

環境DNAを用いた指標生物調査

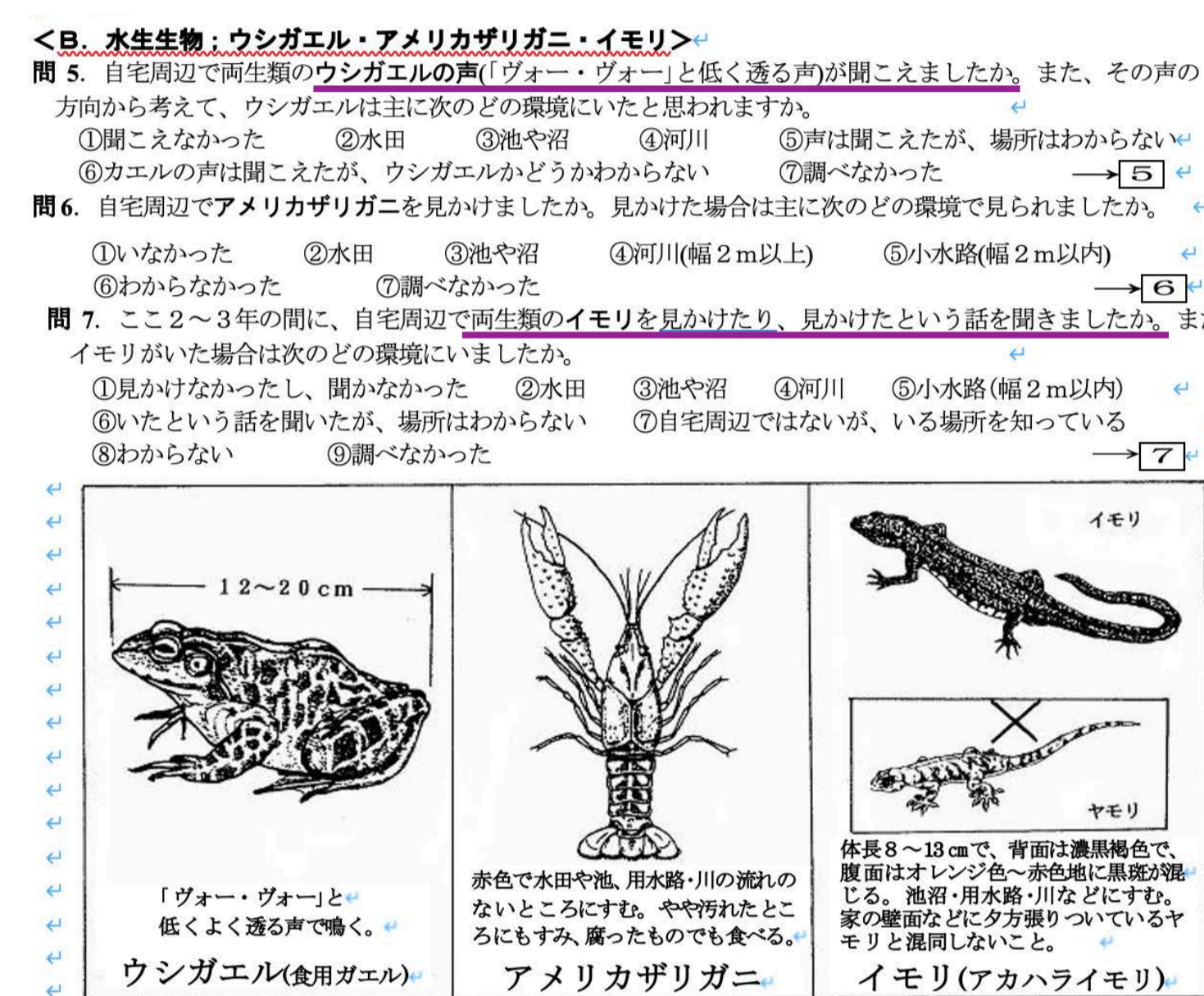
要約

新教育課程では「探究の過程」を踏まえた授業づくりが重視されるようになってきている。これまで「探究の過程」を踏まえた授業づくりで活用できる教材として指標生物調査の教材化について研究を行ってきた。指標生物調査には「探究の過程」の各要素が含まれており、それを生徒が経験できるように教材化を試み教育現場で実践してきた。「ウシガエル・アメリカザリガニ・イモリ」といった水生生物の調査は実際に見つけることは困難なため、鳴き声を聞いたことがあるか、見かけたという話を聞いたことがあるかといった形も有効にしている。しかし、生物・地域・環境への理解と興味関心が高い生徒と低い生徒での調査の信頼性が大きく異なるという課題があった。

