



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（特集1 環境DNA分析を利用した水中生物のモニタリング）

福岡，有紗；高原，輝彦；松本，宗弘；兵庫県立農業高校生物部；丑丸，敦史；源，利文

(Citation)

日本生態学会誌, 66(3):613-620

(Issue Date)

2016-11-30

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(Rights)

本文データは学協会の許諾に基づきJ-stageから複製したものである。

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90003988>





特集 1 環境 DNA 分析を利用した水中生物のモニタリング

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

福岡 有紗¹・高原 輝彦²・松本 宗弘³・兵庫県立農業高校生物部・丑丸 敦史¹・源 利文^{1,*}

¹ 神戸大学大学院人間発達環境学研究科

² 島根大学生物資源科学部・³ 兵庫県立農業高等学校

Establishment of detection system for native rare species, *Hemigrammocyppris rasborella*, using environmental DNA

Arisa Fukuoka¹, Teruhiko Takahara², Munehiro Matsumoto³,

Biology Club of Hyogo Prefectural Agricultural High School, Atushi Ushimaru¹ and Toshifumi Minamoto^{1,*}

¹Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University

²Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University

³Hyogo Prefectural Agricultural High School

要旨：生物多様性は近年著しく減少しており、特に淡水域では深刻である。希少種の保全においては、対象種が低密度で棲息していたとしても分布を把握する必要がある。従来、分布域の調査法として直接捕獲や目視確認などが行われてきたが、いずれも相当な時間や労力、専門性を必要とする。そこで近年、従来の手法を補完する方法として、生体外に放出された DNA である環境 DNA を用いた手法が開発されている。本研究では、カワバタモロコ (*Hemigrammocyppris rasborella*) を対象とし、環境 DNA 分析を用いた手法によってその検出系を設計し、野外に適用した。はじめに、カワバタモロコの在・不在が既知のため池 11 箇所で行ったところ、既知の分布情報と完全に一致する結果が得られた。次に、カワバタモロコの在・不在が未知のため池 81 箇所で行ったところ、この検出系を適用し、6 箇所で行ったところ、カワバタモロコの環境 DNA を検出した。環境 DNA が検出された 6 箇所において、もんどりをを用いた捕獲調査を行った結果、5 箇所で行ったところ、カワバタモロコの棲息が確認された。これらの結果から、環境 DNA 分析は、従来の調査手法では困難であった希少種の生息確認に有用な生物モニタリング法であることが実証された。

キーワード：希少種モニタリング、魚類、ため池、リアルタイム PCR

Abstract: In recent years, the degradation of biodiversity has advanced significantly, especially in freshwater ecosystems. To conserve rare species, the distribution of the target species should be known, even if the density is very low. Traditional habitat surveys using direct catches or observations require much time, labor, and expertise. Over the last decade, environmental DNA (eDNA) analysis methods that complement traditional surveys have been developed. In the present study, we developed an eDNA-based detection method for a Cyprinidae species, *Hemigrammocyppris rasborella*, and applied it in natural habitats. First, we tested our method in 11 irrigation ponds for which information on the distribution of *H. rasborella* was available. The eDNA detection results matched completely with the known presence/absence data. Next, we applied this method to 81 irrigation ponds for which no distribution information was available, and detected the eDNA of *H. rasborella* in 6 ponds. Subsequently, we conducted capture surveys in the 6 eDNA-positive ponds and found the species in 5 ponds. These results suggest that eDNA analysis is useful for the monitoring of rare species.

