高津川における環境 DNA を用いたアユ降下・産卵モニタリング

山口大学大学院　創成科学研究科　学生会員　○河野誉仁
山口大学大学院　創成科学研究科　正会員　乾隆帝
山口大学大学院　創成科学研究科　正会員　赤松良久
山口大学大学院　創成科学研究科　正会員　後藤益慈

1. 緒論

アユは河川における漁業対象として最も重要な種の一つであるが [1]，近年その資源量の減少が懸念されている．アユ資源の減少要因を解明するためには，生活史の各ステージに着目し，アユ資源量の変化を把握することが必要である．近年，産卵場の悪化がアユ資源量の減少要因となっていることや，いくつかの西日本の河川においてはアユ仔魚の海域への流下時期と回帰率の関係性が示唆されているため [2]，アユの降下・産卵時期のアユの動態を把握することは急務であるといえる．

魚類などの資源量を定量化するのは非常に困難であり，これまで行われてきた採集や目視などの方法では労力やコスト，時間的な面で不可能な場合が多かったため，近年は，環境 DNA 分析技術による魚類の定量化が注目されている．これは水中に含まれる DNA を分析することで，対象生物の在・不在や相対的に生物量を定量化することが可能な最新の技術である．

本研究では，島根県の一級河川である高津川を対象に，環境 DNA 分析を用いたアユの降下・産卵モニタリングを実施し，産卵期におけるアユの動態を明らかにすることを試みた．

2. 方法

(1) 対象河川および現地観測概要

高津川は，島根県西部の日本海側に位置し，日本海に注ぐ，幹線流路延長 81km，流域面積 1090km^2 の一級河川である．高津川の特徴として一級河川で唯一，本流においてダムが無いこと，また，国管理区間には，最上流付近に位置する固定堰を除き，目立った横断構造物がないことが特徴として挙げられ，天然アユが遡上する川で，釣り人などに人気のある河川である．

図-1 に対象河川の調査地点を示す．調査地点は図-1 に示す河口から 1.2km～10.6km の区間に 9 地点を設定し，2017/10/1，10/13，10/18，10/28，11/7，11/13，11/21，12/1 および 12/13 の計 9 回行った．なお，St.1 については 11/13 以降に採水調査を行った．採水は昼間と日没 3 時間後の夜間に行い，夜間採水については 10/1，11/7，11/13，11/21，12/1 に行った．また，昼間は瀬の上流側，夜間は瀬の上流側と下流側の 2 箇所で，表層水 1L を採集し，クーラーボックスに入れ，冷却して持ち帰った．なお，サンプルには DNA の分解を阻害するために塩化ベンザルコニウム溶液を 1L あたり 1mL 入れた [3]．また，輸送時の DNA の混入を確認するために，輸送時のクーラーボックスの中に，採水ボトルに脱イオン水を入れたクーラーブランクを入れた．

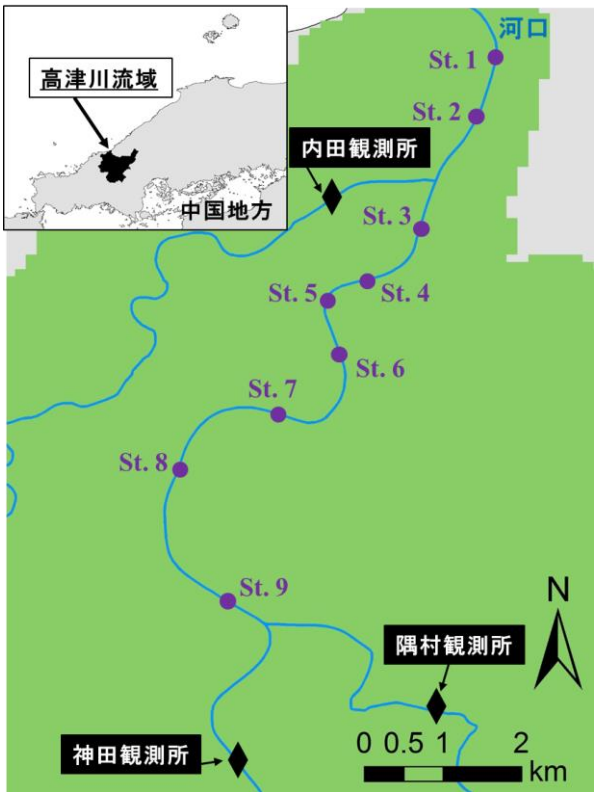

図-1　調査地点図

キーワード　アユ産卵，環境 DNA，高津川
連絡先　〒755-8611　山口県宇部市常盤台 2-16-1　山口大学工学部社会建設工学科　TEL0836-85-8319

