

## 環境DNA分析による入間川支流のホトケドジョウの生息地調査

\*石黒直哉<sup>1</sup>・加藤優斗<sup>1</sup>

### Habitat survey of the Japanese Eight-barbel Loach in Iruma-gawa River system using environmental DNA analysis

\*Naoya Ishiguro<sup>1</sup> and Yuto Kato<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Science, Josai University

1-1 Keyakidai, Sakado City, Saitama 350-0295, Japan

\*E-mail: ishiguro@josai.ac.jp

**Abstract** Japanese Eight-barbel Loach, *Lefua echigonia* (Nemacheilidae, Cypriniformes), is an endemic freshwater fish species that inhabits slow-flowing streams in irrigation channels, spring water, and marshlands in the area from Tohoku district to Kinki district of Japan. This species' habitat is severely threatened by human activities and the species was listed as "endangered" by the FY2020 Japanese Ministry of the Environment in its Red List of Threatened Species. In this study, we attempted to detect the environmental DNA (eDNA) of the Japanese Eight-barbel Loach in the tributaries and waterways of the Koma-gawa River, Kuzu-gawa River, and Oppe-gawa River in the Iruma-gawa River system. Japanese Eight-barbel Loach eDNA was detected in nine of twenty water samples. Furthermore, target species eDNA was detected at all sites where this species could be captured and at one site where it could not be captured. Many small tributaries and waterways in this area have not yet been explored; thus, further surveys are needed in these areas.

**Key words** environmental DNA, habitat survey, Iruma-gawa River system, Japanese Eight-barbel Loach, real-time PCR, Saitama Prefecture

### はじめに

ホトケドジョウ (*Lefua echigonia*) はコイ目フクドジョウ科ホトケドジョウ属に分類される日本固有の淡水魚である。東北地方から近畿地方にかけての河川上・中

流域や農業用水路、丘陵地細流、池沼など様々な場所に生息しており、水質が良好で植生が豊富な緩やかな流れのある場所を好む (中島 2017)。埼玉県では、サワガニ (*Geothelphusa dehaani*) やオランダガラシ (*Nasturtium officinale*) が生息できるような湧水環境に本種が生息しているが、こういった環境も近隣地域の開発により湧水が枯渇する可能性があり、実際、その生息地および個体数が減少している (金澤 2021)。2020年度環境省レッドリストでは絶滅危惧IB類に (環境省 2020)、2018年度埼玉県レッドリストでは絶滅危惧IA類に指定されている (埼玉県 2018)。

本研究で調査対象としたのは坂戸市とその周辺地域である。外秩父・奥武蔵の山々と入間川の支流である高麗川的作用によって形成された扇状地性台地であり、毛呂山台地や坂戸台地の武蔵野面、立川面等の河岸段丘から湧水が生じている (真野ほか 2022)。坂戸台地舌端部では高麗川が合流した越辺川に繋がる水路に湧水が流れ込んでいると思われる水域があり、これらの台地に加えて毛呂山丘陵等の丘陵地、関東山地の裾野の河川・水路などには本種が生息している可能性がある (図1)。本種は秋から冬にかけての水温低下に伴って湧水域へ移動すると報告があり (守山ほか 2007)、保全池での確認も行われている (守山ほか 2010)。こういった生態故なのであるか、栃木県小貝川上流域の本種のマイクロサテライト遺伝子座の解析では、集団間に有意な遺伝的分化が認められた (小出水ほか 2008)。それぞれの生息地を別個に保全していくことが本種の保全に必要となり、本種の生息地を少しでも多く把握しておくことが重要である。

近年、水圏生物のモニタリング手法として、環境DNA分析が注目されている。環境DNAとは、河川や池、土壌、空気中などの環境中に存在している生物由来の組織片や排泄物などの生体外に放出されたDNAの総称のことである。環境DNA分析では、湖沼や河川で採取した水サンプルに含まれるDNAを分析することで生物の分布や生物量が分かることか明らかになっている (Goldberg et al. 2016; 高原ほか 2016; 赤松ほか 2018)。環境DNAを用いる利点は、水を汲むだけで生物のDNAを採取することが可能であるため、生物の発見に時間や労力がか

