



環境DNA技術を活用した 希少種調査手法の開発

令和6年10月25日

発表者：調査研究部 主任研究員 長谷部 勇太

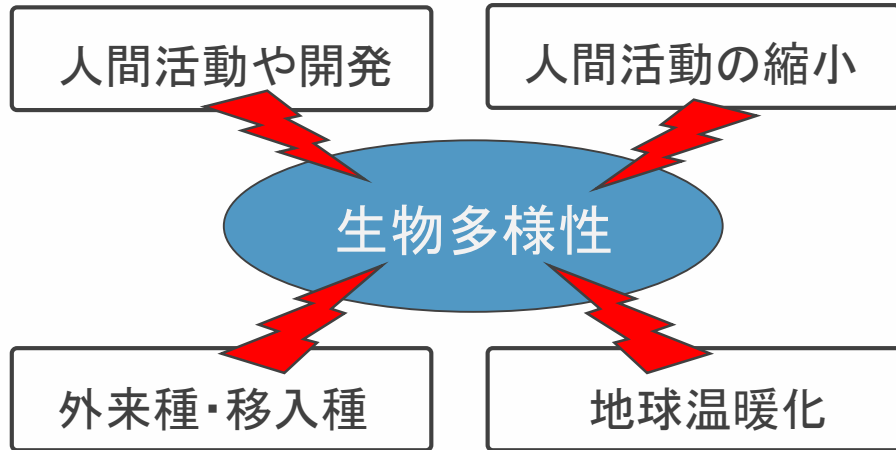
研究主任：技師 濱邊一弥

(現在の所属は水源環境保全課水源企画G)

- 研究テーマの背景・目的・手法
- 調査研究結果
- まとめ

- 研究テーマの背景・目的・手法
- 調査研究結果
- まとめ

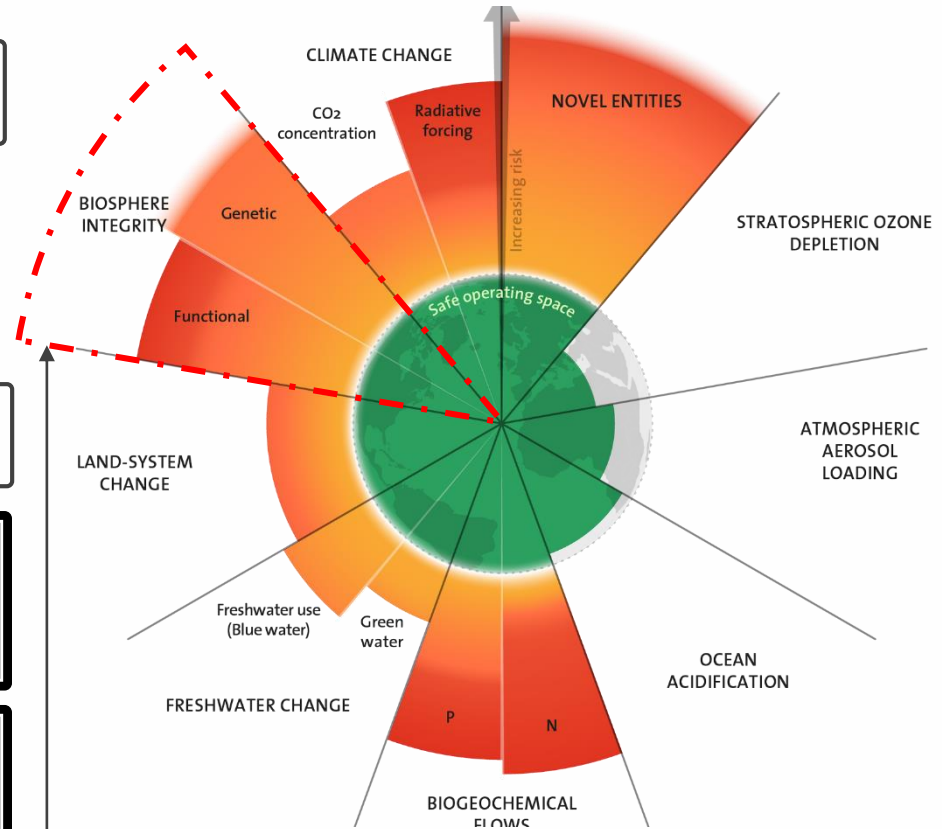
生物多様性の危機



「地球上に800万種いる動植物のうち、100万種が絶滅の危機にある」
(IPBES地球規模評価報告書2019より)

愛知目標(生物多様性のため各国が取り組む20の目標)は「いずれも完全には達成できなかった」
(2020年9月国連報告書より)

Planetary boundaries(地球の限界)

