

環境 DNA 手法を用いた希少種調査捕法の確立 第 2 報

喜多山友輔・久次米響・本城将真（兵庫県立農業高等学校 生物部）
松本宗弘・森垣 岳（兵庫県立農業高校 生物部顧問）

1. はじめに

私たちは 2007 年からカワバタモロコについて標識再捕法を用いた分布調査と保全活動を行っている。(図 1) また、環境 DNA を用いる手法を知り、標識再捕法と組み合わせることでより正確な調査が行えると考え、大学と共同研究を行った。成果として、カワバタモロコの環境 DNA を検出でき、新たな生息地を発見することができた。さらに、環境 DNA から生息数を把握する手段を確立するための実験を行い、標識再捕法と比較した。



写真1 カワバタモロコ(上: 雌、下: 雄)

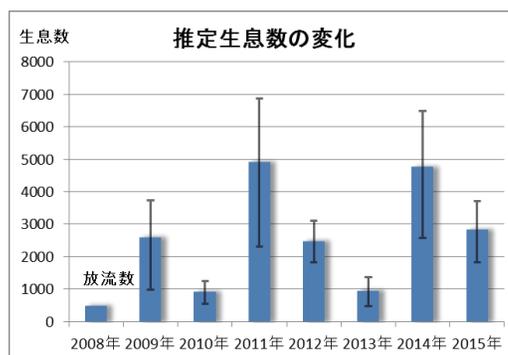


図1 推定生息数の変化

2. 個体数による DNA 量の変化

(1) 丸型容器での実験

環境 DNA を用いてカワバタモロコの生息数を求めるために、個体数によって DNA 量にどのような違いがあるのかを調べる実験を丸型容器で行った。(写真 2)

実験前にカワバタモロコの各個体重量を測定し、個体数を 1 匹、10 匹、50 匹とし、水道水を 78L 入れた丸型容器で 1 週間飼育した。また、ネガティブコントロールとして、0 匹の容器も用意した。1 週間後採水を行い、丸型容器を洗浄した。この作業を 3 週間にわたって 3 反復した。採水後は学校でろ過を行い、3 反復分の冷凍したフィルターを、神戸大学に持ち込んで DNA の検出作業に参加させていただいた。(写真 3) 分析にはリアルタイム PCR 法を用いて測定した。



写真2 飼育容器



写真3 実験の様子

この実験を行った結果、生体重はカワバタモロコの全重量を水量で割った数値とし、生体重と DNA 量の相関より回帰式、 $y=0.003x$ ($R^2=0.7607$) を得ることができた。(図 2) この結果から、個体数と DNA 量に相関が見られたため、DNA 量から生息数を推測できると考える。しかし、2 反復目の実験では同じ個体数でも DNA 量に大きな差があった。原因として、スペースや数の問題で同時に実験を行えず、水温などの周辺環境の変化によって、DNA 量に変化があったと考えられる。

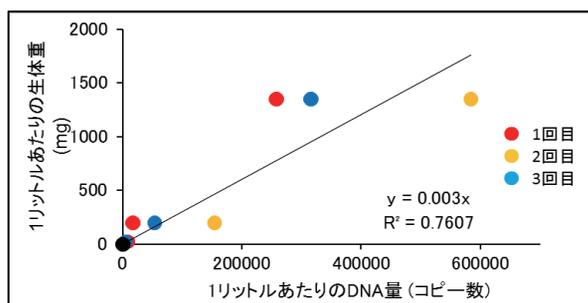


図 2 丸型容器実験の相関図

(2) ビオトープでの実験

丸型容器での実験を踏まえて、より自然環境に近い条件で実験を行った場合、正確な結果を得られると考え、校内の水量約 2,000L のビオトープで実験を行った。(写真 4)

実験方法は、初めにネガティブコントロールとしてカワバタモロコを放流する前に採水を行った。その後、個体重量を測定したカワバタモロコを 1 匹放流し、1 週間後に対角となる 2 か所で採水を行った。その後は、各個体重量を測定したカワバタモロコ 9 匹を追加して 10 匹、40 匹を追加して 50 匹とし、それぞれ 1 週間後に採水を行った。

