第１０章　微生物に注目して海の環境を調べよう！

「環境 DNA でさぐる海の環境調査」

●対象年齢：小学生～大人　●実施場所：野外　●活動に適した時期：いつでも
●所要時間：1地点 90 分程度
●実施形態：2人以上
●海洋教育の 12 分野：A 生活・健康安全、E. 地球、F. 物質、G 生命、H 環境・循環、K 管理（海を知る・海を利用する・海を守る）

概要

地球にすむすべての生物は、遺伝物質として DNA をもっている。DNA は、水中、土壌中、空気中など、あらゆる環境中に存在している。この環境中にある生物由来の DNA のことを、**「環境 DNA」**と呼ぶ。

環境 DNA 解析用の採水サンプリングで用いた道具一式
写真提供：産業技術総合研究所地質調査総合センター
（以下全て同様）

環境 DNA は環境中にあふれるほど存在していて、水や土を採取し分析することで、その環境に希少種がいるのか・いないのか、いるのであればどのくらいいるのかといったことがわかる。また、技術の進歩により、環境中にどのような生物がいるのかをまとめて検出することもできるようになってきた。

天草海部では、2022 年、産業技術総合研究所地質調査総合センター「環境調和型産業技術研究ラボ（E-Code）」の井口亮氏、水山克氏のお声かけで、天草での環境 DNA 調査に協力することとなった。この調査では、野外においてその組成がほとんど明らかになっていない、微生物叢（びせいぶつそう：細菌・古細菌や真菌、微小な真核生物などの集団のこと、マイクロバイームともいう）に着目している。微生物は環境の変化に最も敏感に反応すると予想されるため、場所による環境の違いが見やすいことから、**「環境を知るための代替品」**になると考えられる。環境 DNA 調査を実施することで、天草の海の生物多様性が明らかになることが期待される。

ねらい

・環境 DNA の採水とろ過を体験することで、海の環境に関心をもつようになる。
・環境 DNA 調査に参加することで、最先端の技術への理解を深める。
・他地域と比較し、また継続的にモニタリングすることで、天草の持続的な海の利用方法を検討できるようになる。

学びのポイント

・環境 DNA 調査から、生物多様性を明らかにする調査について理解を深める。
・海洋環境を調査し、継続してモニタリングすることの重要性に気づく。
・調査結果をもとに、海を持続的に利用する方策を考える。

2022 年の天草調査で得られた各地点の微生物組成。縦軸は各微生物種の割合、横軸は調査地点を示す。
データ提供：産業技術総合研究所地質調査総合センター

準備するもの

① 採水に必要なもの（産業技術総合研究所で準備）
- ・ロープ付きバケツ
- ・ステリベクス（海水をろ過するカートリッジフィルタのこと、基本は 0.22um、一部 0.45um※）
- ・ステリベクス蓋（上下 2 箇所分）
- ・シリンジ（ろ過する注射器のこと）
- ・マッキーペン（日付と場所を記録）
- ・手袋
- ・カウンター
- ・50ml チューブ
- ・耐水紙
- ・はさみ
- ・キムタオル（ペーパータオルでも OK）
- ・袋詰一式：RNAlater 2ml 入 2ml チューブ
- ・ステリベクス蓋（上下 2 箇所分）・スポイト小
- ・泡洗浄ハイター ・精製水 ・ゴミ袋（ドラッグストアでも買える）
- ・野帳 ・保冷剤 ・保冷バッグ ・パラフィルム（予備）

ロープ付きのバケツを用いて採水をしているところ

進め方

① 準備

1. 採水をする調査地を決める。調査地は、安全に採水ができる場所を選び、環境 DNA が人為的に汚染されている可能性のある場所（水揚げ漁港など）は避ける。
2. 調査地にて、最初に汚染防止のため手袋をする。
3. ステリベクス（カートリッジフィルタ）を開け、ステリベクスと袋にマッキーペンで日付と場所を記入する。
4. 泡ハイターでロープ付きバケツを除染する。泡ハイターは残らないようにペーパータオルできれいに拭きとる。
5. 除染したバケツで海水を採取して離れた場所に捨て、バケツを洗う（バケツのリンス）。