序 文

近年、生物多様性の減少は進んでいく一方であり、特に約 400 種の魚類が棲息する日本の汽水・淡水域における生物多様性の減少は非常に深刻である。1991 年の初版レッドデータブック（第一次レッドリスト）では汽水・淡水域の魚種が 41 種掲載されていたが（環境庁）、1996 年の第二次リストでは 76 種（環境省 <http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=8648>、2014 年 11 月 28 日確認）、2007 年の第三次リストでは 144 種（環境省 <http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=8648>、2014 年 11 月 28 日確認）と顕著に増加しており、2013 年の第四次リストでは 167 種（環境省 <http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=16264>、2014 年 11 月 28 日確認）にまで達している。生物多様性の保全にあたっては、基礎的な情報としてそれぞれの生物種の生息域を正確に把握することが重要である。特に絶滅危惧種などの希少種を保全するためには、対象種が低密度で棲息していてもその分布を把握する必要がある。

水域生態系において、どこにどのような魚種が生息しているかを把握するために、従来は釣り、網、罟などによって直接捕獲する手法や、目視観察によって確認するなどの手法がとられてきたが、いずれの手法も相当な時間と労力を必要とする。また、これらの手法を用いる場合には、捕獲後の種同定の際に、それぞれの種に関する分類の知識が必要となる。このような制約から、従来の方法のみを用いて水域生態系での種の分布域を広域で正確に把握することは困難である。

従来の手法を補完する手法として、近年、環境 DNA を用いた生物相の調査法が開発されている（Ficetola et al. 2008；Minamoto et al. 2012 ほか）。環境 DNA とは、生体外に放出されて水中に存在している DNA の総称であり、配偶子、皮膚片、粘液や排泄物などに由来すると考えられている（Ficetola et al. 2008）。環境 DNA は紫外線などの物理的要因、生体外の分解酵素などの生物学的要因によって分解されると考えられており、水環境中では最大で一ヶ月程度残存するとされている（Dejean et al. 2011）。つまり、サンプル水の中に含まれる DNA を調べることでどのような種が調査対象地域に存在するかを把握することが可能である。このような手法を用いる場合、調査で採取するのは水だけであるという簡便さから、従来の手法と比べて時間や労力を削減できる可能性が指摘されている（Jerde et al. 2011；Takahara et al. 2012；Thomsen et al. 2012）。環境 DNA を用いた手法を使った研究は徐々に報

告が増えており、対象種は魚類だけでなく、両生類（Pilliod et al. 2013；Fukumoto et al. 2015）、ほ乳類（Foote et al. 2012）、甲殻類（Tréguier et al. 2014）、軟体動物（Goldberg et al. 2013；Deiner and Altermatt 2014）などと多岐にわたり、希少種（Jerde et al. 2011；Bronnenhuber and Wilson 2014）や外来種を検出する目的の研究（Mahon et al. 2012；Dejean et al. 2012；Takahara et al. 2013）でも環境 DNA 分析を用いた調査法の有効性が示されている。

本研究では希少種であるカワバタモロコ（*Hemigrammocypris rasborella*）を対象として、その検出法の開発、野外での分布調査への応用を試みた。カワバタモロコは、環境省レッドリストの絶滅危惧 IB 類に分類されているコイ科の魚で、平野部の浅い池沼や用水、泥底の水草の多い浅所に棲息する（細谷 2013）。近年、オオクチバス、ブルーギルなどの魚食性の外来種による捕食などによって、カワバタモロコの棲息箇所が激減していると考えられており、生息域の現状を正確に把握することは保全上重要である。

本研究では、第一にカワバタモロコの環境 DNA 検出系を作成し、その分布情報が既知であるため池のサンプルを用いてテストを行い、検出系の有効性を確認した。第二に、作成した検出系を用いて、カワバタモロコの在・不在が確認されていない兵庫県内のため池 81 箇所で採水を行い、その環境サンプル中のカワバタモロコの DNA の検出実験を行った。最後に、カワバタモロコの DNA が検出された地点で捕獲調査を行い、実際にカワバタモロコが生息しているかどうかの確認を行った。

材料と方法

カワバタモロコに特異的なプライマー・プローブセットの設計

カワバタモロコの在・不在を調査するためには、他種の DNA を誤って検出しないように、種特異的な検出系を作成する必要がある。本研究では Taqman プローブ法を用いたリアルタイム PCR による検出系の確立を試みた。Taqman プローブ法では、PCR 産物の検出にプローブを用いることで、通常の PCR 法よりも検出の特異性を高めることができる（高原ほか 2016）。

