海草の環境 DNA の定量化に向けた分析条件の検討

大成建設株式会社　正会員　○赤塚　真依子　正会員　高山　百合子
正会員　ムチェブエ　エドウィン　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

著者らは，採水した試料から生物情報を入手する環境 DNA を活用し，海草場の繁茂や枯死をモニタリングすることを目標に，実海域で調査している [1)]．2019 年 6 月（枯死期）調査では，採水試料の運搬や分析等の操作性の観点から採水量を 1 L としたが，現地の環境 DNA 量が希薄で，同時に採取した 3 試料を分析すると検出の有無が混在し，検出値は定量下限以下だった．モニタリングに活用するためには定量性の確保が重要な課題であり，分析する DNA 量を増やすことで解決できる可能性がある．その方法として，採水量の増量，DNA 抽出時の抽出液量の減量（濃縮），抽出液から分取する分析液量の増量等がある．しかし，前述の方法で DNA 量を増やすと，分析時に DNA の増幅を阻害する物質（海水に含まれる腐植物質等の夾雑物 [2)]）も増えることが懸念され，対策が必要である．本研究では，海草が生育する水槽の海水を用いて，環境 DNA 量が低い試料を対象とした採水量，抽出液の濃縮，分析液量の検討と阻害対策として磁性ビーズ精製の効果を確認した．

２．試験方法

浅海域に生育する海草であるコアマモの環境 DNA（182bp）を対象とし，コアマモが生育する干潟水槽 [3)]の貯水槽（**図１**）から**表１**に示す量を採水した．貯水槽は，連結している干潟水槽と海水を循環させることで潮汐を制御し，週 2 回，地先の海水と 80%交換している．分析手順を図 2 に示す．採水後，1L（従来法），10L，20L の海水をそれぞれ 1 枚のガラス繊維ろ紙（0.7μm，Φ47mm）でろ過し，冷凍保存した．抽出試薬として DNeasy BLood & Tissue kit（QIAGEN）を用い，ろ紙上の残差物から DNA を 100μL または 25μL に抽出した（抽出液）．抽出液から 2μL または 5μL を分取し，定量 PCR 分析した [1)]．阻害対策として，磁性ビーズ Agencourt AMPure XP（BECKMAN COULTER）による抽出液の精製を行った．阻害影響の有無は，既知濃度のアマモの人工遺伝子（131bp）で確認した．

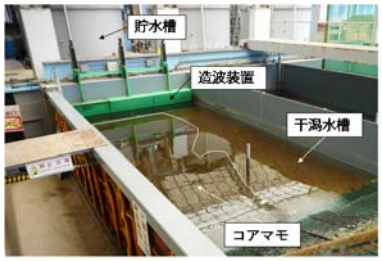

図１　干潟水槽

表１　試験条件

	採水日時	採水量	抽出液量	分析液量	精製
（1）	2019年 11月26日	1L×3本, 10L×1本	100μL 100μL	2μL，5μL	あり，なし
（2）					
（3）	2019年 12月12日	1L×6本, 10L×6本, 20L×1本	100μL，25μL 100μL，25μL 100μL	5μL	あり，なし

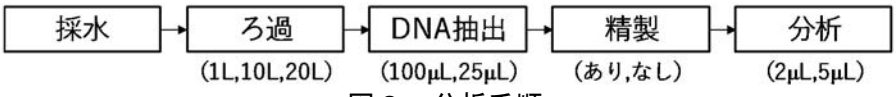

図２　分析手順

３．試験結果

（１）採水量と分析液量の予備検討　従来法（1L）の分析では検出なしとなった水槽の海水を用いて，採水量，分析液量の予備検討を行った（**図３**）．まず，採水量を 1L から 10L にすることで，定量下限を超えた DNA 量が得られた．次に，分析液量を 2μL から 5μL にすることで，1L の分析でも DNA の増幅を確認した．また，分析液量 2μL では精製の有無で結果に差はなかったが，分析液量 5μL では精製ありで，精製なしの値に比べ数倍高い DNA 量となり，精製により阻害影響が低減できる可能性が得られた．

キーワード：環境 DNA　海草　採水量　生物調査　分析阻害　磁気精製
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

