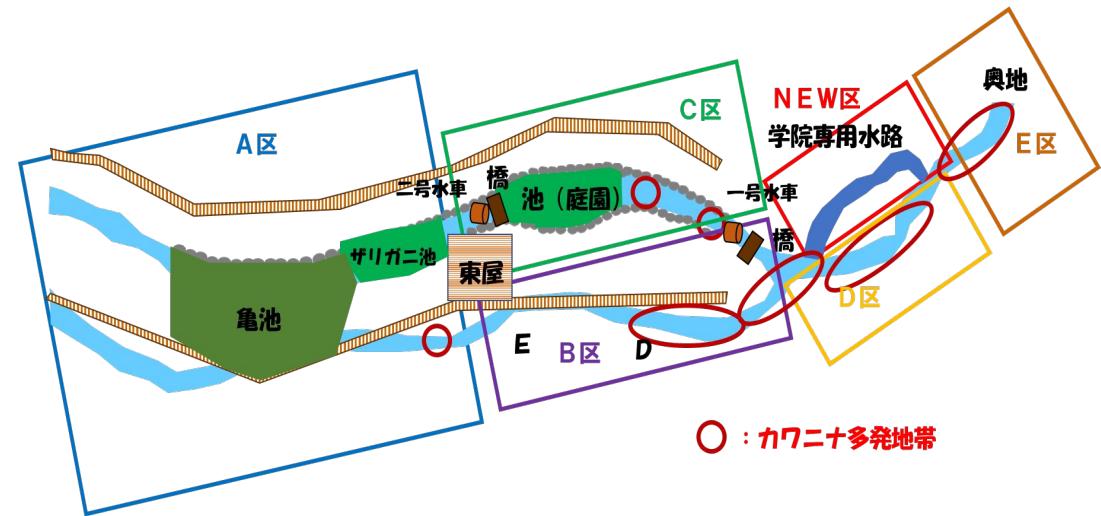


カワニナやゲンジボタルの水 路内分布調査による水環境 の理解

東北学院中学校・高等学校科学部生物班

研究の目的・背景

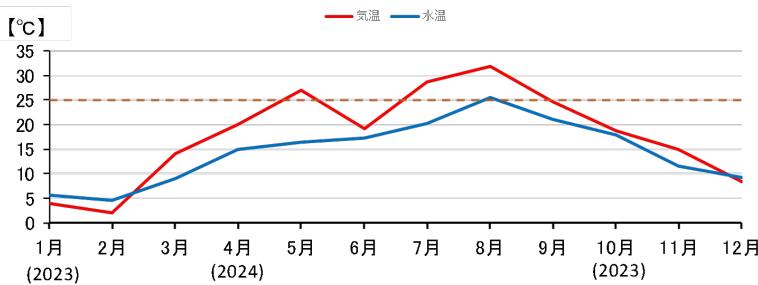
台原森林公園内ホタルの里エリアのゲンジボタルとカワニナが定着できる水環境を維持するため、定期的な水温、水質の調査とカワニナの分布調査、ゲンジボタルの分布を調べるため、環境DNA調査を行った。



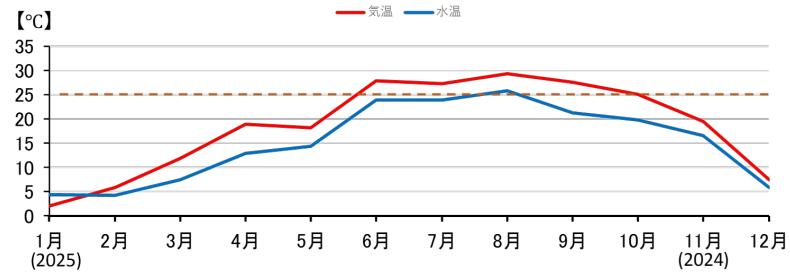
現地水環境

2023年10月からこれまで継続して現地保全活動を行い、水温・水質調査を行ってきた。以下はその結果である。

台原森林公园ホタルの里エリアの気温と水温の関係(2023~2024)



台原森林公园ホタルの里エリアの気温と水温の関係(2024~2025)



