

〈第 35 回 山崎賞〉

〈第 8 回高校生バイオサミット in 鶴岡 文部科学大臣賞〉

〈生徒理科研究発表会静岡県大会 高文連会長賞〉

〈第 16 回高校生科学技術チャレンジ JSEC2018 文部科学大臣賞〉

空中 DNA を使った鳥類調査法の確立

静岡県立掛川西高等学校

自然科学部 2年 岡本優真 塚本颯

1 研究の背景と目的

河川や土壌などの環境中に存在する DNA は「環境 DNA」と呼ばれ、水試料中や土壌試料中から環境 DNA を検出する手法が確立されている。研究対象の生物に由来する環境 DNA を検出できれば、その生物の生息域、生息時期、生息数を知る手掛かりとなるため、環境 DNA 分析の研究は近年注目を浴びている。

本研究では、水中や土壌中と同様に、空気中からの環境 DNA 検出を試みた。私たちは、特に鳥類に着目した。鳥類は、尾腺という器官から皮脂を分泌し、羽毛の表面に擦り付けることで羽毛の撥水効果を得る。羽毛についての皮脂等の微粒子は、鳥が羽ばたくときに空中に飛散すると考えられ、鳥類を飼育する際にケージが油分で汚れるという現象も主にこれによるものだと思われる。空気中に存在すると考えられる鳥類由来の微粒子を装置等を用いて集め(図 1-①)、鳥類の DNA を検出できれば(図 1-②)、空気中の環境 DNA (以後、空中 DNA) が検出可能であることが証明されたと考えた。



図 1 空中の環境 DNA 検出の方針

フクロウ(ウラルフクロウ、*Strix uralensis*)は、沖縄を除く日本全土に分布する身近な猛禽類として知られている。猛禽類は日本の生態系の頂点に位置し、生息を調査することでその地域の生態系の安定性を知ることができる生物であるが、フクロウ類は夜行性のため生息域調査が難しい。空中 DNA を検出する手法が確立すれば、フクロウ類の生息調査が容易になるだけでなく、他の鳥類でも有効な調査法になるに違いない。我々は、まずフクロウを対象に実験を始めた。

2 手法実現に向けて

(1) 空気中に浮遊する微粒子の採取

空気中の微粒子を採取するため、装置を製作した(図 2)。装置中には液体が入っており、液体内に空気を通すことで空中の微粒子を集める。液体は、水中環境 DNA の調査で DNA の長期(最低 6 時間)保持を確認した塩化ベンザルコニウム希釈液(体積 0.2%)を用いた。詳しくは、吸引ポンプでボトル内の空気を減圧し、中央のストローから外の空気が液体中に送り込まれる仕組みである。そのため、ポンプ内の空気が溶液に触れず、ポンプ内部に残留する DNA があっても採取用液体には残留 DNA が混入することはない。溶液を入れるボトルは 50mL サンプルチューブ(SARSTEDT 社)を使用し、塩化ベンザルコニウム希釈液 10mL を入れて採取に用いた。また、溶液を入れた状態で、ポンプの吸

引量は 23L/h、バッテリーによる連続駆動時間は 22 時間であることを実験的に確認した。ポンプ用クッションとしてスポンジを使用し、駆動中の騒音は平均約 30 デシベル(0.5m で測定)に抑えた。

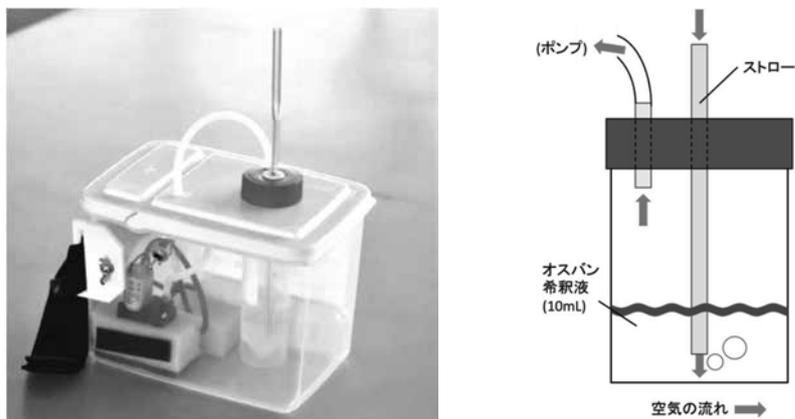


図 2 制作した装置 (写真/模式図)

