

環境 DNA を用いた遊泳魚生物量の季節変動の把握

山口大学大学院 創成科学研究科	学生会員	○小林 勘太
山口大学大学院 創成科学研究科 教授	正会員	赤松 良久
福岡工業大学 社会環境学部 准教授	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	齋藤 稔
山口大学大学院 創成科学研究科 学術研究員	正会員	河野 誉仁

1. 背景

河川管理をする上では治水、利水と共に環境保全を行うことが重要であり、そのためには河川生物の生息状況を把握することが必要不可欠となる。河川生態系における主要な分類群である魚類の生息状況を調査する方法として、従来より、潜水目視や、採捕といった手法が用いられている。しかし、これらの手法では、大規模河川や魚類の生息密度が極端に低い河川において、生息状況の定量的な評価は困難である。近年、水棲生物の生息状況（在、不在、現存量）を評価する手法として、環境 DNA 分析の開発が急速に進んでいる。河川で採水した水サンプルに存在する DNA の情報を調べるこの手法を用いた研究として、アユをはじめとした水産有用種の定量評価を試みたものは存在するものの、河川生態系を構成する魚類複数種を対象として、定期的かつ定量的な分析を行った研究は国内では見当たらない。そこで、本研究では、島根県の一級水系である高津川の下流域を対象として、潜水目視による魚類の定量モニタリングに加え、調査中に確認された主な魚種について環境 DNA 分析を行い、これらを比較することで、環境 DNA 分析の、生物量の季節変動を捉えるうえでの有用性を検討した。

2. 方法

2.1 物理環境

水温（℃）は、2018年4月～2019年12月の間、設置式のロガー（HOBO U20 ウォーターレベルロガー）をナガタ地点（図-1）に設置し、15分間隔で記録した。水位データは、国土交通省が管理する『水文水質データベース』から、神田水位観測所、及び隅村水位観測（図-1）の水位データ（cm）を1時間間隔で取得した。



図-1 調査地点図

2.2 魚類の生物量調査

調査は、2018年4月～2019年12月の間、月1回程度を基準として実施した。調査地点の下流側に位置する早瀬の上端付近からその上流に位置するトロにかけて、河川横断方向に長さ約20mのライントランセクトをおおよそ20m間隔で6本ずつ設け、それぞれ幅1mの範囲で、アユ、ウグイ、オイカワの3種を対象に、潜水目視調査を行った。確認された魚類は、種、及びサイズ区分ごとに個体数を計数し、調査面積で除すことで平均密度（n/m²）を求めた。生物量（g/m²）は、平均密度（n/m²）に乾ら²⁾の平均体重（g/n）を乗じて算出した。

2.3 環境 DNA 分析

前述した潜水目視調査を行う直前に、調査地点下流側の早瀬の下流寄りの地点で、表層水を1L採水した。分析対象は、潜水目視調査を行ったアユ、ウグイ、オイカワの3種とした。環境 DNA 分析は、基本的に Doi et al.³⁾ で用いた手法に従い、濾過、DNA の抽出を行った後、定量 PCR を行った。サンプル水は、GF/F ガラスフィルター（孔径、0.7μm；GE Healthcare）で

キーワード 環境 DNA 魚類 産卵

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 TEL0836-85-9339

吸引ろ過し、市販のアルミホイルに包んで DNA 抽出を行うまで-20℃で冷凍保存した。フィルターからの DNA 抽出には、サリベット(Sarstedt, Numbrecht)及び DNA 抽出キット(DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen)を用い、サンプル水 1L から DNA 抽出溶液 100µm を精製した。抽出した DNA サンプルは、CFX Connect Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD)によって定量 PCR を行い、環境 DNA 濃度 (copies/ml) を測定した。分析結果の検討にあたり、環境 DNA 濃度に調査日の日平均流量 (神田水位観測所と隅村水位観測所の流量の合計、HQ 式から算出；図-1) を乗じ、環境 DNA フラックス (copies/s) を算出した。

3. 結果

3.1 アユ

図-2 に、アユの環境 DNA 分析結果と潜水目視から得られた生物量の季節変化を、図-3 に生物量と環境 DNA フラックスの散布図を示す。アユは、潜水目視において、ナガタ地点では 2018 年の 6 月、及び 2019 年の 8 月と 11 月にのみ観測され、ムソウ地点

では 2018 年の 6 月～7 月、及び 2019 年の 8 月～11 月にかけて観測された。環境 DNA フラックスは、両地点ともに、概ね秋季 (10 月、11 月) に高い値を示した。また、ナガタ地点に比べてムソウ地点が高い値を示す傾向にあった。この傾向は、生物量の推移と概ねと同様であった。環境 DNA フラックスと生物量は、有意な強い正の相関を示した ($r=0.802$, $p<0.01$)。

