

ドジョウ飼育水における 様々な温度での環境DNA量の経時的変化

班員 柴 葉月、中山 絢乃、松原 慶治、村山 昂輝
担当教諭 谷野 智了

キーワード：環境DNA量、個体数推定、ドジョウ、バクテリア、分解速度

To establish methods for estimating the number of organisms living in the environment based on the amount of environmental DNA, we measured changes in the amount of DNA over time at various water temperatures using loaches rearing water. The results showed that DNA degradation progressed over time, and the lower the temperature, the smaller the DNA degradation rate.

1 はじめに

環境DNAとは川や土壌・空気中などの外部環境中に単独で存在するDNAのことであり、生物の脱落細胞やフン・尿といった老廃物などに由来すると考えられている。環境DNAを用いれば、実際に生物を捕獲し種を同定するといった作業が不要である。水界での環境DNAを用いた調査・分析では、採水し吸引ろ過・フィルターからのDNA抽出・PCRでの増幅・電気泳動を行うことで、バンドの有無を元に対象生物種の生息の有無を確認することができる。さらに、対象生物種だけでなく、次世代シーケンサーを用いて、その河川にいる生物種を網羅的に解析できるような技術開発も進んでおり^{[1], [2]}、環境への負荷が少なく、手軽な調査方法として注目を集めている。

また、リアルタイムPCRを用いればDNAの定量ができ、定量データを元に対象生物種の個体数推定が可能か現在も様々な生物種で研究がなされている^{[3], [4], [5]}。しかし、環境DNA量からの個体数推定の方法の開発にはいくつかの課題がある。まず、水温や水質・その日の天候といった環境条件により、水界生物の活動量や代謝速度が変化し、バクテリアやDNAを含む老廃物の放出速度が変化する。また、老廃物中のバクテリアやその環境に生息しているバクテリアの

DNA分解活性も変化してしまうことが先行研究^[6]でわかっている。

つまり、調査時期や調査場所ごとに環境条件は異なるためDNAの放出速度や分解速度に違いが生じ、DNA量やDNA量から推定される個体数も変化する。従って、DNA量からの個体数推定を行っていくために生物種ごと、季節ごと、場所ごとの環境DNA量の変化を地道に追っていき、できるだけ多くのデータを蓄積する必要がある。

そこで本研究ではまず初めに河川の調査を行い、その調査において特に変化が大きく、先行研究^{[1], [2], [6]}でも環境DNA量との関係について複数報告のあった水温に着目し、各水温における環境DNA量の経時的変化をドジョウ飼育水を用いた実験を行うことで明らかにし、複数の推定方法の確立につなげようとした。

2 材料と方法

〈河川の調査で使用した器具〉

- ・ワイヤレス気象/GPSセンサ（PASC0）
- ・無線温度センサ（PASC0）
- ・ワイヤレスpHセンサ（PASC0）
- ・ワイヤレス比色/濁度センサ（PASC0）

〈実験で使用した器具〉

- ・水槽（縦 28cm、横 58cm、高さ 35.5cm）

- ・容器（縦 15cm、横 30.5cm、高さ 23cm）
〈実験で使用した材料〉
 - ・ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*)
 - ・バクテリア入り水質調整剤 (GEX ベストバイオ)
- 〈河川の調査〉

七尾市の御祓川水系の3地点(上流: 37°00' 29.4"N, 136°57' 21.4"E 中流: 37°00' 29.4"N, 136°57' 21.4"E 下流: 37°02' 43.2"N, 136°57' 52.8"E)で2023年の6月から7月にかけて河川の実験条件を調べた。

〈実験1〉

温度と時間経過がDNA量変化に与える影響を検証するために以下の実験を行った。飼育水を3つの容器に8Lずつ分注し、それぞれを、4℃の冷蔵庫、15℃のインキュベーター、ドジョウ飼育時と同じ気温である室温28℃の環境下で保管した。そして、3つの容器の水を、採水後すぐ、1時間、3時間、5時間、8時間、24時間、48時間後に吸引ろ過した。その後は、DNA抽出、リアルタイムPCRを行った(図1)。

