

携帯型 PCR を用いた環境 DNA 分析手法の開発

渡部 健 (パシフィックコンサルタンツ(株)), 岡村 武志 (パシフィックコンサルタンツ(株))
西澤 尚文 (株ゴーフォトン)

キーワード：環境 DNA, 種特異的解析, 携帯型 PCR

1. はじめに

近年, 土壌や水域等の環境中に存在する DNA を分析し, 生息する生物種を解析する手法である環境 DNA 分析技術が注目を集めている。環境 DNA 分析には, 主に 2 つの手法があり, 一つは検出対象種の DNA を特異的に増幅することで検出する手法 (PCR 法) であり, もう一つは魚類, 哺乳類, 鳥類, 甲殻類など特定の分類群の DNA について網羅的に同時に検出する手法で, メタバーコーディング法と呼ばれる¹⁾。

環境 DNA 分析は, 現状では, 現地で採取された試料を実験室で分析しているが, 今後, 社会でより広く利用されるにつれ, 現場で簡易に環境 DNA が分析できる技術開発の展開が求められるようになって考えられる。

我々は, 株式会社ゴーフォトン, 兵庫県立大学と共同研究を行い, 片手で持ち歩ける程度の大きさで, 従来の室内設置型 PCR 装置と同程度の検出感度をもつモバイル リアルタイム PCR 装置 (PicoGene® PCR1100, 日本板硝子(株), 以下 PCR1100 と省略) を利用して現場で環境 DNA が分析できる環境 DNA オンサイト分析システム (PCR 法) を開発したので, 以下ではシステムの構成内容や, 魚類の環境 DNA 分析事例を紹介する。

2. 環境 DNA オンサイト分析システムの概要

2.1 PicoGene® PCR1100 の特徴

本システムで利用する PCR 装置は, 日本板硝子(株)製品のモバイル・リアルタイム PCR 装置で, 同社が保有する①「遺伝子の量を高感度で測定できる独自の小型蛍光検出技術」及び②「小さなプラスチック基板で遺伝子を高速に増やす技術」を組み合わせる事で, 高精

度のままでの小型化, 検査時間の短縮を実現している。以下では, 特色ある蛍光検出方法と温度制御方法について紹介する。

a) 蛍光検出方法

PCR1100 では, 新たな蛍光検出法を開発し小型化を実現している。従来の PCR 装置は球面レンズと空間光学系を使用しているため光学系が大型で暗箱が必要である (図 1A)。また振動に弱いため, 安定した机の上に設置して分析する必要がある。一方, PCR1100 では日本板硝子の SELFOC®マイクロレンズと光ファイバーを使うことにより光学系が小型化され暗箱も必要ではなくなった (図 1B)。また, 振動の影響を受けにくく, 分析中に手で持ち歩くことも可能となっている。

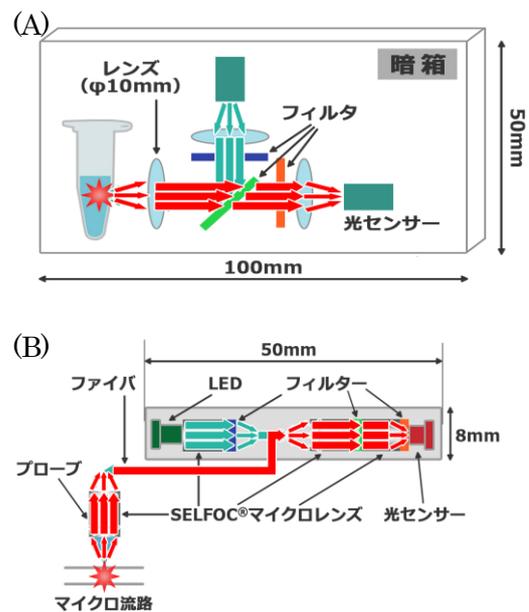


図 1. A : 従来の蛍光検出法。B: PCR1100 の蛍光検出法

b) 温度制御方法

PCR1100 の際立った特色として, 新たに開

発されたユニークな温度制御方法がある。従来の PCR 装置では、増幅試料の容器（マイクロチューブ）を挿入したヒートブロックを加熱・冷却することで溶液の反応温度を制御しているが（図 2A）、この方法では一つのヒートブロックの温度を変化させるため、温度移行（加熱・冷却）に時間がかかり、消費電力も大きい。一方、PCR1100 では、増幅試料は独自に開発されたプラスチック基盤内の微細な流路（マイクロ流路）に注入する（図 2C）。その後、試料を異なる温度領域間を往復させるため、温度移行の時間がなく高速な遺伝子増幅が可能になっている（図 2B）。

