流水環境におけるアユの環境 DNA の動態の解明

山口大学大学院創成科学研究科　学生会員　○山口　皓平
山口大学大学院創成科学研究科　准教授　正会員　赤松　良久
山口大学大学院創成科学研究科　特命助教　正会員　乾　隆帝
山口大学大学院創成科学研究科　学術研究員　正会員　後藤　益滋
山口大学大学院創成科学研究科　学生会員　河野　誉仁

1. 緒論

近年，採水した水サンプルに浮遊・存在している DNA の情報を調べることで，水棲生物の生息状況を評価する生物モニタリング手法の開発が急速に進んでいる．この手法は，環境 DNA(environmental DNA: eDNA)分析 [1]と呼ばれ，調査地において水を汲むだけでよいため，従来の採集調査や目視による生物量調査のように労力や人員を必要とせず，低コスト・高パフォーマンスな手法として注目されている．しかしながら，環境 DNA に関する先行研究は滞水環境を対象としたもの [2),3)]が多く，流水環境においては，環境 DNA の影響範囲や環境 DNA を含む物質の流下中の動態など不明な点が多い．本研究では，実河川での環境 DNA の減耗の傾向と影響範囲を明らかにすることを目的としたアユ *Plecoglossus altivelis altivelis* を用いた野外実験と，環境 DNA を含むフンおよび粘液の沈降速度を明らかにすることを目的とした，佐波川で捕獲したアユのフンおよび粘液の室内静水条件下での沈降実験をおこなった．さらに，野外実験を実施した河川を対象に，流水環境下でのフンおよび粘液の動態を再現するための数値シミュレーションをおこない，環境 DNA を含む物質が流下する際の粒径や沈降速度を推定することを目的とした．

2. 方法

2-1. アユを用いた野外実験

野外実験は，環境 DNA を用いた予備調査によりアユが確認されなかった山口県の厚東川水系甲山川で，2017 年 6 月および 9 月に 2 回実施した．まず，堰直下のプール部を網で仕切って養殖アユを 50 尾放流し，6 月は放流箇所直下地点と放流箇所から 80m，200m，450m，1000m，の合計 5 地点で，9 月は前述の 5 地点に 2000m，3100m を追加した合計 7 地点（**図-1**）にて，4 時間の馴致の後に，30 分間隔で 3 回採水(1L)をおこなった．各採水地点の流量や流速の測定は，馴致時間中にポータブル電磁流速計 FH950（日本ハイコン株式会社）を用いておこなった．

環境 DNA 分析は，Doi et al.[4)]で用いた手法と同様に抽出し，定量 PCR をおこなった．サンプル水は，10%次亜塩素酸ナトリウムで洗浄して DNA を含まない脱イオン水で洗浄したボトルを用いて採水し，冷却して持ち帰った後，サンプル水を粒子保持径 0.7μm(GF/F)のガラスフィルターで濾過し，アルミホイルで包んで-20℃で凍結保存した．輸送時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，濾過時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．抽出した DNA のサンプルは，quantitative PCR (qPCR) を用いて，Piko Real 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蛍光プローブについては，Yamanaka & Minamoto[5)]に準拠したものを使用した．また，標準試料としてアユの DNA30000, 3000, 300, 30 コピーについて測定し，検量線からサンプルの定量をおこなった．定量 PCR の測定結果には，サンプルごとに 4 ウェルの平均値を用いた．

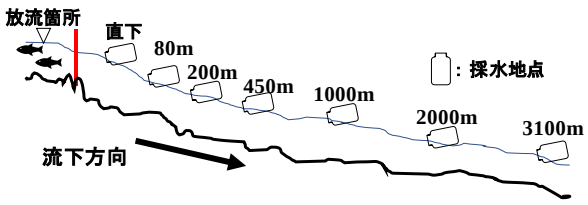

図-1 野外実験の模式図

キーワード　環境 DNA，流水環境，数値シミュレーション
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

