

## 環境DNAを用いたホクリクサンショウウオの生息調査と保護活動



実施担当者 富山県立富山中部高等学校  
教諭 真野 佳余

### 1 はじめに

ホクリクサンショウウオ (*Hynobius takedai*) は富山県と石川県の標高 250m までの山の麓に生息しており、環境省のレッドリスト絶滅危惧 I B 類に指定されている止水性の両生類である<sup>(1)</sup>。水中に卵を産み幼生は水中生活をし、変態して幼体になると陸上生活もするが、茶色の卵と幼生は泥や落ち葉に紛れて目視確認しづらく、陸へ上がった幼体は 4～5 cm で黒っぽく、成体になっても 7～8 cm と小さいため、目視確認が非常に難しい。そこで、4 年前より富山市の動物園の悠久の森実行委員会が中心となって行っている生息調査のうちの数地点を中心に、ホクリクサンショウウオが生息していそうな地点で環境DNAの検出を試みている。その結果、目視確認の有無に関わらず、数地点から環境DNAが検出された。今年度は、今までのように、様々な地点で生息調査をしたり、富山市の動物園のイベントや本校の文化祭で、ホクリクサンショウウオについて発表をし、知名度と保護意識の向上を目指したりした。そして、それらに加えて、ホクリクサンショウウオの環境DNAが検出された地点で、ホクリクサンショウウオ以外の環境DNAを同定することによって、ホクリクサンショウウオの餌となり得る生物を推定することも試みた。



図1 ホクリクサンショウウオの幼体（上。黄枠内）と成体（下）

#### ～環境DNAについて～

環境DNAとは、水や土壌、空気の中に含まれている、そこに生息している生物由来のDNAのことである。剥がれ落ちた皮膚の細胞や糞に含まれる生物体の腸の内壁片などのDNAが例として挙げられる。環境DNAは数週間で分解されるため、それ以前の個体のDNAは検出されない。また、環境DNAを採取し分析することで、実際に生物を採集したり目視で確認したりせずに、生物の在、不在がわかり、生物量や個体数などを推定することが可能である。

### 2-1 環境DNAの検出方法と結果、考察について

## 2-1-1 採水地と採水方法など

ホクリクサンショウウオが幼体や成体になると行動範囲が広がるので、目視確認は非常に困難である。そこで、まだ卵嚢や幼生の3月～6月に、呉羽丘陵と射水丘陵で、富山市内の動物園の悠久の森実行委員会が中心となって毎年調査している地点のうちの5地点と、私たちが生息を予想した2地点の合計7地点で、採水と卵嚢や幼生などの目視確認、水深や水温などの環境調査を行った。採水は、環境DNA学会の調査・実験マニュアルを参考に行った<sup>(2)</sup>。水は、なるべく泥が入らないように気をつけながら約1Lを採水瓶に入れ、DNAが分解されにくいようにすぐにオスパンを約1mL入れて冷蔵した。



図2 調査地（赤丸内。  
 詳細は保護のため  
 非公開）

表1 ある調査日の調査地点の気温などと目視確認の有無（④と⑦は今年初めて調査した地点）

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
気温 (°C)	16	16	20	16	18.5	11	9.1
水温 (°C)	11	11	15	12	13	9	10
水深 (cm)	4.5	9	7.5	6	6.1	23.5	10
泥下 (cm)	13.5	15	14	25	16.5	15.5	8
流速 (cm/s)	2.3	1.5	0	11.5	0	0	0
目視確認 (昨年)	成体	成体	卵嚢		卵嚢・成体	卵嚢・成体	
目視確認 (今年)	卵嚢	卵嚢	卵嚢	幼生	卵嚢・成体	卵嚢・成体	なし

\*泥下とは、水底に溜まっている泥の深さのことである。

## 2-1-2 DNAの抽出方法

採水後、速やかにオスパンを入れてもDNAの分解が少しずつ進むため、採水したその日のうちにDNAの抽出を行った。まず、汲んできた水をガラスフィルターで吸引濾過してから、DNeasy Blood & Tissue kit を使用してDNAの抽出を行った。

