

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15578

研究課題名（和文）環境DNAを用いた魚類における新たな産卵行動モニタリング手法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for monitoring fish spawning events using environmental DNA

研究代表者

辻 冴月（Tsuji, Satsuki）

京都大学・理学研究科・特別研究員（PD）

研究者番号：80867656

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：繁殖は生物にとって最も重要なライフイベントのひとつであるため、繁殖生態に関する知識は、特に希少種や水産重要種の資源量の維持や管理において不可欠な情報となる。本研究では、水圏生物の多様性評価手法として近年急速に発展してきた環境DNA分析を応用し、水を汲むだけで非侵襲的かつ効果的に魚類の産卵行動を検出する手法の開発に取り組んだ。その結果、産卵時にはオスから放出された精子によって環境DNA濃度が急上昇するとともに、精子由来環境DNAの特徴的な動態が明らかとなった。さらに、環境DNA分析に基づいて、舞鶴湾におけるマアジの地先産卵時期と場所を推定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで直接的な捕獲や観察が必須であった魚類の産卵調査において、水を汲むだけで非侵襲的かつ効果的に産卵の発生や規模を推定する手法を新たに提供することができた。また、これまで種多様性を評価する手法として発展してきた環境DNA分析技術において、対象種の行動を検出する手法としての新たな展開を提示し、さらなる技術開発を促進するものとなったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：As reproduction is one of the most important life events for macroorganisms, knowledge of reproductive ecology is essential information for maintaining and managing rare species and commercially important aquatic species. In this study, we applied environmental DNA (eDNA) analysis, which has rapidly developed in recent years as a method for assessing aquatic biodiversity, to develop a non-invasive and effective method for detecting fish spawning behaviour simply by sampling water. As a result, we observed a significant increase in eDNA concentration during spawning due to sperm released from males, and the characteristic dynamics of sperm-derived eDNA were revealed. Furthermore, we successfully estimated the timing and location of the spawning of Japanese horse mackerel (*Trachurus japonicus*) in Maizuru Bay using an eDNA-based spawning survey.

研究分野：水域生態学

キーワード：環境DNA 産卵 精子 マアジ アユ 舞鶴湾

1. 研究開始当初の背景

繁殖は生物にとって最も重要なライフイベントのひとつである。そのため、繁殖生態に関する知識は、特に希少種や水産重要種の資源量の維持や管理において不可欠な情報となる。一般的な産卵調査では、親魚や卵の採集・観察に基づき、産卵期や産卵場所、産卵量などを推定する。しかし、これらの手法はいずれも産卵期の過敏な時期に対象個体や生息場所へダメージを与えるほか、夜間や広い範囲で産卵を行う種では調査自体が困難、かつ観測誤差も大きくなるという課題があった。

そこで、本研究では、水圏生物の多様性評価手法として近年急速に発展してきた環境 DNA 分析を応用し、水を汲むだけで非侵襲的かつ効果的に魚類の産卵行動を検出することができないかと着想した。環境 DNA とは、生物からフンや粘液、表皮細胞などの形で放出された DNA 全般を指し、魚類などの体外受精を行う種では産卵時に放出された精子なども環境 DNA として回収される。しかし、現状では野外において対象種の産卵期に環境 DNA 濃度が上昇するという報告がいくつか散見されるのみであり、産卵行動の「何が」環境 DNA 量に「どのような」影響を与えるかについての知見が欠落していた。また、産卵期における環境 DNA 濃度の上昇が主にオスから放出された精子に起因する場合、産卵時間帯を中心とした大幅な環境 DNA 濃度の日周変化が起こることが想定されるが、これまで検証された例はない。