(2) プライマーの作製と動作確認

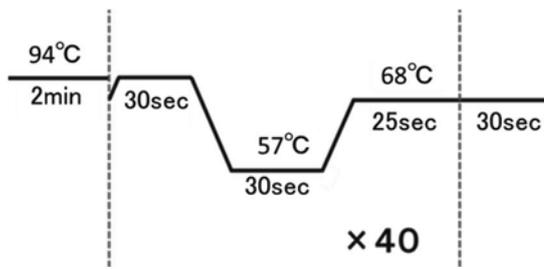
山階鳥類研究所の遺伝子バーコーディングに登録されている日本産フクロウ 7 個体の塩基配列データ (ミトコンドリア DNA, COI 遺伝子)の中から、静岡県に最も近かった長野県軽井沢産のデータを参考にして、フクロウに特異的な配列を含む 22~25bp の長さのプライマーを設計した。Tm 値は 64°C程度で、他の生物には見られない配列であることを DNA データベースで確認しながら設計した。プライマーは 6 つ設計し、組み合わせて用いることにより約 450bp の領域を 3 つ(領域 1、領域 2、領域 3)と約 700bp の領域 1 つ(領域 4)を検出する DNA の候補とした(図 3)。

ACCCTCTAGATAATCTTCGGCAGATGAGCCGGCATAGTTGGCACTGCCCTTAGCCTGCTCATCCGAGCCGAAGTAGGCCAACCTGGAACACTTCTAGGTG	1-100
<u>F1</u> <u>F2</u>	
ATGACCAAATCTACAACGTAATCGTTACTGCCCATGCCCTTGTAAATAATTTCTTCATAGTCATACCAATCATGATCGGAGGGTTGGAAACTGACTGGT	101-200
CCCCTAATAATTGGAGCCCAGACATGGCCTTCCCGTATAAACAACATAAGCTTTTGACTCCTCCCGCCCTCATTCTACTCCTATTAGCATCCTCC	201-300
<u>ACAGTAGAAGCCGGAGCAGGCACCGGATGAACCGTCTACCCCCACTAGCCAGCAACCTGGCCATGCTGGAGCCTCAGTAGACTATTTTCTCTC</u>	301-400
<u>F3</u>	
TCCACCTGGCCGGAGTGCTCCTCATCTAGGAGCAATCAATTTTATCACTACTGCTATTAACATAAAACCCCTTCTCTGTACAGTACCAAAACCCCT	401-500
<u>R3</u> <u>R2</u>	
ATTTGTATGATCGTCTTATCACCGCCATTCTCCTACTTCTATCACTCCAGTCTCGCCGAGGCATCACCATACTACTAAGTACCGTAACCTAAC	501-600
ACCACATTCTCGACCCTGCCGGGGGGGCGACCCGTCCTATATCAACACCTCTTCTGATTCTTGGACATCCAGAAGTCTACATCCTCATCCTGCCAG	601-700
<u>R1</u>	
GATTTGG	701-707

図 3 軽井沢産フクロウのミトコンドリア DNA COI 遺伝子の塩基配列と設計プライマーの位置

作製したプライマーを用いて、以下の方法でフクロウの DNA を羽毛から検出した。

- I. 静岡県産フクロウの羽のつけ根から羽軸を含む約 10mm を切り取り、滅菌蒸留水 15μL、抽出試薬 15μL を加えたチューブ内でホモジェナイズし、95°Cで 10 分間インキュベート、遠心分離 (4°C, 15000rpm, 10min)後、上澄み 1 μL を DNA 抽出液とした。
- II. 得られた DNA 抽出液を用いて図 4 の PCR 条件で DNA の増幅を行った。



抽出試薬
 UniversAll™ Extraction Buffer II (Yeastern Biotech 社)
 PCR 酵素
 Quick Taq® HS DyeMix (東洋紡社)

図4 PCR サイクルと試薬

Ⅲ. 電気泳動法により、領域1～4のDNA増幅を確認した。増幅されたフクロウのDNAについてシーケンシング解析を行ったところ、参考にした軽井沢産の塩基配列と1塩基の置換(C→A)が見られた。

(3) 羽毛表面の微粒子からのDNA検出

DNAが羽毛表面の微粒子から検出されるのかを確かめた。

ア 実験方法

塩化ベンザルコニウム希釈液を入れたサンプルチューブに10～20cmに切り取ったフクロウの羽毛をすりつぶさずに入れ、30秒ほど振り混ぜて羽を除いて得られた溶液から、DNAの検出を試みた。2-2に示した方法と同じ手順でDNA増幅を行った。