3.2 ウグイ

図-4 に、ウグイの環境 DNA 分析結果と潜水目視から得られた生物量の季節変化を、図-5 に生物量と環境 DNA フラックスの散布図を示す。環境 DNA フラックスは、春季 (2018 年 4 月と 2019 年 5 月) 及び秋季 (11 月) に高い値を示し、夏季 (2018 年の 6 月～10 月、2019 年の 5 月～6 月) は低い値を示した。両地点で特に環境 DNA フラックスの値が大きかったのは、2018 年 4 月と 2019 年 11 月であった。ナガタ地点では、2018 年 11 月に特に環境 DNA フラックスの値が大きかった。これに対して、生物量は、両地点ともに、概ね春季から夏季にかけて増加し、秋季から冬季にかけて減少した。環境 DNA フラックスと生

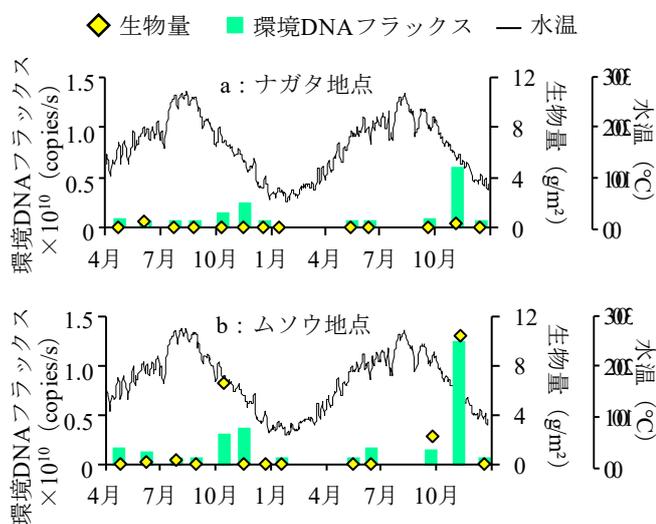


図-2 アユの環境 DNA フラックス、及び生物量の推移。
a: ナガタ地点, b: ムソウ地点

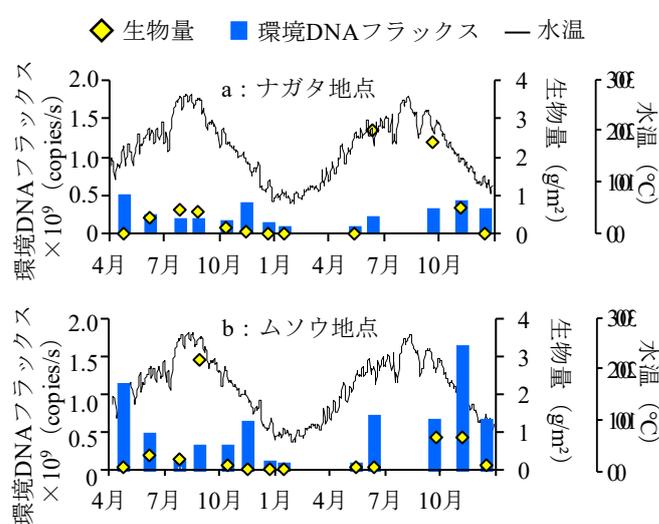


図-4 ウグイの環境 DNA フラックス、及び生物量の推移。
a: ナガタ地点, b: ムソウ地点

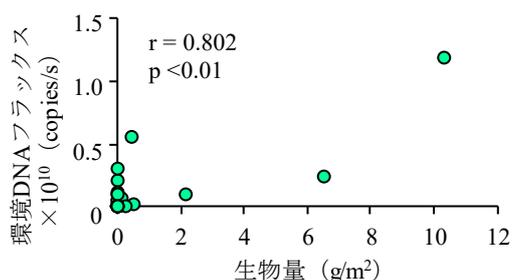


図-3 アユの環境 DNA フラックスと生物量の関係

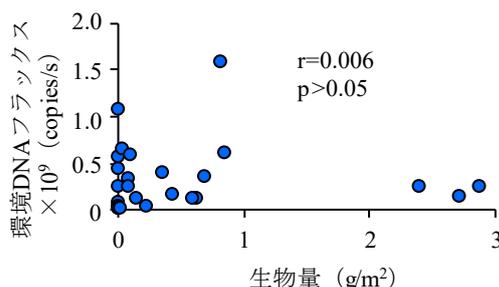


図-5 ウグイの環境 DNA フラックスと生物量の関係

物量の関係において、明瞭な相関はみられなかった ($r=0.006$, $p>0.05$).

