

原著

河川水を対象とした環境DNA分析による魚類相調査の可能性

平川周作・中島淳

魚類相調査を目的としたメタバーコーディング法による環境 DNA 分析について、福岡県内の大佐野川における採捕調査で確認された魚種をどの程度検出できるか調査した。2014 年から 2020 年までの期間に実施した計 7 回の採捕調査では、調査回によって確認される魚種が異なっていたが、採捕調査で確認された全ての魚種を瀬と淵の混合試料による一度の環境 DNA 分析で検出することができた。また、採捕して確認されていないオオクチバスが環境 DNA 分析で検出されたため、調査地点上流を調査した結果、目視調査によりその生息が確認された。このように、環境 DNA 分析は調査地点およびその上流に生息する魚類を検出する能力が高く、魚類相調査に有効な手法と考えられる。

[キーワード：環境 DNA、メタバーコーディング]

1 はじめに

近年、環境中に放出された生物由来のDNA（環境DNA）を分析する技術が発展し、環境水から DNA を抽出し、そのDNA を解析することで調査地点に生息する魚類の情報を獲得できるようになってきた。水域の環境 DNA 分析における試料採取は水を汲むだけで良いという利点がある一方で、採水地点の特徴に応じた時期、場所、採水量といった採水方法、採水後の保存方法や DNA の抽出方法などにおいて、研究者により様々な方法が採用されている²⁾。国内では、環境 DNA 分析手法の普及と標準化を目的として、一般社団法人環境 DNA 学会により“環境 DNA 調査・実験マニュアル”が発行され、標準的な方法と注意点が示されている⁴⁾。しかし、調査地点の環境や状況は様々ではないため、実際に環境 DNA 分析による魚類調査をおこなうにあたっては、同マニュアルや研究事例を参考にしつつ、目的に応じた調査計画と検討が求められる。

魚類を対象とした環境 DNA メタバーコーディング法は、多種の魚類から放出され調査地点に存在する環境 DNA をまとめて同時並列的に分析する手法であり、近年、魚類相の把握のための適用とその有効性が検証されはじめて^{3,5)}。環境 DNA 分析による魚類相の把握には、調査地点の水中に存在する多様な魚種から放出された環境 DNA を効果的に捕集できるように採水することが重要である。環境 DNA の抽出濃度や検出率を上昇させるためには、採水量や調査地点を増やすなどの方法があるが³⁾、調査や分析にかけられることができる労力は限られていることから、コストパフォーマンスが最大になるよう、最適な

調査計画を検討する必要がある。我々はこれまでに、環境 DNA メタバーコーディング法を用いて河川における魚類相調査に関する検討をおこなった⁶⁾。その結果、同一の調査地点でも瀬と淵で環境 DNA 分析によって検出される魚種が完全に一致することではなく、どちらか一方で採水した場合、検出可能な魚種を取りこぼす可能性が示唆された。そのため、河川を対象とした環境 DNA 分析では、各調査地点について瀬と淵の試料を混合するなど複数箇所から採水することにより、検出される魚種の取りこぼしの低減につながると思われる。



図 1 調査地点の概要

本研究では、環境 DNA 分析による魚類相調査の可能性を探るため、事前検討した採水方法を用いて環境 DNA メタバーコーディングをおこない、同調査地点でこれまでに実施された採捕調査から確認された魚種をどの程度検出できるか調査した。

2 試料と方法

2・1 採捕調査

福岡県内の御笠川水系大佐野川川久保橋付近 (N33.5111, E130.4995) において、2014 年 6 月 14 日、2015 年 6 月 11 日、2016 年 6 月 11 日、2017 年 6 月 17 日、2018 年 6 月 9 日、2018 年 9 月 7 日、2020 年 1 月 21 日の計 7 回、投網 (直径約 5 m、目合約 10 mm) およびタモ網 (口径 40 cm、目合 2 mm) を用いて採捕調査を実施し、採捕した種および目視で確認した種を記録した。調査地点の概要は図 1 に示す。種の同定は、中坊⁷⁾ および細谷⁸⁾ を基本とした。また、環境 DNA 分析でのみ検出された魚種に関する追加調査のため、調査地点の約 1.2 km 上流に位置するため池 (大池) と、同じく約 3.3 km 上流に位置するダム (大佐野ダム) において 2020 年 10 月 19 日に双眼鏡を用いて目視調査を実施した。

