

九州に生息する希少淡水魚類の種特異的環境DNA検出系の確立

鬼倉，徳雄

九州大学大学院農学研究院資源生物科学部門動物・海洋生物科学講座アクアフィールド科学研究室

栗田，喜久

九州大学大学院農学研究院資源生物科学部門動物・海洋生物科学講座アクアフィールド科学研究室

梅村，啓太郎

九州大学大学院生物資源環境科学府資源生物科学専攻動物・海洋生物科学教育コースアクアフィールド科学研究室

永江，栞奈

九州大学大学院生物資源環境科学府資源生物科学専攻動物・海洋生物科学教育コースアクアフィールド科学研究室

他

<https://hdl.handle.net/2324/7443177>

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 81 (2), pp.11-17, 2026-09-29. 九州大学大学院農学研究院

バージョン：

権利関係：



九州に生息する希少淡水魚類の種特異的環境 DNA 検出系の確立

鬼倉徳雄*・栗田喜久・梅村啓太郎¹・永江葉奈¹・外西拓斗¹・柞磨佑紀¹・中塚宇宙¹・
程 榮添¹・十河雅樹¹・大鷲優紀¹・國崎紗弥¹・鈴木規慈^{2,3}・久保 優⁴

九州大学大学院農学研究院資源生物科学部門動物・海洋生物科学講座アクアフィールド科学研究室
(2026 年 4 月 15 日受付, 2026 年 5 月 15 日受理)

Establishment of a species-specific environmental DNA analysis method for threatened freshwater fishes inhabiting Kyushu

Norio ONIKURA*, Yoshihisa KURITA, Keitaro UMEMURA¹, Kanna NAGAE¹,
Takuto HOKANISHI¹, Yuuki TARUMA¹, Hiroshi NAKATSUKA¹,
Letian CHENG¹, Masaki SOGOU¹, Yuuki OWASHI¹, Saya KUNISAKI¹,
Noriyasu SUZUKI^{2,3} and Suguru KUBO⁴

Fishery Research Laboratory, Kyushu University, 4-46-24 Tsuyazaki, Fukuoka 811-3304, Japan

はじめに

近年、環境水を分析して、そこに生息する生物相や
特定種の生息量を推定する環境 DNA 分析が頻繁に行
われるようになってきた (乾, 2022)。漁具等を使用
しないため、希少な淡水魚を殺傷してしまうリスクも
小さく、絶滅のおそれのある野生動植物の種の保存に
関する法律 (通称「種の保存法」) に基づき、捕獲や
殺傷が禁止されている国内希少野生動植物種の生息状
況の調査には優れると考えられる。九州に生息する純
淡水魚のうち、セボシタビラ *Acheilognathus tabira*
nakamurae (以後、セボシと称す) とハカタスジシマ
ドジョウ *Cobitis striata hakataensis* (以後、ハカタスジ)
が国内希少野生動植物種に、カワバタモロコ
Hemigrammocypripis neglectus (以後、カワバタ) が特定
第二種国内希少野生動植物種に指定されており (環境

省, 2025), これらの魚種を対象とした環境 DNA 分析
法は、今後、ニーズが高まるだろう。また、絶滅危惧
IA 類のニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus*
(以後、ニチバラ) は、九州でも外来近縁亜種タイリ
クバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* (以後、タイバ
ラ) との交雑が深刻化し始めており (鬼倉, 2026)、
純系集団の生息地探索や外来近縁亜種の侵入を監視す
る手法として環境 DNA 検出系の確立が急がれる。当
研究室では、保全上の緊急性が高いこれらの魚種につ
いて、種特異的プライマー・プローブを使った環境
DNA 分析手法を開発したので、ここにとりまとめる。

なお、本研究の一部は、有明海流入河川流域を対象
とした減災と淡水生態系保全の両立プロジェクト (The
Coca-Cola Foundation の助成)、科研費学術変革領域 A
(21H05181) および環境省・(独) 環境再生保全機構
の環境研究総合推進費 (JPMEERF 20254003) の中で

