

「環境 DNA を用いた在来および外来オオサンショウウオの分布状況調査」

神戸大学大学院人間発達環境学研究科

源 利文

## 1 研究の背景と目的

兵庫県下に多数生息するオオサンショウウオ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。国際的には、国際自然保護連合 (IUCN) のレッドリストに準絶滅危惧種として掲載されている。本種は水の比較的きれいな河川中上流域に生息し、河川における食物連鎖の最上位に位置することからも、環境保全活動のシンボリック的存在となっている。近年、京都府の桂川水系や三重県の名張川水系において、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が報告されている。チュウゴクオオサンショウウオは、オオサンショウウオと同様の生態を示す高次捕食者であり、この侵入によってオオサンショウウオとの競合、さらに雑種形成が起こっており、在来種の遺伝的独自性が損なわれるおそれがある (松井 2005)。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。外来種の侵入は京都府のみならず兵庫県を含む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る。

近年それら従来の捕獲調査手法におけるデメリットを補完しうる、環境 DNA 分析手法が開発され、様々な生物種に適用されている。環境 DNA 分析手法とは、河川水中や土壌中に含まれる、生物の排泄物や分泌物に由来すると考えられる DNA 断片を検出することによって、そこに生息する対象生物のモニタリングを行う手法である。本手法は直接個体を目視によって識別するのではなく、環境サンプル中の DNA を検出してその塩基配列によって種を識別するため、従来の水中における生物のモニタリングと比べ、少ない労力で広範囲を調査することができる点、夜行性の種など生息確認の難しい希少種であっても低コストで検出できる点、目視では簡単に識別できないような種の識別も可能である点などから従来の方法と比較して優れていることが示されてきた。

そこで、本研究では在来個体群の保全に向けた知見を提供することを目的として、申請者らが開発した、河川水中の DNA (環境 DNA) を調べることで生息種をモニターできる手法を利用し、兵庫県下における在来および外来オオサンショウウオの生息状況調査を行った。

## 2 研究方法・研究内容

佐用川を中心とする千種川水系 (以下佐用川水系と略す)、円山川水系、市川水系、羽束川水系の 4 水系において多点調査を実施した。調査地点の選定理由は以下の通りである。

### 佐用川水系

佐用川は兵庫県佐用郡佐用町を流れる川で、名水百選に選ばれている千種川の支流である。オオサンショウウオだけでなく、ニホンイシガメなどの希少種も見られ、生物多様性に富んだ河川であるが、台風や大雨による水害がたびたび発生しており、特に 2009 年 8 月の台風 9 号による大水害では 20 人の犠牲者を出した。水害による被害を軽減するため、近年護岸工事などの河川工事が急ピッチで行われており、河川生態系への影響が懸念されることから調査地点として選定した。

### 羽束川水系

羽束川は兵庫県東部を流れる武庫川の支流である。水源は大阪府能勢町にある深山の中腹に位置し、標高が高く、オオサンショウウオが多数生息していることが知られている。

兵庫県下では特にオオサンショウウオの多い河川の一つであり、環境 DNA 手法の有効性を評価する上でも重要になるため、調査地に選定した。

#### 市川水系・円山川水系

市川は、兵庫県の中央部を流れており、栃本ら（2007）の報告によれば、下述の円山川水系について目撃情報が多い。流路も長く、瀬戸内海側の水系におけるオオサンショウウオの生息状況を把握するためにも、重要である。円山川は、兵庫県北部に位置する河川であり流域面積は兵庫県で2番目である。オオサンショウウオの目撃情報が最も多く（栃本ら 2007）、日本海側の水系におけるオオサンショウウオの生息状況を把握する上で重要である。また、この2河川が目撃情報が多いことは、災害復旧等の改修工事が実施され、その際の発見情報が多いことが示唆されている。このことから改修工事終了後の分布把握を行うことが可能であることもこの2河川を選定した理由である。

