

2018/12/5

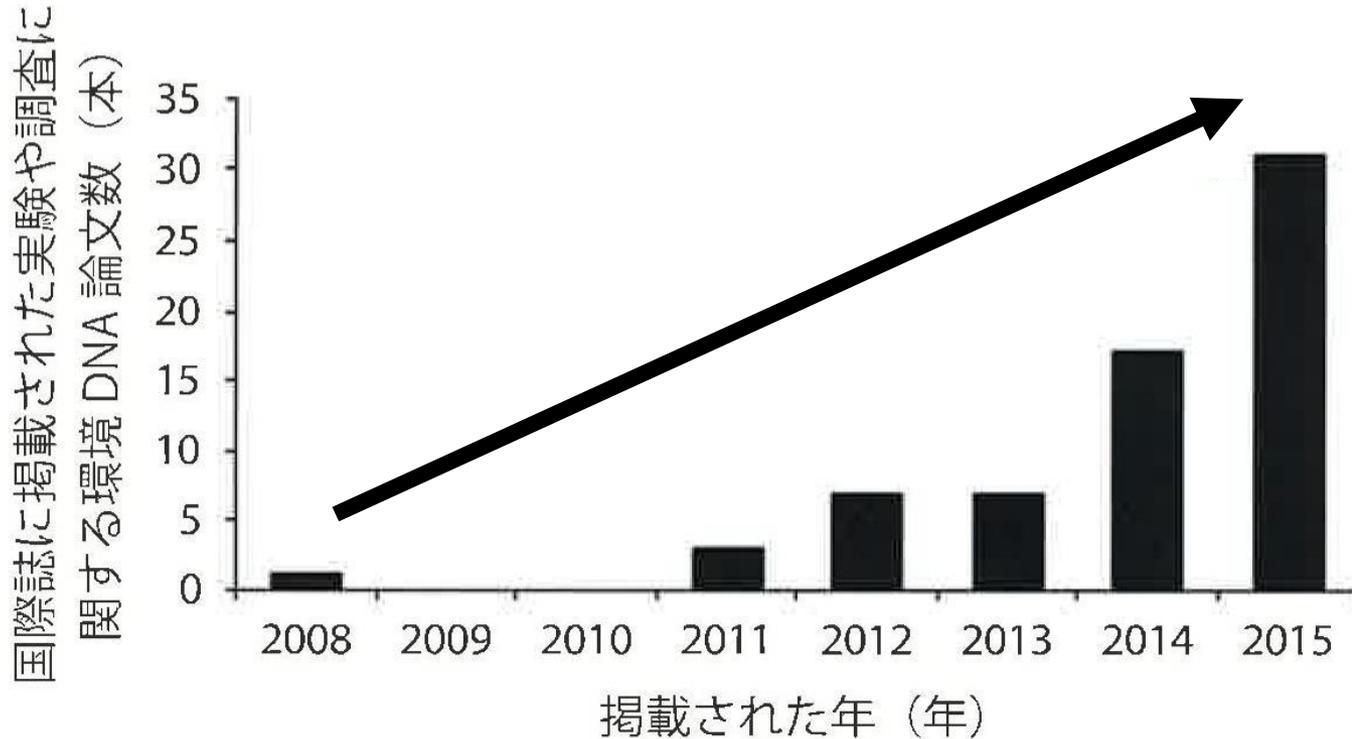
一般社団法人 日本環境アセスメント協会 第14回技術交流会

環境DNA技術の紹介
～外来淡水エビを例として～

株式会社日本海洋生物研究所
平岡 礼鳥

環境DNAについて

環境DNAとは？



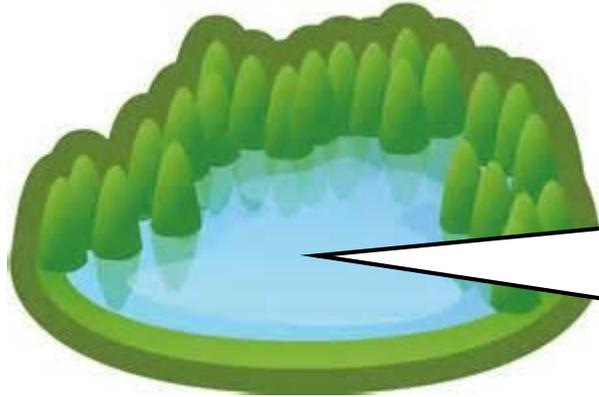
環境DNA分析を用いた論文発表数の推移

高原ら, 2016より抜粋

著しく掲載数が増加

環境DNAが研究分野として非常に注目されている。

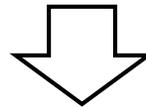
環境DNAとは？



各写真Wikipediaから引用



