

一般社団法人 関西空港調査会
2017年度 調査研究助成事業

環境 DNA を活用した関空島周辺の藻場魚類
(カサゴ、キジハタ) の分布調査法の確立

成果報告書

2018年3月

地方独立行政法人 大阪府立環境農林水産総合研究所
辻村 浩隆

1. 研究目的

関西国際空港島（以下、関空島とする）の護岸には生物多様性に配慮した緩傾斜護岸が造成されている（一期空港島護岸の約 80%、二期空港島護岸の 90%以上）。この緩傾斜護岸は、藻場や岩礁域を生息場とする魚類にとって貴重な生息・再生産の場となっており、周辺海域へ稚魚を供給し漁業資源の維持増大に貢献していると推測されている。過去には生息魚類の種類や分布、現存量の把握等が行われてきたが、漁具により直接魚類を採捕する従来の調査方法はコストも時間も非常に掛かる。そのため、近年では定量的な調査は行われていない。

近年、水を調べるだけで、当該水域に生息する生物を調べる事が可能な環境 DNA 法が開発された (Ficetola et al. 2008; Minamoto et al. 2012 ほか)。現時点においては統一的な調査手法が確立されておらず研究者によって様々な調査手法が試されている。海域での調査事例は少ないが、この手法が確立されれば漁具による手法より低コストで分布が把握できる (Darling and Mahon 2011)。また、冬季の水温低下期等のように魚類の活動が低下し漁具に掛らない時期でも環境 DNA であれば把握できる可能性があり、時期を問わずに安定的な調査が可能と考えられる。更に、分布の把握から現存量の推定に発展できる可能性があり、関空島護岸の魚類生息・再生産効果を定量的に明らかにすることが期待される。そこで本研究では環境 DNA を調べることによる低コストな魚類分布調査法の確立を目指し、分布調査の可能性について検討を行う。

2. 研究目標

関空島の緩傾斜護岸に生息し、現存量が多く漁業資源として重要な魚種はカサゴ (*Sebastes marmoratus*) である。過去においてもこれらの種については重要な魚種として調査が行われている。一方、資源量は少ないが高級魚であり、大阪府がブランド化を目指している魚種がキジハタ (*Epinephelus akaara*) である。大阪府沿岸ではあまり見られない大型のキジハタ親魚が関空島周辺には数多く生息しており、周辺海域への稚魚の供給が大いに期待されている。また、資源増大の取り組みとして、関空島周辺での調査で捕獲されるキジハタを親魚として公益財団法人大阪府漁業振興基金が種苗生産を行い、大阪府沿岸に稚魚の放流を行っている。これらのことから本研究ではカサゴおよびキジハタについて DNA の検出系を設計し、天然海域から検出手法の確立を目指す。

3. 研究方法

(1) カサゴおよびキジハタに特異的なプライマーおよびプローブの設計

本研究ではプローブ法を用いたリアルタイム PCR による環境 DNA の検出の確立を目指した。種を特定する遺伝情報の部位をミトコンドリア DNA のチトクローム b 領域とし、必要な遺伝情報を遺伝子データベースから得た。カサゴについては、カサゴおよび関空周辺に生息していると考えられる近縁種のメバル類 (*Sebastes inermis*, *S. cheni*, *S. ventricosus*)、クロソイ (*Sebastes schlegelii*)、タケノコメバル (*Sebastes oblongus*)、ムラソイ (*Sebastes pachycephalus*)、ヨロイメバル (*Sebastes hubbsi*) の情報を得た。キジハタについても同様にキジハタおよび近縁種のクエ (*Epinephelus bruneus*)、マハタ (*Hyporthodus septemfasciatus*)、オオモンハタ (*Epinephelus areolatus*) の情報を得た。リアルタイム PCR に用いるプライマーについては、ウェブアプリケーションの Primer-BLAST で設計、プローブについては、ウェブアプリケーションの Primer3Plus で設計した。近縁種を誤って検出する可能性を出来るだけ下げるため、プライマーの 3' 末端側の 5 塩基以内に種特異的な塩基数が多くなるようにプライマーを選択した。得られたプライマーおよびプローブについては遺伝子データベース上で近縁種以外にも結合する可能性がないか確かめた。

(2) 組織からの検出

設計した検出系が機能するかをカサゴおよびキジハタの生体から抽出した DNA で試験を行った。カサゴおよびキジハタの胸鰭の先の組織を採取、Chelex を用いた熱抽出法 (Reed et al. 1997) により DNA を抽出した。PCR の溶液には 900nM のプライマー、125nM のプローブ、1×Environmental Master Mix (TaqMan 製)、1U/ $\mu\ell$ の Amp Erase UNG (Applied Biosystems 製)、2 $\mu\ell$ のサンプル DNA を加え、合計 20 $\mu\ell$ とした。PCR 増幅にはリアルタイム PCR 装置 (Thermal Cycler Dice® Real Time System II : TaKaRa 製) を用い、PCR 条件には 95°C で 10 分後、95°C で 15 秒、60°C で 60 秒からなるサイクルを 60 サイクル行った。全ての PCR で 3 反復行い、サンプル DNA の代わりに水を用いたネガティブコントロールも 3 反復行った。

