

河床底質の環境 DNA メタバーコーディング分析法の有効性について

○パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	加藤敦子
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	渡部 健
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	池田幸資
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	小菅敏裕
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		岡田泰明
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

河川、湖沼、海域等の水域で環境DNA分析により水生生物の生息状況を調査する場合、採水試料からDNAを濃縮、抽出して分析する方法が広く行われている。一方、近年では水域の底質試料からも高濃度に魚類の環境DNAが検出されることが分かり¹⁾、底質試料の環境DNAから得られる生物情報について注目されるようになってきた。近年の事例としては、英国沿岸の複数の調査地点で採水試料と底質試料についてメタバーコーディング分析により検出される種 (OTU) を比較し、底質試料からは水試料よりも多様な種が検出されることが報告されている²⁾。また、滋賀県の伊庭内湖沿岸で採取した水試料と底質試料について、3種の魚類 (コイ、ブルーギル、オオクチバス) を対象として定量PCR分析を行った研究では、底質試料の単位重量 (g) あたりの環境DNA量は、水試料の10～1,000倍に達することが示された³⁾。一方、同所でのMiFish領域を対象とするメタバーコーディング分析では、底質試料の方が水試料よりも検出種数が少なくなる傾向が報告されている³⁾。

本研究では、河川の中流域で表層水と底質を採取してMiFish法によるメタバーコーディング分析を行った結果、河床底質の環境DNA分析により、採水試料の分析と同様な種数・魚類相が検出される知見を得たので、以下に結果の概要を報告する。

2. 調査方法

2017年8月3日に相模川水系の一次支川である小出川の中流域に調査地点を設定し、河道の横断方向3箇所 (右岸、流心、左岸) で環境DNA分析のための水試料及び底質試料を採取した。

水試料は、各箇所で表層水 (7,610ml) を大型の容器に採水して転倒混合した後、6つの異なる容量のポリエチレン容器 (10ml、100ml、500ml、1,000ml、2,000ml、4,000ml) に3検体ずつ分注した (計18検体)。底質試料は、各箇所の河床で採取した50 g (湿重量) の底質から9 g の検体を5つ作成した (計15検体)。水試料には、細菌によるDNA分解を抑制するため市販の塩化

ベンザルコニウム溶液 (オスバン) を添加し、遮光・冷蔵状態で実験室に運搬して36時間以内にろ過 (フィルター: Whatman, Grade GF/F) を行った。ろ過後のフィルターと底質試料は、DNA抽出まで-20℃の冷凍庫で保存した。

DNA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以上のシーケンスを対象に、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%で検索した。分析により得られた一次リストには汽水・海水域を生息環境とする魚種が多く含まれていたが、調査地点は淡水であったことから生活排水等の影響が考えられた。そこで、生活型が汽水・海水魚の魚種、及び、主な生息環境を汽水域とする周縁性魚類を除き、純淡水魚と回遊魚を抽出するスクリーニングを行って得られたリストについて、以降の解析を行った。なお、既往捕獲調査⁴⁾等の情報から、小出川では回遊魚であるサケ属魚種の分布の可能性が低いと考えられたことから、サケ属の魚種は除外した。また、周縁性魚類のうちスズキとボラについては、当該調査地点でも確認される可能性があるため二次リストに含めた。

3. 結果

DNA分析により底質試料からは88種、水試料からは57種が検出された。汽水・海水魚や周縁性魚類を除くスクリーニングの結果、底質試料からは15科34種、水試料からは12科30種、合計16科38種が抽出された (表1)。

「底質試料のみで確認された種」、「水試料のみで確認された種」、「共通して確認された種」で区別して底質試料と水試料から検出された種数を比較すると、いずれの採取箇所でも約70～80%は共通して確認された種であった (表2)。一方、底質試料あるいは水試料のみで確認された種数の大小関係は箇所間で傾向が異なり (Pearson's χ^2 -test, $p < 0.01$)、底質試料と水試料で種の検出力の差に傾向はみられなかった。

