

環境 DNA を用いて別寒辺牛川水系における
「幻の魚」イトウの河川内移動様式と餌資源との関連性に迫る

2016 年調査報告

北海道大学

環境 DNA を用いて別寒辺牛川水系における「幻の魚」イトウの河川内移動様式と餌資源との関連性に迫る

水本寛基¹・荒木仁志¹・宮正樹²

¹北海道大学農学院動物生態学研究室 ²千葉県立中央博物館

はじめに

イトウ(*Parahucho perryi*)は日本国内で最大の淡水魚であり、河川生態系における最高次捕食者である。本種はかつて北海道全域と本州北部の青森県、岩手県に分布していた。しかし、河川開発などの影響により生息域を著しく減少させ、現在では北海道の一部の水系でしか彼らの姿を確認することができない(Fukushima et al. 2011)。こうした希少性から本種は IUCN の Red List において最も絶滅の危険性が高いとされる CR に分類されているが、他の多くの絶滅危惧種同様、「当該種が現在どこにいるのか、どれぐらいいるのか」といった生態学における基礎的な情報の集積すら十分でない。また、遡河回遊魚である本種の保全を行う上で必要不可欠な「河川内でいつどの流域を利用しているか」という情報については、バイオテレメトリー技術等を用いた回遊行動の探索が行われてきたが、これらの研究にはサンプル個体数が少ない、冬季は河川が結氷するためデータを得ることができないという弱点があり、イトウの普遍的な行動様式の解明には至っていない(Honda et al. 2010a, b, 2012, 2014, 2017)。さらにその行動様式の決定要因についても他の冷水性魚類と同様、水温変動に言及するにとどまり、餌資源をめぐる生活史戦略については未解明のままであ

る。

こうした状況を打破する特効薬として、近年環境 DNA 技術がにわかに注目を集めている。環境 DNA 技術とは、環境水や土壌などの環境媒体に含まれる周辺生物由来の DNA を解析する技術のことを指す。この技術は 2008 年にヨーロッパで初めて脊椎動物の在・不在の検出に利用されて以降、世界中で様々な生物への応用が報告されており、サンプルが環境媒体であるという特性から標的生物に対する侵襲性の低さを活かし、特に希少種や絶滅危惧種の力を発揮している(Ficetola et al. 2008, Jerde et al. 2011; Fukumoto et al. 2015; Janosik et al. 2015; Laramie et al. 2015; Bellemain et al. 2016; Pflieger et al. 2016)。加えて、この技術で用いられるサンプルには標的生物以外の DNA も含まれることから、ユニバーサルプライマーを用いた生物相の把握への応用も始まっている(Miya et al. 2015)。

本研究では、北海道内でも安定したイトウ個体群が存続しているとされる道東の別寒辺牛川水系を対象として、環境 DNA 技術を用いてイトウの河川内利用様式の季節性を明らかにすることを第一義の目的とした。さらに次世代シーケンサー(NGS)による解析を併用することで、「イトウの回遊行動が彼らの餌資源の在不在と同期する」という仮説を検証し、イトウの河川内移動様式の季節変動と餌資源との関係の解明を試みた。

材料と方法

調査水域・サンプル採集

調査水域は別寒辺牛川水系および厚岸湖とした。別寒辺牛川の上流から河口部、厚岸湖の右岸・左岸の間で計 7 定点 (B1-B7) を設け、2016 年 6 月、8 月、11 月、2017 年 2 月と四季を通じて計 4 回の採水を実施した(図 1)。各定点

ではブリーチ済みの 1L ボトルを用いて 2 リットルの環境水を採集した。なお、冬季については河川が凍結していたためワカサギ釣り用の穴あけドリルを用いて氷に穴をあけそこから採水を行った(図 2)。このうち B2 定点では 2017 年 2 月に採水ポイントにアクセスできなかつたためサンプルを採集できなかつた。採集した環境水はガラスメンブレンフィルター(Whatman GF/F, GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan)で濾過を行い、濾紙 1 枚あたり 1L の水を濾過したものを濾紙サンプルとして冷凍保存した。各地点の環境水を濾過する前には必ず滅菌蒸留水を濾過し、濾過機材を介したサンプル汚染がないかの確認を行った。濾過作業は北海道大学厚岸臨海実験所にてその日の内に行い、得られた濾紙サンプルは北海道大学動物生態学研究室に持ち帰った後 DNA 抽出に供した。