2. 研究の目的

本研究では、魚類の産卵がいつ・どこで・どれだけ行われたかを効果的に検出するための、環境 DNA 分析に基づく新しいアプローチ法を提案することを目的とした。まず、水槽実験により産卵行動が環境 DNA 濃度に与える影響やその主要因、特徴的な動態を明らかにすることを目指した。次に、産卵期における河川での環境 DNA 濃度の日周変化を観察し、環境 DNA 分析に基づく産卵調査におけるサンプリング時間の重要性について検討した。さらに、産卵期に特異的な環境 DNA 変動を利用した産卵検出の実例を提示するため、舞鶴湾における水産重要魚種マアジの地先産卵の検証に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 産卵行動において環境 DNA 濃度を上昇させる主要因の検討

まず、飼育下で容易に交雑するミナミメダカ *Oryzias latipes* とキタノメダカ *O. sakaizumii* を雌雄の組み合わせが異なるように 1 尾 : 1 尾で飼育し、水槽内で産卵させた。産卵の前後で採水を行い、雌雄どちらの環境 DNA 濃度が上昇するか調べた。次に、ミナミメダカのメス 10 尾とキタノメダカのオス 6 尾を水槽で飼育し、点灯 15 分後および産卵行動が確認されるたびごとの採水を行った。この一連の採水を飼育開始後 5、9、16、18 日目の計 4 回実施した。さらに、野外の各種生息池にて、産卵期および非産卵期に、メダカ類の産卵時間帯である日の出時の前後における環境 DNA 濃度の変化を調べた。

(2) 精子由来環境 DNA の動態

重要水産魚種マアジ *Trachurus japonicus* のオスから採取した精子を地下汲み上げ海水に添加し、0、12、24 経過時間ごとの環境 DNA 粒径サイズ分布および濃度の変化を観察した。さらに、マアジを水槽内で人工的に産卵させ、産卵の前後における核およびミトコンドリアの環境 DNA 濃度と粒径サイズ分布を異なる孔径のフィルターを用いた分画濾過により調べた。

(3) 産卵期における河川での環境 DNA 濃度の日周変化

重要水産魚種アユ *Plecoglossus altivelis* の産卵最盛期である 9 月中旬に、琵琶湖流入河川の塩津大川の下流にて 1~3 時間間隔、24 時間の採水調査を行った。各時間のサンプルに含まれるアユの環境 DNA を定量し、環境 DNA 濃度の日周変化を観察した。

(4) 舞鶴湾における水産重要種マアジの地先産卵の検証

2021 年 1 月から翌年 1 月にかけて、月に一度、新月の大潮にあわせた湾内 3 か所での日の入り前および翌日の出時の定期採水調査を行った。マアジの環境 DNA 濃度の周年変化および日の入り前・日の出後での濃度差を調べた。濃度の変化から、産卵している可能性が高いことが示唆された 7 月に、主な産卵場所であると想定される湾内中程に位置する地点 2 にて、3 時間間隔、24 時間の採水調査を行った。さらに、環境 DNA 分析の結果を実証するため、マアジの産卵期と推定された 7 月に、調査船からプランクトンネットを曳き、マアジ卵の採集を試みた。得られた浮遊性の魚卵計 270 粒について、個別に DNA を抽出し、DNA メタバーコーディングによる魚種判定を行った。

4. 研究成果

(1) 産卵期に環境 DNA 濃度を上昇させる主要因が主に精子であることを実証

水槽にて 2 種を交雑させた結果、産卵行動後にオス種の環境 DNA 濃度が急上昇することが示された。これは、繁殖期に見られる環境 DNA 濃度の上昇が主にオスから放出された精子によって引き起こされていることを示唆している (図 1-1)。また、産卵行動に伴う環境 DNA の増加は、産卵行動の途中でメスがオスから離れてしまう偽産卵に関係なく、卵と精子の放出を伴う産卵行動の回数と有意な関係があることが明らかとなった (図 1-2)。これは、環境 DNA 分析に基づく産卵調査により、産卵行動の発生だけでなく、その規模も推定できる可能性を示している。さらに、各種の野外生息地においても、産卵期にのみ産卵時間帯である日の出の前後での環境 DNA 濃度の急上昇が確認された (図 1-3)。

