

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19346

研究課題名（和文）DNAメチル化をマーカーとする環境DNAエピジェネティクス

研究課題名（英文）Environmental DNA epigenetics using DNA methylation as a marker.

研究代表者

源 利文（MINAMOTO, Toshifumi）

神戸大学・人間発達環境学研究科・教授

研究者番号：50450656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：簡便な生物モニタリング手法としての有用性が認識されている環境DNA分析手法を更に発展させ、親か子かなどの生物の状態を知るための手法として昇華させるため、DNAのメチル化状態を環境DNAで分析する「環境DNAエピジェネティクス」手法の開発に取り組んだ。ゼブラフィッシュを用いた実験の結果、適切な遺伝子マーカーを選択することで、生体のメチル化状態を環境DNAで明らかにする「環境DNAエピジェネティクス」分析が可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物モニタリングの新技术として有用な環境DNA分析手法を更に発展させ、フィールドの水を汲むだけで生物の生理状態などをモニタリングすることのできる新たな手法の開発に成功した。この手法を用いることで、野生生物がどのような生理状態にいるのか、いつどこで繁殖しているのかなど、従来の環境DNA分析では得ることのできなかった情報を簡便に得られる可能性がある。この手法が発展することで、生物多様性の保全や、水産有用魚種の持続的利用などに応用可能である。

研究成果の概要（英文）：To further develop the environmental DNA analysis method, which is recognised for its usefulness as a simple biomonitoring method, and to sublimate it as a method to determine the state of an organism, such as whether it is parent or offspring, we worked on the development of an 'environmental DNA epigenetics' method, which analyses the methylation state of DNA with environmental DNA. The results of experiments using zebrafish showed that, by selecting appropriate genetic markers, the 'environmental DNA epigenetics' analysis, which reveals the methylation state of an organism by its environmental DNA, is possible.

研究分野：生態学

キーワード：環境DNA DNAメチル化 エピジェネティクス バイサルファイトシーケンス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2021年6月に開催されたG7サミットでは2030年までに国土の30%を生物多様性の保護区とする目標(30by30)に合意し、日本でも保護区を大幅に増やすこととなった。野生生物の保護にあたっては、種がどこに生息しているかという種分布の把握とともに、健全な個体群の持続のための繁殖地の保護が重要であるが、特に水中生物の場合は、繁殖地を特定することはときに困難である。採捕を伴う調査で産卵直前の親個体や生まれたばかりの子個体が採捕できれば繁殖地を推定することができるが、このような調査には大きな労力が必要であり、また、特に希少種の場合は生物へのダメージも懸念される。そこで、申請者らはより簡便な生物モニタリング手法としての有用性が認識されている環境DNA分析手法を更に発展させ、親か子かなどの生物の状態を知るための手法として昇華させることを考えた。