3.3 オイカワ

図-6 に、オイカワの環境 DNA 分析結果と潜水目視から得られた生物量の季節変化を、図-7 に生物量と環境 DNA フラックスの散布図を示す。環境 DNA フラックスは、両地点で、夏季(8月)と秋季(10月, 11月)に高い値を示し、春季と冬季(11月~1月)に低い値を示した。ナガタ地点で特に大きい値を示したのは、2018年10月と2018年, 2019年の8月であった。ムソウ地点で特に高い値を示したのは、2018年10月, 2019年11月であった。生物量は、両地点ともに、概ね春季から夏季にかけて増加し、夏季から冬季にかけて減少する傾向を示した。環境 DNA フラックスが夏季に増加する傾向は、増減の強度は異なるものの、生物量と概ね同様であった。また、ナガタ地点において、2019年は環境 DNA フラックスと生物量の増減が概ね一致しているが、その他の期間において、潜水目視でオイカワが観測されなかった月に環境 DNA が多く検出されている等、増減の合わない月も多くみられた。環境 DNA フラックスと生物量の関係において、明瞭な相関はみられなかった ($r=0.092$, $p>0.05$).

4. 考察

アユを除く魚類について、環境 DNA フラックスと生物量には相関が示されなかった。このことから、現状ではアユを除いて環境 DNA 分析を用いて生物量の季節変動を追うことは難しいと考えられる。そこで、環境 DNA フラックスの増減パターンと、各魚類の季節的な行動様式の変化や生活史特性とを比較検討する。

4.1 アユ

生物量、及び環境 DNA フラックスは、秋季に増加する傾向を示した(図-2)。アユの産卵期は秋季であり、中・上流域から下流域に降下して産卵を行う。よって、秋季の環境 DNA フラックス、生物量の増加は、アユの降下、産卵に伴うものだと考えられた。秋季を除いて生物量、環境 DNA フラックスは小さい値を示しており、これはアユが遡上、産卵を行う時を除いて中上流域に生息するという知見とも一致する。また、2018年の春季に、環境 DNA フラックスが産卵期を除く期間の中では僅かに高い値を示しているが、こ

れは遡上途中のアユを捉えたものだと考えられた。生物量と環境 DNA フラックスの増減の傾向が一致すること、環境 DNA フラックスの増減パターンが生活史特性と概ね一致することから、高津川下流域において、環境 DNA 分析を用いてアユの生物量の季節変動を追える可能性が示唆された。

4.2 ウグイ

生物量は春季から夏季にかけて増加する傾向を示したのに対し、環境 DNA フラックスは、2018年において両地点ともに春季にピークを示し、そこから夏季にかけて減少した(図-4)。ウグイの産卵期は、3月~4月である。よって、環境 DNA フラックスが春季に高い値を示し夏季に低い値を示したのは、産卵行動を捉えたもの、及びその終了に伴って環境 DNA 放出量が減少する傾向を捉えたものであると考えられた。これに対して、生物量が春季から夏季にかけて増加したのは、水温の上昇に伴い活性が高まり、潜水目視を行う平瀬で確認される個体が増えたことが原因として考えられた。また、2019年の春季は、調査を行った日の時点で繁殖期のピークを過ぎ

