

短報 (Short Report)

環境 DNA 技術を用いた希少種スナヤツメ類の調査手法の開発

濱邊 一弥*, 長谷部 勇太

(調査研究部, *現在 水源環境保全課)

Development of a survey method for the rare species Lethenteron spp. using environmental DNA technology

Kazuya HAMABE*, and Yuta HASEBE

(Research Division, *currently Water Source Environment Conservation Division)

キーワード：環境 DNA, 魚類, スナヤツメ北方種, スナヤツメ南方種

1 はじめに

スナヤツメは主に平野部の湧水のある小河川に生息しており、国においては絶滅危惧Ⅱ類、神奈川県（以下、「県」という。）では絶滅危惧ⅠB類に指定されている希少種である。県内では鶴見川、相模川、酒匂川水系などに分布しているが、湧水域の減少や河川改修などの影響により生息地が減少している¹⁾。最近の遺伝学的な研究から、スナヤツメは遺伝的に大きく分化した北方種と南方種の二つのグループに分類され、これら両種は交雑しないことから、それぞれが別種と考えられている²⁾（以下、北方種と南方種を合わせて「スナヤツメ類」という）。北方種と南方種は外部形態からは判断が困難であることから、スナヤツメ類の種を判別するためには、DNA解析を行う必要がある。県内のスナヤツメ類は南方種に属するとされていた³⁾が、その後、神奈川県水産技術センター内水面試験場（以下、「内水面試験場」という）より、相模川水系の道保川と道志川で採集されたスナヤツメ類の遺伝子解析を行った結果、道保川のスナヤツメ類は北方種、道志川のスナヤツメ類は南方種であったと報告されている。同報告において、道保川の北方種は在来種、道志川の南方種については琵琶湖水系の移入種であることが判明した。相模川水系道志川では琵琶湖産アユの放流が毎年行われており、スナヤツメ南方種が混入して放流されたものと推定されている³⁾。このような状況により、県には外部形態では判別が困難な2種のスナヤツメ類が生息しているが、それら2種の生息分布は明確になっていない状況にある。

このようななか、近年、生物から放出され、環境中

に存在する細胞片などに含まれるDNAを解析することにより、その環境に生息する生物の種類やおおよその生物量を把握できる環境DNA調査が注目されている。従来の生物捕獲調査と比較して、環境DNAによる生物調査は以下のような特徴がある。

- ①現場の作業が採水のみで済むため、効率的な調査が可能
- ②調査結果が調査者の技術に依存しない
- ③立入が危険な河川の調査が可能
- ④捕獲困難な生物の生息状況の把握が可能
- ⑤形態では同定困難な種も判別可能な場合がある

神奈川県環境科学センター（以下、「当センター」という）では令和元年度に酒匂川水系について魚類の環境DNA調査を実施しており、その結果から酒匂川においてスナヤツメ北方種が生息していることが明らかとなった。

そこで本研究では、先に述べた環境DNA調査の特徴⑤「形態では同定困難な種も判別可能な場合がある」を生かし、形態では同定困難なスナヤツメ北方種および南方種を判別可能な環境DNA調査手法を開発し、県内におけるスナヤツメ類の生息状況を把握することを目的とする。また、スナヤツメ類の生息数が減少している河川で捕獲調査を実施することにより、環境DNA調査の精度検証を実施する。

本研究により、捕獲調査では得られない希少種の生息情報を得ることが可能となり、将来的には移入の有無なども確認することにより、河川工事等の際における適切な生態系・生育環境保全の取

組に活用することが期待できる。

2 調査方法

2.1 調査対象種

調査対象種は、スナヤツメ北方種及びスナヤツメ南方種とした。

2.2 用いる環境 DNA 分析手法

環境 DNA の分析手法は、網羅解析と種特異解析の二つに大別される。

網羅解析は、特定分類群のユニバーサルプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により対象分類群の DNA をまとめて増幅し、次世代シーケンサーを用いてそれらの塩基配列を解析することにより、対象分類群の DNA を同時並列的に分析する手法である。環境 DNA 学会の環境 DNA 調査・実験マニュアルでは、ユニバーサルプライマーとして MiFish プライマーを用いた魚類の網羅解析手法が公開されている^{4,5)}。

種特異解析は、リアルタイム PCR を用いて単一種または数種を特異的に検出する手法である。前述の網羅解析と比較して分析手順が少なく、分析に要する時間が短いというメリットがある。種特異解析手法では対象とする生物種ごとにプライマーやプローブを設計する必要がある。