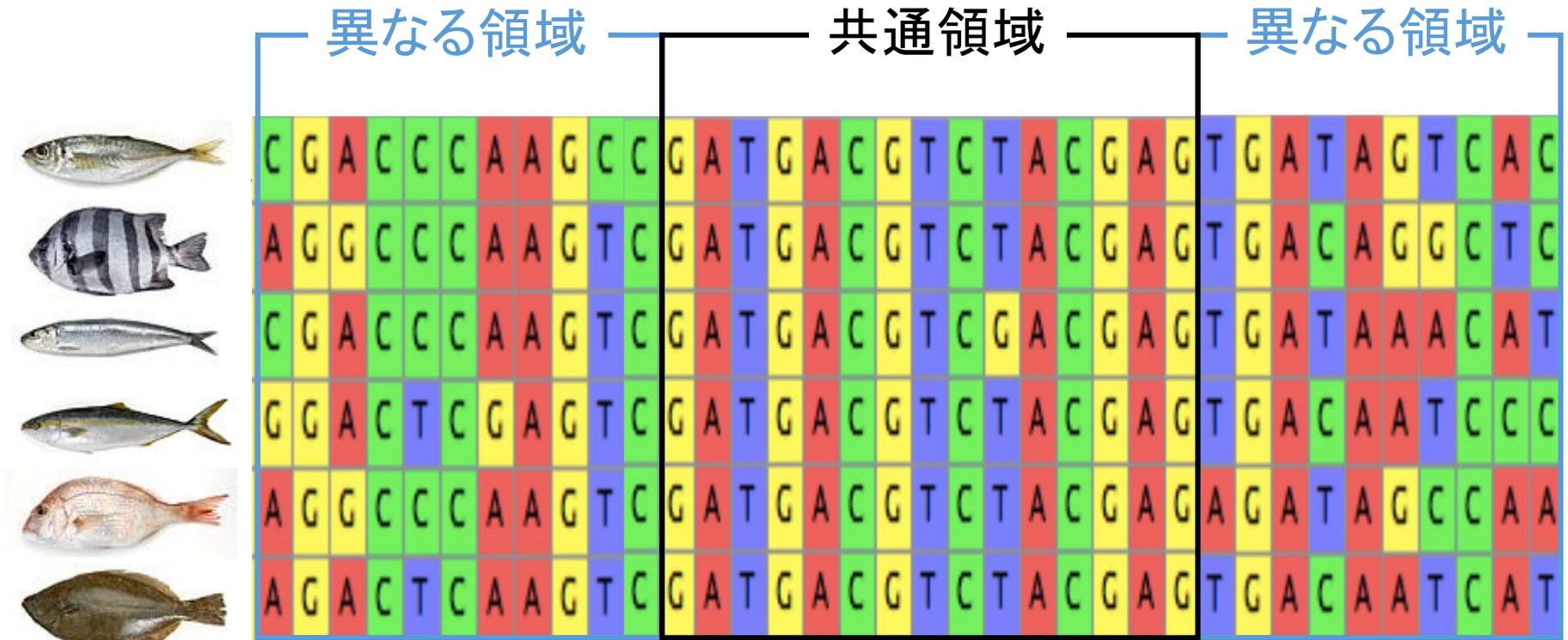
排泄物、ウロコ、体液など



生物が環境中に放出した、断片DNA

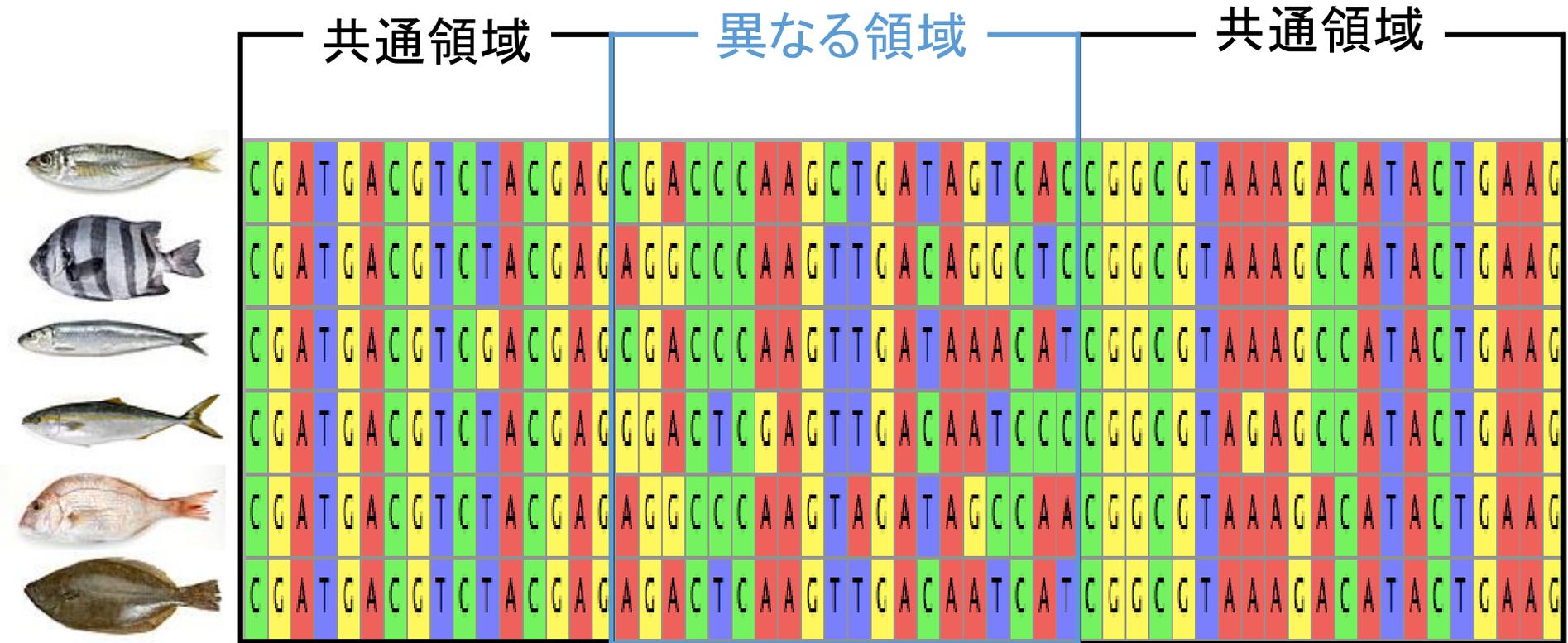
||
環境DNA

種特異的解析



異なる領域で種特異的なプライマーを設計し、
特定種の在・不在を明らかにする解析方法

環境DNAメタバーコーディング



共通領域にプライマーを設計し、
環境下における生物組成を明らかにする解析方法

環境DNAのメリット

- ・形態学的な知識を必要としない。
- ・調査による環境破壊、生物への影響がほとんどない。
- ・調査員による結果のばらつきが小さい。
- ・外来種の侵入をDNAの有無から検知できる。
- ・夜行性や生息密度低い希少生物を検出できる。
- ・野外調査が簡易である。

高原ら, 2016より抜粋

環境DNAのデメリット

- ・対象生物とともに近縁種や共存種の遺伝子情報が必要となる。
- ・検出されたDNAがいつ、どこで放出されたのか不明なことが多い。
- ・環境DNAが検出されても集団の年齢構成やサイズ構成がわからない。
- ・偽陽性、偽陰性に対しての細心の注意を払う必要がある。

環境DNAにおける調査および分析の手順

環境DNA調査、分析の手順

野外調査

(1) 環境水のサンプリング



(2) 環境水のろ過



(3) ろ紙上のDNAの抽出



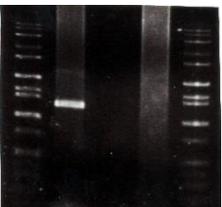
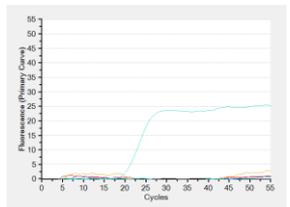
(4) 抽出したDNAのPCR



