

環境 DNA 分析を用いたカワバタモロコのモニタリング手法の検討

Study on monitoring methods of *Hemigrammocypris neglectus*
using environmental DNA analysis中務 まこ
Mako NAKATSUKASA村上 恭子
Kyoko MURAKAMI

要 旨

絶滅危惧IB類(環境省)に選定されているカワバタモロコの生息モニタリングに環境DNA分析が適用できるかを検討した。まず、PCRとアガロースゲル電気泳動を用いた検出系において既往の研究で公表されたプライマーが使用できることを確認した。さらにカワバタモロコが生息するため池の水から抽出した環境DNA溶液を希釈または精製することで、そのDNAを検出することができた。

キーワード：カワバタモロコ 環境 DNA 分析 アガロースゲル電気泳動 PCR 阻害

I はじめに

カワバタモロコ *Hemigrammocypris neglectus* は、静岡県以西の本州太平洋側、四国地方瀬戸内海側および九州地方北部に分布する日本固有の淡水魚である¹⁾。本種は環境省レッドリスト 2020 で絶滅危惧 IB 類(EN)に選定されるだけでなく、生息が確認されている全ての府県のレッドリストまたはレッドデータブックにおいて絶滅危惧種に選定されている。本県では現在までに 14ヶ所のため池と 4 河川で天然分布が確認されているが、今も本種が生息しているのは 7ヶ所のため池と 1 河川のみ²⁾であり、その生息地の把握と保全の必要性は高まりつつあると言える。

近年、新しい生物調査方法として、環境 DNA 分析が急速に広まっている。環境 DNA とは、環境中に放出された DNA のことで、水中には配偶子、粘液、および排泄物などに由来すると考えられている DNA が含まれている³⁾⁴⁾。この環境 DNA を分析することで、生息する生物種の推定が可能となる。環境 DNA 分析は、採水するだけで生物分布を調査することのできる非侵襲的な手法であり、調査の際に生息場所を攪乱することがないことから⁵⁾、希少種を対象とした研究例が報告されている⁶⁾⁷⁾⁸⁾。カワバタモロコは兵庫県での研究例があり、リアルタイム PCR による検出系が確立されている⁹⁾。リアルタイム PCR を用いる分析においては高額な機器や試薬類を必要とするため、その実施は一部の研究機関に限られている⁹⁾。そこで本

研究では、公表されているカワバタモロコ検出用プライマー・プローブセットのうちプライマーのみを用い、検出方法をリアルタイム PCR からアガロースゲルに改変して、香川県内の生息地の水からカワバタモロコの DNA を検出できるかを検証した。

II 方法

1 カワバタモロコ検出用プライマーの確認試験

福岡ら⁹⁾のプライマー：Hra-CyB-F (5' -CACCCCAGCAAA CCCCTTA-3')、Hra-CyB-R (5' -ACTAGAATAGAGAACAGTAACGC GAGAA-3') を使用して、香川県に生息するカワバタモロコの DNA を増幅できるかどうかを確認する試験を行った。

(1) 採捕・DNA 抽出

2020 年 7 月に東讃地域のため池で希少野生生物保護推進員とともにモンドリを用いてカワバタモロコを採捕し、氷冷して実験室に運搬し、-20℃で保存した。この個体の筋肉組織約 25mg から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。

(2) PCR

5 μL の KOD One PCR Master Mix -Blue- (東洋紡)、終濃度 0.3 μM の各プライマー、およびテンプレート DNA (10ng 未満) を含む全量 10 μL の PCR 反応液を調製した。最適アニーリング温度を決定するため、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ) を用いて、グラジエント PCR (54~65℃) を行った。98℃で 10 秒、各

アニーリング温度で 5 秒、68°C で 1 秒からなるサイクルを 30 回繰り返した。

(3) PCR 産物の検出

アガロースゲル電気泳動は、3%ゲル(PrimeGel Agarose PCR-Sieve HRS(タカラバイオ))を使用し、PCR 産物 4 μ L を泳動した。電気泳動後、Gel Red(Biotium)を用いて染色し、紫外線照射下で、132bp の DNA 断片が増幅されているかどうかを確認した。

2 環境 DNA 分析

(1) 採水・濾過

1(1)で個体を採捕したため池において、2023年2月に未使用の滅菌済みプラスチック製ボトルを用いて表層水を直接採水した。採水した水試料は保冷して実験室に持ち帰り、ガラス繊維濾紙 GF/F(Cytiva)を用いて濾紙 1 枚あたり 200mL を吸引濾過した。濾紙はアルミホイルで遮光しチャック付きビニール袋に入れ、DNA 抽出までの間-30°Cで保存した。

