

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03005

研究課題名(和文) 環境DNAを用いたサケ科魚類および回遊性魚類の種内多型解析手法の開発

研究課題名(英文) Development of eDNA methods for estimating intra-genetic variation of salmonid and migratory fish species

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：サケ科魚類は水産資源として高い価値を有すると同時に、食物連鎖を介して森・川・海を繋ぐ重要な生態的役割を担っている。しかし、生活史を通して広範囲に移動する彼らの生態を網羅的に把握するのは非常に困難で、生物保全・管理上の障壁となっている。そこで本研究では広域の生物分布を効率的に推定可能な環境DNA技術を応用し、種内変異解析を可能な技術へと発展させることで、周辺生物の分布と同時にその遺伝的多様性の推定を実現した。その結果、河川水に含まれるDNAから絶滅危惧種イトウの分布とその制限要因となりうる外来種ニジマスの影響を定量的に評価できたほか、北日本のサケの系統群を明確に区別することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サケなどの回遊性魚類は重要な水産資源であると同時に、食物連鎖を介して陸と海を繋ぐ重要な生態的役割を担っている。しかし、広範囲に移動する彼らの生態を網羅的に把握するのは非常に困難で、生物保全・管理上の障壁となってきた。そこで本研究では環境DNA技術を応用し、周辺水圏生物の存在や分布のみならず、種内多型に関する情報の推定を試みた。その結果、希少種イトウの分布制限要因となるニジマスの影響を定量評価したほか、サケの個体群の遺伝的構成を環境水から再現することに成功した。これらの結果は水産有用種のみならず希少種・外来種管理に広く応用可能で、今後の生物モニタリングに広く適用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Salmonid fishes are highly valuable as fishery resources and play an important ecological role in linking forests, rivers, and oceans through the food chain. However, it is very difficult to comprehensively understand their ecology as they move over a wide area throughout their life history. In this study, we applied environmental DNA technology, which can efficiently estimate the distribution of organisms over a wide area, and developed it into a technology that can analyze intraspecific variation, thereby realizing the estimation of the distribution of aquatic organisms and their genetic diversity at the same time. As a result, we were able to quantitatively evaluate the distribution of Sakhalin taimen and the impact of non-native rainbow trout from DNA contained in river water. In addition, we were able to clearly distinguish the phylogenetic relationship of chum salmon in northern Japan.

研究分野：分子生態学

キーワード：環境DNA 種内多型 魚類

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

サケに代表される回遊性魚類は水産資源として高い価値を有すると同時に、食物連鎖を介して森・川・海を繋ぐ重要な生態的役割を担っている。しかし、生活史を通して広範囲に移動する彼らの生態を網羅的に把握するのは非常に困難で、生物保全・管理上の障壁となっている。

そもそも水圏生物の生態解明には様々な技術的障害がある。河川や湖沼、海洋の環境変動を測定する技術が日進月歩な一方、水圏生物の調査には依然として捕獲網や電気ショッカーが用いられている。これらの方法では調査に多大な労力がかかる上、その結果が調査者のスキルや専門知識に強く影響される。また希少種や外来種については、その発見すらままならないことが多い。

そこで救世主として期待されているのが「環境 DNA 技術」である。野生生物の周辺には水、空気、土壌といった環境媒体が存在するが、近年この環境媒体、特に環境水中に検出可能な量の DNA (以下、環境 DNA) が存在することが分かってきた。これを解析することで捕獲に依らず、周辺水圏生物の存在、生物量や分布、その時空間変動に関する情報が得られる。更にこの技術は申請者らの先行研究により、一度に数百もの魚類相解析が出来る系へと発展を遂げてきた。一方でサケ科魚類については種分化してからの時間が比較的短く、遺伝的な差異が少ないことから環境 DNA に含まれる短い DNA 断片から種や系統群を見分けることは困難とされてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では環境 DNA 技術を種内多型解析ツールとして発展させ、地域特異性の高い回遊性魚類の生物分布と遺伝的多様性を同時に評価する手法の開発を目指す。サケに代表される回遊性魚類は日本人にとって資源・文化両面から極めて重要な存在だが、分布域における季節性や個体群の遺伝的特性は網羅的な捕獲調査の困難さ故にしばしば著しく制限されている。そこで本研究では河川・沿岸で採取した環境水から DNA を抽出し、これを解析することで回遊魚の移住特性と遺伝的背景の関係を明らかにする。これにより非侵襲的で効果的な野生動物の集団遺伝解析が実現し、周辺生物・生息環境を含めた生態系の管理に必要な情報を得ることが可能となる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 環境 DNA サンプリング

