

海草の季節変化における環境DNA検出に及ぼす分析阻害の影響検討

大成建設株式会社 正会員 ○赤塚真依子 高山百合子 フェロー会員 伊藤一教
港湾空港技術研究所 渡辺 謙太 正会員 桑江 朝比呂 神戸大学 源 利文

1. はじめに

環境影響評価において重要となる生物種の分布やその変化を入手するひとつの手法として、環境 DNA (以下 eDNA) が注目されており、著者らは eDNA による海草場モニタリングを目指している¹⁾。水域に放出された希薄な DNA を対象とする eDNA 分析は、現地作業が 1L 程の採水であり、季節によって水質や生物量が変化する実海域でのモニタリングに向けて eDNA 分析に影響を及ぼす要因の把握は重要である。eDNA 分析の PCR 反応への阻害物質として植物由来のフミン酸等があり²⁾、海草の eDNA 分析試料には底泥や海草由来の阻害物質が供給される可能性がある。本報告では、海草の eDNA 分析における分析阻害の影響度把握と対策検討に向けて、海草の量や状態(枯死体、発芽体)が異なる季節の海水と人工遺伝子を用い、分析試料の希釈や再精製による分析阻害の影響度把握を試みた。

2. 対象生物と採水

対象とした海草は、冬に発芽・生育し、夏季に枯死・脱落するアマモである。アマモが生育する水槽(3m×2m×平均水深 0.75m, 潮汐振幅 0.5m, 12.4h 周期)は、上潮時に地先の海水と 50% 交換している。本報告では、海草量が多い 6 月、枯死して海草が脱落する 8 月、9 月、発芽後の 2 月に水槽の表層水を干潮時に 1L 採水した(表 1, 図 1)。枯死し流出した海草は水槽から日々除去した。採水後、速やかにガラス繊維ろ紙(0.7 μ m, Φ 47mm)で 1L ろ過し、ろ紙を冷凍した。DNA の分析は、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を抽出試薬として用い、ろ紙上の残差物から DNA を抽出し¹⁾、100 μ l の抽出液を得て定量した。

表 1 採水時のアマモの状況

採水月	海草	草丈	密度
		[cm]	[本/m ²]
6月	生長期	100	175
8月	枯死期	30	100
9月	枯死期	20	50
2月	発芽期	10	225

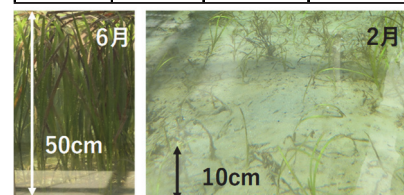


図 1 採水時のアマモの写真

3. eDNA の分析方法

アマモの DNA 定量は、リアルタイム PCR 解析 (以下, qPCR) によって行った。プライマーや PCR 反応の温度条件等は赤塚ら²⁾の方法とし、基本条件として、PCR 反応液 20 μ l あたり 2 μ l の DNA 抽出液を鋳型として分析した。本研究では、分析試料である抽出液に含まれる阻害物質が対象であることから、PCR 反応液に抽出液とアマモの人工遺伝子を添加することにより分析阻害の影響度を確認した。人工遺伝子は既知量を添加できるので、qPCR 分析で抽出液による阻害があれば、添加した量より低い分析値となる。分析阻害影響度の比較として、PCR 反応液 20 μ l あたり、2 μ l の DNA 抽出液とアマモの人工遺伝子(2×10²[copies])を添加した条件と、1 μ l の DNA 抽出液とアマモの人工遺伝子(1×10²[copies])を添加した条件について qPCR を実施した。比較のため蒸留水(以下、水)と水槽に汲み上げる前の海水(2 月採水)の分析を実施した。海水はアマモの DNA が非検出であることを事前に確認した。

分析阻害影響を低減する方法として抽出液に含まれる阻害物質を減らすことを目的に、①抽出液を希釈して分析する方法と②抽出液を再精製して分析する方法について検討した。①希釈による分析方法は、まず希釈が分析値に反映されるかを確認するために、アマモの人工遺伝子について 3 ケース(std2(2×10²[copies]), std3(2×10³[copies]), std4(2×10⁴[copies]))の溶液を用いて、それぞれ 2 倍、5 倍、10 倍の希釈液を分析した。その後、分析阻害の影響度を確認した試料(6 月～2 月の採水、水、海水)について 2 倍希釈液を、採水試料のうち DNA 量が多く含まれる 6 月の抽出液を用いて 5 倍、10 倍の希釈液を分析した。qPCR 分析において阻害の影響があれば、希釈なしの分析値は希釈ありの分析値に比べて低くなる。②抽出液の精製は、阻害物質を除去するカラム(OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (ZYMO RESEARCH))に抽出液を通し、精製前の抽出液と比較した。阻害の影響があれば、精製なしの試料で PCR の増幅が阻害されて低い値となると考えられる。

キーワード：環境 DNA 海草 環境影響評価 モニタリング 阻害物質 フミン酸

連絡先 : 〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設(株)技術センター TEL 045-814-7234

