

環境DNAの精製時に発生する誤差要因に関する基礎検討

国立研究開発法人土木研究所

正会員 ○鈴木 宏幸 村岡 敬子 中村 圭吾

1. 背景と目的

河川水や土壌等の環境中に含まれる生物の組織片からDNAを抽出し、そこから得られる生物情報を活用した生物調査（以下、環境DNA調査）が近年注目されている。

河川で環境DNA調査を実施する際、必要なサンプルは河川の水であり、直接生物を捕獲する必要が無い。そのため今後の河川管理において、採捕調査では多大な労力を要する種や希少種といった、採捕が困難な種の調査等への活用が期待されている。

実際に環境DNA調査を河川管理の現場に適用する場合、他の調査と同様に、調査者や使用機材が毎年度同じとは限らない。そのため調査手法の汎用性や信頼性ととも、調査結果を経年的に比較し、環境の評価へつなげていくために再現性を確保することは重要である。

環境DNA調査では調査地点の選定を含め、目的に応じた配慮が必要とされており、たとえばサンプリング地点の選定が結果に影響を及ぼす¹⁾という報告もある。土木研究所でも共同研究²⁾を通じて、個々の現場で想定される課題について基礎実験および現地での検証を進めており、あわせて実験室内における作業においても基礎的な検討を行っている。

本報では図-1に示す環境DNA調査の流れのうち、Step 3における環境DNAの精製作業に着目して実験を行った結果の第一報を報告する。

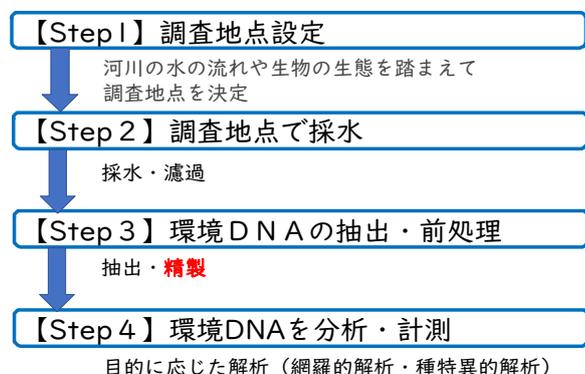


図-1 河川における環境DNA調査の流れ

2. 方法

実験では、表-1に示す実験経験年数の異なる3人の作業者が、手順の異なる2つの手法でDNA精製作業を各種法で7サンプル実施し、得られたサンプルのDNA濃度を比較した。

実験で使用したサンプルは、あらかじめ自然環境下で採水し、抽出しておいた環境DNAサンプルで、これを混合、希釈し、均質なサンプル（濃度 25ng/ μ L）とした。このサンプルを1人の作業者が使用する量（320 μ L）に3本分を分注し、ディープフリーザー（-80 $^{\circ}$ C）へ保管し、作業員毎の実験開始直前に解凍した。

続く一連の作業は、作業員全員が同じ方法で手動ピペットを用いて実施した。まずサンプルを20 μ L毎に14本分注し、各手法7サンプルずつ精製作業を行った。図-2に本実験で実施した2手法を示す。手法Aはフィルター付の専用スピニングカラムを用いた手法で、サンプルや試薬の添加後、DNAと不純物の分離は遠心分離を用いた。手法Bは手法Aと同様のサンプルや試薬の添加作業のほか、DNAと不純物の分離手順でピペットによる上清の吸引作業があり、この部分はより作業員の技能を必要とする。

3. 結果と考察

図-3に、精製作業後のサンプルのDNA濃度を示す。経験年数の長い作業員aとbの濃度は、手法にかかわらず5~6ng/ μ Lの値にまとまり、ばらつきの少ない結果となった。一方経験の短い作業員cでは、両手法とも作業員a、bと比べて濃度が低く、作業員aとc、またbとcの間に有意な差（ $p < 0.01$ ）が

表-1 実験作業員の技能と実験に要した時間

作業員	実験経験年数	各手法で7サンプルの処理に要した時間
a	20年以上	手法A：15分程度
b	10年程度	手法B：30分程度
c	ほぼ未経験	手法A：30分程度 手法B：1時間程度

キーワード 環境DNA, eDNA, 河川管理

連絡先 〒305-8516 茨城県つくば市南原1番地6 (国研) 土木研究所 TEL: 029-879-6775 E-mail: h-suzuki@pwri.go.jp

