

## ため池水からのコイ科希少魚類ウシモツゴの 環境 DNA 検出

鈴木良地<sup>1)</sup>・河村邦生<sup>2)</sup>・佐伯晶子<sup>3)</sup>・鈴木啓子<sup>1)</sup>・水上優子<sup>4)</sup>

**摘要:** 希少魚類のウシモツゴについて、現存する3つの系統集団の全てに適用可能なTaqMan qPCR法による環境DNA検出技術を開発した。愛知県内の15か所のため池の環境DNA調査では、簡易DNA抽出法であるSGF法を適用することにより、本種が捕獲されたことがある全てのため池水から陽性反応が確認され、既知の分布と環境DNA分析結果が一致した。本技術は東海地方における本種の分布実態調査に活用できる可能性がある。

**キーワード:** 環境 DNA、ウシモツゴ、TaqMan qPCR、ため池、SGF 法

## Environmental DNA Detection Identifies the Rare Cyprinid Fish *Pseudorasbora pugnax* in Reservoir Water

SUZUKI Ryoji, KAWAMURA Kunio, SUZUKI Keiko and MIZUKAMI Yuko

**Abstract:** We developed an environmental DNA detection technique to identify the rare cyprinid fish *Pseudorasbora pugnax* using TaqMan qPCR, which can be applied to all three extant phylogenetic populations. In an environmental DNA survey of 15 reservoirs in Aichi Prefecture, using the SGF method, a simple DNA extraction method, positive reactions were confirmed in all reservoir waters where this species was caught, and the environmental DNA analysis results matched the known distribution. This technology has the potential to be used to conduct surveys of the actual distribution of this species in the Tokai region.

**Key Words:** Environmental DNA, *Pseudorasbora pugnax*, TaqMan qPCR, Reservoir, SGF method

<sup>1)</sup>環境基盤研究部 <sup>2)</sup>環境基盤研究部(現豊田加茂農林水産事務所) <sup>3)</sup>環境基盤研究部(現海部農林水産事務所) <sup>4)</sup>環境基盤研究部(現研究戦略部)

緒言

ウシモツゴ(*Pseudorasbora pugnax*)は環境省レッドリストの絶滅危惧IA類に分類される日本固有のコイ科モツゴ属の小型魚類である<sup>1)</sup>。かつては中部地方の太平洋側および濃尾平野一帯に生息していたとされるが、生息地である池沼の荒廃や外来魚類による捕食、同属のモツゴ(*P. parva*)との競合などにより激減し、現在では愛知県、岐阜県および三重県の極めて限られた範囲にのみ、かろうじて分布することが知られている<sup>2,3)</sup>。一方、これらの地域には、生息調査が行われていない農業用ため池が大小含めて多数あり、この中には本種の貴重な生息地が含まれる可能性がある。従って、ため池の改修や埋め立てを行う際は本種が生息するかどうかについて留意する必要があるが、本種は生息密度が低く、捕獲調査で確認することは極めて困難と考えられる。近年では、希少種や外来種など多くの魚類の分布調査に、水中に溶出した生物のDNAである環境DNAをPCR法などで検出する技術が広く用いられている<sup>4,5)</sup>。本種の生息確認や分布調査にも、環境DNA検出技術が有効と考えられるが、本種の環境DNAを特異的に検出する技術は開発されていない。

現在、野生下で生息するウシモツゴは、ミトコンドリアDNAの多様性比較により、グループI(濃尾平野)、グループII(長久手・日進)、グループIII(伊勢・三河)の3つの地理的系統に大別される<sup>6)</sup>。そこで、本研究ではこれら3つの系統集団の全

てを検出可能なTaqMan qPCRプライマーを開発した。また、愛知県内の15か所の農業用ため池を対象として、ウシモツゴ検出を目的とした環境DNA分析を行い、プライマーの有効性を検証した。環境DNA抽出には、ため池などの濁水のろ過時でもフィルターが目詰まりし難く、DNA抽出が容易なSGF法<sup>7)</sup>の利用を検討した。

