

環境 DNA 分析を活用した希少両生類の生息地調査における底泥の影響について

大成建設株式会社 正会員 ○赤塚真依子 正会員 高山 百合子

正会員 内池 智広 正会員 望月 聖 正会員 松宮 綾香

1. はじめに

建設地周辺に希少な動植物が生息する場合に、建設前後や施工中に保全対象種の生息状況を把握することが重要である。保全対象に指定される種の一つとして、小型で活動範囲が限定的な両生類のサンショウウオ属が挙げられる。従来の生息状況調査は、幼体、成体の目視確認が困難であることから、繁殖期の卵塊調査に限られることが多い。そこで、従来調査では困難な繁殖期後の生息状況調査に環境 DNA の活用を検討した¹⁾。

環境 DNA 分析は、水域での採水が現地作業となる。採水試料をろ過し、ろ紙に回収したろ過残渣（排泄物や組織片）から DNA を抽出する。抽出した DNA は、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）で増幅させる。DNA 増幅の有無から、生息状況（生物種の在/不在）を判断する。水中に存在する環境 DNA は、微生物や紫外線等により数日で分解されることから、数日間の生物情報を反映していると考えられている。一方で、大きい細胞片は沈降し、底泥等に覆われた場合、長期間分解されずに残存する報告もある。また、底泥には DNA と構造が類似した有機物が存在し、DNA の抽出や PCR での増幅時に、環境 DNA と反応する試薬や抽出した DNA が底泥に吸着することで目的の DNA が増幅できない分析障害がある²⁾。サンショウウオ属は、水深が浅く流速が穏やかな湿地に生息していることから、底泥が採水試料に混入する可能性がある。本報告では、底泥の混入が環境 DNA 分析に及ぼす影響（分析障害、底泥由来の DNA 検出）を検討した。

2. 試験方法

採水から分析までの手順を図 1、採水地の状況を図 2 に示す。試験 1 では、繁殖期（2020 年 2 月）に、周辺に生息が期待される、卵塊の移設先（地点 A）と目視で卵塊を確認した地点（地点 B）から採水した。環境 DNA 分析では、水中に含まれる環境 DNA が希薄な場合に DNA が増幅しにくいこと、ろ紙に回収するろ過残渣が多い場合に分析障害の影響があることが報告されており、対象水域におけるろ過量の設定が重要となる¹⁾。ろ過量の検討として、1L、500mL、250mL における DNA の増幅傾向を確認した。

試験 2 では、卵塊を移設した地点 A において、幼生が生息する水中期（2020 年 8 月）、変態後の陸上期（2020 年 11 月）に採水した（ろ過量 250mL）。底泥が採水試料に混入する影響を確認するため、底泥の混入に留意した試料（条件 1：上澄み）と、故意に表層の底泥を巻き上げ、濁度が高い試料（底泥混合水）を採取した。底泥混合水をろ過前に攪拌し、30 分静置後、上澄みをろ過した試料（条件 2：底泥上澄み）と、ろ過前に攪拌後、全量をろ過した試料（条件 3：底泥混合水）を検討した。また、輸送時の DNA 分解抑制を目的に、採水試料には塩化ベンザルコニウム 10% 水溶液を 1L 当たり 1ml 添加した。8 月には、DNA の分解抑制効果を確認するため、分解抑制剤を添加しない試料も検討した。

環境 DNA 分析は、今回対象としたサンショウウオ属と種は異なるが、サンショウウオ属の DNA を増幅した分析方法（PCR 条件）を採用し³⁾、ろ過残渣から抽出した DNA について、PCR で増幅した。2 月に採取した試料の DNA 配列から調査対象としたサンショウウオ属の 1 種の配列であることを確認した¹⁾。8 月、11 月の試料は、PCR で増幅後、2 月の試料を基準とした電気泳動法で同じ配列位置に蛍光を確認した試料についてサンショウウオ属の DNA が増幅したと判断した。

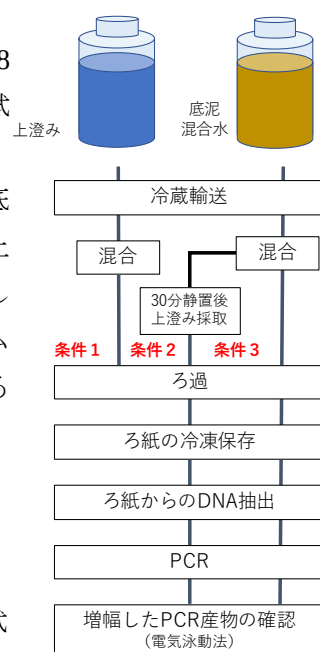


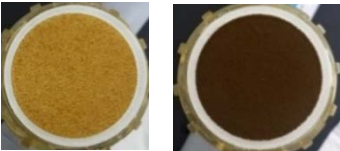
図 1 採水・分析手順

キーワード：環境 DNA 両生類 サンショウウオ 採水量 生物調査 分析障害

連絡先：〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設（株）技術センター TEL 045-814-7221



