

## 対馬市海洋保護区設定における魚類相の把握と地形的考察

九州大学工学部地球環境工学科 学生会員 櫻田歩夢  
九州大学大学院工学研究院環境社会部門 正会員 清野聡子  
九州大学大学院工学研究院環境社会部門 會津光博  
千葉県立中央博物館 宮正樹・佐渡哲也

### 1. はじめに

長崎県対馬市では、2010年6月から水産資源の持続可能な利用を目的とした海洋保護区(MPA: Marine Protected Area)の設定に向けて、検討が行われている。海洋保護区とは、「海洋生態系の健全な構造と機能を支える生物多様性の保全および生態系サービスの持続可能な利用を目的として、利用形態を考慮し、法律又はその他の効果的な手法により、管理される明確に特定された区域」である。持続可能な水産資源の利用のために、資源量に適した漁獲量の管理が必要であり、現在の対馬海域における魚類相を把握する必要がある。しかし、従来の魚類相調査では、目視による確認、捕獲による採集、過去の文献などによって魚類の生息を確認していたため、多大な労力と技術が必要であり、発見できる魚種に限界があった。そこで、生物から排出され、環境中に漂うDNA(環境DNA)を分析することで、生物の在、不在や生物量を推定できる環境DNA分析が現在、注目を集めている。環境DNA分析では、現地で採水濾過し、得られたDNAを分析するだけで生物の生息を確認できるため、従来の調査より効率や、コストなどの面で多くの利点がある。また、水試料から複数の生物を同時に検出できる環境DNAメタバーコーディング手法を用いることで、膨大な情報を一挙に得ることができる。

本研究では、対馬沿岸で海水を採水濾過し、環境DNAメタバーコーディング手法を用いて魚類相調査を行い、長崎県対馬に海洋保護区設定の基礎情報を得ることを目的とした。さらに、地理情報システム(GIS:Geographic Information System)を用いて、地点ごとの海底地形の情報を可視化、集積し、魚類相との相関を検討した。

### 2. 材料と方法

2016年10月25日と26日に対馬沿岸で現地調査を行った。対馬を上対馬東(NE)、上対馬西(NW)、上対馬北(NN)、下対馬東(SE)、下対馬南(SS)、下対馬西(SW)の6つのエリアに分け、上対馬15地点、下対馬14地点、計29地点で海水を採水した(図.1)。採水には、次亜塩素酸ナトリウム(ハイター)で処理したバケツとポリエチレン製の10Lタンクを用いた。下対馬西のみ1地点につき2.5Lずつ、4地点で採水し、その他のエリアでは1地点につき2Lずつ、5地点で採水し、1エリアで計10L採水した。海水はエリアごとに1つのタンクにまとめた。採水後は、エリアごとにステリベクス-HVフィルター(孔径0.45 $\mu$ m)を用いて、アスピレーターによる吸引濾過を30分間行い、海水中の環境DNAを得た。上対馬、下対馬でそれぞれブランク(精製水をろ過したもの)を1Lずつとった。採取したサンプルを調査期間

中は冷蔵保存し、調査後は冷凍保存した。

得られたサンプルからDNeasy Blood and Tissue Kit(キアゲン社)を用いてDNAを抽出した後、魚類ユニバーサルプライマーMiFish<sup>1)</sup>を用いてPCRを行い、ミトコンドリアDNA12S rRNA領域を増幅させた。得られたアンプリコンにアダプター配列等を付与した後、次世代シーケンサーMiSeq(イルミナ社)を用いて、超並列シーケンスを行い、塩基配列を決定した。得られたデータを処理して、国立生物工学情報センター(NCBI: National Center for Biotechnology Information)のデータベースと照合し、種の特定制を行った。

その後、全データを用いて、系統樹を作成し、種の精査を行った。系統樹の作成にはMRGA7を使用し、解析法には近隣結合法(Neighbor-joining method: NJ法)を用いた。

階層的クラスタ分析と多次元尺度法を行い、採水地点間の魚類相の類似性を検証した。解析にはR ver3.4.2を用いた。階層的クラスタ分析ではユークリッド距離、ウォード法に基づきクラスタ間の距離を測定し、多次元尺度法では座標値をcmdscale (Classical Metric Multidimensional Scaling)関数で求めた。

また、魚類相と周辺環境の相関の有無を検証するために、ArcGIS10.3(Esri社)を用いて、採水地点周辺の海底地質と水深の情報を可視化した。環境DNAは1000m流下すると大半が減耗すること<sup>2)</sup>から、採水地点を中心とした半径1.5kmの円エリアを分析対象とした。海底地質、水深のデータは日本水路協会から入手した。海底地質のデータは紙面データのみであったため、GISで電子化を行った。まず、紙面データにジオリファレンスを行い、幾何学的な補正と座標系の付与をした。そして、採水地点ごとに海底地質のポリゴンを作成し、海底地質の種類別にポリゴンの面積を算出した。その後、海底地質の構成を円グラフでまとめ、エリアごとに比較し、特徴を把握した。さらに、エリアごとの魚類OTU(operational taxonomic unit:操作分類単位)を目的変数、海底地質の種類別の割合(砂や岩など)を説明変数とし、海底地質の種類別に単回帰分析を行い、標本相関係数Rを求めた。Rを基に母相関係数について有意水準5%で仮設検定を行った(帰無仮説:母相関係数=0, 両側検定)。水深のデータは、ポリラインデータからTINデータへ変換し、エリアごとに勾配を算出し、エリアごとに特色を分析した。海底地質と同様に、エリアごとの魚類OTUを目的変数、勾配の大きさの割合を説明変数とし、単回帰分析を行い、検定を行った。

