



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	環境DNAメタバーコーディングと電気ショッカー採捕調査による魚類相結果の比較
Author(s)	馬谷, 佳幸; 福澤, 加里部
Citation	北方森林保全技術, 42, 8-15
Issue Date	2024
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93955
Type	departmental bulletin paper
File Information	2023_42 (2).pdf



I - 2 環境 DNA メタバーコーディングと電気ショッカー採捕調査 による魚類相結果の比較

馬谷 佳幸^{1,2}, 福澤 加里部¹

¹ 中川研究林, ² (現所属) 和歌山研究林

はじめに

近年、土壌や水などの環境中に存在する生物由来の DNA (環境 DNA) を分析することで、生物情報を得る手法が急速に広まっている。本手法は、生物の採捕や目視観察を必要とせず、現地では少量の環境 DNA を採取するだけであり、簡便かつ非侵襲的な調査法として注目を集めている (高原ほか 2016 ; 山中ほか 2016)。環境 DNA 分析には、特定の対象種の DNA を検出する種特異的な「単一種検出法」と、特定の分類群 (例えば魚類) の DNA を同時並列的に検出するメタバーコーディングと呼ばれる「多種同時検出法」に大別される (環境 DNA 学会 2024)。後者は大規模な魚類相モニタリングに活用され始めている (源ほか 2016 ; Yamamoto et al. 2017 ; Nakagawa et al. 2018 ; 北川ほか 2020 ; 速水ほか 2021)。2019 年には、全国の沿岸や河川・湖沼の魚類を対象とした多地点・高頻度のメタバーコーディングによる環境 DNA 観測を行うために、全国の大学や水産研究機構等が連携して ANEMONE (All Nippon eDNA Monitoring Network) が設立された。北海道大学の各研究林も 2020 年から ANEMONE に参加して定期的に環境 DNA 調査を実施している。

北海道大学中川研究林では、電気ショッカーを用いた採捕調査による魚類相モニタリングを 1999 年から実施しており (Umatani et al. 2020)、その調査地のひとつを ANEMONE の環境 DNA 調査地点に設定した。今回は両調査の結果を比較することにより、環境 DNA メタバーコーディングが生息する魚類相の把握と各魚種の個体数や生物量の推定に有効かどうかを検証することを目的とした。

材料および方法

【調査地点と調査時期】

調査は、北海道北部の天塩川水系琴平川で行った。調査地点は、天塩川河口から約 60km 上流付近で合流する支流琴平川の合流点から約 3.5km 上流地点である (N44.7766 E142.0939、標高 40m)。電気ショッカーによる採捕調査は 1999 年から毎年 6 月、8 月、10 月頃の年 3 回実施し、環境 DNA 調査は 2020 年から毎年 4 月、6 月、8 月、10 月の年 4 回実施している。2023 年 12 月時点において関係者に公開されていた、2020 年と 2021 年の環境 DNA 調査の分析結果に基づき、両調査の結果が比較できる 2020 年 6 月 17 日、8 月 18 日、10 月 15 日、2021 年 6 月 16 日、8 月 17 日、10 月 19 日のデータを解析に用いた。

【採捕調査】

流路長 50m 区間において、電気ショッカー (Smith-Root 社製、LR-24 型) とタモ網を用いて魚類を 3 回繰り返して採捕した (写真 1、2)。採捕した魚類は、クローブオイル水溶液で麻酔し、魚種の同定、体サイズと体重を測定したのちに覚醒を待って採捕区間内に放流した。各魚種の生息個体数を除去法により推定し、各魚種の平均体重との積により調査区間の生物量 (g) を算出した。なお、生息個体数の推定には、Program capture (<https://www.mbr-pwrc.usgs.gov/software/doc/capture/capture.html>) の model number 4: removal を用いた。

【環境 DNA 調査】

採捕調査区間の下流端から約 50m 下流の右岸にて、採捕調査を行う直前に、チャック付きポリ袋を用いて環境水を 1 L 以上採集した後、50 mL シリンジとステリベクスを用いてろ過処理を行った（写真 3、4）。環境水はステリベクス 1 本につき 500 mL ろ過し、2 本を合わせて計 1,000mL のろ過サンプルを得た。ろ過処理後、ステリベクス内の環境水を十分に排出した上で、約 2 mL の RNeasy (Sigma-Aldrich) を DNA 保存液として充填してサンプルを固定し、クーラーボックスに入れて実験室に持ち帰った。サンプルは-20℃で冷凍保存し、定期的に ANEMONE 事務局の筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所へ冷凍便で送付した。DNA 分析は ANEMONE で実施された。分析には、1 サンプルにつき 400μL に溶出された DNA 溶液のうち 2μL が抽出され、次世代シーケンサーを用いた環境 DNA メタバーコーディング解析（内部標準は 10・20・40・80 コピーの 4 種類）に使用された。

