

環境 DNA メタバーコーディング法を用いた青森港における魚類相の把握（事例報告）

○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 鬼久保浩正
パシフィックコンサルタンツ株式会社 大美利光
パシフィックコンサルタンツ株式会社 横田和弥
神戸大学大学院人間発達環境学研究科 邬倩倩
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

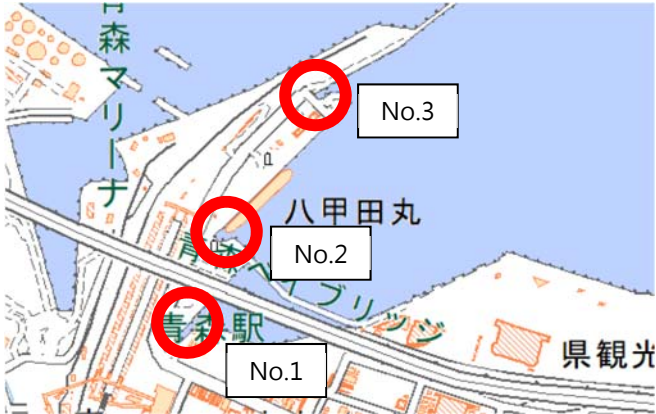
近年、環境中に存在するDNAを分析し、そこに生息する生物を明らかにする環境DNA分析の研究、活用事例が急速に増えている。環境DNA分析には大きくふたつの手法があり、ひとつはターゲットとする対象種のDNAを特異的に検出する手法で、もうひとつは特定の分類群のDNAを網羅的に検出する次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディングと呼ばれる手法である。両手法共に、特に魚類を中心に実用化を目指した研究や調査事例の収集が多く機関で進められている。

今回、我々は、青森港をフィールドにメタバーコーディングの分析に取り組み、その結果、海域における環境DNA分析の有用性及び課題が明らかとなったのでその事例を報告する。

本調査は青森県東青地域県民局青森港管理所の協力を得て実施しており、この場を借りてお礼申し上げる。

2. 調査の概況

調査地域は陸奥湾に面する青森港とした。青森港には、コの字型に直壁護岸で囲まれた場所が3か所存在する(図1)。No.1は、青森県が環境整備のために砂を投入しコアマモを植栽した比較的水深が浅い地点である。No.2は、八甲田丸が展示され、船の周辺に隠れ場が存在する透視度が低い地点である。No.3は、砂場や展示物がない開放された空間で、比較的水深があり透視度も高い地点である。このような特徴を持つ3地点で春夏秋の3季節に採水し、メタバーコーディングの分析を行うことで、環境特性に応じた魚類相の把握を試みた。



出典：国土地理院ウェブサイトに加筆

図 1 調査地域・採水地点図

その他、潜水目視調査が6月にNo.1地点において行われたことから、潜水目視調査の前にも採水を行い、目視調査結果との整合性について確認を行った。

3. 調査方法

採水地点は図1に示すNo.1～No.3の3地点とした。調査時期は、春季、夏季、秋季の魚類相を確認するため、5月、7月、9月に実施し、その他、別機関による潜水目視調査が行われた6月にも補足調査を行った。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

季節	採水日	備考
春季	2019年5月28日	
夏季	2019年6月22日	潜水調査に合わせて補足実施
夏季	2019年7月17日	
秋季	2019年9月9日	

(1)採水方法

各地点において未使用のバケツを用いて表層で1回採水し、ポリ容器3本に1Lずつ分注した。分注後は、DNAの分解を抑えるために、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。

(2)分析方法

メタバーコーディングの分析は、次世代シーケンサーを用いてMiFish法で行った。解析では、すべての種を対象に、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、海域に明らかに生息しない淡水魚のオイカワについてはリストから削除した上で、分析を行った。