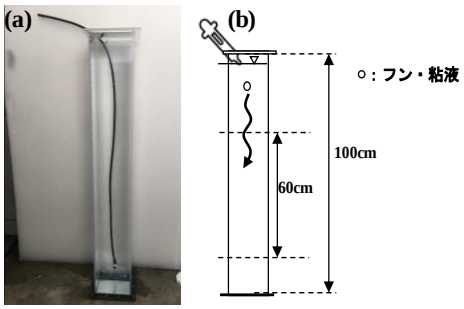

図-2 沈降実験の実験装置
(a)実際の装置 (b)模式図

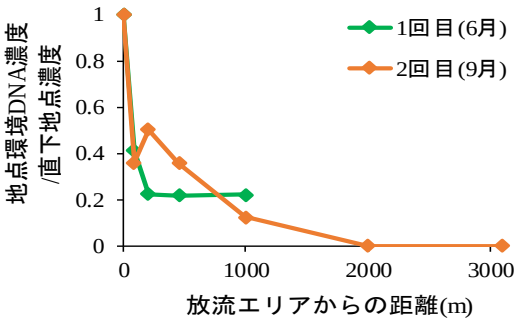

図-3 直下地点の平均環境 DNA 濃度を基準とした時の地点ごとの濃度比の推移

2-2. アユを用いたフン・粘液の沈降実験

2017 年 10 月 28 日に佐波川で捕獲したアユを用いて実験をおこなった．フンは生時に排出されたものを採取した. 粘液は, 氷冷により即殺した個体の体表をアルシアンブルー溶液(pH2.5)で染色した後，採取した．フン・粘液ともに，スポイトで吸い取り，アクリル製の実験装置（図-2，内寸 14cm×14cm，高さ 100cm）に水を満たして，静水状態にしてから落下させ，60cm 落下する時間を計測した．フンは 50 回，粘液は 20 回の繰り返し実験をおこない，95%信頼区間と区間内データの平均を算出した．

また, 実験前に撮影した粒子の画像を, 画像処理ソフトウェア ImageJ(URL: https://imagej.nih.gov/ij/)を用いて，フンおよび粘液の平均体積と代表粒径を算出した．平均体積の算出では，フンは円柱状，粘液は厚さが 0.01mm の円盤状を仮定した．代表粒径は，算出した平均体積と体積が同じ球形粒子を仮定し，その直径とした. 算出した代表粒径と平均体積, 測定した平均沈降速度をもとに，ストークス式(1)を変形した(2)式より粒子密度を決定した．

$$v_s = \frac{{D_P}^2(\rho_p - \rho_f)g}{18\eta} \quad \cdots(1)$$

$$\rho_p = \frac{18\eta}{{D_P}^2 g} \cdot v_s + \rho_f \cdots(2)$$

ここに，v_s：終端速度（沈降速度）(cm/s)，D_p：粒子径(cm)，ρ_p：粒子の密度(g/cm^3)，ρ_f：流体の密度(g/cm^3)，g：重力加速度(≒980.7) (cm/s^2)，η：流体の粘度(≒0.01) (g/cm・s)である．

2-3. 流動モデルを用いた環境 DNA の動態の検討

フンと粘液の平均および最低沈降速度を流動モデルに組み込み，(1)環境 DNA を含む物質の流水環境下での移動距離の検討と，(2)実際の結果との比較検討のために実際の環境 DNA の減耗程度を参照したフンと粘液の流下中の沈降速度と流下距離の算出をおこなった．流れ場の検討として，赤松ら[6]による一次元河川生態系モデルのうち，河川流動モデルと河床変動モデルの部分を抜粋して使用した．上流からの流量には，採水前のアユ馴致時間中に計測した 80m 地点の流量を設定し，計算対象期間は，アユを上流のプール部に放流してから採水までの 6 時間とした．計算区間は，アユを放流したエリアから，下流方向へ 1000m 地点までについて検証した．地形データは 2018 年 2 月 8 日に Phantom 4 Professional（DJI Science and Technology 社）により撮影した空撮写真から，Photoscan（Agisoft 社）を用いて三次元データを計算し，作成したオルソ画像から流心の Z 値と川幅を算出して, 矩形断面を設定した. 計算のための格子は 5m 間隔とした．

3. 結果と考察

3-1. アユを用いた野外実験

図-3 に直下地点の平均環境 DNA 濃度を基準とした時の地点ごとの濃度比の推移を示す. 環境 DNA 濃度は, 放流箇所直下が最も高く, 下流に向かうほど減少傾向を示し，80m で直下の半分未満となったものの，1000m においても検出された．しかし，2000m 以上流下すると，アユの DNA は検出されなかった．これらの結果から, 今回の条件下における環境 DNA の影響範囲は放流箇所直下から 1000-2000m 間にあり，検出限界よりも上流で環境 DNA の大半が減耗することが示唆された．