<sup>1</sup>城西大学理学部

350-0295 埼玉県坂戸市けやき台1-1

\*E-mail: ishiguro@josai.ac.jp



図1. 本研究で新規に発見されたホトケドジョウ生息地。

からないことが挙げられる (Taberlet et al. 2012)。また、調査時の対象生物の生息環境への影響が少ないことや (Thomsen and Willerslev 2015)、目視による調査が難しい生物等の発見が行えるなど多くの利点がある。

本研究は、入間川水系の高麗川および越辺川の支流や水路において、ホトケドジョウ由来の環境DNAの検出を試みた。また、現地採集調査の結果とも比較し、本種の生息状況を調べることを目的とした。

## 材料と方法

### 属特異的プライマー・プローブセットの設計

ホトケドジョウのみを種特異的に増幅させるプライマー・プローブセットを設計するために、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) からホトケドジョウ属のホトケドジョウ、ナガレホトケドジョウ (*L. torrentis*)、エゾホトケドジョウ (*L. nikkonis*)、ヒメドジョウ (*L. costata*) と同じフクドジョウ科のフクドジョウ (*Barbatula oreas*)、ドジョウ科のヤマトシマドジョウ (*Cobitis matsubarae*)、イシドジョウ (*C. takatsuensis*)、シマドジョウ (*C. biwae*)、ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*)、カラドジョウ (*M. dabryanus*)、アジメドジョウ (*Niwaella delicata*) のミトコンドリアゲノムの調節領域の塩基配列 (アクセッションNo. は表1に記載) を入手し比較した。ホトケドジョウ属内の変異が少なく、種特異的なプライマー・プローブセットが設計できなかったため、属特異的なプライマー・プローブセットを作製した (表1)。しかしながら、当該地域においては、ナガレホトケドジョウやエゾホトケドジョウの生息域ではなく、外来種であるヒメドジョウも含めて現在までのところ生息確認されたことがないため、これらをマーカーとして用いて問題が無いと判断

した。

属特異的プライマー・プローブセットの特異性の検証と検量線の作成

設計されたプライマー・プローブセットがホトケドジョウ属のみを特異的に増幅させるものであることを確認するために、ホトケドジョウ属4種に加え、当該地域に生息しているドジョウ科のヒガシシマドジョウやドジョウ、カラドジョウの個体からWizard Genomic DNA purification Kit (Promega) を用いてDNAを抽出し、増幅確認を行った。

PCR分析には、リアルタイムPCR装置 (Step One リアルタイムPCRシステム: Thermo Fisher Scientific) を用いた。TaqMan Environmental Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を5 $\mu$ L、超純水を3.5 $\mu$ L、プライマー・プローブ混合溶液を0.5 $\mu$ L、DNA抽出溶液を1 $\mu$ L加え、全量を10 $\mu$ LとしたものをリアルタイムPCR反応に供した。プライマー・プローブ混合溶液は、最終的な濃度がプライマー (Lefua CR-F・Lefua CR-R) では900nM、プローブ (Lefua CR-Probe) では125nMとなるように調製したものである。温度条件は、95 $^{\circ}$ C 10分間の初期熱変性の後、熱変性95 $^{\circ}$ C 15秒、アニーリングと伸長反応57 $^{\circ}$ C 1分で55サイクルとした。分析の際には、DNA抽出溶液の代わりに超純水を1 $\mu$ L入れたPCRブランクを作成し、PCR時にコンタミネーションが起こっていないかの確認に用いた。

各PCRのホトケドジョウ環境DNA濃度を求めるために、人工DNAを用いて検量線を作成した。本種のDNA領域を含む人工DNA配列は、FASMAC社製のqUCFaベクターDNAに挿入されたものを用いた。プロトコルに従い濃度計算を行い、TE bufferで希釈することにより $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^{10}$  copies/ $\mu$ Lまでの希釈系列を作成した。その後、この希釈系列を用いて上述と同条件でリアルタイムPCRを行った。