(2) DNA 抽出

濾紙からの DNA 抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit を用いた。(1)で保存した濾紙を室温で解凍して細い円筒形状に折り畳み、事前にポリエチレンフィルターを除去した EconoSpin 空カラム(ジーンデザイン)1 本に対して 1 枚入れた。4000 $\times g$ で 2 分間の遠心分離を行って濾紙を脱水し、コレクションチューブを交換した。400 μ L の Buffer AL、40 μ L の Proteinase K を混合した溶解液を濾紙に添加し、56°C で 60 分間インキュベートした。その後、4000 $\times g$ で 2 分間の遠心分離を行って濾液を回収した。220 μ L の TE (pH 8.0) (ニッポンジーン)を濾紙に添加し、室温で 1 分間インキュベートした後、4000 $\times g$ で 2 分間の遠心分離を行って、再度濾液を回収した。コレクションチューブに回収した濾液を 2mL チューブに移し、400 μ L の 99.5%エタノール(富士フィルム和光純薬)を添加し、よく混合した。この混合液 600 μ L を DNeasy Mini Spin Column に移し、6000 $\times g$ で 1 分間の遠心分離を行って濾液を捨てる操作を濾紙 1 枚分(濾過量 200mL)または濾紙 2 枚分(濾過量 400mL)の混合液全量がなくなるまで繰り返した。以降は溶出工程で Buffer AE を 100 μ L 添加して 5 分間インキュベートしたことを除きキット付属のプロトコルどおり操作し、環境 DNA 抽出液を得た。

なお、全ての遠心操作は室温で行った。

(3) 環境 DNA 抽出液の精製

PCR 阻害対策として、環境 DNA 抽出液を 60 μ L ずつ

OneStep PCR Inhibitor Removal Kit(以下 OneStep、ZYMO RESEARCH)または DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit(以下 PowerClean、QIAGEN)を用いて精製し、各 60 μ L の精製液を得た。

(4) PCR

10 μ L の KOD One PCR Master Mix -Blue-、終濃度 0.3 μ M の各プライマー、および 2 μ L のテンプレート DNA を含む全量 20 μ L の PCR 反応液を調製した。テンプレート DNA には、環境 DNA 抽出液または各精製液の未希釈、5 倍希釈、10 倍希釈を使用し、それぞれ 5 回繰り返した。ポジティブコントロールには、カワバタモロコの筋肉組織から抽出した DNA を用いた。PCR 反応には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用い、98°C で 10 秒、60°C で 5 秒、68°C で 10 秒からなるサイクルを 45 回繰り返した。

(5) PCR 産物の検出

PCR 産物 5 μ L を 1(3)と同様に電気泳動し、バンドの濃淡に関わらず目的の DNA 断片の増幅を確認できた回数を記録した。

III 結果および考察

1 カワバタモロコ検出用プライマーの確認試験

設定した全てのアニーリング温度で正常に増幅したことから、福岡らのプライマーは、香川県のカワバタモロコにも使用可能であることが確認できた(図 1)。ただし、今回はリアルタイム PCR から一般的な PCR とアガロースゲル電気泳動に検出方法を変更したため、福岡らの報告のうちプライマーのみを用いており、今後検出方法をリアルタイム PCR に変更する場合は確認試験が必要である。

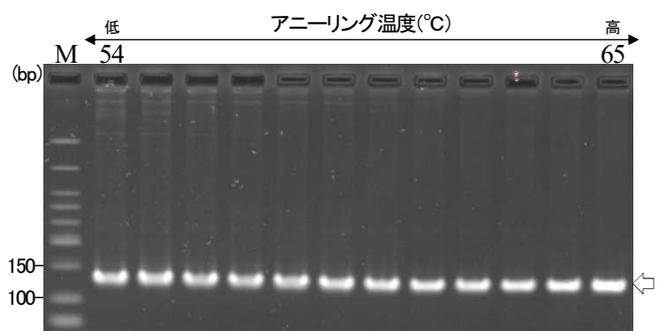


図 1 カワバタモロコの筋肉組織 DNA を使用したアニーリング温度の検討結果

M : Low Molecular Weight DNA Ladder (New England Biolabs)
 ◄ : ターゲット増幅領域長 132bp の位置