(3) 飼育海水からの検出

(公財)大阪府漁業振興基金栽培事業場では種苗生産に必要な親魚としてカサゴおよびキジハタの飼育を行っている。カサゴは 5t (2.9m×1.9m×約 0.9m) の水槽に約 50 尾を収容、キジハタは 100t (7m×7m×約 2m) の水槽に約 100 尾を収容している。飼育海水には地先海面から汲み上げた海水を砂濾過後、紫外線殺菌を行って使用している。開発した検出系が正しく機能することを確認するため、飼育海水からの検出を行った。カサゴおよびキジハタの飼育海水を 1.25 ℓ 採水、DNA の分解を防ぐ防腐剤 (ProClin300 (SIGMA-ALDRICH 製)) を 200 $\mu\ell$ 加えた。また、ネガティブコントロールとして飼育水槽へ注水している海

水を直接採水した。採水した海水は実験室にてオムニポアメンブレンフィルター（メルクミリポア製、穴径 $0.45\ \mu\text{m}$ ）を用いて各 $1\ \text{l}$ を吸引濾過した。濾過後のフィルターは DNA の抽出を行うまで -20°C で保存した。

フィルターからの DNA 抽出には DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen 製) を用いた。抽出手順は海水からの抽出事例 (Jo et al, 2017) に沿って、 $20\ \mu\text{l}$ の Proteinase K (600mAU/ml)、 $200\ \mu\text{l}$ の水、 $200\ \mu\text{l}$ の BufferAL をフィルターに加え、 56°C で 30 分間保温した。フィルターから濾液を遠心分離し回収、更にフィルターに $200\ \mu\text{l}$ の TE を添加、遠心分離により濾液を回収した。回収した濾液に $200\ \mu\text{l}$ の BufferAL と $600\ \mu\text{l}$ のエタノールを添加、DNeasy のカラムに入れ、 $6000\times g$ で 1 分間遠心した。以降はキット付属の手順通りとした。PCR は組織からの検出と同様に行った。

(4) 天然海域からの検出

カサゴおよびキジハタの検出系が天然海域の海水から検出することを確認するため、関空島周辺に 16 地点を設定した (図 1)。8 地点は関空島の岸から 50m 以内、残りの点は 1km 以上離れた場所とした。2017 年 7 月 31 日、8 月 28 日、9 月 25 日に採水を行った。バケツにより表層水を採水、採水量は $2.5\ \text{l}$ とし、飼育水槽からの採水と同様に ProClin300 を $200\ \mu\text{l}$ 加えた。サンプル水は温度が上がらないように研究室へ持ち帰り、濾過を行うまでの間、冷蔵庫にて保管した。サンプル水の濾過は出来る限り速やかに行い、3 日以内にはすべて濾過した。濾過水量は $2\ \text{l}$ としたが、8 月のサンプル水ではフィルターが目詰まりが起き、フィルター 1 枚で $2\ \text{l}$ を濾過することが困難であったため、 $1\ \text{l}$ ずつ濾過し、DNA の抽出ではフィルターは 2 枚まとめて行った。その他の濾過方法および DNA の抽出は飼育水からの検出と同様に行った。PCR ではポジティブコントロールとして飼育水を 100 倍または 1000 倍に希釈したものを使用した。その他の PCR については組織からの検出と同様に行った。

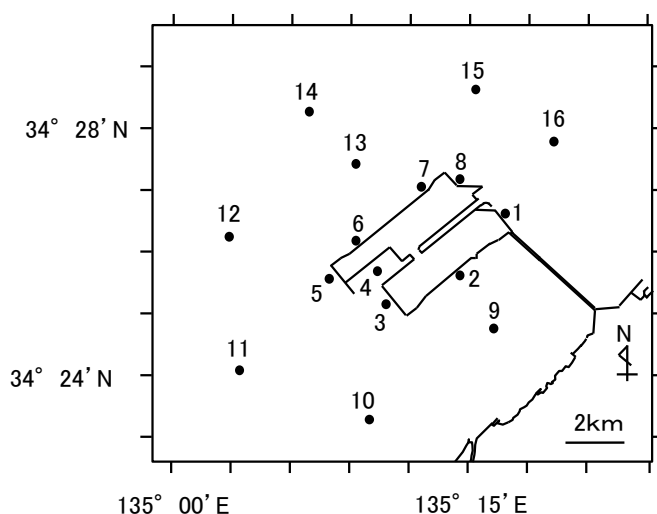


図 1 採水地点

4. 研究結果と考察

(1) プライマーおよびプローブの設計

カサゴについては2セット、キジハタについては3セットの組み合わせを設計した。得られたプライマー・プローブは以下の通りである (図2、3)。

カサゴ1 (増幅領域長 121bp) : kasag1F (5' -TTTCCTCCGTTGCACACATC-3')、kasag1R (5' -TAGAGGCCTCGGCCAATATG-3')、kasago1P (5' -AACGGCGCATCTTTTCTT-3')