### 環境DNA分析

入間川の支流である高麗川や葛川、越辺川に注ぐ湧水起源と考えられる小川や水路など20ヶ所を選定した (表2)。2021年8、10、12月に、各採水地点でポリエチレン製のボトルに1L採水し、DNAの分解を抑制するために10%塩化ベンザルコニウム水溶液を1mL添加し (Yamanaka et al. 2017)、保冷して研究室に持ち帰った。輸送時のDNAの混入をチェックするためのクーラープランクと、一日に複数箇所を採水する際の採水作業時および過時の混入をチェックするためのブランクをそれ

表1. 作製されたホトケドジョウ属特異的プライマーと近縁種の塩基配列。A) はフォワードプライマー、B) はリバースプライマー、C) はプローブの領域を示す。

Accession No.	Primer, probe, or species	Sequences
A)	Lefua CR-F Primer	ACCAAGCCGGGCATTCTT
AB177677	<i>Lefua echigonia</i>	ACCAAGCCGGGCATTCTT
AB177668	<i>L. torrentis</i>	.....
AP011300	<i>L. nikkonis</i>	.....
KT943751	<i>L. costata</i>	.....
AB102809	<i>Barbatula barbatula</i>	CA...T...TT.....
AP013310	<i>Cobitis matsubarae</i>	.....G.....C
AP011290	<i>C. takatsuensis</i>	....T....A....C
AP011344	<i>C. biwae</i>	....T.....
AP011291	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	....T.....
AP012124	<i>M. dabryanus</i>	....T.....
AP011230	<i>Niwaella delicata</i>	....T.....
B)	Lefua CR-R Primer	GAAATTCTGAATCAAGGTTAGGAACA
-	<i>Lefua echigonia</i>	GAAATTCTGAATCAAGGTTAGGAACA
-	<i>L. torrentis</i>	.....
-	<i>L. nikkonis</i>	.....-T.....
-	<i>L. costata</i>	.....-T.....
-	<i>Barbatula barbatula</i>	A....GT.A...T.....-n.....
-	<i>Cobitis matsubarae</i>	...C.GACA...T.....-T.....
-	<i>C. takatsuensis</i>	....GACA...T.....-T.....
-	<i>C. biwae</i>	...C.GG.A...T.....-.....
-	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	...C.GG.A...T.....-.....
-	<i>M. dabryanus</i>	....AA.A.A.A.....-.....
-	<i>Niwaella delicata</i>	..G..GT.A...T.....-.....
C)	Lefua CR-Probe	ATCCACATTTTCAGAGTGC
-	<i>Lefua echigonia</i>	ATCCACATTTTCAGAGTGC
-	<i>L. torrentis</i>	.....
-	<i>L. nikkonis</i>	.....
-	<i>L. costata</i>	.....
-	<i>Barbatula barbatula</i>	..CTTG.....A
-	<i>Cobitis matsubarae</i>	A..AT...C...A.....
-	<i>C. takatsuensis</i>	A..AT...C...A.....
-	<i>C. biwae</i>	A..AT...C.....
-	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	A..AT...C.....
-	<i>M. dabryanus</i>	A..AT...C.....
-	<i>Niwaella delicata</i>	..ATG...C.....

表2. 採水地点別のホトケドジョウの環境DNA検出状況および環境DNA濃度。

	水系	環境	採水日	リアルタイムPCR の検出状況	環境DNAコピー数 (copies/L)
A1	高麗川	河川	2021年10月20日	1/8	460
A2		河川	2021年10月20日	2/3	2992
A3		河川(三面張)	2021年10月20日	0/8	0
A4		河川	2021年10月20日	1/3	463
A5		河川	2021年12月12日	1/8	457
A6		河川	2021年12月12日	2/3	899
A7		土水路	2021年12月12日	0/8	0
A8		湧水池	2021年12月25日	3/3	9006
A9		土水路	2021年12月25日	3/3	5322
A10		土水路	2021年12月25日	2/3	813
B1	葛川	土水路	2021年8月7日	0/8	0
B2		河川	2021年8月7日	0/8	0
B3		河川	2021年8月7日	2/3	1438
B4		土水路	2021年8月7日	0/8	0
C1	越辺川	土水路	2021年8月28日	0/8	0
C2		土水路	2021年8月28日	0/8	0
C3		河川	2021年10月28日	0/8	0
C4		土水路	2021年10月28日	0/8	0
C5		土水路	2021年10月28日	0/8	0
C6		土水路	2021年10月28日	0/8	0

表3. 捕獲調査による個体確認状況.