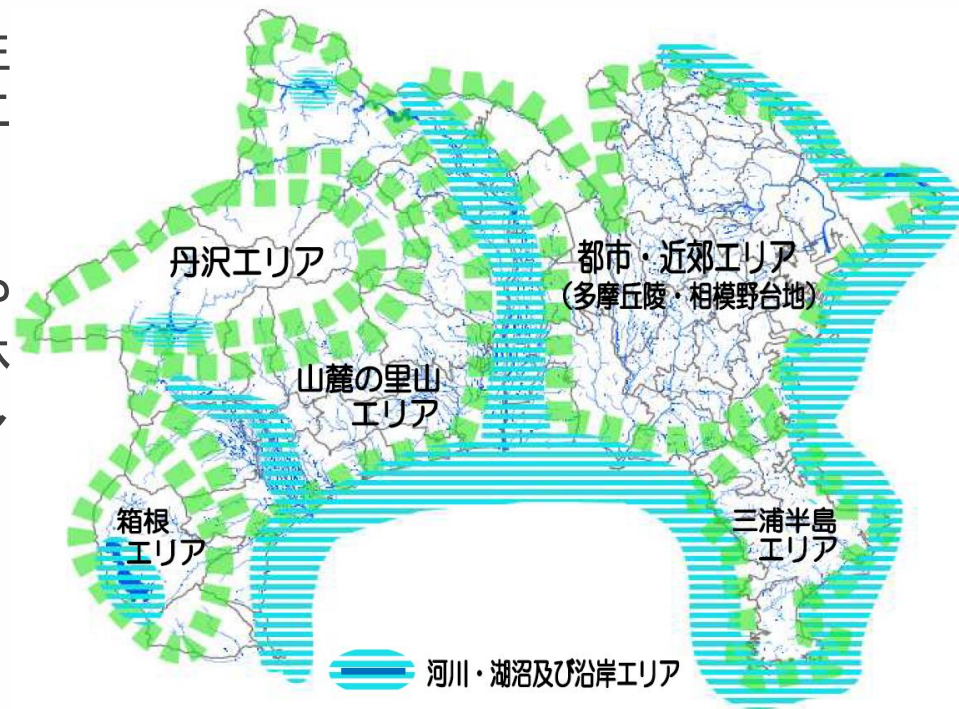


Azote for Stockholm Resilience Centre, based on analysis in Richardson et al 2023

生物多様性の損失は既に地球の限界を超えている。

本県の生物多様性保全の取組

- H28年3月に「かながわ生物多様性計画」を策定し、その後R6年3月に改定
- 都市域や丹沢山地、里山、河川や沿岸域、三浦半島の連続した樹林地など地域の特性に応じた生物多様性の保全を推進
- 水環境については、調査の困難性や人手・予算の不足等により生物相の把握は不十分



⇒ より簡便で低コストな手法でのモニタリングの必要性

環境DNA技術を用いた生物調査

<環境DNAとは>

環境DNA (eDNA) 動植物の排泄物、組織片などに由来する水中に存在するDNA断片

1リットルの水から、環境DNAを調べることで

環境DNAの**有無**から**生物**の存在を推定

環境DNAの**量**から**生物量**を推定



<調査手順>

1リットル採水



フィルターろ過



DNA抽出



定量PCR又は次世代シーケンサーで測定



環境DNA技術発展の変遷



- 2008 ○ フランスの研究チームがウシガエルの生体外DNAを検出
(水生大型生物のDNAを検出した初めての研究)
- 2012 ○ このころから日本でも環境DNAの研究が本格化
- 2015 ○ 千葉県立博物館の宮氏がMiFishプライマーを発表
(魚類の網羅的調査手法の確立)
- 2018 ○ 環境DNA学会設立
- 2019 ○ 環境DNA学会が調査分析マニュアルを作成・公開
- 2024~○ 様々な環境、分類群での調査手法の開発が進行中

生物多様性保全の重要性の高まりとともに、注目を集める技術となってきた

環境DNA研究テーマの立ち上げ

R4年度より、環境科学センターの新規課題として研究テーマを立ち上げ

研究テーマ：「環境DNA技術を活用した希少種調査手法の開発」

研究目的：環境DNA技術を活用し、希少種の生息状況を把握し、種の保全に役立てる。

調査研究期間： R4年度～R5年度

担当者： 調査研究部 濱邊一弥(研究主任)
長谷部勇太
高坂和彦

調査対象の希少種：スナヤツメ類

調査対象に選定した希少種：スナヤツメ類

～主な選定理由～

- 国により絶滅危惧Ⅱ類、県のレッドデータブックにより絶滅危惧IB類に指定。近年、谷戸の減少や河川工事によって生息地が減少している。
- 従来は単一種と扱われてきたが、近年の遺伝子研究等から北方種と南方種が存在することが分かった。
- **北方種と南方種は外部形態からは判別できないため、捕獲での調査では十分に種同定できない。**
- 北方種と南方種は同じ河川に共存しても、交配することはない。



神奈川県レッドデータブック



相模川で捕獲されたスナヤツメ類



環境DNAで両種の生息状況を把握

神奈川県内のスナヤツメ類①

- 県内各地の湧水のある谷戸では普通に生息していたが、都市化に伴う湧水域の減少および河川改修などの影響で生息地が激減した。
- 現在、県内では鶴見川、相模川および酒匂川の3水系だけに分布が限定されている。
- 2006年発行の県のRDBでは、本県の在来のスナヤツメは**南方種**に属する(山崎2005)とされていた。

