

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640136

研究課題名(和文)環境DNAを用いた回遊性サケ科魚類の非侵襲的モニタリングとバイオマス推定

研究課題名(英文) Non-invasive monitoring and biomass estimation of salmonid fish using environmental DNA

研究代表者

荒木 仁志 (ARAKI, Hitoshi)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：20707129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：野生生物のモニタリングや生物資源の正確な把握は生物資源保全学上の急務となっているが、実証的な研究には様々な制限が伴う。殊に水圏に生息する生物はその捕獲が困難で、これまでごく限られた情報を基にその資源量推定を行ってきた。

本研究では水から周辺生物のDNAを検出する環境DNAと呼ばれる技術を用いて、サケ科魚類を対象に、野外で捕獲に頼らず資源量を推定する新しい手法の開発に取り組んだ。その結果、管理環境下では検出された環境DNA量が生物量を反映しており、野外においても河川・海洋を問わず、回遊魚であるサケの季節消長や空間分布をある程度正確に検出できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Monitoring and biomass estimation of wild organisms are of central importance in conservation biology. However, aquatic organisms are difficult to monitor because of their difficulties in catch and visual observations in the wild. In this study, we aimed to establish a new molecular method for monitoring and biomass estimation of salmonid species in the wild. We use environmental DNA, which is defined as DNA from environmental media (e.g., water for fish), in order to identify and estimate the amount of wild organisms nearby. Results from our rearing experiments, together with our trials in rivers and the ocean, suggest that environmental DNA we detected indeed reflects the presence/absence and spatio-temporal variation in salmonid species.

研究分野：生物資源保全学

キーワード：環境DNA サケ科魚類 モニタリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界的規模での人為的環境変化は史上稀に見る速度で生物の大量絶滅をもたらし、第六次大量絶滅期の到来が現実となっている。このため、野生生物の個体群動態把握は生物資源保全学上の急務となっているが、実証的な研究には様々な制限が伴う。殊に水圏に生息する生物はその捕獲が困難で、これまでごく限られた時空間からの情報を基に資源量の推定を行ってきた。

(2) 近年、環境中に存在する生物由来の DNA (環境 DNA) から対象種を検出する手法が開発された。この方法であれば環境水を採集・解析するだけなので個体を捕獲する必要がなく、また安価で非侵襲的なので対象種の生息域を広範囲かつ継続的にモニタリングできる。分担者らの先行研究では湖水などの環境水から魚類の DNA が検出され、実験系ではその検出量とバイオマスとの間に一定の相関がみられることを確認している。

(3) サケ科魚類は日本の主要漁業資源だが、その回遊性・季節性の高さから安定的資源保全や管理が難しい。もし環境 DNA を用いてサケ科魚類の稚魚・親魚の資源量推定が可能となれば、簡便で広範囲、且つ非侵襲的なサケ科魚類のモニタリングと管理が可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は回遊性サケ科魚類から水中に放出された環境 DNA を非侵襲的に検出・定量化することで生物資源量を大規模且つ継続的に把握する全く新しい技術を確立することにある。この手法は個体捕獲によらないため安価で汎用性が高く、野生動物保全モニタリングに革命的变化をもたらす。具体的目標は、1) サケの成長段階ごとの環境 DNA 量を測定し成長に伴うバイオマス推定技術の開発、2) サケ科魚類に特異的な環境 DNA を同時に検出、定量化する技術の開発、3) 上記複数種が混在する河川、海域において実際にバイオマスを推定、捕獲量等のバイオマス推定値との比較検証、の3つである。

3. 研究の方法

(1) サケのバイオマス推定技術の開発：国立研究開発法人・水産研究・教育機構・千歳さけます事業所の協力の下、サケ仔稚魚の飼育実験を行う。管理条件下で受精卵から魚の成長とともに変化する環境 DNA 量を測定することで、生物量相関や補正の必然性を検討する。

(2) 環境 DNA の由来の解明：上記飼育実験では発生初期のサケを用いる。彼らはまだ消化器官が整っておらず、糞をしない。これにより、糞以外の由来の環境 DNA が検出され得るのかを解明する。

(3) 自然環境下での環境 DNA：申請者が所属する北海道大学のキャンパス周辺には、多くのサケマス遡上河川が存在する。これらの河川や海での採水を行い、サケマスの季節変動や分布変化をこの技術で捉えられるか、検証する。