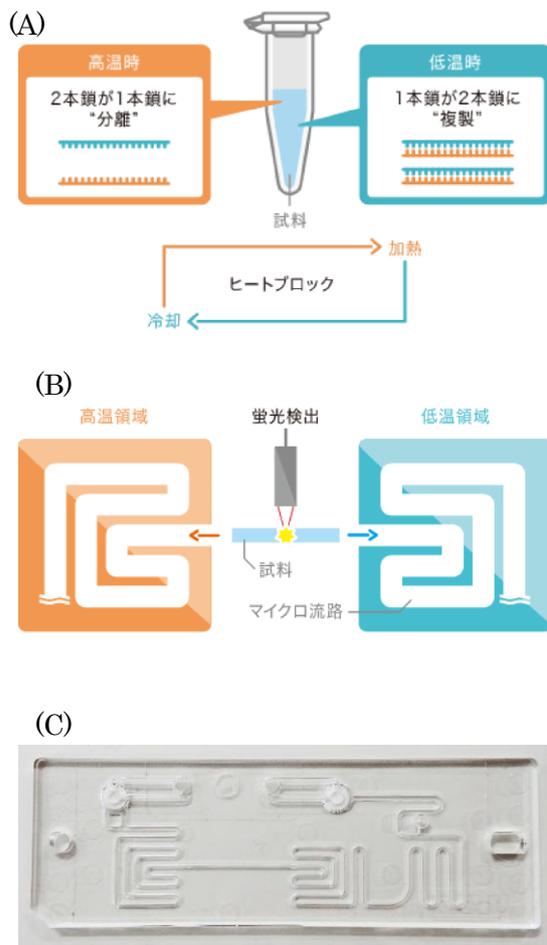


図 2. A:従来の温度制御法。B:PCR1100 の温度制御法。C:マイクロ流路チップ

2.2 ろ過・DNA 抽出の方法

水域の生物について環境 DNA 分析を行う場合、採水試料からの DNA のろ過・抽出も技術的に困難な課題である。我々の開発した環境 DNA オンサイト分析システムでは、現地でもろ過・DNA 抽出を簡易に行う方法を提案している。技術的には様々な方法がありうるが、現場での実験を通して、PCR1100 での分析にスムーズに接続できる前処理方法を以下に紹介する。

a) ろ過

採水試料のろ過については、カートリッジ式フィルター（ステリベクス、孔径 $0.45 \mu\text{m}$, SVHV010RS, メルク・ミリポア社）を利用する。バケツ等で汲んだ環境水を 50mL ロックタイプシリンジ（SS-50LZ, テルモ社）で吸引し、ステリベクスを装着して加圧濾過を行う（図 3）。一回のろ過水量が限られているので、ステリベクスとシリンジの着脱を繰り返して、ろ過総量が 500mL~1,000mL になるまでろ過する。カートリッジ式フィルターを利用することで閉鎖状態で水試料を処理できるので、現場作業時のコンタミのリスクを低減できる。



図 3. シリンジとカートリッジ式フィルターを利用したろ過。

底生動物や魚類等の大型生物の環境 DNA の検出を目的とする場合、環境 DNA 濃度が薄い場合が多い。より多くの試料をろ過することで検出確率を高めることができるが、実際には浮遊物質、プランクトン等による目詰まりが発生し、1 本のステリベクスでろ過できる

水量が 200mL 程度にとどまる場合もある。後々、分析した環境 DNA の濃度評価をするため、実際に濾過できた水量を記録しておく必要がある。

b) DNA 抽出

フィルター表面に捕捉された DNA 含有物質からの DNA 抽出は、市販の DNA 抽出試薬を直接、カートリッジ容器内に 0.5mL 程度注入して利用する (図 4)。カートリッジを閉鎖反応容器として利用することで、コンタミリスクを軽減しながら手順・用具の簡略化を行っている (図 5)。

