

第 66 回日本生態学会に参加して

釣 健 司

Kenji TSURI

環境ソリューション工学専攻修士課程 1年

1. はじめに

私は 2019 年 3 月 15 日から 19 日に神戸国際会議場、及び神戸国際展示場で開催された、第 66 回日本生態学会大会に参加し、「環境 RNA 分析を用いた環境核酸の由来組織の推定」という題目でポスター発表を行った。

2. 発表内容

2.1 研究背景

近年、環境水中に含まれる核酸物質 (DNA 及び RNA) を回収、分析し、水生生物種の在不在や生物量を推定する環境 DNA 分析が注目されている。この分析手法は野外での調査が水の採取のみであり、迅速かつ簡便である点から新たな生態学的調査手法として普及しつつある。さらに、最近の研究で、環境水中の DNA と比較して分解速度が速いと考えられていた RNA が環境 DNA と同様に回収、分析できることが明らかになり、分析方法が確立されつつある。RNA のうち、メッセンジャー RNA (mRNA) は組織特異的な発現や、環境の変化にตอบสนองして発現するものが存在する。このような mRNA を環境水から検出できると水試料から生物の在不在の情報に加えて、生物の生理状態の推定など様々な情報を得られることが期待されるが、そもそも環境核酸の放出源となっている組織が明らかになっておらず、これにより環境 RNA 分析で対象として取り扱うことが可能な遺伝子がどういったものであるのかを絞り込むことができない状況にある。本研究では、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) の飼育水から環境核酸の由来と考えられる組織において特異的かつ恒常的に発現、転写される mRNA を検出し、環境核酸の由来組織の推定を試みた。

2.2 方法

2.2.1 飼育水からの環境 RNA 検出

本研究では、ゲノムが解読されており、モデル生物として研究例が多いゼブラフィッシュを対象種とした。対象種の発現に組織特異性を持つ遺伝子 5 種を対象 mRNA とし (表 1)、そのうちプライマーセットが存在する *clcn2c* 以外の 4 種の mRNA を特異的に増幅させるプライマーセットを設計した。

ゼブラフィッシュは飼育水槽 (水道水 12 L, 水温 25°C, 明期 12 時間, 暗期 12 時間) で 7 日間馴致させた後、3 L 採水し攪拌後、1 L ずつ分け、3 反復の水試料を得た。また、水槽間と実験器具間のコンタミネーションの有無を確認するために、飼育水槽と同条件のゼブラフィッシュを飼育していないネガティブコントロール水槽からも 1 L 採水した。4 つの飼育水試料をそれぞれ孔径 0.45 μm の Sterivex フィルターユニットを用いて加圧ろ過を行った。その後直ちに Nucleo Spin RNAPlus を用いて RNA 抽出・精製を行った。その後 PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) を用いてゲノム DNA (gDNA) 除去、逆転写反応を行い、相補的 DNA (cDNA) を合成し、 -20°C で保存した。RT-PCR は対象遺伝子 5 種のプライマーセットに加えて、どの組織、細胞でも常に発現するハウスキーピング遺伝子である *b2m* 遺伝子の特異的に増幅するプライマーセットも陽性対照として使用し行った。その後、1.5% アガロースゲル電気泳動を行い増幅を確認した。

2.2.2 組織試料からの RNA 検出

また、飼育水から検出した組織特異的 mRNA のゼブラフィッシュの各組織での発現と組織特異性を確認するために、飼育していたゼブラフィッシュの組織試料から、2.2.1 と同様の方法で分析を行った。対象とした組織は脳、鰓、肝臓、腸、表皮、筋肉である。

2.3 結果及び考察

飼育水試料及び組織からの対象遺伝子の検出結果

を表1に示す。組織特異性を確認できた鰓、表皮は環境核酸の由来組織の一つであることが強く示唆された。また、組織特異性は確認できなかったもの腸も由来組織であると考えられる。よって上皮系組織が環境核酸の由来である可能性が示唆され、上皮系組織で発現が起こる各種生理反応については、環境RNA分析によって状態の推定が可能なのではないかと期待される。

水試料は3反復で設定したが、対象遺伝子の検出

表1 対象遺伝子と検出結果

対象遺伝子	主な発現組織	飼育水	組織	
			主な発現組織	組織特異性
clcn2c	鰓	++	○	○
FABP2	腸管上皮	++	○	×
muc5.2	表皮	++	○	○
pleca	表皮	+++	○	×
krt5	表皮	+++	○	×
b2m	ハウスキーピング遺伝子	+++	-	-

飼育水は3反復で採水され、電気泳動での陽性数を+で示した。

にはばらつきがみられた。mRNAはDNAと比較して分解されやすいことが知られており、細胞外や損傷した細胞内のmRNAは短く断片化し検出できないと考えられる。損傷していない細胞内の断片化の進んでいないmRNAを検出している可能性があり、細胞1つを回収できるかできないかで、検出にばらつきが見られたと考えられる。また水槽内の濃度の低いmRNAは分析過程で分解された可能性があり、採水量の検討、分析方法の改善が必要である。

3. おわりに

学会でのポスター発表を通して様々な意見を頂き、また公聴会で様々な知見を得ることができた。修士課程での研究に活かしていきたい。本大会で発表するに当たり、龍谷大学 山中裕樹講師、三重大学 島田康人講師、神戸大学 源利文准教授、山中研究室の皆様には多くのご指導、ご協力を頂いた。此処に厚く御礼申し上げる。