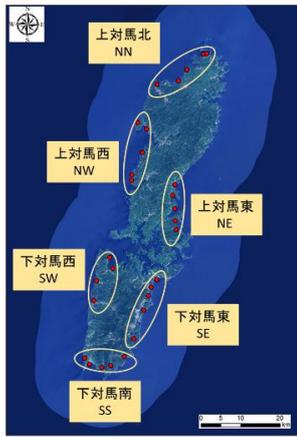


図1 対馬採水地点

3. 結果と考察

環境 DNA メタバーコーディング手法によって 6 エリアで計 178OTU の魚類を検出した。過去の調査では、375 種の魚類が確認されており<sup>3)</sup>、本調査のみで、多くの種を検出することができた。また、本調査で検出された数種は文献に記載のないものもあり、環境 DNA メタバーコーディング手法が効率のよい魚類モニタリング方法であることを示した。各エリアにおける魚類の種数を表 1 に示した。上対馬の方が下対馬より多くの種が検出される傾向にあった。また、階層的クラスタ分析により、魚類相は下対馬東と下対馬西、上対馬東と上対馬西でそれぞれ類似し、対馬の南北で大きく異なることが明らかになった(図 2)。

今後、季節ごとに調査を行い、魚類相の変化を把握することや分析エリアを細分化し、より詳細な魚類相を把握することが必要である。

海底地質において、最も絶対値の大きい相関係数を得られたのは、各エリアに占める砂、泥面積の割合と各エリアの砂底、砂泥底に生息する魚類 OTU の割合の  $R=0.8666$  であった(図 3)。上述のように検定を行ったところ、帰無仮説を棄却できたため、各エリアに占める砂、泥面積の割合と各エリアの砂底、砂泥底に生息する魚類 OTU の割合に強い正の相関があることが判明した ( $n=6, T=3.473 > t=2.776, p=0.02551$ )。また、勾配において、最も絶対値の大きい相関係数を得られたのは、各エリアに占める緩勾配(0-1.00%)の割合と各エリアの魚類 OTU の  $R=0.4053$  であった。同様に検定を行ったが、帰無仮説は棄却できなかったため、緩勾配の割合と魚類 OTU に正の相関があるかは判断できなかった( $n=6, T=0.8867 < t=2.776, p=0.4253$ )。本研究では、海底地質と魚類相の相関は見られたが、勾配と魚類相の相関は見られなかった。今後、分析エリアの細分化や季節別の魚類相との比較などによるさらなる検討が必要である。

エリア	NE	NW	NN	SE	SW	SS
魚類OTU	75	74	71	59	55	60

表 1 エリアと魚類 OTU

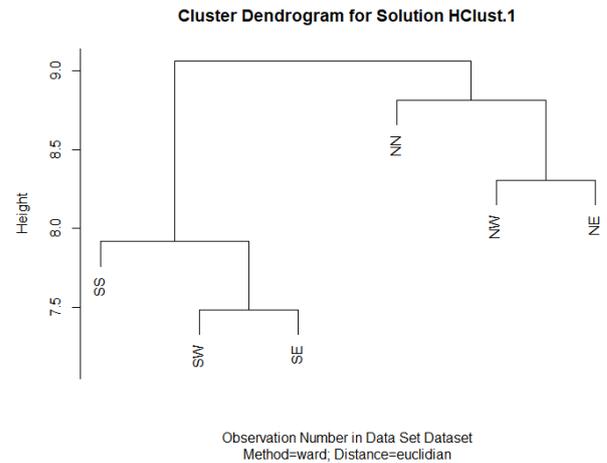


図 2 対馬海域の魚種に基づく階層的クラスタ分析によるデンドログラム

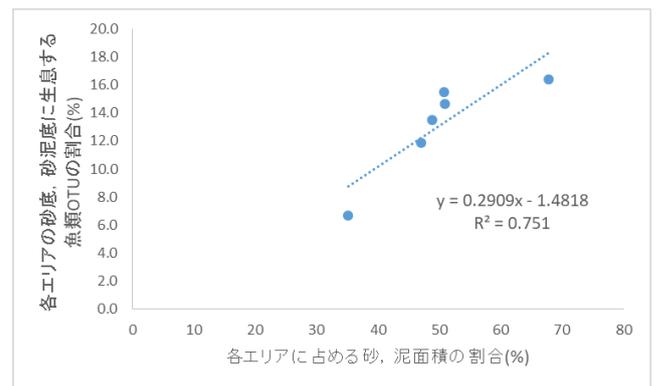


図 3 各エリアに占める砂、泥面積の割合と各エリアの砂底、砂泥底に生息する魚類 OTU の割合

4. 参考文献

- 1) Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, 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 >230 subtropical marine species. Royal Society Open Science, 2:150088
- 2) 山口皓平・赤松義久・乾隆帝・後藤益滋・小室隆 (2017) . 実河川における環境 DNA の影響範囲の検討—アユを用いた野外実験—. ELR2017 名古屋/8thICLEE 講演論旨集. 218p
- 3) Takeuchi N, Senou H, Seino S (2015). Fish fauna of Tsushima Island, Nagasaki Prefecture, Japan : Researches from 1948 to 2015. Bulletin of the Biogeographical Society of Japan 70, 1-11, 2015-12-20

5. 謝辞

現地調査は対馬市、九州大学の山内国弘、技術職員、学生諸君にご協力をいただいた。本研究は JST-CREST(JPMJCR13A2)、環境研究推進費 S-13 による。