魚など水中生物の環境DNA分析は、この15年ほどの間に急速に発展している。代表者の源と分担者の山中は当初からこの技術の研究に取り組んでおり、環境DNA分析の利点だけでなくその欠点についても十分に理解し、改善のための検討を重ねてきた。環境DNA分析の大きな弱点のひとつが、生息する種は把握できても、その状態までは把握できないということである。これは、これまでの環境DNA分析では、生まれてから死ぬまで変わることのないDNAの塩基配列を調べることでしかできないためである。そこで、生物の状態によって変わり得るマーカーとして考えられたのがRNAの発現パターンおよびDNAの修飾状態である。このうち、RNAについては先行する科研費研究(2017-2019: 17H03735、2020-2022: 20H03326)によって実現可能性が見いだされてきたが、DNAの修飾状態については、2017年度に予備的な実験が行われたものの成功には至っていない。魚類におけるエピジェノミクスの理解が不十分であったことや、モデル生物ではないアユを材料として用いたことなどがこのときの失敗の一因であると考えられるが、その後研究が進み、様々な分析ツールが揃いつつある現在、魚類においてメチル化研究の最も進んだモデル生物であるゼブラフィッシュを用いればこの研究を遂行できると考え、本研究を実行することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、環境DNA分析を用いて水中に生息する生物の遺伝子修飾状態を把握する技術を開発することである。ここ15年ほどの間に、河川水や海水などといった環境媒体の中に存在するDNAを用いて生物分布を把握する「環境DNA分析」と呼ばれる技術が急速に発展し、生物モニタリングの新たな手法として定着しつつある。しかし、環境DNA分析では生物の種類は把握できても、成熟個体か未成熟個体かなどの生物の状態を知ることはできない。生物多様性の保全にとってこのような情報は極めて重要であり、環境DNA分析で生物の状態に関わる情報を得ることができれば、その有用性は一層増すことになる。これまでの環境DNA分析では遺伝子の配列のみに着目してきたが、本研究では、環境DNA分析によって、DNAのメチル化という遺伝子の修飾状態(エピジェネティックな修飾状態)を把握する手法の開発を目指した。これに成功すれば、水を汲むだけで、そこにどのような生物種がいるかというこれまでの環境DNA分析手法で得ることのできた情報に加え、そこにいる生物の成長段階(年齢)、ストレス状態、後天的な形質などといった情報を得ることが可能になる。近年、ヒグマの血液から得たDNAを用いたメチル化解析によって、ヒグマの年齢を推定可能であることなどが報告されており、環境DNAサンプルを用いても同様の解析が可能であると目される。なお、同様の狙いをもった取り組みとして、環境中のRNAを調べる環境RNA分析法が現在開発されつつあり、本研究で取り組む手法とあわせて、環境サンプルから生物の状態を把握する手法として、二本柱となることが期待される。

3. 研究の方法

研究項目1. 環境DNAにおけるDNAメチル化修飾状態の解析(特定遺伝子領域)

まず、水槽内で飼育したゼブラフィッシュの特定遺伝子領域(18S rRNA遺伝子)を対象に、水槽中の環境DNAのメチル化率の変化を調べた。ゼブラフィッシュを飼育した水槽の水サンプルを経時的に採取し、環境DNAの濃度を調べると同時に、バイサルファイトシーケンシングによって5-mCの割合を定量した。次に、組織サンプルと環境DNAサンプルをそれぞれ解析し、メチル化状態が組織中と環境サンプルで一致するかを知るため、ゼブラフィッシュの筋肉、肝臓、表皮などの各組織から抽出したDNAと水槽中の環境DNAの5-mCを定量し、比較した。

研究項目2. 環境DNAにおけるDNAメチル化修飾状態の解析(ゲノムワイド)

近年出版されたDNAのメチル化に関わる論文の収集を行って、モノアラガイやゼブラフィッシュを用いた研究例から、適切なメチル化解析手法のトレンドについて整理し、効率的にCpG領域等のメチル化の程度を把握する手法としてRRBS(Reduced Representation Bisulfite Sequencing)を選定した。ゼブラフィッシュをモデルとして組織DNAと飼育水から得た環境DNA試料から得られたシーケンシングデータのうちCpG、CHG、CHHの三つのメチル化領域に着目し、組織由来DNAと環境DNAのメチル化状態を比較した。これにより遺伝子マーカーによらない全

一般的なメチル化特性の情報を取得し、組織 DNA と環境 DNA から得られるメチル化に関する解釈の仕方について基礎的な知見の蓄積を進めた。研究項目 1 と合わせ、環境 DNA エピジェネティクスのマーカー開発に有用な情報を得られることが期待される。

研究項目 3. 環境 RNA の利用

環境 DNA メチル化解析のさらなる発展として、メチル化状態の測定と環境 RNA 分析を用いた分析系を併用することによるより高精度な分析法の開発を試みた。水槽で飼育したゼブラフィッシュを対象とし、HSP (heat shock protein) 遺伝子とベータアクチン遺伝子の環境 mRNA 量の測定を試みた。

