

## 助成金研究報告書（概要書）

報告者：山崎裕治・富山大学理学部生物学科

研究テーマ：環境 DNA 技術を用いた希少種保護のための生物相評価手法の開発

近年注目されている希少種保護のために、環境 DNA 技術を用いた生物相評価方法の確立と、遺伝的多様性評価を行った。対象として、水田生態系の主要構成種であり、国指定天然記念物のイタセンパラ（コイ科の小型魚類）およびその共存生物を選定した。

まず、種特異的な検出のための技術開発を試み、その結果、イタセンパラを特異的に増幅するプライマーの開発に成功した。また、共存種として、イタセンパラが繁殖する上で欠かすことのできない二枚貝を検出する方法も確立した。

次に、環境水中に含まれる DNA（環境 DNA）を、簡便かつ安価に検出・評価する技術を開発した。イタセンパラ生息水域およびその周辺水域において、環境水を採水し、実験室でフィルター濾過した後、DNA を得た。それら DNA に対して、上記で開発したプライマーを用いた PCR を行った。その結果、環境水からイタセンパラの DNA を検出することに成功した。また、PCR の成功頻度から、イタセンパラの生息状況、例えば個体数を推察することができた。また同様に、二枚貝の検出にも成功した。これら分析の結果、二枚貝が生息するにもかかわらず、イタセンパラの個体数が少ない水域の存在が明らかになった。そのような場所では、イタセンパラの生息環境整備を積極的に行うことにより、イタセンパラの生息地の拡充に寄与することが示唆された。

さらに、イタセンパラの健全性を評価するために、遺伝的多様性分析を行った。その結果、イタセンパラ集団は、概ね自由な交配をしていることが明らかになった。また、過去に報告された多様性の数値と大きな違いはないため、健全な状態で維持されていると考えられる。

以上で得られた成果については、富山大学理学部・氷見市連携研究室における公開、および当該研究室における高校生を対象とした実習を通して、広く普及啓発活動に努めた。

これら一連の研究活動により、環境 DNA を用いた遺伝的分析技術の確立および活用を通して、希少種保護に大いに貢献したと考えられる。

## 助成金研究報告書

報告者：山崎裕治・富山大学理学部生物学科

研究テーマ：環境 DNA 技術を用いた希少種保護のための生物相評価手法の開発

### 【研究の目的】

近年、生物多様性を考える際に、グローバル・スケールで考えることの重要性が認識されつつある。これと同時に、生物多様性地域戦略をはじめとして、地域スケールで生物多様性に注目することが求められている。しかし、地域における生物多様性研究は必ずしも十分には行われていない。特に、生物多様性評価においては、フィールドにおける生物採集や観察が必要である一方で、希少種のように、生息地域が限定される種や、個体数の少ない種においては、直接的な調査だけでな、正確な生息状況の把握が必ずしも十分ではなかった。また、希少種保護においては、対象生物の健全性を評価することが必要である。この健全性は、その生物の生息状況に加えて、繁殖状況に関する情報も必要とする。これら双方を用いることで、信頼性のより高い希少種保護が成し遂げられると期待される。

昨今では、環境水中に含まれる DNA（環境 DNA）の分析技術が注目されており、河川等から水を採取し、そこから得られた DNA を対象に種特異的 PCR を行うことにより、対象生物の存否を確認する技術が開発されつつある。しかし、これまでの研究では、次世代シーケンサーやリアルタイム PCR など、高額な機器を用いる方法での解析が先行しており、地域スケールの生物相や希少生物の生息状況の把握については、注目されてこなかった。また、遺伝的多様性評価においては、マイクロサテライト DNA 法等の遺伝的多様性分析を用いることにより、有益な情報を得ることが期待される。