カサゴ2 (増幅領域長 121bp) : kasag1F、kasag1R、kasago2P (5' -TATCCGGAATCTTCAGCCA-3') ※プライマーはカサゴ1 と共通

キジハタ1 (増幅領域長 97bp) : kijihata1F (5' - AAATCGCAAACGACGCCCTA-3')、kijihata1R (5' - GGCCTGTAAGGATTTGGGCA-3')、kijihata1P (5' - TAGACCTCCAGCCCCCTCC-3')

キジハタ2 :kijihata2F (増幅領域長 95bp) (5' - AATCGCAAACGACGCCCTA-3')、kijihata2R (5' - GGGCAATGAGACAGAGTCCAA-3')、kijihata1P※プローブはキジハタ1 と共通

キジハタ3 : kijihata3F (増幅領域長 134bp) (5' - TTGCCACAGCCTTTTCATCTG-3')、kijihata3R (5' - GTAAAGTCCTCGTCCAATGTGTG-3')、kijihata3P (5' - CAACGGGGCCTCTTTTCT-3')

(kasago1F)

メバル類	T	C	T	T	C	T	C	T	G	T	A	G	C	T	C	A	T	A	T	T
クロソイ	T	T	T	T	C	T	C	C	G	T	C	G	C	C	C	A	T	A	T	T
タケノコメバル	T	T	T	T	C	T	C	C	G	T	C	G	C	T	C	A	T	A	T	T
ムラソイ	T	T	T	C	C	T	C	C	G	T	C	G	C	C	C	A	C	A	T	T
ヨロイメバル	T	T	T	T	C	T	C	C	G	T	C	G	C	C	C	A	T	A	T	T
カサゴ	T	T	T	C	C	T	C	C	G	T	T	G	C	A	C	A	C	A	T	C
	5'										3'									

(kasago1R)

メバル類	C	A	C	A	T	T	G	G	C	C	G	A	G	G	A	C	T	T	T	A
クロソイ	C	A	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	G	C	T	T	T	A
タケノコメバル	C	A	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	A	C	T	T	T	A
ムラソイ	C	A	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	A	C	T	T	T	A
ヨロイメバル	C	A	C	A	T	T	G	G	C	C	G	C	G	G	A	C	T	T	T	A
カサゴ	C	A	T	A	T	T	G	G	C	C	G	A	G	G	C	C	T	C	T	A
	3'										5'									

(kasago1P)

メバル類	A	A	C	G	G	C	G	C	A	T	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T
クロソイ	A	A	C	G	G	C	G	C	A	T	C	T	T	T	C	T	T	C	T	T
タケノコメバル	A	A	C	G	G	T	G	C	A	T	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T
ムラソイ	A	A	C	G	G	T	G	C	A	T	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T
ヨロイメバル	A	A	C	G	G	C	G	C	A	T	C	T	T	T	C	T	T	C	T	T
カサゴ	A	A	C	G	G	C	G	C	A	T	C	C	T	T	T	T	T	C	T	T
	5'										3'									

(kasago2P)

メバル類	C	A	T	C	C	G	A	A	A	C	C	T	T	C	A	C	G	C	C	A
クロソイ	C	A	T	C	C	G	A	A	A	C	C	T	T	C	A	C	G	C	C	A
タケノコメバル	C	A	T	C	C	G	A	A	A	C	C	T	T	C	A	C	G	C	C	A
ムラソイ	C	A	T	C	C	G	A	A	A	C	C	T	T	C	A	C	G	C	C	A
ヨロイメバル	C	A	T	C	C	G	A	A	A	C	C	T	T	C	A	C	G	C	C	A
カサゴ	T	A	T	C	C	G	G	A	A	T	C	T	T	C	A	C	G	C	C	A
	5'										3'									

図2 カサゴのプライマーおよびプローブの塩基配列と近縁種との比較

網掛け部はカサゴと異なる塩基を示している。(kasago1F) フォワードプライマーに相当する塩基配列、(kasago1R) リバースプライマーに相当する塩基配列、(kasago1P、kasago2P) プローブに相当する塩基配列を示す。リバースプライマーについては示した配列の相補鎖配列である。

(kijihata1F)

クエ	A A A T C G C A A A T G A C G A C G C A C T G
マハタ	A A A T C G C A A A C G A C G A C G C A C T R
オオモンハタ	A A A T C G C A A A C G A C G A C G C A T T A
キジハタ	A A A T C G C A A A C G A C G A C G C C C T A