今回分析に用いられた環境 DNA メタバーコーディングでは、配列の相同性が高いことにより分類が困難な種が存在し、属までの分類になるものや近縁の他種が代表種として出力されてしまう可能性があった。そこで、米国国立生物工学情報センターの BLAST 検索機能 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて DNA の配列との相同性 99.0 %以上を基準として種を再判定し、種判定ができなかった種については属レベルにとどめた。

なお、2020 年 10 月と 2021 年 10 月の調査時に精製水 500 mL をろ過したサンプルをそれぞれ作製し、採水・ろ過の作業に伴うコンタミネーション（試料汚染）を確認するためのネガティブコントロールとしたが、分析結果においてはどちらも DNA は検出されなかった。



写真 1：採捕調査地（下流端から上流方向を写す）



写真 2：電気ショッカーを用いた魚類採捕の様子



写真 3：環境 DNA 調査地（採水地点）



写真 4：環境水のろ過作業の様子

結果及び考察

【採捕調査】

すべての調査日でヤマメ、フクドジョウ、スナヤツメ北方種（以下スナヤツメ）が採捕された（写真 5-8）。スナヤツメは 2021 年 8 月の成体 2 個体以外はアンモシーテス（幼生）だった。また、2020 年 10 月と 2021 年 10 月の調査時に調査区間においてサケ生体を各 3 個体目視で確認している（写真 9）。

調査区間における各魚種の生息個体数の推移を図 1 に、生物量の推移を図 2 に示した。2021 年の 8 月と 10 月のフクドジョウについて、生息個体数が多いわりに生物量が少ないのは、0 歳魚と推測される小型個体が大量に採捕されたためである（写真 10）。これは琴平川の他の採捕調査地でも同じ傾向だったため、2021 年春の繁殖・ふ化が好条件だったと考えられる。



