

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840152

研究課題名(和文) 環境核酸の分析による生物量推定法の高精度化および代謝量推定への応用に向けた新展開

研究課題名(英文) Improvement of the quantification accuracy of environmental nucleic acids for the estimation of the biomass and the metabolic rate of aquatic organisms

研究代表者

山中 裕樹 (Yamanaka, Hiroki)

龍谷大学・理工学部・講師

研究者番号：60455227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水棲生物が環境中へと放出している環境DNAおよび環境RNAを分析する技術の高精度化と非接触での代謝量測定への展開を試みた。試料水中の環境DNAは輸送中に急激に分解し、分析の精度低下をもたらす。これを回避するため車内で利用可能な過システムを新規に開発し、採水後速やかに濾過を行って、フィルターを冷凍保存するという系を確立した。一方、環境RNAについては測定値のばらつきが想定以上に大きく、その回避策を十分確立できなかった。ただし、コイを対象として代謝関連遺伝子を水中から種特異的に検出できること、そして、定量可能な濃度の環境RNAが比較的長く水中に残存することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to improve the accuracy of the quantification of environmental nucleic acids (environmental DNA and environmental RNA) to expand the application of eDNA and eRNA analyses for the estimation of biomass and metabolic rate of aquatic organisms. Environmental DNA has known to degrade rapidly in water, and it causes problem in the quantification of eDNA. We developed a new on site filtration system. Immediate filtration followed by freezing of the obtained filter sample provided eDNA samples which precisely reflected the real concentration of eDNA at the sampling time. On the other hand, the quantification accuracy of eRNA did not improved well due to an unexpected large variation of measurement values. However, we succeeded in the species-specific detection of mRNA relating to the metabolism of common carp from field water sample, and found that eRNA might remain in water at quantifiable concentration for at least 24 hours by a tank experiment.

研究分野：水域生態学

キーワード：生物量 代謝量 環境核酸 環境評価 測定精度

1. 研究開始当初の背景

水中を漂う DNA 断片 (環境 DNA) の回収・分析によって特定生物種の存在を明らかにした Ficetola et al. (2008 Biol Lett) の世界初となる論文が発表されて以来、それまで採捕や目視に頼るしかなかった生物の生息確認やさらには生物量の推定 (Takahara et al. 2012 PLoS ONE) への環境 DNA 技術の応用が急速に進んだ。微生物生態学分野では試料水中に生物個体自体が含まれているために一般的な手法であるが、この技術の大型水棲生物への応用は革命であった。調査努力量が大きく広範囲での継続調査が困難であった生物量推定において、短時間で実施できる全く新たな新手法として広がりつつある。1 調査地点における努力量が格段に小さく (採水のみで済む)、時空間的に大量の情報を集めることが可能で、保全や水産の現場からの期待も非常に大きい。

ただ、環境 DNA 技術はトピック的に野外への適用が進んだものの、技術の信頼性に関わる、詰めるべき基礎的課題が多く残されている。体サイズなど個体の特性や水温などの外部環境要因が代謝活性に影響することは広い分類群の生物に当てはまる事実であり (Whitfield 2006 National Academy Press)、また、体表面積 / 体重の比が個体のサイズ依存で変化することを考えれば、体サイズが環境中への DNA 放出量に影響を与えるのは必然のように思われる。しかし、これらの要因が生物量推定にどれだけのばらつきを与えるのかについては現在のところほぼ手つかずのままとなっている。「大きな個体」と「小さな個体」、もしくは「成魚」と「仔稚魚」で水中の環境 DNA 濃度への寄与が異なるとすれば大きな推定誤差を生む可能性がある。

環境 DNA による生物量推定はそれだけでも個体群サイズや資源量の推定に利用できる大きな潜在性を持っているが、その一方で、対象生物の「状態」についての情報は得られない。環境条件依存的に変化する代謝量は生態系内でのエナジーフローや必要餌資源量などを推定する上で不可欠の要素であり、特に重要性が高い情報である。野外における生物個体の代謝量はバイオテレメトリー技術を用いて筋電位や加速度データから推定する試みが進んでいる (Cooke et al. 2004 TREE) が、機器が高額であることや調査努力量が膨大であることから統計解析可能な繰り返し数を得るのが難しい。遺伝子発現の過程で合成される RNA は DNA と異なり「個体の現在の状況」に関する情報を与えてくれる。微生物生態学分野では環境 RNA を用いて土壤微生物群集の機能を解析するなど技術が発展している (Bally et al. 2007 The ISME J) が、大型水棲生物への適用例は今のところ皆無である。申請者は環境条件の変化に対する魚類の生理生態学的応答について研究してきた経緯から、環境中の核酸から生理状態を推定するという本研究の着想を得た。生態系

