

環境 DNA による魚類の定量評価の検討

一般財団法人九州環境管理協会環境部水圏生物課係長 城内 智行
環境部生態工学室主席研究員 大井 和之

要 旨

本研究では、有明海のナルトビエイの捕獲量と環境 DNA 量を調べ、その結果から環境 DNA による魚類の定量評価について研究した。捕獲量については、九州農政局の公開 HP より引用し、環境 DNA は有明海 8 地点で採水したものを分析した。その結果、環境 DNA はナルトビエイが捕獲されない地点で検出され、放出された DNA は分解されるまで数時間から数日かかるため、潮流等により広い範囲に拡散していることが示唆された。移動性の大きいナルトビエイに関しては、環境 DNA により、数 10km 単位の範囲の在・不在、さらにはその生物量の多少を評価できる可能性がある。

1. はじめに

水産資源であるマイワシやマダイなどは、その資源管理のために、資源量の定量評価が実施されている¹⁾。また、二枚貝の食害生物であるナルトビエイ、外来種のオオクチバスやブルーギルなどに関しては、駆除量から定量評価が行われている²⁾。魚類の定量評価の手法としては、漁獲時の個体数や体長などの情報から推定する漁獲統計法、標識放流個体の再捕率から推定する標識再捕法などが挙げられる³⁾。いずれにしても、魚の捕獲が必要であり、漁獲や調査などの大きな労力を減らすことが課題となっている。

近年、新たな調査手法として、水の中に含まれる DNA (環境 DNA) を分析し、生物量を推定する技術が注目を集めている。生物は、体内に遺伝情報として DNA (デオキシリボ核酸) を持っており、その遺伝情報は種によって異なっている。分析キットの普及や分析器の進歩により、生物の細胞から正確に種を判別する技術は一般的に浸透してきた。しかし、生物から剥がれ落ちた表皮や糞などに含まれる微量の DNA を検出し、種の在、不在や生物量を推定する環境 DNA 分析技術については、近年発達中の技術である⁴⁾。

魚類調査における環境 DNA 分析の利点は、現地作業が水を汲むだけと労力が小さいことである。そのため、捕獲調査に代わるモニタリング手法として、技術開発が進められている⁵⁾。当協会においても、環境 DNA の技

術開発を進めており、プライマーの設計⁶⁾や環境 DNA によるヒナモロコの生息確認⁷⁾などを実施し、特定生物の在・不在を確認する技術を確立してきた。しかし、環境 DNA 分析による定量評価では、種による DNA 排出速度の差異、水の流れによる DNA 流入と流出など様々な課題があり、種別、水系別など様々なケースでのデータの蓄積が求められている。

そこで、本研究では九州の河川および海域の数か所で、捕獲量と環境 DNA 量を比較し、環境 DNA による魚類の定量評価を検討しているところである。今回、有明海におけるナルトビエイ捕獲量と環境 DNA 量について

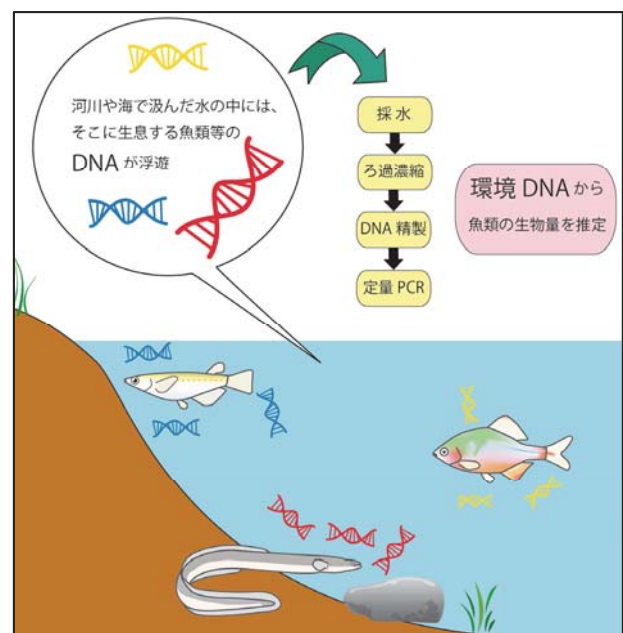


図 1 環境 DNA による魚類の定量評価の概念図

て、一定の関係性が認められたので、その手法と結果を紹介する。

2. 方法

2. 1 研究対象種

研究対象種は、ナルトビエイ *Aetobatus narutobiei*⁸⁾とした。本種は、冬季の水温が低下する時期は東シナ海の暖流域に分布し、水温が上昇する春に有明海に來遊する⁹⁾。春から秋にかけて有明海でアサリやタイラギを摂餌するため、食害生物として駆除の対象となっている¹⁰⁾。

