

環境DNAを用いたアユの定量化と降下状況 モニタリングの試み

QUANTIFICATION OF *Plecoglossus altivelis* USING ENVIRONMENTAL DNA AND TRIAL OF MONITORING OF DOWNSTREAM MIGRATION

河野 誉仁¹・赤松 良久²・後藤 益滋³・乾 隆帝⁴
Takanori KONO, Yoshihisa AKAMATSU, Masuji GOTO and Ryutei INUI

¹学生会員 修（工） 山口大学大学院生 創成科学研究科（〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1）

²正会員 博（工） 山口大学大学院准教授 創成科学研究科（〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1）

³正会員 博（工） 山口大学大学院学術研究員 創成科学研究科
（〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1）

⁴正会員 博（農） 山口大学大学院特命助教 創成科学研究科
（〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1）

In recent years, the resource of *Plecoglossus altivelis* which is the most important fishery target in rivers is decreasing. So it is necessary to grasp the current status of resources and to clarify the factor of decline resources. Environmental DNA (eDNA) analysis is useful tools for clarifying resource dynamics of river organisms. We determined the eDNA concentration of *P. altivelis* in Saba river and Takatsu river in May, July, October and November to grasp the resource dynamics of *P. altivelis*. The results of this study shows that *P. altivelis* was distributed at high density in the downstream in Saba river, and it was distributed at low density in a wide area in Takatsu river. In addition, downstream migration of *P. altivelis* were confirmed from October to November in both rivers.

Key Words : eDNA, *Plecoglossus altivelis*, qPCR, resources conservation

1. はじめに

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⁾、農林水産統計によるとアユの漁獲量は全国的に減少傾向であり²⁾、河川におけるアユ資源量の減少が懸念されている。それに伴い、多くの河川でアユの放流や産卵場の保護等の増殖策が行われているが、それらについての有効性を科学的に明らかにした例は、静岡県の天竜川や鳥取県の日野川、高知県の奈半利川等の一部の河川に限られているという現状がある³⁾。その理由として、まず各河川において資源量の現状が把握できていないこと、そして、科学的な視点からアユの減少要因を明らかにできていないことが挙げられる。

河川におけるアユの資源量の把握と減少要因の解明の

ためには、河川の広範囲にわたってアユの資源量を定期的に把握する必要があるが、従来おこなわれてきた採集や目視ではコスト的に不可能な場合が多かった。しかしながら、近年発展が著しい環境DNA分析により^{4)~6)}、水中に含まれるアユのDNAが、その箇所へ生息するアユの生物量（個体数や現存量）と強い関係性があることが明らかになっているため⁷⁾、環境DNA分析をおこなうことにより、その箇所のアユの生物量の大小を相対的に評価できる段階にまで至っている。

アユは、秋に河川下流域で孵化した仔魚が海域に流下し、海域生活を経た後、春に河川に遡上し、秋に産卵して死亡する回遊性の年魚である⁸⁾。よって、減少要因を解明する上で、生活史段階のそれぞれに着目する必要があるが、近年、西日本のいくつかの河川において、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