近年、環境DNAを用いて特定の生物の生息の有無を客観的に信頼できるデータとして収集することが可能となっている。この調査手法を用いることで水生生物の調査の課題であった生徒による信頼性を検証するためアンケート法による調査結果と環境DNAを用いた調査結果の比較を行った。アンケートの調査地点から任意の地点で採水及び環境DNAを抽出し、「ウシガエル・アメリカザリガニ・イモリ」の特異的プライマーを用いて調査した。各種において「その生物がいない」とアンケートで答えた地点でPCR法によるDNAの増幅が確認された。この結果からアンケート法では本来調査対象の生物が生息しているにも関わらず生息していないと誤って判定してしまっている可能性があると考えられる。しかし、環境DNAの分析が初の試みであったこと、近年環境DNAの分析と実地調査のどちらを信頼すべきかの議論がでていいることを踏まえるとアンケート結果が正しく、環境DNAの分析の結果が誤っている可能性も否定できない。今回の結果のみでアンケート調査の信憑性を判断せず継続してアンケートによる調査と環境DNAによる調査の両方を行い検証していく必要がある。

目的・背景

新教育課程の大きな狙いは「コンテンツベースからコンピテンシーベースへ」である。授業でどのような内容を教えるかではなく、授業でどのような資質・能力（コンピテンシー）を育むかに重点が置かれるようになった。高校理科で求められる「資質・能力」を育む過程で働く「見方・考え方」として「科学的に探究する方法を用いて考えること」と示されている。そのため、「探究の過程」を踏まえた授業づくりが重視されるようになってきている。これまで「探究の過程」を踏まえた授業づくりで活用できる教材として指標生物調査の教材化について研究を行ってきた。指標生物調査には「探究の過程」の各要素が含まれており、それを生徒が経験できるように教材化を試み教育現場で実践してきた。「ウシガエル・アメリカザリガニ・イモリ」といった水生生物の調査は実際に見つけることは困難なため、鳴き声を聞いたことがあるか、見かけたという話を聞いたことがあるかといった形も有効にしている。しかし、生物・地域・環境への理解と興味関心が高い生徒と低い生徒での調査の信頼性が大きく異なるという課題があった。そこでアンケート法による指標生物調査の精度を検証するため本研究をおこなった。



実験

近年、環境DNAを用いて特定の生物の生息の有無を調査することが可能となっている。環境DNAは生物が生息する水中に存在するその生物由来のDNAである。環境DNAを用いた調査では調査者が身近な環境の水を採取し、PCR法で特定の生物のDNAが増幅されるかどうかを分析するため、客観的に信頼できるデータを収集することができる。この調査手法を用いることで水生生物の調査の課題であった生徒による信頼性を検証するためアンケート法による調査結果と環境DNAを用いた調査結果の比較を行った。アンケート調査地点から任意の地点で採水し環境DNAを抽出に成功した5サンプルに対して、「ウシガエル・アメリカザリガニ・イモリ」の特異的プライマーを用いて調査した。本来はrealtimePCRを用いた解析が主流であるが高校現場では実施が困難であるため従来のPCR法によりバンドが見られるかどうかで判断することにした。

環境DNA調査の流れ

- 採水
- 濾過吸着 (Whatman Glass microfiber Filters GF/F)
- DNAの抽出 (Qiagen CNeasey Blood&Tissue kit)
- PCR法によるDNAの増幅 (TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0)
- 電気泳動によるDNAの増幅の確認

プライマー

・アメリカザリガニ
F 5'-AAACTAGGGGTATAGTTGAGAG-3'
R 5'-CAGAAGCTAAAGGAGGATAA-3'
引用元: Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds

・ウシガエル
F 5'-TTACACCGAGAAAATGTCGGTTT-3'
R 5'-GAAATTTTTTCGATCGCCTGTACTATA-3'
引用元: 環境DNAによる絶滅危惧種・外来種の生息場所把握

・アカハライモリ
F 5'-TATTTTTCTATAAAGACCTG-3'
R 5'-CAAGGATCAAATAGATATTAGA-3'
指導助言 神戸大学大学院人間発達環境学研究科 教授 源 利文



