

大阪湾奥における 魚類多様性検出のための環境DNA調査

上村 了美¹・大谷 壮介²・岩見 和樹³・上月 康則⁴・田辺尚暉³・山中 亮一⁵

¹大阪市立大学大学院工学研究科 (〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138)

E-mail: satomi.kami@gmail.com

²正会員 大阪府立大学工業高等専門学校総合工学システム学科 (〒572-8572 寝屋川市幸町 26-12)

³学生会員 徳島大学大学院 先端技術科学教育部 (〒770-8506 徳島県徳島市南常三島 2-1)

⁴正会員 徳島大学 環境防災研究センター (〒770-8506 徳島県徳島市南常三島 2-1)

E-mail: yasunorikozuki@gmail.com

⁵正会員 徳島大学 環境防災研究センター (〒770-8506 徳島県徳島市南常三島 2-1)

大阪湾奥に位置する尼崎運河において、環境DNA調査と捕獲調査を比較して運河内スケールにおける環境DNAの有効性と問題点を検討し、各調査地点の魚類相の比較および環境条件との関連を明らかにした。東堀では1月の表層のORPやDOが回復し、同時期の環境DNAにより検出された種数が最も多かった。このことから、この場所が水質の回復によって魚類の利用場所となるポテンシャルを持っている可能性が示唆された。環境DNA調査はより環境の異なる港湾との比較や季節変化については差の検出が可能であった。環境DNA調査は検出は不安定で、検出できない種もあるが、採捕調査よりも多くの魚種を検出する傾向にあり、直接採捕の調査と合わせると互いの調査方法の結果を補い、魚類相全体の把握に有効な手法であると考えられる。

Key Words : eDNA, Amagasaki canal, MiFish, fish diversity

1. はじめに

大阪湾奥部に位置する尼崎運河から尼崎港にかけての水域は、廃棄物処分場や工場用地のための埋め立てや防潮堤の建設によって、浅場はほぼ消滅し、閉鎖的な環境となっている。尼崎運河は、陸間・水門と直立護岸に囲まれているため、流速もほとんどなく、底質はヘドロ化し、年間を通して富栄養状態かつ底層はほとんど貧酸素化した状態にある。このような尼崎運河における生物相を再生させようと、水質改善のための曝気手法の検討や護岸付帯式浅場による二枚貝の生息区間の創出¹⁾、藻類を用いた水質改善手法²⁾、二枚貝を活用した水中懸濁物除去手法の開発³⁾、構造物底面への生物付着防止手法⁴⁾などの研究が実施されてきた。さらに汚濁化対策と利活用促進を目的として「尼崎運河水質浄化施設」が2012年に竣工し、大阪湾再生行動計画のアピールポイントに選定されている。⁵⁾

このような取り組みが生物相にもたらす効果の評価するため、2016年度には年間を通してボサ籠(垂下式の小型の籠)を設置した魚類を主とする生物相調査が行われた⁶⁾。しかしながらこの調査手法では毎回ボサ籠を設置・回収する労力と形態から種を同定するための専門知識が必須となり、継続的なモニタリングを行うためにはより効率的な方法が求められていた。

近年、生物の生息状況や生物多様性を知るために

一般的であった目視や捕獲とは異なる手法として、環境中のDNAを解析して生物の生息状況を知ることができる環境DNA手法が提案された⁷⁾。この環境DNA調査は簡易的に種多様性の評価ができる手法として注目されているが、生態系の特徴や対象種にあわせた改良が必要であると言われている。尼崎運河では、2017年11月および2018年1月に環境DNAを用いた魚類調査が行われたが⁸⁾、尼崎運河のような流速が遅く、過栄養域で懸濁物質が多い海域での環境DNAの本格的利用のためには、捕獲調査との比較や有効な空間スケールの把握を目的とした調査が必要であると考えられた。そこで本研究では、1) 環境DNA調査と捕獲調査を比較して運河内スケールにおける環境DNAの有効性と問題点を検討し、2) 各調査地点の魚類相を比較し、環境条件との関連を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

(1) 調査地と試料採取方法

尼崎運河において、北堀、南堀、東堀の3か所を選定し、港湾を対象区として合計4地点を調査地点とした(図-1)。北堀は水質浄化施設の前面、南堀は水深が2m以浅の浅場、東堀は運河内の最も奥の地点である。水質調査および環境DNA調査は2018



