

## 環境DNA手法を用いた希少種調査方法の確立

米田創樹・木澤祥士・松本 涼・久次米 響・生月秀幸  
 本城将真・岸田周士・喜多山友輔・柳瀬 太  
 (兵庫県立農業高等学校生物部)・松本宗弘・森垣 岳 (顧問)

### 1 はじめに

生物部では2007年より絶滅危惧種であるカワバタモロコについて県内での分布調査と保全活動を行っている。2008年にヘラブナやオオクチバスが侵入した池の池干しを行って外来魚を駆除した。その後、カワバタモロコの繁殖について標識再捕法を用いて継続的に調査してきた。その結果、増減を繰り返しながら個体数を維持していることがわかった。しかし、2013年の調査では仮説通りなら増加する予定だったが前年の推定生息数より減少した(図1)。調査結果が正しいのか疑問を持っていた時に、環境中に溶存している、生物が出すフンや皮膚などのDNA断片(環境DNA)を用いて魚の種類や密度がわかることを、講演会に参加した時に知り得た(図2)。カワバタモロコで応用ができれば疑問を解決することができると考え、さらに保全に活用できるように神戸大学・広島大学と共同研究を行った。



図1 カワバタモロコ

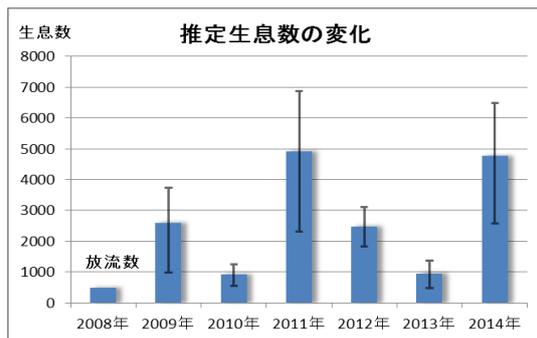


図2 標識採捕法による推定生息数の変化

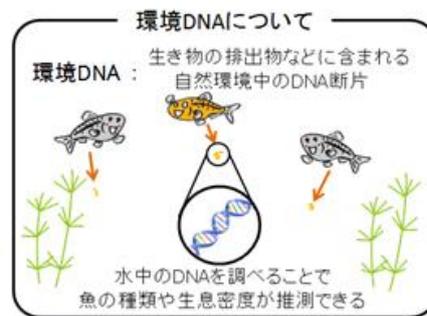


図3 環境DNAについて

### 2 環境中のカワバタモロコ DNA の検出実験

#### 2-1 目的

カワバタモロコが生息する水からDNAが検出できるのかを調べるために、カワバタモロコが生息するため池と、生息しないため池の水を採取して環境DNAの検出実験を行った。

#### 2-2 方法

調査は2014年1月12日に行った。方法は、カワバタモロコが生息するため池7箇所、生息しないため池4箇所の計11箇所ですべて採水を行った。その後採水したサンプルをろ過し、ろ紙に付着したDNAを広島大学に郵送して、PCR法で増幅させて検出した。1サンプルあたり8反復行い、DNA検出率を求めた(DNA検出は広島大学で実施)。



図4 採水の様子



図5 ろ過準備



図6 ろ過の様子

### 2-3 結果

右表の通り、カワバタモロコが生息する全てのため池から DNA が検出でき、生息しないため池からは検出しなかった。

### 2-4 考察

捕獲調査による存不存情報と一致したことから環境 DNA 手法はカワバタモロコの生息状況を把握できると考えられる。C 地域の B 池の検出率が低いのは、生息数が他のため池より極端に少ないため検出率が低くなったと考えられる。また、ため池の環境や生息数によって、検出率に違いが出るのが判明した。このことから、カワバタモロコが生息していたとしても、密度が薄い場合は DNA を検出しない可能性もあると考えられる。

