

第 63 回日本生態学会大会 に参加して

垣 見 直 希

Naoki KAKIMI

環境ソリューション工学専攻修士課程 2年

1. はじめに

私は 2016 年 3 月 20 日から 24 日に仙台国際センターで開催された、第 63 回日本生態学会大会に参加し、「魚類からの環境 RNA 放出速度と温度依存性」という題目でポスター発表をおこなった。

2. 研究内容

2.1 背景

近年、環境水中に含まれる生物由来の DNA 断片（環境 DNA）を分析することで水棲生物の在／不在の判定（Ficetola *et al.* 2008；Miya *et al.* 2015）や生物量を推定（Takahara *et al.* 2012；Thomsen *et al.* 2012）する環境 DNA 分析の開発が進んでいる。しかし、環境 DNA では資源管理における重要な指標となる代謝や産卵、ストレスなどの生物の状態を推定することは不可能である。ここで、本研究では RNA に着目した。RNA は生物の活動によって発現量に変化する（Murakami *et al.* 1994）ことから、環境水中に含まれる生物由来の RNA（環境 RNA）を環境 DNA と同様に環境水中から回収することで、環境 DNA 分析では困難であった生物の状態を推定できる情報が得られると考えられる。しかし、RNA は分解速度が速いため環境水中からの回収は困難であると考えられており、環境 RNA の温度依存性や環境水中での放出や減少といった基礎的知見がない。このことから、本研究では環境 RNA の温度依存性と放出速度を解明することを目的として実験をおこなった。

2.2 方法

対象種は環境 DNA の先行研究（Takahara *et al.*

2012；Doi *et al.* 2015）が多いコイ（*Cyprinus carpio* L.）とした。実験では供試魚 3 個体を試験用水槽（60×30×36 cm：約 57 L、7-19 時の 12 時間明期）で 5 日間馴化した。温度依存性を検証するために水温は 20℃（n=4）と 30℃（n=3）の条件下で実験をおこなった。

馴化後各水槽から飼育水を 4 L を採水し、採水後に飼育水と同様の温度でインキュベートした。試料水は採水直後および 3、6、12、24 時間経過ごとに RNA 用サンプルとして 300 mL、DNA 用サンプルとして 150 mL を GF/F フィルター（1825-047, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK）で濾過した。

濾過後のフィルターは RNAlater（AM 7021, Ambion, Foster City, CA, USA）で RNA 用サンプルを抽出まで保存し、NucleoSpin RNA Plus（740984.50, Macherey-Nagel, Düren, German）で RNA を抽出、精製をおこなった。その後 PrimeScript™ RT reagent Kit（Perfect Real Time）（RR 047 A, タカラバイオ（株）、大津市、日本）を用いて相補的 DNA（cDNA）を合成した。

DNA 用サンプルは -20℃ で保存し、DNeasy Blood & tissue kit（cat. no.69504, Qiagen, Hilden, Germany）で DNA を抽出、精製をおこなった。

定量 PCR は、多種が混在する環境水中から対象生物の mRNA のみを特定するために、種特異的な配列をもつミトコンドリアのチトクロム *b* 領域を対象としておこなった。

遺伝子発現の解析では一般的に代謝やストレスなどで発現量に変化しないハウスキープ遺伝子を基準に解析をおこなうが、飼育水中からハウスキープ遺伝子を回収することができないため、水温で濃度に変化しない環境 DNA（Takahara *et al.* 2012）をハウスキープ遺伝子の代わりとして環境 RNA を cDNA 濃度／環境 DNA 濃度の環境核酸比で示した。温度依存性を検証するために水温間の環境核酸比を比較した。また、放出直後と 3、6、12、24 時間後の環境核酸比を比較し、環境 RNA の分解速度から放出速度の推定を試みた。

2.3 結果および考察

20℃ と 30℃ の間で採水直後の環境核酸比に差は見られなかった (Wilcoxon rank sum test, $p > 0.05$, *n.s.*). 今後は水温によって発現量が増減する遺伝子配列を選択することで、水温の影響を評価することが可能になると考えられる。また、塩基配列情報のデータベースが充実することで、環境 RNA による状態の推定が可能になると考えられる。

採水直後と各経過時間の間で環境核酸比に変化が見られなかった (Steel-Dwass test, $p > 0.05$, *n.s.*) ため、分解速度や放出速度の解析には至らなかった。

しかし、分解速度が速いと考えられていた環境 RNA が長時間環境水中に存在していることが明らかになった。放出後に比較的長い時間が経過しても環境 RNA は検出できたため、水試料のみから生物の生理的状态を推定できる可能性が高まったといえる。

3. おわりに

学会では発表を通して様々な意見を頂くことができました。また、来年も発表できるようにさらに研究に励みたいと思います。最後に、研究や学会発表に関して指導いただきました山中裕樹講師に深く感

謝いたします。

引用文献

- Doi, H, Uchii, K, Takahara T, Matsuhashi, S., Yamanaka, H., Minamoto, T., 2015. Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys, PLoS ONE, 10 : e0122763
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. Biol Lett 4 : 423-425.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Kondoh, M., 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes : detection of more than 230 subtropical marine species. R Soc Open Sci, 2(7), 150088.
- Murakami, T., Shimomura, Y., Fujitsuka, N., Nakai, N., Sugiyama, S., Ozawa, T., Suzuki, M., 1994. Enzymatic and genetic adaptation of soleus muscle mitochondria to physical training in rats. Am J Physiol, 30(3), E 388.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., Kawabata, Z., 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. PLoS ONE 7, e35868.
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M., Willerslev, E., 2012. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PLoS ONE, 7(8), e41732.