環境 DNA メタバーコーディング法‘MiFish’を用いた農業水路に生息する魚類の予備推定

Preliminary estimation of fish inhabiting agricultural canals using environmental DNA metabarcoding method, MiFish

○小出水規行*・咸　成南**・中田和義**・宮　正樹***・佐土哲也***・渡部恵司*・
森　淳****・竹村武士*****・嶺田拓也*・吉永育生*・山岡　賢*
Koizumi, N., Ham, S. N., Nakata, K., Miya, M., Sado, T., Watabe, K.,
Mori, A., Takemura, T., Mineta, T., Yoshinaga, I. and Yamaoka, M.

１．はじめに

演者らは，水や土壌に含まれている DNA を抽出し，その中から対象生物種の DNA を検出することによって，当該種の生息の有無や分布を推定する環境 DNA 手法の開発に取り組んでいる．環境 DNA は微生物の他，そこに生息している生物個体の代謝物や排泄物等に由来すると考えられ，個体採捕を必要とせず，対象種の DNA 検出力も高いことから，現在，本手法は世界的にも注目されている．

このような状況のもと，我が国における環境 DNA 研究は，農業水路，河川，湖沼におけるアブラハヤ，アユ，ブルーギルの生息分布推定（Koizumi et al.，2015；Yamanaka and Minamoto，2016；Takahara et al.，2013）等の特定種を対象にした解析が行われている．さらに，環境 DNA メタバーコーディング法‘MiFish’の開発により（Miya et al.，2015），サンプルに含まれている全ての種の DNA を網羅的に検出することも可能となった．本発表では，MiFish 解析は個体採捕に基づく現行の生きもの調査に代替可能なことに着目し，その検証を兼ねての予備推定をいくつかの水路で実施した．

２．材料と方法

１）調査水路，採水，DNA 抽出　広島県内の農業水路 A～E において（**図 1**，ここでは国内希少野生動植物種のスイゲンゼニタナゴが生息しているため，現地名の使用は避けている），2017 年 2 月 27 日に水 1 リットルを採水した．各水路で採水した水は実験室でフィルターろ過し，フィルター上の残渣から DNA を抽出した．

２）MiFish 解析　解析手順は Miya et al.（2015）に準拠した．次世代シークエンサーMiSeq の解析ライブラリ作成にあたって，1st PCR では各水路の DNA サンプルを MiFish プライマ

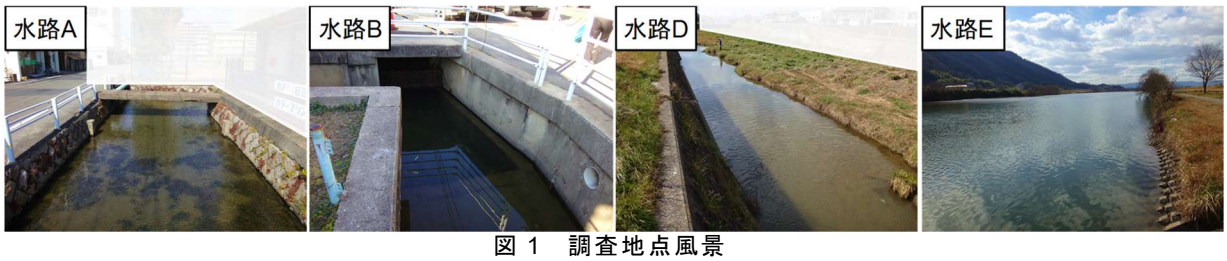

図 1　調査地点風景

*農研機構・農村工学研究部門（Institute for Rural Engineering, NARO），**岡山大学大学院環境生命科学研究科（Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University），***千葉県立中央博物館（Natural History Museum and Institute, Chiba），****北里大学獣医学部（School of Veterinary Medicine, Kitasato University），*****農研機構・西日本農業研究センター（Western Region Agricultural Research Center, NARO）
キーワード：次世代シークエンサー，生きもの調査，生物多様性

ーで増幅し，2nd PCR では精製した増幅産物へのインデクス付けを行った．MiSeq 解析後，シークエンサーからの出力塩基配列と DNA データバンク上の登録配列との照合については，Blast 検索を搭載した解析パイプラインを通じて行った．

３．結果とまとめ

水路全体で 6 科 20 属 26 魚種の DNA 配列が検出された（**表 1**）．ここでは，特定された種のうち，シークエンサーによる DNA 配列のリード数が 100 以上を対象にスクリーニングした．検出された種について水路別にみると，最多となったのは水路 A の 21 種，次に水路 E の 18 種と水路 D の 15 種が続き，水路 C の 9 種が最少となった．また，魚種別にみると，ヤリタナゴ，オイカワ，カワヨシノボリ，フナ類 sp.，ドンコ，ムギツクの 6 種は全水路で共通し，スイゲンゼニタナゴもまた地点 D で検出されている．

タモ網やセル瓶などの一般的な漁具を用いた個体採捕調査によって，これだけの種を一度の調査だけで確認することは難しいと推察する．講演においては，各地点における既存の採捕調査結果との比較についても触れたいと考えている．なお，本研究の一部は，神戸市立須磨海浜水族園の平成 28 年度スマスイ自然環境保全助成を受けた．

参考文献　Koizumi et al.（2015）：農業農村工学会論文集，**297**，IV_7–IV_8．Yamanaka and Minamoto（2016）：*Ecological Indicators*，**62**，147-153．Takahara et al.（2013）：*PLoS ONE*，**8**，e56584．Miya et al.（2015）：*Royal Society open science*，**2**，150088．

表 1　環境 DNA サンプルから検出された農業水路に生息する魚類の DNA 配列リード数（リード数 100 以上の種を対象に 50 音順に掲載した）

科	属	種	地点					計
			A	B	C	D	E	地点数
アカザ科	アカザ属	アカザ					183	1
コイ科	アブラボテ属	アブラボテ				557	101	2
		ヤリタナゴ	4437	14857	1423	648	321	5
	カマツカ属	カマツカ	260	230				2
	カワムツ属	カワムツ				284	192	2
		ヌマムツ	2249	2118		149		3
	コイ属	コイ	735		288	331	1744	4
	スゴモロコ属	イトモロコ	494	491				2
		コウライモロコ	137	808			136	3
	ゼゼラ属	ゼゼラ	245					1
	タナゴ属	カネヒラ		111				1
	タモロコ属	タモロコ	1172			315	127	3
	ニゴイ属	コウライニゴイ	515		423	440	1736	4
	ハス属	オイカワ	2126	3387	5193	3568	3814	5
	バラタナゴ属	スイゲンゼニタナゴ					102	1
		タイリクバラタナゴ	396	215				2
		ニッポンバラタナゴ	105					1
	ヒガイ属	カワヒガイ	218	122		1352		3
	フナ属	ゲンゴロウブナ	176				472	2
		フナ類 sp.	4670	217	577	264	202	5
	ムギツク属	ムギツク	601	331	212	1401	1659	5
ドジョウ科	ドジョウ属	ドジョウ	334			422	652	3
ドンコ科	ドンコ属	ドンコ	1187	573	162	1986	1499	5
ハゼ科	チチブ属	ヌマチチブ	119				104	2
	ヨシノボリ属	カワヨシノボリ	2402	660	729	2924	5789	5
Percichthyidae	オヤニラミ属	オヤニラミ	198		120	232	400	4
計　DNA リード数			22776	24120	9127	14873	19233	5
計　種数			21	13	9	15	18	5