

Nested PCR 法を利用した環境 DNA メタバーコーディングの検討

山梨大学 学生会員 ○佐々木 優人 山梨大学 正会員 原本 英司
山梨大学 正会員 金子 栄廣 山梨大学 正会員 八重樫 咲子

1. はじめに

近年、人間社会と野生動物の行動圏が重なり合うようになり、新興人獣感染症の発生や農林業への被害などの野生動物の人間社会への被害が問題視されている。例えばシカが樹木の樹皮や枝を食べてしまう林業への被害、タヌキやイノシシなどが畑に侵入し農作物を食べてしまう農業への被害が挙げられる。令和3年度の野生鳥獣による農作物被害は全国で約155億円にものぼる。また、野生動物による水源汚染の可能性も指摘されている。

野生動物の被害に対策するためには、生息する生物やその行動を明らかにする必要がある。これまでに野生動物の生活圏や多様性を把握するため、生物の痕跡を利用した生物調査が行われてきた。例えば直接観察調査法では、目視あるいは双眼鏡などを用いて個体を観察して生息密度を測定する。生活痕跡調査法では食痕や足跡、フンのなどの生活痕跡から生息種を推定している。さらに捕獲調査法ではワナを用いて捕獲・捕殺し種を同定する。また、センサーを利用したカメラで動物を自動的に撮影し映像で種類を判別する自動撮影調査法や、GPS 機器を利用した野生動物の行動調査もこれまでに行われてきた¹⁾。しかし、従来型の調査方法は調査のために多大な時間や労力を要する点や、機器のバッテリー継続時間などの問題点から、継続的な調査は困難である場合もあった。

そこで本研究では野生動物が日常的に利用するヌタ場に注目し、ヌタ場の泥中の環境 DNA を用いた分析により野生動物相の調査を行った。ヌタ場とは、野生動物が体温調節や体表のダニなどの外部寄生虫などから身を守るために体に泥を塗る（以下、ヌタ浴び）場所であり、さまざまな野生動物が利用することで知られている。ヌタ場を利用する過程で野生動物はヌタ浴びの過程で、自身の DNA を含む体毛や精液などをヌタ場に残していくことが予想される。したがって、ヌタ場の泥にはヌタ場を利用した生物由来の DNA（環境 DNA）が含まれると考えられる。ヌタ場の底泥中に残された生物の DNA を分析し、その由来となった生物名を明らかにする（DNA バーコーディング）ことで、従来型の調査よりも簡便にヌタ場を利用した野生動物を明らかにできる可能性がある。

以上の背景より本研究では、野生動物がヌタ場の泥中の環境 DNA メタバーコーディングを行うことで、ヌタ場を利用する野生動物を検出することを目的とした。

2. 研究方法

2-1 ヌタ場の泥からの DNA 抽出

本研究ではカメラ調査でニホンジカおよびイノシシの利用が確認されている 2 箇所のヌタ場から、2020 年 10 月および 11 月に底泥の泥を採集した。この泥は実験室へ持ち帰り、DNA 抽出まで冷凍で保管した。DNA は ISOIL for Beads Beating と Fast Prep spin kit for soil 2 種類のキットを用いて、プロトコルに沿って抽出した。

2-3 哺乳類由来の DNA の PCR 増幅

ヌタ場泥から抽出した環境 DNA を鋳型として、通常の PCR とネステッド PCR の 2 種類の PCR 増幅を行った。まず、一般の PCR には MiMammal primer セット²⁾を用いた。これは哺乳類の 12s rRNA 領域を増幅するプライマーである。反応溶液は通常の PCR では PCR 用 water (ThermoFisher Science) 5.3μL, 10mM dNTP (New England Bio Lab) 0.2μL, GC Buffer (New England Bio Lab) 2μL, 10μM forward primer および reverse primer 0.2μL, Phusion (New England Bio Lab) 0.1μL, 10% Tween20 (関東化学) 1μL, 2 倍希釈した

キーワード ヌタ場 野性動物 Nested PCR 環境 DNA 環境 DNA メタバーコーディング

連絡先 〒400-8511 山梨県甲府市武田 4 丁目 3-11 TEL : 055-220-8596 E-mail : t18ce020@yamanashi.ac.jp

