

# 環境 DNA メタバーコーディング解析を用いた生物モニタリング

## ～長良川・揖斐川の魚類調査～

岐阜県立岐阜高等学校自然科学部生物班

鷲見康介・天満陽奈子・藤吉里帆

瀧花雄大・柳澤壮玄・高井一

### A：研究背景

世界中で、開発などによる環境破壊や乱獲、外来種による生態系の攪乱が問題視されている。2015年には国連でSDGs(Sustainable Development Goals：持続可能な開発目標)が採択された。目標14では水産資源の保全について、目標15では陸域及び淡水の資源の保全について述べられており<sup>1)</sup>、持続可能な範囲で経済発展をしていくためには環境全体を保全することが必要不可欠であることが示されている。

本研究の対象である長良川、揖斐川は岐阜県を流れる全長100 km超の一級河川である。長良川は日本三大清流に指定されており、約80種の魚類が生息する全国でも有数の河川である<sup>2)</sup>。さらに、岐阜県では内水面漁業が盛んであり、県民と河川との関係は深く、特にアユは長良川の特産品として知られている。岐阜県では古くから鵜を操りアユを捕る鵜飼が有名であり、観光資源として重要である。岐阜県内において、アユの漁獲量はサケ・マス類、シジミに次いで3番目であり、漁業資源としての役割も大切である。長良川のアユはこうした地域や経済、河川環境とのつながりが評価され、2015年12月に「清流長良川のアユ」として世界農業遺産に認定され、さらに重要性が増している。



図1 清流長良川のアユ

一方で、岐阜県の内水面漁業における総漁獲量は昭和63年をピークに減少傾向にある<sup>3)</sup>。1994年には長良川に治水と利水を目的とした長良川河口堰が建設され、河川と海が分断されたため、アユなどの回遊する生物に与える影響が懸念されている。また、外来種についても問題視されており、揖斐川では外来種であるオオクチバス、コクチバス、ブルーギルの侵入が報告され<sup>4)</sup>、既に生態系に被害が及んでいると考えられる。また、遊漁などの目的で違法放流が行われている現状から、今後、長良川にコクチバスが侵入・定着する可能性も考えられる。そのため、継続的に魚類相を把握し、水産資源を管理していく必要がある。しかし、採捕などの調査方法は時間と労力がかかる。そこで、本研究では環境中の生物相の把握に使われる環境DNAメタバーコーディング解析を利用することにより、長良川、揖斐川という大規模河川全体で、効率的に魚類相を把握し、生物資源の持続的管理に応用することを目的として研究を進めた。なお、本校では先行研究として種に特異的なプライマー、プローブを用いた環境DNA定量解析により、季節ごとのアユおよび冷水病菌の分布調査を行っている<sup>5)</sup>。本研究では先行研究に使用した約400の環境DNAサンプルを用いて解析を行った。

### B：研究目的

持続的に水産資源を管理していくためには生物分布や生物量の把握が必要である。従来の調査方法は多大な労力と時間を要し、調査者によって結果が変わってくるため、河川全体の魚類相の把握は困難であった。そこで本研究では、近年生物モニタリングの手法として注目されている環境DNAメタバーコーディング解析に着目した。

環境DNAとは、環境水中に含まれる生物の皮膚片や糞に由来するDNAである<sup>6)</sup>。環境DNAメタバーコーディング解析では、魚類全体に共通な12S rRNA内の領域を認識するユニバーサルプライマー(MiFish-U)<sup>7)</sup>を用いてリアルタイムPCRを行うことで河川水のサンプルに含まれる魚類の環境DNAを増幅させる。その後、次世代シーケンスデータをブラウザ上のMiFish pipeline<sup>8)</sup>で解析することで検出魚類を判別する。これにより水中の魚類を幅広く検出し、河川全体の魚類相の把握を行うことができる。Aで述べた環境DNA定量解析を含め、これらの手法は従来の採捕などによる調査方法と比較し

