

## 環境DNA分析手法を用いたヨシ帯における魚類の産卵状況の推定

○パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	森元愛和
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	渡部健
パシフィックコンサルタンツ株式会社	正会員	上月佐葉子
パシフィックコンサルタンツ株式会社		松井理恵
パシフィックコンサルタンツ株式会社		岡田泰明
神戸大学大学院人間発達環境学研究科		佐々木大介
神戸大学大学院人間発達環境学研究科		源利文

### 1. はじめに

琵琶湖岸のヨシ帯は、コイ・フナ類をはじめとする様々な魚類の産卵場や稚魚の生育場として重要な環境である。滋賀県では、ヨシ群落を保全するために平成4年7月に「滋賀県琵琶湖のヨシ群落の保全に関する条例（通称：ヨシ条例）」が施行され、良好なヨシ群落が現存している場所においてはその状態を維持し、失われた場所においては再生させるために、積極的に維持管理や植栽による造成を行うなどヨシ群落の維持再生が図られている。

一般に自然再生の計画が対象とする生態系は複雑で、その維持機構は科学的に十分に解明されていない部分があるため、事業の結果に関する予測には不確実性が伴う。そのため自然再生の計画を立案する際には、仮説（事業目標の設定）が必要とされ、事業を実施した後は、モニタリング調査により事業効果（事業目標の達成状況）を把握し、新たに明らかになった事実に応じて管理手法を再検討し、必要な場合は修正する「順応的管理」の適用が不可欠である。

滋賀県の野洲川の下流域は、北流と南流に分かれていたが、治水事業により昭和54年に下流域を1本にまとめた放水路が完成し、現在の流れになっている。改修された野洲川河口部は矢板護岸となっていたため、水陸移行帯の連続性を回復し魚類等の産卵・生息環境を再生するため、国土交通省によりヨシ帯再生事業が実施されている。現在ヨシ帯の再生箇所では、コイ・フナ類の産卵・生育の場としての機能評価のため「産卵状況調査」や「稚魚生息状況調査」を目視観察や捕獲手法によるモニタリング調査が実施されている。このヨシ帯再生事業におけるモニタリング調査では、ヨシ群落の植生調査や魚類の生息状況調査について「住民と連携した調査」が実施されているが、魚類の繁殖状況を把握する調査については、現行の方法では卵や稚魚の探索・識別に専門的な技術が必要になるため、データ精度確保の観点から市民参加型調査への移行は、困難と考えられる。

本研究では、産卵期に魚類の環境DNAの濃度がその前後よりも増加するという報告や、放精によりミトコンドリアDNA濃度に対する核DNA濃度の比が増加するという知見<sup>2)</sup>をふまえ、再生したヨシ帯がコイ・フナ類の産卵の場として機能しているかどうかを把握する方法と

して、環境DNA分析の利用を検討した。本研究では、再生ヨシ帯がコイ・フナ類の産卵や稚魚の生育の場として利用されている時期には、コイ・フナ類の環境DNAの濃度が特異的に高くなる傾向を示すことを作業仮説として、検証調査を行った。

### 2. 調査方法

採水箇所は、野洲川河口に整備された右岸側再生ヨシ帯で5箇所（St. 1～5：ヨシ帯）及び右岸上流側でコンクリート護岸の露出したエリアの2箇所（St. 6～7：ヨシ帯外）とした（図1）。採水は、St. 1～5では2019年3月から6月にかけて9回と、産卵終了後の8月に1回の合計10回。St. 6～7では4月から6月にかけて5回と、8月に1回の合計6回実施した。

各箇所でポリエチレンボトルに1L採水し、市販の塩化ベンザルコニウム溶液（オスバン）1mLを添加して冷蔵便にて実験室に搬送した。サンプルは採水後36時間以内にガラス繊維ろ紙（Whatman, グレードGF/F）でろ過し、ろ紙は分析時まで冷凍庫で-25℃以下で保管した。

