

一般社団法人 関西空港調査会  
2018 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  
(キジハタ等) の分布調査法の確立

成果報告書

2019 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

生物多様性に配慮して造成された関空空港島（以降、関空島）の緩傾斜護岸は、特に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、従来の漁具による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、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 (Ficetola et al. 2008; Minamoto et al. 2012 ほか)。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 (Darling and Mahon 2011)。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き安定的な調査が可能となる。さら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 法による低コストの魚類分布調査法の確立を目指す。

## 2. 研究目標

キジハタ (*Epinephelus akaara*) は大阪府がブランド化を目指している高級魚であり、大阪府の沿岸海域と関空島周辺海域に生息している。緩傾斜護岸のある関空島周辺海域には、大阪府沿岸の他海域ではあまり認められない大型のキジハタ親魚が数多く生息しており、関空島周辺海域は周辺海域への稚魚の供給源としても期待されている。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(公財)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。

2017 年度に行った本助成事業による研究では多種多様の DNA が混在する海域からキジハタの DNA の検出に成功した。さらに場所による生息密度の高低を反映したと推定される DNA 濃度の濃淡も認められた。そこで本研究では水槽試験による季節や体重の違いによる環境 DNA 濃度を測定、また、海域における季節や水深による DNA 濃度の違いを測定することで、分布密度推定に向けた検証を行う。

## 3. 研究方法

### (1) 検量線の作成

環境 DNA の濃度を測定するため、人工合成 DNA を用いて検量線を作成した。遺伝子データベースから明らかになっている PCR 増幅を行う領域を含む 312bp の塩基配列を人工的に合成した。濃度既知の人工合成 DNA を段階的に希釈し PCR 増幅を行った。PCR 増幅方法に

については後述の環境 DNA 検出方法に準じた。これをスタンダードサンプルとし、各サンプルの濃度を求めた。

## (2) 水槽試験

体重別・季節別の環境 DNA 濃度を調べるため、水槽にキジハタを収容し飼育水の採水を行った。試験には（公財）大阪府漁業振興基金栽培事業場が飼育している採卵用親魚を用いた。コンクリート水槽（約 6.5m×3.5m×1.5m）に大サイズ（体重約 1.5kg）、中サイズ（体重約 1.0kg）、小サイズ（体重約 0.5kg）のキジハタを 1 尾ずつ収容（表 1）、砂濾過紫外線殺菌海水を換水率 100%/日でかけ流し、排水はオーバーフローとした。収容後 6 日目に採水を行い、期間中は無給時とした。表層の採水はバケツを、底層の採水は理研式バンドーン採水器を用い、採水量は 2.5ℓとし、採水後、ProClin300 を 200 μℓ加えた。サンプル水は濾過を行うまでの間、冷蔵庫にて保管した。季節変化を調べるため試験は 2018 年 7 月～8 月、12 月、2019 年 2 月に行った（表 1）。

稚魚の環境 DNA 濃度を調べるため、コンクリート水槽（約 6.5m×3.5m×1.5m）に（公財）大阪府漁業振興基金栽培事業場で生産された稚魚（平均全長 80.5mm）を収容し、採水を行った。水槽に高密度（合計体重 1,504g、178 尾）、中密度（合計体重 502g、60 尾）、低密度（合計体重 150g、18 尾）になるように収容し、採水およびその他の手法については体重別・季節別の試験と同様に行った。稚魚の収容は 2018 年 12 月 19 日に、採水は収容後 6 日目の 2018 年 12 月 25 日に行った。期間中の水温は 13.4～14.8℃であった。

表 1 水槽試験に用いたキジハタ（親魚）

収容日	採水日	全長 (mm)	体重 (g)	水温 (°C)
2018.7.3	2018.7.9	318	490	23.0～23.4
2018.7.17	2018.7.23	460	1,445	24.3～25.6
2018.7.31	2018.8.6	415	1,010	25.0～26.0
	2018.12.10	330	504	
2018.12.4	2018.12.10	438	994	13.8～18.6
	2018.12.10	427	1,470	
	2018.2.18	339	530	
2018.2.12	2018.2.18	420	970	10.0～10.7
	2018.2.18	453	1,600	

