

河川水中におけるミトコンドリア DNA 量の定量方法の検討

東北大学大学院工学研究科	学生会員	○内田	典子
東北大学大学院工学研究科	正会員	糠澤	桂
東北大学大学院工学研究科	正会員	風間	聡
東北大学大学院工学研究科	正会員	久保田	健吾

1. はじめに

開発や気候変動等による環境負荷は、在来生物の生息場の劣化をもたらす。このため、野生生物、特に希少種やキーストーン種等の生息分布を把握することは保全生物学上極めて重要である¹⁾。従来の生物調査は、観察や捕獲、足跡・糞便などから種を推定する手法が主であった。このため、広域調査や長期モニタリングを行う場合には時間的・労力的負担が大きい点、生物種の同定に専門知識が必要な点、調査結果に人的要因によるバイアスが介在する点等が問題であった。環境 DNA (environmental DNA, eDNA) を用いる手法はこれらの課題を解決し得る生物生息分布の把握手法として近年注目されている技術である。環境 DNA とは、生物の表皮や糞尿等を由来として環境中に放出された DNA を指す²⁾。対象種に特異な DNA の環境中における有無を調べることにより、対象種の有無を判定できるため、従来の生物調査と比較して調査の効率化および結果の客観化が期待される。すでに湖沼などの閉鎖性水域を対象とした研究では、対象種の検出ならびに検出された DNA 量と生物量が比例することが明らかにされている³⁾。一方、河川など流水中かつ広域の環境 DNA は閉鎖的環境よりも分解要因が多様であること、また輸送過程における拡散により低濃度で存在することなどから解析が難しく、いまだ知見が少ないのが現状である²⁾。

本稿では、河川における時系列的な環境 DNA サンプルを定量 PCR により検出する方法の構築を検討している。将来的には、分布型水文モデルを用いて、環境 DNA 量の動態を表現するモデルを構築する。このモデルと、観測されたデータを組み合わせて、流域規模における環境 DNA の推定を目的とする。

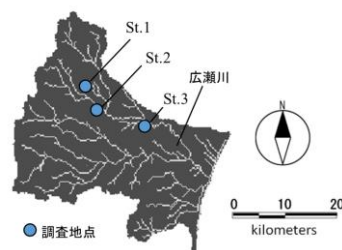


図 1 調査地点 (St.1 が最上流)

2. 実験方法

対象地域は宮城県広瀬川水系の 3 地点の河川区間を等間隔で設定し、2015 年 8 月から 12 月にかけて月に 1 回の頻度でサンプリングを行った (図 1)。検出対象は動物界の生物とした各地点の河川区間内 (10～数 10 m) において無作為に 3 箇所にて河川表面水を合計 2L になるよう採水した。水サンプルは既往の実験^{2, 3)}に従い氷冷保存して実験室に持ち帰り、その日の内に吸引濾過を行った。濾紙は孔径 0.7 μm 、直径 90 mm の GF/F (Whatman)、プレフィルターとして孔径 2.7 μm 、直径 90 mm の GF/D (Whatman) を用いた。サンプルを捕捉させた濾紙は DNA 抽出を行うまでアルミホイルに包み、マイナス 20℃で保存した。

DNA 抽出は DNeasy Blood & Tissue KIT (QIAGEN) のプロトコルに従って行った。抽出した DNA の濃度は PicoGreen を用いて測定した。プライマーには、真核生物のミトコンドリア DNA に含まれる CO I 領域を標的とした LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'), HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') を用いた (約 658 bp の増幅産物)。本プライマーは刺胞動物を除く多細胞の真核生物が検出可能なプライマーとして一般的なものである⁴⁾。定量 PCR は SYBR®Premix Ex

キーワード バイオマス, 環境 DNA, ミトコンドリア, 定量 PCR

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 TEL:022-795-7455

Taq (TaKaRa) を用いて、初期熱変性を 95℃で 20 秒行った後、95℃で 5 秒、53℃で 30 秒、72℃で 1 分間の PCR40 サイクルを LightCycler[®] 2.0 (Roche) を用いて行った。増幅産物の特異性の確認は、アガロースゲル電気泳動により行った。また、定量 PCR のスタンダードには、同一河川から採取したヒゲナガカワトビケラの体組織から抽出した DNA をテンプレートとして、LCO1490-HCO2198 プライマーで増幅した PCR 産物を用いた。