DNA 抽出・解析

濾紙からの DNA 抽出は先行研究(Mizumoto et al. 2018)に基づいて、DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用い、抽出 DNA の最終収量は 110 μ L とした。

イトウの在・不在の検出については先行研究(Mizumoto et al. 2018)に基づき定量 PCR を用いた検出形を使用した。すべての定量 PCR のランにおいて 1 サンプルあたり 2 μ L の抽出 DNA を 3 レプリケート供し、同時に 2×10^1 、 2×10^2 、 2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 コピーの合成 DNA を解析に供することで各サンプルに含まれる DNA 量を推定した。また、滅菌蒸留水を各定量 PCR のランに供することでサンプル間および PCR 実験に伴うサンプル汚染の有無を判定した。

餌資源の解明については先行研究(Miya et al. 2015)に基づき、魚類全体を網羅する魚類ユニバーサルプライマーである MiFish プライマーを用いて DNA 増幅を行い、NGS(Illumina MiSeq, NGS hereafter)によるメタバーコーディング解析

(MiSeq platform: Illumina, San Diego, CA, USA)に供した。得られた解析データは Miya et al. (2015)に基づいて種判別を行い、このときリード数が1桁のものは解析から除外した。

結果

定量 PCR を用いた解析の結果、B7 定点を除くすべての定点でイトウの DNA が検出され、別寒辺牛川河口域に当たる B5 定点においては一年を通してイトウの DNA が検出された(図 3)。季節ごとの検出頻度を見ると、夏季に最も多くの地点でイトウの DNA が検出され、秋季・冬季が最も検出頻度が低かったが、検出された DNA 量においては冬季の B5 定点が最も多かった(図 3)。

NGS を用いた解析の結果、合計 26 種の魚類が検出された(表 1)。このうち、イトウとアメマスは増幅配列のミスマッチが 1 塩基しかなく種判別が困難なためリストから除外し、同様に *Oncorhynchus* 属と *Gymnogobius* 属も種判別が困難なため属ごとにまとめて分類し、さらに亜種間の判別も困難なため、*Tribolodon brandtii brandtii* と *Tribolodon brandtii maruta* は *Tribolodon brandtii* とした(表 1)。これら種判別が可能な魚種のうちエゾトミヨ *Pungitius tymensis*、イバラトミヨ *Pungitius pungitius*、エゾウグイ *Tribolodon sachalinensis* が 1 年を通して高頻度で検出され、中でもエゾウグイは 80%の割合でイトウと同所的に検出された(図 4)。しかしながら、これらの魚種の在・不在およびリード数の多寡とイトウの在・不在およびコピー数の間に有意な相関は認められなかった。

考察

本研究の結果、環境 DNA 技術を用いて別寒辺牛川水系における、冬季を含むすべての季節においてイトウの河川内分布を推測することができた。また、NGS を用いた魚類相推定の結果、本水系における魚類相の季節的な変化を網羅的に明らかにすることができただけでなく、エゾトミヨ、イバラトミヨ、エゾウグイが本水系における優先種であること、中でもエゾウグイが高頻度でイトウと同所的に分布する魚種であることが明らかとなった。これらは従来の直接観察やバイオテレメトリー等を用いた調査では得られない極めて新しい知見であった一方で、先行研究から明らかにされてきた「春季には産卵のため上流域における個体群密度が高まる」「夏季には高水温を避けるため上流域における個体群密度が高まる」などの回遊行動パターンとは異なる結果となった。また、「イトウの回遊行動が彼らの餌資源の在不在と同期する」という仮説についても、それを支持する明確な結果は得られなかった。こうした結果が得られた理由として、環境 DNA 技術の物理的な検出範囲、検出感度が様々な環境パラメータ(水温、紫外線量、流速、濁度など)によって時々刻々変化していたことが原因として考えられる。今後の展望として、採水地点の数を増やすこと、採水の回数を 1 シーズンに複数回に増やすことで、環境パラメータの時空間的なバラつきを考慮した解析を行うことができるものと期待される。さらに本研究の調査スキームはサンプリングに関する制限がほぼ存在しないため、同様の調査を複数河川で同時に行うことでイトウを含めた遡河性回遊魚の普遍的な行動生態を解明する新たな技術となることが期待される。

