

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440238

研究課題名(和文) 市民科学活動との協働による在来・外来オオサンショウウオの環境DNA調査

研究課題名(英文) Environmental DNA survey for endemic and exotic giant salamanders by cooperation with citizen scientists

研究代表者

源 利文 (Minamoto, Toshifumi)

神戸大学・人間発達環境学研究科・特命助教

研究者番号：50450656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：特別天然記念物であるオオサンショウウオの環境DNA検出手法を確立し、分布域全域である西日本の河川で検出試験を行った。12水系の331地点で調査を行った結果、111地点でオオサンショウウオのDNAを検出した。この結果をもとに、生息適地モデルを作成したところ、既知の生息地とほぼ一致するモデルが得られ、環境DNA分析を用いた希少種の生息適地探索が可能であることが示された。研究の過程では市民団体や高等学校との協働も行い、お互いにとって意義のある連携が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Detection method of environment DNA (eDNA) of Japanese giant salamander (*Andrias japonicus*), a special natural treasure of Japan, was established, and a detection test was conducted in rivers in Western Japan. As a result of investigating at 331 sites in the 12 rivers, eDNA of Japanese giant salamander was detected at 111 sites. Based on this result, we created an ecological niche model. The model almost matched the known distribution of the species, showing the possibility of niche modeling for rare species based on environmental DNA analysis. In the process of research, we collaborated with civic groups and high school students, and it became clear that meaningful collaboration is possible for each other.

研究分野：分子生態学、水域生態学

キーワード：環境DNA リアルタイムPCR オオサンショウウオ 河川 市民科学

### 1. 研究開始当初の背景

オオサンショウウオ(在来)は国の特別天然記念物にも指定される日本固有の両生類である。近年、京都府の桂川水系において、中国産の外来種であるチュウゴクオオサンショウウオの侵入および雑種形成が報告されており、深刻な問題となっている。両種の形態的な識別は困難であり、DNA 鑑定によってのみ識別することができる。外来種の侵入は西日本全域で懸念されているが、個体数が少ないこと、夜行性であることなどの理由により、従来の捕獲・DNA 鑑定の手法による広域調査は困難であった。

近年、環境中の DNA を解析して大型脊椎動物の分布モニタリングを可能とする研究例が多数報告されている。研究代表者の源は、在来及び外来オオサンショウウオの環境 DNA 検出法の開発に取り組み、京都の桂川水系で野外適用の実績も有していた。

また、代表者らはこれまでに神戸大学サイエンスショップを通じて、兵庫県内の河川で地元の環境保全団体とともにオオサンショウウオ環境 DNA 調査を行った実績があり、その経験からは、市民参加型の環境 DNA 調査により、「水を汲むだけでオオサンショウウオのことがわかる」という先進技術を知ることによる驚きと「自分の汲んだ水を解析した結果がわかる」といった参加の喜びを生み、単なる講演会や講義よりも効果的な科学教育の手段となることが期待される。

このような背景のもと、市民団体等と協働してオオサンショウウオの環境 DNA 検出の系を作成し、西日本全域で調査を行った。

### 2. 研究の目的

本研究で行う西日本全域(オオサンショウウオの自然分布域全域)における広域調査によりオオサンショウウオの国内における分布を正確に理解することが可能である。また、種分布モデルに適用によって、オオサンショウウオの分布モデルの作成、温暖化に対する応答予測などを行うことを目的とする。

さらに、本研究では環境保全活動を行う市民団体、中学校や高校の科学部などと連携して、現地調査および環境水サンプリングを行う。環境 DNA を用いた生物調査はオオサンショウウオに限らず、水棲の脊椎動物をはじめ、水の近くに棲息するさまざまな動物種に適用可能である。そこで、本研究では市民と協働して環境 DNA 調査を行ってお互いに情報を交換することも一つの目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) プライマーの作成

本研究では、核の rDNA 領域を対象としたプライマーおよびプローブを作成し、ミトコンドリアを対象とした検出系と、どちらが効率的に環境 DNA を検出できるか検証した。まず、両生類 2 種 3 個体、硬骨魚類 2 種 7 個体の核 rDNA 領域配列を National Center for

