武博, 秦健一郎, 野原恵子
2. 発表標題 Small RNA sequencingを用いた 妊娠期無機ヒ素曝露による子世代精子で変化するtRNA fragmentsの探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Nohara
2. 発表標題 Epigenetics and Environment
3. 学会等名 47th Myanmar Health Research Congress (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Udagawa O, Okamura K, Suzuki T, Nohara K	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 14
3. 書名 Chapter 3. Arsenic Exposure and Reproductive Toxicity. In: Yamauchi H, Sun G editors. Arsenic contamination in Asia.	

〔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	秦 健一郎 (Hata Kenichiro) (60360335)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・部長 (82612)	
研究協力者	松下 隼也 (Matsushita Junya)		
研究協力者	石渡 啓介 (Ishiwata Keisuke)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	近藤 直登 (Kondo Naoto)		
連携研究者	中林 一彦 (Nakabayashi Kazuhiko) (10415557)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・室長 (82612)	
連携研究者	鈴木 武博 (Suzuki Takehiro) (60425494)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員 (82101)	
連携研究者	岡村 和幸 (Okamura Kazuyuki) (50736064)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員 (82101)	
連携研究者	宇田川 理 (Udagawa Osamu) (50738466)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員 (82101)	
連携研究者	古山 昭子 (Furuyama Akiko) (20177661)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・室長 (82101)	