

環境DNA分析に挑戦！

～水槽の水からアカハライモリのDNA、川・池の水から～
 バイオサイエンス科 バイオ研究部 2年

研究の動機・・・目指せ！環境DNA分析による池田市オオサンショウウオ調査

2017年7月の台風7号による豪雨のあと、池田市にある園芸高校構内の八王子川（農業用水路）にオオサンショウウオが流されてきてしばらくの間、生息していたと聞いて地域の水系の生物相に興味を持った。

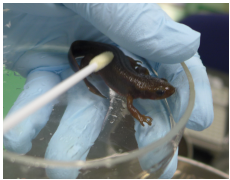
河川や湖沼の水に含まれるDNAから水系に生息する生物の種類を分析特定する「環境DNA分析」の研究が進んでいることを知り、この技術を習得し、地域の水系の生物相の分析に挑戦しようと考えた。

研究計画1・・・まずは、イモリ水槽の水からDNAを得てPCR増幅を実現する。



能勢町産アカハライモリ

<<体表と尾組織からDNA抽出>>



イモリの体表を拭っている様子

<<飼育開始2週目と4週目の水を20mL用いる。>>

DNA源の濃縮はアルコール沈殿法を適用する。

DNA抽出は、エア・ブラウンライフサイエンス社の迅速抽出キットを使用する。

<<全DNA増幅試薬GenomiPhiV2の適用を試みる>>

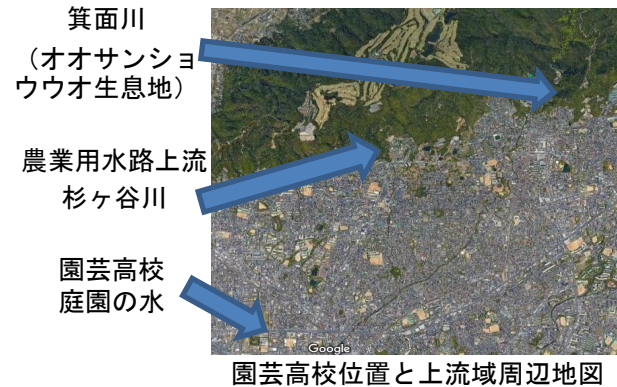
広い範囲の生物種に適用できるユニバーサルプライマーを用いてPCRをかける。

動物用ユニバーサルプライマーCOIの増幅バンドの塩基配列分析を行い比較する。

表1. 研究計画1の実験に使用したユニバーサルプライマーとその配列

DNA領域	対象生物	フォワード配列	リバース配列
COI領域	動物用	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG (LC01490)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA (HCO2198)
matK領域	植物用	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG (3F_KIM f)	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC (1R_KIM r)
ITS領域	真菌用	GTAACAAGGT(Y)TCCGT (ITS1F)	CGTTCTTCATCGATG (ITS1R)
16SrRNA領域	細菌用	GTTTGTATCCTGGCTCA (10F)	TACCAGGGTATCTAATCC (800R)
ITS領域	緑藻用	TCTTTGAAACCGTATCGTGA (18S1505-ITS1f)	GCTTATTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGT (ENT26S-ITS2r)

研究計画2・・・計画1で成功した方法を池や河川の水に適用する。



園芸高校位置と上流域周辺地図

<<各箇所採水する>>

DNA源の濃縮はアルコール沈殿法を適用する。

DNA抽出後、GenomiPhiV2を使用し増幅する。

動物用COIプライマーを用いPCR増幅し、増幅バンドの塩基配列分析を行う。

実験方法

計画1に関連した実験の構成を表2に示した。DNA抽出源、DNA抽出後処理、PCR後処理を組み合わせで9実験を実施した。水槽の水は20mLとした。

表2. 研究計画1で実施した各実験の構成の詳細

実験名	DNA抽出源	DNA抽出後処理	PCR後の処理
PCRtest 1-1	イモリ体表を拭ったスワブ	濃度測定のみ	特になし
PCRtest 1-2		エタノール沈殿精製後濃度測定	特になし
PCRtest 2-1-1	2週間飼育した水槽の水	濃度測定のみ	特になし
PCRtest 2-1-2	4週間飼育した水槽の水	濃度測定のみ	特になし
PCRtest 2-2-1	2週間飼育した水槽の水	濃度測定のみ	再PCR実施
PCRtest 2-2-2	4週間飼育した水槽の水	濃度測定のみ	再PCR実施
PCRtest 3-1	イモリ体表を拭ったスワブ	GenomiPhiV2※処理後濃度測定	特になし
PCRtest 3-2	4週間飼育した水槽の水	GenomiPhiV2処理後濃度測定	特になし
PCR control	イモリの尾先端組織2mm	濃度測定のみ	特になし

※: illustra社製のゲノムDNA増幅試薬キット GenomiPhi DNA Amplification Kitを適用

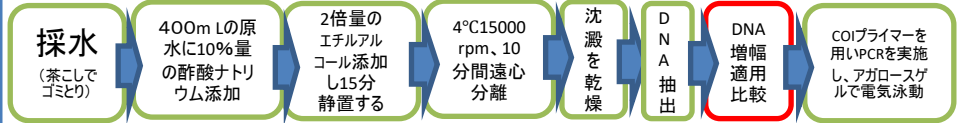
表3、4. この研究で実施したPCRの反応液組成(左)とサーマルサイクル(右)

