

環境 DNA を利用したヒゲナガカワトビケラの生息地検索

山梨大学	学生会員	○村松	和十
山梨大学	正会員	金子	栄廣
山梨大学	正会員	平山	けい子
山梨大学	正会員	八重樫	咲子

1. はじめに

近年、環境 DNA を用いた生物調査が注目されている。環境 DNA とは生物の体外に放出され、水中に存在している DNA のことを意味し、生物の皮膚片や排泄物などが由来であると考えられている。環境 DNA を用いた生物調査は採水とそれに含まれていた DNA 分析により対象生物の生息地を確認する。このため捕獲や目視などで行われている従来の生物調査に比べて、環境 DNA による生物調査では低コストで時間や労力を削減できる。また従来法よりも捕獲が困難である種や生息密度が低い種の確認が容易であると報告されている¹⁾。

環境 DNA を検出する方法には、主に種特異的領域の PCR 増幅、リアルタイム PCR、デジタル PCR、メタバーコーディングの 4 種類がある。種特異的領域の PCR では種特異的な領域を PCR 増幅することで対象種の DNA を検出する。DNA の定量性が低いことが欠点であるが、他手法に比べ安価で容易に DNA を検出できる。リアルタイム PCR は環境 DNA に含まれている対象種由来の DNA を定量する。生物量の推定にも利用できる。デジタル PCR はリアルタイム PCR よりも優れた定量と検出ができる。しかし、リアルタイム PCR とデジタル PCR で使用する機器は高額であり、またランニングコストも高い。メタバーコーディングでは、次世代シーケンサーを利用して環境 DNA 全体の網羅的な DNA 解析を行う。水生生物の群集解析が可能であるが、解析には高額な機器と試薬を要し、データ解析に専門的な知識を要するという欠点がある¹⁾。したがって安価に対象種の生息域を検索するためには、環境 DNA の種特異的領域の PCR が有効である。

本研究では種特異的な領域の PCR にマイクロサテライトマーカースを利用する。マイクロサテライトとは 2 ～ 6 塩基が連続して繰り返されている反復配列（例：ACACACACA）で、非常に変異性の高い領域である。マイクロサテライトマーカースとはこの領域を PCR 増幅するプライマーを指し、種ごとに設計されており、種特異性の高い PCR 増幅が可能である。このマーカースはこれまで多くの種で設計されてきたが、環境 DNA から特定種の DNA 検出するために用いた例は少ない。

本研究ではマイクロサテライトマーカースを利用した種特異的な領域の PCR により、環境 DNA から水生昆虫ヒゲナガカワトビケラの DNA を検出し、同種の生息地の検索を行う。ヒゲナガカワトビケラは日本全土の河川でよく見られる水生昆虫で、マイクロサテライトマーカースが開発されている種である。

2. 研究方法

2-1 現場調査と採水

富士川水系の上流から中流までの 9 地点で調査を行った（図 1）。富士川水系は山梨県北巨摩郡白州町と長野県諏訪郡富士見町境の鋸岳が水源となっている。①②⑤が釜無川、③④が塩川、⑥⑦⑧が笛吹川、⑨が合流点となっている。