4. 研究成果

研究項目 1. 環境 DNA における DNA メチル化修飾状態の解析 (特定遺伝子領域)

水槽内で飼育したゼブラフィッシュを対象に、環境 DNA サンプルを時系列で解析し、特定遺伝子領域におけるゼブラフィッシュのメチル化状態の変化を検証した結果、環境 DNA 濃度が分解によって急速に減少していくのに対して、メチル化率は分解の影響をほぼ受けず放出から 72 時間が経過した後も安定的に保たれていた (図 1)。また、組織由来の DNA と環境 DNA のメチル化率を比較した結果、環境 DNA のメチル化率は皮膚や脳、精巣などの組織 DNA と同程度であり、組織 DNA のメチル化状態を正しく反映していることが示唆された (図 2)。一方で、卵巣の組織 DNA のみ他の組織よりも明確にメチル化率が低かった。さらに、ゼブラフィッシュの繁殖活動がメチル化解析の結果に及ぼす影響を調べると、メチル化率は時間帯による差異がなかったものの、繁殖活動が活発に起きる時間帯では多くのサンプルから卵巣 (成熟卵) に由来するものと考えられるメチル化率 0% のリードを検出することに成功した。検出される数は時間帯によって有意な差があり、環境 DNA のメチル化解析の応用可能性として、野外環境での魚の繁殖活動の検出が期待できる結果となった。この結果については、論文としてまとめ投稿中である。なお、査読前の原稿をプレプリントとして公開した。

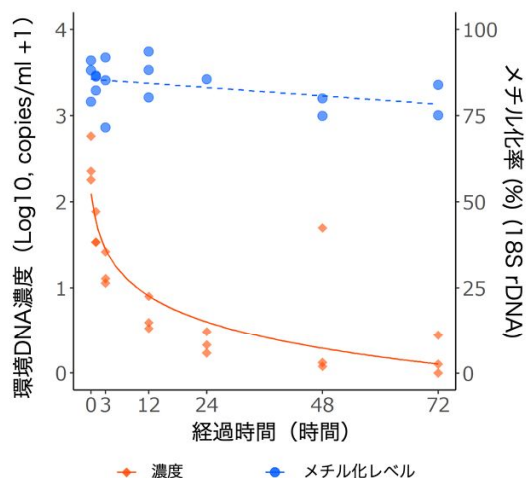


図1. 環境DNA濃度とメチル化率の経時変化。環境DNA濃度は経時的に有意に変化し ($p < 0.001$)、メチル化率はわずかに変化したが、その変化は統計的に有意ではなかった ($p = 0.052$)。

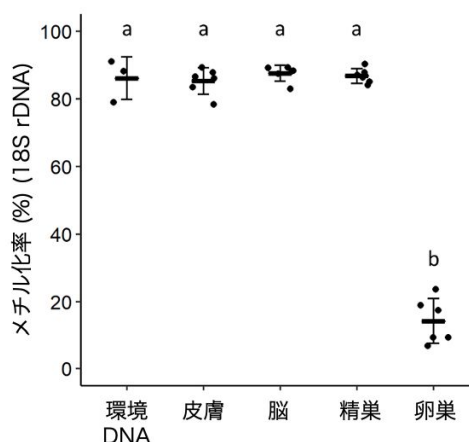


図2. 様々な組織における環境DNA (魚体除去後0時間) とゲノムDNAのメチル化率。同じ文字のサンプルは有意差がなかった ($p > 0.05$)。卵巣DNAは有意に低メチル化されていた。

研究項目 2. 環境 DNA における DNA メチル化修飾状態の解析 (ゲノムワイド)

環境 DNA メチル化解析を一般生物種まで将来的に展開する基礎として、組織 DNA と環境 DNA の間でのメチル化の特徴の違いを検討した。ゼブラフィッシュの組織及び飼育水に由来する DNA 試料を RRBS によってメチル化パターンを分析し、CpG、CHG、CHH の三つのメチル化領域に焦点を当てて解析した結果、CpG 領域では組織由来の試料で、その他の領域では飼育水由来の試料でメチル化率が高かった (図 3)。このことから、環境 DNA 分析によって得られるメチル化パターンは個体を分析した場合と異なる可能性が見出された。この結果は、環境 DNA のメチル化解析を行う際にはマーカーとなる遺伝子領域ごとに個体試料との比較検証が不可欠であることを示唆している。

