

## 1. 魚類の飼育と養成

滋賀県立大学の水生生物実験室（湖沼環境実験施設内）で採卵したコイ、キンギョ、およびホンモロコの受精卵を、圃場実験施設内のコンクリート池に收容し（2017年5月）、同11月まで約6か月間養成した。卵の收容に先立ち、池の掃除、除草等をおこなった。池の周囲にはポリエチレン製の波板（園芸用）を設置し、カエルの侵入防止措置をおこなった。また、鶏糞を散布し、初期餌料としてのプランクトンを培養した。

孵化後しばらくは生物餌料（プランクトン）のみで飼育し、その後、配合飼料を給餌した。仔魚期には、粉末の微粒子飼料を自動給餌機を用いて1日5回給餌し、稚魚期以降は、コイ用の市販飼料を1日2～3回、手まきで与えた。なお、卵の收容から約1か月を経た頃に、鳥害防止用のネットを池を覆うように設置し、各池にエアープンプで常時曝気を開始した。また、テラピア（ティラピア）の稚魚を近隣の繁殖地から採集し、同様に養成した（図1～7）。



図1. 飼育池の準備（5月）



図2. 投網でテラピア稚魚を採集（7月）



図3. 受精卵（5月）



図4. 手の大きさに成長したキンギョ(11月)



図5. 手より大きく成長したコイ(11月)



図 6. 飼育魚の取り上げ（11月）



図 7. 成長したテラピア（11月）

## 2. 魚類の飼育実験

夏季期間中、圃場実験施設内の屋外コンクリート池において養成した魚類（上記参照）を、水生生物実験室（湖沼環境実験施設内）の屋内の大型飼育水槽に收容した。コイ、キングヨ、テラピア、およびホンモロコをそれぞれサイズ別、種別に選別し、別々に收容した。それらの一部を実験水槽 5 基に收容し、飼育実験を開始した（各水槽、サイズが同程度のコイ 5 尾、テラピア 5 尾、キングヨ 10 尾）。しかし水温低下に伴う摂餌不良のため、途中から実験水槽をバイオマス実験室（圃場実験施設内）に移し、加温条件下（25℃）で飼育実験を継続した（図 8）。用いた試験飼料を表 1 に示す。

基礎飼料は市販の浮上性ペレット飼料（キングヨ用）を用いた。添加する大豆油、グルコース、およびフルクトースは外割とし、全区とも水道水（50mL）に溶解・分散してから基礎飼料に添加・混合した。なお、グルコースを完全に溶解するため、ぬるま湯程度に加温した。また、ペレットへの浸透を促すため、添加・混合後ただちに真空ポンプで含浸置換した。それを室温で 1 晩風乾し、翌朝 50℃に設定した乾燥機内（コンベクションオーブン）で 1 時間乾燥した。乾燥した飼料はジップロック付のポリ袋に入れて給餌に供するまで冷蔵保存した。

表 1. 試験飼料の組成

	Control 飼料 (対照区)	グルコース 20%飼料	グルコース 40%飼料	フルクトース 20%飼料	フルクトース 40%飼料
基礎飼料 (g)	100	100	100	100	100
大豆油 (g)	5	5	5	5	5
グルコース (g)	0	20	40	0	0
フルクトース (g)	0	0	0	20	40

## 環境フィールドワーク 2017 報告集より (抜粋)

試験飼料は、毎日7時、13時、20時に各水槽、定量を給餌した。飼育期間中、試験魚の斃死はなかった。飼育開始から約1か月後(12月28日)、遺伝子発現解析(後述)に用いる組織のサンプリングをおこなった。サンプリング当日は、通常通り朝の給餌をおこない、午前11時頃、Control区、グルコース40%区、およびフルクトース40%区の3水槽からキンギョをそれぞれ5尾ずつランダムに採取し(平均体重 $7.70\text{g} \pm 0.92$ , SD,  $n=15$ 尾)、素早く解剖して肝臓のサンプリングをおこなった(図9)。なお、15尾中9尾が擁卵個体で、2尾からは寄生虫も確認された。取り出した肝臓はただちにRNAlaterで固定し、分析に供するまで約2週間冷蔵保存した。なお、グルコース20%区およびフルクトース20%区からのサンプリングは行わなかった。また、コイ、テラピアからのサンプリングも見送った(分析するサンプル数を減らすため)。

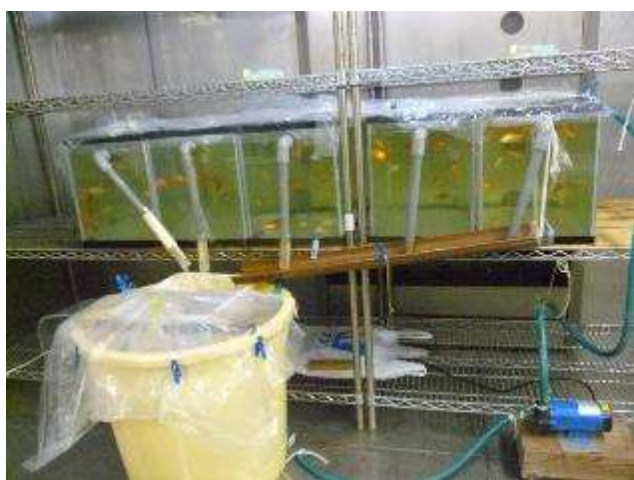


図8. 簡易飼育実験のセット(12月)