内での資源の収支を考察するのに不可欠な代謝量を水試料の分析から野外で直接測定できるようになれば、群集生態学や水産資源学に革命的な前進をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

環境 DNA 濃度の測定誤差にかかわる各種要因について検討し、その測定誤差を小さくするための試料保存方法、測定方法等の検討を行うことを第一の目的とした。また、水棲生物の「状態」を環境水の分析によって推定可能にするべく、水に含まれる RNA の回収、測定方法の検討を行うことを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 環境 DNA 測定の誤差の低減

環境 DNA の濃度を指標として対象生物の生物量を推定するという研究が進みつつあったが、ある生物量の生物からは常に同じ量の DNA が放出されているとは限らず、各種環境要因によってその濃度や、放出後の分解速度が変化すると考えられた。この問題について検討を進めた結果、環境中での放出、希釈、分散についての検討以外に、採取した水試料を分析に供するまでの輸送中に相当量の DNA が分解しており、この問題を解決せねば正確な「初期濃度」を測定できないことが明らかになった。これに加えて当初計画通りの環境 DNA 濃度の温度依存性の問題と合わせて、次の二つの課題に分けて研究に取り組んだ。

(1)-1. 現場での即時濾過のシステム開発

採水後にただちに試料水の濾過を行うことが DNA 試料の質を確保するために重要であるため、調査車両内で利用可能な 12V の電源で作動するアスピレーター (DP0105-X1-0001, Nitto Kohki) を組み込んだ、現場濾過のシステムを開発した。装置の中心となるアスピレーターは片手に収まるほどのサイズであり、通常卓上で使用されるアスピレーターと同等の真空度を実現できる性能を持つ。次に重要なマニホールドの部分には 4 つのポートが接続できる水道配管パーツを使用して、4 連での濾過が可能となるようにした。また、蓋つきの密閉プラスチック袋 (DP16-TN1000, Yanagi) を採水容器として使用し、GF/F フィルターを挟み込んだフィルターホルダー (PP-47, ADVANTEC) を介してマニホールドに直接つなぐ設定とすることで、走行中であっても試料水をこぼすことなく濾過を可能にした。利便性を考慮して、ここに型番を記したアスピレーターとフィルターホルダー、プラスチック袋以外は一般的なホームセンターで購入可能なパーツを使用して、この濾過システムの普及を容易にするよう配慮した。

即時の濾過を行うことでどれほど DNA の分解を押さえられるのかを、ため池に生息するブルーギルとオオクチバスの環境 DNA を対象

として検証した。両種のミトコンドリアのチトクローム b 領域を特異的に PCR で増幅可能な特異的プライマーをそれぞれ使用して、TaqMan プローブを使用するリアルタイム PCR によって、1) 現場濾過によって得られたフィルターをクーラーボックスで 6 時間輸送してから抽出した DNA、2) クーラーボックスで 6 時間輸送した水を濾過し、フィルターから抽出した DNA、3) 常温で 6 時間輸送した水を濾過し、フィルターから抽出した DNA を試料として、3 つの処理区の間での 2 種の DNA 濃度を比較した。

(1)-2. 環境 DNA 濃度の温度依存性

水温 20、30 の水槽で標準体長 8.0 cm のコイを 3 匹ずつ飼育し、6 日後に水槽水を採取し、飼育水温と同様の温度で試料水を保管した。採水直後および 3、6、12、24 時間経過ごとに、試料水を環境 DNA 用に 150 mL、GF/F フィルターでろ過をした。水槽の繰り返し数は、水温 20 が 4 回、30 が 3 回で行った。その後 DNA を抽出、コイのチトクローム b 領域を特異的に増幅するプライマーを使用して上述のようにリアルタイム PCR により解析した。

(2) 環境 RNA 回収・測定法の検討

RNA は DNA に比べて環境中では非常に分解されやすいとされてきた。環境 RNA を回収するという目的での分析技術開発ではまず、どれほどの残存時間があるのかを確かめる必要があった。また、環境中にはさまざまな生物の RNA が混在しているため、適切に種特異的に RNA を検出できるプライマーを設計することが不可欠である。本研究ではこれまでに環境 DNA 分析を用いた多くの研究で分析対象となってきたミトコンドリアのチトクローム b 領域に注目し、その転写産物である mRNA をターゲットした。

