

# オオミジンコ 3 系統の網羅的遺伝子発現の系統差に基づく DNA メチル化の評価および環境汚染化学物質への感受性比較

2022 年 3 月 自然環境循環学講座 4720-6606 加藤晃汰  
指導教員 山本裕史 教授

キーワード: 遺伝子発現解析, Gene Ontology enrichment 解析, DNA メチル化, 系統間の感受性差, キチン合成阻害剤

## 1. はじめに

北米などを原産とする甲殻類枝角目のオオミジンコ (*Daphnia magna*) は、一次消費者モデルとして化学物質の生態影響評価に頻繁に使用される。オオミジンコには様々な系統が存在し、化学物質に対する感受性が異なる。しかし、生態影響評価に用いられる急性遊泳阻害試験 (OECD TG202) 等の試験法では系統に指定がないため、系統の違いによって、同じ物質の生態影響評価結果が大きく異なる可能性が懸念される。感受性の系統差を引き起こす生物学的な要因の 1 つに、遺伝的な相違の影響がある。*Daphnia* 属の系統間には、ゲノム変異や発現制御機構である DNA メチル化に差があり、これらの差は遺伝子発現量の変化として現れることで感受性に影響すると考えられている。ある特定の化学物質に対する系統間の感受性差の原因が、その物質の作用に関連する遺伝子発現量の差であることを示唆する研究 (Lyu et al., 2019) もある。系統間の感受性差が特定の遺伝子の発現量の差によって引き起こされているのであれば、系統間で発現量の異なる遺伝子を特定することで、その遺伝子と関連性の高い化学物質に対する感受性の系統差を把握できるのではないかと考えた。

そこで本研究では、オオミジンコの網羅的遺伝子発現解析による系統比較に基づき、①各系統の遺伝子発現量の違いに発現制御機構である DNA メチル化が関与していないか、②感受性に系統差を引き起こす環境汚染化学物質を事前に把握できないか検証した。

## 2. 実験方法

オオミジンコの対象系統は、幼若ホルモン類似物質や金属類への感受性差が判明している NIES 系統, England 系統, Clone 5 系統の 3 系統とした (Oda et al., 2007)。まず、個体の遺伝子発現量を網羅的に調べる手法である RNA-sequencing (RNA-seq) を 3 系統に実施し、系統間で発現量が異なる遺伝子群 (DEGs: Differentially Expressed Genes) を抽出した。次に、3 系統間の DEGs を対象にした階層クラスター解析で発現傾向の違いがより顕著な 2 系統を選び、以下 2 項目の実験を実施した。項目①の DNA メチル化影響を評価するため、DEGs の中で塩基配列中に CpG 領域 (シトシンとグアニン含有率 50% 以上の 200 bp 以上の配列) を含む遺伝子を対象に DNA メチル化阻害剤による遺伝子発現量の上昇を検証した。項目②の感受性に系統差を引き起こす化学物質を探索するため、まず、2 系統間の DEGs の生体機能の特徴を Gene Ontology enrichment 解析 (GO 解析) により推定した。次に推定された機能に関連する活性等を各系統で測定し、GO 解析結果を検証した。最後にその機能を阻害する化学物質を用いて急性遊泳阻害試験を実施し、48 時間後の半数遊泳阻害濃度 (48 h-EC<sub>50</sub>) を用いて各系統の感受性を比較した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 3系統の遺伝子発現解析結果:比較2系統の選定

RNA-seq から得た 3 系統間の DEGs の階層クラスター解析から, 3 系統の中で NIES 系統と England 系統の遺伝子発現傾向が大きく異なっていることが分かった。そのため, 以降の実験はこの 2 系統に絞って行った。

#### 3.2 系統間の遺伝子発現量の差への DNA メチル化影響

NIES 系統と England 系統間の発現量の差が 10 倍以上の DEGs の中で CpG 領域を含む 10 遺伝子を抽出した。ミジンコを DNA メチル化阻害剤 5-アザシチジンに曝露し, 脱メチル化により遺伝子発現制御が外れ, 発現量が上昇するか定量 PCR で検証したところ, いずれの遺伝子においても発現量の有意な上昇は認められなかった。よって, 今回対象とした 10 遺伝子は DNA メチル化の影響を受けている可能性は低いと考えられる。