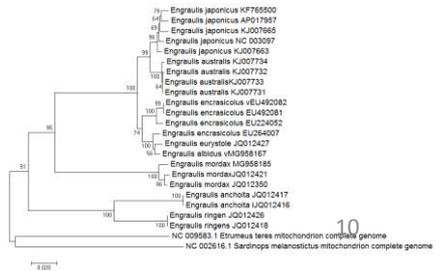
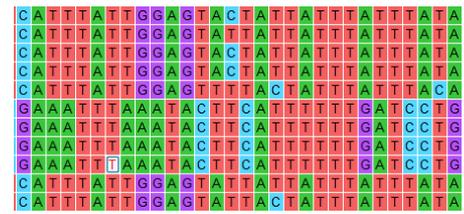
(5) NGSまたは電気泳動等にて増幅確認



イルミナ社HPから引用



(6) データ処理



環境水のろ過（環境DNAの濃縮）

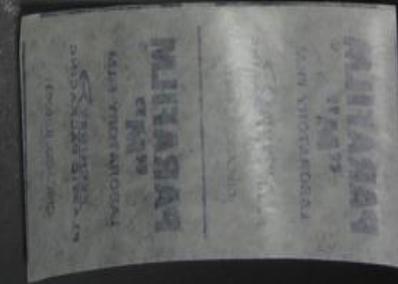
シリンジ (50mL)



Sterivex



パラフィルム



ユニパック



ゴム手袋 テック手袋



環境DNA・ステリベックスろ過キット（一式約1,000円弱？）

チュウゴクスジエビとは？



Palaemon sinensis (Sollaud, 1911) チュウゴクスジエビ

- ・中国、ミャンマー、シベリア、サハリンなどに分布
- ・1990年ごろにつり餌として、日本に輸入
- ・日本各地で定着が報告、分布拡大が懸念されている。

在来種であるスジエビと同所的に生息するとともに、形態が酷似している。
そのため、誤同定により侵入の発覚が遅れる可能性がある。

形態形質による種判別が困難である場合、DNAを用いた種判別が有効であるが、
チュウゴクスジエビのDNA情報はほとんど得られていない。

環境DNAからチュウゴクスジエビを検出する方法の確立

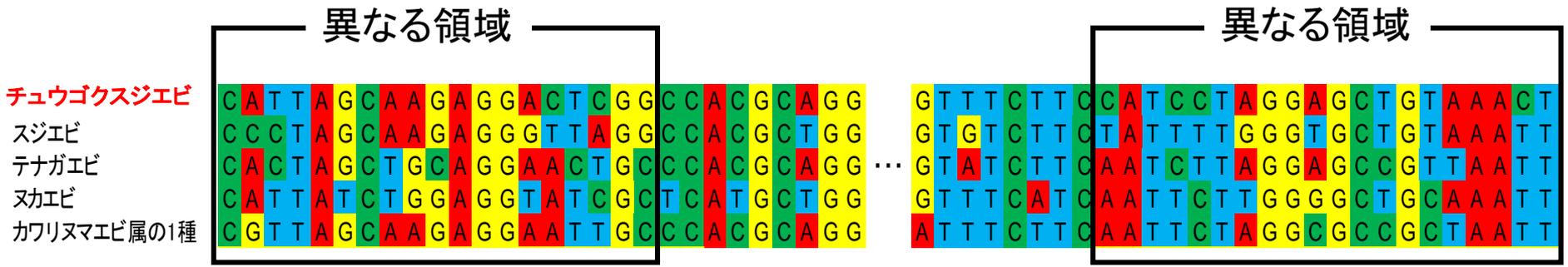
チュウゴクスジエビのCOIにおける種特異的プライマーの設計



生息環境でみられたエビ類計5種(チュウゴクスジエビ、スジエビ、テナガエビ、ヌカエビ、カワリヌマエビ属の1種)のCOI領域を比較した。

COI:ミトコンドリアDNAに含まれる領域でDNAバーコーディングなどDNAによる種判別によく使用される領域

チュウゴクスジエビのCOIにおける種特異的プライマーの設計



増幅領域長99bpのプライマーセット

PS-F8(5'-CATTAGCAAGAGGACTCGG-3')、PS-R1(5'-AGTTTACAGCTCCTA GGATG-3')