流れの緩やかな小川や湧水のある水路などに生息し、県内の谷戸を中心に広く生息していた。最近の遺伝学的な研究から、北方種と南方種の二つのグループに分類され、それぞれ別種と考えられており、本県のスナヤツメは南方種に属する (山崎2005)。幼生は成魚と異なり、目も吸盤状の口も

※神奈川県レッドデータブックより引用



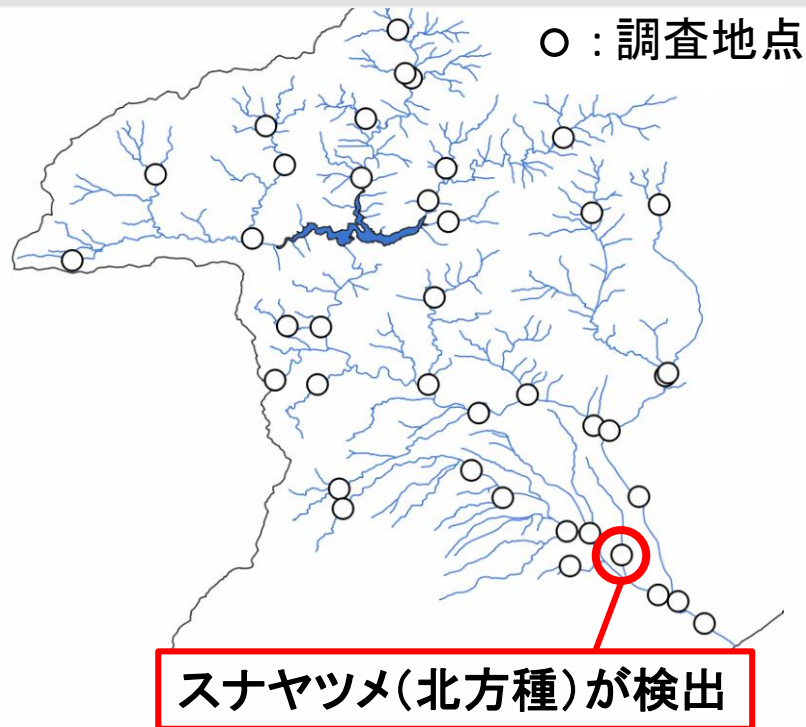
神奈川県内のスナヤツメ②

れた。道志川の記録は、奥相模湖が土砂を放流した際にそのダム下において、相模川漁連の組合員が砂泥の中から採集した魚である。提供いただいたアンモシーテス幼生12個体のうち5個体について、富山大学理学部山崎研究室の協力を得て遺伝子の解析を行ったところ、すべて南方種・琵琶湖水系の移入種と判断された（未発表）。道志川水系は本県では最大規模の生息地となっている²⁾が、今後は同河川その他水域においても遺伝子分析を進め、分布状況を調査する必要がある。

「神奈川県内の気象淡水魚生息状況－Ⅳ」より引用

- 最近の遺伝子解析の結果、**南方種**については琵琶湖水系の**移入種**が存在している可能性が示唆された。相模川水系では琵琶湖産アユの放流があり、それに南方種が混在していた可能性がある。
- 2019年に行われた酒匂川水系の環境DNAのメタバーコーディングでは、**北方種**が検出されている。

→県固有のスナヤツメは**北方種**の可能性が高い。



環境DNAの分析手法の選択

＜各手法の特徴＞

○網羅解析(次世代シーケンサー)

- 2019年の調査(前スライド参照)で用いた手法。
- 魚類を網羅的に解析することが可能。
- 分析手順が長く、時間がかかり、試薬も高価。

○種特異解析(リアルタイムPCR)