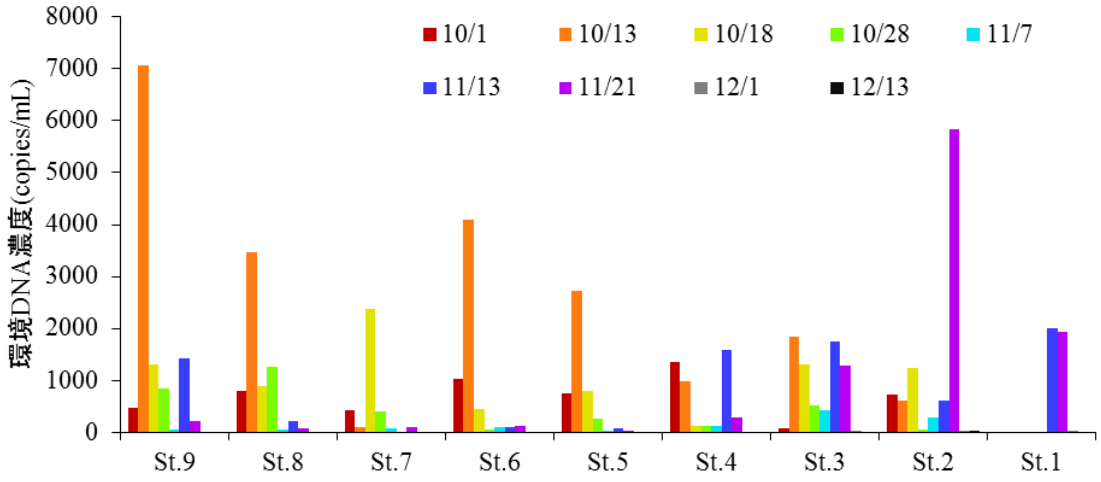

図-2　昼間における環境 DNA 濃度の地点別時系列変化

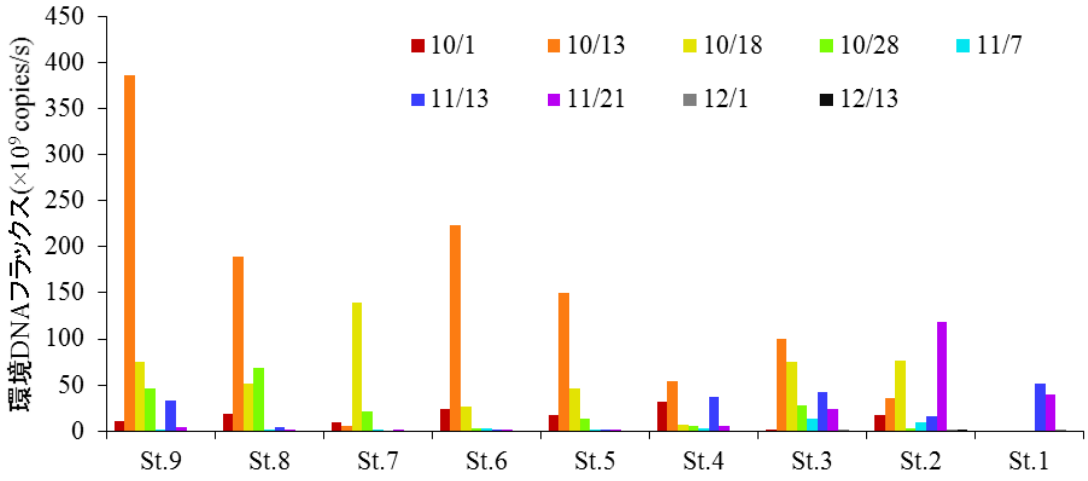

図-3　昼間における環境 DNA フラックスの地点別時系列変化

なお，採水に用いるボトルは，次亜塩素酸ナトリウム漂白剤（市販製品を 10 倍希釈したもの）で洗浄し，DNA を含まない脱イオン水によって洗浄した．

(2) 分析手法

サンプル水は，冷却して持ち帰った後，GF/F ガラスフィルター(pore size c. 0.7 μm; GE Healthcare, Little Chalfont)で濾過し，アルミホイルで包んで−20℃で凍結保存した．クーラーブランクは，濾過時の DNA の混入を確認するためのブランクとともに，ネガティブコントロールとして用いた．フィルターからの抽出は，サリベットチューブ(Sarstedt, Nümbrecht, Germany)および DNA 抽出キット(DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen)を用いて DNA 溶液を抽出した．