

# 環境 DNA を用いた生物調査方法の検討

(一財)九州環境管理協会 環境部陸生生物調査課 大城戸 博文  
環境技術課 大井 和之  
水生生物調査課 柴田 幸次

## 1. はじめに

フィールドで動物を調査する場合、対象とする種類によって調査方法や調査時期、時間帯などを適切に設定しなければならないため、そこにどのような種類が生息しているかを事前に予測する必要がある。この予測は、対象地域や近隣地域で過去に実施された調査結果や地形、河川形態、現地の踏査結果を元に行い、生息が予測される種類に応じて現地調査を計画する。

水生動物調査を例に挙げると、実際の現地調査では投網や手網など生息する魚の種類に対応した様々な漁具を使用し、採集する。採集した生物の中には、成体の他十分に成長していない仔魚や稚魚も含まれ、外見では種類の判別が困難な場合もある。卵であれば種類を特定することがさらに難しくなる。これまでの環境調査では、種まで判別できない場合は、“〇〇科(属)の一種”と記録することが多々あった。

一方、生物は、体内に遺伝情報を記録した DNA (デオキシリボ核酸 (Deoxyribo-nucleic Acid)) を持っており、その遺伝情報は種類により異なっている。近年は、分析キットの普及や分析器の進歩により、DNA 分析手法が一般的に浸透してきており、これを活用することにより、仔魚や稚魚、卵などのように外見では種類の判別が困難な場合でも、種類を判別することが可能となってきた。当協会でも DNA 分析を行い、種類を特定する機会が増えているが、分析にあたっては、まだ技術上の課題も多く、精度の高い同定技術の必要性を感じているところである。

生物が生息している環境中には、その生物から剥がれ落ちた皮膚の細胞や腸の粘膜を含む糞が漂っている。この浮遊物に DNA が含まれていれば、採集、分析して、そこにどのような生物が生息しているか調べることが可能とな

る。環境中に漂っている DNA は“環境 DNA”と呼ばれ、水や土壌などの試料から抽出される。このように対象となる生物を採集するのではなく、採取した水や土壌の分析から調査地に調査対象生物が生息しているかどうかを特定する“環境 DNA 分析”が新しい方法として注目されている。

生物調査に環境 DNA 分析を活用すると、①現地では試料となる水や土壌の採取作業を行うだけでよいので、サンプリングにかかるコストが小さい、多数の地点で試料を採取して分布を把握することができる、②生息個体を採集する必要がないため、希少種を含む生息種を傷つけない、などの利点が考えられる。その一方で、環境 DNA 分析は発展途上の技術であり、試料の分析コスト、検出力や定量性等、検証しなければならない課題も多い。

当協会ではこれまでも生物の糞や魚のヒレ等からの DNA 分析にあたり、効率的なプライマーの設計や実験手順の構築により DNA 分析のコスト削減や検出力の検証を行ってきた。環境 DNA 分析は短時間・少人数による試料採取のみで広範囲の生息種を把握できるなど優れた部分があることから、我々もこの分析に取り組み、環境調査へ適用できるか検討を行った。



図1 ヒナモロコ

## 2. 材料と方法

### 2. 1 研究対象種

研究対象種はヒナモロコ (*Aphyocypris chinensis*) とした (図 1)。本種は、コイ目コイ科の淡水魚で、環境省・福岡県のレッドデータブックでいずれも絶滅危惧 IA 類、佐賀県のレッドデータブックで絶滅危惧 I 類とされている希少種である。その生息は、博多湾流入河川と有明海流入河川で記録されているが、現在では生息地は極めて限定的となっている。水中に生息しており採取が難しいため、生息調査に環境 DNA 分析を適用する意義がある種と判断して研究対象とした。

### 2. 2 試料の採取と保存

環境 DNA を採取する試料は、水試料 3 検体と土(底泥)試料 1 検体とした。水試料は、平成 26 年 1 月 11 日に対象種が生息している人工池、生息していないと考えられる河川、および対象種が飼育されている水槽から、それぞれ濁っていない箇所の上澄み液 3L をポリ瓶に採取した。土試料は、同日に人工池の底泥(池泥) 約 10g を葉さじを用いてポリ袋に採取した。採取した試料は、クーラーボックスで保冷して持ち帰った。