4. 調査結果

(1)検出結果

全季節を合計した検出結果は表2、図2のとおりであり、No.1で15種、No.2で15種、No.3で18種検出され、全体で29種であった。陸奥湾奥のNo.1及びNo.2より入口側のNo.3で種数が多い結果であった。月別では、多くの種の産卵時期にあたる5～6月に種数が増え、産卵活動が収束する7月にはカタクチイワシ等の特定の種だけが確認された。その後、9月には再び種数の増加がみられた。

表2 魚類分析結果

和名	学名	No.1	No.2	No.3
マイワシ	<i>Sardinops melanostictus</i>	●	●	●
コノシロ	<i>Konosirus punctatus</i>		●	
カタクチワシ	<i>Engraulis japonicus</i>	●	●	●
イワナ(アメマス)	<i>Salvelinus leucomaenis</i>		●	
ボラ	<i>Muzil cephalus</i>	●		●
メナダ	<i>Liza haematocheila</i>			●
サヨリ	<i>Hyporhamphus sajori</i>	●		●
ダツ	<i>Strongylura anastomella</i>			●
メバル属の一種	<i>Sebastes spp</i>	●	●	●
アイナメ属の一種	<i>Hexagrammos spp</i>		●	●
カジカ科の一種	<i>Cottoidea spp</i>		●	
ギスカジカ属の一種	<i>Myoxocephalus spp</i>			●
マアジ	<i>Trachurus japonicus</i>		●	
クロダイ	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	●		
マダイ	<i>Pagrus major</i>	●	●	●
オキタナゴ	<i>Neoditrema ransonneti</i>	●		●
フサギンボ	<i>Chirolophis japonicus</i>	●		
ダイナンギンボ	<i>Dictyosoma burgeri</i>	●	●	●
ムスジガジ	<i>Ernogrammus hexagrammus</i>	●		
ハナジログジ	<i>Opisthocentrus teneis</i>			●
ニシキギンボ属の一種	<i>Pholis spp</i>	●	●	●
ドロメ	<i>Chaenozobius gulosus</i>	●	●	●
イソギンボ	<i>Parablennius yatabei</i>	●	●	●
ナベカ	<i>Omobranchius elegans</i>		●	●
セジロハゼ	<i>Clarizer cosmurus</i>			●
サバ属の一種	<i>Scomber spp</i>		●	
ツノガレイ属の一種	<i>Pleuronectes spp</i>	●		
トラフグ属の一種	<i>Takifugu spp</i>			●
ウグイ	<i>Tribolodon hakonensis</i>		●	
合計29種		15種	15種	18種

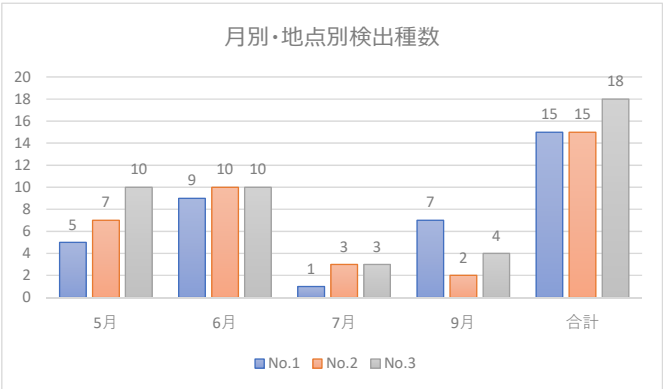


図2 月別・地点別検出種数

(2)採水地点別検出種数の状況

地点別の検出種数は図2及び表3のとおりであり、1地点でのみ検出された種はNo.1が5種、No.2とNo.3が6種、2地点で検出された種は5種、すべての地点で検出された種は7種であった。砂が投入されコアマモが植栽されているNo.1では、砂場に生息するツノガレイ属の一種が確認された。3地点共通で確認された種はマイワシやカタクチワシ等、広い範囲を回遊する種であった。

