

環境調和型の環境DNA捕集装置の有効性

静岡県立掛川西高等学校
自然科学部 2年 大林祐輝 鈴木虹太郎

1 動機・背景

静岡県磐田市に位置する桶ヶ谷沼は絶滅危惧種ベッコウトンボの県内唯一の生息地として知られており、NPO 静岡県自然史博物館ネットワークの福井順治先生を中心に地域の方による保護活動が行われてきた。ベッコウトンボは 1991 年 8 月に環境庁発行のレッドデータリストで絶滅危惧 1A 類に指定され、その後 1994 年 1 月には「種の保存法」の対象種となって原則採集が禁止されている。本校自然科学部では、2020 年よりベッコウトンボの保護活動に参加している。また、平成 29 年より空中環境 DNA に関する研究を行っており、フクロウやシイタケの空中環境 DNA の検出に成功している。本研究では活動の一環として、ベッコウトンボの環境 DNA 回収を目指した研究を行っている。ベッコウトンボの空中環境 DNA を回収できれば生息確認等に役立てられる。過去の研究で使用していた空中微粒子採取装置は稼働時間に制限がなく、常に稼働している状態となっている。そのため電力の浪費が多く、不要な DNA 分解酵素が混入するリスクが高かった。これは、環境に調和していこうとする本研究には適していないと判断した。そこで、この装置をベッコウトンボの飛翔条件や真菌の孢子形成など、その生物の生態的活動条件に合わせて稼働する環境調和型の装置に改良し、その有効性を確かめた。装置完成時、目的とするベッコウトンボの飛翔時期は逃したため、有効性は昨年度の研究で DNA が検出できた真菌で確かめた。



2 先行研究における空中微粒子採取装置での環境 DNA の採取

空中微粒子採取装置は空気中に浮遊・飛散している微粒子を採取し、空中環境 DNA の減少を抑制するオスバン溶液に保存する。その溶液に含まれる環境 DNA を既知のプライマーを用いて PCR 法で増幅することで、その地域に生育する種を特定する。写真と仕組みを図 1 に示す。また、本研究で用いたオスバン溶液に含まれる塩化ベンザルコニウムは 0.01% 添加することにより 16 時間程度の DNA 保存効果が確認されている。なお、使用するボトルやストローは使い捨てである。

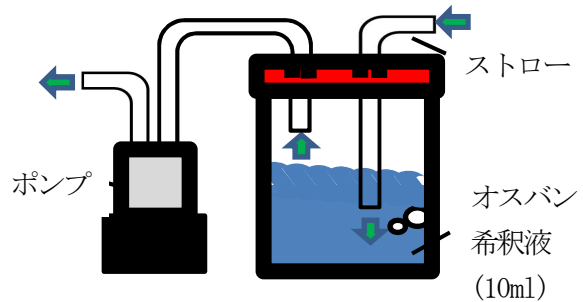
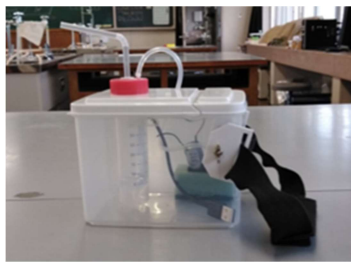


図1

先行研究では空中微粒子採取装置を16時間稼働させ、フクロウの生息が確認されている場所で空中からそのDNAを検出し、PCR法によるDNAの増幅に成功した。さらにシイタケ農園内に装置を16時間稼働させ、電気泳動結果より、シイタケの特異的な増幅長である1000bpのバンドが確認できた。

3 研究方法

(1) 実験1 従来の空中微粒子採取装置の改良

従来の装置は同定したい生物が活動しない環境下でも16時間稼働していたため、対象生物の活動環境下のみ稼働するように装置を改良した。本研究では、ArduinoUno、HIH6130、ACM1602A、SSR(ソリッドステートリレー)を用いた。温度・湿度を感知するのにI²Cを用いた。I²Cとは、IC間での通信を目的としたシリアル通信方式である。SDAでデータのやりとりを行い、SCLでIC間のタイミングを合わせることでI²CデバイスとArduino間のデータのやり取りを可能にする。温度・湿度センサが搭載されているHIH6130は補正された温度の範囲が5~50℃、湿度の範囲が10~90%であり、本研究に適していると考えた。これらの接続方法を図2に示す。

