

汽水域の魚類群集把握に向けた 環境 DNA の最適な採水手法の検討

A STUDY OF OPTIMAL SAMPLING METHODS FOR ENVIRONMENTAL DNA
IN IDENTIFYING FISH COMMUNITIES IN BRACKISH WATER

菅野一輝¹・篠原隆佑²・中島颯大³・村岡敬子⁴・崎谷和貴⁴

Kazuki KANNO¹, Ryusuke SHINOHARA², Souta NAKAJIMA³, Keiko MURAOKA⁴ and Kazutaka SAKIYA⁴

¹非会員 博 (農) 国立研究開発法人 土木研究所 流域水環境研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6)
(現所属: 株式会社建設環境研究所 〒170-0013 東京都豊島区東池袋 2-23-2)

²非会員 国立研究開発法人 土木研究所 流域水環境研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6)
(現所属: 株式会社ウエスコ 〒690-0047 島根県松江市嫁島町 16-1)

³非会員 国立研究開発法人 土木研究所 流域水環境研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6)

⁴正会員 国立研究開発法人 土木研究所 流域水環境研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6)

汽水域における環境 DNA 調査では、捕獲調査との一致率が河川淡水域と比べて低いことが知られており、潮汐の影響や多様な岸際環境から地区を代表する採水箇所・採水タイミングの設定が課題である。本研究では、汽水域における調査精度を向上に資する情報を得るため、汽水域における時空間的な環境 DNA の検出特性を把握することを目的とした。那珂川河口域の 2km 区間内に 9 地点を設定し、潮汐の異なる 4 回 (下げ潮、干潮、上げ潮、満潮) の採水を行い、MiFish 法による環境 DNA メタバーコーディングを実施した。検出された魚類相の類似性を NMDS により可視化した結果、下げ潮・干潮では地点間の魚類相が類似し、上げ潮・満潮では地点ばらつきが大きくなり、採水場所の空間的な違いより、潮汐タイミングによる時間的な違いが、環境 DNA の検出種に大きな影響を与えることが分かった。また、検出種数は、干潮が満潮よりも有意に多く ($P < 0.01$)、干潮と上げ潮・下げ潮の間には差がなかったことから、汽水域における採水は、満潮時を避け、干潮時を中心とした採水を行うことで、多くの魚種が検出しやすいと考えられた。

Key Words: eDNA metabarcoding, MiFish, brackish water, tide, NMDS, revetment

1. はじめに

河川と海洋を繋ぐ汽水域は、餌資源の豊富な生産性の高い水域であり、塩分耐性を持つ一部の純淡水魚をはじめ、河川と海洋を往来する通し回遊魚、干潟等の汽水域特有の環境に依存する汽水魚、過渡的に河川を利用する海水魚等、様々な魚類にとって重要な生息場である。一方で汽水域は人口が集中しやすく、護岸整備等による人為的環境変化の影響が大きい水域であり、自然河岸の護岸化や河口堰による感潮域の分断といった要因から、生息場の機能低下が懸念されている¹⁾。

汽水域の環境保全のためには、環境変化を行う前にどのような生物が生息しているか確認した上で、それらの種に影響を与えない対策を行う必要がある²⁾、生物情報を効率的に取得する技術が求められている。水中等の環境に存在する生物由来の DNA から生息魚種を推定する環境 DNA 調査技術は、従来の捕獲調査より労力が低減される手法として注目されている³⁾⁴⁾。汽水域における環境 DNA 調査の課題として、捕獲調査との一致率が河川淡水域よりも低いことが知られており⁵⁾⁶⁾、この原因として、汽水域の流速

が低いこと、潮汐により流速・流向が変化すること等が考えられる。汽水域における環境 DNA を用いた魚類調査の精度を高める採水方法として、利根川で調査を行った事例では、流心より岸際の底層が適している⁷⁾と報告されているが、潮汐による流況は河川によっても異なり、どのような潮汐のタイミングで採水地点を設定すればよいのかは不明である。

そこで本研究は、河口域に多様な岸際環境を有する那珂川の河口域を対象として、比較的近い複数の地点において、塩分や流向・流速等の物理環境が異なる複数回の採水を行うことで、汽水域における時空間的な環境 DNA の検出特性を把握することを目的とした。