表3 採水地点別検出種数の概況

地点	確認種名	種数
No.1のみ	クロダイ、フサギンボ、ムスジガジ、イソギンボ、ツノガレイ属の一種	5種
No.2のみ	コノシロ、カジカ科の一種、マアジ、ナベカ、サバ属の一種、ウグイ	6種
No.3のみ	メナダ、ダツ、ギスカジカ属の一種、ハナジログジ、セジロハゼ、トラフグ属の一種	6種
2地点で共通	ボラ、サヨリ、アイナメ属の一種、オキタナゴ、ナベカ	5種
3地点で共通	マイワシ、カタクチワシ、メバル属の一種、マダイ、ダイナンギンボ、ニシキギンボ属の一種、ドロメ	7種

(3)潜水目視調査結果との比較

潜水目視調査が行われたNo.1の6月調査において、環境DNA分析で検出された種は、ボラ、メバル属の一種、マダイ、フサギンボ、ダイナンギンボ、ムスジガジ、ニシキギンボ属の一種、ドロメ、ツノガレイ属の一種の9種であった。一方、同日の潜水目視調査で確認された種は、スナガレイ、マコガレイ又はマガレイ、シロメバル、スジハゼ、アカオビシマハゼの5種であった。このうち、スナガレイ、マコガレイ又はマガレイはいずれもツノガレイ属であり、環

境DNAの結果と一致する。同様に、シロメバルについてもメバル属の一種が検出されており両者の結果は一致する。一致しなかったハゼ科の2種については、調査の時間差で検出されなかったか、個体数が極めて少なく環境DNA分析で検出されなかった可能性が考えられる。

(4)採水量別の検出種数

本調査は、1杯のバケツで採水し1Lずつ3つの容器に分注したが、サンプルにより検出種数に最大で7種の差が生じた(No.3の5月)(表4参照)。次に、1Lのサンプル2本分の2Lで検出種数を整理した場合、1Lよりはばらつきが小さいものの、最大で4種の差が生じた(No.2の6月)。陸水域の中小河川では1Lの採水で検出種数が概ね横ばいになることが報告※1されているが、海域で検出種数が横ばいになるためには、陸水域の中小河川より多い量の採水が必要であることが示唆された。

表4 採水量別検出種数

地点	採水時期 採水量	5月	6月	7月	9月
No.1	1L	1～3種	2～5種	1種	2～4種
	2L	4種	5～8種	1種	4～6種
	3L	5種	9種	1種	7種
No.2	1L	3～4種	3～6種	1～2種	0～1種
	2L	5～6種	5～9種	1～3種	1～2種
	3L	7種	10種	3種	2種
No.3	1L	0～7種	3～6種	0～3種	1～3種
	2L	7～9種	8～10種	0～3種	3～4種
	3L	10種	10種	3種	4種

5. まとめ

環境DNA分析結果より、砂浜の環境が広がるNo.1地点でのみツノガレイ属の一種が検出されるなど、環境の特徴を捉えた魚類相の検出ができた。また、ツノガレイ属の一種であるスナガレイ、マコガレイ又はマガレイは、別途実施した潜水目視調査でも直接確認されており、環境DNA分析結果の妥当性も確認された。これらのことから、環境DNA分析は、海域における環境条件ごとの魚類相の把握にも適用できと考えられる。

海域における潜水目視調査は、ダイバーの経験により結果がばらつくことが想定され、かつ、調査準備の時間も膨大になる。環境DNA分析では、コンタミ管理やリスト作成過程で注意が必要な部分もあるが、海域においても簡便で高精度な結果が得られる良質な調査手法といえる。

6. 今後の課題

海域における採水量について、今回採水したのは3Lであるが、採水量を増やすほど検出種数が増えており、海域において検出種数を概ね横ばいにするために必要な採水量がどの程度か今後検討していく必要がある。

参考文献

※1「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)」(令和元年9月 令和元年度土木学会全国大会第74回年次学術講演会要旨集)