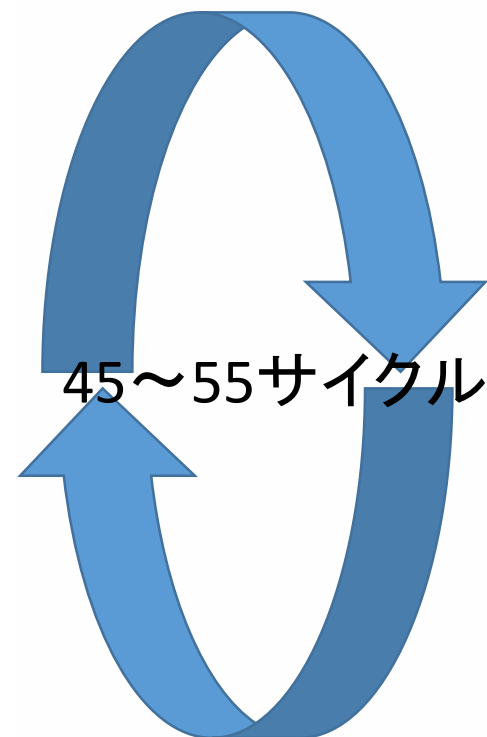
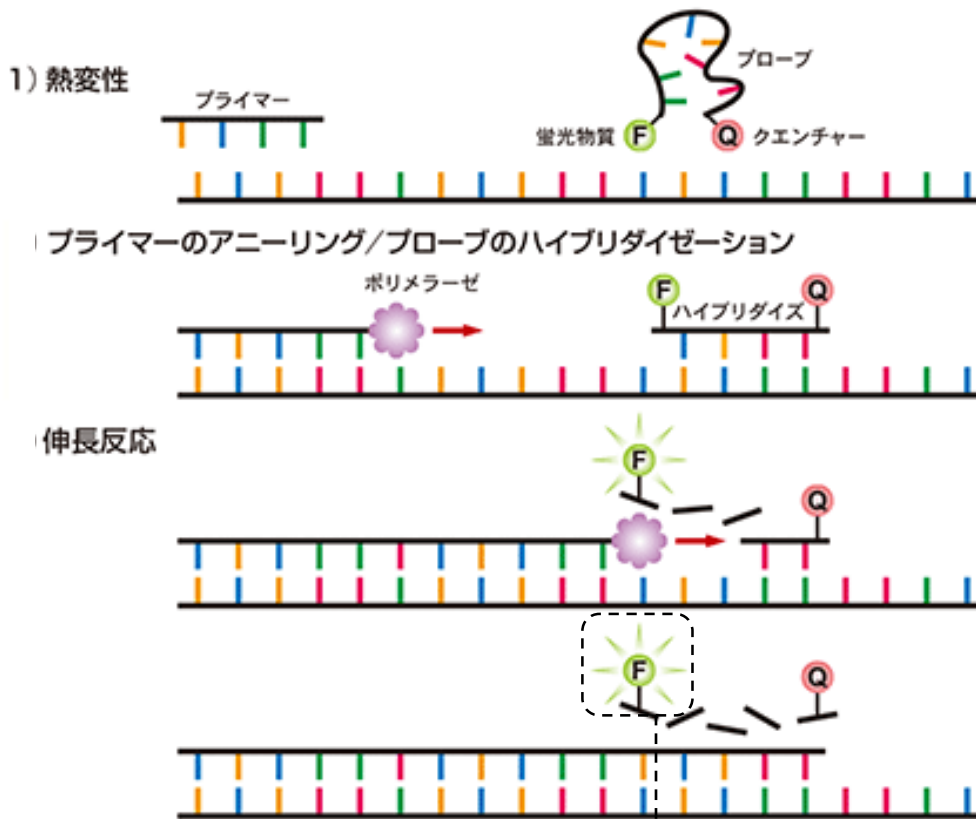
- 単一種を特異的に検出。
- 単一種の検出であれば、網羅解析よりも検出感度が高い。
- 分析手順も少なく、短時間で分析可能。
- 種ごとに専用の試薬(プライマープローブセット)を設計する必要がある。

 **リアルタイムPCRを用いた種特異解析を採用**

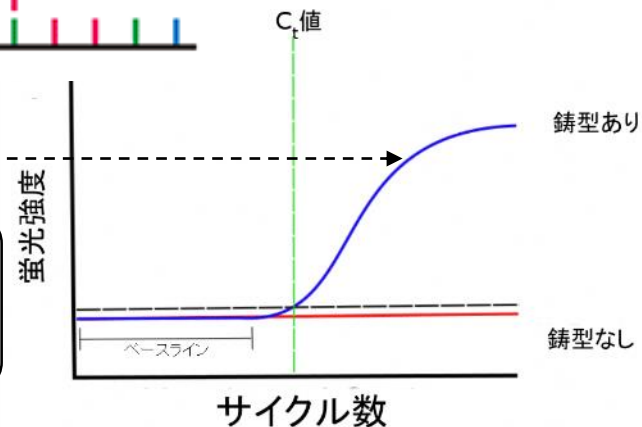
種特異解析の原理



リアルタイムPCR



PCR反応の進行により、プローブが分解され、クエンチャーによって蛍光が吸収されていたものが吸収されなくなり、蛍光を発するようになり、サイクル数とともに蛍光強度が上がる。