2. 材料・方法

(1) 対象河川

関東地方の一級河川である那珂川 (幹線流路延長: 150 km) の河口より約 2.0 km 区間を調査範囲とした (図-1)。本河川は弱混合型であり、支川の瀬沼川が河口よりおよそ 0.7 km の地点で合流している。那珂川の河口部は、数種類

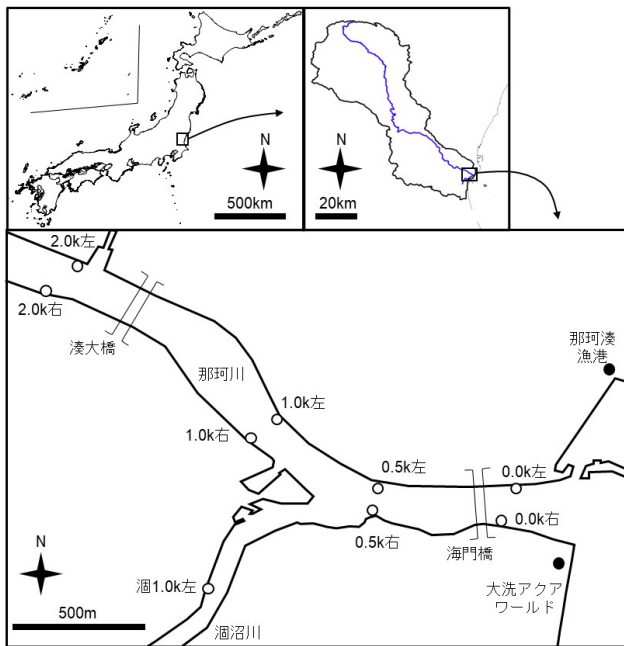


図-1 調査地区と設定した地点。



図-2 採水地点の状況。(a)1.0k 右岸：袋型根固め工，(b) 1.0k 左岸：矢板，(c) 瀬沼川 1.0k 左岸：捨石工，(d)0.0k 右岸：消波ブロック，2022/4/2 撮影。

の人工護岸から自然河岸まで多様な岸際環境がみられ(図-2)、環境DNA調査結果との比較に適している。また、本調査地区は、河川水辺の国勢調査(以下、水国調査)の調査地区(那那常1、海門橋、-0.3~0.7km)を含み、1993~2021年に計7回の調査が行われている。長期にわたる捕獲調査の結果は、地区が潜在的に有する魚類相として、環境DNA結果との比較が可能と考えられる。

(2) 調査方法

水国調査地区と概ね重なる地点として、0.0k、0.5k、1.0kの左右岸の計6地点、補足的な地点として、那珂川2.0k左右岸、と瀬沼川1.0k左岸の計3地点を設定した(図-1)。2022年4月2日の大潮の際に、潮汐の異なる4タイミング(下げ潮、干潮、上げ潮、満潮)で、那珂川2.0kの左右岸は、2タイミング(下げ潮、上げ潮)で河岸より表層水

表-1 採水地点の環境。

地点名	潮汐	塩分 (ppt)	流速 (cm/s)	流向	KP*1	河岸の状況	自然河岸	捨石工法
0.0k左岸	下げ潮	12.21	ND*2	順流	0.0	消波ブロック	0	0
	干潮	10.11	3.5	順流				
	上げ潮	8.06	-7.6	逆流				
	満潮	25.94	-8.2	逆流				
0.0k右岸	下げ潮	7.54	7.3	順流	0.0	自然河岸(砂浜)	1	0
	干潮	8.48	-3.7	逆流				
	上げ潮	9.01	-9.5	逆流				
	満潮	21.26	-7.9	逆流				
0.5k左岸	下げ潮	7.35	6.7	順流	0.5	消波ブロック	0	0
	干潮	5.67	1.7	停止				
	上げ潮	8.66	-10.3	逆流				
	満潮	11.16	-2.6	停止				
0.5k右岸	下げ潮	9.08	23.8	順流	0.5	自然河岸(岩盤)	1	0
	干潮	6.59	13.6	順流				
	上げ潮	7.2	-6.5	逆流				
	満潮	10.7	-5.5	逆流				
1.0k左岸	下げ潮	4.14	ND*2	順流	1.0	矢板	0	0
	干潮	2.74	ND*2	順流				
	上げ潮	9.77	ND*2	逆流				
	満潮	9.34	ND*2	逆流				
1.0k右岸	下げ潮	3.89	0.6	停止	1.0	袋型根固め工	0	1
	干潮	2.67	1.7	停止				
	上げ潮	9.18	-5.5	逆流				
	満潮	9.52	-1.6	停止				
瀬沼川 1.0k左岸	下げ潮	7.94	1.8	停止	1.0	捨石工	0	1
	干潮	12.27	26.4	順流				
	上げ潮	9.05	-24.8	逆流				
	満潮	17.9	-41.3	逆流				
2.0k左岸	下げ潮	4.05	2.1	停止	2.0	捨石工	0	1
	上げ潮	2.89	-0.5	停止				
2.0k右岸	下げ潮	2.94	22.3	順流	2.0	袋型根固め工	0	1
	上げ潮	3.25	-10.1	逆流				

