

## 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

地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所  
主任研究員 辻村浩隆

関空島は生物多様性に配慮した傾斜護岸として造成され、魚類にとって貴重な生息の場となっている。過去に魚類の分布調査が行われてきたが、コストも時間も掛かる。近年、魚類の分布を低コストで調べることが出来る環境 DNA による手法が開発された。そこで、関空島周辺に生息する魚種の中で重要なカサゴ、キジハタを対象に環境 DNA による調査方法の可能性の検討を行った。まず、これらの魚種の DNA の検出系を設計し、関空島周辺の海水からの検出を試みたところ、対象とする DNA が検出された。また、いずれも関空島近くで高く、離れると低くなる傾向があり、関空島近くでは地点による高低がみられた。この結果は他の手法による過去の分布調査と概ね一致しており、分布を調べる方法としての有効な手法であることが示唆された。

キーワード：関空島、環境 DNA、カサゴ、キジハタ

### 1. はじめに

関空島の周囲には生物多様性に配慮した緩傾斜護岸が造成され、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いるだけでなく、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、従来の漁具による調査方法は非常にコストも時間も掛かる。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、そこ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。現時点においては統一的な手法はなく研究者によって様々な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。また、魚類の活動が低下し漁具に掛らない時期でも環境 DNA であれば把握することで安定的な調査が可能となる。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る。

関空島の緩傾斜護岸に生息し、漁業資源と

して重要な魚種はカサゴ (*Sebastes marmoratus*) およびキジハタ (*Epinephelus akaara*) である。カサゴについては資源量が多く過去においても重要な魚種として調査が行われている。キジハタは資源量が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。大阪府沿岸ではあまりみられない大型のキジハタ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環境 DNA の検出手法の確立を目指し、分布調査の可能性について検討を行う。

### 2. 材料と方法

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。

## 2.1 プライマー・プローブの設計

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。また、誤って他の種類を検出しないように関空周辺に生息していると考えられる近縁種についても同様に遺伝情報を得た。得られた遺伝情報からウェブソフト (Primer-BLAST、Primer3Plus) を活用し、プライマー・プローブを設計した。得られたプライマー・プローブについてカサゴおよびキジハタの組織から抽出した DNA を用いて機能するか確かめた。また、個体密度が明らかな飼育海水からの検出も行った。

## 2.2 天然海域からの検出

カサゴおよびキジハタの検出系の天然海域の海水からの検出を確認するため、関空島周辺に 16 地点を設定し (図 1)、2017 年 7 月 31 日、8 月 28 日、9 月 25 日に採水を行った。得られた水は研究室に持ち帰り、2l を濾過した。フィルターからの DNA の抽出は、海水からの抽出事例 (Jo et al. 2017) <sup>1)</sup> に従って、PCR では Environmental Master Mix (TaqMan 製) を用い、試薬標準の手順に従って行った。なお、PCR では 1 地点あたり 3 回反復を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 DNA の検出

カサゴに対しては 2 セット、キジハタについては 3 セットのプライマー・プローブセットが得られ、いずれも組織からの DNA を検出することが出来た。この中で反応が速く精度の良いものを飼育海水および天然海域からの検出に使用した。飼育海水からの検出では、カサゴ、キジハタとも感度良く検出され、多様な DNA が混在する海水からの目的の DNA の検出に成功した。

### 3.2 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。地点間の DNA 濃度の違いについては 3 回反復中の検出回数を基に相対的な階級に分け、この階級を元に描いたコンターを描いた (図 2 a)。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みられ、離れた点では検出されない地点もあった。また、

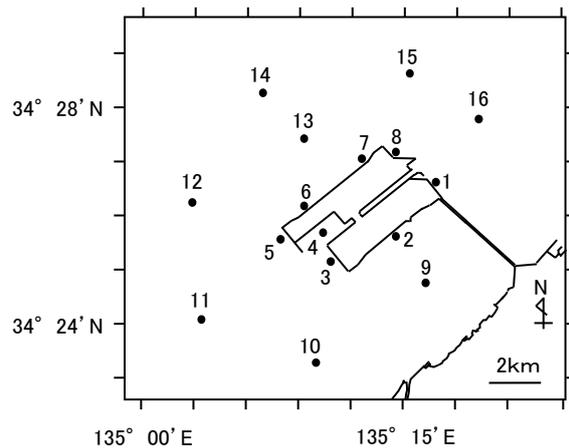


図 1 採水地点

関空島近くの点においては相対的な差がみられた。

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、飼育海水の情報を元にするると、1 m<sup>3</sup>あたり 0.05 尾と推定された。過去の潜水観察による調査では、小型魚を含め多い場所では 1 m<sup>3</sup>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 m<sup>3</sup>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 の濃度から分布や資源量を推定できる可能性が示唆された。

### 3.3 キジハタ

PCR で感度良く DNA が検出された。天然海域から標的とする DNA を検出することに成功した。カサゴと同様に DNA 濃度を相対的な階級に分けてコンター図を描いた (図 2 b)。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みられたが、沖合の地点でもやや高く検出されることもあった。

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、飼育海水の情報を元にするると 1 m<sup>3</sup>あたり 0.005 尾以下と推定された。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) <sup>2)</sup>、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、未発表) などから今回の推定値は概ね妥当な値であると考えられ、今後の資源推定に使用出来る可能性が示唆された。