© Japan Society of Civil Engineers

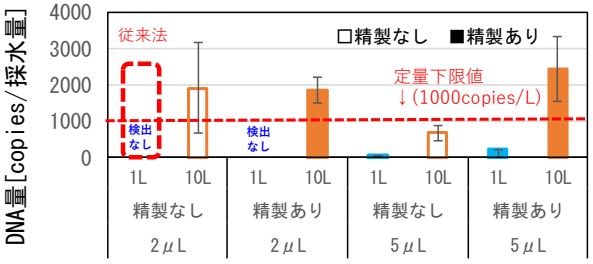

図３　予備検討結果

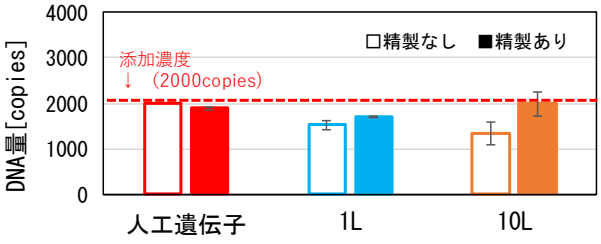

図４　阻害影響の低減効果（分析液量：2μL）

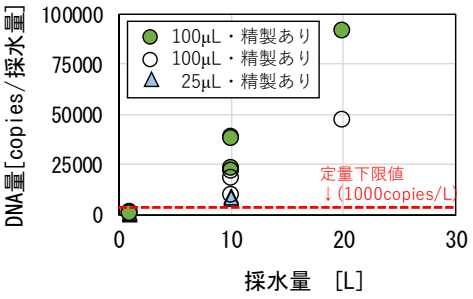

図５　採水量と抽出量の検討

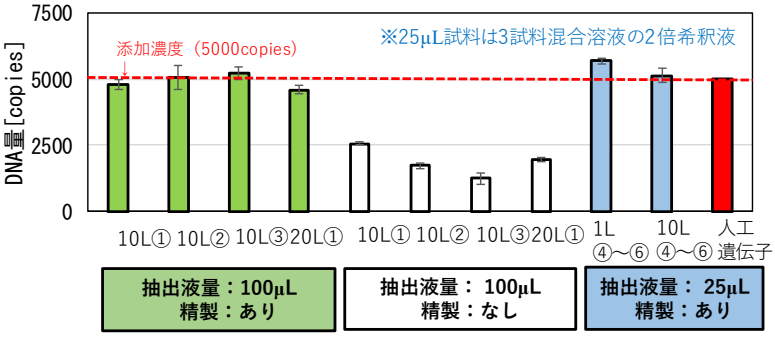

図６　阻害影響の確認（分析液量：5μL）

（２）人工遺伝子による阻害影響の確認　磁性ビーズによる精製は，一般に PCR 産物の精製法として NGS 解析等で採用されている．夾雑物を除去し，100bp 以上の DNA 断片を高回収する特徴がある．定量 PCR 分析で用いる場合は，精製時に阻害物質とともに対象とする DNA が除去され，DNA 量が低下する可能性が懸念される．精製による DNA 量の低下と各抽出液の阻害影響の低減効果を確認するため，人工遺伝子（1×10^3copies/μL）の検出確認を行った（**図４**）．既知濃度の人工遺伝子溶液を精製後に分析した結果，添加した人工遺伝子量の 95%（CT 値 Δ0.3）の値を示したことから，精製による人工遺伝子の DNA 量の低下は分析誤差の範囲内と考えられる．また，各試料での阻害影響をみると，精製ありの条件で，より既知濃度に近い値を検出したため，精製により阻害影響が低減されたと考えられる．

（３）採水量，抽出液量の検討　（１），（２）より，採水量，分析液量の増量と精製の有効性を確認したため，試料数を増やし，分析液量を 5μL とした場合の採水量と抽出液量を**表１**の条件で分析した（**図５**）．10L の結果をみると，抽出液量を 100μL とした試料は，精製なしに比べ，精製ありで高い値を示した．また，抽出液量を 25μL に減らし，抽出する DNA を濃縮することで 4 倍の値を期待した条件では，100μL に比べ低い値となった．阻害の影響を人工遺伝子（1×10^3copies/μL）で確認した結果を示す（**図６**）．抽出液量 100μL では，精製なしで DNA 量が添加した人工遺伝子量から半減したことから，阻害の影響があると判断した．精製ありでは，添加量相当の値を示し，阻害影響はないと判断した．抽出液量 25μL では，分析液量確保のため 3 試料の混合液を 2 倍に希釈した溶液で確認し，阻害影響はないまたは少ないと判断した．**図５**の抽出液量 25μL の条件で DNA 量が 100μL に比べ低くなった要因の一つとしては，抽出時に DNA を抽出液へ溶解しきれなかった可能性が考えられる．抽出液の濃縮については溶出効率などの確認などが必要である．従来法（1L）では検出なしとなった海水は，100μL に抽出した抽出液を精製後，分析液量を 5μL として分析することで，1L~20L のいずれの試料でも DNA を検出し，10L，20L と採水量に応じて DNA 量が高くなる傾向を確認できた．

４．まとめ

コアマモが生育する水槽の海水を用いて採水量，抽出液量，分析液量を検討し，採水量，分析液量で有用な結果が得られた．分析液量を増やすことで，従来法では検出なしとなった 1L で DNA の増幅を確認し，採水量を増やすことで，10L，20L では定量下限を超えた値を得ることができた．ただし，採水量や分析液量が増えると，分析阻害の影響も大きくなるため，精製による阻害物質の除去が必要であることが明らかとなった．

参考文献：1)赤塚真依子他：海草場を対象とした環境 DNA の季節変化・日変化・形態変化に関する基礎研究，土木学会論文集 B2（海岸工学），75(2), 1075-1080, 2019.2) McKee AM et aL.:The effect of diLution and the use of a post-extraction nucLeic acid purification coLum on the accuracy, precision, and inhibition of environmentaL DNA sampLes, BioLogicaL Conservation, 183:70-76, 20153) 桑江朝比呂 他：干潟実験施設における底生生物群集の動態，港湾技術研究所報告，36(3), 3-35, 1997.

© Japan Society of Civil Engineers