

環境 DNA 調査における両生類の DNA 分解特性

大成建設株式会社 正会員 ○赤塚真依子 正会員 大井涼太郎
正会員 渡邊千佳子 正会員 内池 智広

1. はじめに

中山間地における開発の建設工事では、希少な動植物が生育している地域が多く、希少種の移設や代替生息地の整備など保全対策が重要となる。水域の生物情報を得る新しい技術として、採水試料から生物情報を入手できる手法として注目されている環境 DNA 分析では、魚類だけでなく、様々な生物種の調査に適用が検討されている。著者らは、ビオトープを整備した保全地域において、両生類であるサンショウウオ類の生息状況（季節変化）と環境 DNA の関係を確認し、環境保全対策における対象生物種の生息状況を環境 DNA によって評価する可能性を示した¹⁾。

自然環境に放出される環境 DNA の分解特性を把握することで、対象とする生物種を精度良く検出するためのサンプリング計画を行うことが可能である。本報では、水域における両生類の環境 DNA 量の変化やその分解特性の把握を目的に、水槽実験を実施した。捕獲したヤマアカガエルの幼生と成体（写真1）を水槽内で飼育し、飼育中および飼育後の経時的な環境 DNA 量の変化から分解傾向を把握することを目指した。

2. 水槽実験

水槽実験の手順を図1に示す。本実験では、アカガエル属の一種であるヤマアカガエルの生息が確認されている保全地域内（久保川流域のため池群

（知勝院敷地内：岩手県一関市）で専門調査員が捕獲した個体を用いた。水槽に 15L の蒸留水を用意し、水槽内に投入する生体数は、幼生については 5 匹と 25 匹、成体については 2 匹と 10 匹の各 2 条件とした。生体を水槽に投入後、10 分、30 分、2 時間、4 時間、24 時間後に水槽内を撹拌し、水槽内から試料水（3L）を採取した。採水後、新しい蒸留水（3L）を水槽内に添加し、水槽内の総量は 15L を維持した。24 時間経過後に生体を取り出し、試料水のみ室温で保管した 24 時間、48 時間後に、試料水（3L）を採取した。また、環境 DNA 量の分解傾向を把握するため、生体を投入してから 24 時間後の試料に蒸留水を等量混合させた試料、現地のため池環境水を等量混合させた試料を作成し、生体を取り出して 24 時間後に試料水を採取した。採取した試料水は、速やかにガラス繊維ろ紙 GF/F（0.7μm）でろ過し、ろ紙を冷凍保存した。



写真1 ヤマアカガエルと水槽実験の状況

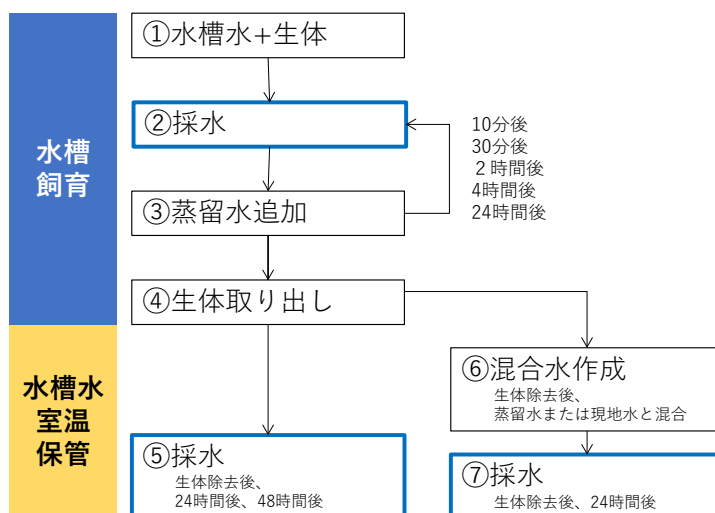


図1 試験手順

キーワード 環境 DNA、両生類、生物調査、環境影響、分解特性

連絡先 〒245-0051 横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設（株）技術センター TEL 045-814-4355

3. qPCR 分析による環境 DNA 量の定量

環境 DNA は、環境 DNA 学会法²⁾に準拠し、ろ紙に回収したろ過残渣（排泄物や組織片）から DNA を抽出した。qPCR 分析は、両生類のプライマー領域（Amph16S³⁾）を対象領域とし、SYBR 法で増幅させた。ヤマアカガエルの人工遺伝子増幅効率を確認し、DNA 量を定量した。

4. 試験結果

幼生および成体を飼育した水槽水の環境 DNA 量変化の結果を図 2、図 3 に示す。幼生、成体それぞれ、投入数が異なるの 2 条件を実施したが、全ての条件で、生体を投入した 10 分後から、環境 DNA を確認できた。時間経過とともに環境 DNA 量は増加し、閉鎖的な水槽内であったことから、24 時間経過後の環境 DNA 量は 1×10^7 copies/L 前後の非常に高い値となった。また、各生体の個体差や排泄物が排出のタイミングは異なると考えられるが、幼生、成体ともに、生体数が多い条件のほうが、少ない条件に比べて高い値になる傾向となった。