2・2 環境 DNA メタバーコーディング

環境 DNA メタバーコーディングのための採水は、2020 年 1 月 21 日の採捕調査と同時に実施した。試料は、瀬と淵をそれぞれ複数回採水し、約 500 mL ずつを混合して 1 L としたものをを用いた。採水地点は図 1 に示す。なお、DNA の分解を抑制するため、採水時に 10 w/v% ベンザルコニウム塩化物液 (日本製薬株式会社) を 1 mL 添加した。試料は、採水当日中にガラス繊維円形ろ紙 GF/F (Whatman) を用いてろ過し、DNA 抽出までろ紙を -20 °C で冷凍保存した。Miya ら⁹⁾ の方法を参考にして、ろ紙に細胞溶解液を加え、溶解液を回収した後、15% ポリビニルポリピロリドン溶液を最終濃度 2.5% になるように添加し、MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Biomedicals)

および AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて DNA を抽出・精製した。

次に、12S rRNA の一部を標的領域とした MiFish U (forward: 5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA TCTNNNNNGTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC-3', reverse: 5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNN NNNNCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3') および MiFish E (forward: 5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTC TCCGATCTNNNNNGTTGGTAAATCTCGTGCCAGC-3', reverse: 5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGA TCTNNNNNCATAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG-3') を混合したプライマーセットを用いて、精製した DNA について環境 DNA メタバーコーディング法による網羅的な魚類検出をおこなった¹⁰⁾。PCR 酵素は TAKARA Ex Taq (タカラバイオ株式会社) を用い、1st PCR は 4 連で実施し、それらを混合したものを 2nd PCR に適用してサンプル識別 index とアダプター配列を結合させ、ライブラリーを作製した。シーケンシング解析は、Miseq System (Illumina) を用いて 2×300 bp の条件で実施した。解析した DNA 配列データは、DDBJ Sequence Read Archive データベースに登録した (Accession No. DRA010905)。

取得した DNA 配列について、MiFish pipeline (MiFish DB Ver. 30) (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish>) を用いて魚種の同定をおこなった¹¹⁾。今回解析に用いた MiFish 領域による環境 DNA メタバーコーディングでは、配列の相同性が高いことから分類が困難な種が存在し、属までの分類になるものや近縁の他種が代表種として出力されてしまう場合がある。そこで、MiFish pipeline から出力された代表配列について、National Center for Biotechnology Information の BLAST 検索機能を用いて国際塩基配列データベースに登録されている DNA 配列との相同性を確認し、また、調査地点の生息情報をもとに和名の表記を含めて表 1 のように整理した。

表 1 BLAST および生息情報に基づく MiFish Pipeline 出力結果の読み替え

MiFish pipeline 出力結果		読み替え結果	
学名	和名	学名	和名
<i>Cyprinus carpio</i>	コイ	→ <i>Cyprinus carpio</i>	コイ
<i>Cyprinus megalophthalmus</i>	コイと同じ属名の種	→ <i>Cyprinus carpio</i>	コイ
<i>Pseudorasbora parva</i>	モソゴ	→ <i>Cyprinus carpio</i>	コイ
<i>Carassius gibelio</i>	フナ	→ <i>Carassius auratus</i>	キンギョ
<i>Oryzias latipes</i>	メダカ	→ <i>Oryzias latipes</i>	ミナメダカ
<i>Carassius</i> sp.	アカブナと同じ属名の種	→ <i>Carassius langsdorfii</i>	ギンブナ
<i>Rhinogobius</i> sp.	アヤシノボリと同じ属名の種	→ <i>Rhinogobius</i> sp. OR	トウヨシノボリ