水試料は、採取当日に 1 $\mu$ m ガラス繊維フィルターで濾過し、DNA を含んだ浮遊物をフィルター上に捕集した。捕集した浮遊物が他のものと混ざらないようにフィルターを 1 つずつチャック付きポリ袋に入れ、DNA が分解せず長期間の保存に適しているとされる -20 $^{\circ}$ C で DNA 分析を行うまで保存した。土試料はそのまま -20 $^{\circ}$ C で保存した。

このほか、分析対照として用いるため、飼育しているヒナモロコのヒレの一部を切り取り、アルコールに浸漬し保存した。

### 2. 3 DNA 分析

#### 2. 3. 1 DNA 抽出と電気泳動

水試料は、浮遊物を捕集したフィルターを約 5mm 四方に切り取ったものを、標本切片は約 5mg を切除したものを、QIAGEN 社の DNeasy Blood & Tissue kit を用いて、マ

ニユアルに従って DNA を抽出した。また、土試料は約 200mg を QIAGEN 社の QIAamp DNA Stool mini kit を用いて同様に行った。

DNA 抽出の過程の概略を以下に示す。

- (1) フィルター上の懸濁粒子、標本切片や土を界面活性剤とタンパク質分解酵素によって溶かし、DNA を含む溶液を調製した。
- (2) この溶液にアルコールなどを混ぜ、シリカメンブレンフィルターに通すことで DNA を捕捉し、不純物を除去した。
- (3) シリカメンブレンフィルターに吸着した DNA をバッファー溶液で洗浄したのち、アルコールを含まない水で溶出させ分析溶液とした。

次に、得られた分析溶液に DNA が含まれているか検証するため、DNA 濃度マーカーとともに 2%LO3 アガロースゲルを用いて 100V で 20 分間電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色したのち、写真撮影した。

#### 2. 3. 2 ヒナモロコに特異的なプライマーの設計

研究対象としたヒナモロコのミトコンドリア DNA は、全配列が決定されている<sup>2)</sup>。これらを参考に、ヒナモロコとして判別可能な DNA の一部を特異的に増幅できるプライマー\*を設計することとし、プライマー設計用 web プログラム「Primer3plus」を用いてヒナモロコのミトコンドリア DNA 配列の中からプライマー候補配列を探した。探す際の留意点としては、プライマー候補配列が近縁の別種の DNA を増幅しないよう、ヒナモロコと同じ DNA 配列を有するコイ科のニッポンバラタナゴ、オイカワの DNA を比較し、ヒナモロコに特有の配列をプライマーとして採用した。チトクローム b 遺伝子領域(cytb)と制御領域(CR)から合計 3 組のヒナモロコのプライマーを設計した。プライマーの配列を表 1 に示す。

#### 2. 3. 3 PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction: ポリメラーゼ連鎖反応)

\* DNA 複製反応の起点となる 20 塩基程度の合成一本鎖 DNA 断片。

表1 設計したプライマーの塩基配列

名称	配列	向き
Ac_cytb_1F	CGGATTTTAACCGAGACCAA	順方向
Ac_cytb_1R	CCTCACGGAAGAACATAGCC	逆方向
Ac_cytb_2F	CCAAACTTATTAGGAGACCCAGA	順方向
Ac_cytb_2R	TCAGAACAAGAATTGAGTGATGG	逆方向
Ac_CR_F	TTTGCCTATTCTCATCCTT	順方向
Ac_CR_R	GGGATTAATCTATTCCCAGGTC	逆方向

