

第 63 回日本生態学会大会を終えて

十 河 勇 樹

Yuki SOGO

環境ソリューション工学専攻修士課程 2年

1. はじめに

2016年3月20日～24日に開催された第63回日本生態学会大会に参加した。また「環境 DNA 分析におけるリアルタイム PCR とデジタル PCR の検出率の比較」というタイトルで口頭発表を行った。

2. 目的

近年、水棲生物のモニタリング手法として環境 DNA 分析が注目されている。環境 DNA (以下 eDNA) とは生物由来の DNA 断片の事であり、野外から採水した試料水をフィルター濾過・DNA 抽出する事で獲得したサンプルを分析する事で生物の在・不在判定だけでなく生物量の推定を行う事が出来る手法である。eDNA を分析する際、一般的にリアルタイム PCR (以下 qPCR) が用いられている。qPCR とは濃度既知の対象生物の DNA を用い検量線を作成し、サンプルと検量線を比較する事で相対的に定量することが出来る手法である。一方、新たな環境 DNA 分析手法としてデジタル PCR (以下 dPCR) が期待されている。dPCR とは、2万個の well が刻まれたチップ上にサンプルを充填し PCR を行う事で、サンプルが充填された well のうちいくつの well で陽性反応が見られたかを分析する事で絶対定量が出来る手法である。qPCR と比べ、検量線を必要とせず DNA が低濃度なサンプルに対しても高感度な検出力・高精度な定量性を有し、PCR 阻害物質にも強い分析手法であると言われている。PCR 阻害物質とは、PCR 反応を抑制する働きをする物質である。これらの物質にはフミン酸やタンニン酸といった植物由来の有機酸等が報告されている。

dPCR は近年になって開発された手法であるため、野外サンプルに適用された研究例が少なく実際にどの程度の検出力や定量精度があるか明らかになっていない。本研究では、溜池のような PCR 阻害物質が多く含まれていると考えられるサンプルを qPCR 及び dPCR で分析を行い、検出率と定量精度を比較する事で dPCR の性能を評価した。

3. 方法

調査地は滋賀県大津市にある月の輪大池とした。採水地より、0.1・0.5・1.0・2.0・4.0 (L) の水量をフィルター濾過・DNA 抽出しサンプルを獲得した。獲得したサンプルは濾過量の違いにより含まれている PCR 阻害物質の濃度が同一比で変化していると考えられる。濾過量に依存した PCR 阻害の効果を検討するため、各濾過量のサンプルに対し溜池にはいないスズキの精製 DNA を内部標準として既知量 (45 copies/ μ L) を添加し、qPCR 及び dPCR を用いてそれぞれのサンプル 8 繰り返しで分析を行った。

4. 結果及び考察

qPCR 及び dPCR を用いて分析した全てのサンプルにおいて陽性反応が確認された。濾過量の違いによりつものプルに同一量のと考えられ、その物量の推定も定量された DNA コピー数に差があるかを一元配置の分散分析を用い統計的に解析した。その結果、有意な差は見られなかった (Fig. 1)。濾過量の違いにより定量された DNA コピー数に有意な差が見られなかった為、qPCR 及び dPCR で定量された DNA コピー数のデータを纏め、t 検定を用い両手法間で定量精度に差があるか統計的に解析した。その結果、dPCR の方が CV 値が有意に低い値を示した (Fig. 2)。これらの結果から、dPCR の方がより高い精度で DNA を定量できる手法である可能性が示唆された。また濾過量の違いにより定量された DNA コピー数に差が見られなかった理由として、今回用いたサンプルに PCR 阻害物質があまり含まれていなかった可能性や対象生物の DNA がより低

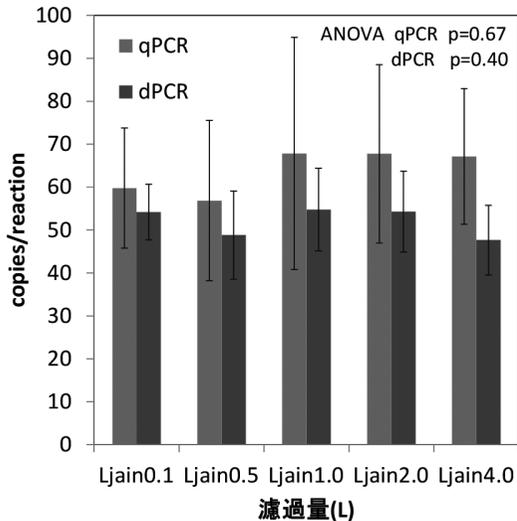


Fig. 1 両手法により定量された DNA コピー数の比較

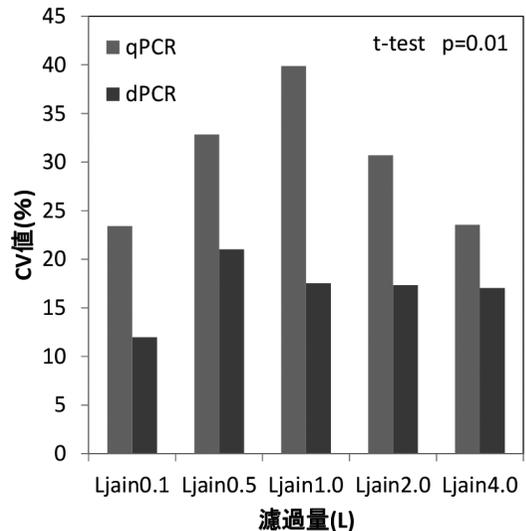


Fig. 2 両手法の変動係数 CV 値の比較

濃度の場合に PCR 阻害物質の影響が出てくるのではないかと考えられる。

5. 生態学会を終えて

今回初めて学会に参加したが、まず生態学会の規模が私の想像以上であった。学会登録者数が4000人を超えており、世の中にこれほど生態学者がいるのかと驚いた。また環境 DNA が非常に注目されている研究分野であるという事を肌で感じた。環境 DNA に関する口頭発表、ポスターには非常に多くの人が集まっており、改めてこの研究分野に関わっている事に関して身が引き締まる思いを感じた。口頭発表に関しては事前にしっかり練習を重ねていた

為、滞りなく発表することが出来た。質問に関しては非常に簡単なものしかなかったので、簡潔に分かりやすく情報を伝える事が出来たのではないかと思う一方、私が学会を通してディスカッションしたいと考えていた所をより強調して発表した方が良かったのではないかと感じた。

6. おわりに

今回の第63回日本生態学会で口頭発表するにあたり、懇切丁寧な指導をして頂いた山中裕樹講師、土居秀幸准教授をはじめ、たくさんの方々から助言を頂いた。ここに厚く感謝の意を申し上げる。