*1: KPは、キロポストを示す
*2: NDは、水面まで遠い等の理由で測定が不可能であったことを示す

1Lを採水し、計32検体を得た。採水した検体は、クーラーボックスで10°C以下になるように氷冷して環境DNAの分解を抑制し⁸⁾、研究室に持ち帰った。また、現地の環境として、塩分、流速、流向、護岸の状況(自然河岸の有無、捨石工法の有無)、を記録した。流速は電磁流速計 VE20 (KENEK社)を、塩分は多項目水質計 YSI ProDSS (Zylem社)で計測した。

(3) 環境DNA分析

採水した水は、研究室に持ち帰り、孔径0.45μmのメンブレンフィルター(ADVANTEC社)を用いて、室内で1Lろ過した。環境DNA学会マニュアルに準じて、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN社)により抽出し、DNeasy PowerClean Pro Cleanup Kip (QIAGEN社)で精製した。1stPCRのプライマーは、硬骨魚類全般を増幅するMiFish-U-F/R⁹⁾、アナハゼ類を増幅するMiFish-U2-F/R¹⁰⁾、軟骨魚類を増幅するMiFish-E-F/R-v2¹⁰⁾、ヤツメウナギ類を増幅するMiFish-L-F/R¹¹⁾を、それぞれ4:2:2:1の比で混合したものを使用した。1stPCRは、Ex Taq HS (TaKaRa社)を用いて、10x Ex Taq Buffer 2.0μL、2.5mM dNTP 1.6μL、Ex Taq HS 5U 0.2μL、プライマーミックス 2.0μL、精製DNA 1.0μLを含む20μLの反応系で行った。1stPCRは各サンプル8反復で行い、同一サンプルから得られたPCR産物を混合して、2ndPCRに供し、iSeq100 (illumina社)による超並列シーケンスを行った。シーケンスデータは、タグ配列の除去後、DADA2¹²⁾を用いたデノイジング処理を行い、アダプター配列と低品質配列を除去して得られた代表配列を得た。1stPCR産物の混合からデノイジングまでの工程は、株式会社リクチコンサルタントへの外注で行った。

得られた代表配列のうちリード数が4以上あるものを、

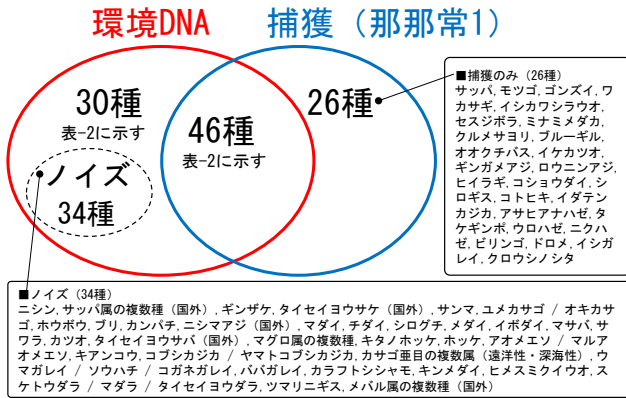


図-3 環境 DNA 検出種と河川水辺の国勢調査捕獲種との比較.

表-3 生態別の一貫率.

