

環境DNAを利用した仏生寺川・万尾川水系河川の生物相調査及び生物保全の実践活動

学校法人大阪学園 大阪高等学校
谷脇 鉄平

1. 研究背景

環境問題は21世紀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問題に関する教育は、重要な項目の一つである。事実、SDGs(持続可能な開発目標)が国連サミットで採択され、2030年までの国際目標とされている。しかし、昨今の子どもたちを取り巻く受験環境では、進学のための勉強に偏りがちとなり、自然と触れ合う体験が少ないことや、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、2017年10月から京都産業大学生命科学部先端生命科学科高橋純一准教授と共同研究(高大接続)を行い、環境DNA分析を利用して四季における淀川に生息するイタセンパラ等の希少種の生物相(魚種)を調査するため、これまで「環境調査活動(網羅的調査)」を行ってきた。

また、この研究活動を通じて希少種の保護活動を目的として、採水時にその採水域周辺のゴミ回収・清掃といった「環境保全活動」や、市民への啓発といった「環境教育活動」にも積極的に取り組みながら、客観的な外部評価を得るために発表会(大阪府学生科学賞等)にも参加し、高校生らしい研究活動を行ってきた。

当時、大阪府下の学校教育機関での環境DNA分析を利用した研究活動の前例はなく、2018年第1回環境DNA学会で科学探究部がポスター発表した際、SSH指定校ではない学

力中間層の本校におけるクラブ活動を通じた教育・研究実践が「高校生らしい活動」として評価していただいた。

この実績は、文部科学省の「高大接続改革」や経済産業省が開発・実証を進めている「未来の教室」にも関連し、生徒たちにワクワク感を抱かせる「学びの実体験」を提供できた。

2. 研究目的

このような背景がある中、富山大学学術研究部理学系山崎裕治准教授¹⁾から富山県氷見市の生物相(魚種)調査について、共同研究を提案いただいた。

富山県氷見市で環境DNA分析を利用した生物相(魚種)の網羅的調査はこれまで行われておらず、特に、イタセンパラ(タナゴ類)は、富山県²⁾及び環境省³⁾のレッドリストで絶滅危惧種に指定されている。

本研究では、これまで調査してきた淀川と同じイタセンパラが生息する富山県氷見市の仏生寺川・万尾川水系河川において、生徒たちの主体的なフィールドワーク活動で生物相(魚種)を網羅的調査し、淀川と氷見市の河川を比較することで、生物相と環境との関係について理解を深めながら、環境保全計画を立案することを目的とする。

また、イタセンパラ等の生息状況の把握を通して生徒たちが立案した環境保全計画を環境教育に繋げ、これらの「学びの実体験」をアウトプットするために外部発表を経験させることも併せて目的とする。

3. 「高大接続改革」及び「未来の教室」を活用した教育支援のねらい

①生徒たちが立案した環境保全計画や活動実践を、理科教育の現場や市民向けのイベントで情報発信することで、多くの生徒や市民が身近な自然科学により興味関心を抱き、将来の進学目的や環境への意識等の芽生えに繋げたい。

②ワクワク感を抱かせる「学びの実体験」を提供することで、学問としての理科の重要性を生徒や教員が再認識するきっかけに繋げたい。

③これらの実体験を客観的に評価いただくためにも、積極的に外部発表に取組み、今後社会で求められる「生きる力・タフな人間力を育む」ことを狙いながら、生徒たちの成長育成に繋げたい。

4. 研究計画

以下は、2020年1月から科学探究部が主体的に行った研究活動内容であるが、COVID-19による影響で一部計画変更した。

<環境DNA調査にかかる調べ学習>

2020年1月～2月

富山県氷見市の生物相を図書館やインターネット等から調べ学習した。

<富山大学理学部・氷見市連携研究室(ひみラボ)での生物相調査>

2020年3月下旬

ひみラボを拠点に2泊3日の研究合宿を実施し、採水域の目視による生物相調査活動及び採水域の河川水からDNA採取及びDNA抽出等を予定していたが、COVID-19による影響で9月に延期することにした。

