

第 65 回日本生態学会大会 を終えて

池田 静也

Shizuya IKEDA

環境ソリューション工学科 2017 年度卒業

1. はじめに

2018 年 3 月 14 日～18 日、札幌コンベンションセンターにて開催された第 65 回日本生態学会大会に参加した。本大会において「環境 RNA 分析による遺伝子発現解析に向けた基礎技術の検討」という題目でポスター発表を行った。

2. 研究内容

2.1 はじめに

近年、環境水中の DNA (環境 DNA) を分析して簡便に水生生物を検出できる環境 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) が行われている。野外での調査が採水のみで済み、非常に簡便な手法であるという利点から、環境 DNA 分析は新たな調査ツールとして普及しつつある。しかし、環境 DNA 分析にはその由来 (Turner et al. 2014 a) や、生死を含めた生物の状態 (Merkes et al. 2014), そして放出後の時間 (Thomsen et al. 2012 b) が不明といった未解明の問題がある。これらの問題の解決は環境 DNA 分析が信頼に足る調査ツールとして普及する上で不可欠である。他方、特定の組織で生理状態に依存して発現し、かつ速い分解速度を示すメッセンジャー RNA (mRNA) を環境水から分析する環境 RNA 分析の進展は、これらの問題を解く手がかりを与えると考えられる。しかし、水生生物の環境 RNA 分析に関する研究報告例はごく限られている。そこで本研究では、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を対象とし、飼育水中から環境 RNA の検出を試みた。

2.2 方法

2.2.1 組織試料からの mRNA の検出

ゼブラフィッシュの *lhb*, *b2m*, *g6pd*, *tbp*, *mt-cyb* の mRNA 配列を特異的に増幅するプライマーセットを用いて、ゼブラフィッシュの組織試料 (脳, 表皮, 腸, 卵巣) からの mRNA の検出を試みた。RNA 抽出は、NucleoSpin RNA Plus (740984.50, MACHEREY-NAGEL, Germany), ISOSPIN Cell & Tissue RNA (314-08211, NIPPON GENE, 東京, 日本), RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (cat. No.74704, Qiagen, Hilden, Germany) を用いた。逆転写反応は PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (RR 047 A, TAKARA, Otsu, Japan) を用いた。また、gDNA のコンタミネーションを確認するために、逆転写酵素の代わりに RNase Free dH₂O を添加した逆転写ネガティブコントロールを作成した。試料は PCR 増幅まで 4°C で保存した。PCR 増幅は Step One-Plus™ Real-Time PCR (Life Technologies, City of Carlsbad, CA, USA) を用いた。電気泳動は 1.5% アガロースゲルを用いた。

2.2.2 飼育水からの環境 RNA の検出

ゼブラフィッシュの *lhb*, *b2m*, *smyhc2*, *clcn2c*, *mt-cyb* の mRNA 配列を特異的に増幅するプライマーセットを用いて、ゼブラフィッシュの飼育水からの環境 RNA の検出を試みた。飼育開始 4 日後のゼブラフィッシュの飼育水槽 (50 匹/54 L, n=3) から、ポアサイズ 0.45 μm のステリベクス (STERIVEX, cat. No.SVHV 010 RS, Merck, Germany) を用いて 0.5 L, 1 L, 1.5 L を採水、ろ過した。ブランク水槽からも同様に 1 L 採水、ろ過した。各試料に RNA-later (1.5 mL) を添加し、抽出まで -20°C で保存した。環境 RNA の抽出は NucleoSpin RNA Plus を用いた。ステリベクス中のろ液を遠心分離 (2000 G, 1 分) で破棄し、Buffer LBP (400 μL) を添加した。ROLLER 6 digital (IKA, Germany) 上で回転 (20 rpm) させながら室温で 5 分間インキュベートし、遠心分離 (2000 G, 2 分) でろ液を NucleoSpin gDNA Removal Column に移し、以降はキットのプ

ロトコルに従った。上記と同様に逆転写反応, PCR 増幅, 電気泳動を行った。タカラバイオ株式会社のプレミックスシーケンス解析を利用し, PCR 産物の配列決定を行った。

2.3 結果

全ての組織試料から, 対象遺伝子を検出することができた。また, 飼育水中から環境 RNA を検出できた。 *lhb* は全ての試料から検出できなかった。 *b2m* は全ての試料から検出できた。 *smyhc2* は採水量 1 L の試料からのみ検出できた。 *clcn2c* は採水量 0.5 L, 1 L の試料から検出できた。 *mt-cyb* は全ての試料から検出できた。全ての PCR 産物は配列決定され, 対象遺伝子であることが確認された。

2.4 考察

本研究の結果より, 魚類の環境 RNA を水中から検出できることが示された。また, 鰓での発現が豊富である *clcn2c* が水試料から検出されたことから, 環境 DNA や環境 RNA の由来の 1 つが鰓であることが示唆された。

3. おわりに

本大会で発表するにあたり, 龍谷大学山中裕樹講師, 神戸大学大学院源利文准教授をはじめ, 多くの

方々から助言を頂いた。此処に厚く感謝の意を申し上げる。

参考文献

- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4 : 423-425.
- Merkes CM, McCalla SG, Jensen NR, Gaikowski MP, Amberg JJ (2014) Persistence of DNA in carcasses, slime and avian feces may affect interpretation of environmental DNA data. *PLOS ONE*, 9 : e113346
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 13 : 193-197
- 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.
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M, Willerslev E (2012 b) Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE*, 7 : e41732
- Turner CR, Barnes MA, Xu CCY, Jones SE, Jerde CL, Lodge DM, Gilbert M (2014 a) Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5 : 676-684