それぞれの水をろ過し、冷凍したフィルターを広島大学に送付して DNA 分析を行った。丸型容器実験と同様に回帰式を求めたところ $y=0.0006x$ ($R^2=0.7557$) を得た。(図 3)

それほど大きくないビオトープだが、採水ポイントの違いで DNA 量に大きな違いが生じることもわかった。



写真 4 使用したビオトープ

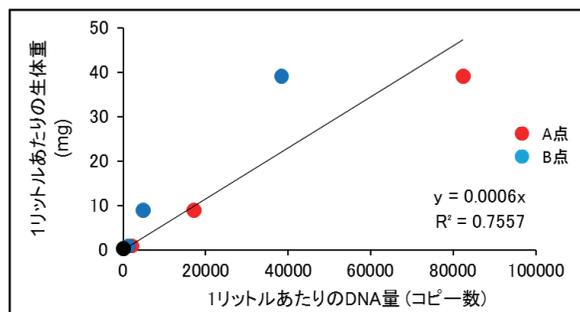


図 3 ビオトープ実験の相関図

(3) 噴水池での実験

より水量の多い場所で実験を行えば実際の池の条件に近くなると考え、校内の直径 10m、水深 40cm (31,400L) の噴水池で実験を行った。(写真 5) また、同時に環境 DNA の検出限界水量を算出できると考えた。

まず、噴水池の中央にカワバタモロコを移動制限する形でかごを設置した。次に、重量を測定したカワバタモロコ 1 匹をかごの中に入れ、1 週間後に噴水池の中央から 1m、3m、5m の 3 点、3 方向の計 9 か所から採水を行い、サンプルをガラスフィルターでろ過して冷凍保存した。その後は、10 匹、50 匹と個体数を増やし、同様の作業を行った。冷凍したフィルターは広島大学に送付して DNA 分析を行った。

採水する際は、長い棒の先に採水ボトルをつけた道具で、水をかきまぜないように注意しながら行った。(写真 5)



写真5 採水の様子

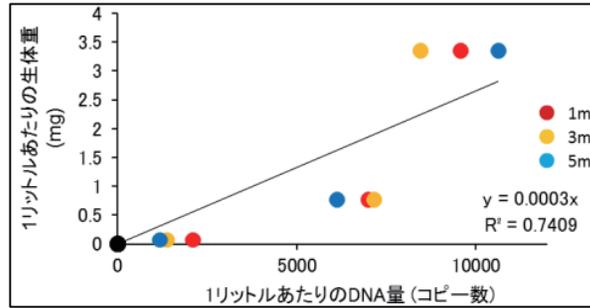


図4 噴水池実験の相関図

この噴水池での実験の結果、生体重は全重量を水量で割った数値とし、生体重と DNA 量の相関より回帰式 $y=0.0003x$ ($R^2=0.7409$) を得ることができた。(図4) この実験の結果では、噴水池の中心からの距離、1m、3m、5mごとに徐々にDNA量が減少すると考えていたが、DNA量の差はあまり見られなかった。このことから、10m程度の噴水池では環境DNAがまんべんなく拡散されたと考えられる。

次に、カワバタモロコの環境DNAの検出限界水量を求めた。1匹のカワバタモロコから検出されたDNA量は平均1,534コピーとなった。採水した1Lに由来する100 μ Lのサンプルのうち2 μ Lを使用したため、2 μ Lから1コピーを検出したとして、1Lあたり50コピーが検出限界として計算した。31,400(L) \times 1,534/50=963,352L/匹となり、25mプールに換算すると2.6杯もの水量から検出が可能だとわかった。

3. 水質の違いによるDNA検出量の変化

これまでの実験で、回帰式の値が大きく異なったことから、生息環境の違いでDNAの放出量や分解速度が違ふと考えたため、ため池の水と水道水を用いてDNAの分解速度の違いを検証する実験を行った。(写真6)

まず、ため池の水と水道水を用意し、丸型容器にため池の水を2つ、水道水を2つそれぞれ用意した。次に、重量を合わせたカワバタモロコ5匹をそれぞれの容器に入れ、1週間飼育した。1週間後にカワバタモロコを取り出し、その後は、6日間にわたって毎日採水とろ過を繰り返した。