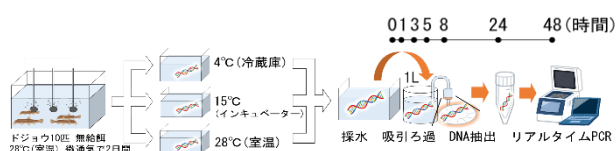


図1 飼育水の保管温度と採水後のワークフロー

〈実験2〉

温度と実験1より長い時間経過がDNA量変化に与える影響を検証するために以下の実験を行った。実験1と同様に保管した3つの容器の水を、採水後すぐ、その後は24時間ごとに6回行い、計7回吸引ろ過した。その後の操作は、実験1と同様に行った(図2)。

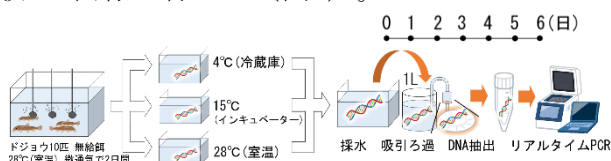


図2 飼育水の保管温度と採水後のワークフロー

〈実験3〉

実験1、2のDNA量変化がバクテリアの働きに

よるものなのか、またバクテリアの量に左右されるのかを検証するために以下の実験を行った。飼育水を2つの容器に8Lずつ分注し、片方の容器のみにバクテリア入り水質調整剤を3mL添加後、どちらも室温28℃の環境下で保管した。それ以外の操作は実験2と同様に行った(図3)。

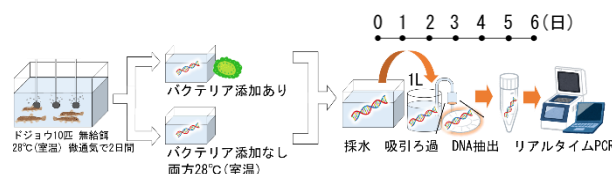


図3 バクテリア添加と採水後のワークフロー

3 結果

〈河川の調査〉

いずれの環境条件もかなり変化していた(表)。水温は、同日・同河川で上流から下流まで調べた結果ではそれほど差がないこと、別日に調査するとかなり変化があるということがわかった(図4)。

表 河川の調査での環境条件

	最高	最低
UVインデックス	6.3	1.03
太陽照射度(W/m ²)	1190	182.5
水温(℃)	30.3	21.2
pH	8.63	7.74
アンモニア(mg/L)	0.8	0.1
濁度(NTU)	280	77