5' 3'

(kijihata2F)

クエ	A A T C G C A A A T G A C G A C G C A C T G
マハタ	A A T C G C A A A C G A C G A C G C A C T R
オオモンハタ	A A T C G C A A A C G A C G A C G C A T T A
キジハタ	A A T C G C A A A C G A C G A C G C C C T A

5' 3'

(kijihata3F)

クエ	T T G C C A C A G C C T T T T C G T C T G
マハタ	T C G C C A C A G C C T T T T C A T C C G
オオモンハタ	T C G C C A C A G C C T T C T C G T C T G
キジハタ	T T G C C A C A G C C T T T T C A T C T G

5' 3'

(kijihata1R)

クエ	T G C T C A A A T T C T C A C A G G C C
マハタ	T T C C C A G A T T C T T A C A G G M C
オオモンハタ	C C C A C A A A T C T T A C A G G C C
キジハタ	T G C C C A A A T C C T T A C A G G C C

3' 5'

(kijihata2R)

クエ	T C G G A C T C T G C C T T A T T G C T C
マハタ	T C G G A C T C T G C C T T A T T T C C C
オオモンハタ	T A G G A C T C T G C C T T A T C G C A C
キジハタ	T T G G A C T C T G T C T C A T T G C C C

3' 5'

(kijihata3R)

クエ	C C C A C A T T G G A C G A G G A C T T T A C
マハタ	C T C A C A T T G G A C G A G G C C T C T A T
オオモンハタ	C C C A C A T C G G A C G A G G C C T C T A C
キジハタ	C A C A C A T T G G A C G A G G A C T T T A C

3' 5'

(kijihata1P)

クエ	T	T	G	A	G	C	T	C	C	C	A	G	C	C	C	C	T	C	C	
マハタ	T	A	G	A	T	C	T	C	C	C	A	G	C	C	C	C	T	C	C	
オオモンハタ	T	A	G	A	C	C	T	C	C	C	A	G	C	C	Y	C	M	T	C	C
キジハタ	T	A	G	A	C	C	T	T	C	C	A	G	C	C	C	C	T	C	C	
	5'																			3'

(kijihata2P)

クエ	T	C	G	G	A	C	T	C	T	G	C	C	T	T	A	T	T	G	C	T	C
マハタ	T	C	G	G	A	C	T	C	T	G	C	C	T	T	A	T	T	T	C	C	C
オオモンハタ	T	A	G	G	A	C	T	C	T	G	C	C	T	T	A	T	C	G	C	A	C
キジハタ	T	T	G	G	A	C	T	C	T	G	T	C	T	C	A	T	T	G	C	C	C
		3'																			5'

(kijihata3P)

クエ	C	A	A	T	G	G	G	G	C	T	T	C	C	T	T	C	T	T	T	T
マハタ	C	A	A	C	G	G	G	G	C	C	T	C	C	C	T	C	T	T	C	T
オオモンハタ	T	A	A	C	G	G	A	G	C	A	T	C	C	A	T	C	T	T	C	T
キジハタ	C	A	A	C	G	G	G	G	C	C	T	C	C	T	T	T	T	T	C	T
	5'																			3'

図3 キジハタのプライマーおよびプローブの塩基配列と近縁種との比較

網掛け部はキジハタと異なる塩基を示している。(kijihata1F、kijihata2F、kijihata3F) フォワードプライマーに相当する塩基配列、(kijihata1R、kijihata2R、kijihata3R) リバースプライマーに相当する塩基配列、(kijihata1P、kijihata2P、kijihata3P) プローブに相当する塩基配列を示す。リバースプライマーについては示した配列の相補鎖配列である。

(2) 組織からの検出

いずれの組み合わせにおいても対象とするカサゴまたはキジハタの組織由来の DNA の増幅が確認された。DNA の検出にはいずれの組み合わせでも問題は無いが、リアルタイム PCR で反応が速くばらつきが小さいと判断したカサゴ2およびキジハタ4の組み合わせを飼育海水および天然海域からの環境 DNA の検出に使用した。

(3) 飼育海水からの検出

キジハタについては約 100 尾収容している 100t 水槽の飼育海水から、カサゴについては約 50 尾収容している 5t 水槽の飼育海水から感度良く検出された。また、ネガティブコントロールとした水槽に注水している海水からは検出されず、飼育海水から検出された

DNA は飼育魚由来であることが確認された。天然海域に比べ個体密度が高いが、微生物をはじめとする様々な DNA が混在する海水から標的とする DNA の検出することに成功したと言える。