本研究は希少種であるスナヤツメ類を検出対象としていることから、種特異解析手法を用いることとした。

2.3 プライマー・プローブセットの開発

種特異解析手法を用いるにあたり、スナヤツメ北方種と南方種を特異的に解析できるプライマーとプローブの設計を行った。県内ではスナヤツメ類の近縁種とされるカワヤツメ属のカワヤツメ及びシベリアヤツメ、ミツバヤツメ属ミツバヤツメの生息は確認されていないため、スナヤツメ類の両種を近縁種と設定し、プライマーとプローブの設計を行うこととした。

DNA 配列は県内の調査で得られていた既存のデータ及びアメリカ国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information, NCBI) に公開されているデータを用いた (表 1 にアクセッション番号を示す)。スナヤツメ両種の配列を比較し、ミトコンドリア DNA の 12SrRNA 領域上にプライマーおよびプローブを設計した。プライマーについてはフォワード、リバーズともに両種共通配列であり、プローブについては両種の配列間に 3 つのミスマッチを含むよう設計した。更に、特異性を高めるためにミスマッチの塩基には Locked Nucleic Acid(LNA)を用いた。プローブ設計領域において福岡県の南方種のみ他地域との遺伝的差異が含まれていたが、本研究は神奈川県内のスナヤツメ類を調査の対象としていたため、福岡県のスナヤツメ南方種は検討対象外とした。プライマー及びプローブの発注は Integrated DNA Technologies 株式会社に行った。設計したプライマー及びプローブの情報を表 2 に示す。

設計したプライマー及びプローブについては、既報により、スナヤツメ北方種が分布するとされる岐阜県五六川⁶⁾、及びスナヤツメ南方種が分布するとされる神奈川県道志川³⁾から捕獲された生体サンプルの組織片を用いて分析し、種特異的に増幅することを確認した (図 1, 図 2)。

表 1 NCBI のアクセッション番号

アクセッション番号			
NC_014270.1	AB565771.1	AB969938.1	AB969939.1
KC353466.1	LC104352.1	LC104353.1	LC277735.1
LC277736.1	LC458010.1	LC458428.1	LC492298.1
LC557051.1	LC681846.1	LC681857.1	LC681858.1
LC681859.1	LC681860.1	LC681865.1	LC681866.1
LC681867.1	LC681868.1	LC681869.1	LC681870.1
LC681907.1	LC681908.1	LC681909.1	LC681910.1
LC681918.1	LC710289.1	LC710290.1	LC729539.1

表 2 プライマー配列

種	プライマー及びプローブ	
スナヤツメ類	フォワードプライマー	5'-AGTTTGTCTAGTTGAAGTTGGC-3'
	リバーズプライマー	5'-CACCTTCCGGTACGCTT-3'
	プローブ (北方種)	5'-CCCCC <u>ACC</u> CCTA-3'
	プローブ (南方種)	5'-CCCCC <u>CTC</u> CCTT-3'