4. 研究成果

(1) サケのバイオマス推定技術の開発

環境 DNA 量定量のためのサケ受精卵は国立研究開発法人・水産研究・教育機構・千歳さけます事業所にご提供いただいた。これらの供試魚は千歳川遡上サケ親魚由来で、死骸は同事務所職員により適宜カウント後除去された。供試魚は4月時点で9割以上が生残していたため、生存個体は実験終了後、全て千歳川に放流された。

飼育実験は2014年11月から2015年4月、2015年11月から2016年4月にかけての2期にわたり、同事業所の一角に長さ3.5m、幅35cm、高さ30cmの増収型アトキンス2間槽3機、計6レーンを設置して行った(図1)。



図1. サケ仔稚魚飼育実験

各レーンで飼育するサケ受精卵は2500粒が3レーン、850粒が3レーンとしたが、今回は2500粒の3レーンの解析結果について報告する。なお、注水量は100-105リットル/分とし、水位は最終的に21.5cmとなるよう調整した。初年度は水深11cmから魚の成長に合わせて水位上昇などの調整を行ったため、環境 DNA 濃度を推定する際には水の体積に比例した補正を行った。

飼育水は供試魚生育槽の下流側から毎回2リットルを未使用の使い捨てピッカーを用いて採取し、入水部の水1リットルと併せて採水直後に現場でワットマン GF/F フィルターを用いてろ過した。飼育水はフィルター1枚当たり1リットルをろ過し、1回1レーン当たりのサンプル数を3(2レプリケート+1ネガティブコントロール)とした。飼育水の水源は同施設そばの湧水で、飼育実験前に

この水にサケ DNA の混入がないことを確認している。

サケ仔稚魚の生育は水温と生育時間によってコントロールされる。千歳川由来のサケの場合、受精からの積算水温が 250 度前後で発眼し、500 度前後でふ化する(図 2)。このため、採水は受精卵導入前、積算水温 51 度、476 度、510 度、646 度、740 度、918 度、1012 度(2014 年度は 1020 度) 1105 度(2014 年度は 1097 度)、1190 度(2014 年度は 1182 度)、1292 度(2014 年度は 1275 度)の 1 期計 11 回行った。



図 2 . 積算水温 510 度でふ化したサケ仔魚

これらのフィルターサンプルは冷凍保存後、北大農学部動物生態学研究室(荒木研)で研究室スタッフにより DNA 抽出に供され、サケ環境 DNA 検出用に独自に開発したサケ特異的プライマーとプローブを用いて同研究室所有の定量 PCR 装置(アジレント・テクノロジー社 Mx3000P)による DNA 量測定に用いられた。測定は抽出 DNA 1 サンプル当たり 3 回実施し、同時に測定した DNA 量が既知のスタンダードによる検量線を用いて DNA コピー数への換算を行った。

その結果、発眼卵からの環境 DNA 放出はあるとしても微量で限定的な一方、ふ化後は数週間うちに指数関数的な増加を見せ、その後卵嚢を吸収し、浮上して採餌を始めた後は放出量の増加が抑えられる傾向があることが明らかとなった(Araki et al. in prep. 図 3)。

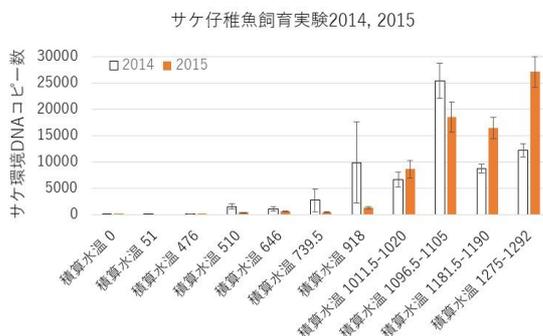


図 3 . サケ環境 DNA と積算水温の関係

この期間のサケ生物量の変化は主に体サイズの増加によるものであることから、この結果は環境 DNA 量がサケの体サイズに比例して増加していることを示している。

(2) 環境 DNA の由来の解明

上記サケ仔稚魚飼育実験の二つ目の目的は、環境 DNA の由来を解明することにある。消化器官が未発達なサケ仔魚(積算水温 900 前後まで)の間に環境 DNA 量の顕著な増加が見られたことは、少なくとも糞のみに依存して環境 DNA の検出がされているわけではないことを示している。同時に卵嚢を吸収して浮上・採餌を開始したサケ稚魚では環境 DNA 量の顕著な増加が見られないことから、卵嚢期においては体表の粘液細胞の活動が活発で、表面積依存的な環境 DNA 量増加が認められる一方、浮上して採餌するようになると、絶対値としての環境 DNA 量は多いものの表面積依存的ではない生物量を反映していることが示唆された。

