

環境 DNA 分析を用いた簡便なカブトガニ産卵モニタリング手法の検討

熊本大学 学生会員 ○川原優紀, 正会員 皆川朋子, 非会員 小山彰彦
九州大学 非会員 栗田喜久

1. はじめに

カブトガニは環境省のレッドリストにおいて絶滅危惧 IA 類に指定されている希少種である。本種は海岸線沿いの砂浜の満潮線付近で産卵するが、このような産卵場は沿岸開発による消失が著しい。そのため、本種の繁殖地となる砂浜において産卵モニタリングが求められている。

従来の産卵モニタリング¹⁾では、産卵のため来浜した成体の雌雄（産卵ペア）、あるいは産卵行動の際に砂底から放出される泡（産卵泡）の観察によって産卵状況が評価される（図-1）。しかしながら、本種の産卵は、6～8月の大潮から中潮の数日間において、最満潮時前後で行われるため、従来のモニタリング手法は時間的なコストが大きく、継続が難しい。さらに、産卵泡以外にも水面中に無数の泡が表在するため（図-1）、産卵泡か否かを判断するには専門的な観察眼が求められる。その他、一部の地域では、砂浜を掘り返し、確認された受精卵の数から産卵状況の評価が試みられているが、この方法では産卵場を踏襲することに加え、掘り返すことで卵の孵化率が低下するリスクがある。つまり、長期的なモニタリングを実現するためには、非専門家でも実施可能であり、かつ従来よりも簡便で非侵襲的な産卵モニタリング調査の確立が必須である。

カブトガニの成体は、砂浜の満潮線付近で放卵・放精することから、産卵時には大量の DNA 含有物（あるいは、DNA 断片）が水中に放出されると考えられる。そこで、本研究では、生物の分布、および生物量を評価可能な環境 DNA 分析に着目した。

本研究では、簡便で非侵襲的なカブトガニの産卵モニタリング手法の1つとして環境DNA分析の有効性を検討することを目的とした。産卵場である砂浜の周辺の干潟には、本種の幼体が生息しているため、幼体由来の微量の DNA を検出する可能性もある。そのため、本研究では、DNA の検出・非検出に加えて、採水試料中の DNA を量的に評価することで、現場で確認された産卵ペアの有無との関係を解析した。

2. 方法

2.1 現地調査

調査地は、国内で対象種の個体群が最も大きいと考え

られている福岡県北九州市曽根干潟とした。調査はカブトガニの産卵期を含めた 2019 年 5～10 月の大潮最満潮時刻前後の 1 時間に、過去に産卵が確認された 6 地点²⁾（図-1）で実施した。産卵ペア数の把握調査は採水地点周辺約 15 m の範囲を 5 分程度目視によって成体ペア、あるいは産卵泡の探索を行い、産卵ペア数を記録した。また、産卵ペアが確認されなかった地点では産卵泡と断定できない泡も多数存在したため（図-2）、泡の有無も記録した。目視観察の後、各地点で表層水を 1 L 採取した。採水した試料には DNA の分解を阻害するため塩化ベンザルコニウム溶液を 1 mL を添加し、冷暗状態で保管した。



図 - 1 産卵泡（左）と水面に表在する無数の泡（右）

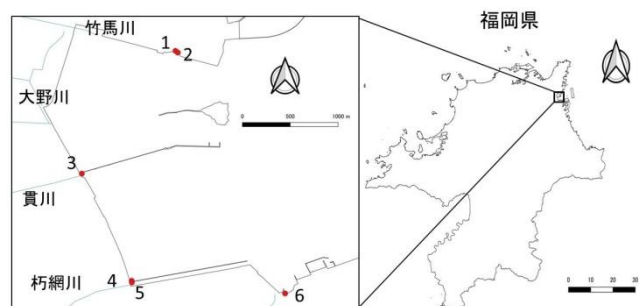


図 - 2 産卵ペアの把握調査および採水地点

2.2 環境 DNA 分析

採水した試料は採水日の翌日、GF/F ガラスフィルターでろ過し、アルミホイルに包んで、-20 °C で凍結保存した。後日、フィルターから DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し、100 μ L の溶液に調整した。

リアルタイム PCR を用いて定量 PCR を実施した。この際、対象種のミトコンドリア DNA の COI 領域 161 bp をターゲットとして、本種に特異的に反応するプライマーおよび蛍光プローブを設計した。スタンダードとして 3×10^6 , 3×10^5 , 3×10^4 , 3×10^3 , 3×10^2 , 3×10^1 copies の人工遺伝

子試料を抽出した DNA 試料と合わせて分析した。人工遺伝子試料の分析結果に基づき検量線を作成することで、それぞれの採水試料 1 L 中の DNA コピー数（以下、DNA コピー数 copies/L）を算出した。本研究における定量限界は、 3×10^1 copies の人工遺伝子試料 1 L 中のコピー数である 1,500 copies/L とした。採水試料を 4 反復で分析し、全ての反応で DNA の増幅が認められなかった場合、非検出とした。また、4 反復のうち、DNA の増幅が確認された DNA コピー数の平均値を解析に使用した。