注) 太字下線の塩基は Locked Nucleic Acid(LNA)であることを示している。

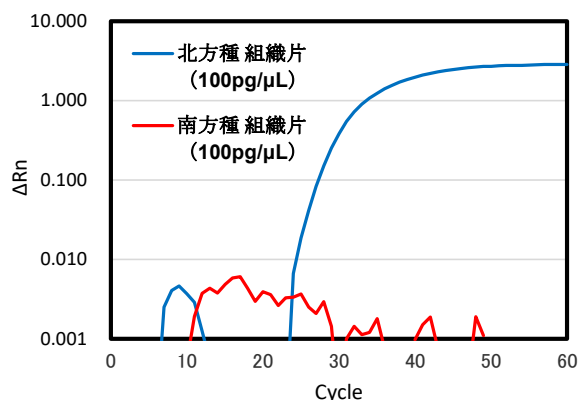


図1 プローブ（北方種）の検証結果

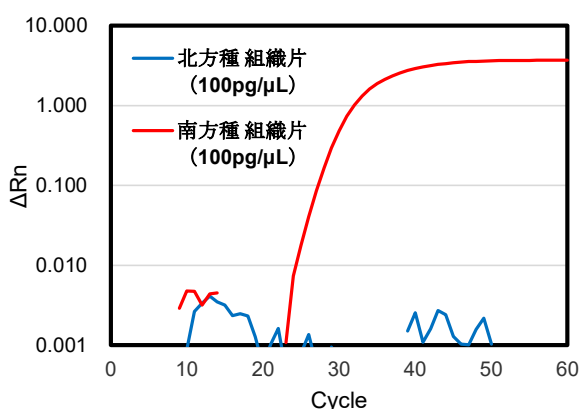


図2 プローブ（南方種）の検証結果

2. 4 調査対象河川と調査時期

調査対象河川は、相模川水系と酒匂川水系を中心に、内水面試験場や相模川ふれあい科学館から提供いただいた情報や、「神奈川県レッドデータ生物調査報告書 2006」に記載のある情報を参考に選定した。採水を行った河川の水系及び河川名を表3に示す。

採水時期は春～秋を基本としたが、調査スケジュールの関係で酒匂川水系の上総川、泉川、太刀洗川は冬季（12月）に採水を実施した。

2. 5 環境 DNA 分析手順

2. 5. 1 採水及びろ過

採水は、新品の滅菌済みポリプロピレン製広口びんを使用し、河川水 1L を採水した。採水後に DNA の分解を抑制するため、塩化ベンザルコニウムを 1mL 添加した⁷⁾。試料は冷蔵で実験室まで輸送し、実験室内においてカートリッジ型のステリベクスフィルター(Merck & Co.,Inc., 口径 0.45

μm)を使用し、ろ過を行った。このとき、ろ過ポンプと廃液タンク等を除き、コンタミネーション防止のため試料に直接触れる部分はすべて使い捨てタイプの器具を使用した。ろ過を行ったフィルターには RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を約 2mL 充填し、注入口と排出口にキャップをして DNA 抽出を行うまで-20℃の冷凍庫で保管した。

2. 5. 2 環境 DNA の抽出

ろ過したステリベクスフィルターからの DNA 抽出・精製は Wong et al.(2020)⁸⁾ のインレットから DNA 溶解液ミックスを注入する手法により実施した。

始めにシリンジを用いてフィルター内の RNALATER を除去し、そこにプロテナーゼ K 溶液 100 μL, リン酸緩衝生理食塩水 990 μL, Buffer AL910 μL の混合物を入れ、56℃で 60 分保持し、フィルターの注入口側からシリンジにより吸引し DNA 抽出液を回収した。

得られた DNA 抽出液を DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)のプロトコルに従いエタノール, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE を添加し、精製を行い、精製した DNA 抽出液 150 μL を得た。

2. 5. 3 リアルタイム PCR による分析

精製した DNA 抽出液を鋳型とし、今回開発したプライマー・プローブセットを用いて、リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific, Inc., QuantStudio3) による分析を行った。リアルタイム PCR 用試薬として 10 μL の TaqPath™ qPCR Master Mix, CG (Applied Biosystems) を使用し、終濃度 500nM の各プライマー、終濃度 250nM の北方種または南方種のプローブ及び DNA 抽出液 2 μL を混合して、反応の全量を 20 μL とした。PCR の温度条件は、50℃2分、95℃20秒の初期ステップの後、95℃1秒、60℃20秒を計 60 サイクル行った。各 DNA 抽出液について、偽陰性を最小限にするため 3 反復とした。3 反復のうち、1 つでも増幅が確認されたものを陽性として取り扱った。

2. 5. 4 捕獲調査

県在来の北方種が生息する相模川水系道保川は近年、分布域が縮小し、生息数も低下していることが報告されている³⁾ため、同河川を捕獲調査の

表3 調査地点一覧

水系	河川	地点番号	水系	河川	地点番号	
相模川	相模川	St.1	金目川	室川	St.25	
	相模川	St.2		葛川	不動川	St.26
	相模川	St.3			葛川	St.27
	相模川	St.4			葛川	St.28
	相模川	St.5	葛川		St.29	
	中津川	St.6	中村川	中村川	St.30	
	中津川	St.7		中村川	St.31	
	中津川	St.8		中村川	St.32	
	中津川	St.9	森戸川 (小田原)	森戸川	St.33	
	中津川	St.10	酒匂川	酒匂川	St.34	
	早戸川	St.11		河内川	St.35	
	水沢川	St.12		河内川	St.36	
	道志川	St.13		尺里川	St.37	
	道志川	St.14		金瀬川	St.38	
	道保川	St.15		狩川	St.39	
	姥川	St.16		狩川	St.40	
	鳩川	St.17		狩川	St.41	
	八瀬川	St.18		仙了川	St.42	
	小鮎川	St.19		要定川	St.43	
	恩曾川	St.20		洞川	St.44	
	恩曾川	St.21		上総川	St.45	
	玉川	St.22		泉川	St.46	
金目川	金目川	St.23		太刀洗川	St.47	
	鈴川	St.24		太刀洗川	St.48	

