

# 河川における魚類相モニタリングを目的とした 環境DNAメタバーコーディング法の評価

An evaluation of environmental DNA metabarcoding approach for monitoring stream fish species

小関 右介<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大妻女子大学家政学部ライフデザイン学科

Yusuke Koseki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Design, Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University

12 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8357, Japan

キーワード：eDNA, 魚類群集, 生物多様性, 種数, 次世代シーケンシング

Key words : eDNA, Fish community, Biodiversity, Species richness, Next-generation sequencing

## 抄録

環境DNAメタバーコーディング法による河川魚類相調査の有効性を検証するため、本手法による調査結果を既存の採捕調査の結果と比較した。新潟県佐渡島の14河川における比較の結果、環境DNAメタバーコーディング法は、採捕調査で生息が確認されている魚種の95%を検出した。また、個々の河川・魚種でみた両手法間の検出／不検出の一致率も82%と高かった。これに加えて、環境DNAメタバーコーディング法は、採捕調査と比べて調査河川全体で12種類、河川ごとで平均2.5種類多く魚種を検出した。この検出種類数の増加はとくに大きな河川において顕著であった。以上のことから、環境DNAメタバーコーディング法は、従来の採捕調査と比べて十分検出力が高く、とくに採捕効率が低下しやすい大規模河川では大きなアドバンテージを有する有効な魚類モニタリングツールであると考えられた。

## 1. はじめに

近年、人間活動の増大にともなう生物多様性の喪失が危惧される中、定期的な生物モニタリング実施の重要性はますます増している。しかし、野外における生物モニタリングにはさまざまな困難がともなう。たとえば、一般的な採捕調査では、生物ごとの採捕方法の違いや調査地点の環境の制約などにより、調査に費やす時間と労力はしばしば大きなものとなる。また、そうした調査には、高度な専門知識と分類技能を持つ人材を要するが、そうした人材は圧倒的に不足している<sup>[1]</sup>。さらに、希少種の個体群調査や小規模生息地の群集調査では、採捕行為やそれにとともなう生息地の攪乱自体が集団の存続に負の影響をもたらす可能性がある。

こうした生物調査における課題に対して、環境DNA分析は有効なツールとなりうる。環境DNA分析は、土壌や水などの環境媒体中に存在する生物由来DNA、すなわち環境DNA (environmental

DNA, eDNA) を取り出し、生物情報を得る手法である。本手法は、もともとは微生物の調査法として発展したが、2008年にフランスの研究グループが池から汲んだ少量の水でウシガエルの検出に成功したと報告して以降<sup>[2]</sup>、マクロ生物への応用が急速に進んだ。最近では、次世代シーケンサーによるDNA配列決定処理の高速化やバイオインフォマティクスの発展にとともなう配列解析アルゴリズムの実装などにより、ある特定の生物のみならず、多種を同時に検出可能な環境DNAメタバーコーディング<sup>[3]</sup>とよばれる技術が開発され、新たな生物モニタリング手法として注目を集めている。

環境DNAメタバーコーディング法の利点は、現地で行う作業が少量の環境媒体を採取するだけであり、きわめて簡便かつ非侵襲的な調査法であることである。とくに、川や海といった水圏の生物を対象とした調査では、必要な作業はコップ1杯ほどの水を汲むだけであることから、網や電気漁

具を用いた採捕に比べて時間的・労力的コストははるかに小さく、環境への影響もほとんどない。作業の簡便さがもたらす調査の迅速化・省力化は、努力量あたりの調査地点数を増やし、これまでよりも広域的で高精細なモニタリングを可能にする。さらに、土や水を採るだけという簡便さは、アマチュア研究者や市民ボランティアによる生物モニタリングの実施を可能にし、生物との共生を目指した社会づくりにおける市民科学の役割をより大きなものにするかもしれない<sup>[4-5]</sup>。

こうした可能性と期待の一方で、環境 DNA メタバーコーディングは生まれたばかりの若い技術であり、得られる結果の精度やデータの特性についての検討が必要である。そこで本研究では、新潟県佐渡島の河川において、環境 DNA メタバーコーディング法による魚類相調査を行い、得られたデータを従来の採捕調査に基づく魚類相データと比較することで、本手法による調査結果の妥当性を検証した。