カワバタモロコと近縁な種と塩基配列を比べるため、コイ目コイ科に属するハス（*Opsariichthys uncirostris*）、オイカワ（*Opsariichthys platypus*）、ワタカ（*Ischikauia steenackeri*）、カワムツ（*Candidia temminckii*）、ヌマムツ（*Candidia sieboldii*）のミトコンドリアのチトクローム *b*

(a)

カワムツ	T	A	C	C	C	C	A	G	C	T	A	A	C	C	C	T	T	T	A
オイカワ	T	A	C	C	C	C	A	G	C	A	A	A	C	C	C	A	C	T	G
ハス	C	A	C	C	C	C	C	G	C	A	A	A	C	C	C	G	T	T	G
ヌマムツ	C	A	C	C	C	C	A	G	C	A	A	A	C	C	C	A	C	T	A
ワタカ	T	A	C	G	C	C	A	G	C	A	A	A	C	C	C	A	C	T	A
カワバタモロコ	C	A	C	C	C	C	A	G	C	A	A	A	C	C	C	C	T	T	A

5' → 3'

(b)

カワムツ	T	A	C	T	T	G	C	A	T	T	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	A	T	C	C	T	A	G	T
オイカワ	T	A	C	T	T	G	C	C	T	T	A	C	T	A	T	T	T	T	C	T	A	T	T	C	T	A	G	T
ハス	T	A	C	T	T	G	C	C	C	T	A	C	T	A	T	T	T	T	C	C	A	T	C	C	T	A	G	T
ヌマムツ	T	A	C	T	T	G	C	A	T	T	A	C	T	A	T	T	C	T	C	T	A	T	T	C	T	A	G	T
ワタカ	T	C	C	T	T	G	C	A	T	T	A	C	T	A	T	T	C	T	C	T	A	T	C	C	T	A	G	T
カワバタモロコ	T	T	C	T	C	G	C	G	T	T	A	C	T	G	T	T	C	T	C	T	A	T	T	C	T	A	G	T

3' ← 5'

図 1. カワバタモロコのプライマー部分の塩基配列の近縁種との比較。灰色の網掛けはカワバタモロコの配列と異なる塩基を示している。(a) 本研究で作成したカワバタモロコに種特異的なフォワードプライマー (Hra-F) に相当する部分の塩基配列および、(b) リバースプライマー (Hra-R) に相当する部分の塩基配列を示した。リバース側のプライマー配列はここで示した配列の相補鎖配列である。矢印は各プライマーの 5' 末端側から 3' 末端側の向きを示す。カワバタモロコと近縁種の配列間で 3' 側の末端 5 塩基以内に 2 塩基以上の置換がある。

(CyB) 遺伝子の情報を遺伝子データベースから得た。リアルタイム PCR に用いるプライマーおよびプローブは Primer Express 3.0 (Life Technologies 社) を用いて設計した。近縁種を誤って検出する可能性をできる限り下げるため、プライマーの 3' 末端側の 5 塩基以内の種特異的な塩基数が多くなるようにプライマーを選択した。最終的に得られたプライマー及びプローブは、増幅領域長 132bp のプライマーセットおよびその増幅領域を認識するプローブで、その配列情報は以下の通りである。Hra-CyB-F (5'-CACCCCAGCAAACCCCTTA-3')、Hra-CyB-R (5'-ACTAGAATAGAGAACAGTAACGCGAGAA-3')、Hra-CyB-P (5'-FAM-CCTGTTTCGCTTACGCCATTCTACGATCA-TAMRA-3') (図 1)。

ビオトープからの採水、濾過、DNA抽出

神戸大学発達科学部内の 2 つのビオトープ (120cm × 880cm × 32cm [3380 L]、120cm × 400cm × 31cm [744 L]) にはカワバタモロコが域外保全されている。我々の開発