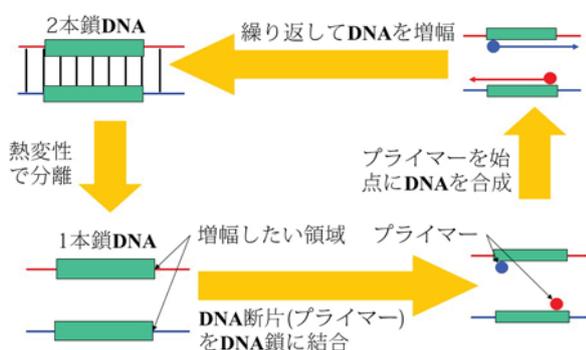


図2 PCRのしくみ

とは、プライマーと DNA、耐熱性 DNA 合成酵素などを混ぜた溶液を周期的に加熱・減熱し温度を変えることで、図2に示すように DNA の解離→プライマーの結合→相補鎖の伸長反応を繰り返して DNA の1対のプライマー配列には含まれた特定の部位を増幅する方法である。今回は94℃30秒→57℃45秒→72℃1分を1サイクルとして、それを35回繰り返し、対象とする部位を増幅させた。反応終了後、増幅された DNA を含む溶液の一部を取ってアガロースゲル電気泳動を行い、目的の DNA 断片の増幅の有無を確認した。

### 3. 結果

#### 3.1 分析溶液の電気泳動

分析溶液の電気泳動の結果、図3に示すように、濃度が薄いものの、人工池の水試料(池水)、飼育水槽の水試料(水槽)、人工池の土試料(池泥)のいずれからも DNA が抽出されたことが確認できた。河川の浮遊物からは目視確認できる濃度の DNA が得られなかったが、PCR では微量

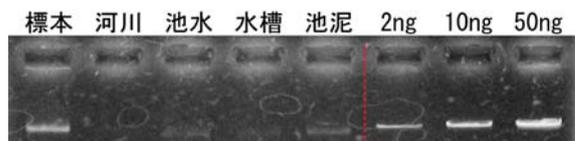


図3 分析試料(左側)と濃度マーカー(右側)

の DNA から目的配列を大量に増幅できる可能性があったため、他の試料同様に河川試料も PCR の対象とした。

#### 3.2 PCRによる増幅結果

今回作成したヒナモロコに特異的なプライマー3組を用いて PCR 法で増幅した結果、飼育水槽の環境 DNA からヒナモロコの DNA が検出でき、その塩基長は標本切片と同じであった。その結果を図4に示す。一方、ヒナモロコが放流されている人工池の水と池泥の環境 DNA からは、いずれのプライマー組においてもヒナモロコの DNA は検出できなかった。ヒナモロコが生息していないと考えられていた河川の環境 DNA からも PCR で増幅は認められなかった。

また、図4に示す3つのプライマー間で輝度の違いはほとんどなく、今回作成したヒナモロコに特異的なプライマー3組の検出力は同等であった。

### 4. 考察

飼育水槽の環境 DNA からヒナモロコ DNA が検出(増幅)できたことから、生体を捕獲・観察しなくても DNA 分析によって特定の生物の生息を確認できることがわかった。しかし、ヒナモロコが放流されている人工池の環境 DNA では、電気泳動により DNA の存在が認められたものの、PCR による増幅ではヒナモロコ DNA は検出されず、現時点ではプライマー設計が妥当であったかを含め、環境 DNA 分析の検出力が十分とはいえないことがわかった。ヒナモロコ DNA が検出された飼育水槽の環境 DNA 中の DNA 濃度は、人工池の水や泥から得た DNA 濃度よりも低く(図3)、藻類など他の生物の DNA が混入していることが PCR 反応に悪影響を及ぼしている可能性がある。そのため、採水量の不足や PCR 反応最適条件の未解明が課題となった。今後、微量 DNA から確実に増幅が行われるように適切な採水量や PCR 反応条件の検討を進めていき

たい。一方、他のコイ科魚類が生息すると推定される河川の環境 DNA から PCR 増幅がみられなかったことは、他のコイ科魚類に反応して誤判定する可能性は低いことを示している。