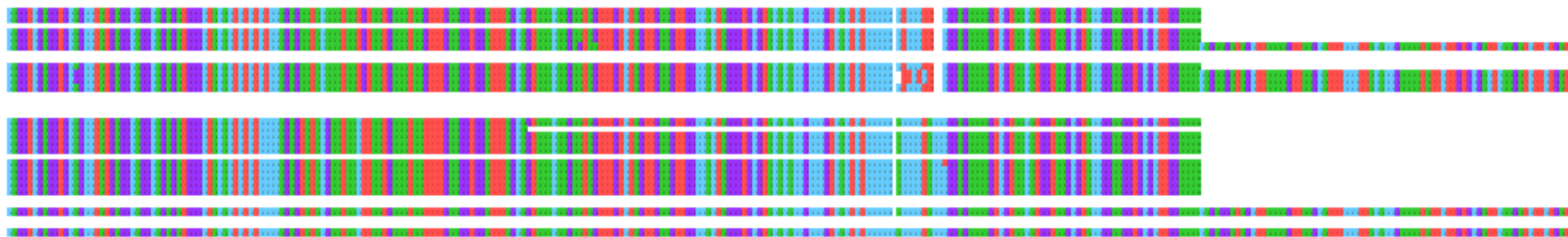
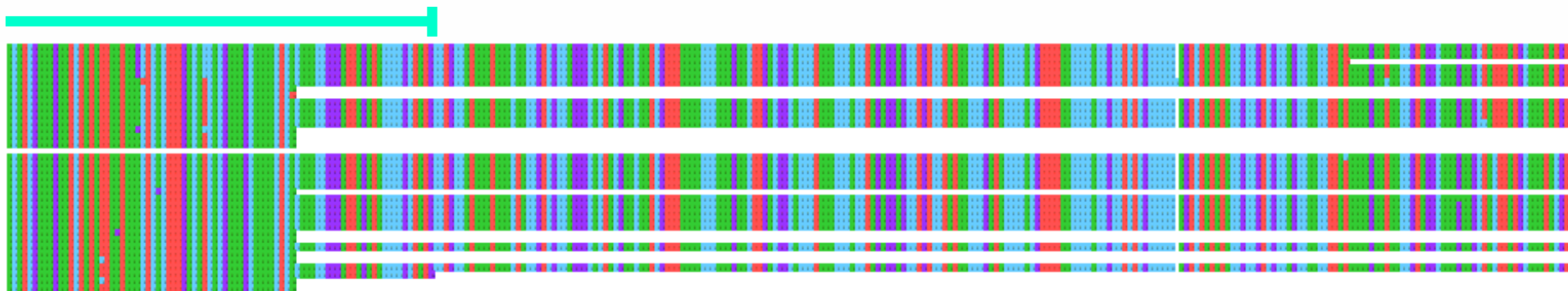
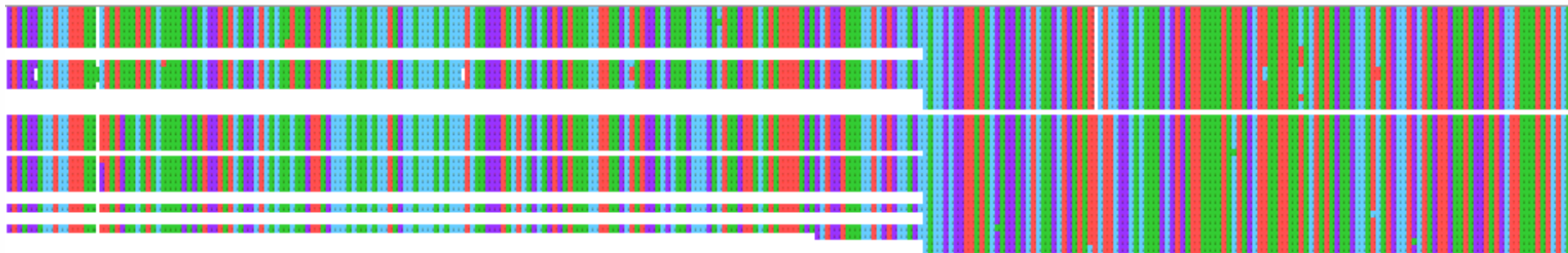


