

環境 DNA によるゲンジボタルの種の特定

静岡県立掛川西高等学校
自然科学部 2年 杉山寛晃 他 2名

1 研究動機

本校ではこれまでに、PCR 法による DNA 増幅方法を確立し、様々な生物を対象とした研究を行ってきた。本研究で扱うゲンジボタルについては、静岡県西部と東部、伊豆地区を対象に、発光周期の調査と、現地のゲンジボタルを採取してミトコンドリア DNA の配列の比較を行ってきた。その結果、これまでに報告されていない発光周期を示す種の可能性と、DNA の配列から外来種と在来種が混ざり合っている地区の確認等を行うことができた。しかし、私たちの研究では DNA を扱うため、生息数が減少傾向にあるボタルを捕獲して実験せざるをえないため、さらなる進展が難しい状況にあった。一方、昨年度本校では淡水魚のヤリタナゴを対象とする環境 DNA の研究を行った。環境 DNA とは、そこに生息する生物が環境中に排出する DNA のことで、これを検出できればその生物が生息することが分かるというものである。

私たちは、この環境 DNA を利用することができれば、ゲンジボタルを捕獲することなく、そこに存在するのが在来種か外来種かを判別できると考えた。さらに、環境 DNA はその生物の生息が確認できる。ボタルは幼虫の段階では水中にいるため、どの地区に、どの時期に幼虫としているのか把握することができれば、保護すべき水辺がどこなのかを、ボタルが成虫として発生する前に判断できると考え、研究に着手した。

2 研究内容

(1) 予備実験

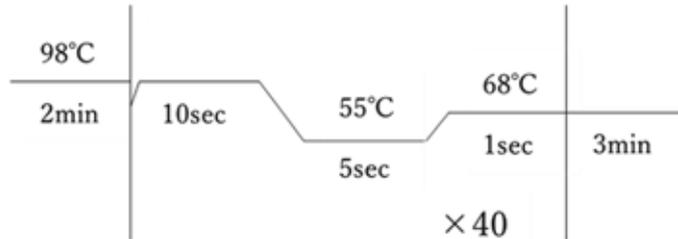
研究を始めるにあたり、まず初めにゲンジボタルを飼育している水槽中からの DNA 検出を試みた。

実験手順

- ア 水槽中から採取した水 499 mL に、DNA の長期保存に有効であることが確認されているオスバン(塩化ベンザルコニウム)を 1.0 mL 加え、これを試料とした。
- イ 粒子保持能 0.7 μm のガラスフィルターを用いて試料を濾過し、フィルターの上面を直接ピンセットで削り、固形物を取り出す。
- ウ 1.5 mL のエッペンドルフチューブに、DNA 抽出試薬として UniversAll™ Extraction Buffer II (Yeastern Biotech 社) 16 μL 、滅菌水 80 μL を入れた。そして、イの固形物を加え混合した。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。上澄み液を取り、これを DNA 抽出液とした。
- エ DNA 抽出液を含む PCR 溶液(図表 1)を作製し、図表 2 の PCR 条件で DNA を増幅した。

PCR 溶液の内訳	1 本当りの組成
KOD One™ PCR Master mix	25 μ L
滅菌水	22 μ L
プライマー混合液 (F+R)	2.0 μ L
DNA 抽出液	1.0 μ L
合計	50 μ L

図表 1 PCR 溶液の内訳



図表 2 PCR 条件

プライマーは参考文献に示された全地域のゲンジボタルに対応している以下のものを使用した。

F-primer 5' -TAATTCGTTTTAATTTTTGTTTTAG-3'

