

# 環境 DNA 技術を用いたカラスガイのモニタリング手法の検討（第 2 報）

【水環境対策チーム】

盛山哲郎、増川正敏<sup>1)</sup>、羽田智栄<sup>2)</sup>、成岡朋弘

## 1 はじめに

生物の生息状況の情報は生物を対象とする研究を行う上で必須である<sup>1)</sup>。しかし、実際に生息状況を調べるためには、生物の捕獲調査などを行う必要があるため、大変な労力がかかるほか、見分けが困難な生物種の場合、種の同定ができる専門家の協力が必要となってくる<sup>1)2)3)</sup>。そこで近年、従来の調査法を補う手法として「環境 DNA 技術」と呼ばれる分析手法が急速に発展している<sup>1)3)4)</sup>。

環境 DNA とは、水などの環境中に存在する生物由来の DNA のことである<sup>5)</sup>。環境 DNA 技術とは、環境 DNA を調べることで、同 DNA の有無から調査対象の生物の存否を推定することができる技術である<sup>6)7)</sup>。環境 DNA 技術のメリットは、調査地での作業が水を採取するだけなので対象生物を捕獲する必要がないことから簡便であることであり、生物の生息状況の調査を迅速化することが可能となる<sup>2)4)8)9)</sup>。

一方、イシガイ類の淡水産二枚貝であるカラスガイ *Cristaria plicata* は、現在、環境省レッドリストで準絶滅危惧種に、鳥取県では特定希少野生動植物に指定されている。本県のレッドデータブックによるとカラスガイの生息地は県東部の湖山池と多鯰ヶ池とされているが<sup>10)</sup>、湖山池では、平成 24 年 3 月から開始された汽水化事業により湖内のカラスガイの個体群は絶滅したことが確認された<sup>11)12)</sup>。このため、県内において確認されているカラスガイの生息地は、公に知られる場所としては多鯰ヶ池のみとなり、その他個人所有の 2 つの農業用ため池での生息が確認されているのみである<sup>11)12)</sup>。

カラスガイの保全の必要性がこれまで以上に高まったことから、カラスガイの生息が確認されているため池とされていないため池の両方において本種の生存・生息確認手法の一つの可能性として、環境 DNA 技術を用いたモニタリング手法を検討したので本稿で報告する。

## 2 研究方法

### 2.1 カラスガイの環境 DNA 検出系の設計

カラスガイの存在を確認するためには、近縁種の

DNA を誤って検出することがないように、カラスガイの DNA を特異的に検出する手法（以下「検出系」という。）を作製する必要がある。第 1 報で報告したとおり、本研究では PCR による検出系の設計を行った<sup>13)</sup>。検出の対象は湖山池周辺水域とし、当該水域に生息することが知られているカラスガイの近縁種（イシガイ類）を下記のとおり 4 種選定した。

イシガイ、ヌマガイ、ニセマツカサガイ、タガイ

上記 4 種の近縁種とカラスガイ（以下「湖山池周辺水域のイシガイ類」という。）の遺伝子情報を DNA データベースの DDBJ (DNA Data Bank of Japan) から入手し、プライマー設計ツールの Primer-BLAST (NCBI (National Center for Biotechnology Information) 提供) を用いてカラスガイのミトコンドリア 16SrRNA 遺伝子に特異的なプライマーを設計した。

### 2.2 カラスガイの検出系の確認試験

設計したプライマーが、実際にカラスガイの DNA のみ特異的に増幅し、近縁種 4 種の DNA を誤増幅しないかどうかを確かめる試験を行った。

#### 2.2.1 DNA 抽出

湖山池周辺水域のイシガイ類（各種 2 個体（①、②とする）ずつ）の軟体部外側を滅菌綿棒でぬぐうことによって粘液を 2017 年 10 月に採取した。この綿棒から QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA 抽出した。

#### 2.2.2 PCR 反応

各 DNA 抽出サンプルを用いて、1 次 PCR と 2 次 PCR (nested PCR) の連続した 2 回の PCR (使用装置：バイオ・ラッドラボラトリーズ社製 S1000 Thermal Cycler) を行った。2 回の PCR を行った理由は、検出感度を高めるためである<sup>14)</sup>。PCR 反応条件は表 1 のとおりであり、使用した酵素は KOD-Plus-Neo (東洋紡社) で、アガロースゲル電気泳動にて目的の DNA 断片（以下「目的断片」という。）が増幅されているかどうか確認した。

