

汲んだ海水でカレイの資源量がわかる！？ 一定量遺伝子増幅技術ー

増殖技術室 主任研究員 清水孝昭

はじめに

潮汐の変化や季節の移ろいを捉えながら、海に棲む魚たちは沿岸から沖合へ、個から群へ、卵から親へと生活史の場や姿を変え、広大な海の中を暮らし続けています。私たちの先人はこうした魚の動きを試行錯誤しながら理解し、時宜に応じた漁具、漁法を駆使して、魚ごとに、季節や場所ごとに、豊穡な海の幸を効率よく漁獲し、糧とするようになりました。海の中を直接のぞいて魚の多さを知ることから、魚群探知機を用いて目的の群れを捉えることまで、漁業は常に資源の量を把握する試みを続けています。魚の資源量を知ることは、それを保全し、持続可能な漁業を後世に伝える意味でも重要です。産卵場の情報、集まる繁殖群の大きさ、海域を抜けてやってくる加入群の大きさ、毎年の発生量、着底する稚魚の量、すべてを知ることでは、私たちが、「いつ」「どこで」「どれくらい」利用すれば、あるいは漁獲量を制限すれば、その資源は減ることなく維持されていくのか、また、どの場面で資源添加や増殖の手助けをおこなえば、資源を今以上増やすことができるのか、その答えを手にするできるようになります。数多の魚種で漁獲量の減少が言われて久しい今日にあって、こうした情報の取得、解析、予測は常に求められている命題といえるでしょう。

魚を測る、から水を測る、へ。資源量解析の新しい展開

私たち栽培資源研究所は、市場調査や調査船による卵稚仔調査、潜水調査など、さまざまな手法を駆使して水産資源の動向把握に努めてきました。調査用具や技術の改良は日進月歩ですが、資源量把握の基本は容積あたりの卵稚仔魚の数であったり、一定期間、一定の漁獲努力のもとでの水揚げ量であったり、漁獲物の年齢別割合であったりと、実際に個体から得られる情報を基本としています。また、その専門性故に、ある程度調査に習熟が必要であること

が求められ、誰でも簡便にできる手法とはいえないことも課題です。加えて、海は広大で魚種は多様、生活史も多岐にわたる中、広い範囲、長い季節を通じ、簡便な方法で魚の資源量を知る方法があったら・・・、その可能性の一つとして近年急速に技術開発が進んできたのが、環境水中から定量的にDNAを検出し、生物の資源量を把握する試みです。

環境水に漂う DNA を捉える

いま私たちが見ている海の中には、そこに棲む水生生物の粘液や老廃物などの分泌物や排泄物に付随して放出された、その生物自身のDNAのかけらが漂っています(図1)。こうした断片は徐々に分解され、なくなってしまうのですが、これを採取し、検出することができれば、その場所にどんな生きものがあるかが確かめられます。海水中のDNA断片を検出し、そこから魚の種類を同定する試みは、デンマークで成功しました。日本では、コイをもちいて水槽内で検出されるDNA量とコイの多さ、水温のDNA検出量への影響などを検証し、実際の野外調査において、コイの好適環境にはコイ由来のDNAがより多く検出される、という結果が得られています。バケツ一杯程度の海水を汲みさえすれば、その周辺にいる魚の資源量がわかる、それは新たな資源量推定の手法となることが期待されます。私たちは手はじめに、