農林水産省九州農政局では、本種の分布と來遊量を調べるために、平成 17 年度以降、捕獲調査を実施している。環境 DNA の比較対象とする捕獲データは、九州農政局の捕獲調査の県別の結果をホームページ公開資料¹¹⁾から引用した。



図 2 駆除されたナルトビエイ(約 100 個体)

2. 2 分析試料の採取

環境 DNA 分析試料は、図 3 に示す有明海 8 地点(各県地先 2 地点)で平成 29 年 10 月に採取した。2L の各ポリ容器を水中に沈め、水面 5cm までの水を容器が満杯になるように採取した。採取した試料を持ち帰ってその日のうちに、全量を直径 47mm のガラス繊維ろ紙(ワットマン GF/F 粒子保持能 0.7 μm)で減圧ろ過し、ろ紙は清浄な容器に入れて-20℃で冷凍保存した。

2. 3 DNA 分析

試料ろ紙 1 枚を DNA 抽出に使用した。ろ紙は滅菌

したはさみを使用して短冊状に切ってサリベットチューブの上部カップに入れ、Qiagen Dneasy Blood & Tissue kit のバッファーと、Proteinase K を 10:1 で混合した液に浸した状態で 56℃1 時間インキュベートした。遠心分離した後、フィルターを湿らせ、再度遠心分離して DNA が溶解した液を回収した。回収した液にバッファーとエタノールを添加し、3 回に分けてカラムを通した。その後、キットのマニュアルに従いカラムを洗浄した後、DNA を溶出した。

ナルトビエイの筋肉から抽出し 1 倍から 100 万倍に希釈したナルトビエイ標本 DNA を濃度対照として、蛍光標識プローブによる定量 PCR を実施した。ナルトビエイ DNA を検出するために、表 1 に示すプライマーとプローブを設計した。

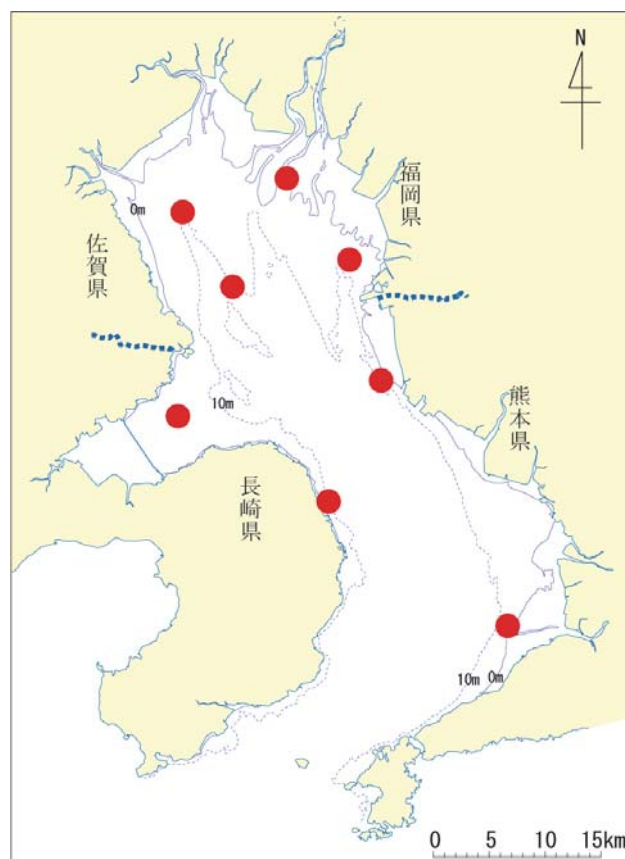


図 3 試料採取地点

表 1 ナルトビエイ検出用プライマー(上、中)及びプローブ(下)

名称	塩基配列(5'-3')
Ana-cytb-qF	GATATCCTTTTGAGGAGCAACC
Ana-cytb-qR	GGGTAGGAGGAAGTGAAATGTG
Ana-cytb-qIN	[FAM]GGAGGCTTCTCAATTGACAAC GCAAC[TAM]

3. 結果と考察

3. 1 同一日の捕獲量と環境DNA量の関係

環境DNAを採取した同一日に同地点で捕獲されたナルトビエイの量(個体数 CPUE¹、重量 CPUE)と環境DNA量の関係を、図4に示す。ナルトビエイの環境DNAは8地点すべてで検出されたが、2地点で捕獲されなかった。ナルトビエイが捕獲されなかった時の環境DNA量が最大となっており、捕獲数と環境DNA量の間には正の相関関係は認められなかった。

