

すくった水を見るだけで、棲んでいる生きものが分かる

小出水規行*

[キーワード]: 環境 DNA, PCR, メタバーコーディング, 魚類生息調査, 農業水路

1. はじめに

最近、絶滅危惧種や外来種の増加,あるいはSDGs(持続可能な開発目標)といった観点から,私たちの身近な生きものや自然環境に目を向ける機会が増えている。しかし,ここにどのような生きものが棲んでいるのか?この素朴な疑問に正確に答えることはとても難しい。例えば,水田,農業水路,ため池などの農村水域における生きもの調査では,これまで魚類を対象として,定置網,タモ網,センなどの漁具による個体採捕が行われてきた(図1)。ところが,それぞれの漁具による個体の捕れ易さや調査者の経験による採捕能力は異なるため,常に正しい結果が得られるとは限らない。正しい結果を得るには,多大な時間と費用をかけ,綿密な調査を行わなくてはならない。

このような中,近年,個体採捕の代わりに,すくった水を見るだけで,棲んでいる生きものが分かる「環境DNA(environmental DNAまたはeDNA)分析法」が新たな生きもの調査法として注目を浴びて



図1 農業水路における魚類調査(定置網を設置している様子)

いる。野外の水は一般に,プランクトンやバクテリアのほか,魚類や甲殻類などの代謝物や排泄物に由来する細胞片も微量に含んでいる。したがって,すくった水からDNAを抽出すれば,そこに棲むすべての生きもののDNAが得られ,このDNAに基づいてどの生きものがあるかを推定できる。このDNAは,水という環境に由来することから,環境DNAと呼ばれている(図2)。実は,環境DNAを利用した分析は,以前からバクテリアなどの同定で適用されていた。ところが,2008年になって,魚類や両生類などの同定にも利用できることが確認され,以降,日本,アメリカ,イギリスなどに広がり,現在では,世界各国で様々な動植物を対象に環境DNA分析が取り組まれている。

環境DNA分析は,これまでの個体採捕による生きもの調査のあり方に大きな変化をもたらすと考えられている。現段階の技術では,個体識別まではできないが,分析によって検出されたDNAの在否や量から,それに該当する生きもの生息の有無や

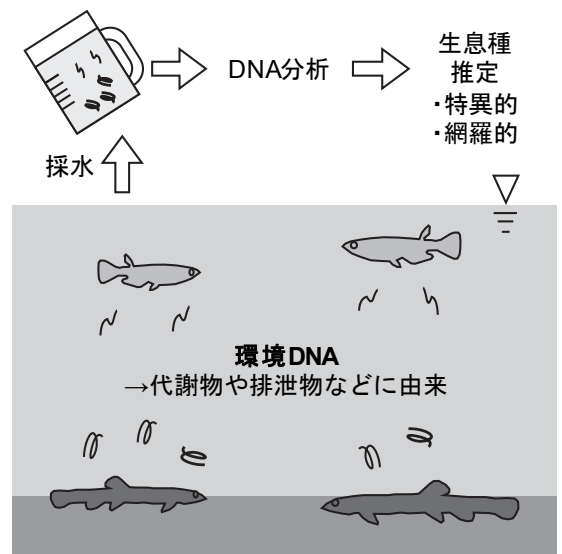


図2 環境DNA分析のイメージ

多寡を推定できる。また、個体採捕と比較して、環境 DNA 分析は調査現地での作業が採水（水をすくう）だけで済むこと、漁具による魚体の損傷や個体の死亡がないこと、環境 DNA 分析の検出力や精度が高いことなどが利点として挙げられる。ただし、残された課題も少なくなく、いまだ分析手順が統一されていないこと、結果が半定量的なこと（DNA 量と個体数が 1 対 1 対応するわけでないこと）、調査事例に限られていることなどが挙げられる。

以下では、環境 DNA 分析について、分析の流れを概説し、種特異的解析の事例として東海地方におけるアユ稚魚のモニタリング、種網羅的解析の事例として中国地方における 4 水域の魚類群集比較の 2 つの分析事例を紹介する。なお、環境 DNA 分析について理解を更に深めたい場合は、日本語による既報（環境技術学会 2017；生物研究社 2018；環境 DNA 学会 2019）が参考になる。また、国際誌（例えば、PLoS ONE, Scientific Reports, Conservation Genetics Resources など）を中心として研究論文の蓄積も進みつつある。

2. 環境 DNA 分析の流れ

DNA はアデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)の4つの塩基が結合した構造をもつ。環境 DNA も含めて DNA による種同定では、これらの塩基の並び方（塩基配列）の違いを利用する。塩基配列の違いには、個体レベルで異なるものから、種レベル、属レベル、…、魚類などの分類群レベルで異なるものがある。このため、目的に応じて塩基配列のどの部分が異なるかを調べることで、例えば個体識別や血縁関係、種の同定などが可能である。環境 DNA 分析には、対象とする 1 種の在否や多寡を推定する方法 A（種特異的解析）、複数種を対象に網羅的に分析する方法 B（種網羅的解析）の 2 つの方法がある。方法 B は環境 DNA メタバーコーディングとも呼ばれ、一度に生物群集全体が分かる反面、作業や結果の解釈がやや高度になる。両方法の分析の流れを図 3 に示す。まず、方法 A, B 共通して、①調査現地地で数 100~1,000ml 程度の水を採る。②その場または実験室でフィルターを用いてろ過する。③ろ過したフィルター上の残渣から DNA を抽出し、環境 DNA サンプルとして分析に用いる。

