

名取川流域における河川水中のミトコンドリア DNA 濃度の時系列解析

東北大学大学院工学研究科

宮崎大学工学部社会環境システム工学科

東北大学大学院工学研究科

東北大学大学院工学研究科

学生会員 ○内田 典子

正会員 糠澤 桂

正会員 風間 聡

正会員 久保田 健吾

1. はじめに

開発や気候変動等による環境負荷は、在来生物の生息場の劣化をもたらす。このため、野生生物、特に希少種やキーストーン種等の生息分布を把握することは保全生物学上極めて重要である¹⁾。従来の水域における生物調査は、目視や捕獲によるものが主であった。このため、広域調査や長期モニタリングを行う場合には時間的・労力の負担が大きい点、生物種の同定に専門知識が必要な点、調査結果に人的要因によるバイアスが介在する点等が問題であった。環境 DNA(environmental DNA, eDNA)手法はこれらの課題を解決し得る近年注目されている技術である。環境 DNA とは、生物の表皮や糞尿等を由来として環境中に放出された DNA を指す²⁾。対象種に特異な DNA の環境中における有無を調べることで、対象種の有無を判定できるため、従来の生物調査と比較して調査の効率化および結果の客観化が期待される。すでに湖沼などの閉鎖性水域を対象とした研究では、対象種の検出ならびに検出された DNA 量と生物量が比例することが明らかにされている³⁾。一方、河川など流水中における、または広域における環境 DNA 量の定量は閉鎖的環境よりも分解要因が多様であること、また輸送過程における拡散により低濃度で存在することなどから解析が難しく、いまだ知見が少ないのが現状である²⁾。

本稿では、河川水中の環境 DNA を定量 PCR により検出する方法を構築し、時系列的な環境 DNA 量の分析を行った。将来的には、分布型水文モデルを用いて、河道上における環境 DNA 量の動態を表現するモデルを構築する。このモデルと、観測された環境 DNA データを用いて、流域規模におけるバイオマスの推定を目的とする。

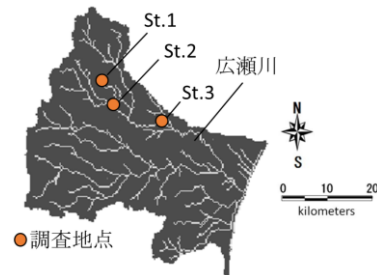


図1 調査地点 (St.1 が最上流)

2. 実験方法

対象地域として、宮城県広瀬川水系の3地点の河川区間を等間隔で設定し、2015年8月から12月にかけて月に1回の頻度でサンプリングを行った(図1)。水サンプルは河川表面水を合計2Lになるよう採水し、既往研究^{2,3)}に従い氷冷保存して実験室に持ち帰り、その日の内に吸引濾過を行った。濾紙は孔径0.7μm、直径90mmのGF/F(Whatman)、プレフィルターとして孔径2.7μm、直径90mmのGF/D(Whatman)を用いた。サンプルを捕捉させた濾紙はDNA抽出を行うまでアルミホイルに包み、マイナス20℃で保存した。

DNA抽出をDNeasy Blood & Tissue KIT(QIAGEN)のプロトコルに従って行った。抽出したDNAの濃度はPicoGreenを用いて測定した。プライマーには、真核生物のミトコンドリアDNAに含まれるCOI領域を標的としたLCO1490(5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'), HCO2198(5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3')を用いた(約710bpの増幅産物)。本プライマーは主に昆虫類が検出可能なプライマーとして開発されたものである⁴⁾。定量PCRの効率化のための前増幅処理にはABI®PreAmpMasterMixを用いて、初期酵素活性化を95℃で10分間行ったのち、95℃で15秒、60℃で4分のPCR10サイクルをTaKaRaPCRを用いて行った。定量PCRに関して、

キーワード バイオマス、環境DNA、ミトコンドリア、定量PCR

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 TEL:022-795-7455

SYBR®Premix Ex Taq(TaKaRa)を用いて、初期熱変性を 95℃で 20 秒行った後、95℃で 5 秒、53℃で 30 秒、72℃で 1 分間の PCR40 サイクルを LightCycler® 2.0 (Roche)を用いて行った。増幅産物の特異性の確認をアガロースゲル電気泳動により行った。また、定量 PCR のスタンダードには、同一河川から採取したヒゲナガカワトビケラの体組織から抽出した DNA をテンプレートとして、LCO1490-HCO2198 プライマーで増幅した PCR 産物を用いた。

