

第 63 回日本生態学会に参加して

本澤 大生

Hiromu MOTOZAWA

環境ソリューション工学専攻修士課程 2年

1. はじめに

私は 2016 年 3 月 20 日から 24 日に開催された第 63 回日本生態学会に参加し、「マルチプレックス PCR による環境 DNA 試料を用いた複数魚種同時検出手法の開発」という題目で口頭発表を行った。

2. 研究概要

2.1 研究背景

生物がどこに、どれだけいるかといった生物の分布調査から得られる情報は、生態系の維持管理に必要不可欠である。生物の分布調査は現在、投網や電気ショック漁法などが一般的である。しかし、この手法では人手や時間が多大に必要となるので短期間に広範囲の調査を行うことが難しい。そこで、近年注目されているのが環境 DNA（以下、eDNA）分析である。この分析は、生物が環境中に DNA 断片を何かしらの形で放出しており、それを回収することによって調査地域の生物の定性調査を行う技術である。この eDNA 分析は特定の DNA のみを増幅させる PCR を用いることにより可能となる。

現在の研究では水環境での調査が多く、現地での調査内容は調査地で採水してくるのみである。そのため 1 地点で必要とする調査時間は非常に短く、現地では採水を行うのみなので人手も少なく済むことから、従来の調査手法と比較してコストが小さく済む。また、eDNA 分析は非常に検出感度が高く、従来の調査手法に比べ、迅速かつ高い検出能力を有する調査手法であると考えられる。

しかし、この eDNA 分析では 1 回の PCR で 1 種の検出を行うのが一般的な手法である。しかし、それでは複数種に対して調査を行う際には、調査対象種数分の PCR を実施する必要が生じ、時間や試

薬、サンプルが多く必要となる。そこで本研究では 1 回の PCR で複数種の検出を行うマルチプレックス PCR を eDNA 分析に適用し、マルチプレックス PCR による環境 DNA 試料を用いた複数魚種同時検出手法の開発を試みた。

2.2 方法

海から河川へ遡上する性質を持つアユ (*Plecoglossus altivelis*)、スズキ (*Lateolabrax japonicus*)、ボラ (*Mugil cephalus*) の 3 種を対象種とし、ミトコンドリアの Cyt *b* 領域を対象とした種特異的な既存のプライマー・プローブを用いた。プローブはアユが TAMRA-BHQ、スズキが JOE-BHQ、ボラが FAM-BHQ の系を使用した。マルチプレックス PCR を行うにあたって、各種のプローブ終濃度はアユが 375 nM、スズキが 66 nM、ボラが 45 nM とした。これは各種のプローブの蛍光強度を揃えるためである。

野外サンプルを用いて 1 種ずつ分析する従来手法の PCR とマルチプレックス PCR の結果の比較を行うため、2015 年 8 月 10 日と 9 月 8 日に大阪湾へ流入する 15 河川でサンプリングを行った (図 1)。PCR 分析は両手法とも 1 サンプル 3 繰り返しで行い、DNA の在不在の判定を行った。

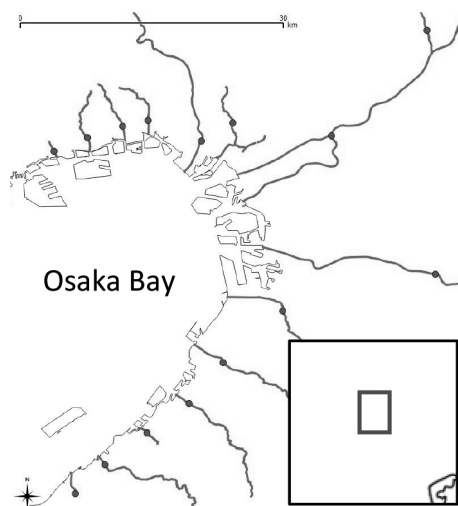


図 1 大阪湾流入河川の調査地点

2.3 結果及び考察

15 地点の野外サンプルをアユ、スズキ、ボラの 3 種について従来手法の PCR とマルチプレックス PCR のそれぞれで分析を行ったところ、結果の 91 % が一致した (図 2)。このことから、今回考案した eDNA 試料を用いたマルチプレックス PCR の分析手法は十分に実用可能な検出能力を有することが証明された。また 4 個の異なる結果については、両手法の間に検出能力の偏りが無いことから検出能力の違いではなく、河川内のバイオマスが少ない種の eDNA がサンプル中に存在する確率に依存した問題である可能性が高い。

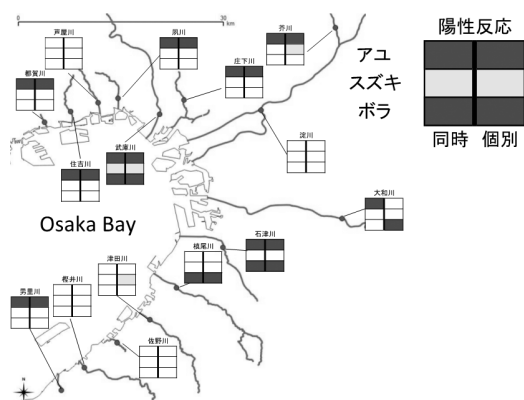


図 2 マルチプレックス PCR と 1 種ずつ個別に分析を行う従来手法の PCR による大阪湾流入河川におけるアユ・スズキ・ボラの eDNA の定性分析結果

今回の大阪湾 15 地点における対象種 3 種の調査のコスト計算をしたところ、濾過から PCR にまでかかった分析費用は 45,649 円から 29,422 円へと 35.6%, PCR の仕込みから分析にかかった時間は約 5.5 時間から 2.5 時間へと 54.5%, サンプルの使用量は全体の 6% から 2% へと 66.7%, それぞれ削減された。この成果は eDNA 分析の更なる発展に大きく寄与されるものであると考えられる。

2.4 まとめ

本研究によってマルチプレックス PCR による eDNA 試料を用いた複数種の同時検出手法は確立された。これにより様々な面で大きくコストの削減が可能となったため、より一層の eDNA 分析技術の発展が期待される。

3. おわりに

今回の学会に参加したことにより、多方面の研究者の方から数多くの貴重な意見を頂くことが出来た。これらの頂いた意見は今後の研究の発展に活かしていきたい。

また、今回このような研究発表の場を与え、ご指導して下さいました山中裕樹講師、ならびに本研究に協力して下さいました山中研究室の皆様へ厚く御礼を申し上げます。