Biotechnology Information (NCBI) のデータベースから得た。その後遺伝子配列解析ソフトである eBioX1.6 を用いてアライメントし、プライマー設計ソフト Primer3 を用いて、保存性の高い 18S、5.8S、28S rRNA 領域の共通部分に、Tm 値が 55 前後、GC 含有量が 50%前後となるように、両生類の rDNA を対象とするユニバーサルプライマーを設計した。その後、作成したユニバーサルプライマーを用いてオオサンショウウオの組織由来する DNA を PCR 増幅し、ダイレクトシーケンスを行った。

上述のシーケンス情報を利用して、在来種のオオサンショウウオに固有の ITS1 領域の両端に特異的なプライマーを設計した。この PCR 産物について、MiSeq を用いた次世代シーケンシングを行った。次世代シーケンシングによって得られた多数の配列から、オオサンショウウオ由来のものだけを抽出し、これまでにダイレクトシーケンシングによって得られている配列と一緒にアライメントし、オオサンショウウオ ITS 領域のコンセンサス配列を作成した。得られたコンセンサス配列をもとに Primer Express 3.0 を用いて、TaqMan minor groove binding (MGB) Quantification の設定で条件に合うプライマー・プローブセットを検索した。その結果、プローブとリバースのプライマー配列がオオサンショウウオ属に特異的なプライマー・プローブセットを選定することができた。最後に、先行研究で用いられている、ミトコンドリア DNA の NADH1 領域を対象とするプライマー・プローブセット(増幅長 133bp)と感度の比較を行った。

#### (2) 西日本広域調査

西日本の広域においてオオサンショウウオの分布を調査すべく、岐阜、三重、兵庫、岡山、鳥取、広島、島根、大分の 8 県において、12 水系の 331 地点で 2014 年 6 月から 2015 年の 11 月までの計 19 日間で採水を行った。水サンプルを実験室に持ち帰り、平均孔径 0.7  $\mu\text{m}$  のグラスファイバーフィルター(GF/F フィルター)でサンプル水 1L を濾過した。コンタミネーションを防止するため、サンプルと触れる各種器具類は使用前後に市販のハイター溶液でブリーチングした。

DNA 抽出は、市販の DNA 抽出キット(DNeasy Blood & Tissue Kit)と、遠心溶出器(サリベット)を用い、Uchii et al. (2016; Molecular Ecology Resources)の方法に従って行った。核 DNA を対象としたプライマーと、先行研究で用いられているミトコンドリアを対象としたプライマーを比較したところ、核 DNA を対象としたプライマー・プローブセットを用いた検出系の方が検出感度が高かったため(研究成果参照)本研究では核 DNA を対象としたプライマー・プローブセットを用いてリアルタイム PCR を行った。溶液の組成は 1 チューブあたり 1 x TaqMan Gene

Expression Master Mix、900 nM の各プライマー、125 nM の Taqman プローブ、2  $\mu$ l の環境 DNA サンプル の計 20  $\mu$ l とした。また PCR 条件は、50 で 2 分、95 で 10 分のインキュベーション後、95 15 秒、60 60 秒からなるサイクルを 55 サイクル繰り返した。一サンプルについて 4 繰り返しずつ行ったので、一つの 96 穴プレートで、ポジティブコントロール (0.1 ng/ $\mu$ l の対象 DNA) とネガティブコントロール (純水) 環境サンプル 22 サンプルの解析を同時に行った。サンプルは、4 繰り返し中 1 つでも増幅を確認できたら陽性と判断した。キャリアオーバーコンタミネーションを防止するため、PCR 前後で実験室を分けて利用した。

### (3) 生息適地モデルの作成

本研究では、Maxent を用いたモデルの作成を行った。環境データは国土数値情報から最高/最低/平均気温、全天日射量、傾斜、標高、最深積雪、平均降水量、河川流域を、国土交通省の国土調査サイトから表層地質図をダウンロードして用いた。その後、地理情報システム (GIS) のソフトウェア QGIS のオープンソースソフトウェアである GLASS を用いてそれぞれのデータを 1 km メッシュの ASC ファイルに変換した。また、作成したモデルを評価するため、比較として環境省の生物多様性センターによる動物分布調査のデータも用いて、2 つのモデルを作成した。生息適地モデルの作成には、統計解析ソフト Maxent v.3.3.3k を用いた。環境 DNA および動物分布調査の 2 つの分布情報を用いて、どちらのモデルも 2:8 でクロスバリデーションを行った。また、繰り返しは 100 回行った。その他の設定はデフォルトのままで行った。