イ 結果

作製した溶液からフクロウのDNAが検出された(図5)。また、DNAの増幅を検出できたのは領域3のみであった。

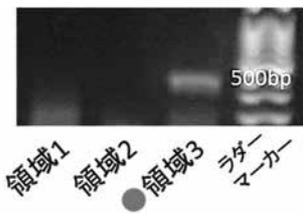


図5 泳動結果

3 野外実験

2018年7月～8月に、掛川市周辺の山林で野外採取を行った。装置は16:00～18:00に設置、翌朝8:00～10:00に回収し、採取時間を16時間程度にした。採取時間中に降水はなかった。また、装置は地面から約1m～1.5mの高さに設置した。



図6 設置の様子

(1) 採取場所

採取場所は掛川市と袋井市にまたがる小笠山山中(1・2)、菊川市・八穂神社(3)、御前崎市・賀茂神社(4)の4カ所である(図7)。

いずれも学校付近で調査が行いやすいため採取場所に選んだが、御前崎市の賀茂神社(4)については、予めフクロウの生息が確認されている場所として選んだ。

(2) 採取地点

採取した試料は冷却して学校まで運び、回収後3時間以内に処理した。試料50μLにDNA抽出試薬16μLを加え、実験2-2と同様の方法でDNA抽出・増幅を試みた。

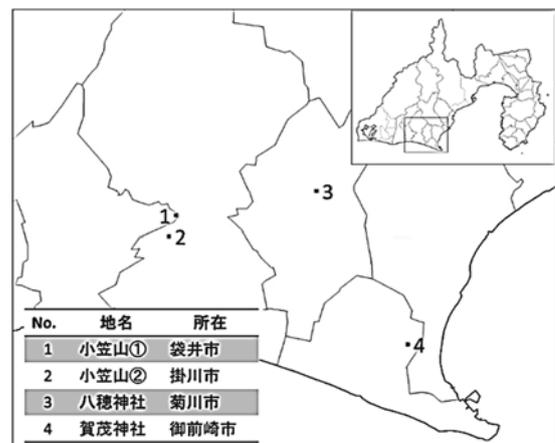


図7 採取地点

(3) 結果

採取した試料のうち、御前崎市賀茂神社と小笠山で採取した5つの試料から、全て領域3のみだがDNAの増幅を確認した(図8・9)。この結果から、フクロウの空中DNAの検出は可能であることが示されたと言えるだろう。

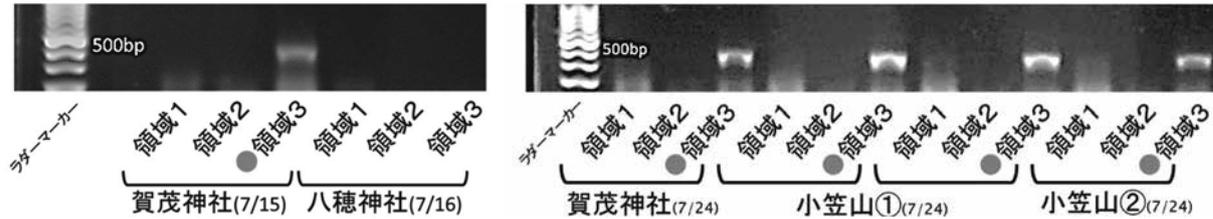


図8・9 泳動結果

4 他の鳥類での実験

ムクドリとアオバズクについても、それぞれCOI遺伝子・Cytb遺伝子の配列を参考にプライマーを設計・作製し、フクロウと同じ方法で空中DNA検出を試みた。

(1) ムクドリ

観察が容易な鳥で同様の調査をすることで、検出範囲などの詳細な確認ができると考え、ムクドリを対象に実験を行った。実験は2018年9月に行った。

ア 採取地点と採取時刻

ムクドリは掛川市内で主に夕方に多く集まっている。掛川駅周辺の2か所(図10)で、朝(9:00 - 12:00)、昼(12:00 - 15:00)、夕(15:00 - 18:00)の3つの時間帯で採取を行った。

