

採水量・採水位置の違いによる小出川における魚類相の検出精度について (環境 DNA メタバーコーディング法)

○パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員 真木伸隆
 パシフィックコンサルタンツ株式会社 渡部 健
 パシフィックコンサルタンツ株式会社 岡田泰明
 パシフィックコンサルタンツ株式会社 小菅敏裕
 パシフィックコンサルタンツ株式会社 池田幸資
 パシフィックコンサルタンツ株式会社 松島夕佳子
 神戸大学大学院人間発達環境学研究科 坂田雅之
 神戸大学大学院人間発達環境学研究科 源 利文

1. はじめに

近年、環境中に存在するDNAを分析し、そこに生息する生物を明らかにする環境DNA分析の研究、活用事例が急速に増えている。環境DNAの分析には大きく2つの手法があり、一つはターゲットとする対象種のDNAを特異的に検出する分析手法で、もう一つは特定の分類群のDNAを網羅的に検出する次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディングと呼ばれる分析手法である。環境DNA分析の一連の作業手順のうち、分析手法については環境DNA学会や各種セミナーを通じて、研究者より標準プロトコルに関する情報発信がなされているが、採水手法に関しては、知見の蓄積段階にある。

上記を踏まえて、パシフィックコンサルタンツ㈱と神戸大学では、魚類の採捕データが公表されている相模川流域の支川小出川等を対象に、採水位置、採水量の違いによるメタバーコーディングの精度に関する知見を得るための自主研究を行ったのでその成果を報告する。

2. 調査地域の概況*1

小出川は、神奈川県中央部を流れる相模川の下流部に位置する一次支川であり、一級河川区間は諸之木橋から富士見橋付近までで、延長は約11kmである。流域には、茅ヶ崎市、藤沢市、平塚市、寒川町の3市1町が含まれる。小出川に流入する二次支川としては、一級河川及び準用河川指定の千の川、準用河川指定の駒寄川、打戻川等が挙げられる。千の川流



図1 小出川流域の概況・採水地点

域を含めた小出川の流域面積は約35km²である(図1)。

今回、採水を行った中流域は、茅ヶ崎市と寒川町の行政境界を流れており、周辺は宅地と農地が混在し、近年、宅地化も進んでいる。河道は多自然川づくりの一環で、覆土した護岸で整備されており、河道内には部分的に洲も形成されている。

3. 小出川における魚類の既往調査データ

茅ヶ崎市では、市内を流下する小出川や駒寄川、千の川等で魚類調査を行っており、その結果が公表されている。本研究では、茅ヶ崎の淡水魚類相(第3報)(文化資料館調査研究報告書24,2015)の調査結果を引用しながら、メタバーコーディング結果の考察を行った。

4. 調査概要

採水位置、採水量の違いによる環境DNA分析のメタバーコーディングの精度を検討するための調査を行った。採水地点は、小出川中流域にある駒寄川合流点付近にある鷹匠橋の上流1地点とし、2017年8月3日に採水作業を行った。調査概要は表1に示すとおりである(採水地点は図1参照)。

表1 調査概要

採水日	水温(℃)	採水位置	天候
2017/08/03	25.4	左岸、流心、右岸	曇り

注) 各採水位置で、10ml, 100ml, 500ml, 1,000ml, 2,000ml, 4,000ml の採水を行った。

(1) 採水方法

採水量の相違により検出される魚類相の相違を検討するため、バケツを用いて表層を採水し、全体の量を合計7,610mlとなるように調整した後で転倒混合し、ポリ容器に10ml、100ml、500ml、1,000ml、2,000ml、4,000mlとなるように小分けにした。この作業を、植生が発達する左岸及び右岸、植生がなく浮石や泥質の底質が見られる流心の3箇所で行った。なお、DNAの減少を抑えるために、Yamanaka et al. 2017に従い、すべてのサンプルについて、終濃度が0.01%になるように塩化ベンザルコニウムを加えてよく振り混ぜた。

キーワード: 環境DNA、メタバーコーディング、採水量、採水位置

発表者連絡先: 東京都千代田区神田錦町三丁目 22 番地 TEL:03-6777-4577、FAX:03-3296-0527

(2)分析方法

分析は、次世代シーケンサーを用いてMiFish法で行った。解析では、リード数が10以上の種を対象に、種同定においてリファレンスデータベースに対して相同性98.5%で検索し、2塩基違いまでを許容した。

上記で得られた魚類リストのうち、下水による影響と考えられる海水性のカライワシ科、ニシン科、カタクチイワシ科、ニザダイ科の魚類及び生息環境から生息の可能性が極めて小さいと考えられるマハゼについてはリストから削除した上で、分析を行った。

5. 調査結果

(1)採水量別、採水位置別検出種数

採水量ごとに検出種数を合計し、左岸、流心、右岸別に全体の検出種に対する検出割合を算出した。採水量別、採水位置別の検出種数は表2に示すとおりである。

採水位置別に見ると、100ml、500ml、1,000ml、2,000ml、4,000ml共に左岸の採水で最も高い検出種数・検出率を示した。特に4,000mlの採水では、流心、右岸で検出された種を含む全種が検出された。なお、10mlについては、右岸が最も高い検出種数・検出率であった。

