

近藤 倫生

学校法人龍谷大学 理工学部  
教授

環境 DNA 分析に基づく魚類群集の定量モニタリングと生態系評価手法の開発

## § 1. 研究実施体制

### (1) 近藤グループ (龍谷大学)

- ① 研究代表者: 近藤 倫生 (龍谷大学理工学部、教授)
- ② 研究項目
  - ・環境 DNA による特定対象種の検出系の開発
  - ・環境 DNA の回収効率に関する水質条件の検討
  - ・環境 DNA から種間相互作用を検出する技術、および生物定量をおこなう技術の開発

### (2) 源グループ (神戸大学)

- ① 主たる共同研究者: 源 利文 (神戸大学人間発達環境学研究科、特命助教)
- ② 研究項目
  - ・海水からの効率的 DNA 回収法の開発
  - ・特定対象種の高精度 DNA 量評価手法の開発
  - ・環境 DNA の由来に関する研究

### (3) 益田グループ (京都大学)

- ① 主たる共同研究者: 益田 玲爾 (京都大学フィールド科学教育研究センター、准教授)
- ② 研究項目
  - ・生物分布・生物量の定量モニタリング技術
    - フィールド実証実験
      - 舞鶴湾における目視潜水調査と環境 DNA 量との対応の検証
    - 水槽実験
      - 水槽内における環境 DNA 量の偏在性の検証

○発電所温排水実験

温排水による局所的温暖化海域における魚類群集の検討

(4) 笠井グループ(京都大学)

①主たる共同研究者: 笠井 亮秀 (京都大学フィールド科学教育研究センター、准教授)

② 研究項目

- ・環境 DNA を利用したスズキの生物量・分布評価の実証実験
- ・環境 DNA 情報を魚類定量情報へと「翻訳」する技術の開発

(5) 宮グループ(千葉県立中央博物館)

①主たる共同研究者: 宮 正樹 (千葉県立中央博物館、動物学研究科長)

② 研究項目

- ・次世代シーケンサを用いた環境 DNA 分析法の確立と魚類ミトゲノム全長配列の網羅的決定
- ・魚類ミトゲノムデータベース *MitoFish* の開発・運用

## § 2. 研究実施の概要

### <全体の概要>

本研究では、環境 DNA を活用した、三つの魚類モニタリング・管理技術の開発を目標に設定している。それぞれ、[目標1] 生物分布・生物量の定量モニタリング技術、[目標2] 魚類群集構造の種解像度モニタリング技術、[目標3] 非線形予測を応用した群集動態評価・予測技術の開発である。これらのうち、目標 1・2 は分子手法の開発、翻訳技術の開発、実証実験を組み合わせることで推進され、目標 3 は数理モデルを利用した理論的な研究が主となる。今年度は、個々の目標・課題について、以下の研究を実施した。

### <近藤グループ>

目標1に関わる分子手法の開発に関連して、源グループと共同して、野外調査・高精度定量系の開発等を行った(下記詳細)。目標3に関連して、舞鶴湾での野外調査データに基づき、DNA の空間分布を基に生物量と分布の推定をおこなうための統計モデルを作成した。また、同目標での課題「数理モデルによる環境 DNA を利用した群集把握」については、多種個体群密度時系列データから種間相互作用を検出する理論手法の完成をみた。

### <源グループ>

今年度は目標1における課題「分子手法の開発」に関連して、主に舞鶴湾における多地点調査、高精度定量系の開発、環境 DNA の由来の解明を行った。舞鶴湾における多地点調査では、100 地点から 600 サンプルを得た採水調査と計量魚群探知機による魚群のバイオマス計測を同時に行い、マアジの環境 DNA 濃度が魚群探知機で計測した魚類バイオマスと有意に相関することを見いだした。このことは、環境 DNA 解析が海域における生物資源量の分布把握に有効なツールとなり得ることを示唆している。これに並行して環境 DNA の高精度定量手法の開発に取り組み、デジタル PCR を用いることで、環境 DNA 量を従来のリアルタイム PCR 法より高精度に定量可能であることを示した。また、さけの受精卵から微量の環境 DNA が検出されることや、ふ化直後の仔魚からその数百倍の濃度の環境 DNA が放出されていることなどを明らかにした。

### <益田グループ>

フィールド実証実験、水槽実験および発電所温排水実験を並行して進めた。個体数と環境 DNA の関係を調べた水槽実験では、環境 DNA 量は個体数の増加に伴い上昇することが示された。水槽内における環境 DNA の日周性を調べた水槽実験では、環境 DNA の放出量に時間帯による違いは認められなかった。また、舞鶴湾内でおこなった野外実験より、環境 DNA 量に時間変動が見られること、これが対象魚種の摂餌等の活動性を反映している可能性が考えられた。昨年度に始めた京都府舞鶴湾における定例目視潜水調査および試料採水を 1 年間継続した。その結果、目視調査では夏季をピークに春季から晩秋までマアジが記録されたのに対し、採水試料からは冬季にも多量のマアジ DNA が検出された。調査地点では冬季にマアジが釣獲されることもあることから、本種の生息状況に関して潜水目視で得られない情報を環境 DNA により検出できたものと考え

られる。また、発電所温排水近傍における調査も継続して行っている。現在稼働を停止している福井県高浜原子力発電所の温排水から2kmに位置する音海において、昨年度から継続して毎月1回の魚類目視調査を行うとともに、調査測線上から毎回6検体の採水を行った。2014年にも、夏季から晩秋にかけては南方系の魚種が出現し、これらは2015年1月以降は見られなくなった。

#### <笠井グループ>

目標1における課題「実証実験」のうち「丹後海スズキ実験」として、環境DNAを利用したスズキの生物量・分布評価の実証実験をおこなった。冬季にスズキ卵稚仔が出現する丹後海において、ネットサンプリングによりスズキ卵稚仔を採集するとともに、環境水を採集し、水中に含まれるスズキのDNA量を分析した。着底直後のスズキ稚魚密度とDNA量の間には正の相関がみられた。

また、目標1における課題「翻訳技術の開発」に関連して、環境DNA情報を魚類定量情報へと「翻訳」する技術の開発に必要なシミュレーションを行った。その結果、丹後海の海洋環境を概ね再現することができた。

#### <宮グループ>

次世代シーケンサ・イルミナ社 MiSeq を用いた魚類群集の定性的・定量的モニタリング法を確立するために、魚類環境DNA用ユニバーサルプライマーを開発した (MiFish-U)。沖縄美ら海水族館の4つの水槽から得られた環境DNAを利用し、各水槽の既知の魚類群集をどれだけ再現できるか検討した。板鰓類 (サメ・エイ類) の再現性が低いことが予備的実験において判明したため、新たに板鰓類用ユニバーサルプライマー (MiFish-E) を設計し、MiFish-U/Eを用いたマルチプレックスPCRを行いライブラリを作成し、MiSeqによる超並列解析を行った。その結果、リファレンス配列をもつ種の93.3%に相当する168種の魚類を環境DNA中から検出することができた。さらに、水族館に隣接する天然海水から得られた環境DNA中からも93種の魚類を検出することができ、全体で70科・152属に含まれる232種を検出することができた。また、マグロ属などMiFish配列だけでは識別できない種については、新たなプライマーを設計してマルチプレックスPCRを行うことにより、正確な種判別ができることもわかった。並行して、リファレンス配列の充実にも努めた結果、本年度末現在約2,500種のMiFish配列を決定することができた。