このうち佐用川水系と羽束川水系では年間2回の繰り返し調査を行った。調査を実施した河川の地図を図1に示す。これらの調査で合計186の水サンプル（それぞれ2L）を採取した。

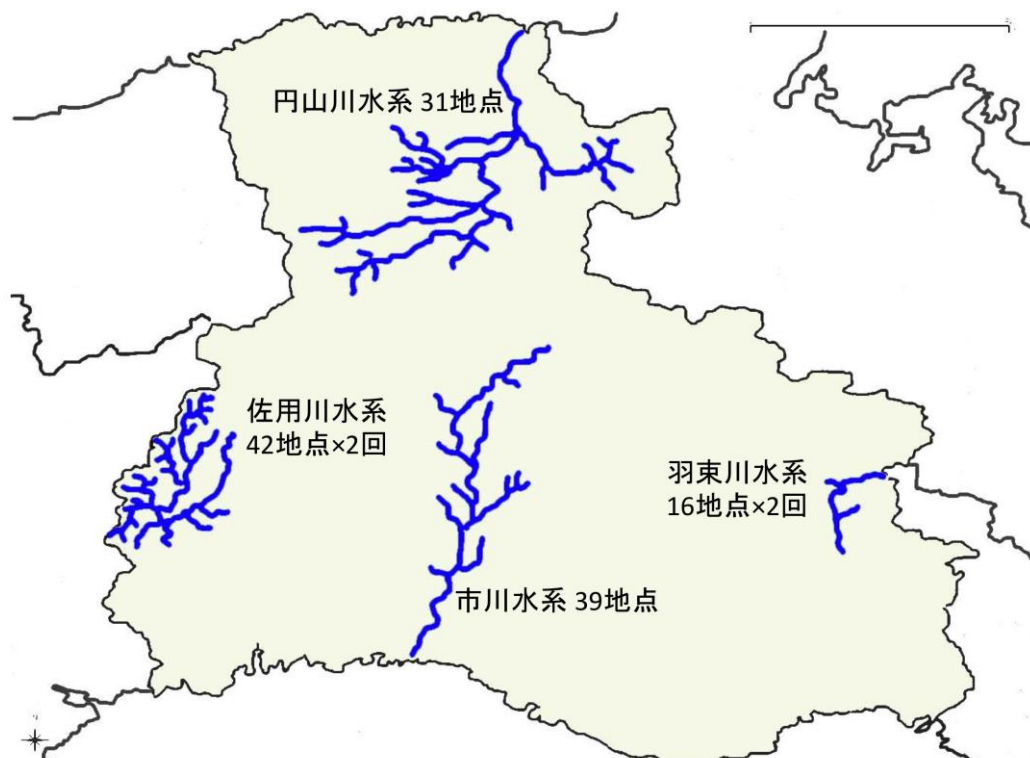


図1 調査地点。兵庫県下の4水系にて合計186サンプルを採取し、解析した。

採水サンプルを実験室に持ち帰り、その日のうちに平均口径 0.7 $\mu$ m のガラスファイバーフィルター（GF/F フィルター、Whatman 社）で1Lを濾過し、ろ紙に環境 DNA をトラップした。ろ紙にトラップした DNA をタンパク質の分解酵素である Proteinase K で処理した後、市販の DNA 抽出用カラムを用いて DNA を抽出した。最終的な抽出 DNA の容量は 100 $\mu$ L である。なお、サンプルのろ過や DNA 抽出作業時のコンタミネーションをモニターするため、一回のサンプル処理につき1つのネガティブコントロールを採用した。

在来および外来オオサンショウウオの DNA 検出には、Taqman Probe 法によるリアルタイム PCR 法を用いた。本手法は、陽性シグナルの特異性がプライマーとプローブの双方