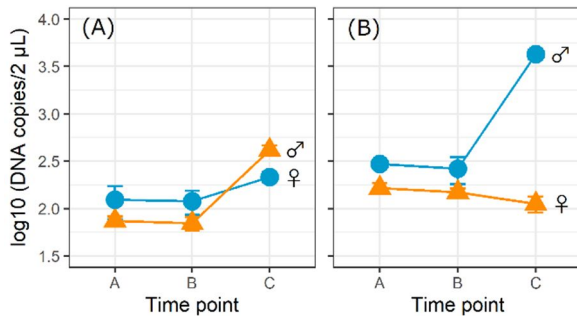


図 1-1. 水槽での交雑実験における産卵前後での環境 DNA 濃度の比較。3 つの採水時間は以下の通り: A 点灯 15 分前、B 点灯 15 分後、C 点灯 45 分後。産卵は全ての水槽において時間 B と C の間に行われた。橙色の三角はミナミメダカ、水色の丸はキタノメダカをそれぞれ示している。各水槽における種の組み合わせは次の通り: 左図 A ミナミメダカのオスとキタノメダカのメス、右図 B ミナミメダカのメスとキタノメダカのオス。

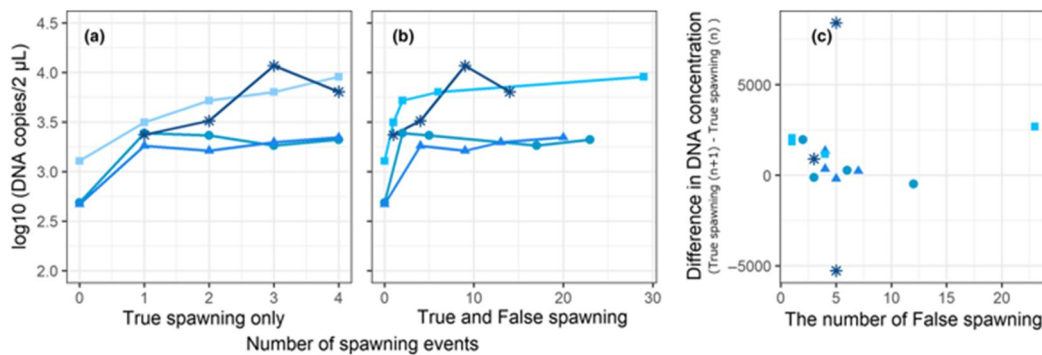


図 1-2. キタノメダカの環境 DNA 濃度と産卵行動の回数との関係。各図の x 軸はそれぞれ (a) 卵と精子の両方の放出が確認された産卵行動 (産卵) の回数、(b) 卵の放出に至らなかった産卵行動 (偽産卵) も含めた全産卵行動の回数、(c) 偽産卵の回数を示す。(c) における y 軸は卵と精子の両方の放出が確認された産卵行動間の環境 DNA 濃度の差を示し、産卵 $(n+1)$ - 産卵 (n) の式により算出した。四角、丸、三角、アスタリスクはそれぞれ採水を行った飼育開始後 5、9、16、18 日を示している。