第1表:2023年10月から2025年10月までの月ごとのpHの変化

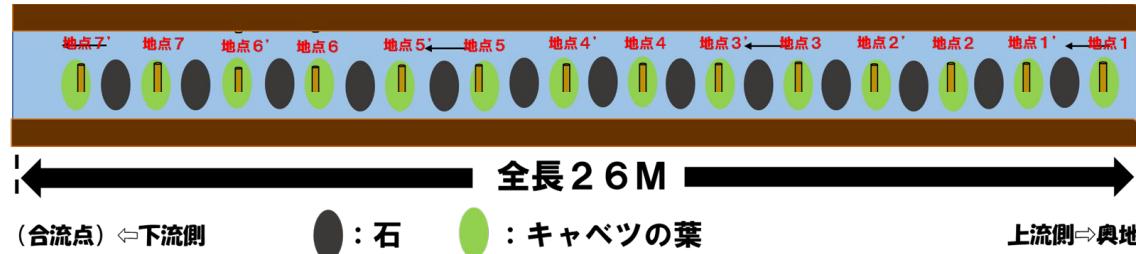
	1月	2月	3月	4月	5月	6月
2023~2024	6.5	—	—	6.9	7.2	—
2024~2025	6.5	7.5	7.9	7.2	7.5	7.7
	7月	8月	9月	10月	11月	12月
2023~2024	7.2	7.3	7.4	—	6.8	—
2024~2025	7.4	7.8	7.1	7.7	7.5	6.9

※ハイフン(ー)は測定していない月を示している。

カワニナの放流と定着①

カワニナの分布調査の手法は以下の通りである。

- ①全長26mの東北学院専用水路全体にネットを敷き、ネットの下や土にカワニナが 潜ることがないように工夫する。
- ②中央を第5地点とし、上流から下流にかけて第1～8地点に等間隔に区分する。
- ③さらにそれぞれの区間を1'～7'に細区画化する。
- ④中央5地点に100匹のカワニナを放流し、その後の3日間、1週間後のカワニナの分 布を調べる。このとき、3日間はネットを取り外さず目視で、1週間後はネットを 全て外して頭数をカウントする。



カワニナの放流と定着②

分布調査の結果は以下の通りである。

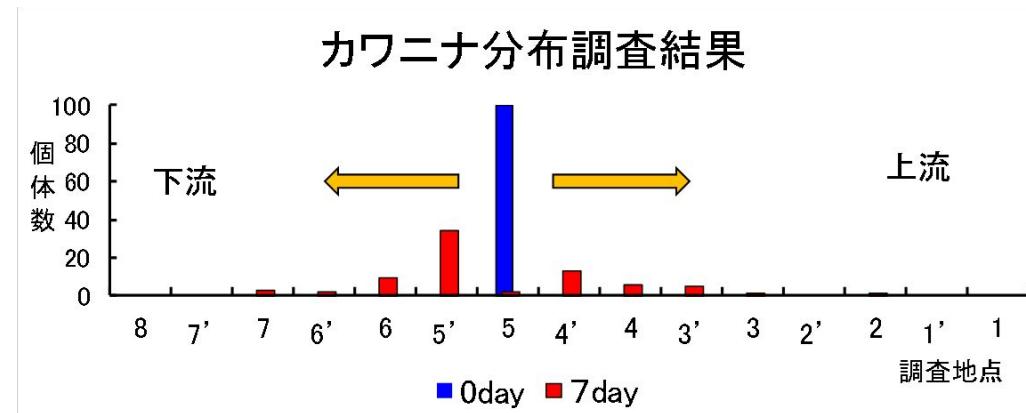
①3日間、目視で確認できた頭数

1日目合計38匹、2日目合計27匹、3日目合計16匹であった。

	8	7'	7	6'	6	5'	5	4'	4	3'	3	2'	2	1'	1
0day	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
1day	0	0	0	0	1	5	16	14	1	0	1	0	0	0	0
2day	0	1	0	1	3	2	4	3	2	5	4	2	0	0	0
3day	0	0	0	2	1	1	3	3	0	0	2	1	0	1	2