生態区分	種数 (区分内での割合)			
	eDNA のみ	一致	捕獲のみ	計
純淡水	12 (50%)	8 (33%)	4 (17%)	24
通し回遊	4 (22%)	13 (72%)	1 (6%)	18
汽水魚	2 (8%)	14 (58%)	8 (33%)	24
海水魚	12 (33%)	11 (31%)	13 (36%)	36

いため、ノイズとして以降の解析から除外した。また、確認種の生態的特徴として、増補改訂日本の淡水魚¹⁷⁾の記載より純淡水魚、通し回遊魚、周縁性淡水魚 (汽水魚) に区分し、これに未記載の種を海水魚とした。

(4) 群集構造解析

魚類の群集構造を可視化するために、各調査地点、採水タイミングによる魚類相を、非計量的多次元尺度法 (Non-metric multidimensional scaling: NMDS) により解析した。NMDS には、環境 DNA メタバーコーディングで検出された魚類の在・不在データを用い、検体間の類似度には Jaccard 係数を用いた。また、envfit 関数を用いて、魚類群集と環境要因 (塩分, KP, 自然河岸の有無, 捨石の有無) の関係について解析した。解析には R4.1.1 (R Development Core Team) の vegan パッケージ (version 2.6-4) を用いた。

加えて、潮汐間での種数、種組成の違いを確認するために、Kruskal-Wallis の多重比較検定で、生態別に潮汐間での検出種数を比較した。また、潮汐間の種組成の確認のため、4 地点 (0.0k 右, 0.5k 左, 0.5k 右, 1.0k 左) を合算した魚種リストでベン図を作成した。多重比較検定は GraphPad Prism9 (エムデーエフ社) により行い、ベン図は jvenn¹⁸⁾ を用いて作成した。

3. 結果と考察

(1) 調査日の概況

採水日の環境の概況を表-1 に示す。上げ潮時、満潮時は、

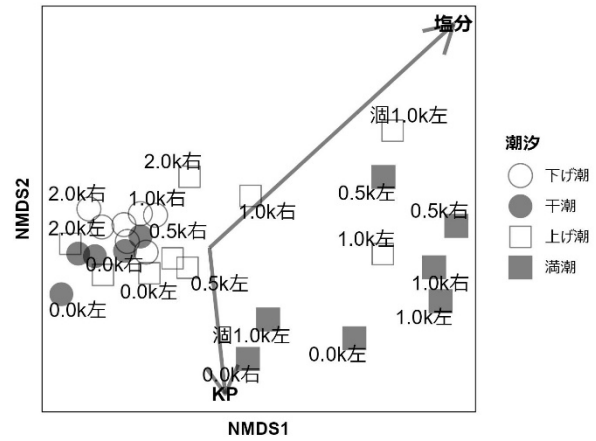


図-4 魚類相の類似度を用いた NMDS による 28 検体から検出された魚類相の可視化。地点名を文字で示し、プロットの形状で潮汐回を示す (○下げ潮, △干潮, ●上げ潮, ▲干潮)。ばらつきを有意に説明する環境要因 ($P < 0.05$) を矢印で示した。

比較的一様に上流向きの流れが生じていたのに対し、下げ潮時、干潮時は左右岸で流速の違いが見られた。涸 1.0k 左は、上げ潮時、満潮時に高い流速がみられた。

(2) 検出魚種と捕獲調査との比較

環境 DNA メタバーコーディング解析より、9 地点合計 28 検体の水から、109 種の魚類が検出された (総リード数 $73,147 \pm 49,998$)。その他の 4 検体 (0.0k 左の上げ潮時, 1.0k 右の干潮時, 涸 1.0k の干潮時と上げ潮時) は、解析不調で十分なリード数が得られなかった。特に、上げ潮時の検体の解析不調は、海藻に由来するアルギン酸等の多糖類による PCR 阻害¹⁹⁾が一因と推察された。

那那常 1 での 7 回の水国調査で捕獲された魚種は計 73 種であり、このうち環境 DNA でも検出された種が 34 種、環境 DNA では種まで特定されないが一致している可能性が高い種が 13 種、捕獲でのみ確認された種が 26 種であった。環境 DNA の種名を基準とすると 46 種が捕獲と一致した。環境 DNA でのみ確認された種は 64 種で、うち 34 種が食品等由来の可能性が高いノイズと判断された (図-3)。ノイズを除いた環境 DNA 検出種 (表-2) のうち、純淡水魚が 20 種、通し回遊魚が 17 種、汽水魚が 16 種、海水魚が 23 種みられた。