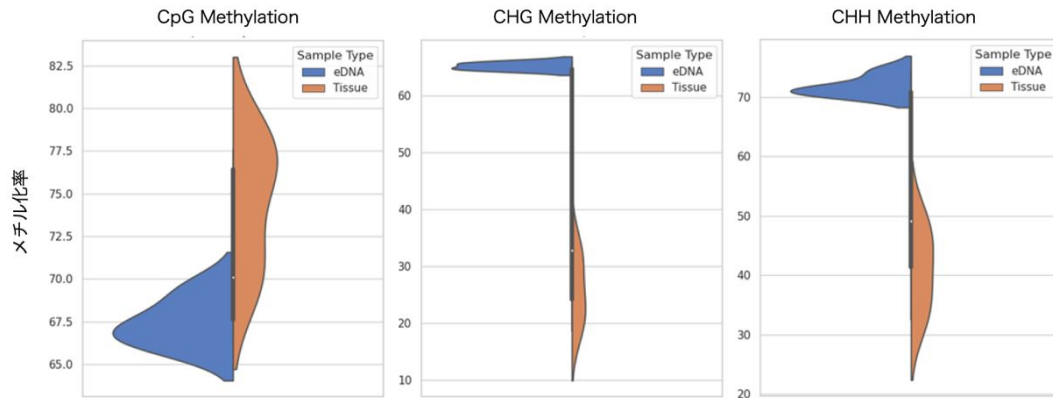


図3. 組織DNA (Tissue)と環境DNA (eDNA) でのメチル化率の分布の違い。縦軸はメチル化率を示す。横軸は異なる領域を区別して表示している (オレンジ: 組織DNA、青: 環境DNA)。バイオリンプロットのボリュームはデータの分布密度を表す。

研究項目 3. 環境 RNA の利用

水槽で飼育したゼブラフィッシュを対象として、HSP (heat shock protein) 遺伝子とベータアクチン遺伝子の環境 mRNA 量の測定を試みた結果、両遺伝子について環境 mRNA 量の測定が可能であることが明らかになった。この成果は、今後繁殖に関連するマーカーとして、環境 DNA のメチル化状態だけでなく、環境 mRNA を併用することで繁殖活動のより高精度な推定が可能となることを示唆している。

まとめ

研究項目 1 の結果より、適切な遺伝子マーカーを選択することで、環境 DNA エピジェネティクスは実行可能であることが示された。一方で、研究項目 2 の結果より、ゲノム全体のメチル化率が個体組織の DNA と環境 DNA が必ずしもリンクしないため、マーカーの選択が重要であることが示唆された。研究項目 3 は予備的な検討にとどまったが、適切なマーカー遺伝子のメチル化率と環境 mRNA 解析を組み合わせることで、水からより詳細な生理情報を得られる可能性が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Itsuki Hirayama, Toshifumi Minamoto, Luhan Wu	4. 巻 -
2. 論文標題 Stability of environmental DNA methylation and its utility in tracing reproductive activities of fish	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Author	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22541/au.171007239.91091562/v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平山一槻, 源利文
2. 発表標題 環境DNAにおけるDNAメチル化解析とその生態学的利用に向けたアプローチ
3. 学会等名 環境DNA学会「あなたが主役のワークショップ」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Itsuki Hirayama, Luhan Wu, Toshifumi Minamoto
2. 発表標題 Application of DNA methylation analysis to eDNA studies
3. 学会等名 The eDNA Society International Meeting 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山中 裕樹 (YAMANAKA Hiroki) (60455227)	龍谷大学・先端理工学部・准教授 (34316)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------