写真6 ため池の水と水道水を用意

結果は、仮説通りDNAの分解速度に違いがみられ、水道水より池の水の方が早く分解されることが証明された。(図5) このことから、自然環境に近いビオトープの分解速度が早く、丸型容器と噴水池では分解速度が遅かったことが証明された。(表1) DNAの分解は微生物や生体外酵素などが要因の1つと考えられる。

また、検出できるDNA量は、ため池の水の方が水道水より3.86倍少ないことがわかった。(図6) ため池からのDNA量が少ないと、実際の生息数より少ない値が算出されるため、環境DNA手法による推定生息数が標識再捕法と比べて少なくなったと考えられる。

表1 水の状態とDNA量の推測

	実施日	水温	使用した水	分解速度	DNA放出量
丸型容器	5月	高	水道水	遅	多
ビオトープ	7月	高	池の水	速	多
噴水池	12月	低	井戸水	遅	少

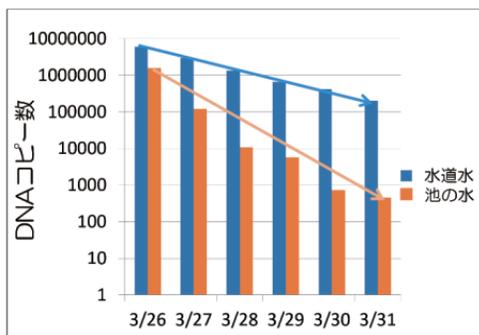


図5 DNAの分解速度の違い

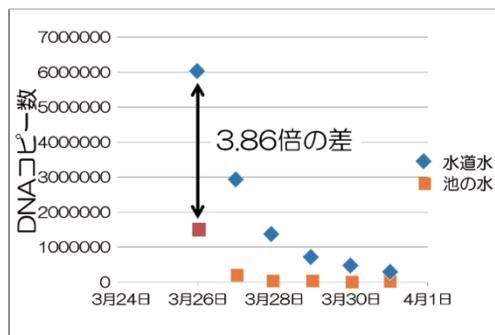


図6 DNA量の違い

4. 推定生息数の比較

これらの結果から DNA 分解は微生物や生体外酵素などの生物的作用によって変化することがわかったので、ため池の環境に近いビオトープの回帰式が一番信用できるデータであると考えた。

A 池(水量 1, 753, 200L)では毎年標識再捕法を行っており、2014 年から環境 DNA 手法を用いた生息数調査を行っている。2015 年は、B 池(水量 22, 500L)という、A 池よりはるかに小さいため池で同様の調査を行い、ビオトープの回帰式($y=0.0006x$)を DNA 検出量にあてはめて生息数を算出して、池の大きさによる推定生息数の違いについて比較した。

(1)A 池 (水量 1, 750, 000L) での推定生息数

まず採水箇所数を検討した。噴水池での実験より、1 匹あたりの検出限界水量(963, 352L)を求めることができたが、前述の分解実験でため池の水の方は DNA 検出量が少なくなることがわかった。水道水の方が 3.86 倍も多く検出できると仮定すると、実際の検出限界水量は(249, 573L)の可能性もある。そうすると A 池 (水量 1, 750, 000L) では最大 7 箇所、最少 2 箇所の採水となることから、今回は中間の値である 4 箇所での採水を実施することにした。

A 池 4 箇所での採水した水から検出した DNA 量を、ビオトープで得た回帰式 $y = 0.0006x$ にあてはめた。結果は 4 箇所の推定生息数の平均は 855 匹となった。標識再捕法による推定生息数が 2, 852 匹だったので、1, 997 匹の誤差となった。(表 2)採水ポイント③での DNA 量が多いのは、その付近に多くのカワバタモロコが集まっていたためだと考えられる。

カワバタモロコは群れで回遊する習性をもつので、群れから離れた場所で採水した場合は DNA 量が薄くなる可能性がある。このため、数か所の値を平均する方がよいのか、一番大きな値だけを抽出するのかを検討する必要がある。