研究室でこれまでに集積した環境 DNA サンプルに加え、石狩川水系の千歳川や世界自然遺産・知床半島の河川、滋賀県姉川や秋田県雄物川水系の河川・湖沼・溜池などから定期的に採水・ろ過を行い、環境 DNA サンプルの収集を行った。この際、水温や電気伝導率、塩濃度や濁度、溶存酸素量や pH 等の水質情報に加え現場周辺の生物目視情報等を記録し、その後の解析に供した。

#### (2) 環境 DNA 分析手法の確立

環境 DNA 分析手法は近年、飛躍的な発展を遂げつつある。特に環境 DNA を濃縮するためのろ過手法は黎明期から大きく様変わりしており、長期モニタリング時に手法の選択を難しくしている。このため研究室で長年継続してきた定点環境 DNA 収集については比較的為、グラスメンブレンを用いた従来のろ過手法を継続する一方、新規調査地点での環境 DNA 収集についてはステリベクス (カートリッジ式ろ紙) を用いた最新の手法を用いて分析を行った。

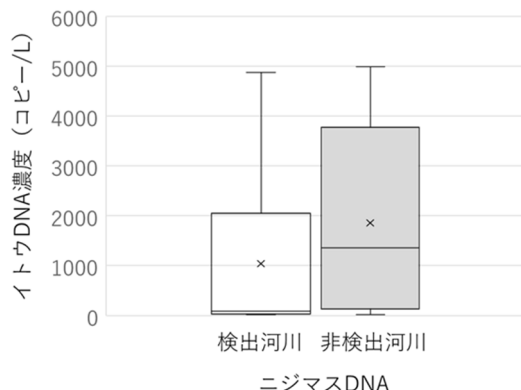
環境 DNA サンプルから種内多型情報を得るため、サケ亜科に注目した新規 PCR プライマーの開発を行った。これを用いて PCR を行った後、次世代シーケンサー (iSeq) による超並列アンプリコン解析により種内多型を検出し、集団遺伝解析に供した。また同所的に生息する魚類を推定するため、一部のサンプルについては先に我々が開発を行った魚類メタバーコーディング用の PCR プライマー (MiFish) や種特異プライマーによる解析を行い、種間相互作用解析に供した。なお、千歳川環境 DNA サンプルの一部については全国的な環境 DNA モニタリングデータベース (ANEMONE, <https://db.anemone.bio/>) にも提供し、MiFish 解析の結果を一般公開している。

### 4. 研究成果

サケ科魚類の種内多型解析技術開発に先立ち、サケ科魚類についてこれまで困難とされてきた環境 DNA を用いた種判別が可能なプライマー (SalmonU4) の開発を行った。このためデータベース登録されたサケ科魚類 19 種の DNA 配列を収集、これをもとに国内に生息する全てのサケ科魚類について種判別可能な領域を選別しプライマーをデザインした。その後、サケ科 10 種の組織由来 DNA を用いて実際に検出能を確認したのち、札幌市豊平川さけ科学館の協力の下、同館で飼育している 16 種のサケ科魚類水槽から採水を行い、環境 DNA サンプルを採集して太平洋サケ属 8 種、大西洋サケ属 2 種 (全種)、イワナ属 5 種、イトウ属 1 種 (全種) の識別能を確認した。