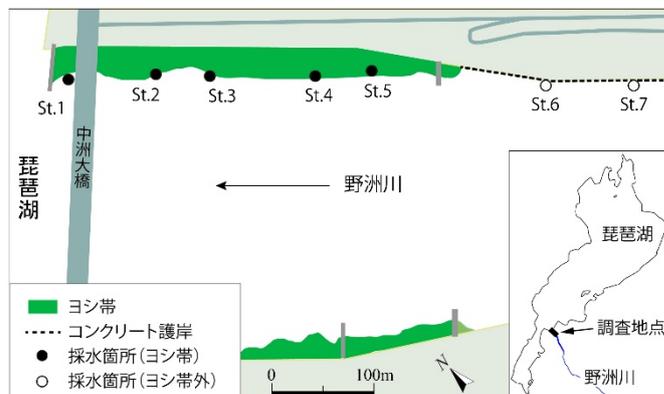


図1 調査地（野洲川河口右岸）のヨシ帯と採水箇所

### 3. 分析方法

コイ及びフナ属魚種の環境DNAを定量PCR法により分析した。DNA試料の抽出、精製、PCR分析の手法は、「環境DNA調査・実験マニュアル」<sup>3)</sup>に準拠して行った。コイの環境DNAを検出するプライマー・プローブは、核DNAのITS1領域およびミトコンドリアDNAのCytB領域を対象とした既存のものを用いた<sup>4),5)</sup>。フナ属の環境DNA検出は、ミトコンドリアDNAのCytB領域を対象としたプライマー・プローブ（源 未発表）を用いた。

#### 4. 結果

コイ及びフナ属の環境DNA濃度の測定結果を図2A-Dに示す。ヨシ帯におけるコイのミトコンドリアDNA濃度は、4月24日の採水日に一つのピークをもつ増減傾向がみられた。核DNA濃度も、概ね同様の傾向を示した。ミトコンドリアDNA濃度に対する核DNA濃度の比も概ね同様で4月中～下旬にピークがみられた。

フナ属のミトコンドリアDNA濃度は5月11日に最大値となり、次いで一か月前の4月11日の濃度が高かった。

ヨシ帯外でも採水を行った4月24日以降について、ヨシ帯とヨシ帯外の環境DNA濃度を比較すると、コイはヨシ帯外でも同程度に高濃度のDNAが検出された。一方、フナ属ではヨシ帯内でのみ高濃度なDNAが検出された。