て、非侵襲的かつ効率的に調査をすることが可能である。さらにメタバーコーディング解析は環境 DNA 定量解析と比較して、生物量の定量は不可能であるが、河川全体の生物を一度に把握することが可能であり、生物分布を把握する手法として非常に有用である。本研究では、大規模河川の上流域から河口まで通年の調査を行い得たサンプルを解析することで、河川全体の年間の魚類相の把握を試みた。

## C: 研究方法

環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2.1(一般社団法人環境 DNA 学会発行)<sup>9)</sup> に従い、採水、環境 DNA 抽出、メタバーコーディング解析を行った。

### 1: 採水

1 年を通して長良川(約 110 km 間)・揖斐川(約 121 km 間)においてサンプリングを行った。2017 年 7 月 30 日から 2019 年 10 月 5 日まで 1 か月ごとに長良川 10 地点、揖斐川 8 地点の計 18 地点で、河川水 1 L を塩素消毒済みペットボトルに採取した。その後、DNA の保存性を高めるために塩化ベンザルコニウム 1 mL を添加した<sup>10)</sup>。採水時には各地点で水温を計測した。

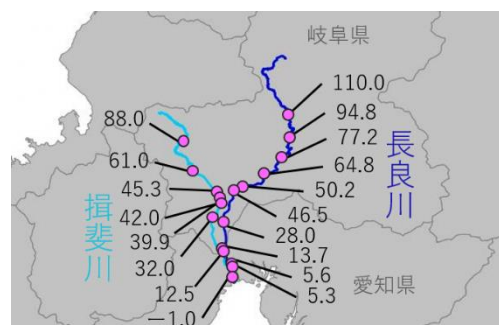


図 2 河川広域での調査

### 2: 環境 DNA 抽出

採取した河川水 1 L をガラスフィルター(GE Healthcare, GF/F 0.7  $\mu$ m)でろ過し、QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit(QIAGEN)により、フィルター付着物から最終的な容量が 100  $\mu$ L になるように DNA 抽出を行った。抽出した DNA 溶液は-20  $^{\circ}$ C で保存した。

### 3: メタバーコーディング解析

ミトコンドリア DNA 上の 12S rRNA(約 300 bp)を標的とした、MiFish-U<sup>7)</sup>(表 1)を使用し、DNA を増幅した。PCR はリアルタイム PCR 装置を用い、1st PCR では 95  $^{\circ}$ C 3 分の初期ステップの後、98  $^{\circ}$ C 20 秒、65  $^{\circ}$ C 15 秒、72  $^{\circ}$ C 15 秒を 1 サイクルとして 40 サイクルの増幅を行った。その後、SeraPure(磁性ビーズ)を用いて、DNA を精製し、Qubit を用いて、濃度を測定した。

2nd PCR では次世代シーケンスのために Nextera XT Index Primer を用いて、95  $^{\circ}$ C の初期ステップの後、98  $^{\circ}$ C 20 秒、72  $^{\circ}$ C 15 秒を 1 サイクルとして 10 サイクルの増幅を行い、インデクス配列を付加した。その後、SeraPure(磁性ビーズ)を用いて DNA を精製し、Qubit を用いて、濃度を測定した。

2ndPCR で増幅した DNA を E-Gel を用いて、増幅長 370 bp の DNA 断片を抽出後、Bioanalyzer を用いて増幅した DNA のピークが 370 bp 前後にあることと、Primer dimer がないことを確認した。その後、MiSeq(Illumina)を用いてシーケンスを行い、MiFish pipeline<sup>8)</sup>にて各ライブラリ由来の塩基配列の解析を行い、種を同定した。さらに検出魚類を評価し、MiFish の増幅領域では判別不可能とされている種を環境省発表の判別不能種データ<sup>11)</sup>に基づいて検証し、種を絞り込んだ。

| Name             | Sequence ( 5' - 3' )       | Product size |
|------------------|----------------------------|--------------|
| MiFish-U Forward | GTCGGTAAACTCGTGCCAGC       | 300 bp       |
| MiFish-U Reverse | CATAGTGGGGTATCTAATCCAGTTTG |              |