本プライマーを用いて研究室で保有する全道約 300 河川の環境 DNA サンプルの解析を行った結果、IUCN によって絶滅危惧種 (CR) に指定されているイトウ (*Parahucho perryi*) の高精度分布を推定することに成功した (Kanbe et al. *submitted*)。同時に特定外来種ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) についても解析を行い、両種が道内の複数河川で分布を重複させており、その種間相互作用の結果、イトウの生物量が減少している可能性が明らかとなった (図 1)。

図1 環境 DNA 解析で推定された、イトウ DNA 濃度のニジマス DNA 検出・非検出河川における二群比較。×が各群の平均値、横線が中央値を示す (Kanbe et al. *submitted*より一部改変)。



サケを対象とした種内多型解析用のプライマーは、突然変異率が通常の点突然変異と比べ 10-100 倍高いことで知られるマイクロサテライト領域を対象にデザインした。その結果、22 遺伝子座中 21 座については種内多型を確認する一方、一部の領域では同時に他のサケ科魚類由来の DNA 増幅も認められた。このためサケ由来の DNA のみが増幅可能な 10 遺伝子座について追解析を行い、うち 8 遺伝子座について通常的环境 DNA メタバーコーディング解析手法である 150bp のペアエンドシーケンシングに加え、より反復配列数の多い、長い DNA 塩基配列も解析可能な 300bp シングルリードシーケンシングに供して結果を比較した (図 2)。その結果、8 遺伝子座のうち少なくとも 3 座については 150bp ペアエンドでは得られない、反復配列数の多い対立遺伝子を 300bp シングルリードで検出可能であることが分かった。更にこれらの最適化された遺伝子座セットを組み合わせた分子系統樹を作成し、北海道内の複数のサケ個体群、本州のサケ個体群を環境水から明確に識別できることが明らかとなった (Araki et al. *in prep.*)。

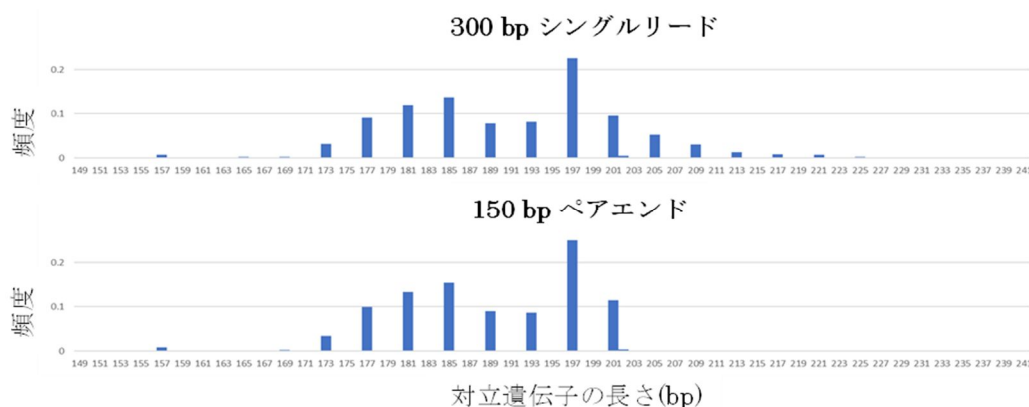


図2 千歳川サケ蓄養池由来の環境 DNA から推定したマイクロサテライト対立遺伝子頻度

石狩川水系の支流である千歳川では、環境 DNA 解析により種内変異に加えサケの季節性や生物量変動、他種との相互作用を解明する試みを行った。その結果、千歳川においてサケの河川利用とウグイの季節動態には一年を通して明確な相関があることが判明し、両種の間産卵床等の空間資源を巡る種間相互作用が存在する可能性が示された (Onyekamma et al. *in prep.*)。