表-1 各沈降物のパラメータ

	フン	粘液
平均粒径(cm) (mean±SD,n=50)	長さ：0.298±0.081 幅：0.036±0.009	0.128±0.050
平均体積(cm^3)	3.03×10^{-4}	1.29×10^{-4}
球体と仮定した時の半径(cm)	0.083	0.063
沈降速度(±95%CI)(cm/s)	1.00±0.04	0.56±0.03
粒子密度(g/cm^3)	4.454	4.426
平均重量(g)	1.35×10^{-4}	1.33×10^{-4}

表-2 実験結果から設定したパラメータ

実際の河川と環境DNAに関する条件		
	6月	9月
80m地点の流量(m^3/s)	0.018	0.012
直下地点の平均環境DNA濃度(copies/mL)	12.13	196.43
80m地点の平均環境DNA濃度(copies/mL)	5.01	70.78
直下地点の濃度に対する80m地点の濃度(%)	41.3	36.0

DNAを含む物質に関する条件		
	フン	粘液
平均沈降速度(cm/s)	1.00	0.56
最低沈降速度(cm/s)	0.72	0.35

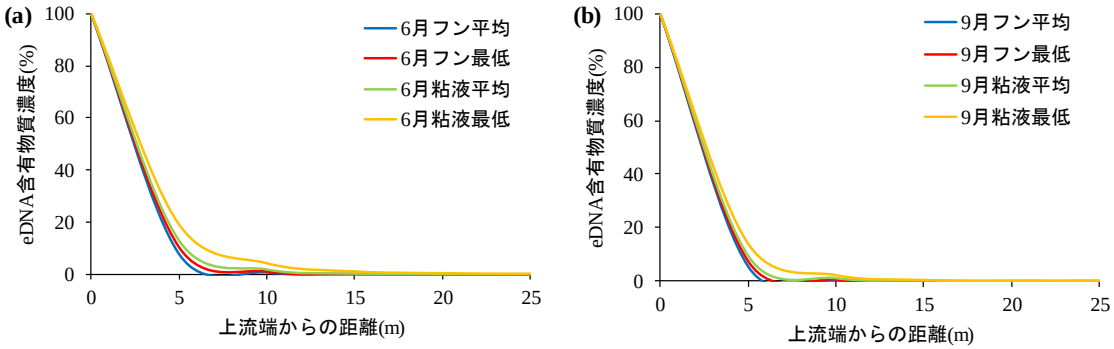

図-4 沈降速度（実測値）から算出した流下に伴う環境 DNA 含有物質の濃度推移
(a)6 月の場合，(b)9 月の場合

また，水温が高い（28.7℃） 6 月は環境 DNA 濃度が低く（直下地点で 12.13copies/mL），逆に水温が低い（22.9℃）9 月は環境 DNA 濃度が高い（直下地点で 196.42copies/mL）という傾向がみられた．

3-2. アユを用いたフン・粘液の沈降実験

沈降実験の結果，フンの沈降速度は 1.00±0.04cm/s (n=17)，粘液の沈降速度は 0.56±0.03cm/s(n=5)となり（95%信頼区間内データの平均±標準偏差），粘液に比べてフンの沈降速度が速いことが明らかになった．

計測した各沈降物の粒径とストークス式より算出した粒子密度(g/cm^3)および平均重量(g)を**表-1** に示す．

3-3. 流動モデルを用いた環境 DNA の動態の検討

表-2 に現地実験の結果から設定したパラメータを示す．**図-4** に，測定した沈降速度から算出した環境 DNA 含有物質の流下に伴う濃度の推移（各地点濃度/直下濃度）を示す．5m 地点において，6 月の場合は，7.7%（フン平均沈降速度），10.4%（フン最低沈降速度），12.8%（粘液平均沈降速度），18.9%（粘液最低沈降速度），9 月の場合は 5.4%（フン平均沈降速度），7.3%（フン最低沈降速度），9.3%（粘液平均沈降速度），13.9%（粘液最低沈降速度）の量の沈降物が堆積し，全ての沈降物が流下してから 25m までの間に堆積しているという結果となった．この結果から，静水条件下で測定した沈降速度から計算した場合，沈降物は，環境 DNA を実際に検出した地点まで移動しないことが示唆された．