写真 5：ヤマメ



写真 6：フクドジョウ



写真 7：スナヤツメ（成体）



写真 8：スナヤツメのアンモシーテス（幼生）



写真 9：調査区間で目視確認されたサケ



写真 10：0 歳魚と推測される小型のフクドジョウ

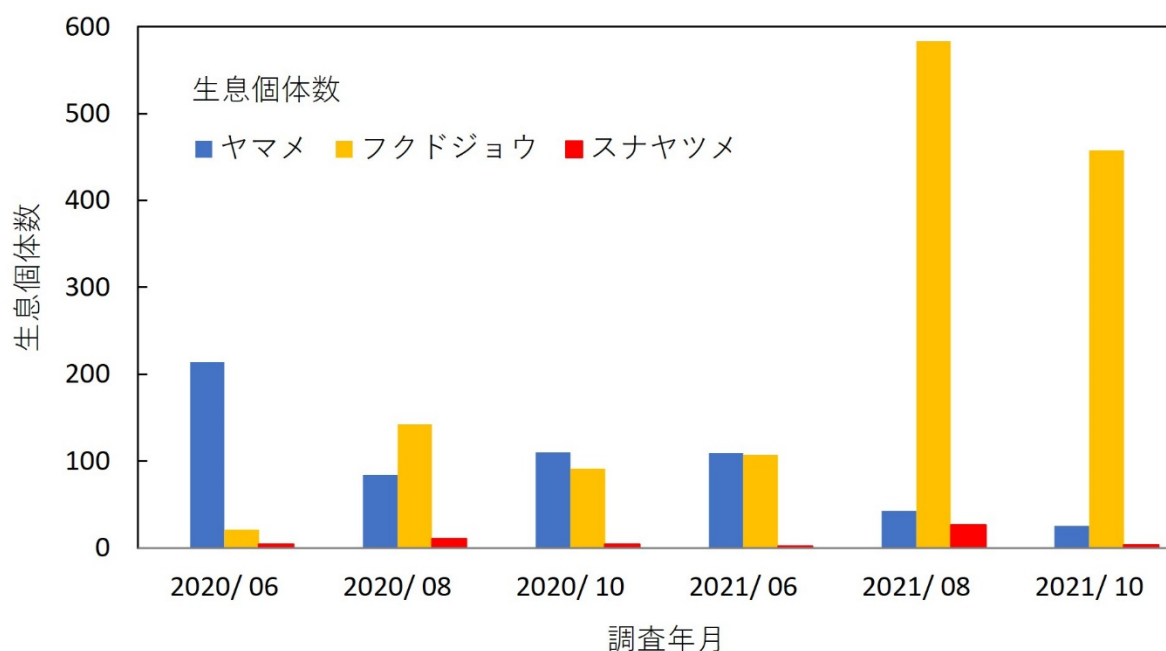


図 1 : 採捕調査により推定された調査区間における魚類の生息個体数の推移

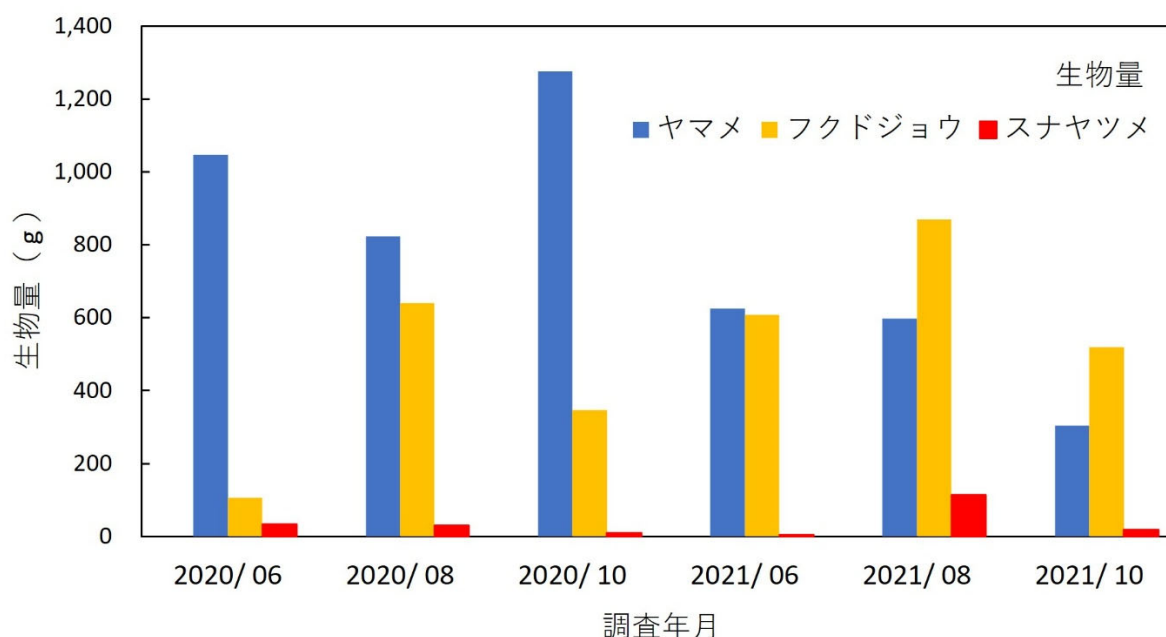


図 2 : 採捕調査により推定された調査区間における魚類の生物量の推移

【環境 DNA 調査】

メタバーコーディングでの検出後 BLAST 検索をした結果、20 科 26 種(うち属レベル 9 種)に判定された(表 1)。このうち、BLAST 検索で修正されたのはサケ科サケ属がサケ属とサケに区分されたほか 5 種であった(フグ科クサフグがトラフグ属に、メジナ科メジナがメジナ属に、ハゼ科チャガラ属がチャガラに、ニシン科マイワシ属がマイワシに、アンコウ科アンコウがアンコウ属に判定された)。BLAST 検索におけるサケ属判定の近縁種間の DNA 配列の相同性は、ヤマメ・アマゴ・タイワンマス・サケ・ビワマスが 100%や 99.41%のように高かったため、サケ属レベルの判定にとどまった。一方、サケ判定の相同性は、サケ 99.41%、ベニザケ 98.82%、ギンザケ 98.24%のように、サケのみが高かったため種判定できた。フクドジョウ属