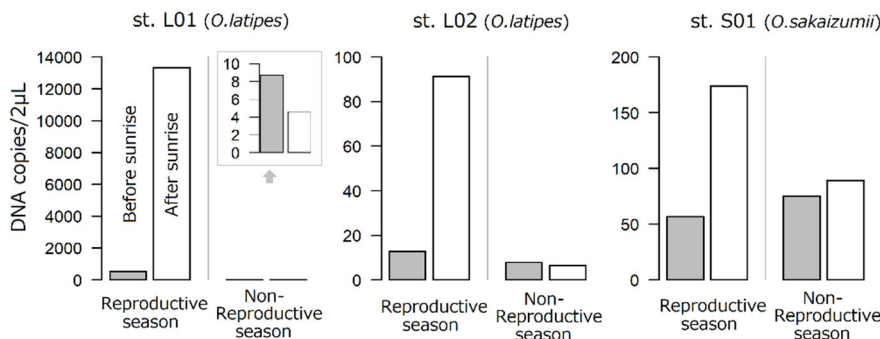


図 1-3. 各種の野外生息地での産卵期 (9 月) と非産卵期 (11 月) における産卵時間帯 (日の出) 前後の環境 DNA 濃度比較。

(2) 精子由来環境 DNA の時間経過に伴うサイズシフトおよび特異的な粒径分布を観察

精子由来環境 DNA は時間経過に伴って小さな粒径へサイズシフトしながら分解が進行することが示唆された(図 2-1)。また、水槽でマアジを産卵させ、産卵の前後で環境 DNA 濃度を比較したところ、有精卵が確認された水槽でのみ、濃度の有意な上昇がみられた(図 2-2)。さらに、産卵がみられた水槽では、産卵後に 8-14 μm の分画で核とミトコンドリア DNA の比率が上昇することが明らかとなった(図 2-3)。これは、精子から放出された核およびミトコンドリア DNA が、単にそれぞれのサイズに依存しないサイズ分布を示すことを示唆している。

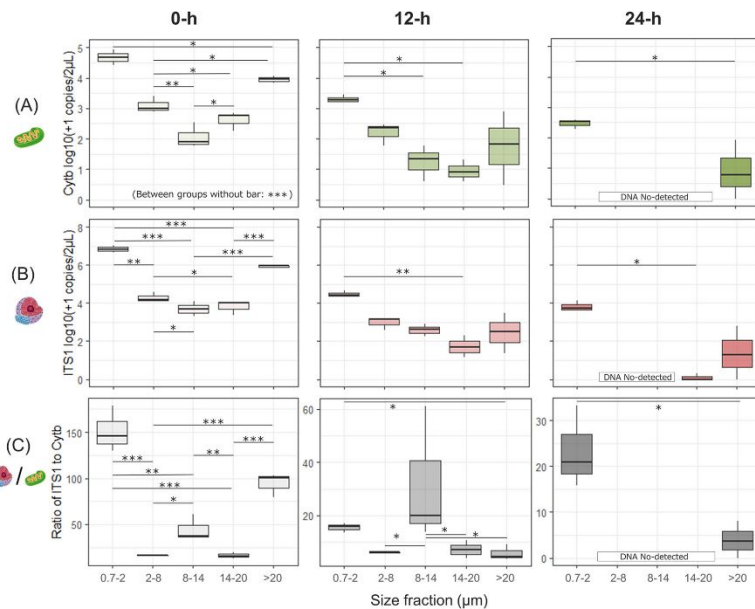


図 2-1. マアジ精子由来環境 DNA の粒径サイズ分布の時間的変化 : (A) ミトコンドリア DNA チトクローム b、(B) 核 DNA ITS1、(C) ITS1/チトクローム b 比。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Conover's test)

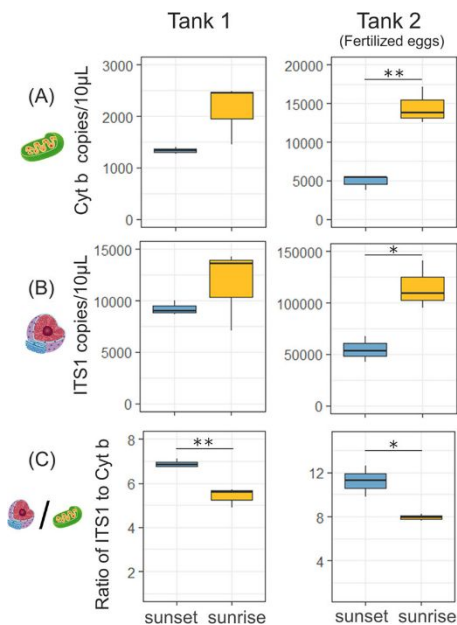


図 2-2. 各水槽における産卵(日没)前後の環境 DNA 濃度。Tank2 のみ、夜間にマアジが産卵した。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; t test or Wilcoxon rank-sum test)

