

環境 DNA 分析を用いたサクラマスとニッコウイワナの個体数推定手法の開発

山形大学農学部	正会員	○西山正晃, 渡部徹, 渡邊一哉
山形大学大学院農学研究科	非会員	菊田将太郎
山形大学農学部	非会員	小笠原舞美

1. はじめに

環境 DNA (environmental DNA, eDNA) は、水中の生物量や希少種の分布を評価できる手法として注目を集めている¹⁾。近年の eDNA 分析技術の発展により、様々な環境に生息する生物種や生物量の把握が可能となり、外来性生物の検知や絶滅危惧種の保護など、その利用用途は多岐にわたっている^{2,3)}。

山形県の県魚に指定されているサクラマス (*Oncorhynchus masou masou*) は、水産資源としてだけでなく、最上川・赤川流域の祭事の際の供物となるなど、文化的資源としても重要な種である。しかしながら、山形県内のサクラマスの漁獲量は 1994 年の 30 t をピークに減少し、近年 (2015 年から 2019 年) は 5 t/年で推移している。県内の内水面漁業協同組合は、赤川水系のサクラマスの資源保護を目的として、種苗放流を毎年約 50 万匹行っており、一定数の資源回復が認められているものの、以前ほどの漁獲量までは回復していない。その理由として、サクラマスの県内河川における生息場の評価が十分でないことがあげられる。本研究では、水産上重要資源であるサクラマスとニッコウイワナ (*Salvelinus leucomaenis pluvius*) を対象に、eDNA を用いて両魚類の出現状況を把握するための分析手法の開発を試みた。

2. 実験方法

2.1 個体数把握のためのプライマーの設計

両魚種に特異的な遺伝子を検出するためのプライマーは、ミトコンドリア DNA の Cytochrome b 領域を対象として設計した。NCBI のデータベースからサクラマスとニッコウイワナの Cytochrome b の全長配列情報 (1,141bp) を取得した。併せて、両魚類の近縁種 (サクラマス: *O. keta*, *O. mykiss*; ニッコウイワナ: *S. leucomaenis leucomaenis*, *S. leucomaenis japonicus*, *S. leucomaenis imbrius*, *S. curilus*) の配列も同様に取得した。配列情報のアライメント解析の後、標的魚類の特異的なプライマーとプローブは Primer3 を用いて設計し、Primer-BLAST でプライマーの特異性を確認した。プライマーの検証のために、標的魚類の組織から抽出した DNA を使用した PCR によって増幅を確認した。増幅産物の配列はシーケンス解析で取得し、BLAST 検索によって目的魚類の標的遺伝子の領域が増幅できているか確認した。

2.2 検証実験

2.2.1 試料採取と DNA 抽出

開発した定量 PCR 反応系の検証は、2021 年 7 月 8 日にサクラマスとニッコウイワナの稚魚を放流する際の試料を用いて行った。試料は、両魚類を輸送時に使用したコンテナ水、両魚類の飼育池、放流先である赤川水系早田川で採水した。サンプリングと DNA 抽出は、環境 DNA 調査・実験マニュアル (ver.2.2) を参考にした⁴⁾。抽出した DNA 濃度は、Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) を使用して測定した。

2.2.2 定量 PCR

2.2.1 で抽出した DNA を使用して、定量 PCR を行った。定量 PCR の反応には、TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、3.05 μL の Nuclease Free water (QIAGEN)、10.0 μL の 2×Environmental Master Mix 2.0、0.1 μL の AmpErase Uracil N-Glycosylase (Thermo Fisher Scientific)、各 1.8 μL のプライマー (10 mM)、0.25 μL のプローブ (10 mM) 3.0 μL の DNA を加え、全量を 20 μL とした。

キーワード 環境 DNA, 河川管理, サクラマス, ニッコウイワナ, 定量 PCR

連絡先 〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23, Tel.0235-28-2894, e-mail:m-nishiyama@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

PCRの反応条件は、50°C（2分）、95°C（10分）の反応の後、95°C（10秒）と55°C（1分）の反応を50サイクル行った。陽性区には両魚種から抽出したDNAを、陰性区にはNuclease Free waterを使用した。試料およびコントロールからの遺伝子定量は $\Delta\Delta Ct$ 法に則り、それぞれ2回の繰り返し測定を行った。

