環境DNA調査手法の獲得から属検出プライマー開発へ

―イモリ飼育水分析からオオサンショウウオほか地域の水生生物調査へ―

バイオサイエンス科　バイオ研究部　3年　森田　柚月

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。

研究の経緯

2019

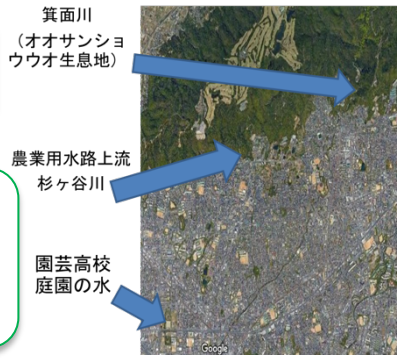
【目標】イモリ水槽の飼育水からイモリのDNAを得ることが出来るのかという実験により、水から生息する生物のDNAを分離しPCR増幅できる技術を習得する。

能勢町産アカハライモリ

【結果】次の3サンプルからCOI領域のユニバーサルプライマーを用いてPCR増幅し、得られたDNAバンドのダイレクトシーケンシングを行ない、同じ配列が確認できた。
〇直接イモリの体表を拭ったスワブ
〇尾の組織片
〇4週間飼育後の水槽水からエタノール沈殿によりDNA源を濃縮し、全DNA増幅試薬を用いたDNAサンプル

2020

【目標】2019と同じ方法を河川、池の水に適用し、COI領域のDNAを得て、シーケンス分析により、何の生物であるかを調査した。



【結果】3箇所の水からユニバーサルCOIプライマーで得られたDNAバンドのシーケンス分析をおこなった。
　2箇所から塩基配列データが得られ、日本DNAデータバンク（DDBJ）のBLAST検索の結果、昆虫類（主に節足動物やハネカクシ）のDNAの配列であった。

【問題点】
〇ユニバーサルプライマーを使用したPCRだと河川など自然環境では特定の生物のDNAを増やすことは出来ない。
〇環境水からのエタノール沈殿を用いたDNA収集は、大量のエタノールが必要になりコストがかかる。

＜＜2021研究目標＞＞

〇ガラスフィルターを用いたDNA収集法の獲得
　→メッシュグレードと適用水量を検討（本報告では割愛）
〇特定の生物種ではなく、属等の対象生物グループの検出プライマーの設計と実用性の検証

研究計画・・・設計したプライマーを河川の水から得たDNAに適用し、PCR増幅後、シーケンス分析を行い、生息する生物種の特定を試みる。

STEP1:DDBJのDNAデータベースを元にチュウゴクオオサンショウウオと（日本産）オオサンショウウオの塩基配列を並べ共通する部分をプライマーとする。
地域の生物相で課題となっているカメ目、シジミ属、ドブガイ属のプライマーも同時に作成する。（「池田人と自然の会」からの情報提供）

STEP2:池田市域を流れる余野川・猪名川水系の天狗橋・吉田橋・中川原橋・絹延橋・猪名川大橋・軍行橋の6ヶ所で採水し、ダラスフィルターで濾過後、DNA抽出、エタノール沈殿による精製を行いPCRテンプレートとして濃度調整する。

STEP4：作成した4組のプライマーを使用し、PCR増幅し、増幅バンドの塩基配列分析を行う

図1　池田市6箇所採水した河川の位置

実験方法

DDBJのデータベースを元に下のように組み合わせを作り、塩基配列を並べて比べ同じ配列の部分をプライマーとする

図2　このように塩基配列を並べ共通部分を探す

池田市生物環境調査のためのNCBIデータベースを利用した在来外来等属種共通検出プライマーの検討

目的	分類（属名等）	遺伝子領域	在来種	accession	外来種	accession	多重照列結果
在来外来検証	Andrias オオサンショウウオ属	CO I	A. japonicus オオサンショウウオ	AB208679	A. davidianus チュウゴクオオサンショウウオ	JN700795 MH085445	95%
	Testudines カメ目	CO I	M aurem ys japonica ニホンイシガメ	AY337349	Trachem ys scripta elegans ミシシッピアカミミガメ	KX559044	86%
	Corbicula シジミ属	CO I	C. leana マシジミ	AB722063	C. flum inea タイワンシジミ	KT006544	97%
生物多様性検証	S inanodonta ドブガイ属	CO I	S. lauta ヌマガイ	MN809939	S. japonica タガイ	LC519018	87%
CO I cytochrom e oxidase subm it 1							