A地点	ムクドリが多く集まった。
B地点	ムクドリが集まらなかった。

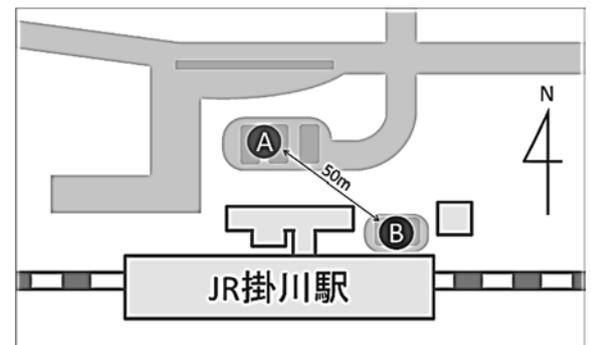


図10 A・B地点の位置

イ 結果

A地点で採取した試料からムクドリの空中DNA検出に成功した(図11)。また、ムクドリが特に多く集まった夕方の試料のみ検出した。

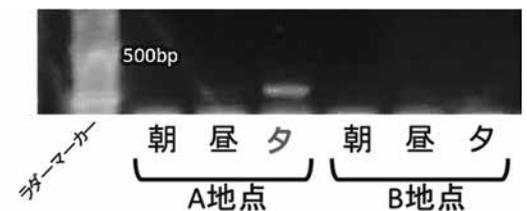


図11 泳動結果

(2) アオバズク

アオバズクは夏季(主に4月~11月)に繁殖のために日本へ飛来する渡鳥である。空中DNAの検出手法を用いることで、静岡県においてアオバズクが去るタイミングを観測することができるのではないかと考えた。

ア 7月に採取した試料(賀茂神社、小笠山)からアオバズクの空中DNA検出を試みた。

イ 結果

小笠山・賀茂神社で採取した試料ともに、アオバズクの空中 DNA の検出に成功した(図 12)。

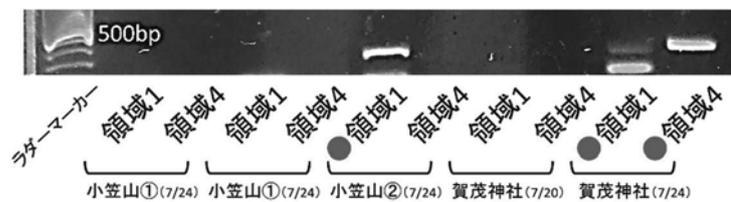


図 12 泳動結果

5 考察

フクロウ・ムクドリ・アオバズクについて、空中 DNA 検出に成功した。このことから、鳥由来の空中 DNA 検出は可能であることが示された。他の鳥類の調査についても空中 DNA を利用できるだろう。これはおそらく世界初の例であり、今後の応用が考えられる。

一方、DNA 増幅に関しては、羽毛をすりつぶした試料からは領域 1～4 がすべて検出されたにも関わらず、羽毛表面物質と野外実験においての DNA 増幅では、いずれも領域 3 しか増幅されなかった。よって、フクロウの空中 DNA は、羽毛そのものではなく表面にある微粒子から検出されていると考えられる。領域 3 でしか検出できない原因については、DNA の断片化や紫外線による影響(ピリミジンのダイマー化等)が考えられるが、今のところ決定的な証拠は得られていない。

また、実験 4 で調査した 2 地点は 50m しか離れていなかったにもかかわらず、ムクドリが集まった A 地点でのみムクドリの空中 DNA が検出された。このことから、実験 4 では狭い範囲の空中 DNA を検出していることがわかる。さらに、実験 3 から、フクロウの生息が確認されていた賀茂神社では空中 DNA が検出され、生息が未確認の八穂神社では検出されなかった。実験 4 の結果と合わせると、空中 DNA の検出手法は生息域の調査に用いることが可能であると考えられる。

実験 4 (2) で、アオバズクは夏季に小笠山と賀茂神社に生息していることがわかった。アオバズクは夏鳥であるため、冬季に空中 DNA が検出されなくなる、すなわち冬季にアオバズクがいなくなっていることを今後確かめたい。

6 今後の展望

本研究で確立できた空中 DNA の検出手法は、いままでの環境 DNA 研究では取り扱えなかった鳥類を調査できる点で、応用の幅が広い手法だろう。現在、オオタカやオオコノハズクのプライマーを作製しており、今後調査を行う予定である。また、空中 DNA 検出により生息個体数を把握する方法についても検討したい。

7 謝辞

研究助成をいただきました山崎自然科学教育振興会様、資料を提供いただいた静岡市立日本平動物園様、ふじのくに環境史ミュージアム様、日本野鳥の会会員宮本勝海様、研究をご指導くださった静岡県立大学河原崎泰昌准教授、静岡大学農学部一家崇志准教授に感謝申し上げます。

8 参考文献

- ・日本鳥学会「フクロウ」『日本鳥類目録 改訂第 7 版』日本鳥学会 (目録編集委員会) 2012
- ・山階鳥類研究所・国立科学博物館 遺伝子バーコーディング
- ・NCBI, Basic Local Alignment Search Tool - NIH
- ・近藤静夫「手指殺菌・消毒剤の科学」2002