<DNA採取及びDNA抽出・DNA分析>

2020年3月～6月

富山大学山崎准教授に採水地点の河川水(3月、5月及び6月)を採水していただき、その河川水からDNA採取及びDNA抽出を行

った。

その後、DNA抽出したサンプルを株式会社生物技研⁴⁾(以下、生物技研とする)に冷蔵便で発送し、*DNA分析・**DNA解析を委託した。

*生物技研が実施。

**得られた結果及びその結果から判断されることで、生物技研も行い、科学探究部も実施。

なお、5月分は、本校がCOVID-19による影響で休校措置(4月8日～5月31日まで)により活動自粛になったため、富山大学山崎准教授のもとで河川水からDNA採取及びDNA抽出したサンプルを直接、生物技研に冷蔵便で発送し、DNA分析・DNA解析を委託した。

<DNA解析>

2020年6月～9月

生物技研のDNA分析から得られたDNA塩基配列をNCBI⁵⁾、MitoFish⁶⁾等の公共DNAデータベースで魚種の同定及び生息数を解析しながら、その同定した魚種の生息有無を富山県レッドリスト、氷見市で確認されている淡水魚類リスト(ひみラボ)⁷⁾と照合させた。

<富山大学理学部・氷見市連携研究室(ひみラボ)での生物相調査>

2020年9月

7月にCOVID-19収束の兆しが見えたが、その後、再びCOVID-19が蔓延し始めたため、安全面・健康面を考慮し2021年3月以降に延期することにした。

5. 実験方法

以下の実験方法は、環境DNA学会(環境DNA技術標準化委員会)が作成した標準版「環境DNA調査・実験マニュアル」⁸⁾の手順に沿って行ったため、詳細な手順は省略する。

5-1 環境DNA

自然環境(海・河川等)中に生息する魚や鳥を始めとする生物のDNAが、目には見えない状態で自然環境中に存在する。これを環境DNAという。そのため、河川水を次世代シーケンサー(遺伝子の塩基配列を高速に読み込む装置)等を用いて分析することで、河川に生息する生物の種類や割合を迅速かつ定量的に測定することができる。捕獲調査が困難な環境においても、わずか1Lの採水で採水域周辺に生息する生物の把握や生態系の評価を可能とする画期的な手法である。

5-2 採水

富山大学山崎准教授に採水地点の選定⁹⁾(図1)及び採水(3月、5月及び6月〔今後、9月及び10月にも予定〕)をお願いした。

図2-1~2-4のとおり、各河川を仏生寺川①、仏生寺川②、万尾川①、万尾川②とする。

各河川ごとに河川水を1L採水し、5月分を除いてその河川水を冷蔵便で本校に発送していただいた。このとき、DNAの分解を抑制するため10%塩化ベンザルコニウム水溶液(オスバン)を1Lに対して1mL添加した。



図2-1 仏生寺川①での採水の様子



図2-2 仏生寺川②での採水の様子



図2-3 万尾川①での採水の様子



図2-4 万尾川②での採水の様子



図1 採水地点

5-3 DNA採取・DNA抽出

図3～6のとおり、「環境DNA調査・実験マニュアル」に従って、ガラスろ紙1枚とアスピレーターを用いて、各河川水1Lを吸引ろ過し、DNA採取した、DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)を用いて、DNA抽出を行った。



図3 ろ過の様子



図4 DNA採取したガラスろ紙を抽出する様子



図5 DNA抽出の様子



図6 DNA抽出の様子

5-4 DNA分析・DNA解析

DNA抽出したサンプルを生物技研に冷蔵便で発送し、DNA分析・DNA解析を委託後、約1か月程度でDNA解析結果が届いた。

なお、環境DNA分析は、MiFishプライマー¹⁰⁾(対象領域12SrRNA〔12SリボソームRNA遺伝子〕)が用いられている。

DNA解析結果には、魚種ごとのDNA塩基配列だけでなく、検出遺伝子のリード数(塩基配列の単位)や魚種の塩基配列一致率、魚種の同定結果等も含まれている。

しかし、生徒たちにはその結果を見せずに、DNA解析結果が「100%正しいとは限らない」というクリティカルシンキングを身に付けさせる目的で、魚種ごとのDNA塩基配列をNCBI、MitoFish等の公共DNAデータベースで魚種の同定及び生息数の割合(検出遺伝子数は、DNA分析で得られたその魚種の塩基配列のリード数を各河川ごとに割合換算)を解析させた。

その後、同定した魚種が各河川に生息しているかどうかを富山県レッドリスト、氷見市で確認されている淡水魚類リスト(ひみラボ)と照合させて、各魚種を希少種又は外来種か調べたものが図7～9である。