¹九州大学大学院生物資源環境科学府資源生物科学専攻動物・海洋生物科学教育コースアクアフィールド科学研究室

²環境省九州地方環境事務所福岡事務所

³環境省沖縄奄美自然環境事務所石垣自然保護官事務所

⁴WWF ジャパン自然保護室

¹Laboratory of Aquatic Field Science, Division of Animal and Marine Bioresource Sciences, Department of
Bioresource Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 811-3304, Japan

²Fukuoka Office, Kyushu Regional Environment Office, Ministry of the Environment, Fukuoka 812-0013, Japan

³Ishigaki Ranger Office, Okinawa-Amami Nature Environment Office, Ministry of the Environment, Okinawa 907-
0011, Japan

⁴Conservation Division, WWF Japan, Tokyo 108-0073, Japan

*Corresponding Author (E-mail: onikura@agr.kyushu-u.ac.jp)

行われた。また、環境省業務の一環として実施したデータを含んでいる。熊本県立玉名高等学校の科学部の方々、市民団体の方々、東与賀地区のプロジェクト参加者の皆様、当時、アクアフィールド科学研究室に在籍した多くの学生、大学院生に採水等で協力を頂いた。厚く御礼申し上げたい。

材 料 と 方 法

1. プライマー・プローブの設計および特異性の確認

環境DNAを用いて特定の種を調査するには、他種のDNAによる誤検出が起こらない検出系を設計しなければならない(百富ら, 2023)。本研究ではPCR産物の検出に、標的配列に特異的に結合するプローブを用いるリアルタイムPCRによる検出系を確立した(高原ら, 2016)。まず、アメリカ国立生物工学情報センター(NCBI)のデータベースから対象種とその近縁種のミトコンドリアDNA(以後, mtDNA)のcytochrome *b*領域(タイバラについてはミトコンドリアのNADH dehydrogenase subunit 1 遺伝子)の配列情報を収集した(表1)。それらをMEGA7(Kumar *et al.*, 2016)でアラインメントし、対象種に特異的となるように、プライマーとプローブを設計した。ハカタ

スジについては、近縁亜種のオンガスジシマドジョウ *Cobitis striata fuchigamii* (以後, オンガスジ)とチュウガタスジシマドジョウ *Cobitis striata striata* (以後, チュウガタスジ)との配列の相違が乏しかったため、亜種特異的な設計とした。また、カワバタについては、本州に生息する個体で検出系が確立されているが(福岡ら, 2016)、本州産と九州産の個体群に亜種レベルの遺伝的差異が見られるため(Watanabe *et al.*, 2014)、九州産の個体群の配列情報で新たに設計した。

その後、対象種および近縁種の抽出DNAを用いて、PCR(T100™ Thermal Cycler, BIO-RAD)を行い、そのPCR産物について電気泳動装置(Mupid®-exU, タカラバイオ)を使って100 V、20分の電気泳動を行い、特異性を確認した。近縁他種/亜種にも増幅が認められた場合は、抽出DNAあるいは飼育水を使って、後述するリアルタイムPCRで検出できないことを確認した。

2. 飼育水の採水

セボシ、ハカタスジについては、既知生息地が河川や流水型の農業用水路であるため、流水型の小型の水路に水を流し、そこに個体を入れて、15～20分間泳

表1 種特異的な配列の探索に用いたデータ一覧(NCBIのアクセッションナンバー)