	水系	調査日	時間(分)	人数	捕獲尾数	
A1	高麗川	2021年12月25日	80	5	3	
A2		2022年3月20日	10	2	> 25	
A4		2021年12月25日	90	6	17	
A6		2021年12月12日	90	5	25	
A7		2021年12月12日	90	3	0	
A8		2021年12月25日	90	4	10+	
A9		2021年12月25日	100	5	24	
A10		2021年12月25日	90	4	3	
B1		葛川	2021年12月12日	30	3	0
B2			2021年8月7日	60	4	0
B3	2021年8月7日		40	4	0	
B4	2021年8月7日		90	2	0	
C1	越辺川	2021年8月28日	90	3	0	
C2		2021年8月28日	90	3	0	
C3		2022年8月25日	105	6	0	

ぞれネガティブコントロールとして用いた.

サンプル水の採水、ろ過およびDNA抽出は、環境DNA調査・実験マニュアル ver.2.1に従った(一般社団法人環境DNA学会 2019). 採水サンプルはその日のうちにガラス繊維フィルターWhatman GF/F(直径47mm, 孔径0.7μL; GE Healthcare)を用いて減圧ろ過を行った. フィルターをプロテアーゼK溶液で処理後, サリベットチューブ(Sarstedt)を通して溶液を回収した. DNAの抽出にはDNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen)を用い, 最終的にBuffer AE 100μLで溶解した. 抽出したDNAは-20℃でリアルタイムPCR実験まで冷凍保存した. PCR分析は上述と同条件で行った. 環境DNA学会が推奨しているプロトコルに従い, 各採水地点3反復行い, そのうち1つでも増幅が確認された場合を陽性として扱った. また, 本種は希少種であるため, 回収できる環境DNAも非常に低濃度である場合も考えられるため, 3反復全てで増幅が確認されなかった場合は, カワバタモロコの研究(福岡ほか 2016)でやられていた8反復に倣って, さらに5反復リアルタイムPCRを行った. 計8反復行った場合も同様に, 1つでも増幅が確認されたものを陽性として扱った.

#### 現地採集調査

捕獲には30cm × 32cmの網目3mmのタモ網を用いた. 調査人数は1つの地点に対して最低2人以上で行い, 採水同日の調査では採水地点から上流に遡って行った(表3). 環境DNA分析で陽性と判定された地点の後日調査では, 採水地点とその上流の範囲で, 湧水の出ているところや本種が隠れる場所のあるような領域を上流に遡って行った. これらの調査はホトケドジョウ調査会のメンバーに

より行われた. 生息個体の確認が第一の目的であり, 調査範囲や時間など努力量を合わせることはされていない. そのため, 個体確認尾数は参考までに留めたい(表3).

## 結果と考察

### 属特異的プライマー・プローブセットの有効性

設計されたプライマー・プローブセットがホトケドジョウ属のみを特異的に増幅させるものであることを確認するために, ホトケドジョウ属4種に加え, 当該地域に生息しているドジョウ科のヒガシマドジョウやドジョウ, カラドジョウのDNA試料を用いて増幅確認を行った. その結果, ホトケドジョウ属4種全てにおいてDNA増幅が確認されたが, ドジョウ科のDNA試料では確認されなかった. これにより, ホトケドジョウ属のみを特異的に検出するプライマー・プローブセットであることが確認された. また, 上述したように, 当該地域には現状ではホトケドジョウの生息しか確認されておらず, これらをマーカーとして用いて問題が無いと判断した.

$1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^{10}$  copies/μLに調整した人工DNAをリアルタイムPCRしたところ, それぞれのCt値が27.96, 23.97, 19.95, 16.97, 12.95, 8.96, 5.98であった. それらをもとに検量線を作成したところ,  $y = -3.6771x + 42.417$  ( $R^2 = 0.9985$ )となった.