(3) 自然河川内での環境 DNA

上述のように飼育実験下ではサケの生物量と環境 DNA 量に明確な正の相関が見られたが、自然環境にはこの相関に影響しうる様々な要因が存在している。そこで、本研究ではサケ遡上河川である千歳川でのサケ環境 DNA の季節消長と空間分布を推定した。

千歳川においては産卵床の存在する上流部から本流 5 地点、同じく産卵床が存在し目視も可能な支流 2 地点を定点とした。このうち本流 5 地点では、野生サケ親魚遡上が目視された冬季およびサケ稚魚が河川内に存在する可能性の高い春季にはサケ環境 DNA 量の上昇がみられる一方、サケ稚魚が降河し終わった夏季には河川内の環境 DNA は非検出となり、飼育実験結果から予想されるパターンと一致することが明らかとなった(Araki et al. in prep. 図 4)。

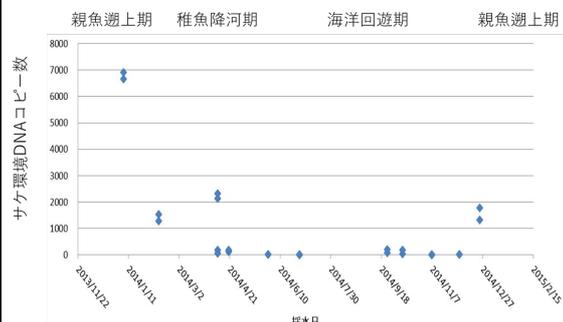


図 4 . 千歳川サケ環境 DNA 量の季節変化

また、サケ親魚遡上期に定点間での環境 DNA 量比較を行ったところ、産卵床そばの最上流部で高い値が検出される一方、そこから 12km 離れた中流部では低い値が、そこか

ら更に 8km 下流では中程度の値が検出されたが、最下流部では検出がされなかった。このようなパターンは河川内での環境 DNA 検出に強い空間的制約が働いていることを示している。

この検出範囲をより正確に評価するため、札幌市豊平川さけ科学館にご協力いただき、同じサケ科魚類で同科学館内で飼育しているイトウ由来の環境 DNA が、河川排水を起源として隣接する真駒内川においてどこまで検出可能か調べた。

この施設には 1 歳、3 歳、10 歳および 15+ 歳のイトウが飼育されているが、このうち 10 歳のイトウ飼育水槽からは 1 尾あたり 351.5 コピーの環境 DNA が検出された。これら施設内の飼育水はろ過水槽などを介して最終的に真駒内川に流入しており、飼育水が河川に合流する直前には 174-272 コピーのイトウ環境 DNA が検出された。初期値としては当初予想より低い結果だったが、河川内のイトウ環境 DNA は河川接続点より 40m-80m 下流でも検出された。これらの値から環境 DNA の指数減衰を仮定すると、DNA 発生源（自然状態では魚の位置）からの距離と環境 DNA 検出の相対量期待値が算出できる。例えば、10 歳のイトウが河川内に 1 尾いたとすると、その検出限界は 80-190m の範囲になることが予想される。

より小規模河川での環境 DNA 量と対象生物の位置の関係をみるため、千歳川支流における環境 DNA の定量も実施した。その結果、目視したサケの河川内位置関係と環境 DNA の測定点に強い関連は見られなかったものの、河川内に目視確認したサケ親魚数の週平均をとると、週最終日の環境 DNA 量との有意な相関が見られた ($r = 0.82, p < 0.01$, 図 5)。

