

カメ類用環境DNA分析技術開発 ーユニバーサルプライマーと種識別プライマーの検討ー

大阪府立園芸高等学校 バイオ研究部 3年 比嘉ことこ

<はじめに>

○外来生物の繁殖が進み、2020年バイオ研究部で環境DNA分析による池田市の生物環境調査のためのプロジェクトがスタートし、プロジェクトの一環として外来種と在来種の検出のために爬虫綱カメ目（以下カメ類）のCOI領域を対象としたユニバーサルプライマーが設計した。

<目的>

- 【実験1】環境DNA分離法として考案したガラスフィルターやアルコールを使用しない高速遠心分離法を試行し、有用性を検証する。
- 【実験2】カメ目用に設計したユニバーサルプライマーの性能を検証するとともに、環境DNAに対する作用について検証する。
- 【実験3】クサガメ、ニホンイシガメ、各識別プライマーを作成し、有効性を検証する。
- 【実験4】スッポン識別プライマーを作成し、有効性を検証する。

<材料>

園芸高校内の江原川で2022年までに捕獲、飼育されていたニホンイシガメ、クサガメとその飼育水槽水を使用した。また、23年に同じ箇所捕獲されたスッポンを使用した。



図1. 供試したカメ類（ニホンイシガメとクサガメ（左）、スッポン（右）

NCBI登録データを参考に設計試作したユニバーサルプライマー（F側プライマー 5' atagt aggca cagca ttaag ttat t3' (Tm59) , R側プライマー 5' gacta tttag gtttc ggtct gt3' (Tm 59)) およびニホンイシガメ、クサガメ識別プライマーを使用した。

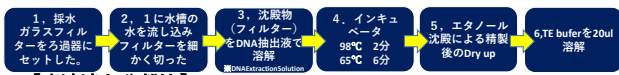
図2. 試作設計したニホンイシガメ、クサガメ識別プライマーのDNA配列

ニホンイシガメ種抽出プライマー (MjCOI)	
元配列	5'TGACTTGTGCCACTAATAATTGGG3'
F1	5'TTGTGCCACTAATAATTGGG3'(Tm59.8)
F2	5'TGACTTGTGCCACTAATAATTGGG3'(Tm65.5)
F3	5'TGTCTTGTGCCACTAATAATTGGG3'(Tm65.5)
クサガメ種抽出プライマー (MkCOI)	
元配列	5'CTGACTTGTACCTTTAATGATCGGA3'
F1	5'TTGACCTTTAATGATCGGA3'(Tm57.1)
F2	5'CTGACTTGTACCTTTAATGATCGGA3'(Tm63.9)
F3	5'GACAGCTGTACCTTTAATGATCGGA3'(Tm63.9)

<方法>

○【実験1~4】カメ体表からのDNA抽出
前後肢付け根に綿棒を擦りつけ、DNA Extraction Solution (Lucigen社)を使用し、抽出した (65°C 6分、98°C 2分、on ice 5分、エタノール沈殿精製)。

○【実験1】カメ飼育水槽水からの環境DNA抽出
【ガラスフィルター濾過法】



【高速遠心分離法】



○PCR増幅

DNA合成酵素には、KOD FX(東洋紡株式会社)、またはGo Taq (Promega社)を使用した。サーマルサイクルと反応液調整は各社のプロトコルの準じて行なった。

○アガロースゲル電気泳動

TAE, 1bufを用い調整した1.5%アガロースゲルを使用し、100V30分電気泳動で行った。

○シーケンス分析

PCR産物をEDTAとエタノールを用いて精製し、蛍光標識反応液調整し、オートシーケンサーで塩基配列を分析した。得られた塩基配列は、NCBIのCLUSTALWを用いて整列、比較した。