抽出した DNA のサンプルは，quantitative PCR (qPCR) を用い，PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham)によって定量 PCR をおこなった．定量 PCR をおこなう際，アユに特異的なプライマーおよび TaqMan 蛍光プローブについては，Yamanaka&Minamoto[4]と同様のものを使用した．また，標準試料として，PCR ごとにプラスミドによってクローニングされたアユの人工 DNA[4]，30000，3000，300 および 30 copies について測定し，それらの結果から検量線を作成することによりサンプルの定量化をおこなった．

(3) 評価指標

環境 DNA の評価指標として，環境 DNA 濃度と環境 DNA フラックスを用いた．環境 DNA 濃度は PCR 法により増幅した DNA の数であり，採水したサンプルに含まれている DNA 濃度である．環境 DNA フラック

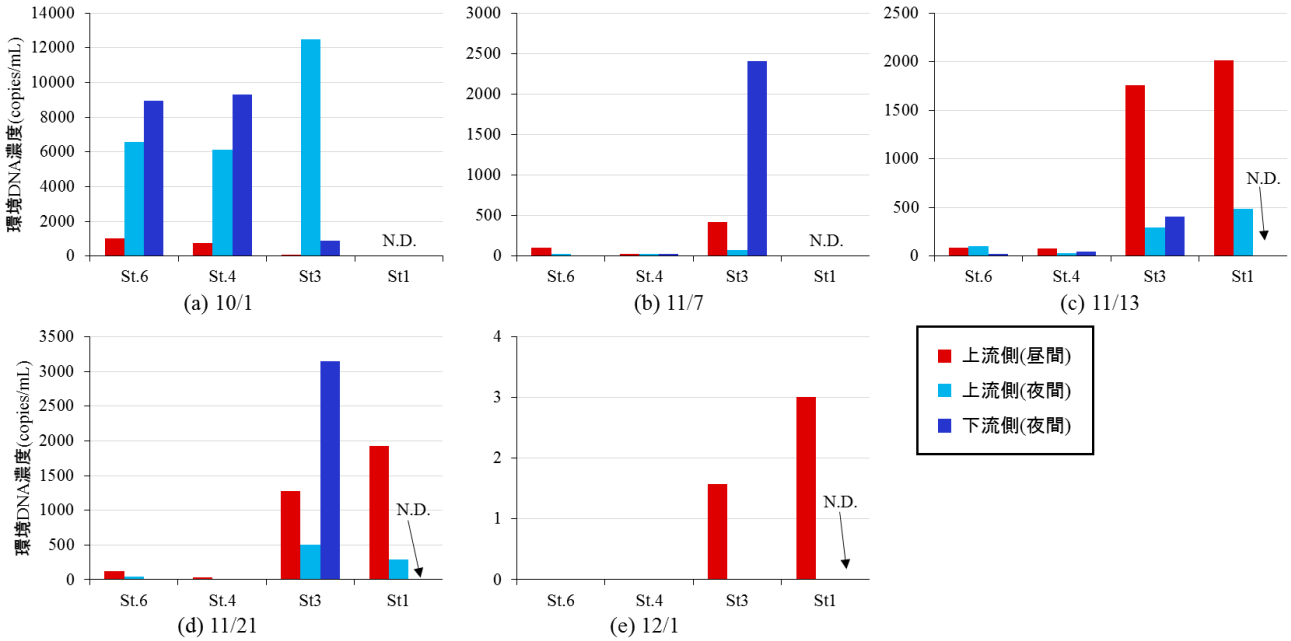

図-4　(a) 10/1，(b) 11/7，(c) 11/13，(d) 11/21 および (e) 12/1 における St. 1，3，4 および 6 の環境 DNA 濃度の昼夜間比較

