

3

環境DNAを用いた 神明川における魚類相調査

山田 裕貴

1. はじめに

当社ではこれまで、新人研修の一環として、千葉県鴨川市小湊を流れる神明川において底生生物および付着藻類の調査を実施している。一方、魚類も調査対象としているが、現在までにウグイ *Tribolodon hakonensis*、ヨシノボリ類 *Rhinogobiu* sp.、スミウキゴリ *Gymnogobius* sp.のみ確認されている（浦野ら、1996；伊東ら、1997；筑後ら、1999；鵜澤ら、2000）。

近年、新たな生物分布調査手法として、環境DNA分析が注目されている（環境省、2021）。環境DNA分析は現地でも水を採取するのみで、その環境に生息する生物を推定することが可能である。本研究では、千葉県鴨川市小湊を流れる神明川を対象に、従来のタモ網による採集調査と環境DNA分析による魚類調査結果について報告する。

2. 方法

本調査は、千葉県神明川3地点（St.1～3）において採集および採水を行った。タモ網による採集調査は、1地点あたり2人、作業時間30分を目安に実施した。環境DNA分析による魚類調査は、柄杓を用いて、表層水を2L採水した。採水した試料に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2ml添加し、氷の入ったクーラーボックス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2L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。

試水およびブランク水を孔径0.7 μ mガラス繊維ろ紙GF/F（Cytiva, Marlborough, MA, USA）上に2L濾過採集した。濾過したフィルターはアルミホイルで包み、DNA抽出まで冷凍保存した。DNA抽出はDNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN, Hilden, German）を用いてMiya *et al.*（2015）に従い実施した。抽出したDNAは魚類のユニバーサルプライ

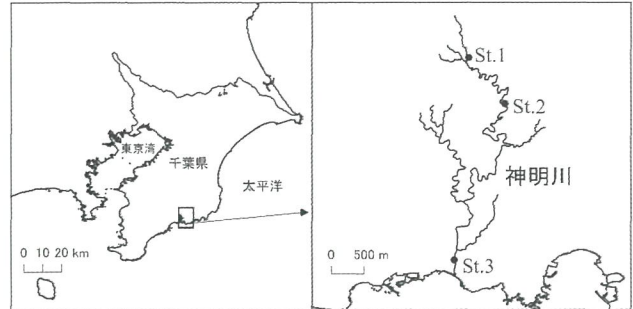


図1 調査場所

マーMiFish (Miya *et al.*, 2015)で増幅し(1st PCR: 8反復)、次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina)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を加味し、種査定を行った。さらに、生態情報を加味し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10以下のデータは解析から除外した。

3. 結果・考察

採集調査および目視観察の分析結果は、6種が出現した（表1）。地点別では、上流に位置するSt.1で2種、St.2で4種、河口付近のSt.3で2種がみられた。

表1 採集調査および目視観察にて確認された種リスト

学名	和名	St.1	St.2	St.3
<i>Tribolodon hakonensis</i>	ウグイ	○	○	
<i>Mugil cephalus cephalus</i>	ボラ			△
<i>Sicyopterus japonicus</i>	ボウズハゼ		○	
<i>Tridentiger</i> sp.	ヌマチチブ			○
<i>Rhinogobius</i> sp.	シマヨシノボリ	○	○	
<i>Gymnogobius</i> sp.	スミウキゴリ		○	

○: 採集調査で確認、△: 目視で確認

環境DNA分析のデータ解析結果は、魚類環境DNAメタバーコーディング法により、15種が検出された（表2）。地点別では、上流に位置するSt.1で3種、St.2で3種、河口付近のSt.3で15種がみられた。

表2 各地点における環境DNA分析により検出された魚種およびリード数

No.	目	科	学名	和名	4月					
					St.1		St.2		St.3	
					リード数	%	リード数	%	リード数	%
1	ウナギ	ウナギ	<i>Anguilla</i> sp.	ウナギ属の一種*1			1273	5.19	4390	6.25
2	コイ		<i>Opsariichthys platypus</i>	オイカワ	15	0.07			4691	6.68
3			<i>Tribolodon hakonensis</i>	ウグイ	21476	98.18	18712	76.25	4291	6.11
4			Cyprinidae	コイ科の一種*2					4890	6.96
5	サケ	アユ	<i>Plecoglossus altivelis altivelis</i>	アユ					237	0.34
6	ボラ	ボラ	<i>Mugil cephalus cephalus</i>	ボラ					1413	2.01
7	スズキ	スズキ	<i>Lateolabrax japonicus</i>	スズキ					14	0.02
8		カワアナゴ	<i>Eleotris oxycephala</i>	カワアナゴ					36	0.05
9		ハゼ	<i>Luciogobius</i> sp.	ミミズハゼ*3					1699	2.42
10			<i>Acanthogobius flavimanus</i>	マハゼ					68	0.10
11			<i>Sicyopterus japonicus</i>	ボウズハゼ					517	0.74
12			<i>Tridentiger</i> sp.	チチブ属の一種*4					30601	43.55
13			<i>Rhinogobius giurinus</i>	ゴクラクハゼ					3690	5.25
14			<i>Rhinogobius</i> sp.	ヨシノボリ属の一種*5	365	1.67	4554	18.56	9561	13.61
15			<i>Gymnogobius</i> sp.	ウキゴリ属の一種*6					4135	5.89