日付	河川名	検出 遺伝子数 [%]	種同定結果 (学名)	種との 配列一致率 [%]	希少種又は外来種	
2020年3月30日	仏生寺川①	70.258	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	98.276	—	
		19.446	ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	100	—	
		4.554	ドジョウ (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	100	富山県(準絶滅危惧)、環境省(準絶滅危惧)	
		2.878	ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	99.425	—	
		0.988	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	98.256	—	
		0.707	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.701	—	
		0.547	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.701	—	
		0.228	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.701	—	
		0.141	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.701	—	
		0.129	ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	99.425	—	
		0.088	ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	98.851	—	
		0.034	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.126	—	
		仏生寺川②	26.188	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.619	富山県(絶滅危惧 I 類)
			23.138	オイカフ (<i>Zacco platypus</i>)	100	—
			16.253	ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	100	—
	13.415		タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	98.276	—	
	12.273		ウキゴリ (<i>Gymnogobius urotaenia</i>)	100	—	
	3.101		ニシマドジョウ (<i>Cobitis sp. BIWAE type B</i>)	100	—	
	2.768		タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus</i>)	100	—	
	1.853		オイカフ (<i>Zacco platypus</i>)	98.851	—	
	0.298		オイカフ (<i>Zacco platypus</i>)	99.425	—	
	0.259		クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.024	富山県(絶滅危惧 I 類)	
	0.162		タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.701	—	
	0.147		クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.024	富山県(絶滅危惧 I 類)	
	0.137		ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	99.425	—	
	0.005		カジカ (<i>Cottus pollux</i>)	100	富山県(準絶滅危惧)	
	0.003		ニゴイ (<i>Hemibarbus barbus</i>)	100	—	
	万尾川①	54.695	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	100	—	
		12.031	オイカフ (<i>Zacco platypus</i>)	100	—	
		8.591	カタクテイワシ (<i>Engraulis japonicus</i>)	100	—	
		5.641	マダイ (<i>Pagrus major</i>)	100	—	
		4.930	ウキゴリ (<i>Gymnogobius urotaenia</i>)	100	—	
		4.380	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	100	富山県(絶滅危惧 I 類)	
		4.037	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	99.429	—	
		3.349	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	99.429	—	
		0.997	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	99.429	—	
		0.538	オイカフ (<i>Zacco platypus</i>)	99.425	—	
		0.295	マダイ (<i>Pagrus major</i>)	99.405	—	
		0.176	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	98.857	—	
		0.158	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	99.401	富山県(絶滅危惧 I 類)	
		0.126	オイカフ (<i>Zacco platypus</i>)	99.425	—	
		0.052	カタクテイワシ (<i>Engraulis japonicus</i>)	98.83	—	
	万尾川②	0.003	ニホンウナギ (<i>Anguilla japonica</i>)	100	富山県(情報不足)、環境省(絶滅危惧 I B 類)	
		32.842	ギンブナ (<i>Carassius langsdorfii</i>)	100	—	
		25.769	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	100	—	
		8.466	ゲンゴロウブナ (<i>Carassius cuvieri</i>)	100	外来種、環境省(絶滅危惧 I B 類)	
		7.110	コイ (<i>Cyprinus carpio</i>)	100	国際自然保護連合(絶滅危惧)	
		4.495	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus</i>)	100	—	
		4.281	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	100	富山県(絶滅危惧 I 類)	
		3.740	ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	100	—	
		2.422	ウキゴリ (<i>Gymnogobius urotaenia</i>)	100	—	
		1.979	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	99.429	外来種	
		1.815	モツゴ (<i>Pseudorasbora parva</i>)	100	—	
		1.556	ニッポンバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>)	100	環境省(絶滅危惧 I A 類)	
		1.234	スボテッド・タティア (<i>Tatia intermedia</i>)	100	—	
		1.096	ドジョウ (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	100	富山県(準絶滅危惧)、環境省(準絶滅危惧)	
		0.619	ゲンゴロウブナ (<i>Carassius cuvieri</i>)	99.415	外来種、環境省(絶滅危惧 I B 類)	
	0.444	ギンブナ (<i>Carassius langsdorfii</i>)	99.415	—		
	0.414	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus</i>)	99.429	—		
	0.392	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	99.429	—		
	0.236	コイ (<i>Cyprinus carpio</i>)	99.415	国際自然保護連合(絶滅危惧)		
	0.146	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	99.429	—		
	0.141	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus</i>)	99.429	—		
	0.116	モツゴ (<i>Pseudorasbora parva</i>)	99.429	—		
	0.109	ギンブナ (<i>Carassius langsdorfii</i>)	98.83	—		
	0.107	ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	99.425	—		
	0.095	モツゴ (<i>Pseudorasbora parva</i>)	99.429	—		
	0.095	ウキゴリ (<i>Gymnogobius urotaenia</i>)	99.398	—		
	0.089	ニッポンバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>)	99.429	環境省(絶滅危惧 I A 類)		
	0.062	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	99.429	—		
	0.048	コイ (<i>Cyprinus carpio</i>)	98.83	国際自然保護連合(絶滅危惧)		
	0.046	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	98.857	外来種		
	0.031	フナ属の一種 (<i>Carassius auratus</i>)	99.415	—		
	0.002	カジカ (<i>Cottus pollux</i>)	100	富山県(準絶滅危惧)		

