

環境DNA捕集装置の制御とその効果

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

本校自然科学部では、平成 29 年より空中環境 DNA に関する研究を行っており、フクロウや真菌の空中環境 DNA の検出に成功している。過去の研究で使用していた空中微粒子採取装置は常に稼働している状態となっていたため水中に比べて環境 DNA が拡散しやすい空中では、捕集できる DNA 量に比べて稼働時間の浪費が大きく、合理的に空中環境 DNA を検出することが難しかった。そのためこの装置に温度・湿度センサーを取り付け、稼働時間を制御することで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ように改良し、その有効性を確かめた。孢子などの細胞の中の DNA は狭義の環境 DNA には定義されないが、有効性の確認のためには十分であると考えた。また、本校ではベッコウトンボの環境 DNA を回収することを目指した研究を行っている。空中からの環境 DNA を回収できればベッコウトンボの生息確認等に役立てられる。

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。

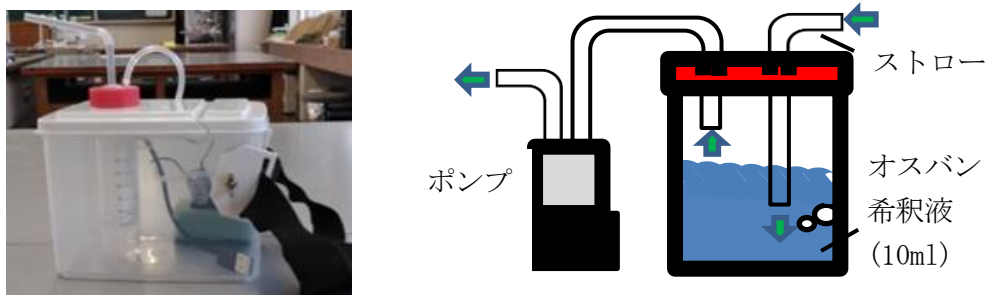


図 1

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) 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 時間連続して稼働していたため、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 間での通信を目的に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

ON/OFFを切り替えるのに、SSR(ソリッドステートリレー)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ング速度が速いため、空中からの環境 DNA の採取に適していると考えられる。それを通じて出力回路のトリガ回路に電気信号を伝え、電圧変換部で高電圧に変換し、電極間に高電圧を印加してコロナ放電による電流が流れる仕組みである。SSR と他の機器との接続方法については図7に示す。菌糸の成長に最適な温度・湿度帯 [20℃ $\leq$ T<30℃かつ60%RH<湿度<85%RH]と、この範囲内の温度・湿度と SSR のスイッチの ON/OFF 状態を ACM1602A に設定し、その設定値に基づいて動作するプログラムを作成し、マイコンとフローチャートを図8に示す。



图 4



(2) 真菌の空中環境 DNA の捕集による有効性の証明

改良した装置の有効性を証明するために、真菌の空中環境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30分設置した(図6)。改良した装置の稼働する条件を $[20^{\circ}\text{C} < T < 30^{\circ}\text{C}$ かつ $65\% < H]$ にした。回収した試料 $50\mu\text{L}$ にDNA抽出試薬としてUniversAll Extraction Buffer IIを $16\mu\text{L}$ 加え、 95°C で10分加熱し、 5°C 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 $1\mu\text{L}$ にDNAポリメラーゼとしてKOD One® PCR Master Mix $25\mu\text{L}$ 、滅菌蒸留水 $22\mu\text{L}$ 、図7のプライマーを $2\mu\text{L}$ 加えた。なお、プライマーについては、昨年度の研究にて九州大学農学部の宮崎和弘博士に情報を提供して頂いた。このプライマーはIGS1領域を増幅するもので、シイタケの品種識別に使われており、シイタケの安定したDNAの増幅が確認されているため、使用することとした。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'-TAGGATTCCCGCGTGGTCCCCCA-3'