表 1 調査したため池の検出結果 (11 箇所)

| 地域   | 池名  | 生息状況 | DNA 検出率 (%) |
|------|-----|------|-------------|
| A 地域 | A 池 | ◎    | 75          |
|      | B 池 | ◎    | 87.5        |
|      | C 池 | ×    | 0           |
|      | D 池 | ×    | 0           |
| B 地域 | A 池 | ◎    | 100         |
|      | B 池 | ×    | 0           |
|      | C 池 | ×    | 0           |
|      | D 池 | ◎    | 100         |
| C 地域 | A 池 | ◎    | 100         |
|      | B 池 | ○    | 12.5        |
|      | C 池 | ○    | 100         |

※ ◎今年度確認済 ○昨年度確認済 ×未生息

### 2-5 課題

現在生息が確認されている全てのため池で実験を行い、どのような環境でも DNA が検出できるように検討したい。また、DNA 検出率が一定になるように採水方法を検証する必要がある。

## 3 環境 DNA を用いた生息地調査

### 3-1 目的

カワバタモロコの DNA 検出実験で、DNA が検出できることが証明できた。そこで、この調査方法を用いて新たな生息地の発見を試みることにした。

### 3-2 方法

ため池における DNA の検出は神戸大学が実施した。任意に選択した 83 箇所のため池の環境 DNA の検出を行ったところ、7 箇所でカワバタモロコの DNA が検出された。そこで当該のため池でモンドリを用いて捕獲し生息確認を行った。

### 3-3 結果

カワバタモロコの DNA が検出された 7 箇所でもンドリを用いて生息確認を行った結果、7 箇所のうち 6 箇所でカワバタモロコの生息を確認した。

### 3-4 考察

今回の調査の結果、6 箇所のため池でカワバタモロコの新たな生息地を発見することができた。この結果から兵庫県下に未知のカワバタモロコの生息地が多数存在することが示唆される。このことから新たな生息地発見に環境 DNA 手法が利用できることがわかった。1 箇所生息が確認できなかったため池については生息数が非常に少なく、捕獲できなかった可能性があると考えられる。

## 4 個体数による DNA 量の変化

### 4-1 目的

カワバタモロコが生息するため池から DNA が検出されることが実証できたので、検出された DNA 量から生息数を推測できないかと考えた。

### 4-2 方法

カワバタモロコの個体数を 1 匹、10 匹、50 匹に設定し、丸型容器に水量 78L で飼育した。実験開始前にカワバタモロコの各個体重量を測定した。1 週間後採水し、個体数によって DNA 量がどのよ



図 7 個体数別の実験

うに変化するのかを調べた。この作業を3反復行い、個体数によってDNA量がどのように変化するかを調べた。ろ過までは学校で行い、冷凍したフィルターを神戸大学に持ち込んで、私達もDNAの検出作業に参加した。分析にはDNA量を調べるためにリアルタイムPCR法を用いて測定した。

#### 4-3 結果

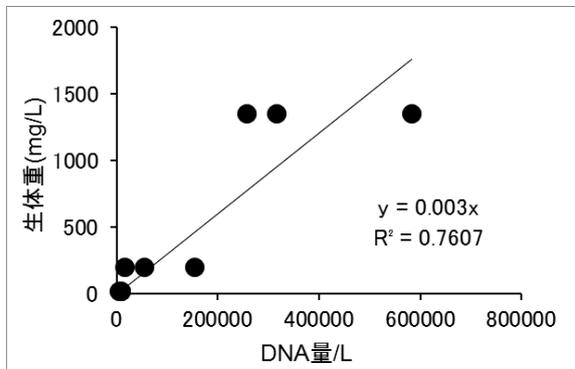


図8 個体数とDNA量の相関図



図9 DNA抽出実験の様子

生体重はカワバタモロコの全重量を水量(78L)で割った数値とした。生体重(mg/L)とDNA量(コピー数/L)の相関より回帰式 $y=0.003x$  ( $R^2=0.76$ )を得た。

#### 4-4 考察

個体数とDNA量に相関が見られたことからDNA量から生息数が推測できると考えられる。しかし、2回目の実験では同じ個体数でもDNA量に違いが見られた。原因として気温や水温といった周辺環境の変化によって、カワバタモロコが放出するDNA量が変化した可能性が考えられる。

#### 4-5 課題

反復実験を行う際に同条件で実験を行う必要があるが、今回の実験ではスペースやカワバタモロコの個体数の問題で同時に実験を行うことができなかった。今後は再度条件を揃えて実験したい。