した検出系が正しく機能することを確認するため、ビオトープ中の水を用いた実験を行った。2 つのビオトープからそれぞれ 500 ml のサンプル水を 3 本ずつ採水した。サンプル水は実験室に持ち帰り、ガラスフィルター (GF/F; ワットマン社) を用いて各サンプル 250 ml を吸引濾過した。濾過後のフィルターを -20℃ で保存した。

フィルターからの DNA 抽出には QIAGEN 社の DNeasy Blood & Tissue Kit を用いた。プロトコルは本研究のために若干改変した。24 µl の Proteinase K (600 mAU/ml)、240 µl の水、240 µl の BufferAL をろ紙に加え、56℃ の恒温槽で 30 分間インキュベートした。濾紙から濾液を搾り出し、エタノールを 110 µl 添加後、DNeasy のカラムに入れ、6000 × g で 1 分間遠心した。以降は最終的な溶出量を 100 µl とした事を除き、キット付属のプロトコル通りとした。ここで得られた DNA 溶液は -20℃ で保存した。

分布既知のため池における採水、濾過、DNA抽出

カワバタモロコの検出系が機能するかどうかを確認す

るため、兵庫県立農業高等学校生物部らの調査によって、既にカワバタモロコの在・不在が明らかな兵庫県神戸市北区および西区のため池 11 箇所、2014 年 1 月に採水調査を行った。分布情報の詳細については、当該種が希少種であることから公開されていない。サンプルの汚染（コンタミネーション）を防ぐための採水タンクの洗浄方法は Fukumoto et al. (2015) に従った。水道水でよく洗ったポリタンクを調査地の水で 2 度共洗いしてから、表層水を約 2 L 採水し、ガラスフィルター（GF/F）を用いて吸引濾過をした。フィルターは合計 2 枚を使い、1 枚あたり 500 ml のサンプルを濾過した。二枚のフィルターを 1 本のサリベット（ザルスタット社）に入れ、400 μ l の BufferAL、40 μ l の Proteinase K を添加し、56℃ の恒温槽で 30 分間インキュベートした。その後 5000 $\times$ g で 2 分間遠心し、サリベットの下部にたまった溶液約 1000 μ l を 2 ml チューブに移し替え、400 μ l のエタノールを添加して軽く振り混ぜた。DNeasy のカラムの中へ 700 μ l 程度移し、6000 $\times$ g で 1 分間遠心する操作を繰り返して DNeasy カラムにサンプル DNA をトラップした。その後の操作はビオトープサンプルと同様に行った。

ため池の選定、採水、濾過、DNA抽出

調査地であるため池は Google Earth (<https://www.google.co.jp/intl/ja/earth/>) を用いて任意に選定した。2013 年 10 月から 2014 年 1 月にかけて、兵庫県宝塚市の 12 箇所、三田市の 14 箇所、神戸市北区の 18 箇所、小野市の 16 箇所、三木市の 10 箇所、加東市の 11 箇所、2014 年 1 月に採水を行った（図 2）。採水方法とその後の濾過方法、DNA 抽出方法は分布既知のため池における方法と同様である。陰性対照（ネガティブコントロール）として水道水をガラスフィルターで濾過し、野外サンプルと同様に処理した。

リアルタイムPCRによるカワバタモロコのDNA検出

PCR 溶液には、それぞれ 900 nM のプライマー、125 nM の TaqMan プローブ、1 $\times$ TaqMan Gene Expression Master Mix（Applied Biosystems 社）、2 μ l のサンプル DNA を加え、合計で 20 μ l とした。PCR 増幅にはリアルタイム PCR 装置（StepOnePlus；Life Technologies 社）を用い、PCR の条件は、50℃ で 2 分、95℃ で 10 分の後、95℃ で 15 秒、60℃ で 60 秒からなるサイクルを 55 サイクル行った。

ビオトープサンプルの実験においては、6 つのビオトープの水サンプルに加え、ポジティブコントロールとしてカワバタモロコの筋肉組織から DNeasy Blood and Tissue

