

## 水域における環境DNA法を用いた生物モニタリング

龍谷大学大学院理工学研究科環境ソリューション工学専攻

辻 冨月

龍谷大学理工学部教授・里山学研究センター研究スタッフ

遊磨 正秀

龍谷大学理工学部講師

山中 裕樹

### はじめに

近年、里山や里海は、いずれも山から海に至る日本の多様な自然の中で人の生活や暮らしとその周辺の自然とが関係しもたらされた空間を指す言葉として一般に用いられつつある（中村ら2010）。しかし、里山里海域の社会では人口の減少や耕作放棄地の増加、さらには生物多様性の減少といったさまざまな課題を抱えているのが現状である（北澤 2010）。

特に、生物多様性の喪失は非常に深刻な問題となっており、水域生態系においては、1970～2000年の間に、知られているだけでも内陸性水生種で約50%の減少、海洋および陸域生物種は、それぞれ約30%の減少が確認されている（環境省 2008）。刻一刻と減少する生物多様性を保全するためには、より簡便で迅速な絶滅危惧種等の生息地把握や外来種等による侵入検知が求められる。

例えば、池や河川にコイがいるか、いないかを判断するためにはどうすればいいだろうか。多くの人が、手網や投網によって直接個体を捕獲する手法や、長時間の観察により個体を直接確認する手法を思い浮かべるだろう。しかし、実際には池の水が濁って目視が困難、地形や植生により網を使えない、対象種が岩の隙間や穴の中にいる等の問題が起こるほか、見分けが困難な対象種によっては種の同定ができる専門家の協力が必要となる。そこで、水域における新しい生物モニタリング手法として近年注目を集めている環境DNA法について紹介する。

### 環境DNAとは

環境DNAとは、生物が環境中に放出した生物由来DNA断片を指す。水域に生息する生物は常に体表組織の更新や排泄などによって環境水中に自身のDNA断片を排出しており、2008年には環境水からDNAを回収して種同定を行い、脊椎動物であるウシガエルの在不在を判定した研究が世界で初めて報告された（Ficetola *et al.* 2008）。それ以降、環境DNAに関する研究は世界中で盛んに行われるようになり、2014年12月現在において筆者らが知る限りでも82報もの論文が発表されている。対象種は水域に生息する幅広い分類群（微生物、水生昆虫、甲殻類、貝類、魚類、両生類、爬虫類、哺乳類）での研究例があり、里山にも多く存在するため池のほか、湖や河川、海域に至る様々な水域での研究が進められている。

### 環境DNA法を用いた生物検出の流れ

現在主流である、種特異的に対象種の存在を明らかにする分析方法について解説する。まず、環境中に放出された対象種由来DNA断片を採水によって回収し、フィルター濾過やエタノール沈殿により濃縮する。濃縮されたDNAはDNA抽出・精製キットなどを用いてさらに濃縮・精製された後、対象種の種特異的な塩基配列領域に結合するよう設計されたプライマーと呼ばれる人工合成核酸断片を用いてPCR (polymerase chain reaction) を行い、様々な生物のDNAが混在したサンプル溶液から対象種のDNAのみを増幅・検出する。増幅対象の塩基配列には、データベースが充実していることや細胞あたりに含まれるコピー数が多いため検出上有利であると考えられるミトコンドリアDNA上の遺伝子が多く用いられている。つまり、水を汲み、DNAを集めてPCRを行うという非常に簡単なステップで対象生物の存在が確認可能なのである (図1)。

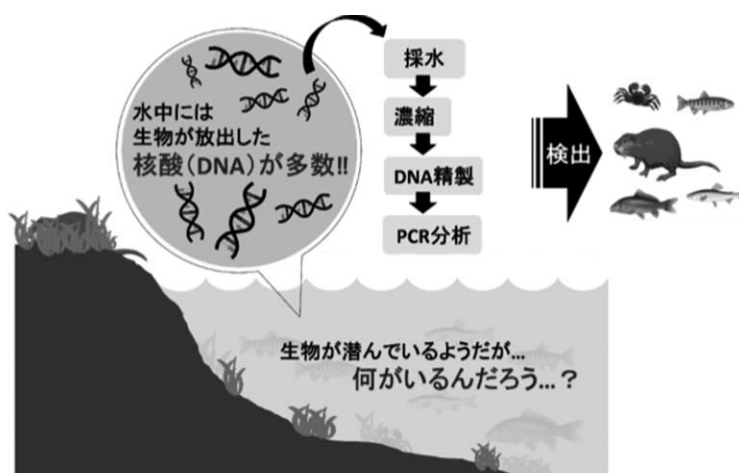


図1 環境DNA法を用いた生物検出の流れ

### 環境DNA法による生物モニタリングの研究例

環境DNA法による生物モニタリングには大きく分けて二つの方向性がある。まず1つ目は現在主流である、対象種を限定してその存在を明らかにするもので、2つ目は環境水中に漂っていたDNAの塩基配列を網羅的に解読し、種組成をまとめて明らかにするものである。

