

早田川における環境 DNA を用いたサクラマス(ヤマメ)の行動特性把握

株式会社 復建技術コンサルタント	正会員	○松野 匠
株式会社 復建技術コンサルタント	正会員	佐藤 高広
株式会社 日本海洋生物研究所		平岡 礼鳥
山形大学 農学部		渡邊 一哉

1. はじめに

サクラマスは、晩秋に産卵のため河川を遡上するものの、本種が遡上する河川には、頭首工や砂防堰堤等の治水・利水を目的とした河川横断構造物が多く存在し、これらは遡上障害の要因とされている。

早田川は山形県鶴岡市を流れる赤川水系梵字川の支流であり、サクラマスが遡上する川として知られている。2010年、遡上障害への対策として第一砂防堰堤がスリット化された。魚類をはじめとする生物の移動障害の改善が期待されているものの、砂防堰堤のスリット化後の環境動態を把握した事例は少ない。

そこで本研究では、サクラマス(ヤマメ)の出現状況を環境 DNA により把握するため、その検出技術を確立すること、早田川において環境 DNA を用いてサクラマス(ヤマメ)の河川利用の実態を把握することを目的とした。

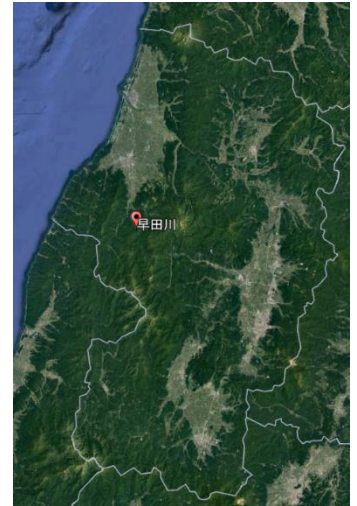


図1 早田川の位置

参照：Google Earth

2. 方法

①環境DNA分析技術の確立

NCBI が提供する遺伝子データベースから対象種および比較種の DNA 配列を用いて、Clustal X (Thompson et al. 1994) によるアライメントを行った。アライメント後、対象種の DNA のみを特異的に増幅する領域を対象にプライマーセットとプローブを設計した。設計したプライマーセットとプローブを用いてリアルタイム PCR による解析を行い、対象種の DNA のみを特異的に増幅可能か検証した。本調査における対象種はサクラマス(ヤマメ)：*Oncorhynchus masou masou*、比較種はニジマス：*Oncorhynchus mykiss*、ヤマトイワナ：*Salvelinus leucomaenis japonicus*、ニッコウイワナ：*Salvelinus leucomaenis pluvius*、サケ：*Oncorhynchus keta* である。各種の標本を集め、一部の組織を分取し凍結乾燥した後、細胞溶解液(株式会社ニッポンジーン)に溶解し、MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio) を用いて粉砕サンプルから DNA を抽出した。DNA の精製は、MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio) を使用した。その後、さらに Agencourt AMPure XP (ベックマン・コールター株式会社) を使用して DNA の精製を行った。DNA 溶液の定量測定は Synergy H1 (Bio Tek) と QuantiFluor dsDNA System (Promega) を用いた。抽出した DNA および陰性対照サンプルを用いて、リアルタイム PCR による種特異的解析を行った。本解析では設計した 4 組のプライマーセットとプローブを使用した。

②環境DNAによるサクラマスの河川利用の実態把握

梵字川合流点からヤマメ稚魚放流場所までの区間に 5 か所の採水地点(下流から①梵字川合流点、②スリットダム下流、③農業用取水堰直下流、④第二砂防堰堤上流、⑤ヤマメ放流地点)を設定し、6月から12月に毎月採水を行った。採水サンプルは孔径 0.7 μ m の GF/F ガラスフィルター(Whatman 社)により 2L をろ過した。フィルターはアルミホイルで包み、DNA 抽出まで冷凍にて保存した。DNA 抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen 社) を用いて Miya et al., 2015 に従い実施した。なお、各工程でブランクを作成し、コンタミネーションを確認した。リアルタイム PCR は進化速度が速く特異性の高いプライマー Ver.4 を用いた。