## 2. 方法

### 2.1. 環境 DNA の採取

2018 年 8 月 21 日から 26 日にかけて新潟県佐渡島を流れる大小 121 の独立河川において環境 DNA の採取を行なった (図 1)。各河川において、流水部の表層水を採集し、10%塩化ベンザルコニウム液を最終濃度 0.1%になるよう添加したのち、ペリスタルティックポンプ (Geopump, Geotech Environmental Equipment) とステリベクス-HV フィルター (ポアサイズ 0.45  $\mu\text{m}$ , Merck) を用いてろ過を行った (平均ろ過水量 380 mL, レンジ 80–550 mL)。ろ過後のフィルターは遮光・冷蔵のうえ、実験室に持ち帰った。

### 2.2. 環境 DNA メタバーコーディング法

上記のフィルター試料のうち、手網による採捕調査に基づく魚類相情報 (満尾世志人, 飯田碧, 北橋隆史, 未発表データ) が存在する 14 河川の試料について、DNeasyBlood and Tissue Kit (Qiagen) により DNA を抽出した。抽出した DNA を魚類用ユニバーサルプライマー MiFish<sup>[6]</sup> で増幅し、次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) により塩基配列を分析した。得られた塩基配列を MiFish パイプライン処理<sup>[7]</sup>により解析し、種判別を行った。ただし、カジカ類, フナ類, メダカ類, ヨシノボリ類, ミミズ

ハゼ類およびチチブ類では、解析対象 DNA 領域に同属近縁種を識別するほどの変異が存在せず種判別には至らなかったため、それぞれ複合種として扱った。

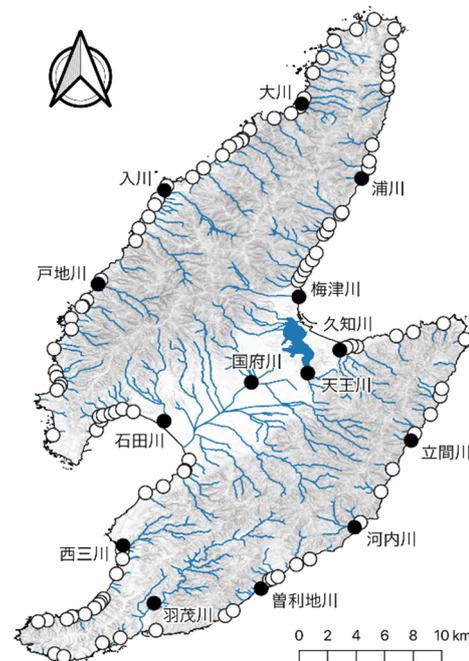


図 1. 環境 DNA の採取を行なった地点 (丸) およびそのうち採捕調査と環境 DNA 分析による魚類相の比較を行なった地点 (黒丸)

## 3. 結果

全 14 河川を通じて採捕調査で検出された魚類の種類数は 19 (14 種, 5 複合種) であった。このうち 18 種類 (95%) が環境 DNA メタバーコーディング法によっても検出された。また、14 河川における 32 魚種 (全 448 ケース) の検出/不検出に関して 2 つの調査手法間の一致性を調べたところ、両手法ともに検出したケースおよび不検出だったケースがそれぞれ 79 ケース (18%) および 285 ケース (64%) であり、一致率は 82%であった (表 1)。

採捕調査による結果との高い一致性の一方で、環境 DNA メタバーコーディング法による検出種類数は調査河川全体で 31 (5 複合種, 26 種) であり、採捕調査と比べて 12 種類も多かった。また、河川ごとで見ると、環境 DNA メタバーコーディング法は、採捕調査と比べて平均 2.5 種類多く魚種を検出することが示された (表 2)。この環境 DNA