図-5 に直下地点から 80m 地点までの環境 DNA 濃度の減耗割合と環境 DNA 含有物質の濃度が等しくなるように算出した推定沈降速度における環境 DNA を含む物質の流下に伴う濃度の推移（各地点濃度/直下濃度）を示す．推定沈降速度は，6 月では 0.0058cm/s，9 月では 0.0045cm/s となり，実際の沈降速度と比較すると，フン沈降速度の約 200 分の 1，粘液の沈降速度の約 100 分の 1 の沈降速度となった．

また，6 月の場合は 535m まで，9 月の場合は 455m までの範囲で環境 DNA を含む物質が沈降するという結果がみられた．沈降速度とストークス式から，環境 DNA を含む物質の粒子径を算出すると，6 月の場

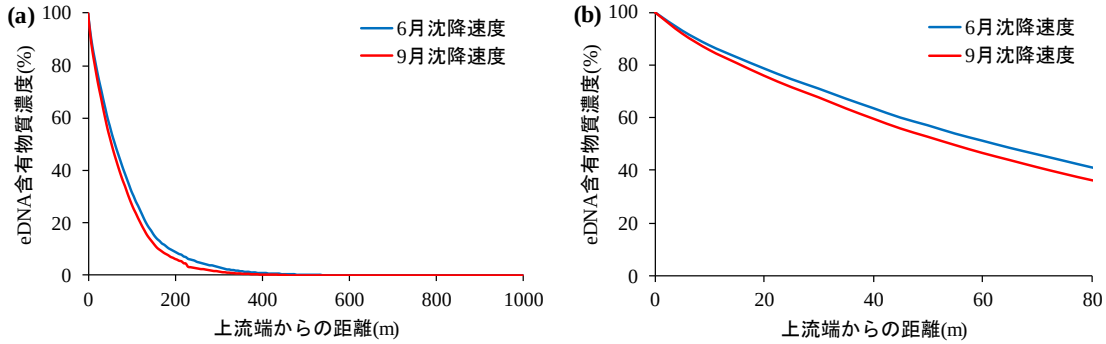

図-5 推定沈降速度における環境 DNA 含有物質の流下に伴う濃度推移
(a)1000m まで，(b)80m まで

合は 0.0063cm，9 月の場合は 0.0056cm と，3-2 で算出した粒子径（フン：0.083cm，粘液：0.063cm）の 10 分の 1 程度にまで小さくなることが示された．この結果から，環境 DNA を含む物質は，そのままの形で沈降・堆積するのではなく，流下中に微細な粒子に破砕され，流水中に漂流していることが考えられる．

4. 結論

本研究では，流水環境にてアユを対象とした実験をおこない，環境 DNA の影響範囲と減耗の傾向，DNA を含む物質であるフンと粘液の沈降速度が明らかになった．また，流動モデルを用いた環境 DNA を含む物質の流下シミュレーションにより，流水環境中においては，DNA を含む物質は流下に伴って破砕され，微細な粒子となって漂流または沈降することが示唆された．今後の環境 DNA 動態のシミュレーションの展開としては， DNA を放出する生物の生態や動態を踏まえたシミュレーションの構築を目標としたい．

参考文献

1) 山中裕樹，源利文，高原輝彦，内井喜美子，土居秀幸：環境 DNA 分析の野外調査への展開，日本生態学会誌，66，pp.601-611，2016.
2) Takahara T, Minamoto T, Doi H: Using environmentalDNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. PLOS ONE, 8:e56584, 2013
3) Klymus K.E., Ritcher C.A., Chapman, D.C., and C.Paukert: Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp Hypophthalmichthys nobilis and silver carp Hypophthalmichthys molitrix, Biological Conservation,183,pp.77-84,2015.
4) Doi H, Inui R., Akamatsu Y., Kanno K., Yamanaka H., Takahara T. and Minamoto T.: Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, Freshwater Biology, 62, 30-39, 2017.
5) Yamanaka H. & 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.
6) 赤松良久，上鶴翔悟，高村紀彰，永野博之：一次元河川生態系モデルの開発と佐波川への適用，土木学会 B1(水工学) Vol.71, No.4, I_1237-I_1242, 2015.