

福岡工業大学 学術機関リポジトリ

Comparison of distribution patterns between two clades of *Liobagrus reinii* in coexisting rivers using environmental DNA metabarcoding

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-04-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 乾, 隆帝, 中尾, 遼平, 齋藤, 稔, 赤松, 良久 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/11478/00001709

環境 DNA メタバーコーディング法を用いたアカザ *Liobagrus reinii* 2 クレードの河川内分布パターンの比較

乾 隆帝 (社会環境学部社会環境学科)
中尾 遼平 (山口大学大学院創成科学研究科)
齋藤 稔 (山口大学大学院創成科学研究科)
赤松 良久 (山口大学大学院創成科学研究科)

Comparison of distribution patterns between two clades of *Liobagrus reinii* in coexisting rivers using environmental DNA metabarcoding

INUI Ryutei (Faculty of Socio-Environmental Studies, Fukuoka Institute of Technology)
NAKAO Ryohei (Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University)
SAITO Minoru (Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University)
AKAMATSU Yoshihisa (Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University)

Abstract

Recently, it has become clear that there are two clades in *Liobagrus reinii*, which can reasonably be judged as separate species. In this study, we attempted to clarify the differences in distribution and habitat of the two clades of *Liobagrus reinii* in the Gonokawa and the Ota River Systems by using environmental DNA analysis metabarcoding. In the Gonokawa River System, the number of the present sites and environmental DNA concentrations of clade 1 were higher than those of clade 2. In the Ota River System, the number of the present sites and environmental DNA concentrations of clade 2 were higher than those of clade 1. In both river systems, clade 1 tended to be found at lower elevations and clade 2 at higher elevations.

Keywords : environmental DNA, freshwater fish, qMiFish, quantitative metabarcoding analysis, threatened species

1. はじめに

アカザ *Liobagrus reinii* は、体長 10cm 程度の小型のナマズ目魚類である⁽¹⁾。河川の上流域下部から中流域に生息しており、河床の礫の下や岩の隙間などに隠れるという特徴を持っている⁽²⁾。本種は、生息環境の悪化（例えば、河川改修や砂利採集にともなう河床の掘削や、水質の悪化等）により生息個体数や生息地が減少したとされており⁽³⁾、環境省版のレッドリストでは絶滅危惧Ⅱ類 (VU) として掲載されており⁽⁴⁾、多くの都道府県版レッドリスト・レッドデータブックにおいても絶滅危惧種として掲載されている。アカザは、従来 1 種のみであると考えられてきたが、近年、Nakagawa et al.⁽⁵⁾ によって別種と判断するのが妥当な 2 つのクレードが存在することが明らかになった。Nakagawa et al.⁽⁶⁾ は、クレード 1 が中四国から東北地方に、クレード 2 が近畿から九州地方に分布することを示しているものの、河川スケール、あるいはそれより詳細なスケール（例えばセグメント、リーチ、マイクロハビタット等）での両クレードの

生息環境の相違は明らかになっていない。

環境省や多くの都道府県でレッドリスト・レッドデータブックに掲載されているため「アカザ」が全国的に減少しているという事実は疑いようがないものの、それがクレード 1 なのか、クレード 2 なのか、あるいはその両方なのかは現状では不明である。さらに、その両クレードが、生息環境が重複するのか、何かしらの空間スケールで棲み分けているのかの情報がないため、現状では共存域における適切な保全策を講じることが不可能であるといえる。

そこで本研究では、環境 DNA 分析を用いたアカザ 2 クレードの調査方法の確立と、共存河川における生息環境の相違の解明を目的に、共存河川における環境 DNA 分析をおこない両クレードの河川内における分布の状況を明らかにし、両クレードの生息環境の相違を明らかにすることを目的とした。