図-1 調査地点

年5月, 8月, 11月, 2019年1月(計4回)に行った。水質調査は多項目水質計(HydroLab社, MS5)を用いて, 水深, 水温, DO, 塩分, ORPを計測した。水深を把握した後に, 各調査地点の上層, 下層において1000 mlの採水ボトルを用いて3回の採水を行った。上層は水面より0.5 m下の箇所, 下層は海底より1 m上の箇所での採水した。ただし, 南堀と港湾は水深が浅いため, 下層は0.5 m上での採水とした。3回分の採水試料を混合し, DNA分解を抑えるために, すぐに塩化ベンルコニウム溶液(オスバン消毒液)を水の容量に対して1%となるように添加した⁹⁾。ろ過量は5月と11月のすべての試料は1000 mL, 8月と1月のすべての試料は500 mLとした。ろ紙はDNA抽出まで-20°Cで冷凍保存した。

(2) 環境DNA調査

DNA抽出からPCRまでの方法はMiya et al. (2015)¹⁰⁾を参照して, 環境DNAメタバーコーディング法による工程で実施した。まず, ろ過を行ったろ紙からMPureBacterial DNA Extraction Kit (MP Bio)を用いてDNAを抽出, OneStepPCR Inhibitor Removal Kit (ZYMO RESEARCH)を用いてPCR阻害物質を除去・精製した。次に, Synergy H1 (Bio Tek)とQuantifluor dsDNA System (Promega)を用いて, 抽出・精製したDNAの濃度を測定し, 適切な濃度のDNA液をテンプレートとして, MiFishプライマーを用いて2step tailed PCRによりライブラリーを作製した。運河と港湾の試料は, ろ過の偶然性と偽陰性の関連を明らかにするため1stPCRを4replicationとした。次に, SynergyH1とQuantifluor dsDNA System, Fragment AnalyzerおよびDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies)を用いてライブラリーのクオリティーと濃度を測定し, 次世代シーケンサー解析(Miseq)を行った。

データ解析は上村ら⁸⁾と同じソフト, 手法を用いた。作成した97%以上の相同性のOTU(類似性の高い塩基配列)は, Blast検索を用いて魚類ミトコンドリアゲノムデータベース(MitoFish: <http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>)やMiFish用リファレンスの

配列と比較し, 種名を決定した。97%以上の相同性のある種が複数の場合はそれらを併記した。100リード以上の種・分類群を信頼性のあるデータとして扱うこととした。

(3) 採捕調査

採捕調査では定置網・刺し網・投網を2018年8月(計1回)に北堀と南堀で行った。定置網・刺し網は1日目に漁具の設置, 2日目に漁具にかかった魚類を回収した。北堀では, 刺し網(約30 m×3 m)を上層と下層, 小型定置網, カゴ網を底層に設置した(図-5)。一方で, 南堀では刺し網(約15 m×3 m)を1層, 小型定置網, カゴ網を底層に設置した。投網は, 両地点において3回ずつの実施し, 採集した試料は現地にて同定した。

また, 継続的に籠を設置して採捕するボサ籠調査(籠の詳細などは, 竹山ら, 2017を参照)を2018年1月~2019年1月(計13回)に北堀で行った。

3. 結果

(1) 水質調査

水温は, 5月と8月では水深が深くなるに伴って低下していた。一方で, 11月と1月は水深が深くなると水温が高くなっていった。水深の深い北堀と東堀では上層と下層で温度差が大きかったが, 比較的浅い南堀と港湾では上下層の温度差は小さかった(図-2b)。

塩分は, 各季節・地点において, 水深が深くなるに伴って増加する傾向がみられたが, 11月と1月の港湾においては水深による変化はほとんど見られなかった。また, 運河3地点の塩分は, 表層において10psuから15psuとおおむね同様の値を示した(図-2a)。

ORPは, 北堀と東堀のいずれの季節においても, 底から1~2 mのところできく低下し, マイナスの値を示した。また, 5月の東堀と8月の北堀では, 上層においてもマイナスの値を示し, 還元的であった。東堀では, 表層2 mまでのORPの季節変動が大きく, 1月が100 mV以上と最も高い値を示した。一方で, 同じ運河内でも南堀のORPは年間を通してプラスの値を示しており, どの水深帯に関わらず酸化的な環境であった(図-2c)。

DOは上層から水深1.5 m程度までは大きな変化はなく, 5 mg/L以上と十分に酸素がある環境であった。しかしながら, 北堀と東堀のDOはある水深帯をさかいに, 大きく低下して, 底層では3 mg/L以下になることが確認された。これはORPでみられたものと同様の傾向である。一方で, 南堀のDOは3 mg/L以下になることはなく, どの水深帯に関わらず十分な酸素がある環境であった(図-2d)。