方法 A では、④対象種だけに反応する試薬（種特

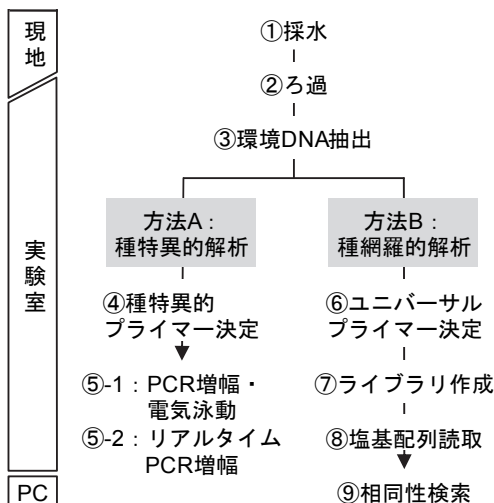


図3 環境 DNA 分析の全体の流れ

異的プライマー)を用いて、⑤-1: DNA サンプルを PCR 増幅、電気泳動して対象種の検出有無を確認する。また、⑤-2: リアルタイム PCR 増幅を行えば、サンプルに含まれている対象種の DNA 量も推定できる。方法 B では、⑥魚類等の種に共通する試薬(ユニバーサルプライマー)を用いて、⑦DNA ライブラリを作成、⑧次世代シーケンサーで塩基配列を読み取り、⑨読み取った塩基配列がどの種に近いかが推定する。なお、上記の作業のうち、①と②では DNA 分析専用の機器は必要なく、③以降に専用の機器が必要となる。分析の流れは小出水・渡部(2020)に分かりやすく整理しているので、参考にさせていただきたい。

3. 種特異的解析の事例：

アユ稚魚の遡上モニタリング

環境 DNA 分析の種特異的解析の事例として、河川を遡上するアユ稚魚のモニタリング調査を紹介する。毎年春になるとアユ稚魚は河口から上流へと遡上する。アユは重要な水産資源であり、水域の連続性（頭首工や堰堤が移動の障害にならないこと）や良好な水質環境を表す生物指標でもある。頭首工や堰堤に設置された魚道について、アユ稚魚が遡上できるかどうか、これまで目視観察やビデオ撮影、個体採捕などにより調べられてきた。しかし、このような方法は、当日の天候や調査員の経験などに左右され、簡単には実施できない。そこで、採水だけ

でモニタリングが可能な環境 DNA 分析が代わりに利用できないか調査した。

調査は、東海地方の河川下流にある魚道付きの頭首工で実施した。採水地点は、この頭首工から下流 400m と 100m、上流 100m と 400m の計 4 地点とした。どの地点も 2017 年 4 月～6 月に週 1 回採水し、採水量はすべて 1,000ml に統一した。採水サンプルをろ過後、DNA 抽出し、4 地点の環境 DNA サンプルについて、アユの DNA 濃度をリアルタイム PCR で推定した。

結果を図 4 に示す。図を見ると、頭首工下流の DNA 濃度は調査開始の 4 月から徐々に増え、5 月末をピークに以降は減少した。この変化はアユ稚魚が河口から遡上し、その数は 5 月末に最多になることを表す。また、濃度は低いが頭首工上流でも DNA が検出されたことは、稚魚は魚道を遡上していることを反映している。ただし、下流の DNA 濃度が上流よりもかなり高いことから、頭首工下流には多く

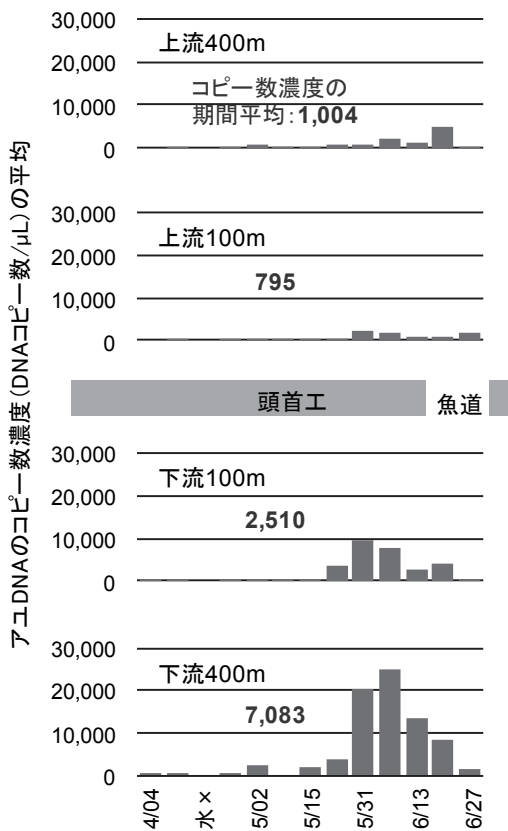


図 4 アユの DNA 濃度の変化

の稚魚が留まっていると推察される。実際、この頭首工において採水と同時にアユ稚魚の目視観察も実施したが、6 月には降雨に伴う濁りによって観察できない時が多々あった。この事例は、手軽でありながらも、目視観察では対応できない状況まで把握でき、環境 DNA 分析の長所を示している。

