

環境 RNA を用いた河川生態調査と水質評価への活用

花王株式会社	正会員	○井上 泰彰
花王株式会社	非会員	宮田 楓
花王株式会社	非会員	本田 大士
花王株式会社	非会員	天野 雄斗
花王株式会社	非会員	西岡 亨
株式会社環境指標生物	非会員	長池 智久
株式会社環境指標生物	非会員	川口 貴光
花王株式会社	非会員	森田 修
花王株式会社	非会員	山根 雅之

緒 言

生態調査は生物多様性保全や環境問題解決への方針策定などに重要な役割を担っているが、従来の生態調査（TFS）は生物を捕獲して同定する際の、侵襲性やコスト、専門性の確保、再現性の低さなどに課題があり、生物の分布や生息数を正確に推定できる生物調査方法の開発が重要である。近年、水環境中に生息するマクロ生物に由来する DNA（環境 DNA ; eDNA）を用いたメタバーコーディング解析が急速に発展しており、TFS を補完・代替する技術として様々な水生生物を対象に研究されている。eDNA は生物の糞、粘液、表皮、血液などが環境に放出されたものと考えられており、その分析から種組成や個体数を推定できる可能性がある。しかし、eDNA は分解されにくく、環境中に長期間残留するため、上流から移流した核酸や死骸、生活排水などに由来して誤検出が生じることが課題であり、より環境中における滞留期間が短い指標を用いた分析法の開発が重要である。そこで我々は、環境 DNA よりも分解されやすいと考えられる環境 RNA（eRNA）を用いることで、誤検出を低減し、その場に生息する種を正確に推定できるのではないかと考えた。しかしながら、生態調査における eRNA メタバーコーディングの有用性はほとんど研究されていない。

本研究では、生態調査における eRNA の有用性を明らかにすることを目的として、魚類、節足動物、および藻類を対象に eRNA メタバーコーディング解析を行い、同時に実施した eDNA 解析結果と比較することで、eRNA の存在量と生物種の豊富さを評価した。さらに、TFS との比較検討により、生態調査や水質評価への活用の可能性を評価すると共に、誤検出の原因究明のため、生活排水の魚類群集解析を行った。

実 験

河川水は、淡水域である那珂川的那珂川大橋（茨城県）、新那珂橋（栃木県）で採取した（3.0 L, n=22 : 2 地点×11 日）。ステリベクスフィルター（孔径 0.45 μm, Millipore）で DNA・RNA を濃縮し、DNA を DNeasy Blood & Tissue Kits（Qiagen）、RNA を ChargeSwitch Total RNA Cell Kits（Thermo Fisher Scientific）を用いて抽出した。生活排水（家庭排水・放流水）は、栃木県の下水処理場から採取し、DNA/RNA 共抽出を行った（RNeasy PowerSoil Total RNA Kit, RNeasy PowerSoil DNA Elution Kit (Qiagen)）。河川水・生活排水から抽出した RNA を鋳型として PrimeScript II 1st strand cDNA synthesis kit（TaKaRa Bio Inc.）を用いて cDNA を合成した。それぞれライブラリー調整後（MiFish-U/E primer ; 12S rRNA）、次世代シーケンサー MiSeq（Illumina）に供し（MiSeq Reagent Kit v3, 2×300 bp）、メタバーコーディング解析を行った。eDNA、eRNA および TFS（国土交通省、河川水辺の国勢調査）の結果を比較することで、生態調査と水質評価への eRNA の有用性を評価した。

キーワード 環境 RNA, 環境 DNA, 生物多様性, 生態調査, 水環境

連絡先 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町大字赤羽 2606 番地 花王株式会社 安全性科学研究所 inoue.yasuaki@kao.com

結果と考察

2 地点で実施した魚類の eDNA/eRNA 解析と河川全体の TFS で検出された魚種を比較した結果、TFS で検出された 42 種のうち、eDNA と eRNA 解析でそれぞれ 22 種と 24 種が検出された (図-1)。eRNA の感度 (57.1%) は eDNA (52.4%) よりやや高く、陽性適中率 (43.6%) は eDNA (26.5%) より顕著に高かった。したがって、eRNA 解析は eDNA 解析より高精度の生態調査を実現する可能性がある。

