

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450348

研究課題名(和文) 水から抽出したDNAを用いて水路に生息する魚類を検出する手法の開発

研究課題名(英文) Development of method for detecting fish in agricultural canals using DNA extracted from water

研究代表者

小出水 規行 (Koizumi, Noriyuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究部門 水利工学研究領域・上級研究員

研究者番号：60301222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：農業水路の水から抽出したDNA(環境DNA)を利用して、水路にいる魚類の生息状況を評価する手法開発に取り組んだ。ドジョウとタモロコの分析では、環境DNAから両種のDNAが検出され、生息の有無を推定することに成功した。アブラハヤの分析では検出された本種のDNA量と定置網による採捕個体数との比較により、環境DNAが生息分布量の推定手法として利用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：An evaluation method of fish inhabitation in agricultural canals was developed using DNA extracted from canals' water, environmental DNA (eDNA). In analyses for dojo loach and tamoroko, it was successful to estimate fish presence or absence through DNA detection of both species from eDNA. In analysis of Amur minnow, it was shown that eDNA could be used as an estimation method of abundance distribution of fish by comparing fish DNA volumes detected from eDNA with fish numbers caught by trap nets.

研究分野：農村生態工学

キーワード：環境DNA 農業水路 水田生態系

1. 研究開始当初の背景

農業農村整備事業の実施現場では、2001年の土地改良法の改正をきっかけに、環境や生態系配慮に向けての基盤データとなる水生生物（魚類や両生類等）の生息や移動分布情報を収集しなくてはならない。このような情報を得るためには、通常、漁具やトラップを用いての個体採捕による生物調査を実施するが、調査に係る人員や費用の確保、採捕や生物分類の技術等の様々な問題が生じている。さらに、農村環境には個体数が少なく希少性の高い種も多く生息し、侵襲的である個体採捕の良否とともに、時には煩雑な行政手続きを通じての採捕許可が必要な場合もある。現行の生物調査法を見直し、これに代替可能な調査法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究課題は、近年、進展が著しいDNA分析技術の導入により、簡便かつ精度の高い生物調査法を開発できないか、という着想に基づいている。具体的には、現在、水や土壌に含まれているDNAを抽出し、その中にどのような微生物や細菌のものがあるのか網羅的に推定できる。当課題担当者も予備実験において、岩手県いさわ南部地区の農業用排水路の水から、数10に及ぶ原生生物や菌類とともに、種まで特定できないが、魚類のDNAを確認した。

さらに、種の特정에繋がる予備実験として、課題担当者はドジョウ1尾を水槽に放し、1時間後に採水し、抽出した水のDNAからドジョウのものを検出した。このことは、どのような状態（例えば、糞や組織等）であるかは不明だが、水から抽出したDNAを分析して、生息している魚類を推定できることを示している。

上述のように、水から抽出したDNAは‘環境DNA’と呼ばれている。環境DNAを抽出し、対象種のDNAを検出することによって、種の

生息を確認する手法が（図1）、近年、河川や沿岸域に適用され、良好な結果を得ている。本研究課題では、農村水域における環境DNA手法の開発と適用に向けて、(1)ドジョウとタモロコの生息の有無の推定、(2)アブラハヤのDNA量と個体数密度との関係解析について取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) ドジョウとタモロコの生息の有無の推定

農業水路や水田域に広く分布するドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* とタモロコ *Gnathopogon elongatus* を対象に、水路の水から抽出した環境DNAを用いて、両種の生息の有無を推定できるか実験した。

① 調査水路と採水

千葉県成田市と栃木県下野市における農業用排水路1~4を対象とした（図2）。水路1, 2, 4は水面幅約1mの支線排水路、水路3は幅約5mの幹線排水路である。どの水路においてもドジョウとタモロコの生息を確認しているが、水路4では非かんがい期（10~4月）に通水が止まるため、タモロコはいなくなる。

環境DNAを抽出するため、各水路で水2Lを2014年12月に採水した。採水は、水路1~3では水面幅中央付近の表層で、水路4では降水による溜まり水で行った。採水後の水は冷蔵状態で実験室へ搬送し、直ちにDNAを抽出した。

② 環境DNA抽出とリアルタイムPCR解析

分析手順の全体について略述すると、1) 採水2Lのうち1Lをフィルターろ過した。2) フィルターに付着した残渣から、シリカメンブレン製のキットを用いてDNAを抽出した。3) DNA量を定量可能なリアルタイムPCR解析（SYBR Green法）により、環境DNAに含まれているドジョウとタモロコのDNAを検出した。PCR解析の試薬組成と温度条件はPCR酵素に