②1週間後に確認できた頭数

合計76匹確認できたが残りの 24
匹の所在は不明である。



環境DNA調査 実験方法①

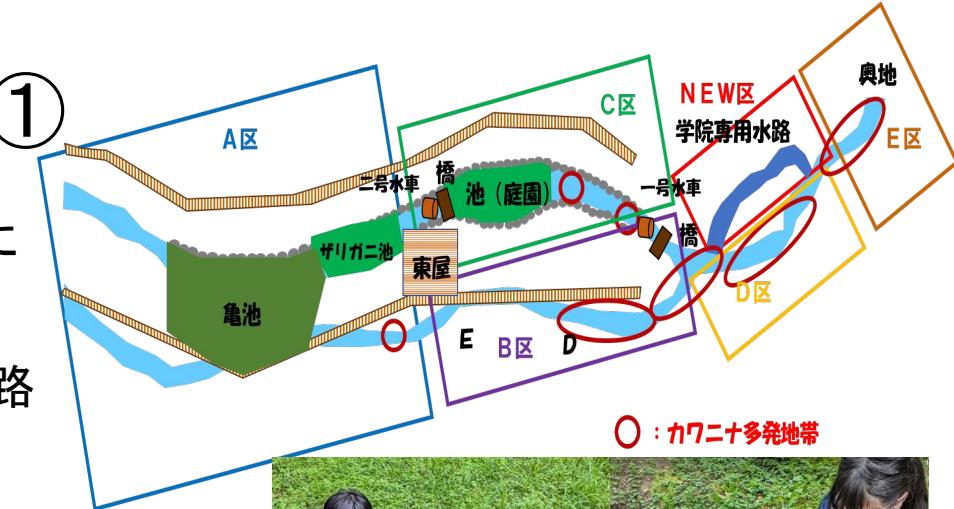
環境DNAのサンプルの採取を以下の手順に従って行った。

①サンプルをE区、D区、東北学院専用水路で採取する。

②①のサンプルをゲンジボタルのDNAが通過するように濾過する。

③②のサンプルをステリベクスを用いて更に濾過する。一つのステリベクスにつき、5回濾過し、それを四回繰り返す。

④フィルターにRNAlaterを注入してから、パラフィルムを使って封をする。



環境DNA調査 実験方法②

次に、DNAの抽出を以下の手順に従って行った。
用しDNAを吸引後、再びフィルターに封をする。

20 μ LのProteinase-K(600mAU/ml)、 $2.0 \times 10^2 \mu$ L の AL、 $2.2 \times 10^2 \mu$ L の PBS (-) の割合で抽出液を調合し、それをステリベクスに注入後、再びフィルターに封をする。