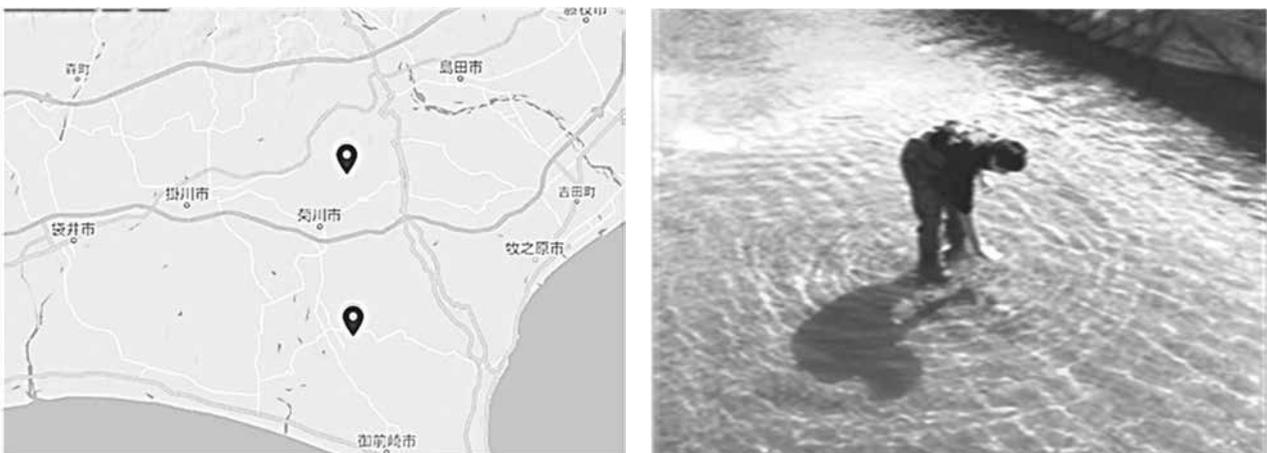
R-primer 5' -AAAATAAAATAAACCTTAAACTATTAT-3'

オ 目的の DNA が増幅できたことを確認するため、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°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 2.0 μ L 加えて作製した。電気泳動では 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 μ L 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～オの方法で目的の約 900 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。

(2) 野外実験 1

ホタルの成虫が観測されている菊川市牛湊川と富田川で採水を行い、実際の環境中からの検出を試みた。それぞれの川でボトル 3 本ずつ採水し、予備実験のアと同様にオスバンを加え、これを試料とした。



図表 3 採水地点と採水の様子

プライマーは参考文献に示された在来種、外来種、全種にそれぞれ特異的に結合するものを使用した。なお、全種対応のプライマーは、予備実験で用いたものと同じものである。Rプライマーは共通である。

在来種 F-primer 5' -TTATATGTGCAGGGTGTATG-3'
 外来種 F-primer1 5' -GTGTATAATCCATAATTTAATGAAC-3'
 外来種 F-primer2 5' -ATAATCCATAATTTAATGAAGCTGC -3
 R-primer 5' -AAAATAAAATAAACCTTTAAACTATTAT-3'

そして予備実験と同様の手順で DNA 増幅を試みたが、目的の位置にバンドは確認できなかった。

バンドが見られなかった原因は複数考えられたが、私たちは環境水中の DNA 濃度と DNA の断片化の2つの点に着目した。予備実験ではおおよそ 1 L あたり 2 匹のゲンジボタルの幼虫がいる水槽の水を試料として使っていたが、この試料の DNA 濃度は実際の環境水と比べると極めて高いと考えられる。また、今回使用したプライマーの増幅領域は約 900 bp と長く、一部断片化した環境 DNA と結合できなかったことが考えられる。

(3) 野外実験 2

野外実験 1 の結果を受けて、実験にいくつかの変更を加えた。

牛渕川と富田川よりも多くのゲンジボタルが観測されている御殿場市篠ヶ谷川で 1 月 4 日に採水を行った。

NCBI (National Center of Biotechnology Information) に登録されている塩基配列のデータ (ミトコンドリア DNA, COII) から、増幅領域の短い新たなプライマーを F プライマー、R プライマーでそれぞれ 4 つずつ、計 8 つ設計した。プライマーの組み合わせと領域は以下の表のとおりとした。