によって決定されるため、通常の PCR（特異性を決めるのはプライマーのみ）と比較して、さらに特異性の高い手法である。本研究ではすでに申請者らの研究室で開発した、ミトコンドリア NADH1 遺伝子をマーカーとした検出系を用いた (Fukumoto et al., 2015)。上述の抽出 DNA 2 $\mu$ L を鋳型とし、各 900nM のプライマーおよび 125nM のプローブ、1 $\times$  Taqman Gene Expression Master Mix（ライフテクノロジーズ社）を加えてリアルタイム PCR によりオオサンショウウオおよびチュウゴクオオサンショウウオの DNA 検出を試みた。PCR 条件は、50 $^{\circ}$ C で 2 分・95 $^{\circ}$ C で 10 分のインキュベーション後、95 $^{\circ}$ C 15 秒・60 $^{\circ}$ C 60 秒からなるサイクルを 55 サイクル繰り返した。PCR は全てのサンプルについて 4 繰り返しで行った。なお、PCR 時のコンタミネーションをモニターするため、一度の PCR につき 4 繰り返ししのネガティブコントロールを採用した。

### 3 研究成果

4 水系の 128 地点（うち 58 地点は二度の採水を行ったため、サンプル数としては合計 186 サンプル）のうち、合計 23 地点（佐用川水系：4/42 地点、羽束川水系：9/16 地点、市川水系：9/39 地点、円山川水系：1/31 地点）でオオサンショウウオの DNA が検出された。一方、いずれの地点からもチュウゴクオオサンショウウオの DNA は検出されなかった。また、ネガティブコントロールからの DNA 検出は無かった。

今回の調査結果では全体的に検出地点の分布に偏りが見られた。具体的には、全般に河川の上流域での検出が多かった。オオサンショウウオは、標高の高い所に多く生息すると言われているが、過去を目撃情報などを検討すると、下流での目撃も少なくない。それを踏まえた上で栃本ら（2007）の情報と、今回の研究結果を比較してみると、オオサンショウウオの個体密度や、生息域が過去（おおむね 1996 年以前）と比べて縮小している可能性が考えられる。兵庫県分布情報の調査は、そのほとんどが聞き取り調査などの、目撃情報によるものであるが、佐用川、羽束川、市川では 2000 年以降に目撃情報が多い地点と検出できた地点を比較してみると、かなり類似していることが分かった。例として、図 2 に市川の検出点と目撃情報の比較を示す。