図7 2020年3月30日採水 DNA解析結果

日付	河川名	検出 遺伝子数 [%]	種同定結果 (学名)	種との 配列一致率 [%]	希少種又は外来種	
2020年5月25日	仏生寺川①	46.109	タカハヤ(<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	98.295	—	
		36.360	ウグイ(<i>Tribolodon hakonensis</i>)	100	—	
		15.329	クロヨシノボリ(<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.633	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)	
		0.509	クロヨシノボリ(<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.041	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)	
		0.484	タカハヤ(<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.727	—	
		0.480	ウグイ(<i>Tribolodon hakonensis</i>)	99.432	—	
		0.463	タカハヤ(<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.727	—	
		0.266	タカハヤ(<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.727	—	
		仏生寺川②	30.153	クロヨシノボリ(<i>Rhinogobius brunneus</i>)	100	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
			13.435	ウグイ(<i>Tribolodon hakonensis</i>)	100	—
	12.187		ニシマドジョウ(<i>Cobitis sp. BIWAE_type_B</i>)	99.422	—	
	6.916		オイカワ(<i>Zacco platypus</i>)	100	—	
	6.875		アブラハヤ(<i>Phoxinus steindachneri</i>)	98.864	—	
	6.321		ギンブナ(<i>Carassius langsdorfii</i>)	100	—	
	6.073		タカハヤ(<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	98.295	—	
	3.826		タモロコ(<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	100	—	
	3.757		スポテッド・タティア(<i>Tatia intermedia</i>)	100	—	
	3.662		タカハヤ(<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.727	—	
	1.956		クロヨシノボリ(<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.633	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)	
	1.458		スポテッド・タティア(<i>Tatia intermedia</i>)	99.422	—	
	0.765		オイカワ(<i>Zacco platypus</i>)	99.432	—	
	0.420		クロヨシノボリ(<i>Rhinogobius brunneus</i>)	99.408	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)	
	0.304		ウグイ(<i>Tribolodon hakonensis</i>)	99.432	—	
	0.298		ニシマドジョウ(<i>Cobitis sp. BIWAE_type_B</i>)	98.844	—	
	0.270		スポテッド・タティア(<i>Tatia intermedia</i>)	98.844	—	
	0.262		ウグイ(<i>Tribolodon hakonensis</i>)	99.432	—	
	0.253		タカハヤ(<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.727	—	
	0.245		アブラハヤ(<i>Phoxinus steindachneri</i>)	98.295	—	
	0.194		ギンブナ(<i>Carassius langsdorfii</i>)	99.422	—	
	0.187		クロヨシノボリ(<i>Rhinogobius brunneus</i>)	99.408	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)	
	0.184		アブラハヤ(<i>Phoxinus steindachneri</i>)	98.295	—	
	万尾川①		54.960	ギンブナ(<i>Carassius langsdorfii</i>)	100	—
		19.000	ウキヨリ属の一種(<i>Gymnogobius sp. HOKURIKU-JUZUKAKE-HAZE</i>)	100	—	
		12.340	クロヨシノボリ(<i>Rhinogobius brunneus</i>)	100	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)	
		8.450	ゲンゴロウブナ(<i>Carassius cuvieri</i>)	100	外来種、環境省(絶滅危惧ⅠB類)	
		3.739	ギンブナ(<i>Carassius langsdorfii</i>)	99.422	—	
		0.491	コイ(<i>Cyprinus carpio</i>)	99.422	国際自然保護連合(絶滅危惧)	
		0.316	クロヨシノボリ(<i>Rhinogobius brunneus</i>)	99.408	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)	
		0.284	ギンブナ(<i>Carassius langsdorfii</i>)	98.844	—	
		0.256	ウキヨリ属の一種(<i>Gymnogobius sp. HOKURIKU-JUZUKAKE-HAZE</i>)	99.401	—	
		0.164	ウキヨリ属の一種(<i>Gymnogobius sp. HOKURIKU-JUZUKAKE-HAZE</i>)	99.401	—	
	万尾川②	55.106	コイ(<i>Cyprinus carpio</i>)	100	国際自然保護連合(絶滅危惧)	
		32.370	タイリクバラタナゴ(<i>Rhodeus ocel latus ocel latus</i>)	100	外来種	
		6.153	ゲンゴロウブナ(<i>Carassius cuvieri</i>)	100	外来種、環境省(絶滅危惧ⅠB類)	
		3.648	タイリクバラタナゴ(<i>Rhodeus ocel latus ocel latus</i>)	99.435	外来種	
		1.055	コイ(<i>Cyprinus carpio</i>)	99.422	国際自然保護連合(絶滅危惧)	
		0.830	タイリクバラタナゴ(<i>Rhodeus ocel latus ocel latus</i>)	99.435	外来種	
		0.728	タイリクバラタナゴ(<i>Rhodeus ocel latus ocel latus</i>)	99.435	外来種	
	0.111	タイリクバラタナゴ(<i>Rhodeus ocel latus ocel latus</i>)	98.87	外来種		