対象種	アクセッションナンバー
セボシタビラ	AB366471, AB620154, AB620146, KF410744
近縁種	カネヒラ(AB109001, AB366466, AB620135, OP314890), イチモンジタナゴ(AB109003, AB109008, AB239347, KF410714), ヤリタナゴ(LC465040), アブラボテ(AB907154), カゼトゲタナゴ(AB366485), ニッポンバラタナゴ(LC792278), タイリクバラタナゴ(LC757003)
ハカタスジシマドジョウ	LC699040, LC829482, LC829486, LC829594
近縁種	オンガスジシマドジョウ(LC533346, LC829477-LC829480), チュウガタスジシマドジョウ(MK023481, LC829489), アリアケスジシマドジョウ(AB162952), ヤマトシマドジョウ(LC387514-LC387516, AB039348, AB819608-AB819610), インドジョウ(AB039340), ドジョウ(AB473406, AB473407)
カワバタモロコ	九州産(AB907333, AB907334, AB907336, LC533950), 本州産(AB354657, AB354659, AB907326, AB907319, LC098425, LC556090)
近縁種	ハス(LC098423), オイカワ(AB198972), カワムツ(LC633704), ヌマムツ(LC633722), ワタカ(LC098433)
ニッポンバラタナゴ	AB366504, AB366506, AB366507, AB769511-AB769515
近縁種	タイリクバラタナゴ(KF410776, AB109009, AB769516-AB769519, AB620133), カゼトゲタナゴ(AB109007, AB366484, AB366485), ヤリタナゴ(AB108851, AB108870, AB108873, AB108876), アブラボテ(AB108913, AB108927, AB108932, AB108933), セボシタビラ(AB366471, KF410744), カネヒラ(AB620135, AB109001), イチモンジタナゴ(KF410714, AB239347)
タイリクバラタナゴ	AB292619, AB769507-AB769510
近縁種	ニッポンバラタナゴ(AB262802, AB769503-AB769506, LC201737), カゼトゲタナゴ(AB543627-AB543630), セボシタビラ(AP013347, KF410744), カネヒラ(AB620135, AB366466), イチモンジタナゴ(KF410714, AB239347)

がせ、その水を採水した。流速は10cm/s前後、流量を $0.4 \sim 0.5 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$ 前後とし、セボシは1, 2, 4, 8, 16個体（総重量1.8～29.4g）の遊泳で各1回、ハカタスジは1, 2, 4個体（1.5～9.0g）の遊泳で2回行った。

カワバタについては、既知生息地が止水的な農業水路やため池であるため、水槽に魚を入れて2時間遊泳させた。13.5Lに1, 2, 4個体を泳がせたケースと27L, 54Lに1個体を泳がせたケースの計5パターンで採水した。

ニチバラとタイバラについても止水的な環境を好むため、水槽に魚を入れて12時間遊泳させた。10Lの水にニチバラ10個体のケース、タイバラ10個体のケース、それぞれ5個体ずつを入れたケースで、採水した。

いずれのケースも、採水量は500mLで、汚染防止のため、採水時は手袋を着用し、採水ごとに手袋を交換した。また、コンタミネーションの有無を確認するため、ネガティブコントロールとして蒸留水を準備した。すべてのサンプルに塩化ベンザルコニウムを最終濃度0.01%になるように加えた。

3. 自然水域からの採水

セボシについては、2021～2025年にかけて、筑後川水系の延べ136地点、矢部川水系10地点、菊池川水系97地点、緑川水系8地点の採水サンプルを分析した。これらのサンプルには、環境省から依頼されて分析した地点、WWFジャパン、玉名高校および市民団体との合同モニタリングで採水した地点を含んでいる。ハカタスジシマドジョウについては多々良川水系内の既知生息地5地点で、産卵期（2020年6月）と非産卵期（2019年11月27日）に採水した。

カワバタ、ニチバラ、タイバラについては、佐賀県佐賀市東与賀地区で市民参加型のモニタリングをWWFジャパンと共同して実施しており、2022年6月に20地点、2023年6月に16地点、2024年7月に17地点、2025年7月に18地点で採水した。

1地点当たりの採水本数は原則3本で、1本あたりの採水量は500mLとした。汚染防止のため、採水時は手袋を着用し、地点ごとに手袋を交換した。また、コンタミネーションの有無を確認するため、ネガティブコントロールとして蒸留水、水道水、もしくは市販の天然水を1本準備した。すべてのサンプルに塩化ベンザルコニウムを最終濃度0.01%になるように加え、クーラーボックスで氷冷しながら持ち帰った。