材料及び方法

1 ウシモツゴ検出用TaqMan qPCRプライマーおよびqPCR反応

ウシモツゴを含む8種のコイ科近縁種のミトコンドリア DNA-16SrRNA 領域の配列を比較し、プライマー設計支援ソフトウェアの Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>)を用いて、増幅長116 bpのウシモツゴに特異的な TaqMan qPCR プライマーおよびプローブを設計した(図1)。qPCR 反応液は、10.0 μL の Takara Probe qPCR Mix (タカラバイオ、草津)、0.2 μM の Forward プライマー(5'-CCCCCATGGGAGAAATTATG-3') および Reverse プライマー(5'-CCTCTGTTAATTGGGTTCGTTAGA-3')、0.2 μM のプローブ(5'-FAM/TAAGCCAGATCGGACAAACC/ZEN/IBFQ-3') (Integrated DNA Technologies Japan、東京)、0.4 μL の50×Rox、および2 μL の抽出 DNA からなる総量20 μLとした。qPCR 反応はリアルタイム PCR 装置 StepOne (サーモフィッシャーサイエンティフ

		5'		3'	
グループ	Accession No.	Forward プライマー			
ウシモツゴ	I LC682783 (1765-0896)	CATG	CCCCCATGGGAGAAATTATG	CCTAAAATGAGTAACAAGAAGACTT	GCTCTTCTCCGA
	II LC682804 (1764-1895)	*****			
	III LC682816 (1766-1897)	*****			
モツゴ	LC098028 (415-546)	*****A*****AC*****A*			
シナイモツゴ	LC098033 (414-545)	*****C*			
ホンモロコ	LC097982 (415-546)	*****G*****A*****C*****A*			
タモロコ	LC097985 (415-546)	*****T*****A*****G*****A*****A*			
イトモロコ	LC098015 (419-550)	*****AA*****A*****CC*****A*			
ニゴイ	LC097994 (420-551)	*****A*****A*****C*****T*****T*			
ムギツク	LC098045 (417-548)	*****A*****T*****			

(続き)

		5'		3'	
グループ		プローブ	Reverse プライマー		
ウシモツゴ	I	GCACAAGTGTAAAGCCAGATCGGACAAACC	ACTGGAA	TCTAACGAACCAATTAACAGAGG	GTAGTGTAGAC-A
	II	*****G*****C*****-			
	III	*****G*****C*****-			
モツゴ		*****A*****A*****AA*****G*****A*****T*****A*****-			
シナイモツゴ		*****A*****A*****G*****T*****A*****-			
ホンモロコ		*****TA*****C*****AT*****AC** - *****A*****C*****GA**TT*			
タモロコ		*****CA*****C*****AT*****AC** - *****A*****T*****GA**TT*			
イトモロコ		*****A*****C*****AT*****AC** - *****C*****GA**A*			
ニゴイ		A*****G*****G*****AT*****CC** - *****A*****GA*****G*****A*			
ムギツク		*****A*****A*****AT*****G*****CC** - *****A*****G*****A*			

図1 コイ科8種のmt-16SrRNA配列の比較

四角枠の配列は、ウシモツゴに特異的なTaqMan qPCRプライマーおよびプローブ領域を示す。

表1 qPCRプライマーの検出感度

DNA copies/反応	qPCR		
	陽性数/供試数	平均 Ct 値	CV (%)
0	0/3	-	-
1	2/3	42.7	1.6
5	2/3	33.7	1.0
10	3/3	33.6	2.2
50	3/3	31.8	7.1
100	3/3	29.7	4.5
500	3/3	28.8	4.7
1000	3/3	25.6	1.3

表2 ウシモツゴ系統集団のqPCR分析結果およびDNA濃度 (平均値)

グループ	飼育機関	陽性数/供試数	平均 Ct 値	DNA 濃度 copies/mL
I	世界淡水魚園水族館	2/2	26.4	2305
II	東山動植物園メダカ館	2/2	31.7	435
III	碧南海浜水族館	2/2	33.4	21

ック、東京)を用い、25°Cで10分、98°Cで30秒の後、95°Cで5秒、60°Cで30秒の45サイクルで行った。

## 2 qPCR定量限界

qPCRプライマーの増幅領域を含む全長372 bpの配列を人工合成し、滅菌水で希釈してqPCR反応液当たり1~1000コピーに調製した。各3連でqPCR反応を行い、定量限界を調査した。定量限界は、3連の全てが検出され、かつ変動係数(CV)が35%以下と定義した<sup>8)</sup>。