世界自然遺産・知床の河川においては毎年約 40 河川での採水調査を行い、知床河川で報告事例のある絶滅危惧種オシロコマの遺伝子浸透個体 (アメマスの遺伝子がオシロコマのゲノムの一部に置換した個体) の割合について、河川間でどのように異なるのか、また個体数変動がどの程度ばらつくのか環境 DNA を基に推定する試みを行った。その結果、1) 知床河川におけるオシロコマの個体数は酷暑だった 2021 年夏には一時的に減少した可能性はあるもののその後は回復傾向にあること、2) 河川ごとの遺伝子浸透率は年間を通して安定していることに加え、同じサンプルを q-PCR 解析に供することで 3) 外来種アメリカミンクの定着とオシロコマの河川内密度に強い相関はないものの、ミンクはサケマス増殖河川に多く出現する傾向、の 3 点が明らかとなった (Ozawa et al. *in prep.*, Takaba et al. *in prep.*)。

同じくイワナ属に含まれるアメマスにはナガレモンイワナとよばれる特殊な表現型が知られており、希少形態型として保全対象とされている。滋賀県・姉川水系では捕獲によるこの魚の保全学調査が行われていたため、本研究ではこれに加え姉川水源近傍で採水調査を行い、ナガレモンイワナの河川内動態と種内多型 (ハプロタイプ) の詳細分布を明らかにした (Araki et al. *submitted*)。その結果、この魚は従来想定されていたより多くの支川に生息しており、また水源によってハプロタイプ組成が異なることが明らかとなった。加えて秋田県・雄物川水系で実施した環境 DNA メタバーコーディング解析の結果、溜池生態系においては肉食性もしくは侵略的外来種の中でも特にオオクチバスの影響が強く、在来種の平均 4 割がオオクチバスの侵入により局所絶滅している可能性が示された (小粥ら *in press*)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 HAYAMIZU Masato, ISHIYAMA Nobuo, MIZUMOTO Hiroki, KANBE Takashi, SHIMODA Kazutaka, MISAKA Naoyuki, URABE Hirokazu, NAGASAKA Akiko, NAGASAKA Yu, ONO Satoru, ARAKI Hitoshi, NAKAJIMA Nobuyoshi, FUKUSHIMA Michio	4. 巻 24
2. 論文標題 Effectiveness of check-dam improvement on freshwater fishes: assessment based on long-term monitoring and environmental DNA applicability.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ecology and Civil Engineering	6. 最初と最後の頁 61～73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3825/ece.20-00043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araki Hitoshi, Kanbe Takashi, Yamanaka Hiroki, Minegishi Yuki, Koizumi Noriyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 edna2021: The fourth annual meeting of The eDNA Society “Species distributions, and beyond”	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 487～491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/edn3.278	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mizumoto Hiroki, Kishida Osamu, Takai Kotaro, Matsuura Naru, Araki Hitoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Utilizing environmental DNA for wide-range distributions of reproductive area of an invasive terrestrial toad in Ishikari river basin in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological Invasions	6. 最初と最後の頁 1199～1211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10530-021-02709-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Minamoto Toshifumi, Miya Masaki, Sado Tetsuya, Seino Satoquo, Doi Hideyuki, Kondoh Michio, Nakamura Keigo, Takahara Teruhiko, Yamamoto Satoshi, Yamanaka Hiroki, Araki Hitoshi, Iwasaki Wataru, Kasai Akihide, Masuda Reiji, Uchii Kimiko	4. 巻 3
2. 論文標題 An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 8～13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/edn3.121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mizumoto Hiroki, Mitsuzuka Takashi, Araki Hitoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 An Environmental DNA Survey on Distribution of an Endangered Salmonid Species, Parahucho perryi, in Hokkaido, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 569425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fevo.2020.569425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yatsuyanagi Tetsu, Araki Hitoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Understanding seasonal migration of Shishamo smelt in coastal regions using environmental DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0239912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0239912	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yatsuyanagi Tetsu, Ishida Ryotaro, Sakata Masayuki K., Kanbe Takashi, Mizumoto Hiroki, Kobayashi Yumi, Kamada Shoko, Namba Satoko, Nii Hisaya, Minamoto Toshifumi, Araki Hitoshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Environmental DNA monitoring for short term reproductive migration of endemic anadromous species, Shishamo smelt ( <i>Spirinchus lanceolatus</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 130 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.50	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件(うち招待講演 3件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 荒木仁志