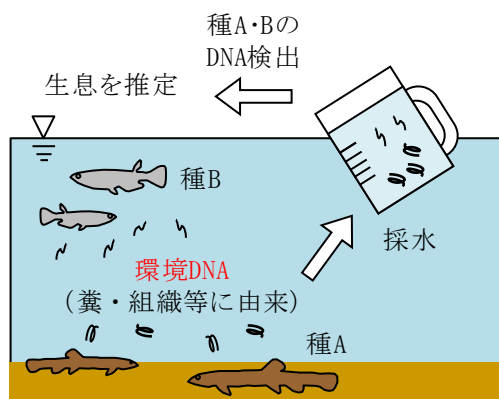


図1. 水中に漂う環境DNAのイメージ



図2. 千葉県成田市の調査水路1, 2と栃木県下野市の調査水路3, 4

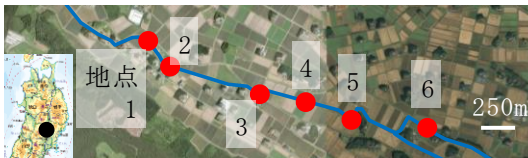


図3. 岩手県いさわ南部地区の農業用排水路における採水及びアブラハヤ採捕の6調査地点（国土地理院ウェブサイト <http://maps.gsi.go.jp> を加工して作成した）

添付の取扱説明書にしたがい、解析後のデータ処理は分析機器に付属のソフトウェアを利用した。なお、PCR 増幅に必要な両種の種特異的プライマーは、DNA データベースを利用して、ミトコンドリア DNA のシトクローム *b* 遺伝子領域を対象に作成した。

(2)アブラハヤの DNA 量と個体数密度との関係解析

環境 DNA を利用した魚類の生息分布推定に関する解析を行った。岩手県いさわ南部地区の農業用排水路に生息し、当該地区の保全対象種であるアブラハヤ *Rhynchocypris lagowskii* について、環境 DNA に含まれる本種の DNA 量と採捕個体数との関係について解析した。

①調査水路と採水及びアブラハヤ採捕

いさわ南部地区の水路延長約 3km 区間において、採水とアブラハヤ採捕を行うための 6 調査地点を設置した（図 3）。各地点での採水を 2015 年 6 月 8 日に行い、表層からくみ取った水 1L をその場でフィルターろ過し、残渣をフィルターごとエタノールで固定した。アブラハヤ採捕を 2014 年 7 月 8～10 日及び 2015 年の採水直後に行った。小型定置網を一晚仕掛け、翌日に採捕された個体を計数した。なお、全ての作業において水位が大きく変化するような降雨はなかった。

②環境 DNA 分析と採捕個体数との関係解析

環境 DNA 分析は次のように行った。市販のキットを用いてろ過フィルター上の残渣から DNA を抽出し、アブラハヤの種特異的プライマーを用いて PCR 増幅した。PCR 増幅産物を電気泳動し、電圧として計測された DNA バンドの輝度を環境 DNA に含まれているアブラハヤ DNA 量の指標とした。また、DNA 量と採捕個体数との関係解析については、アブラハヤの生息数が多いほど DNA 量も多くなると仮定し、各地点の DNA 量と採捕個体数を比較し、その相関関係を調べた。

4. 研究成果

(1) ドジョウとタモロコの生息の有無の推定

調査水路の水から抽出した環境 DNA には、ドジョウとタモロコのものが含まれていた

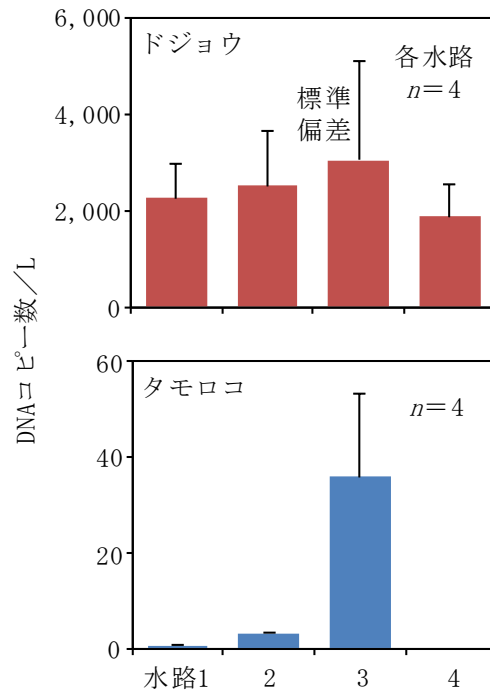


図4. 調査水路 1～4 の環境 DNA から検出されたドジョウとタモロコの DNA 量

（図 4）。検出された DNA 量を 1L あたりコピー数（DNA 鎖の本数）に換算すると、ドジョウの DNA 量はタモロコよりも 100 倍程度多かった。水路間では両種共に水路 3, 2, 1, 4 の順に多い傾向がみられた。水路 1, 2 における過去の生息量調査では、ドジョウよりもタモロコの個体数が多く、両種の個体数共に水路 1 よりも水路 2 の方が多い結果が得られている。本実験結果は既往の個体採捕調査結果にも一致する傾向にある。さらに水路 4 は溜まり水であることから、タモロコの生息は想定し難い。