1つ目の方向性では更に、存在だけでなく生物量を推定する試みが進められている。Takahara *et al.* (2012) では、既知量のコイ *Cyprinus carpio* を放した実験池2面 (41.1m<sup>2</sup>および54.5m<sup>2</sup>) から採水をし、含まれるコイ環境DNAを定量すると、コイの生物量と環境DNA濃度に高い相関関係があることが示された。この研究により、試料水に含まれる環境DNA量を測れば、生息する対象種の生物量を推定できる可能性が示された。更に、実際の自然湖沼 (伊庭内湖、滋賀県) で湖内のコイ環境DNA濃度を定量すると、地点ごとに異なる濃度の環境DNAが検出され、野外においても環境DNA濃度の分布から対象種の分布を推定できると期待されている。

2つ目の方向性である種組成の把握についても急激に研究が進展しつつある。Minamoto *et al.* (2012) ではカワムツ *Candidia temminckii*、メダカ *Oryzias latipes*、ブルーギル *Lepomis macrochirus*、ドンコ *Odontobutis obscura*、ギギ *Pelteobagrus nudiceps* を飼育している水槽の

水から環境DNAを回収し、これらの種のDNAを同時に増幅したうえで塩基配列情報を解読している。結果、水に含まれていた環境DNAから水槽にいた多魚種を同時に検出するとともに、各魚種の水槽内密度をある程度推定することに成功した。この技術を用いれば、将来的に環境中に含まれる複数種の種組成を、水を汲むだけで推定することが可能となり、労力と時間を節約した調査を可能にすることが期待される。

### 環境DNAを生物モニタリングに用いる利点

環境DNAを調査に用いる場合、現地での作業はバケツ一杯の水を調査地からくみ上げるだけで済む（調査風景を図2に示す）ほか、対象種ごとの分析ステップが確立さえされれば、分析自体にも高度な専門知識はほとんど必要とされないため、調査者によるデータのばらつきが抑えられるとともに調査時間の短縮が可能となる。

Jerde *et al.* (2011) は、環境DNA法を用いて五大湖へのハクレン *Hypophthalmichthys molitrix* とコクレン *Hypophthalmichthys nobilis* の侵入状況を調査した。その結果、環境DNAを用いた調査では、従来の網による捕獲や電気ショッカーによる調査で示されたよりも、この2種による五大湖への侵入が進んでいることが示唆されたほか、調査全体を通して従来の手法では24人で8時間、62日を費やしたが、環境DNAを用いた調査では2週間強の調査で済むなど、時間と労力を大幅に削減したことが示された。また、Takahara *et al.* (2013) では、兵庫県内のため池70面において、ブルーギルが目視確認されたすべての池（8面）での環境DNA検出に成功したとともに、目視確認されなかった池11面でも検出が確認され、捕獲・観察法に比べて検出感度が高いことが示唆されている。



図2 採水の様子：大きな河川でも、対象種によってはたった15mLから1L程度の水を分析するだけで対象種の存在を判定できる

### 今後の課題と展望

環境DNAには未だ未解明の部分が多く残されている。例えば、環境DNAが生物から放出された後、どのくらいの時間分解されずに水中を漂っているのか、およびその分散の仕方や速度が明らかになれば、環境DNAがどこから流れてきたのかを推測し、対象生物の生息地を特定することなどが可能になるかもしれない。今後はこういった基礎研究を積み重ねていくことにより、環境DNAを用いて様々な情報を水から得ることができると期待される。また、個体群内把握においては、水中に含まれる環境DNAの個体群内変異の多少から個体群内の遺伝子多

様性解析を推定する技術等を現在開発中である。この技術を用いれば、生物個体を傷つけることなく、対象種の個体群内における遺伝子多様性を評価する有用なツールとなるほか、水産資源養殖の現場でも養殖個体の遺伝子多様性監視を簡便化することができる。また、現在は母系遺伝であるミトコンドリア上の遺伝子を種判別に用いているため難しいとされている交雑個体の検出についても、今後新たな分析技術が確立されれば外来種と在来種との交雑の進行などの評価を行うことが可能となる。

環境DNA法を用いた生物モニタリングは現在発展途上の新技術であり、これまでの生物モニタリング手法を一変させるほど大きな可能性を秘めている。世界中で多くの研究者が技術開発を行っており、今後の進展が待ち望まれている。

#### 引用文献

- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett.* 4 : 423-425.
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM (2011) "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv Lett.* 4 : 150-157
- 環境省 (2008) 地球規模生物多様性概況 2 自然環境局自然環境計画課 生物多様性地球戦略企画室
- 北澤哲弥 (2010) 里山里海の生態系評価における社会的地域区分手法 千葉県生物多様性センター研究報告 2 : 54-57
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* (2012) 13 : 193-197
- 中村俊彦、本田裕子 (2010) 里山、里海の語法と概念の変遷 千葉県生物多様性センター研究報告 2 : 13-20
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z (2012) Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS One*, 7 (4), e35868
- Takahara T, Minamoto T, Doi H (2013) Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. *PLoS One*, 8 (2), e56584