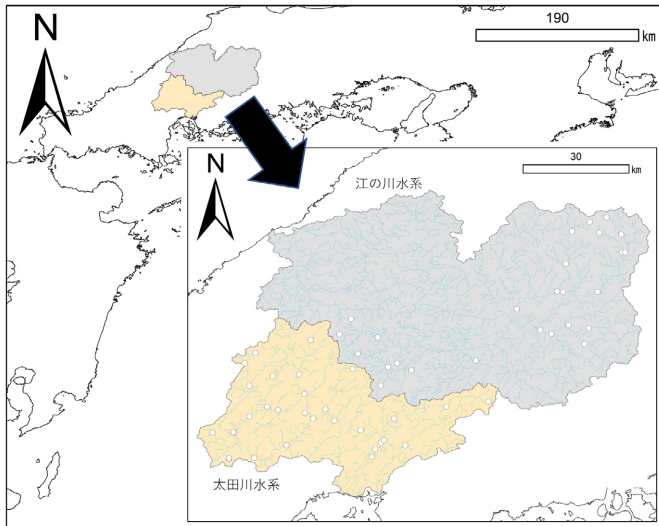


図1 江の川水系および太田川水系の調査地点
Fig. 1. Study sites in the Gonokawa and Ota River system.

2. 方法

2.1 採水調査 対象河川は、アカザ2クレードが共存することが知られている江の川水系および太田川水系 (Nakagawa et al. 2016) とした。調査は、2020年8月30日から9月1日の3日間でおこなった。江の川水系では26地点、太田川水系では31地点において (図1参照)、河川の表層水1Lを採水し、塩化ベンザルコニウム水溶液1mLを添加した後、冷却下で輸送し、GF/Fフィルターを用いて濾過をおこなった。GF/Fフィルターは冷凍保存し、後日DNAを抽出した。

2.2 環境DNA分析 環境DNA分析とは、水中に含まれる生物由来のDNA検出に基づいて、河川や湖沼、海域などの生物の分布や生物量を把握する手法であり、対象の捕獲や目視観察を必要とせず、現地では採水を行うのみで調査が完了するため、野外調査にかかる時間や労力を大幅に削減することができる⁽⁶⁾。本研究では、環境DNA分析の手法のうち、定量メタバーコーディング法 (qMiFish, Ushio et al.⁽⁷⁾) を用いた。本手法は、既知濃度に調整した複数の内部標準DNAをあらかじめ各試料に添加し、最終的に得られた各内部標準DNAのリード数と既知のDNAコピー数を用いて試料ごとに作成した検量線を用いてリード数をコピー数に変換することにより、従来のメタバーコーディング法では不可能だった魚種識別と魚のDNA濃度の推定を同時に行うことができる。

環境DNA定量メタバーコーディングのためのDNAライブラリ調整はUshio et al.⁽⁷⁾に従って実施した。得られたDNA試料に含まれる魚類の環境DNAを、魚類ユニバーサルプライマー (MiFish-UF/UR) を用いた2度のPCRにより網羅的に増幅した⁽⁸⁾。MiFishプライマーは、魚類の環境DNA

を網羅的に検出できるプライマーセットであり、アカザについては種の検出だけでなくDNA配列の違いからクレード1とクレード2を判別できることがわかっている。また、1stPCR時には各反応液にMiFish-UF/URで増幅可能な3種類の内部標準DNAを異なるDNAコピー数 (std. 1 = 5, std. 2 = 25, std. 3 = 50 copies/μL) で添加し、実試料中の魚類DNAと同時に増幅した。調整したDNAライブラリはiSeq 100 (Illumina) による超並列塩基配列決定に供した。得られた塩基配列データはMiFishパイプライン⁽⁸⁾を用いて解析し、データベースに登録された各種・各内部標準DNAの配列との相同性98.5%以上を基準としてリード数 (得られた塩基配列の数) の割振りを行なった。各種に割り当てられたリード数をDNAコピー数に変換するため、試料ごとに得られた各内部標準DNAのリード数と既知のDNAコピー数の関係から回帰直線 (検量線) を求めた。各種のリード数を試料固有の回帰直線の傾きで割ることにより、DNAコピー数 (以下、環境DNA濃度) に変換した。

3. 結果と考察

3.1 環境DNA分析 江の川水系および太田川水系における定量メタバーコーディングの結果を表1に示している。江

表1 江の川水系および太田川水系におけるアカザ2クレードの定量メタバーコーディングの結果。表中の数値はcopies/Lを示している

Table 1. Results of quantitative metabarcoding of two clades of *Liobagrus reinii* in the Gonokawa and Ota River systems. The numbers in the table indicate copies/L.

