

## 日本陸水学会第 81 回大会 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 2016 年度修了

### 1. はじめに

私は 2016 年 11 月 3 日から 6 日に琉球大学で開催された日本陸水学会第 81 回大会（那覇大会）に参加し、「野外における魚類由来の環境 RNA 回収・定量の試み」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 はじめに

近年、環境水に含まれる DNA 断片を検知し生物種を特定する環境 DNA 分析が注目されている。環境 DNA 分析では生物の在／不在のモニタリング (Ficetola *et al.* 2008; Minamoto *et al.* 2012) や生物量の推定 (Takahara *et al.* 2012; Thomsen *et al.* 2012) が行なわれている。しかし、環境 DNA 分析では資源管理において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。生物の代謝や産卵状況などのモニタリング手法としておこなわれる捕獲や目視調査などでは広範囲を調査することは困難である。ここで、生物の代謝を反映することで知られる RNA (Palstra *et al.* 2010) に着目する。この RNA を環境 DNA と同様に環境水中から回収することで生物の活動を推定することが可能になると考えられる。しかし、RNA は分解されやすく環境水からの分析は困難であると考えられる。このことから、本研究は環境 RNA 分析手法を確立することを目的として、野外における環境 RNA の回収の試みと水槽による環境 RNA の持続性について検証した。

### 2.2 材料と方法

#### 2.2.1 野外実験

2014 年 4 月に琵琶湖の内湖の 1 つである伊庭内湖 (35° 11' N, 136° 08' E) で水試料の採取し、47-mm ガラス繊維濾紙 (GF/F, 孔径 0.7 μm; GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) で 500 mL の湖水を濾過し、環境 RNA 試料とした。環境 RNA 試料は濾過後、RNA<sub>later</sub> (AM 7021, Ambion, Foster City, CA, USA) に浸漬して抽出まで保存した。

環境 RNA 試料は RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (cat. no.74704, Qiagen, Hilden, Germany) で抽出し -80°C で逆転写反応まで保存した。環境 RNA の存在形態が不明であったことから、濾紙から RNA を抽出する過程で proteinase 処理の有無による収量の違いについて検討を行った。また、サンプリング地点間で環境 DNA および環境 RNA の存在量に違いがあるかを調べるため、2014 年 9 月に伊庭内湖において各 6 地点から試料水を採取し、それぞれ定量した。環境 RNA 試料は RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit を用いて抽出し -80°C で逆転写反応まで保存した。環境 DNA 試料は DNeasy Blood & Tissue Kit (cat. no.69504, Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出し、PCR まで -20°C で保存した。抽出した環境 RNA サンプルは PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (RR 047 A, タカラバイオ (株), 大津市, 日本) を用いて逆転写反応を行ない相補的 DNA (cDNA) を合成し PCR まで -20°C で保存した。環境 DNA および環境 RNA の定量はコイ (*Cyprinus carpio* L.) のミトコンドリア、チトクロム *b* 領域を対象とし、この領域を特異的に増幅できる既存のプライマープローブを使用した。定量 PCR は Step One-Plus™ Real-Time PCR (Life Technologies, City of Carlsbad, CA, USA) を用いて定量 PCR により定量した。

#### 2.2.2 環境 RNA の持続性の検証

対象種はコイとして、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。水温は 20°C (n=4) と 30°C (n

=3) として、馴化後各水槽から飼育水を4Lを採水した。採水後に飼育水と等温で濾過行程まで保存した。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300mL, DNAサンプルとして150mLをガラス繊維濾紙で濾過した。

濾過後はろ紙からRNAをNucleoSpin RNA Plus (740984.50, MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany)を用いて抽出を行ない、野外実験と同様にcDNAの合成を行なった。また、DNA用サンプルも野外実験と同様にDNAを抽出を行ない、定量PCRにより分析した。cDNA濃度は環境DNA濃度で補正してcDNA相対量の経時変化および水温間で比較した。

### 2.3 結果

野外実験より環境水から環境核酸を回収し、抽出、定量できることが確認された。環境RNAについてはproteinaseを添加した試料において、添加していない試料より10倍程度多く環境RNAを回収できた(Welch's *t*-test,  $p < 0.05$ )。湖内の6地点中、3地点で定量PCRの定量限界以上の環境RNAを回収でき、定量することができた。

環境RNAの持続性については採水後24時間後も採水直後と同様に環境RNAが検出された(Wilcoxon rank sum test,  $p > 0.05$ , *n.s.*)。また、採水直後のcDNA/DNA比に水温間で差は見られなかった(Steel-Dwass test,  $p > 0.05$ , *n.s.*)。

### 2.4 考察

本研究の結果から、分解速度が早く野外では回収が困難であると考えられていたRNAを環境水から

定量することが可能であることが明らかになった。また、proteinaseを用いた抽出方法が用いない場合に比べて格段に効率よく環境RNAを回収できることが示された。このことから、環境RNAは細胞や細胞小器官などの膜構造に含まれた状態で環境水中に存在していることが考えられる。また、環境RNAの持続性についても長時間水中に存在していることが明らかになったことから、環境RNAを用いて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。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

- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4: 423-425.
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 13: 193-197.
- Plastra AP, Tudorache C, Rovira M, Brittijn SA, Burgerhout E, Thillart GE, Spaink HP, Planas JV (2010) Establishing zebrafish as a novel exercise model: swimming economy, swimming-enhanced growth and muscle growth marker gene expression. *PLoS One*, 5(12), e14483.
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLOS ONE*, 7: e35868.
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MT, Orlando L, Willerslev E (2012) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21: 2565-2573.