1) 現 鳥取県水環境保全課、 2) 現 鳥取県健康政策課

表1 PCRプログラム

○PCRプログラム (1次PCR、2次PCR)	
熱変性	: 94°C, 2分
熱変性	: 98°C, 10秒
アニーリング	: 55°C, 45秒
伸長反応	: 68°C, 1.5分
} 30 サイクル	

### 2.3 生息池の水と飼育水槽の水での検出系の実証試験

本検出系の有用性を確認するため、鳥取県内で既にカラスガイが存在している生息地のA池、B池、多鯰ヶ池の3池で1池当たり3箇所において、表層水2Lずつ採水した。A池の採水箇所をA1、A2、A3、B池の採水箇所をB1、B2、B3、多鯰ヶ池の採水箇所をT1、T2、T3とする。

また当研究所では、湖山池の汽水化事業によって絶滅したカラスガイの再生に向けて、付近のため池で発見された湖山池のカラスガイと同系統のカラスガイを元にして、カラスガイ稚貝を2016年度から2018年度にかけて人工的に生産しており<sup>15)</sup>、カラスガイ稚貝の飼育水槽2個(S3、S4)においても、1個につき2Lずつ採水した。

採水時期は、A池と飼育水槽の水は2018年3月、B池と多鯰ヶ池の水は2018年8月である。

#### 2.3.1 ろ過、DNA抽出、PCR反応

3地点の生息池の水と飼育水槽の水を、ガラス繊維ろ紙GF/D(粒子保持能:2.7μm)とGF/F(粒子保持能:0.7μm)を用いて2L全量を吸引ろ過した(GF/Fの上にGF/Dを重ねた)。ろ過後のGF/DとGF/Fを別々のマイクロチューブに入れた後は、2.2と同様の条件で、DNA抽出、PCRを行い、その後、アガロースゲル電気泳動を行った。なおPCRで用いたPC(ポジティブコントロール)は、2.2.1でDNA抽出したカラスガイのサンプルである。

#### 2.3.2 DNAシーケンス

A池と飼育水槽の水に由来する2次PCR産物をMonoFas DNA精製キットI(GLサイエンス製品)で精製し、BigDyeTerminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems製品)にて、設計したプライマーを用いてサイクルシーケンスを行った。BigDye Xterminator精製キット(Applied Biosystems製品)で精製後、塩基配列の読み取りにはDNAシーケンサー(Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)を使用して、両側読みによりDNAの塩基配列を確認した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 カラスガイの検出系の確認試験(図1)

確認試験を行う前に設計したプライマーは近縁種4種のDNAを誤増幅しないことをPrimer-BLASTで理論上確認しているものの、実験結果によると、1次PCRで目的断片(144bp)はカラスガイのみならずタガイ②でも確認された(図1(a))。2次PCRで目的断片(121bp)はカラスガイのみならず、タガイ①、②とヌマガイ①でも確認された(図1(b))。これらの近縁種のDNAが誤増幅された要因について次のとおり考察した。

1次PCRに供した近縁種のDNAの濃度(PCR反応液内での終濃度)は、使用した酵素の製造メーカーが推奨する範囲内の2ng/μL程度であったが、このDNA濃度が高すぎた可能性が考えられる。他の環境DNAの研究例では、PCRに供した近縁種のDNAの濃度(PCR反応液内での終濃度)は5pg/μLという報告がある<sup>16)</sup>。今回、検出系の確認試験では生体から直接ぬぐった粘液(以下「ぬぐい液」という。)を使用した。本検出系を実際に自然生態系で運用する段階においては、環境水を対象とすることになる。近縁種生息地の環境水の方が、ぬぐい液より、近縁種のDNA濃度はかなり低いものと予想されるため、近縁種のぬぐい液のDNAサンプルを薄めた試料を作製して、検出系の確認試験を行う方法もあったかと考えられる。

また、近縁種のDNAが誤増幅された考えられるその他の要因としては、今回、誤増幅されたタガイとヌマガイの遺伝子配列は、DNAデータベースに登録されていない変異を持ったDNA配列だった可能性も否定できない。さらに、Primer-BLASTにおいては、設計したプライマーは近縁種4種のDNAを誤増幅しなかったが、実際に確かめたところ誤増幅されたことから、プライマー設計の改善の余地も残されていると考えられる。

