

# 環境 DNA 技術を用いたカラスガイのモニタリング手法の検討（第 1 報）

【水環境対策チーム】

盛山哲郎、増川正敏<sup>1)</sup>

## 1 はじめに

生物の生息状況の情報は生物を対象とする研究を行う上で必須である<sup>1)</sup>。しかし、実際に生息状況を調べるためには、生物の捕獲調査などを行う必要があるため、大変な労力がかかるほか、見分けが困難な生物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ってくる<sup>1)2)3)</sup>。そこで近年、従来の調査法を補う手法として「環境 DNA 技術」と呼ばれる分析手法が急速に発展している<sup>1)3)4)</sup>。

環境 DNA とは、水や土壌などの環境中に存在する生物由来の DNA のことである<sup>5)</sup>。環境 DNA 技術とは、環境 DNA を調べることで、同 DNA の有無から生物の存在を推定することができる技術である<sup>6)7)</sup>。環境 DNA 技術のメリットは、調査地での作業が水を汲むだけなので、簡便であることと、捕獲調査に伴う個体群や生息地への攪乱がほとんどないことである<sup>2)4)8)9)</sup>。よって、同技術は、調査の広域化を可能とし、生息調査に困難を伴う夜行性動物にも利用されている<sup>8)</sup>。

一方、イシガイ類の淡水産二枚貝であるカラスガイ *Cristaria plicata* は、現在、環境省レッドリストで準絶滅危惧に、鳥取県では特定希少野生動植物に指定されている。本県のレッドデータブックによるとカラスガイの生息地は県東部の湖山池と多鯰ヶ池とされているが<sup>10)</sup>、湖山池では、平成 24 年 3 月から開始された汽水化事業によりカラスガイの個体群は激減した<sup>11)12)</sup>。今後、本県では、湖山池周辺に淡水ビオトープを造成することを検討しており、同ビオトープでカラスガイの保全を目指している<sup>11)13)</sup>。よって、当研究所では、現在、人工的にカラスガイ稚貝を生産しており<sup>14)</sup>、この稚貝をビオトープに放流することも考えられる。そこで、放流されたカラスガイ稚貝の生存確認手法の一つの可能性として、環境 DNA 技術を用いたモニタリング手法を検討することとした。カラスガイの環境 DNA を検出する手法（以下「検出系」という。）を設計したので、本稿で報告する。

## 2 カラスガイの環境 DNA 検出系の設計

カラスガイの存在を確認するためには、近縁種

の DNA を誤って検出することがないように、カラスガイに特異的な検出系を作製する必要がある。本研究では PCR による検出系の設計を行った。

### 2.1 湖山池周辺水域イシガイ類の選定

検出の対象は湖山池周辺水域とし、当該水域に生息することが知られているカラスガイの近縁種（イシガイ類）を表 1 のとおり 4 種選定した。

表 1 湖山池周辺水域に生息するカラスガイの近縁種 4 種とカラスガイ（以下「湖山池周辺水域イシガイ類」という。）

対象種	カラスガイ
近縁種	イシガイ
	ヌマガイ
	ニセマツカサガイ
	タガイ

カラスガイの近縁種を表 1 の 4 種に選定した理由は以下のとおりである。

イシガイ、ヌマガイ、ニセマツカサガイは平成 24 年 11 月に実施された湖山池周辺の淡水貝類調査において、湖山池の流入河川で生息が確認されている（平成 24 年 12 月 27 日開催湖山池環境モニタリング委員会資料）。タガイは平成 25 年 1 月 29 日～2 月 1 日に実施された湖山池周辺ため池のイシガイ類調査において、1 か所だけ生息が確認されている（調査の実施主体は主に当所。結果は未公表）。

### 2.2 湖山池周辺水域イシガイ類の遺伝子情報入手

湖山池周辺水域イシガイ類 5 種のミトコンドリアの 16S rRNA 遺伝子の情報を DNA データベースの DDBJ (DNA Data Bank of Japan) から入手した（表 2）。

### 2.3 カラスガイに特異的なプライマーの設計

湖山池周辺水域イシガイ類 5 種の遺伝子を比較して、プライマー設計ツールである Primer-BLAST (NCBI (National Center for Biotechnology Information) 提供) を用いて、カラスガイ遺伝子に特異的なプライマーを表 3 のとおり設計した。この設計した 2 種類のプライマーセットの PCR での増幅

1) 現 鳥取県生活環境部くらしの安心局水環境保全課

領域長は、144bp と 121bp である。環境 DNA 技術で  
使用されるプライマーは、増幅領域長が 100～  
150bp 程度となるよう設計されるのが一般的であ  
る<sup>7)</sup>とされており、本研究でも、この範囲内にな  
るようプライマーを設計した。増幅領域長を前述の  
100～150bp 程度にする理由は以下のとおりである。

増幅領域長が長すぎると、環境中で DNA が徐々に  
分解されていくために PCR で増幅できる可能性が  
小さくなり<sup>15)</sup>、増幅領域長が短すぎるとダイレク  
トシーケンスが困難となるためである<sup>7)</sup>。

### 3 今後について

設計したカラスガイ検出系は、近縁種 4 種の DNA  
を誤増幅しないことを Primer-BLAST で理論上確認  
している。今後、本検出系が実際にカラスガイの  
DNA のみ特異的に増幅し、近縁種 4 種の DNA を誤増  
幅しないかどうかを確かめる確認実験と、本検出系  
の有用性を確認する生息池での実証実験を行う予  
定である。