試料の量と検出種数の関係は図1に示すとおりである。底質試料については、各箇所の5検体から1検体

キーワード：環境 DNA、底質、メタバーコーディング、魚類相

発表者連絡先：東京都千代田区神田錦町三丁目 22 番地 TEL03-6777-4577、FAX03-3296-0527

表. 1 検出種一覧

No.	綱名	目名	科名	種名	学名	生活型		底質				表層水			
						游泳	底生	左岸	流心	右岸	計	左岸	流心	右岸	計
1	硬骨魚綱	ウナギ目 コイ目	ウナギ科 コイ科	ニホンウナギ	<i>Anquilla japonica</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
2				コイ(聖不明)	<i>Cyprinus carpio</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
3				フナ属種群	<i>Carassius</i> spp.			●	●	●	○	●	●	●	○
4				ハクレン属種群	<i>Hypophthalmichthys</i> spp.			●	●	●	○	●	●	●	○
5				ハス	<i>Oreochromis latipes</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
6				オウゴン	<i>Oreochromis niloticus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
7				ソウギョ	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
8				アブラハヤ	<i>Phoxinus phoxinus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
9				マルタ	<i>Tribolodon brandtii</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
10				ウグイ	<i>Tribolodon hakonensis</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
11				モツゴ	<i>Pseudorasbora parva</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
12				タモロコ	<i>Gnathopogon elongatus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
13				ホンモロコ	<i>Gnathopogon caeruleus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
14				ゼゼラ	<i>Biwia zezera</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
15				カマツカ	<i>Pseudogobio esocinus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
16				ニギイ属種群	<i>Hemibarbus</i> spp.			●	●	●	○	●	●	●	○
17				スゴモロコ類	<i>Squalidus chankaensis</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
18			ドジョウ科	ドジョウ	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
19				カラドジョウ	<i>Misgurnus dabryanus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
20				フクドジョウ	<i>Barbatula oreas</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
21		ナマズ目	ナマズ科	ナマズ	<i>Silurus asotus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
22				アユ	<i>Plecoglossus altivelis</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
23				ボラ	<i>Mugil cephalus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
24				メダカ	<i>Oryzias latipes</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
25				ミナミメダカ	<i>Lateolabrax japonicus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
26				スズキ	<i>Lepomis macrochirus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
27				ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus macrochirus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
28				オオクチバス	<i>Micropterus salmoides</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
29				カシカ	<i>Cottus pollux</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
30				ドンコ	<i>Odontobutis obscura</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
31		カワアナゴ科	カワアナゴ科	カワアナゴ	<i>Eleotris oxycephala</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
32				ボウズハゼ	<i>Scyopterus japonicus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
33				チチブ属種群	<i>Tridentiger</i> spp.			●	●	●	○	●	●	●	○
34				カワヨシノボリ	<i>Rhinogobius flumineus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
35				ゴクラクハゼ	<i>Rhinogobius similis</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
36				ヨシノボリ属種群	<i>Rhinogobius</i> spp.			●	●	●	○	●	●	●	○
37				スミウキゴリ	<i>Gymnogobius noshoni</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
38				ウキゴリ	<i>Gymnogobius urotaenia</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
39				カムルチー	<i>Channa argus</i>			●	●	●	○	●	●	●	○
計	1綱	7目	16科	38種	38種	20	18	20	25	32	34	27	27	23	30

(n=5)、2検体(n=10)、3検体(n=10)、4検体(n=5)、5検体(n=1)を抽出して全ての組合せ毎に種数を算出し、その平均値を各底質重量(9g~45g)における検出種数とした。底質試料及び水試料は、どちらも検出種数が頭打ち型の非線形的な増加傾向を示した(図1)。

4. 考察

河川で表層水と底質を採取してMiFish法による環境DNAメタバーコーディング分析を行った結果、底質試料から採水試料と同程度もしくは上回る魚種が検出された。底質試料では水試料に比べて箇所間の検出種組成のばらつきがやや大きい傾向があるものの、箇所ごとの種組成の共通度は高く、底質の環境DNA分析は、水試料と同様に河川の魚類相を調査するツールとして利用できる可能性が示された。検出された種の組成を水試料と底質試料で比較すると、底質試料のみで確認された魚種はハクレン属、スゴモロコ類、及び底生魚のゼゼラ、スゴモロコ類、フクドジョウ、カシカ、ドンコ、カワアナゴ、カワヨシノボリの9種であり、底生魚が多く含まれていた。一方、水試料のみで確認された魚種はハス、ソウギョ、ブルーギル、ボウズハゼであった。底質では環境DNAが水中よりも分解されにくい傾向があることから³⁾、水試料から得られる情報とは異なる時間スケールの情報が含まれている可能性があるが、表層水と底質のデータを相補的に利用す

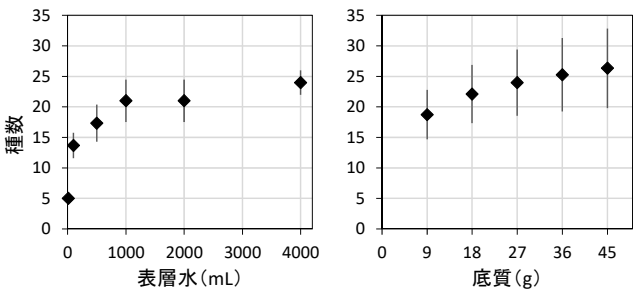


図. 1 試料の量と検出種数。(◆)は左岸、流心、右岸の平均値。エラーバーは標準偏差。

ることで、調査流域の魚類相をより網羅的に把握できるものと考えられる。

《参考文献》

1) Turner, C. R., K. L. Uy, and R. C. Everhart. 2015. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation* 183: 93–102.

2) Holman L.E., de Bruyn, M., Creer, S., Carvalho, G., Robidart, J., Rius, M. 2019. Detection of introduced and resident marine species using environmental DNA metabarcoding of sediment and water. *Scientific Reports* 9(1):1-10.

3) Sakata, M., Yamamoto, S., Gotoh, R., Miya, M., Yamanaka, H., Minamoto, T. 2020. Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA* 00:1-14.

4) 木村喜芳、齋藤和久、森上義孝. 茅ヶ崎市の淡水魚類相(第 3 報).文化資料館調査研究報告. 24: pp21-46. 2015.

表. 2 箇所別検出種の共通度

採取箇所	確認種数			共通度 (Jaccard係数)
	底質のみ	共通	表層水のみ	
左岸	1	19	8	0.68
流心	3	22	5	0.79
右岸	9	23	0	0.82