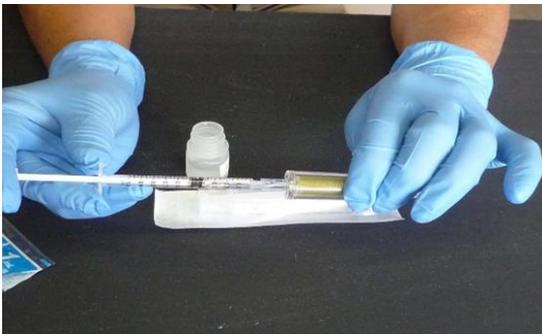


図 4. 排出口側にキャップをして注入口側から DNA 抽出試薬を注入する。



図 5. DNA 抽出液注入後の状態。注入口・排出口がキャップで閉じられた状態。



図 6. 振とう機を利用した DNA 抽出。

カートリッジに DNA 抽出液を注入し、注入口・排出口を閉じたら、振とう機を利用して、2~3 分程度フィルター表面にまんべんなく抽出液を晒すことで DNA 抽出を行う (図 6)。

カートリッジ容器内で DNA 溶出液が得られるが、様々な残渣と混合した状態のため、そのままでは DNA 溶液として PCR 分析に利用できない。残渣を取り除く方法として、溶出液を一旦、注入口側から排出して遠心分離器を利用することもできるが、最も簡便な方法は、ステリベクスの注入口にシリンジを装着して、空気加圧により排出することである (図 7)。カートリッジ内で DNA 抽出液に溶解した DNA 分子は $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターの目を通るので、様々な残渣物と溶出 DNA が混在する状態から、夾雑物を除去した DNA 溶液を得ることができる。

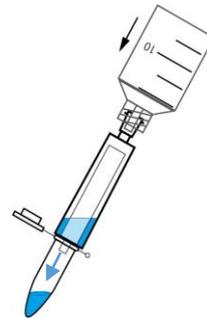


図 7. カートリッジから DNA 溶出液をろ過することで残渣が除去された DNA 溶液を得る。

2.3 PCR 反応液の準備

PCR 酵素やプライマー・プローブ等を含むプレミックス PCR 試薬 (マスターミックス GFMM シリーズ, (株)ゴーフォトン) と、前処理で得られた DNA 溶液を混合して PCR 反応液を調製する (図 8)。

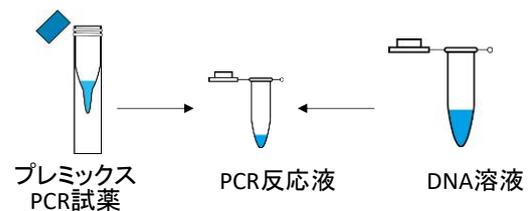


図 8. PCR 反応液の調製

2.4 PCR 分析

PCR1100 による増幅実験は、流路チップを利用して行われる (図 2C)。マイクロピペットにより調製した PCR 反応液 15 μ L 程度を流路チップに注入し (図 9)、流路チップを装置下部端の挿入部 (図 10) にセットして Start ボタンを押せば、PCR 増幅サイクルが開始する。増幅サイクルは 2 ステップで、各ステップの温度と時間はプログラムにより設定できる。なお、ゴーフォトン社製のプレミックスは、あらかじめ PCR1100 に反応条件が最適化されているため前試験なく利用できる。

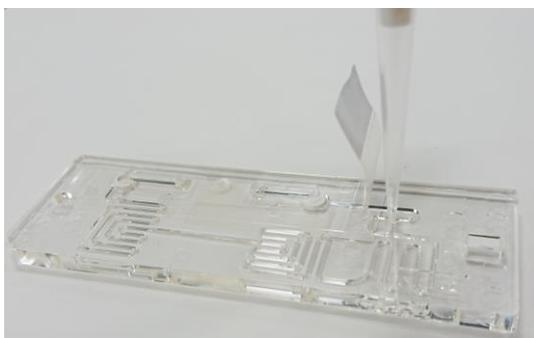


図 9 PCR 反応液を流路チップに注入。



図 10 流路チップを装置にセット。増幅サイクルの条件はあらかじめ設定しておく。

PCR 増幅条件は検査対象によって変わるが、目安として変性が 95 $^{\circ}$ C、3~5 秒、アニーリング/伸長反応が 60 $^{\circ}$ C、10~15 秒程度である。特殊な温度制御方法により、温度変化に時間がほとんどかからないため、実質、1 サイクル 15 秒程度 \times サイクル数 (最大 50 サイクル) が実験に必要な時間となり、セットして検出