対象とし、内水面試験場の協力のもと、電気ショッカーを用いた捕獲調査を行った。

既存の生息地を調査対象区間とし（区間長 750 m 程度）、魚類調査経験のある 4 名で 2023 年 2 月 16 日に捕獲調査を行った。

3 結果

3.1 環境 DNA の分析結果

環境 DNA の分析を行った結果、酒匂川水系の 4 地点（狩川、仙了川、太刀洗川、泉川の各 1 地点）でスナヤツメ北方種の DNA が検出された。一方、スナヤツメ南方種の DNA は、相模川水系の 5 地点（相模川 1 地点、中津川 2 地点、道志川 2 地点）で検出された。環境 DNA 分析結果を図 3、図 4、図 5 に示す。

3.2 捕獲調査と環境 DNA 調査の結果の比較

相模川水系道保川における捕獲調査の結果、スナヤツメ類が 1 匹のみ捕獲された。一方、本研究における道保川の環境 DNA 調査では、いずれのスナヤツメ類の DNA も検出されなかった。

当センターには、本研究とは別の調査において、2022 年に道保川で採水された河川水の DNA 抽出液があったため、参考として分析を行った。その結果、別調査のサンプルからは、スナヤツメ北方種の DNA が検出された。

また、内水面試験場から 2010 年に水沢川で捕獲されたスナヤツメ類の生体サンプルの提供があり、組織片を分析した結果、スナヤツメ南方種の DNA が検出されたことを参考として記載する。

分析結果を図 3、図 4、図 5 に併せて示す。

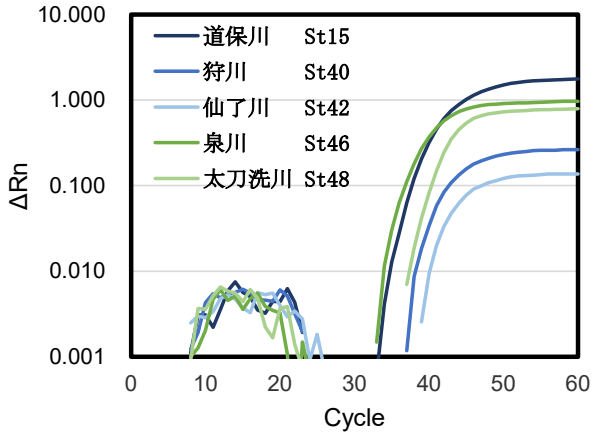


図3 北方種を検出した河川の増幅曲線

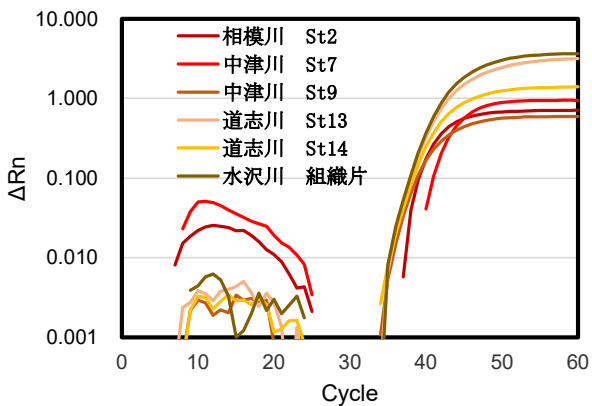


図4 南方種を検出した河川の増幅曲線

4 考察

4.1 調査河川におけるスナヤツメ類の分布

県では、県民参加による河川のモニタリング調査を毎年度実施しており、令和4年度・令和5年度の調査にて、相模川水系の中津川からスナヤツメ類が捕獲されている。また、本研究期間中には、相模川ふれあい科学館から相模川本流で捕獲されたスナヤツメ類の生体サンプルを提供いただき、同じく相模川本流でスナヤツメ類が捕獲されたとの情報提供を内水面試験場からいただいている。以上のことから相模川水系では、現在もスナヤツメ類が一定の範囲で連続的に分布していることが推定される。しかし、本研究において、相模川水系で検出されたスナヤツメ類のDNAは、本川・支川ともに南方種が中心であり、北方種のDNAが検出された河川は道保川のみであった。県在来種である北方種の生息域は、相模川水系では道保川に限られているか、もしくは個体数が非常に少ないことが推定される。相模川水系道保川や