今回、分析に用いた水試料は 3L で、1 枚のフィルターで浮遊物を捕集して分析に供したが得られた DNA の濃度はかなり薄いものであった。分析の精度をあげるためには、1 地点の試料から複数回の分析を行う必要があるが、そのためにははる過量を増やさなければならない。また、DNA 抽出のコスト削減と効率化のためには、キットを使わずにフィルターから効率的に DNA 抽出を行う方法の確立が必要である。このように今後、環境 DNA からの対象種 DNA の検出効率を上げるために、サンプル量を増やして反復分析を行うこと、DNA 抽出および PCR 反応の方法を改良することや定量 PCR (ごく少量の DNA でも定量的に増幅できる PCR 法) を導入することを検討する。

今回試みた特定の水生生物の検出を目的とした環境 DNA 分析では、サンプリングは 1 地点あたり十数分で済み、多くの地点での調査を効率的に進めることができた。また、DNA 分析は同時に複数検体を処理することで効率的に進めることができ、20 検体程度であれば、DNA 抽出、PCR 反応と電気泳動によるチェックまで全て行って約 1.5 日の工程であった。1 河川の上流から下流まで、目視観察で 15 地点の調査を行うと少なくとも 10 人日以上になることを考えると、環境 DNA 分析によって非常に効率的に分布調査を行うことができる。特に、捕獲することが環境攪乱につながる希少種調査においては、生体を傷つけることなく生息確認できることは大きなメリットである。

なお、生物相を把握するためにその場に生息する魚類全

ての DNA を分析するには、魚類一般に同じ塩基配列になる領域をプライマーとして PCR を行い、その PCR 産物を次世代 DNA シーケンサーで分析してどの種の塩基配列が何%含まれるか明らかにする、という方法が考えられるが、現時点ではコストや分析精度の点で環境調査での実用には至っていない。

広島大学や神戸大学などの研究者によって、環境 DNA を用いた生物調査手法の確立に向けた研究が積極的に行われ、例えばため池の水中の DNA による外来種 (ブルーギル) の分布調査では目視観察よりも効率的に把握することができている<sup>3)</sup>。このことは、捕獲が難しい水生動物の分布を把握する上で、環境 DNA を用いた分析が有望な技術であることを示している。当協会でも希少種や外来種の動物調査における手法として、新しい技術の獲得や調査精度の向上に努めていきたい。

## 参考文献

- 1) Minamoto T., *et al.* Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* **13**(2), 193-197. (2012)
- 2) Saitoh, K., *et al.*, Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): the first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater fish clade based on 59 whole mitogenome sequences, *J. Mol. Evol.*, **63** (6), 826-841 (2006).
- 3) Takahara T., *et al.*, Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds, *PLOS ONE*, **8**(2), e56584 (2013).

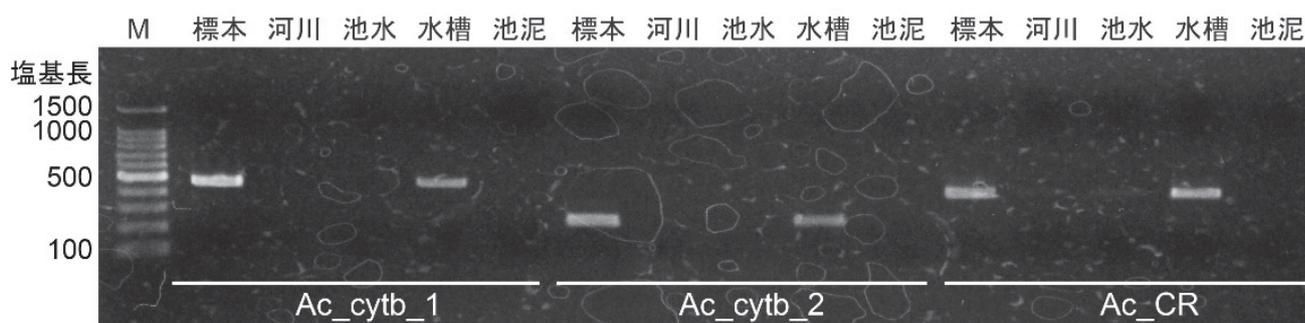


図 4 PCR で増幅された DNA