## (3) 天然海域

海域の環境 DNA 濃度を調べるため、関空島周辺に 10 地点の採水地点を設定した（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。すべての地点で表層採水を行い、関空二期島近傍の 5 地点（地点番号 4～8）については、中層（水深 10m）および底層（水底から 1m 上層）の採水を行い、計 20 サンプルを得た。採水に

は、表層はバケツを、中層および底層は理研式バンドーン採水器を用いた。採水量は2.5ℓとし、サンプル水に ProClin300 を 200 μℓ 加えた。サンプル水は温度が上がらないようにクーラー等を用いて研究室へ持ち帰り、濾過を行うまでの間、冷蔵庫にて保管した。季節変化を調べるため、2018年7月31日、11月28日、2019年2月25日に採水を行った。

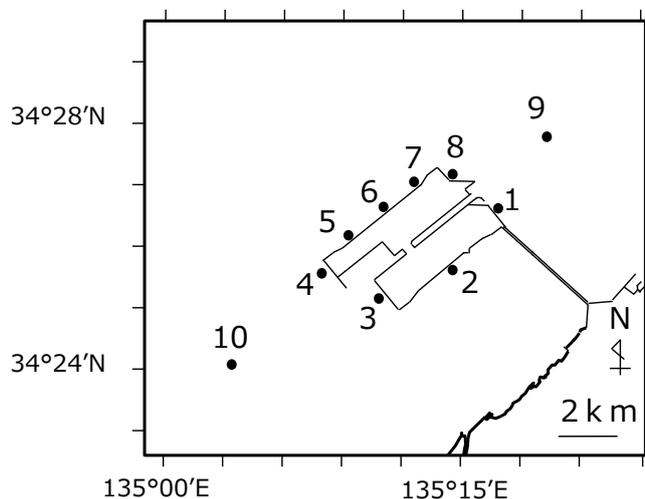


図1 採水地点

#### (4) 環境 DNA の測定方法

水槽試験および天然海域から得られたサンプル水の濾過は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 μm）を用いて吸引濾過した。サンプル水は 2ℓ を濾過したが、天然海域のサンプル水については目詰まりすることがあるため 1ℓ ずつ分けて濾過した。濾過は可能な限り採水を行った当日に行った。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 (Minamoto, 2017) に沿って行った。まず、20 μℓ の Proteinase K (600mAU/ml)、200 μℓ の水、200 μℓ 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 μℓ 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 μℓ の BufferAL と 600 μℓ のエタノールを添加、DNeasy のカラムに入れ、6000×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 増幅にはリアルタイム PCR 装置 (Thermal Cycler Dice® Real Time System II : TaKaRa 製) を使い、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/μℓ の Amp Erase UNG (Applied Biosystems 製)、4 μℓ のサンプル DNA を加え、合計 20 μℓ とした。プライマーおよびプロ

ープは2017年度の本助成事業で開発し有効性が確認されたものを用いた（辻村、2018）。PCR条件には95℃で10分後、95℃で15秒、60℃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。基本的には2017年度に確立した方法に沿って行ったが、PCRの溶液に加えるサンプルDNAの量を2μlから4μlに変更し、検出力向上を図った。

## 結果と考察

### (1) 検量線の作成

希釈した人工合成DNAの測定結果について図2に示した。濃度とCtの間には直線関係があることから、人工合成DNAを濃度推定の基準として問題無いことが確認された。

6.7copies/mlに希釈したものにおいては3反復中2回しか反応せず、また、反応した2回の値についても濃度の濃い時と比べてばらついていた。そのため、安定して測定出来る濃度は約10 copies/ml以上であると考えられた。

