

環境 DNA メタバーコーディング法の河川における 魚類相モニタリング調査手法としての有効性について

(水国調査結果と環境 DNA メタバーコーディング法の魚類相比較)

Effectiveness of the Environmental DNA Metabarcoding Method as an Ichthyofauna Monitoring Investigation Method for Rivers (Comparison Between the results of National Survey on River Environments Biological Survey Results and Ichthyofauna in the Environmental DNA Metabarcoding Method)

自然環境グループ	主任研究員	都築 隆禎
	主席研究員	舟橋 弥生
自然環境グループ	研究員	太田 昌志
自然環境グループ	研究員	内藤 太輔
山口大学大学院	准教授	赤松 良久
山口大学大学院	特命助教	乾 隆帝

1. はじめに

河川水辺の国勢調査は、河川の管理において生物の生息・生育環境に配慮する観点から河川の自然環境に関する基礎的情報を把握するため、主に全国の一級河川において、平成2年度から国土交通省水管理・国土保全局(当時は建設省河川局)によって実施されており、河川の生物の生息・生育状況に係るデータが定期的・継続的・統一的に蓄積されてきた。

本調査の対象の一つである魚類は、水生動物の中では高次捕食者が多く、かつ他の水生動物に比べて大型の生物が多いことから、環境変化にともなう影響を大きく受ける可能性が高く、また、アユやニホンウナギなどのような水産上有用種も含まれることから、河川の管理上、重要な分類群である。

そこで、本研究では、河川における魚類の簡易なモニタリング方法として近年急速に開発が進んでいる環境 DNA 分析に着目した。環境 DNA 分析とは、水サンプルに浮遊・存在する DNA (環境 DNA) の情報を調べることで水生生物の生息状況を評価する生物モニタリング手法であり、一つの対象種の DNA を特異的に検出するアプローチと、特定の分類群の DNA を網羅的に検出するメタバーコーディング法と呼ばれるアプローチに大別される¹⁾。本研究では後者の手法に着目し、河川水辺の国勢調査による魚類の採集によって得られた結果と、環境 DNA メタバーコーディング法によって得られた結果を比較することにより、環境 DNA メタバーコーディング法の河川における魚類相モニタリング手法としての有効性を検証することを試みた。

2. 調査方法

2-1. 対象河川・調査箇所の選定

多様な魚類の生息環境への環境 DNA 分析技術の適用を念頭に、平成 29 年度に河川水辺の国勢調査(魚類調査)を実施した河川の中から、北海道の鶴川および近畿地方の淀川水系木津川を対象河川として選定した。鶴川における魚類調査および環境 DNA 分析のための採水は淡水区間の 3 地区、木津川では二次支川を含めた 4 地区を選定した。

2-2. 各調査箇所の採水および採集調査

採水および採集調査は、調査地区の様々な環境に生息する魚類を把握するために、調査地区内の環境区分(早瀬、淵、ワンド・たまり、湛水域、支川等)ごとに行った。採水については、1 つの調査地区あたり 4 つの環境区分ごとに表層水を 1L 採水した。採集調査の方法は、平成 28 年度版河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル[河川版](魚類調査編)に従い、全体計画に基づき調査を実施した。なお、採水はかならず採集の作業前(直前から 1 週間前)に実施した。

2-3. 環境 DNA メタバーコーディング法

採水検体は、塩化ベンザルコニウム 10w/v% 水溶液を 0.1% になるように添加し、クーラーブランケットとともに遮光・冷蔵状態で実験室に運搬した。検体をろ過したフィルター(ワットマン GF/F フィルター)から DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を Miya et al.(2015)による魚類のユニバーサルプライマーで増幅し、次世代シーケンサー(MiSeq, Illumina)により分析し

た。分析結果は、MiFish パイプライン²⁾により解析した。得られた解析結果（配列の相同性 98% まで確認）は、公開されているデータベース（DDBJ: DNA Data Bank of Japan）に照合して再確認した。また、MiFish の解析領域（ミトコンドリアの 12SrRNA の一部分）では種判別不能（種間で同じ配列、種間変異と種内変異が識別困難等）であった以下の分類群（ヨシノボリ属、サクラマス等のサケ属、トミヨ属の一部、ウキゴリ属の一部、チチブ属、ズナガニゴイを除くニゴイ属）は属止めとした。種名は、河川水辺の国勢調査のための生物リスト（平成 29 年度版）に従った。