表 1 MiFish-U プライマーの

## D: 結果・考察

### 1: 先行研究との比較

A で述べた本校の先行研究であるアユの定量モニタリングの結果と環境 DNA メタバーコーディング

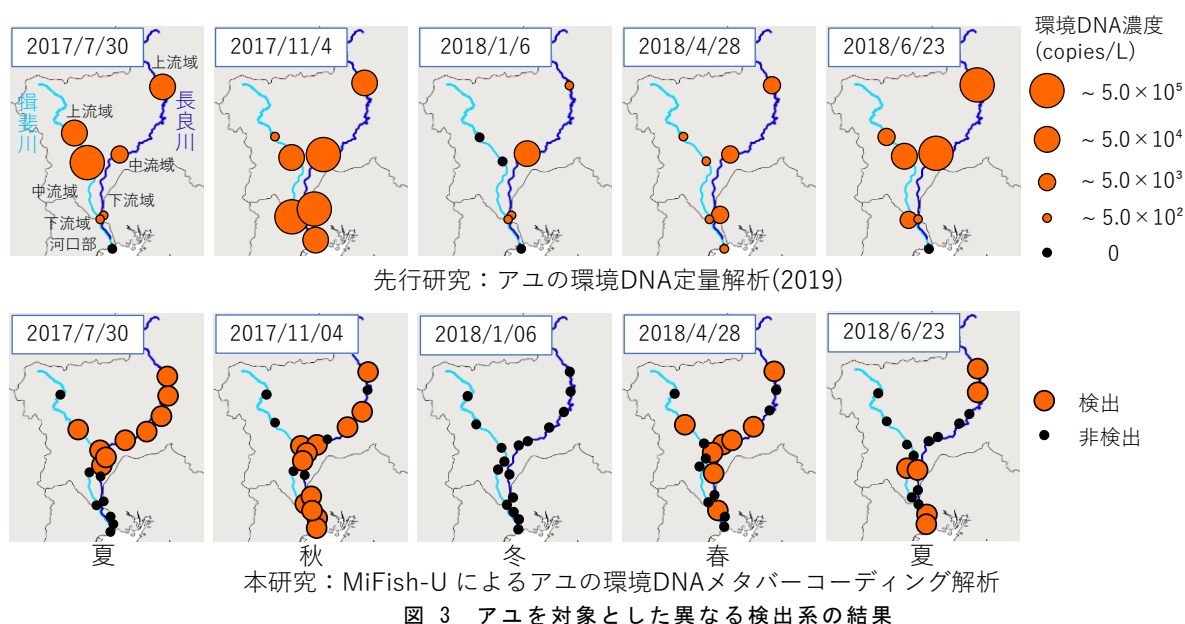
解析の結果を比較した。アユは秋に河川中流で産卵後、孵化した仔魚が海に降下し、冬に海洋沿岸で生活、春には成長した稚魚が河川へ遡上し、夏には成魚が上流で生息し、秋になると再び産卵場となる中流に集まるという生活史<sup>12)</sup>が知られている。同じ環境 DNA サンプルを用いて行った検出系の違う 2 つの解析結果を比較した(図 3)。環境 DNA 定量解析と環境 DNA メタバーコーディング解析の結果はともに既知のアユの生活史とほとんど一致している。したがって環境 DNA メタバーコーディング解析は、通年の大規模河川での生物の分布調査において有用であるといえる。また、アユ以外の様々な魚種の調査も同様に行うことができ、様々な調査に応用できると考えられる。

## 2: 検出種

アユをはじめ、ウグイ類やカジカ類など長良川で 98 種、揖斐川で 96 種、両河川で 117 種の魚類を検出した。琵琶湖にて行われた同じ検出系を用いた先行研究では、38 種の魚類を検出していたことから<sup>13)</sup>、長良川、揖斐川の生物多様性の豊かさが示された。

