

### <H3 1 生物工学部門 必須 1－2>

#### (問題)

生物多様性の保全のためには、まず生態系の現状を把握・評価するためのモニタリングを行い、その結果に基づき、保全・再生の計画や対策を行う必要がある。海洋や河川等に生息する生物のモニタリング調査は、直接捕獲や観察によって行われているが、近年では、水中に存在する生物由来の微量 DNA を、種特異的なプライマーを用いた PCR 方法で増幅・定量することで水棲生物の生息情報を取得する新しいモニタリング技術も注目されている。以上のような状況を踏まえて以下の問いに答えよ。

- (1) 上述した PCR に基づく手法を、水棲生物のモニタリング技術として利用する際に生じる技術的な課題を、多面的な観点から抽出し分析せよ。
- (2) 抽出した課題のうち、重要と考える課題を 1 つ挙げ、その課題に対する複数の解決策を示せ。
- (3) (2) で掲げた課題が解決されたとして、この手法により生態系を把握・評価する場合に新たに生じうるリスクとそれへの対応について述べよ。
- (4) 業務遂行に当たって必要な要件を技術者としての倫理、社会の持続可能性の観点から述べよ。

#### (解答例)

##### 1. PCR 法による水棲生物モニタリングに生じる技術的課題

PCR 法は種特異的な遺伝子の開始コドンを含む 10bp 前後の配列を、抽出ゲノム DNA に混和する。同様の配列があれば、ポリメラーゼの作用により DNA が増幅するので、増幅の有無により抽出 DNA が種特異的遺伝子を含むかを判定できる。

しかし、以下の課題がある。

##### (1) PCR 法自体の精度問題

PCR 法は 100%の精度で、プライマーが対象 DNA と結合するわけではない。1bp 異なり、種が異なっているにも関わらず、PCR されるケースもあり、類似種を同定することもある。

この課題は以下の (2) (3) の課題にも関与する課題である。

##### (2) 検体抽出個所による個体数変動問題

水棲生物は、陸上と異なり、鉛直方向の生息に変動がある。PCR 法は微量数の DNA でも種同定が可能であることから、たまたま通常生育個所と異なる環境の 1 個体が違う環境で捕獲、種同定されることで、違う個所が通常生育個所として誤認識される可能性があり、鉛直方向の生育変動の分だけ、水棲生物はこのリスクが高い。

##### (3) 種特異的配列の同定問題

最初に捕獲・発見した生物の場合、特異的遺伝子の同定が困難である。どの遺伝子のプライマーを用いるか、他の生物と重複していないか検討が必要である。理論的には全遺伝子配列の同定および比較になるが、遺伝子のクローニングとシーケンスに膨大な時間がかかる。水棲生物は、個体数の確保が陸上より困難であることから、個体数確保による同時作業が困難であり、また生息環境の把握が困難であるため、種特異的遺伝子の同定が困難である。

##### 2. 種特異的配列の同定の問題

上記（３）が最重要問題である。解決方法は以下が挙げられる。

（１） シーケンス以外の種特異的配列の同定

クローニング、シーケンスには膨大な時間とコストがかかる。特にクローニングはコンタミネーションの問題があり、一度外部の遺伝子が混入されクローニングされると、種特異的遺伝子として認識されてしまう。このため、複数の制限酵素で、抽出 DNA を切断し、電気泳動パターンを比較する。類似種でなく本種に特異的なバンドを抽出し、放射物質などでマーキング後、他個体にサザンハイブリダイゼーションをしてヒットした場合、種特異的遺伝子断片としてクローニングしてもよい。こうすることで、全 DNA 配列のシーケンスが不要となるため、膨大な時間の短縮につながる。

（２） 個体数の確保

水棲生物は一度に取得できる個体数が少なく、同時に多くの同定作業ができない。このため外観を目・鼻・口・色・体躯などに分けて分類し、誰でも種同定ができるように明確な基準を作成・公布すべきである。こうすることで、複数の個所で取得された個体の同定が PCR 法で迅速に行われる。

（３） PCR 法プライマーの長さの調整

PCR 法を水棲生物のような少ない個体数で、高精度で行うためには、プライマーの少しの変化による PCR の実施を阻止せねばならない。このためにはプライマーの長さを長くすることで、少しの変化による DNA へのバインドを防ぐことができる。

３． PCR 法による誤判定リスクと解決法

上記（１）のように、電気泳動パターンの比較は容易な方法であるが、数 bp～数十 bp 程度の長さの断片を区別することが難しく、コンタミネーション以外でも種特異的遺伝子をクローニングする恐れがある。これによる誤判定リスクを防止するためには、クローニングした DNA をサザンでコンタミネーションの可能性を排除し、更にシーケンスをすることで、得られた配列情報を他と比較することが重要である。他に登録されていなければ、種特異的遺伝子である可能性が高い。

このようにして、コンタミネーションと種特異的でない DNA による誤判定を防止する。

４． 水棲生物モニタリングの倫理および持続可能性

特異的な水棲生物を分子生物学的方法である PCR 法によって同定する中で、有用物質を持つ種を同定する可能性や物質の詳細、生息範囲を調べることができる。これにより乱獲が発生する可能性がある。水棲生物は陸上生物と異なり、取得や把握が困難であったことが生態系の多様性を保持してきた、最後の生物のフロンティアになっている。持続して人類が恩恵を受け、持続可能性を保持するためには、これらを守らねばならない。このためには、有用遺伝子を同定すれば乱獲によって確保するのではなく、大腸菌等にクローニングして大量生産技術を確立するのが、生物工学に求められている。