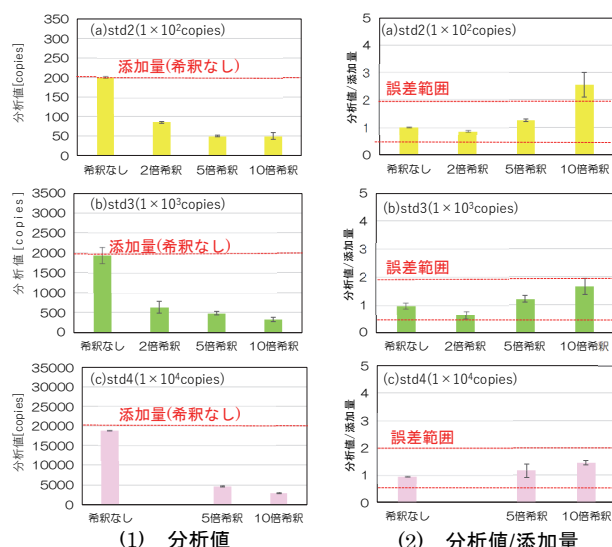


図2 人工遺伝子による分析感度確認

3. 試験結果

(1) **希釈と分析値の関係** 人工遺伝子を用いた希釈液の分析結果を図2に示す. 図2(1)は分析値であり, 希釈することで値が低く検出されることを確認した. 図2(2)は, 希釈なしの分析値に対する増減割合を比較するために分析値を人工遺伝子濃度で除した値を縦軸とした. 一般にPCR反応1サイクル分となる0.5~2倍の範囲で反応誤差があるとされている反応誤差範囲で, std2(2×10^2 [copies])の5倍, 10倍希釈における差異が反応誤差を上回ったが, それ以外は反応誤差以内であった. これよりDNAが 1×10^2 [copies]オーダーの場合は2倍希釈, DNAがそれ以上のオーダーであれば10倍希釈までは有効な操作であると考えられた.

(2) **人工遺伝子による阻害物質の影響確認** 採水試料の分析結果を図3(a)に示す. 各試料について分析阻害が無い場合に得られると考えられる分析値を想定値として, それと比較することにより影響を確認した. 水の想定値は, 阻害物質の混入が無いと考えられるので人工遺伝子量のみから得られる値である. 海水は, アマモDNA以外の影響があれば差異が得られる. 水槽水(6月~2月)は, 抽出液について事前に確認したアマモDNA量と添加した人工遺伝子量の合計を想定値とした. 図3(a)より, 2月を除いて分析値が想定値と同程度となりこれらは阻害の影響がないと考えられた. 次に, 希釈による阻害影響の変化を見るために2倍希釈した結果を見ると(図3(b)), 6月は想定値に比べ高い分析値となり, 2月は希釈なしに比べて想定値との差異が低減した. これは, 希釈をすることで阻害影響が低減され, 希釈なしでは阻害物質の影響があった可能性が示唆された. なお, 枯死期の8月, 9月に比べ, 生物量が少ない2月の阻害要因としては水槽内に数株生育している多年草の脱落影響などが考えられ, 今後整理が必要である.

(3) **阻害の影響対策** 図4に6月試料を用いて阻害対策検討結果を示す. 図2と同様に反応誤差の範囲を示し, 縦軸は希釈なしの分析値に対する増減割合を比較するため, 希釈倍率を乗じた分析値を希釈なしの分析値で除した値を示す. 5倍, 10倍希釈は反応誤差範囲を超え, 希釈なしの2倍以上の値を示したことから, 阻害影響が希釈により低減されることで高い値となった可能性が考えられる. 一方, 再精製した結果は希釈なしから半減した. これは, 精製時に阻害物質とともにDNAも一部除去されるが, 6月試料の濃度では, DNAの除去影響が大きいと考えられた.

4. まとめ

アマモを対象としたeDNA分析への阻害影響を検討し, 海草の量や状態など採水する季節が異なることで阻害影響が一部ある可能性が明らかとなった. 希釈操作によって阻害影響を低減できる一方, 低濃度のDNA分析では分析誤差が大きくなり, 精製ではDNA損失もあることから, 低濃度のeDNAを対象とした対策方法の確立が重要と考えられる. 将来, 水質や生物量が変化する実海域でのモニタリングに活用するためには, 分析時の条件を規格化する必要があり, 今後, 抽出液に与える阻害物質の要因や物質の特定, 抽出液内に含まれる阻害物質の評価方法など分析時の対策やeDNAが低濃度の場合の採水量, 抽出方法などの検討を進める予定である.

参考文献: 1) 赤塚真依子 他: 海草場を対象とした環境DNA検出方法と三次元数値解析の適用性に関する検討, 土木学会論文集B2(海岸工学), 74(2), 1225-1230, 2018. 2) McKee AM et al.: The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples, Biological Conservation, 183:70-76, 2015

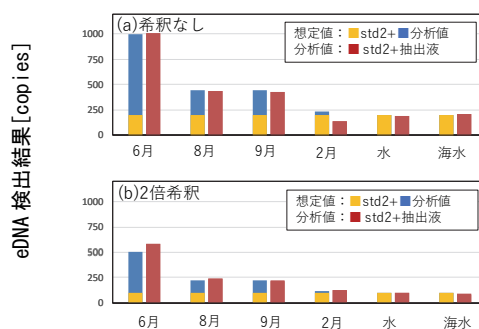


図3 人工遺伝子添加によるeDNA検出結果

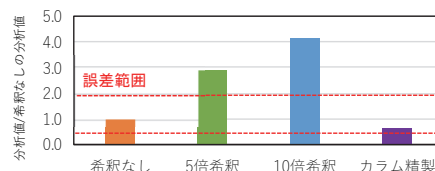


図4 阻害対策検討結果(6月)