水槽飼育水から生体を取り出し後、室温保管した試料では、環境 DNA 量が徐々に低下はしたが、24 時間、48 時間後の試料からも環境 DNA を確認できた（図 2、図 3）。飼育 24 時間後に生体を取り出した直後の環境 DNA 量からその後の残存率を算出した結果を図 4 に示す。蒸留水を混合した条件では、80%以上の環境 DNA が残存したが、現地水を混合させた条件では、10%以下に低下した。実環境で採取した試料は、採水試料の保管条件や運搬条件によって速やかに分解されるという報告³⁾にもあるように、水試料中の環境 DNA が微生物等により、分解されたものと考えられる。

5. おわりに

環境中での両生類の環境 DNA 量の変化やその分解特性の把握を目的に、ヤマアカガエルを水槽で 1 日間飼育し、その後、生体を取り出して環境 DNA 量の時間変化を確認した。生体を投入した 10 分後でも環境 DNA を確認できたことから、生体が水域に短時間接触するだけでも環境 DNA を検出するための生物断片や排泄物が生体から放出されている可能性を確認することができた。また、蒸留水のみを用いて生体を飼育した飼育水中の環境 DNA は数日経過後も検出できたが、現地水と混合した条件では環境 DNA が短時間で検出されにくくなる傾向となった。以上のことから、環境 DNA は実環境では微生物等の影響等により速やかに分解されており、このような分解状況を考慮した採水方法や採水計画を立案することが重要であると考えられる。

参考文献

- 1) 赤塚真依子他：建設工事現場における環境 DNA を活用した希少両生類の年間調査，土木学会全国大会第 77 回年次学術講演会，VII, 19, pp.1-2, 2022.
- 2) Minamoto, T.他：An illustrated manual for environmental DNA research: water sampling guidelines and experimental protocols, Environmental DNA, Vol.3, 8-13, 2021.
- 3) Sakata, M.他：Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia, Metabarcoding and Metagenomics, Vol.6, 15-26, 2022.

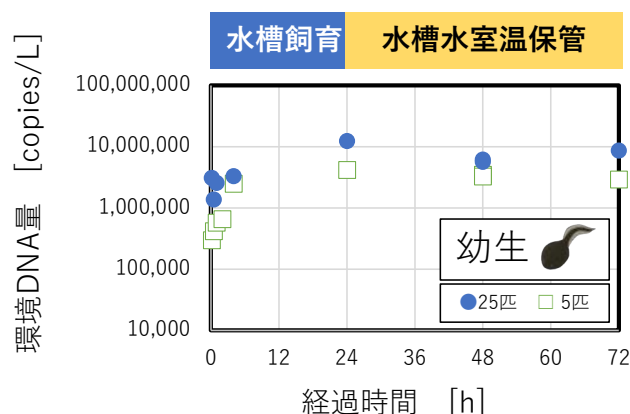


図 2 環境 DNA 分析結果（幼生）

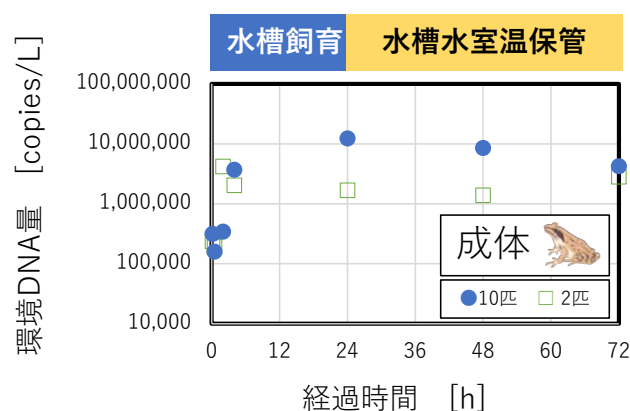


図 3 環境 DNA 分析結果（成体）

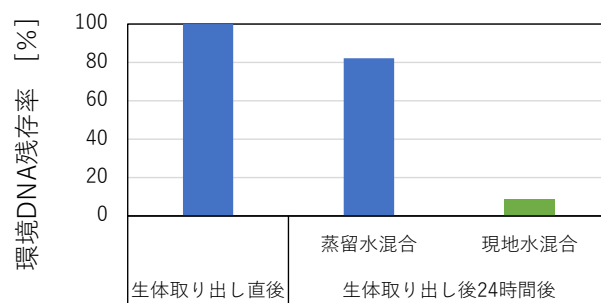


図 4 環境 DNA 分解傾向