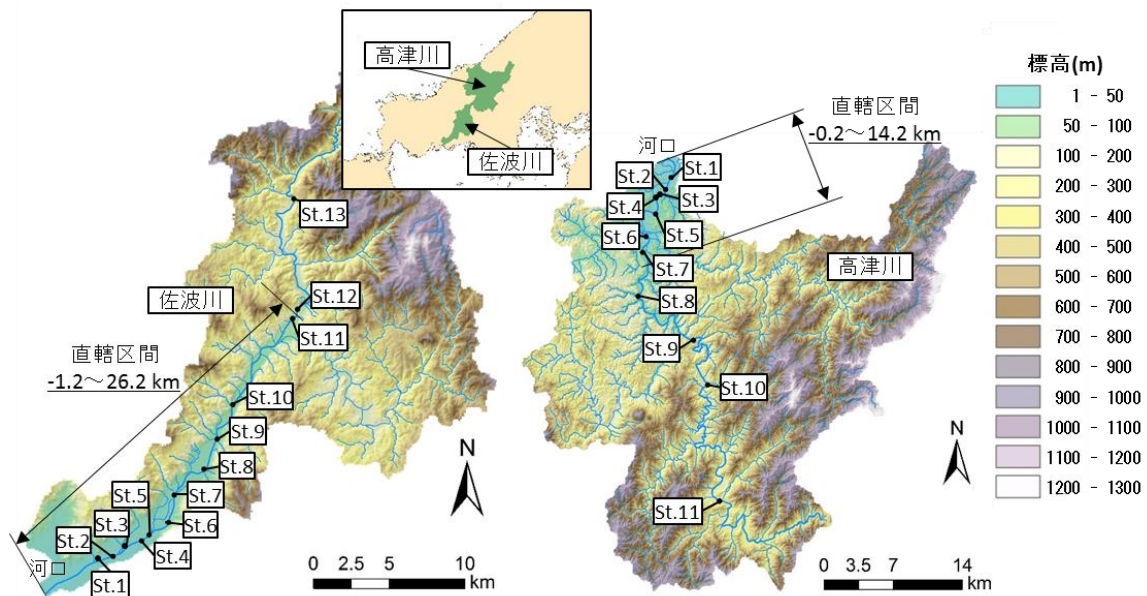


図-1 佐波川および高津川の調査地点

いる³⁾。よって本研究では、中国地方の1級水系である佐波川と高津川を対象とし、環境DNA分析を用いることにより、初夏の河川生活期から、秋季の降下・産卵期に着目したアユ資源の動態を明らかにすることを試みた。

2. 方法

(1) 対象河川

佐波川は山口県のほぼ中央に位置し、周防灘に注ぐ幹線流路延長56km、流域面積460km²の1級河川である。流域の土地利用は山地が約90%を占め、谷底平野と下流部の三角州および干拓地に農耕地が開けている。佐波川本流の国管理区間内には15基もの堰が存在していることが特徴の一つである。

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1090km²の1級河川である。流域の土地利用は山地が96%、農地が約3%、市街地が1%となっている。高津川の特徴として1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る。

(2) 調査方法

図-1に対象河川の調査地点を示す。調査は、佐波川においては2016年5月30日、7月21日、10月14日、28日、11月10日および24日、高津川においては2016年5月24日、7月27日、10月13日、27日、11月11日および25日に行った。佐波川では、河口から約37km区間に13定点を設定し、