### 3.2 生息池の水と飼育水槽の水での検出系の実証試験(図2、図3、図4)

A池のA1で採水した水をGF/D、GF/Fでろ過したDNA抽出サンプルの名前をそれぞれA1D、A1Fとする。その他の生息地や飼育水槽で採水した水のDNA抽出サンプルの表記名についても前述と同様とする。

#### 3.2.1 1次PCR(図2(a)、図3(a)、図4(a))

1次PCRを行ったところ、生息池の水では、多鯰

ヶ池の1サンプルT2Fで若干目的断片(144bp)が確認されたが、これ以外のA池、B池、多鯰ヶ池のサンプルにおいては、目的断片は全て確認されなかった。

飼育水槽の水は4つのサンプル(S3D、S3F、S4D、S4F)全て目的断片(144bp)が確認された。

### 3.2.2 2次PCR(図2(b)、図3(b)、図4(b))

2次PCRを行ったところ、A池、B池、多鯰ヶ池の各3箇所の水はGF/Fでろ過したサンプル(A1F、A2F、A3F、B1F、B2F、B3F、T1F、T2F、T3F)から目的断片(121bp)が確認され、GF/Dでろ過したサンプルからは目的断片は全て確認されなかった。

1次PCRで上記3池の水から目的断片がほとんど確認されず、2次PCRを行うことで目的断片が確認された理由としては、環境中に存在するカラスガイの環境DNAの濃度がかなり低かったものと考えられ、実際、環境中の生物のDNAはかなり希薄であるとの報告がある<sup>4)</sup>。

飼育水槽の水は1次PCRと同様に4つのサンプル(S3D、S3F、S4D、S4F)全てから目的断片(121bp)が確認された。

### 3.2.3 DNAシーケンス

2次PCRで目的断片が確認されたA池の水のA1F、A2F、A3Fと飼育水槽の水のS3D、S3F、S4D、S4FとPCをシーケンス解析したところ、これらの目的断片(121bp)のDNA配列は、カラスガイのDNA配列と完全に一致していた。

## 4 まとめ

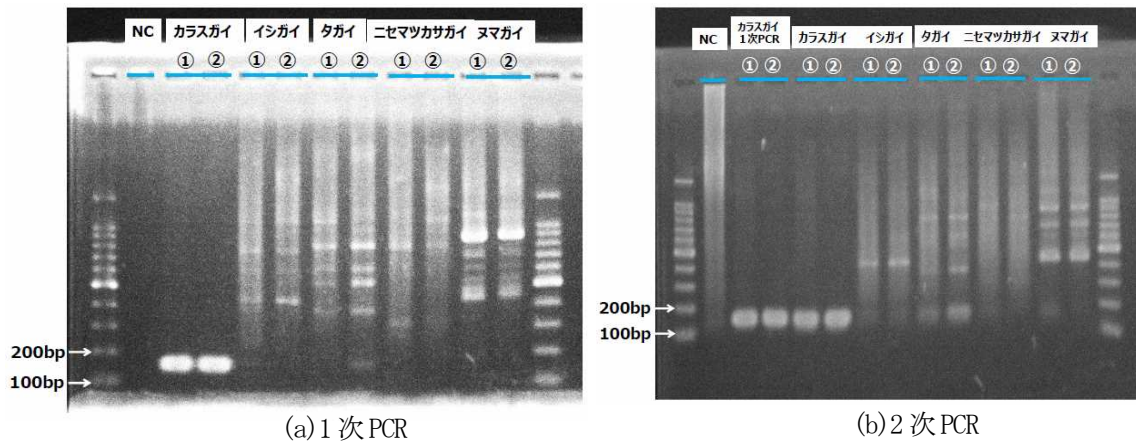
湖山池でカラスガイの個体群が絶滅したことを受け、周辺のため池等での本種の生息・生存確認手法の一つの可能性として、環境DNA技術を用いたカラスガイのモニタリング手法を検討した。今回、検出系の確認試験で近縁種のDNAが誤増幅されたことから、PCRだけでなく、シーケンス解析まで行いカラスガイの生息・生存状況を確認した。