水温 20、30 の水槽で標準体長 8.0 cm のコイを 3 匹ずつ飼育し、6 日後に水槽水を採取し、飼育水温と同様の温度で試料水を保管した。採水直後および 3、6、12、24 時間経過ごとに、環境 RNA 用に 300 mL、GF/F フィルターでろ過をした。水槽の繰り返し数は、水温 20 が 4 回、30 が 3 回で行った。また RNA は Nucleospin RNA Plus (Macherey-Nagel) による抽出後、逆転写、リアルタイム PCR により解析した。コイのチトクローム b 領域を対象とし、特異的に増幅できる既存のプライマーと Taqman プローブ (Takahara et al. 2012 PLOS ONE) を転用した。各試料水に含まれる環境 RNA/環境 DNA 比 (環境核酸比) を水温および時間ごとに比較した。

4. 研究成果

(1) 現場濾過による環境 DNA 保存性の向上
氷冷で 6 時間の輸送をした試料水から得られたオオクチバスの環境 DNA 濃度は現場で即時

の濾過を行った試料水で測定された濃度と統計的に有意な差はなかったが、その一方で、常温で 6 時間輸送した試料水では即時濾過の試料水よりも 56% 濃度が低かった (図 1)。一方、ブルーギルでは現場濾過の試料水の環境 DNA 濃度よりも、氷冷輸送水と常温輸送水でそれぞれ 23% および 64% 濃度が低かった (図 2)。

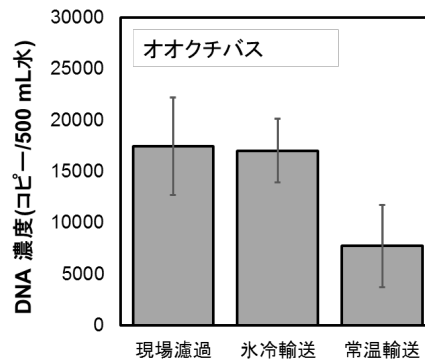


図 1. 各処理区におけるオオクチバスの環境 DNA 濃度

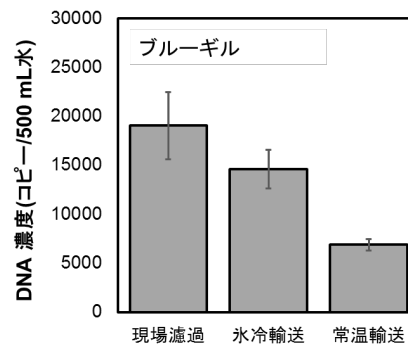


図 2. 各処理区におけるブルーギルの環境 DNA 濃度

すなわち、種によって若干の違いは見られるが、総じて現場濾過の試料水が高い DNA 濃度を示した。このことは、試料水中の環境 DNA は輸送条件による差が認められるものの、輸送中に環境 DNA 濃度が分解によって大きく低下することを示している。環境 DNA 試料の質を担保するためには、現場での濾過と、それに続くフィルターの冷凍保存が必要であることを示唆している。この成果は 2015 年のイギリス生態学会大会で発表し、現在結果をまとめた論文を投稿中である。

(2) 環境 DNA 濃度の温度依存性

コイから放出されてのちの環境 DNA は時間とともに分解が進み、これは 20 (図 3) でも 30 (図 4) でも同様であった。0 時間での両水温間での環境 DNA の濃度について解析したところ、差は見られなかった。この結果は、これまでに 1 例だけ報告があった先行研究 (Takahara et al. 2012 PLOS ONE) と同様の結果であった。

