

環境 DNA によるヤリタナゴ調査法確立

静岡県立掛川西高等学校
自然科学部 1年 岡本優真 他9名

1 動機

ヤリタナゴは、コイ科アブラボテ属の淡水魚である（図1）。日本に幅広く生息し、水流の緩やかな川を好む。本校の位置する掛川市においては、ヤリタナゴの詳細な生息地が確認されていないため、より詳しい生息域の調査を行うことを目的に研究を始めた。しかし、静岡県でヤリタナゴは指定希少野生動物に指定されており、直接捕獲することが禁止されている。そこで、近年確立された「環境 DNA」を用いた手法がふさわしいと考えた。

環境 DNA とは、水や土壌などの環境中に存在する、魚類などの大型生物に由来する DNA のことであり、生活する中で環境中に放出された表皮細胞や排泄物などに含まれている。（図2）。川で採水を行い、ヤリタナゴの環境 DNA を検出することができれば、ヤリタナゴを直接捕獲することなく生息域を知ることができる。これは、今までの捕獲による生息域調査に代わる画期的手法であるといえる。

本校では、DNA の検出方法として PCR 法を用いることが可能なため、これを利用してヤリタナゴの環境 DNA 検出の研究に取り組んだ。なお、研究を進めるにあたり使用したのは九州産の観賞用ヤリタナゴで、約 25 L の水槽に 3 匹飼育した。



図1 校内で飼育しているヤリタナゴ

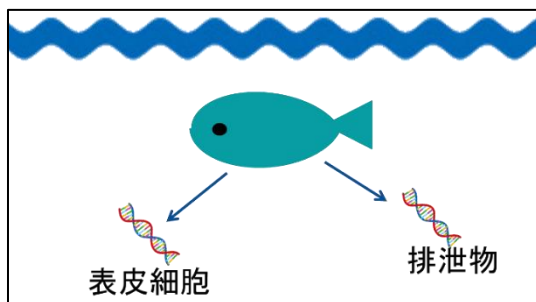


図2 環境 DNA のイメージ

2 研究の概要

環境 DNA は環境中に微量にしか存在していない。確実に検出するには条件を整える必要があると考え、環境 DNA 検出方法の確立に向けた実験を行った。環境 DNA 検出までの流れとしては、川から水を採取し、実験設備がある本校に輸送、環境 DNA 検出のための処理を行い、最後に DNA を増幅し、電気泳動法を用いて DNA の増幅を確認するという流れとなる。しかし、実際にこれらを行うには課題がある。まず、輸送時間が経つにつれ、DNA が分解されること。次に、前述のとおり環境 DNA は微量にしか存在していないため、試料の濃縮が必要であること。最後に、ヤリタナゴの DNA だけを増幅できるのかということ。大型の設備や輸送のための冷蔵庫がない中で、高校生でも環境 DNA が検出できるよう、これらの課題解決に取り組んだ。

3 実験の概要

（1）試薬について

DNA の抽出には UniversAll™ Extraction Buffer II (Yeastern Biotech 社)、PCR には Quick Taq® HS DyeMix (東洋紡社)、プライマーはヤリタナゴのミトコンドリア DNA 中のチトクロム b の領域に結合するもので、特異性が高い配列のものをマクロジェン社に依頼し、作成した。

(2) 実験器具について

PCR 法による DNA 増幅では Personal サーマルサイクラー (WAKO 社)、濾過には粒子保持能 0.7 μm のガラスフィルター (Whatman 社)、アスピレーター、濾過用ガラス器具 (SIBATA 社) を用いた。また、試薬の調合等はクリーンベンチ内で、マイクロピペットとエッペンドルフチューブを用いて行った。

(3) 実験方法

以下の実験ではヤリタナゴの糞を「排泄物」、砂など水槽中に含まれる粒子を「固形物」と表記する。

ア PCR 条件の確立

(ア) DNA 抽出液の作成

1.5 mL のエッペンドルフチューブに DNA 抽出試薬 15 μL を入れ、ヤリタナゴを飼育している水槽から採取した排泄物を加え、混合した。その後、恒温槽を用いて 95 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間加熱した後、遠心分離を行った。上澄み液を 1 μL 取り、これを DNA 抽出液とした。

(イ) PCR 溶液の作成

DNA 抽出液を含む以下の溶液を作成した。

PCR 溶液に添加する溶液等	1 本当たりの組成
滅菌水	22 μL
Quick Taq® HS DyeMix	25 μL
プライマー混合液 (F+R)	2.0 μL
DNA 抽出液	1.0 μL
合計	50 μL