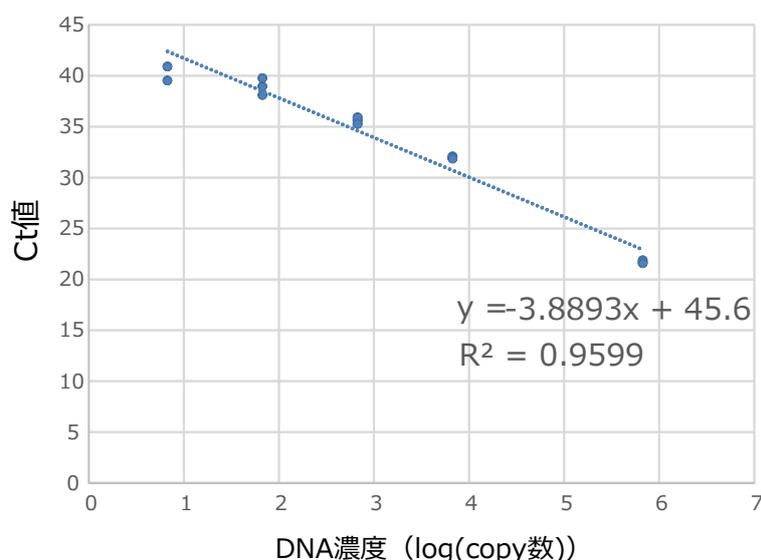


図2 人工合成DNA測定結果

### (2) 水槽試験

体重別・季節別の試験結果を図3に示した。7月の中サイズの底層および11月の中サイズで特異的に高い値が検出された。これらを除くと水槽水から概ね100~200copies/mlの濃度で環境DNAが検出され、体重および季節の明瞭な濃度差は見られなかった。他と異なる高い値が検出された原因は不明であるが、水槽内の魚が体を擦った等の原因で水槽内に環境DNAが高くなった可能性が考えられた。

マアジの水槽実験の例では水温が高い時ほど環境DNAの放出量が高くなっていった（Jo、2019）。この研究では分解速度も推定しており、分解速度も水温が高いほど高くなっていった。キジハタの場合、水温が高いほど活動が活発になるため、環境DNAの放出量も多くな

ると考えられるが、同時に分解速度も早くなり、今回の試験結果では水槽内の環境 DNA 濃度に季節間の差が見られなかったと考えられた。

稚魚の試験結果について図 4 に示した。密度が高いほど環境 DNA の濃度が高くなるが、その上昇は緩やかになるという関係が確認された。他の研究（赤松, 2017）でも同様の関係が見られており、環境 DNA 濃度と生物量は比例の関係ではないことが示唆された。

これまでの研究では生物量（体重）と環境 DNA 濃度との関係について指摘されてきたが、今回の結果では体重と環境 DNA 濃度に明瞭な関係が見られなかった。特に稚魚と親魚では同じ体重当たりの環境 DNA 濃度が大きく異なっており、同じ 1.5kg で比較すると親魚で 100~200copies/ml、稚魚で 1,100~1,300copies/ml であった。そこで、稚魚と親魚の環境 DNA 濃度の関係を繋げるため、12 月に行った試験結果について水槽内に収容した個体の総全長と環境 DNA 濃度の関係を図 5 に示した。親魚の 2 例で高い値が検出されているが、これらを除くと関係性がみられた。生体の長さや環境 DNA 濃度の関係が示唆され、全長組成等のデータが必要となるものの、環境 DNA 濃度から天然海域の密度推定につながる知見が得られた。

