

## 第 66 回日本生態学会大会 に参加して

廣原 嵩也

Takaya HIROHARA

環境ソリューション工学専攻修士課程 1年

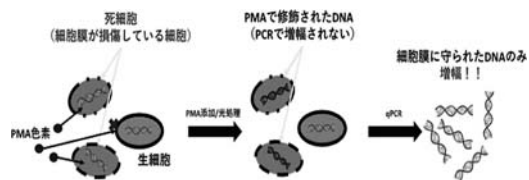


図 1 PMA 色素の性質

### 1. はじめに

私は 2019 年 3 月 15 日から 19 日に神戸国際展示場で開催された、第 66 回日本生態学会大会に参加し、「環境 DNA 分析における PMA 色素の有用性」という題目でポスター発表を行った。

### 2. 発表内容

#### 2.1 背景

環境 DNA とは、土壌や水などかの環境中に生物が放出した核酸の総称である。この環境 DNA を環境中より回収し、分析することによって、生息する生物相の把握や検出を行うことができる。環境 DNA 分析での調査は、調査地の水を汲むだけであるため、目視調査や捕獲調査などの一般調査と比較して、時間・経費のコストが抑えられる。そのため、近年、水域での環境 DNA 分析について関心が高まっている。しかし、現在の環境 DNA 分析では、実際に生息している生物由来の DNA 以外にも死骸・堆積物・漁港からの排水由来の DNA も検出している、という問題を抱えている。そこで、これらの問題を改善するために、微生物研究などで利用されている PMA (propidium monoazide) 色素に着目した。PMA 色素は、DNA に対して高い親和性を持つ光反応色素であり、強い可視光に曝露すると二本鎖 DNA と共有結合を形成し、PCR による DNA の増幅を阻害する色素である。また、細胞膜不透過性であるため、個体から放出されて間もないと考えられる細胞膜で保護されている DNA のみを選択的に検出することができる。しかし、PMA 色素を魚類細胞に用いた研究例はない。

そこで本研究では魚類を対象とした環境 DNA 分

析において、PMA 色素を用いた分析手法の開発と有用性について検討することを目的とした。

#### 2.2 方法・結果

PMA 色素は微生物用の試薬であるため、ゼブラフィッシュの飼育水を用いて実験を行った。ゼブラフィッシュの飼育水から採水し、ろ過、PMA 色素を用いた処理（以降 PMA 処理とする）、DNA 抽出を行い、その後、定量 PCR (qPCR) によって DNA を定量した。6 L の飼育水を 3 L ずつに分注し、一方の飼育水を疑似的に損傷を受けた細胞を作り出すために 10 分間煮沸し、もう一方を煮沸の間室温で放置した。その後、ろ過を行った。その結果、PMA 処理を行った飼育水中の環境 DNA 濃度は、煮沸を行うことにより減少することが確認された。

次に、水槽環境とは異なり様々な環境にさらされている野外的水でも細胞膜によって保護されている DNA は存在するのか、また、細胞膜はどれほどの期間膜機能を維持しているのかを確認するため、コイを対象種として実験を行った。コイの生息している野外的池から 18 L 採水し 0, 1, 2, 3, 5, 7 日後にろ過、PMA 処理、DNA 抽出を行い、その後 qPCR によって DNA を定量した。結果より、環境水においても細胞膜によって保護されている DNA が存在することが示された。さらに、PMA 色素を使用した試料では 5 日後の検出を最後に 7 日後には非検出となった。

#### 2.3 考察・展望

今回行った実験により、PMA 色素が魚類細胞にも利用できることが確認された。また、飼育水中でも検出された総 DNA 量の約 3% が細胞膜によって

保護されている状態で存在していることが示唆された。環境水での実験では、野外環境中の魚類細胞にも PMA 色素の利用が可能であることが確認され、環境 DNA の一部が細胞膜に保護された状態で存在していることが示唆された。また、PMA 色素を用いた環境 DNA 分析では個体から放出されてからおおよそ 5 日以内の DNA を検出できることが示唆された。本研究で環境 DNA 分析で得られる新たな情報として、細胞膜に保護されている DNA の量を得られることが示された。今後、PMA 色素を用いた環境 DNA 分析の定量性において、漁港や堆積物からの影響を軽減させた、より精度の高い結果が得ら

れることが期待される。

### 3. おわりに

今回、学部生という立場ながら、初めて学会に参加させていただき、様々な方々から貴重な意見を頂くことができた。また、自分の研究内容や意義などをわかりやすく伝える力の重要性、難しさを改めて実感することができた。さらに、他の参加者の発表から、新しい知識を得ることができた。

最後に、研究、学会発表に関してご指導いただきました山中裕樹講師、山中研究室の皆様へ深く御礼申し上げます。