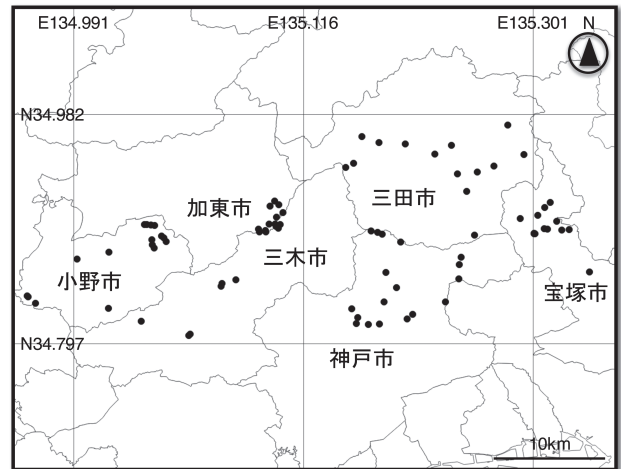


図 2. 分布未知のため池調査における採水地点。宝塚市 12 地点、三田市 14 地点、神戸市北区 18 地点、小野市 16 地点、三木市 10 地点、加東市 11 地点の計 81 地点で採水を行った。

Kit を用いて抽出したトータル DNA を 1 ng、0.1 ng、0.01 ng、0.001 ng となるように薄めた DNA サンプルを用いて検出実験を行った。全ての PCR を 3 反復行い、3 反復のうちの一度でも DNA 増幅が確認された場合、陽性であると判断した。また、サンプル DNA の代わりに純水を用いたネガティブコントロール実験も 3 反復行った。

分布情報既知のため池サンプルを用いた実験は、8 反復で行った。その際、8 反復のうちの一度でも DNA 増幅が確認された場合、陽性であると判断した。また、各 PCR プレートにカワバタモロコの組織由来のポジティブコントロールと、鋳型の代わりに純水を入れたネガティブコントロールを入れ、これらのコントロールも 8 反復行った。

分布情報が未知の野外サンプルの実験は、分布情報既知の池の実験と同様の手法で行った。ただし、サンプルおよびポジティブコントロール、ネガティブコントロールとも、3 反復で行った。対象種の DNA の在・不在の判断基準は、ビオトープで行った場合と同様である。

カワバタモロコのプライマーセットの特異性を確認するために、カワバタモロコの環境 DNA が検出された地点の PCR 産物を Wizard® Gel and PCR Clean-Up System（プロメガ社）を用いて精製したあと、ダイレクトシーケンスを行って PCR 産物のシーケンスを確認した（タカラバイオ社）。

カワバタモロコの捕獲調査

採取した 81 の野外サンプルの中でカワバタモロコの環

カワバタモロコの環境 DNA 検出

表 1. カワバタモロコの在・不在が既知の池での環境 DNA の検出結果。DNA 検出では、PCR を 8 反復行ったうちの DNA が検出された回数を示す。分布情報は、兵庫県立農業高等学校生物部らによる非公開データによる。○は分布が確認されている地点、×は分布が確認されていない地点を示す。

調査地	分布	DNA 検出結果
神戸市西区 X 町	A 池	○ (6 / 8)
	B 池	○ (7 / 8)
	C 池	× (0 / 8)
	D 池	× (0 / 8)
神戸市北区 Y 町	E 池	○ (8 / 8)
	F 池	× (0 / 8)
	G 池	× (0 / 8)
	H 池	○ (6 / 8)
神戸市北区 Z 町	I 池	○ (8 / 8)
	J 池	○ (1 / 8)
	K 池	○ (8 / 8)

表 2. カワバタモロコの在・不在が未知の池での環境 DNA の検出地点数及びカワバタモロコの捕獲地点数。カワバタモロコ DNA 検出地点数は調査を行った地点のうちカワバタモロコの DNA を検出した地点数を、捕獲地点数はカワバタモロコの DNA を検出した地点のうち、実際にカワバタモロコを捕獲することができた地点数を表す。