4. 種網羅的解析の事例：

中国地方における 4 水域の魚類群集の比較

環境 DNA の種網羅的解析の事例として、中国地方の農業水路と 3 河川における魚類群集の比較分析を紹介する。中国地方は関東地方や東北地方などと比べて、生息している魚類の種類が多いことで知られている。ここでは、環境 DNA 分析による生息魚類の推定結果とタモ網などの漁具による既存の個体採捕による調査結果を比較した。

採水地点は、水域の延長や幅などを考慮して、各水域 3～5 地点とした。採水は 2017 年 2 月に行い、種特異的解析と同様に、採水量は 1,000ml に統一した。採水サンプルをろ過し、環境 DNA を抽出後、得られた環境 DNA サンプルは魚類に共通するユニバーサルプライマーを用いて PCR を行った。どのサンプルかが分かるように、ライブラリには異なるタグを付け、次世代シーケンサーで解析後、各地点の環境 DNA サンプル溶液に含まれる魚種を推定した。一方、個体採捕による調査結果として、過去 5 年以内に近隣の地点でタモ網、投網、定置網などにより実施されたものを利用した。

解析結果の一部を図 5 に示す。コイ科、ドジョウ科、ハゼ科を中心に合計 31 種が環境 DNA によって

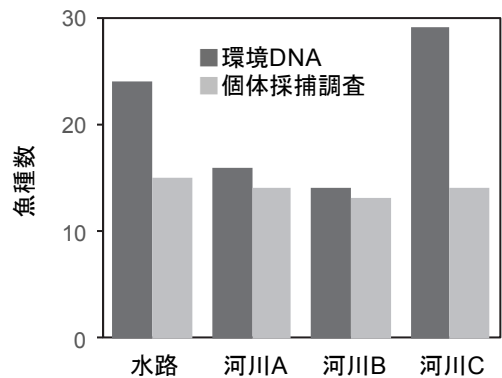


図 5 環境 DNA 分析と個体採捕調査による種数比較

推定され、河川Bの14種が最小となり、29種の河川Cが最大となった。水域間の種数の違いは水域の大きさや流れといった環境の違いに関連すると考えられた。また、既存の採捕調査結果と比較して、各水域で採捕できたのは13~15種に留まり、その全ての魚種が環境DNAによる推定魚種に含まれていた。採捕できる魚類には限りがあり、環境DNA分析による生息魚類推定の有効性を示している。

5. おわりに

以上のように、生きもの調査法として、最先端の環境DNA分析法とその分析事例を紹介した。環境DNA分析法は、この他にも希少種や外来種、有害鳥獣などの生息分布やその季節変化、移動の推定、糞の分析による餌生物の推定にも広く適用できるだろう。環境DNA分析には、環境DNAの移動範囲や滞留時間、劣化速度をはじめ、低コスト化、簡便化に向けた分析技術の改善などの多くの課題が残されている。しかし、環境DNA分析の利用により、個体採捕や目視観察などの従来の調査法では捉

えられなかった、様々な現象が明かされようとしている。今後、水域だけでなく様々な環境において、また、魚類だけでなく他の生物分類群にも環境DNA分析が適用され、生態系のモニタリングや保全管理に大きく貢献することを期待したい。

引用・参考文献

- 1) 環境DNA学会 (2019) : 環境DNA調査・実験マニュアル Ver.2.1, 1-104, http://cdnasociety.org/eDNA_manual_ver2_1_3.pdf.
- 2) 環境技術学会 (2017) : 生物分布調査における環境DNA分析の可能性, 環境技術, 46, 623-652.
- 3) 小出水・渡部 (2019) : 環境DNAを利用したアユ稚魚の遡上モニタリング : 2017年と2018年の比較, 2019年度農業農村工学会大会講演会講演要旨集, 778-789.
- 4) 小出水・渡部 (2020) : 生態系解析, 農業水利学, 文永堂, (印刷中).
- 5) 農研機構農村工学研究部門 (2018) : 魚が棲みやすい農業水路を目指して~農業水路の魚類調査・評価マニュアル~, 農研機構農村工学研究部門, 1-110.
- 6) 森ら (2018) : 農業農村整備のための生態系配慮の基礎知識 (11) - 農村生態系配慮にむけた新しい調査・分析手法 -, 農業農村工学会誌, 86 (11), 59-64.
- 7) 生物研究社 (2018) : 環境DNAが拓く魚類生態研究の未来, 海洋と生物, 40, 3-65.