表2 採水地点別の検出種数・検出率

採水量	10mL	10mL	10mL	10ml合計(30ml)
検出数(種)	4	5	6	9
検出率(率)	44%	56%	67%	100%
採水量	100mL	100mL	100mL	100ml合計(300ml)
検出数(種)	16	12	13	19
検出率(率)	84%	63%	68%	100%
採水量	500mL	500mL	500mL	500ml合計(1500ml)
検出数(種)	23	20	16	25
検出率(率)	92%	80%	64%	100%
採水量	1000mL	1000mL	1000mL	1000ml合計(3000ml)
検出数(種)	26	24	21	27
検出率(率)	96%	89%	78%	100%
採水量	2000mL	2000mL	2000mL	2000ml合計(6000ml)
検出数(種)	22	24	24	26
検出率(率)	85%	92%	92%	100%
採水量	4000mL	4000mL	4000mL	4000ml合計(12000ml)
検出数(種)	28	24	23	28
検出率(率)	100%	86%	82%	100%

注)L:左岸、C:流心、R:右岸

(2)左岸、流心、右岸別の検出種数

すべての採水量の調査データを左岸、流心、右岸別にまとめて検出種数を整理した結果を図2に示す。全体で検出された種数は31種であるが、そのうち、左岸では29種が検出され全体の93.5%、流心では27種が検出され全体の87.1%、右岸では24種が検出され全体の77.4%であった。

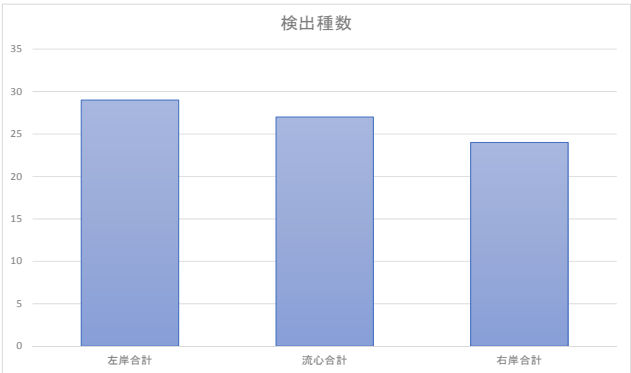


図2 採水位置別検出種数

特定の位置でのみ検出された種をみると(表3)、右岸でのみ検出された種はなく、左岸でのみ検出された種はホンモロコ、タモロコ、ブルーギルの3種である。同様に、流心でのみ確認された種はソウギョとボウズハゼであるが、いずれの種もサンプルに含まれるリード数の割合は小さいものであった。

表3 特定位置で確認された種

左岸でのみ確認	ホンモロコ(4000ml、10)、タモロコ(4000ml、27)、ブルーギル(1000ml、19)
流心でのみ確認	ソウギョ(2000ml、39)、ボウズハゼ(2000ml、14)
右岸でのみ確認	なし

注)()内の左側は採水量、右側はリード数

(3)採水量別検出種数

採水量と検出魚類種数は図4に示すとおりである。

採水量1,000mlまでは、採水量が増えた分だけ検出される魚類の種数も増加したが、1,000mlを越えた辺りからは、採水量を増やしても検出される種数は横ばいか、微増に留まる結果となった。

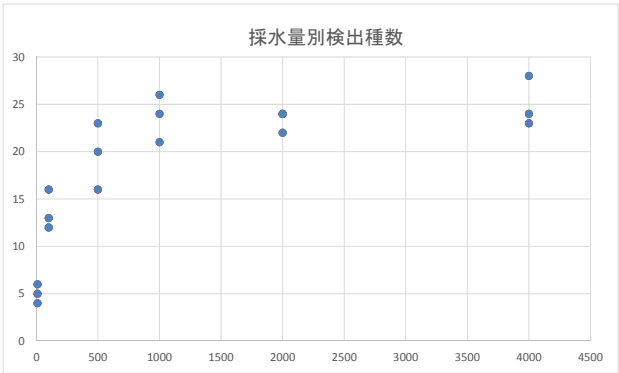


図4 採水量と確認種数の整理(縦軸:種数、横軸:採水量)

6. まとめ

河川における採水量については、様々な事例が報告されており、中でも1,000mlとする事例が多く認められるが、今回の研究はその結果の妥当性を支持するものとなった。

また、今回の分析では、左岸での検出種数が流心や右岸より多くなったが、左岸あるいは流心でのみ検出された種は、サンプルに含まれるリード数の割合が小さかった。このため、採水地点周辺における生物量自体が少ないと考えられた。当初、DNAが植生等に捕捉されることで、流心と比べて左岸あるいは右岸の検出種数・検出率が高まると想定していたが、本研究の結果では、生物量が少ない種のDNAの捕捉次第で種数が増減するものの、一定量以上生息する種については、どこで採水しても同程度の結果が得られることを示すものとなった。

7. 今後の課題

今回の報告は、相模川水系小出川を対象にしたケーススタディとなる。他の河川でも採水位置、採水量の違いによる検出数の検討を行い、事例を蓄積していく必要がある。

参考文献

※1「相模川水系 小出川・千の川河川整備計画」
(平成 27 年 4 月 神奈川県)
※2「茅ヶ崎の淡水魚類相(第3報)」
(文化資料館調査研究報告書 24,2015)