謝辞

本研究の遂行に当たり、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター厚岸臨海実験所の仲岡雅裕教授、井坂友一博士をはじめとする職員の方々には大変お世話になった。また、国立研究法人水産研究・教育機構北海道区水産研究所の本多健太郎博士には本水系におけるイトウ研究の先達として、情報提供や有益なご助言を賜った。本研究は上記の方々のサポートなくして達成することは不可能であったこと、ここに深く御礼申し上げる。なお本研究は旭硝子財団研究助成金、平成 28 年度厚岸湖・別寒辺牛川湿原学術研究奨励補助制度厚環水第 18 号の補助を受けて行われた。

参考文献

- Bellemain E, Harmony P, Gray T, Guegan F, Valentini A, Miaud C, Dejean T (2016) Trails of river monsters: detecting critically endangered Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas* using environmental DNA. *Glob Ecol Conserv* 7: 148–156.
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett* 4(4): 423–425.
- Fukumoto S, Ushimaru A, Minamoto T (2015) A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *J Appl Ecol* 52(2): 358–365.
- Fukushima M, Shimazaki H, Rand PS, Kaeriyama M (2011) Reconstructing Sakhalin taimen *Parahucho perryi* historical distribution and identifying causes for local extinctions. *Trans Am Fish Soc* 140(1): 1–13.
- Honda K, Arai T, Takahashi N, Miyashita K (2010a) Life history and migration of Sakhalin taimen, *Hucho perryi*, caught from Lake Akkeshi in eastern Hokkaido, Japan, as revealed by Sr: Ca ratios of otoliths. *Ichthyol Res* 57(4): 416–421.
- Honda K, Kagiwada H, Tojo N, Miyashita K (2010b) Riverine environmental characteristics and seasonal habitat use by adult Sakhalin taimen *Hucho perryi*. *J Fish Biol* 77(7): 1526–1541.
- Honda K, Kagiwada H, Takahashi N, Miyashita K (2012) Seasonal stream habitat of adult Sakhalin taimen, *ParaHucho perryi*, in the Bekanbeushi River system, eastern Hokkaido, Japan. *Ecol Freshw Fish* 21(4): 640–657.
- Honda K, Kagiwada H, Takahashi N, Miyashita K (2014) Movement patterns of adult Sakhalin taimen, *ParaHucho perryi*, between stream habitats of the Bekanbeushi

- River system, eastern Hokkaido, Japan. *Ichthyol Res* 61(2): 142–151.
- Honda K, Takahashi N, Yamamoto K, Kagiwada H, Tsuda Y, Mitani Y, Miyashita K (2017) First documentation of detailed behaviors of endangered adult Sakhalin taimen *Parahucho perryi* in the Bekanbeushi River system, eastern Hokkaido, Japan, using bio-logging and acoustic telemetry concurrently. *Ichthyol Res* 64(3): 357–364.
- Janosik AM, Johnston CE (2015) Environmental DNA as an effective tool for detection of imperiled fishes. *Environ Biol Fish* 98(8): 1889–1893.
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM (2011) “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv Lett* 4(2): 150–157.
- Laramie MB, Pilliod DS, Goldberg CS (2015) Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biol Conserv* 183: 29–37.
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R Soc Open Sci* 2(7):150088
- Mizumoto H, Urabe H, Kanbe T, Fukushima M, Araki H (2018) Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid. *Limnology* 19(2): 219–227.
- Pfleger MO, Rider SJ, Johnston CE, Janosik AM (2016) Saving the doomed: Using eDNA to aid in detection of rare sturgeon for conservation (Acipenseridae). *Glob Ecol Conserv* 8: 99–107.