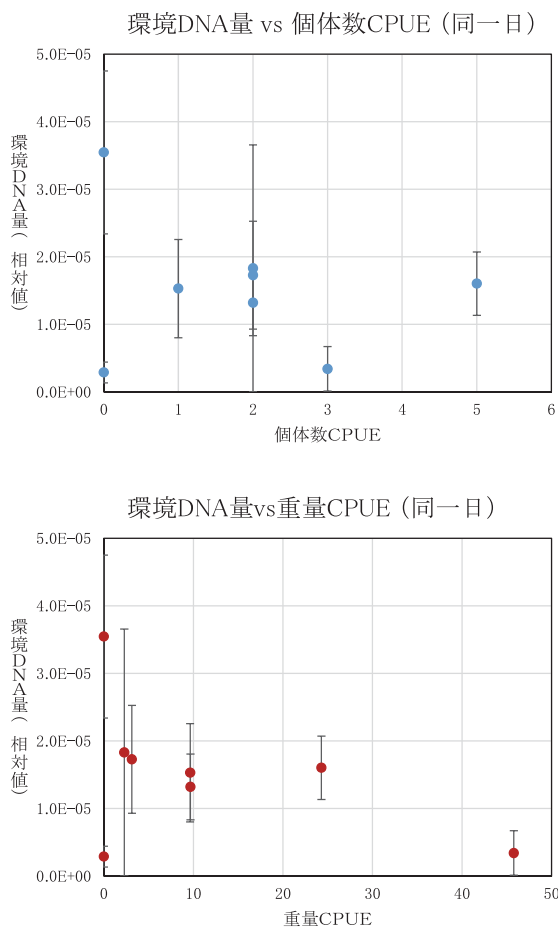


図4 同一日に同一地点で採取した環境DNA量と捕獲ナルトビエイ個体数、重量の関係

※環境DNA量はナルトビエイゲノムDNA溶液(31.1ng/ μ L)の希釈系列を標準とした相対値で、各3~6回の繰り返し分析の平均と標準偏差を示す。

ナルトビエイは体盤幅1.5mに達する大型の魚類であり、その移動性は大きい。また、群れる習性があり、100個体にも及ぶ大きな群れが捕獲されなかった網のすぐ近くを通過した可能性も否定はできない。環境DNAは、生物の糞や剥がれ落ちた表皮など生物から放出されたDNAであるが、1分前、1時間前、1日前など様々なタイミングで放出されたものが、混ざった状態で浮遊していると考えられる。そのため、その場所にいるもの量(捕獲量)と環境DNA量の間には時空間的なずれが生じると推察される。

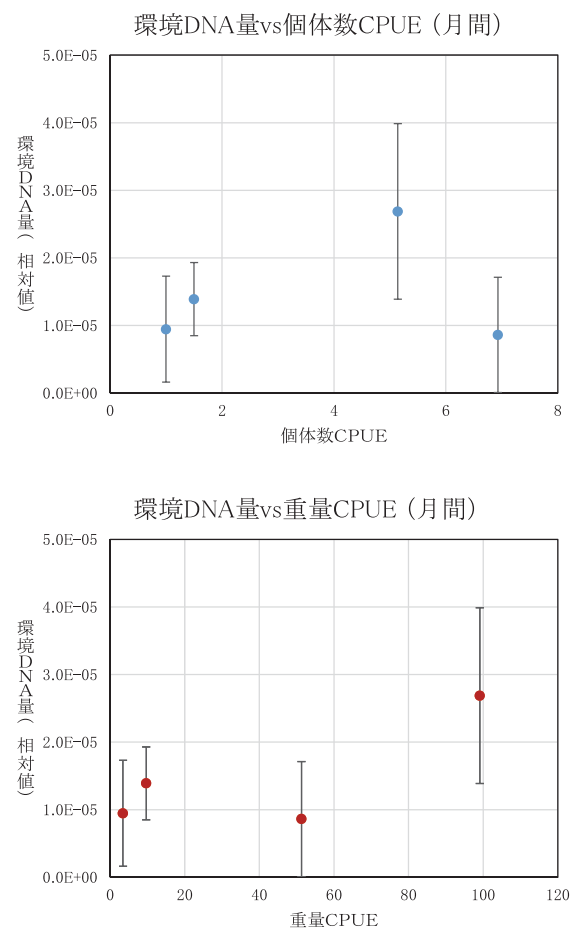


図5 平成29年10月の1か月に捕獲されたナルトビエイ個体数、重量のCPUEと環境DNA量との関係

※環境DNA量はナルトビエイゲノムDNA溶液(31.1ng/ μ L)の希釈系列を標準とした相対値で、各6~12回の繰り返し分析の平均と標準偏差を示す。

¹ CPUE: Catch per Unit Effort.