2 環境 DNA 分析

表 1 に各テンプレートの増幅確認数を示す。濾過量 200mL/精製なしでは、未希釈で増幅が確認できず、5 倍希釈と 10 倍希釈で増幅が確認されたが、バンドは 10 倍希釈よりも 5 倍希釈の方が濃くなった。また増幅確認数の合計は 5 回であった (図 2-A)。濾過量 400mL/精製なしでも同様の傾向であったが、バンドは 5 倍希釈よりも 10 倍希釈の方が濃くなり、増幅確認数の合計は 9 回であった (図 2-B)。

濾過量 200mL よりも 400mL で増幅確認数が多くなったことから、検出率向上のためには濾過量の増加が有効であることが明らかとなった。これは、濾過量を増やすことにより、濾紙上に回収される DNA の量が増加したためと考えられる。

一方で、濾紙上には環境水中に含まれている PCR 阻害物質も捕集され、DNA と併せて溶出される。今回、得られ

た環境 DNA 抽出液が褐色に着色していたことから、多量の PCR 阻害物質が含まれており、未希釈では増幅しなかったと考えられた。また、濾過量 400mL では阻害物質の量が 200mL よりも多くなったため、5 倍では希釈が不十分であり、10 倍希釈のバンドが濃くなったと考えられた。

表 1 各テンプレートの増幅確認数(5 繰り返し)

濾過量	200mL				400mL			
	未希釈(1倍)	5倍	10倍	計	未希釈(1倍)	5倍	10倍	計
精製なし	0	2	3	5	0	5	4	9
精製あり(OneStep [®])	0	4	3	7	0	4	5	9
精製あり(PowerClean [™])	5	2	1	8	5	5	2	12