結果を得られるまで要する時間はわずか 15 分程度である。

増幅状況はリアルタイムで装置のモニターに表示される。図 11 は 50 サイクル終了時点の状況を示している。検出時には Ct 値が合わせて表示される。なお、PCR1100 では 3 種類の蛍光色素 (FAM, ROX, Cy5) に対応する蛍光チャンネルを持つため、同時に 3 種類の DNA を検出するマルチプレックス増幅試験も可能である。ただし、マルチプレックス試験を行う場合には、かならず FAM を利用する必要があるなど PCR1100 の特性がある。詳細は、日本板硝子 (株) のホームページ (<https://pcr-nsg.jp/>)、及び (株) ゴーフォトンのホームページ (<https://pcr.gofoton.co.jp/>) に詳しく紹介されている。



図 11 実験終了時の画面。

3. 環境 DNA 分析事例

PCR1100 を利用して魚類の環境 DNA 分析を行った事例を以下に紹介する。

3.1 利根川水系におけるハクレンの調査

利根川水系 (本川、支川: 鬼怒川・小貝川、霞ヶ浦) の複数地点で採水し、外来魚ハクレンの環境 DNA 分析を行った。また、ハクレンの生息状況に関する捕獲データ (河川水辺の国勢調査)²⁾ をモバイル PCR1100 による検出結果と比較し、検出精度の検証を行った。結果を図 12 に示す。(図中では、環境 DNA を「eDNA」と略称で示している。)

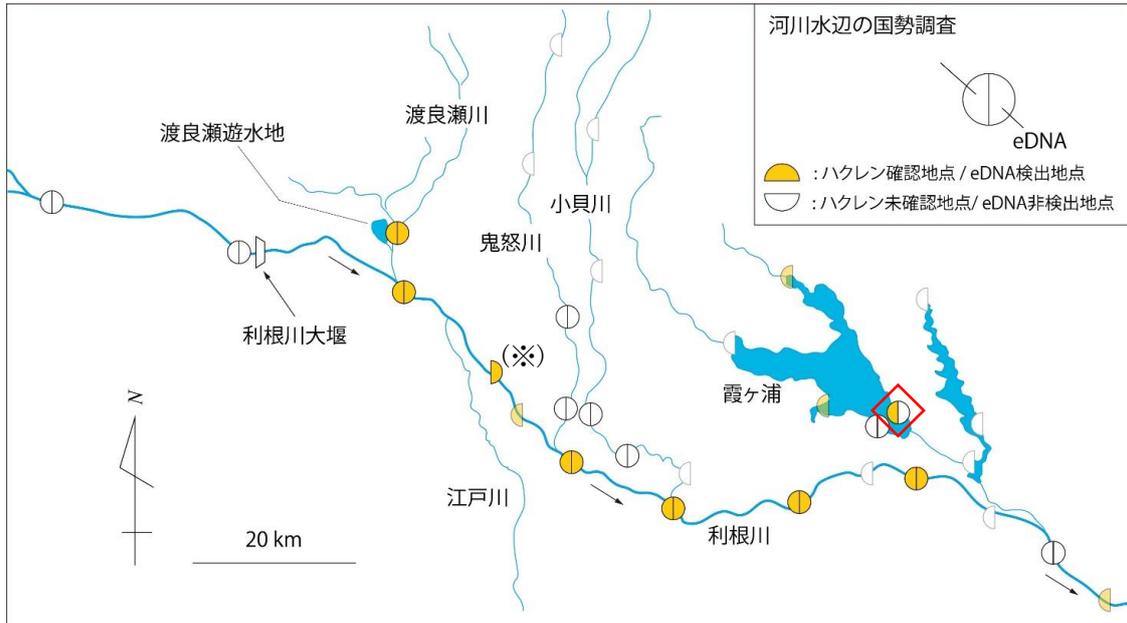


図 12 利根川水系における PCR1100 を用いたハクレンの環境 DNA 分析結果と、既往捕獲調査による生息情報。半透明で示した地点は既往調査のデータのみを示している（環境 DNA 分析は未実施）。(*) の地点は参考として環境 DNA 分析のみ実施。