江の川	G21	G22	G23	G24	G25	G26	G27	G28	G29
クレード1	0	0	266	29	234	287	0	0	61
クレード2	97	33	0	0	0	200	130	0	0
江の川	G30	G31	G32	G33	G34	G35	G36	G37	G38
クレード1	379	0	654	935	0	0	0	108	35
クレード2	0	0	0	58	379	0	0	141	37
江の川	G39	G40	G41	G42	G43	G44	G45	G46	
クレード1	0	127	61	0	10	0	0	0	
クレード2	0	41	0	0	0	0	0	0	
太田川	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	O11	O12
クレード1	0	0	59	61	47	54	0	0	0
クレード2	0	0	0	0	63	102	279	0	0
太田川	O13	O14	O15	O16	O17	O18	O19	O20	O21
クレード1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
クレード2	51	181	142	67	199	0	529	0	0
太田川	O22	O23	O24	O25	O26	O27	O28	O29	O30
クレード1	0	0	0	0	0	0	0	28	0
クレード2	568	246	35	27	154	415	160	203	116
太田川	O31	O32	O33	O34					
クレード1	0	0	0	0					
クレード2	0	0	0	387					

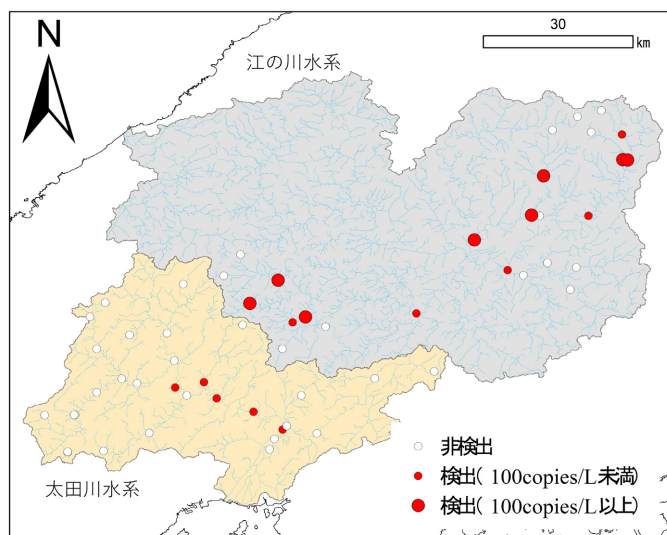


図 2 環境 DNA 分析によるアカザクレード 1 の検出状況
Fig. 2. Results of environmental DNA analysis of clade 1.

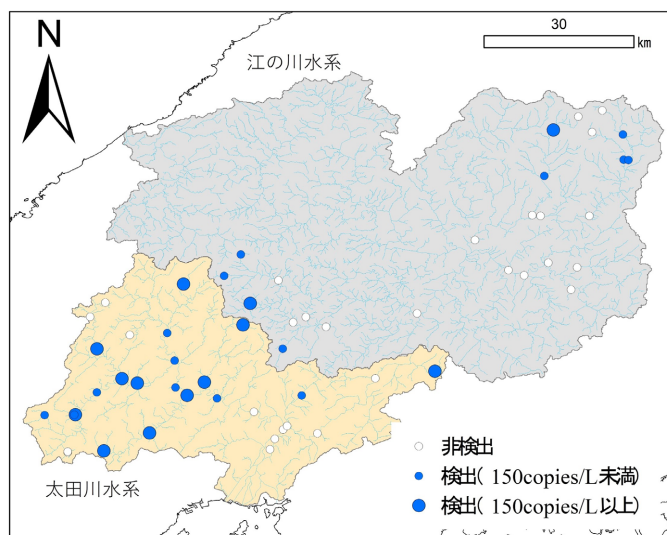


図 3 環境 DNA 分析によるアカザクレード 2 の検出状況
Fig. 3. Results of environmental DNA analysis of clade 2.