調査地	調査地点数	カワバタモロコ DNA 検出地点数	カワバタモロコ捕獲地点数
宝塚市	12	1	1
三田市	14	0	-
神戸市北区	18	2	1
小野市	16	2	2
三木市	10	1	1
加東市	11	0	-
合計	81	6	5

境 DNA が検出された 6 箇所について、もんどりを用いた捕獲調査を行った。網目が 3 mm の網もんどりを、1 箇所のため池につき 3 個用い、誘因餌としてさなぎ粉とグルテンを混合したゴルフボール大の練り餌を入れ、20 分～30 分間放置した後に引き上げた。一回の調査でカワバタモロコが確認できなかった場合には、同じ作業を最大 3 回繰り返して行った。

結 果

カワバタモロコの筋肉由来の DNA およびビオトープの水由来の DNA からのカワバタモロコの DNA 増幅

カワバタモロコの筋肉に由来する DNA サンプル、および棲息するビオトープの水サンプルに由来する環境 DNA サンプルについて、カワバタモロコの DNA の増幅が確認された。

分布既知のため池からのカワバタモロコの DNA 検出

カワバタモロコの在・不在が既知のため池 11 箇所の水サンプルを解析した結果、分布が確認されている 7 箇所の池全てからカワバタモロコの DNA を検出することがで

きた。また分布しないと考えられているため池 4 箇所の水サンプルからはカワバタモロコの DNA は検出されなかった（表 1）。

PCR による兵庫県内のため池からのカワバタモロコの DNA 検出

宝塚市 12 箇所のうち 1 箇所、神戸市北区 18 箇所のうち 2 箇所、小野市 16 箇所のうち 2 箇所、三木市 10 箇所のうち 1 箇所の計 6 箇所でカワバタモロコの DNA が検出された。三田市 14 箇所と加東市 12 箇所ではカワバタモロコの DNA は検出されなかった（表 2）。また、PCR 産物のダイレクトシーケンスの結果、PCR 産物は確かにカワバタモロコのものであることが確認された。

カワバタモロコの捕獲調査

カワバタモロコの環境 DNA が検出された上記の 6 箇所のうち、5 箇所でカワバタモロコが捕獲された（表 2）。

考 察

兵庫県内にはため池が 40,000 面以上あり、そのうちカ

ワバタモロコが発見されているため池はわずか30面であると報告されている（農林水産省：http://www.maff.go.jp/j/nousin/bousai/bousai_saigai/b_tameike/、2014年11月28日確認、神戸市：<http://www.city.kobe.lg.jp/life/recycle/environmental/tayosei/kawabatamoroko.html>、2014年11月28日確認）。本研究ではカワバタモロコの環境DNAを用いた検出系を確立し、ため池81箇所について検出実験を行った結果、6箇所の環境水からカワバタモロコのDNAが検出された。さらに、カワバタモロコのDNAが検出された6箇所のうち、5箇所でカワバタモロコを捕獲することができた。このことから、環境DNAを用いた手法は対象種を比較的精度良く検出できる可能性がある。Takahara et al. (2013) では、目視で対象種が確認された全ての地点で、環境DNAを用いた手法で対象種のDNAが検出されている。さらに、目視では対象種を確認できなかった地点においても、環境DNAを用いた手法で対象種の環境DNAを検出している。Jerde et al. (2011) では、電気ショッカーを用いた漁法と環境DNAを用いた手法で対象種の在・不在調査が行われ、環境DNAを用いた手法は広範囲での迅速な調査が可能であるという有用性が示された。以上のような既存の研究からも、環境DNAを用いた手法の希少種の分布域調査に対する有効性は明らかである。本研究においても、調査地での作業時間が5分程度の調査によって、新規生息地を5箇所発見できたことから、環境DNAを用いた手法が希少種の生息地を発見する手段として有効であることが示された。今後、この検出系を用いて全国のため池などでカワバタモロコの環境DNA調査を続けることで、これまで未知であるカワバタモロコの棲息地を明らかにすることができるだろう。