## 5 環境DNAを用いた生息数調査

### 5-1 目的

個体数とDNA量の相関図より得られた回帰式を用いて環境DNA量から推定生息数を求め、標識再捕法を用いて算出した推定生息数と比較することを目的とした。

### 5-2 方法

毎年生息数調査を行っているため池で採水を行い、DNA量を測定した。標識再捕法でモンドリを仕掛けた3箇所で採水し、DNA検出実験と同じ方法で分析を行った。

### 5-3 結果

表2 環境DNAによる推定生息数

|                               | 池の水1LあたりのDNA量 | 池の水1Lあたりの推定生体重(mg) | 池全体の推定生体重(mg) | 池全体の推定生体重(g) | 池全体の推定生息数(匹) |
|-------------------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------|--------------|
| 採水ポイント①                       | 136.1735307   | 0.408520592        | 716218.3019   | 716.2183019  | 607          |
| 採水ポイント②                       | 40.68226954   | 0.122046809        | 213972.4649   | 213.9724649  | 181          |
| 採水ポイント③                       | 9.744204028   | 0.029232612        | 51250.6155    | 51.2506155   | 43           |
| 回帰式 $y=0.003x$ に1LあたりのDNA量を代入 |               |                    |               |              | 277          |

3箇所すべてにおいてDNA濃度に違いがみられ、それらの値から池全体の平均個体数を推定した

ところ 277 匹となった。2014 年 6 月の標識再捕法を用いた生息数調査では、推定生息数が約 4783 匹だったので、環境 DNA を用いた生息数調査と一桁以上の違いが見られた。

#### 5-4 考察

標識再捕法と環境 DNA 実験で推定生息数に大きな差が見られた理由としては、ため池が大きく水量が多いため、カワバタモロコの DNA が均等でなかったためと考える。3 箇所から採水を行ったが、推定生息数に大きな差があった。実際、採水ポイント①ではモンドリでも一番多く捕獲でき、採水ポイント③ではほとんど捕獲できなかった。つまり、採水した場所付近でのカワバタモロコの生息数によって DNA 量に変化があり、推定生息数に影響が表れる。このことから、大きなため池の場合はカワバタモロコが均等に分散しているわけではないので、数箇所の採水による環境 DNA から、池全体の個体数を推定するのは難しいと思われる。

#### 5-5 課題

DNA 量がどれだけの範囲までの個体数を反映しているのかを調べるために、カワバタモロコ 1 匹から分泌される DNA 量がどれだけの水量まで検出できるのか実験を行う必要がある。

## 6 環境 DNA の検出可能範囲と DNA 量の変化

### 6-1 目的

任意の数とした条件でカワバタモロコの環境 DNA が、どの程度の範囲まで拡散するかを調べるため、校内にある直径 10m の噴水池を用いた実験を行った。

### 6-2 方法

カワバタモロコ 1 匹を池の中心に置いた籠の中に入れて移動制限を行い、一週間後に池の中心から 1m・3m・5m の 3 点を決め、3 方向の計 9 ヶ所の採水を行い、ろ過したフィルターをサンプルとした。採水後 4 匹を追加して 5 匹とし、一週間後に同様の作業を繰り返した。さらにカワバタモロコの数を 10 匹・50 匹と増やし、同様の作業を繰り返した。



図 10 噴水池での実験



図 11 カワバタモロコの投入



図 12 採水の様子

### 6-3 結果

現在、広島大学に DNA 検出作業を依頼している。

## 7 まとめ

これまでの実験や調査によって環境 DNA を用いることで、新たな生息地発見に利用できることが証明できた。しかし、多くの課題も残っており今後より正確なデータにするために実験を反復し、精度の高い調査方法にしたいと考えている。さらにカワバタモロコだけでなく、他の生き物にも利用できるように技術開発を行いたいと考えている。

## 8 参考文献

源利文・福岡有紗・高原輝彦・兵庫県立農業高校生物部 (2014) 環境 DNA 手法の希少生物種調査への応用: 兵庫県下のため池におけるカワバタモロコの分布調査. 日本陸水学会第 79 回大会