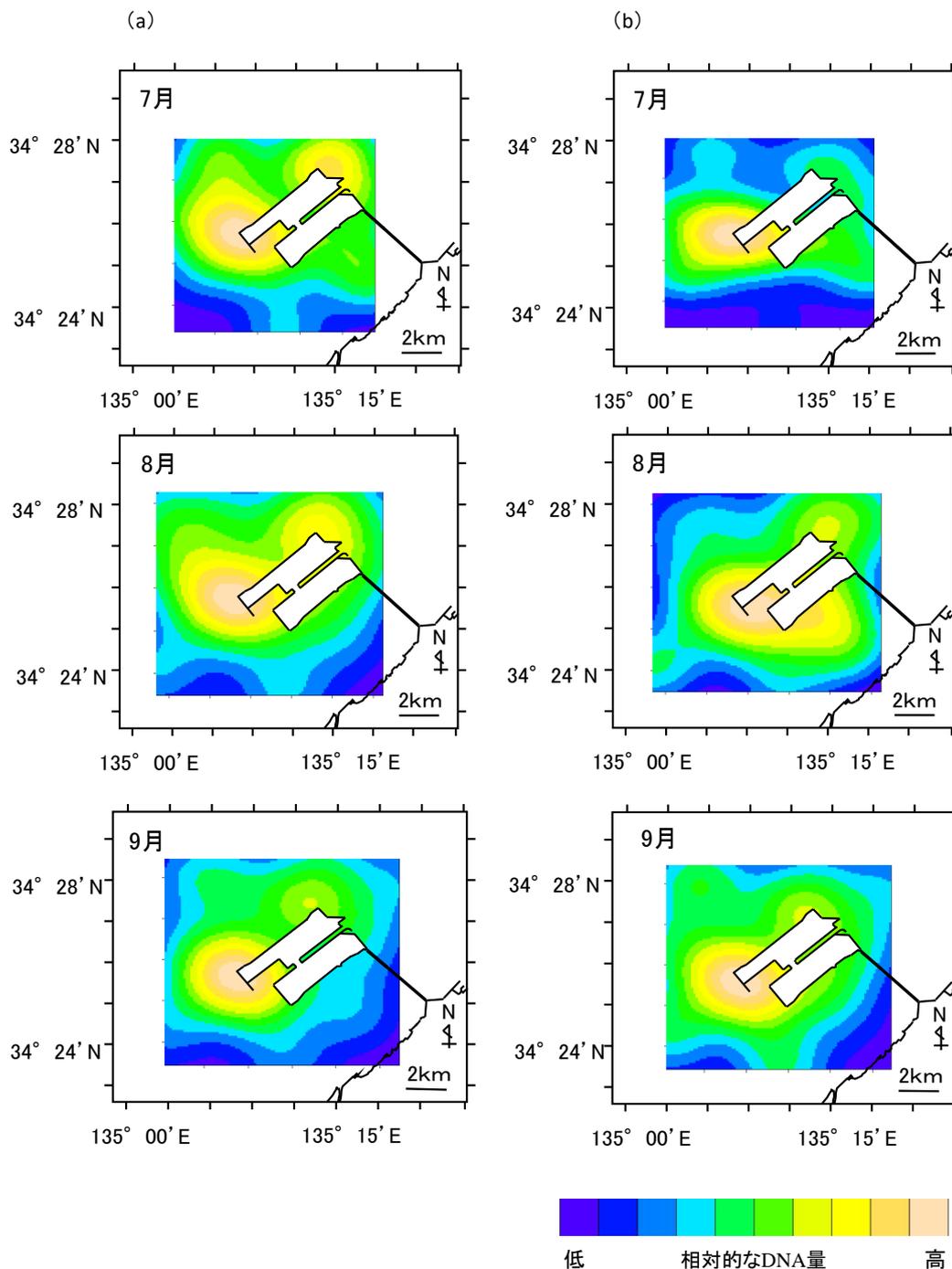


図2 相対的なDNA量 (a) カサゴ、(b) キジハタ

### 3.4 調査手法の有効性

カサゴ、キジハタともDNA量が関空島周辺で高く、離れると低くなる傾向がみられ、護岸近くに生息するという一般的な知見と矛盾しない結果であった。また、関空島周辺におけるDNA量の濃度差は、カサゴでは過去の分布調査(関西国際空港 2006)<sup>2)</sup>とは一致しないが、ほぼ妥当な結果が得られている。キジハタについても一般的に潮通しのよい場所を好むとされ

る分布と一致しており妥当な結果が得られており、分布を調べる方法としての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、水を2ℓ濾過するには長時間を要した。濾過水量を減らすことが出来れば、作業効率は上がるが、DNAの検出感度が下がってしまう。よって濾過量が2ℓというのは関空島周辺の環境DNA調査手法として妥当であると

考えられる。

### 3.5 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地点自動観測装置、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。その結果、西方 3.3~6.8km、南方 0.5~9.5km の南西方向への流れがみられた。一方、DNA 濃度は多くの場合、関空島周辺で高く、また、流れの上流側である北東でも高い地点があった。このため数 km 単位での護岸の藻場魚類調査において潮流による影響は現時点では小さいと考えられたが、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。

今回採水を行ったのは夏季であるが、他の時期では DNA 濃度や分解速度が異なると予想される。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

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、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。

### 参考文献

- 1) Jo, T., Murakami, H., Masuda, R., Sakata, MK., Yamamoto, S., Takahashi, K., Minamoto, T. : Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA, *Molecular Ecology Resource*, 17(6), e25-e33, 2017.
- 2) 関西国際空港：関空調査会，緩傾斜護岸調査，平成 17 年泉州海域漁業生物調査報告書，2006.