

河川における回遊性魚類の産卵場や存在量調査手法の開発

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 29～平 30

担当チーム：河川生態チーム

研究担当者：中村 圭吾、村岡 敬子

鈴木 宏幸

【要旨】

本研究では、直轄河川のように大規模な河川を移動する回遊性魚類の動態を、環境 DNA の量の変化から捉えるための手法の基礎的な検討を行った。九頭竜川におけるサクラマスを対象とし、産卵場や越夏場所などの情報をもとにサンプリング地点を設定し、サクラマスの生活史を目安に複数回のサンプリングを実施した。調査の結果、本川や支川の合流部においては、サンプルのばらつきが多いため、複数のサンプルを繰り返し分析することが望ましいことが示唆された。また、分解しやすい環境 DNA の取扱いに当たっては、分析技能者による差にも注意が必要であることが示された。

キーワード：九頭竜川、環境 DNA、採水量、分析技能、サクラマス

1. はじめに

河川事業の実施にあたり、河川管理者らは生物の生息場の保全に配慮するとともに、魚の移動を妨げる可能性のある河川横断工作物には魚道を設置するなど、生物の移動環境を確保に努めている。特に、生活史の中で海域と河川双方の場を必要とする回遊性魚類においては、移動環境の喪失が当該集団の消滅につながるため、河川事業者らはより慎重に河川横断工作物などの影響評価を行っている。

近年、対象とする魚の環境 DNA を用いて、魚の動態を捉えようとする取り組みが、水産分野などで行われている。しかし、サクラマスやサツキマスのように同種で回遊する個体と陸封個体双方がいる種においては、水系内に通年留まる同種が存在するため、環境 DNA の有無だけでは動態を捉えることができない。一方、本種は春先に遡上してきた個体が夏場に水温の低い場所で越夏し、秋季に産卵場所に移動するなど、季節によって特定の環境を利用していることから、河道内における物理環境と環境 DNA の量の変化双方を組み合わせることによって、河道内における本種の動態を把握できる可能性がある。一方で、直轄規模の河川において、個体数の少ない種を定量するために必要なサンプル量やサンプリング地点の選定など、不明瞭な部分が多い。そこで本研究では、河道内における回遊性魚類の動態を捉えるために必要な技術的課題を抽出し、解決に向けた方策を提案することを目的とした。

2. 研究方法

2. 1 調査対象河川の選定およびサンプリング

本研究における調査対象河川として、サクラマスの遡上環境の改善に取り組んでいる九頭竜川を選定した。調査対象地点は、九頭竜川流域でサクラマスの保全活動を行っている NPO に協力を仰ぎ、サクラマスの越夏、産卵の時期、産卵場所やサクラマスの遡上が確認されている支川などの情報を得たうえで、本川 4 地点、支川 9 地点の計 13 地点を設定するとともに、産卵時期の前後および降下前の時期をサンプリング時期として設定した。また、本研究の汎用性を高めるため、河川規模の異なる 2 河川において、同時期にサンプリングを実施した。

それぞれの地点において 1 地点あたり、6 リットルを目安に採水を行い、0.01～0.04% の BAC を添加後、冷蔵便にて実験室に輸送した。実験室内においては、0.22 μ m のグラスファイバーろ紙を用いて 1000ml を目標にろ過を行ったが、濁りなどのためにろ過が困難な場合には 500～200mL 単位で複数回に分けてろ過を行った。

2. 2 DNA の分析

ろ紙 1 枚ごとに、QIAGEN 社製 DNeasy Tissue Kit を用いて DNA を抽出し、分析までの間、ディープフリーザーに保管し、MiFish プライマーによる種網羅解析および Q-PCR 装置による定量解析を行った。また、一部のサンプルについては、得られる環境 DNA の再現性を確認するために、各地点 3DNA サンプル、地点毎の混合サンプル、混合サンプルの希釈サンプル(2～15 倍希釈)を作成し、MiFish 解析を行った。

2. 3 分析者の技能の影響の評価

分析作業に従事した年数が20年以上(作業員 a)、10年(作業員 b)、未経験者(作業員 c)の3名の技能者が、同一の環境 DNA サンプルを精製し、精製後の DNA 濃度を比較した。一連の作業は、均質なサンプルを用いて、作業員全員が同じ方法で手動ピペットを用いて実施した。手法 A はフィルター付の専用スピニングカラムを用いた手法で、サンプルや試薬の添加後、DNA と不純物の分離は遠心分離を用いた。手法 B は手法 A と同様のサンプルや試薬の添加作業のほか、DNA と不純物の分離手順でピペットによる上清の吸引作業があり、この部分はより作業員の技能を必要とする。