酒匂川水系は、本県在来とされるスナヤツメ北方種が生息する貴重な水域であり、生息地の保全を行っていく必要があると考えられる。

4.2 環境DNAによる希少種調査の課題

相模川水系道保川では、捕獲調査及び他調査で採水された河川水の環境DNA分析結果からスナヤツメ類の生息が確認されたが、本調査で採水した河川水からは、スナヤツメ類のDNAは検出されなかった。これは、スナヤツメ類の生息密度が低く、河川環境に含まれるDNA量が少ないため、スナヤツメ類のDNAを検出できなかったものと考えられる。例えば、本研究では、河川水1Lを採水し、DNA抽出過程で150 μ Lまで濃縮したものから2 μ Lを分取してリアルタイムPCRによる種特異解析を行っているが、その工程における試料中にスナヤツメ類のDNAが含まれていなかった可能性がある。

環境DNAの捕集は採水量の他に、季節や採水時の河川環境、生物種の行動パターンに依存しており、種の生息密度が低い希少種の調査においては、対象となる生物の環境DNAの取りこぼしが課題になる⁹⁾。

このような課題があるなか、現在は新たなサンプリングツールが開発されており、パッシブサンプリングという手法により天然海綿を河川に24時間設置することで、河川水を2時間ごとに24時間採水したデータと同程度の種数を検出できることが報告されている¹⁰⁾。今後の更なる技術発展により、環境DNA技術を用いた、より詳細な調査が可能になることが期待される。

5 まとめ

本研究では、県内に生息する希少種であり、外部形態では種判定が困難なスナヤツメ北方種と南方種のDNAを特異的に検出可能なプライマー及びプローブを開発した。

県内水系48地点において採水を実施し、開発したプライマー及びプローブを用いて分析を行った結果、酒匂川水系の4地点(狩川、仙了川、太刀洗川、泉川の各1地点)で北方種のDNAを検出し、相模川水系の5地点(相模川1地点、中津川2地点、道志川2地点)で南方種のDNAを検出した。