(2) 環境DNA調査と採捕調査の比較

a) 環境DNA調査

上層と下層の環境DNAの検出種数にはいずれの

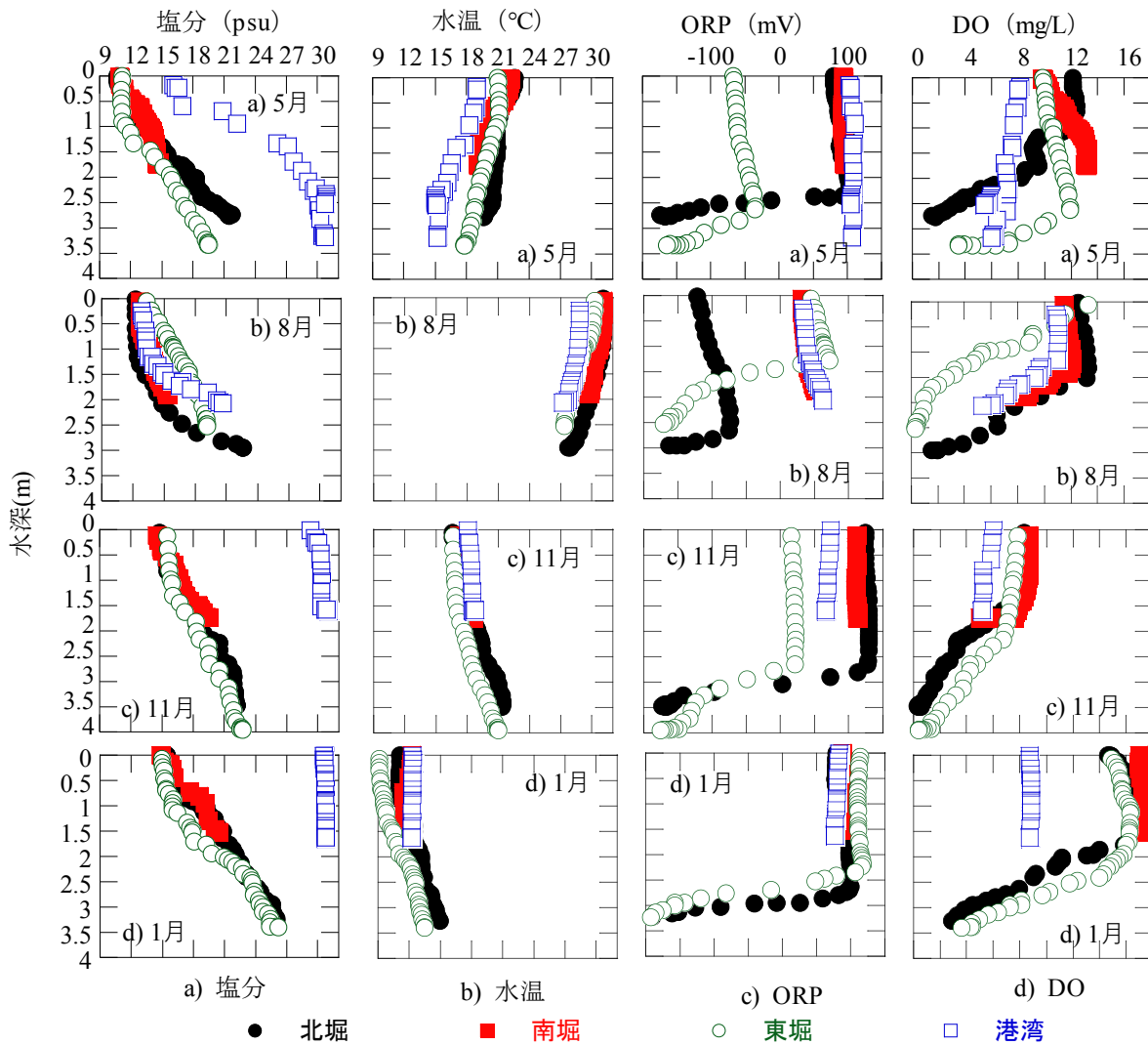


図-2 尼崎運河内および港湾の水質

調査地点も大きな差はなかった（表-1）．5月から1月の各地点の環境DNAでは、港湾で検出された種が最も多く、5～11月の運河内3点の種数に大きな差はなかった（表-2）．魚種では、北堀ではゲンゴロウブナ、東堀ではウキゴリが検出されるなどの特徴がみられた．他にも東堀ではマダラ、港湾ではナマズ、ヘラツノザメ、ブリなどが検出されたが、これらは当環境では実際に生息しているとは考えにくい種であった．東堀では1月の種数が最も多かった．