4. 濾過、DNA抽出および環境DNA分析

採水サンプルは、可能な限り、その日のうちにGF/Fガラスフィルター（pore size c. 0.7 μm , Cytiva）で濾過した。フィルターからのDNAの抽出には、DNA抽出キット（DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen）を使用し、抽出DNA溶液は-20℃で保管した。手順の詳細は、環境DNA調査・実験マニュアル（環境DNA学会, 2020）に準拠した。

リアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems® StepOnePlus™, Thermo Fisher Scientific, またはThermal Cycler Dice® Real Time System III, タカラバイオ）を用いて定量PCRを行った。先述した各種のプライマー・プローブセットに加え、qPCRマスターミックス（Probe qPCR Mix, with UNG, タカラバイオ）を使用した。定量化のための検量線は、PCR毎に各種の人工DNAの希釈系列から作成した。希釈系列および超純水を用いたネガティブコントロールは各3反復、採水サンプルは各4反復PCRを行った。なお、増幅が確認された野外サンプルのPCR産物の一部は、サンガー法によるシーケンシング（FASMAC）にて配列決定を行った。塩基配列相同性検索を用いてホモロジー検索を行い、分析対象種であることを確認している。

各種の定量PCRの反応条件を以下に示す。

セボシ：95℃で30秒の後、95℃で5秒、60℃で30秒の2ステップを55サイクル

ハカタスジ：95℃で20秒の後、95℃で15秒、52℃で15秒、72℃で15秒からなるサイクルを55サイクル

カワバタ：95℃で15秒の後、95℃で5秒、55℃で15秒、72℃で15秒からなるサイクルを55サイクル

ニチバラおよびタイバラ：95℃で20秒の後、95℃で15秒、55℃で20秒、72℃で20秒からなるサイクルを55サイクル

結 果

1. 各種のプライマー・プローブの配列情報

フォワードプライマー（F）、リバースプライマー（R）、プローブ（P）の配列情報を以下に示す。

セボシ（増幅領域長132bp）

Atn- CytB -F : 5'-CGAAACTTACACGCCAATGGC-3'
Atn- CytB -R : 5'-GACGAGAAGGAGAAGAACTACGC-3'
Atn- CytB -P : 5'-FAM-ACATGCACATCGCCGCGGA
CTCTA-TAMRA-3'

ハカタスジ (増幅領域長 166bp)

Csh- CytB -F: 5'-TATTATTGCCGCCGCGCCACTATTC-3'
Csh- CytB -R: 5'-AAGTGAAGTTAATGCTAAAAGGACT-3'
Csh- CytB -P: 5'-FAM-GTATAAAGACTTACTAGGCTT-MGBEQ-3'

カワバタ (増幅領域長 136bp)

Hra-CytB-F: 5'-CACCCCAGCAAACCCCTA-3')
Hra-CytB-R: 5'-GAGCACTAGAAATAGAAAATAGTAATGCA-3')
Hra-CytB-P: 5'-FAM-TGATCGTAGGATAGCGTAGGCA AATAGG-TAMRA-3')

ニチバラ (増幅領域長 196bp)

Rok-CytB-F: 5'-ACATCTGCCGTGATGTAACTAT-3'
Rok-CytB-R: 5'-AGGACGTAGCCTACGAAGGCGG-3'
Rok-CytB-P: 5'-FAM-TTGGAGTTGTTCTCCTTC-MGBEQ-3'

タイバラ (増幅領域長 126bp)

Roo-ND1-F: 5'-CCAAACGATCTCTTACGAAG-3'
Roo-ND1-R: 5'-CATGCCGGGATTAATAATCAG-3'
Roo-ND1-P: 5'-HEX-CTCCTCTCCATTGTTGTT-TAMRA-3'

