

## [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・土壤等)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」として評価いただってきた。

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。

### [3] 結論・考察

#### ・ムギツク(淀川)

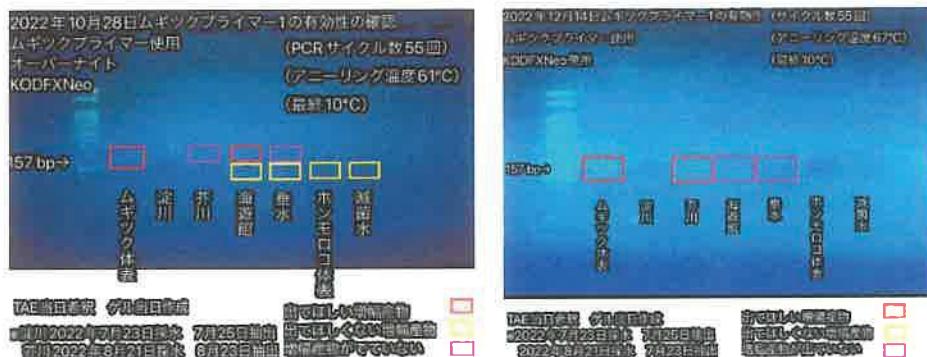
ムギツクの識別プライマーが正常に機能するか否か種特異的調査を行った結果、個体の体表及び海遊館の飼育水から種特異的増幅産物が確認されたため、各識別プライマーが正常に機能していることが分かった。

しかし、マリンピア神戸さかなの学校(垂水)の飼育水からは種特異的増幅産物が確認されなかった。

この原因について、当初は種特異的増幅産物が確認されていたものの、長期間の実験の繰返しによるDNAの劣化が考えられる。

その後、ムギツクが生息する芥川から種特異的増幅産物が確認された。

### 【結果Ⅰ】



#### ・ニッポンバラタナゴ(万尾川)

万尾川の種特異的調査前に、Umemura et al.(2020)による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否か種特異的調査を行った結果、各個体の体表及び鰭、ニッポンバラタナゴの飼育水から種特異的増幅産物が確認されたため、各識別プライマーが正常に機能していることが分かった。

しかし、ニッポンバラタナゴが生息する可能性のある万尾川から種特異的増幅産物は確認されなかった。

### 【結果Ⅱ】



### 【結果Ⅲ】



上記の結果で、ニッポンバラタナゴをニチバラ、タイリクバラタナゴをタイバラ、ネガティブコントロール(滅菌水)をネガコンと表記する。

以上の結果から、本校単独で行ったムギツク(淀川)及びニッポンバラタナゴ(万尾川)の種特異的調査については、一定の成果を得ることができた。引き続き生息マップの作成に挑みながら、希少種の保全に貢献していきたい。

また、これらの研究結果を客観的に評価頂くためにも、大阪府教育委員会が主催する大阪府学生科学賞等の出展や、学会での発表も視野に入れて活動することで外部評価を得ていきたい。