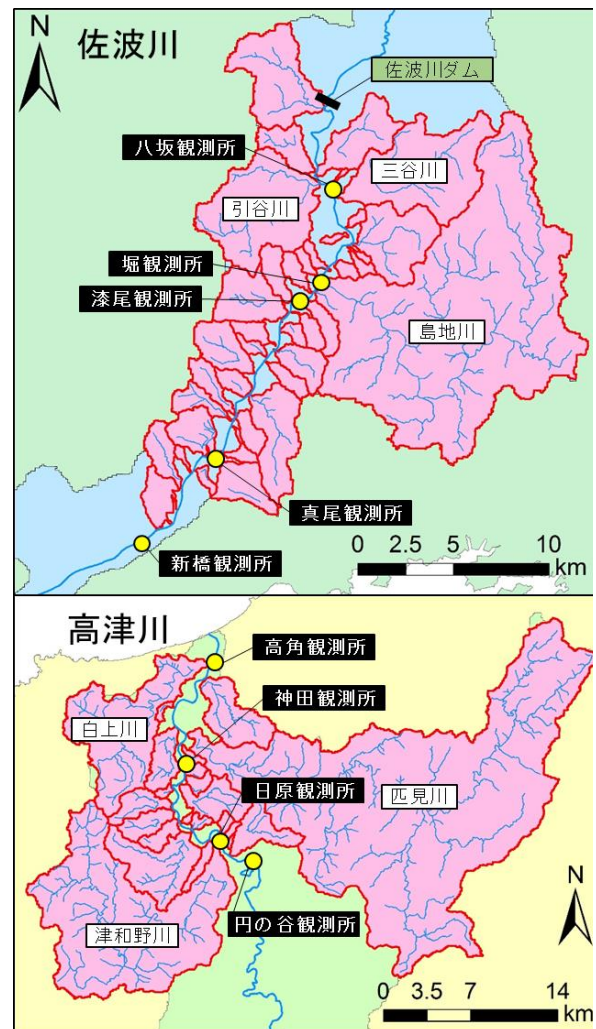


図-2 佐波川および高津川的环境DNAフラックス算出区間に流入する支流

遡上期にあたる5月および河川生活期にあたる7月は、瀬の下流側の11地点で1回ずつ、降下時期にあたる10月か

ら11月にかけては、河口から約9km区間の6地点の瀬の上流側と下流側において、2週間に1回、合計4回のサンプリングをおこなった。高津川では、河口から約58km区間に11定点を設定し、遡上期にあたる5月および河川生活期にあたる7月は、瀬の下流側の9地点で1回ずつ、降下時期にあたる10月から11月にかけては、河口から約11km区間の6地点の瀬の上流側と下流側において、2週間に1回、合計4回のサンプリングをおこなった。各調査ともに、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、降下時期のサンプルには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⁹⁾。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。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°C 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, Wal-tham) 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&Minamoto⁹⁾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DNA⁹⁾、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) 環境DNAフラックスの算出

上下流域や河川間で流量規模が異なるため、フラックスによる比較を行った。フラックスの算出には調査日の各地点の流量に環境DNA濃度を乗じることで求めた。図-2に佐波川と高津川の環境DNAフラックス算出区間に流入する支流と流量観測所を示す。各地点の流量の算出には上下流の流量観測所の調査日の日平均流量を用いて観測所間の流量差を算出し、調査地点と上流側の観測所までの間に流入する合計集水面積と上下流の観測所間に流入する支流の合計集水面積との比を乗ずることで求めた。本手法では、両河川ともに、流量観測所が上下流に存在する地点について流量が算出可能であるため、佐

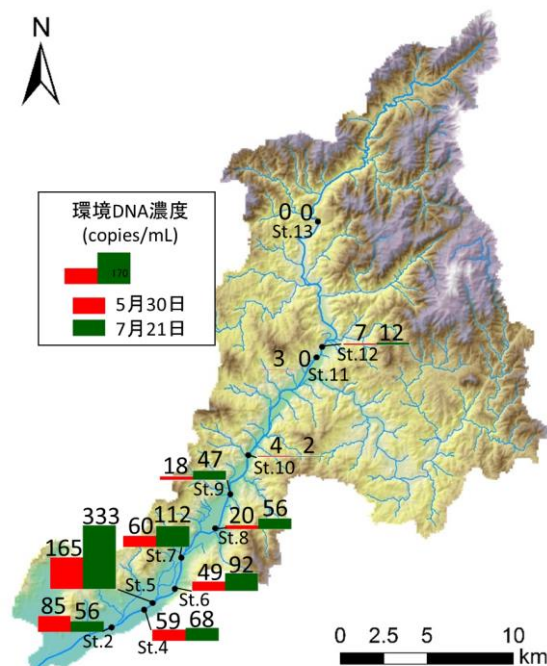


図-3 佐波川における5月および7月の環境DNA濃度

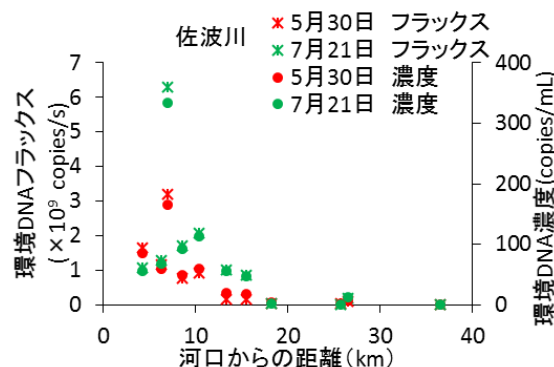


図-4 佐波川における5月および7月の環境DNAフラックス、濃度と河口からの距離との関係

波川においては全地点、高津川においてはSt.1～St.9において環境DNAフラックスを求めた。

3. 結果と考察

(1) 佐波川の結果

図-3に佐波川における5月および7月の環境DNA濃度、図-4に5月および7月の環境DNAフラックス、環境DNA濃度と河口からの距離との関係を示す。遡上期にあたる5月の環境DNA濃度は平均で 42.6 copies/mL、フラックスは平均で 0.74×10^9 copies/s であった。5月においては下流域のDNA濃度が高く、河口から7km付近 (St.5) でピークとなることが分かる。河川生活期にあたる7月の環境DNA濃度は平均で 70.9 copies/mL、フラックスは平