b) 環境DNA調査と採捕調査

2018年8月の北堀では、環境DNA調査で検出された種が8種であったが、定置網では採捕できず、他の各採捕調査は2～3種の魚類が採捕できた．南堀では、環境DNAと定置網の種数が同じ7種であったが、投網や刺し網は3種と少なかった（表-3）．キチヌとボラは、北堀と南堀の両方で、環境DNAのみから検出された．マハゼは北堀では環境DNAのみで検出され、南堀では刺し網・定置・投網でのみみられた．トウゴロウイワシでは北堀・南堀両方において採捕調査のみでみられた．

表-1 環境DNAによって検出された種数．上層と下層で検出された種について、重複を除いたものを全体の種数とした．

調査月	層	北堀	南堀	東堀	港湾
5	上	3	3	1	3
	下	4	3	1	3
	全体	4	3	1	4
8	上	6	5	6	6
	下	7	7	4	8
	全体	8	7	6	10
11	上	6	7	4	13
	下	6	6	4	12
	全体	8	7	5	17
1	上	4	3	5	8
	下	3	1	5	9
	全体	5	3	9	12

表-2 環境DNAにより検出した魚種

魚種	北堀	南堀	東堀	港湾
アカオビシマハゼ				○
アブラハヤ	○			
アミメハギ				○
イソギンボ				○
イダテンギンボ				○
ウミタナゴ				○
カサゴ				○
カタクチイワシ		○		○
キチヌ	○	○		○
クロダイ	○	○	○	○
クロメバル				○
コノシロ	○	○	○	
サッパ	○	○	○	○
サヨリ				○
シマイサキ	○			○
スズキ	○	○	○	○
ドロメ				○
ナマズ				○
チチブ/ヌマチチブ	○	○	○	
ボラ	○	○	○	○
マアジの1種	○	○		○
マサバ			○	○
マハゼ	○		○	○
メジナ				○
メナダ	○	○	○	○
ゲンゴロウブナ	○			
マダラ			○	
ウキゴリ			○	
ハゲブダイ				○
ヘラツノザメ				○
ブリ				○
	13	10	11	25

4. 考察

(1) 尼崎運河の水質の季節変化

尼崎運河における水質は季節変化を示していた。北堀と東堀の下層では季節を通じて還元的かつ貧酸素状態であり、底生生物が生息するには厳しい環境であることが示唆される。しかしながら、東堀では表層において1月にORPやDOが回復し、同時期の環境DNAから検出された全体の種数（上層・下層の重複を除いた種数）は、5～11月に比べて最も多い時期であった。このことから、この場所がORPやDOの回復によって、より多様な魚類の利用場所となるポテンシャルを持っている可能性がある。

(2) 環境DNA

上層と下層の環境DNAの検出種数にはいずれの調査地点も大きな差はなかった。本調査では、最大で4m程度の水深で調査しており、特に運河内においては、上層と下層では塩分やORPなどの水質条件に違いがみられたことから、魚類の生息状況も異なっていると予想した。しかしながら、環境DNAの結果からは、上層と下層の検出種数に大きな差はみられなかった。このことは、そもそもの検出種数が少ないことと、本調査の鉛直のスケールでは環境DNAによる違いの検出は難しいことが考えられる。

一方、港湾で検出された種が最も多かったことや、運河内の各地点で検出された魚種に特徴がみられたことから、本調査地のような空間スケールにおいての違いの検出は可能であると考えられる。尼崎運河は閘門により管理されているため運河内の流れはほとんど停滞しており¹¹⁾、一般的な河川とは異なる空間スケールでの差異の検出が可能であると考えられる。また、同じ調査地点での季節変化については特に運河内において違いがみられたことや、環境DNAの分解について、温度に依存するものの、最大でも25日程度と考えられることから¹²⁾、本調査のような3か月程度の時間スケールの変化も、環境DNAによって検出が可能であると考えられる。

