環境 RNA を利用した魚類の健康状態評価系の構築

大石　一樹

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

連絡先住所：〒890-8544　鹿児島市桜ケ丘 8 丁目 35-1

要旨

世界的な食糧需要の増加に伴い養殖業の重要性が高まる中、地球温暖化による高水温ストレスは魚病の蔓延や成長停滞を招く深刻な課題となっている。従来の血液や組織を採取する侵襲的な魚の健康診断は、魚体への過度なストレスや感染リスク、多大な労力を伴うため、簡便かつ非侵襲的な評価法の開発が急務であった。

本研究では、生体の生理状態を反映する環境 RNA(eRNA)に着目し、ヒメダカを用いた高水温ストレス下での健康状態評価の有効性を検証した。飼育水から抽出した eRNA を網羅的に解析した結果、環境試料特有の微生物由来配列が多く含まれるものの、魚類由来の遺伝子解析に十分なリード数を確保した。解析の結果、高温条件下において熱応答関連遺伝子である *dnaj* ファミリーや *hsp90*、*hsf2* などの発現上昇が確認された。これらは分子シャペロンとして機能するストレス応答の代表的なマーカーであり、飼育水中の eRNA から生体内の生理状態を検知できる可能性が強く示唆された。

本成果は、eRNA 解析が養殖魚の生理状態を非侵襲的に把握するための手法となり得ることを示している。今後は検出感度や定量性の向上が課題であるが、次世代の養殖モニタリング技術としての応用が期待される。

1. 緒言

近年の世界的な人口増加に伴う食糧需要のひっ迫を背景に、養殖業は安定的なタンパク質の供給源としてその重要性がますます高くなっている。集約的な養殖生産を安定的に維持するためには、飼育環境の変化や魚病といった外部ストレスによる健康状態の悪化を早期に、かつ的確に把握することが不可欠である。特に、近年の地球温暖化に起因する夏季の水温の上昇は、養殖魚に対して慢性的な高水温ストレスを強いており、免疫機能の低下による感染症の蔓延や成長の著しい停滞を招くなど、養殖業に深刻な経済的な打撃を与えている。

これまで、魚の健康状態の把握において主流とされてきた手法は、魚から組織や血液を直接採取する侵襲的な方法であった。しかし、これらの方法はサンプリングそのものが魚体に多大なストレスを与え、サンプリング後の感染症への罹患や死亡リスクを誘発するという問題点がある。また、多大な労力を要するため、広い水域に点在する養殖生け簀全体の状態を迅速かつ網羅的に評価するには限界があった。こうした背景から、魚体を傷つけることなく、飼育環境そのものから生け簀内の魚の生理状態を非侵襲的、かつ簡便に評価できる新たな評価法の開発が期待されている。

そこで本研究では、生物の組織から水などの環境中に放出された RNA である環境RNA(eRNA)に着目した。RNA は生体の一時的な状態を反映しているため、生理状態や環境応答に応じた変化を捉えるのに適した特性を持っている。その一方で、分解しやすいという RNA の特性から、eRNA を用いて魚体の生理状態の変化を捉えようとする試みはほとんど行われていない。

本研究では特に、養殖現場において最も危惧される環境因子である高水温ストレスに焦点を絞った。温度上昇に伴い飼育水中に放出される eRNA を網羅的に解析し、ヒメダカを用いて、eRNA による魚の健康状態の把握が可能かどうかを検証した。

2. 実験方法

2.1. 試験魚

実験にはヒメダカ(*Oryzias latipes*)の成魚を用いた。水温 24±1℃、光周期は 14L/10D に調節した。餌は市販の飼料を 1 日 2 回、試験に供するまで与えた。

高温ストレス試験は、魚を 2 L 水槽に移して行った。水温をコントロール群が 24±1℃、ストレス群が 31±1℃に設定し、水温以外の条件は両群で同一とした。

2.2. 遺伝子発現解析

試験水槽からの eRNA の回収は、環境 DNA 学会のマニュアルに基づき [1]、ステリベクスフィルター(0.45 μm)を用いて 1 L の飼育水をろ過した。抽出には、NucleoSpin RNA を使用した。

RNA-seq 用のライブラリ調製(SMART-Seq mRNA HT LP)およびシーケンシング(Illumina NovaSeq X Plus)、データ解析は、株式会社 Rhelixa に委託した。データ解析は、トリミング、リファレンスゲノムへのマッピング、リードカウントの算出および正規化を行った。

3. 結果および考察

高温ストレス下における飼育水中の遺伝子情報を網羅的に解析するため、飼育水から抽出した eRNA を用いて RNA-seq を実施した。各条件で得られたシーケンスデータは約 40 million reads であった。これらのリードをメダカのリファレンスゲノム（ASM223467v1）へマッピングした結果、マッピング率はコントロール区で 5.88%、高温ストレス区で 5.26%であった。マッピングされなかったリードの大部分は飼育水中に含まれる微生物由来の配列であると考えられ、環境試料特有の低いマッピング率を示したものの、魚類由来の遺伝子解析には十分なリード数が確保された。