- 研究テーマの背景・目的・手法
- **調査研究結果**
- まとめ

プライマープローブ設計

Mifish領域(230bp)の前後900bpで北方種、南方種で配列が異なるところを探索し、プローブを設計した。

Mifish領域

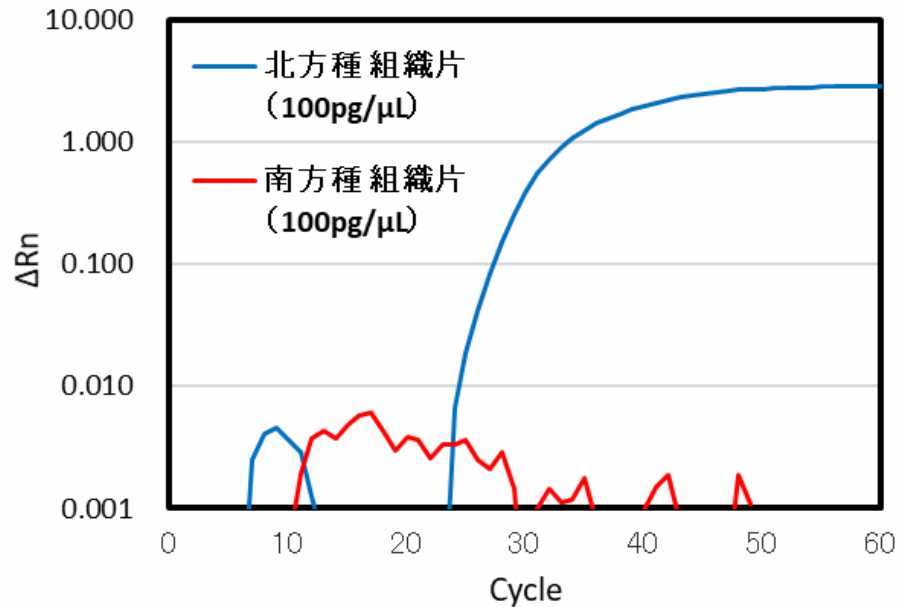


プライマープローブ設計

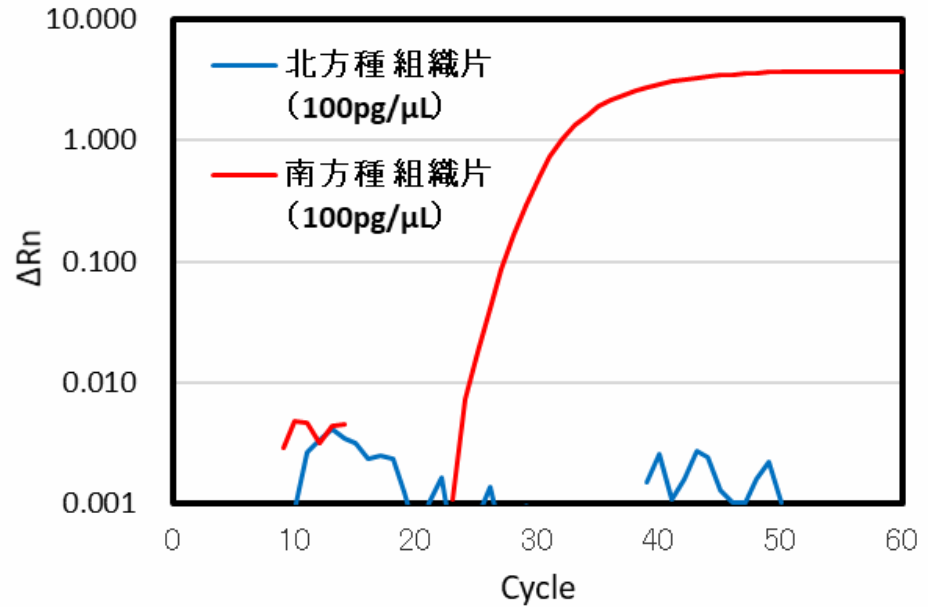
		5'→3'		← プローブ領域 →																															
北 方 種	都道府県 河川等	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	T	A	C	C	C	G	G	A	G	A	A	A	A
	青森県 とぐさり川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	T	A	C	C	C	G	G	A	G	A	A	A	A
	青森県 褰部川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	T	A	C	C	C	G	G	A	G	A	A	A	A
	山形県 泉田川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	T	A	C	C	C	G	G	A	G	A	A	A	A
	宮城県 江合川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	T	A	C	C	T	G	G	A	G	A	A	A	A
	福島県 木戸川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	T	A	C	C	C	G	G	A	G	A	A	A	A
千葉県 宮古川水系	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	T	A	C	C	C	G	G	A	G	A	A	A	A	
南 方 種	岩手県 中津川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	T	-	-	C	G	G	A	G	A	A	A	A
	岩手県 磐井川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	T	-	-	C	G	G	A	G	A	A	A	A
	岩手県 北上川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	T	-	-	C	G	G	A	G	A	A	A	A
	山形県 泉田川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	T	-	-	C	G	G	A	G	A	A	A	A
	富山県 射水市	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	T	-	-	C	G	G	A	G	A	A	A	A
	愛知県 矢作川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	T	-	-	C	G	G	A	G	A	A	A	A
	福岡県 千手川	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	-	T	T	C	T	C	T	-	-	C	G	G	A	G	A	A	A	A
韓国? 不明	C	C	C	G	T	C	A	C	T	C	T	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	T	-	-	C	G	G	A	G	A	A	A	A	