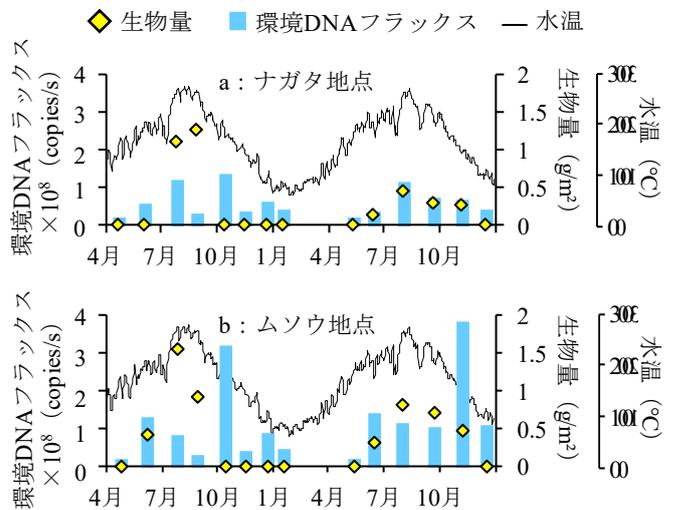


図-6 オイカワの環境 DNA フラックス、及び生物量の推移。
a: ナガタ地点, b: ムソウ地点

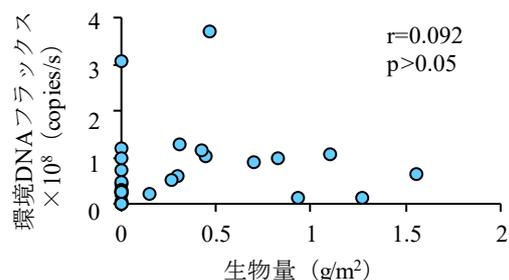


図-7 オイカワの環境 DNA フラックスと生物量の関係

ていたため、環境 DNA フラックスの値が 2018 年の同季節に比べて小さかったと考えられた。ムソウ地点において、生物量は秋季以降に減少する傾向であったのに対し、環境 DNA フラックスは 2019 年 11 月に、他の期間に比べて非常に高い値を示した。この時期は、アユの産卵期が終わるころである。ウグイは雑食性の魚類であり、産卵し終わったアユの卵を捕食する。また、日中にアユが早瀬で藻類を食べなくなり、早瀬を餌場として利用可能となる。よって、糞や粘液といった環境 DNA 含有物質の放出量が増え、生物量が減少傾向にあったにもかかわらず、このような結果が得られた可能性が考えられ、そのほかの秋季にみられる環境 DNA フラックスの増加も、同様な原因によるものと考えられる。

4.3 オイカワ

両地点で春季には環境 DNA フラックスが低い値を示し、夏季に増加した(図-6)。オイカワの産卵期は 5 月～9 月であるため、夏季に環境 DNA フラックスが高い値を示したのは、オイカワの繁殖行動を捉えた結果であると考えられた。また、産卵期において、前月と比較して、生物量が増加し、環境 DNA フラックスが減少する場合があった。これは、産卵を終えた個体が放出する環境 DNA の量が、産卵時に比べて減少したことが要因として考えられる。産卵期以外の期間において、潜水目視でオイカワを確認できなかった月(主に冬季)についても環境 DNA は検出された。成魚のオイカワは、餌場として平瀬を好む傾向にある他、活性が下がる冬季は、淵などの深みに分布する。よって、流速が速く、潜水目視を行うのが困難な平瀬の中央部、潜水目視範囲外に位置する淵などの深みにオイカワが分布したため、潜水目視で確認されていないにもかかわらず環境 DNA が検出された月があり、生物量と環境 DNA フラックスの間に差が生じたと考えられる。

5. 結論

本研究では、潜水目視による魚類の定量モニタリング、及び環境 DNA の定量的な分析を 2 年間にわたり継続し、これらと比較することで、環境 DNA 分析により生物量の季節変動を捉えるうえでの有用性を検討した。その結果、アユについては、環境 DNA 分析を用いて生物量の季節変動を追うことが可能であると示唆された。その他の魚類については、生物量と

環境 DNA フラックスの間に明瞭な相関関係はみられなかった。しかし、潜水目視で確認できなかった時期や、活性が低い時期にも DNA を検出できている他、産卵期を捉えられていると考えられ、潜水目視と組み合わせて継続的に照査を行うことで生物量の増減と活性の季節的な変化を大まかに把握できる可能性が示唆された。生物量と環境 DNA 分析結果に明瞭な相関がみられないのは、水温の変化に伴う魚類の活性の変化や、繁殖行動の有無によって糞や粘液といった環境 DNA 含有物質の単位重量当たりの放出量が増えることが原因として考えられる。今後、魚類の環境 DNA 含有物質の放出の傾向が、季節、生活様式、生息場の環境などによって、どのように変化するかを明らかにする必要がある。

謝辞：本研究は国土交通省中国地方整備局浜田河川国道事務所受託研究「高津川における河床掘削が河川環境に与える影響の研究(研究代表者：赤松良久)」の一環として行われた。本研究の調査に際して、高津川漁業協同組合には快く許可とご協力を賜った。記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 乾隆帝, 後藤益滋, 河野誉仁, 赤松良久, 掛波優作, 一松晃弘: 江の川における環境 DNA 分析を用いたアユの定量化と生物量に影響を与える環境要因の検討, 土木学会論文集 B1 (水工学), 73 巻, 4 号, pp.I_1105-I_1110, 2017.
- 2) 乾隆帝, 一松晃弘, 赤松良久, 河野誉仁: 佐波川における魚類量予測モデルの構築, 土木学会論文集 B1 (水工学) 72 巻, 4 号, I_997-I_1002, 2016.
- 3) 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, *Freshw. Biol.*, Vol.62, No.1, pp.30-39, 2017.