図7

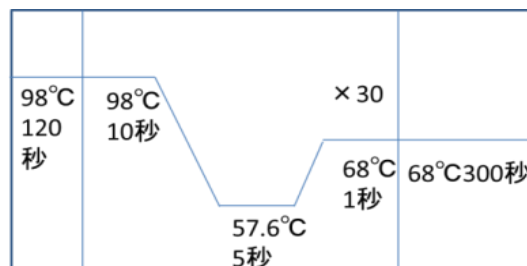


図8

(3) 温度、湿度に合わせて昇降する装置の作成

トンボは種によって温度、湿度とともに飛翔高度が異なる場合がある。そのため、ベッコウトンボの活動域まで昇降する装置を作った。HIH6130で感知した温度・湿度が稼働条件をみたすとき、装置を指定した時間上昇させ、稼働条件から外れたときに装置を指定した時間下降させる装置を作成した。なお、装置の昇降にはLMガイドを使用した。LMガイドとは、主にLMレールとLMブロックから構成されている直線レールであり、LMレール上をLMブロックがスライドすることで直線運動をガイドする。本研究では、タコ糸でギアモーターとLMブロックを繋げ巻き上げることで装置を昇降させた(図9)。また、ギアモーターの制御にはTA7291P、ArduinoUnoを使用した。これらの接続方法を図10に示す。雨への耐性、重量、修理のしやすさなどの観点から、実験装置に適していると判断したプラスチックダンボールを用いて支柱を作成した(図11)。持ち運びやすいように支柱を4つのパーツに分けて作成し、L字の金具を用いて接続した。



図 9

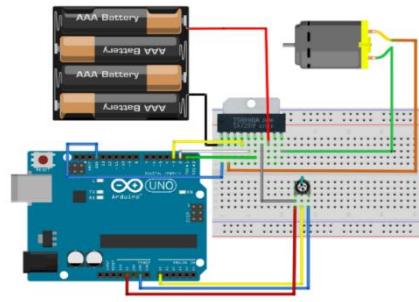


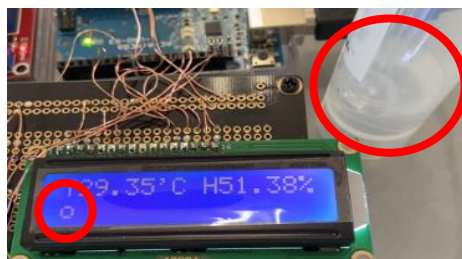
図 10



図 11

4 結果

装置の改良により、HIH6130 から感知した温度・湿度が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 $65\% < H]$ 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 17 に示すように稼働する条件を満たすと装置が稼働した。また、図 18 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。

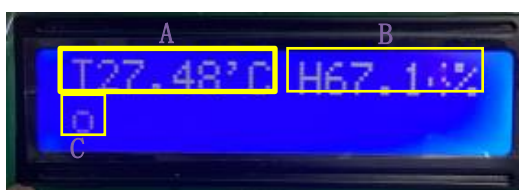


↑ 条件を満たす



↑ 条件を満たさない

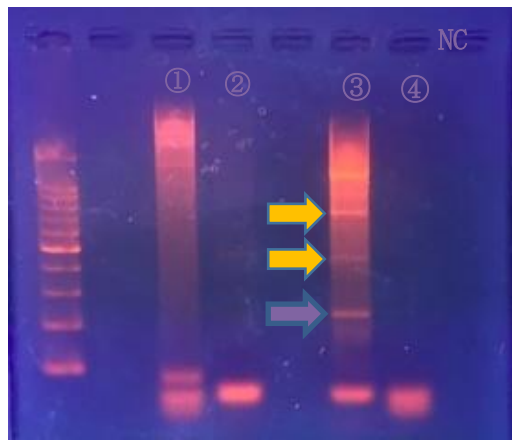
図 12



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 13

従来の装置で採取した試料は DNA の増幅を確認できなかったが、担子菌類に最適な温度・湿度域のみ稼働する装置で採取した試料は 400bp や 800bp バンドが確認できた(図 14)。昨年度の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ことから、従来の装置よりも改良した装置の方が環境 DNA の検出に適していると分かった。



①、②：従来の装置で捕集した試料
③、④：改良した装置で捕集した試料
NC：ネガティブコントロール

図 1 4

4. 考察

改良した空中微粒子採取装置は、HIH6130 の補正された温度範囲 (5~50℃)・湿度範囲 (10~90%) の環境下にいる生息種であれば、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。そのため、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合理的に DNA を捕集でき、DNA の増幅ができたと考えられる。

5 結論と課題

装置の稼働条件はプログラム上で変更可能であり、改良した装置で捕集した試料のみから担子菌類の DNA を増幅できたことから、センサーと ArduinoUno による制御により、効率的に DNA を集めることが出来た。また、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、現在検証中である。

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判別に関わる研究～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://gakusyu.shizuoka-c.ed.jp/science/sonota/ronnbunshu/h30/183184.pdf>
4. 環境 DNA の解析 F A Q 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.gsr.mlit.go.jp/n-park/park/kanminrenkei_koubo/betten/9_betten

8. モータードライバ (DC モーター) ・ Arduino docs

<https://fabkura.gitbooks.io/arduino-docs/content/chapter17.html>

