

## 第 65 回日本生態学会大会 に参加して

平 尾 陽 平

Yohei HIRAO

環境ソリューション工学専攻修士課程 1年

### 1. はじめに

私は 2018 年 3 月 14 日から 18 日にかけて札幌コンベンションセンターで開催された、第 65 回日本生態学会大会に参加し、「環境 DNA からの魚類ミトコンドリア全長配列に向けた PCR 条件の検討」という題目でポスター発表を行った。

### 2. 研究内容

#### 2.1 背景

環境 DNA 分析では、一般的に mtDNA の短鎖断片を解析することで、マクロ生物の在不在や生物量、種組成の推定が行われている。マクロ生物の環境 DNA から長鎖断片の検出に成功した研究例は僅少であるが、これが可能となれば水を汲むだけで種内の遺伝的多様性を評価することや、複数の遺伝領域についての情報を同時に得ることができ、環境 DNA 分析の利用拡大に大きく貢献できると期待される。この解析を可能にするためには、僅かながらも存在していると考えられる長鎖断片を適切に増幅するための PCR 条件の最適化が必要である。そこで本研究では、環境水から魚類の mtDNA 全長を増幅できる PCR 条件の検討を行い、環境水から mtDNA の全長配列を回収できることを示す。加えて、次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディングにより全長増幅産物の確認を行った。さらに、環境 DNA 試料から従来の環境 DNA 手法と同様に短鎖断片を増幅し、検出された魚類種数と全長増幅産物から検出された魚類種数を比較した。

#### 2.2 方法・結果

ハスの組織試料及びカワムツの飼育水から得た

DNA 試料を対象として PCR 条件を確認した。その結果、16 SrRNA 領域に設計された魚類の mtDNA を一度の PCR で全長増幅できる既存のプライマーセットと PCR 酵素 KOD FX Neo を用いたステップダウン PCR（アニーリング温度：74~68℃）による増幅で目的産物の単一バンドが確認された。次に、京都府の宇治川と木幡池で採取した環境水からの増幅試験を行った。35, 40, 45, 50 サイクルで PCR を行ったところ、45, 50 サイクルの増幅産物では両試料から目的断片長の増幅が確認された。非特異的増幅やスミアが少なかった 45 サイクルの増幅産物を元試料として、どのような魚類の DNA が含まれているのかを知るためにメタバーコーディングを行った。その結果、宇治川の試料ではコイやカワヨシノボリなど 5 種が検出され、木幡池の試料ではゲンゴロウブナやモツゴなど 4 種が検出された。これに対して、従来の環境 DNA 分析と同様の短鎖断片増幅の検出結果は宇治川の試料では長鎖断片から検出された 5 種を含む 21 種が検出され、木幡池の試料でも長鎖断片から検出された 4 種を含む 13 種が検出された。

#### 2.3 考察・展望

本研究の PCR 条件の検討結果により、環境 DNA 試料に全長サイズの魚類 mtDNA が含まれていることが明らかになった。長鎖断片からの検出種数は短鎖断片の結果と比べると少ないが、一種ごとでは長鎖断片で検出された種は長鎖断片でも短鎖断片でも安定した DNA 量を示しており、研究対象種や調査地点を適切に選定すれば、十分に利用出来る技術であると考えられる。今後は複数種の DNA が混在している試料から長鎖断片の DNA を高精度に解析できる手法について検討し、本研究で回収したミトコンドリア DNA 全長配列の解析を可能にすることで種内の遺伝的多様性を評価することや、複数の遺伝領域についての情報を同時に得ることなど、現在は個体から直接 DNA を得るしかない解析までもが水試料から解析できるようになると期待さ

れる。

### 3. おわりに

今回、学部生という立場ながら、初めて学会で発表する機会を頂き、様々な方々から貴重な意見を頂くことができた。しかし、私の説明が不十分になったり、うまく受け答えが出来なかったりと議論が滞ってしまう場面もあり反省点も多く残った。また、

他の参加者の発表に触れることで、新しい知識を得ることができ、自分の研究の課題や新たな研究テーマの着想などを考えることができた。今回の学会参加を通して頂いた貴重な意見や反省点、経験などを活かし今後の研究ではより一層励みたいと考える。

最後に、研究や学会発表に関してご指導いただいた山中裕樹講師に深くお礼申し上げます。