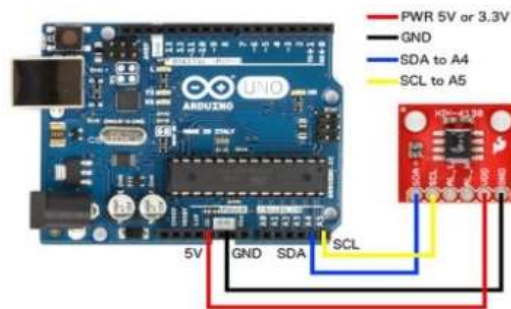


図2

HIH6130から得た情報をもとにスイッチのON/OFFを切り替えるのに、SSR(ソリッドステートリレー)を用いた。SSRは半導体で作られた無接点リレーである。無接点リレーは有接点リレーと比べてスイッチの開閉回数に制限がなく、動作音が小さいため、空中からの環境DNAの採取に適していると考えた。HIH6130から得た情報が設定した稼働条件を満たしている場合のみ、SSRの入力機器がオンになり、電流が流れることでフォトカプラが動作する。それを通じて出力回路のトリガ回路に電気信号を伝え、出力回路の開閉素子がオンになることで負荷電流が流れる仕組みである。SSRと他の機器との接続方法を図3に示す。

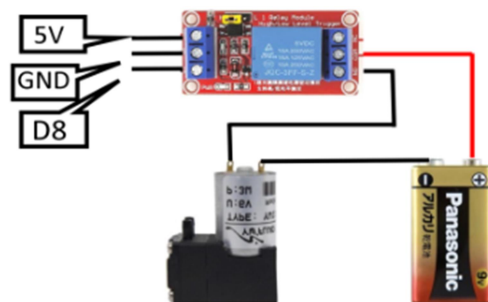


図3

装置の稼働条件をベッコウトンボの活動帯[20℃<T<30℃かつ45%<H]にした。この稼働条件は図4の文

献を参考に設定した。また、HIH6130 で感知した温度・湿度と SSR のスイッチの ON/OFF 状態を ACM1602A に表示しようと試みた。作成したプログラムとフローチャートを図5に示す。

回	調査日	調査内容	天候	気温 (°C)	湿度 (%)	風向	風力	照度 (Lux)
1	4月11日	個体数調査	曇	21.9	66.7	S	1	33,130
2	4月18日	行動域調査	晴	20.5	54.5	ESE	1	113,879
3	4月26日	個体数調査	曇	21.9	48.0	ESE	1	121,900
4	5月1日	行動域調査	晴	26.0	44.9	ESE	1	114,600
5	5月9日	個体数調査	晴	22.6	48.6	E	2	81,500
6	5月16日	行動域調査	晴	29.5	49.0	S	2	113,400
7	5月22日	個体数調査	晴	26.4	56.2	E	1	106,900
8	5月30日	行動域調査	曇	30.2	59.0	E	1	116,100
9	6月7日	個体数調査	晴	27.4	65.3	E	1	116,400

図4

```

sketch_ON_OFF | Arduino IDE 1.8.13 (Windows Store 1.8.13.0)
ファイル 編集 スケッチ ツール ヘルプ

sketch_ON_OFF
#include <LiquidCrystal.h>
LiquidCrystal lcd(4, 5, 10, 11, 12, 13);
int indater;
#define ACM1602_h
#include "Arduino.h"
#include <Wire.h>

#define HIH6130_ADDR 0x27
#define ACM1602_ADDR 0x50

#define ACM1602_BL_SOCKET 7
#define led(ACM1602_ADDR, ACM1602_BL_SOCKET) ;
int relay = 5;

void setup()
{
  Wire.begin();
  lcd.begin(16, 2);
  lcd.clear();
  lcd.setCursor(0, 0);
  analogWrite(3, 10);
  pinMode(relay, OUTPUT);
}

void loop() {
  unsigned int dac[4];
  int i, n, h;
  float temp, humi, comp;

  Wire.beginTransmission(HIH6130_ADDR);
  Wire.endTransmission();
  delay(100);

  Wire.requestFrom(HIH6130_ADDR, 4);
  for( i=0; i < 4 ; i++){
    dac[i] = Wire.read();
  }

  Wire.endTransmission();
  h = ( ( dac[0] & 0x3f ) << 8 ) | dac[1];
  humi = (float)(h) / 16383 * 100;
  t = ( dac[2] << 6 ) | ( dac[3] >> 2);
  temp = (float)(t) / 16383 * 165 - 40;
  lcd.clear();
  lcd.print("T");
  lcd.print(temp);
  lcd.print("C");
  lcd.print(" H");
  lcd.print(humi);
  lcd.print("%");
  lcd.setCursor(0, 1);
  if ( (23<temp) && (50<humi) && (27>temp) ) {
    digitalWrite(relay, HIGH);
    lcd.print("o ");
  }
  else{
    digitalWrite(relay, LOW);
    lcd.print("x ");
  }
  delay(1000);
}