作成した生息適地モデルによる予測を保全につなげるため、このまま気候変動が進んだとき、オオサンショウウオがどのように生息地を変化させていくのか (どのように生息地が狭まるのか) を予測するモデルを作成した。気温データをそれぞれ 2 あるいは 4 ずつ上昇させたモデルを作成し、温暖化のあたえる影響の検証を行った。種の分布データは、環境 DNA 分析手法によって得られた分布データを用い、Maxent で将来の分布域を予測した。

### (4) 追加調査によるモデルの検証

生息適地モデルによって生息確率が高いと評価された場所のうち、環境 DNA 調査が行われていない山口県と四国の河川について、追加でサンプリングを行い、作成されたモデルの検証を行った。ろ過、DNA 抽出、リアルタイム PCR については広域調査と同様の手法を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 新たなプライマーの作成

佐用川、羽束川、駅館川の 3 つの水系にお

いて核 DNA を対象とするプライマー・プローブセットと、先行研究で用いられているミトコンドリア DNA を対象とするプライマー・プローブセットを比較したところ、核 DNA を対象としたプライマー・プローブセットの方が有意に検出感度が高いことがわかった (一般化線形モデル:  $p=0.00492$ ;  $N=136$ )。そのため、広域調査には核を対象とする検出系を用いることとした。

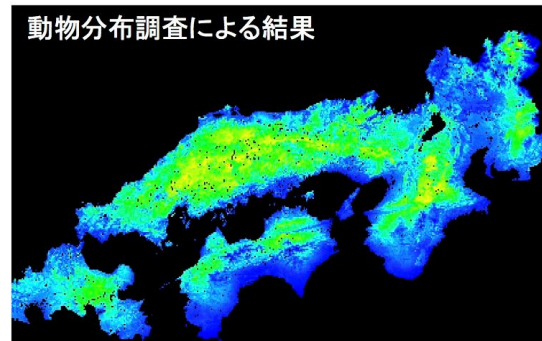
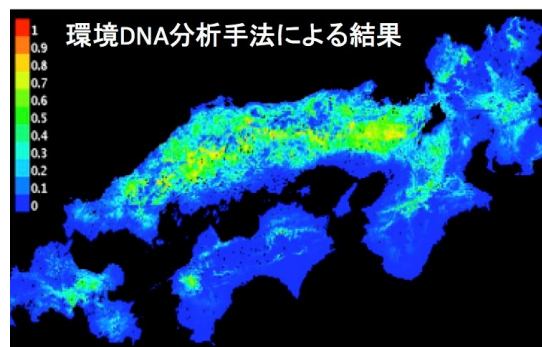
### (2) 西日本広域調査の結果

広域調査の結果、12 水系 331 地点中 111 地点 (岐阜県: 長良川水系 11 地点、三重県: 名張川水系 5 地点、兵庫県: 佐用川を中心とする千種川水系 9 地点、羽束川水系 13 地点、市川水系 9 地点、円山川水系 1 地点、岡山県: 高梁川水系 8 地点、旭川水系 11 地点、鳥取県: 日野川水系 10 地点、広島県: 太田川水系 14 地点、島根県: 江ノ川 17 地点、大分県: 駅館川水系 3 地点) においてオオサンショウウオの DNA 検出に成功した (下図: 先行研究の桂川のデータを含むため、地点数などが上述と異なる)。



### (3) 生息適地モデル

環境 DNA 分析手法によって得られた分布予測図と、動物分布調査によって得られた分布によるそれぞれのモデルによる生息ポテンシャルは下図のようになった。どちらのモデ



ルも現在多数の個体が生息することが知られている中国山地や、分布の南西限である大分県などで生息ポテンシャルが高くなった。また、環境 DNA 分析によるモデルは、動物分布調査によるモデルに比べて、生息ポテンシャルが高いところと低いところのはっきり分かれているのがみてとれる。モデルの当てはまりの良さを比較する AUC を両モデル間で比べると環境 DNA 分析手法による結果の方が高かった（環境 DNA : 0.94、動物分布調査 : 0.84）。モデルに大きく影響するパラメータは、環境 DNA 分析によるモデルでは日射量、降水量、最低気温であり、動物分布調査によるモデルでは降水量、標高、表層地質であった。相関解析から、双方のモデル間には有意な相関があった（相関係数  $r = 0.59$ 、 $p = 2.2e-16$ ）。また、二つのモデルは 72% の割合で同じ予測をしていた。

