

アカイシサンショウウオの 環境DNA種特異的検出系の開発

○岡本悠吾、川森文彦、栗田佳典（(株)静環検査センター）
国領康弘（志太自然ネットワーク）

アカシサンショウウオ (*Hynobius katoï*)

- ・ 分類：両生綱有尾目サンショウウオ科
- ・ 分布：本州中部地方南部
- ・ 生態：体長10 cm前後、溪流源流域付近に生息、流水性、4月～5月頃に繁殖すると考えられている
- ・ 卵のう：短い円筒状で透明（※室内産卵）

環境省レッドデータブック2014：絶滅危惧ⅠB類（EN）

静岡県レッドデータブック2019：絶滅危惧ⅠA類（CR）

国内希少野生動植物種に指定

種の保存法により個体等の捕獲や採取等が禁止されている

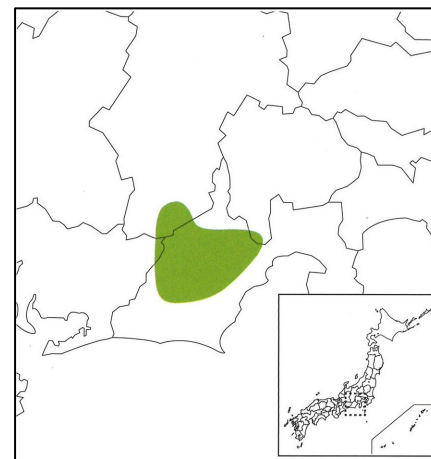


図1 アカシサンショウウオ分布図

引用：特盛山椒魚本（2019年 北九州魚部）

種特異プライマー及びプローブの作製

○方法

GenBankからサンショウウオ類のミトコンドリアDNA cytochrome b (cytb) 領域を取得
→アカシサンショウウオをターゲットとして、TaqManプローブ法で種特異的になるように設計

○結果

計46データ（オオサンショウウオ属、ハコネサンショウウオ属、サンショウウオ属（一部除く））のcytb領域を比較
→アカシサンショウウオの特異的な箇所（約100 bp）を見出した

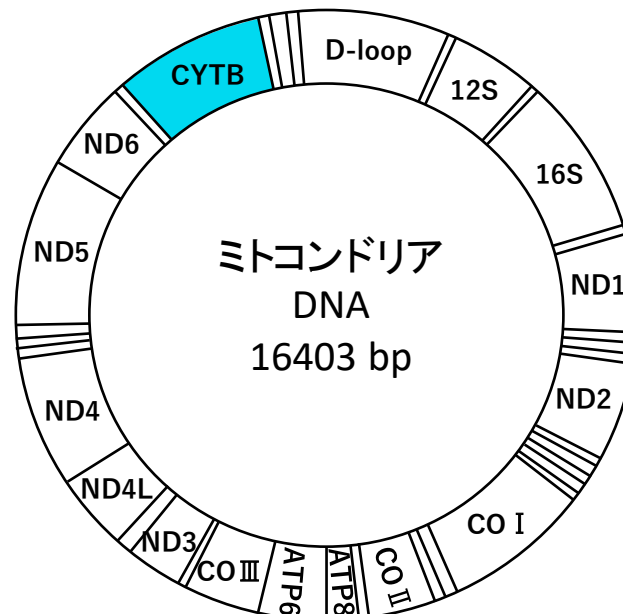


図2 ミトコンドリアDNAの模式図

特異性の検証

○方法

サンショウウオ属8種類の組織DNAを鋳型にし、リアルタイムPCRを用いて種特異的検出系の動作を検証

○結果

アカイシサンショウウオのみ増幅を確認した

表1 種特異的検証結果

種名	検証結果
トウホクサンショウウオ	×
クロサンショウウオ	×
アカイシサンショウウオ	○
ヒガシヒダサンショウウオ	×
ヒバサンショウウオ	×
イシヅチサンショウウオ	×
トウキョウサンショウウオ	×
ヤマトサンショウウオ	×