```

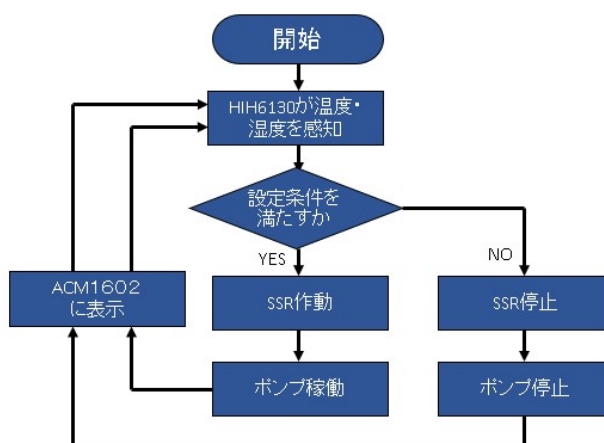


図5

(2) 実験2 改良した空中微粒子採取装置

の空中環境 DNA の検出に成功している静岡県磐田市桶ヶ谷沼付近に従来の装置と改良した装置を 2021 年 8 月 28 日 17:00~8 月 29 日 8:30 に設置し、15 時間程度稼働させた(図6)。改良した装置は担子菌類の菌糸の成長に最適な温度・湿度帯 $[20^{\circ}\text{C} < T < 30^{\circ}\text{C}]$ かつ $65\% < H$ に限定して稼働するようにした。回収した試料

50 μ L に DNA 抽出試薬として UniversAll Extraction Buffer II を 16 μ L 加え、95℃ で 10 分加熱し、5℃ で遠心分離を 10 分行った。この上澄み液を DNA 抽出液とし、本液 1 μ L に DNA ポリメラーゼとして KOD One® PCR Master Mix 25 μ L、滅菌蒸留水 22 μ L、図 7 のプライマーを 2 μ L 加えた。用いたプライマーにコンタミネーションがないことを確認するため、DNA 抽出液の代わりに滅菌蒸留水を 1 μ L 加えた試料を用意した。図 8 の温度サイクルで PCR 法による DNA 増幅を行い、その後アガロースゲルを用いた電気泳動法に置の有効性の証明

改良した装置の有効性を証明するために、きのこより DNA の増幅を確認した。昨年度はアガロースゲル濃度を 3% としたが、濃度を下げて泳動速度を上げることによって、増幅長の違いを明確にすることが可能となるため、本年度は 2% とした。



図 6

F 5'-TTGCAGACGACTTGAATGG-3'
R 5'-TAGGATTCGCCGTGGTCCCCCA-3'

図 7

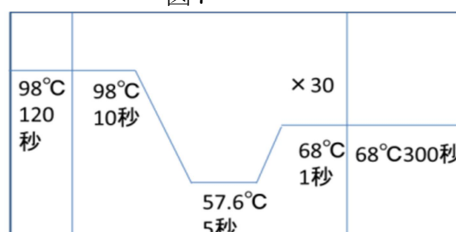


図 8

(3) 実験 3 トンボの糞からの DNA の増幅

他種のトンボが排出した糞から DNA を増幅できれば、ベッコウトンボの空中環境 DNA の検出につながると考えた。本研究では、身近に多く生息するショウジョウトンボで以下の実験を行った(図 9)。採取した糞をホモジナイズし、DNA 抽出試薬として UniversAll Extraction Buffer II 25 μ L、滅菌蒸留水 15 μ L を加え、95℃ で 30 分加熱した後、遠心分離を 30 分を行い、上澄み液を DNA 抽出液とした。この DNA 抽出液 2 μ L に DNA ポリメラーゼとして KOD one Master Mix 25 μ L、滅菌蒸留水 22 μ L、図 10 のプライマーを 2 μ L 用いた。図 11 の温度サイクルで(2)と同様に PCR 法による DNA の増幅を行った。プライマーは COI 遺伝子領域(シトクローム c オキシダーゼ・サブユニット I の遺伝子領域)の塩基配列から、本校自然科学部、プライマー班が作成した。