(ウ) PCR 条件の確立

PCR 条件を図 3 のように設定した。なお、アニーリング温度は 50 $^{\circ}\text{C}$ 、48 $^{\circ}\text{C}$ 、46 $^{\circ}\text{C}$ 、44 $^{\circ}\text{C}$ に設定した温度サイクルで試し、最も増幅が確認できた 50 $^{\circ}\text{C}$ を最適温度として適用した。

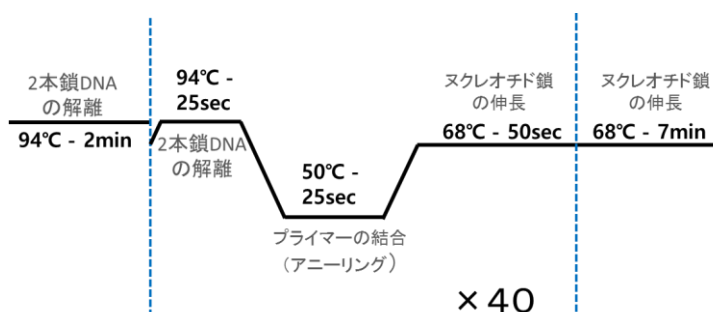


図 3 確立した PCR 条件

(エ) DNA 増幅の確認

目的とする DNA の増幅の確認をするため、電気泳動を行った。ゲルは TAE バッファー 50 mL にアガロースゲル S (ニッポンジーン社) を 1 錠加え、105 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間加熱して完全に溶かし、染色液としてゲルレッドを 2 μL 加えて作成した。

泳動では TAE バッファーで満たした泳動槽にゲルを入れ、100 bp ごとのラダーマーカーと試料をそれぞれ 3.5 μL ずつ別々に入れて 100 V で約 30 分泳動し、紫外線で増幅を確認した。

以上、(ア)～(エ)の方法で、目的の約 500 bp の位置に DNA の増幅を示すバンドを確認することができた。

イ 採水後の環境 DNA の保持方法の検討

DNA は常温下において分解されやすいため、採水した試料が輸送中に分解されることが考えられる。そこで、DNA の分解を防ぐことが知られているオスバン(塩化ベンザルコニウム) と、DNA 分解酵素の活性を妨げる EDTA (エチレンジアミン四酢酸) を試料に加える実験を行い、環境 DNA の保持可能時間を探った。オスバンは市販されている濃度で、EDTA は濃度 13.9% のものを用いて実験を行った。

以下の 4 種類の組み合わせについて調べ、各試料を採水後 0~48 時間、30℃ に保たれた恒温機に入れた後、DNA 抽出、PCR を行った。

- ① 試料+滅菌水 ② 試料+オスバン ③ 試料+EDTA ④ 試料+オスバン+EDTA

ウ 濾過濃縮による環境 DNA 検出方法の確立

実際の環境中から検出するためには、不純物を多く含む水を取り、濾過して環境 DNA を濃縮して検出する必要がある。ここで、濾過をして検出するまでの方法を検討した。

水槽から固形物が入るように水を 500 mL 採水し、濾過を行った。その際、ガラスフィルターを用い、濾過後のフィルターは以下のように処理した。

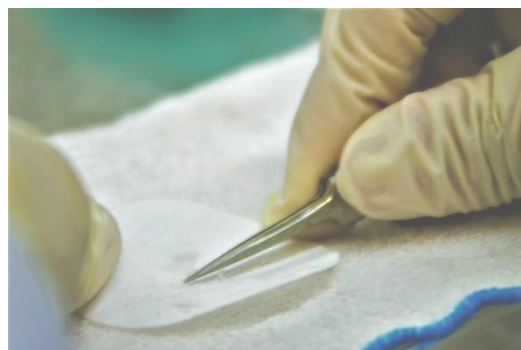


図4 フィルター上部を削る様子

I. フィルターの上面をピンセットで削り、固形物を取り出し DNA 抽出・PCR を行った(図4)。

II. フィルターを上面が内側になるように織り込んでエッペンチューブに入れた。

III. フィルターを上面が外側になるように織り込んでエッペンチューブに入れた。】※

※II と III は記述作業の後に、pH9.5 の塩基性水溶液を加え、十分なじませて DNA を溶かしだした後、フィルターを除き、残った溶液を遠心分離して上澄みを 50 μL 採取し、DNA 抽出・PCR を行った。