図8 2020年5月25日採水 DNA解析結果

日付	河川名	検出 遺伝子数 [%]	種同定結果 (学名)	種との 配列一致率 [%]	希少種又は外来種
2020年6月30日	仏生寺川①	43.800	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.633	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		39.965	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	98.295	—
		12.410	ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	100	—
		0.754	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.727	—
		0.749	ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	99.432	—
		0.669	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.041	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		0.570	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.041	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		0.565	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.727	—
		0.307	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.041	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		0.139	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.041	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
	0.073	タカハヤ (<i>Phoxinus oxycephalus jouyi</i>)	97.159	—	
	仏生寺川②	26.225	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.633	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		19.443	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	100	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		13.963	ウグイ (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	100	—
		13.116	ニシシマドジョウ (<i>Cobitis</i> .sp._BIWAE_type_B)	100	—
		11.521	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	100	—
		6.840	オイカワ (<i>Zacco platypus</i>)	100	—
		6.538	オイカワ (<i>Zacco platypus</i>)	99.432	—
		1.987	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.041	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		0.368	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.041	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		0.230	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	100	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
	万尾川①	23.657	コイ (<i>Cyprinus carpio</i>)	100	国際自然保護連合(絶滅危惧)
		12.462	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	100	外来種
		10.757	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	100	—
		6.601	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	99.435	外来種
		0.578	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	98.817	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		0.517	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	99.408	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		0.474	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	98.87	外来種
		0.457	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	98.87	外来種
		0.267	コイ (<i>Cyprinus carpio</i>)	99.422	国際自然保護連合(絶滅危惧)
		24.771	オイカワ (<i>Zacco platypus</i>)	100	—
	万尾川②	19.195	ギンブナ (<i>Carassius langsdorfii</i>)	100	—
		18.506	オイカワ (<i>Zacco platypus</i>)	99.432	—
		6.491	ウキゴリ属の一種 (<i>Gymnogobius</i> .sp._HOKURIKU-JUZUKAKE-HAZE)	100	—
		5.195	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	99.435	外来種
		4.119	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	100	外来種
		3.716	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	100	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)
		3.017	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus elongatus</i>)	100	—
		2.657	ジュズカケハゼ (<i>Gymnogobius castaneus</i>)	100	富山県(絶滅危惧Ⅱ類)、環境省(準絶滅危惧)
		2.155	ヌマチチブ (<i>Tridentiger brevispinis</i>)	100	—
		1.855	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	99.435	外来種
	1.685	キタノアカヒレタビラ (<i>Acheilognathus tabira tohokuensis</i>)	98.87	環境省(絶滅危惧ⅡB類)	
	1.389	ニッポンバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i>)	100	環境省(絶滅危惧ⅠA類)	
	1.189	クロヨシノボリ (<i>Rhinogobius brunneus</i>)	97.633	富山県(絶滅危惧Ⅰ類)	
	1.082	モツゴ (<i>Pseudorasbora parva</i>)	100	—	
	0.636	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus</i>)	100	—	
	0.569	モツゴ属の一種 (<i>Pseudorasbora interrupta</i>)	100	—	
	0.426	オイカワ (<i>Zacco platypus</i>)	99.432	—	
	0.304	モツゴ属の一種 (<i>Pseudorasbora interrupta</i>)	99.435	—	
	0.215	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	98.87	外来種	
0.205	タモロコ (<i>Gnathopogon elongatus</i>)	99.435	—		
0.153	モツゴ (<i>Pseudorasbora parva</i>)	99.435	—		
0.150	カワヨシノボリ (<i>Rhinogobius flumineus</i>)	98.225	富山県(地域個体群)		
0.147	ウキゴリ属の一種 (<i>Gymnogobius</i> .sp._HOKURIKU-JUZUKAKE-HAZE)	99.401	—		
0.126	ギンブナ (<i>Carassius langsdorfii</i>)	98.844	—		
0.047	オイカワ (<i>Zacco platypus</i>)	98.295	—		