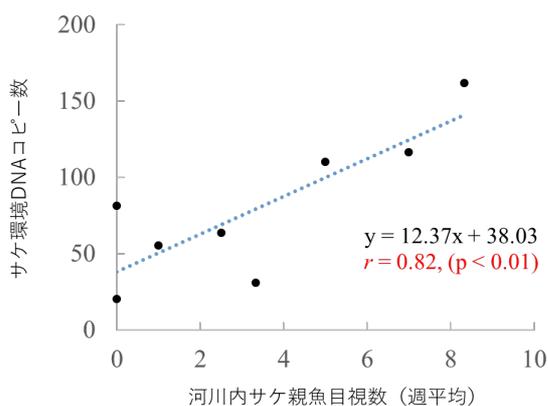


図 5 . 千歳川支流サケ環境 DNA 量と目視数相関

(4) 海洋沿岸環境 DNA アプリケーション

サケは回遊性であり、その生活史の多くの割合を海で過ごす。そのため、多角的なサケの資源管理を行う上で、海洋における環境 DNA の検出技術を確立する必要がある。

このため、国立研究開発法人・水産研究・教育機構が毎年夏季に行う定期ベーリング航海調査において、9 定点での環境 DNA 採集と解析を行ったところ、各定点で大きくコピー数の異なる良好なサケ環境 DNA 検出が確認された (Araki et al. *in prep.* 図 6)。

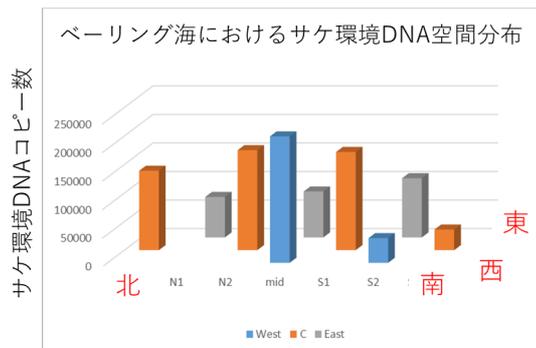


図 6 . ベーリング海 9 定点におけるサケ環境 DNA

ただし同定点におけるトロール調査で捕獲されたサケ稚魚数との環境 DNA 量相関はみられず、やはり海洋においても検出される環境 DNA 量は比較的狭い範囲の生物量を反映していることが示唆された。

海洋域での環境 DNA 検出量と生物量の関係を解明するため、申請者らも参画している CREST の環境 DNA グループとの共同研究において、京都・舞鶴湾におけるマアジの資源量推定を行った。本研究では魚群探知機を用いて舞鶴湾西部でのマアジ魚影を定量化しつつ、同日に 47 地点に及び環境 DNA 採集を船上で行うことで、両者の整合性を評価した。その結果、環境 DNA は海洋域においても対象魚の資源量を反映する正の相関が見られる一方、湾奥に存在する魚市場の影響を最も強く受けていること、環境 DNA が反映している資源量の範囲は周辺数百メートルであることが示された (Yamamoto et al. 2016, 2017)。また、サケを含む魚類全般を対象種を絞らずに環境 DNA から検出する新しい手法も、大きな本研究成果の一つといえる (Miya et al. 2015)。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

S. Yamamoto, R. Masuda, Y. Sato, T. Sado, H. Araki, M. Kondoh, T. Minamoto, M. Miya. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Sci. Rep.* 7: 40368. DOI:10.1038/srep40368. (2017)

S. Tsuji, H. Yamanaka, T. Minamoto. Effects of water pH and proteinase K

treatment on the yield of environmental DNA from water samples. *Limnology* 18; 1-8. DOI: 10.1007/s10201-016-0483-x. (2017)

H. Yamanaka, T. Minamoto, J. Matsuura, S. Sakurai, S. Tsuji, H. Motozawa, M. Hongo, Y. Sogo, N. Kakimi, I. Teramura, M. Sugita, M. Baba, A. Kondo. A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology* 17; 233-241. DOI: 10.1007/s10201-016-0508-5. (2017)

H. Doi, R. Inui, Y. Akamatsu, K. Kanno, H. Yamanaka, T. Takahara, T. Minamoto Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshw. Biol.* 62; 30-39. DOI: 10.1111/fwb.12846. (2017)

S. Yamamoto, K. Minami, K. Fukaya, K. Takahashi, H. Sawada, H. Murakami, S. Tsuji, H. Hashizume, S. Kubonaga, T. Horiuchi, M. Hongo, J. Nishida, Y. Okugawa, A. Fujiwara, M. Fukuda, S. Hidaka, K.W. Suzuki, M. Miya, H. Araki, H. Yamanaka, A. Maruyama, K. Miyashita, R. Masuda, T. Minamoto, M. Kondoh. Environmental DNA as a 'Snapshot' of fish distribution: a case study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS One* 11: e0153291. DOI: 10.1371/journal.pone.0149786. (2016)