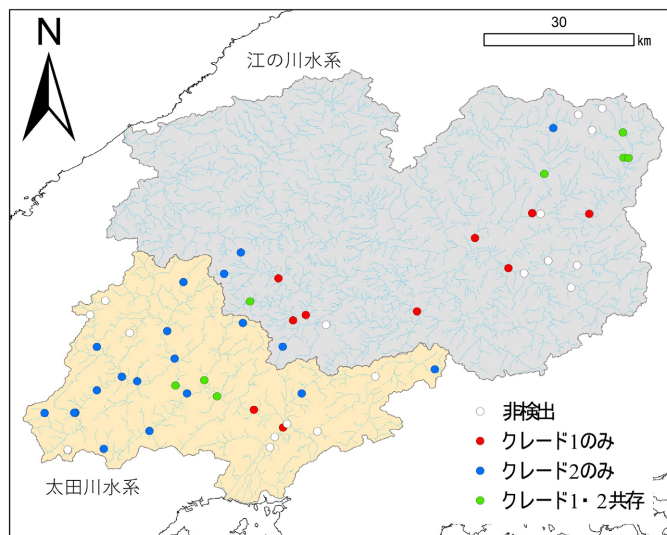


図 4 アカザ 2 クレードの検出状況の比較
Fig. 4. Comparison of the distribution of two clades of *Liobagrus reinii*.

の川水系では 26 地点中 17 地点でアカザいずれかの DNA が検出され、クレード 1 が検出されたのが 13 地点 (図 2 参照)、クレード 2 が検出されたのが 9 地点 (図 3 参照)、それらのうち 2 クレードの両方が検出されたのが 5 地点 (図 4 参照) だった。クレード 1 の検出濃度については、最大で 935copies/L、検出地点の最小で 10copies/L、検出地点の平均で 245copies/L だった。クレード 2 の検出濃度については、最大で 379copies/L、検出地点の最小で 33copies/L、検出地点の平均で 124copies/L だった。これらの結果から、三次盆地より上流の江の川水系においては、クレード 1 が生息地点、密度ともにクレード 2 よりも多いと推定された。また両クレードの検出地点はほぼ重複していないことが明らかにな

った。

太田川水系では 31 地点中 21 地点でアカザいずれかの DNA が検出され、クレード 1 が検出されたのが 5 地点 (図 2 参照)、クレード 2 が検出されたのが 19 地点 (図 3 参照)、それらのうち 2 クレードの両方が検出されたのが 3 地点だった (図 4 参照)。クレード 1 の検出濃度については、最大で 61copies/L、検出地点の最小で 28copies/L、検出地点の平均で 50copies/L だった。クレード 2 の検出濃度については、最大で 568copies/L、検出地点の最小で 27copies/L、検出地点の平均で 568copies/L だった。これらの結果から、太田川水系においては、クレード 2 が生息地点、密度ともにクレード 1 よりも多いと推定された。江の川同様、両クレードの検出地点の多くは重複していないことが明らかになった。

3.2 江の川水系における 2 クレードの分布パターン 江の川水系におけるアカザ 2 クレードの分布状況を図 4 に示している。クレード 1 のみが検出された地点が比較的下流に分布し、中流域に 2 クレードが検出された地点が分布し、上流域にクレード 2 のみが検出された地点が分布していた。ArcGIS (10.7.1) および数値標高モデル (解像度 50m) を用いて、各調査地点の標高を抽出したところ、クレード 1 が検出された地点の標高の中央値は 278m、クレード 2 が検出された地点の標高の中央値は 385m であった。不等分散である独立した 2 群データを比較可能なノンパラメトリック検定、Brunner Munzel 検定⁽⁹⁾ で両クレードが出現した地点の標高に違いがあるか検定したところ、クレード 1 が低標高に、クレード 2 が高標高に生息することが明らかになった (Brunner Munzel Test Statistic, 3.656; $p < 0.01$) (図 5 参照)。