## 3 ウシモツゴ各系統集団のqPCR分析

ウシモツゴの3つの系統集団(グループI、II、III)をそれぞれ保存、飼育している、世界淡水魚園水族館「アクア・トぎふ」、東山動植物園メダカ館、碧南海浜水族館の協力により、各水槽の飼育水約2Lの提供を受け、それぞれ2試料ずつ環境DNAを抽出した。飼育水からのDNA抽出は「環境DNA調査・実験マニュアル」<sup>9)</sup>の標準的な方法(以下、標準法)を用いた。すなわち、飼育水1LをGF/Fガラス繊維ろ紙(GE Healthcare、東京)で吸引ろ過し、DNeasy Blood and Tissue Kit (キアゲン、東京)を用いてろ紙からDNAを抽出した。抽出DNAは分析に用いるまで-30°Cで保存し、qPCR分析した。

## 4 農業用ため池の環境DNA分析

愛知県内の15か所の農業用ため池(Ar1~Ar15)を調査対

象とした。このうち、5か所(Ar1、Ar3、Ar4、Ar9、Ar10)では、2020年または2022年の捕獲調査および地元住民による保全活動により、いずれもウシモツゴの生息が確認されている(データ省略)。Ar1については、表層水および底層水(約40~70cm 深)を、他のため池については、表層水をそれぞれ採水した。底層水は、任意の深さに取り付けられたチューブから吸引シリンジで採水した。採水は1か所あたり、1~4回行った。

環境 DNA 抽出は、標準法および SGF 法<sup>7)</sup>の2法で行った。SGF 法は、ため池水1Lと懸濁態のガラス繊維(GA-55、アドバンテック、東京) (以下、SGF)10mg を混合して DNA を SGF に吸着させ、0.2mm 目のナイロンメッシュでろ過して SGF を回収後、MightyPrep reagent for DNA (タカラバイオ、草津)により DNA を抽出した。2法による抽出 DNA は分析に用いるまで-30°Cで保存し、qPCR 分析した。なお、「環境 DNA 調査・実験マニュアル」<sup>9)</sup>に準じ、各調査に際して、蒸留水1Lを2法でそれぞれろ過および DNA 抽出し、フィールドブランク試料とした。

## 結果及び考察

### 1 qPCR反応および定量限界

本研究で設計したウシモツゴ検出用の TaqMan qPCR プライマーおよびプローブを使った qPCR 反応における検量線の R<sup>2</sup>値は0.994~1.000、傾きは-3.44~-3.23だった。また、