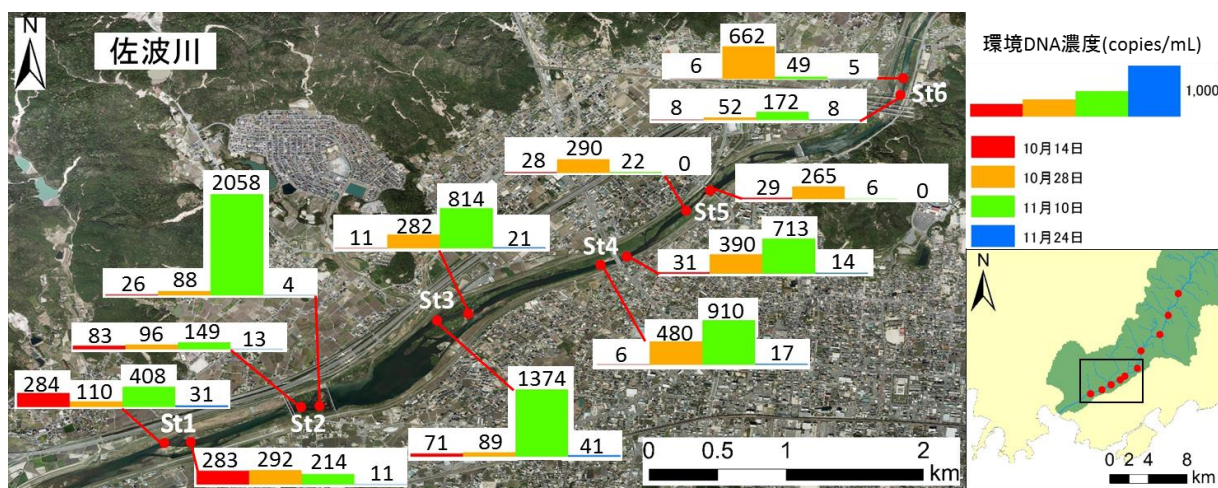


図-5 佐波川における10月および11月の環境DNA濃度

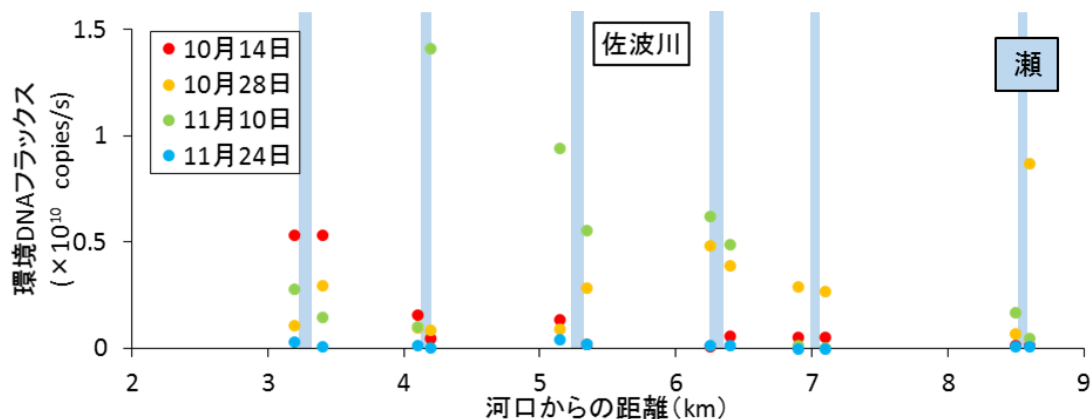


図-6 佐波川における10月および11月の環境DNAフラックスと河口からの距離との関係

均で 1.31×10^9 copies/s となり、共に5月よりも大きな値を示した。下流域で高い値を示す傾向は5月と同様であるが、最下流地点の値が5月より低くなるのに対して、中上流 (St.3～St.5) の地点の値が増加した。5月と同様、河口から7km付近でピークを示した。フラックスと濃度を比較しても同様の傾向を示すことが分かる。佐波川は堰の多い河川であり、特にSt.9より上流には多数存在している。よって、アユは堰が少なく、遡上が可能であるSt.9より下流の区間を主要な生息場としていと考えられる。