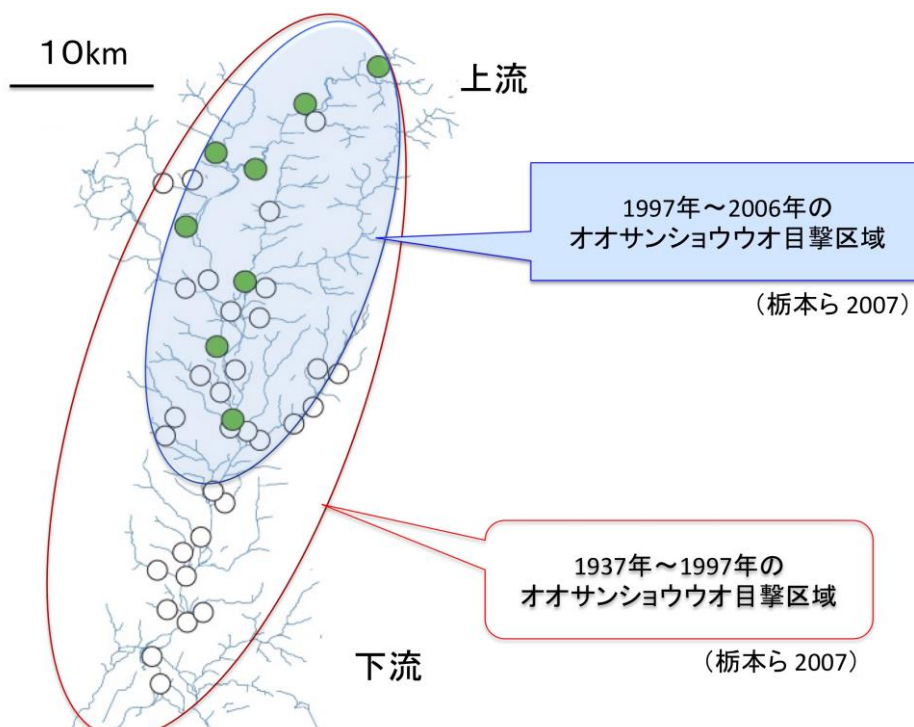


図2 市川水系におけるオオサンショウウオのeDNA検出地点と目撃情報の分布。丸は環境DNA調査点を示し、白抜きはDNA非検出を、緑色の塗り潰しはDNA検出を示す。

また、佐用川の検出点に注目すると、小集団が孤立化していることを示していると考えられるような地点を発見することができた。佐用川水系における検出地点のうちの一つは、マンションのすぐ裏にあり、河川工事により補強され3面張りの水路となっていて、おおそオオサンショウウオの生息地として適切とは見えなかった。しかし、この地点で検出されたということは、採水地点上流におけるオオサンショウウオの生息を示唆しており PCR の検出頻度からも、DNA 濃度が低い、すなわち集団サイズが小さいことが考えられる。これは、河川工事により本流の集団と分断され、孤立化した集団の存在を示しているのではないかと思われる。近年の河川工事による河川補強や、ダムや井堰の設置により、分断化や孤立化などオオサンショウウオの生態へ影響が出ていることが、これまでも報告されている。今回の結果から、佐用川では、河川改修工事によりオオサンショウウオが影響を受け孤立化・小集団化している過程を、市川では、河川工事によってオオサンショウウオの生息域の縮小化した結果を見ることができたと考えられる。このように、環境 DNA 分析手法は河川工事など、人為的な地形改変による生態系への影響をキャッチすることもできる可能性がある。

今後、環境 DNA 分析手法調査を時空間的により広く適用することにより、面的あるいは時間的な拡がりを持つオオサンショウウオの分布情報をこれまでより低コストで得ることができるであろう。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究で用いた環境 DNA 手法は、希少種や外来種のモニタリングなど、環境保全の上で応用性が高い。本研究は日本固有の在来と外来のオオサンショウウオの分布を水中に残存する微量 DNA でモニタリングするものであるが、両種は自然環境下で交雑するほど近縁であり、ミトコンドリア DNA の類似度も 97%に達する。このような近縁種を誤ることなく検出できる本手法は、同様の問題をかかえる他種への応用も可能であり、在来種の保全のために貴重な基礎的データを供給することができるであろう。

本研究で用いたオオサンショウウオのモニタリング手法を京都府下で実施した事例については 2015 年 2 月 14 日付けの朝刊各紙（読売新聞、朝日新聞、産経新聞、日経新聞、神戸新聞ほか）に掲載されたことなどからも世間での注目の高さがうかがえる。また、環境 DNA 手法による調査は現場では水を汲むだけであるので、誰でも参加することができる。本手法を市民参加型の環境調査手法として確立することで、より迅速な広域調査が可能になるだけでなく、参加者への結果のフィードバックなどを通じて市民の環境意識の向上にも寄与できる可能性がある。

#### 5 引用文献

Fukumoto S, Ushimaru A, Minamoto T (2015) 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 Applied Ecology*, 52 (2), 358-365.

松井正文 (2005) DNA解析による外来種チュウゴクオオサンショウウオの生息確認、河川整備基金助成事業、DNA解析による外来種チュウゴクオオサンショウウオ事業報告書。

栃本武良・田口勇輝・大沼弘一・川上徳子・清水邦一・土井敏男・柿木俊輔・夏原由博・三橋弘宗 (2007) 兵庫県におけるオオサンショウウオの分布情報、人と自然 *Humans and Nature*, 18, 51-65.