

博多湾における環境 DNA メタバーコーディングによる魚類相の評価と沿岸環境の対応(予報)

○九州大学工学部地球環境工学科 学生会員 蔵森光輝

九州大学大学院工学研究院附属環境工学研究教育センター 會津光博

九州大学大学院 工学研究院海域港湾環境防災共同研究部門 正会員 中川康之

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

1.はじめに

近年、水域に生息している生物相を把握する手法として環境 DNA メタバーコーディング法が急速に普及している。この技術は、海域や河川、湖沼等から採水し、その水に含まれている生物由来の DNA(環境 DNA)を分析することで、採水した地点周辺に生息する生物相を把握することが出来る。

魚類を対象とした従来手法による生物相調査は、直接捕獲の後に種同定する必要がある。この従来手法では、調査には十分な技術と経験、および時間が必要である。また、種同定には専門的な知識が必要であり、多大な労力と時間を要する。一方で、環境 DNA メタバーコーディング法は採水・濾過するのみで調査は終了し、分析も短期間で終わることが可能である。また、捕獲調査では捕獲漏れの可能性を考慮する必要があるものの、環境 DNA メタバーコーディング法は生物相を網羅的に把握することができる。特に魚類に関しては、MiFish プライマー(Miya et al. 2015)が設計され、魚類であればほぼ全ての分類群で種判別が可能となっている。簡便な調査かつ高解像度な分析力を有するため、環境 DNA メタバーコーディング法のモニタリングへの適用が期待されている。

本研究では、水質汚濁が深刻とされる博多湾の魚類相を環境 DNA メタバーコーディング法で把握し、かつ水質調査も同時に行うことで、魚類相と沿岸環境の関係性の把握を目的として行った。

2.調査方法

調査は2018年3月6-7日8月29-30日、11月28-29日の計6日間、国土交通省九州地方整備局所属の監督船なじまに乗船し、実施した。博多湾内に4つの海域を設定し、東部側から順にE、M、I、Wとした。それぞれの海域で調査地点を4つ設定し、計16地点で調査を行った(図1)。全16地点において、バケツを用いて表層水を2L汲み、ポリタンクに保存した。採水した試料水は、

ステリベクス HV-フィルター(0.45 μ m)を用いて1L濾過した。濾過したフィルター内にRNAlaterを充填し、-25 $^{\circ}$ Cで冷凍保存した。その後、実験室においてDNA抽出、MiFish プライマーを用いたPCRを行い、illumina 社製次世代シーケンサーMiSeqを用いた超並列シーケンスを実施した。得られたデータはMiFish Pipelineを用いて種同定を行い、各海域の魚種リストを作成した。本研究では2018年3月に採水した試料のみを分析に供した。

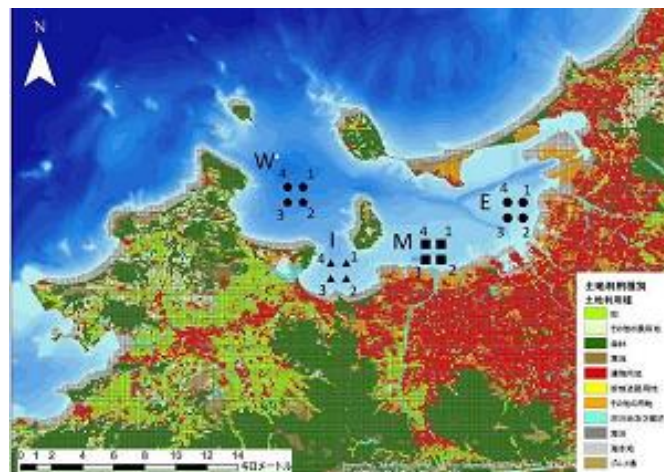


図1. 博多湾における調査地点

水質調査は HORIBA 社製マルチ水質チェッカーを使用し、各地点の表層、中層、底層それぞれで、水温・pH・pHmV・ORPmV・mS/cm・NTU・mg/L DO・g/L TDS・ppt・ σ_t の計10項目を計測した。

3.結果と考察

(1)環境 DNA メタバーコーディング

海域E、M、I、Wで検出された魚種はそれぞれ18種、12種、15種、16種であり、計35種が検出された。海域EとMは開発等による魚類相への影響が懸念されるが、種数のみでは他海域と明確な差異は見られなかった。各海域で検出されたリード数(DNA量)TOP10を表1にまとめた。E、M、I、Wの全ての海域で、コノシロが最も多く検出された。このことから、調査を実施した3月には、

博多湾全域でコノシロが多く生息していたことが推測される。また、全海域でコノシロとボラが検出された。この2種は沿岸域に生息しよく確認される種であり、環境DNAメタバーコーディング法の有用性が確認された。