検出された魚種の妥当性については、目視や捕獲調査が行われた過去の記録や生態特性から検討したが、マダラ（東堀）、ナマズ、ヘラツノザメ、ブリ（いずれも港湾）については当環境では実際に生息しているとは考えにくい種であった。このような生息の可能性の低い種が検出されることは、上村ら⁸⁾の調査でも確認されている。釣り餌として混入した可能性もあるが、やはり由来は不明である。このようなデータは、過去の文献や、検出された種の生息環境などの情報をあわせて精査し、慎重に取り扱う必要がある。

上村ら⁸⁾の調査では、外来生物であるブルーギルが北堀から環境DNAによって検出されたが、今回の調査では検出されなかった。前回に比べて調査回数や調査地点を多くしているため、本調査期間内の運河内には生息している可能性は低いと考えられる。しかしながら、外来生物であることの重要性を鑑み、本種は本調査地点の上流でも生息が確認されていること、汽水域での生息も可能であることなどから、継続的に注視していく必要がある。

(3) 環境DNAと採捕調査の比較

2018年8月の北堀では、環境DNA調査で検出された種が8種、定置網では魚類を採捕できず、他の各採捕調査は2～3種の魚類が採捕できた。南堀では、環境DNAと定置網の種数が同じ7種であったが、投網や刺し網は3種と少なかった。これより定置網の結果においては、北堀よりも南堀のほうが魚類の生息に適している可能性が支持された。キチヌとボラは環境DNAのみで検出されており、採捕手法では

表-3 北堀と南堀における
環境DNAおよび採捕調査の魚種の比較 (2018年8月)

魚種	北堀					南堀			
	環境DNA	採捕				環境DNA	採捕		
		ボサ籠	刺し網	定置	投網		刺し網	定置	投網
ウロハゼ						○	○		
カタクチイワシ					○				
キチヌ	○					○			
ギマ								○	
クロダイ	○					○			
コノシロ	○		○		○	○	○		
サッパ	○				○	○			
シマイサキ	○							○	
スズキ			○						
チチブ	○	○				○		○	○
トウゴロウイワシ					○			○	○
ヒイラギ								○	
ボラ	○					○			
マハゼ	○						○	○	○
メジナ		○							
総計	8	2	2	0	3	7	3	7	3

採捕できなかったような大型種を環境DNAでは検出できたといえる。また、マハゼは北堀では環境DNAのみで検出されたが、南堀では刺し網・定置・投網でのみみられたこと、トウゴロウイワシでは北堀・南堀両方において採捕調査のみでみられた。このことから、環境DNA調査は、採捕調査よりも多くの魚種を検出する傾向にあるが、検出は不安定で、検出されにくい種もあることが示唆された。環境DNA調査は簡便な方法で、生物相全体を把握することが可能であると期待されているが、尼崎運河のような閉鎖的で濁質の多い汽水環境では、同時期の運河内全体の魚類相の特徴を検出することは困難で、課題があることがわかった。ただし、より環境が異なる運河と港湾での比較や季節変化については、ある程度特徴を把握できること、直接採捕の調査と合わせると互いの調査方法の結果を補い、魚類相全体の把握に有効な手法であることなども把握できた。

5. 結論

本研究では、環境DNA調査と捕獲調査を比較して運河内スケールにおける環境DNAの有効性と問題点を検討し、各調査地点の魚類相と環境条件との関連を明らかにした。主な結論は以下のとおりである。

- (1) 尼崎運河の東堀では表層において1月にORPやDOが回復し、同時期の環境DNAから検出された種数は、5~11月に比べて最も多い時期であった。このことから、この場所が水質の回復によって魚類の利用場所となるポテンシャルを持

っている可能性がある。

- (2) 2~4m程度の水深では、上層と下層での魚類相の差異を環境DNA調査で検出することは難しいが、塩分などの環境が異なる港湾と運河での魚類相の比較や季節変化については検出可能であることがわかった。
- (3) 環境DNA調査は、採捕調査よりも多くの魚種を検出する傾向にあるが、検出は不安定で、検出されにくい種もあることが示唆された。一方で、より環境が異なる運河と港湾での比較や季節変化については、ある程度特徴を把握できることから、環境DNA調査は、直接採捕調査と補い合えば、効率的な魚類相全体の把握や考察に有効であることが示された。

謝辞：本研究は、JSPS科研費 17K01921、大阪湾広域臨海環境整備センターの平成30年度「大阪湾圏域の海域環境再生・創造に関する研究助成事業」の助成を得た。また、調査にご協力いただいた元徳島大学大学院 上田敦史氏、瀧口裕己氏、徳島大学大学院 藍澤夏美氏、宮内尚輝氏、戸田涼介氏、尼崎運河〇〇クラブ、尼崎港管理事務所の支援を受けて行われた。ここに謝意を表す。

参考文献

- 1) 森紗綾香, 山中亮一, 上月康則, 板東伸益, 高橋秀文, 上嶋英機：尼崎運河における護岸付帯式浅場を用いた砂浜性二枚貝の生息空間創出に関する現地実験, 海洋開発論文集, 第25巻, pp.431-436, 2009.