メタバーコーディング法における検出種類数の増加は、西三川、羽茂川、国府川、石田川などの相対的に規模の大きな河川で顕著であった（図2）。

表1. 14河川における全32魚種の検出／不検出に関する調査手法間の一貫性

採捕	環境 DNA		
	検出	不検出	合計
検出	79 (18%)	24 (5%)	103 (23%)
不検出	60 (13%)	285 (64%)	345 (77%)
合計	139 (31%)	309 (69%)	448 (100%)

表2. 14河川における調査手法間の検出魚種数の差

	環境 DNA	採捕	差
平均	9.9	7.4	2.5
(標準偏差)	(4.6)	(1.6)	(3.7)

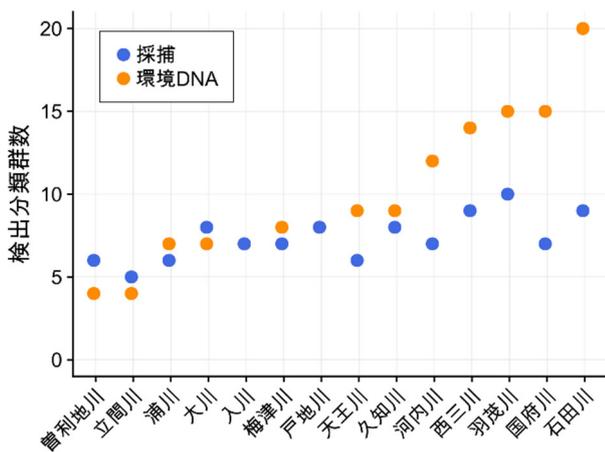


図2. 14河川における調査手法間の検出分類群数（複合種および種）の違い

#### 4. 考察

本研究は、環境 DNA メタバーコーディング法の魚類モニタリングツールとしての有用性をあらためて示した。従来の採捕調査との比較結果から明らかのように、本手法の検出力は極めて高く、少ない時間と労力で従来の採捕調査と同等かそれ以上の質の魚類相データを得ることができる。そうした環境 DNA メタバーコーディング法のアドバンテージは、網や電気漁具などによる採捕の効率が低下する大規模河川でとくに大きなものになるだろう。今後、この環境 DNA メタバーコーディング法が、魚類はもちろんさまざまな生物のモニタリング手法としての地位を確立し、生物多様性の

研究やその保全管理に広く活用されることが期待される。

#### 謝辞

調査の実施にあたり、新潟大学の満尾世志人氏、飯田碧氏、ならびに東海大学の武島弘彦氏、野原健司氏に多大なるご助力をいただいた。また、龍谷大学の山中裕樹氏、神戸大学の田中良輔氏には環境 DNA 分析の実施にご協力いただいた。ここに記して感謝申し上げる。

#### 付記

本研究は、平成30年度大妻女子大学戦略的個人研究費の採択課題「温帯島嶼における河川魚類多様性の理解と保全のための大規模環境 DNA 観測」（課題番号 S3016）の助成を受けた研究成果の一部である。

#### 引用文献

- [1]大原昌宏. 分類学者の養成：パラタクソノミスト養成講座について. 昆虫（ニューシリーズ）. 2010, 13(2), p.83-92.
- [2]Ficetola G. F. et al. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*. 2008, 4(4), p.423-425.
- [3]Taberlet P. et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*. 2012, 21(8), p.2045-2050.
- [4]Biggs J. et al. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*. 2015, 183, p.19-28.
- [5]Miralles L. et al. Controlling populations of invasive pygmy mussel (*Xenostrobus securis*) through citizen science and environmental DNA. *Marine Pollution Bulletin*. 2016, 110(1), p.127-132.
- [6]Miya M. et al. 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*. 2015, 2(7), 150088.
- [7]Sato Y. et al. MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*. 2018, 35(6), p.1553-1555.

### 小関 右介 (こせき ゆうすけ)

現職：大妻女子大学家政学部ライフデザイン学科准教授

北海道大学農学研究科環境資源学専攻博士課程修了

専門は淡水生態学，生物資源保全学．現在は河川性魚類の生態・保全や水田水域の自然再生に関する研究を行なっている．

主な著書：淡水生態学のフロンティア（共著，共立出版），Social-Ecological Restoration in Paddy-Dominated Landscapes (Coauthored, Springer)