生態別の一貫率を表-3 に示す。環境 DNA と捕獲の一貫率は、通し回遊魚と汽水魚で比較的高く、純淡水魚、海水魚で低かった。純淡水魚は、環境 DNA でのみ確認された種が多く、この中の大半は那珂川水系の上流の水国調査地点で捕獲歴のある種で、本地区に少数生息していても不思議ではない。周辺の水路等からの流入による偽陽性の可能性もあるため、取扱いには注意が必要である。確からしさの指標として、検出された検体数があり、複数の検体から検出されたゲンゴロウブナ、カワムツ、ヌマムツ等は真陽性の可能性が高い。海水魚は、捕獲のみの種、環境 DNA

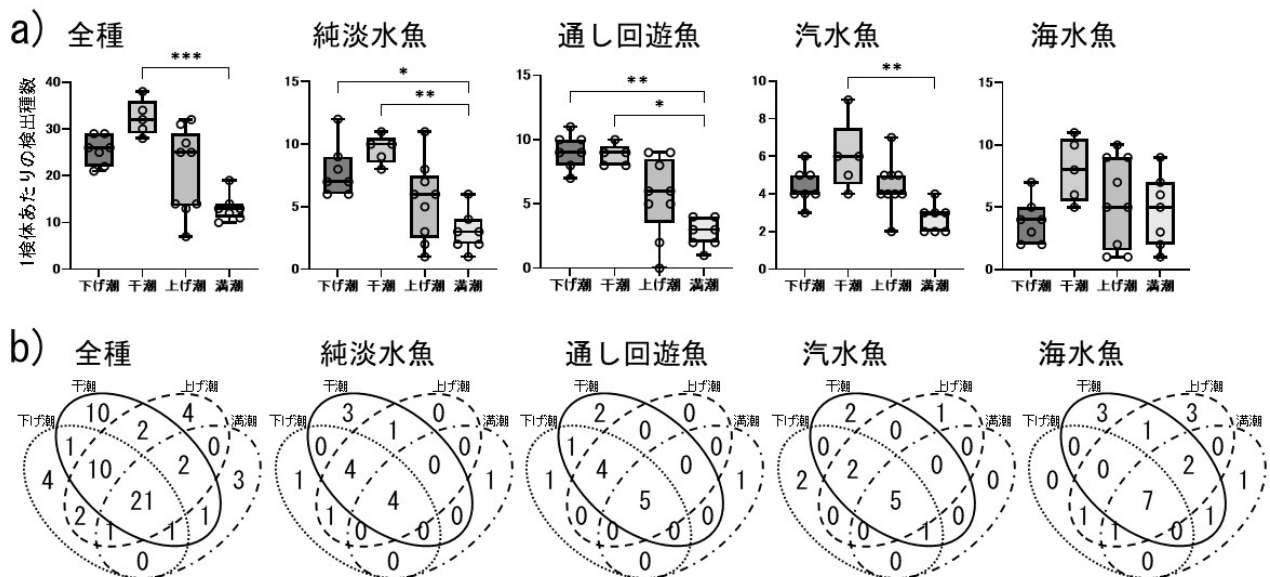


図-5 潮汐タイミングによる検出種数の違い(a)と4地区における検出種の重複状況(b). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

のみの種の両方が多く、過来的に河川を利用する海水魚は、どちらの調査方法でも十分に網羅できない可能性が示唆され、生息する海水魚をより正確に把握するには、捕獲調査と環境DNA調査を併用することが効果的と考えられた。

(3) 群集構造解析

魚類群集構造を把握するためのNMDSの結果を図-4に示す。2軸によって最終的なストレス値が0.189を示し、検体間の類似性を2次元で良好に表現できた。NMDSでは、地点間の距離が近いほど、群集構造が類似していることを意味する。上げ潮時・満潮時に比べて、下げ潮時・干潮時の検体が原点付近にまとまって配置され、魚類相のばらつきは塩分、KP、種数によって有意に説明された ($P < 0.01$)。河岸の状況(自然河岸、捨石工法)と魚類相の間には有意な関係はみられなかった。環境DNAの流量量は概ね2km以内²⁰⁾とされ、およそ2km区間に複数地点を設定した本研究では、解像度が不足している可能性が高い。

