

「種特異的環境 DNA 手法を用いた万尾川水系におけるタナゴ類の生息状況調査と生物保全の実践活動」

学校法人大阪学園 大阪高等学校
教諭(科学探究部顧問) 谷脇 鉄平

1. 活動背景

環境問題は、21世紀中に解決すべき地球規模の危機的課題とされており、次世代の人材育成においても環境教育は、重要な項目の1つである。事実、SDGs(持続的な開発目標)が国連総会で採択された背景には、この環境問題の存在が否めない。

その一方で、昨今の子どもたちを取り巻く環境においては、進学のための勉強に偏りがちで、自然とふれ合う体験が少なく、理科及び環境教育で重要な実験授業やフィールドワーク活動が困難であることも事実として存在している。

本校科学探究部は、2020年3月から「環境DNAを利用した仏生寺川・万尾川水系(仏生寺川及び万尾川:2020年3月、5月、6月、9月及び10月)の生物相調査」を富山大学学術研究部理学系山崎裕治准教授と共同研究(高大接続)として行い、生物相(魚類)の網羅的調査¹⁾を行ってきた。富山県氷見市内における環境DNA分析を利用した生物相(魚類)調査はこれまで行われておらず、環境DNA分析で検出されたDNAの解析結果から、各河川に多様な魚類が生息していることが判明した。特に万尾川では、タナゴ類(ニッポンバラタナゴ、タイリクバラタナゴ等)のDNAを検出することができた。ところが、ニッポンバラタナゴは富山県氷見市内では生息確認がされておらず、この理由については環境DNA分析だけでは確かな説明ができない。

そこで2021年は、万尾川の環境DNA分析で検出されたニッポンバラタナゴ(環境省絶滅危惧ⅠA類)及びタイリクバラタナゴ(外来種)をはじめとするタナゴ類に着目し、万尾川の河川水から得られた環境DNA、各個体から直接採取したDNA及び各個体の識別プライマー²⁾を用いて、PCR法及び電気泳動法によりニッポンバラタナゴの生息有無の判定を、新型コロナウイルスの影響で現地に出向くことはできなかったが遠隔で行ってきた。

2. 活動目的

本活動では、これまでの実績を踏まえ、富山県氷見市内の河川に生息するタナゴ類等の捕獲による生物相(魚類)調査、並びに調査域の河川水から環境DNA分析を利用したタナゴ類(ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴ)の生息有無の判定を、富山大学理学部・氷見市連携研究室(ひみラボ)を拠点に行うことを目的とする。

また、タナゴ類の生息状況の把握から環境教育に繋げ、生徒たちが立案した生息マップから生物保全の研究に貢献することも併せて目的とする。なお、以下、ニッポンバラタナゴをニチバラ、タイリクバラタナゴをタイバラと省略する。

3. 活動内容

富山県氷見市内の河川に生息するタナゴ類等の魚類は春頃(3月～5月)から孵化し始める。そこで、2022年3月16日～18日の期間に、下記の内容で研究合宿(2泊3日)を行った。

【1日目:河川中のタナゴ類の捕獲、河川水の採水及びろ過】

ひみラボに昼到着し、今回の合宿にかかる講習会を実施した後、調査域 B-1, B-2 でタナゴ類等の捕獲(定置網、たも網)による生物相(魚類)調査、並びに調査域 B-1, B-2, C の河川水をステリベクスを用いて採水及びろ過をした。この際、フィールドワーク活動(図1)を通じて、生息地周辺の環境を知るための探索も行った。