図4 御祓川水系における調査地点間・調査日間での水温の違い

〈実験1〉

減少率に大小はあるもののDNA量はどの温度でも2日後までに減少しており、4℃の最終的なDNAは15℃、28℃に比べ多く残存していた(図5)。

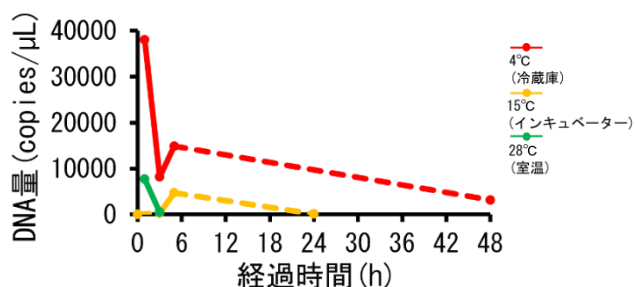


図 5 各温度における 48 時間後までの DNA 量の経時的変化

〈実験2〉

15℃、28℃でのDNA量は2日後までに減少しており、4℃の最終的なDNAは15℃、28℃に比べ多く残存していた（図6）。

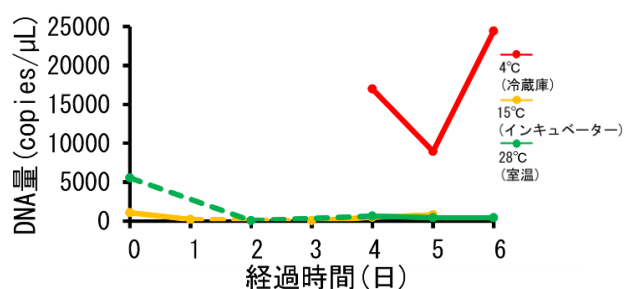


図 6 各温度における 6 日後までの DNA 量の経時的変化

〈実験3〉

バクテリア添加の有無にかかわらず、DNA量は2日後までに減少していた。また、バクテリアを添加した方の容器ではDNAの減少が早かった（図7）。

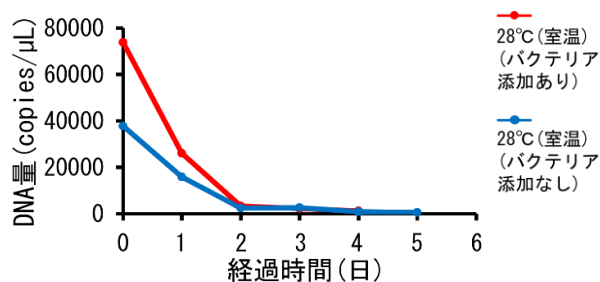


図 7 バクテリアの添加有無における DNA 量の経時的変化

4 考察

河川の調査より、水温は調査河川・調査日による差が大きいことが示唆された。このことから同日・同河川では地点による水温差が小さいため、個体数推定において温度によるDNA分解速度の変化の反映が不要で、時間経過によるDNAの減少のみを反映した推定のみを行えば良いと考えた（図8）。一方で、調査河川や調査

時期・天候が異なる場合は水温の変動が大きい
ため、温度によるDNA分解速度の変化を反映した推定も必要になると考えた。また、今回の実験結果は個体数推定だけでなく、その種の生息の有無の推定にも利用できると考えた（図9）。

実験結果全てで2日後までにほぼ全てのDNAが分解されてしまう傾向が見られたことから、2日間は河川の中をDNAが漂っている可能性が高いことがわかった。このことより、DNAが分解されるまでの時間と河川の流速から、上流何kmまでの範囲にその種がいるかといった種の生息範囲を絞り込むことができるのではないかと考えた（図10）。

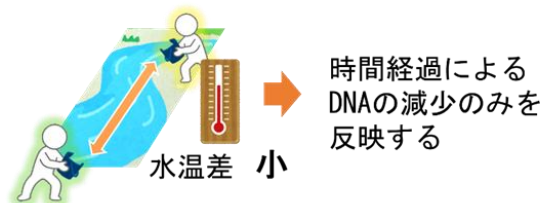


図 8 同日・同河川における時間経過による DNA の減少を反映した個体数推定

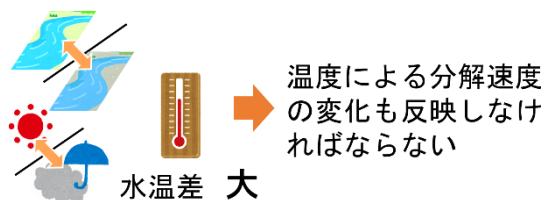


図 9 異なる調査河川・調査時期・天候における温度による DNA 分解速度の変化を反映した個体数推定

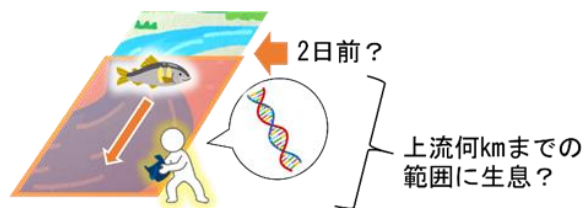


図 10 2 日後までの DNA 量減少について

5 今後の展望

温度設定を細かくして同様の実験を行うことで、温度変化によるDNA量の減少をより正確に比較しようと考えている。

さらに、濃度既知のDNAを滅菌水に添加し、その水をドジョウ飼育水の代わりに用いて、同様の実験を行おうと考えている。これにより、

吸引ろ過や抽出の操作が不要になるだけでなく、実験のスケールダウンや、条件を揃えやすくすることが可能である。そのため、ヒューマンエラーを減らし、DNA量の減少をより正確に検証することが可能になるのではないかと考えた。