そこで本研究では、水田生態系の主要な構成種であり、絶滅の危険性が指摘されているイタセンパラ（図 1）とその共存種を対象に、環境 DNA 技術を用いた生物相評価手法の開発、およびマイクロサテライト DNA 法を用いた遺伝的多様性評価を目指す。タナゴ類の共存種としては、タナゴ類の繁殖に不可欠な二枚貝類の生息状況を解明することにより、直接的および潜在的なタナゴ類の生息適地の発見を試みる。

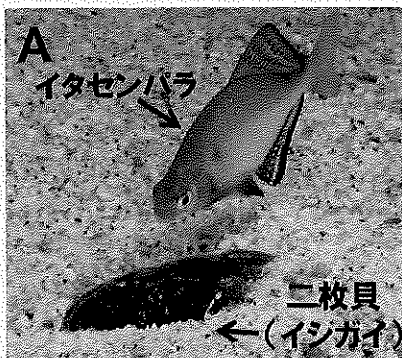


図 1. A: イタセンパラと二枚貝.  
B: イタセンパラ生息河川 (A 川)

## 【研究の内容・方法】

### ①プライマーの作成と確認

日本データバンクに登録されている塩基配列情報に基づき、対象となるイタセンバラを特異的に増幅するプライマーを設計および合成した。解析領域として、既報情報が多いミトコンドリア DNA の *cytb* 領域を採用した。一方、二枚貝については、登録されている塩基配列が乏しいため、ミトコンドリア DNA の *cytb* 領域を増幅するユニバーサルプライマーを採用し、合成した。

PCR 増幅確認を行うための試料として、氷見市教育委員会から提供されたイタセンバラの鰭に加えて、調査河川に同所的に生息する 3 種のタナゴ類（ミナミアカヒレタビラ、ヤリタナゴ、タイクバラタナゴ）の鰭から抽出され、当研究室に冷凍保存されていた DNA を用いた。また、二枚貝については、イタセンバラ生息河川における主要種であるイシガイの足から DNA を抽出した。

PCR における増幅酵素として、東洋紡ライフサイエンスの KOD シリーズを用いた。試薬の分量や増幅条件は、マニュアルに従った。PCR 増幅には、アプライドバイオ社の GeneAmp PCR System9700 を用いた。

増幅産物の確認のために、2%アガロース・ゲルを支持体として、電気泳動装置 Mupid-II を用いて電気泳動した。この際、産物の染色と電気泳動の緩衝剤および発色のために、和光純薬の GelGreen および LED トランスイルミネータ・ゲルみえーるを用いた。

### ②環境 DNA 技術を用いたイタセンバラと二枚貝の探索

#### ②-1：環境水の採水

環境水の採水地点は、次の通りである。

- イタセンバラ保護池（検体数 2）
- A 川 St.1（検体数 2）
- A 川 St.2（検体数 1）
- B 川 St.1（検体数 1）
- B 川 St.2（検体数 1）
- B 川 St.3（検体数 1）

このうち、イタセンバラ保護池は、富山県氷見市が管理し、イタセンバラの保護を目的として運営されている池である。イタセンバラおよび二枚貝（イシガイ）のいずれもが生息し、毎年イタセンバラが自然産卵している。また、A 川と B 川のいずれも、イタセンバラおよび二枚貝の生息が記録されている河川である。ただし、イタセンバラ個体数については、A 川の方が多く生息することが知られている。

いずれの場所においても、採水は、2016年9月から11月の好天が続く期間に行った。また、採水においては、氷見市および地元の許可と協力の下で行った。

環境水の採水は、滅菌済みの1リットルボトルを用いて、2本分(2リットル)の環境水を直接採水した。採水後、保冷クーラーを用いて冷却状態にしたまま、富山大学理学部・氷見市連携研究室に持ち込み、直ちに濾過作業を行った。

## ②-2：環境水の濾過

採水した2リットルの環境水を、アスピレーターを用いて吸引濾過した。濾過フィルターとして、グラスフィルター(網目径0.7 $\mu$ m)を用いた。なお、懸濁物が多い環境水については、フィルターが目詰まりしたため、できる限り多くの水を濾過した。なお、使用するすべての機材について、予め10%ブリーチで消毒した。