	F1 プライマー	F2	F3	F4
R1 プライマー	領域 1	2	3	4
R2	5	6	7	8
R3	9	10	11	12
R4	13	14	15	16

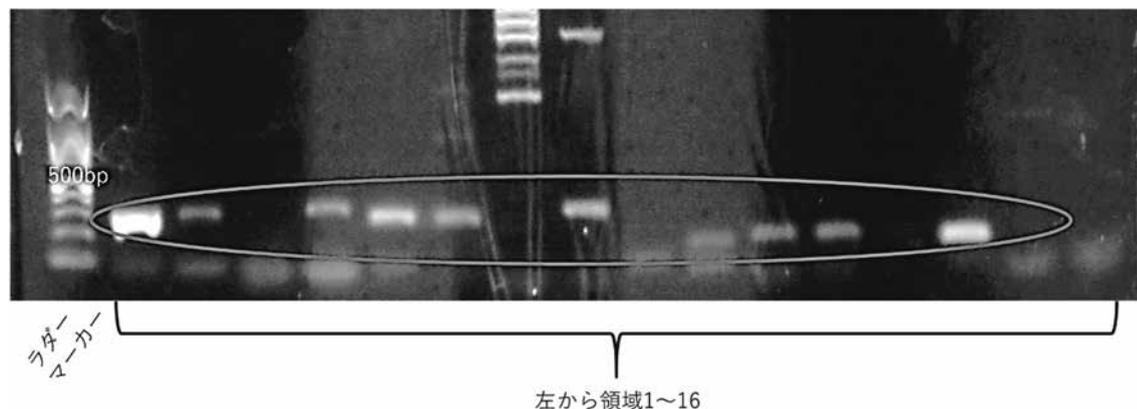
図表 4 プライマーと増幅領域の対応表

そして、野外実験 1 で用いたプライマーに新たなものを加えた計 13 個のプライマーを用いて実験を行った。このプライマーは、ゲンジボタルの配列の中で地域によって差がある場所を含むようにした。

その他の実験手順は野外実験 1 と同様に行った。

(4) 実験結果

泳動の結果、目的の位置にバンドを確認することができた。(図表 5 枠内)



図表 5 泳動結果

この実験結果から、ゲンジボタルの環境 DNA の検出に成功したことが分かった。一方で、目的でない領域の増幅であるエキストラバンドも多く見られた。種の判別に関しては、一カ所から採水したのにもかかわらず、複数のプライマーで増幅が確認された。

3 考察

野外実験 2 の実験結果より、環境水からのゲンジボタルの環境 DNA の検出が可能であることが示された。私たちが調べた限りでは、環境水からゲンジボタルの DNA の検出に成功したのは全国でこれが初めてである。しかし、今回の実験では、試料ごとの結果のばらつきが大きかった。環境 DNA は環境中にごく微量しか存在しないうえ、ゲンジボタルの幼虫は体長が小さく、魚と比べると活動が活発でないため、環境中に存在するゲンジボタルの環境 DNA は極めて少ないことが予想される。それにより、試料ごとの DNA 濃度に差が生まれ、今回の結果のばらつきにつながったと考えられる。

また、野外実験 1 の結果から、環境 DNA で用いるプライマーの増幅領域はある程度小さい必要があることが示唆される。今回新たなプライマーを設計するにあたり、当初はミトコンドリア ND5 遺伝子での作製を試みた。しかし、ゲンジボタルのミトコンドリア ND5 遺伝子は全体的に見て A(アデニン)、T(チミン)の含有率が極めて高く、短い増幅領域のプライマーを作製することが困難であったため、私たちはプライマーを設計する領域をミトコンドリア ND5 からミトコンドリア COII に変更した。ミトコンドリア COII 遺伝子においても A, T の含有率は高かったが、増幅領域が 200~300bp 程度のプライマーを複数個作製することができた。しかし、図表 5 の泳動結果から、これらのプライマーは種の判別に用いることは難しいことが考えられた。ここから、今回の領域では在来種と外来種の塩基配列のわずかな差を利用して判別するプライマーを設計しても、条件によっては他の種の DNA も増幅してしまうことが分かった。

4 今後の展望

環境 DNA による種の判別に向けて、検出精度の向上と新たなプライマーの設計が必要である。検出精度の向上に関しては実験手法を見直し、試料ごとのばらつきを減らしていきたい。新たな種判別用のプライマーの設計に関しては、より特異性を持たせるため、プライマーの 3' 末端から 3 塩基以内に在来と外来の塩基配列の差が入るように設計していく予定である。

5 参考文献

ミトコンドリア ND5 遺伝子の塩基配列から推定されたゲンジボタルの種内変異と分子系統昆虫.
ニューシリーズ 4(4), 117-127, 2001