スは環境 DNA 濃度に調査地点の流量を乗じたものであり，単位時間当たりに通過する DNA 量の指標とする．調査地点の流量は図-1 に示す流量観測所の実測の流量を用いて，St.1,2 においては神田，隅村および内田観測所の合計流量，St3～St.9 においては神田と隅村観測所の合計流量とした．

3. 結果と考察

(1) 降下・産卵時期の検討

昼間採水の結果を用いて降下・産卵時期の検討を行った．**図-2** に昼間における環境 DNA 濃度の地点別時系列変化を示す．10/1 から 10/13 に上流域において環境 DNA 濃度が大きく上昇し，St.9 で 7056 copies/mL の最大の環境 DNA 濃度が検出された．その後は全体的に減少傾向であり，11 月上旬には全体的に濃度が低くなった．そして 11/21 に再び下流域において濃度が上昇し，St.2 で 5832 copies/mL の 2 度目のピークを迎え，12 月上旬には環境 DNA がほとんど検出されなくなった．このことから，2017 年の高津川におけるアユの産卵期のピークは 2 度存在し，これらは別の個体群であることが示唆される．そして 12 月上旬に産卵が終了していることが示唆される．

図-3 に昼間における環境 DNA フラックスの地点別時系列変化を示す．傾向としては環境 DNA 濃度と同様であり，10 月中旬と 11 月下旬にピークが存在する．10 月中旬のピークは St.9 の 387×10^9 copies/s ，11 月下旬のピークは St.2 の 119×10^9 copies/s であり，10 月中旬のピーク時のほうが 3 倍以上の環境 DNA フラックスである．よって，10 月上旬の産卵個体群のほうが量的に多かったことが示唆される

(2) 好適産卵場の推定

アユは日没後数時間が主要な産卵時間であることが知られているため，産卵場の直下流に位置する地点は，夜間の環境 DNA 濃度やフラックスの値が高くなると考えられる．そこで昼夜間データを比較することで，好適産卵場の推定を行った．**図-4** に夜間採水を行った(a)10/1，(b)11/7，(c)11/13，(d)11/21 および(e)12/1 における St.1，3，4 および 6 の環境 DNA 濃度の昼夜間比較を示す．10/1 の夜間の DNA 濃度は昼間に比べて非常に高く，St.3 の昼間は 74 copies/mL，夜間の上流側で 12480 copies/mL であり，夜間の環境 DNA 濃度が桁違いに大きいことが分かる．11/7 は St.3 で夜間の DNA 濃度が高いことが分かる．11/13 は下流域で高い濃度を示し，St.1 の昼間は 2009 copies/mL，夜間は 489 copies/mL であり，昼間の DNA 濃度が高いことが分かる．11/21 は St.1 では昼間の濃度が高く，St.3 では夜間の濃度が高いことが分かる．12/1 の時点では昼間の環

