

# 「環境 DNA による絶滅危惧種・外来種の生息場所把握」

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

絶滅が危惧されている希少な生物種の保護・管理や外来種の駆除を行う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。生物の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、その行政事業への活用が期待されている。しかし、これらの従来分布調査では、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、近年は“環境 DNA (environmental DNA、eDNA)”と呼ばれる DNA 分析を用いた新たな生物調査方法、環境 DNA 手法が開発されつつある。

環境中、例えば、水中、土壌中、空気中などあらゆる場所には、そこに生息している生物由来の DNA が存在していると考えられている。その DNA を総称して、環境 DNA (environmental DNA、eDNA) と呼ばれている。これらの環境 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。そして、ため池や河川をはじめとした淡水域の多くの水域、分類群に応用されつつある。

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り、絶滅危惧種であるスイゲンゼニタナゴ (*Rhodeus atremius suigensis*、図 2) を対象として、播磨地域でのスイゲンゼニタナゴの保全のための環境 DNA による調査手法を開発する。本研究ではスイゲンゼニタナゴ 1

種のリアルタイム PCR による検出系を確立することを目指す（図 3 参照）。また、絶滅危惧種であるオヤニラミ (*Coreoperca kawamebari*) について、本年度は塩基配列とプライマーの検証を行った。さらに、本研究では Ogata ら（未発表）で開発された、外来種ウシガエル (*Lithobates catesbeiana*) の検出系を利用し、外来種の検出を試みる。

## 方法

### 採水・DNA 抽出

2018 年度に採集した兵庫県赤穂市、姫路市内のため池 9 面 (St. 1-1 1) に加えて、兵庫県赤穂市、姫路市内 (図 1 0) のため池 5 面 (St. 1 0-1 4) において、2019 年 11 月に調査を行った。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 本を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。

### リアルタイム PCR のプライマープローブ

スイゲンゼニタナゴについて、1 2 S、1 6 S、COI、ND5 など様々な領域を検討した結果、ミトコンドリア DNA CytB 領域を使用してリアルタイム PCR のプライマープローブの設計を行なった。NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) より取得した、スイゲンゼニタナゴとそのコイ科近縁種（主にタナゴ類）の配列を取得した。スイゲンゼニタナゴの 5 つの配列のコンセンサス配列により、プライマープローブを Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) を用いて設計した。

設計したプライマー・プローブと他のコイ科魚類の配列について目視で検証し、最終的に1つのプライマー・プローブセットを決定した。このセットでは、フォワードプライマー(Forward Primer)の5'末端、リバースプライマー(Reverse Primer)の3'末端5塩基中で、それぞれ1-2塩基以上の違いがある(図12)。

スイゲンゼニタナゴのプライマー・プローブセット

RhAs-Cytb-F: 5'-TAGTCCCAATTCTGCACACA-3'

RhAs-Cytb-R: 5'-AGCGCGGACTCACCTTTCGC-3'

RhAs-Cytb-Pr: 5'-[FAM]-TTTGCCCGATGGTGGTGTAC-[TAMRA]-3'

ウシガエルについては、Ogata et al. (未発表)のものを使わせていただいた。こちらについても近縁の日本に生息するカエル類の配列との違いについてはOgata et al.による研究で精査されている。

ウシガエルのプライマー・プローブセット (Ogata et al. 未発表より)

Lcat-12S-F: 5'-TTACACCGAGAAAATGTCCGTTT-3'

Lcat-12s-R: 5'-GAAATTTTTTCGATCGCCTGTACTATA-3'

Lcat-12S-Pr: 5'-[FAM]-CTACACACATTCGCATGACCCCCTTACC-[TAMRA]-3'

リアルタイムPCR分析

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 μL の AmpErase Uracil N-Glycosylase (UNG, Thermo Fisher Scientific 社)、2 μL の テンプレート DNA

を加え、全量を 10  $\mu$ 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。

オヤニラミについては、本年度は塩基配列とプライマーの検証を行った。公開されているプライマープローブ (丹羽ら 2018) で、姫路市近郊でも環境 DNA 調査が可能であることを確認した。

## 結果と考察

ため池については、これまで全ての地点で、スイゲンゼニタナゴの生息が確認されておらず、すべての場所でスイゲンゼニタナゴの環境 DNA については、リアルタイム PCR の結果から非検出となった。ポジティブコントロールとして採取したスイゲンゼニタナゴの水槽水からは多くの DNA が検出された。よって、プライマープローブ自体は、スイゲンゼニタナゴを検出できていると考えられた。ウシガエル については、いくつかの地点から検出がみられた。これらのため池では、これまでには水族館の観察ではウシガエル が認められていない。しかし、これらの中では、St. 7, 9, 11 について、ウシガエルの環境 DNA が、リアルタイム PCR により検出された。

これらの結果より、播磨地域でのスイゲンゼニタナゴや外来種のウシガエル について、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 手法によるスイゲンゼニタナゴの生息調査手法の開発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 (Miya et al. 2017, Yamamoto et al. 2017) 。