総フィールドワーク活動距離:約9 km

総フィールドワーク活動時間:約4時間

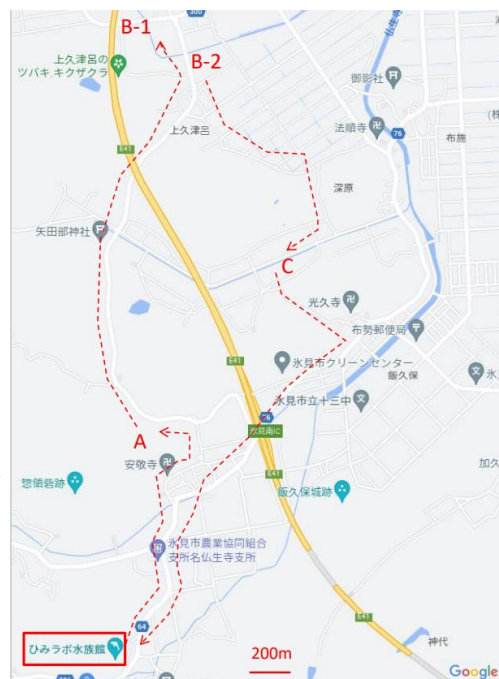


図1 フィールドワークマップ
B:万尾川、C:仏生寺川

【2日目:捕獲個体、河川水からの DNA 抽出、種特異的環境 DNA 手法】

(1) 捕獲個体(タイバラ)の組織片(ヒレ)からの DNA 抽出

試薬(Template Prepper for DNA キット)、マイクロピペッター、チップ、チューブ、遠心分離機及び恒温機を用いて、万尾川で捕獲したタイバラのヒレから DNA を抽出した。

(2) 河川水からの環境 DNA 抽出

試薬(DNeasy Tissue Kit 及び滅菌水)、マイクロピペッター、チップ、チューブ、遠心分離機及び恒温機を用いて、ステリベクス内のフィルターに付着した DNA を抽出した。

(3) 種特異的環境 DNA 手法(PCR 法及び電気泳動法)

試薬(滅菌水、PCR バッファー、dNTP、ポリメラーゼ(GXL)、ニチバラとタイバラの識別プライマーF 及び R)、マイクロピペッター、チップ、チューブ、遠心分離機、サーマルサイクラー、ニチバラ(事前に八尾市のきんたい廃校博物館から提供)の組織片から得られた DNA 及び(1),(2)から得られた DNA を用いて、PCR 法及び電気泳動法によりニチバラの生息有無の判定を行った。

<試薬分量(1本当たり)>		<PCR 法 温度変化条件>	
滅菌水	6.0 µL	I. 初期加熱	98°C 5分
PCR バッファー	3.0 µL	II. DNA 分解	98°C 10秒
dNTP	1.5 µL	III. プライマー結合	55°C 15秒
ポリメラーゼ(GXL)	0.5 µL	IV. DNA 伸長	68°C 10秒
プライマーF	1.0 µL	V. 最終伸長	68°C 7分
プライマーR	1.0 µL		
抽出 DNA	2.0 µL		
総量	15.0 µL		

<電気泳動法 電圧条件>	
50 V で 10 分間泳動後、100 V に切り替えて 20 分間泳動	

【3日目:成果発表会等】

2日間の活動内容を整理したものを午前発表し、午後帰阪した。



フィールドワークの様子



生物相(魚類)調査の様子



定置網での捕獲の様子



採水・ろ過の様子

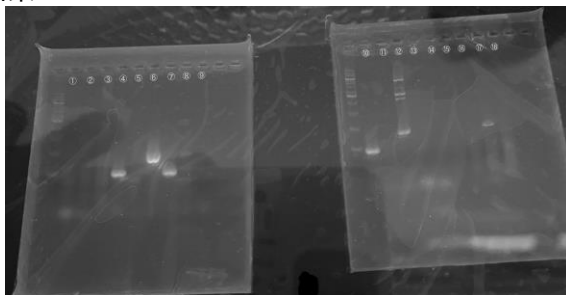


DNA 抽出の様子



電気泳動の様子

4. 活動結果



- ①:ヒレ1、タイバラ
- ②:ヒレ1、ニチバラ
- ③:タイバラDNA、タイバラ (ポジ)
- ④:ヒレ2、タイバラ
- ⑤:ヒレ2、ニチバラ
- ⑥:ニチバラDNA、ニチバラ (ポジ)
- ⑦:ヒレ3、タイバラ
- ⑧:ヒレ3、ニチバラ
- ⑨:滅菌水、タイバラ (ネガ)
- ⑩:ヒレ4、タイバラ
- ⑪:ヒレ4、ニチバラ
- ⑫:タイバラDNA、ニチバラ (ポジ)
- ⑬:ヒレ5、タイバラ
- ⑭:ヒレ5、ニチバラ
- ⑮:ニチバラDNA、タイバラ (ポジ)
- ⑯:ヒレ6、タイバラ
- ⑰:ヒレ6、ニチバラ
- ⑱:滅菌水、ニチバラ (ネガ)



- ⑲:万尾川B1、タイバラ
- ⑳:万尾川B1、ニチバラ
- ㉑:タイバラDNA、タイバラ (ポジ)
- ㉒:万尾川B2、タイバラ
- ㉓:万尾川B2、ニチバラ
- ㉔:ニチバラDNA、ニチバラ (ポジ)
- ㉕:仏生寺川、タイバラ
- ㉖:仏生寺川、ニチバラ
- ㉗:滅菌水、タイバラ (ネガ)