2. 種特異性の確認

抽出DNAを用いたPCRによる特異性の検証試験の結果、セボシについては、対象種で増幅が確認できたものの、イチモンジタナゴ *Acheilognathus cyanostigma*、ヤリタナゴ *Tanakia lanceolata*、ニッポンバラタナゴで微量の増幅が認められた。ハカタスジについては、対象種および同じ亜種のオンガスジ、チュウガタスジに加えて、アリアケスジシマドジョウ *Cobitis kaibarai* で増幅が確認され、またヤマトシマドジョウ *Cobitis matsubarae* とインドジョウ *Cobitis takatsuensis* で微量の増幅があった。カワバタについては、対象種に加えてヌマムツ *Nipponocypris sieboldii*、ワタカ *Ischikauia steenackeri* でも増幅が確認された。ニチバラとタイバラのプライマーについては、九州に生息する在来タナゴ6種で確認したところ、対象種のみが増幅が確認された。近縁他種で増幅が認められたものについては、それらの抽出DNAあるいは飼育水サンプルからの抽出DNAを使い、リアルタイムPCRを行ったところ、他魚種で蛍光が認められず、対象種のみが高い蛍光強度を示した。

3. 流水水路、飼育水槽の環境DNA

流水水路で実験したセボシとハカタスジについて、遊泳させた個体の総体重と環境DNA濃度との関係性を調べたところ、前者は4.1-75.4copies/mL、後者は2.9-205copies/mLの値を示し、いずれも直線的な回帰式が得られた (図1)。水槽内で2時間泳がせたカワバタについては、生物量 (水槽1Lあたりの総体重) と環境DNA量との関係性を調べ、148-8680copies/mLの値を示し、直線回帰した (図2)。

バラタナゴ類については、ニチバラのみ入れた水槽からはニチバラの環境DNAが、タイバラのみ入れた水槽からはタイバラの環境DNAが、両亜種を入れた水槽からはニチバラとタイバラの環境DNAの両方が検出された (表2)。