構成試薬	1反応液あたりの容量	Step	温度	時間
10Xバッファ	2.5 uL	ホットスタート	95°C	9分
dNTP	2.0 uL			
Taq DNA合成酵素	0.2 uL	熱変性	94°C	45秒
Primer (10uM)		アニーリング	40°C	30秒
Forward	2.5 uL	伸長	72°C	1分
Reverse	2.5 uL			
Template DNA	(10 ng 相当量)	最終伸長	72°C	10分
H ₂ O	to 25 uL			

○アガロースゲル電気泳動: TAE(X1)バッファを用い、2%アガロースゲルを使って100V20分で行った。

○シーケンス分析・・・PCRでDNAバンドが得られたサンプルは、ダイターミネータ法定法で蛍光標識処理し、ABI社シーケンサーSeqStudioを用い塩基配列分析を試みた。

計画2関連の河川・池のDNA分離・増幅実験を以下の手順で実施した。



○シーケンス分析・・・得られたDNAバンドについて、ダイターミネータ法定法で蛍光標識処理し、ABI社シーケンサーSeqStudioを用い塩基配列分析を試みた。

○ホモロジー検索・・・得られたシーケンスを日本DNAデータベースのBLAST検索にかけて類似度の高い登録アクセッションをチェックした。

実験結果

アカハライモリ水槽の水の分析・・・COIプライマーを用いた動物のDNAは直接イモリの体表を拭ったスワブと尾の組織切片以外には、4週飼育後の水からDNA源を濃縮し、全DNA増幅試薬を用いたサンプルからのみ得られた(表5)。このサンプルの塩基配列は、尾の組織切片と同一であった。

表5. 研究計画1で実施した各実験の結果

	用途	動物用	細菌用	真菌用	植物用	緑藻用
	名称	COI	16SrRNA	ITS	matK	ITS
	DNA長	710bp	800bp	300bp	800bp	160~558bp
実験名	PCRtest 1-1	X	○(約800bp)	X	-	-
	PCRtest 1-2	○(約700bp)	○(約800bp)	X	-	-
	PCRtest 2-1-1	X	X	-	X	-
	PCRtest 2-1-2	X	○(約800bp)	-	X	-
	PCRtest 2-2-1	X	○(800,400bp)	-	○(約200bp)	-
	PCRtest 2-2-2	X	○(約800bp)	-	○(約400bp)	-
	PCRtest 3-1	X	○(約800bp)	X	X	X
	PCRtest 3-2	○(約700bp)	○(約800bp)	X	X	X
	PCR control	○(約700bp)	-	-	-	-

○: バンド検出 (DNAバンド長)、X: バンドなし、-: 実施せず

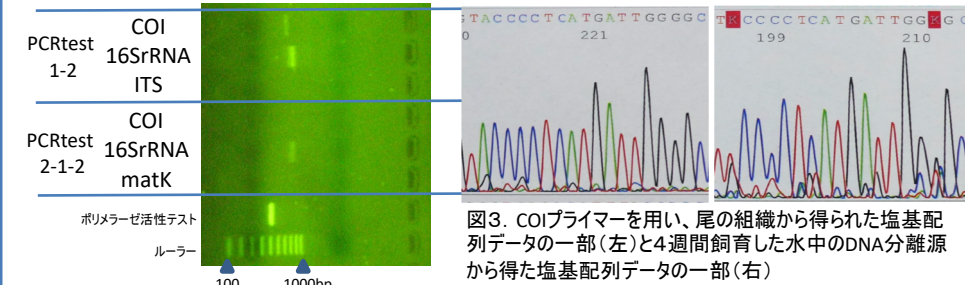


図3. COIプライマーを用い、尾の組織から得られた塩基配列データの一部(左)と4週間飼育した水中のDNA分離源から得た塩基配列データの一部(右)

図2. アガロースゲル電気泳動で確認したDNA増幅バンド

川・池の水の分析・・・COIプライマーを用いたPCRについて、3箇所いずれもDNA増幅試薬GenomiPhiV2をPCR前に適用したものは、DNAバンドが得られた。なお、箕面川からのサンプルは、正常な700bpのバンドのほか、300bpのバンドも出現したため、700bpのバンドをゲルから抽出したが、塩基配列のデータは得られなかった。

シーケンスが得られた2箇所は、昆虫類の配列であった。

採水源	エレクトロフェログラム	BLAST 検索結果(一致率)
実習庭園池		UNVERIFIED(未確認生物) 89% Calosiphia(ベッコウヒラタシテムシ) 87% Staphylinidae(ハネカクシ科の一種) 87% Arthropoda(節足動物) 86% Ptomascops(コクロシテムシ) 86%
五月山 杉谷川		Arthropoda(節足動物) 86% Staphylinidae(ハネカクシ科の一種) 86% UNVERIFIED 87% Calosiphia(ベッコウヒラタシテムシ) 85% Oniscus(ホンワラジムシ科の一種) 84%

図4(右). 川・池からの採水中から得られたDNAの分析結果

<<まとめ>>: ○イモリを飼育している水槽水の20mLの水から、アルコール沈殿による分離源の収集とDNA増幅試薬GenomiPhiV2を使用することで、アカハライモリのDNAを検出できた。

○河川・池の水400mLからユニバーサルプライマーを用いた分析によって昆虫のDNAを検出できた。

<<課題>>: ○ガラスフィルターを用いたDNA分離源採集法の習得

○オオサンショウウオ識別プライマーの開発