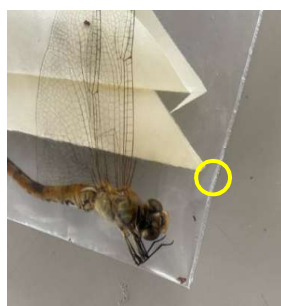


図 9

F 5'-CTATCTAGCGAAACCACAGCCAAG-3'
R 5'-CAAAGTAGTGGTATTTACCGTCG-3'

図 10

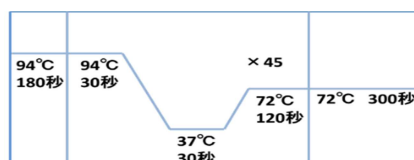


図 11

(4) 実験 4 空中からのベッコウトンボの環境 DNA の検出への挑戦

静岡県磐田市桶ヶ谷沼で改良した装置を 2021 年 6 月 6 日 17:30~6 月 7 日 9:30 に設置し、16 時間程度稼働させた(図 12)。装置の稼働条件は、実験 1 で設定した [20℃ < T < 30℃ か 45% < H] にした。設置場所では、ベッコウトンボやヨツボシトンボが飛翔する様子を確認でき、採取時間中には降雨はなかった。回収した試料を図 13 のプライマーを用いて実験 2 と同様に混合液を作った後、図 11 の温度サイクルで DNA の増幅を行った。プライマーは COI 遺伝子領域(シトクローム c オキシダーゼ・サブユニット I の遺伝子領域)の塩基配列から、本校自然科学部、プライマー班が作成した。



図 12

F 5'-CTATGGGCTCTAGGATTGTATTC-3'
 R 5'-TATTGATAGTACATAGAGAAAGTG-3'
 F 5'-CCTTATTATGAGCTCTAGGATTGTAATC-3'
 R 5'-GCCCCTATTGATAAACATAATGGAATGAG-3'

(上：ベッコウトンボ 下：ヨツボシトンボ)

図 13

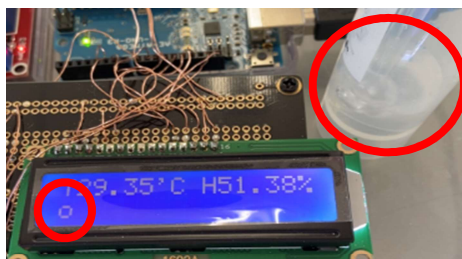
また、桶ヶ谷沼で採取したベッコウトンボとヨツボシトンボの活動環境下の飼育水をガラス棒に塗布し、本校の教室内で扇風機によって風を送った。ベッコウトンボとヨツボシトンボの環境 DNA を空气中に飛ばし、従来の空中微粒子採取装置を用いて環境 DNA の採取を試みた (図 14)。図 11 の温度サイクルで上記の実験と同様に PCR 法による DNA の増幅を行った。



図 14

4 実験結果

実験 1 で HIH6130 から感知した温度・湿度がベッコウトンボの飛翔の生態的活動条件 [$20^{\circ}\text{C} < T < 30^{\circ}\text{C}$ かつ $45\% < H$] を満たしている場合のみ、SSR のスイッチが ON になりポンプが動いた (図 15)。また、図 16 に示すように感知した温度・湿度とスイッチの ON/OFF 状態を ACM1602A に表示できた。



↑ 条件を満たす

図 15



↑ 条件を満たさない



A…感知した温度
 B…感知した湿度
 C…スイッチの ON/OFF 状態

図 16

実験 2 の電気泳動結果 (図 20) より、従来の装置での試料では DNA の増幅を確認できなかったが、改良した装置での試料では 400bp や 800bp バンドが確認できた。DNA の増幅長から先行研究のデータをもとに、アイシメジやキアミアシイグチなどの担子菌類のバンドを増幅できた。

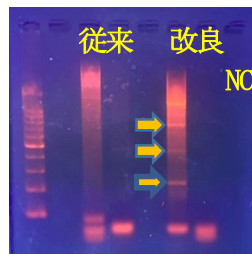


図 17

実験 3 では、ショウジョウトンボの DNA の増幅長はまだ得られていない。糞からの DNA の増幅が確認できれば空中からの採取ができる可能性が大きい。

実験 4 では、ベッコウトンボの増幅長である 135bp とヨツボシトンボの増幅長である 145bp のバンドは見られなかった(図 18)。飼育水を用いた空中から環境 DNA の検出を行う実験では、まだ目的の増幅長のバンドが得られていない