判定の相同性は、*Barbatula barbatula*、*Barbatula oreas*、*Barbatula toni*（いずれも和名はフクドジョウ）が上位を占めていたが、複数の学名で相同性が 99.0%以上、もしくはいずれも 99.0%以下の場合だったことから、すべて属レベルにとどめた。エゾハナカジカ判定の相同性は、いずれもエゾハナカジカ 99.41%、ハナカジカ 97.06%であった。琴平川の上流域には一生を河川で過ごす純淡水魚のハナカジカが優占して生息しており（馬谷・奥田 2017）、本調査区間でもしばしば採捕されている（Umatani et al. 2020）。仔魚期に海で育つ両側回遊魚のエゾハナカジカが生息しているのか検討の余地はある一方、解析時のデータベースに起因する近縁種の誤同定の可能性も考えられる。上記以外に検出された魚種の環境 DNA はほとんどがごく微量であり、海水魚が多かった。これらは調査地に生息していないにもかかわらずサンプルからその種の環境 DNA が検出される偽陽性と考えられる。琴平川流域には民家がなく生活排水の影響はない。道路工事や釣り人の影響は否定できないが、シーケンス解析時に生じるエラーに起因する誤検出の可能性も考えられる。

環境水 1L あたりに換算したうえで 1.0 コピー以上の環境 DNA 濃度を有効とすると、フクドジョウ属、サケ属、サケ、エゾハナカジカ、スナヤツメ、および、海水魚で偽陽性と考えられるトラフグ属、コケギンポ、カサゴが残った（表 2）。なお、2020 年の環境 DNA 濃度が 2021 年と比べて全体的に低い原因は不明である。

表 1: 環境 DNA メタバーコーディングで検出後 BLAST 検索によって種判定された魚類の環境 DNA 濃度 (抽出 DNA 2pL あたりの DNA コピー数の総数)。*: 海水魚を示す。

科	種 or 属		2020年			2021年		
			6月	8月	10月	6月	8月	10月
ドジョウ科	フクドジョウ属		30.0665	15.1159	2.2785	113.1509	211.1697	36.1426
	ドジョウ			0.0005				
サケ科	サケ属		14.4872	8.1821	3.5826	31.4573	32.1412	7.6817
	サケ				13.3915	1.4323		35.7156
カジカ科	エゾハナカジカ			0.0005	0.0516	0.0464		0.1234
ヤツメウナギ科	スナヤツメ北方種			0.0010		0.0166	0.1475	0.0148
フグ科	トラフグ属	*					0.0148	0.0148
コケギンボ科	コケギンポ	*					0.0098	0.0025
メバル科	カサゴ	*					0.0098	
メジナ科	メジナ属	*	0.0013				0.0049	0.0025
ハゼ科	アサヒアナハゼ	*					0.0049	
	イソハゼ	*					0.0049	
	チャガラ	*						0.0025
	シマウキゴリ			0.0005				
タウエガシ科	ダイナンギンポ属	*					0.0049	
	タウエガシ属	*						0.0025
カワハギ科	アミメハギ	*					0.0049	
ニシン科	マイワシ	*					0.0049	
アンコウ科	アンコウ属	*						0.0025
ダツ科	ハマダツ	*						0.0025
タイ科	クロダイ属	*	0.0019					
カタクチイワシ科	カタクチイワシ	*	0.0013					
ボラ科	ボラ	*	0.0013					
ヘビギンボ科	ヘビギンポ	*	0.0006					
コイ科	ウグイ属		0.0006					
スズキ科	スズキ	*		0.0005				

表 2 : 定量下限 (1.0 コピー/ 環境水 1L) 以上で検出された魚類とそれらの環境 DNA 濃度 (環境水 1L あたりの推定 DNA コピー数の総数)。*: 海水魚を示す。

科	種 or 属	2020年			2021年		
		6月	8月	10月	6月	8月	10月
ドジョウ科	フクドジョウ属	6,013.3	3,023.2	455.7	22,630.2	42,234.0	7,228.5
サケ科	サケ属	2,897.4	1,636.4	716.5	6,291.5	6,428.2	1,536.3
	サケ			2,678.3	286.5		7,143.1
ハゼ科	エゾハナカジカ			10.3	9.3		24.7
ヤツメウナギ科	スナヤツメ北方種				3.3	29.5	3.0
フグ科	トラフグ属	*					3.0
コケギンボ科	コケギンボ	*				2.0	
メバル科	カサゴ	*				2.0	

