

環境DNAを用いた 夜間における館山港の魚類相

平岡 礼鳥

1. はじめに

船舶の係留地点である港内は静穏水域であり、餌となる生物が豊富なため幼稚魚の生息場としても良好な環境である(奥村・小畑, 2006)。しかし、港内における幼稚魚を含む魚類相を報告した例は少なく、その原因の一つとして採捕等の調査が困難であることが上げられる。魚類相の把握には一般的に網を使用した捕獲調査や、潜水による目視調査等が用いられる。これらの調査手法は定量的な評価が可能であるが、船舶の往来が激しい港内では調査の実施が困難である。また、従来の手法による夜間調査は安全性が低く、同時に多大な労力を要する。

近年、環境DNA分析による生物の存在などの評価を通じて、生態学的な調査に利用する例が増加している(山中ら, 2016)。環境DNA分析とは土壌や水中に含まれるDNAを対象としており、いつどこで生物から放出されたものか不明であることが多く、またコンタミネーションへの細心の注意が必要な手法である(源, 2018)。しかし、現地では水を採取するのみであり、野外調査における労力を要さず、港内での魚類調査には適した調査手法といえる。本研究では千葉県館山港付近を対象に環境DNAによる魚類調査を夜間実施したので、その結果について報告する。

2. 材料と方法

2020年3月13日21:30～22:30にかけて、千葉県館山港内4地点(St.1～4)、港外の磯場1地点(St.5)の計5地点において、塩分、水温測定および採水を行った(図1)。塩分は株式会社カスタムのデジタル塩分計(SA-02)を用いて、水温は棒状温度計を用いて測定した。採水はひしゃくを用いて、表層水を1L採取した。1Lポリエチレン製容器に分取し、塩化ベンザルコニウム(製品名:オスバンS、日本製薬株式会社)を1ml添加し、氷の入ったクーラーボックス内にて低温状態で保存した。なお、調査資材は全て次亜塩素酸ナトリウムにより洗浄し、

コンタミネーションの可能性を排除した。調査時はクーラーブランクとして蒸留水入りの1Lポリエチレン製容器を採水サンプルとともに運搬し、調査時および運搬時のコンタミネーションの有無を確認した。

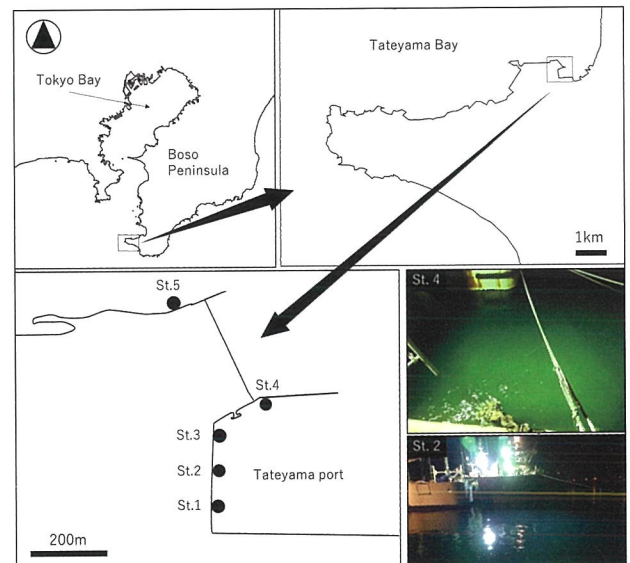


図1 館山港と調査地点

外灯により海面が照らされている地点であるSt.2とSt.4のみ現地の様子として記録した。

3. 環境DNAメタバーコーディング法

孔径0.7 μ mのGF/Fガラスフィルター(Cytiva社)により海水1Lをろ過した。フィルターはアルミホイルで包み、DNA抽出まで冷凍にて保存した。ろ過ブランクとして蒸留水を海水と同じ条件でろ過し、ろ過時のコンタミネーションを確認した。DNA抽出はDNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen社)を用いてMiya *et al.*, (2016)に従い実施した。得られたDNAは魚類のユニバーサルプライマーMiFish(Miya *et al.*, 2016)で増幅(1st PCR:8反復)、次世代シーケンサー(MiSeq, Illumina社)により分析した。得られた分析結果はMiFishパイプライン(Sato *et al.*, 2018)により処理および解析を行った。魚類のユニバーサルプライマーMiFishで判別が困難な種について