カラスガイの生息池の水とカラスガイ稚貝の飼育水槽の水をシーケンス解析まで行うことで、カラスガイのDNAを検出できた。PCRのプライマー設計や、PCRに供する試料調整方法にも検討の余地があるものの、環境DNA技術はカラスガイの生息・生存確認に有用なモニタリング手法である可能性が示唆された。

## 5 参考文献

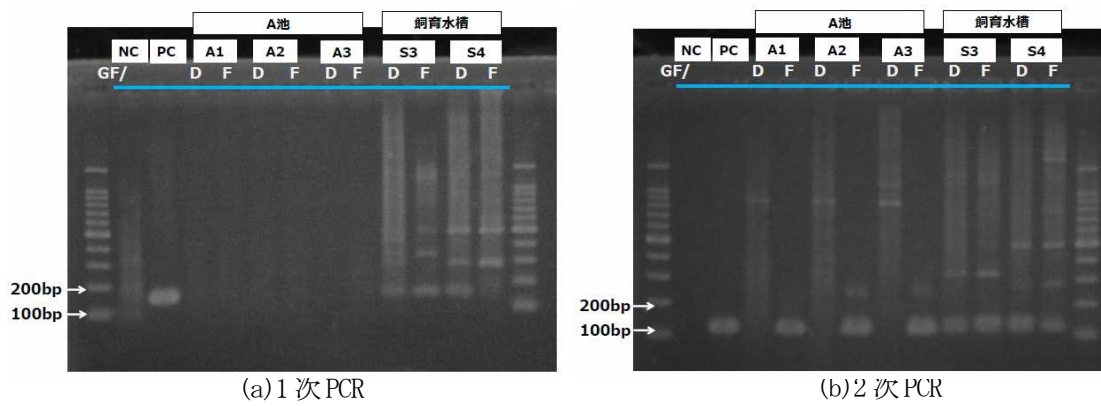
- 1) 土居秀幸：環境DNAによる新しい生物調査法, 繊維機械学会誌, 69(4), 209-211(2016)
- 2) 辻冨月, 遊磨正秀, 山中裕樹：水域における環境DNA法を用いた生物モニタリング, 龍谷大学里山学術研究センター 2014年度年次報告書, 188-191(2016)
- 3) 福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 丑丸敦史, 源利文：在来希少種カワバタモロコの環境DNAによる検出系の確立, 日本生態学会誌, 66, 613-620(2016)
- 4) 源利文：水域生態系における環境DNAモニタリング手法開発の現在, 環境技術, 46(12), 624-629(2017)
- 5) 近藤倫生：水環境における環境DNAを用いた生物モニタリング, 水環境学会誌, 41(A)(4), 118-122(2018)
- 6) 土居秀幸ほか：環境DNA技術を用いた生物分布モニタリング手法の確立, 環境省環境研究総合推進費平成27年度研究成果報告会資料(ネットde研究成果報告会), (2015), [http://www.env.go.jp/policy/kenkyu/suishin/kadai/syuryo\\_report/h27/h27\\_suishin\\_report.html](http://www.env.go.jp/policy/kenkyu/suishin/kadai/syuryo_report/h27/h27_suishin_report.html), 平成31年1月9日確認
- 7) 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, 583-599(2016)
- 8) 源利文：種特異的な環境DNA検出によるマクロ生物の生態調査, 水環境学会誌, 41(A)(4), 123-127(2018)
- 9) 内井喜美子：環境DNAによる外来種および希少種の迅速な検出, 環境技術, 46(12), 630-635(2017)
- 10) レッドデータブックとつとり改訂版, 2012年3月発行, <http://www.pref.tottori.lg.jp/95805.htm>, 平成31年1月11日確認
- 11) 鳥取県、鳥取市：汽水化に伴う湖山池の環境等の変化に関する調査報告書(2020)
- 12) 宮本康, 福本一彦, 畠山恵介, 森明寛, 前田晃宏, 近藤高貴：鳥取県における特定希少野生動物カラスガイ *Cristaria plicata* 個体群の現状：幼生と宿主魚類の関係に着目して, 保全生態学研究, 20, 59-69(2015)
- 13) 盛山哲郎, 増川正敏：環境DNA技術を用いたカラスガイのモニタリング手法の検討(第1報), 鳥取県衛生環境研究所報, 58, 17-19(2017)