表 2 採捕調査 (目視含む) で確認、および環境 DNA メタバーコーディングで検出された魚種の一覧

種名	採捕調査							環境 DNA
	2014年 6月	2015年 6月	2016年 6月	2017年 6月	2018年 6月	2018年 9月	2020年 1月	2020年 1月
コイ				○				○
ギンブナ	○	○	○	○				○
ゲンゴロウブナ	○	○	○					○
オイカワ	○	○	○	○	○	○	○	○
カワムツ		○	○	○	○	○	○	○
カマツカ	○	○	○	○	○	○		○
イトモロコ			○	○	○	○	○	○
ムギツク	○		○	○	○	○	○	○
ドンコ						○		○
トウヨシノボリ		○				○	○	○
ミナミメダカ	△	△	△					○
キンギョ								○
オオクチバス								○

採捕調査 (○:採捕確認、△:目視確認)、環境DNA (○:検出)

3 結果及び考察

2014年6月から2020年1月の期間に実施した計7回の採捕調査の結果、表2の左側に示す合計11種の魚類が確認された。調査回によって確認された魚種は異なっていたが、オイカワ *Zacco platypus* は全ての調査回で確認され、次いでカワムツ *Nipponocypris temminckii*、カマツカ *Pseudogobio esocinus*、ムギツク *Pungtungia herzi* は7回のうち6回、イトモロコ *Squalidus gracilis gracilis* は7回のうち5回の調査で高頻度に確認された。一方、コイ *Cyprinus carpio* やドンコ *Odontobutis obscura* は7回のうち、それぞれ異なる1回の調査でのみ確認された。採捕調査は主に小型の投網を用いて実施したことから、大型のコイや基質内に隠れる性質の強いドンコは捕獲されにくかったと考えられる。このほか、調査期間中に採集はできなかったが、ミナミメダカ *Oryzias latipes* が複数回、目視により確認された。

2020年1月に実施した環境DNAメタバーコーディングの結果を表2右側に示す。シーケンシング解析から取得したDNA配列データについてMiFish pipelineを用いて魚種の同定をおこない、BLAST検索および生息情報をもとに整理した結果、採捕調査で確認された全ての魚種(11種)が検出された。これまでに、環境DNAメタバーコーディングでは底生魚の確認率が低い傾向にあることが報告されているが^{5,6)}、本研究ではカマツカやドンコ、トウヨシノボリ *Rhinogobius* sp. ORなどの底生魚を含め、採捕調査で確認された魚種全てを検出することができた。本研究において実施した瀬および淵で複数回採水し混合する方法は、一度の環境DNAメタバーコーディングにおいて検出魚種の取りこぼしの低減に寄与したと考えられ



図2 大佐野ダムで確認されたオオクチバス



図3 大佐野ダムで確認されたブルーギル



図4 大佐野ダムで確認されたニシキゴイ

る。

また、環境 DNA メタバーコーディングにおいて、採捕調査では確認されていない外来種のキンギョ *Carassius auratus* とオオクチバス *Micropterus salmoides* も検出された。これらの魚種は 7 回の採捕調査で一度も確認されていないが、その上流に生息していた場合は DNA のみ流下して検出された可能性があることから、調査地点上流のため池およびダムについて追加調査をおこなった。ため池では、目視調査で魚影を確認することはできなかった。一方、ダムでは、オオクチバス、ブルーギル *Lepomis macrochirus*、コイ（ニシキゴイ）、オイカワが確認された。このうち、撮影したオオクチバス、ブルーギル、コイ（ニシキゴイ）の写真を図 2-4 に示す。また、ダムの流入部では、採捕によりトウヨシノボリとタカハヤ *Rhynchocypris oxycephala* の生息が確認された。調査から、環境 DNA でのみ検出されたオオクチバスは、調査地点の上流に生息していることが確認されたが、キンギョについては、その生息を確認することができなかった。要因として、放流により一時的に生息した個体を検出した可能性やキンギョを飼育している家庭からの生活排水の混入の可能性、キンギョと在来フナ類は交雑することから¹²⁾形態と DNA 情報が一致していなかった可能性が考えられる。また、オオクチバスと同様に上流に生息していたブルーギルとタカハヤは、下流にある本研究の環境 DNA 調査では検出されなかった。個体から放出された DNA は環境中で分解が進むため、環境 DNA が生物分布を反映する距離は数百 m 程度と見積もられているが⁴⁾、河川において約 10 km 上流の地点に生息する生物の環境 DNA を検出した事例も報告されている¹³⁾。また、魚種によって水試料の採取位置で DNA 濃度と検出率が異なることも示されている²⁾。このように、河川によって環境が異なること、また、対象種やその存在量にも影響されることから、どの程度下流まで DNA が残存し、環境 DNA 分析で検出されるかについては、今後さらなる検証が必要である。

