

環境 DNA を用いた海草・サンゴのモニタリングに向けた一検討

大成建設（株）技術センター 社会基盤技術研究部 正会員 ○赤塚真依子 高山百合子 伊藤一教

1. はじめに

建設工事に伴う環境影響評価や移植の適地選定においては、生物種の分布やその変化が重要な情報となる。近年、土壌や水中など環境中に存在する DNA (環境 DNA, 以下 eDNA) 関連の技術開発が進んでおり、1L 程の採水から生物情報を容易に入手できるようになりつつある¹⁾。

著者らは、生物多様性の維持や水質浄化機能²⁾、ブルーカーボン³⁾等により近年生態系保全の重要性が再認識されつつある海草海域・サンゴ海域のモニタリング手法として eDNA の導入を検討している。本報では、海草海域において同湾内 5 地点の海草の eDNA 検出と海草分布範囲との関係を整理した。また、サンゴ海域の 1 地点において異なる 3 つの遺伝子領域を対象とした eDNA 検出結果と、サンゴ、魚類の目視観察との比較を行った。

2. 試験方法

試験手順を図1に示す。海草海域として、コアマモ、アマモの群生が確認されている三重県英真湾の入り江(立神)から入り江外に向かう5地点(A~E)にて、船上から水面下 1m の海水を採水した。なお、1m より水深が浅い場合は海草直上から採水した(図2)。また、サンゴ海域として、サンゴの生育が確認されている浅海域内の 1 地点にて水深約 3m から採水した。冷蔵輸送後、採水した翌々日にガラス繊維ろ紙(0.7 μ m, Φ 47mm)にてろ過し、eDNA をろ紙に濃縮した。eDNA 抽出には、ISOSPIN Blood & Plasma DNA キット(ニッポンジーン)を用いた。抽出した eDNA は、海草の rbcL 領域、動物の CO I 領域⁴⁾、花虫網の 18SrRNA 領域、魚類の 12SrRNA 領域(MiFish¹⁾)を対象とし、2 段階 PCR 法にて対象領域の塩基配列を特異的に増幅させた(表1)。泳動結果から有意な DNA 増幅を確認後、シーケンス解析(MiSeq)を行った。解析結果は、配列相同性の閾値を 99%とし、米国の国立生物工学情報センター(NCBI)など対象領域に合わせたデータベースに対して eDNA の blast 検索を実施した。また、国立遺伝学研究所(DDBJ)にて公開されている ClustalW を用いて系統解析も実施した。

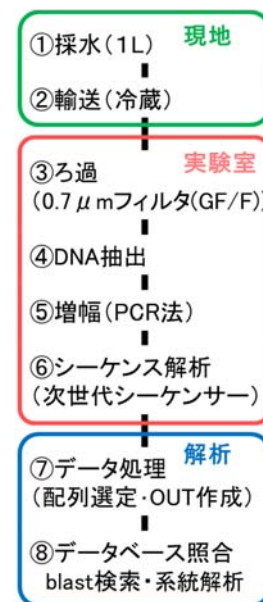


図1 試験手順

3. 海草海域における試験結果

海草の目視観察と eDNA の検出数を総検出数で除した割合を図3に示す。採水時、船上からの目視観察では、岸に近い地点 A, B にてコアマモの群生を確認し、アマモは確認できなかった。eDNA では、データベースとの一致率 100%となったコアマモが地点 A~C において検出でき、同じく一致率 100%となったアマモは地点 B にて微量の 0.07%、地点 C にて 8%の検出割合となった。また、海草の分布している入り江から外に向かう地点 D, E においては海草の

表1 対象とした生物群・遺伝子領域およびデータベース

海域	生物群	遺伝子領域	データベース
海草海域	海草	rbcL	NCBI
サンゴ海域	花虫網	18SrRNA	SILVA NCBI
	動物	CO I	BOLDsystems NCBI
	魚類	12SrRNA	MitoFish NCBI

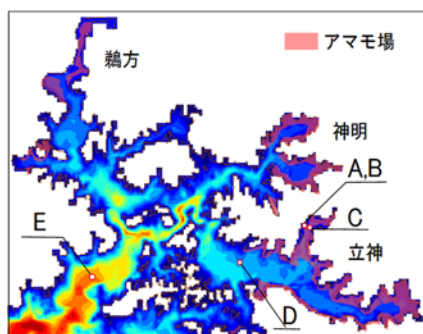


図2 水深、海草場の分布および採水地

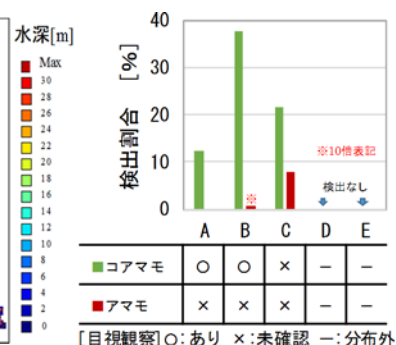


図3 海草の目視観察とeDNA検出割合結果

キーワード：環境 DNA 海草 サンゴ 魚類 モニタリング

連絡先 : 〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設（株）技術センター 社会基盤技術研究部 TEL 045-814-7234