## ②-3：DNAの抽出とPCR

フィルターからのDNA抽出は、キアゲン社のDNeasy Blood and Tissue Kitを用いた。抽出DNAは、PCRまで冷凍保存した。

イタセンパラおよび二枚貝を対象としたPCRおよびPCR産物の確認のための電気泳動においては、①で確立した方法を用いた。

各試料(抽出DNA)について、5回から10回のPCRを行い、増幅成功率を調べた。

## ③イタセンパラの遺伝的多様性評価

遺伝的多様性とは、生物多様性を構成する要素の1つであり、その生物がもつ遺伝的特徴の豊かさ、複雑さを表す指標である。一般に、この値が高いほど、その生物が多様な環境やその変化に対応できる可能性が高いことを示しており、集団の存続性における健全性の指標とされている。そのため近年では、希少種を保護する際には、遺伝的多様性の評価が求められている。そこで本研究では、環境DNA研究の対象種とした希少種イタセンパラについて、その保護のために遺伝的多様性の現状を評価した。

分析において、2014年に氷見市教育委員会から提供された自然河川(A川)30個体および保護池110個体のイタセンパラの鱗の一部を用い、そこからDNAを抽出した。得られたDNA産物に対して、既報の7つの多型的マイクロサテライト遺伝子座を対象として、キアゲン社のType-itマルチプレックスPCRキットを用いて、マルチプレックスPCR法を用いた増幅を行った。その後、ABI3130ジェネティックアナライザーを用いて、波形の検出と、GeneMapperを用いたアレルの検出を行った。得られたアレル組成について、自然河川集団および保護池集団のそれぞれについて、遺伝的多様性の指標となる平均ヘテロ接合度を算出した。

## 【研究の成果】

### ①プライマーの作成と確認

イタセンパラを特異的に増幅するプライマーを作成し、PCR 増幅を確認した結果、同所的に生息するタナゴ類の中では、イタセンパラだけを増幅することが確認された（図2）。

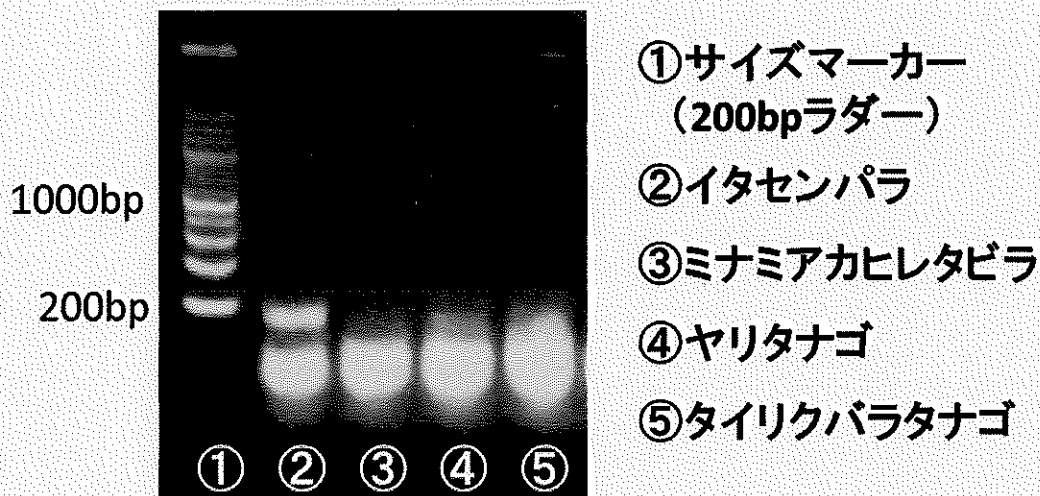


図2. イタセンパラ特異的増幅の結果.