今回の実験方法の流れ

今回の実験で用いたプライマー

濾過吸着の様子

DNAの抽出

結果

ウシガエルでは5サンプル中アンケート結果と環境DNAの解析結果が一致したものは4サンプルであった。1サンプルアンケートではウシガエルが「いない」と回答していたが環境DNAの解析結果では「いる」という結果であった。アメリカザリガニでは5サンプル中アンケート結果と環境DNAの解析結果が一致したものは2サンプルであった。3サンプルアンケートではアメリカザリガニが「いない」と回答していたが環境DNAの解析結果では「いる」という結果であった。イモリでは5サンプル中アンケート結果と環境DNAの解析結果が一致したものは2サンプルであった。3サンプルアンケートではアメリカザリガニが「いない」と回答していたが環境DNAの解析結果では「いる」という結果であった。上記の様にウシガエル・アメリカザリガニ・イモリそれぞれにおいて「その生物がいない」とアンケートで答えた地点でPCR法によるDNAの増幅が確認された。

考察

これらの結果からアンケート法では本来調査対象の生物が生息しているにも関わらず生息していないと誤って判定してしまっている可能性があると考えられる。しかし、環境DNAの分析が初の試みであったこと、近年環境DNAの分析と実地調査のどちらを信頼すべきかの議論がでていいることを踏まえるとアンケート結果が正しく、環境DNAの分析の結果が誤っている可能性も否定できない。今回の結果のみでアンケート調査の信憑性を判断せず継続してアンケートによる調査と環境DNAによる調査の両方を行い検証していく必要がある

謝辞

- 共同実験者（天野 怜・西田 勇耶・河津 葵・和気 史奈・西田 郁哉）のみなさん放課後・土日お疲れさまでした
- 日本学術振興会令和3年度科学技術研究費助成事業の助成を頂きありがとうございました
- 神戸大学大学院人間発達環境学研究科教授 源 利文にご指導助言を頂きありがとうございました。
- ポジティブコントロールの採水には滋賀県立琵琶湖博物館金尾滋史博士にご協力いただきありがとうございました

アメリカザリガニ	A	B	C	D	E
アンケートの回答	○	×	○	×	×
環境DNAの解析	○	○	○	○	○

ウシガエル	A	B	C	D	E
アンケートの回答	○	×	○	○	×
環境DNAの解析	○	○	○	○	×

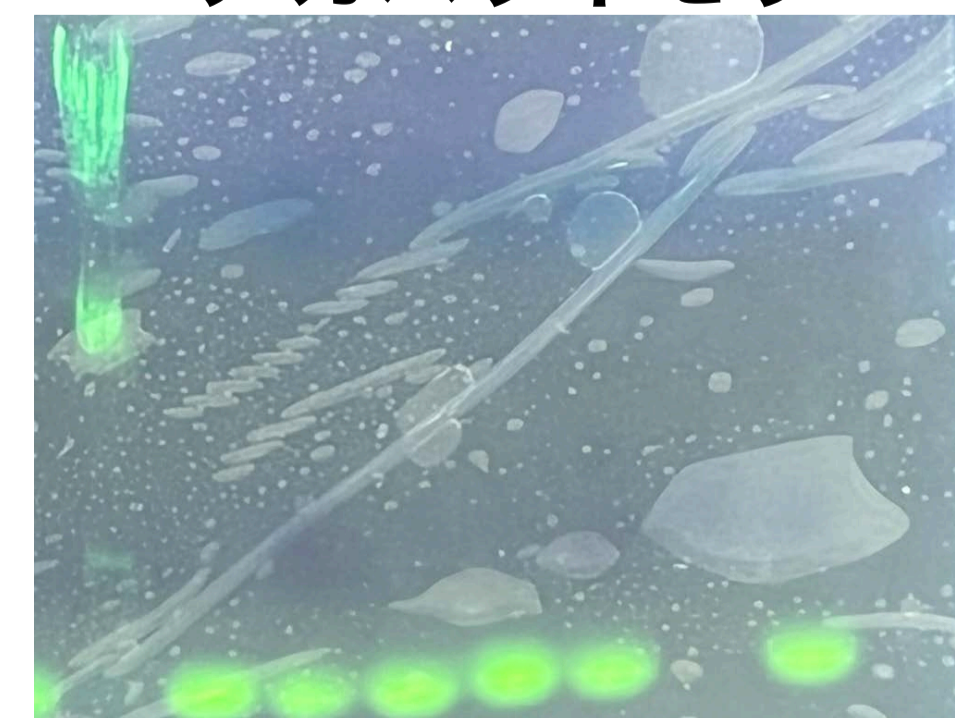
イモリ	A	B	C	D	E
アンケートの回答	○	○	×	×	×
環境DNAの解析	○	○	○	○	○

アンケートの回答と環境DNAの分析結果
それぞれの生物が「いる」と判断できる場合・・・○
それぞれの生物が「いない」と判断できる場合・・・×



PCR法による増幅

アカハライモリ



NC PC

電気泳動による増幅確認