

## 環境DNA多種同時検出法(メタバーコーディング)による淡水域の魚類相調査

## — 野洲川河口部ヨシ帯における調査事例 —

○パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	渡部 健
国土交通省 琵琶湖河川事務所	河川環境課	帰山 淳
国土交通省 琵琶湖河川事務所	河川環境課	小島 勇人
国土交通省 琵琶湖河川事務所	河川環境課	水上 幸夫
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	上月 佐葉子
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	松田 尚郎
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	小菅 敏弘
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	糸井 孝一
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	岡田 泰明
兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究所		土居 秀幸

## 1. はじめに

近年、個体を捕獲せずに、水域の生物の生息状況を把握する新たな手法として環境DNA分析が注目されている<sup>(1)</sup>。

従来、生物から環境中に放出されたDNAは、紫外線やバクテリア等によって速やかに分解されると考えられてきたが、急速に減衰しつつも、ある程度の期間、塩基配列から由来する生物を特定できる状態で残存すること明らかになり、環境水中に浮遊するDNA断片の塩基配列情報から水域に生息する魚種を間接的に分析する手法についての研究が急速に進展している。

環境DNA分析による調査は、現地調査は採水のみであるため、専門的なスキルが必要とされる従来の採捕調査と比較して、調査結果が調査員の技能に依存しないことが期待されることから、市民が参加する調査での利用も検討されつつある<sup>(2)</sup>。

一方で、日本国内では、環境アセスメント等で実施されている従来の標準的な採捕による調査手法と、環境DNA分析による生物の検出力を比較した事例が少ない。

そこで、琵琶湖河川事務所が自然再生事業のモニタリングのための魚類調査と、その調査の簡易手法の検討を行った野洲川河口部を調査地として、従来の標準手法である「河川水辺の国勢調査マニュアル」に準拠した採捕調査によって確認される魚種と環境DNA分析により検出される魚種を比較し、環境DNA分析の魚類相調査における性能評価を行った。

## 2. 方法

採捕調査は、2016年の夏季(7月28日~29日)及び秋季(10月12日~13日)に、琵琶湖に流入する一級河川である野洲川の河口の両岸、約360m区間で実施した。便宜的に、調査区間は上・中・下の3エリアに分けて調査を実施した。調査区間は、河川水辺の国勢調査の調査地点であり、「河川水辺の国勢調査マニュアル」に準拠した採捕調査が経年的に実施されている。本調査でも同様にタモ網、投網、定置網、刺し網、どう、セルビン、はえ縄、地引網を使用した採捕調査を、マニュアルに準拠した努力量で行った。

各季の採捕調査の初日(調査開始前)に、環境DNA分析のため、1検体あたり1L(リットル)の表層水をポリエチレン製容器に採水した。野洲川河口部の左右岸で、ヨシ帯の水際の5箇所各1検体(合計10検体)の採水を行った。また、比較的ヨシ帯が発達している右岸では、ヨシ帯の内部5箇所でも採水を行った。採水した試料水は、採水から24時間以内に濾過・冷凍し、分析時まで-20℃以下で保存した。

試料に含まれる魚類のミトコンドリア12SrRNAの遺伝子を対象として、ユニバーサルプライマーMiFish<sup>(3)</sup>により約172塩基対の領域を増幅後、次世代シーケンサーを用いて配列を決定し、データ・ベースと照合することで魚種の検出を行った。

## 3. 結果

## ・確認種

採捕調査の結果、野洲川河口全体では、4目6科18種の魚類が確認された。一方、次世代シーケンサーを用いた環境DNA分析では、4目9科32種の魚種が確認された(表1)。

分類群(科)単位で見ると、いずれの分類群(科)でも、環境DNA分析によって、採捕調査による確認種数と同程度か、より多くの種数が検出された。コイ科では、採捕個体が小さい場合、外部形態からはコイ科、あるいはフナ属といった分類までしか出来ないことも多いが、環境DNA分析の場合には、基本的に種まで検出できている。

ヤリタナゴは、採捕調査のみで確認された。一方、ドジョウ類、サケ科(ビワマス)、ドンコ科(ドンコ)の魚種は、環境DNA分析のみで検出された。

## ・希少種

環境省のレッドリスト及び滋賀県レッドデータブックに掲載されている種を希少種として、採捕調査と環境DNAによる確認状況を比較した。

環境DNA分析で検出された希少種は、ゲンゴロウブナ、カネヒラ、ハス、ナマズなど合計17種であった。一方、採捕調査ではヤリタナゴ、ナマズ、アユなど8種が確認された。採捕調査で確認された8種のうち、ヤリタナゴを除く7種は、環境DNA分析でも検出された。環境DNA分析では更に、採捕調査で確認されていない希少種として、ビワヒガイ、ゼゼラ、ズナガニ