実験を始めた頃は、環境DNA学会のマニュアル通りに、採水した水をそのまま吸引濾過してガラスフィルターにDNAを吸着させていたが、目視確認していたすべての地点から環境DNAが検出されなかった。その原因は、濾過した際に泥がガラスフィルターに付着しすぎて、試薬が十分DNAに届かないからだと考えた。また、授業で行うDNAの抽出実験で、DNAはコーヒーフィルターを通り抜けることを知っていた。そこで、吸引濾過する前にコーヒーフィルターで、ある程度泥を取り除くことをすると、環境DNAが検出されたので、それ以降はこの方法でDNAの抽出をすることにした。



図3 コーヒーフィルターを使った濾過の様子

## 2-1-3 自分たちで行ったPCR法、電気泳動と染色方法について

<PCR法について>

今までの研究で、ホクリクサンショウウオのミトコンドリアのシトクロムbのDNAのうち、ホクリクサンショウウオに特異的と判断し、BLAST検索で99%ホクリクサンショウウオと同定されたものを使用した。

プログラムは、今までの研究で最も検出できた、98°C 1分→【98°C10秒→55°C15秒→72°C14秒×

3サイクル】→72℃3分→15℃∞で行った。DNAポリメラーゼは、PrimeSTAR HS DNA Polymerase を用いた<sup>(4)(5)</sup>。

#### <電気泳動と染色方法>

増幅したサンプルをアガロースゲルを用いて、サンプル量：ローディングダイ=6：1にして、全量7.0μLを電気泳動した。そしてGelGreenで染色後、主波長500nmのLEDライトを照射し、ホクリクサンショウウオに特異的なDNAが検出できる領域にバンドが検出するかどうかで、ホクリクサンショウウオの生息の有無を判断した。

### 2-1-4 ホクリクサンショウウオの餌となり得る生物の同定について

私たちがDNAの抽出まで行った試料を(株)生物技研に送り、生物の同定を依頼した。

### 2-1-5 結果と考察

昨年環境DNAを検出した3地点のうち、今年目視確認できた地点は2地点、昨年環境DNAを検出していない4地点のうち今年目視確認できた地点は3地点あり、そのうち今年初めて調査をした地点は1地点だった。また、2022年までの悠久の森実行委員会と今年私たちが行った目視調査計33ヶ所の結果をまとめると図4のようになる<sup>(3)</sup>。安定産地とは、卵囊が昨年と今年見つかっている地点、不安定産地とは卵囊がいずれかの年でしか見つかっていない地点、消失地点は、現在繁殖地として利用されていない地点、未評価は、今年初めて調査した地点である。ホクリクサンショウウオは止水性のサンショウウオであるため、流速の速い場所には生息しないと考えていた。しかし、流速が速い場所であっても、一部流れが緩やかになっている場所がある場合は、水深や泥下の深さに関係なくホクリクサンショウウオが生息していることもわかった。

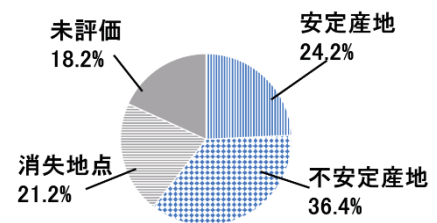


図4 ホクリクサンショウウオの生息地

私たちはホクリクサンショウウオが幼体になって陸に上がる前の3月～6月にかけて、同じ地点で数回調査を行っているが、途中で水が干上がってしまう地点もある。その地点は卵囊のときに悠久の森実行委委員会が引き上げてふ化させ、動物園や地域の小学校などで飼育し、幼体になってから現地に帰すことをしている。しかし、途中で干上がるすべての地点でそのようなことをできないので、保護するためには干上がらないように水を引き込むなどの工夫をした方がいいと考える。

(株)生物技研に餌となり得る生物の同定を依頼したが、環境DNAは一切出てこなかった。依頼した地点ではホクリクサンショウウオの幼生を目視確認できていたので、私たちのDNAの抽出方法が適切ではなかったことが原因と考えられる。