### 環境DNA分析と捕獲調査

環境DNA分析の結果, 本研究の調査地20地点中9地点でホトケドジョウの環境DNAが検出された(表1). 検出された地点は, 山間部の湧水起源の小川やそれらに連続している水路などであった. 一方, 山間部でも長い流路が三面張り水路である河川(A3)や, 平野部の畑や水田地帯の水路(A7, C1~6)では検出されなかった(表1).

3反復で1つでも陽性反応が出たところは本種の環境DNAコピー数が比較的多く, さらに5反復行い計8反復で1つだけ陽性反応が出た地点は比較的少なかった. 環境DNA濃度が低いと考えられる希少種を対象とした分析の場合には, よりコストが高むことになるが, 8反復程度は行うことが必要ではないだろうか.

調査地点のうち最もホトケドジョウの環境DNA濃度が高かったのは湧水池(A8, 図1)で9,006 copies/Lであった(表1). ここは近隣住民のボランティアによる管理が行われており, ゲンジボタル(*Luciola cruciata*)も観察できる綺麗な湧水池である. そのため, 池の中には入

らず、池の縁から水生植物の根付近をさらうだけの捕獲調査であったが、短時間でホトケドジョウを数尾確認できた（調査では下流の水路にてさらに10尾確認）。かつてこの湧水池の下流は土水路であったが、2020年に一部がコンクリートU字溝化されてしまった（真野ほか2022）。今後の本種の生息状況について注視していく必要がある。

捕獲調査では、環境DNA分析で陽性判定となった後調査を行った3地点（A1, A2およびA4）を含めた計15地点中7地点でホトケドジョウを捕獲できた。この7地点全てでホトケドジョウの環境DNAも検出でき、環境DNA分析と捕獲調査の結果が一致した。ホトケドジョウの環境DNAが検出された9地点のうち8地点で捕獲調査を行ったのだが、1地点（B3）でのみ本種の生息を確認できなかった。ここは山間の水田地域で、水田水路など細い水路まで調査していないため、本研究での個体確認はできなかった。しかしながら、当地域は農業や化学肥料を使わずに稲作などを行っており、今後捕獲調査を重ねることにより本種の生息が確認できるのではないかと期待される。

今回、捕獲調査によりホトケドジョウを確認できた全ての地点で本種の環境DNAを検出できた。また、その中には、環境DNA分析の陽性判定を受けて後日捕獲調査を行い、生息確認ができた地点もある。地点A2はその上流はほとんどが三面張水路となっており、生息の可能性は低いと考えられていた。しかし、環境DNA分析により本種の環境DNAが高濃度に存在することが明らかとなり後日の捕獲調査となった。調査の結果、三面張水路までのわずかな領域であったが、5メートルほどの範囲に多数のホトケドジョウの生息が確認された。これらのことから、環境DNA分析の優位性が検証でき、本研究で用いたプライマー・プローブセットの有効性も再確認できた。すなわち、まずは労力のかからない環境DNA分析を、湧水の存在や河川・水路状況から本種の生息可能性が高いと思われる地点で行い、陽性判定となった地点から優先的にその周辺で捕獲調査を行って行くことで作業の効率化を図ることができる。今後は、更に調査範囲を広げて環境DNAによる分析および捕獲調査を行い、ホトケドジョウの生息分布を把握し、環境要因と生息状況の関係を明らかにし、保全に有効活用していく必要がある。

## 謝 辞

現地での捕獲調査にご協力くださったホトケドジョウ調査会の皆様に、この場を借りて深謝いたします。なお、

本研究は武州・入間川プロジェクトの助成を受けて行われた。

## 摘 要

ホトケドジョウ (*Lefua echigonia*) はコイ目フクドジョウ科ホトケドジョウ属に分類される日本固有の淡水魚である。東北地方から近畿地方にかけての河川上・中流域や農業用水路、丘陵地細流、池沼など様々な場所に生息しており、水質が良好で植生が豊富な緩やかな流れのある場所を好むが、その生息地および個体数が減少しており、2020年度環境省レッドリストでは絶滅危惧 I B類に、2018年度埼玉県レッドリストでは絶滅危惧 I A類に指定されている。本研究は、入間川水系の高麗川および越辺川の支流や水路において、ホトケドジョウ由来の環境DNAの検出を試みた。20地点中9地点で陽性と判定された。そのうちの8地点で当日あるいは後日捕獲調査を行い、7地点では生息を確認できたが1地点では捕獲できなかった。この地域周辺ではまだ踏査していない小さな支流や水路が多数存在する。今後それらの捕獲調査を行っていく必要がある。