ゴイ、ドジョウ、アジメドジョウ、ビワマス、イサザ、ドンコを検出した。

・特定外来生物

採捕調査ではブルーギル及びオオクチバスの2種が確認された。一方、環境DNA分析では、ブルーギル、オオクチバス、コクチバスの3種が検出された。

4. 考察

夏季調査では、環境DNA分析で検出された24種に、捕獲調査で確認された14種全てが含まれていた。秋季調査では、環境DNA分析で検出された30種に、捕獲調査で確認された17種のうち、ヤリタナゴを除く16種が含まれていた。以上の結果から、野洲川河口で捕獲確認された魚種は、概ね環境DNA分析で網羅的に検出されていたといえる。

ヤリタナゴは、採捕調査で秋季に右岸の上流側で1個体が確認されたのみであったことから、ヨシ帯付近での生息密度は少なく、環境DNAで検出されなかった可能性がある。

季節別での確認状況をみると、採捕調査と環境DNA分析のいずれでも、秋季の確認種数が多い傾向がみられ、特に、環境DNA分析では、秋季調査のみで、夏・秋季の合計の検出種(32種)のうち30種(約94%)の種が確認できている。ただし、秋季のみに確認された種であるビワヒガイ、タモロコ、アジメドジョウ等は1箇所での検出、カワムツは3箇所での検出と、検出箇所数が少なかった。コイ・フナ類をみると、コイは、夏・秋季いずれも多く箇所で検出された。ゲンゴロウブナとニゴロブナは、夏季には多くの箇所で確認されたが、秋季は確認箇所数が少なかった。一方、ビワマスについては、湖の深層に生息する夏季には確認されなかったが、遡上・産卵期の秋季には全ての検体で検出された。

コイ・フナ類や秋季のみに検出された種について、秋季の検出箇所数は少なく、安定して検出されるかどうかには不確実性が残ることや、生活史の一時期を河川で過ごす種がいることから、野洲川河口域の魚類相を環境DNA分析により網羅的に検出するためには、複数の季節で調査を実施することが望ましいと考えられる。

環境DNA分析は、希少種の検出及び特定外来種についても、従来の採捕調査で確認された魚種を上回る種数を検出しており、MiFishを用いたメタバーコーディングによる手法が、淡水魚類について高い検出力を持つことが示された。

一方、河川のような開放水域では、調査地点で捕捉された環境DNAが、上流から流入してきた分子である可能性があり、検出されても、必ずしも採水箇所に検出された魚種が生息していることを示すものではない。環境DNAの流下過程における分散や河床への捕捉、及び時間経過に伴う分解等による環境DNA濃度の減衰と検出限界の関係について知見を蓄積し、検出される環境DNAが、様々な流況条件の下でどの程度の範囲に生息する個体由来するかを明らかにすることが、今後の大きな課題である。

表1 採捕調査及び環境DNA分析による確認種

水国No.	種名	夏季		秋季		2季	
		環境DNA	捕獲	環境DNA	捕獲	環境DNA	捕獲
1	コイ	○	●	○	●	○	●
2	ゲンゴロウブナ	○		○		○	
3	ニゴロブナ	○		○		○	
4	キンギョ	○		○		○	
	フナ属		●		●		●
5	ヤリタナゴ				●		●
6	カネヒラ	○	●	○	●	○	●
7	ハス	○		○	●	○	●
8	オイカワ	○	●	○	●	○	●
9	カワムツ			○		○	
10	モツゴ	○	●	○	●	○	●
11	ビワヒガイ			○		○	
12	タモロコ			○		○	
13	ゼゼラ	○				○	
14	カマツカ	○		○	●	○	●
	カマツカ属			○		○	
15	ズナガニゴイ			○		○	
16	コウライニゴイ	○	●	○	●	○	●
	ニゴイ属		●		●		●
17	コウライモロコ	○		○		○	
	スゴモロコ類	○	●	○	●	○	●
18	ドジョウ	○				○	
	ドジョウ属	○		○		○	
19	アジメドジョウ			○		○	
20	シマドジョウ属			○		○	
21	ナマズ	○		○	●	○	●
22	アユ	○	●	○	●	○	●
23	ビワマス			○		○	
24	オヤニラミ	○		○		○	
25	ブルーギル	○	●	○	●	○	●
26	オオクチバス	○	●	○	●	○	●
27	コクチバス	○		○		○	
28	ウキゴリ	○	●	○		○	
29	イサザ	○				○	
	ウキゴリ属		●				●
30	ヨシノボリ属	○	●	○	●	○	●
31	ヌマチチブ	○	●	○	●	○	●
	ハゼ科		●				●
32	ドンコ			○		○	
33	カムルチー	○	●	○	●	○	●
計	33種	24種	14種	30種	17種	32種	18種

<参考文献>

- 1) Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z. (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13 : 193- 197. doi:10.1007/s10201-011-0362-4
- 2) Biggsa J, Ewald N, Valentinib A, Gaboriaudb C, Dejeanb T, Griffithsc RA, Fosterd J, Wilkinsond JW, Arnelld A, Brothertone P, Williams P. (2015) Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183:19-28.
- 3) Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, J. Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W. (2015) 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*. DOI: 10.1098/rsos.150088.