#### 3.3 急性遊泳阻害試験を用いた 3 系統のキチン合成阻害剤に対する感受性比較

NIES 系統では, 外殻の主成分であるキチンの合成酵素遺伝子 (*chitin synthase CHS-2-like transcript variant X2*) の発現量が高く, NIES 系統と England 系統間の DEGs を対象にした GO 解析からもキチン合成・代謝に関する機能が有意に高いと推定された。GO 解析結果と一致してキチン含有量は NIES 系統で有意に高かった。NIES 系統ではキチン含有量が多いため, キチン含有量の低下から不完全脱皮や致死作用を引き起こすキチン合成阻害剤に対する感受性が低くなると予測される。そこで, 2 種類のキチン合成阻害剤 (ジフルベンズロンとテフルベンズロン) を用いて急性遊泳阻害試験を実施した (図)。その結果, ジフルベンズロンでは, NIES 系統と England 系統間で 14 倍 (3 試験の平均 EC<sub>50</sub> から算出) という大きな感受性差が確認され, テフルベンズロンでも 2 倍程度の感受性差が確認された。どちらのキチン合成阻害剤でもキチン含有量の多い NIES 系統で感受性が低いため, これらの感受性差はキチン含有量の違いに起因すると考えられた。

以上から, 遺伝子の機能阻害から遊泳阻害に至る経路が明らかにされていて, なおかつ, キチン合成阻害剤のように, 化学物質の詳細な作用機序が判明している場合に, 本研究で示した遺伝子発現量の系統差に基づく感受性差の予測手法が適用できる可能性が示された (Kato et al., 2022)。

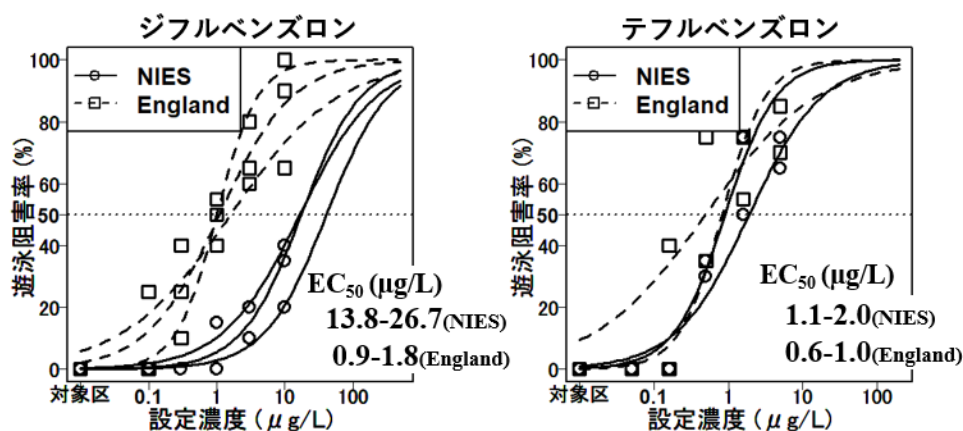


図. NIES 系統と England 系統を対象としたキチン合成阻害剤 2 種の急性遊泳阻害試験結果  
引用文献

Lyu, K., et al., (2019) *Limnol Oceanogr*, 64 (1), 272–283; Oda, S. et al. (2007) *Ecotoxicol Environ Safe*, 67 (3), 399–405; Kato et al. (2022), *Aquatic Toxicol.* 243 106071.

# Evaluation of the DNA methylation and sensitivity comparison of environmental contaminants based on different gene expression profiles of three *Daphnia magna* strains

Mar. 2022 Material Cycling in the Environment 47-206606 Kota Kato  
Supervisor Professor, Hiroshi Yamamoto

Keyword: chitin synthesis inhibitor, DNA methylation, gene expression analysis, Gene Ontology enrichment analysis, sensitivity difference among strains

## I. Introduction

*Daphnia magna* Straus (*D. magna*), a species of Crustacea: Cladocera native to North America, is commonly used as a model primary consumer for ecotoxicity testing to assess ecological effects of chemicals. The standardized ecotoxicity test methods using *D. magna* such as OECD Test Guideline No. 202 do not specify recommended strains, which could cause the different results of ecological effect assessment for the same chemical depending on the strain used for the test. In the case of *Daphnia* sp., strain differences in genetic alteration and DNA methylation were found to change gene expression levels, which cause changes in sensitivities to chemicals. For example, previous studies indicated that strain difference in sensitivity to a certain chemical could be caused by differences in gene expression levels related to the chemical's mode of action (Lyu et al., 2018, Limnol. Oceanogr., 64(1), 272-283). I hypothesized that I could specify chemicals which cause sensitivity difference among strains by specifying differentially expressed genes among strains.

Based on comparison of gene expression profiles of *D. magna* strains, I verified two hypotheses. (1) Possibility of DNA methylation to cause strain differences in gene expression; (2) Possibility of specification of environmental contaminants to cause sensitivity difference among strains.

