

室内水槽実験による環境 DNA の分解速度推定

東北大学工学部 学生会員 ○森田 陽
 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 会田 俊介
 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DNA分析による生物モニタリングが水域の生物調査の新たな手法となることが期待されている。環境DNAを用いた生物モニタリングに関する研究としては野外調査において環境DNA分析により種の「在・不在」を評価した事例¹⁾やDNA濃度と生物量との間の相関を評価した事例²⁾などが挙げられる。しかし、環境DNAの拡散や分解を評価した研究事例は少ないのが現状である。水中における環境DNAの拡散や分解などの動態は未だ明らかではない。そのため、放出源となる個体が生息している場所からのDNA検出可能距離が未だ知られていない³⁾。従って、環境DNA分析による河川の生物調査の精度向上には環境DNAの分解に関する基礎的な知見が求められている。そこで、本研究では環境DNAの分解速度を推定することを目的とし、魚を用いた水槽実験を行った。水槽実験においては魚の放出した環境DNAと水槽内の乱流強度、飼育した個体数の相関を調べた。

2. 方法

(1) 実験方法

実験水槽は延長60cm×幅30cm×高さ36cmの水槽を4基用意し、エアリフト式のポンプを使用して水を循環させるものとした（図1）。実験開始時における水槽内の水量はおよそ30Lとした。水槽内の生体の在期間は4日間とした。その後、生体を回収し不在期間を設けた。そして、不在期間において飼育水を経時的に採水した。採水試料は濾紙で濾過し、濾紙に環境DNAをトラップした。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) DNA 分析方法

DNAをトラップした濾紙からDNAの抽出を行い、定量PCR(LightCycler2.0:Roche)を使用してDNAコピー数を定

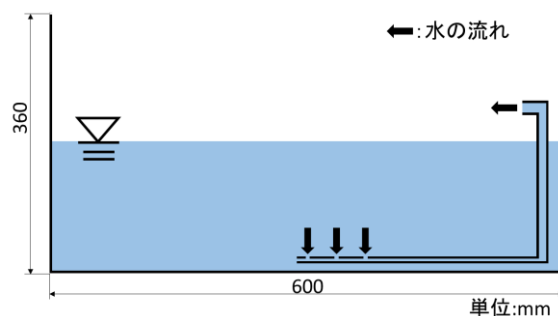


図1 実験水槽

量した。サンプル濾紙はフィルターを除去したスピンカラムに入れ220μlのProteinase K溶液(BufferAL:Proteinase K = 10:1)を滴加し、56℃で30分間インキュベートした。その後、DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen)を用いてDNAを抽出した。抽出DNAの容量は200μlである。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 CCC AGT TTG-3')を用いた(増幅産物長:173bp)⁴⁾。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℃で2分行った後、95℃で3秒、60℃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:7.2μl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。

(3) 実験1

投入する生体としてキンギョを用意し、各水槽に5匹ずつ投入した。エアリフト式ポンプにより循環する流量は水槽①=25cm³/s、水槽②=50cm³/s、水槽③=75cm³/s、水槽④=100cm³/sとした。飼育水の採水はキンギョ回収後から3日間のうちに計7回行った。