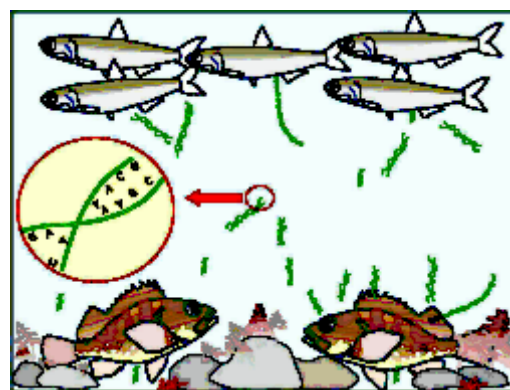


図1 海の中は生きものからはがれ落ちたDNAでいっぱい

沿岸漁業の主要魚種の一つであるマコガレイを対象として、この資源量推定技術の開発に取り組みました。

水の中に漂う DNA 断片をどうやって検出するのでしょうか。それには、対象生物の DNA を蛍光的に検出するために設計・合成された短い DNA 断片（プライマー、プローブ）と、高感度遺伝子増幅が可能なリアルタイム PCR（qPCR）技術を用います。まず、採取した海水をろ過します。フィルターに残った残滓には、さまざまな生物の DNA や、その他無機物、有機物が含まれています。ここから、キットを使って DNA だけを抽出します。多くの生物由来の DNA がひとまとめに抽出され、ここから件の手法でマコガレイの DNA のみを検出します。まず、温度を機械的に段階変化させる PCR 反応の初期過程で、蛍光ラベルを付与された 10 塩基（AGCT の 10 個の組み合わせ）程度の短いプローブが、目的の DNA 断片に結合します。その後、一对のプライマーがその前後を挟んで DNA を複製し、その過程でプローブから蛍光ラベルが剥がれて qPCR 機器のセンサーが捉えます。合成反応が 40 回程度機械的に繰り返されると、目的の DNA 断片だけが大量に増幅され、それに応じて放出された蛍光量の値も測定されます（図 2）。最初に含まれる DNA 量の多さに応じて、検出される蛍光量も多くなるという仕組みです。蛍光量から逆算することで DNA 量が求められ、魚の多さと排出される DNA 量の関係がわかれば、蛍光量から魚の資源量を推定することが可能となります。

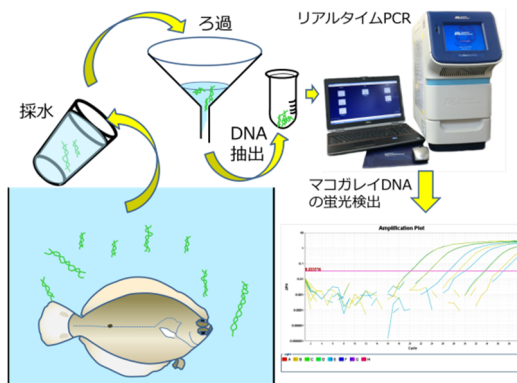


図 2 魚のいる水中から DNA を検出する流れ

マコガレイ資源量解析のための環境水 DNA 検出試験

技術開発の第 1 は、海水中に漂う数多の DNA 断片から正しくマコガレイ由来の DNA を検出することです。海水中で、長い DNA は徐々に短く断片化されていきますので、短くなった DNA でも検出可能なように、100 塩基前後の断片をターゲットにします。マコガレイの DNA については、web サイト DDBJ（DNA Data Bank of Japan）上に多くの配列情報が登録されています。それら配列を比較し、どの配列にも共通している 24 塩基の連続した箇所をプローブ配列として選択しました。このプローブ配列を挟んで目的の DNA 領域を増幅させることができる一对のプライマー配列を加え、プライマー・プローブ配列を設計しました。次に、設計した配列が正しくマコガレイのみを検出するかどうかを確認します。瀬戸内海で採集された他のカレイ・ヒラメ類を含めて遺伝子増幅を実施し、マコガレイ以外はほぼ増幅しないことを確認しました。最後に、DNA の量と検出される蛍光量との関係を知るため、DNA 濃度の希釈系列を使って qPCR を行い、核酸量と蛍光量の検量線を作成しました。これで検出の準備は整いました。

技術開発の第 2 は、実際に生きたマコガレイを使って飼育水から DNA を検出すること、そして魚の収容量と検出される DNA 量との関係を導くこと、です。まず、10–30g 程度に育てたマコガレイを使って、1–25 尾を 200L 水槽で流水飼育し、一定時間ごとに排水を 2L ずつ採取、ろ過後、DNA を検出しました（図 3）。次いで、50–70g のマコガレイ 1 尾を、



図 3 試験風景（収容密度を変えて飼育水中の DNA 量を測定する）

1-100t の水槽に收容し、同様に時間経過とともに検出される DNA 量を測定します (図 4)。また、魚がいなくなったあと、いつまで DNA が検出されるかを知るために、收容して 24 時間後に個体を取りだし、検出される DNA の量を測定しました。この結果、マコガレイが收容されて数時間後には、マコガレイ由来の DNA が充分量検出されること、魚を除去すると 24 時間以内におおむね検出限界以下まで DNA 量は減少すること (図 5)、100t あたり 1 尾 (魚体重 0.5g/トン) でも飼育水から目的 DNA が検出できること、などが確かめられ、收容密度 (単位容積あたり重量) と蛍光検出量の関係をもとに、DNA 量から資源量を求める関係式を得ることができました (図 6)。これにより、環境水から検出されるマコガレイ DNA は、そこにいるマコガレイの資源量に応じて検出されることが確かめられました。