4. 環境水中の環境DNA

国内希少野生動植物種のセボシとハカタスジについ

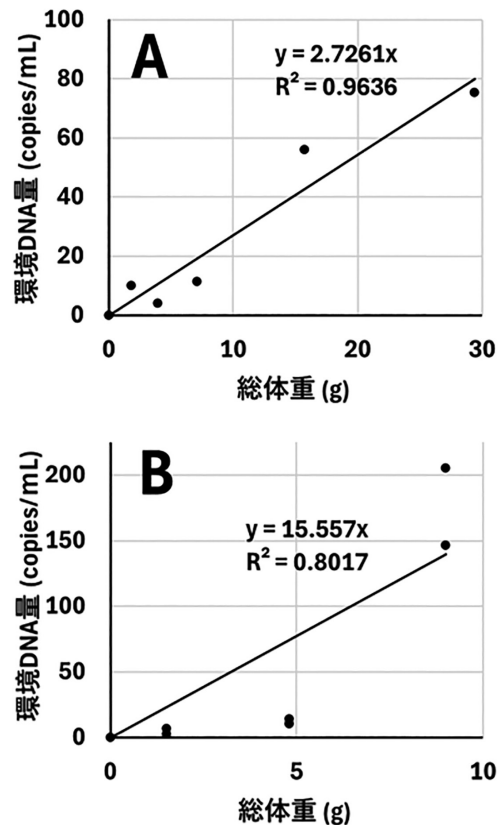


図1 流水条件下でのセボシタナゴ (A) とハカタスジシマドジョウ (B) の環境DNA濃度と魚体重の関係。

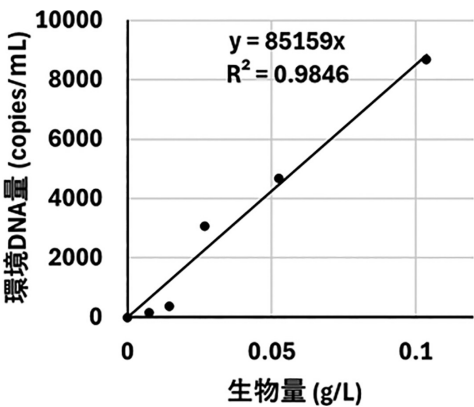


図2 水槽下でのカワバタモロコの環境DNA濃度と生物量（体重／飼育水量）の関係。

表2 ニッポンバラタナゴ（Rok）のみ、タイリクバラタナゴ（Roo）のみ、および両亜種を混泳させた飼育水から検出された環境DNA濃度

種 (水槽内の個体数)	環境DNA濃度 (copies/mL, 平均 ± 標準偏差)	
	Rok	Roo
Rok (10)	107925 ± 16286	0
Roo (10)	0	107925 ± 16286
Rok (5), Roo (5)	73304 ± 29071	44090 ± 16629

ては、希少淡水魚の密漁等を防ぐために、詳細な位置情報を示さないが、前者については緑川流域の2地点、菊池川流域の7地点、矢部川流域の1地点、筑後川流域の延べ16地点で環境DNAを検出できた（表3）。後者については、既知生息地で環境DNAを検出することができ、また産卵期の検出地点数が非産卵期よりも多かった（表3）。

佐賀市東与賀地区で年1回行っている希少魚の環境DNAモニタリングでは、カワバタのDNAが2022年と2023年に、ニチバラのDNAは2022-2025年のすべてで、タイバラDNAは2022年、2023年および2024年に検出された（表4）。

考 察

1. 種の保存法指定種の環境DNA検出系

今回の研究で、九州北部の在来希少魚のうち、国内希少野生動植物種セボシ、ハカタスジおよび特定第二種国内希少野生動植物種カワバタの環境DNA検出系が確立された。セボシのプライマー・プローブは、九州に生息する他のタナゴ類による誤検出が起きないこ

表3 天然水域からのセボシタビラとハカタスジシマドジョウの環境DNA検出実績

種名および調査した水系	延べ検出数 / 延べ地点数
1. セボシタビラ	
筑後川水系	16/136
矢部川水系	1/10
菊池川水系	7/97
緑川水系	2/8
2. ハカタスジシマドジョウ	
多々良川水系	産卵期 4/5 非産卵期 1/5

表4 佐賀市東与賀地区のクリークでのカワバタモロコ、ニッポンバラタナゴおよびタイリクバラタナゴの環境DNA検出実績

調査年月と種名	検出数 / 地点数	環境DNA量(copies/mL) 平均 ± 標準偏差
1. カワバタモロコ		
2022年6月	4/20	8.7 ± 12.5
2023年6月	3/16	4.4 ± 5.0
2024年7月*	0/17	—
2025年7月	0/18	—
2. ニッポンバラタナゴ		
2022年6月	18/20	6245 ± 2112
2023年6月	15/16	12088 ± 22915
2024年7月*	9/17	78.7 ± 109
2025年7月	14/18	1236 ± 4248
3. タイリクバラタナゴ		
2022年6月	1/20	52.4
2023年6月	2/16	41.2 ± 26.9
2024年7月*	3/17	3.7 ± 5.4
2025年7月	0/18	—

* 冷凍庫の保管トラブルがあったため参考データ

とを確認したが、九州以外のタナゴについては確認していない。BLAST検索でPercent Identity (PI) と Query Coverage (QC) がともに90%を超えた種が、Fプライマーで4種、Rプライマーで3種、プローブで6種確認されたが、すべてで高いPI、QCを示した種はなかった。東日本に生息するキタノアカヒレタビラ *Acheilognathus tabira tohokuensis* と韓国の *A. signifier* は、Rプライマーとプローブの両方の検索でヒットしたので、検出される可能性があることを注記しておく。ハカタスジの検出系については、亜種特異的であることに注意を要する。同じ分析法で検出可能な魚種は、九州ではオンガスジとチュウガタスジで、これらは自然分布域が重複しないため (Nagae *et al.*, 2025)、それぞ