図-5に佐波川における10月および11月の環境DNA濃度、図-6に10月および11月の環境DNAフラックスと河口からの距離との関係を示す。降下時期にあたる10月および11月における平均環境DNA濃度は10月上旬が 72.2 copies/mL、10月下旬が 258.1 copies/mL、11月上旬が 574.2 copies/mL、11月下旬が 13.7 copies/mL、環境DNAフラックスは平均で10月上旬が 0.14×10^{10} copies/s、10月下旬が 0.28×10^{10} copies/s、11月上旬が 0.40×10^{10} copies/s、11月下旬が 0.01×10^{10} copies/s となり、共に11月上旬においてピークを示した。10月上旬から下旬にかけて、河口から8.6km付近 (St.6の上流側) と6.3km付近 (St.4) 前後で濃度が高くなっていることが分かる。11月上旬には

河口から4.2kmから6.3kmの区間 (St.2～St.4) にて高い濃度を示しており、河口から4.2km付近 (St.2) でピークを示している。11月下旬にはDNAが検出されない地点が出現し、全体的に大きくDNA濃度が低下している。フラックスと濃度を比較しても同様の傾向となることが分かる。これらの結果から、10月下旬から11月上旬にかけてアユが降下および産卵し、11月下旬には多くの個体が産卵後斃死したことが推察される。

(2) 高津川の結果

図-7に高津川における5月および7月の環境DNA濃度、図-8に5月および7月の環境DNAフラックス、環境DNA濃度と河口からの距離との関係を示す。遡上期にあたる5月の環境DNA濃度は平均で 2.7 copies/mL、フラックスは平均で 0.75×10^8 copies/s となり、匹見川合流地点付近である河口から10.6km付近 (St.6) でピークを示した。河川生活期にあたる7月の環境DNA濃度は平均で 32.7 copies/mL、フラックスは平均で 4.12×10^8 copies/s であり、上流域に向かって環境DNA濃度が高くなり、河口から58.6km付近 (St.11) でピークを示している。全体的に5月よりもDNA濃度が高くなっており、5月の分布と明らかに生息分布が異なることが分かる。一方、フラックス