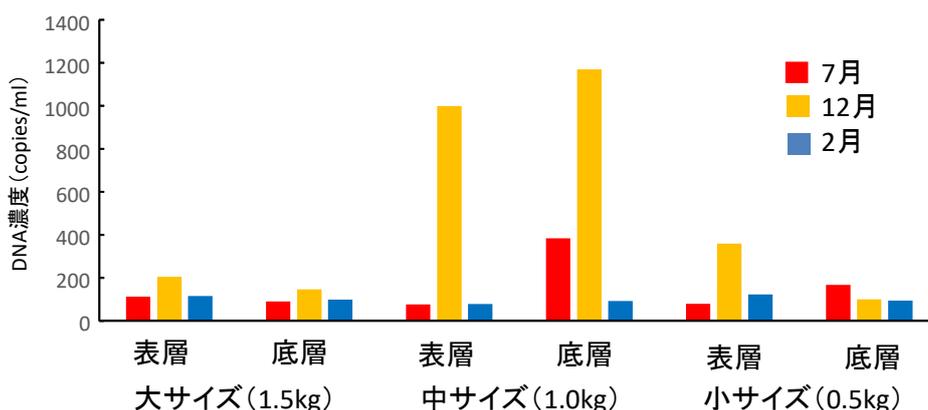


図 3 体重別・季節別環境 DNA 測定結果（親魚・水槽試験）

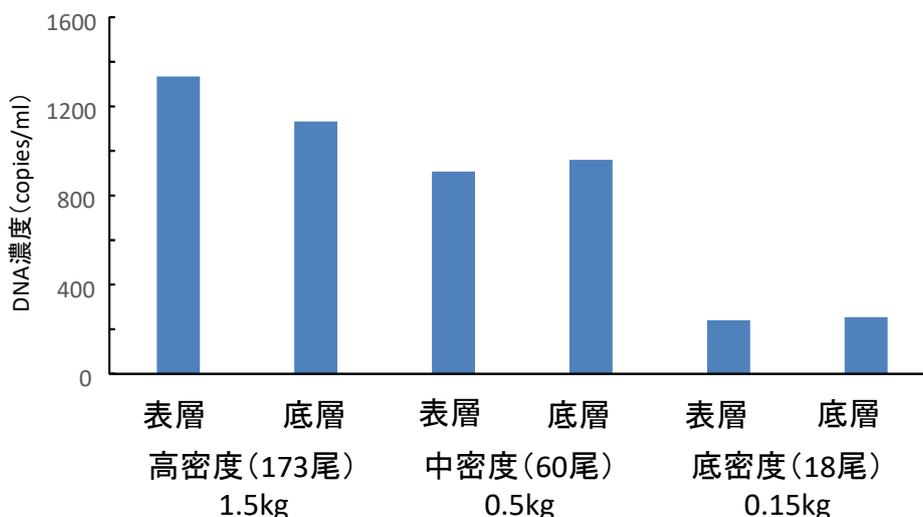


図 4 密度別環境 DNA 測定結果（稚魚・水槽試験）

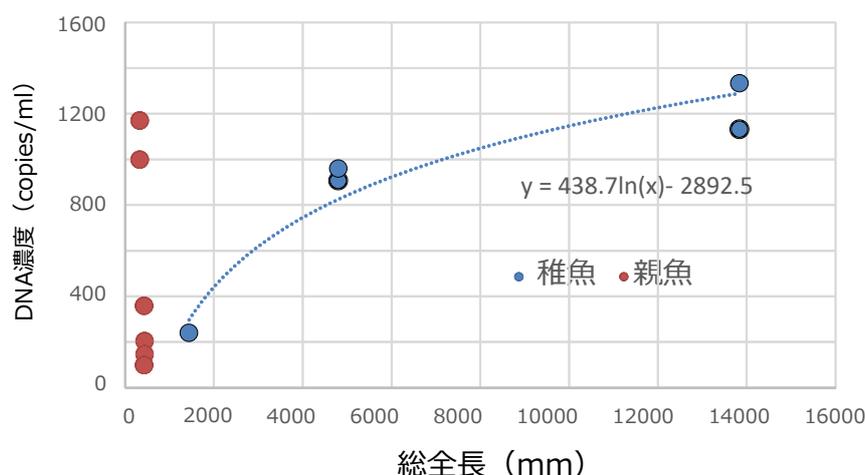


図5 総全長と環境 DNA の関係（水槽試験）

### (3) 関空周辺の環境 DNA 濃度

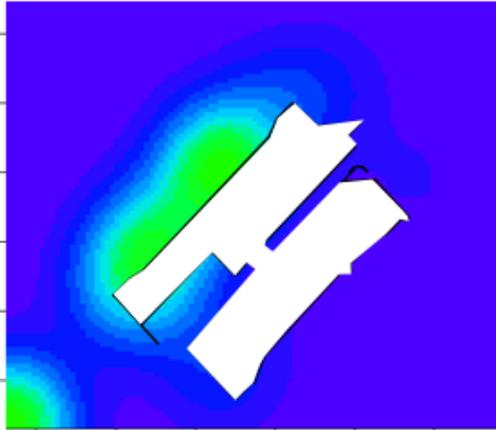
関空島周辺における表層の DNA 濃度のコンター図を図6に示した。コンター図から7月は関空島北西側、2月は北側で高くなる傾向が見られた。比較のため、2018年に行われた籠網によるキジハタの採捕尾数（関西国際空港株式会社、2019）をコンター図に示した（図7）。関空島北西側で多く採捕される傾向が見られており、環境 DNA の測定結果は実際の採捕結果と矛盾しておらず、分布を反映していると考えられる。

関空島北西側（地点番号4-8）における鉛直方向のコンター図を図8に示した。いずれの時季も中層で低いこと、夏季は底層と表層、冬季は表層で高いことが明らかとなった。環境 DNA は表層と底層で異なることがある（Moyer、2014）が、キジハタの場合は表層で高くなる魚種だと考えられた。