潮汐間の検出種数の違いを図-5aに示す。満潮時は、干潮時に比べて有意に種数が少なく、純淡水魚、通し回遊魚、汽水魚でも同様の傾向がみられたが、海水魚の種数に有意な違いはなかった。また、下げ潮、干潮、上げ潮の検体間の種数は、生態区分別でも有意な違いはみられなかった。

潮汐間の検出種の重複状況を図-5bに示す。4地区の合計種62種のうち干潮で48種、上げ潮で42種、下げ潮で40種、満潮で29種が検出され、干潮で最も多かった。潮汐に固有な種は干潮で10種、上げ潮で4種、下げ潮で4種、満潮で3種が検出され、同様に干潮で最も多かった。干潮固有の10種は、純淡水魚3種(ヌマムツ、タカハヤ、カワヨシノボリ)、通し回遊魚が2種(カワアナゴ、ボウズハゼ)、汽水魚が2種(ヒナハゼ、ヌマガレイ)、海水魚が3種(アカエイ、イソギンポ、ウマズラハギ)で、生態区分に偏りは見られないが、ハゼ科の底生魚類が比較的多くみられた。下げ潮固有の4種(スナゴカマツカ、サクラ

マス類、メナダ、キチヌ)に海水魚は見られず、上げ潮固有の4種(アオタナゴ/ウミタナゴ、シマイサキ、ギンポ、マガレイ/マコガレイ)に純淡水魚、通し回遊魚はみられなかった。なお、満潮固有の3種は、スゴモロコ/デメモロコ/コウライモロコ、クジメ、イドミミズハゼであった。

(4) 最適な採水タイミング

NMDSの結果からは、那珂川汽水域の2km区間において、地区内の採水箇所の空間的な違いより、どの潮汐タイミングで採水するかの時間的な違いが大きいことが分かり(図-4)、魚類相の把握には、採水タイミングが重要であること示された。

潮汐間の検出種数からは、満潮時が他のタイミングよりも種数が少なく(図-5)、採水タイミングに固有の種の検出もほとんどみられないため、避けるべきタイミングであった。干潮、上げ潮、下げ潮では、種数に有意な差はないが、干潮時に固有で検出された種が10種と多く、干潮時を中心として採水を行うと多くの種を網羅できると考えられる。干潮時に加えて、もう1タイミングで採水する場合、種数の少ない満潮時ではなく、上げ潮時か下げ潮時が候補となる。種組成からは、純淡水魚、通し回遊魚、汽水魚を優先するならば下げ潮時、海水魚をより検出したいならば上げ潮時が有効と考えられる。ただし、上げ潮時は0.0k左岸で非常に多くのノイズが検出され、これは那珂湊漁港等の周辺施設に由来する可能性が高い。0.0k左岸の上げ潮時、満潮時の2検体からノイズとして検出されたアオメエソ/マルアオメエソは、いずれも250m以深に生息する深海魚であり、メヒカリとして茨城県で多く漁獲されている。

総じて、汽水域で採水を行う際には、干潮時の採水を基本とし、上げ潮時か下げ潮時の採水を追加すると良いと考えられた。その際、確認したい魚種、漁港等ノイズとなるDNA放出が想定される施設との位置関係に注意する必要がある。

4. 結論

本研究では、人工護岸から自然河岸まで多様な岸際環境を有する那珂川水系の汽水域を対象とし、2 km 区間内の複数地点で潮汐の異なる4回の採水を行い、時間的・空間的な環境DNAの分布を把握した。その結果、次のような知見が得られた。

- ・ 那珂川河口部の2 km 区間での環境DNAの魚類相は、空間的な差異より潮汐による時間的な違いで変化した。
- ・ 検出種数は、干潮で満潮より有意に多く、満潮時の採水は避けるべきと考えられた。
- ・ 上げ潮と下げ潮は、干潮との間に有意な種数の差はみられなかった。しかしながら、上げ潮時に下流側に位置する漁港に由来すると思われる種が多数検出される地点があり、生息魚種由来でないDNAの発生が想定される施設から流出する環境水の混入を低減させるように位置関係に留意して採水を行うべきと考えられた。
- ・ 汽水域における捕獲調査との一致率は、通し回遊魚と汽水魚で比較的高く、純淡水魚と海水魚で低かった。
- ・ 純淡水魚は、環境DNAでのみ確認された種が多く、河川上流や周辺水路からの流入による偽陽性が示唆された。海水魚は、捕獲のみ、環境DNAのみで確認された種の双方が多く、遇来的に河川を利用する海水魚を網羅的に把握するには、捕獲調査と環境DNA調査を併用することが効果的と考えられた。

