

環境 DNA 分析を用いた淀川におけるイタセンパラ生息域の推定

○パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員
 パシフィックコンサルタンツ株式会社
 神戸大学発達科学部
 神戸大学大学院人間発達環境学研究科
 (地独)大阪府立環境農林水産総合研究所
 (地独)大阪府立環境農林水産総合研究所

上月佐葉子
 渡部 健
 稲波 璃香
 源 利文
 上原 一彦
 山本 義彦

1. はじめに

近年、環境中に浮遊・存在している生物由来のDNA（環境DNA：environmental DNA）を用いた魚類や両生類の調査手法の開発が進められている^{1,2)}。本稿では、昨年度、飼育下のイタセンパラ（*Acheilognathus longipinnis*）の環境DNA検出に成功したこと⁵⁾を踏まえ、野外における有効性を検証するため、従来の調査方法との比較を行い、生物調査への適用について考察を行うものである。

2. 環境DNAで生物種を検出する方法

環境DNAとは、生物から環境中に放出されたDNAの総称である。環境DNAによる生物種検出は、動植物に共通する縮退プライマーを作り「水」をはかることで生息する種類を調べる技術や¹⁾、特定の種の環境DNA量からその種のバイオマスを推定する技術である³⁾。

本研究では、淀川水系で採水したサンプルについて、イタセンパラDNAの増幅と検出を試みた。

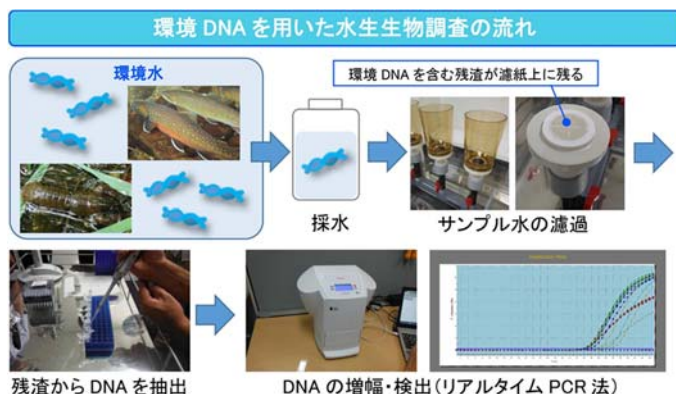


図1 環境DNAの主要分析手順と使用機器

3. イタセンパラとは

イタセンパラはコイ科タナゴ亜科に属し、天然記念物や国内希少野生動植物種（種の保存法）に指定さ

れている。大阪府内では近年個体数が激減しており、(地独)大阪府立環境農林水産総合研究所（水生生物センター）では、保護に取り組んでいる。



写真1 イタセンパラ

4. 方法

1) 現地調査

水生生物センターにより、環境DNA検出用の採水と従来の捕獲調査（地引網）が同時に行われた。

- 調査地点：淀川淡水域のワンド群および本流・止水域88 地点。
- 調査期間：2014 年7 月から9 月。
- 採水方法：2Lの角形瓶または500mL の未使用のサンプル瓶を用いて、表層より採水した。
- 捕獲調査：地引網（長さ30mm，袖網の深さ1mm，袋口の深さ3mm，袋網の長さ4mm，網目5mm）を用いて魚類の捕獲を行い、捕獲個体の種名と数を確認した。



写真2 現地調査イメージ（左：採水、右：地引網）

2) 分析

神戸大学にて以下の手順でサンプルを分析した。

- 試料水500mlをガラスフィルターGF/Fでろ過し、フィルター上の試料からDNeasy Blood & Tissue KitでDNA抽出した。

キーワード：環境DNA、PCR、イタセンパラ、水生生物調査、環境影響評価、淀川水系

発表者連絡先：大阪府大阪市北区堂島浜一丁目2番1号 TEL:06-4799-7321 FAX:06-4799-7385

- 昨年度開発したイタセンパラに特異的なプライマー・プローブセット（源ら未発表データ）を用いてStepOnePlus リアルタイムPCRシステムによりDNAを増幅し、イタセンパラDNAの存在判定を行った。
- 1検体あたりPCRを3回繰り返してイタセンパラのDNA検出を試みた。
- PCRのネガティブコントロールとしてサンプルDNAの代わりに蒸留水についてサンプルと同様にPCRを行った。