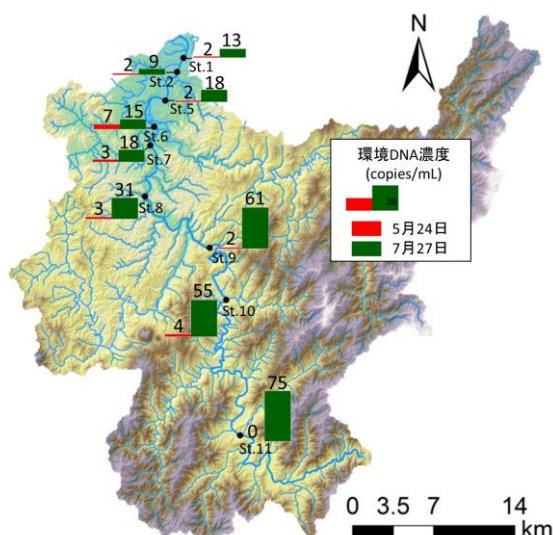


図-7 高津川における5月および7月の環境DNA濃度

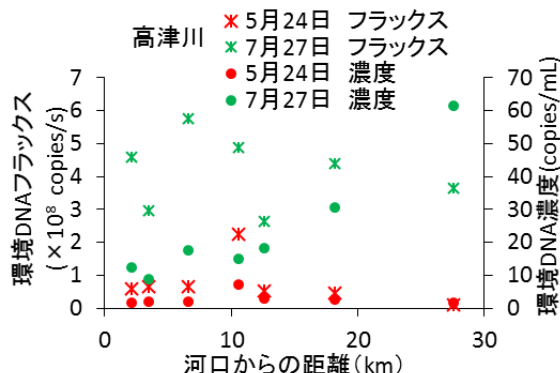


図-8 高津川における5月および7月の環境DNAフラックス、濃度と河口からの距離との関係

では河口から6.6km付近 (St.5) でピークとなり、上流に向かって緩やかに減少することが分かる。

図-9に高津川における10月および11月の環境DNA濃度、図-10に10月および11月の環境DNAフラックスと河口からの距離との関係を示す。降下期にあたる10月および11月における平均環境DNA濃度は10月上旬が 10.7 copies/mL, 10月下旬が 20.1 copies/mL, 11月上旬が 43.8 copies/mL, 11月下旬が 2.1 copies/mL, 環境DNAフラックスは平均で10月上旬が 0.54×10^9 copies/s, 10月下旬が 0.54×10^9 copies/s, 11月上旬が 1.31×10^9 copies/s, 11月下旬が 0.15×10^9 copies/s となり、共に11月上旬においてピークを示した。10月上旬は河口から10.6km付近でピークを示しているが、10月下旬は河口から1.9km地点 (St.1) で高い環境DNA濃度を示している。11月上旬は最上流地点と河口から1.7kmから4.6kmの区間 (St.1~St.4) にて高い濃度を示し、河口から1.9km地点でピークとなった。11月下旬には多くの地点で環境DNAが検出されず、最も高い地点は最下流地点であった。フラックスと河口からの距離との関係でも同様の傾向となることが分かる。最上流地点である河口から10.6km付近では10月上旬と11

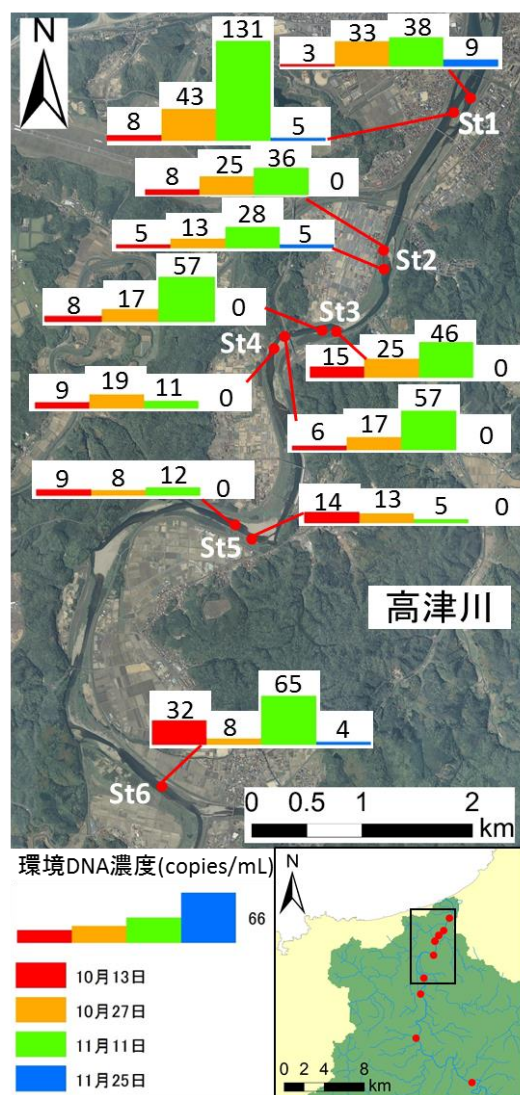


図-9 高津川における10月および11月の環境DNA濃度

月上旬の2回高い濃度を示していることが分かる。これらの結果から、佐波川と同様に、10月下旬から11月上旬にかけてアユが降下および産卵し、11月下旬には多くの個体が産卵後斃死したこと、降下するタイミングの異なる2つの個体群が存在したことが推察される。

(3) 両河川でのアユの降下生態の違い

高津川と佐波川を比較すると、遡上期、河川生活期および降下時期のすべての時期で佐波川の環境DNA濃度が高いことが分かる。フラックスで比較しても11月下旬を除き、佐波川の環境DNAフラックスが高い値を示した。

遡上期において、佐波川では下流域の値が高い傾向にあるが、高津川においては上下流域で大きな差がないことが分かる。河川生活期においては、佐波川では上流方向へ環境DNA濃度の高いエリアが少し移動していることが分かるが、下流域の濃度が高い傾向は変わらない。一方、高津川では河川生活期のDNA濃度が上流側のほ