3.3 太田川水系における 2 クレードの分布パターン 太田川

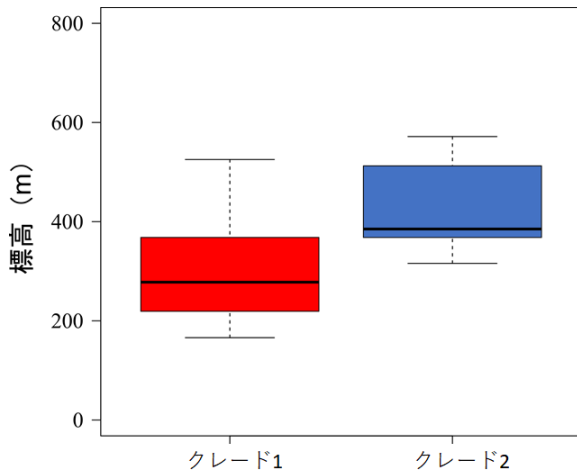


図5 江の川における2クレードの検出標高の比較

Fig. 5. Comparison of the distribution elevations of two clades in the Gonokawa River.

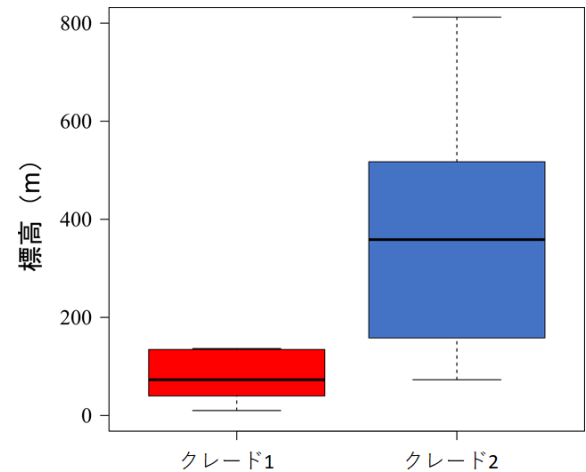


図6 太田川における2クレードの検出標高の比較

Fig. 6. Comparison of habitat elevations of two clades in the Ota River.

水系におけるアカザ2クレードの分布状況を図4に示している。江の川水系同様、クレード1のみが検出された地点が比較的下流に分布し、中流域に2クレードが検出された地点が分布し、上流域にクレード2のみが検出された地点が分布していた。ArcGIS (10.7.1) および数値標高モデル（解像度 50m）を用いて、各調査地点の標高を抽出したところ、クレード1が検出された地点の標高の中央値は 73m、クレード2が検出された地点の標高の中央値は 359m であり、江の川水系同様にクレード1が低標高に、クレード2が高標高に生息することが明らかになった（Brunner Munzel Test Statistic, 6.452; $p < 0.01$ ）（図6参照）。

3.4 まとめと今後の課題 本研究では、環境 DNA 分析を用いたアカザ2クレードの調査方法の確立と、共存河川における生息環境の相違の解明を目的に、アカザ2クレードが共存することが知られている江の川水系および太田川水系において、環境 DNA 分析（定量メタバーコーディング法）を用いることにより、両クレードの分布および生息環境の相違を明らかにすることを試みた。その結果、江の川水系においては、クレード1が生息地点、密度ともにクレード2よりも多いこと、太田川水系においてはクレード2が生息地点、密度ともにクレード1よりも多いことが明らかになり、また両河川ともに2クレードの検出地点は完全には重複しておらず、クレード1が低標高に、クレード2が高標高に生息する共通した傾向がみられた。

これらの結果から、アカザのクレード1およびクレード2は、両クレードが共存する水系においては、地理的に分布が偏っているわけではなく、同一河川に分布するものの、クレード1は下流寄りに、クレード2は上流寄りに分布する可能性が高いことが明らかになった。つまり、両クレードは、セグメントスケールで生息環境の相違がある可能性が高