3. 研究結果

3. 1 種網羅解析による調査地点の魚類相

3 河川の MiFish 解析の比較結果では、同一地点であってもサンプル間で種の存在結果が一致しないものがあった。結果のばらつきは河川の規模に応じて大きくなるとともに、複数サンプルを混合することで改善されるものの、完全な解消には至らなかった。これらは、サンプル中の組織片の偏在が原因と考えられる。一方で、相同性が高く、概ねリード数が 6000 を上回る場合には再現性が高くなる結果を得た(図-1)。

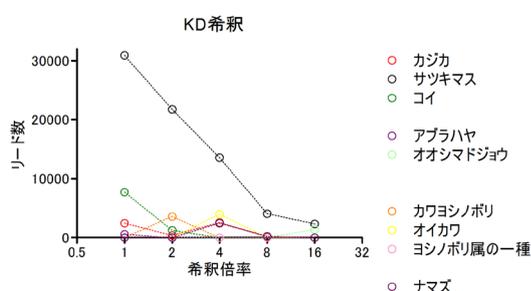


図-1 同一サンプルを希釈した時の、種網羅解析における存在結果の安定性

3. 2 Q-PCR によるサクラマスの定量

九頭竜川本川および支川で採取した 200mL の水から抽出した DNA を、サクラマス(ヤマメ)のプロンプを用いて定量解析を行った。これらサンプルには確実にサクラマスが上流にいる地点、サクラマスがいないと考えられる地点双方を含んでいる。しかしながら、サンプル中のサクラマスの DNA 量が不足していたため、精度良く定量することができなかった。Ct 値および検量線の比較から、精度よく定量するためには、2L

程度の水サンプルの残渣から DNA を抽出する必要があると推察された。

3. 3 分析者の技能による影響

図-2に、精製作業後のサンプルの DNA 濃度を示す。経験年数の長い作業員 a と b の濃度は、手法にかかわらず 5~6ng/μL の値にまとまり、ばらつきの少ない結果となった。一方経験の短い作業員 c では、両手法とも作業員 a, b と比べて濃度が低く、作業員 a と c、また b と c の間に有意な差 ($p < 0.01$) が見られた。さらに作業員 c の手法ごとの結果を見ると、手法 B の値にばらつきが見られた。また一連の作業に要した時間は、作業員 a, b に大きな違いは無かったが、作業員 c は倍ほどの時間を要した。この作業員 a, b と c の結果に差が見られた要因としては、作業員の技能によるピペット操作の不正確さと、作業時間の長さ双方の影響が考えられた。

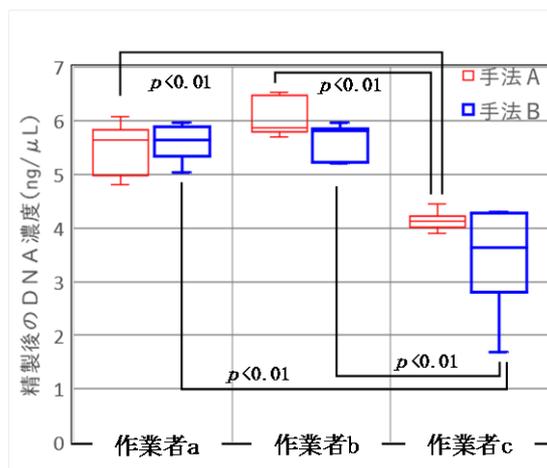


図-2 異なる分析者間の精製作業後の DNA 濃度 (p 値: 等分散を仮定した 2 標本による t 検定)

4. まとめ

本研究では、直轄規模の河川において、個体数の少ないサクラマスの環境 DNA を分析するための課題について検討を行った。その結果、以下のことがわかった。

- 1) 種網羅解析では、河川規模や支線の合流によって再現性が影響を受けるため、複数回の分析を行うなどの配慮が必要である。
- 2) 河川の規模や魚の存在量にもよるが、今回の検討の範囲においては定量解析においても 1 L を超える水サンプルが必要と考えられる。
- 3) 環境 DNA の量には、分析者の技能も影響する。今後も引き続き検討を進め、精度良いデータを得る

ための留意点を示していく予定である。

参考文献

- 1) 村岡敬子、鈴木宏幸、相島芳江、加藤徳子、中村圭吾：
「環境 DNA による河川魚類相調査データの再現性に関する基礎検討」、DNA 多型学会第 27 回学術集会抄録集、pp.72, 2018.12
- 2) 鈴木宏幸、村岡敬子、中村圭吾：「環境DNAの精製時に発生する誤差要因に関する基礎検討」第 46 回関東支部技術研究発表会,2019.3