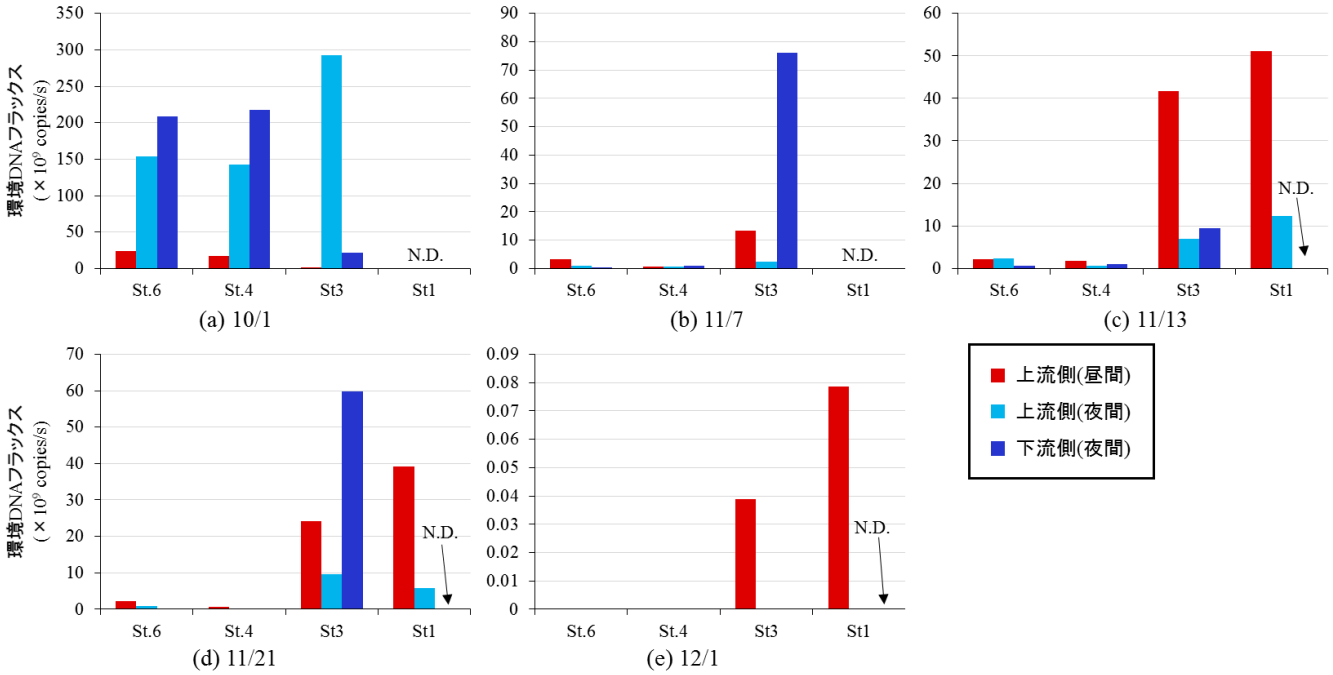

図-5　(a) 10/1, (b) 11/7, (c) 11/13, (d) 11/21 および (e) 12/1 における St. 1, 3, 4 および 6 の環境 DNA フラックスの昼夜間比較

境 DNA 濃度が非常に低く，夜間は未検出であった．このことから，10 月上旬のアユの産卵は調査開始時には既に始まっており，広範囲で産卵しており，それ以降に関しては St.3 を中心に比較的下流側で産卵していることが示唆される．

図-5 に夜間採水を行った(a)10/1，(b)11/7，(c)11/13，(d)11/21 および(e)12/1 における St.1，3，4 および 6 の環境 DNA フラックスの昼夜間比較を示す．10/1 の St.3 の昼間は 2×10^9 copies/s，夜間の上流側は 292×10^9 copies/s であり，全体的に夜間の値が高いことが分かる．11/7 は St.3 で夜間の DNA フラックスが大きいことが分かる．11/13 は下流域で高い値を示しているが，昼間の値のほうが高い．11/21 は St.3 で夜間の値が高いことが分かる．以上より，10 月上旬のアユの産卵個体群の規模が大きく，広範囲で産卵しており，11 月の産卵個体群は比較的規模が小さく，下流域で産卵していることが示唆される．また，11/13 においてはアユはいるものの，夜間に産卵している個体が少ない時期であったことが示唆される．

4. 結論

島根県の一級河川である高津川において，環境 DNA を用いたアユの降下・産卵場モニタリングを実施した．その結果，2017 年における高津川のアユの降下・産卵期はピークが 10 月上旬と 11 月下旬に存在し，12 月には産卵期が終了していること，産卵期前半は調査区間の 広範囲で産卵していることに対して，後半は下流域を中心に産卵していることが示唆された．

参考文献

1) 川那部浩哉，水野信彦，細谷和海：日本の淡水魚（山渓カラー名鑑）改訂版，山と渓谷社，2005.

2) 高橋勇夫：天然アユが育つ川，築地書館，東京，2009.

3) Yamanaka H., Minamoto T., Matsuura J., Sakurai S., Tsuji S., Motozawa H., Hongo M., Sogo Y., Kakimi N., Teramura I., Sugita M., Baba M. and Kondo A. : A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant, *Limnology*, Volume 18, Issue 2, pp.233-241, 2017.

4) Yamanaka H. and Minamoto T.: The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity, *Ecological Indicators*, Vol.62, pp.147-153, 2016.