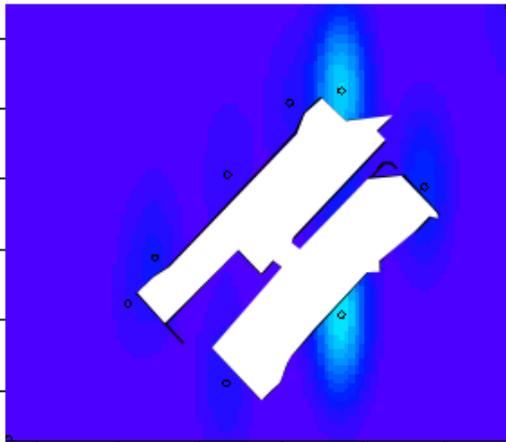
季節別に比較すると表層では2月、7月、11月の順に、底層は7月、11月、2月の順に DNA 濃度が高い傾向がみられた。キジハタは水温の高い時期は摂餌や産卵行動など活発に動き、水温の低い時期は冬眠状態であるため、7月、11月、2月の順に環境 DNA 濃度が高いと予測される。測定された底層の DNA 濃度は予測と同じであり、放出後間もない DNA を検出していると思われる。

水槽試験では季節間の違いが見られなかったが、天然海域では明らかな違いが確認された。水槽実験中は無給餌のため、摂餌行動等の活動はほとんど観察されなかったことなどから、天然状態を再現できていない可能性がある。つまり環境 DNA の放出量はキジハタの行動と関係している可能性があり、この点については課題として残された。

2018.7.25



2018.11.25



2019.2.13

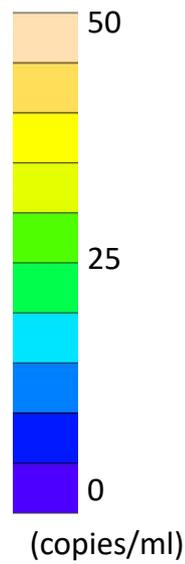
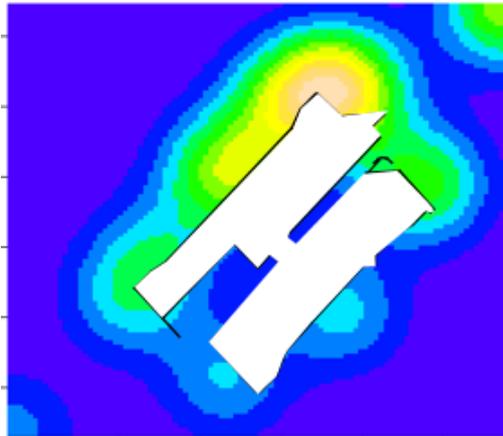


図6 関空島周辺のキジハタの環境 DNA 濃度 (表層コンター図)