図9 2020年6月30日採水 DNA解析結果

6. 考察

生物技研のDNA解析結果は、イタセンパラ単独のDNAを検出することができなかったが、レッドリストに掲載されているクロヨシノボリ、ニッポンバラタナゴ、キタノアカヒレタビラ、ジュズカケハゼや、外来種であるタイリクバラタナゴ等、様々な魚種のDNAが検出された。

河川水中の環境DNA量は、種によって異なる体サイズの大小にも左右されるので、検出遺伝子数が大きいほど生息数が多いとは一概に言えない。

ところが、希少種であるドジョウ(図7の仏生寺川①及び万尾川②)、カジカ(図7の仏生寺川②及び万尾川②)、ニホンウナギ(図7の万尾川①)、ジュズカケハゼ(図9の万尾川②)、カワヨシノボリ(図9の万尾川②)の検出遺伝子数は、各河川の全体の割合に対して少ないことが分かる。

また、今回のDNA解析結果から、いくつかの課題が浮き上がった。

<課題>

- (i) 図7～9の青色部分の魚種が、各河川で同種(種との配列一致率が同じ)と思われるものが、別種としてDNA塩基配列が得られた。これまで淀川水系河川での調査では、このような結果はでなかった。
- (ii) 図7、9の黄色部分のニッポンバラタナゴ、キタノアカヒレタビラは、富山県氷見市では生息確認がされておらず、この理由について環境DNAだけでは確かな説明ができない。
- (iii) 図8、9の緑色部分が、種との配列一致率100%にも関わらず「ウキゴリ属の一種」と表記した。その理由は、ジュズカケハゼとシンジコハゼの12SrRNAの塩基配列が完全一致することが判明し、ジュズカケハゼとシンジコハゼともに氷見市に生息するのでどちらかに特定すること

ができなかったからである。また、少しでも塩基配列が異なると種との配列一致率が低くなり、特に同じ河川中に生息する近縁種で特定することが困難な魚種は、「フナ属の一種」、「ウキゴリ属の一種」、「モツゴ属の一種」と表記している。

(iv) 図10のとおり、クロヨシノボリだけを図7～9から抽出し、月ごとの検出遺伝子数を示した。未検出の月はあるが、希少種ながら検出遺伝子数の割合から各河川における生息数が多いと想定できる。また、産卵期が5月～7月頃であるため、産卵期に合わせて検出遺伝子数も増加していることが分かる。

河川名	3月	5月	6月
仏生寺川①	0.000	0.000	0.000
	(0.000)	(15.838)	(45.483)
仏生寺川②	0.000	30.153	19.443
	(26.595)	(32.716)	(48.023)
万尾川①	4.380	12.340	44.230
	(4.538)	(12.340)	(45.326)
万尾川②	4.281	0.000	3.716
	(4.281)	(0.000)	(4.905)

図10 クロヨシノボリの検出遺伝子数の推移

上段：種との配列一致率100%のみ

下段：種との配列一致率100%以外も含む

以上の課題は、コイ科(アブラハヤ、タカハヤ、ウグイ、オイカワ、タモロコ、モツゴ、ニッポンバラタナゴ、タイリクバラタナゴ、イタセンパラ、キタノアカヒレタビラ等)、ハゼ科(クロヨシノボリ、カワヨシノボリ、ジュズカケハゼ、シンジコハゼ等)は交雑しやすいと言われているため、本来の塩基配列が生息環境により長い年月をかけて変異した可能性がある。

