

[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

本県環境基本計画では「川の保全と再生や生物多様性の保全」を施策展開の方向としており、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多くの人員と時間を要する、②調査者の技術練度が調査結果に影響する可能性がある、③作業に伴い生息環境を荒らす恐れがある(特に希少生物調査の場合)といった課題があった。

近年、環境DNA分析による魚類等の生息状況調査が注目されており、この手法の併用により、調査の効率化と精度の改善が期待される。環境DNAとは、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のことであり、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、魚類生息密度推測法への環境DNA分析の適用と実用化の検討を行う。具体的には、特定外来種のコクチバス(*Micropterus dolomieu*)等を対象とする。なお、本種は全長30~50cmに成長し、在来魚類・水生昆虫等を食害する。低水温に耐性がある上、流速の大きな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。

本年度は、コクチバスのDNAの増幅したい領域を特定するPCRプライマーの検討と、本種の体組織片や河川水等を用いたDNA量を増幅させるPCR条件の検討を行った。

2 方法

2.1 対象種のPCRプライマーの検討

主に既往研究等に基づき、コクチバスのPCRプライマーについて検討した。

2.2 PCR条件の検討

県内河川で捕獲したコクチバスの鱭(尾鱭先端の3mm×3mm程度)、コクチバスあるいはオオクチバスの代謝物の含有水、生息が確認されている河川水(入間川水系、図1)を用いて検討を行った。水試料については、カートリッジフィルター(ステリバックス、Merck Millipore社、孔径0.45μm、ろ過面積約10cm²)あるいはガラス繊維フィルター(GF/F、Whatman社、孔径0.7μm、ろ過面積約20cm²)を用いてろ過を行い、適正なフィルターの検討を行った。各試料からのDNA抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen社)を用いた。

PCR酵素は、KAPA HiFi HS ReadyMix (Kapa Biosystems社)を用いた。温度・時間・サイクル数を変えてPCRを実施し、アガ

ロースゲル電気泳動によりPCR産物の増幅を確認することで、適正PCR条件を検討した。



図1 採水地点の例(有間ダム)

3 結果及び考察

3.1 対象種のPCRプライマーの検討

本年度は、コクチバス、オオクチバスを含むブラックバス類を対象としたプライマーセットを用いることとした¹⁾。

3.2 PCR条件の検討

数パターン反応条件を用いてPCRを行ったところ、コクチバスの鱭試料(ポジティブコントロール)については、いずれの条件でも明瞭な1本のバンドが確認でき、本種のDNAが増幅されることがわかった。魚体代謝物の含有水試料については、本プライマーセットを用いたPCRでは、条件によって鱭試料と同位置にバンドが確認される場合、されない場合があったものの、コクチバスの方がオオクチバスよりもバンドの輝度が高い傾向があり、本種の検出感度が高い可能性が考えられた。河川水試料については、鱭試料よりもやや短鎖長側に、鱭試料ほどではないものの明瞭なバンドが見られた。PCR条件についてはさらなる検討が必要と考えられる。

一方で、フィルターの種類とPCRの結果には明確な関連性はみられなかった。取り扱いカートリッジフィルターの方が簡便であるものの、懸濁物質含有量が多い場合は、ガラス繊維フィルターの方が迅速であり、フィルターを使い分けることが有効と考えられる。

文献

- 1) J. R. Alvarado Bremer and L. Zhang (1998) A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay for the discrimination of mitochondrial DNA from the Florida and Northern subspecies of largemouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 127: 507-511.