Key words : 環境DNA, 生物量推定, 分解速度

〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻水環境システム学研究室

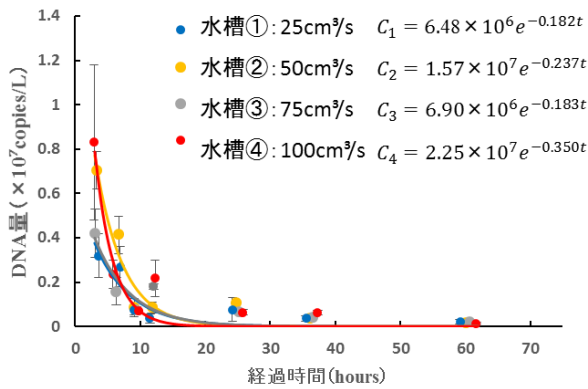


図2 実験1のDNA濃度推移

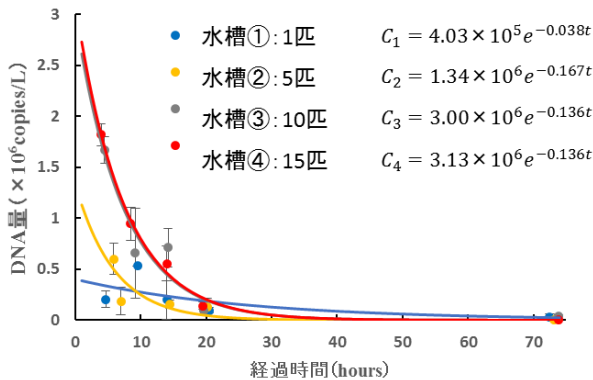


図3 実験2のDNA濃度推移

(4)実験2

投入する生体としてメダカを用意し、各水槽に投入する個体数を水槽①=1匹、水槽②=5匹、水槽③=10匹、水槽④=15匹とした。エアリフト式ポンプにより循環する流量はおよそ50cm³/sとした。採水はメダカ回収後から3日間のうちに計5回行った。

3. 結果と考察

図2、図3に実験1、実験2の結果をそれぞれ示す。横軸に生体回収からの経過時間、縦軸はDNA量測定値の技術的反復3回分の平均値である。環境DNAの分解モデル式として以下の式を用いた。

$$\frac{dN}{dt} = -\beta N \quad (1)$$

$$N(t) = N_0 e^{-\beta t} \quad (2)$$

ここで、 $N(t)$: t 時間後の環境DNA濃度 (copies/L), N_0 : 初期環境DNA濃度 (copies/L), β : 分解係数 (1/hours), t : 経過時間 (hours) である。DNA量の測定結果から上記(2)式に基づき近似式の推定を行った。その結果、実験1について、水槽①(25cm³/s) : $C_1 = 6.48 \times 10^6 e^{-0.192t}$, 水槽② (50cm³/s) : $C_2 = 1.57 \times 10^7 e^{-0.237t}$, 水槽③ (75

cm³/s) : $C_3 = 6.90 \times 10^6 e^{-0.183t}$, 水槽④ (100 cm³/s) : $C_4 = 2.25 \times 10^7 e^{-0.350t}$, 実験2について、水槽① (1匹) : $C_1 = 4.03 \times 10^5 e^{-0.038t}$, 水槽② (5匹) : $C_2 = 1.34 \times 10^6 e^{-0.167t}$, 水槽③ (10匹) : $C_3 = 3.00 \times 10^6 e^{-0.136t}$, 水槽④ (15匹) : $C_4 = 3.13 \times 10^6 e^{-0.136t}$ の近似曲線を得た。

得られた分解係数と水槽に与えた循環流量との間の相関関係について有意な相関は得られなかった。今回の実験では水槽容量に対して与えた流量が十分に大きくなく、実河川を想定するには十分な乱流環境を再現できていなかった。そのため、より速い流速環境で分解速度と乱流強度の関係を評価する必要があると考える。また、分解係数と飼育した個体数との相関関係についても有意な相関関係は得られなかった。個体数が多い水槽ほど初期濃度は高かった。しかし、分解係数には相関はみられなかった。ここから個体数差によるDNA量の初期濃度の違いは分解速度に影響を与えるものではないと考えられる。

4. まとめ

本研究から個体数密度の違いによるDNA初期濃度の違いは分解速度に影響を及ぼさない結果が得られた。より強い乱流条件での分解速度の検証が今後の課題である。

謝辞 : 本研究は、科学研究費補助金 (16H02363, 代表 : 風間聡) および JSPS 科研費 (JP17J02158, 代表 : 内田典子) の助成を受けた。併せてここに深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) Takahara T, Minamoto T, Doi H : Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. PLOS ONE, 8:e56584, 2013.
- 2) 赤松良久 : 環境DNAを用いた河川生物モニタリングの現状と今後の展開, RIVER FRONT Vol.84, pp. 4-7, 2017.
- 3) 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, pp.601-611, 2016.
- 4) Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W : 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, 2015.