【採捕調査と環境 DNA 調査の結果比較】

採捕調査で確認された魚類の環境 DNA 濃度の推移を図 3 に示した。採捕状況から、種判定までされなかったサケ属がヤマメ、フクドジョウ属がフクドジョウと推測される。よって、本調査地の主要な魚類 2 種は、すべての調査日において環境 DNA メタバーコーディングで検出されたといえる。サケの DNA が 2021 年 6 月にも検出されている。これは春に浮上して海へ下る稚魚、もしくは前年秋～冬に産卵遡上した個体の残渣が起因した可能性がある。なお、サケは 1 個体 3 kg 程度とすると、2020 年 10 月と 2021 年 10 月の調査区間のサケの生物量はともに 9,000g 程度になるが、環境 DNA 濃度はそれほど高くないように見える。スナヤツメは 2021 年に検出されたが 2020 年には検出されなかった。2020 年は 2021 年と比べて全体的に環境 DNA 濃度が希薄であったことから、他の種と比べて生物量が少ないスナヤツメは検出されなかったと思われる。一方で、2021 年 8 月スナヤツメは生物量がある程度大きいにもかかわらず環境 DNA 濃度は低かったため、他の種と比べて環境 DNA が検出されにくい可能性もある。これは幼生期に砂の中で生活するため、河川水中に DNA が放出されにくいことが考えられる。

ヤマメやフクドジョウの生息個体数や生物量と環境 DNA 濃度はあまり一致していなかった。メタバーコーディングの多種同時検出法はそれぞれの種の生物量の相対的な比較はできないとされる (環境省 2021)。これに対して、リアルタイム PCR 等を用いた単一種検出法では特定の種の環境 DNA 濃度が生物量と相関しているため (Doi et al. 2017 ; Mizumoto et al. 2018)、サンプル間の量的な比較が可能とされる (高原ほか 2016)。ただし、一度の分析で 1 種の情報しか得られないため、複数の種を調べたい場合は種数に応じた分析コストがかかる (環境省 2021)。本調査地では主要魚種が少ないため、主要魚種のみをモニタリングする場合は、単一種検出法を用いることも有効であろう。しかしながら、魚類相モニタリングを目的とするならば多種同時検出法が必要であることから、メタバーコーディングにおいて定量性も把握できることが望ましく、今後の技術開発が期待される。

検出結果について、魚種が調査地に実際にいるかを判断するには、既存の生息情報や魚種の生息条件なども踏まえた上で結果を評価する必要がある。また、判定が困難な種を区別することが重要である場合は、必要に応じて環境 DNA 分析の単一種検出法あるいは採捕調査を併用していくことが望ましいといえる。また、魚種ごとの環境 DNA の特性や環境 DNA が水中に滞在する時間や範囲など時空間的な距離の把握は重要であり、幼魚と成魚の割合などの成長段階に応じた個体群構造が把握できれば採捕調査の代替にもなり得る。今後の研究の発展に注視したい。

多種同時検出法である ANEMONE の環境 DNA メタバーコーディング観測は、現時点にお

いては、主要な魚類相を把握できるが、正確な個体数や生物量の推定、近縁種の識別は不得意なことが確認された。万能ではなく、調査手法の得意・不得意を認識したうえで研究・教育に活用していければよいと考えられる。