チュウゴクスジエビのCOIにおける種特異的プライマーの設計



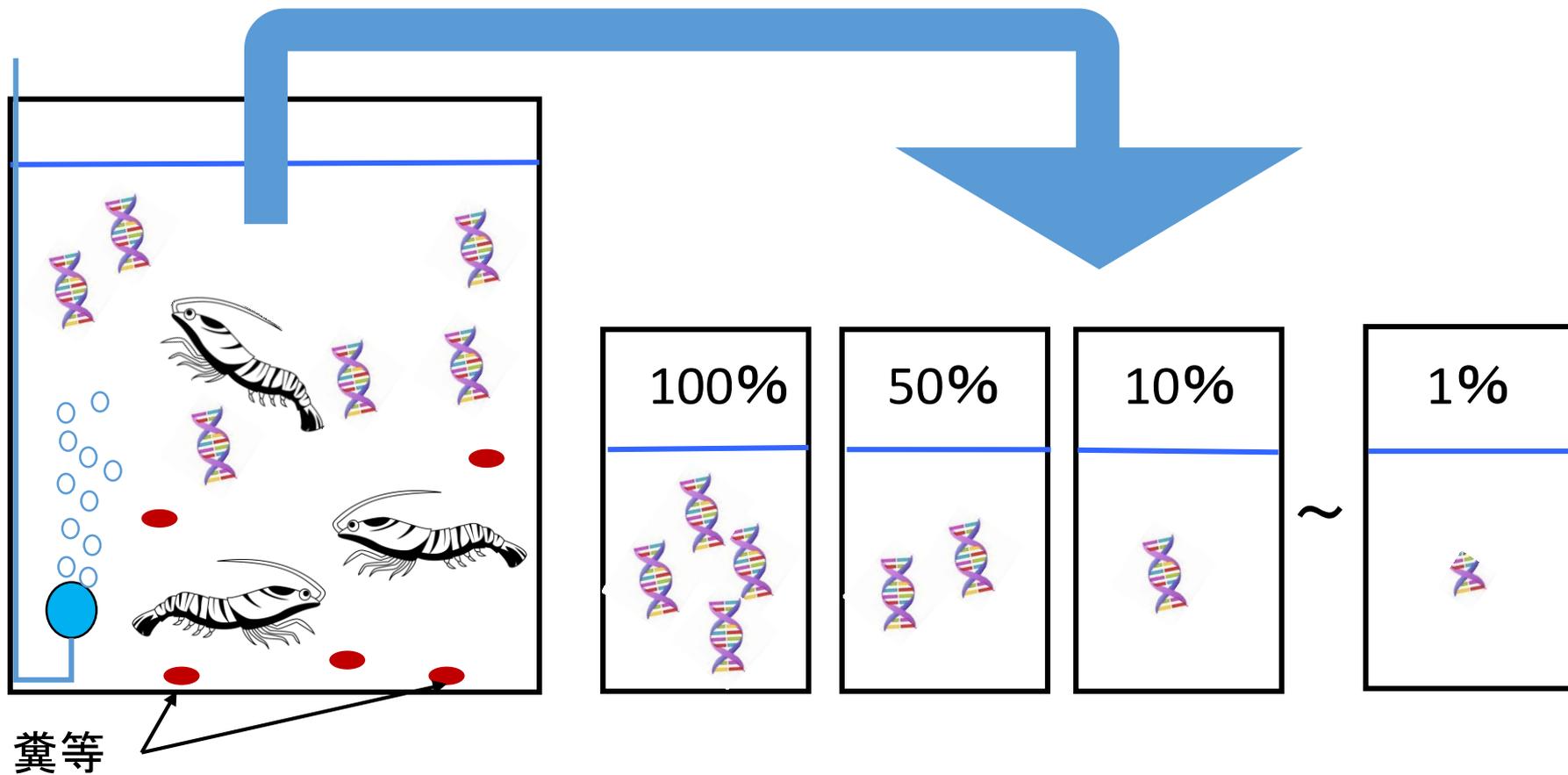
チュウゴクスジエビのみ
増幅が確認

種特異的プライマーを用いたPCR結果

①チュウゴクスジエビ、②スジエビ、③テナガエビ、④ヌカエビ、⑤カワリヌマエビ属の1種

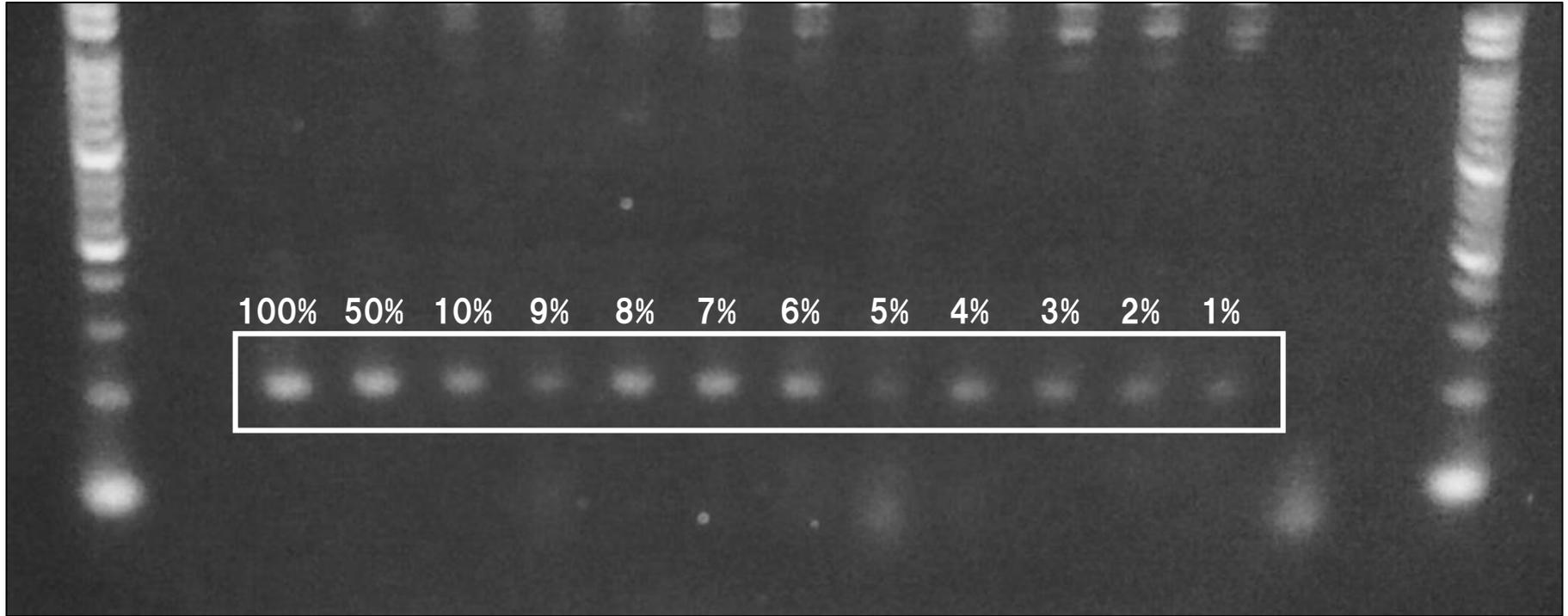
チュウゴクスジエビのCOIにおける種特異的プライマーの設計に成功

飼育水槽からの環境DNA検出実験



水槽内で3個体を3日間飼育し、得られた環境DNAを50%、10～1%に希釈
DNAが低濃度でも検出可能か検証

飼育水槽からの環境DNA検出実験



DNA濃度を希釈した低濃度サンプルにおいても、増幅を確認

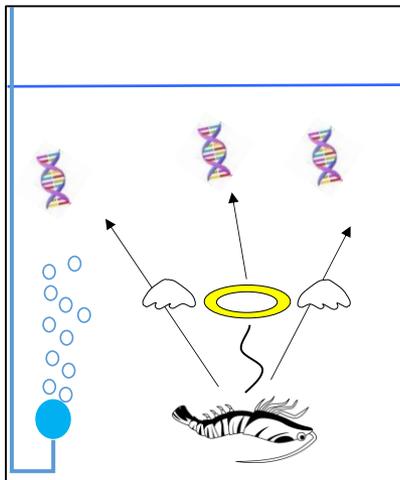
まとめ

・環境DNA

水から種特異的なプライマーを用いて対象生物を検出することが可能

⇒検出できたとしても存在するのか、存在したのか判別はできない。

⇒検出できなかったとしても存在しないことの証明にはならない。



死亡個体からもDNAが放出されることが報告されている。

ご静聴ありがとうございました。