

環境 DNA の減衰係数推定のための室内水槽実験

東北大学大学院工学研究科 正会員 ○会田俊介
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 風間 聡

1. はじめに

環境サンプル中から大型生物の DNA を検出する環境 DNA 技術の展開により、水域における生態調査の簡略化が期待されている。これまでの河川内の付着藻類・底生動物・魚類のサンプリングは直接採取や潜水調査など多大な労力を必要とし、また調査を行える河床環境や流速・水深といった条件も限られていた。さらに、収集したそれぞれの生物サンプルを形態同定するための専門知識が求められた。これに対して、環境 DNA は河川水を数ミリリットルから数リットル採取するだけのシンプルなサンプリングである^{1),2)}。環境 DNA を用いた生態調査の精度を高めるために、対象となる生物が放出した環境 DNA はどれくらいの期間水中に残存しているのかを把握することは重要である。本研究では、実験水槽を用いてキンギョが放出する環境 DNA を経時的に採取することで、環境 DNA の減衰係数を推定することを目的とする。

2. 方法

2.1 実験方法

延長 60cm×幅 30cm×高さ 45cm の水槽にエアリフト式のポンプを 2 機使用して水を循環させるものとした。流量は約 12cm³/s の一定に保ち、14 日間稼働させた。実験開始時における水槽内の水量は 30L とした。実験水槽は 3 基用意し、投入するキンギョの個体数を水槽①=5、水槽②=10、水槽③=15 とした。

用意した実験水槽にキンギョを投入した後、7 日間の在期間を設けることで水槽内に検出可能な濃度の DNA を放出させた。また、キンギョ回収後 7 日間のキンギョ不在期間を設けた。この期間における環境 DNA の変化を経時的サンプリングにより調べた。サンプリング回数はキンギョ投入から 1 日後、2 日後、4 日後、7 日後

の在期間に 4 回、不在期間の 8 日後、9 日後、11 日後、14 日後に 4 回の計 8 回行い、技術的反復数を n=3 とした。サンプリングは実験水槽から採水した後、最大濾過量を濾紙 1 枚当たり 250ml として、濾紙の目が詰まるまで濾過を行いサンプルとした。濾紙は粒子保持機能 0.7μm 直径 25mm のガラス繊維濾紙グレード GF/F(Whatman)を使用した。

2.2 DNA 分析

得られたサンプルから DNA の抽出・精製を行い、定量 PCR(LightCycler:Roche 社製)を使用して DNA コピー数を定量した。DNA 抽出はフィルターを除去したスピナラムを容量 2ml のマイクロチューブにセットし、サンプル濾紙を入れて 440μl の Proteinase K 溶液(BufferAL:Proteinase K = 10:1)を滴加、56°C で 30 分間のインキュベート後、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて 200μl の溶液を得た。定量 PCR による DNA コピー数の定量には、魚類環境 DNA メタバーコーディング用に開発された(ユニバーサルプライマー) MiFish-U-F(5'-GTC GGT AAA ACT CGT GCC AGC-3'), MiFish-U-R(5'-CAT AGT GGG GTA TCT AAT CC C AGT TTG-3')である(増幅産物長:173 bp)³⁾。DNA コピー数の定量はインターカレーター法を採用した。TB Green Premix Ex Taq (TaKaRa)を用いて初期熱変性を 95°C で 2 分行った後、95°C で 3 秒、60°C で 30 秒の PCR40 サイクルを行った。1 サンプルに使用した調整試薬は TB Green Premix Ex Taq:10μl, MiFish-F:0.4μl, MiFish-R:0.4μl, 超純水:7.1μl, BSA:0.1μl である。これに抽出した DNA サンプルまたはネガティブコントロール用の超純水を 2μl 添加した。

キーワード：レイノルズ数、生物量、減衰係数、循環

連絡先：〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-06 東北大学工学部工学研究科技術部
TEL 022-795-7426

3. 結果と考察

図 1 に DNA 量時系列推移の個体数別測定結果を示す。横軸に経過日数、縦軸は DNA コピー数(copies/L)を表しており、技術的反復 3 回分の平均値である。どの水槽においても 8 日目に DNA コピー数が増加する傾向にあった。これは、水槽内のキンギョを前日に回収する際にキンギョに過剰なストレスがかかったため、環境 DNA をより多く放出したためであると考えられる。キンギョ回収後から 1 日経過後までのサンプリング回数を増やすことで詳細な変化を調べ、同様の結果が得られるか検証する必要がある。また、キンギョ回収後の DNA 量減衰速度について解析を行った結果、水槽①: $y = 1 \times 10^8 e^{-0.6x}$, $R^2 = 0.90$, 水槽②: $y = 9 \times 10^7 e^{-0.5x}$, $R^2 = 0.48$, 水槽③: $y = 4 \times 10^8 e^{-0.7x}$, $R^2 = 0.89$, の近似曲線を得た。決定係数の高い水槽①と水槽③について図 2 に示す。この図から個体数密度の高い水槽③が水槽①と比較して減衰速度が速い結果となった。これは、個体数密度の高い水槽ほど、生物的分解を担うバクテリアの量も多く分解が進んだものと考えられる。