ターゲット検出プライマー候補リスト

分類（属名等）	遺伝子領域	primer	code	シーケンス(5'→3')	Tm
Andrias オオサンショウウオ属	CO I	F	ACO I-F	gactttacttggtgatgatca	57
		R	ACO I-R	ttgatattatgtcataagctgg	58
Testudines カメ目	CO I	F	TCO I-F	atagtaggcacacgcattaagtttatt	59
		R	TCO I-R	gtagtatttaggtttccggtctgt	59
Corbicula シジミ属	CO I	F	CCO I-F	tttctttttttctatttgatctggtttaat	62
		R	CCO I-R	aacaatatcatcaaataaacattgtagt	58
S inanodonta ドブガイ属	CO I	F	SCO I-F	gttttttatttaagatcytctttggtaga	61
		R	SCO I-R	tacgatcygtaagaagcatcgtaat	62

作成したプライマーを使用して
PCR後、
TAE（×1）バッファーを用い
2%アガロースゲルを使って
100V20分でアガロース電気泳動を行った。

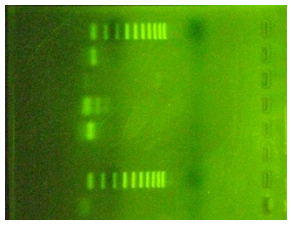


図3　増幅バンドの写真

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、
ABL社シーケンサー
SeqStudioを用い塩基配列分析を試みた。

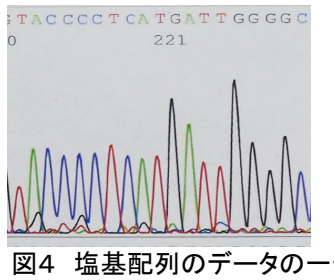


図4　塩基配列のデータの一部

ホモロジー検索・・・得られたシーケンスを日本DNAデータバンクの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。

結果

アガロース電気泳動

オオサンショウウオ属、カメ目のプライマーは増幅バンドを確認することが出来たが、残りのシジミ属、ドブガイ属は確認することが出来なかった。

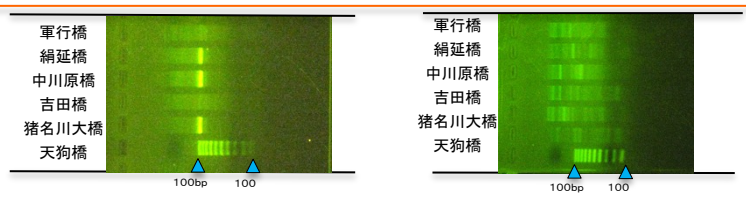


図6　オオサンショウウオ属（右）カメ目（左）のそれぞれで確認できた増幅バンド

シーケンス分析

オオサンショウウオ属検出用プライマーでバンドの得られた天狗橋、吉田橋、中川原橋の塩基配列を並べた結果3か所いずれも同じ生物由来の塩基配列であることが分かった。

しかし BLAST検索で登録アクセッションを調べたが、該当する登録アクセッションが無く、なんの生物の塩基配列かは確認することが出来なかった。（NCBIにもなかった。）

図7　天狗橋、吉田橋、中川原橋の塩基配列を並べたもの

考察

オオサンショウウオ属検出プライマーを作成し、そのプライマーで上流域サンプルでPCRがかかることを確認することができ、塩基配列も得ることが出来たが何の生物であったかは確認することが出来なかった。

PCRで増幅が確認できることでその生物がいると確認できる「環境DNA分析」だと認識し、今まで実験を行ってきたが．．．
今回の実験により、PCRだけにとどまらずシーケンス分析までですることで本当にその生物のDNAが増幅されているのか確認した結果、PCRで増幅されても目的としていた生物ではなかったことが分かった。このことから識別プライマーが別の生物種に反応している可能性からPCR増幅だけではその生物がいると断定するのは危険であるといえる。