キーワード：サクラマス、砂防堰堤、スリットダム、環境 DNA、リアルタイム PCR

連絡先：〒980-0012 宮城県仙台市青葉区錦町 1-7-25 (株)復建技術コンサルタント TEL:022-217-2026

3. 結果

①環境DNA分析技術の確立

作成したプライマーセットおよびプローブはミトコンドリアDNAのチトクロームb領域およびD-loop領域である。設計したプライマーセットおよびプローブを用いて特異性を検証したところ、すべてのプライマーセットおよびプローブでも対象種サクラマス(ヤマメ)だけではなく、比較種ニジマスも擬陽性になった。しかし、今回は個体から抽出したDNAを使用した実験系で検証を行っており、いずれの結果も陽性・擬陽性サンプル間で蛍光反応が検出され始めるサイクル数(以下、サイクル数)に10サイクル以上の差が確認できた。このような実験条件でサイクル数に明確な差が見られる種特異的プライマー・プローブの場合、あらかじめ対象種DNAのサイクル数を確認しておくことで、サイクル数の差から陽性か擬陽性かを判別可能である。環境中から抽出したDNA(環境DNA)は、個体から抽出したDNAに比べ、極めて濃度が薄いため、擬陽性由来の環境DNAは種特異的解析で検出できないと考えられる。一方で、比較種を煮出した液体をサンプルにするなど極端な場合や検証していない種の遺伝子配列が偶然一致する場合など擬陽性検出のリスクは排除できない。

②環境DNAによるサクラマスの河川利用の実態把握

採水月ごとのサクラマス DNA 濃度は図2に示すとおりである。令和3年は9月に早田川①および早田川②で、令和元年は10月に早田川①でDNA濃度が大きくなった。産卵期に遡上するサクラマスが増加したことによるものだと考えられる。早田川③の農業用取水堰はサクラマスが遡上できない高さであるため、上流側ではDNA濃度が小さかったと考えられる。

また、令和3年は7月に早田川⑤でDNA濃度が大きくなった。早田川⑤ではヤマメの放流を行っているため、放流魚のDNAを検出したと考えられる。

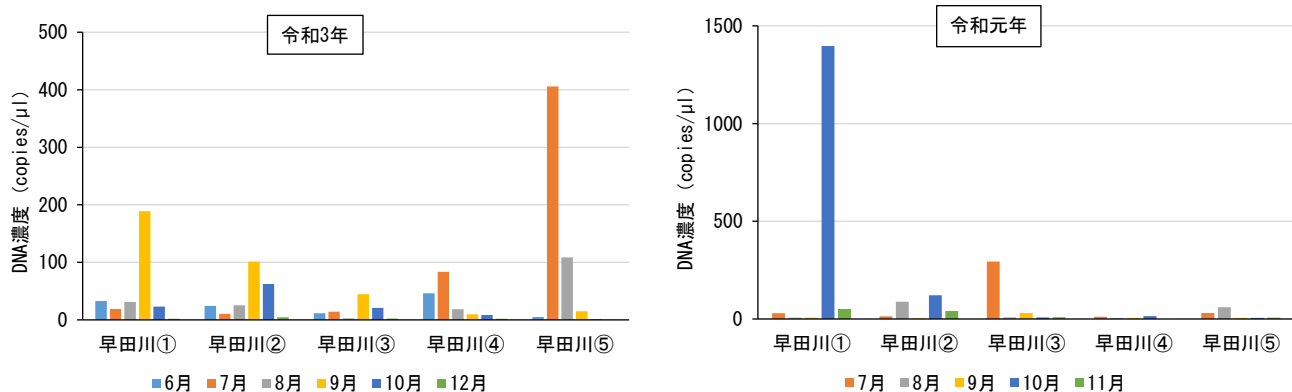


図2 採水月ごとのサクラマス DNA 濃度 (左: 令和3年、右: 令和元年)

4. 考察

本研究で確立した技術を用いて、早田川におけるサクラマスの環境DNAを対象に分析を実施した結果、測点間および季節間で一部検出結果に差がみられ、サクラマスの遡上状況をとらえることができた。

今後の課題として、DNAの定量精度向上やより広い区間での検証を実施する必要がある。本研究では環境DNA結果の定量にあたり、検量線として段階的な濃度に設定したサクラマスのDNAを用いてリアルタイムPCRを実施し、Ct値からサンプル中のDNA濃度への変換を行った。今後は定量の精度を上げるために、サンプルごとに検量線を作成する必要があると考えられる。

また、調査地点を赤川本川まで拡大して、本研究で確立した技術が適用できるかどうかについての検証を実施する。

謝辞

本研究は、山形大学 農学部 河川環境学研究室の協力のもと実施しました。この場を借りて感謝申し上げます。