*:OneStep PCR Inhibitor Removal Kit

** :DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit

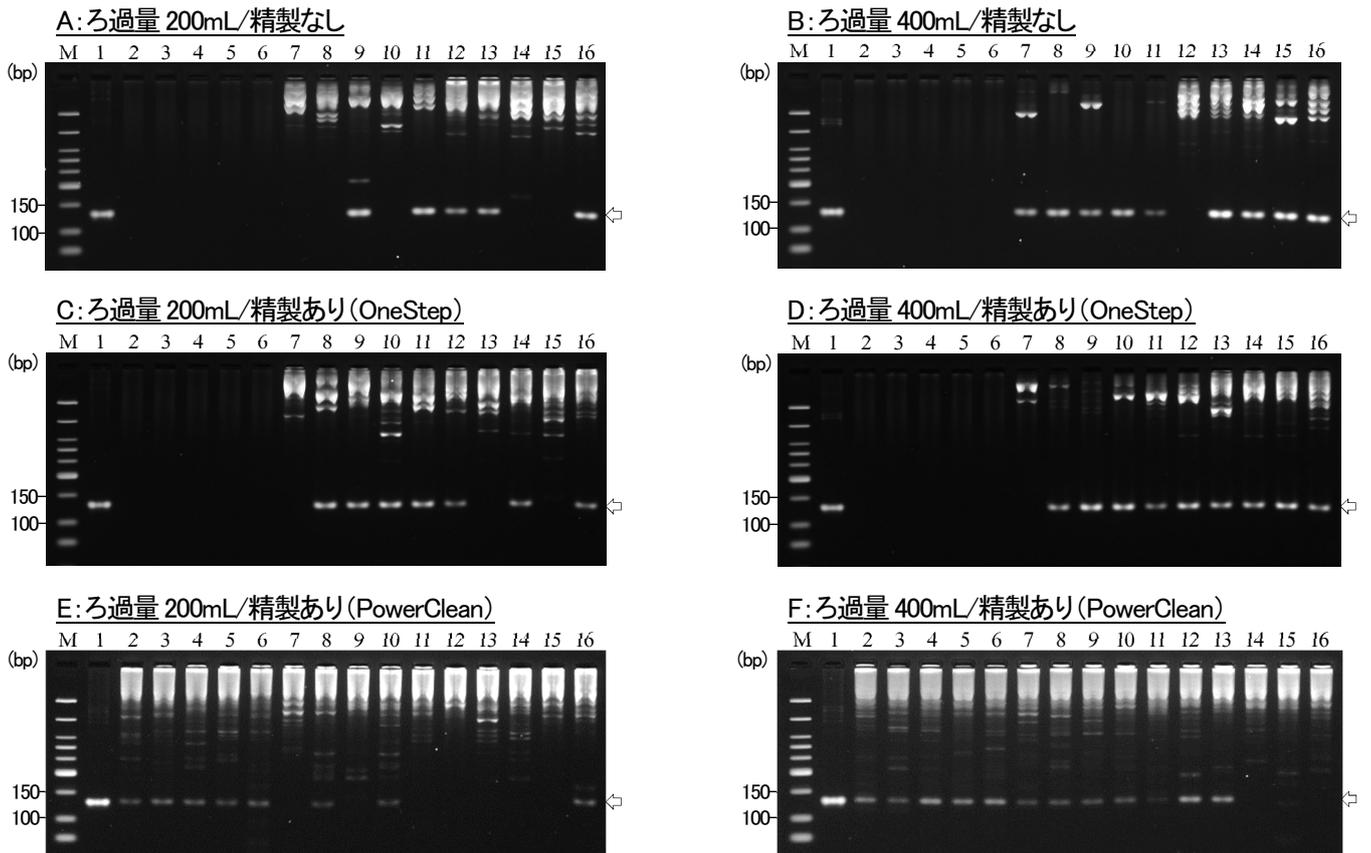


図 2 環境 DNA を使用した PCR 産物の電気泳動結果

M : Low Molecular Weight DNA Ladder(New England Biolabs) 1 : PC
 鋳型 DNA は、未希釈(2-6), 5 倍希釈(7-11), 10 倍希釈(12-16)とした
 ◁ : ターゲット増幅領域長 132bp の位置
 OneStep : OneStep PCR Inhibitor Removal Kit
 PowerClean : DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kit

Minegishi et al.¹⁰⁾は、抽出したDNAをさらに精製することでPCR阻害が解消されると報告しており、本研究でも2つのキット(OneStepまたはPowerClean)を用いて精製の効果を検討した。OneStepを用いて精製した場合には、精製なしと同様に、いずれの濾過量でも未希釈で増幅が確認できず、5倍希釈と10倍希釈で増幅が確認できた(図2-C、D)。一方PowerCleanを用いて精製した場合には、いずれの濾過量でも未希釈で増幅が確認でき、希釈により逆にバンドが薄くなった(図2-E、F)。

OneStepを用いて精製した場合には効果が見られなかったのに対し、PowerCleanを用いた場合には未希釈で安定して増幅が確認できたことから、精製キットによってPCR阻害物質除去効果に違いがあり、目的に合ったキットを使用することで検出率が向上する可能性が高いと考えられる。ただし、精製なしと比較してPowerCleanではバンドが薄くなっており、精製過程でDNAの損失があることが示唆された。

今回、抽出したDNA溶液の希釈やDNA溶液をさらに精製する工程の追加によってPCR阻害の影響を低減し、生息地の水から対象種のDNAを検出することができたことから、環境DNA分析を生息モニタリングに活用することが期待できる。今後は本研究で検討したプロトコルを適用し、個体密度の低い生息地や非生息地も対象として検出感度や偽陽性についての検証を行いたい。

謝辞

カワバタモロコの採捕にご協力いただきました香川県立高松工芸高等学校の安芸昌彦教諭に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) 前畑政善, 環境省(編): カワバタモロコ, レッドデータブック2014 4 汽水・淡水魚類—日本の絶滅のおそれのある野生生物—, 168-169, ぎょうせい, (2015)
- 2) 安芸昌彦, 安芸嘉彦, 特定非営利活動法人みんなでつくる自然史博物館・香川(編): カワバタモロコ,

香川県レッドデータブック2021 香川県の希少野生生物, 286, 香川県, (2021)

- 3) Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P.: Species detection using environmental DNA from water samples, *Biology Letters*, 4(4), 423-425, (2008)
- 4) Barnes, M. A. and Turner, C. R.: The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics, *Conservation Genetics*, 17, 1-17, (2016)
- 5) 高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子: 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して～, *日本生態学会誌*, 66(3), 583-599, (2016)
- 6) Fukumoto, S., Ushimaru, A., Minamoto, T.: 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(2), 358-365, (2015)
- 7) Sakata, M. K., Maki, N., Sugiyama, H., Minamoto, T.: Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, *Acheilognathus typus*, in a natural river in Japan, *The Science of Nature*, 104(11), 100, (2017)
- 8) 山崎裕治, 西尾正輝: 簡易的な環境DNA分析方法を用いた絶滅危惧種イタセンパラの検出, *魚類学雑誌*, 66(2), 171-179, (2019)
- 9) 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: 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(3), 613-620, (2016)
- 10) Minegishi, Y., Wong, M. K.-S., Kanbe, T., Araki, H., Kashiwabara, T., Ijichi, M., Kogure, K., Hyodo, S.: Spatiotemporal distribution of juvenile chum salmon in Otsuchi Bay, Iwate, Japan, inferred from environmental DNA, *PLOS ONE*, 14(9), e0222052, (2019)