図9. 魚の解剖と肝臓のサンプリング(12月)

### 3. 遺伝子の発現解析

#### 3.1. RNAの抽出、濃度測定、DNase処理、逆転写

肝臓の脂質代謝に関わる遺伝子4種(表2)のmRNA量をリアルタイムPCRで定量した。まず、肝臓から全RNAを抽出した。ディスポーザブル試験管15本にそれぞれTrizol液1mLを入れた。RNA固定液からピンセットで組織片を取り出し、組織片に付着している固定液を除去した後、試験管に入れて60秒間ホモジナイズした。その後、ホモジナイズしたサンプル溶液を、試験管から1.5mLマイクロチューブに完全に移し替え。室温で5分間放置した。それぞれのマイクロチューブにクロロホルムを0.2mL加え、マイクロチューブにふたをして15秒間手で激しく震とうした。これらを室温で3分静置した後、2~8°Cで10分間高速遠心した。遠心が終わったら静かにマイクロチューブを取り出し、上層(水層)をできるだけ完全に無菌の1.5mLマイクロチューブに移した。これらにイソプロパノール0.5mLを加えてふたをして震とうし、室温で10分間静置した。次に、2~8°Cで3分間遠心し、遠心後ゆっくりチューブを傾けて上澄みを除去した。これらに75%エタノールを1mL加えて沈殿を洗った後、2~8°Cで5分間遠心した。遠心後、ゆっくりチューブを傾けて上澄みを除去し、沈殿が乾く前にDEPC水を200 $\mu$ L加えてRNA

## 環境フィールドワーク 2017 報告集より (抜粋)

を溶解した。沈殿を溶解するため、DEPC 水を加えたそのチップで沈殿を分散してから Vortex した。RNA が完全に溶解し、溶液が透明になった後、すぐに氷冷した。

次に、RNA 濃度の測定を行った。キュベット内部を蒸留水で洗い、キュベットを振って中を空にした。まず、蒸留水 100  $\mu$ L をキュベットに入れ、分光光度計内部のキュベットホルダーにセットした。その後、光度計のふたを閉めてブランクの読み取りをした。キュベット内の蒸留水を捨て、振って中を空にした後、再び蒸留水 100  $\mu$ L をキュベットに入れ、今度はサンプルとして蒸留水の吸光度を読み取り、Abs (Abs260、280、320) がすべてゼロであることを確認した。キュベット内の蒸留水を捨て、振って空にした後、次は蒸留水 99  $\mu$ L をキュベットに入れ、続いて RNA 水溶液 1  $\mu$ L を加えて、キュベットを振って均一になるように混ぜた。その後、キュベットホルダーにセットして光度計のふたを閉め、Abs を読み取った。同様の手順で残りのサンプルの吸光度も測定した。測定した RNA 濃度 (100 倍希釈) は、16.0~83.5  $\mu$ g/mL であった。この結果より、DNase 処理で必要となる試薬の量を計算した。

続いて DNase 処理を行った。RNA 水溶液を 1  $\mu$ L、RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer を 1  $\mu$ L、RQ1 RNase-Free DNase を 1u/ $\mu$ gRNA、そして ddH<sub>2</sub>O を加えて合計 10  $\mu$ L を PCR チューブに入れた。それを 37°C で 30 分サーマルサイクラーで加温した。続いて DNase を不活性にするため、RQ1 DNase Stop Solution を 1  $\mu$ L 加え、65°C で 10 分サーマルサイクラーで処理した。その後 2~8°C で保存した。

次に、逆転写反応を行った。200  $\mu$ L の PCR チューブに DNase 処理を行った RNA 水溶液を 1  $\mu$ g、Oligo (dT)18 Primer を 1  $\mu$ L、そして DEPC 水を加えて合計 8.6  $\mu$ L にした。これらの混合液を、サーマルサイクラーで 65°C-5 分間加熱し、素早く氷水で冷却した。その後、M-MLV 5X Reaction buffer を 2.5  $\mu$ L、dNTP Mix (10mM each) を 0.6  $\mu$ L、RNase Inhibitor を 0.3  $\mu$ L、M-MLV RT を 0.5  $\mu$ L 順に入れ、低速で Vortex した。サーマルサイクラーで 37°C-3 分間、引き続き 42°C-40 分間、75°C-10 分間加熱し、酵素反応を停止させた。RT 終了後の反応液 (12.5  $\mu$ L) に ddH<sub>2</sub>O 12.5  $\mu$ L 加え、flip、遠心した。