## 3: 希少種

岐阜県レッドデータブック<sup>14)</sup>と環境省レッドリスト<sup>15)</sup>に今回の結果を照らし合わせた。その結果、アユカケ(カマキリ)、マハゼ、チチブなど岐阜県レッドデータブックに指定されている魚類 31 種の中の 18 種、環境省レッドデータリスト登録種中 28 種を検出した。この結果から長良川、揖斐川が希少種も多数生息している生物多様性の豊かな河川であることが示される。環境 DNA メタバーコーディング解析により、河川全体の希少種を含めた魚類相のモニタリングを行うことで、生態系の変化を継続的に注視することが重要であると考えられる。環境 DNA メタバーコーディング解析は、生物量を把握することが困難であるため、希少種が検出された重要スポットについては、捕獲や潜水などの入念な調査も必要になると考えられる。



## 4: 生息未確認種

生息未確認種と今回の検出結果を比較した。ここでの生息未確認種は、2019 年に出版された岐阜県の魚類を参考に、「目撃情報はあるが個体の写真や標本がいまだ存在しない」10 種の魚類(サツパ、マゴチ、ウロハゼ、アベハゼ、クサフグ、コノシロ、クロダイ、セスジボラ、ヒメハゼ、イシガレイ)<sup>16)</sup>を指す。また別途文献調査を行い、1967 年時点でのこれらの魚種の生息状況についても確認した。そして、環境 DNA メタバーコーディング解析による検出データと照合した(図 4)。

その結果、10 種のうち 7 種(サッパ、アベハゼ、コノシロ、クロダイ、ウロハゼ、ヒメハゼ、イシガレイ)を検出した。今後、捕獲調査や潜水調査を行うことで新たに生息を確認できる可能性が示唆された。

一方で、サッパ、ウロハゼ、クロダイは本来、海洋や汽水域に生息している。本研究で、対象種の環境 DNA を河川の上流域で検出したことは、生活排水の混入やコンタミネーションが起きたためである可能性がある。今後は、

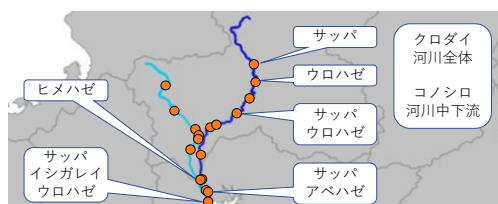


図 4 生息未確認種検出

MiFish pipeline の解析結果を詳細に確認し、生息未確認種と従来から生息が確認されている種の DNA のコピー数を比較することで、生活排水に含まれているわずかな DNA やコンタミネーションの可能性を検討する予定である。解析結果で得られた生息未確認種の DNA 配列を実際にアラインメントすることで、誤同定の可能性についても検討していきたい。

生物調査を行う上で、生息地の予想がないまま調査を行うには実に多大な時間がかかる。しかし、環境 DNA 調査を用いることで、適切な評価は必要であるが、効率的に調査を進めることができることが分かった。

## 5：回遊魚の動態

本研究ではアユカケ (*Rheopresbe kazika*) に着目した。アユカケは春に遡上し、夏は河川で生活、秋に降下し、産卵するという降河回遊魚として知られている<sup>16)</sup>。春、夏、秋、それぞれの季節の環境 DNA 検出地点を図 5 に示す。春から秋にかけての検出地点の動きは、既知の生活史とおおむね一致している。環境 DNA メタバーコーディング解析は、河川全体の魚類相の把握だけでなく、前述したアユやアユカケなど魚類の通年の大まかな動態を把握する手法としても有用であると考えられる。データでは示さないがウナギについて十分な動態は把握できなかった。