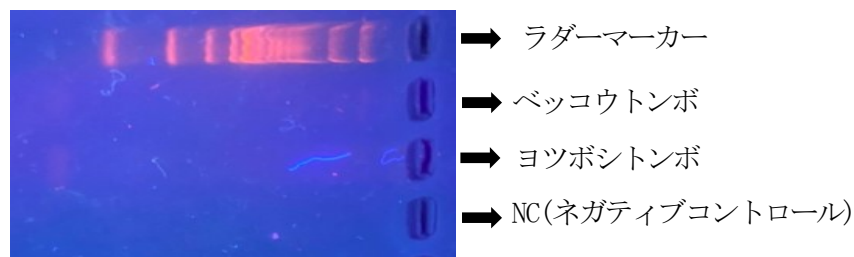


図 18

4 考察

実験 1 から、HIH6130 の補正された温度範囲(5~50℃)・湿度範囲(10~90%)の環境下に生息種であれば、その生態的活動条件に限定して装置を稼働させることができるため、ベッコウトンボの空中からの環境 DNA の検出に役立てられる。

実験 2 から、担子菌類の菌糸の成長に最適な温度・湿度帯のみ稼働したことで DNA 分解酵素がはたらかず、DNA を検出できたと考えられる。100bp 未満のバンドはアプライ量が多かったことにより、電気泳動でテーリングしたものと考えられる。

実験 4 から、目的の増幅長は確認できなかったが 100bp 未満のバンドが確認できたことから、実験 2 と同様にアプライ量が多かったことにより電気泳動でテーリングしたと考えられる。

5 結論と課題

実験 1 で改良できた装置は電子回路がむき出しているため、水が染み込むと電気の流れが阻害されてしまい、正常な動作ができなくなる。降雨等の気象現象による装置の破損を防ぐために、防水ケースの使用や設置場所の工夫等の対策を行う。装置の稼働条件はプログラム上で変更可能であり、改良した装置での試料のみ担子菌類の DNA を増幅できたことから、ベッコウトンボの空中からの環境 DNA の検出に役立てられる。

実験 3 では、ショウジョウトンボの胸筋から DNA の増幅が可能であることを確認し、図 13 のプライマーの有効性の証明を行う。飼育水を用いた空中から環境 DNA の検出を行う実験では飼育水をフィルターろ過し、付着物の DNA を抽出・増幅できるかを確認する。また、株式会社リバネスのご協力と共に HIH6130 から感知した温度・湿度が設定した稼働条件に限定して、ベッコウトンボの活動領域まで装置を動かせるようにする。

6 謝辞

トンボの空中環境 DNA の採集にあたり、NPO 静岡県自然史博物館ネットワークの福井順治先生、株式会社リバネス様、岡本優真様にご指導ご鞭撻をいただき、心より感謝申し上げます。この研究は THK 財団より助成を受けて行っている。

7 参考文献

1. 真菌類の環境DNA検出による生育種の半別出に関わる研究～森林生態系の生物調査の手法の開発～（掛川西高校自然科学部 2019年1月～2020年9月）
2. 静岡県桶ヶ谷沼地域における絶滅危惧種ベッコウトンボの遺伝的多様性
https://www.jstage.jst.go.jp/article/hozen/14/1/14_KJ00005576307/_article/char/ja/
3. 空中DNAを使った鳥類調査法の確立（掛川西高校自然科学部）
<https://gakusyuu.shizuoka-c.ed.jp/science/sonota/ronnbunshu/h30/183184.pdf>
4. 環境DNAの解析FAQ 株式会社生物研究
<https://gikenbio.com/dnaanalysis/ngs/environment/>
5. 森林とみどりの技術者養成セミナー・テキスト きのこの菌床栽培 ―ヒラタケ編―
<http://www.foresternet.jp/files/0001/0203/099001.pdf>
6. プログラムによる計測・制御を学ぶためのLilyPad Arduino シミュレータと学習環境の開発
https://ipsj.ixsq.nii.ac.jp/ej/?action=repository_action_common_download&item_id=165071&item_no=1&attribute_id=1&file_no=1
7. カモ池環境評価に関する情報
http://www.qsr.mlit.go.jp/n-park/park/kanminrenkei_koubo/betten/9_betten