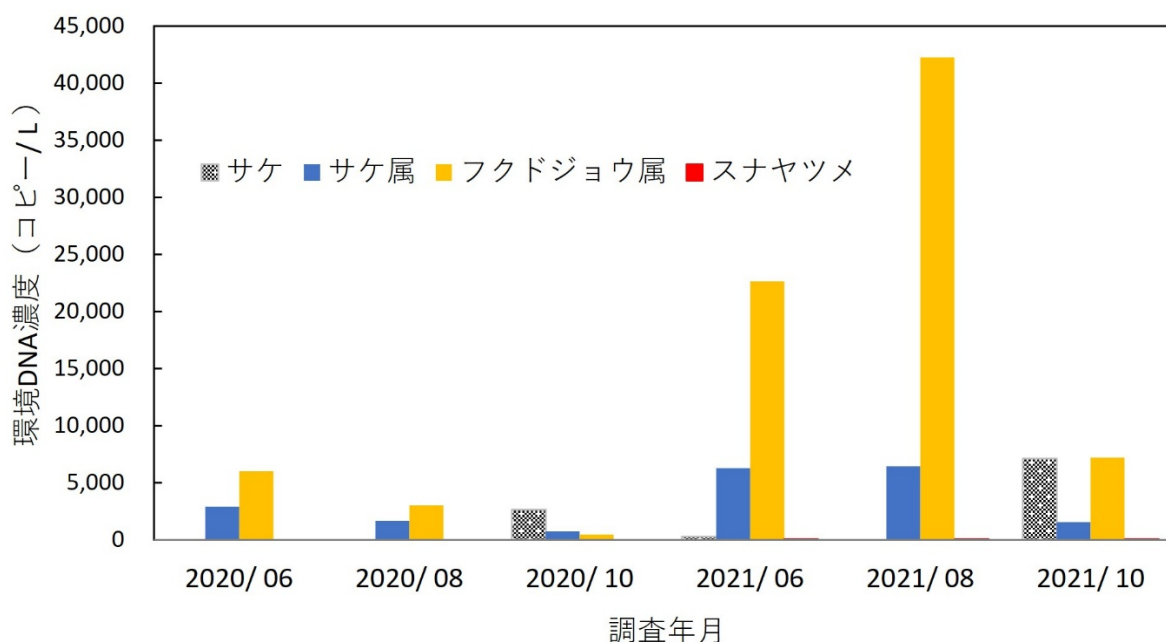


図 3 : 採捕調査で確認された魚類の環境 DNA 濃度の推移。環境水 1L あたりの推定 DNA コピー数の総数を示した。

謝辞

電気ショッカーを用いた魚類採捕や環境水のろ過作業などのフィールドワークには、北海道大学中川研究林の鷹西俊和氏、伊藤悠也氏、金子潔氏、間宮渉氏、高橋悠河氏、特定非営利活動法人 ECO の声の村上泰弘氏、石井健一氏、古田泰之氏、大塚由美子氏、斉藤満氏にご協力いただいた。また、同大中川研究林の阿部由希子氏、根津京子氏にはデータの入力作業にご協力いただいた。国立研究開発法人水産研究・教育機構水産資源研究所の水本寛基博士には環境 DNA 解析に関してご助言いただいた。東北大学の田辺晶史博士には環境 DNA の分析データについてご確認いただいた。ここに厚く御礼を申し上げる。本研究の一部は、ANEMONE の一環で実施され、JSPS 科研費 19H05641 の助成を受けたものである。

引用文献

- Doi H・Inui R・Akamatsu Y・Kanno K・Yamanaka H・Takahara T・Minamoto T (2017) Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology*, 62 (1) : 30-39.
- 速水将人・石山信雄・水本寛基・神戸崇・下田和孝・三坂尚行・ト部浩一・長坂晶子・長坂有・小野理・荒木仁志・中嶋信美・福島路生 (2021) 北海道の溪流魚を対象とした治山ダムの改良効果の検証：長期モニタリングによる検証と環境 DNA の活用可能性. *応用生態工学*, 24 (1) : 61-73.
- 環境 DNA 学会 (2024) 環境 DNA 調査・実験マニュアル. Ver 3.0 : pp124
- 環境省自然環境局生物多様センター (2021) 環境 DNA 分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き. 第 2 版 : pp86
- 北川哲郎・村岡敬子・山田拓也・中村圭吾 (2020) 河川水辺の国勢調査 (魚類) における環境

- DNA メタバーコーディング解析の試行事例分析. 河川技術論文集, 26 : 319-324.
- 源利文・山本哲史・笠井亮秀・近藤倫生 (2016) 環境 DNA を用いた沿岸域における魚類モニタリング. 沿岸海洋研究, 53 (2) : 173-178.
- Mizumoto H・Urabe H・Kanbe T・Fukushima M・Araki H (2018) Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid. *Limnology*, 19 : 219-227.
- Nakagawa H・Yamamoto S・Sato Y・Sado T・Minamoto T・Miya M (2018) Comparing local-and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshwater Biology*, 63 (6) : 569-580.
- 高原輝彦・山中裕樹・源利文・土居秀幸・内井喜美子 (2016) 環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～. 日本生態学会誌, 66 : 583-599
- 馬谷佳幸・奥田篤志 (2017) 天塩川水系琴平川における治山ダムのスリット化にともなう魚類相の変化. 北方森林保全技術, 34 : 10-20.
- Umatani Y・Okuda A・Fujito E・Yoshida T・Sato H・Maekawa K・Nakamura M (2020) Long-term observation of fish community in streams inside and outside road construction of Teshio River system, northern Hokkaido, Japan. *Ecological Research*, 35 (6) : 986-993.
- Yamamoto S・Masuda R・Sato Y・Sado T・Araki H・Kondoh M・Minamoto T・Miya M (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific reports*, 7 (1) : 40368.
- 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.