今後の課題として、干満差の異なる他水系で同様の検出傾向が得られるか精査していく必要がある。

謝辞：本研究の遂行にあたり、相島芳江氏、雨貝則子氏をはじめとする土木研究所流域生態チームの方々には、技術的協力を得た。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 楠田哲也, 山本晃一: 河川汽水域—その環境特性と生態系の保全・再生, 技法堂出版, 2008.
- 2) 乾隆帝, 小山彰彦: 本州・四国・九州の河口干潟に生息するハゼ類, 魚類学雑誌, 61(2), pp.105-109, 2014.
- 3) 山中裕樹, 源利文, 高原輝彦, 内井喜美子, 土居秀幸: 環境DNA分析の野外調査への展開, 日本生態学会誌, 66(3), pp.601-611, 2016.
- 4) 土居秀幸, 近藤倫生: 環境DNA—生態系の真の姿を読み解く—, 共立出版, 2021.
- 5) 中尾遼平, 赤松良久, 乾隆帝, 内藤太輔, 都築隆禎: 環境DNA手法を用いた河川流程における魚類相再現性の検証— 中国地方1級河川における河川水辺の国勢調査との比較—, 河川技術論文集, 26, pp.331-336, 2020.

- 6) 篠原隆佑, 村岡敬子, 菅野一輝, 天羽淳, 中村圭吾: 環境DNA分析の河川の魚類調査への適用に向けた最適な採水地点の検討, 河川技術論文集, 28, pp.181-186, 2022.
- 7) 平田真二, 白尾豪宏, 飯田岳, 赤松良久, 乾隆帝, 中村圭吾, 村岡敬子: 汽水域及び河川下流域における環境DNAの空間分布把握とサンプリング法の検討, 河川技術論文集, 25, pp.417-422, 2019.
- 8) Tsuji, S., Ushio, M., Sakurai, S., Minamoto, T., Yamanaka, H.: Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance, PLoS One, 12(4), e0176608, 2017.
- 9) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., ...Iwasaki, W.: 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(7), 150088., 2015.
- 10) Minamoto, T., Miya, M., Sado, T., ...Uchii, K.: An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. Environmental DNA, 3(1), pp.8-13., 2021.
- 11) 環境省: 環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き改訂第2版, (https://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html), 2021.
- 12) Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P.: DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data, Nature methods, 13(7), pp.581-583, 2016.
- 13) 環境省: MiFish法に係る誤同定チェックシート, (https://www.biodic.go.jp/edna/reports/mifish_tebiki2re.pdf), 2022.
- 14) 総務省統計局: e-Stat 令和2年度漁業産出額, 主要魚種別海面漁業産出額, (<https://www.e-stat.go.jp/>), 2020.
- 15) 河村功一: 日本産魚類検索全種の同定, 第三版, 中坊徹次 (編), 東海大学出版会, 2014.
- 16) 本村浩之: 日本産魚類全種目録. これまでに記録された日本産魚類全種の現在の標準和名と学名, (<https://www.museum.kago-shima-u.ac.jp/staff/motomura/jaf.html>), 2023.
- 17) 細谷和海: 山溪ハンディ図鑑 増補改訂 日本の淡水魚, 山と溪谷社, 東京, 2019.
- 18) Philippe B., Jérôme M., Frédéric E., Christophe D., Christophe K.: jvenn: an interactive Venn diagram viewer, BMC Bioinformatics, 15:293, 2014.
- 19) 板宮裕実, 吉川ひとみ: 植物の法科学的検査に適したPCRキットの比較, 分析化学, 65(12), 757-763, 2016.
- 20) Jo, T., Yamanaka, H.: Meta-analyses of eDNA downstream transport and deposition in relation to hydrogeography in riverine environments. Freshwater Biology, 67(8), pp.1333-1343, 2022.

(2023. 3. 24 受付)