魚類採集および環境 DNA 分析による確認結果は、過去の河川水辺の国勢調査での確認結果と比較した。過去の調査結果は、河川環境データベースを参照した。

3. 調査結果

魚類採集に基づく種リストと採水した河川水に含まれる環境 DNA のメタバーコーディング法による分析結果について、環境区分ごとの環境 DNA メタバーコーディング法の有効性を明らかにするために、図-1 および図-2 に採集・環境 DNA メタバーコーディング法の共通種、採集のみで確認された種、環境 DNA メタバーコーディング法でのみ確認された種の割合について、環境区分ごとに集計した結果を示している。

3-1. 鶴川における調査結果と分析結果の比較

鶴川の調査結果では、全ての調査地区のいずれの環境区分でも、採集で確認された種に比べて、環境 DNA メタバーコーディング法で確認された種数が多かった。特に、淵、湛水域のような止水的な環境で、環境 DNA メタバーコーディング法でのみ確認される種の割合が高かった（75~82%）。同一の調査地区において、魚類採集調査では確認されず、環境 DNA 分析でのみ確認された種は 15 種だったのに対し、環境 DNA 分析では確認されず、魚類採集調査でのみ確認された種は 4 種だった。

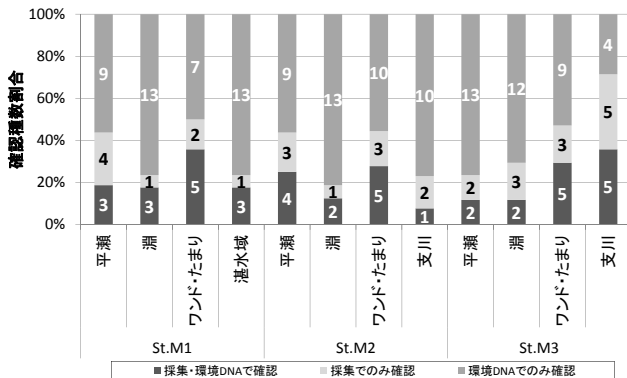


図-1 鶴川における魚類採集及び環境 DNA メタバーコーディング法で確認された種数割合

3-2. 木津川における調査結果と分析結果の比較

木津川の調査結果でも、全ての調査地区のいずれの環境区分でも、採集で確認された種に比べて、環境 DNA メタバーコーディング法で確認された種数が多かった。木津川では、ワンド・たまりの止水環境の他、早瀬の環境区分で、環境 DNA メタバーコーディング法でのみ確認種の割合が相対的に高かった（38~67%）。また、平瀬、淵では魚類採集と環境 DNA 双方で確認される種の割合が高い傾向があった（31~58%）。同一の調査地区において、魚類採集調査では確認されず、環境 DNA メタバーコーディング法でのみ確認された種は 11 種だったのに対し、環境 DNA 分析では確認されず、魚類採集調査でのみ確認された種は 4 種だった。

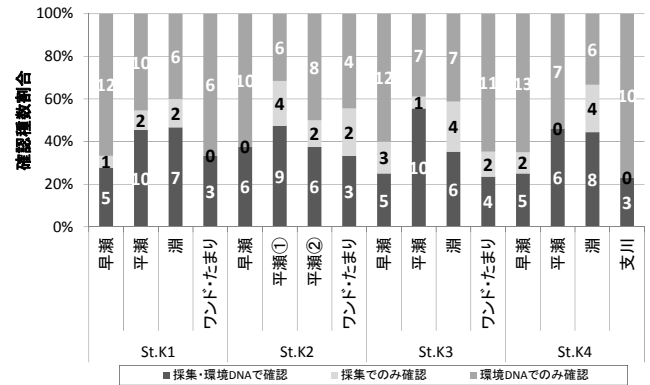


図-2 木津川における魚類採集及び環境 DNA メタバーコーディング法で確認された種数割合

4. おわりに

鶴川および木津川における魚類の環境 DNA メタバーコーディング法の結果と河川水辺の国勢調査の採集調査の結果を比較したところ、両河川の全ての地区、環境区分において、環境 DNA メタバーコーディング法で確認された種が採集で確認された種よりも多かった。しかし、環境 DNA メタバーコーディング法では確認されなかった種もあり、有効性には詳細な考察（生息環境やサイズ）が必要であると考えられた。

環境 DNA メタバーコーディング法の有用性を高めるため、今後「抽出された DNA からの魚類相リストの作成手順」や「どのくらい上流までの魚類相の情報を含んでいるか」などの検討を進めていきたい。

<参考文献>

- 源 利文：種特異的な環境 DNA 検出によるマクロ生物の生態調査，水環境学会誌，Vol.41(A)，pp.123-127，2018
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., Iwasaki, W. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. Royal Society Open Science, 2:150088, 2016