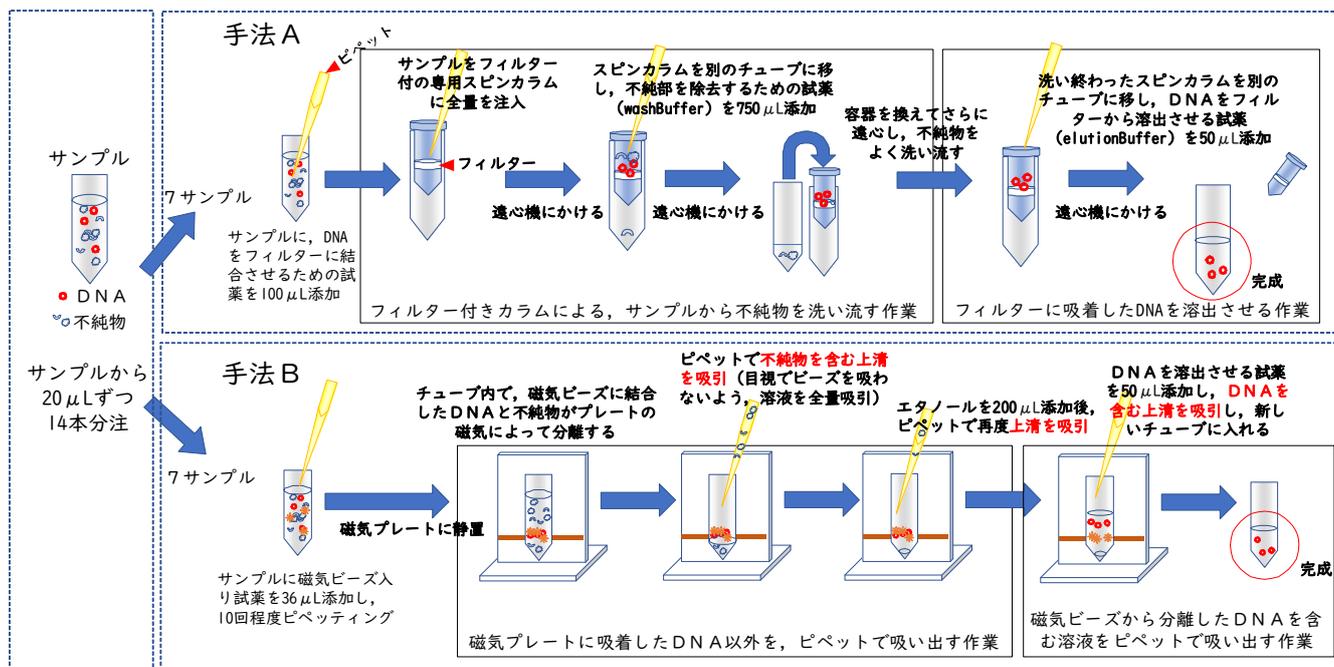


図-2 本実験で比較したDNA精製手法

見られた。さらに作業者 c の手法ごとの結果を見ると、手法Bの値にばらつきが見られた。また一連の作業に要した時間は、作業者 a, b に大きな違いはなかったが、作業者 c は倍ほどの時間を要した(表-1)。

この作業者 a, b と c の結果に差が見られた要因としては、作業者の技能によるピペット操作の不正確さと、作業時間の長さ双方の影響が考えられる。

なおピペット操作の不正確さについては、電動ピペットを用いることにより改善が期待できる。しかし手法Bに関しては、上清の吸引作業があることから、すべてを電動ピペットに置き換える事は困難である。

4. まとめ

DNA精製作業を対象とした本実験の結果から、作業者の技能および手法の選択が結果に影響を及ぼす可能性が示唆された。今回は2手法の比較であったが、DNAを精製するキットはほかにも複数あり、今後はそれらも含めて比較することで、調査目的に適した手法を選択するための検討を進める。また別の作業工程においても同様の検討を行うとともに、経済性や作業の簡便性も踏まえた最適な手法を提案することで、河川管理者の環境DNA調査の活用に寄与する情報を提供していく。

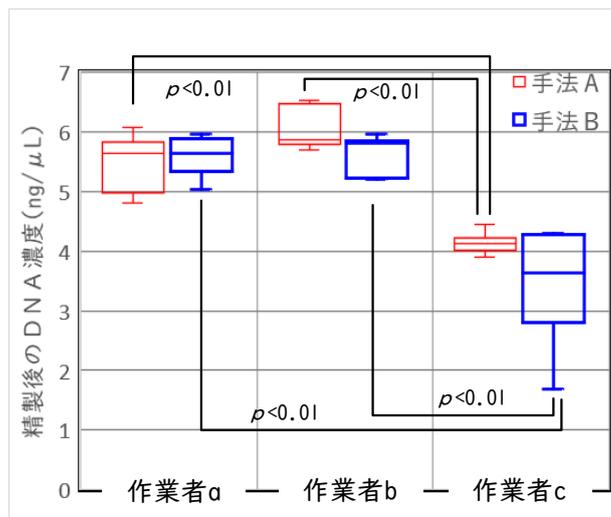


図-3 精製作業後のDNA濃度比較

(p値：等分散を仮定した2標本によるt検定)

参考文献

- 1) Bylemans, J. Gleeson, M. D. Lintermans, M. Hardy, M. C. Beitzel, M. M. Gilligan, M. D. Furlan, M. E. : Monitoring riverine fish communities through eDNA metabarcoding: determining optimal sampling strategies along an altitudinal and biodiversity gradient, Metabarcoding and Metagenomics 2: p 1-12, December 2018
- 2) 土木研究所「河川・湖沼における環境DNA活用技術に関する共同研究」
<https://www.pwri.go.jp/team/rrt/joint.html>