

[自主研究]

# 県内河川の魚類生息密度推測法への環境DNA分析の適用の検討

木持謙 渡邊圭司 田中仁志

## 1 目的

これからの水環境施策は、水生生物多様性の保全・改善も視野に入れた対応や、希少種保全策・外来種対策などが重要である。そのためには、生物の生息実態の正確な把握に基づく生息環境の適正な評価が必要となるが、実捕獲に基づく従来の生物調査法は、①多くの人員と時間が必要、②調査者の技術が結果に影響する可能性、③作業に伴い生息環境を荒らす恐れ(特に希少生物調査の場合)といった課題があった。

そこで、近年注目されている、環境DNA分析による生物調査手法の併用で、調査の効率化と精度改善が期待される。生物から排泄物や代謝物等を通じて環境中に放出されたDNAを環境DNAとよび、これを分析することで、存在する生物の種類や調査対象となる生物の在・不在等を調べることができる。

本研究では、特定外来生物のコクチバス (*Micropterus dolomieu*) を対象に、魚類生息密度推測法への環境DNA分析の適用を検討した。本種は最大約50cmに成長し、魚類・水生昆虫等を食害する。低水温に強く、流れのある環境にも生息可能なことから、河川の多い本県では特に問題視されている。

## 2 方法

### 2.1 コクチバス DNA 検出・定量法の構築

既往研究等も参考に、本種や近縁種オオクチバスの体組織(尾鱗)とこれらの飼育水槽水を用いて、本種のDNAを特異的に増幅・可能なPCRプライマーについて検討した。定量PCRについてはインターカレーター法によるリアルタイムPCRを用い、DNA増幅・検出の適正条件を検討した。

### 2.2 コクチバス放出 DNA の挙動の検討

水槽実験により、本種から水中へのDNA放出と、主に生分解に起因するとされる減衰の挙動を検討した。水槽に水5L、微生物植種源5mL、本種1個体(生体)を投入し、6時間後に個体を取り出した。水(DNA)試料の採取は、個体投入時、取り出し時、取り出し後24時間経過時に行った。

### 2.3 モデル河川等におけるコクチバス DNA 検出感度と生息密度推測法の検討

入間川水系の7地点を対象に、季節ごとに2年間の調査・試料採取を実施した。また、入間川本種の高密度生息地点において、流下方向に詳細な調査を行った。

## 3 結果及び考察

### 3.1 コクチバス DNA 検出・定量法の構築

Thomasら<sup>1)</sup>の研究を基に実施した、プライマーセットのPCR検討結果を図1に示す。コクチバスの体組織と水槽水のみで

DNA増幅がみられたが、オオクチバスのDNAの増幅やプライマーダイマー等のバンドはみられなかった。したがって、このプライマーは、本種の特異的検出に有効であることがわかった。

### 3.2 コクチバス放出DNAの挙動の検討

水槽水中のDNA数は、個体の投入後に増大した(1,500copies/ $\mu$ L $\rightarrow$ 5,300copies/ $\mu$ L)が、個体取り出し後、24時間で約1/10(520copies/ $\mu$ L)に減少した。よって、水槽レベルで生体からのDNA放出と減衰の挙動を追跡することができた。

### 3.3 モデル河川等におけるコクチバス DNA 検出感度と生息密度推測法の検討

河川水試料では本種のDNAは全て定量下限未満だったが、DNAの検出自体はできているものがほとんどであった(図には示さず)。したがって、分析過程のさらなる検討で定量下限を下げる等により、定量できる可能性がある。また、リアルタイムPCRに比較して、より高感度な絶対定量技術とされるデジタルPCRの適用も有望と考えられる。

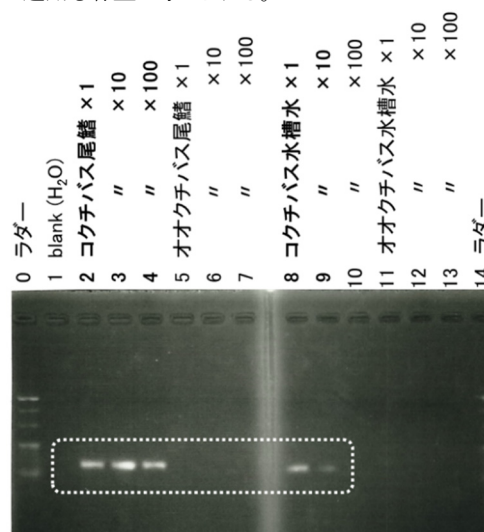


図1 電気泳動結果

## 4 今後の課題と展望

フォローアップとして、リアルタイムPCRの定量性改善を中心に検討する。続いて、生息密度予測等を含めて検討、とりまとめていく。なお、定量精度の検討にあたり、本研究と共通の調査地点における魚類環境DNA網羅解析(定性評価、既にデータは得られている)の結果も活用していく。

## 文献

1) W. F. Thomas *et. al.* (2018) Northwest Science, 92, 149-157.