5. 結果

リアルタイム PCR によるイタセンパラ DNA の増幅曲線を図 2 に示す。88 サンプル中、ポジティブのサンプルは 4 サンプルだった。ワンド 1-1（黄色）で 3 反復中 3 回、ワンド 1-2（黄色）で 3 反復中 1 回、ワンド 2（青）で 3 反復中 1 回、本流 1（黄緑色）で 3 反復中 1 回の増幅を確認した。ワンド 1-1 と 1-2 は近接したワンドである。

PCR および採水時のネガティブコントロールの増幅はなかった。

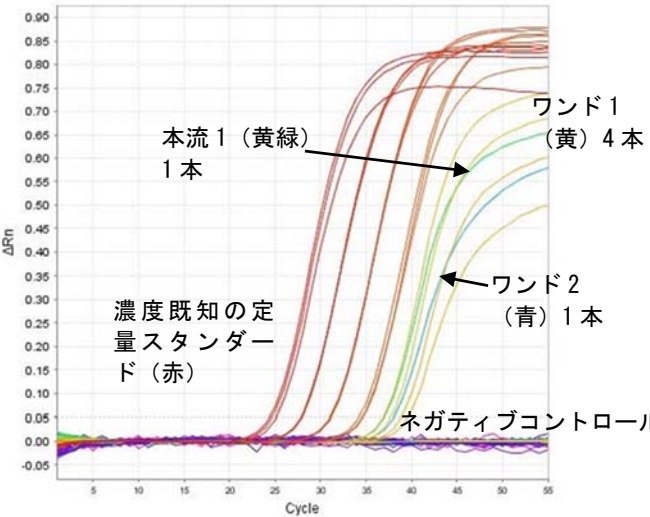


図2 イタセンパラDNAの検出結果

6. 考察

地引網による捕獲調査で同地点に個体の生息が確認されたのは4地点中、ワンド2の1地点のみであった。

表1 イタセンパラDNAの検出結果

地点名	ワンド 1-1	ワンド 1-2	ワンド2	本流1
PCR増幅数	3	1	1	1
捕獲有無	×	×	○	×

両調査結果が異なった要因として、生息はしているが体サイズが小さい、または捕獲の際に人が入水することで個体が端へ逃げてしまい捕獲漏れをしたことなどが考えられる。

7. 今後の課題と研究

1) 最適な採水条件

イタセンパラの野生生息地は、河川のワンドなど完全な閉鎖水域ではなく、水域の規模も大きく、その他の生物の影響も格段に大きい環境である。水中の環境DNA量は生物からの供給と分解のバランスで決まると考えられ、季節変化も大きいと考えられる。

季節を通じて野外で調査を実施し、最適な採水時期や方法の検討が必要と考えられる。

2) 流水環境への適用

今回の採水では、本流からもイタセンパラのDNAが検出された。流水環境では、上流部に生息するイタセンパラのDNAを採水した可能性がある。今後は流水環境でも環境DNAの検出で生息箇所の絞り込みが可能かを検証する研究も重要である。

以上を踏まえ、野外の生息地において、環境DNAによる効果的な水生生物調査方法を確立するため、今後とも継続した検証調査を進める予定である。

参考文献

1) Minamoto T., Yamanaka H., Takahara T., Honjo M. N., Kawabata Z. (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13(2), 193-197.
2) Fukumoto S., Ushimaru A., Minamoto T. (2015) A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: A case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology* 52 (2) 358-365.
3) Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H., Kawabata Z. (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLOS ONE*, 7 (4), e35868.
4) 川那部浩哉,水野信彦,細谷和海 (編・監修), (2001) 日本の淡水魚 (山溪カラー名鑑) 改訂版, 株式会社山と溪谷社,370.
5) 上月,渡部,源,上原,山本, (2015)環境影響評価における新しい調査手法の試み,土木学会第70回年次学術講演会VII-108.