表 1 NGS 解析により検出された魚種。種判別が困難な種は属ごとにまとめられ、イトウとアメマスは表から除外されている。

<i>Scientific name</i>	Japanese name	Detection
<i>Acanthogobius lactipes</i>	アシシロハゼ	3
<i>Ammodytes personatus</i>	イカナゴ	1
<i>Arctoscopus japonicus</i>	ハタハタ	1
<i>Barbatula toni</i>	フクドジョウ	5
<i>Clidodermasperrimum</i>	サメガレイ	1
<i>Clupea pallasii</i>	ニシン	3
<i>Colobopsis saira</i>	サンマ	4
<i>Cottus amblystomopsis</i>	エゾハナカジカ	2
<i>Cyprinus carpio</i>	コイ	1
<i>Eleginus gracilis</i>	コマイ	2
<i>Gadus macrocephalus</i>	マダラ	5
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	イトヨ	1
<i>Gymnogobius</i>		14
<i>Hippoglossoides dubius</i>	アカガレイ	1
<i>Hypomesus japonicus</i>	チカ	2
<i>Inopsetta ischyra</i>	ヌマガレイ	7
<i>Liparis agassizii</i>	エゾクサウオ	1
<i>Microstomus achne</i>	ババガレイ	1
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	ドジョウ	3
<i>Moxocephalus brandti</i>	アオカジカ	1
<i>Oncorhynchus</i>		15
<i>Pholidapus dybowskii</i>	ムロランギンポ	2
<i>Pholis crassispina</i>	タケギンポ	2
<i>Pleuronectes schrenkii</i>	クロガシラガレイ	2
<i>Pungitius pungitius</i>	イバラトミヨ	11
<i>Pungitius tymensis</i>	エゾトミヨ	18
<i>Rhynchocypris percnurus sachalinensis</i>	ヤチウグイ	3
<i>Sardinops melanostictus</i>	マイワシ	4
<i>Tribolodon brandtii</i>		13
<i>Tribolodon hakonensis</i>	ウグイ	8
<i>Tribolodon sachalinensis</i>	エゾウグイ	10
<i>Tridentiger bifasciatus</i>	シモフリシマハゼ	1