2. 発表標題 環境DNAを透して見る北方水圏生態系の生き物たち
3. 学会等名 日本動物学会北海道支部・公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木仁志
2. 発表標題 環境DNAを用いた生物相モニタリングとその活用
3. 学会等名 全国湖沼河川養殖研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hitoshi Araki, Hiroki Mizumoto, Tetsu Yatsuyanagi, Takashi Kanbe
2. 発表標題 Anadromous fish monitoring using environmental DNA
3. 学会等名 NPAFC-IYS workshop（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水本寛基、三塚多佳志、荒木仁志
2. 発表標題 絶滅危惧種イトウの分布解明
3. 学会等名 野生生物と社会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahito Ikeda, Takashi Kanbe, Hitoshi Araki
2. 発表標題 Seasonally differentiated distributions of the two smelt species in Hokkaido
3. 学会等名 環境DNA学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Kato, Takashi Kanbe, Hitoshi Araki
2. 発表標題 eDNA survey on distribution of domestic alien freshwater shrimp, <i>Paratya compressa</i> , in Hokkaido
3. 学会等名 環境DNA学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki MIZUMOTO, Osamu KISHIDA, Kotaro TAKAI, Naru MATSUURA, Hitoshi ARAKI
2. 発表標題 An eDNA survey on toxic invasive toad in Hokkaido
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hitoshi Araki, Hiroki Yamanaka, Kimiko Uchii, Michinobu Kuwae, Hideyuki Doi
2. 発表標題 Environmental DNA for identifying "red zone" of endangered/invasive species
3. 学会等名 PICES (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hitoshi Araki, Hiroki Yamanaka, Kimiko Uchii, Michinobu Kuwae, Hideyuki Doi
2. 発表標題 Development and Application of Environmental DNA Techniques for Evaluating Distribution and Population Status of Rare/Invasive Species
3. 学会等名 環境DNA学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水本 寛基、亀甲 武志、荒木 仁志
2. 発表標題 環境DNAを用いたナガレモンイワナのハプロタイプ解析
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八柳哲、神戸崇、水本寛基、福島路生、中嶋信美、荒木仁志
2. 発表標題 環境DNAにより推定された、純淡水魚フクドジョウの分布傾向と系統地理
3. 学会等名 日本進化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroki MIZUMOTO, Takeshi KIKKO, Takashi KANBE, Jun-ichi TSUBOI, Kentaro MORITA, Hitoshi ARAKI
2. 発表標題 Applicability of an eDNA technique for haplotype analysis on nagaremon-charr
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsu Yatsuyanagi, Takashi Kanbe, Hiroki Mizumoto, Nobuyoshi Nakajima, Michio Fukushima, Hitoshi Araki
2. 発表標題 Phylogeographic analysis on Siberian stone loach based on environmental DNA
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 荒木仁志
2. 発表標題 河川・湖沼の環境DNAアプリケーション
3. 学会等名 信州大学・東京大学・北海道大学・水産技術研究所 合同研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小粥淳史、八柳哲、神戸崇、井上頌子、荒木仁志
2. 発表標題 環境DNAを用いた北日本の溜池における外来魚の影響評価
3. 学会等名 野生生物と社会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hitoshi Araki
2. 発表標題 eDNA applications to rare and invasive species in northern biosphere of Hokkaido, Japan
3. 学会等名 1st Australian & New Zealand Environmental DNA Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 一般社団法人 環境DNA学会、土居 秀幸、近藤 倫生	4. 発行年 2021年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 300
3. 書名 環境DNA	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 edna2021:The 4th annual meeting of The eDNA Society	開催年 2021年～2021年
---	--------------------

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------