③ステリベクスをローターのチューブホルダーに
かじめ56°Cまで温めておいた乾熱滅

せながら加温する。

チュー
ブを挿し込む。

①QIAvacを使

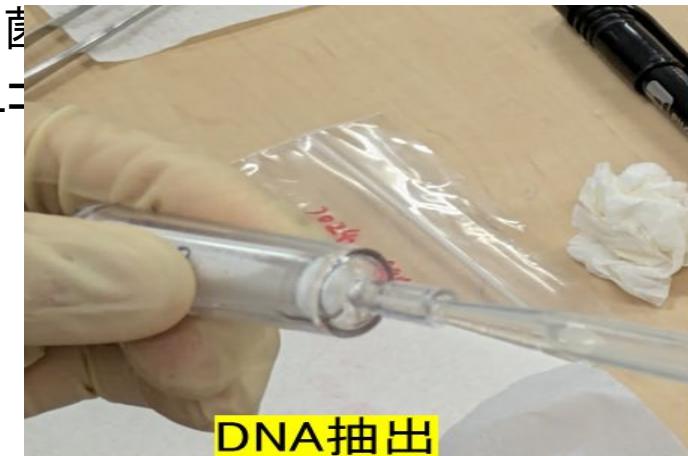
②1本のステリベクスあたり

AL、 $2.2 \times 10^2 \mu$ L の PBS (-) の

入後、再びフィルターに封をする。

セットし、あら

このとき、50mLニ

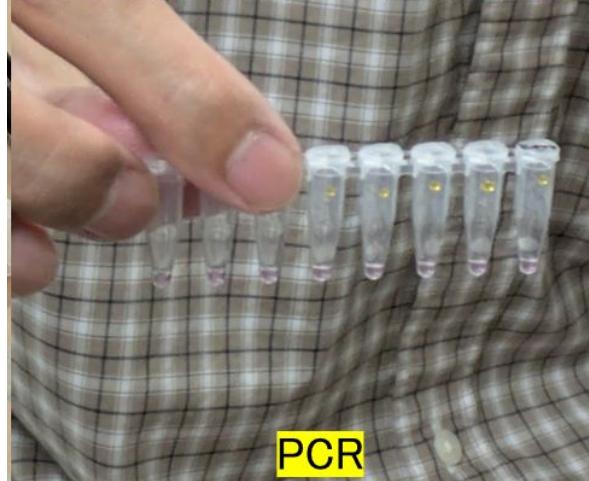


環境DNA調査 実験方法③

- ④加温終了後、ステリベクスの注入孔を50mLコニカルチューブ内の2.0mLチューブを挿入し、そこまで押し込む。
- ⑤キャップを閉めた後、 6.0×10^3 gで一分間遠心し、DNAを抽出する。
- ⑥遠心終了後、コレクションチューブを取り替え、 5.0×10^2 μLのBufferAW1で再び 6.0×10^3 gで1分間遠心する。
- ⑦再びコレクションチューブ、 5.0×10^2 μLのBufferAW2を注入し、 2.0×10^4 gで3分間遠心する。
- ⑧遠心終了後、1.5mLチューブ取り替え、 2.0×10^2 μLの溶出Buffer AEをカラムのメンブレン上に注ぎ、室温で1分間インキュベートしたあと 6.0×10^3 gで一分間 遠心する。

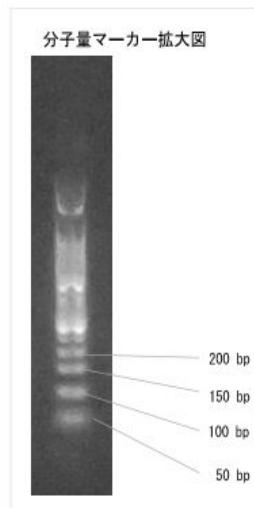
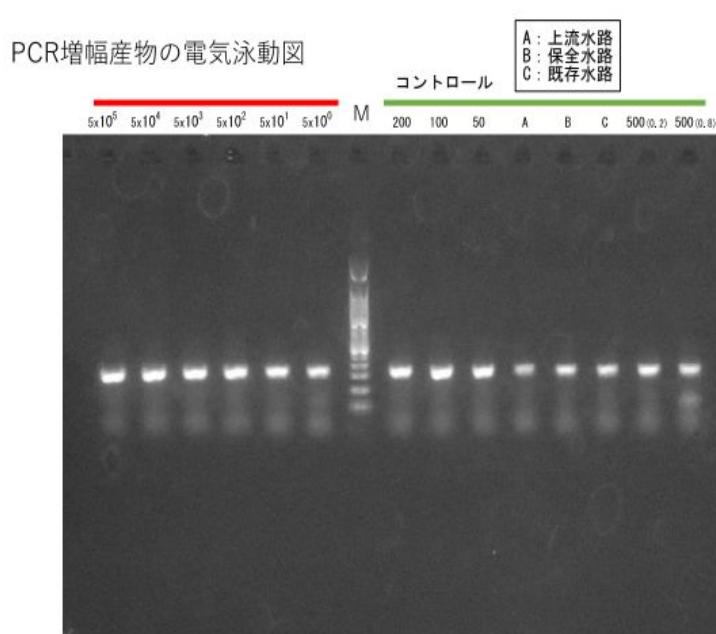
環境DNA調査 実験方法④

- ⑨目的のサンプルが入手できたかを調べるために、電気泳動を行う。
- ⑩リアルタイムPCR調査を行う。(リアルタイムPCR調査とは、DNAを増幅させてDNAの有無を判断する方法である。)



結果①

以下は電気泳動の結果である。



リアルタイムPCRの50サイクル後増幅産物を
2μL使用し、1.5%アガロースゲルで1.0×10²、
15分間の電気泳動

赤:標準サンプル

左からコピー数5.0×10⁴、5.0×10³、5.0×10²、
5.0×10¹、5.0

緑:測定サンプル

左からホタル200、ホタル100、ホタル50
水路A(上流水路)、水路B(保全水路)
水路C(既存水路)

ホタル500(0.2L)、ホタル500(0.8L)