eDNA/eRNA 解析で得られた魚類のリード数の量的な関係を種ごとにプロットした結果、多くの魚種で eDNA と同等量の eRNA が検出された (図-2)。よって、河川水中には様々な魚類の環境 RNA が存在し、メタバーコーディング解析で検出可能な量が維持されていることが明らかになった。また、eDNA のみで検出された 35 種のうち 30 種はその場に生息しないはずの海産・汽水産魚であり、残りの 5 種のうち 4 種の淡水魚は生態や生息地の情報から調査地点に生息している可能性は低い。したがって、eRNA は eDNA よりもその場に生息する生物の検出に優れていることが示唆された。検出された海産・汽水産魚のうち 90%以上が食用魚であったため、我々は誤検出が家庭排水に含まれる食用魚に由来すると仮説を立て、eDNA/eRNA を用いて、生活排水の魚類群集構造を解析した。その結果、家庭排水から検出された 121 種のうち、117 種が、放流水から検出された 22 種のうち、20 種が食用魚であり、生活排水中に含まれる eDNA 量は、eRNA 量よりも有意に多かった。よって、河川は生活排水に由来する食用魚の核酸で広範囲に汚染されている可能性が高く、特に eDNA の汚染度が高いことが予想された。さらに、本研究における調査地点は河口付近ではないため、海産・汽水産魚の核酸を誤検出と定義できたが、海水・汽水域の調査ではこのように誤検出を定義することは困難である。eRNA 解析は誤検出の影響を排除できる可能性があり、誤検出を定義できない地点ほど eRNA を用いた生態調査が有用と考えられる。

また、節足動物と藻類の eDNA/eRNA 解析で得られた生物種から水質指標として用いられる EPT(%), ASPT score 及び Saprobic score を算出した結果、TFS から得られる値と同等であった。(図-3)。また、得られた ASPT score は 2017 年及び 2020 年の栃木県が実施した TFS に

る調査結果と類似していた (ASPT: 那珂川大橋、新那珂橋で 7.6~7.8)。したがって、eDNA/eRNA メタバーコーディング解析から TFS から算出される水質指標を推定できることが示唆された。

以上の結果から、我々は、環境 RNA が河川中に豊富に存在し、調査地点に生息する生物群を同定する誤検出の極めて少ない高感度な解析が可能であることを示した。また、節足動物や藻類の eRNA は、水質の評価に活用できることを示した。eRNA 解析の普及に向けて、更なるケーススタディーの積み重ねが重要である。

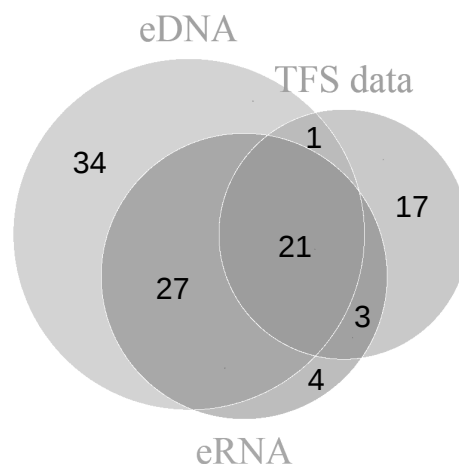


図-1. eDNA/eRNA メタバーコーディング解析と TFS で検出された種数の比較。

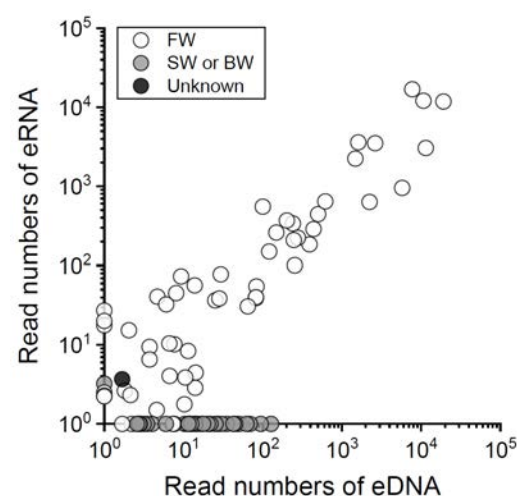


図-2. 河川中の魚類の eDNA/eRNA のメタバーコーディング解析におけるリード数の比較。(FW; 淡水魚, SW or BW; 海産・汽水産魚, Unknown; 不確定)

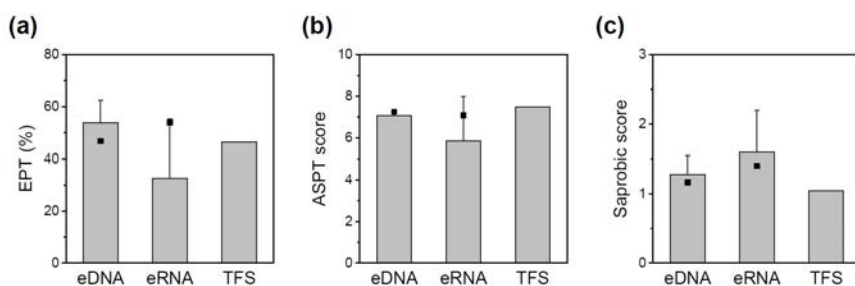


図-3. eDNA/eRNA メタバーコーディング解析と TFS における各水質評価値の比較。(a; EPT(%), b; ASPT score, c; Saprobic score)