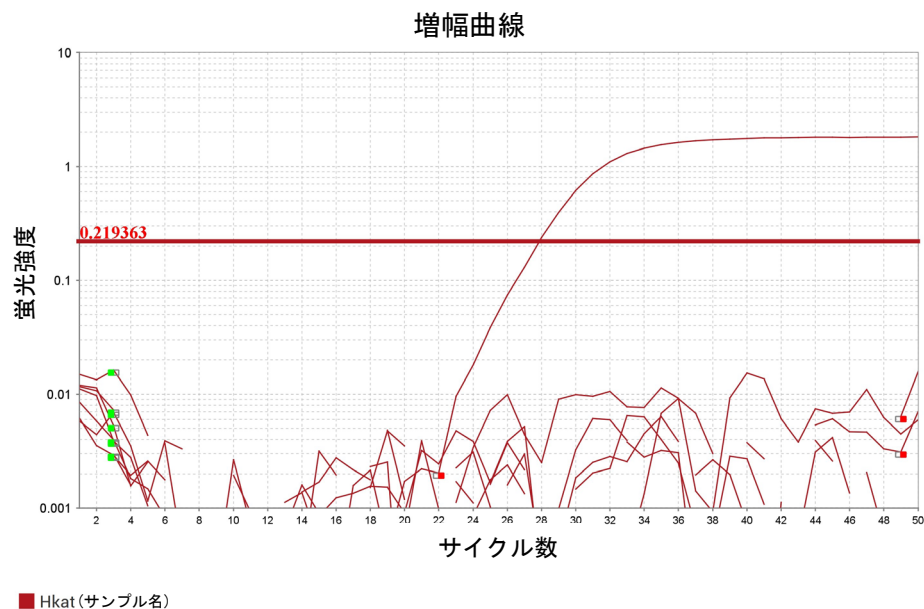


図3 リアルタイムPCRの増幅曲線

環境DNA種特異的検出

○方法

・採水地点

→静岡県内の3地点（St. 1～St. 3）において採水を行った
St. 1, St. 2：源流域、St. 3：上流域

・採水頻度

→2021年1月～8月の各月1～2回

※1月と2月（St. 1, 2）及び7月下旬（St. 2）は水枯れにより採水できなかった

表2 採水状況

採水日	St. 1	St. 2	St. 3
2021. 1. 31	×	×	○
2021. 2. 28	×	×	○
2021. 3. 27	○	○	○
2021. 4. 24	○	○	○
2021. 5. 15	○	○	○
2021. 6. 9	○	○	○
2021. 6. 23	○	○	×
2021. 7. 15	○	○	○
2021. 7. 30	○	×	○
2021. 8. 18	○	○	○
2021. 8. 26	○	○	○

環境DNA種特異的検出

○結果

- ・ 源流域であるSt. 1及びSt. 2において、アカイシサンショウウオの環境DNAを検出した
- ・ St. 1では、3月下旬～6月下旬に検出され、アカイシサンショウウオの繁殖時期と考えられる4月下旬と5月中旬に高い頻度で検出された
- ・ St. 2では、3月下旬・4月下旬・6月上旬・7月中旬に検出され、6月上旬に高い頻度で検出された
- ・ St. 3では、いずれの月においても検出されなかった

表3 アカイシサンショウウオ種特異的検出結果

採水日	St. 1	St. 2	St. 3
2021. 1. 31	NT	NT	0/6
2021. 2. 28	NT	NT	0/6
2021. 3. 27	2/6	3/6	0/6
2021. 4. 24	6/6	1/6	0/6
2021. 5. 15	5/6	0/6	0/6
2021. 6. 9	1/6	5/6	0/6
2021. 6. 23	1/6	0/6	NT
2021. 7. 15	0/6	1/6	0/6
2021. 7. 30	0/6	NT	0/6
2021. 8. 18	0/6	0/6	0/6
2021. 8. 26	0/6	0/6	0/6

注1) 「NT」は、分析していない事を示す。

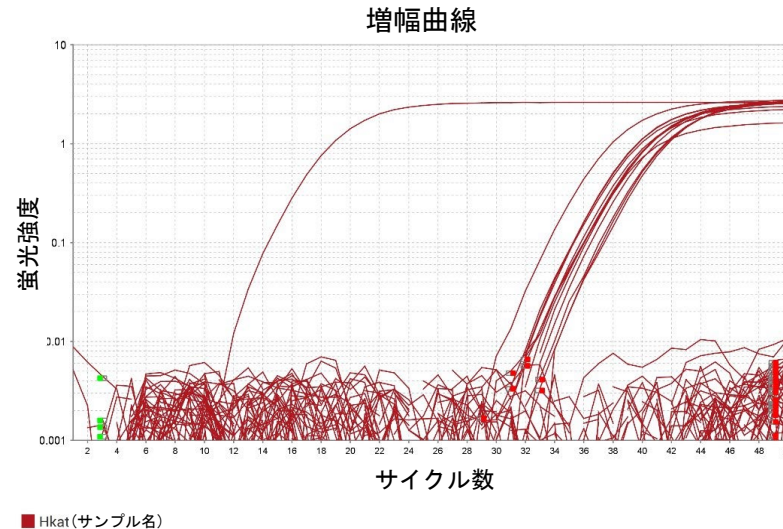


図4 リアルタイムPCRの増幅曲線

まとめ

○種特異的検出系の開発

- ・アカイシサンショウウオを種特異的に検出するリアルタイムPCR系を開発した

○環境DNA種特異的検出

- ①St. 1とSt. 2の環境DNAが検出される時期に違いが見られた
…両地点の産卵時期の違い、または降雨増水の影響の違いによると考えられる
- ②St. 1とSt. 2は環境DNAが検出されたが、St. 3は検出されなかった
…河川規模の違いによると考えられる

アカイシサンショウウオの在不在を環境DNAで検出するためには、
採水時期や採水地点の選定が重要になる！