れの種の生息域で、その生息状況を調査できる一方、外来近縁亜種の監視には不適なケースも想定される（例えば、オナガスジやチュウガタスジが、ハカタスジの生息地に放流されてしまった場合など）。

セボシとハカタスジは流水水路試験で、カワバタは飼育水サンプルで、いずれも体重や生物量と環境DNA濃度との間に正の回帰が認められており（図1と2）、将来的には自然水域での量的評価への展開を期待している。実際、アユ*Plecoglossus altivelis altivelis*では河川での環境DNA濃度と生物量との関係性が示されている（乾, 2022）。

2. ニチバラ, タイバラの環境DNA検出系

今回の研究ではプライマーを設計するために、近縁の他種を含めて、DNAの配列情報が充実している必要があり、mtDNAで環境DNAの検出系を開発した。しかし母系遺伝のmtDNAでは交雑集団を過小評価してしまう可能性がある。実際に、野生個体のDNAを分析した研究では、mtDNAよりも核DNAの方が雑種判別に優れる結果を示している（鬼倉, 2026）。核DNAの配列に基づいた環境DNA分析系の開発が急がれる。

ニチバラとタイバラの両亜種を混泳させた飼育水から、両方の環境DNAを高濃度で検出できた（表2）。この結果は、一方が他方のDNA増幅の阻害要因にはならないことを示している。先に述べた新たな検出系の開発までは、本検出系をスクリーニングと位置づけ、タイバラ環境DNAが検出された場合は個体を採集して、核DNA配列に基づく簡易雑種判別法（Umemura et al., 2020）で判定するのが良いだろう。

3. 自然水域への適用

セボシについては、自然水域からの環境DNAの検出地点数は1割程度と少なかったが（表3）、今回の採水地点には、既知生息地以外に、環境省から依頼されて分析した「かつての生息河川」を多く含んでいる。それが検出の割合が少なかった大きな要因である一方、昔に比べて分布域が縮小していることを示す結果でもある。

ハカタスジシマドジョウについては、既知生息地で採水を行い、産卵期、非産卵期ともに検出できた（表3）。ただし、砂にもぐる生態特性のせいか、非産卵期の検出地点数が産卵期に比べて少なかった。本分析法で生息状況を調べる場合、産卵期に行う方が良いだろう。

佐賀市東与賀の環境DNA分析を使ったモニタリン

グにおいて、カワバタの環境DNAの検出地点数は少なく、また、検出された場合の濃度が低い（表4）、これは感度の問題ではなく、その生息量が極めて少ないことに起因している。調査地は明治時代の海岸堤防（大串, 2004）よりも海側に位置しており、100～150年前の干拓で創出されたクリーク地帯で、淡水生態系として成立してからの歴史が浅い。本種は、干拓地にも出現する代表的な在来種のひとつであるが、ニチバラに比べるとその出現頻度は低く（鬼倉・中島, 2016）、この地域への進入と定着がニチバラほど進んでいないのかもしれない。

東与賀のバラタナゴについては、ニチバラの環境DNA濃度が高く、タイバラは検出されても低濃度であった（表4）。そして、この調査地内で採集された個体のmtDNAと核DNA分析で、タイバラが検出されたことはない。ただし、東与賀を含む嘉瀬川流域では現在進行形でタイバラが分布を拡大させており（鬼倉, 2026）、最下流に位置する東与賀にもいずれ侵入してくると予想される。飼育下での系統保存およびビोटープなどでの生息域内保全を提唱したい。

要 約

九州に生息する純淡水魚のうち、国内希少野生動物種のセボシタビラ、ハカタスジシマドジョウ、同特定第二種のカワバタモロコ、そして、外来近縁亜種タイリクバラタナゴとの交雑で急激に絶滅リスクが高まっているニッポンバラタナゴについて、種特異的な環境DNA検出系を確立した。ミトコンドリアDNAのチトクロームb領域で、セボシタビラは増幅領域長132bp、ハカタスジシマドジョウは166bp、カワバタモロコは136bp、ニッポンバラタナゴは196bpのプライマーセットおよびその増幅領域を認識するプローブを設計できた。タイリクバラタナゴについてはミトコンドリアのNADH dehydrogenase subunit 1遺伝子で、増幅領域長126bpのプライマー・プローブセットを設計できた。いずれの検出系も、飼育水や既知生息地の採水サンプルでも検出できることが確認された。