②のイタセンパラにおいてのみ、約200bp付近に増幅バンドが確認できる。

また、二枚貝を増幅するプライマーを用いたPCRにおいても、イシガイのDNAが増幅することが確認された。

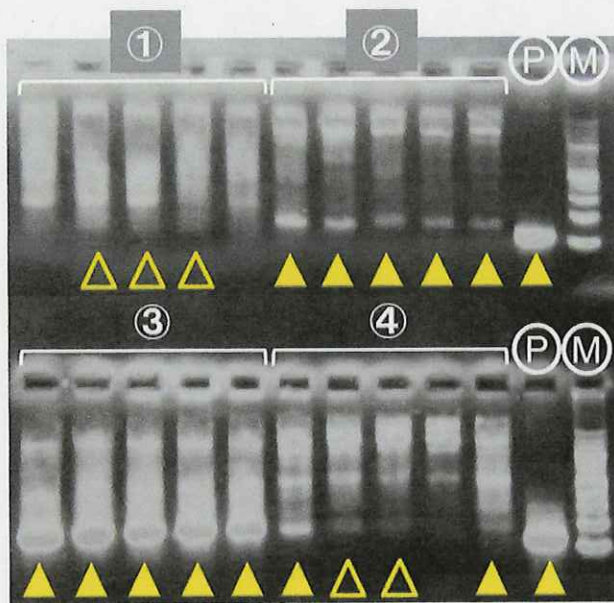
以上のことから、イタセンパラおよび二枚貝だけを検出する方法を確立することに成功した。

### ②環境DNA技術を用いたイタセンパラと二枚貝の探索

①で確立した方法を用いて、環境水中におけるイタセンパラおよび二枚貝の検出を試みた。その結果、イタセンパラにおいては、採水地点ごとにPCRの増幅成功率が異なった（表1）。また、増幅が確認された産物においても、バンドの濃淡の度合いが異なっていた（図3）。

表 1. 採水地点におけるイタセンパラおよび二枚貝特異的な PCR 増幅の結果.  
5~10 回の PCR を行い, 増幅あるいは非増幅を集計.

採水地点	検体番号	イタセンパラ		二枚貝	
		増幅	非増幅	増幅	非増幅
保護池	1	5	5	1	4
	2	4	6	—	—
A 川 St.1	1	2	8	3	2
	2	4	6	5	0
A 川 St.2	1	6	4	—	—
B 川 St.1	1	1	4	5	0
B 川 St.2	1	0	5	5	0
B 川 St.3	1	1	4	5	0



①A川  
②B川St.1  
③B川St.2  
④B川St.3  
P: 二枚貝  
(ポジティブコントロール)  
M: サイズマーカー  
(200bpラダー)

図 3. 環境水を対象とした二枚貝特異的増幅の結果  
黄色で塗りつぶした三角は明確な増幅が認められた試料.  
黄色枠の三角は, 弱い増幅が認められた試料.

表 1 において, 同じ DNA 抽出産物を用いて繰り返し PCR を行った結果, 増幅が確認された場合とされなかった場合が示された. また, 図 3 において, 増幅 (ゲル状のバンド) が確認された場合 (非増幅) においても, バンドの濃さには違いが出る場合があった. これらの結果は, 検体となった環境水中における DNA 量に依存している可能性が考えられる. すなわち, 環境水中にイタセンパラあるいは二枚貝が多数生息

していたり、多くの DNA が懸濁していたりする場合には、PCR の成功率の向上や、濃いバンドが検出されたと考えられる。この結果は、環境 DNA を用いた PCR レベルの検出においても、その水域に生息する対象生物の多寡を推定できることを示唆している。

各調査地点において、イタセンパラの出現パターンを確認すると、イタセンパラについては、B 川 St.2 では検出されなかったが、これ以外の地点においては検出された。しかし、B 川の St.1 と St.3 においては、出現頻度が低いことが示唆された。実際に、先行研究におけるイタセンパラの捕獲調査において、A 川には多くのイタセンパラが生息する一方で、B 川では、特に昨今のイタセンパラ生息数が少ないことが報告されている。本研究の結果は、このような生息状況を反映したものと考えられる。