は生態情報等を加味し、種査定を行った。生態情報を用いても種査定が困難な場合は上位分類にとどめた。哺乳類などの魚類以外の塩基配列およびリード数が100以下のデータは解析から除外した。調査地点間における種組成の関係を把握するため、クラスター分析を行った。各調査地点の環境DNAによる検出結果を1/0データに置き換え、クラスタリングにはウォード法を用いた。なお、距離の測度はユークリッド距離を指定した。統計解析は統計ソフトR ver 3.6.3を用いており、統計検定の有意水準は0.05とした。

4. 結果および考察

各調査地点における塩分および水温を図2に示す。塩分は32.4～32.6であり、地点間における差はなかった。水温は港内において16.3～16.6℃であったが、港外に位置するSt.5では15.5℃と約1℃低かった。

環境DNAメタバーコーディングにより検出された魚種を地点別に表1に示す。本調査で検出された種数は33種であった。港内のSt.1で9種、St.2で12種、St.3で8種、St.4で15種であり、港内4地点で計24種が検出された。港外に位置するSt.5は19種であり、港内の地点よりも種数が多かった。各調査地点の魚類相に基づくクラスター分析の結果、ユークリッド距離5.5および4.0を目安に大きく3つのクレード（クレードA：St.5、クレードB：St.4、クレードC：St.1～St.3）に分けられた（図3）。

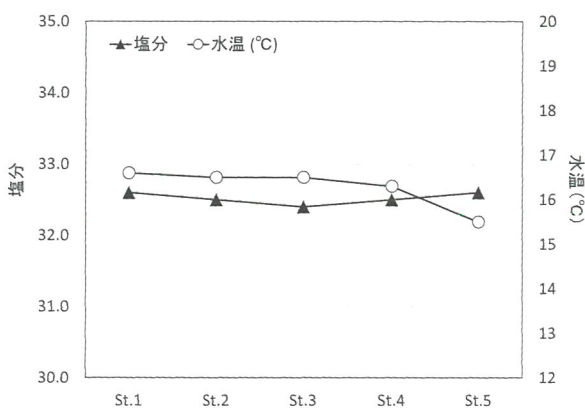


図2 地点間における水質結果（塩分および水温）

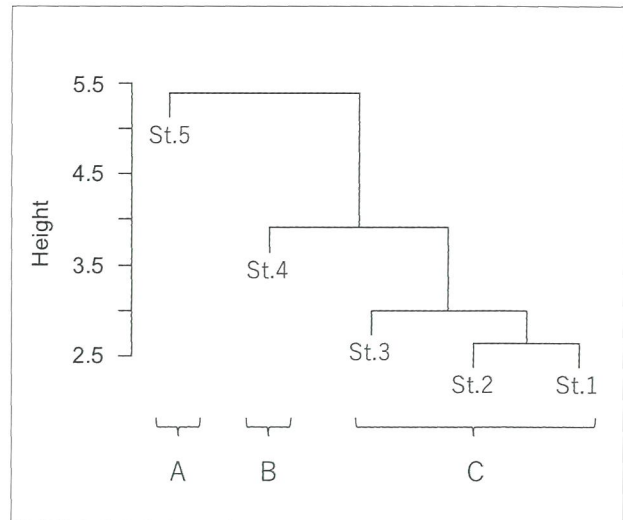


図3 各調査地点における種の検出／非検出情報を基にしたクラスター分析結果

クレードAは港外の磯場であり、ウツボやカエルウオなどの磯場に生息する種が検出され、他の地点とは明確に異なる地点であった。クレードBは港口付近に位置するSt.4であり、メジナなどSt.5と共通する種が検出され、港内でも外海の種が検出される地点であった。クレードCは港奥に位置する地点であった。環境DNA分析による結果は地点により異なり、環境の違いを一部反映したものであった。本調査では比較となる採捕等による従来の手法結果はないが、環境DNAは港内における魚類相の把握にむけ有効な手法であると考えられる。

