

## 第 81 回日本陸水学会を終えて

十 河 勇 樹  
Yuki SOGO

環境ソリューション工学専攻修士課程 2016 年度修了

### 1. はじめに

2016 年 11 月 3 日～11 月 6 日、沖縄県琉球大学農学部にて開催された第 81 回日本陸水学会大会に参加した。本大会において「環境 DNA 分析におけるデジタル PCR の定量精度と PCR 阻害耐性について」という題目で口頭発表を行った。

### 2. 研究目的

近年、水棲生物のモニタリング手法として環境 DNA 手法が注目を集めている。環境 DNA (以下 eDNA) とは、環境中の生物由来の DNA 断片のことであり、野外から採水した試料水に含まれる eDNA を分析することで生物の在・不在判定だけでなく生物量の推定も行うことができる。eDNA から種特異的な DNA を分析する際、一般的にリアルタイム PCR 法が用いられているが、新たな分析手法としてデジタル PCR が期待されている。デジタル PCR はリアルタイム PCR と比べ DNA が低濃度な試料に対しても検出力・定量精度に優れ、野外水中に含まれる PCR 阻害物質の影響を受けにくい手法であると言われている。PCR 阻害物質とは植物由来のフミン酸やタンニン酸といった植物由来の有機酸を指し、このような物質が作用することにより DNA の検出率が低下する (Takahara *et al.* 2015) といった報告がされている。しかし、野外試料に用いられた例は少なくどの程度の定量精度や PCR 阻害耐性があるのか明らかになっていない。本研究ではため池のような PCR 阻害物質が多く含まれる環境から採水した試料をリアルタイム PCR 及びデジタル PCR で分析し、デジタル PCR の定量精度や PCR 阻害耐性を評価することを目的とした。

### 3. 方法

2016 年 6 月 28 日に京都府亀岡市にある中池で採水を行った 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 (L) の水量をフィルター濾過し、その後 DNA 抽出を行った。濾過量を変えることでサンプル中の PCR 阻害物質の濃度を変化させることが狙いである。DNA 抽出後の各サンプル 13.5 (μL) に対し、デジタル PCR の定量結果に基づき調整した採水池にはいない魚種であるスズキ (*Lateolabrax japonicus*) の DNA (133.33 copies/μL) を 1.5 μL ずつ添加した。同時に TE Buffer 13.5 μL に対し同濃度のスズキ DNA を 1.5 μL 添加したサンプルを作成 (以下 Lja only) し、野外サンプルに DNA を添加して作成したサンプル (以下 Lja in Nakaike) との比較を行った。作成したサンプルをリアルタイム PCR 及びデジタル PCR で分析した。各サンプル PCR の繰り返しを 3 回行い、実験の繰り返しを 5 回行った。

### 4. 結果

Lja only の定量結果が本来得られる定量結果の真値と考え、Lja only の定量結果から各濾過量の Lja in Nakaike の定量結果を差し引いた値の絶対値を

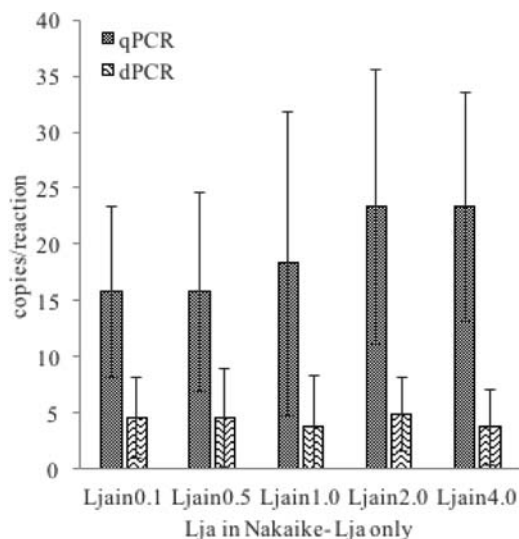


Fig. 1 リアルタイム PCR 及びデジタル PCR の定量結果の比較

Fig. 1に示した。リアルタイム PCR はデジタル PCR の定量結果と比べ、Lja only の定量結果より離れた値を出す傾向が見られた。また濾過量別にリアルタイム PCR 及びデジタル PCR での分析値を t 検定で比較したところ、いずれの濾過量のサンプルにおいてもデジタル PCR の方が Lja only との定量結果の差が有意に低い結果を示した (t-test,  $p < 0.05$ )。

## 5. 考察

今回の結果より、リアルタイム PCR よりデジタル PCR の方が定量精度に優れている可能性が示唆された。対象生物の在・不在判定だけでなく定量された DNA 濃度も厳しく評価しなければならない場合は、デジタル PCR 分析を用いた方が良いと考えられる。eDNA 分析において eDNA 濃度からの生物量の推定は多く試みがなされている (Takahara *et al.* 2012, Thomsen *et al.* 2012, Pilliod *et al.* 2013, Moyer *et al.* 2014) が、DNA 分解のメカニズム、野外試料中に含まれる PCR 阻害の影響評価等、DNA を定量する際に重要であると考えられる事象に関して未だ明らかになっていない事も多い。個々の事象のメカニズムを解明しつつ、定量精度の高い手法を用いることで生物量推定の精度を上げることが可能である。

## 6. おわりに

今回の第 81 回日本陸水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龍谷大学山中裕樹講師、兵庫県立大学大学院土居秀幸准教授をはじめ、多く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。

### 参考文献

- Moyer GR, Díaz-Ferguson E, Hill JE, Shea C (2014) Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems. PLOS ONE, 9: e103767
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP, Richardson J (2013) Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 70: 1123-1130
- Takahara T, Minamoto T, Doi, H (2015) Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*). Biological Conservation, 183: 64-69.
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. PLoS ONE, 7: e35868
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MT, Orlando L, Willerslev E (2012) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology, 21: 2565-2573.