以上を踏まえると、検出されたドジョウとタモロコの DNA 量は生息の有無だけでなく、生息量までも反映している可能性が推察される。生息魚類のモニタリング手法として、水路の水から抽出した環境 DNA 分析が有効であることが確認された。

(2)アブラハヤの DNA 量と個体数密度との関係解析

アブラハヤの DNA は全調査地点から検出され、各地点の DNA 量は地点 3, 4 で多く、地点 1, 6 で少なかった（図 5 上）。一方、採捕個体数は地点 4, 5 で多く、地点 2, 3 で少なかった（図 5 下）。両者の相関関係を図 6 に示す。結果として、地点 2, 3 を外れ値として除くと、各地点の DNA 量は採捕個体数と強い正の相関を示し、DNA 量が生息数を反映している可能性を示唆している。また、地点 2, 3 は、流れが速く水路底も不安定なため、定置網の設置が難しい場所であった。採捕個体

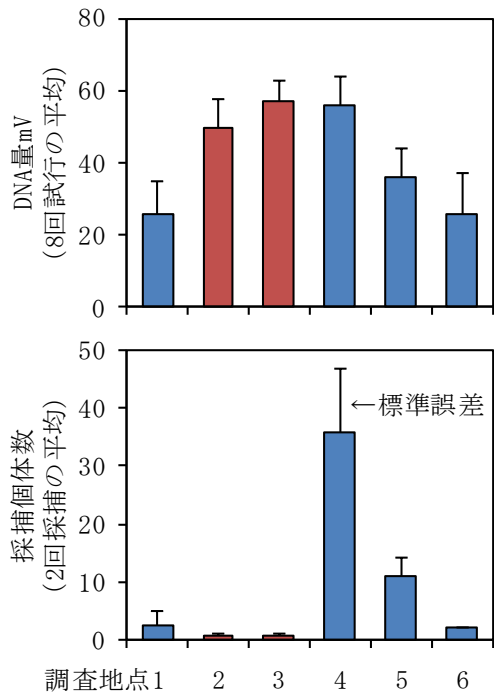


図5. 各調査地点のアブラハヤ DNA 量 (上) と採捕個体数 (下) の平均

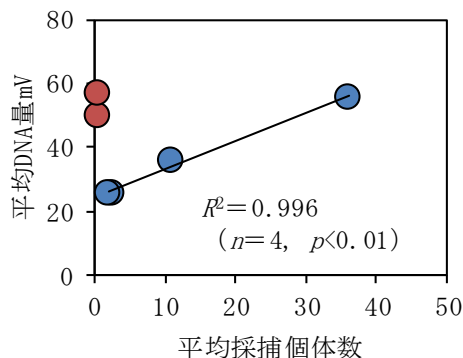


図6. 各調査地点のアブラハヤ平均 DNA 量と採捕個体数の相関関係

数が生息数を十分に反映していないのかも知れない。

以上、調査地点数が少ない等のいくつか課題は残されているが、環境 DNA を利用して魚類生息分布を推定できる可能性が示された。今後は推定精度を高めるための採水量、時期、場所等の最適なサンプリング方法について検討し、本手法の実用化に向けた取り組みを行う予定である。さらに、魚類だけでなく、両生類や水生昆虫等についての PCR プライマーを作成し、農村環境に生息する様々な生物種、特に生息量の少ない希少種等への適用も期待される。研究事例の蓄積とともに、調査・分析方法についてのマニュアル作成等も今後の課題として取り組む必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Koizumi N., A. Mori, T. Mineta, E. Sawada, K. Watabe and T. Takemura (2017) Plant species identification using fecal DNAs from red-eared slider and Reeves' pond turtle in agricultural canals for rural ecosystem conservation. *Paddy and Water Environment* **15** (in press). (査読有)
DOI:10.1007/s10333-016-0576-5
- ② 小出水 規行, 森 淳, 渡部 恵司, 竹村 武士 (2016) 水路の水に含まれている DNA から対象魚類の生息の有無を推定する方法. 平成 27 年度農村工学研究所研究成果情報. 31-32. (査読有)
- ③ Koizumi N., A. Mori, T. Mineta, E. Sawada, K. Watabe and T. Takemura (2016) Exploratory environmental DNA analysis for investigating plant-feeding habit of the red-eared turtle using their feces samples. *Jurnal Teknologi* **78**:9-13. (査読有)
- ④ Koizumi N., T. Takahara, T. Minamoto, H. Doi, A. Mori, K. Watabe and T. Takemura (2015) Preliminary experiment for detection method of fish inhabiting agricultural drainage canals using environmental DNA. *Transactions of The Japanese Society of Irrigation, Drainage and Rural Engineering Journal* **297**:IV_7-IV_8. (査読有)
- ⑤ Koizumi N., Y. Hanamura, K. Nishida, A. Mori, K. Watabe T. Takemura, A. Man, F.M. Kassim and S. Morioka (2015) Development of 18 novel polymorphic microsatellite markers for the mysid crustacean *Mesopodopsis orientalis*. *Conservation Genetics Resources* **7**:133-135. (査読有)
- ⑥ Koizumi N., T. Moriyama, T. Yoshino, K. Nishida, A. Mori, K. Watabe and T. Takemura (2015) Development and characterization of microsatellite loci for *Rhinogobius* sp. YB (Gobiidae). *Conservation Genetics Resources* **7**:137-141. (査読有)
- ⑦ Nishida K, N. Koizumi, T. Sato, Y. Senga, T. Takemura, K. Watabe and A. Mori (2015) Influence of the domestic alien