表2 イシサンゴ目の目視観察と eDNA 検出結果

	目視	CO I	18SrRNA
ハマサンゴ類	○	○	○
ハナガササンゴ類	未確認	○	-
ノウサンゴ類	○	○	-
キクメイシ類	○	○	-
ハナヤサイサンゴ類	○	○	△
ミドリイシ類	○	×	△

○生息, 検出あり ×検出なし △いずれか検出 -データベースなし

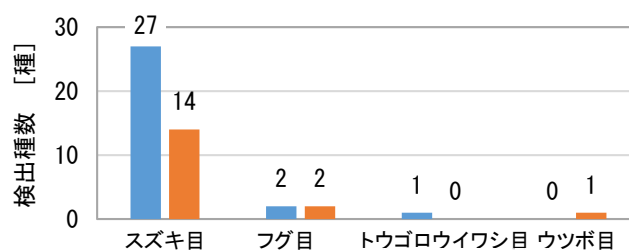


図4 魚類の eDNA 検出種数

eDNA は検出されなかった。本検討では定量化をしていないため相対的な比較とはなるが、実海域で流れによる拡散の影響があるなか、コアモモとアマモの eDNA が群生地周辺の限られた範囲でのみ検出されたことから、海草の分布範囲の推定に活用できる可能性が得られた。また、対象とした遺伝子領域について、NCBI に登録されているコアモモ、アマモを含むアマモ科の系統解析を行った。アマモ科のうちコアモモを除くアマモ、オオアマモ、タチアマモ、スゲアマモの相同性一致率は 100%であった。今回検出された eDNA は、水産庁による分布調査の結果²⁾から同地域で生息が確認されているアマモと判断した。なお、コアモモ、アマモとそれぞれ 98%の一致率となる eDNA も検出されたため、現地で群生している海草の塩基配列の確認など、対象生物群の生息情報の入手も今後実施予定である。

4. サンゴ海域における試験結果

サンゴの現地観察および eDNA 検出結果を表2に示す。サンゴはイソギンチャクなどの仲間で刺胞動物の花虫綱として分類される。その中でも、造礁サンゴと呼ばれるサンゴの大部分を占めるイシサンゴ目を調査対象とした。今回、採水した地点は、目視観察にて、主に 5 種のイシサンゴ目(ハマサンゴ類、ノウサンゴ類、キクメイシ類、ハナヤサイサンゴ類、ミドリイシ類)およびソフトコーラルの生育が確認されている地域である。CO I 領域における eDNA では、生育の確認されている 5 種のうち、ミドリイシ類を除く 4 種とハナガササンゴ類が検出された。一方、花虫綱のみの eDNA 増幅となることから動物全般を増幅する CO I よりも多くのサンゴの検出を期待した 18SrRNA 領域においては、イシサンゴ目と考えられる eDNA が 3 種検出されたものの、データベースとの一致率が 98%以上となるものは、ハマサンゴ類とハナヤサイサンゴ類またはミドリイシ類と考えられる 2 種となった。18SrRNA の場合は、対象とした遺伝子領域の登録が NCBI にない種も多く、CO I 領域にて検出された eDNA と同種が検出されていることから新たに別の種を増幅できた可能性は低いと考えられる。実海域では対象となる生物種が多い CO I 領域において、サンゴを属レベルで十分に検出できることが明らかとなった。

また、サンゴ礁の形成には、栄養素として必要となるリンや窒素を尿などで排出する魚類との関わりも報告⁵⁾されていることから、魚類の検出に特化している 12SrRNA 領域と CO I 領域にて魚類を推定した結果を比較した(図4)。いずれもスズメタイやチョウチョウウオなど現地で確認されたスズキ目が一番多く検出され、フグ目も 2 種ずつ検出される結果となった。12SrRNA 領域の場合は、科以降の属、種まで概ね同定でき、CO I 領域においては、目レベルの同定となるものもあった。サンゴの生育情報と合わせて、その生育環境の評価項目となりうる魚類の生息情報も一度で容易に入手できる可能性が得られたので、サンゴ移植時のモニタリングや適地選定などに eDNA を活用できると考える。

5. まとめと今後の課題

本研究では、実海域における eDNA から、アマモ、コアモモの検出、造礁サンゴであるイシサンゴ目の検出、魚類の検出を確認することができた。海草海域では、eDNA の定量化に向けた検討を進めることで流動解析と組み合わせた分布調査への適用を目指したい。また、サンゴ海域では、サンゴの生育環境と魚類との関わりについて、実海域における流れ、採水方法、生物種の生活史の影響も考え、季節や採水地点による違いも加味して検証していきたい。

参考文献

- 1) Minamoto T. et al.: MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species, *R.Soc.open sci.*, 2,150088, doi: 10.1098/rsos.150088, 2015.
- 2) 水産庁: アマモ類の自然再生ガイドライン, 3, pp.22-26, 2007.
- 3) Tokoro T. et al.: Net uptake of atmospheric CO₂ by coastal submerged aquatic vegetation, *Glob. Change Biol.*, Vol.20, pp.1873-1884, doi: 10.1111/gcb.12543, 2014.
- 4) Folmer O. et al.: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, Vol.3, No.5, pp.294-299, 1994.
- 5) Jacob E. A. et al.: Fishing down nutrients on coral reefs, *Nat. Commun.*, 7, 12461, doi: 10.1038/ncomms.12461, 2016.