い。本研究では、生息環境については、標高のみに着目してアカザ2クレードの生息環境を比較したが、標高が直接生息を左右する訳ではなく、標高によって差異が生じる水温や、河床勾配、河床材料の粒径などが両クレードの生息の影響を与えている可能性が高いと考えられる。よって今後は、本研究によって明らかになったクレード1のみが生息する地点、クレード2のみが生息する地点、そして両クレードが生息する地点において現地調査をおこなうことにより、実際の魚類の生息状況や、生息地の河川水温および河床材料粒径の違いを明らかにしていきたいと考えている。さらに、本研究は夏季のみのデータを用いているので、可能ならば複数の季節のサンプルを用いて、2種の分布パターンが季節によって変化するののかも明らかにしていきたい。

また、本研究における分析手法としての課題を以下に挙げておきたい。本研究では qMiFish 法を用いてアカザ2クレードの環境 DNA を量的に評価したが、qMiFish 法は本来魚類相を網羅的に検出するために利用する手法である。複数種の魚類の DNA を増幅する関係上、サンプル中の DNA 濃度が小さい種に関しては増幅されづらくなり、種の存在を見落としがちになってしまう。また、MiFish プライマーは複数の魚類を網羅的に検出できるように、プライマー部位の一部に塩基配列の違い（ミスマッチ）を許容しているため、アカザについても各クレードで1~2塩基程度のミスマッチがみられ、PCR による DNA 増幅の効率が若干落ちている可能性がある。これらのことから、本研究で得られたアカザの環境 DNA 濃度は、サンプル中に含まれている実際の環境 DNA 濃度よりも低く見積もられており、2水系におけるアカザ各クレードの存在や生物量を過小評価している可能性が考えられる。これを改善するために、今後はリアルタイム PCR 機器を用いた種特異的な検出系の開発が課題となる。種特異的な検出では qMiFish 法と異なりアカザのみを検

出対象とし、さらにそれぞれのクレードのみを検出できるようなプライマーセットを使用する。そのため、他魚種の DNA を増幅することがなく、かつプライマーと DNA 配列のミスマッチも含まれていないことから、アカザ各クレードの環境 DNA を高感度かつ正確に検出および定量できるようになると考えられる。

謝辞

本研究は、2020 年度研究スタートアップ支援制度により実施した。

文 献

- (1) 川那部浩哉・水野信彦・細谷和海 (編・監修) : 「山溪カラー名鑑 日本淡水魚」、山と溪谷社 (2005)
- (2) Katano, O., Nakamura, T., Yamamoto, S. and Abe, S.: “Summer daytime habitat and population density of the torrent catfish, *Liobagrus reinii*, in the Urano River”, Ichthyological Research 52, pp. 50-56 (2005)
- (3) 環境省 (編) : 「レッドデータブック 2014—日本の絶滅のおそれのある野生生物—4 汽水・淡水魚類」、株式会社ぎょうせい (2015)
- (4) 環境省 : 「環境省レッドリスト 2020 の公表について」 <https://www.env.go.jp/press/107905.html> (2020)
- (5) Nakagawa H., Seki S., Ishikawa T. and Watanabe K.: “Genetic population structure of the Japanese torrent catfish *Liobagrus reinii* (Amblycipitidae) inferred from mitochondrial cytochrome b variations”, Ichthyological Research 63, pp.333-346 (2016)
- (6) 高原 輝彦・山中 裕樹・源 利文・土居 秀幸・内井 喜美子 : 「環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～」、日本生態学会誌 66、pp.583-599 (2016)
- (7) Ushio, M., Murakami, H., Masuda, R., Sado, T., Miya, M., Sakurai, S., Yamanaka, H., Minamoto, T. and Kondoh M.: “Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing”, Metabarcoding and Metagenomics 2, pp.1-15 (2018)
- (8) Miya, M., Gotoh, O.R. and Sado, T.: “MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples”, Fisheries Science 86, pp.939-970(2020)
- (9) Brunner, E. and Munzel, U.: “The nonparametric Behrens-Fisher problem: asymptotic theory and a small-sample approximation”, Biometrical Journal 42, pp. 17-25 (2000)