- 14) 三浦泉, 川崎加奈子, 津田元彦, 藤原美智子, 立野幸治: ネステッドPCRを用いたアレルギー対応食品中の特定原材料(小麦)の検出について, 山口県環境保健センター所報, 52, 45-49 (2009)
- 15) 増川正敏, 森 明寛, 盛山哲郎, 岡本将揮, 前田晃宏: カラスガイ稚貝育成に関する一考察, 第60回鳥取県公衆衛生学会プログラム及び発表集, 110-112 (2017)
- 16) 丹羽英之, 坂田雅之, 源利文, 清野未恵子: 河川における流程500m間隔での環境DNA分析と現地採集調査による魚類検出結果の比較, 保全生態学研究, 23, 257-264 (2018)



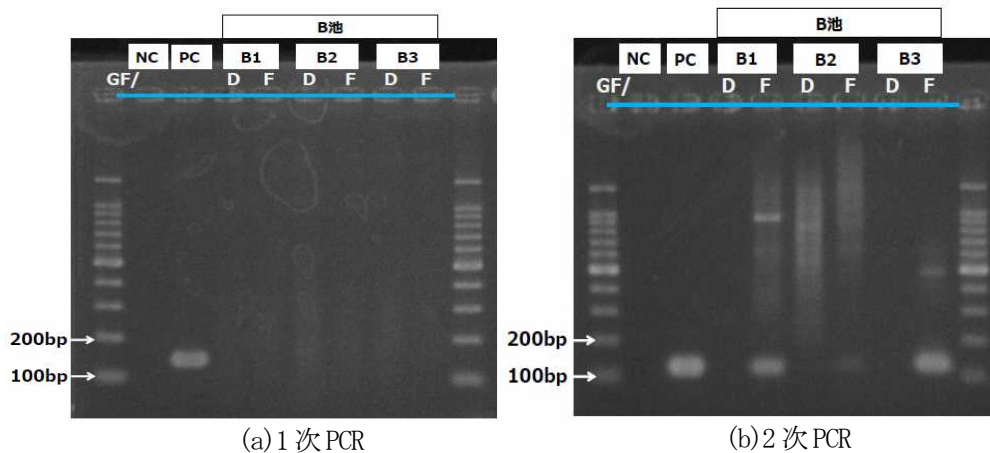
(a) 1次PCR (b) 2次PCR

図1 カラスガイの検出系の確認実験



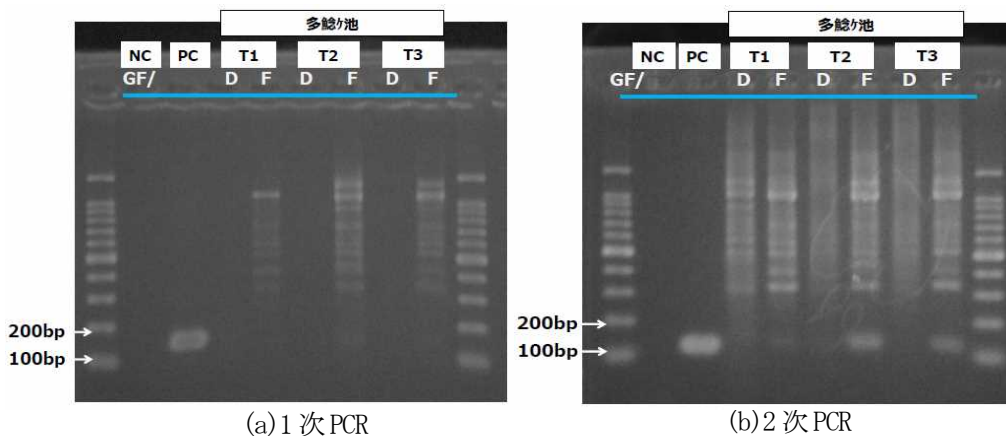
(a) 1次PCR (b) 2次PCR

図2 A池の水と飼育水槽の水での検出系の実証実験



(a) 1次PCR (b) 2次PCR

図3 B池の水での検出系の実証実験



(a) 1次PCR (b) 2次PCR

図4 多鯰が池の水での検出系の実証実験