## II. Material and Methods

Three strains (NIES, England, and Clone 5) of *D.f magna* were selected. There were sensitivity differences among these three strains to juvenile hormone analogs or metals (Oda et al., 2007, Ecotoxicol. Environ. Safe, 67(3), 399-405). First, RNA-sequencing (RNA-seq), which measures comprehensive gene expression, was performed on the three strains, and differentially expressed genes (DEGs) of which expression levels differ among the strains were identified. Next, we selected two strains that showed greatest differences in expression levels by hierarchical cluster analysis for the two experiments as follows (1) To evaluate the effect of DNA methylation, the up-regulation of DEGs containing CpG regions (200 base pair sequences with more than 50% of CG content) was verified by the exposure to a DNA methylation inhibitor. (2) To specify chemicals that cause strain differences in sensitivity, the characteristics of biological functions of the DEGs was estimated by Gene Ontology enrichment analysis (GO analysis). Then, the result of GO analysis was verified by

determining activities related to the estimated functions in the two strains. Finally, acute immobilization test was performed with chemicals that inhibit the function, and the sensitivity was compared by 48 h-50% effect concentration (48 h-EC<sub>50</sub>).

### III Results and Discussion

#### 1. Comparison of gene expression profiles of three strains: selection of two strains

Hierarchical cluster analysis of DEGs obtained from RNA-seq among three strains showed that the greatest difference in expression levels was observed between the NIES and England strains. Thus, subsequent focus was on comparisons between the NIES and England strains.

#### 2. DNA methylation effect on strain difference in gene expression

Ten genes with CpG regions were selected from DEGs between the two strains. Quantitative PCR was performed to verify up-regulation of these genes caused by exposing daphnids to a DNA methyltransferase inhibitor, 5-azacytizine. Since no significant up-regulation of selected ten genes were observed, these genes expression may not be affected by DNA methylation.

#### 3. Comparison of sensitivities to the chitin synthesis inhibitor among three strains

The NIES strain showed significantly higher gene expression levels of *chitin synthase* (*chitin synthase* CHS-2-like transcript variant X2) and higher function related to chitin synthesis and metabolism was suggested by the GO analysis. Also, consistent with the result of GO analysis, chitin content in the NIES strain was significantly higher than that in England strain. I hypothesized that the NIES strain is probably less sensitive to chitin synthesis inhibitors, which decrease chitin content to induce molting inhibition, due to the relatively high chitin content. Thus, two chitin synthesis inhibitors (diflubenzuron and teflubenzuron) were examined by acute immobilization test. There was a significant difference in 48 h-EC<sub>50</sub> for diflubenzuron with 14-fold, and a 2-fold difference was also observed for teflubenzuron between the NIES and England strains (Figure). As the NIES strain was less sensitive to both chemicals, these strain differences could be attributed to the difference in chitin content.

Our results indicated that the possibility of predicting sensitivity difference in strains, based on the gene expression profiles of *D. magna* strains, if the pathway from the inhibition of gene's function to immobilization is revealed and the detailed mechanism of action of the chemical substance are known, as in the case of chitin synthesis inhibitors (Kato et al., 2022, Aquatic Toxicol. 243106071).

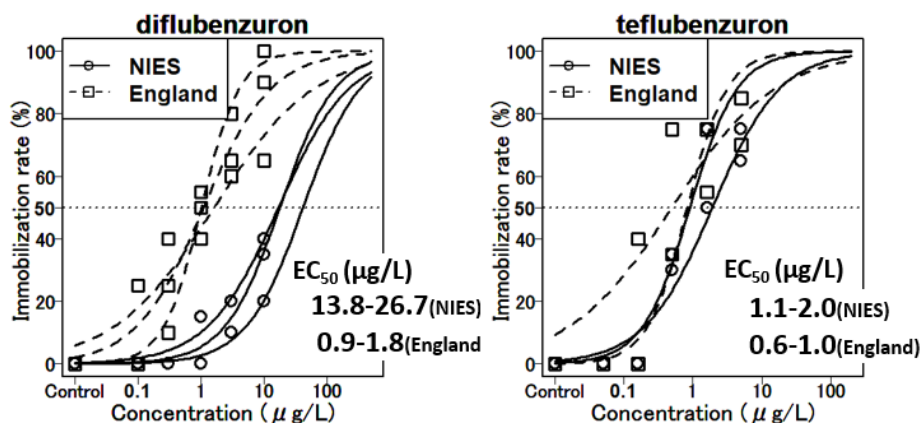


Figure. The results of acute immobilization test of two chitin synthesis inhibitors