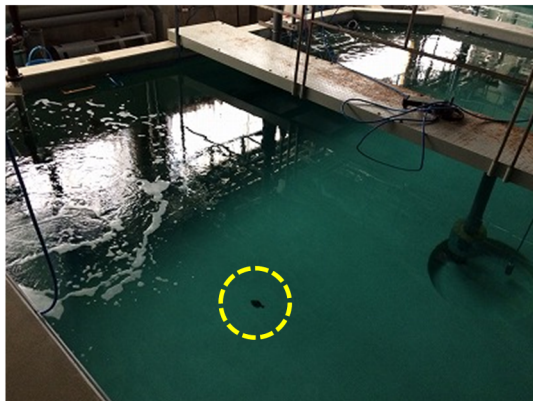


図 4 試験風景 (100 トンの水槽に 70g のマコガレイを 1 尾入れる (黄色破線の円内))

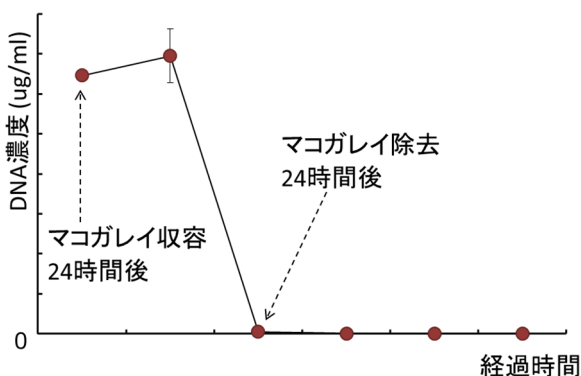


図 5 飼育水から検出される DNA 量の推移

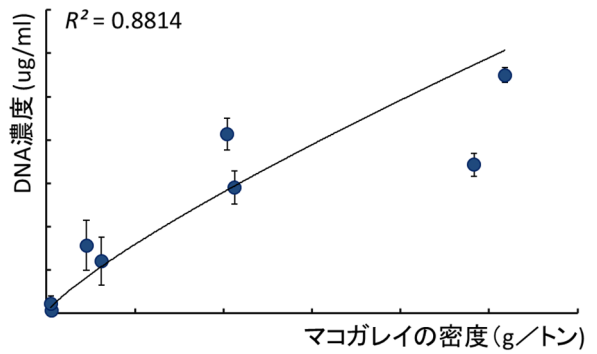


図 6 マコガレイ收容密度と DNA 量の関係。
魚の重量と検出される DNA 量には一定の関係が認められる

環境水 DNA 分析の今後

今回の技術開発により、環境水中の DNA 量はそこに棲む魚の資源量を比較的よくあらわす可能性が見えてきました。これを推し進めていけば、今後バケツ一杯の水で、そこにどれくらいマコガレイがいるかがわかるようになるでしょう。魚種ごとに、技術開発がいったん完成すれば、資源量推定に必要なのは目的海域の水だけ、作業はろ過、キットによる DNA 抽出、溶液の調合と機器の作動のみで、マニュアル通りにこなせば誰でもでき、特殊な知識を必要としない簡便なモニタリング手法になるといえます。また、水を汲みさえすればよいという調査の性質上、広範な地点で定期的実施することが可能であり、調査の効率が向上する可能性もあります。今回は水槽での検証実験でしたが、今後これを実際に野外で検証していく必要があります。環境水 DNA はどれくらいのエリアまでの資源量を示すのか、表層遊泳魚と底棲魚では、採水水深によって値が変わる可能性はないのか、など、確かめるべきことはまだまだ残っています。一方で、すでに私たちは燧灘で天然マコガレイの環境水 DNA 検出を実施中であり、稚魚の出現時期と沿岸海水からのマコガレイ DNA の検出が相応しているような結果が得られています。技術が確立され、普遍的な調査手法となるために、今後も実証研究を続けていく予定です。