

[1] 研究目的

お風呂に入るとその浴槽のお湯の中には目に見えない皮膚片や髪の毛等が残り、これらに含まれる細胞には生物の設計図であるDNAが含まれている。自然環境(海・河川・土壌等)中でも同様なことが起き、そこに生息する魚や鳥等を始めとする生物のDNAが目には見えないかたちで自然環境中に含まれていることがある。

このように自然環境中に存在するDNAを「環境DNA」といい、環境DNAを調査研究することは、絶滅危惧種等の生息状況だけでなく生物保護や漁業等の応用に期待が注目されている。

本校科学探究部では、2017年10月から京都産業大学生命科学部先端生命科学科高橋純一准教授と地元の淀川で環境DNA分析を用いた生物相(魚種)の網羅的調査や、2020年3月から富山大学学術研究部理学系山崎裕治准教授と富山県氷見市内の仏生寺川・万尾川水系で環境DNA分析を用いた生物相(魚種)の網羅的調査について共同研究し、クラブ活動を通じた教育・研究実践が環境DNA学会では「高校生らしい活動」として評価いただけてきた。

これまでの科学探究部の教育・研究実践は、文部科学省の「高大接続改革」や経済産業省の「未来の教室」にも関連し、生徒たちにワクワク感を抱かせる「学びの実体験」の提供は、単に理科が受験科目としての捉え方だけでなく学問としての重要性を教員が再認識するきっかけに繋がっている。

このような背景がある中、希少種のムギツク(淀川)及びニッポンバラタナゴ(万尾川)に着目し、種特異的調査(PCR法及び電気泳動法)で生息マップを作成し生物保全の貢献を検討した。

そこで、下記のとおり、本校単独では実施できない実験については、大学や高校に出向きご支援をいただいていたが、新型コロナの影響により大学や高校に出向くことができなくなった。

	ムギツク(淀川) 大阪府レッドリスト 絶滅危惧Ⅱ類	ニッポンバラタナゴ(万尾川) 環境省レッドリスト 絶滅危惧IA類
各個体から直接DNA採取	◎	◎
近縁種からの直接DNA採取	◎ * コイ科の魚種	◎ * タイリクバラタナゴ
各個体のプライマー作成	○ * プライマー候補を設計し、 園芸高校の協力で外注により作成した	◎ * プライマー設計は論文引用し、 外注により作成した
PCR法及び電気泳動法 ポジティブコントロール	○ * 園芸高校の協力により成功	×
PCR法及び電気泳動法 ネガティブコントロール	×	×

◎：本校単独で実施、○：一部協力を得て実施、×：未実施

本研究では、貴機構の助成金をいただきながら、本校単独で種特異的調査(PCR法及び電気泳動法)にかかる実験環境を整備することを目的とする。

## [ 2 ] 研究の内容・方法

### ・ムギツク(淀川)

滅菌水、KOD FX NEO(TOYOBO)、アガロースゲル、Atlas ClearSight Gold DNA Stain(funakoshi) 、TAE buffer、ムギツクの識別プライマーF及びR、ムギツク個体、マリンピア神戸さかなの学校(2021年3月)及び海遊館(2022年3月)のムギツク飼育水、淀川(2022年7月)及び芥川(2022年8月)から抽出したDNAサンプルを用いて種特異的調査を行い、ムギツクの識別プライマーが正常に機能するか確認(結果Ⅰ)を行った。

なお、PCR法のアニーリング温度やサイクル数等の設定条件は、株式会社ニッポン・ジーンのPCRプロトコルを参考にした。

### ・ニッポンバラタナゴ(万尾川)

滅菌水、GoTaq Master Mixes(Promega)、アガロースゲル、Atlas ClearSight Gold DNA Stain(funakoshi) 、TAE buffer、ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの識別プライマーF及びR、ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴ個体、ニッポンバラタナゴ飼育水から抽出したDNAサンプルを用いて種特異的調査を行い、ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの識別プライマーが正常に機能するか確認(結果Ⅱ)を行った。

なお、PCR法のアニーリング温度やサイクル数等の設定条件は、株式会社ニッポン・ジーンのPCRプロトコルを参考にした。

次に、滅菌水、KOD FX NEO(TOYOBO)、アガロースゲル、Atlas ClearSight Gold DNA Stain(funakoshi) 、TAE buffer、ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの識別プライマーF及びR、万尾川②(2022年5月～7月)から抽出したDNAサンプルを用いて種特異的調査を行い、ニッポンバラタナゴ及びタイリクバラタナゴの識別プライマーが正常に機能するか確認(結果Ⅲ)を行った。

なお、PCR法のアニーリング温度やサイクル数等の設定条件は、Umemura et al.(2020)を参考にした。