4. おわりに

今回の実験から対象種の個体数密度の違いにより環境 DNA の減衰速度の関係に差が得られた。今後は異なる流量・水温について実験を行い、水理特性と環境 DNA 減衰速度との関係性を明らかにしていく。

謝辞：本研究の一部は、科学研究費補助金(16H02363, 風間聡; 25241024, 竹門康弘; 26630247, 渡辺幸三), および文部科学省博士課程教育リーディングプログラム「グローバル安全学トップリーダー育成プログラム」の助成を受けて実施されました。ここに深く謝意を表します。

参考文献

- 1) 高原輝彦, 山中裕樹, 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 Vol.66(2016)No.3p.583-599
- 2) 山中裕樹, 源利文, 高原輝彦, 内井喜美子, 土居秀幸: 環境 DNA 分析の野外調査への展開. 日本生態学会誌, 66:601-611, 2016

3) M.Miya, Y.Sato, T.Fukunaga, T.Sado, J.Y.Poulsen, K.Sato, T.Minamoto, S.Yamamoto, H.Yamanaka, H.Araki, M.Kondoh, and W.Iwasaki : MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes : detection of more than 230 subtropical marine species. Royal Society Open Science, 2, 150088.

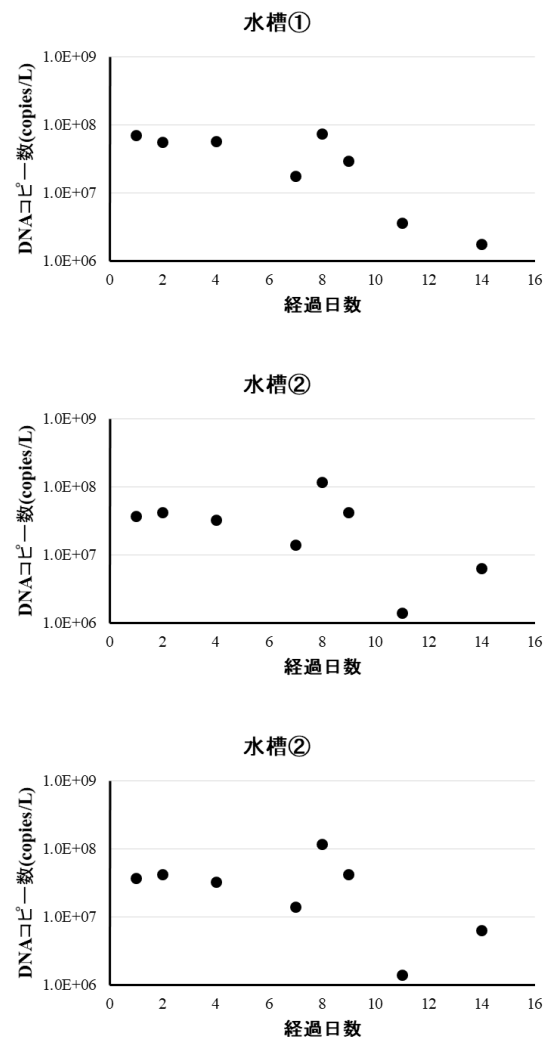


図 1 DNA コピー数時系列推移

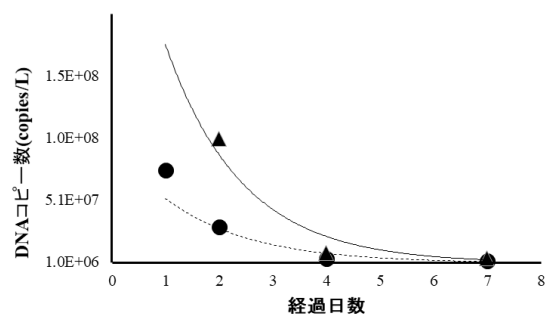


図 2 水槽①と③における環境 DNA 減衰速度
ここで、水槽①:●, 水槽③:▲