(4) 天然海域からの検出

①カサゴ

PCR にて感度良く DNA が検出された地点があり、天然海域から標的とする DNA を検出することに成功した。PCR は同じ調査地点について 3 回反復の検出を行っているが、1~2 回のみ検出される点が見られた。このため、3 回反復のうちの検出回数を指標に、DNA 濃度を相対的な階級に分けた (表 1)。この階級を元に描いたコンターを図 4 に示す。この結果、関空島近くで高く検出され、関空島から離れると低くなる傾向が見られ、離れた場所では検出されない地点も見られた。これは一般的に護岸に生息するカサゴの分布に重なっており、環境 DNA の検出結果はほぼ妥当であると考えられる。関空島近くの点においては濃度差が見られ、期間を通して 2 期島南部で、7 月では 2 期島北部において高い傾向が見られた。

今回は海水中に含まれる DNA の絶対量の推定は行っていないが、PCR の結果では関空島沿岸の DNA 量は飼育海水を 1000 倍に希釈したものに近い量であった。これは 100t あたり 0.5 尾で、カサゴの生息水深を 10m とし海底に生息しているとした場合、1 m²あたり 0.05 尾と推定される。過去の潜水観察による調査(関西国際空港 2006)ではカサゴは水深 6~12m に多く、小型魚を含め多い場所では 1 m²あたり 0.15 尾以上と推定している。関空島周辺の潮の流れや飼育海水の交換速度を考慮していないが、1 m²あたり 0.05 尾という推定値は概ね妥当な値であると考えられる。このことから環境 DNA の濃度から生息重量を推定できる可能性が示唆された。