- 2) 山中亮一, 上月康則, 一色圭佑, 森紗綾香, 川井浩史, 石垣衛, 上嶋英機, 高橋秀文: 尼崎運河に設置した小水路における藻類を用いた水質改善手法の現地実験, 土木学会論文集 B2(海岸工学), Vol. 66, No. 2, pp.1201-1205, 2010.
- 3) 山中亮一, 上月康則, 桶川博教, 沓掛安宏, 一色圭佑, 山中健太郎, 島巡露濤, 中西敬, 川井浩史, 石垣衛, 上嶋英機, 今中治夫: 尼崎運河での優占二枚貝を活用した水中懸濁物除去手法の開発, 土木学会論文集 B2(海岸工学), Vol. 69, No. 2, pp.I_1086-I_1090, 2013.
- 4) 山中亮一, 上月康則, 桶川博教, 森紗綾香, 一色圭佑, 前田真里, 川井浩史, 石垣衛, 中西敬, 上嶋英機, 平井住夫: 尼崎運河における構造物底面への生物付着防止方法の提案とその効果, 土木学会論文集 B2(海岸工学), Vol. 67, No. 2, pp.I_1036-I_1040, 2011.
- 5) 大阪湾再生推進会議: 大阪湾再生行動計画 (第二期), 2014.
- 6) 竹山佳奈, 山中亮一, 河野博, 岩本裕之, 宮本一之, 平川倫, 上月康則: 都市部運河域を利用する魚類を対象とした生物共生護岸に関する実験的検討, 土木学会論文集 B3 (海洋開発), 第 73 巻, 2 号, pp.845-850, 2017.
- 7) 高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子: 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, 第 66 巻, 3 号, pp.583-599, 2016.
- 8) 上村了美, 上月康則, 大谷壮介, 平川倫, 岩見和樹, 竹山佳奈, 山中亮一: 環境 DNA メタバーコーディングによる運河・港湾に生息する魚類の種多様性検出に関する研究, 土木学会論文集 B3 (海洋開発), Vol. 74, No. 2, pp.I_474-I_479, 2018.
- 9) Yamanaka, H., Minamoto, T., Matsuura, J., Sakurai, S., Tsui, S., Motozawa, H., Hongo, M., Sogo, Y., Kakimi, N., Teramura, I., Sugita, M., Baba, M., Kondo, A.: A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*, 17(2), 233-241, 2017.
- 10) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., Iwasaki, W.: MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species, *R. Soc. open sci.*2, 150088, 2017.
- 11) 中西敬, 上月康則, 森紗綾香, 川井浩史, 辻博和, 上嶋英機: 尼崎港内運河における環境修復の取組み 閘門・水門を利用した流況制御・水質改善実験, 海洋開発論文集, 第 23 巻, 757-762, 2007.
- 12) 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, 第 66 巻, 3 号, pp.601-611, 2016.

(2019. 3. 13 受付)

FISH DIVERSITY DETECTION AT THE INNER PART OF OSAKA BAY USING ENVIRONMENTAL DNA ANALYSIS

Satomi KAMIMURA, Sosuke OTANI, Kazuki IWAMI, Yasunori KOZUKI,
Naoki TANABE, Ryoichi YAMANAKA

Fish diversity at Amagasaki canal in the Inner Part of Osaka Bay were investigated by environmental DNA analysis (eDNA) to clarify whether this method is valuable in eutrophic conditions. A ORP and DO was restored in January in Higashi-bori sampling point and the detected fish species was larger number than the other time. The result suggests that Higashi-bori has a potential for fish habitat with a water quality recovery. The number of detected species and fish fauna suggests that eDNA is efficient in comparison among sampling points which has sharp contrast of environmental factors and monitoring seasonal difference. The eDNA is unable to detected a certain species, but allow to detect larger number of species than the conventional sampling methods. eDNA is most effective when used in conjunction with conventional sampling method for investigation of fish diversity.