

水から抽出した DNA を用いて魚類の生息状況を評価する方法の試み Preliminary experiment for evaluating inhabiting situation of fish using environmental DNA extracted from water

○小出水規行・高原輝彦*・源 利文**・土居秀幸***・森 淳・渡部恵司・竹村武士
Koizumi, N., Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H., Mori, A., Watabe, K. and Takemura, T.

1. はじめに

近年、環境中の水、土壌、糞等から DNA を抽出し、その分析によって生物の生息状況を評価する方法が注目されている。このような環境から抽出された DNA は「環境 DNA」と呼ばれ、生息生物の排泄物、代謝物、死骸等に由来すると考えられている。これまで環境 DNA の分析は水や土壌中の微生物類を対象に行われてきたが、ウシガエルをはじめとし、最近年ではため池におけるブルーギル、河川におけるコイの生息状況評価への利用も試みられている (Ficetola et al., 2008 ; Minamoto et al., 2012 ; Takahara et al., 2012, 2013)。

著者らは、環境 DNA 分析が農業水路等に生息する魚類のモニタリング手法として利用できないか検討している。本手法の利点として、一般的な採捕調査と比較して、水路での作業は採水だけでよく（調査努力量の削減可）、DNA 分析も比較的簡単で（初心者でも実施可）、対象種の検出力が高く、将来的に生息量推定にも利用可能なこと等が挙げられる。本研究では、農村水域の代表的魚種であるドジョウとタモロコを対象に、水路の水から抽出した環境 DNA を用いて、両種の生息状況を評価できるか予備実験を行った。

2. 材料と方法

1) 対象水路と採水 千葉県成田市と栃木県下野市における水路 1~4 を対象とした (図 1)。水路 1, 2, 4 は水面幅約 1m の支線排水路、水路 3 は幅約 5m の幹線排水路である。どの水路においてもドジョウとタモロコの生息を確認しているが、水路 4 では非かんがい期 (10~4 月) に通水が止まるため、タモロコはいなくなる。

環境 DNA を抽出するため、各水路でサンプル水 2L を 2013 年 12 月に採水した。

採水は、水路 1~3 では水面幅中央付近の表層で、水路 4 では降水による溜まり水で行った。採水後のサンプル水は冷暗状態で実験室へと搬送し、直ちに DNA を抽出した。

2) DNA 抽出とリアルタイム PCR 解析 手順全体の概略を図 2 に示す。①サンプル水 1L をフィルターろ過した。②フィルター付着物の DNA (環境 DNA) をシリカメンブレン製



図 1 対象水路 (Study canals)

農村工学研究所 (National Institute for Rural Engineering), *広島大学大学院総合科学研究科 (Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University), **神戸大学大学院人間発達環境学研究科 (Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University), ***広島大学サステナブル・ディベロップメント実践研究センター (Institute for Sustainable Sciences and Development, Hiroshima University) キーワード: 環境 DNA, 魚類モニタリング法, 農業水路

のキットで回収した。③DNA量を定量可能なリアルタイムPCR解析(SYBR Green法)により、環境DNAにおけるドジョウとタモロコのDNAを検出・定量した。PCR解析の試薬組成と温度条件はPCR酵素に添付の取扱説明書にしたがい、解析後のデータ処理には分析機器に付属のソフトウェアを利用した。なお、PCR解析に必要な両種の種特異的プライマーは、DNAデータベースを利用して、ミトコンドリアDNAのシトクローム**b**遺伝子領域を対象に作成した。

①サンプル水のフィルターろ過



②フィルター付着物のDNA抽出
→環境DNA



③リアルタイムPCR解析



3. 結果と考察

各水路のサンプル水からはドジョウとタモロコのDNAが検出された(図3)。DNA量を1Lあたりコピー数(DNA鎖の本数)に換算すると、ドジョウのDNA量はタモロコよりも100倍程度多かった。水路間では両種共に水路3, 2, 1, 4の順に多い傾向がみられた。水路1, 2における過去の生息量調査では、ドジョウよりもタモロコの個体数が多く、両種の個体数共に水路1よりも水路2の方が多く結果が得られている(小出水ら, 2005)。本実験の結果はこの傾向に概ね一致した。さらに水路4は溜まり水であることから、タモロコの生息は想定し難い。以上を踏まえると、ドジョウとタモロコのDNA量は生息量を反映している可能性が推察される。

図2 DNA分析手順の概略(Outline of DNA analysis)

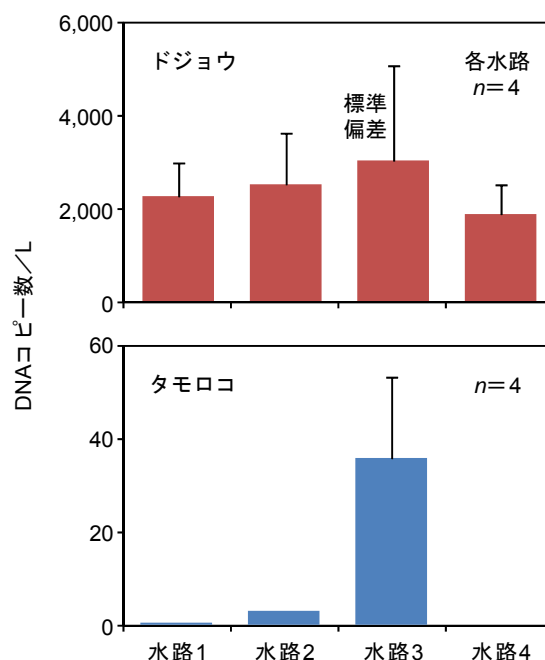


図3 ドジョウとタモロコについての環境DNAの分析結果(Results of environmental DNA analysis for the Dojo and Tamoroko in study canals)

4. まとめ

本実験では、生息魚類のモニタリング手法として、水路の水による環境DNA分析の有効性を明らかにした。魚類だけでなく、両生類や水生昆虫等についてのプライマーを作成することにより、農村環境に生息する様々な生物種、特に生息量の少ない希少種等への適用が期待される。研究事例の蓄積と共に、調査・分析方法についてのマニュアル作成等も今後の課題として挙げられる。

参考文献 Ficetola et al. (2008) : *Biology Letters*, **4**, 423-425. Minamoto et al. (2012) : *Limnology*, **13**, 193-197. Takahara et al. (2012) : *PLoS ONE*, **7**, e35868. Takahara et al. (2013) : *PLoS ONE*, **8**, e56584. 小出水ら (2005) : 農工研技報, **203**, 39-46.