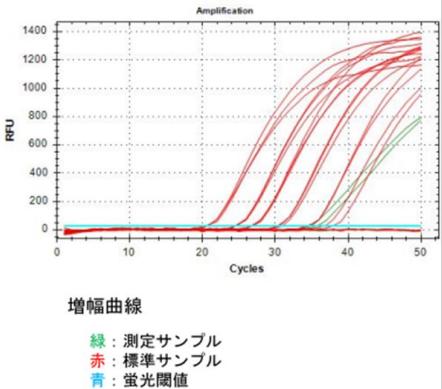
N:分子量マーカー(50 bp DNA Ladder;Takara
社)

※目的の増幅産物(170bp付近)が得られたことを確認するための電気泳動。おそらくいずれのサンプルも増幅の限度近くに達しているので以下のDNA濃度はバンドの濃さに反映されない。

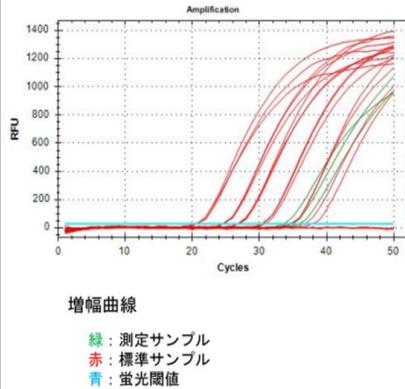
結果②

右はリアルタイムPCR調査の結果である。

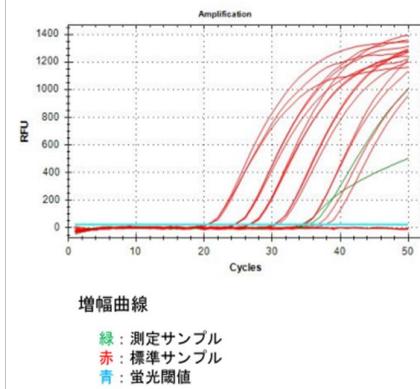
水路A



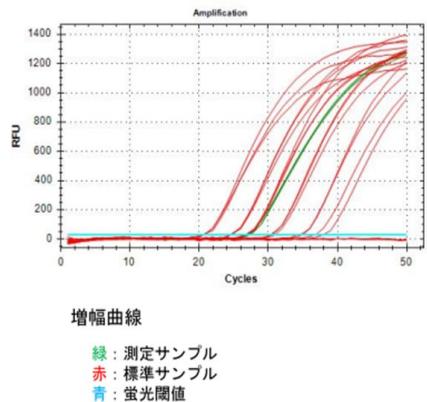
水路B



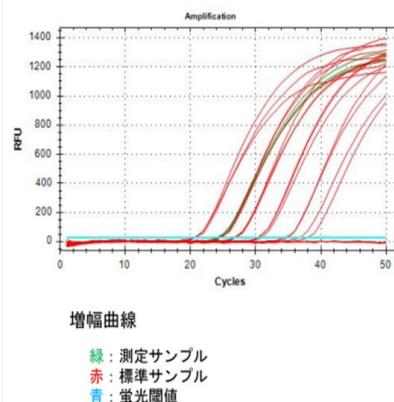
水路C



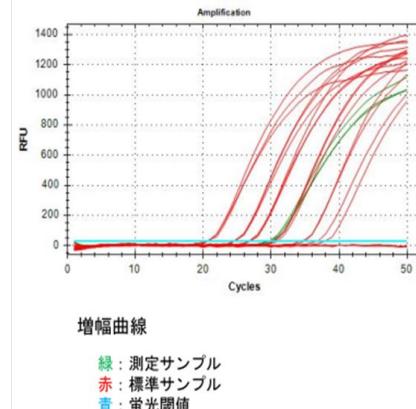
ホタル50



ホタル100

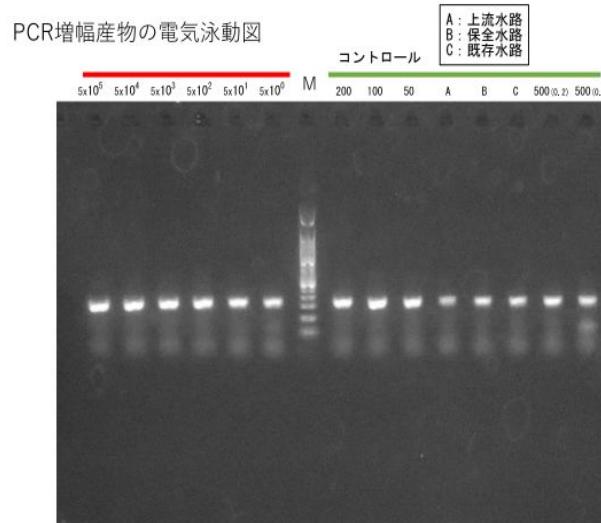


ホタル200



考察①

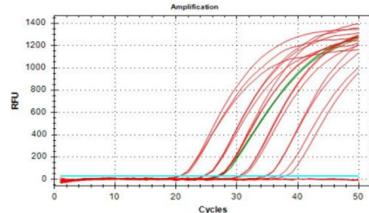
電気泳動の結果から、標準サンプルと同様、校内の卓上飼育及び採取したサンプルでも170bpの増幅DNA断片がPCRにて増えたことを確認できた。A～Cはそれぞれ台原森林公園の水路のE区、TG区、D区から採取したものであるが、いずれも標準サンプルと同様の170bp周辺にバンドが検出できたことから、すべてのゲンジボタルに共通しているといえる。



考察②

次に、リアルタイムPCRの結果を比較すると、全てのサンプルで閾値を超える蛍光が確認できた。得られたCT値から判断して、水路におけるDNA濃度を比較すると、B(保全水路) > A(上流水路) > C(既存水路)であった。