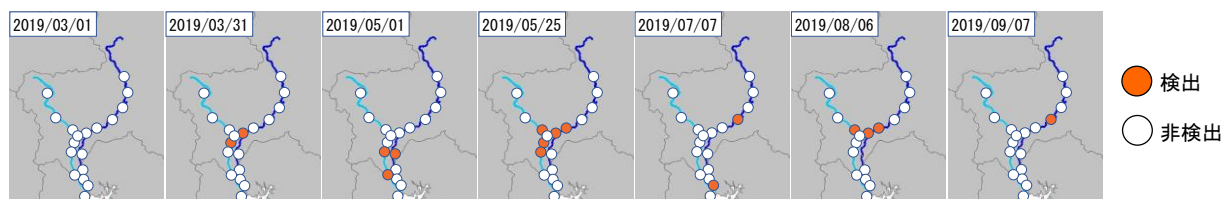


図 5 アユカケの動態

## 6：外来種

環境省が発表している外来種リストと解析結果を照らし合わせた結果、特定外来種のうち、総合対策外来種 5 種(タイリクバナタナゴ、ハス、オオクチバス、ブルーギル、コクチバス)、産業外来種 1 種(ニジマス)の生息が示唆された。各魚類の環境 DNA 検出地点を図 6～11 に示す。

### I：タイリクバラタナゴ (*Rhodeus ocellatus ocellatus*) 図 6

タイリクバラタナゴは二枚貝に産卵することが知られており、同じ習性を持つほかのタナゴ族の産卵を阻害するため問題視されている。神奈川県鶴見川水系のため池はかつてゼニタナゴの生息地であったが、1980 年代のタイリクバラタナゴの侵入により、ゼニタナゴの個体数は激減した<sup>17)</sup>。実際にアブラボテの環境 DNA を検出した地点でタイリクバラタナゴの環境 DNA を検出しており、既に被害を受けていると考えられる。

### II：ハス (*Opsariichthys uncirostris uncirostris*) 図 7

ハスは琵琶湖の原産種以外は国内外来種に指定されている。琵琶湖産アユの放流に交じって侵入したと考えられている。肉食性であり、様々な魚類に対しての食害が報告されている<sup>18)</sup>ため、長良川でも被害があると考えられる。本研究でも両河川の中下流域で検出したため、今後生息域の拡大が懸念

される。

### Ⅲ:オオクチバス (*Micropterus salmoides*) 図 8

オオクチバスは、娯楽として釣り人にも人気があり、山梨県の河口湖や神奈川県のアサノ湖では漁業権魚種に指定され、地域おこしに活用されている。その一方で、肉食性が強く、生態系に与える影響も懸念されている。長良川、揖斐川では上流から下流にかけて検出し、生息域は河川全域に分布していると考えられる。

### Ⅳ:ブルーギル (*Lepomis macrochirus*) 図 9

ブルーギルは北米原産の魚であり、日本には 1960 年に持ちこまれた。繁殖力が非常に強く、国内では天敵が少ないため、様々な魚類や昆虫を捕食し、生態系に悪影響を与えている。滋賀県の瀬田月輪大池には、かつて多数のモツゴが生息していたが本種の侵入により個体数は激減した<sup>19)</sup>。長良川では中下流域で環境 DNA を検出しており、さらなる分布拡大が懸念される。

### Ⅴ:コクチバス (*Micropterus dolomieu*) 図 10

コクチバスは北米原産の魚であり、1925 年の放流を機に全国の河川で確認されている。低水温を好み、流れの速い水域でも生息できるため、様々な水域に分布し、在来種への影響が懸念されている。捕食が確認されている種は、アユやイワナ、ヨシノボリなど多岐にわたる<sup>20)</sup>。コクチバスの環境 DNA は長良川、揖斐川の中流域で検出した。しかし、現在の報告によると長良川ではコクチバスは確認されていない<sup>4)16)</sup>。今後も継続的にモニタリングを続けていくことで、長良川への侵入、定着を防ぐ必要がある。