1つ目の予備実験では、濃度既知のDNAを添加後すぐに採水・PCR・電気泳動を行いバンドの有無を確認する。この予備実験においてバンドが出れば、人為的に添加した濃度既知のDNAを生物から放出されるDNAと考えることができる(図11)。

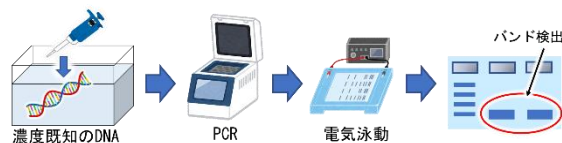


図11 濃度既知のDNAを用いたときのバンドの有無の検証

2つ目の予備実験では、ドジョウ飼育水を用いずに実験を行うときこれまでDNAの分解要因と考えてきた老廃物からのバクテリアが含まれないことからバクテリア入り水質調整剤を用いることを考えた。ドジョウ飼育水に含まれるバクテリアと水質調整剤に含まれるバクテリアが類似したものであるか確認する。そして類似していれば、水質調整剤に含まれるバクテリアをドジョウ飼育水に含まれるバクテリアとみなすことができ、様々なバクテリア濃度とDNA濃度で検証できる実験系を確立することが期待できる(図12)。

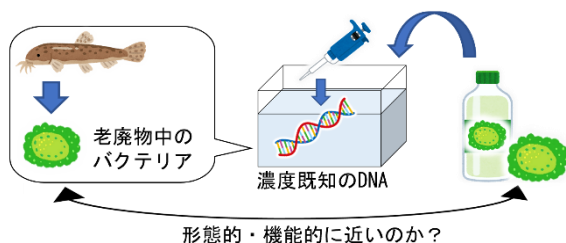


図12 老廃物中のバクテリアと水質調整剤中のバクテリアの比較

6 謝辞

石川県立大学の中谷内修講師、環境公害研究センターの方々には実験や解析の方法についてご指導していただきました。また、リアルタ

イムPCRを使用させていただいた他、プライマーの提供もしていただきました。深く感謝いたします。

7 参考文献

[1]山中裕樹, 源利文, 高原輝彦, 内井喜美子, 土居秀幸. 2016. 環境DNA分析の野外調査への展開. 日本生態学会誌 66(3), 601-611

[2]高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子. 2016. 環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～. 日本生態学会誌 66(3), 583-599

[3]河野誉仁, 赤松良久, 後藤益滋, 乾隆帝. 2017. 環境DNAを用いたアユの定量化と降下状況モニタリングの試み. 河川技術論文集 23, 669-674

[4]Keiichi Fukaya, Hiroaki Murakami, Seok jin Yoon, Kenji Minami, Yutaka Osada, Satoshi Yamamoto, Reiji Masuda, Akihide Kasai, Kazushi Miyashita, Toshifumi Minamoto, Michio Kondoh. 2020. Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modelling. Molecular Ecology 30(13), 3057-3067

[5]平岡礼鳥, 市川哲也, 今尾和正, 宮向智興, 高倍昭洋, 田中義人, 鈴木輝明. 2022. 飼育実験によるタイワンガザミの環境DNA分解速度と放出速度の算出. 水環境学会 45(5), 223-230

[6] Lance, R. F., Klymus, K. E., Richter, C. A., Guan, X., Farrington, H. L., Carr, M. R., Thompson, N., Chapman, D. C., Baerwaldt, K. L., 2017. Experimental observations on the decay of environmental DNA from bighead and silver carps. Management of Biological Invasions 8(3), 343-359