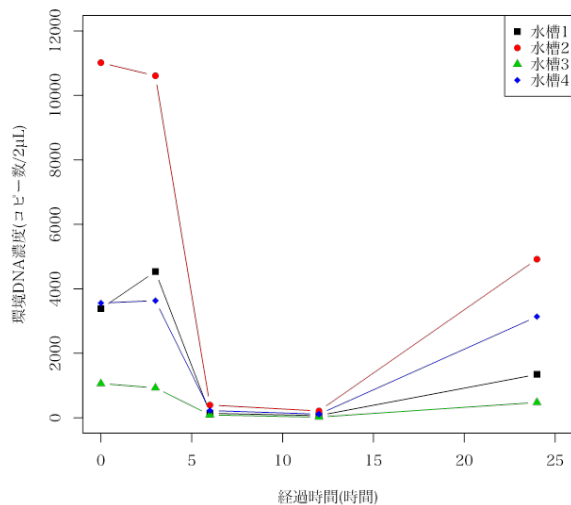


図3. 20 水槽における環境 DNA 濃度の経時変化

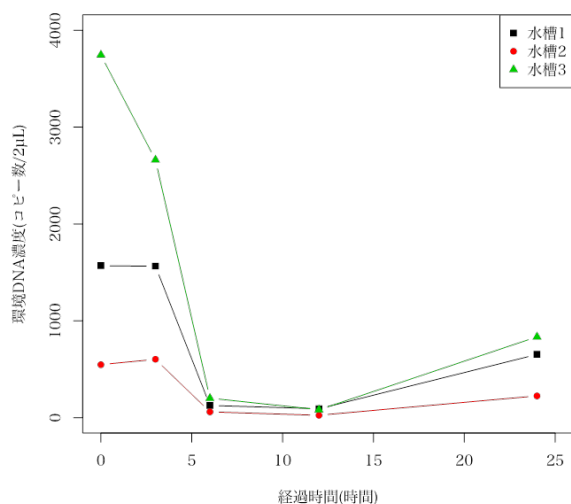


図4. 30 水槽における環境 DNA 濃度の経時変化

(3) 環境 RNA 回収・測定法の検討

環境 RNA は GF/F フィルターによる濾過と市販の RNA 抽出キットを利用したプロトコルで回収することが出来た。環境 RNA は今回コイのミトコンドリアチトクローム b から転写された mRNA が測定対象であり、この量は発現量を反映していると考えられる。通常 RNA の発現量解析ではハウスキーピング遺伝子と呼ばれる、個体の状態によってその発現量が変化しない遺伝子に由来する mRNA の量も同時に測定して、測定対象の RNA との比でその発現量を表見するのが通例である。これは実験操作の過程での逆転写反応の効率が安定しないために、このような補正をしなければ値の変動が発現量を反映しているものか判断できないためである。本研究ではハウスキーピング遺伝子の量を環境 RNA 試料から同時に測定することが不可能であるため、仮に同じ領域の環境 DNA 量を分母として補正を施した。その結果が図5であり、時間とともに大きくその値は変動するものの、環境 RNA は 24 時間後でもなお分析、定量可能な濃度で存在していることが明らかとなった。

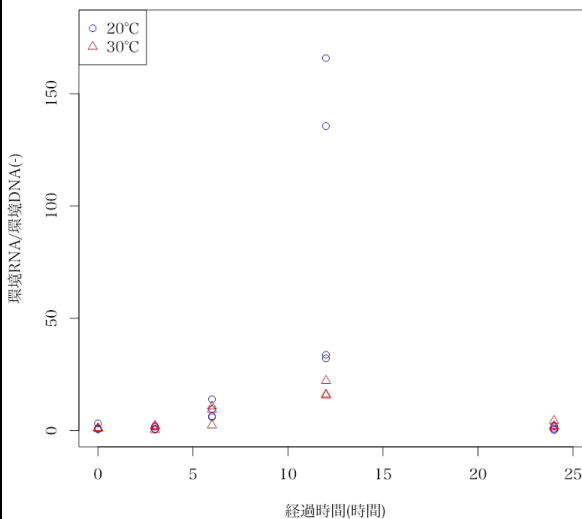


図5. 環境 RNA 濃度を環境 DNA 濃度で割った環境核酸比の時間変化

このことから、少なくとも今回の水槽実験では RNA の分解は事前の想定よりも遅かった。予備的検討から、環境 RNA をフィルターから抽出する際にタンパク質分解酵素を添加することで回収効率が増加することが明らかになっている。このことは環境 RNA が環境水中では 1 本鎖のむき出しの状態ではなく、細胞や細胞小器官などの膜構造に包まれたまま浮遊していることを示唆する。このことから環境 RNA はこれまでに想定していたよりも分解を受けにくいと考えられる。本実験では環境 RNA の測定値に極端に大きなばらつきが見られた。これは繰り返し実験を行っても大きなばらつきが見られ、研究上の大きな壁となっている。環境 DNA でも同様の大きなばらつきを観測することが多く、その原因究明が急務である。今回はチトクロームという代謝にかかわる遺伝子から発言した mRNA を環境水中から回収、分析することに成功した。ハウスキーピング遺伝子の導入や測定値のばらつきの大きさの解消など、まだまだ多くの課題があるものの、種特異的に代謝にかかわる mRNA を環境 RNA 分析によって測定できることを示した意義は大きい。この成果は 2016 年の日本生態学会大会で発表した。継続の実験を進めており、論文としての成果好評を目指す。また、今回の回収方法の野外適用として、滋賀県東近江市に位置する伊庭内湖で環境 RNA 試料を採取し、野外に生息するコイに由来する環境 RNA の回収・測定に成功した。今後は本研究を通して新たに発見された各種の課題を解決して野外に生息している水棲生物の「状態」を知る環境 RNA 分析の技術の安定化、発展をすすめる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Satsuki Tsuji, Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto. (accepted) Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. *Limnology*. 査読有.