3. 結果

図 2 に検量線に用いたヒゲナガカワトビケラ体組織から作成したスタンダード DNA $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^1 \text{copies/ng}$ および St.1 から St.3 のサンプル DNA の PCR 増幅をモニタリングした結果を、図 3 に $10^7 \sim 10^2 \text{copies/ng}$ までの検量線を示す。 10^1copies/ng 以下の濃度においては、検量線から外れたことから、本実験条件においては 10^2copies/ng 以上が定量 PCR による検出が可能な範囲であることが分かった。また、表 1 に河川水サンプルの環境 DNA 濃度の定量結果を示す。ここで、9 月 St.1 はサンプリングができなかったため欠測としている。12 月 St.3 のサンプルに関しては検量線の範囲外であったため、定量ができなかった。

4. 今後の課題と展望

本実験より、 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^2 \text{copies/ng}$ における信頼性の高い検量線を得ることができ、一部を除いて河川水サンプル中の遺伝子のコピー数を定量することができた。また環境 DNA 定量結果より、今回標的とした遺伝子領域数は抽出 DNA 中において非常に少なかったといえる。また定量 PCR で増幅させる塩基配列長は 80~300bp 程度が適切とされることから、今回用いた標的遺伝子領域 (710bp) が適当ではなかった可能性も

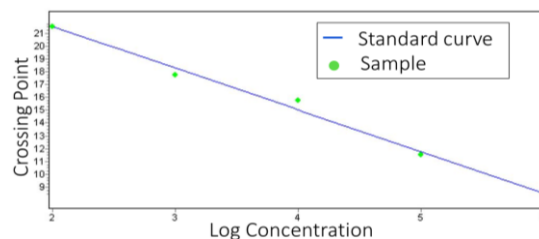


図 3：定量 PCR による検量線

表 1：河川水サンプルの測定結果($\times 10^3 \text{[copy 数/ng]}$)

	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月
St.1	4.6	欠測	1.7	80.0	2.3
St.2	2.5	1.2	3.4	1.1	0.001
St.3	1.1	1.2	1.4	9.0	n/a

考えられる。今後は数理モデルのインプットデータとして用いることを見据え、1) 実験過程におけるサンプルの損失量測定、2) サンプリング地点の増加、3) 標的遺伝子の再検討を行い、より環境 DNA 量定量の精度を高める必要がある。

謝辞:本研究は科学研究費補助金(25241024, 竹門康弘; 26630247, 渡辺幸三; 26820196, 糠澤桂)および福島県の助成を受け実施されました。ここに深く謝意を表します。

参考文献

- 1) 新井涼允, 糠澤桂, 風間聡, 竹門康弘: 水温環境の変化に伴う源流域における底生動物群集の将来変化, 水工学論文集, vol. 70, pp.1303-1308, 2014
- 2) Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., Gough K. C.: The detection of aquatic animal species using environmental DNA-a review of eDNA as a survey tool in ecology, Journal of Applied Ecology, vol. 51, pp.1450-1459, 2014
- 3) Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S. and Waits, L. P.: Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples, Canada Journal of Fisheries and Aquatic Sci., vol. 70, pp.1123-1130, 2013
- 4) Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R.: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 from diverse metazoan invertebrates, Molecular Marine Biology and Biotechnology, vol.3, pp.294-299, 1994

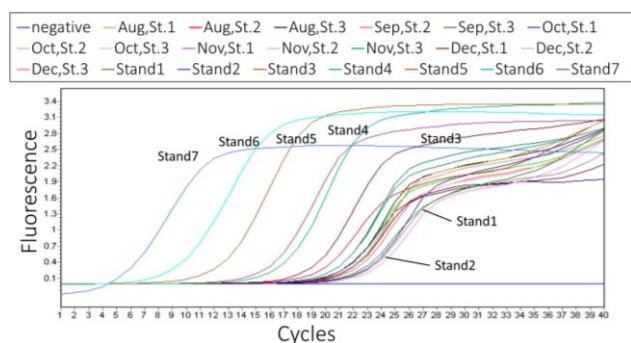


図 2：増幅曲線