追加サンプリングによる検討は 5 水系中 2 水系（佐波川水系、仁淀川水系）においてオオサンショウウオの DNA 検出に成功し、モデルの確からしさを実証できた。

#### （４）市民との協働

本研究を実施するにあたり、佐用川のオオサンショウウオを守る会、兵庫県下、大分県か、岐阜県下の高等学校と協働して環境 DNA の調査を行った。この結果、佐用川流域でオオサンショウウオの新たな生息地が発見されるなど、協働で事業を行ったことによる効果が確認できた。

また、複数の高等学校生物部等に環境 DNA 分析技術の提供を行った。その結果、兵庫県立農業高等学校が 2014 年度兵庫県高等学校総合文化祭自然科学部門で最優秀賞、岐阜県立岐阜高等学校が 2016 年度岐阜県高等学校総合文化祭自然科学部門で最優秀賞を獲得するなど、高等学校の生物部の活動や、課題研究等に貢献できることが明らかになった。

#### （５）まとめ

本研究では、環境 DNA 分析手法の結果に基づく生息適地モデルの作成を行うことに初めて成功した。また、短期間の広域調査による在来オオサンショウウオの最新の分布情報を得ることができた。オオサンショウウオの分布に関しては詳細かつ集約的な情報が存在しておらず、本研究によってオオサンショウウオ分布域の全域にわたるスナップショットを明らかにできたこと、そして生息適地モデルによって、オオサンショウウオに適した環境を持つ地域の可視化することに成功したことは、オオサンショウウオ保全において有益である。また、生息適地モデルを利用する際に環境 DNA 分析が有効であることも示すことができた。これにより、少ない労力で広範囲における生物種のスナップショットを得ることができるため、生物多様性の保全を促進させるツールになりうる。

また、市民と協働することで地元に住む人

ならではの情報を得られること、逆に大学のもつ技術による最新情報を提供できることなど、生物の保全上有益であることが示された。さらに、環境 DNA 分析技術を高等学校に提供することもできた。このことは、環境 DNA 分析が多くの人に行える難しくない技術であることを示しており、今後ますます生物多様性保全の役に立つツールとなることが期待される。

#### ５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

##### 〔雑誌論文〕(計 23 件)

源 利文、伊藤 真之、蛭名 邦禎、環境 DNA 分析手法による高校生研究活動への支援、日本科学教育学会研究会研究報告、査読無、30 巻、2016、pp. 21-24.

Minamoto, T., Naka, T., Moji, K., Maruyama, A., Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction, *Limnology*, 査読有, 17 巻, 2016, pp. 23-32.

DOI: 10.1007/s10201-015-0457-4

Fukumoto, S., Ushimaru, A., Minamoto, T., A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan, *Journal of Applied Ecology*, 査読有, 52 巻, 2014, pp. 358-365.

DOI: 10.1111/1365-2664.12392

##### 〔学会発表〕(計 28 件)

Minamoto, T., Hidaka, S., Katsuhara, K., Tomita, S., Yamamoto, S., Ushimaru, A., Estimating the distribution of the Japanese giant salamander (*Andrias japonicus*) by ecological niche modeling based on environmental DNA detection, Ecological Society of America Annual Meeting 2016, フォートローダーデール (アメリカ)

日高 舜介、勝原 光希、富田 勢、丑丸 敦史、源 利文、環境 DNA 分析手法を用いたオオサンショウウオ (*Andrias japonicus*) の広域調査、日本生態学会第 63 回全国大会、2016.3.20-24、仙台国際センター (宮城県)

福本 想、丑丸 敦史、源 利文、環境 DNA 分析を用いた在来希少種と近縁外来種の流域スケール調査：京都府桂川のオオサンショウウオを例に、日本生態学会第 62 回全国大会、2015.3.18-22、鹿児島大学 (鹿児島県)

##### 〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室のホームページ（研究成果等を掲載）

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~minamoto/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

源 利文（MINAMOTO, Toshifumi）

神戸大学・大学院人間発達環境学研究科・

特命助教

研究者番号：50450656

### (4)研究協力者

富田 勢（TOMITA, Sei）

日高 舜介（HIDAKA, Shunsuke）

福本 想（FUKUMOTO, Sou）