科名、種名及び並び順は、「日本産魚類検索 全種の同定 第三版」に準拠した。

*1: eDNA解析ではニホンウナギ、オオウナギを判別できないため、ウナギ属の一種として扱った。

*2: eDNA解析ではコイ、ゲンゴロウブナ、モツゴを判別できないため、コイ科の一種として扱った。

*3: eDNA解析ではミナミヒメミズハゼ、ミミズハゼを判別できないが、分布情報からミミズハゼとして扱った。

*4: eDNA解析ではヌマチチブ、チチブを判別できないため、チチブ属の一種として扱った。

*5: eDNA解析ではクロヨシノボリ、オオヨシノボリ、シマヨシノボリ、ルリヨシノボリ、カズサヨシノボリを判別できないため、ヨシノボリ属の一種として扱った。

*6: eDNA解析ではスミウキゴリ、ウキゴリを判別できないため、ウキゴリ属の一種として扱った。

環境DNA分析により、既知の採集では確認されなかった12種が検出された。特に、St.3は水深が80cm以上あり、夕暮網による採集調査が困難であったが、環境DNA分析では最大15種検出された。このことから、採集調査が厳しい環境においても環境DNA分析を用いることで、簡便に魚類相調査が行え、また、採集調査では抜け落ちていた種の確認が可能であることを再認識できた。

一方、St.2の採集調査において確認されたボウズハゼ *Sicyopterus japonicus* およびスミウキゴリは、DNA分析では検出されなかった。分析に用いた環境水は河川の瀬の表層水を採水しており、河川の底を遊泳するあるいは淵に生息する2種の環境DNAを十分量拾うことができなかった可能性が考えられる。反復採水および中層の採水など、環境に応じて採水手法を工夫することで、検出精度を高めることができると考えられる。

本分析結果の表からは削除したが、27種の高産魚が環境DNA分析より検出され、外洋の深海魚であるリュウグウノツカイ *Regalecus glesne* が最もリード数が多かった。その理由として、分析に用いた環境水を採水する前に、海洋で船上研修を実施しており、その際、衣類に付着した海水からのコ

ンタミネーションの疑いが懸念される。この点については、環境省が発行する手引きにも注意点として記載されている(環境省, 2021)。今後、コンタミネーションを未然に防ぐために、サンプリングの順番や衣服、特に帽子やライフジャケット等に注意してサンプリングを実施する必要があることを再認識した。また、試水を濾過する際にも、現地調査で着用した衣服を着用しないほうが良いと考えられた。

参考文献

- 環境省. 2021. 環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の引き 第2版. 環境省自然環境局生物多様性センター. 85 pp.
- 伊東永徳・武山真也・中山和子・伊藤 学・浮田達也・水谷美直子. 1997. 平成9年度小湊周辺における河川・海域環境調査. 株式会社日本海洋生物研究所 1997年年報, 2-30.
- 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. 2015. 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.
- Sato, Y., Miya, M., Fukunaga, T., Sado, T., 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: 1553-1555.
- 筑後 海・山本貴史・禰亙田真弓・近藤桂一. 1999. 平成10年度小湊周辺における河川・海域環境調査報告書. 株式会社日本海洋生物研究所 1999年年報, 2-27.
- 浦野庸子・鈴木信也・松丸 智・Tim Dempster・栗田貴代・師田 彰子・林野 原. 平成8年度小湊周辺における河川・海域環境調査. 株式会社日本海洋生物研究所 1996年年報, 3-41.
- 鵜澤 聡・西田和功・松丸 智・筑後 海・禰亙田真弓・山本貴史. 2000. 平成11年度小湊周辺における河川・海域環境調査報告書. 株式会社日本海洋生物研究所 2000年年報, 43-73.