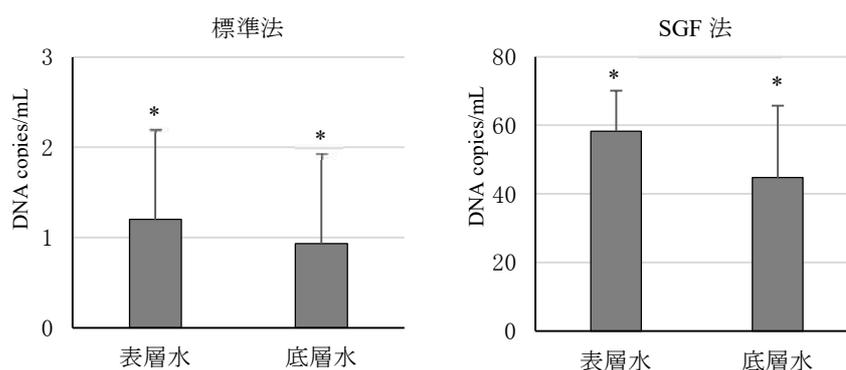


図2 ため池Ar1の採水層位別のウシモツゴ環境DNA濃度

表3 15か所のため池のウシモツゴ環境DNA調査

ため池 No.	所在地	調査日	標準法		SGF 法		
			陽性数/検体数	DNA 濃度 copies/mL <sup>2)</sup>	陽性数/検体数	DNA 濃度 copies/mL	
*1)	Ar1	長久手市	2021.12.23	3/3	1.2	3/3	58.3
	Ar2	長久手市	2021.12.23	0/2	-	2/2	6.8
*	Ar3	長久手市	2022.2.7	0/2	-	2/2	20.6
*	Ar4	長久手市	2022.2.7	0/2	-	1/2	4.1
	Ar5	長久手市	2022.2.7	0/1	-	0/1	-
	Ar6	長久手市	2022.2.7	0/1	-	0/1	-
	Ar7	長久手市	2022.7.7	0/1	-	0/1	-
	Ar8	長久手市	2020.5.25	0/2	-	0/2	-
*	Ar9	日進市	2022.7.14	0/1	-	1/1	1.6
*	Ar10	日進市	2022.7.14	1/3	1.0	3/3	7.9
	Ar11	日進市	2020.5.26	0/4	-	0/4	-
	Ar12	みよし市	2020.11.30	0/2	-	0/2	-
	Ar13	みよし市	2020.5.26	0/2	-	0/2	-
	Ar14	豊田市	2020.5.26	0/2	-	0/2	-
	Ar15	半田市	2023.7.19	0/3	-	0/3	-

1) \*印は捕獲調査等によりウシモツゴの生息が確認されているため池を示す。

2) DNA濃度は陽性試料の平均値。

PCR 効率は0.95~1.04であり、増幅効率が良好であることを確認した。なお、検出特異性に関しては、ウシモツゴの他にモツゴ、タモロコの抽出 DNA を用いて qPCR 反応を行い、ウシモツゴだけが検出されることを確認した(データ省略)。

qPCRの定量限界を表1に示した。反応当たり10コピー以上の場合で、3連の全てで陽性反応が確認され、変動係数は35%以下だった。従って、本研究で開発したqPCRプライマーの定量限界は反応当たり10コピーであることが明らかとなった。この数値は類似の研究<sup>10,11)</sup>が10~100コピーであることと比較して、同等の水準と考えられた。

## 2 ウシモツゴ各系統集団のqPCR分析

各系統集団の飼育水からのウシモツゴ環境DNAのqPCR分析結果を表2に示した。それぞれの水槽の管理状況や個体数が不明なため、系統集団間のDNA濃度の比較はでき

ないが、少なくとも全ての試料から定量限界以上のウシモツゴDNAが検出された。このことから、本研究で設計したqPCRプライマーは、現在確認されている全ての系統集団のウシモツゴ検出に活用できると考えられた。

## 3 農業用ため池の環境DNA分析

ため池Ar1の表層水および底層水のウシモツゴ環境DNA濃度を図2に示した。標準法およびSGF法ともに、底層水より表層水のDNA濃度が高い傾向がみられたが、層位に有意な差は確認されなかった(Welch's t-test,  $p=0.596$ )。ため池を含む閉鎖系水域では、底層付近の魚類の環境DNAが検出されにくいとの報告があるが<sup>12,13)</sup>、ウシモツゴが好む比較的水深の浅い水域では、表層水と底層水の環境DNA濃度に差が生じにくいと考えられることから、採水はサンプリングが容易な表層水で良いと考えられた。

15か所のため池の環境DNA分析結果を表3に示した。標準法では2か所(Ar1, Ar10)から、SGF法では6か所(Ar1～Ar4, Ar9, Ar10)からウシモツゴDNAが検出された。SGF法では、ウシモツゴが生息することが明らかな5か所(Ar1, Ar3, Ar4, Ar9, Ar10)のため池の全てで陽性反応が得られ、生息が未確認の他のため池は、Ar2を除き全て陰性だった。生息が未確認のAr2で陽性反応が得られた理由として、Ar2は隣接するAr1から排水が流入しており、排水とともに本種が移動し、定着している可能性が考えられた。なお、フィールドブランク試料は全て陰性だった。筆者らは、貝類の環境DNA分析において、SGF法のDNA抽出効率が標準法より高いことを報告しているが<sup>7,14)</sup>、本研究により、魚類においてもSGF法の優位性が示唆された(図2、表3)。この理由として、SGF法では採水試料を全量ろ過できたのに対し、標準法ではフィルターの目詰まりにより、半分の500mL程度しかろ過できなかった試料もあったことから、ろ過水量が抽出DNA濃度に影響した可能性が考えられた(データ省略)。