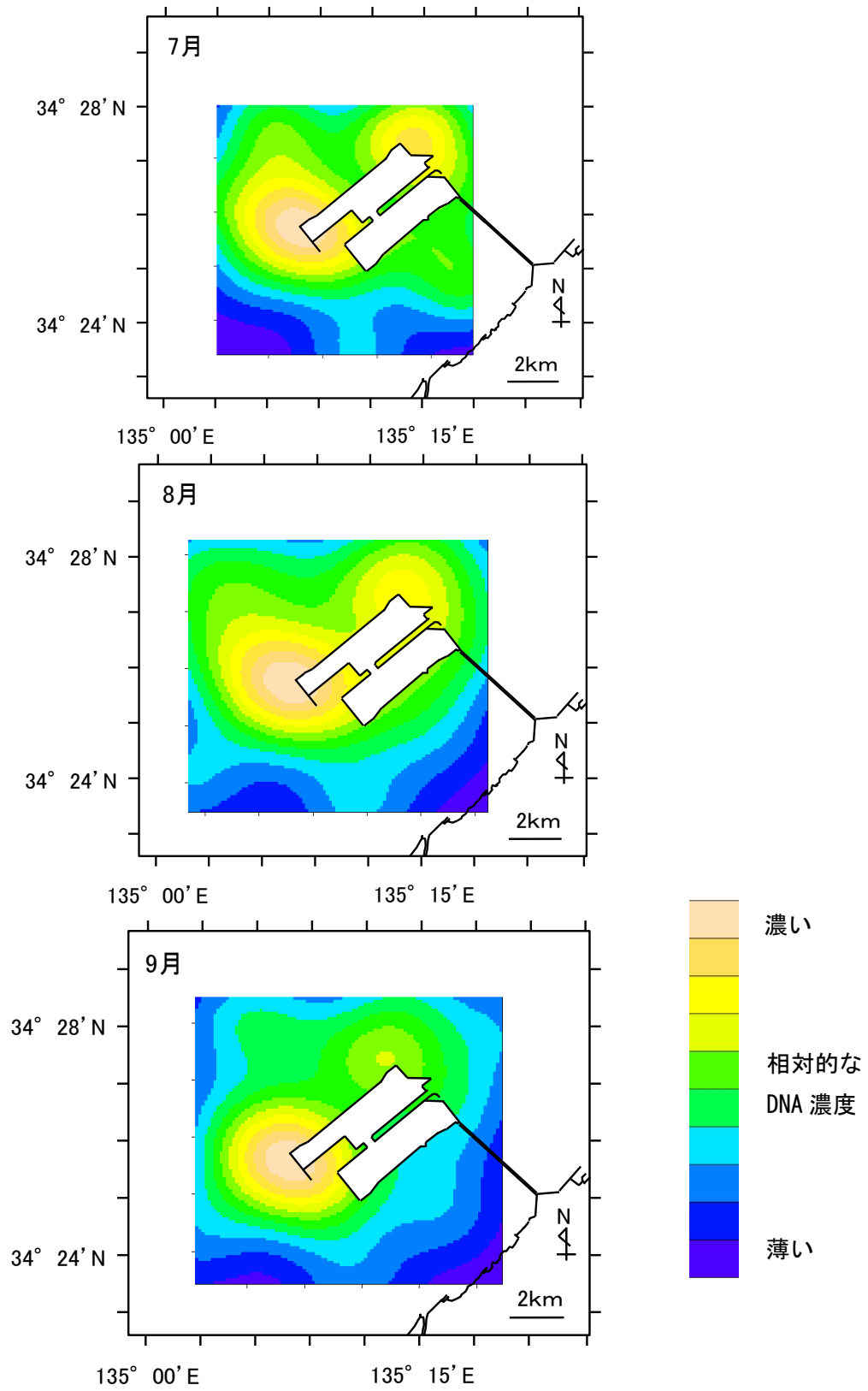


図4 カサゴの相対的なDNA量のコンター図

表1 リアルタイムPCRによる検出結果（Ct値）とDNA濃度の相対値（カサゴ）

7月						8月					
地点	Ct値				相対値	地点	Ct値				相対値
	1回目	2回目	3回目	平均			1回目	2回目	3回目	平均	
1	48.5	-	47.1	-	2	1	-	-	-	-	0
2	-	-	-	-	0	2	47.2	-	46.6	-	2
3	47.4	48.5	-	-	2	3	-	-	48.6	-	1
4	-	-	-	-	0	4	-	-	-	-	0
5	47.9	46.4	-	-	2	5	44.9	46.2	-	-	2
6	46.2	45.8	44.9	45.6	3	6	46.0	44.2	44.5	44.9	3
7	-	-	-	-	0	7	-	-	-	-	0
8	45.9	44.3	46.3	45.5	3	8	-	44.2	47.7	-	2
9	47.1	45.9	47.5	46.8	3	9	-	-	50.4	-	1
10	-	-	-	-	0	10	-	-	-	-	0
11	46.3	-	-	-	1	11	-	-	-	-	0
12	-	-	-	-	0	12	-	-	-	-	0
13	-	-	-	-	0	13	-	-	-	-	0
14	-	-	-	-	0	14	-	-	-	-	0
15	-	-	-	-	0	15	-	-	-	-	0
16	N.D.	N.D.	N.D.	-	-	16	47.5	-	-	-	1

9月					
地点	Ct値				相対値
	1回目	2回目	3回目	平均	
1	46.3	-	46.5	-	2
2	-	48.7	-	-	1
3	43.6	43.6	44.3	43.8	3
4	45.6	45.2	45.4	45.4	3
5	44.3	44.8	45.9	45.0	3
6	47.7	43.5	43.3	44.8	3
7	44.9	44.0	44.1	44.3	3
8	44.4	44.4	-	-	2
9	-	-	-	-	0
10	-	-	-	-	0
11	-	-	-	-	0
12	-	44.5	-	-	1
13	-	46.6	46.3	-	2
14	-	-	-	-	0
15	-	-	-	-	0
16	-	-	-	-	0

※（-）は検出限界以下
（N.D.）はデータ無し

②キジハタ

PCRにて感度良くDNAが検出された地点があり、天然海域から標的とするDNAを検出することに成功した。同じ調査地点について3回反復を行っているが、カサゴに比べて検出される確率は高かったものの、3回とも検出された点は少なかった。このため、カサゴと同様にDNA濃度を相対的な階級に分けて(表2)コンター図を描いた(図6)。この結果、関空島近くで高く、関空島から離れると低くなる傾向が見られたが、沖合の地点で検出されることもあった。関空島周辺ではDNA濃度に差が見られ、期間を通して2期島南部で、9月には2期島北部で高い傾向が見られた。

カサゴ同様、海水中に含まれるDNAの絶対量の推定を行っていないが、PCRの結果では関空島沿岸のDNA濃度は飼育海水を1000倍以上に希釈したものに近い量であると考えられた。これは1000tあたり1尾で、キジハタの生息水深を10mとし海底に生息しているとした場合、1m³あたり0.005尾程度と推定される。過去の刺網調査では漁獲重量がカサゴの1/100であったこと(関西国際空港2006)、カサゴに比べてキジハタは刺網に掛かりにくいこと、近年では資源量が増えていること(辻村、私信)などから今回の推定値は概ね妥当な値であり、今後の資源推定に使用出来る可能性が示唆された。