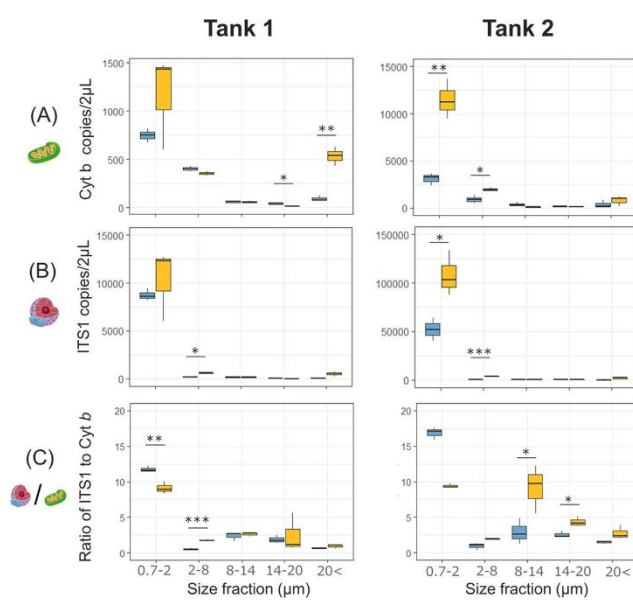


図 2-3. 各水槽における産卵(日没)前後の環境 DNA の粒径サイズ分布の比較。Tank2 のみ、夜間にマアジが産卵した。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; t test or Wilcoxon rank-sum test) タンク 2 の 0.7-2 μm サイズ画分における DNA 比率の差が有意であるかどうかは判断できなかった (Wilcoxon rank-sum test, $P = 0.1$; additional t test, $P < 0.001$)

(3) アユ産卵期において河川での環境 DNA 濃度が大きな日周変化を示すことを実証

産卵時間帯である日の入～数時間を中心に、河川におけるアユの環境 DNA 濃度が大きな日周変化を示すことが明らかとなった(図 3-1)。アユの環境 DNA 濃度は 20:00 頃をピークとして上昇し、早朝 3:00 頃には日中と同程度の濃度まで低下することが示された。この結果から、環境 DNA を用いた産卵調査では、対象種の産卵生態を考慮に入れた採水時間の設定が重要であることが示唆された。