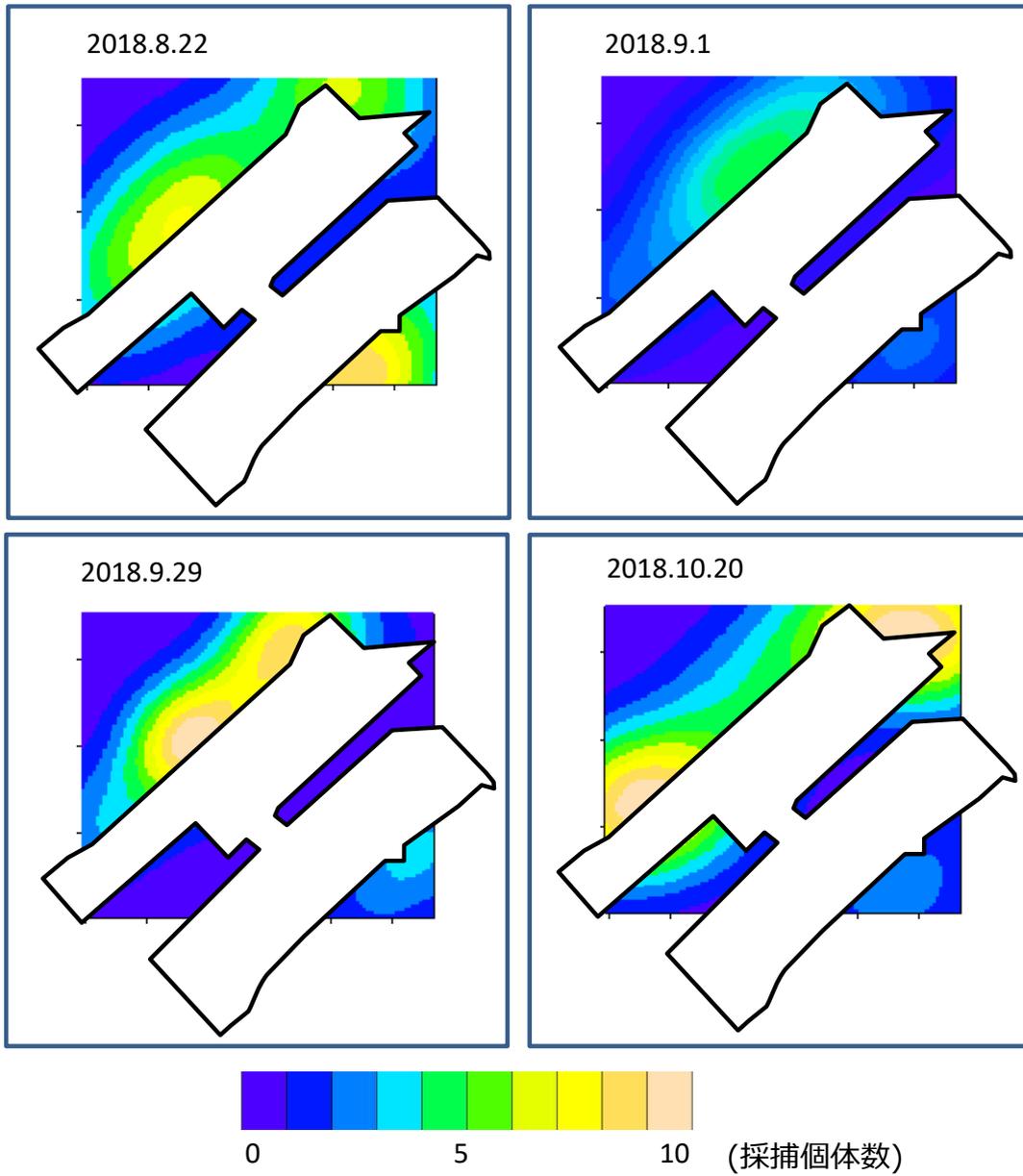


図7 キジハタの採捕結果（コンター図）

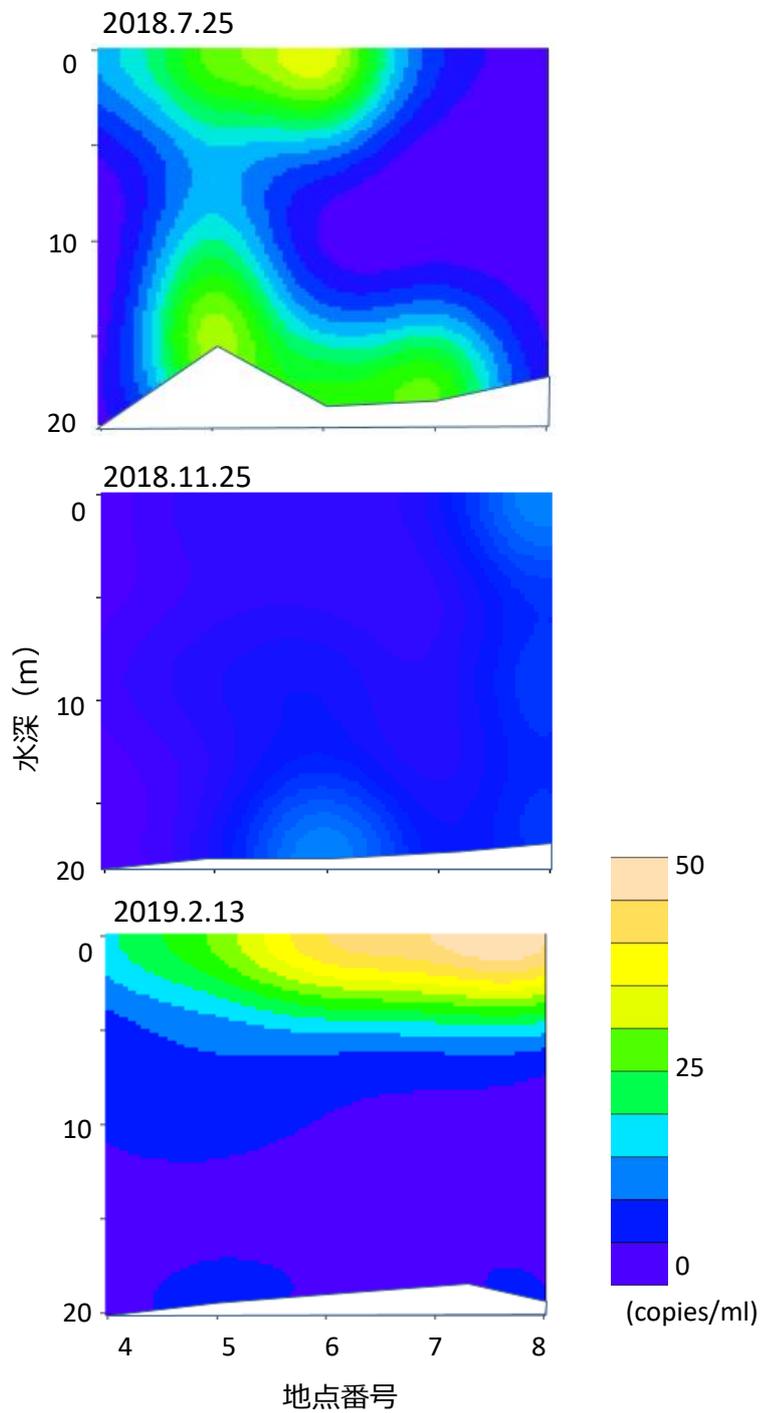


図 8 関空島近傍のキジハタの環境 DNA 濃度  
(鉛直コンター図)

#### (4) 検出手法について

今回の環境 DNA 測定方法は数 copies/ml というレベルでの検出が可能であり、濃度差の検出も可能であることから、本研究の測定方法は実用的であると考えられた。天然海域では季節間で環境 DNA の濃度差が見られており、冬季の表層は夏季や秋季に比べて高かったことから底密度であっても検出できる可能性が高く、生息の有無を調べるにはこの時季が優れていると考えられた。ただ、水温が低く環境 DNA の分解速度が遅いと考えられ、潮流の影響をより強く受け、より広範囲で検出されてしまうことを想定する必要がある。夏季には底層水を採水する作業が必要となるものの、水温が高いため環境 DNA の分解速度が早く、生息場所近傍で検出されるため、より詳細に分布を調べるにはこの時季が優れていると考えられた。

水槽試験からは分布密度推定につながる知見が得られたが、天然海域の環境 DNA の動態については不明な点が多い。得られた環境 DNA 濃度から密度推定を行う精度を高めるためには更なる知見を積み重ねが必要である。特に今回は環境 DNA の分解速度が天然海域の環境 DNA の濃度に強い影響を与えている可能性が示唆され、詳しく調べる必要があると考えられた。

#### 引用文献

- 赤松 良久, 乾 隆帝, 一松 晃弘, 河野 誉仁, 土居 秀幸 (2017) 環境 DNA を用いた河川内の魚類現存量推定に関する基礎的検討. 土木学会論文集 B1 (水工学), 73(4):I\_1111-I\_1116
- 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
- Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R., Minamoto, T. (2019)Effect of temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. Ecology and Evolution, 9:1135-1146
- 関西国際空港 (2019) 平成 30 年度関西空港島周辺海域有効利用検討調査報告書
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z(2012)Surveillance of fish species composition using environmental DNA. Limnology, 16:147-153
- Minamoto, T., Fukuda, M., Katsuhara, K.R., Fujiwara, A., Hidaka, S., Yamamoto, S., Takahashi, K., Masuda, R. (2017) Environmental DNA reflects spatial and

temporal jellyfish distribution. PLOS ONE, 12(2):e0173073.

Moyer GR, Díaz-Ferguson E, Hill JE, Shea C (2014) Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems. PLOS ONE, 9:e103767

辻村浩隆(2018) 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. 一般社団法人関西空港調査会 2017 年度調査研究助成事業成果報告書