本川では、環境 DNA 分析の検出結果は、既往調査データと全地点で整合的であった。支川の調査地点も、既往調査データと概ね整合的であり、霞ヶ浦では整合しない地点も見られたものの、全体として、PCR1100 を利用した環境 DNA 分析により、利根川水系におけるハクレンの分布状況を、既往の捕獲調査と同程度に把握できることを示す結果が得られた。

3.2 霞ヶ浦沿岸及び流入河川における特定外来種アメリカナマズの調査

アメリカナマズは、生態系や農林水産業へ著しい被害を及ぼす恐れの高い外来種として、外来生物法により特定外来生物に指定されている種である³⁾。PCR1100 を利用して、霞ヶ浦沿岸部及び流入河川の複数地点でアメリカナマズの環境 DNA 分析を行った (図 13)。PCR 分析の結果を図 14 に示す。調査した全地点でアメリカナマズの環境 DNA が検出され、当該水域に蔓延している状況が示唆された。また、調査地点間でアメリカナマズの環境 DNA の濃度には大きな変異が見られることも分かった。個体の生息密度と環境 DNA 濃度に相関関係が

あれば、駆除地域の優先順位を計画したり駆除対策の効果測定に利用できる可能性がある。

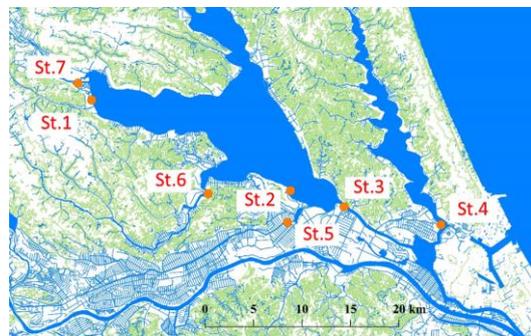


図 13 アメリカナマズの環境 DNA 調査地点

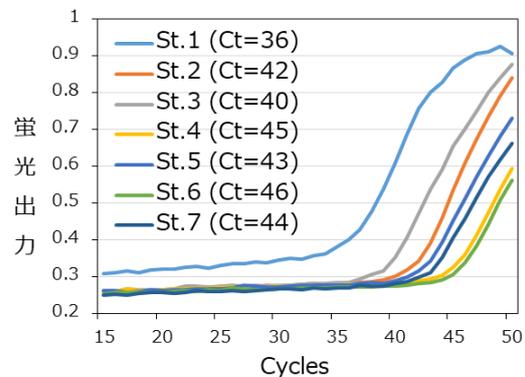


図 14 アメリカナマズの環境 DNA 検出結果。

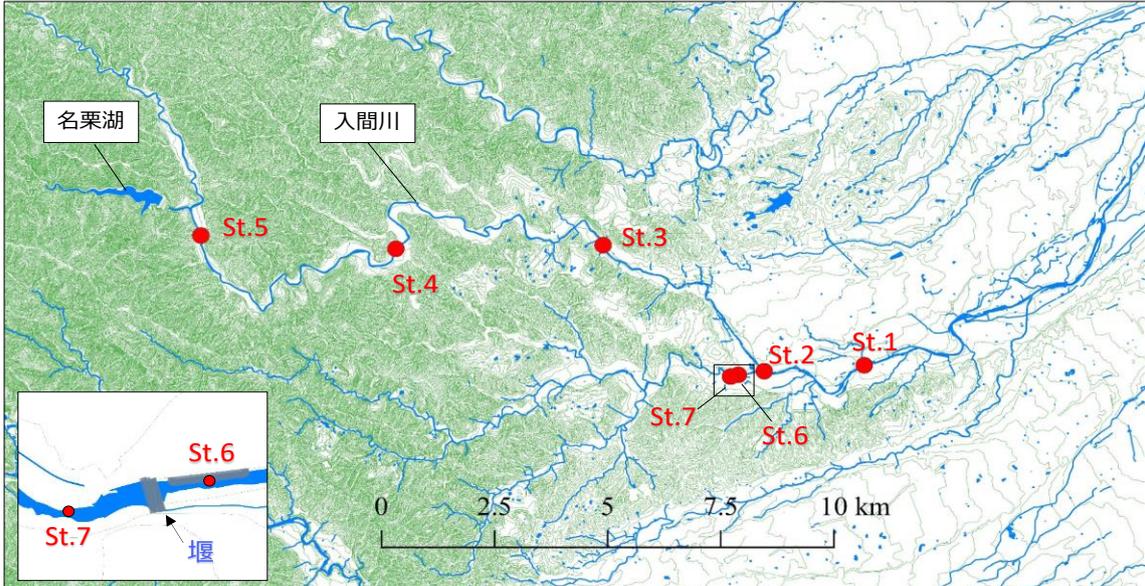


図15 荒川支川入間川におけるPCR1100を用いたコクチバスの環境DNA調査地点。St. 6とSt. 7は取水堰を挟む上流側と下流側の地点。

3.3 入間川における特定外来種コクチバスの調査

コクチバスは、アメリカナマズと同様に外来生物法によって特定外来生物に指定されている種である。オコクチバスよりも低水温や流水域に侵入できる性質を持つため、捕食や競争などによる漁業被害が懸念されている⁴⁾。