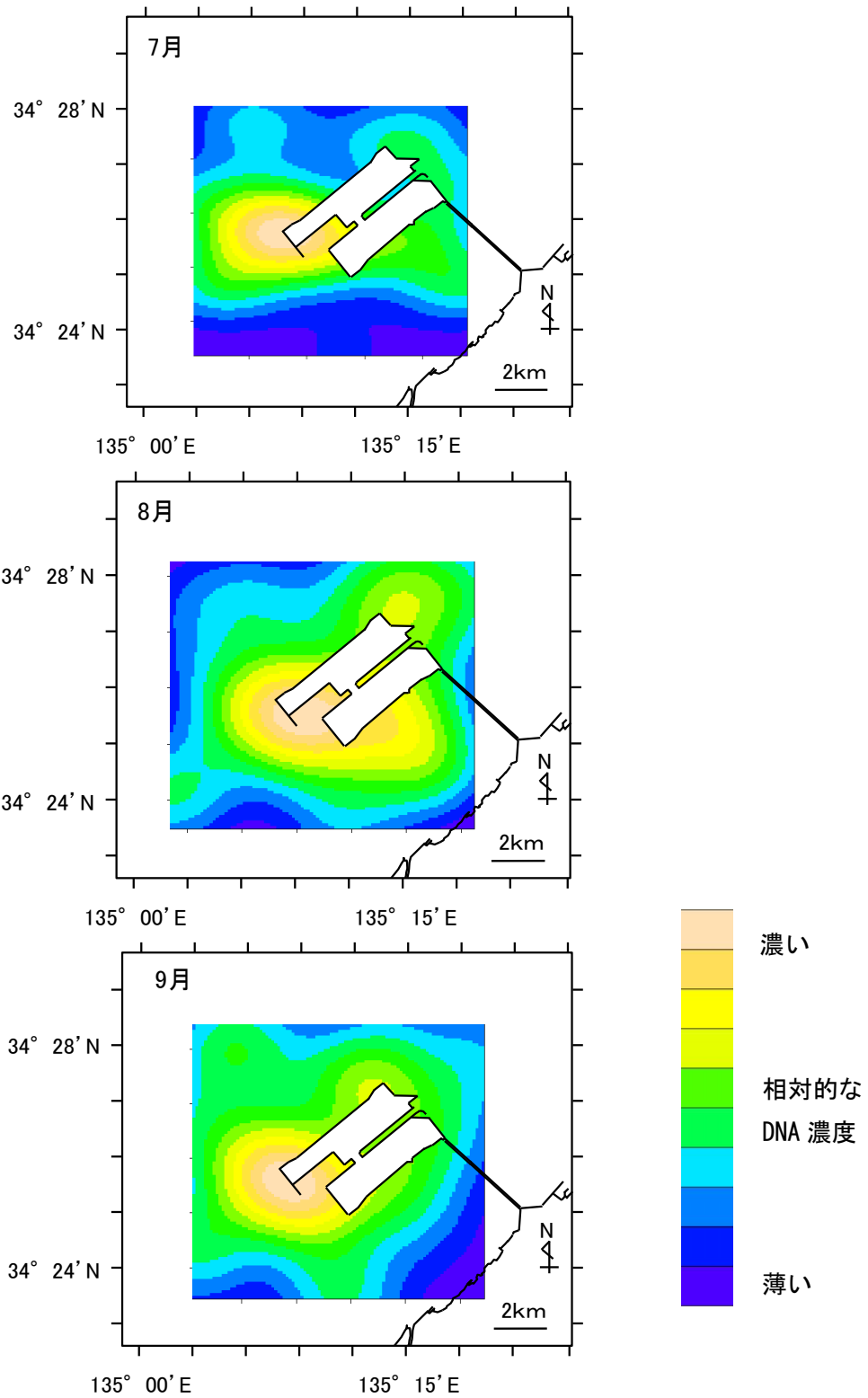


図6 キジハタの相対的な DNA 量のコンター図

表2 リアルタイム PCR による検出結果 (Ct 値) と DNA 濃度の相対値 (キジハタ)

7月						8月					
地点	Ct値				相対値	地点	Ct値				相対値
	1回目	2回目	3回目	平均			1回目	2回目	3回目	平均	
1	-	45.2	45.8	-	2	1	46.7	-	-	-	1
2	44.9	44.4	44.7	44.7	3	2	44.0	45.4	45.4	44.9	3
3	44.1	-	45.7	-	2	3	45.2	-	44.7	-	2
4	43.0	42.2	42.4	42.5	3	4	50.8	44.7	43.2	46.2	3
5	40.5	39.9	40.3	40.3	3	5	44.1	-	44.5	-	2
6	42.8	43.7	44.6	43.7	3	6	-	-	42.9	-	1
7	-	-	43.4	-	1	7	45.9	-	-	-	1
8	44.2	44.5	-	-	2	8	45.8	43.7	-	-	2
9	42.9	43.0	42.8	42.9	3	9	42.2	43.2	44.2	43.2	3
10	-	-	46.1	-	1	10	-	-	-	-	0
11	43.4	44.6	45.2	44.4	3	11	44.7	44.6	43.6	44.3	3
12	43.6	-	44.8	-	2	12	-	44.6	-	-	1
13	-	44.4	-	-	1	13	45.0	44.1	-	-	2
14	-	45.1	44.8	-	2	14	-	45.8	-	-	1
15	-	44.9	-	-	1	15	-	-	-	-	0
16	N.D.	N.D.	N.D.	-	-	16	-	-	-	-	0