図2 採水地状況（地点A）



(a) 地点A (b) 地点B
図3 500mLろ過後（2月）

表1 環境DNA分析結果（2月）

生活史	卵塊：水中期	
地点	地点A	地点B
分解抑制剤	あり	
1L	○	×
500mL	○	△
250mL	○	○

【凡例】
○：DNA増幅あり
△：不明瞭な増幅あり
×：DNA増幅確認なし

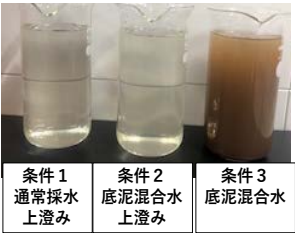


図4 試料写真（8月）

表2 環境DNA分析結果（8月，11月）

生活史	幼体：水中期（8月）					変態後：陸上期（11月）		
	条件1 上澄み	条件2 底泥 上澄み	条件3 底泥 混合水	条件1 上澄み	条件2 底泥 上澄み	条件1 上澄み	条件2 底泥 上澄み	条件3 底泥 混合水
分解抑制剤	あり			なし		あり		
濁度[NTU]	13.4	12.5	101	17.4	25.4	9.6	23.6	584
ろ過量：250mL	○	○	×	×	×	△	△	×

3. 試験結果

（1）ろ過量の検討 試験1の結果を表1に示す。底泥の混入に留意して採水したが、地点Aに比べ地点Bでは底泥が多くろ紙に回収された（図3）。地点Aでは、ろ過量250mL～1Lでいずれも明瞭なDNAの増幅を確認できた。地点Bでは、ろ過量1L、500mLでは明瞭なDNAの増幅を確認できず、250mLで明瞭なDNAの増幅を確認できた。この結果は、ろ紙上に環境DNAを採取できてはいたが、ろ紙上の底泥量が多くなることにより、環境DNAと反応するための試薬が底泥に吸着した等の分析阻害が起きたと考えられる。

（2）底泥混入によるDNA検出傾向の確認 試験2の結果を表2に示す。底泥混入の影響を確認するために実施した8月の条件1、条件2では、明瞭なDNAの増幅を確認でき、条件3ではDNAの増幅を確認できなかった（図4）。11月の条件1、条件2では、不明瞭ではあるがDNAの増幅を確認し、条件3では8月と同じくDNAの増幅を確認できなかった。底泥をろ紙上に多く採取した条件3でDNAの増幅が確認できなかったことから、底泥の混入量が多い場合にDNAの増幅が阻害される課題が明らかとなった。また、8月に分解抑制剤を添加しない試料では、DNAの増幅を確認できなかった。これは、輸送中に分解が進行したためと考えられ、条件1と比べ条件3でDNAの増幅に大きな差異はなかったことから、輸送中に底泥から新たに環境DNAが供給される影響は少ないと考えられる。分解抑制剤を添加した条件1の結果を比べると、水中期の8月はDNAの増幅を確認でき、陸上期の11月は、8月に比べ10分の1以下の増幅量と推定される不明瞭なDNAの増幅を確認した。生活史の変化によって水中に含まれる環境DNAが変化する可能性が得られた。

4. おわりに

サンショウウオ属の環境DNA分析を検討し、底泥が混入することにより分析阻害の影響がある課題が明らかとなった。採取時に底泥が混入した場合であっても、輸送後、ろ過時にろ紙上に回収する底泥を減らすことにより環境DNA分析によるDNAの増幅確認ができる可能性が確認された。また、繁殖期から幼生期の水中期に、環境DNA分析による生息状況調査の可能性が示された。分解抑制剤を添加しない場合は、採取翌日に環境DNAは概ね分解したことから、対象とした水域のサンショウウオ属の環境DNAは分解されやすく、直近の生息情報を得ている可能性が高い。サンショウウオ属の生活史や生息状況が変化した際に、環境DNA分析で変化を得ることができるか、今後も継続的な調査を続ける予定である。

参考文献

1) 赤塚真依子 他：建設現場への環境DNAを活用した生物モニタリング技術の適用について，土木建設技術発表会 2020 講演概要集，IV，7，pp1-8，2021.
2) 高原輝彦 他：環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～，日本生態学会誌，Vol.66，pp.583-599，2016.
3) 坂井雄祐 他：“Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (*Hynobius vandenburghi*) by GIS and eDNA analysis”，*Environmental DNA*，Vol.1，3，pp281-289，2019.