(1) 捕獲したタイバラの DNA 判定

- タイバラのヒレ: ④⑦⑩⑬は鮮明に出たが、⑫⑭は微かに出た。
- ポジティブコントロール: タイバラ⑫は出たが複数の増幅が見られ、⑬は出なかった。また、ニチバラ⑥は鮮明に出たが、⑮は出なかった。

(2) 万尾川及び仏生寺川の河川水の環境 DNA 判定

- 仏生寺川の河川水: ⑯は鮮明に出たが、⑰は微かに出た。ただし、⑰⑱はこれまで仏生寺川からニチバラ及びタイバラの環境 DNA は未検出。
- 万尾川の河川水: ⑲⑳は微かに出た。
- ポジティブコントロール: タイバラ㉑は鮮明に出たが、ニチバラ㉒は出なかった。
- ネガティブコントロール: 滅菌水㉓は微かに出た。

以上、本実験では全てにおいて期待された結果が得られたわけではなかった。その要因として次が挙げられる。

- 本校で行った事前実験で使用した試薬、実験手順及び実験条件と異なっていた。
- 実験中の試薬分量の間違いとコンタミネーションを引き起こした可能性がある。

5. 生徒の感想

まず始めに、今回の合宿は様々な方の協力があったからこそ無事に最後までやりきることが出来たと改めて痛感しました。ありがとうございました。1日目のフィールドワークは、目的である河川水を採水することだけではなく、目的地へ到着するまでの間に観光のような形で様々なスポットの説明をしてもらいながら目的地を目指して歩いたので、長時間歩くことに苦痛を感じることなく、楽しみながら歩くことが出来ました。また、定置網を用いて魚を捕まえ、実際に観察することで、これまでになかった気づきも沢山ありました。2日目の実験は、初めての学校以外の場所での実験だったため、緊張や不安でいっぱいでした。しかし、沢山の方のサポートがあり、分からないことなど聞きやすい雰囲気だったため、何一つ困ることなく実験をすることが出来ました。他にも、1人で実験をするのではなく、同じ部活のチームメイトと一緒に実験をすることで緊張感も和らぎ、とても楽しかったです。3日目の成果発表は、対面での発表でとても緊張しました。そのため、なかなか思うようにいかなかった点多かったのですが、沢山の助言や提案をいただき大変勉強になりました。今回の合宿を通して様々なことを楽しく学ぶことが出来ました。また、機会があれば是非行きたいと思います。

6. 雑感

科学探究部として初めての合宿は、ようやくできたフィールドワーク活動の充実感を得られただけでなく、富山県地方新聞3社(北日本新聞(<https://news.yahoo.co.jp/articles/5fe5b83657ff3191259b76d3780bab5d0595b510>))、北陸中日新聞(<https://www.chunichi.co.jp/article/436106>))、富山新聞(<https://www.hokkoku.co.jp/articles/tym/687486>))に大きく取り上げていただき、予想外の成果が得られた。

その一方で、本活動を通じて種特異的環境 DNA 手法の難しさが露呈された。2022年3月からこの合宿に向けてある程度練習し、また、本活動後も種特異的環境 DNA 手法の実験を繰り返しているが、なかなか成功に繋がらない。特に、コンタミネーションについては、例えば、器具や試薬等、一つ一つの取り扱いをこれまで統一化していなかったため、個々の実験に対する姿勢や意識の差が課題として浮彫化された。

従って、「環境 DNA に限らず、DNA を取り扱う実験は本当に難しい」ことを改めて痛感した。目標であったタナゴ類の生息マップの作成は達成できなかったが、今後も、合宿はできる限り定期的に実施しながら、タナゴ類等の研究を諦めずに継続し、希少種の保全活動に貢献していきたい。

7. 参考文献

- 1) <https://www.shimonaka.or.jp/wp/wp-content/uploads/2021/07/2019-environmental-dna2.pdf>
- 2) Umemura et al. (2020) Novel genotyping system for distinguishing among native, non-native and admixed individuals of rosy bitterling *Rhodeus ocellatus* subspecies. *Journal of Fish Biology*, DOI: 10.1111/jfb.14333

8. 謝辞

本活動を遂行するにあたり、研究助成をいただいた貴財団及びご指導ご協力をいただいた富山大学学術研究部理化学系山崎裕治准教授をはじめ、富山大学、富山大学の学生さん、氷見市教育委員会、NPO 法人 Bio クラブ等に心から深く感謝の意を表します。