### 2-2 ホクリクサンショウウオの保護活動について

#### 2-2-1 方法

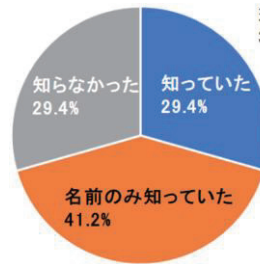
富山市内の動物園のイベントにくる小学生以下の子供や保護者を対象に、ホクリクサンショウウオについてスライドを作成して発表を行い、実験に使用した器具の一部を聴講者に手に取ってもらった。また、校内でホクリクサンショウウオの幼生を育て、中学生を対象としたオープンハイスクールでは、来校した中学生に幼生をみせながら説明を行った。文化祭では、ホクリクサンショウウオについて説明したスライドを展示し、認知度についてアンケート調査を行った。

## 2-2-2 結果と考察

動物園のイベントでは、小学校低学年でも理解できるように構成や用語を考えたので、ある程度は理解してもらえたと感じた。

本校で行ったアンケート結果は、図5、6の通りである。私たちの展示を見て、理解が深まったといえる。この展示とアンケート調査は毎年文化祭で行っており、年々ホクリクサンショウウオを知る人が増え、生態を理解する人も多くなってきていることがわかる。これは私たちの活動により、ホクリクサンショウウオについて知る機会が増え、発表を通してホクリクサンショウウオについて広く伝えることができたからだと考えられる。

ホクリクサンショウウオについて知っていたか



ホクリクサンショウウオについて理解できたか

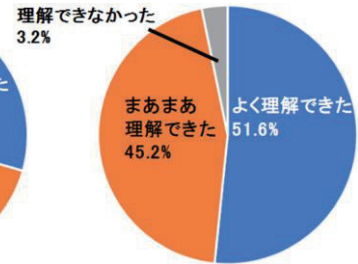


図5 今年度の、展示を見る前とみた後でのアンケート結果

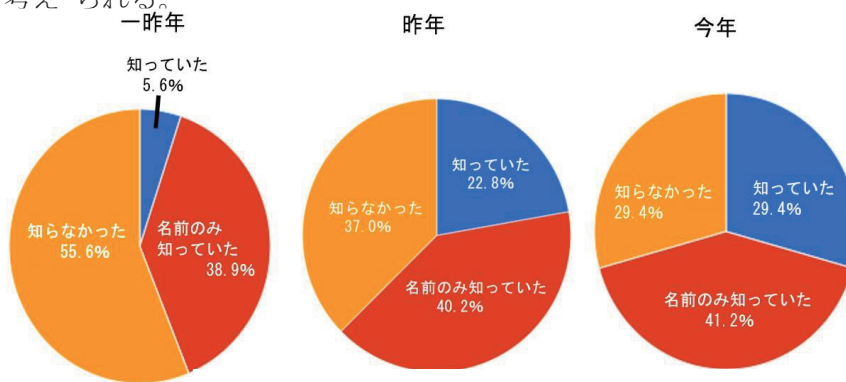


図6 ホクリクサンショウウオの認知度の推移

## 3 まとめ

今年度の目標は、①ホクリクサンショウウオの餌となり得る生物の同定と、②県民の保護意識を高める、ということだった。①については、目標を達成できなかった。原因として、生徒が実験に慣れてきたため、少し雑に実験をしていたことが考えられる。今後指導者として注意し続けていきたい。②については、徐々に知名度が高くなってきているので、保護意識を高められたと感じる。

## 謝辞

本研究を行うに当たり、亀谷三志 様、澤田研太 様、悠久の森実行委員会の皆様、富山大学学術研究部理学系 田中大祐 教授には大変お世話になりました。また、公益財団法人中谷財団より科学教育振興助成金をいただき、研究に必要な薬品を購入し、生物の同定のための経費に充てることができました。深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- (1)絶滅危惧種ホクリクサンショウウオの環境 DNA を用いた検出法の確立, 日本生態学会第 66 回全国大会 (2019 年 3 月、神戸) 一般講演 (ポスター発表) .ESJ66 posterP1-508
- (2)環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver.2.2
- (3)富山の生物 第 62 号 (2023) p110-118
- (4)ホクリクサンショウウオの環境 DNA を利用した生息調査と保護活動について.第 35 回自然科学部研究発表会論文集,p20-p21
- (5)ホクリクサンショウウオの環境 DNA の検出と生息調査.第 34 回自然科学部研究発表会研究論文集, p32-33