(2)B 池 (水量 22, 500L) での推定生息数

B 池での採水箇所は水量的に 1 箇所でも十分なのだが、今回は平均をとる目的で 3 箇所の採水とした。

採水した水から検出した DNA 量を、A 池で行った方法と同じく、ビオトープの回帰式に当てはめてみた。結果は 3 箇所の推定生息数の平均が 824 匹となり、標識再捕法との誤差は 434 匹となった。(表 2)これらのことから池の大きさなどの違いから、大きい池より小さい池のほうが、正確に生息数を求められることがわかった。

今後は大きな池でも正確に生息数が求められるように調査方法を検討する必要がある。

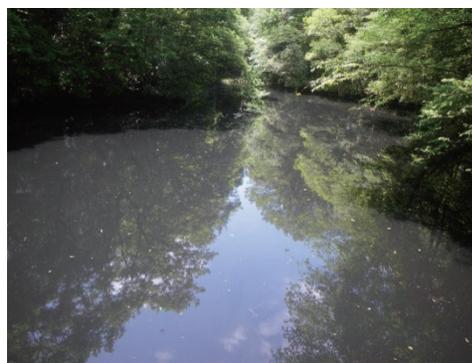


写真7 A池



写真8 B池

表2 推定生息数の比較(2015)

	採水場所	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)	推定生息数の平均	
ため池A	①	297	0.178	312,027	312	294	855	
	②	266	0.160	279,679	280	264		
	③	2,499	1.500	2,629,190	2,629	2,480		
	④	385	0.231	405,441	405	382		
	標識再捕法による推定生息数							2,852
	標識再捕法との誤差(2,852-855)							1,997
ため池B	①	36,830	22	497,199	497	469	824	
	②	66,920	40	903,426	903	852		
	③	90,330	54	1,219,458	1,219	1,150		
	標識再捕法による推定生息数							1,258
	標識再捕法との誤差(2,852-824)							434

5. まとめ

今回の実験で、水質の違いにより DNA の分解量が変化することが判明した。また、同じ池であっても採水場所によって検出できる DNA 濃度に差があることが判明した。今後は池の大きさによって算出する方法を変えることで、カワバタモロコの生息数調査に実用可能な技術に仕上げていきたいと考えている。環境 DNA による生息数調査は2年目なので、今後とも継続して調査を進めることで課題となっていることを解決できるようになると考える。今回調査した A 池、B 池以外のため池でも採水を行ってサンプルを集め、池の水量による算出方法を確立する必要がある。

また、検出限界水量については噴水池を用いて算出したが、自然環境に近い条件の方が正確な DNA 量を求められるので、カワバタモロコがない池を用いて実験を行うことで正確な検出限界水量が求められると考える。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、神戸大学大学院人間発達環境学研究科自然環境論コース源利文特命助教授、島根大学生物資源科学部生物資源学科高原輝彦助教授に指導、助言をいただいた。ここに感謝の意を表す。

7. 参考・引用文献

- 1) 神戸の淡水魚を守るために 調査・保全活動の手引き 神戸カワバタモロコ保全推進協議会
- 2) 大沼淳一・土山ふみ ため池観察ガイド
- 3) 安井幸男(2007)カワバタモロコの域内保全と絶滅要因について 兵庫・水辺ネットワーク 06-07年度交流会資料集 7-9
- 4) 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
- 5) 高原輝彦・源利文・土居秀幸(2014) 水を調べるだけで生き物がわかる! 環境 DNA を利用した生物分布モニタリング法. 日本陸水学会東海支部会編 身近な水の環境科学 実習・測定編. 朝倉書店, 東京都新宿区, pp. 159-161
- 6) 兵庫県立農業高等学校生物部(2015) 環境 DNA 手法によるカワバタモロコ生息調査に関する研究 第 39 回全国高等学校総合文化祭自然科学部門発表会
- 7) 兵庫県立農業高等学校生物部(2015) 環境 DNA 手法を用いた調査方法の確立 ～黄金に輝くカワバタモロコを探る～ 第 18 回日本水大賞・2016 日本ストックホルム青少年水大賞提出論文