fish *Rhynchocypris oxycephalus* invasion on the distribution of the closely related native fish *R. lagowskii* in the Tama River Basin, Japan. *Landscape and Ecological Engineering* 11:169-176. (査読有)

- ⑧ Morioka S., N. Koizumi and B. Vongvichith (2014) Seasonal growth and reproduction of *Rasbora rubrodorsalis*, a small-sized cyprinid fish from central Laos (Teleostei: Cyprinidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 25:277-287. (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

- ① Koizumi N., A. Mori, K. Watabe, T. Takemura, T. Mineta and M. Yamaoka. Trial investigation to estimate relationship between environmental DNA and fish distribution in agricultural canals. PAWEES 2016 International Conference. 2016.10.20 Daejeon (South Korea)
- ② 小出水 規行, 森 淳, 渡部 恵司, 竹村 武士, 嶺田 拓也, 山岡 賢. 環境 DNA を利用した魚類生息分布の予備推定: 岩手県いさわ南部地区のアブラハヤを事例として. 平成 28 年度農業農村工学会大会講演会. 2016.8.31 ホテル法華クラブ仙台 (宮城県・仙台市)
- ③ 小出水 規行, 森 淳, 嶺田 拓也, 澤田 英司, 渡部 恵司, 竹村 武士. 糞からの環境 DNA を利用したアカミミガメの食性解析. 平成 27 年度農業農村工学会大会講演会. 2015.9.2 岡山大学 (岡山県・岡山市)
- ④ Koizumi N., A. Mori, T. Mineta, E. Sawada, K. Watabe and T. Takemura. Plant-feeding habit of the red-eared turtle based on analysis of environmental DNA extracted from their feces samples. PAWEES 2015 International Conference. 2015.8.20 Kuala Lumpur (Malaysia)
- ⑤ 小出水 規行, 森 淳, 渡部 恵司, 竹村 武士. 農村生態系解明に向けた環境 DNA の利用. NGS 現場の会第四回研究会. 2015.7.2 つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)
- ⑥ 小出水 規行. 農村における生態系配慮の取り組み. 平成 26 年度高知県内水面漁業に関する研修会. 2015.2.10 高知城ホール (高知県・高知市)

- ⑦ Koizumi N., T. Takahara, T. Minamoto, H. Doi, A. Mori, K. Watabe and T. Takemura. Development of a method for detecting inhabitation of the Dojo loach using environmental DNA. PAWEES 2014 International Conference. 2014.10.30 Kaohsiung (Taiwan)

- ⑧ 小出水 規行, 高原 輝彦, 源 利文, 土居 秀幸, 森 淳, 渡部 恵司, 竹村 武士. 水から抽出した DNA を用いて魚類の生息状況を評価する方法の試み. 平成 26 年度農業農村工学会大会講演会. 2014.8.26 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.naro.affrc.go.jp/nire/introduction/chart/0504/>

<http://www.naro.affrc.go.jp/nkk/introduction/chart/06-04/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出水 規行 (KOIZUMI, Noriyuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究部門 水利工学研究領域・上級研究員

研究者番号: 60301222

(2) 研究協力者

森 淳 (MORI, Atsushi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究部門 技術移転部・教授

研究者番号: 10414418

渡部 恵司 (WATABE, Keiji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究部門 水利工学研究領域・主任研究員

研究者番号: 50527017

竹村 武士 (TAKEMURA, TAKESHI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究部門 水利工学研究領域・上級研究員

研究者番号: 20373227