

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号： 1 1 3 0 1
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2020 ~ 2020
課題番号： 2 0 H 0 1 1 7 0
研究課題名 ショットガンプロテオミクスによるアユ由来環境DNAの起源解明

研究代表者

高橋 真司 (Takahashi, Shinji)

東北大学・工学研究科・技術専門職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：天竜川下流域で現地調査を行い、28地点中3地点でアユの産卵床を発見した。産卵床が発見された地点では、アユ由来環境DNAが検出され、環境DNAを活用した産卵床探索の有効性が示された。タンパク質解析用試料については、分光光度計を用いて総タンパク質量を測定し、抽出条件の最適化を達成した。MS装置の不具合によりプロテオミクス解析までは至らなかったが、MS解析用試料の前処理条件の最適化までは達成しており、装置が復旧し次第、測定及びデータ解析に取り掛かる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、環境DNAを活用したアユ産卵床探索の有効性とアユ由来環境DNAの起源物質について探求を行った。これまでの産卵床探索は現地踏査で実施されており、調査員の経験やスキルによって発見確率が変化することが指摘されてきた。本研究で実施した環境DNA法は、調査地点の水試料を採取するだけで在・不在を推定することができ作業効率の向上や客観的な評価をすることができる方法である。また、環境DNAの起源物質解析にプロテオミクスを応用する方法は例が少なく新規的な取り組みであった。

研究分野： 応用生態工学

キーワード： 産卵床 環境DNA プロテオミクス 湧水流路

1. 研究の目的

近年、環境 DNA（以下、eDNA）解析は魚類の産卵床探索にも応用され、サケ科やアユの産卵場の位置推定に貢献している。通常、アユの産卵床は河川本流の瀬で形成されることが多いが、天竜川は上流ダム群からの濁質成分の流入の影響で、本流部では産卵床が形成されにくいことが知られている。これまでの研究により流路内の砂州下端側に形成される湧水流路内の瀬（湧水瀬）でアユ産卵床の存在が確認され、推定卵数とアユ由来環境 DNA（以下 eDNA_{ayu}）濃度との間には正の相関関係が認められた。しかしながら、eDNA_{ayu}には複数の起源物質（体液、表皮、筋肉、糞など）が含まれていると予想され、実際の起源物質は明らかになっていない。そこで、本研究はショットガンプロテオミクスによる eDNA_{ayu} の起源推定を行う事を目的とした。

2. 研究成果

現地調査は静岡県天竜川下流域と岩手県新井田川流域で実施した。新井田川では春季～秋季にかけて計 3 回の現地調査を実施したが秋季調査でアユの産卵床が発見できなかったため本報告では産卵床が確認された天竜川の調査についてのみ報告する。天竜川における現地調査はコロナ禍による行動制限により、秋季調査のみとなった。現地調査実施前に、調査日近傍で平水位時の衛星画像（Sentinel-2、解像度 10m）を入手し、調査対象砂州及び湧水瀬の選定を行なった。調査地点は、流路上端が砂州によって本川と分断されている側流路とし、本川の水の色と比較して濃青である水域を複数選択した。湧水瀬が縦断方向に長大な場合、同一の湧水瀬内で上流、中流、下流と複数地点の調査を行った。比較対象として本川も調査地点に加えた。

各調査地点で水質及び物理環境の測定を行い、同地点でアユの産卵床調査を実施した。アユの産卵床は、新村式アユ産卵床探索筒を用いて河床表層から 10cm 程度の深さまでの河床材料を掘り上げた後、バットに移し、目視にて卵の有無を評価した。卵が発見された場合、速やかに河床材料とともに原位置へ戻した。各地点で採水を行い、水中の FPOM（fine particulate organic matter）を採集し、有機物組成分析に供した。当初の計画では FPOM 及びアユの各部位についてプロテオミクス解析を行う予定だったが、期間前半に TOF-MS の電源部が故障したため測定が不可能となった。そこで、まずタンパク質分析の試料前処理条件の検討を行い装置復旧後に速やかに測定に移れる体制を整えた。加えて、FPOM の有機物組成を評価するために FPOM 中の炭素・窒素安定同位体比を測定した。また、FPOM 中の eDNA_{ayu} を測定し、産卵床の有無と eDNA_{ayu} 濃度の関係について評価した。試料中のタンパク質の可溶化は MPEX PTS reagents を用いて行った。試料からタンパク質を抽出後、トリプシン消化、脱塩、精製を経て MS 解析用試料を得た。

調査の結果、28 地点中 3 地点で産卵床が確認された（図 1、図 2）。産卵床が確認された湧水瀬は、河口から 11.2～13.2km 上流に位置する右岸砂州内にあり、産卵床は同一の湧水流路内に縦断的に分布していた。卵密度と産卵床面積から算出した推定卵数は、上流側から 143192 個、457608 個、200667 個だった。同一地点の eDNA_{ayu} は 1187～1852copies/ml であり、産卵床が発見された全地点で eDNA_{ayu} が検出された。既往研究においても産卵床が存在する地点で eDNA_{ayu} が検出されていることから、eDNA_{ayu} による産卵床探索の有効性が示された。但し、最も高い eDNA_{ayu} 濃度を示した地点からは産卵床は確認されなかったことから、流路内における瀬の位置関係や産卵からの時間経過による濃度変化を考慮して解析する必要がある。FPOM の炭素・窒素安定同位体比は湧水流路と本川地点との間で有意さが確認されたが、産卵床の有無による違いは認められなかった。MS 解析用試料については、分光光度計を用いて総タンパク質量を測定し、抽出条件の最適化を達成した。以上の結果より、FPOM に含まれる eDNA_{ayu} の起源物質を同定するためにはプロテオミクス解析が不可欠であることが明らかとなった。本研究期間で、MS 解析用試料の前処理条件の最適化までは達成しており、装置が復旧し次第、測定及びデータ解析に取り掛かる予定である。



13.2～11.2km 右岸砂州,
2020/10/30撮影

図 1 産卵床発見地点

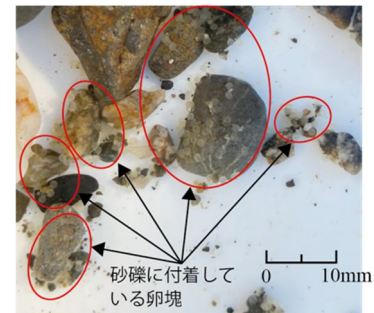


図 2 礫に付着しているアユの卵塊

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 高橋真司
2．発表標題 天竜川における湧水流路に形成されたアユ産卵床の好適性評価
3．学会等名 応用生態工学会2020年度Web研究発表会
4．発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------