環境DNA調査の精度検証のため、近年スナヤツメの生息数が減少している相模川水系道保川で捕獲調査を実施した結果、スナヤツメ類が1匹捕

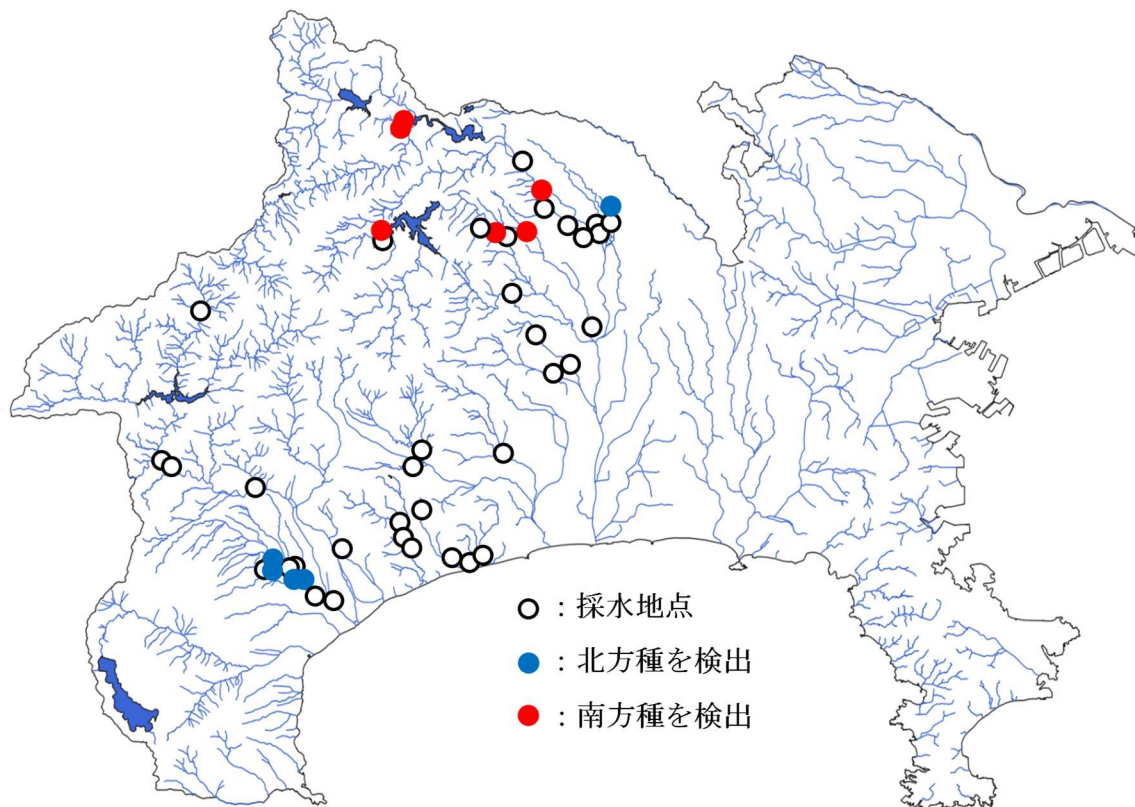


図5 調査地点及び環境 DNA 分析結果

獲された。一方,本研究における道保川の環境 DNA 調査では,スナヤツメ類の DNA は検出されず,生息密度の低い河川での環境 DNA の取りこぼしが課題となった。しかし,本研究とは別調査で採水された相模川水系道保川の河川水の分析を行った結果,スナヤツメ北方種の DNA が検出された。また,同水系水沢川のスナヤツメ類生体サンプルの DNA 抽出液から,南方種の DNA を検出した。

相模川水系道保川や酒匂川水系は, 本県在来とされるスナヤツメ北方種が生息する貴重な水域であり, 生息地の保全を行っていく必要があると考えられる。

謝辞

捕獲調査やスナヤツメ類に関する情報提供では,神奈川県水産技術センター内水面試験場の勝呂尚之氏* (*現在 かながわ淡水魚復元研究会), 井塚隆氏,嶋津雄一郎氏に協力していただいた。生体のサンプル提供やスナヤツメ類に関する情報提供では,世界淡水魚園水族館の波多野順氏,相模川ふれあい科学館の伊藤寿茂氏,竹本淳史氏* (*現在 世界淡水魚園水族館) に協力していただいた。

この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 神奈川県立生命の星・地球博物館: 神奈川県レッドデータ生物調査報告書 2006, 277-278(2006)
- 2) 山崎裕治:スナヤツメー湧水にひそむ生きた化石ー, 希少淡水魚の現在と未来 積極的保全のシナリオ, 片野修,森誠一,信山社, 37(2005)
- 3) 勝呂尚之:神奈川県の希少淡水魚生息状況ーIV (平成 17~26 年度), 22(2019)
- 4) 一般社団法人環境 DNA 学会:環境 DNA 調査・実験マニュアル, <https://ednasociety.org/manual/> (参照; 2024.12)
- 5) Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J. Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M. and Iwasaki W. ,MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine speciesR. Soc. Open Sci.2150088 (2015)

- 6) 向井貴彦・池谷幸樹・古屋康則・大仲知樹・高木雅紀・塚原幸治・寺町茂・吉村卓也:岐阜県におけるスナヤツメ北方種と南方種の分布, 日本生物地理学会会報第 66 巻,203-209(2011)
- 7) H. Yamanaka, T. Minamoto, J. Matsuura, S. Sakurai, S. Tsuji, H. Motozawa, M. Hongo, Y. Sogo, N. Kakimi, I. Teramura, M. Sugita, M. Baba and A. Kondo, A simple method for pre serving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant, *Limnology*, 17, 233-241 (2017)
- 8) Wong, M.K.S., Nakao, M. & Hyodo, S. Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Sci Rep* 10, 21531 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77304-7>
- 9) 環境省自然環境局生物多様性センター: 環境 DNA 分析技術を用いた調査手法の手引き(淡水魚類・両生類) 第 1 版,11-16(2024)
- 10) 今村史子・赤松良久・中尾遼平・五十嵐美穂・加藤靖広:環境 DNA 調査の課題を解決する新たなサンプリングツールの開発について, 建設コンサルタント業務・研究発表会論文集(建設コンサルタント業務研究発表会論文集),23rd,125-128(2023)