一方で、カワバタモロコの環境DNAが検出されたが、捕獲調査でカワバタモロコを捕獲することができなかった地点が1箇所あった。その理由として3つの可能性が考えられる。(1) カワバタモロコが非常に低密度で棲息していたために、捕獲調査で捕獲することができなかった。(2) カワバタモロコが外来種の導入などの原因で環境DNA調査日の直前もしくは環境DNA調査と捕獲調査の間に駆逐されてしまった。(3) この地点における検出が偽陽性であった。どれが真の原因であるかは現時点では不明であるが、今後以下のような手法で検討することが可能である。(1) 捕獲調査の手法や頻度を変える。(2) カワバタモロコを駆逐していると考えられる魚種、例えばオオクチバス (*Micropterus salmoides*) やブルーギル (*Lepomis macrochirus*) の環境DNAの検出などを同時に行う。あるいは(3) 環境DNAの調査を繰り返す行う。

また、環境DNA手法による調査結果には偽陰性の可能性も残される。カワバタモロコは体長5 cmと比較的小さい魚であるため、低密度で存在していた場合に一度のサンプリングでは環境DNAを検出できていない可能性もある。実際に、分布既知のため池における調査では、PCRを8反復行ったうちの一度しかDNAが増幅されなかった地点があった。サンプリングを繰り返すことで、低密度種の検出が可能になることも考えられ (Eichmiller et al. 2014)、偽陰性の可能性を低くすることができるだろう。

水サンプルからの環境DNA検出は、溶存酸素やpH、温度、電気伝導度のような環境変数よりもサンプリングや分析プロトコルにおける影響が大きいと言われている (Dejean et al. 2011)。一方で、水温が下がると環境DNAの検出率が上がるとする報告もある (Moyer et al. 2014)。本研究では、サンプリング調査を10月～1月に1回のみ行ったため、水温による検出率への影響について判断することができない。時期によって大幅に水温が異なり、環境状況や魚の行動も大きく変わってくる可能性があるため、年間を通した調査を行うことなどによって、検出率にどのような影響が出るかを議論できるだろう。

従来の釣り、網、罟などを使った直接捕獲や水を抜くことによる目視確認などの手法では、限られた時間の中で限られた地点でしか調査ができなかった。これまでの著者らの経験では、捕獲を伴う調査では1日あたり5-6箇所程度調査することが限界であったが、本研究では5日間で81地点のサンプリングを行っており (16.4箇所/日)、従来の調査法に比べて多くの地点を迅速に調査することができた。ただし、環境DNAを用いた手法はサンプリングのあとに実験室での作業がある。1日で回収した16地点の水サンプルを濾過するのに約2時間、DNA抽出に約3時間、リアルタイムPCRに約2時間30分必要であり、合計で約7時間30分必要である。しかしながら、これらの作業時間を考慮しても、対象種を絞った調査に関しては、従来法より速くできると言える。一方で、捕獲調査では複数の種を同時に調べることができるが、環境DNAを用いた手法の場合、それぞれの種についてPCRをかける必要があるなどの点で従来法には及ばない。どちらの方法もメリットとデメリットがあるが、少なくとも本研究で示されたような対象種を絞った在・不在の調査に関しては環境DNAを用いた手法の方がより少ない努力量で、効率良く行うことができる可能性がある。また、目視以外の従来の手法では、手法によって影響の大小はあるが、捕獲などに際して対象種にある程度のインパクトを与えてしまう。しかし、環境DNAを用いた手法では、