採水前に、泡ハイターでバケツを除染する

海水ろ過後のステリベクスフィルターに RNAlater を入れる様子

② 採水とろ過

1. 初めに、栄養塩測定用の採水を行う。除染したバケツを海に投げ入れ、海水を採水する。50ml シリンジで水を 50ml 取り、ステリベクスでろ過する。これを 2 回繰り返して 100ml ろ過する。ろ過された水はチューブに入れ、冷蔵で保管する。
2. 次に、環境 DNA 用の採水を行う。除染したロープ付きバケツで海水を採取して、100ml ろ過する。これを 10 回繰り返して、最終的に 1L ろ過する（シリンジでステリベクスに 20 回水を通す。カウンターを使うといい）。※フィルターが詰まった場合は、そこで終了し、通した回数を袋にメモする。
3. ステリベクスから水を抜くために、シリンジで空気を何回か通す。うまく抜けると「プシュッ」という音がする。水が残っていると後の作業に影響するのでしっかり行う。
4. ステリベクスの下の穴に蓋をして、スポイト小で 2ml（1ml x 2 回）の RNAlater を注入する。ステリベクスの上の穴に蓋をして、ステリベクスの袋に入れる。※RNAlater は常温でも大丈夫だが、保冷剤などで冷やして持って帰るとよい。
5. バケツで水を採取し、温度と塩分濃度を測定する。
6. 泡ハイターでロープ先端とバケツ内部を洗浄し、5 分ほど置いて、ペーパータオルできれいに拭く。

7. 調査日の最後（1 日1回）に、ネガティブコントロールの採取を行う。バケツを除染した後、精製水で洗い、精製水を加えて 100ml 分のステリベクスろ過を実施する。再び精製水を入れて 50mlx2 回ステリベクスに通し、RNAlater を入れてネガティブコントロールとして保管する。

ネガティブコントロール採取の様子

8. 得られたサンプルを産業技術総合研究所に送り、次世代シーケンサーにかけることで結果が得られる。最後に、得られた結果を場所ごとや地域別に比較し、考察する。

指導のポイント

・環境 DNA 調査に一番重要なことは、コンタミネーション（汚染）が起こらないように気をつけること。手袋をつけて採水を行い、また除染のための泡ハイターが残らないよう注意する。
・サンプルには、採水日時・サイト名・水温、ろ過中につまった場合はろ過回数も記録する。
※（補足）環境 DNA を、微生物を含めて調査する場合には 0.22um、魚類など真核生物の組織片のみをターゲットとする場合に 0.45um を使用する。

●参考文献

源利文「環境 DNA 入門　ただよう遺伝子は何を語るか（岩波科学ライブラリー315）」岩波書店, 2022.
環境 DNA 学会企画, 土居秀幸, 近藤倫生編「環境 DNA：生態系の真の姿を読み解く」共立出版, 2021.
国立研究開発法人産業技術総合研究所「令和 4 年度沿岸域周辺の生物相に関する基礎研究―環境 DNA 解析による研究事例―実施報告書」, 2023.
環境省自然環境局生物多様性センター「環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き―二次的自然環境においてはじめて環境 DNA 分析を利用するみなさまへ
改訂第 2 版―」, 2022.

天草・海の冒険サポーターズテキスト
第 10 章「環境 DNA でさぐる海の環境調査」プログラム編
■発行：天草海部　■企画・制作：浪崎直子・正角雅代・野間英樹　■執筆：浪崎直子
■協力：産業技術総合研究所地質調査総合センター「環境調和型産業技術研究ラボ（E-Code）」水山克・濱本耕平・井口亮・西島美由紀
※本テキストは、2022 年度地球環境基金の助成を受けて作成しました。
※本テキストではオリジナルを改変しての利用、有償配布、素材流用を禁止します。