4 研究の結果・考察

DNA の保持については、オスバンのみを加えた試料③において、6 時間保存した試料まで DNA の増幅を確認できた(図5)。よって、オスバンを試料に加えれば 6 時間の環境 DNA の保持が可能であることが示された。EDTA を加えた試料②、④についてはいずれにおいても増幅が確認できなかった。これは、増幅の際に DNA ポリメラーゼの働きが EDTA の影響により阻害されたことが考えられる。ウの実験では、ガラスフィルターを用いて濃縮を行った全ての試料で増幅を確認した(図6)。ピンセットで削り取った I は、バンドの明度が強いことから、他と比べて多量の DNA の増幅が確認できるため、この方法が最も検出に適していると考えられる。

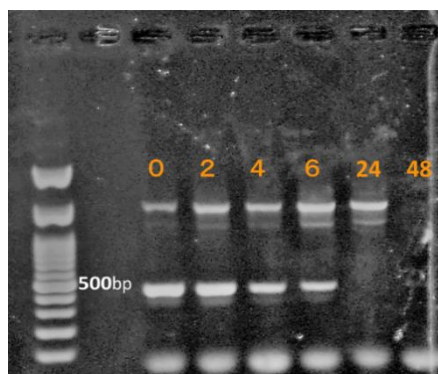


図5 オスバンを加えた試料における泳動結果(橙字は試料の保存時間)

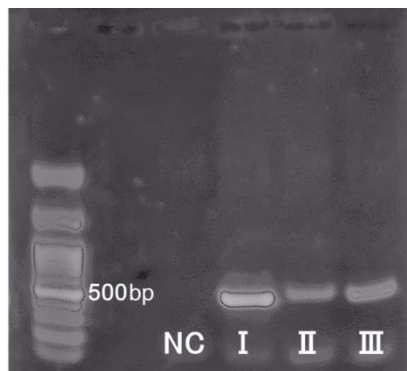


図6 抽出方法確立実験の泳動結果(NC では滅菌水を用いた)

以上の実験結果より、環境中での調査においては、

- ①各地で採取した環境水にオスバンを加えて輸送
- ②ガラスフィルターによって濾過濃縮
- ③フィルター表面を削り、固形物を取り出して DNA 抽出
- ④確立した温度サイクルで PCR 法により DNA を増幅
- ⑤電気泳動法で増幅を確認

以上の方法が有効であることがわかった。

5 野外での検出

確立した手法を用いて、環境中において実際にヤリタナゴの環境 DNA を検出することが可能か調査した。2017 年 10 月 28 日、午前 11 時 45 分から午前 12 時 00 分の間に県内でヤリタナゴの生息が確認されている浜松市都田川に出向き、試料を 500 mL、3 本ずつ採水した。

泳動結果を図 7 に示す。地点 A～C の 3 本ずつの試料で、それぞれ 1 本ずつバンドを確認した。これは、ヤリタナゴの生息を確認したことを示している。確立した手法での生息調査が可能であることが示された。

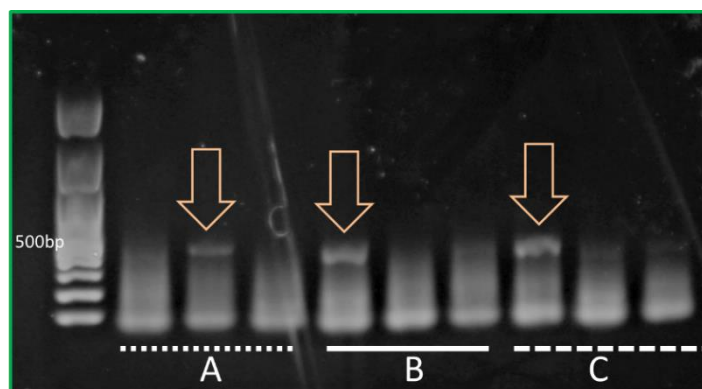


図 7 都田川での採水試料の泳動結果

6 まとめ・考察

本研究において、環境 DNA を用いた調査方法を確立するとともに、この手法が環境中からの試料に使えることが確認できた。今回確立した手法は、大型の機械を必要とせず、容易に実験を行える点で優れたものだといえる。

現在は、掛川市とその周辺で採水を行い、掛川市周辺地域におけるヤリタナゴの生息域の調査を進めている。今後は検出精度の向上を図るとともに、より多くの地点で採水を行い、生息域調査を行っていききたい。また、季節ごとの生息域の変遷や、個体数の調査も行っていく予定である。

参考文献)・Hiroki Yamanaka (2017) A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant Limnology vol 18 p233-241

謝辞) プライマーの情報を提供していただいた富山大学理学部 准教授・山崎裕治先生をはじめ、協力してくださいました皆様に感謝申し上げます。