湾奥に位置するSt.1およびSt.3はSt.2からそれぞれ約100m以内に位置するが、St.1およびSt.2で共通して検出された種は13種中6種であり約46%、St.2とSt.3で12種中6種であり50%、St.1とSt.3で9種中4種であり約44%であった（図4）。益田（2018）は環境DNAの拡散過程を把握するために、舞鶴湾に生息していないシマアジを生け簀に収容し、放出源である魚からどのくらい離れた場所でDNAが検出されるか検証した。結果として、海域で検出される環境DNAは対象とする生物が1時間以内に採水地点から30m以内にいた場合を主に反映していると報告している。一方、Yamamoto *et al.*, (2016)は放出源と考えられる魚群と環境DNA量の関係が強く相関するのは両者の距離が10～150mの範囲であると報告している。静穏水域である港内においてはこれら

表1 各地点で環境DNA分析により検出された魚種

学名	和名	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5	現地ブランク	ろ過ブランク	備考
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	クロダイ	○	○	○	○	○			※1
<i>Acentrogobius pflaumi</i>	スジハゼ	○							
<i>Asterropteryx semipunctata</i>	ホシハゼ			○	○				
<i>Atherion elymus</i>	ムギイワシ					○			
<i>Canthigaster rivulata</i>	キタマクラ					○			
<i>Cheilodactylus</i> sp.	タカノハダイ属の一種				○	○			※2
<i>Cynoglossus joyneri</i>	アカシタビラメ		○						
<i>Engraulis japonicus</i>	カタクチイワシ		○	○					
<i>Entomacrodus stellifer stellifer</i>	ホシギンボ					○			
<i>Equulites rivulatus</i>	オキヒイラギ	○	○						
<i>Gerres</i> spp.	クロサギ属の一種		○	○					※3
<i>Girella leonina</i>	クロメジナ				○	○			
<i>Girella punctata</i>	メジナ				○	○			
<i>Gymnothorax kidako</i>	ウツボ					○			
<i>Istiblennius enosimae</i>	カエルウオ					○			
<i>Istigobius campbelli</i>	クツワハゼ		○						
<i>Kyphosus vaigiensis</i>	イスズミ					○			
<i>Lateolabrax japonicus</i>	スズキ	○	○	○	○				
<i>Lateolabrax latus</i>	ヒラスズキ					○			
<i>Mugil cephalus</i>	ボラ	○	○		○	○			
<i>Omobranchus elegans</i>	ナベカ				○				
<i>Ophisurus macrorhynchus</i>	ダイナンウミヘビ		○						
<i>Parablennius yatabei</i>	イソギンボ				○	○			
<i>Paralichthys olivaceus</i>	ヒラメ				○				
<i>Plotosus japonicus</i>	ゴンズイ				○	○			
<i>Pomacentrus coelestis</i>	ソラスズメダイ					○			※4
<i>Rhynchopelates oxyrhynchus</i>	シマイサキ	○	○	○	○				
<i>Sardinops melanostictus</i>	マイワシ	○	○	○	○				※5
<i>Scorpaenodes evides</i>	イソカサゴ			○		○			
<i>Sebastes</i> spp.	メバル属の一種					○			※6
<i>Sebastiscus marmoratus</i>	カサゴ	○			○	○			
<i>Takifugu</i> spp.	トラフグ属の一種	○	○		○	○			※7
種数合計		9	12	8	15	19	0	0	

※1. *Acanthopagrus schlegelii*_クロダイ、*Acanthopagrus sivicolus*_ミナミクロダイで判別が困難だが、分布域と登録種名からクロダイとした。

※2. *Ganiistius zonatus*_タカノハダイ、*Goniistinus quadricornis*_ユウダチタカノハの判別が困難であるため、タカノハダイ属の1種とした。

※3. *Gerres oyena*_ミナミクロサギ、*Gerres equulus*_クロサギの判別が困難であるため、クロサギ属の1種とした。

※4. *Pomacentrus coelestis*_ソラスズメダイ、*Pomacentrus caeruleus*_カールレアンダムゼル、*Pomacentrus alleni*_アレンズダムゼル等で判別が困難だが、分布域からソラスズメダイとした。