2.3 統計解析

産卵の有無を判定する DNA コピー数の基準値を設定するため、目的変数を産卵ペア確認地点は 1、未確認地点は 0 とした 2 値データ、説明変数をその地点の DNA コピー数として ROC 分析を行った。この際、未確認地点の DNA コピー数は、定量 PCR で DNA を検出し、かつ定量限界である 1,500 copies/L を上回ったものを使用した。

3. 結果及び考察

目視調査の結果、6 月 17 日と 8 月 1 日の計 5 地点で産卵ペアが確認された（表-1）。環境 DNA 分析の結果、本種の DNA は、産卵ペアが確認されたすべての地点で検出された一方で、産卵ペアを確認できなかった 31 地点のうち 11 地点で DNA が検出された。なお、この 11 地点のうち、5 地点が定量限界を下回った。この結果から、DNA の検出・非検出では、産卵の有無を過大評価する可能性が示唆された。

次に、産卵ペアの確認地点と未確認地点において、DNA コピー数を比較した結果（図-3）、前者の中央値は 91,875 copies/L、後者の中央値は 3,583 copies/L と約 26 倍の差が示され、産卵ペア確認地点が有意に大きかった（マン=ホイットニーの U 検定、 $P < 0.05$ ）。さらに、ROC 分析の結果、判別精度を評価する AUC は 0.900 と非常に高い値を示した。つまり、筆者らの仮説通り、本種の産卵時には精子や体液などの DNA 含有物が多量に水中へ放出されるため、環境水中の DNA コピー数から産卵の有無を容易に判別可能であると示唆された。ROC 分析によって算出されたカットオフ値は 10,185 copies/L であった。産卵ペア未確認地点のうち、7 月 16 日の地点 4 と 8 月 1 日の地点 6 の 2 地点はカットオフ値を上回る DNA コピー数が検出された。これらの地点ではいずれも泡が確認されなかったが（表-1）、付近で産卵が行われていた可能性がある。一方、未確認地点のうち泡が確認された 10 地点は、DNA 非検出、あるいはカットオフ値未満の DNA コピー

数であった。つまり、水面中に表在する泡から産卵状況を判断する従来の手法よりも、環境 DNA の定量評価は、泡の有無に依存せず産卵を客観的に評価できる可能性が示唆された。

環境 DNA 分析を用いた産卵モニタリングは、対象種の新専門家でも実施可能である点、作業時間を短縮できる点、および希少種の重要な環境を踏襲する危険性を回避できる点から、従来の手法を大幅に改善できると考える。

4. まとめ

本研究では国内有数のカブトガニ産卵場である曽根干潟において環境 DNA 分析を行った。その結果、産卵ペア確認地点のみならず、未確認地点でも対象種の DNA が検出された。一方、ROC 分析によって産卵の有無の判断可能な DNA コピー数の基準値を設定できた。地域によってこの基準値は前後する可能性があるものの、産卵ペア確認地点の DNA コピー数は産卵ペア未確認地点に比べて約 26 倍の量を示したことから、環境水中の DNA コピー数を定量評価することで、従来よりも低コストかつ非侵襲的に産卵状況を把握できる可能性が示唆された。

表-1 目視による産卵ペア確認数と DNA 検出の有無

地点	5月20日	6月17日	7月16日	8月1日	8月31日	10月14日
1	0	0(泡あり)	0(泡あり)	0	0*	0(泡あり)
2	0	0(泡あり)*	0(泡あり)*	1*	0	0(泡あり)
3	0	0(泡あり)	0*	1*	0(泡あり)*	0
4	0	1*	0*	2*	0*	0(泡あり)*
5	0	0	0	1*	0*	0(泡あり)*
6	0	0	0	0*	0	0

*: カブトガニの DNA 検出

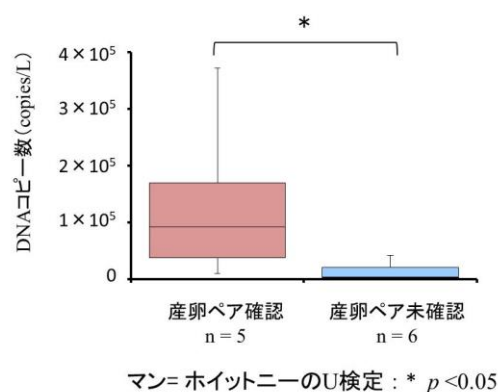


図-3 DNA コピー数と産卵の有無の関係

参考文献

- 1) 和田年史, 板谷晋嗣, 秀野真理: 福岡県津屋崎干潟におけるカブトガニ産卵場所および来浜ペア数の年変動, 保全生態学研究 15, 163-171, 2010
- 2) 林修: 1995 年～2013 年曽根干潟カブトガニ産卵調査の記録, pp1-2. 2015