

希少種ミナミアカヒレタビラの環境 DNA による検出方法の検討と 生息分布推定

【水環境室】

盛山哲郎、羽田智栄*1、安田優*2、成岡朋弘*3

1 はじめに

鳥取県希少野生動植物の保護に関する条例(以下「条例」という)で、特に保護を図る必要がある特定希少野生動植物に指定されている生物種にミナミアカヒレタビラ(環境省:絶滅危惧 IA 類(CR)、鳥取県:絶滅危惧 I 類(CR+EN))がある。本種はコイ科に分類されている淡水魚である。最新のレッドデータブックとっとりでは、鳥取県内の本種の分布域は県西部のみであり⁽¹⁾、県内において本種の生息状況は危機的である。その要因としては、用水路等のコンクリート化や河川改修により本種及び産卵床の二枚貝類の生息環境の悪化などが挙げられる⁽²⁾。現在、県内のNPO法人により本種の保全活動が行われており、その活動の一環として生息状況調査が行われている。この調査は捕獲調査による手法がとられてきたが、捕獲調査には短所があり、相当な時間と労力がかかることと、捕獲後の種同定の際に本種に関する専門的な知識が必要であることである。そこで、本種の生息状況調査に関して、従来の調査法である捕獲調査を補完する手法として環境DNA分析に着目した。環境DNA分析は近年注目されている新たな生物分布調査手法である⁽³⁾。環境DNAとは、水などの環境中に存在する生物由来のDNAのことである⁽³⁾。この環境DNAを水環境中から採取・分析することで、その水環境中にどのような生物種が存在するかを推定することができる⁽⁴⁾。環境DNA分析は、調査地での作業が採水だけと簡便であることから、調査の効率化が可能となり⁽³⁾、従来の調査法(捕獲調査)の短所の改善が期待される。

そこで、本研究では、ミナミアカヒレタビラの保全に資するため、本種の環境DNAの検出方法を検討し、調査対象水系において環境DNAにより本種の生息分布を推定することを目的とした。

2 方法

2.1 ミナミアカヒレタビラの環境DNAの検出方法の確立

2.1.1 プライマー及びプローブの作製

ミナミアカヒレタビラのDNAのみ特異的に検出し、本

種の近縁種のDNAを誤って検出しない検出方法を確立する必要がある。そこで県内での本種の生息河川を調査対象とし、この河川に生息することが知られているコイ科のヤリタナゴ、タイリクバラタナゴ、オイカワ、ギンブナ、タモロコ、モツゴの6種を本種の近縁種(コイ科)として選定した。本種と6種の近縁種の計7種の魚のミトコンドリアのチトクロームb(CyB)遺伝子の情報をDNAデータベース⁽⁵⁾から入手し、7種の魚の遺伝子情報を比較して、専用ツール(ThermoFisher Scientific社製:PrimerExpress3.0)を用いて本種に特異的な「プライマー及びプローブ」(以下「検出系」という)を作製した(表1)。

2.1.2 ミナミアカヒレタビラでの検出系の確認実験

本検出系の有効性を確認するためには、現地に生息しているミナミアカヒレタビラの組織サンプルを入手する必要があるため、本種の生息河川において本種を1尾捕獲した(図1)。なお、捕獲調査は条例上の手続きを行って実施した。捕獲した本種の体表を滅菌綿棒でぬぐうことによって粘液を採取した。この綿棒からDNA抽出キット(キアゲン社製:DNAeasy Blood & Tissue Kit)を用いてDNAを抽出した⁽⁶⁾。その抽出したDNAサンプルについて、作成した本検出系により、モバイルリアルタイムPCR装置(日本板硝子社製:PicoGenePCR1100)を用いてPCRを行った。その後、DNAシーケンスを行った。

2.1.3 近縁種での検出系の確認実験

2.1.1で選定した近縁種6種を対象河川において捕獲した。その後、当所において、捕獲した近縁種6種をイオン交換水を入れた別々の水槽(1個当たりの水量は約13L~56L程度)に入れて、約20日間飼育した。各水槽の水をそれぞれ1Lずつ採水し⁽⁶⁾、ガラス繊維ろ紙(GF/F)を用いて1L全量ろ過した⁽⁶⁾。ろ過後のろ紙をマイクロチューブに入れた後は、2.1.2と同様の条件でDNA抽出⁽⁶⁾、PCRを行った。

2.2 ミナミアカヒレタビラの環境DNA調査

対象河川において、2.1で検討した環境DNAの検出方法(採水、ろ過、DNA抽出、PCR)を用いて、ミナミアカヒレタビラの環境DNA調査を令和2年度に行った。環境DNA調査は表2に示すとおり、A川の5地点(A1, A2, A3,

*1 現 鳥取県食肉衛生検査所

*2 現 鳥取県生活環境部水環境保全課

*3 現 鳥取県生活環境部循環型社会推進課

A4, A5)、B川の4地点(B1, B2, B3, B4)、C川の3地点(C1, C2, C3)で四半期毎(7月、9月、12月、2月)に実施した。なお、採水は各1地点当たり表層水を1L採水し、採水した水試料を当所に持ち帰って、ろ過、DNA抽出、PCRを行った。