3. 結果

定量 PCR は適切な実験条件において対象遺伝子の特異的に増幅させることが可能であり、その条件下において既知の DNA 量から描ける検量線を用いて、サンプル中の標的遺伝子のコピー数を算出できる。図 2 に検量線に用いたヒゲナガカワトビケラ体組織から作成したスタンダード DNA $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^1$ copies/ng および St.1 から St.3 のサンプル DNA の PCR 増幅をモニタリングした結果および図 3 に $10^7 \sim 10^3$ copies/ng までの検量線を示す。 10^2 copies/ng 以下の濃度においては、検量線から外れたことから、本実験条件においては 10^3 copies/ng までが定量 PCR による検出が可能ということが分かった。一方、St.1～St.3 までのサンプルの DNA 増幅は、いずれも検量線の範囲外で増幅が見られ

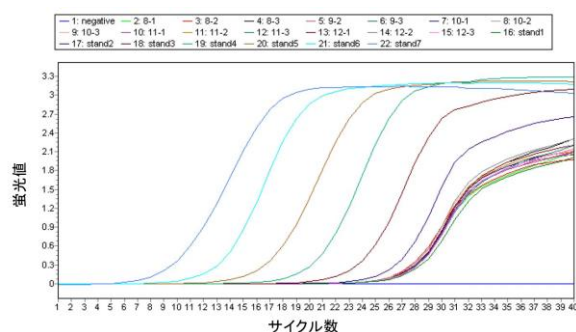


図 2 増幅曲線

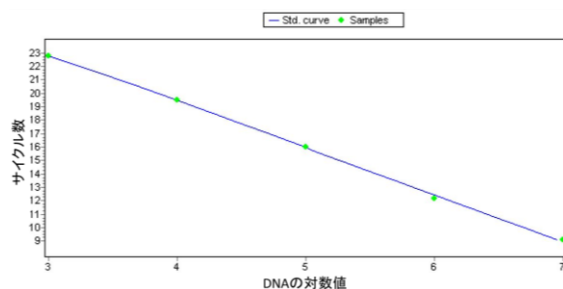


図 3 定量 PCR による検量線

ており、サンプル中の遺伝子のコピー数を求めることは出来なかった。

4. 今後の課題と展望

今回の実験結果より、 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^3$ copies/ng における信頼性の高い検量線を得ることができた。一方で河川水サンプル中の遺伝子のコピー数を定量することはできなかった。これは対象河川水サンプルから抽出した DNA 濃度が低く、非常に低い濃度で定量 PCR を行わなければならなかったこと、また抽出 DNA 中に標的遺伝子数が少なかったことが要因として考えられる。今後は、1) PCR 反応液中のサンプル DNA 量を増加させるため、エタノール沈殿等の手法によりサンプルの濃縮を行う、2) 少ないコピー数を定量するために前増幅を行う等により、改善することができると考えられる。また、水文モデルに環境 DNA の分解式を統合し、環境 DNA 量を推定するモデルを構築する。

謝辞: 本研究の一部は、科学研究費補助金 (25241024, 竹門康弘; 26630247, 渡辺幸三; 26820196, 糠澤桂) および特別研究員奨励費 (256493, 糠澤桂), 福島県の助成を受け実施されました。ここに深く謝意を表します。

参考文献

- 1) 新井涼允, 糠澤桂, 風間聡, 竹門康弘: 水温環境の変化に伴う源流域における底生動物群集の将来変化, 水工学論文集, vol. 70, pp.1303-1308, 2014
- 2) Helen C. Rees, Ben C. Maddison, David J. Middleditch, James R.M. Patmore³, Kevin C. Gough: The detection of aquatic animal species using environmental DNA-a review of eDNA as a survey tool in ecology, Journal of Applied Ecology, vol. 51, pp.1450-1459, 2014
- 3) David S. Pilliod, Caren S. Goldberg, Robert S. Arkle, and Lisette P. Waits: Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples, Canada Journal of Fisheries and Aquatic Sci., vol. 70, pp.1123-1130, 2013
- 4) Paul D.N. Hebert, Sujeevan Ratnasingham, Jeremy R. de Waard: Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, The Royal Society biology letters, pp.96-99, 2003