表 2. 定量 mRNA の種類と機能

略号	名称	機能
ACC	acetyl-CoA carboxylase-1	脂肪酸合成*
HMGCR	HMG-CoA reductase	コレステロール合成*
TK	transketolase	ペントースリン酸経路 (NADPH)
CPT	carnitine acyltransferase-I	脂肪酸 $\beta$ 酸化*
BA	beta-actin	ハウスキーピング

\*律速酵素を表す。

### 3.2. リアルタイム PCR

2018年1月22日、滋賀県立大学研究実験室においてリアルタイムPCRの反応液を調製した。NCBIのNucleotide Databaseから、表2に示す遺伝子の配列を検索し、Primer3ソフトウェアを用いてプライマーを設計した(キングヨの配列が不明な場合は、近縁種の配列をもとにDegenerateプライマーを設計)。プライマー10種類(fwd, rev × 5種類)をそれぞれddH<sub>2</sub>Oで希釈し2μMとした。次に1.5mlマイクロチューブにddH<sub>2</sub>O 55μl、SYBR Premix Ex Taq (2×) 125μl、および2μMのForward PrimerとReverse Primerをそれぞれ25μl加えVortexし、5種類のMaster Mixを調製した(表3)。

次にMaster Mixを、PCR8連チューブに11.5μlずつ分注し、cDNA Template (15種類)を各1.00μl加え、反応液を調製した。合計75個の反応液を作成し、4°Cの冷蔵庫中に1日保管した(図10)。翌日、生物工学実験室でリアルタイムPCR反応を行った(表4; 図11)。反応終了後、増幅されなかった反応と、融解曲線および増幅曲線から反応が異常と認められたものを除去した。PCR反応が有効(正常)と判断されたものに対し、Ct値を基に定量値(相対量)を算出した(表5)。相対値はBAで標準化した。



図10. リアルタイムPCR反応液の調製(1月)



図11. PCR反応(1月)

表3. Master Mixの組成

SYBR® Premix Ex Taq (2×)	6.25 μl
Forward Primer(2 μM)	1.25 μl
Reverse Primer(2 μM)	1.25 μl
cDNA template	1.00 μl
ddH <sub>2</sub> O	2.75 μl
total	12.5 μl

表4. リアルタイムPCR反応における反応条件

目的	温度(°C)	時間
初期変性(initial denaturation)	95°C	15秒
PCR反応:40サイクル	95°C	5秒
	60°C	20秒
融解曲線分析(dissociation analysis)	95°C-60°C-95°C	自動

### 3.3. .結果

表 5. 各 mRNA の定量値\*

遺伝子	Control			Glucose40%			Fructose40%		
	mean	±SD	n	mean	±SD	n	mean	±SD	n
ACC	0.05	---	1	---	---	0	0.17	0.12	4
HMGCR	8.29	11.68	2	0.64	---	1	0.24	0.19	3
TK	0.16	---	1	0.86	0.53	2	0.77	1.01	4
CPT	9.79	13.81	2	0.51	---	1	0.10	0.06	3
BA	1.00	0.00	2	1.00	0.00	2	1.00	0.00	4

\*定量値は、Ct 値をもとに算出した相対値を BA で標準化した値。なお、相対値の算出には次の式を用いた： 相対値 =  $1E+09e^{0.693Ct}$ 。 遺伝子の略号は、表 2 を参照。

” --- ” は「データなし」を表す。各 mRNA とも 5 サンプルを分析したが、qPCR で正常なデータが得られたもの (n) は少なくなっている。

### 3.4. 考察

リアルタイム PCR の結果において、全ての処理区において標準偏差が大きく、標本数が少なくなったため、有意差の有無に関して不明となった。すなわち、グルコースおよびフルクトースが何らかの生理的影響を有するか否かについて、本実験のデータから判断することはできない。また、PCR 反応後に約半数の標本が除外されたことについて、除かれたデータの反応液の cDNA Template が共通個体のもが多くを占めていたことから、逆転写された Template 内に PCR 阻害物質が混入していたか、逆転写が十分にされなかったため PCR 反応が進まなかったことが原因として推測される。今回の実験では、やり直す時間がなく、有意な結果を出すことができなかった。今後は、反応条件、実験操作などを改善することで、データの信頼性の向上する必要がある。

### 4. 参考資料、文献等

組織から RNA を抽出する (2017) 滋賀県立大学環境科学部. 生物資源管理学実験実習 V 配布プリント. 9 pp.

RT-PCR (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 滋賀県立大学環境科学部. 生物資源管理学実験実習 V 配布プリント. 8 pp.

リアルタイム PCR (2017) 滋賀県立大学環境科学部. 生物資源管理学実験実習 V 配布プリント. 7 pp.

Promega (2016) RQ1 RNase-Free DNase プロトコール (Cat# M6101).