※5. *Sardinops melanostictus*_マイワシ、*Sardinops sagax*_カリフォルニアマイワシで判別が困難だが、分布域からマイワシとした。

※6. *Sebastes*_メバル属内の判別が困難であるため、メバル属の1種とした。

※7. *Takifugu*_トラフグ属内の判別が困難であるため、トラフグ属の1種とした。

の報告よりもより拡散範囲が限定的であり、より地点間の魚類相の情報を反映している可能性がある。

現地における調査は調査員1名で約1時間以内に現地作業を終了し、夜間における作業中の危険性は皆無であった。現地作業については従来の手法よりも簡易かつ安全である。しかし、環境DNA分析はコンタミネーションの危険性を有していることや定量的評価が困難であることなど、課題は多く上げられる(深谷, 2018; 源, 2018)。今後、調査手法の一つとして有効的に活用するために、技術向上にむけた取り組みが重要である。

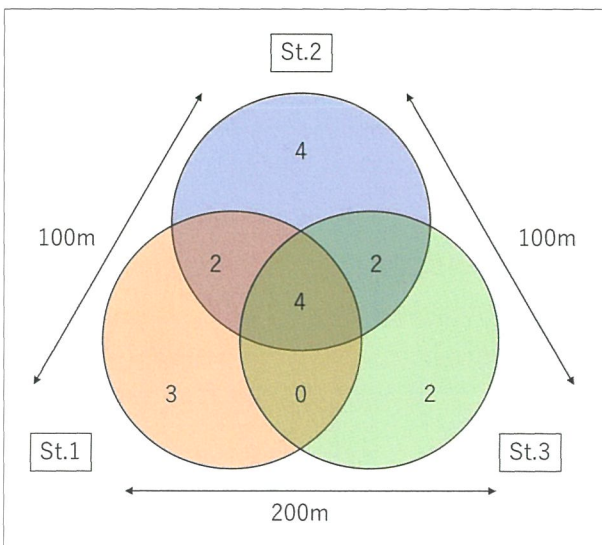


図4 湾奥3地点における環境DNA分析により検出された魚種のベン図

青、緑、赤はそれぞれ各地点でのみ検出された種数であり、重なっている部分は各地点で共通して検出された種数。

参考文献

- 深谷肇一・長田穰・源利文. 2018. 環境DNAによる個体数・生物量推定の可能性. 海洋と生物, 40 (1) : 47-53.
- 益田玲・村上弘章・高橋宏司・源利文・宮正樹. 2018. 環境DNAの有効性: 水槽実験とフィールドでの検証. 海洋と生物, 40 (1) : 17-22.
- 源利文. 2018. 環境DNAとは何か (特集 環境DNAが拓く魚類生態研究の未来). 海洋と生物, 40 (1) : 3-8.
- Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J. Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M. and Iwasaki, W. 2016. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. Royal Society Open Science, 2 : 150088.
- 奥村重信・小畑泰弘. 2006. キジハタ増殖魚礁の開発と漁港への応用. 日本水産学会誌, 72 (3) : 463-466.
- Sato, Y., Miya, M., Fukunaga, T., Sado, T., and Iwasaki, W. 2018. MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. Molecular biology and evolution, 35 (6) : 1553-1555.
- Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K., Takahashi, K., Sawada, H., Murakami, H., Tsuji, S., Hashizume, H., Kubonaga, S., Horiuchi, T., Hongo, M., Nishida, J., Okugawa, Y., Fujiwara, A., Fukuda, M., Hidaka, S., Suzuki, W. K., Miya, M., Araki, H., Yamanaka, H., Maruyama, A., Miyashita, K., Masuda, R., Minamoto, T. and Kondoh, M. 2016. Environmental DNA as a 'Snapshot' of Fish Distribution: A Case Study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. PLOS ONE, 11(3) : e0149786.
- 山中裕樹・源利文・高原輝彦・内井喜美子・土居秀幸. 2016. 環境DNA分析の野外調査への展開. 日本生態学会誌, 66 (3) : 601-611.