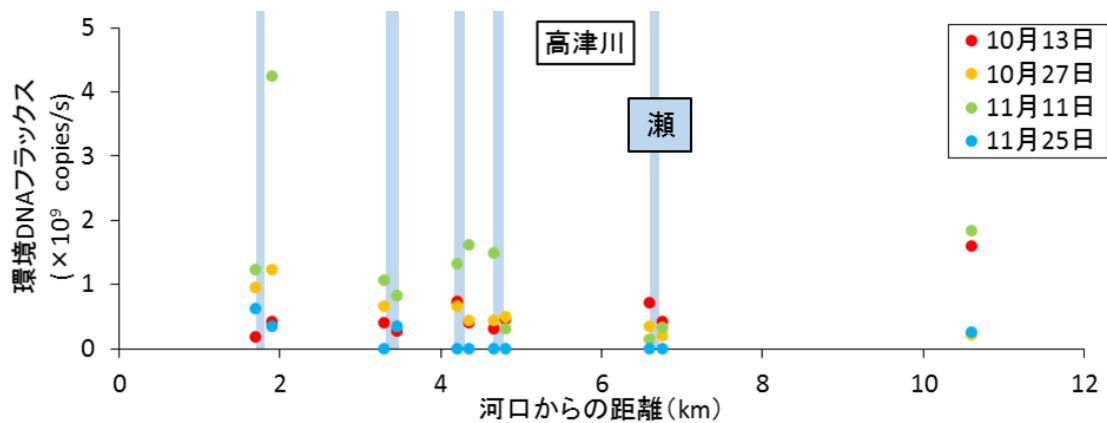


図-10 高津川における10月および11月の環境DNAフラックスと河口からの距離との関係

うが高い傾向にある。フラックスで見たとき、河口から6.6km地点でピークを示し、上流に向かって緩やかに減少する。佐波川では天然遡上アユが連続する堰によって遡上を阻害されることにより、下流域に高密度でアユが分布しているのに対し、高津川では目立った横断構造物が少ないことにより上流域までアユが遡上可能であるため、広範囲に低密度で分布しているためであると考えられる。

降下時期においては、両河川ともに11月上旬をピークに下流域に降下しており、この時期が産卵の最盛期である可能性が高い。また、両河川ともに、下流域の中でも特に高濃度のDNAが検出される地点がみられたことから、これらの地点周辺が、アユの主要産卵場である可能性が高いと考えられる。

4. 結論

本研究では環境DNA分析を用いることにより、中国地方の1級水系である高津川と佐波川におけるアユの動態を明らかにすることを試みた。その結果、河川の広域におけるアユの定期的な定量モニタリングが可能になっただけでなく、アユの降下時期や、主要産卵場となっている可能性のあるエリアを明らかにすることができた。

本研究で構築した手法は、アユの産卵場の目視調査が困難な河川における産卵場の簡易的なモニタリング手法への発展が期待される。よって、目視による産卵場調査と同時に本研究手法を用いたモニタリングをおこない、本手法の制度を検証することが今後の課題である。

謝辞：本研究は国土交通省受託研究「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）の一環として行った。また、国土交通省中国地方整備局から貴重なデータの提供を頂いた。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 川那部浩哉，水野信彦，細谷和海：日本の淡水魚（山溪カラー名鑑）改訂版，山と溪谷社，2005.
- 2) 農林水産省統計部：全国年次別・魚種別生産量（平成16年～26年），平成26年漁業・養殖業生産統計，2016.
- 3) 高橋勇夫：天然アユが育つ川，築地書館，東京，2009.
- 4) Doi H., Takahara T., Minamoto T., Matsushashi S., Uchii K. and Yamanaka H.: Droplet digital polymerase chain re-action (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species, *Environmental Science & Technology*, Vol.49, pp.5601-5608, 2015.
- 5) Takahara T., Minamoto T. and Doi H.: Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds, *PLOS ONE*, Vol.8, e56584, 2013.
- 6) 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.
- 7) 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*, Volume 62, Issue 1, pp.30-39, 2017.
- 8) 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.

(2017. 4. 3受付)