### Ⅵ:ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) 図 11

ニジマスは、水産庁が指定している産業外来種で、産業的利用は認められているが、放流が禁止され、河川での定着を防ぐ必要がある種である。ニジマスの環境 DNA は 1 年を通して河川全域でほとんど検出されなかった。一時的に環境 DNA を検出しているのは、長良川、揖斐川流域周辺にある養鱒場やニジマスの釣り堀からの排水や生活排水に由来する DNA を検出している可能性がある。

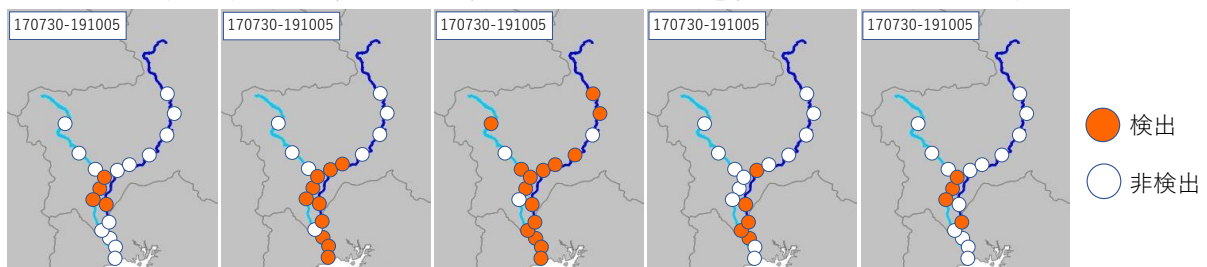


図 6 タイリクバラタナゴ

図 7 ハス

図 8 オオクチバス

図 9 ブルーギル

図 10 コクチバス

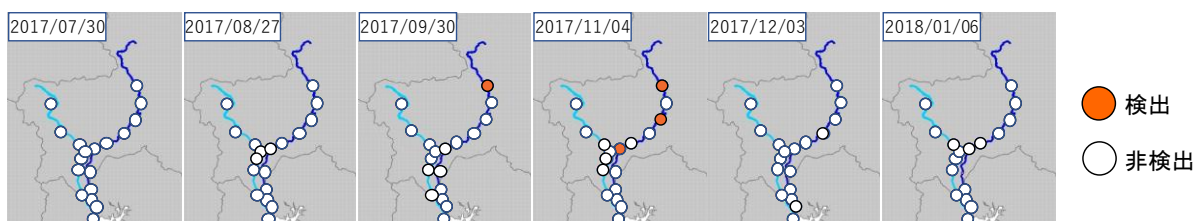


図 11 ニジマスの動態

## 7: 展望

本研究では環境 DNA メタバーコーディング解析を用いて、全長 100 km 超の河川における通年の魚類相を把握することができた。さらに、アユやアユカケなどの回遊魚の動態も把握し、環境 DNA メタ

バーコーディング解析が幅広い研究に応用できることが確認できた。今後も継続的に環境 DNA メタバーコーディング解析を行うことで、希少種のモニタリングや外来種の侵入の把握など定期的な魚類相の把握を行っていききたい。また、河川工事の前後でメタバーコーディング解析を行い、人為的な活動が河川に与える影響について、魚類相の変化を可視化することでより具体的な評価を行いたい。

環境 DNA メタバーコーディング解析は、様々な調査に応用できる一方、環境 DNA は生物の個体サイズや状態によって、放出される量が変わるため、環境 DNA 解析から具体的な個体数や生存数を把握することは困難である。また、水量や水温などの環境要因によっても濃度が変化する。そのため、環境 DNA の放出や分解に影響を与える要因を考慮して生物量を評価する必要がある。