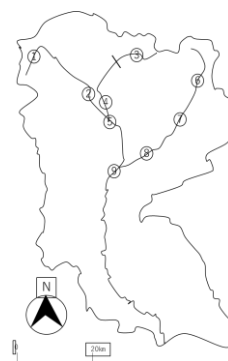


図 1 富士川流域図

キーワード 環境 DNA, PCR, マイクロサテライトマーカース, ヒゲナガカワトビケラ

連絡先 〒400-8510 山梨県甲府市武田 4 丁目 4-37

TEL : 090-7933-1558 E-mail: sakikoy@yamanashi. ac. jp

各調査地点ではヒゲナガカワトビケラの採集と採水を行った。ヒゲナガカワトビケラは生息状況の確認など、水は環境 DNA の採取を目的として採集した。底生動物は各地点でランダムに 3 箇所選択し、コドラート付きサーバーネット（コドラートサイズ：25cm x 25cm，メッシュサイズ：250 μ m）を河床に設置した。そこで石などに固着している底生動物はブラシを用いて採集し、砂層に生息する底生動物については足などで掘り起こしてネットに捕捉した。その後、サーバーネットから底生動物を取り出し、99.5%エタノールで固定した。採水では、10L の採水バックを用いて採水した。水は常温で実験室に持ち帰り、できる限り速やかに濾紙（MEMBRANE FILTER，孔径 0.2 μ m，直径 47 mm，ADVANTEC）を用いて濾過（300ml ずつ 5 回）した。濾過に用いた濾紙は 1.5 mm チューブに入れて -20℃ で保存した。

2-3 DNA 抽出

保存していた濾紙を強熱滅菌したピンセットやハサミを用いて裁断した後、HMW buffer (1M Tris 2ml, 2.5M NaCl 6ml, 0.5M EDTA 4ml, 滅菌ミリ Q 水 188ml) を加えフェノールクロロホルム法とエタノール沈殿により DNA を抽出した。その後、TE buffer 100 μ l で DNA を溶出した。しかしこの手法で抽出された DNA には PCR 阻害物質が含まれている可能性があることから、One Step PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research 社) を用いて PCR 阻害物質を除去した。

2-4 PCR 増幅

各地点で得られた環境 DNA の PCR 増幅を行った。プライマーには 7 種類のマイクロサテライトマーカーを使用した(表 1)。反応溶液は滅菌水 3.35 μ L, 10 $\times$ ExTagBuffer 1 μ L, 25 μ M MgCl₂ 0.8 μ L, dNTP 0.8 μ L, forward primer 1 μ L, reverse primer 1 μ L, exTag 0.05 μ L (以上 TaKaRa), 10% Tween20 1 μ L (関東化学株式会社), 10 倍希釈した混合 DNA 1 μ L を加え、全量 10 μ L になるように調整した。PCR 条件は、98℃ で変性、各マーカーに合った温度でアニーリング、72℃ で伸長反応、サイクル回数を 35 回とした。PCR には PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa)を使用した。PCR 反応後電気泳動を行い、PCR 産物の確認をした。

表 1 マイクロサテライトマーカー

マーカー名	領域	PCR産物の範囲(bp)	アニーリング温度(℃)
Steno01	(AC) ₁₃	105-117	55
Steno02	(TG) ₇	236	45
Steno03	(AC) ₈	169-193	50
Steno04	(AC) ₈	176-204	50
Steno05	(TG) ₇	198-200	47
Steno07	(AC) ₁₀	314-330	55
Steno08	(CA) ₁₆	204-228	47

3. 結果・考察

調査した 9 地点のうち、ヒゲナガカワトビケラが生息する地点⑤で環境 DNA からヒゲナガカワトビケラの DNA 増幅が確認できた(図 2)。このことから環境 DNA からヒゲナガカワトビケラの DNA を検出にマイクロサテライトマーカーが利用できる可能性が示された。また、ヒゲナガカワトビケラが生息しているにも関わらず DNA が検出できない地点も存在した。これは各地点の水質や環境特性が要因である可能性がある。

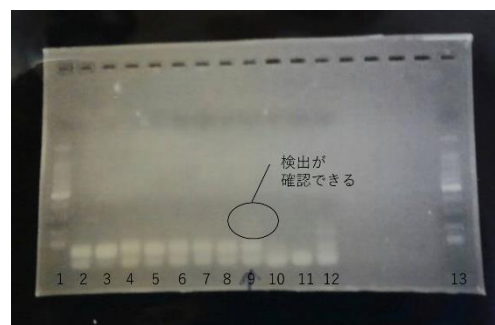


図2 電気泳動結果
1・13 100bpラダー
2～10 調査地点
11・12 ポジティブコントロール

参考文献

1) 高原輝彦、山中祐樹、源利文、土居秀幸、内井喜美子、環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～、日本生態学会誌 66 号、583-599、2016

謝辞

本研究は科学研究費補助金（番号 16H04437, 16K18174）の資金的援助を受けました。謝意を表します。