荒川の支川である入間川は、ヤマメやアユなどの埼玉県内における主要な漁場として知られているが、上流の名栗湖からコクチバスの稚魚が流出し、現在では入間川全域に生息が広がっている。PCR1100を利用して、入間川の複数地点(図15)で、コクチバスの環境DNA分析を行ったところ、調査した全地点でコクチバスの環境DNAが検出された(図16)。現地調査では、入間川の支川で魚類の遡上が困難と考えられる堰が見つかったため、堰が分布の制限要因になっているかどうかを確かめるため堰の上下流側(St. 6とSt. 7)での調査を追加で行った。結果として堰の上流側にも生息している状況が現場で確認された。環境DNAオンサイト分析システムを利用することで、環境DNA分析は、より柔軟に対応できる調査ツールに展開できると考えられる。

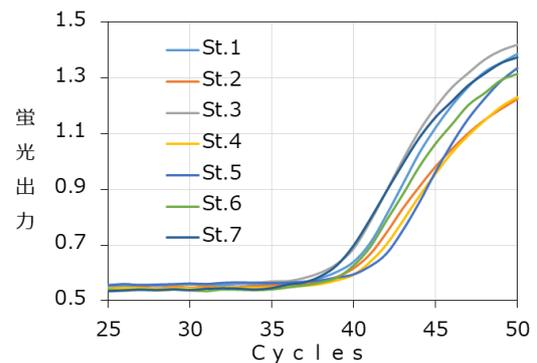


図16 コクチバスの環境DNA検出結果。

4. まとめ

- 1) 現場で環境DNAの種特異的分析(PCR分析)を可能とするシステムを開発した。採水からPCR分析の結果を得るまで所要時間は30分程度である。
- 2) 野外で野生個体(魚類)の検出実験に成功した。種特異的プライマーがあれば、携行型PCRを利用した迅速な環境DNA分析が可能である。
- 3) PCR1100は定量PCR分析が可能であるため、環境DNA濃度の情報を得ることができる。
- 4) 環境DNAオンサイト分析システムの利用により、環境DNA分析の結果を得ながら現地調査を計画・実施することができる。

5. 参考文献

- 1) 環境 DNA 学会. 2019. 環境 DNA 調査・実験マニュアル ver. 2.1
- 2) 河川環境データベース(河川水辺の国勢調査) (<http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/>)
- 3) 日本生態学会(編). 2002. 外来種ハンドブック. 地人書館, 東京.
- 4) 国立環境研究所. 侵入生物データベース (<https://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/>)