9月					
地点	Ct値				相対値
	1回目	2回目	3回目	平均	
1	45.1	-	47.4	-	2
2	45.4	44.0	44.4	44.6	3
3	42.1	42.0	42.5	42.2	3
4	43.2	44.0	43.4	43.5	3
5	-	44.4	43.4	-	2
6	44.3	43.5	45.1	44.3	3
7	44.2	42.4	43.7	43.5	3
8	-	43.9	44.5	-	2
9	-	45.8	-	-	1
10	46.5	43.2	46.3	45.4	3
11	44.3	46.2	46.2	45.6	3
12	44.6	-	45.1	-	2
13	-	44.1	-	-	1
14	43.8	44.7	45.0	44.5	3
15	-	44.5	-	-	1
16	-	43.1	42.7	-	2

※ (一) は検出限界以下
(N. D.) はデータ無し

③調査手法の有効性

カサゴ、キジハタともに推定される DNA 量が関空島周辺で高く、離れると低くなる傾向が見られたが、これは護岸近くの藻場に生息するという一般的な知見と矛盾せず妥当な結果であると考えられる。キジハタでは調査を関空島から離れた点からも DNA が検出されたが、この時季が産卵期で卵や仔魚が浮遊しており、これらを検出したと考えられる。関空島近くにおいて DNA の濃度差が見られたが、カサゴについては過去の調査結果（関西国際空港 2006）とやや傾向が異なっているものの、岸側で低いことは共通しており、概ね妥当な結果であると考えられる。また、キジハタについては比較出来る他の調査結果がないが、一般的に潮通しのよい場所を好むとされるキジハタの分布と一致しており、妥当な結果であると考えられる。これらのことから分布を調べる方法としては有効な手法であることが示唆された。

関空島周辺の夏季の海水は懸濁物が非常に多く、濾過には長時間を要した。海域からの DNA 検出および測定のためには少しでも濾過水量を増やし DNA の回収量を増やしたいが、今回の 2ℓは濾過作業の効率からは限界に近い量であった。関空島から離れた点では DNA が検出されない地点もあったが、環境 DNA が薄まっている地点であり、分布調査を行う場合には離れた地点の DNA 量を測定する必要はない。よって、濾過量が 2ℓというのは関空島周辺の環境 DNA による分布調査手法として妥当であると考えられる。ただし、キジハタの場合は卵や仔魚が浮遊していた時期で関空島沖合の点からも DNA が検出されたが、濃度を測定するには DNA の回収量が少ないと考えられた。関空島からの染み出し効果の把握のため卵や仔魚の分布をとらえるには、濾過量を増やす必要がある。

④今後の課題

天然海域は常に流れがあり、環境 DNA は他の場所へ流されていることが考えられる。そこで潮流による影響を検討するため、採水を行う直前 24 時間の 0.65m 層の残差流について関空島の西にある関空 MT 局（国土交通省の水質定点自動観測装置、北緯 34° 25′ 54″ 東経 135° 11′ 52″）の 1 時間毎の流向・流速データから求めた。2017 年 7 月 31 日は西方 3.3km、南方 0.5km、8 月 28 日は西方 6.8km、南方 7.9km、9 月 25 日は西方 5.9km、南方 9.5km で、南西方向への流れが見られた。環境 DNA がこの流れに流されたのであれば、関空島から離れた地点でも高くなることが予想される。多くの場合、岸近くで高くなっており、潮流の上流側である 2 期島北側で高い結果が得られている。このため、数 km 単位での分布調査では潮流は大きな影響を与えないかもしれない。ただ、より正確に分布調査を行うためには流動モデルと組み合わせた解析が必要であると考えている。

今回採水を行ったのは夏季であるが、1 年で最も水温が高く、紫外線量も多いため、DNA の分解が早い時期であったと推測される。さらに、キジハタの産卵期であり、最も活性が高く、環境 DNA の供給は最も多い時季である。他の季節では環境 DNA の検出にも影響を及ぼす様々な条件が大きく異なると考えられ、普遍的な環境 DNA 調査手法確立のためには異

なる季節における環境 DNA の濃度についても調査を行う必要がある。

資源量を正確にとらえるためには、生息数と DNA 量の関係を調べる必要があるが、天然海域では PCR 時に DNA の増幅を阻害する物質（フミン酸など）があり、この影響を把握する必要がある。今回の調査では関空島周辺海域では懸濁物が多く、これらから様々な物質が抽出されるため阻害物質を含んでいる可能性が高い。正確な DNA 濃度を求めるためにはこの阻害物質の影響を無視できないため、この点については今後の検証課題である。

引用文献

- Darling JA, Mahon AR (2011) From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*, 111:978-988
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4:423-425
- 関西国際空港, 関空調査会 (2006) 緩傾斜護岸調査. 平成 17 年泉州海域漁業生物調査報告書
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo M., Kawabata Z (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 16:147-153
- Reed JZ, Tollit DJ, Thompson PM, W. Amos (1997) Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology* 6:225-234
- Jo T, Murakami H, Masuda R, Sakata M., Yamamoto S, Takahashi K, Minamoto T (2017) Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 17(6):e25-e33