DNA 1 μ L を加え、全量 50 μ L に調整した。PCR 反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TAKARA) を用いた。PCR 条件は、95 $^{\circ}$ C3 分の変性反応の後、95 $^{\circ}$ C30 秒の変性反応、55 $^{\circ}$ C30 秒のアニーリング、72 $^{\circ}$ C20 秒の伸長反応を 35 サイクル行い、72 $^{\circ}$ C5 分の伸長反応の後に 4 $^{\circ}$ C で保存した。

次にネステッド PCR を行なった。ネステッド PCR 法はサンプルに含まれる解析対象生物の DNA が少ない場合に用いられる方法である。この方法では、最初に PCR で解析対象領域を含む広い範囲を予備増幅し、その PCR 産物を鋳型として解析対象領域を改めて PCR で増幅する 2 段階の PCR を行う。1 段階目の PCR では PCR 用 water (SIGMA-ALDRICH) 5.3 μ L, 10mM dNTP (New England Bio Lab) 0.2 μ L, GC Buffer (New England Bio Lab) 2 μ L, 哺乳類の 16s rRNA 領域および 12s rRNA 領域の全長を増幅する R1 および S1 primer³⁾ (10 μ M) それぞれ 0.2 μ L, Phusion 0.1 μ L (以上 TaKaRa), 10% Tween20 1 μ L, 2 倍希釈した DNA 1 μ L を加え、全量 50 μ L に、2 段階で滅菌水 5.3 μ L, 10mM dNTP 0.2 μ L, GC Buffer 2 μ L, forward primer 0.2 μ L, reverse primer 0.2 μ L, Phusion (New England Bio Lab) 0.1 μ L, 10% Tween20 (関東化学) 1 μ L, 2 倍希釈した DNA 1 μ L を加え、全量 50 μ L に調整した。PCR 反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TAKARA) を用いた。PCR 条件は、96 $^{\circ}$ C3 分の変性反応の後、96 $^{\circ}$ C30 秒の変性反応、50 $^{\circ}$ C30 秒のアニーリング、72 $^{\circ}$ C2 分の伸長反応を 30 サイクル行い、72 $^{\circ}$ C5 分の伸長反応の後に 4 $^{\circ}$ C で保存した。ここで得られた PCR 産物 1 μ L を鋳型として、一般 PCR と同様の条件で再度 PCR を行なった。

得られた PCR 産物は AMpure XP (Beckman Coulter) を用いて精製し、株式会社生物技研に委託して MiSeq (Illumina) による PCR 産物の塩基配列の解読を行なった。Qiime2 を用いて代表配列を作成し、BLAST で由来となった生物名を検索した。

3. 結果・考察

ISOIL for Beads Beating からの DNA 抽出サンプルでは、2 種類の PCR 法による PCR 増幅が確認された一方で、Fast Prep spin kit for soil ではネステッド PCR による増幅のみ確認された。MiSeq による解析の結果、平均 87,385 配列 (69,776-107,811 配列) が得られた。これまでにニホンジカやイノシシの DNA が得られた。今後、各 PCR 法による検出効率の検証を行う。

参考文献

- 1) Kenjiro SUZUKI, Atsushi TSUNEKAWA, Seiki TAKAATSUKI and Hideo HIGASHI, Preliminary evaluation of GPS-collars for further wildlife research — A case study on Sika deer on Kinkazan Island —, *Theory and Applications of GIS*, 8, 69-75, 2000
- 2) Ushio, M., H. Fukuda, T. Inoue, K. Makoto, O. Kishida, K. Sato, K. Murata, M. Nikaido, T. Sado, Y. Sato, M. Takeshita, W. Iwasaki, H. Yamanaka, M. Kondoh and M. Miya, Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water, *Molecular Ecology Resources*, 17, e63-e75, 2017.
- 3) Burk, A., E.J.P. Douzery, and M.S. Springer, The Secondary Structure of Mammalian Mitochondrial 16S rRNA Molecules: Refinements Based on a Comparative Phylogenetic Approach, *Journal of Mammalian Evolution*, 9, 225-252, 2002

謝辞

本研究は科学研究費補助金 (番号: 19KK0107)、環境研究総合推進費 (5-2006) およびダイバーシティ研究環境イニシアティブ、山梨大学学術・社会変革研究プロジェクトからの資金援助を受けました。ここに謝意を表します。