

「環境 DNA による希少種生息地の発見」

兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科 土居研究室

はじめに

希少な生物種の保護・管理をする上で最も基本的かつ重要な情報は、生物の生息分布や個体数、生物量である。分布や個体数推定には、様々な手法や分布予測モデルが提案されてきており、近年になってもその議論が終息することはない。しかし、これらの従来の研究では、生物の生息場所や生息量を知るためには、目視で数える、採集を行う、網を仕掛けるなど、多大な労力と時間をかけて調査を行う必要があった。実際、播磨地域の淡水生態系においても多くの調査がこのような方法で行われてきた。

一方で、近年では“環境 DNA (environmental DNA、eDNA) 手法”と呼ばれる新たな生物調査方法が開発されつつある。水中、土壌中、空気中などあらゆる環境中には、そこに生息している生物由来の DNA が存在している。その DNA を総称して、環境 DNA (environmental DNA、eDNA) と呼ばれている。その環境 DNA を採取し分析することで、生物の在不在や生物量・個体数、さらには遺伝情報などの膨大なデータを得ることが可能となってきた。

本研究では、環境 DNA を用いた生物調査手法の確立として、姫路市・播磨地域の希少種であるカワバタモロコを対象として、播磨地域でのカワバタモロコの保全のための環境 DNA による調査手法を開発する。本研究では、ため池において、カワバタモロコの生息状況と環境 DNA の結果を比較して、カワバタモロコ 1 種の環境 DNA 検出系を確立することを目指す。

対象種カワバタモロコ

本研究では、希少種であるカワバタモロコ (*Hemigrammocypripis rasborella*) を対象として、その検出法の開発、野外での分布調査への応用を試みた。カワバタモロコは、環境省レッドリストの絶滅危惧 IB 類に分類されているコイ科の魚で、平野部の浅い池沼や用水、泥底の水草の多い浅所に棲息する。近年、オオクチバス、ブルーギルなどの魚食性の外来種による捕食などによって、カワバタモロコの棲息箇所が激減していると考えられており、生息域の現状を正確に把握することは保全上重要である。

方法

兵庫県赤穂市、姫路市内のため池 11 面 (St. 1-11) において、2018 年 10 月から 11 月にかけて調査を行った。これら調査地は、市街地のため池から農村地や山林に位置するため池を含む。採水は、姫路市水族館のご協力のもと各ため池の沿岸 1 箇所において、1L のポリ瓶 1 本用いて表層水を採水した。それぞれの 1L のサンプル水について、ガラスフィルターを用いて濾過し、環境 DNA を抽出した。

カワバタモロコの環境 DNA を検出する PCR プライマーと TaqMan プローブは、増幅領域長 132bp のプライマーセットと、その増幅領域を認識する TaqMan プローブであり、その配列情報は以下の通りである (福岡ら 2015)。

Hra-CyB-F (5' -CACCCCAGCAAACCCCTTA-3')

Hra-CyB-R (5' -ACTAGAATAGAGAACAGTAACGCGAGAA-3')

Hra-CyB-P (5' -FAM-CCTGTTCGCTTACGCCATTCTACGATCA-TAMRA-3')

リアルタイム PCR 反応液には、マスターミックス溶液 (TaqMan Environmental Master Mix 2.0, Thermo Fisher Scientific 社)、900 nM の F、R プライマー、125 nM の TaqMan プローブ、0.2 μ L の AmpErase Uracil N-Glycosylase (UNG, Thermo Fisher Scientific 社)、2 μ L のテンプレート DNA を加え、全量を 10 μ L とした。PCR 増幅にはリアルタイム PCR 装置 (PikoReal PCR, Thermo Fisher Scientific 社) を用い、PCR 条件は、50 度で 2 分、95 度で 10 分の後、95 度で 15 秒、60 度で 60 秒からなるサイクルを 55 サイクル行った。4 繰り返しで測定して検出頻度を検討した。

結果と考察

カワバタモロコの生息状況と、リアルタイム PCR による環境 DNA の検出との比較から (表 1)、カワバタモロコが生息していないため池においては、全てで環境 DNA は非検出となり、近隣からの水の流入や実験室内でのコンタミネーションがなく、検出できていることがわかった。一方で、カワバタモロコが生息が確認できた St. 7 で、多くの環境 DNA の検出ができた。さらにその下流に位置する St. 9 においてやこれまで採捕されていなかった St. 11 においても環境 DNA が検出された。よって、これまで見つかっていなかった新規の生息場所を発見した可能性がある。これらの生息場所についてたった 1 回の採水で検出できたことは、十分検出力が高かったと考えられる。

これらの結果より、播磨地域でのカワバタモロコについても、環境 DNA で検出が可能であることが明らかとなった。本研究により、環境 DNA 手法によるカワバタモロコが生息調査を行うことができた。今後は、これまで採捕や目視で行い大変な労力がかかっていた生息調査を、環境 DNA 手法を用いることでより簡便に行うことができる。さらに、今後は、採水地点数や、季節的な環境

DNA の検出について精査し、カワバタモロコの生息調査としての環境 DNA 手法を確立する。

本環境 DNA 手法がカワバタモロコについて確立されたことにより、これまで採捕や目視で行なっており大変労力がかかっていた調査を、環境 DNA を用いることでより簡便に行うことができる。さらに、環境 DNA を用いることで、採水のみで調査できることから、カワバタモロコの生息場所をほとんど乱すことなく調査が可能となる。

表1 カワバタモロコ生息状況とリアルタイム PCR によるカワバタモロコ環境 DNA 検出結果（4 繰り返し中の検出数）

ため池 St.	カワバタモロコ生息確認	リアルタイム PCR
1	x	0 /4
2	x	0 /4
3	x	0 /4
4	x	0 /4
5	x	0 /4
6	x	0 /4
7	○	4 /4
8	x	0 /4
9	x (St. 7 の下流に位置)	1 /4
10	x	0 /4
11	x	2 /4