### 4 参考文献

- 1) 土居秀幸：環境 DNA による新しい生物調査法，織  
維機械学会誌，69(4)，209-211(2016)
- 2) 辻冨月，遊磨正秀，山中裕樹：水域における環境  
DNA 法を用いた生物モニタリング，龍谷大学里山学  
研究センター 2014 年度年次報告  
書，188-191(2016)
- 3) 福岡有紗，高原輝彦，松本宗弘，丑丸敦史，源利  
文：在来希少種カワバタモロコの環境 DNA によ  
る検出系の確立，日本生態学会  
誌，66，613-620(2016)
- 4) 源利文：水域生態系における環境 DNA モニタリ  
ング手法開発の現在，環境技術，46(12)，  
624-629(2017)
- 5) 近藤倫生：水環境における環境 DNA を用いた生物  
モニタリング，水環境学会誌，41(A)(4)，118-122  
(2018)
- 6) 土居秀幸ほか：環境 DNA 技術を用いた生物分布  
モニタリング手法の確立，環境省環境研究総合推  
進費平成 27 年度研究成果報告会資料（ネット de  
研究成果報告会），(2015)，[http://www.env.go.jp/  
policy/kenkyu/suishin/kadai/syuryo\\_report/h27/  
h27\\_suishin\\_report.html](http://www.env.go.jp/policy/kenkyu/suishin/kadai/syuryo_report/h27/h27_suishin_report.html)，平成 31 年 1 月 9 日確認
- 7) 高原輝彦，山中裕樹，源利文，土居秀幸，内井喜  
美子：環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域

の研究事例を中心にして～，日本生態学会誌，66，  
583-599(2016)

- 8) 源利文：種特異的な環境 DNA 検出によるマクロ生  
物の生態調査，水環境学会誌，41(A)(4)，123-127  
(2018)
- 9) 内井喜美子：環境 DNA による外来種および希  
少種の迅速な検出，環境技術，46(12)，630-635  
(2017)
- 10) レッドデータブックとつとり改訂版，2012 年 3  
月発行，[http://www.pref.tottori.lg.jp/95805.  
htm](http://www.pref.tottori.lg.jp/95805.htm)，平成 31 年 1 月 11 日確認
- 11) 鳥取県、鳥取市：湖山池将来ビジョン推進計画  
（第 3 期湖山池水質管理計画）(2013)
- 12) 宮本康，福本一彦，畠山恵介，森 明寛，前田  
晃宏，近藤高貴：鳥取県における特定希少野生動物  
カラスガイ *Cristaria plicata* 個体群の現状：幼生  
と宿主魚類の關係に着目して，保全生態学研究，20，59-69(2015)
- 13) 増川正敏，森 明寛，盛山哲郎，岡本将揮，前田晃  
宏：湖山池周辺水域における淡水ビオトープ造成に  
向けた検討（第 1 報）～カラスガイ等淡水生物の保  
全を目指して～，鳥取県衛生環境研究所報，57，  
33-43(2016)
- 14) 増川正敏，森 明寛，盛山哲郎，岡本将揮，前田晃  
宏：カラスガイ稚貝育成に関する一考察，第 60 回鳥  
取県公衆衛生学会プログラム及び発表集，110-112  
(2017)
- 15) 岩崎渉，佐藤行人，源利文，山中裕樹，荒木仁志，  
宮正樹：環境 DNA 解析のインパクト，実験医学，  
34(1)，103-107(2016)

表2 湖山池周辺水域イシガイ類5種のミトコンドリアの16S rRNA 遺伝子配列情報 (アクセッション番号)

対象種	カラスガイ	KM233451 KM233451.1_Cristaria_plicata_mitochondrion_complete_genome.
近縁種	イシガイ	GQ451850 GQ451850.1_Unio_douglasiae_sinuolatus_isolate_C4_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence_mitochondrial.
		GQ451851 GQ451851.1_Unio_douglasiae_sinuolatus_isolate_C42_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence_mitochondrial.
	ヌマガイ	LC223966 LC223966.1_Sinanodonta_lauta_mitochondrial_gene_for_16S_rRNA_partial_sequence_isolate:_FUKUNUMA_22.
		LC223967 LC223967.1_Sinanodonta_lauta_mitochondrial_gene_for_16S_rRNA_partial_sequence_isolate:_KONZAISYU_E.
		LC224010 LC224010.1_Sinanodonta_lauta_mitochondrial_gene_for_16S_rRNA_partial_sequence_isolate:_fk168.
	ニセマツカサガイ	LC223986 LC223986.1_Inversiunio_yanagawensis_mitochondrial_gene_for_16S_rRNA_partial_sequence_isolate:_Iy09_08.
		LC223987 LC223987.1_Inversiunio_yanagawensis_mitochondrial_gene_for_16S_rRNA_partial_sequence_isolate:_Iy09_10.
		LC223988 LC223988.1_Inversiunio_yanagawensis_mitochondrial_gene_for_16S_rRNA_partial_sequence_isolate:_Iy43_01.
		LC223989 LC223989.1_Inversiunio_yanagawensis_mitochondrial_gene_for_16S_rRNA_partial_sequence_isolate:_Iy43_05f.
	タガイ	LC224011 LC224011.1_Sinanodonta_japonica_mitochondrial_gene_for_16S_rRNA_partial_sequence_isolate:_fk20f.
		LC224012 LC224012.1_Sinanodonta_japonica_mitochondrial_gene_for_16S_rRNA_partial_sequence_isolate:_fk35f.

表3 設計したプライマー

○1次PCR (増幅領域長 144bp) 23F forward primer : 5'-GAGGCCAGTGAATGGCAAGA-3' 9R reverse primer : 5'-GTGTGTAAACAGAAGCGCGA-3'
○2次PCR (増幅領域長 121bp) OriF forward primer : 5'-GGAACACCTTACTTTGTGGTGTC-3' 9R reverse primer (1次PCRと同様)