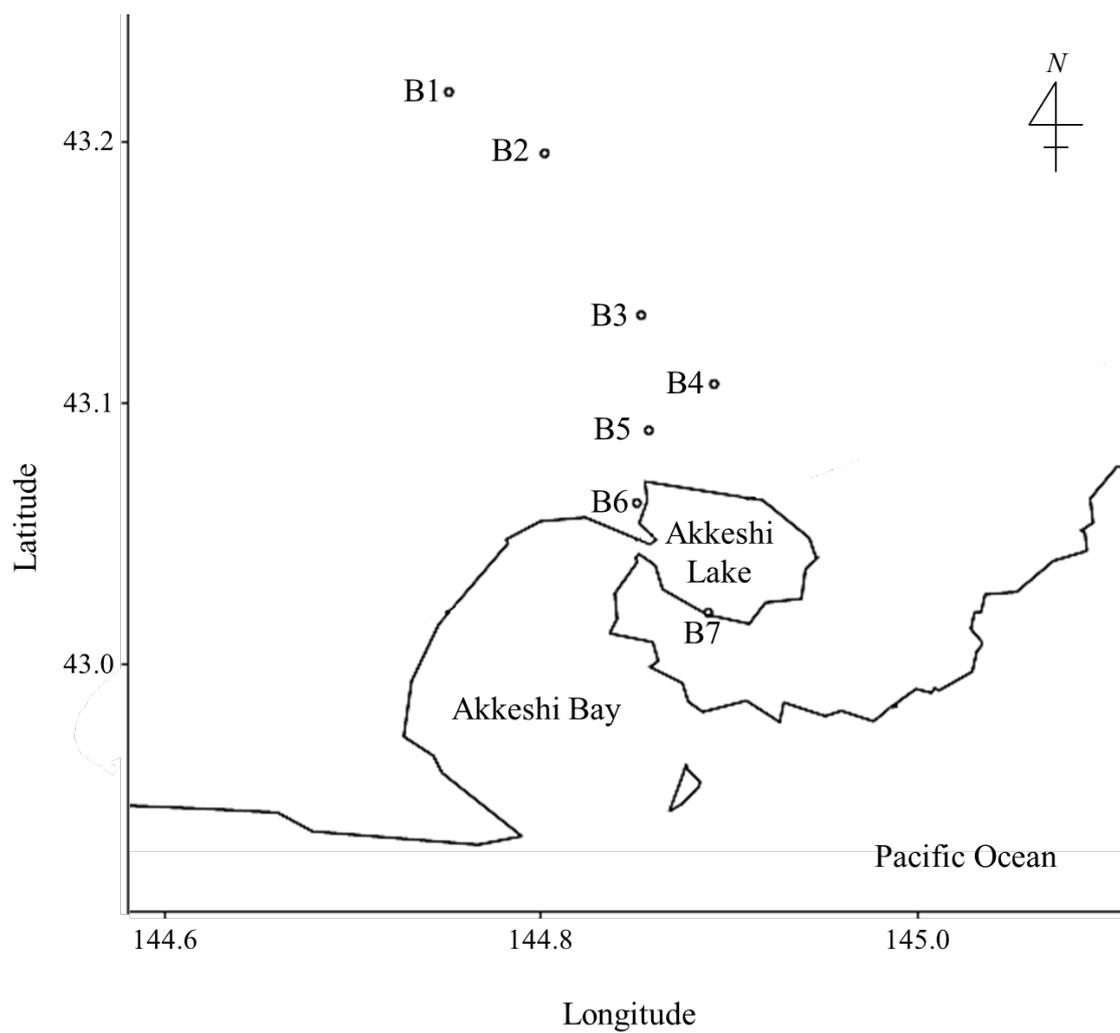


図1 本研究の調査地点。本研究対象種の保護の観点から採水地点の位置情報は明記しない。



図 2 B1 定点における冬季採水の風景。ワカサギ釣り用のドリルで氷に穴をあけ、そこから河川水を採集した。

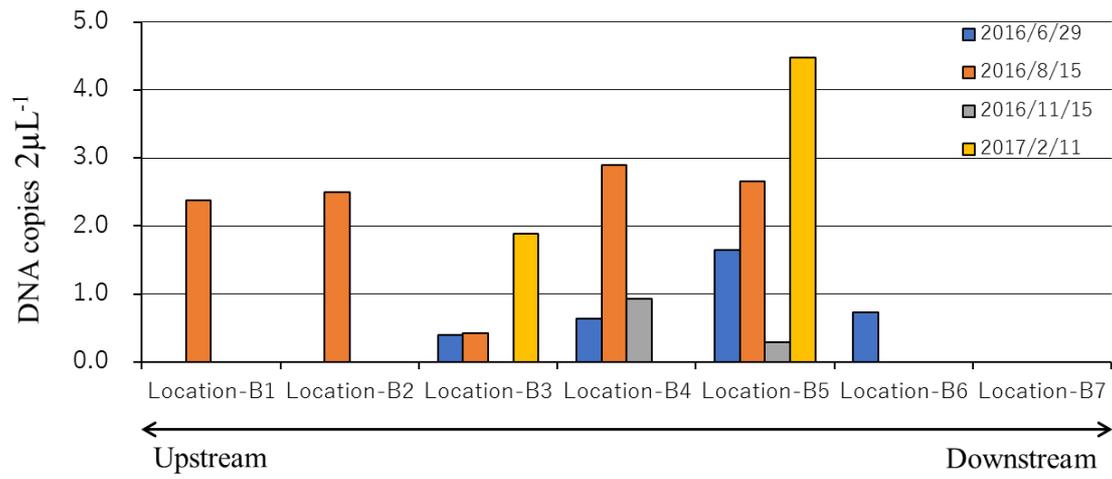


図 3 定量 PCR によるイトウ環境 DNA の季節推移。

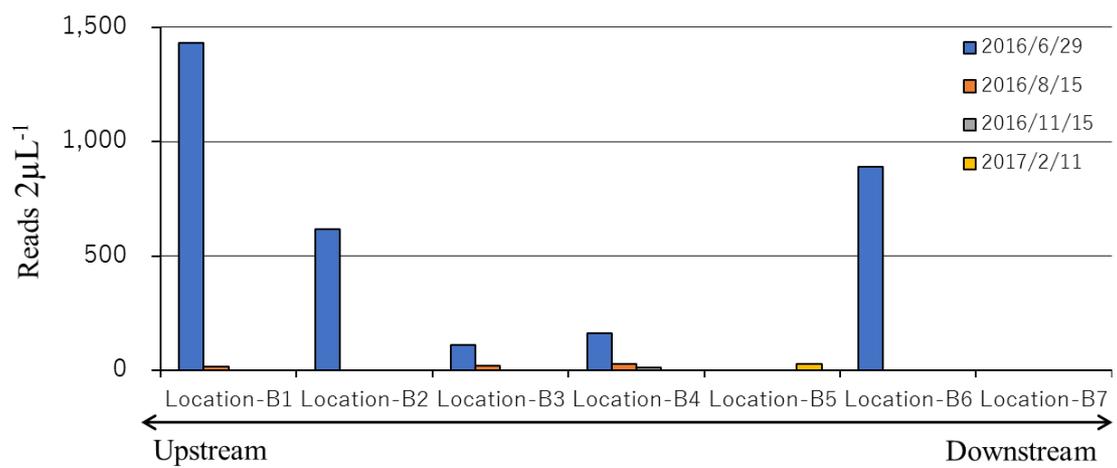


図 4 NGS によるエゾウグイ環境 DNA の季節推移。