<結果>

○【実験1】高速遠心分離法の試行試験
カメ飼育水槽水からのDNA抽出について抽出原液のDNA濃度を図3に示した。

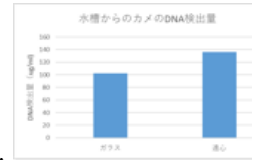


図3. 飼育水槽水から得られたDNA抽出原液のDNA濃度

○【実験2】ユニバーサルプライマー性能試験
シーケンス分析の結果、得られた配列を比較したところ、クサガメとニホンイシガメの間に変異箇所が23箇所あった(図4)。

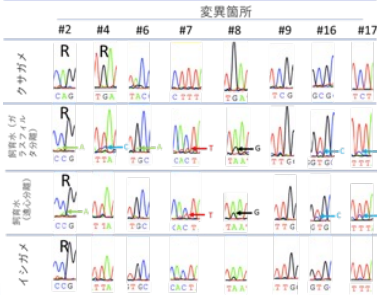


図4. 本研究で開発したカメ目COI領域ユニバーサルプライマーで抽出されたイシガメ、クサガメ、水槽水(環境DNA)のCOI領域3変異箇所の検出波形
R: リバース側検出波形
←: 飼育水のクサガメ型配列微弱シグナル

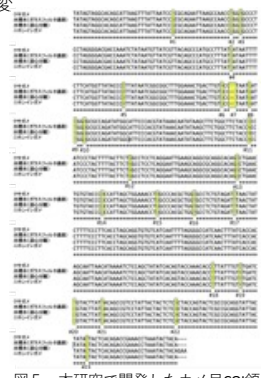


図5. 本研究で開発したカメ目COI領域ユニバーサルプライマーを用いたイシガメ、クサガメ、同飼育水槽水(環境DNA)の塩基配列と23の変異箇所

○【実験3】ニホンイシガメ、クサガメ識別プライマー性能試験

○本来のプライマーの結果に合致した(図6)。

○ニホンイシガメとクサガメにはF2が効果的であることがわかった(図7)。

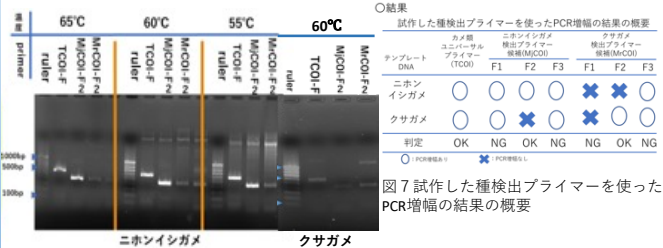


図6 F2プライマー性能テストの電気泳動の結果

○【実験4】スッポン用識別プライマー性能試験

○アリーニング温度を60°Cにしたが、全てのバンドが強く出てしまった(図8)。

○PsCOI-F4プライマーはアリーニング64°Cまで上げられた。(図9)

○アリーニング64°Cにおいてもイシガメ、クサガメテンプレートに反応し、バンドが出た(図10)。

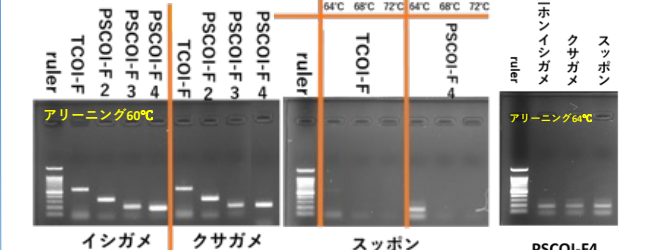


図8 イシガメとクサガメのテンプレートでの性能テスト

図9 スッポンテンプレートでのアリーニング温度試験

図8 アリーニング温度64°Cでのイシガメとクサガメのテンプレート性能テスト

【今後の課題】スッポン識別プライマーでイシガメとクサガメのDNA増幅を止められなかったため、配列、PCR条件の検討を重ねたい。なお、スッポンは、底に潜る性質があるので、イシガメとクサガメに比べて種識別プライマーを作る必要性が高いと感じた。