2.3 ミナミアカヒレタビラの捕獲調査

環境DNAの検出方法の有効性を確認する場合、一般的に、環境DNAによる検出確認と捕獲調査による個体確認の両方による確認がよく取られている。⁽⁴⁾⁽⁷⁾そこで、2.1で検討した環境DNAの検出方法(採水、ろ過、DNA抽出、PCR)の有効性を確認するため、表2のとおり、条例上の手続きを行って本種の捕獲調査を令和2年11月25日に行った。

上記の日に捕獲調査を行なった理由は、ミナミアカヒレタビラの保護の観点から繁殖期(4月から7月頃)を避けるためと、冬場は一般的に魚類の活性が低下するためである。

表2に示すとおりB2、B3、C1の3地点で捕獲調査を行った理由は、当該3地点は本種の生息が既知であり、7月、9月の環境DNA調査で当該3地点から本種の環境DNAが検出されたからである(表2)。

捕獲調査はセルビンを用いて実施した。餌付きのセルビン(サイズ約15cm(直径)×26cm)を1地点につき1箇所設置後、5時間程度放置してから、捕獲魚を同定及び計数した。なお、捕獲魚は計数後、速やかに放流した。

3 結果及び考察

3.1 ミナミアカヒレタビラの環境DNAの検出方法の確立

3.1.1 ミナミアカヒレタビラでの検出系の確認実験

今回、作製した検出系を用いてミナミアカヒレタビラの組織より抽出されたDNAサンプルからDNAの増幅が確認された。その増幅されたDNAをシーケンスした結果、DNAデータベース⁽⁶⁾に登録されている鳥取県産の本種の遺伝子配列と完全に一致していた(図2)。よって、本検出系によりミナミアカヒレタビラのDNAを検出できることが確認された。

3.1.2 近縁種での検出系の確認実験

近縁種6種を入れた水槽の水試料に由来する環境DNAサンプルと本検出系は反応せず、近縁種6種のDNAの増幅はいずれも確認されなかった。以上の結果と3.1.1の結果を照らし合わせると、本種と近縁種において、作製した本検出系がミナミアカヒレタビラに特異的であることが確認され、本検出系の有効性が示唆された。

3.2 ミナミアカヒレタビラの環境DNA調査

対象河川でのミナミアカヒレタビラの環境DNAの検出

結果及び検出割合は表2のとおりであった。B川は他の対象河川と比較して本種の環境DNAの検出割合が最も高く、A川が当該検出割合が最も低かった。特に、B川ではB1、B2、B3で、またC川ではC1、C2で概ね通年、本種の環境DNAが検出されたことから、これらの調査地点周辺又はその上流域で本種が安定的に生息していることが示唆された。

調査対象区間において、本種の環境DNAの検出頻度が高い区域(B1周辺からB3周辺までの区域と、C1周辺からC2周辺までの区域)を概ね特定することができ、本種の生息分布を概ね推定することができた。

3.3 ミナミアカヒレタビラの捕獲調査

B2、B3、C1の3地点全てにおいてミナミアカヒレタビラを捕獲することができなかった。当該3地点では、前述のとおり本種の環境DNAが概ね通年検出されたことから、本種を捕獲できなかった要因としては、本種が県内でも希少であり、生息密度が非常に小さいためであると推察される。

今回、過去において本種の生息が未知の場所8地点でも環境DNA調査を行った結果、本種の環境DNAを4地点で検出することができた(表2)。今回、これらの場所では本種の個体を確認していないが、新規の生息地である可能性が考えられ、環境DNAを用いる方法が本種の生息地を発見する手段として有効であることが示唆された。

4 まとめ

ミナミアカヒレタビラの環境DNAの検出方法を検討した。この方法を用いて本種の環境DNA調査を行った結果、調査対象区間において、本種の環境DNAの検出頻度が高い区域を概ね特定することができ、本種の生息分布を推定することができた。

本研究の成果は、ミナミアカヒレタビラの保全の第一歩につながるものと考えられ、以下に述べるような本種の保全活動に役立つものと期待される。

- (1) ミナミアカヒレタビラのような希少種では、生息域が小さく、個体数が少ないため、捕獲自体が困難であるが、環境DNA分析を用いれば、そのような希少種の存否を推定することができる。また環境DNA分析は、希少種の個体群や生息地を攪乱することのない非侵襲的な調査法である⁽⁸⁾という利点がある。以上のことから、環境DNA分析は捕獲調査を補完する方法として本種の生息状況調査に利用できる可能性が示唆された。
- (2) ミナミアカヒレタビラは、河川では流れが緩やか、ほとんどない場所に生息している⁽⁹⁾。本種の生息河川