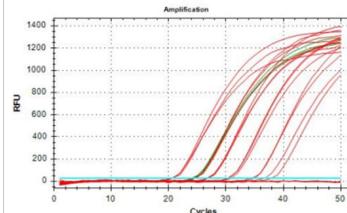
ホタル50



增幅曲線

緑：測定サンプル
赤：標準サンプル
青：蛍光閾値

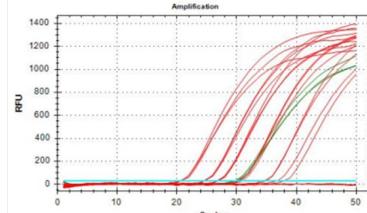
ホタル100



增幅曲線

緑：測定サンプル
赤：標準サンプル
青：蛍光閾値

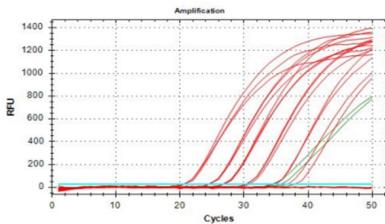
ホタル200



增幅曲線

緑：測定サンプル
赤：標準サンプル
青：蛍光閾値

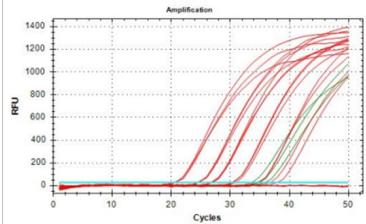
水路A



增幅曲線

緑：測定サンプル
赤：標準サンプル
青：蛍光閾値

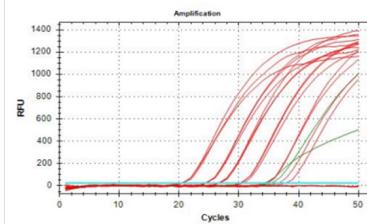
水路B



增幅曲線

緑：測定サンプル
赤：標準サンプル
青：蛍光閾値

水路C



增幅曲線

緑：測定サンプル
赤：標準サンプル
青：蛍光閾値

参考文献

- 1 環境DNA分析によるゲンジボタル幼虫の検出と定量可能性. 渡邊ら. 応用生態工学. 2021; 23(2): 279–293.
- 2 ゲンジボタルの遺伝子解析による人為的放流か自然発生かの判別法. 木村和裕ら. 全国ホタル研究会誌. 2013; 46: 29–41.
- 3 ミトコンドリアND5遺伝子の塩基配列から推定されたゲンジボタルの種内変異と分子系統. 吉川貴浩ら. Jpn. J. Ent.(N.S).2001;4(4):117–127.

謝辞

本研究成果を収めるにあたり、研究助成を賜りました一般財団法人水・地域イノベーション財団の関係の皆様、ならびに環境DNA調査の実施にあたり、ご指導ご鞭撻をいただきました復建技術コンサルタントの皆様に心より感謝申し上げます。