キ ー ワ ー ド

環境DNA, 種の保存法, 定量PCR

文 献

福岡有紗・高原輝彦・松本宗弘・丑丸敦史・源 利文
2016 在来希少種カワバタモロコの環境DNAによる
検出系の確立. 日本生態学会誌, 66: 613-620

- 乾 隆帝 2022 4.6環境DNA分析を用いた生物調査.
皆川ら編：社会基盤と生態系保全の基礎と手法.
朝倉書店，東京，83-87頁
- 環境DNA学会 2020 環境DNA調査・実験マニュアル
Ver. 2.2 : https://ednasociety.org/wp-content/uploads/2022/06/eDNA_manual_ver2_2.pdf (参照2020-5-20)
- 環境省 2025 国内希少野生動植物種一覧 : <https://www.env.go.jp/nature/kisho/domestic/list.html> (参照2025-12-10)
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura 2016 MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol.Evol.*, **33**: 1870-1874
- 百富修平・柞磨佑紀・梅村啓太郎・栗田喜久・鬼倉徳雄 2023 絶滅危惧種カゼトゲタナゴの環境DNA分析を用いた検出法の確立. *Ichthy.*, **28**: 1-5
- Nagae, K., Y. Kurita, D. Ando and N. Onikura 2025 Population structure of *Cobitis striata* complex (Cypriniformes, Cobitidae) based on the mitochondrial DNA in Northern Kyushu, Japan. *Ichthyol. Res.*, **73**, inpress. DOI: 10.1007/s10228-025-01042-x
- 鬼倉徳雄 2026 第5章 平野のクリーク網と魚の多様性. 荒谷ら編：第3巻『ゆらぐ水環境をまもる：水環境の変化と保全』. 九州大学出版会，福岡，印刷中
- 鬼倉徳雄・中島 淳 2016 第10章 特殊な人工水路，有明海沿岸域のクリーク網—人間が生み出した魚類生息環境の多様性. 猿渡編：生きざまの魚類学魚の一生を科学する. 東海大学出版部，平塚，171-187頁
- 大串浩一郎 2004 有明海湾奥の石積み干拓堤防 東与賀地区大掘堤防・授産掘堤防. 土木学会誌，**89**: 60-61
- 高原輝彦・山中裕樹・源 利文・土井秀幸・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
- Umemura, K., Y. Kurita and N. Onikura 2020 Novel genotyping system for distinguishing among native, nonnative and admixed individuals of rosy bitterling *Rhodeus ocellatus* subspecies. *J. Fish Biol.*, **96**:1516-1522
- Watanabe, K., S. Mori, T. Tanaka, N. Kanagawa, T. Itai, J.Kitamura, N. Suzuki, K. Tominaga, R. Kakioka, R. Tabata, T. Abe, Y. Tashiro, Y. Hashimoto, J. Nakajima and N. Onikura 2014 Genetic population structure of *Hemigrammocypris rasborella* (Cyprinidae) inferred from mtDNA sequences. *Ichthyol. Res.*, **61**: 352-360

Summary

Species-specific environmental DNA detection systems have been established for *Acheilognathus tabira nakamurae* (Atn), *Cobitis striata hakataensis* (Csh), *Hemigrammocypris neglecta* (Hn), *Rhodeus ocellatus kurumeus* (Rok) and *Rhodeus ocellatus kurumeus* (Roo). For Roo, primer-probe sets were designed using the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1 gene, while for the others, the mitochondrial DNA cytochrome b region was used. All detection systems were confirmed to function with both rearing water and water samples from their habitats.

Key words : eDNA, specific primer, quantitative PCR