特に、種との配列一致率100%以外の種は、環境DNA分析で用いるMiFishプライマーが、

種によっては判定に注意をする必要があると注意喚起¹¹⁾されている。

従って、MiFishプライマーによる識別に注意を要する淡水魚類リストを参考にしながら、これらの課題を引続き精査していきたい。

7. 今後の展望

本来であればひみラボを拠点に2泊3日の研究合宿から、採水域の目視による生物相調査と環境DNAの解析結果を比較することで、より明確に生物相を把握することができたが、COVID-19による影響でこのような報告内容になったことは大変残念である。

今後は、富山県氷見市の河川に生息するタナゴ類等の魚種が春頃(3月から5月)から孵化し始めるので、定期的な環境DNA分析を利用した生物相調査を引続き行いながら、COVID-19の収束状況を見計らって、ひみラボでの研究合宿を実現させたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご支援をいただいた富山大学学術研究部理学系山崎裕治准教授、研究助成をいただいた公益財団法人下中記念財団及び関係の方々に深く感謝の意を表します。

【参考文献】

- 1) 山崎裕治、西尾正輝「簡易的な環境DNA分析方法を用いた絶滅危惧種イタセンパラの検出」(日本魚類学会 魚類学雑誌 発行 2019年11月 Vol.66, No2)
<https://doi.org/10.11369/jji.19-005>
- 2) 富山県レッドリスト2012
http://www.pref.toyama.jp/cms_sec/1709/kj00013513.html
- 3) 環境省レッドリスト2020
<http://www.env.go.jp/press/107905.html>
- 4) 株式会社生物技研
<https://gikenbio.com/>
- 5) NCBI(National Center for Biotechnology Information, 国立生物工芸情報センター)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 6) MitoFish (Mitochondrial Genome Database of Fish)
<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>
- 7) 氷見で確認されている淡水魚類リスト(ひみラボ)
<https://sites.google.com/site/himilab/5-himirabo-shui-zu-guan/bing-jianno-dan-shui-yu-lei>
- 8) 環境DNA調査・実験マニュアル
<https://ednasociety.org/>
- 9) 採水地点(Yahoo地図)
<https://map.yahoo.co.jp/>
- 10) Mifishプライマー
Miya et al. (2015) Royal Society Open Science 2:15088.
<https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsos.150088>
- 11) 環境省自然環境局生物多様性センター 環境DNA調査
http://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html



谷脇 鉄平先生
(たにわき てっぺい)

<略歴>

1981年 大阪府生まれ
2004年 島根大学総合理工学部物質科学科
卒業
2006年 大阪大学大学院工学研究科
マテリアル科学専攻修士課程 修了
2006年 箕面市役所 勤務
2011年 箕面市役所 退職
2011年 大阪高等学校 勤務(非常勤)
2012年 大阪高等学校 勤務(常勤)
2014年 大阪高等学校 勤務(教諭)
現在に至る

<研究歴>

- ・環境DNAを利用した淀川水系河川の生物相(魚種)調査及び生物保全の実践活動
- ・ムギツク(淀川, 大阪)mDNAの全容解明
Journal: Mitochondrial DNA Part B
「Complete mitochondrial DNA sequence of the East Asian minnow, *Pungtungia herzi* (Actinopterygii: Cypriniformes)」
2020年8月3日付で掲載
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23802359.2020.1800423>

<研究費採択実績>

- 平成29年度公益財団法人未来教育研究所
研究助成(奨励賞) 採択
- 平成30年度公益財団法人未来教育研究所
研究助成(奨励賞) 採択
- 2019年度公益財団法人双葉電子記念財団
青少年創造性開発育成事業 採択
- 2019年度一般社団法人全国浄化槽団体連
合会 水環境保全助成事業 採択
- 第58回(令和元年度)公益財団法人下中記
念財団 下中科学研究助成 採択
- 令和2年度公益財団法人中谷医工計測技
術振興財団 科学教育振興助成 採択

<勤務校>

学校法人大阪学園 大阪高等学校
〒533-0007 大阪府大阪市東淀川区相川2-18-51
電話 06-6340-3031