では、本種の保全のために水が流れにくい区域であるワンドを人工的に整備して、本種が生息しやすい環境が整えられている場所がある⁽¹⁰⁾。また、本種の生息河川において河川改修が行われると、本種の生息環境が失われる可能性がある。以上のことから、本種の環境DNA 検出地点マップは、ワンドの整備場所を選定する際や、本種の生息地に配慮して河川改修を行う際の参考材料になることが期待される。

(3) モバイルリアルタイムPCR 装置は現場でPCR を行うことができる。本装置と簡易DNA 抽出法を用いると、採水・ろ過・DNA 抽出・PCR 操作を含めて、約30分と短時間で環境DNA 分析が現場で行えるので、調査の効率化に役立つものと考えられる。

5 参考文献

- (1) 鳥取県: レッドデータブックとっとり第3版 2022 - 鳥取県の絶滅のおそれのある野生動植物-, 2023.
 (2) 鳥取県: 鳥取県アカヒレタビラ保護管理事業計画, (2004).
 (3) 環境省自然環境局生物多様性センター: 環境DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き (第1版), (2020).

(4) 丹羽英之, 坂田雅之, 源利文, 清野未恵子: 河川における流量 500m 間隔での環境DNA 分析と現地採集調査による魚類検出結果の比較, 保全生態学研究, 23, 257-264(2018).

(5) NCBI (National Center for Biotechnology Information): Genbank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 令和3年1月13日確認

(6) 一般社団法人環境DNA 学会: 環境DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2. 2, (2020).

(7) 福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 丑丸敦史, 源利文: 在来希少種カワバタモロコの環境DNA による検出系の確立, 日本生態学会誌, 66, 613-620(2016)

(8) 内井喜美子: 環境DNA による外来種および希少種の迅速な検出, 環境技術, 46(12), 630-635(2017)

(9) 北村淳一, 内山りゅう: 日本のタナゴ 生態・保全・文化と図鑑, 株式会社山と溪谷社, p. 110-117(2020)

(10) 国土交通省日野川河川事務所: 第3回日野川水系大規模氾濫時の減災対策協議会資料(日野川防災環境教育資料), (2017), <https://www.cgr.milt.go.jp/hinogawa/gensai/pdf/03siryou-ikkatu3.pdf>, 令和6年8月16日確認

表1 設計したミナミアカヒレタビラのプライマー・プローブ

(増幅領域長 135bp)	
フォワードプライマー	5' -CCAATGGCGCATCTTCTT-3'
リバースプライマー	5' -CGAAGGCAGTTATCATTACGAGAAG-3'
TaqMan プローブ	5' -ATACACATCGCCCGGACTCTATTATGG-3'



図1 現地で捕獲したミナミアカヒレタビラ

CCAATGGCGCATCATTCTTCTTTATTTGATTTATATACACATCGCCCGGACTCTATTATGGATCA
TACCTCTACAAAGAACCTGAAACATCGGTGTAATTCTTCTTCTCTCGTAATGATAACTGCCTTCG

図2 ミナミアカヒレタビラの細胞組織より増幅された DNA の遺伝子配列
(増幅領域長 135bp)

表2 対象河川でのミナミアカヒレタビラの環境 DNA の検出結果及び捕獲調査結果

対象河川	調査対象区間の距離 ^{※1}	調査地点 ^{※2}	ミナミアカヒレタビラの過去の生息状況 ^{※3}	ミナミアカヒレタビラの環境 DNA の検出結果 ^{※4}				ミナミアカヒレタビラの環境 DNA の検出割合(%) ^{※7}				捕獲調査結果 ^{※8}
				R2. 7.3	9.24 ^{※5}	12.9 ^{※6}	R3. 2.25	R2. 7.3	9.24 ^{※5}	12.9 ^{※6}	R3. 2.25	
A川	5.6km	A1	未知	—	—	○	×	0	0	40	20	—
		A2	既知	×	×	○	×					—
		A3	未知	×	×	×	×					—
		A4	未知	×	×	×	×					—
		A5	未知	×	×	×	○					—
B川	2.4km	B1	未知	○	×	○	○	75	50	75	50	—
		B2	既知	○	○	○	○					×
		B3	既知	○	○	○	×					×
		B4	未知	×	×	×	×					—
C川	1.2km	C1	既知	○	○	○	○	67	67	33	33	×
		C2	未知	○	○	×	×					—
		C3	未知	×	×	×	×					—

※1 最も上流の調査地点から最も下流の調査地点までの距離。

※2 調査地点名の番号は、調査地点の位置が下流側になるほど大きくなるように付番した。

※3 本種の生息が既知の情報については、聞き取りによるものである。

※4 「○」は環境 DNA が検出された地点、「×」は環境 DNA が検出されなかった地点、「—」は環境 DNA 調査が未実施の地点を表す。

※5 C3 のみ令和2年9月29日に実施。

※6 C1、C2、C3 の3地点は12月8日に実施。

※7 各河川の調査地点数に対して、本種の環境 DNA が検出された地点数の割合 (%) を表す。

※8 「×」は本種が捕獲できなかった地点、「—」は捕獲調査が未実施の地点を表す。