3. 結果と考察

NCBIのデータベース上で両魚種のCytochrome bの配列情報を探索した結果、サクラマスとその近縁種として、*O. masou masou*, *O. keta*, *O. mykiss*の全長配列情報をそれぞれ10個、2個、10個の合計22個取得した。ニッコウイワナとその近縁種のCytochrome bの全長配列情報は少なく、合計8個取得した。これらの情報をもとに2.1の手順で、サクラマスとニッコウイワナを検出するプライマーとプローブを設計した（表1）。

表2に、各試料から抽出したDNA濃度とeDNA量を示す。最も高いDNA濃度とeDNAが検出されたのはコンテナ水であり、ついで飼育池、早田川の順で低くなった。この結果は、コンテナ内と飼育池での魚類の飼育密度がそれぞれ約5,000尾/m³と約15尾/m³であり、約300倍の飼育密度比から想定した通りであった。コンテナ中のニッコウイワナのeDNA量は飼育池と比較して197倍高く、飼育密度が反映されているものの、サクラマスでは25倍にすぎなかった。2.1で両魚種の細胞組織から抽出した単位重量あたりのeDNAの濃度と検出量は違いがなかったことから、体表面から剥離される鱗や分泌物などの量が異なるのかもしれない。放流先である早田川のeDNAを測定したところ、サクラマスとニッコウイワナでそれぞれ $1.9\sim 4.4\times 10^3$ copies/Lと $2.0\sim 2.7\times 10^4$ copies/Lであった。これまでの早田川での巡検調査では、いずれの調査年もサクラマスの個体数はニッコウイワナよりも多かった。ニッコウイワナの方がeDNAに関連した物質を放出しやすい可能性があり、ラボスケールでの両個体の実験的検証が必要である。今後は、開発した定量PCR系を用いて早田川を含めた赤川流域でモニタリングを実施し、両魚種の季節による移動生態や、砂防ダム等の河川横断構造物の構築による生息場の変化などの評価に使用する予定である。

表1 本研究で設計したサクラマスとニッコウイワナのプライマー・プローブセット

種名	プライマーとプローブ名	Primer (5'-3')	産物長 (bp)
<i>O. masou masou</i>	masou-cytb-574F	GCTGCAATCCTCCACCTTCT	227
	masou-cytb-800R	TGGGGTGGGGTAACTAGAGG	
	masou-cytb-756P	CCCCGACAATTTTACACCCGCCA	
<i>S. leucomaenis pluvius</i>	pluvius-cytb-555F	CCCATTCGTAATTGCAGCCG	226
	pluvius-cytb-780R	GTTGGCTGGCGTGAAATTGT	
	pluvius-cytb-734P	TCGCACCTAACCTCCTGGGAGA	

表2 各試料におけるサクラマスとニッコウイワナのDNA濃度とeDNA量 *N.D.:Not Detection

サンプリング地点	通水量 (L)	DNA濃度 (ng/ μ L)	サクラマスのeDNA (copies/L)	ニッコウイワナのeDNA (copies/L)
コンテナ水①	1	206.9	1.6×10^7	7.7×10^7
コンテナ水②	1	132	4.4×10^6	3.7×10^7
飼育池①	1	31.2	3.6×10^5	2.7×10^5
飼育池②	1	31	4.7×10^5	3.0×10^5
早田川①	1	15.6	4.4×10^3	2.0×10^3
早田川②	1	27.6	1.9×10^3	2.7×10^3
Blank (採水前)	1	0.7	N.D*	N.D
Blank (採水後)	1	0.8	N.D	N.D

参考文献

- (1) Taberlet, et al., Mol. Ecol. 21, 1789-1793, 2012. (2) Hänfling, et al., Mol. Ecol., 25, 3101-3119, 2016. (3) Takahara, et al., PLoS One, 7, 3-10, 2012. (4) 令和2年度 国際漁業資源の現況, 63-69, 2021. (4) 環境DNA調査・実験マニュアル Ver. 2.2 (2020年3月発行)