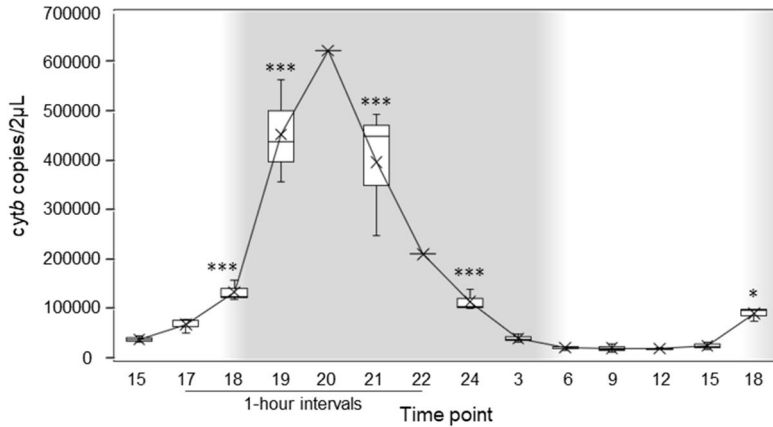


図 3-1. アユの産卵最盛期に見られた河川における環境 DNA 濃度の日周変化。

(4) 舞鶴湾において 7 月にマアジが地先産卵することを突き止めた

各月の日没前後における環境 DNA 濃度を比較したところ、全ての地点において 7 月の日の出時には前日の日の入り時よりも有意にマアジの環境 DNA 濃度が高まることが示された(図 4-1)。特に、深場に近い地点 2 の日の出時には日の入り時の約 15 倍の濃度が観察され、地点 2 またはその周辺が主要な産卵場となっていることが示唆された。地点 2 にて、3 時間おき 24 時間のマアジ環境 DNA 濃度をモニタリングした結果、環境 DNA 濃度は日周変動を示しており、特に 21:00～24:00 の時間帯に、昼間(6:00～18:00)よりも有意に環境 DNA 濃度が高まることが観察された(図 4-2)。この環境 DNA 濃度の日周変化はマアジの産卵行動の発生に起因すると考えられ、21:00～24:00 がマアジの主な産卵時間帯であることが示唆された。湾内の地点 2 にて、24 時間の採水調査と並行してプランクトンネットによるマアジ卵の回収を試みたところ、回収された 270 粒の魚卵のうち、2 粒がマアジ卵であることが確認された。この結果は、7 月に舞鶴湾内でマアジが地先産卵を行っているという環境 DNA による推定結果を裏付けるものである。

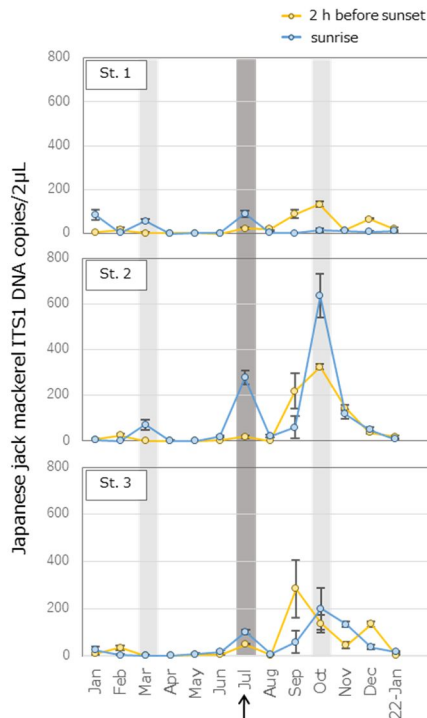


図 4-1. 各月における日の入 2 時間前と翌日の出時のマアジ環境 DNA 濃度の比較

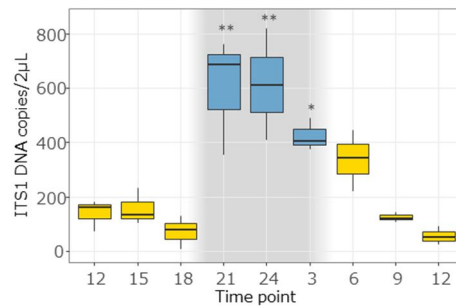


図 4-2. 地点 2 におけるマアジ環境 DNA 濃度の経時変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Satsuki Tsuji, Naoki Shibata	4. 巻 3
2. 論文標題 Identifying spawning events in fish by observing a spike in environmental DNA concentration after spawning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 190-199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/edn3.153	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 Satsuki Tsuji, Hiroaki Murakami, Reiji Masuda	4. 巻 56
2. 論文標題 Analysis of the persistence and particle size distributional shift of sperm-derived environmental DNA to monitor jack mackerel spawning activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 10754-10763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.est.2c01904	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芝田直樹, 辻冨月
2. 発表標題 河川におけるアユ産卵期に特有な環境DNAの濃度と粒径サイズ分布の時間的变化
3. 学会等名 第4回環境DNA学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻冨月, 村上弘章, 益田玲爾
2. 発表標題 環境DNA分析を用いた舞鶴湾におけるマアジ地先産卵の時期および場所の推定
3. 学会等名 第70回日本生態学会仙台大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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0件

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
---------	---------