北摂里山大学

重金昭雄（阪神北県民局 県民交流室 環境課）・中井義光（北摂里山博物館運営協議会）

はじめに

- ・学長：服部保（兵庫県立大学名誉教授）
- ・顧問：岩槻邦男（県立人と自然の博物館名誉館長）

北摂里山大学は、日本一の里山と言われる北摂一帯をフィールドに里山管理、生物多様性、環境学習、歴史・文化を学べる市民大学です。実習中心のプログラムを通じて、北摂里山の保全や地域活性化のための活動に取り組む人材の育成を目指し、平成 24 年度から開講しています。



カリキュラムの特徴

- ・北摂里山を楽しく学べるカリキュラム
里山管理だけでなく、生物多様性、環境学習、歴史・文化などを楽しく学びます。年間 11 回の開講予定。
- ・充実した講師陣
県立大学等の研究者や森林ボランティア、環境活動団体などを講師として迎えます。
- ・豊富なフィールド活動
フィールドで、間伐・下草刈、毎木調査などの実習を行います。現地の視察や学習ハイキングも実施。
- ・活動のネットワークづくり
森林ボランティア、環境活動団体との協同作業を通じた交流で、活動のネットワークを広げます。
- ・働きながら学べる日程
学生や社会人の方も参加しやすいよう、土日を中心に開講します。

開催概要

開催時期：5 月～翌年 2 月(全 11 回を予定)

定 員：25 名

受講料：18,000円(税込)

開催場所：北摂の里山、里山関連施設など

対象：里山に関心を持ち、フィールドでの実習に参加可能な18歳以上の健康な方で、森林ボランティアや環境活動団体のメンバーとして里山に関わる活動をされている方、若しくは、今後、活動をしようとする方

平成27年度に実施されたカリキュラム

第1回（講義形式）

- ・北摂里山博物館構想とは
- ・里山の基礎、歴史・文化

第2回（フィールド活動）

- ・伝統的里山を巡る(川西市黒川)



第3回（講義形式）

- ・北摂里山は日本人のこころ
- ・里山保全団体のマネジメント
- ・里山資源の新たな利活用

第4回（フィールド活動・講義）

- ・里山を活用したまちづくり
- ・下草刈り(川西市黒川)



第5回（公開講座&湿原見学）

- ・湿原連携ワークショップ in 北摂



第6回（フィールド活動）

- ・里山の現地調査、実習
- ・里山管理実習（兵庫方式）



第7回（公開講座）

- ・北摂 SATOYAMA 国際ワークショップ

北摂 SATOYAMA 国際ワークショップ
～里山を誰が守るのか？ 里山に求める働きとは何か？～

2019年に開催する北摂の里山には、今でも古来の里山専門が維持され、里山の文化や生態多様性の魅力を伝える努力が数多く見られます。一方、自然による自然の減少や、利用しなくなることによる自然の回復に課題があります。

そこで里山の文化や生態多様性をもちつながら、里山の持続的な保全を図る環境づくりについて意見交換、報告を行う場として、国際ワークショップを開催します。

国際ワークショップ	国際セミナー
日 時：11月27日（金） 10:00～17:00	日 時：11月28日（土） 13:00～17:00
場 所：国立五條自然の森公園	場 所：伊丹市立金堂・研修センター
趣 意：五條市立自然の森公園/五條市ワークショップ	趣 意：五條市立金堂、五條市の環境教育
定 員：200名 ※要申込（先着順）	定 員：100名 ※要申込（先着順）
※定員・無料	※定員・無料

現地見学ツアー（オプションツアー）
日 時：11月28日（土） 09:00～11:00
場 所：五條市立自然の森公園
趣 意：五條市立自然の森公園/五條市ワークショップ
定 員：50名 ※要申込（先着順）
※定員・無料

4日 五條市立自然の森公園/五條市立自然の森公園/五條市立自然の森公園/五條市立自然の森公園
4日 五條市立自然の森公園/五條市立自然の森公園/五條市立自然の森公園/五條市立自然の森公園

第9回（フィールド活動）

- ・里山での植樹活動
- ・原木しいたけのホダ木づくり（川西市黒川）



第10・11回（講義形式）

- ・グループワーク、発表
- ・修了式



第8回（フィールド活動・講義）

- ・昆陽池での里山林整備、野鳥観察
- ・北摂の鳥類、台場クヌギと昆虫



※講義の様子は、ブログでご覧いただけます。
<http://hitosato.blogspot.jp/>