H. Yamanaka, H. Motozawa, S. Tsuji, R. C. Miyazawa, T. Takahara, T. Minamoto On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. *Ecol. Res.* 31; 963-967. DOI: 10.1007/s11284-016-1400-9. (2016)

M. Miya, Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J.Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh, W. Iwasaki. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Roy. Soc. Open Sci.* 2: 150088. DOI: 10.1098/rsos.150088 (2015)

S. Fukumoto, A. Ushimaru, T. Minamoto 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: 358-365. DOI: 10.1111/1365-2664.12392. (2015)

〔学会発表〕(計13件)

Hitoshi Araki 「Environmental DNA as an Ecological Tool for Salmonid Fish Distribution」日本生態学会全国大会 (2017.3/15, 早稲田大学(東京都))

荒木仁志 「見えない生物多様性を見る - 環境DNA技術の可能性-」北海道海洋生物科学研究会 (2017.1/20, 北海道大学(北海道・札幌市))

荒木仁志 「フィールドリサーチツールとしての環境DNA: 現状と課題」魚類系統研究会 (2016.12/11, 北海道大学(北海道・苫小牧市))

荒木仁志 「環境DNAを用いた水圏動物研究: 現状と課題」ゲノム多様性ワークショップ (2016.12/7, 北海道大学(北海道・札幌市))

荒木仁志 「環境DNAを用いた生物フロンティアの開拓」日本進化学会大会 (2016.8/25, 東京工業大学(東京都))

荒木仁志 「環境DNA研究の実践と課題: 生態学フロンティアへの挑戦」日本生態学会全国大会(2016.3/24, 仙台国際センター(宮城県・仙台市))

高原輝彦 「湖沼や河川に浮遊・存在するDNA断片を用いた生物モニタリング手法の開発」日本生態学会全国大会 (2016.3/24, 仙台国際センター(宮城県・仙台市))

源利文 「環境DNA分析によってどのような情報が得られるのか?」日本生態学会全国大会(2016.3/24, 仙台国際センター(宮城県・仙台市))

荒木仁志 「環境DNAを用いたサケ生態調査手法の確立」サケ学研究会(2015.12/20, 北海道大学(北海道・札幌市))

高原輝彦 「環境DNAを用いた流水環境におけるアユの生物量の推定」水環境フォーラム(2015.9/5, 山口大学(山口県・宇部市))

荒木仁志 「環境DNA: NGSがもたらす生態情報を進化学にどう活かすか」日本進化学会大会 (2015.8/20, 中央大学(東京都))

H. Araki 「eDNA for investigating unrevealed aquatic biodiversity」Unraveling Biodiversity from DNA Symposium (2014.9/19, 国立環境研究所(茨城県・つくば市))

T. Minamoto 「Marine fish surveys using environmental DNA」Ecological Society of America (2014.8/12, サクラメント市(アメリカ))

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

（ 1 ）荒木仁志「小さくても力持ちな DNA の話 遺伝子を透して見る世界 」市民公開講座・時計台サロン（2017. 2/14, 札幌時計台（北海道・札幌市））

（ 2 ）荒木仁志「サケの環境 DNA 研究」市民公開講座さーもん・かふえ（2016. 7/1, エスポワールいわて（岩手県・盛岡市））

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒木 仁志 (ARAKI, Hitoshi)
北海道大学大学院・農学研究院・教授
研究者番号：20707129

(2)研究分担者

源 利文 (MINAMOTO, Toshifumi)
神戸大学・人間発達環境学研究科・特命
助教
研究者番号：50450656

高原 輝彦 (TAKAHARA, Teruhiko)
島根大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：10536048

(3)連携研究者

近藤 倫生 (KONDO, Michio)
龍谷大学・理工学部・教授
研究者番号：30388160

土居 秀幸 (DOI Hideyuki)
兵庫県立大学・大学院シミュレーション
学研究科・准教授
研究者番号：80608505

(4)研究協力者

佐藤 俊平 (SATO, Shunpei)
国立研究開発法人水産研究・教育機構・
北海道区水産研究所・主任研究員
研究者番号：70425461