本研究では、ウシモツゴを検出するためのTaqMan qPCRプライマーを開発するとともに、SGF法を利用した環境DNA分析を行い、本種の分布実態と整合する結果を得た。特に本種のように閉鎖的な環境を好む種の場合は、環境DNAの拡散が抑制されるため、開放系の環境を好む種に比べて環境DNA調査の精度が高くなることが予想される。今後は、より広範な環境DNA調査を行い、特に陽性反応が確認された調査地において捕獲調査を重点的に実施することで、本研究で開発した技術の有効性を明らかにする必要がある。環境DNA調査は捕獲調査と比較して省力的であり、従来よりも多くの調査地を対象とできる利点がある。本技術により、絶滅危惧種であるウシモツゴの分布実態が明らかになり、将来的に本種の保全に貢献することが期待される。

なお、本研究で開発したqPCRプライマーのアンダーリング部位は、ウシモツゴの近縁種で東北地方、長野県、新潟県に生息するシナイモツゴ(*P. pumila*)の配列と類似しており、系統集団によっては本プライマーに反応する可能性がある。従って、本プライマーは、ウシモツゴの分布範囲である愛知県、岐阜県、三重県でのみ適用すべきと考えられた。

**謝辞:** ウシモツゴ飼育水を快くご提供いただいた、世界淡水魚園水族館「アクア・トぎふ」の波多野順氏、東山動植物園メダカ館の水野展敏氏、碧南海浜水族館の地村佳純氏に感謝申し上げます。

## 引用文献

1. 環境省. 環境省レッドリスト2020. <https://www.env.go.jp/press/107905.html> (2024.3参照)
2. 鹿野雄一, 北村淳一, 河村功一. 絶滅危惧種ウシモツゴの繁殖生態と保全策、および近縁種モツゴとの比較. 魚類学雑誌. 57(1), 43-50(2010)
3. 大仲知樹. 愛知県犬山市のため池におけるモツゴ *Pseudorasbora parva* (Temminck et Schlegel, 1846) の繁殖期: とくに絶滅危惧種ウシモツゴ *P. pumila* subsp. *sensu* Nakamura, 1963 の保全と関連して. 豊橋市自然史博物館研報. 18, 11-16 (2008)
4. Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*. 4, 423-425 (2008)
5. Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., Orlando, L. and Willerslev, E. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*. 21 (11), 2565-2573 (2012)
6. Cho, H. and Mukai, T. Mitogenomic phylogeny revealed the fine population structure of an endangered cyprinid fish *Pseudorasbora pugnax* in the Tokai region, central Japan. *Ichthyological Research*. 70, 243-255 (2023)
7. Suzuki, R., Kawamura, K. and Mizukami, Y. Simple extraction and analysis of environmental DNA using glass fibers in suspension form. *Limnology*. 24, 25-36 (2023)
8. Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E., Jackson, C. A., Lance, R. F., Mangan, A. M., Monroe, E. M., Piaggio, A. J., Stokdyk, J. P., Wilson, C. C. and Richter, C. A. Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*. 2, 271-282 (2019)
9. Minamoto, T., Miya, M., Sado, T., Seino, S., Doi, H., Kondoh, M., Nakamura, K., Takahara, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Iwasaki, W., Kasai, A., Masuda, R. and Uchii, K. An illustrated manual for environmental DNA research: water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA*. 3, 8-13 (2021)
10. Sepulveda, A. J., Schabacker, J., Smith, S., Al-Chokhachy, R., Luikart, G. and Amish, S. J. Improved detection of rare, endangered and invasive trout in using a new large-volume sampling method for eDNA capture. *Environmental DNA*. 1 (3), 227-237 (2019)
11. Kirtane, A., Wiczorek, D., Noji, T., Baskin, L., Ober, C., Plosica, R., Chenoweth, A., Lynch, K. and Sassoubre, L. Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three commercially harvested fish species and comparison between eDNA detection and trawl catches. *Environmental DNA*. 3 (6), 1142-1155 (2021)
12. 権元淳一, 西島太加志, 白子智康, 中村匡聡. 農業農村整備事業における環境DNA調査とその分析技術の適用. 農業農村工学会誌. 89 (11), 867-870 (2021)
13. 村岡敬子, 天羽淳, 菅野一輝, 篠原隆佑, 中村圭吾. ダム湖内魚類相を効率的に捉えるための環境DNA調査方法に関する検討. 河川技術論文集. 28, 211-216 (2022)
14. Suzuki, R., Houki, S., Ito, K. and Shibaie, H. PCR and LAMP detection of environmental DNA of the invasive clam *Corbicula fluminea*. *Plankton Benthos Research*. 18 (4), 206-213 (2023)