キーワード 環境DNA, 生息地調査, 入間川水系, ホトケドジョウ, リアルタイムPCR, 埼玉県

## 引用文献

- 赤松良久・後藤益滋・乾 隆帝・山中裕樹・小室 隆・河野誉仁 (2018) 環境DNAを用いた山口県内2級河川におけるヌートリアの侵入状況と生息適地の把握. 応用生態工学, 21:1-8.
- 福岡有紗・高原輝彦・松本宗広・兵庫県立農業高校生物部・丑丸敦史・源 利文 (2016) 在来希少種カワバタモロコシの環境DNAによる検出系の確立. 日本生態学会誌, 66:613-620.
- Goldberg CS, Turner CR, Deiner K, Klymus KE, Francis Thomsen P, Murphy MA, Spear SF, McKee A, Oyler-McCance SJ, Cornman RS, Laramie MB, Mahon AR, Lance RF, Pilliod DS, Strickler KM, Waits LP, Fremier AK, Takahara T, Herder JE, Taberlet P (2016) Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7:1299-1307.
- 一般社団法人環境DNA学会 (2019) 環境DNA調査・実験マニュアル Ver. 2.1 (2019年4月25日発行). 一般社団法人環境DNA学会, 104 p.

- 金澤 光 (2021) 埼玉県の魚類 見て、読んで、食べる  
87種の水族館. さきたま出版会, さいたま, 216 p.
- 環境省 (2020) レッドリスト2020. [<https://www.env.go.jp/press/files/jp/114457.pdf>]
- 小出水規行・渡部恵司・高 振麗・水谷正一・森 淳・  
竹村武士 (2008) マイクロサテライトDNAを用いた  
栃木県小貝川上流域のホトケドジョウ集団の予備遺  
伝解析. 農業農村工学会論文集, 256:55-61.
- 真野 博・石黒直哉・加藤優斗・中澤秀道・石田美咲乃・  
戸井田和希・稲垣喜弘・萩原 章・河合 清・小西  
修也・松田映子・石崎光一・林弥生子・石井邦夫・  
中西一至・真野樹子・大澤吉弘・君羅好史・松本明  
世 (2022) 城西大学坂戸キャンパス周辺の湧水を起  
源とする水環境. 地域と大学—城西大学・城西短期  
大学地域連携センター紀要, 2:102-112.
- 守山拓弥・柿野 亘・水谷正一 (2010) 地下水を水源と  
する保全池における冬期のホトケドジョウの分布パ  
ターン. 魚類学雑誌, 57:161-166.
- 守山拓弥・水谷正一・後藤 章 (2007) 栃木県西鬼怒川  
地区の湧水河川におけるホトケドジョウの季節移動.  
魚類学雑誌, 54:161-171.
- 中島 淳 (2017) 日本のドジョウ 形態・生態・文化と  
図鑑. 山と溪谷社, 東京, 224 p.
- 埼玉県 (2018) レッドリスト動物編2018. [<https://www.pref.saitama.lg.jp/documents/129694/8reddatabook-redlist.pdf>]
- Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg LH (2012)  
Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21:1789-1793.
- 高原輝彦・山中裕樹・源 利文・土居秀幸・内井喜美  
子 (2016) 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.
- Thomsen PF, Willerslev E (2015) Environmental DNA –an  
emerging tool in conservation for monitoring past and  
present biodiversity. *Biological Conservation*, 183:4-18.
- Yamanaka H, Minamoto T, Matsuura J, Sakurai S, Tsuji S,  
Motozawa H, Hongo M, Sogo Y, Kakimi N, Teramura I,  
Sugita M, Baba M, Kondo A (2017) A simple method  
for preserving environmental DNA in water samples at  
ambient temperature by addition of cationic surfactant.  
*Limnology*, 18:233-241.