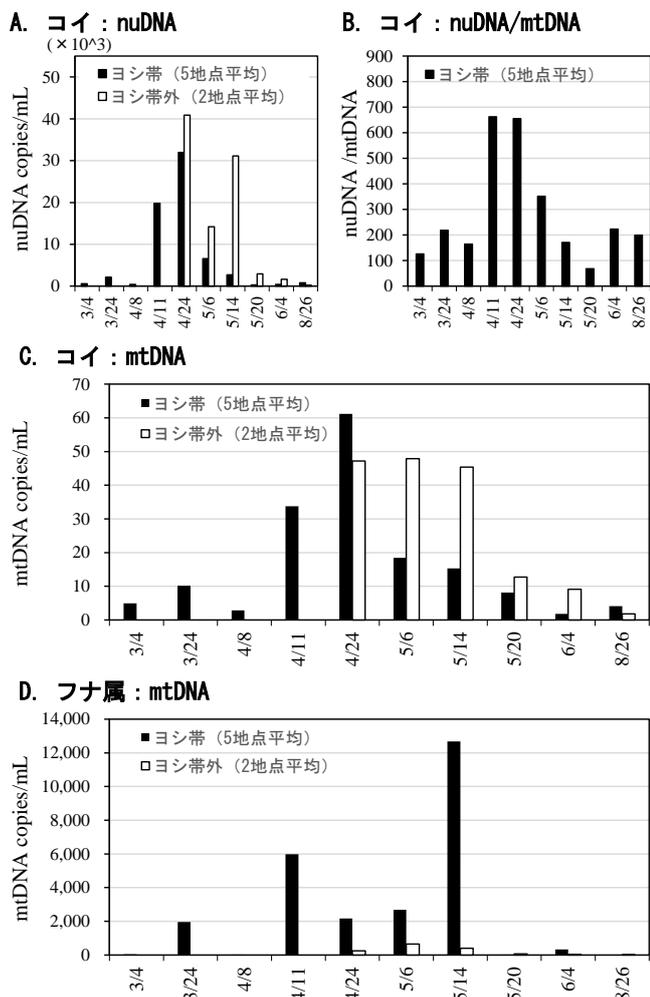


図2 コイ及びフナ属の環境DNA濃度測定結果。A: コイの核DNA (nuDNA)、B: コイの核DNA濃度比 (nuDNA/mtDNA)、C: コイのミトコンドリアDNA (mtDNA)、D: フナ属の mtDNA。ヨシ帯外の調査は4月24日以降のみに実施されていることに注意。

#### 5. 考察

再生ヨシ帯では、コイ及びフナ属のいずれでも、琵琶湖沿岸のコイ・フナ類の繁殖期とされる4月～6月<sup>6)</sup>に環境DNAの濃度に顕著な増加がみられた。コイでは、ミトコンドリアDNAの増加に付随してコイの産卵・放精

行動の活性度が反映していると考えられる核DNA濃度比の明瞭な増加が見られたことから、環境DNA濃度の変動を観測することにより繁殖活性の季節変化をとらえることができたと考えられる。

フナ属では、コイの環境DNA濃度のピークを挟む前後の時期に濃度の高い時期がみられたが、これは、フナ類が、繁殖期間中に水温や水位、降雨等の影響を受けながら複数回産卵を行う状況を反映している可能性がある。また、繁殖期間にヨシ帯ではフナ属の環境DNAの著しい増加がみられたが、上流側の植生のないヨシ帯外のエリアの環境DNAの濃度は低く、大きな変動はみられなかった。これは、繁殖期にフナ属が再生ヨシ帯に蟄集していたことを示唆し、再生ヨシ帯がフナ属の産卵の場として利用されていることを強く示唆する。一方、コイについては、繁殖期間にヨシ帯外でも環境DNA濃度が高い傾向が見られたことから、より上流部の産卵活動の影響を受けた可能性がある。

本研究により、環境DNA分析手法を用いて、コイ・フナ類の産卵時期や場所を推定できる可能性が示された。環境DNA分析により、コイ・フナ類の産卵状況を評価することが可能になれば、現場での作業は採水のみであるため市民参加型調査の一環として実施することも可能になると考えられる。ただし、産卵数等の繁殖状況を定量的に評価するためには、現行調査による着卵数等のデータと環境DNA濃度の関係を解析する必要がある、今後の課題である。

#### 《参考文献》

- 1) 滋賀県「ヨシ群落保全基本計画」(平成23年2月23日)
- 2) Bylemans, J., Furlan, E. M., Hardy, C. M., McGuffie, P., Lintermans, M., & Gleeson, D. M. (2017). An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 646-655.
- 3) (一社)環境DNA学会編. 環境DNA調査・実験マニュアル ver. 2.1. 2019.
- 4) Minamoto, T., Uchii, K., Takahara, T., Kitayoshi, T., Tsuji, S., Yamanaka, H., & Doi, H. (2017). Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular Ecology Resources*, 17(2), 324-333.
- 5) Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H., Kawabata Z. (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLOS ONE*, 7 (4), e35868.
- 6) 中島常夫・里口保文(編). 2007. 琵琶湖のコイ・フナ物語 東アジアの中の湖と人. 滋賀県立琵琶湖博物館, 草津市.