次に、高温ストレス応答を解析するため、熱応答関連遺伝子に着目して eRNA の発現量を比較した。その結果、*dnaja1* や *dnaja3a* といった *dnaj* ファミリー、および *hsp90*、*hsf2* などの複数の熱応答関連遺伝子において、高温条件下での発現上昇傾向が確認された (Fig)。これらの遺伝子は分子シャペロンやその制御因子として機能することが知られており、これらの遺伝子の発現は飼育水からでも検出できる可能性が示唆された。また、熱ストレス応答以外にも、転写因子などの遺伝子発現制御に関わる遺伝子群においても発現変動が認められた。

分子シャペロンは、変性タンパク質の再フォールディングや分解を担う細胞内ストレス応答の代表的なマーカー遺伝子である。本研究において、これらの遺伝子発現の変動を魚の血液や組織から直接抽出した RNA ではなく、飼育水中の eRNA から検出できたことから、eRNA が生体内の生理状態を反映している可能性を強く示唆している。

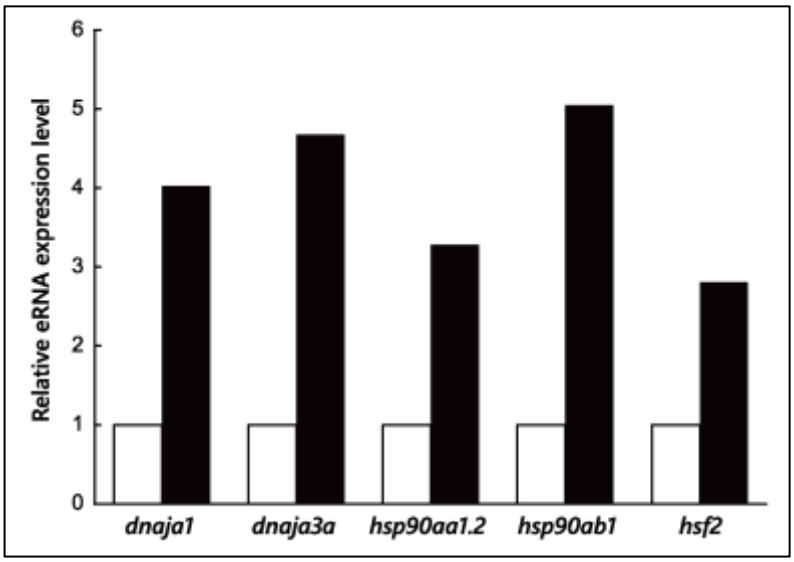


Fig. eRNA 発現量

以上の結果から、eRNA 解析は非侵襲的に魚類の生理状態を把握する手法として有効である可能性が示された。今後は、微生物由来 RNA の混入による相対的な検出感度の低下や定量性の検証といった課題を解決することで、養殖現場における健康モニタリング技術としての応用が期待される。

4. 謝辞

本研究に助成いただいたサンケイ科学振興財団に深く感謝申し上げます。

5. 引用文献

1. 環境 DNA 学会 (2024) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver3.0.

Environmental RNA as a non-invasive tool for fish health monitoring

Kazuki Oishi

Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University
Address：8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima, 890-8544, JAPAN

Abstract

As global demand for protein grows, aquaculture has become a vital food source. However, rising water temperatures due to global climate change impose chronic stress on fish, leading to significant economic losses. Traditional health assessments rely on invasive sampling of blood or tissues, which itself causes stress and increases infection risks. Consequently, there is an urgent need for a non-invasive method to monitor fish physiological states directly from their environment.

This study focuses on environmental RNA (eRNA), which reflects an organism's physiological responses but has been rarely utilized due to its rapid degradation. We investigated whether eRNA could detect high-temperature stress—the most critical environmental factor in modern aquaculture—using medaka (*Oryzias latipes*) as a model. Comprehensive transcriptomic analysis was performed on eRNA extracted from rearing water, yielding approximately 40 million reads per condition. Although mapping rates to the medaka reference genome were relatively low (5.26–5.88%) due to microbial sequences, sufficient fish-derived reads were obtained for robust analysis.

Our results revealed significant up-regulation of heat-response genes, including the *dnaj* family (*dnaja1*, *dnaja3a*), *hsp90*, and *hsf2*, under thermal stress. These genes function as molecular chaperones or regulators in cellular stress responses. The detection of these changes in rearing water, rather than directly from fish tissues, strongly suggests that eRNA effectively mirrors the internal physiological status of the organisms.

These findings demonstrate that eRNA analysis is a promising tool for non-invasive health monitoring in aquaculture. Addressing challenges such as detection sensitivity and quantitative validation will be essential for the practical application of this technology in field-scale monitoring.