- プローブに3塩基のミスマッチを含む。
- 福岡県の南方種は配列が異なるため、環境DNAの検出を断念する。
- プライマーは北方種と南方種で共通。

組織片を用いた検証結果



北方種用プローブを用いた反応

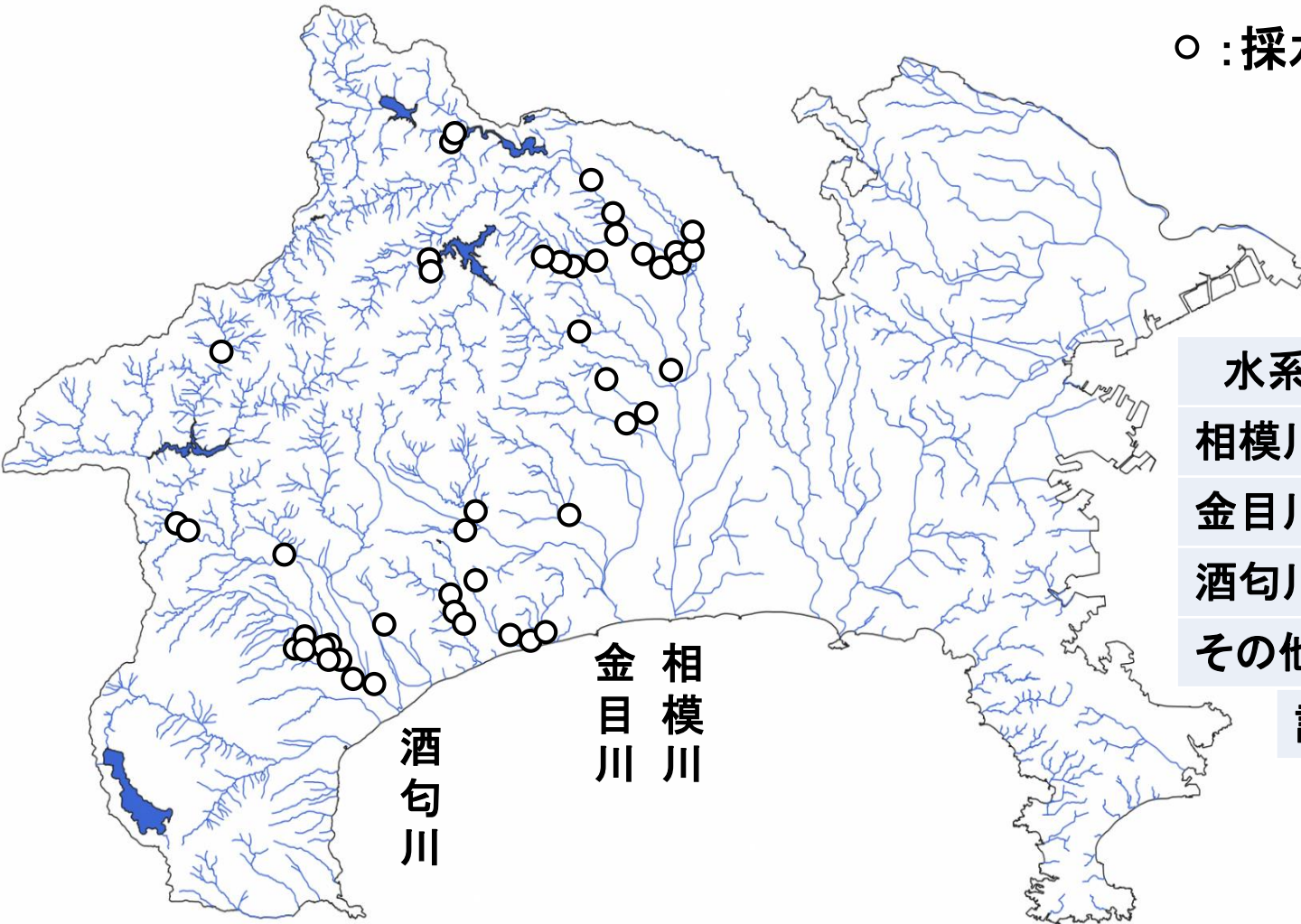


南方種用プローブを用いた反応

- 北方種用プローブ: 北方種の組織片のみに反応を示す。
- 南方種用プローブ: 南方種の組織片のみに反応を示す。

⇒ 両種の判断が可能となった。

環境DNA調査地点



○ : 採水地点 (R3～5年度)

【採水期間】

9月～12月 (R3年度)

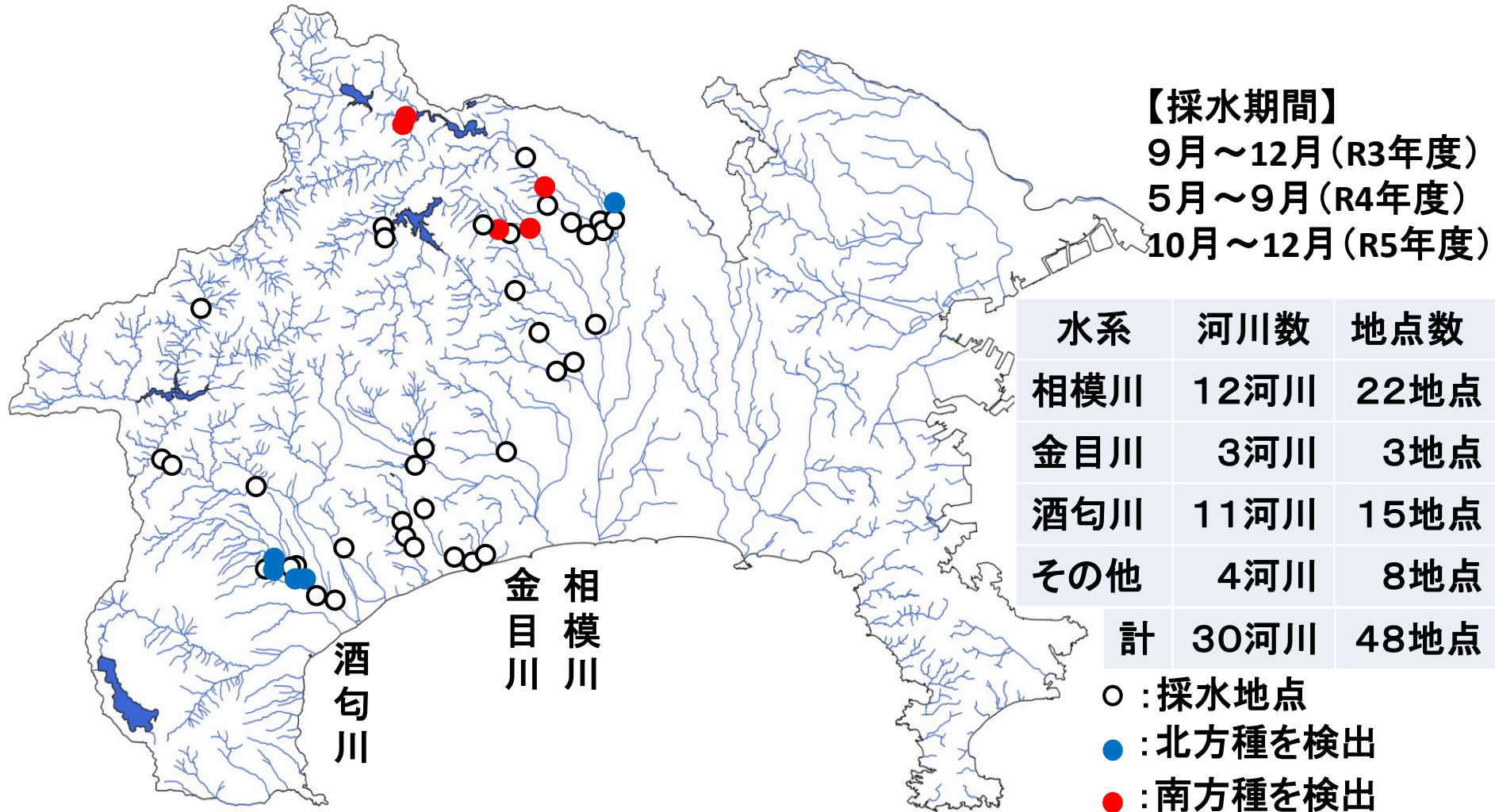
5月～9月 (R4年度)