表 1. 各海域で検出された魚種のリード数 TOP10

TOP10	E	リード数	M	リード数	I	リード数	W	リード数
1	コノシロ	1516	コノシロ	1380	コノシロ	5957	コノシロ	391
2	スズキ	288	マダイ	146	ボラ	260	カタクチイワシ	103
3	メジナ	229	ボラ	79	クサフグ	209	サヨリ	118
4	タラ科の一種	182	ヒイラギ	79	ヒイラギ	164	スズキ	54
5	ボラ	145	クサフグ	53	クロダイ	132	クサフグ	42
6	カタクチイワシ	110	マハゼ	38	スズキ	105	メジナ	42
7	マコガレイ	52	トラフグの一種	30	アカオビシマハゼ	44	クロダイ	34
8	マダイ	48	サヨリ	21	イダテンギンボ	28	カンパチ	31
9	カンパチ	38	ハゼ科の一種	18	ギンボ	23	ボラ	10
10	スシハゼ	23	ウツカリカサゴ	11	セスシボラ	15	コモチジャコ	18
10							ハタタテヌメリ	18
合計		2096		1885		6947		578

次に、1 海域でのみ検出された種を以下にまとめた。

海域 E では、マイワシ、ドジョウ、スケトウダラ、シモフリシマハゼ、サバ属の一種、マコガレイが唯一検出された。マイワシやサバ類は回遊魚であり、シモフリシマハゼやマコガレイは沿岸域の砂泥底を好んで住む魚である。これらのことから、海域 E は様々な種が生息している海域であると考えられる。一方で、博多湾には本来生息していないタラ科の一種が検出された。これは沿岸部に稼働する明太子工場等の排水に由来すると考えられる。

海域 M では、カマツカ、ウツカリカサゴ、ブルーギル、マハゼ、ハゼ科の一種、トラフグ属の一種が唯一検出された。河川や河口部、浅海域で見られる種であることから、海域 M に流れ込む室見川に影響を強く受けていると考えられる。

海域 I では、ボラ属の一種、ギンボ、イダテンギンボ、アカオビシマハゼが唯一検出された。海域 I には瑞梅寺川が流入しており、その河口部には今津干潟が広がっている。今津干潟には、牡蠣礁も発達していることから、砂泥質に生息する種、並びに岩礁帯に生息する種の両方が検出されたと考えられる。

海域 W では、アイナメ属の一種、シロギス、ハタタテヌメリが唯一検出された。最も沖合に位置しているが、上述の種の中には藻場を好む種が検出されている。付近に藻場が広がっている可能性が高いと推測される。

(2)水質調査

3 月と 11 月の水質に関しては、各項目で海域間での明瞭な差異が見られず、DO 値を環境基本法の環境基

準と比較したところ、貧酸素の傾向は見られなかった。しかし、8 月調査時では、海域 E の地点 4、海域 M の地点 1、2、4、および海域 I の地点 3 の底層では、DO 値が 4.0 mg/L を大きく下回り、貧酸素状態となっていた。特に海域 M は 4 地点中 3 地点が該当した。これは、この海域では浚渫による窪地が形成されており、特に貧酸素になりやすい状況になっていることが考えられる。

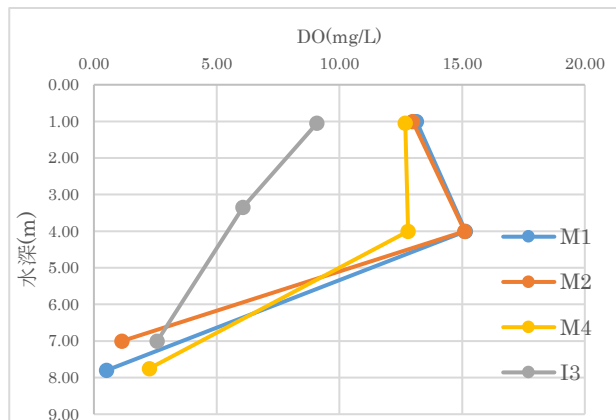


図 2. 8 月の博多湾の水深－DO グラフ

4.まとめ

環境 DNA メタバーコーディング法により、3 月調査時の各海域の魚類相が明らかとなった。開発が進んだ沿岸部の沖合に位置する海域 E、および M は水域環境の悪化が懸念されたが、種数のみでは他海域と明確な差異は検出されなかった。水質調査の結果、3 月、11 月調査時には海域ごとの明瞭な差異は確認されず、貧酸素状態ではなかったのに対し、8 月調査時には特に海域 M の底層付近で貧酸素水塊がみられた。今後、8 月および 11 月採水試料に関し、環境 DNA メタバーコーディング法による分析を実施し、魚類相と水質の関連性について、検証を行う予定である。

謝辞: 本研究は千葉県立中央博物館 宮正樹博士、神戸大学 源利文准教授、国土交通省九州地方整備局 博多港湾・空港整備事務所、JST CREST JPMJCR13A2、環境研究推進費 S-13 により支援、協力いただいた。

参考文献: M.Miya *et al.* (2015) Mifish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marines species, *R. Soc. open sci.* 2: 150088.