一方、二枚貝においては、調査したすべての地点で生息が示唆された。特に、B 川においても、高頻度での出現が示された。以上の結果は、現在、イタセンパラの生息個体が少ない B 川においても、産卵のための二枚貝が多数生息しており、イタセンパラの生息地としては、適していることが考えられる。このことから、今後、B 川においてイタセンパラ保護活動を積極的に取り組むことによって、B 川が再び多数のイタセンパラの生息可能な河川になり得ることが期待される。

### ③イタセンパラの遺伝的多様性評価

イタセンパラの遺伝的多様性分析を行った結果、富山県氷見市の自然河川集団 30 個体、保護池集団 110 個体について、7つの多型的遺伝子座のアリル組成を決定した。

自然河川集団の平均ヘテロ接合度期待値は 0.318、観察値は 0.310 であった。また、保護池集団の平均ヘテロ接合度期待値は 0.332、観察値は 0.342 であった。いずれの集団においても、期待値と観察値との間に大きな差異は認められず、いずれの集団も概ね自由な交配をしていると考えられる。また集団間における多様性の程度の差異は小さく、また、これまでの報告とも概ね一致していた。これらのことから、富山県氷見市のイタセンパラにおいて、自然河川集団と保護池集団の双方とも、同程度の遺伝的多様性を有しており、健全な状態で維持されていることが考えられる。

#### 【研究成果の波及効果・提言】

①イタセンパラを特異的に増幅するプライマーの開発に成功した。このことは、今後の環境 DNA を用いたイタセンパラ生息状況調査に活用することが期待される。また同時に、イタセンパラは、富山県氷見市の他にも、大阪淀川水系および岐阜県木曾川水系においても生息しており、それら地域での応用も期待される。さらに、本研究と同様の手法を採用することにより、イタセンパラ以外の種特異的プライマーを作成することにより、様々な対象種を対象とした検出が可能となる。以上の成果は、環境 DNA 技術において、高額機器や試薬類を用いることなく、簡便かつ安価に環境 DNA を調べることを可能にすることに貢献したと考えられ、環境 DNA 技術の普及にもつ

ながることが期待される。

②富山県氷見市河川におけるイタセンパラおよび二枚貝について、環境 DNA 技術を用いて、その存否を検出することに成功した。また、各水域における生息個体数を反映した結果が得られたと考えられる。このことは、昨今様々な分野での活用が期待されている環境 DNA 技術のさらなる応用につながるものと期待される。また、イタセンパラの生息適地の発見に寄与したことは、大きな成果であると判断される。

③イタセンパラの遺伝的多様性評価において、現在の富山県氷見市集団は、自然河川および保護池の双方において、概ね良好な状態で維持されていることが明らかになった。このことは、希少種の健全性を評価する上で、遺伝的多様性評価の重要性を示唆するものである。これと同時に、特に保護池集団においては、今後も新規個体の導入などを通して、健全な状態の維持が必要である。その際、継続的な遺伝的多様性評価を実施することが求められる。

④以上の研究成果は、今後、学術論文としての報告を予定している。それと同時に、今回の成果は、富山大学理学部・氷見市連携研究室のホームページ (<https://sites.google.com/site/himilab/>) に掲載して、広く普及啓発に勤めている。そして、本施設および得られた成果を活用して、地元の高校生を対象とした実習を実施した。これにより、広く普及啓発に貢献したものと考えられる。

本研究では、希少種の生息状況について、環境 DNA 技術を用いて、簡便かつ安価に評価することに成功した。また、マイクロサテライト DNA 分析により、遺伝的多様性を評価することで、対象種の健全性の評価を可能にした。そして得られた成果を多彩なステークホルダーに提供し、普及啓発に勤めた。これら一連の研究活動を通して、希少種保護に大いに貢献したと考えられる。