環境 DNA メタバーコーディング解析は、魚類の網羅的な検出以外にも哺乳類や鳥類などの調査にも用いられている<sup>21)</sup>。その中で細菌類のメタバーコーディング解析に注目したい。魚類と同様に細菌の中でも外来性細菌による魚病の流行が問題となっている。1987 年に日本で発見された冷水病菌は、全国の河川で様々な魚類を死に至らしめている<sup>22)</sup>。細菌性感染症であるビブリオ病やエドワジエラ・イクタルリ感染症などの感染症も問題となっている<sup>23) 24)</sup>。河川において、外来性細菌の有無や通年の分布を把握することで感染しにくい時期での放流などの対策を講じることができると考える。今後、さらなる環境 DNA メタバーコーディング解析を進め、長良川、揖斐川流域の魚類相と細菌類相の把握を行い、河川に与える人為的な行為の影響を適切に評価することで、持続的な水産資源の管理や河川の生態系の保全に貢献していききたい。

## 8: 謝辞

本研究では多くの方々からご協力をいただきました。環境 DNA 解析は神戸大学准教授 源利文氏、メタバーコーディング解析は宇都宮大学教授 飯郷雅之氏、岐阜県の魚類については岐阜大学准教授 向井貴彦氏、研究全体の指導は静岡県立焼津中央高等学校教諭 矢追雄一氏など、多くの方々に支えられて本研究を行うことができました。ここに深く感謝申し上げます。

## 参考文献・引用文献

- 1) Sustainable Development Goals, United Nations, 2015
- 2) 後藤ら, 長良川の魚類相, 長良川下流域生物相調査報告書, 1994
- 3) 岐阜県農政部里川振興課水産振興室, 岐阜県の水産業, 2017
- 4) コクチバス「長良川も時間の問題」鮎などが在来魚に危機, 岐阜新聞, 2019, 12月29日
- 5) 天満ら, 環境 DNA 定量解析を用いた生物モニタリング〜長良川・揖斐川におけるアユと冷水病菌の動態〜, 第 18 回 AIT サイエンス大賞論文集
- 6) 高原ら, 日本生態学会誌, 2016;66:583-599
- 7) Miya et al., R Soc Open Sc. 2015;2:150088
- 8) Sato et al., Mol Biol Evol. 2018;35(6):1553-1555
- 9) 一般社団法人環境 DNA 学会, 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2.1, 2019
- 10) Yamanaka et al., A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant, CrossMark, 2017;18:233-241
- 11) 環境省, MiFish による種の識別に注意を要する淡水魚類リスト, [http://www.biodic.go.jp/edna/edna\\_top.html](http://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html)
- 12) 内山りゅう, 日本の淡水魚, 山と溪谷社, 2001:66-79
- 13) Nakagawa et al., Comparing local-and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods, WILEY Freshwater Biology, 2018
- 14) 岐阜県版レッドデータブック, 岐阜県, 2015
- 15) 環境省レッドデータリスト, 環境省, 2017
- 16) 向井ら, 『岐阜県の魚類 第 2 版』, 岐阜新聞社, 2019
- 17) 片野修, 希少淡水魚の現在と未来 - 積極的保全のシナリオ, 2005:122-141
- 18) Kurita et al., Analysis of the Gut Contents of the Internal Exotic Fish Species, 2008
- 19) 遊磨ら, Bull. Shina Univ. Med. Sci. (General Education), 1997;8:19-36
- 20) 片野修, 外来魚コクチバス問題の現状と対策, 日本水産学科誌, 2005
- 21) Kristy et al., Environmental DNA metabarcoding Transforming how we survey animal and plant communities, MOLECULAR ECOLOGY, 2017
- 22) 井上潔, アユの冷水病, 海洋と生物, 2000;22:35-38
- 23) 八嶋ら, 天然アユにおけるビブリオ病の発生と分離菌の性状, 日本獣医公衆衛生学会, 1992:203-206
- 24) Sakai et al., Outbreaks of Edwardsiella ictaluri Infection in Ayu Plecoglossus altivelis in Japanese Rivers, Fish pathology, 2008:152-157