DOI: 10.1007/s10201-016-0483-x

(2) Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto. (2016) The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators* 62:147-153. 査読有
DOI:10.1016/j.ecolind.2015.11.022

〔学会発表〕(計 15 件)

(1) 垣見直希, 河野吉将, 山中裕樹, 魚類からの環境 RNA 放出速度と温度依存性, 第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月 20 日 ~ 24 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

(2) 本郷真理, 山中裕樹, 加納光樹, 苅部甚一, 環境 DNA を用いた広域モニタリングによるチャネルキャットフィッシュの早期検出, 第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月 20 日 ~ 24 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

(3) 辻冨月, 宮正樹, 佐藤行人, 山本哲史, 源利文, 山中裕樹, 環境 DNA 分析によるアユのミトコンドリア DNA ハプロタイプの検出, 第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月 20 日 ~ 24 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

(4) 山中裕樹, 櫻井翔, 本澤大生, 本郷真理, 辻冨月, 種特異的プライマーセットとリアルタイム PCR による魚類の分布推定, 第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月 20 日 ~ 24 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

(5) 本澤大生, 山中裕樹, マルチプレックス PCR による環境 DNA 試料を用いた複数魚種同時検出手法の開発, 第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月 20 日 ~ 24 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

(6) 櫻井翔, 三宅凜太郎, 本澤大生, 山中裕樹, 環境 DNA 分析を用いた水棲生物の河川における移動分散の把握, 第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月 20 日 ~ 24 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

(7) 十河勇樹, 土居秀幸, 山中裕樹, 環境 DNA 分析におけるリアルタイム PCR とデジタル PCR の検出率の比較, 第 63 回日本生態学会大会, 2016 年 3 月 20 日 ~ 24 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

(8) Hiroki Yamanaka, Hiromu Motozawa, Satsuki Tsuji, Ryohei C Miyazawa, On site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. *British Ecological Society Annual Meeting* 2015 年 12 月 13 日 ~ 16 日, Edinburgh (Scotland)

(9) 辻冨月, 山本哲史, 源利文, 山中

裕樹, 環境 DNA 手法の新展開: 魚類個体群の遺伝的多様性評価の試み, 日本陸水学会第 80 回大会, 2015 年 9 月 28 日 ~ 29 日, 北海道大学函館キャンパス(北海道函館市)

(10) 山中裕樹, 櫻井翔, 山本大輔, 山本敏哉, 環境 DNA 分析によるアユの河川内移動モニタリング, 日本陸水学会第 80 回大会, 2015 年 9 月 28 日 ~ 29 日, 北海道大学函館キャンパス(北海道函館市)

(11) 辻冨月, 櫻井翔, 山中裕樹, 環境 DNA 分解速度の温度依存性, 第 62 回日本生態学会大会, 2015 年 3 月 18 日 ~ 22 日, 鹿児島大学 郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

(12) 櫻井翔, 山本大輔, 山本敏哉, 辻冨月, 山中裕樹, 環境 DNA 分析によるアユ資源量解析の試み, 第 62 回日本生態学会大会, 2015 年 3 月 18 日 ~ 22 日, 鹿児島大学 郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

(13) Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto, Assessment of the effect of artificial obstructions on fish migration in a river using environmental DNA. *Joint 2014 Annual Meeting - British Ecological Society and Societe Francaise d'Ecologie*, 2014 年 12 月 9 日 ~ 12 日, Lille (フランス)

(14) Satsuki Tsuji, Hiroki Yamanaka, On the effect of pH of water sample on the recovery rate of environmental DNA. *Japanese Society of Limnology 79th Annual Meeting*, 2014 年 9 月 10 日 ~ 13 日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

(15) Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto, Monitoring upstream migration of fish using environmental DNA: Towards a more efficient method for assessing habitat connectivity. *Ecological Society of America Annual Meeting 2014*, 2014 年 8 月 10 日 ~ 15 日, Sacramento (United States of America)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.est.ryukoku.ac.jp/est/yamanka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 裕樹 (YAMANAKA HIROKI)

龍谷大学・理工学部・講師

研究者番号: 60455227