10月～12月 (R5年度)

水系	河川数	地点数
相模川	12河川	22地点
金目川	3河川	3地点
酒匂川	11河川	15地点
その他	4河川	8地点
計	30河川	48地点

神奈川県レッドデータブックにスナヤツメ生息の記載がある河川及び近年スナヤツメの生息情報がある相模川・酒匂川水系を中心に、計30河川48地点の河川水1Lを採水した。

環境DNA調査の結果

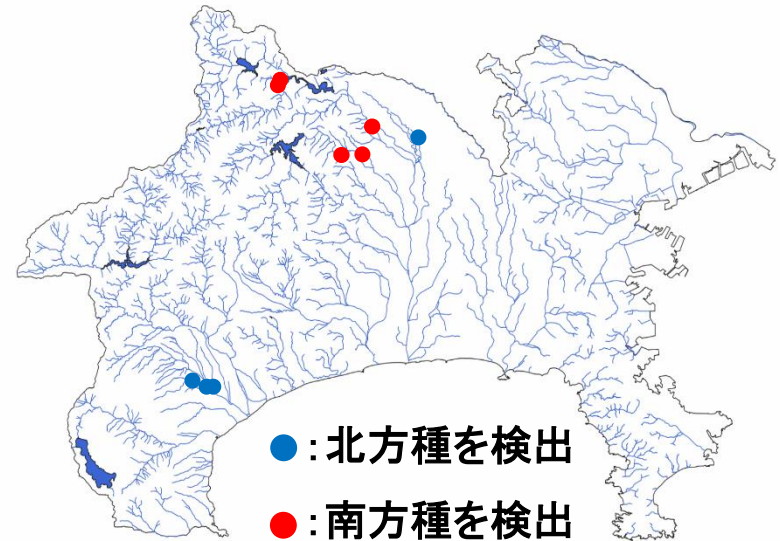


河川水サンプルの分析を行った結果、相模川水系の5地点で南方種のDNAを、相模川水系の1地点と酒匂川水系の3地点で北方種のDNAを検出した。

本調査で得たスナヤツメの分布状況

- 本調査において相模川水系では移入種と考えられる南方種が生息する場所が多いことが明らかとなり、在来種である北方種の生息域は道保川に限られていることが明らかとなった。
- 酒匂川水系では支川の狩川水系で北方種のDNAが検出されており、この水系では比較的様々な地点で北方種のDNAが検出されていることが明らかとなった。

水系	河川	種
相模川	相模川	南方種
相模川	中津川	南方種
相模川	道志川	南方種
相模川	道保川	北方種
酒匂川	狩川	北方種
酒匂川	仙了川	北方種
酒匂川	太刀洗川	北方種



- 研究テーマの背景・目的・手法
- 調査研究結果
- **まとめ**

まとめ

- DNA配列が非常に似通ったスナヤツメ北方種と南方種を特異的に検出することが可能なプライマープローブセットを開発した。
- 30河川48地点の河川水サンプルを分析し、相模川水系の5地点で南方種のDNAを、相模川水系1地点と酒匂川水系の3地点で北方種のDNAを検出した。
- 新たな生物調査ツールである環境DNA調査を導入することで、より詳細な希少種の調査が可能になることを実証した。
- 在来種とされるスナヤツメ北方種の生息範囲は非常に限定されており、特に酒匂川は比較的広範囲に生息していることが明らかとなった。これらの生息地については開発などが行われないう保全を図っていく必要がある。

ご清聴ありがとうございました



私たち一人ひとりの行動が、
未来につながる。

SDGs 未来都市 神奈川県