現場での作業は採水のみであるため、対象種に影響を与えることはない。そのため、特に希少種を対象とする調査においては、従来の手法に比べて有効であると言える。

環境 DNA を用いた手法は、カワバタモロコ以外の絶滅危惧種、希少種や地域個体群にも適用ができる (Jerde et al. 2011; Bronnenhuber and Wilson 2014)。カワバタモロコを含め、絶滅危惧種や希少種の中には今まで検出されていなかった地域で多く検出されることでレッドリストのランクが変わるといった可能性もある。さらに、検出された地点を詳しく分析することで、どのような環境を保全すべきなのかという点について、これまで以上に詳細な情報を得ることができるかもしれない。それぞれの種の拡散経路が理解されるといった可能性もある。また環境 DNA を用いた手法は、在来種の生息に負の影響を与える外来種などの調査にも役立ち、そのような種の駆除の手助けとなる (Takahara et al. 2013; Fukumoto et al. 2015)。駆除対策を行った後に確かに駆除ができているかを確認する手法としても利用できるだろう。さらに、複数種の分布を広域多点で調査することで、それらの関係をより良く理解することができるかもしれない。

環境 DNA を用いた手法は、従来の手法に比べて広域の種の在・不在を迅速に把握でき、時間や労力も削減できる可能性を秘めている。環境 DNA を用いた手法の正確さを更に高めることができれば、この手法を対象種の在・不在を把握する標準的な手法として扱うことができる可能性が高まるだろう。魚類に限らず、様々な種への環境 DNA 分析手法の適用によって、それらの種の生息域を正確に把握でき、生物多様性の保全に貢献できるだろう。

謝 辞

本研究は、環境省の環境研究総合推進費 (4RF-1302) により実施された。

引用文献

Bronnenhuber JE, Wilson CC (2014) Combining species-specific COI primers with environmental DNA analysis for targeted detection of rare freshwater species. *Conservation Genetics Resources*, 5:971-975

Deiner K, Altermatt F (2014) Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS ONE*, 9:e88786

Dejean T, Valentini A, Duparc A, Pellier-Cuit S, Pompanon F, Taberlet P, Miaud C (2011) Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE*, 6:e23398

Dejean T, Valentin A, Miquel C, Taberlet P, Bellemain E, Miaud C (2012) Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49:953-959

Eichmiller JJ, Przemyslaw GB, Sorensen PW (2014) The relationship between the distribution of Common Carp and their environmental DNA in a small lake. *PLoS ONE*, 9:e112611

Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4:423-425

Foote AD, Thomsen PF, Sveegaard S, Wahlberg M, Kielgast J, Kyhn LA, Salling AB, Galatius A, Orlando L, Gilbert TP (2012) Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS ONE*, 7:e41781

Fukumoto S, Ushimaru A, Minamoto T (2015) A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology*, 52:358-365

Goldberg CS, Sepulveda A, Ray A, Baumgardt J, Waits LP (2013) Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32:792-800

細谷 和海 (2013) コイ目コイ科. (中坊 徹次 編) 日本産魚類検索：全種の同定 第三版, 317. 東海大学出版会, 神奈川県

Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM (2011) "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4:150-157

環境庁 (1991) レッドデータブック掲載種 汽水・淡水産魚類. 日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—脊椎動物編, 261. 財団法人 自然環境研究センター, 東京都

Mahon AR, Barnes MA, Li F, Egan SP, Tanner CE, Ruggiero ST, Feder JL, Lodge DM (2012) DNA-based species detection capabilities using laser transmission spectroscopy. *Journal of The Royal Interface*, 10:20120637

Moyer GR, Diaz-Ferguson E, Hill JE, Shea C (2014) Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems. *PLoS ONE*, 9:e103767

Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 16:147-153

Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP (2013) Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14:109-116

Takahara T, Minamoto T, Doi H (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE*, 8:e56584

Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z (2012) Estimation of fish biomass using environmental

DNA. PLoS ONE, 7:e35868

高原 輝彦, 山中 裕樹, 源 利文, 土居 秀幸, 内井 喜美子
(2016) 環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究
事例を中心に～. 日本生態学会誌. 66:583-599

Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M,
Willerslev E (2012) Detection of a diverse marine fish fauna
using environmental DNA from seawater samples. PLoS
ONE, 7:e41732

Tréguier A, Paillisson J-M, Dejean T, Valentini A, Schlaepfer
MA, Roussel J-M (2014) Environmental DNA surveillance
for invertebrate species: advantages and technical limitations
to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater
ponds. Journal of Applied Ecology, 51:871-879