4 まとめ

メタバーコーディング法を用いた環境 DNA 分析について、福岡県内の御笠川水系大佐野川を対象に採捕調査で確認された魚種をどの程度検出できるか調査した。2014 年から 2020 年までに実施した 7 回の採捕調査では、調査回によって確認される魚種が異なっていたが、7 回の採捕調査で確認された魚種全てを一度の環境 DNA 分析で検出することができた。このように、メタバーコーディング法を用いた環境 DNA 分析は、調査地点に生息する魚種を把握する有効な手法になり得る可能性が示された。また、

本研究では環境 DNA 分析の試料採取において瀬および淵で複数回採水し混合する方法を採用しており、検出魚種の取りこぼしの低減に寄与したものと考えられる。さらに、調査地点において採捕確認されていないオオクチバスが環境 DNA 分析で検出され、上流を調査した結果、その生息が確認された。このように、環境 DNA 分析は、外来種の侵入を検知する手段としても活用できる可能性があり、速やかな環境保全対策を講じる手立てとなり得ることが示された。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 JP19K04682 の助成を受けたものです。

文献

- 1) 宮正樹:環境 DNA メタバーコーディングー魚類群集研究の革新的手法 バケツ一杯の水で棲んでいる魚がわかる技術, 化学と生物, 57, 242-250, 2019.
- 2) 高原輝彦ら: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～, 66, 583-599, 2016.
- 3) 山中裕樹ら:環境 DNA 分析の野外調査への展開, 日本生態学会誌, 66, 601-611, 2016.
- 4) 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver.2.2 (https://ednasociety.org/wp/wp-content/uploads/2020/09/eDNA_manual_ver2_2_1.pdf), 2020.10.9.
- 5) 赤松良久ら:河川水辺の国勢調査による魚類相調査と環境 DNA メタバーコーディング解析の比較検討, 土木学会論文集 B1 (水工学), 74, I_415-I_420, 2018.
- 6) 平川周作ら:環境 DNA メタバーコーディングを用いた河川における魚類調査手法の検討と水質による影響の解析, 環境化学, 30, 125-132, 2020.
- 7) 中坊徹次:日本産魚類検索 全種の同定 第三版, 2013 (東海大学出版会, 秦野)
- 8) 細谷和海:増補改訂 日本の淡水魚, 2019 (山と溪谷社, 東京)
- 9) M. Miya *et al.*: *J. Vis. Exp.*, e54741, 2016.
- 10) M. Miya *et al.*: *Royal Soc. Open Sci.*, 2, 150088, 2015.
- 11) Y. Sato *et al.*: *Mol. Biol. Evol.*, 35, 1553-1555, 2018.
- 12) 富澤輝樹ら:ミトコンドリア DNA および核 DNA の解析による魚取沼テツギョの起源, 魚類学雑誌, 62, 51-57, 2015.
- 13) K. Deiner and F. Altermatt: *PloS one*, 9, e88786, 2014.

(英文要旨)

Possibility of fish fauna survey by environmental DNA analysis of river water

Shusaku HIRAKAWA and Jun NAKAJIMA

Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,

Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

We investigated the extent to which environmental DNA analysis using the metabarcoding method can detect fish species identified in the fishing survey in the Osano River in Fukuoka Prefecture. In seven fishing surveys conducted between 2014 and 2020, the identified fish species differed from survey to survey, but all the fish species identified in seven fishing surveys were detected by a single environmental DNA analysis. In addition, a largemouth bass (*Micropterus salmoides*) was detected in environmental DNA, which fishing survey had not identified. As a result of an upstream survey, the presence of largemouth bass was confirmed by visual inspection. Thus, environmental DNA analysis is considered an effective method for ichthyofaunal surveys because of its ability to detect fishes living at, or upstream from, a study site.

[Key words ; environmental DNA, metabarcoding]