水産学の用語で、単位努力量あたりの捕獲量を示す。

本稿では、網1回の設置で捕獲された個体数、重量をそれぞれ「個体数CPUE」、「重量CPUE」とする。

3. 2 1ヵ月の捕獲量と環境DNA量の関係

九州農政局の捕獲調査では、有明海周辺4県の各県別にCPUEを集計している。環境DNA量についても、県別に平均して、各県の10月のCPUEとの関係を図5に示す。概ね、重量CPUEに関しては捕獲量が多いほうが、環境DNA量が多い関係性を示している。ナルトビエイは、前述の通り群れをつくり移動性が大きいいため、捕獲調査では捕獲量の変動が大きい。これを1ヵ月の期間として網入れ回数を数100回以上に増やしたことで、捕獲量が安定して、環境DNA量との関係性が示されたと考えられる。

以上のように、今回検出したナルトビエイの環境DNA量に関しては、数10km単位の広い範囲、数日～数週間の長い期間の分布履歴を示している可能性が示唆された。また、この関係は個体数CPUEでは明確ではなくなるため、稚魚、幼魚の個体数が多いよりも大型の成魚が多いほど環境DNA量が多いことを示している。ナルトビエイは大型個体ほどタイラギなどの有用二枚貝への食害が多くなるため、食害生物の検出手法として優れていると評価できる。

4. 今後の展望

ナルトビエイに関しては、汲んだ水の環境DNA分析をするだけで、その在・不在、さらには生物量を定量化できることが示唆された。しかし、今のところは確認サンプル数が少ないため、継続して調査して相関関係をより明確にすることが望まれる。これらの関係性が不明瞭である原因は、潮流等の流れによる環境DNAの拡散が影響していると考えられる。拡散の影響を軽減するためには、分解が進んでいない長いDNA鎖により定量化するなどの手法が有効であり、今後の課題である。また、ナルトビエイが有明海外に移動している冬季に環境DNAが検出されないことを確認しておく必要がある。

本研究では、ナルトビエイの他に、福岡県の河川の淡水魚の定量評価手法の検討を行っている。福岡県古賀市大根川では地引き網と電気ショッカーを併用して5mの範囲の魚を定量採取したものと環境DNA量を比較する調査を進めているところである。さらに、福岡県み

やこ町の祓川では潜水調査で確認した魚類の個体数と環境DNA量のそれぞれの季節変化を調べている。これらの河川の調査で、複数種の魚類を同時に定量評価する手法を継続的に検討したいと考えている。

参考文献

- 1) 阪本俊雄ほか:瀬戸内海東部海域におけるマダイの生物情報と資源診断、東海水研報 105,p59-113,(1981).
- 2) 尾崎真澄ほか:千葉県亀山湖におけるオオクチバス資源量の推定、千葉県水産総合研究センター研究報告 1,p1-5,(2006).
- 3) 川島利兵衛ほか:改訂版新水産ハンドブック、(1988).
- 4) 高原輝彦ほか: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～、日本生態学会誌 66,p583-599,(2016).
- 5) 源利文:水域生態系における環境DNAモニタリング手法開発の現在、環境技術 46,p624-629,(2017).
- 6) 大井和之:環境DNA分析におけるプライマー設計、環境管理 44,p60-66,(2015).
- 7) 大城戸博文ほか:環境DNAを用いた生物調査方法の検討、環境管理 43,p41-44,(2014).
- 8) W. T. White, et al:A new species of eagle ray *Aetobatus narutobiei* from the Northwest Pacific: An Example of the critical role taxonomy plays in fisheries and ecological sciences, Plos One 8, p1-11,(2013).
- 9) A. Yamaguchi, et al : Occurrence, growth and food of longheaded eagle ray, *Aetobatus fragellum*, in Ariake Sound, Kyushu, Japan, Environmental Biology of Fishes 74, p229-238,(2005).
- 10) 山口敦子:日本の沿岸域へのナルトビエイ *Aetobatus fragellum* の出現と漁業への影響、月刊海洋号外 45,p75-79,(2006).
- 11) 有明海漁場環境改善連絡協議会(第25回)議事録及び会議資料について、http://www.maff.go.jp/kyusyu/seibibu/isahaya/gyobakannkyou/gyoba_kan_kyou_25.html