

環境DNAを用いた絶滅危惧種イトウの遺伝的多様性・
分布・生態系同時評価手法の開発
Methodological development of environmental DNA for
evaluating genetic variation, distribution and ecological
characteristics of Sakhalin taimen in Japan



荒木 仁志
Hitoshi Araki

日本最大の淡水魚、イトウはかつて北海道内の広い範囲に生息していたが、現在ではその分布が大幅に縮小し、絶滅危惧種となっている。本研究では、野外では発見の難しい希少生物の分布を「発見せずに推定する」新技術、環境DNAを用いた検出系を確立し、その検証と実践を行った。水槽実験等による検証実験の結果、本研究で開発したイトウ検出系は高い種特異性と検出感度を持つことが示された。また野外調査の結果、イトウの生息が確認された河川はもちろん、未確認の複数河川からもわずかながらイトウの環境DNA検出がみられた。ただしその検出量は主要2水系に局在しており、本種が未だ厳しい生息環境に置かれていることを示唆する結果となった。

Sakhalin taimen (*Parahucho perryi*) is a critically endangered species. This species is the largest freshwater fish in Japan, and it used to be distributed throughout Hokkaido. In this study, we developed an environmental DNA detection system for Sakhalin taimen. After the development, we tested it by an aquarium experiment, followed by an application to natural river systems in Hokkaido. We found that our system is specific to the species and sensitive to the changes in biomass of the species nearby. We also found that although we could detect the species in a few river systems without any previous record of Sakhalin taimen, the detected environmental DNA was extremely concentrated in two major river systems. Our results suggest that the species is still endangered and that the natural habitat of the species is very limited in Japan.

研究の背景と目的

希少種の生態解明は、その希少性が高ければ高いほど困難となる。その理由は、第一に現行の生態調査の大半がその生物を直接観察・捕獲する機会に依存するからであり、第二に絶滅危惧種ともなれば、仮に野外で運よく彼らを

北海道大学大学院農学研究院環境資源学専攻 教授
Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Professor
Email : arakih@res.agr.hokudai.ac.jp

発見したとしても、その捕獲や個体標本採集には様々な障害が伴うからである。本研究の目的は、環境 DNA と呼ばれる新たな生物探索ツールを駆使して絶滅危惧種イトウ (*Parahucho perryi*) に触れることなく、また彼らを直接発見することすらなく、その生態や分布を簡便かつ網羅的に把握することである。

イトウは北海道に生息し、河川生態系の頂点に位置する国内最大の淡水魚である (図1)。しかし、本種は水産対象種でないため、行政による積極的な保護が行われておらず、生息域の大幅な減少が懸念されている。近年、水圏生物を非侵襲的に検出する新たな技術として環境 DNA が注目を集めている。環境 DNA とは当該環境に生息する生物から脱落した皮膚や鱗、粘液、糞などに由来する環境媒体中の DNA のことで、これを解析することでその環境に生息する生物を検出することができる。ただし新規性の高い技術であるがゆえにイトウが生息する流水河川における環境 DNA の生物定量性については未知の要素が多く、果たして個体数の少ない本種がその生息河川において検出出来るのか、またその検出に定量性があるのかは分かっていない。そこで、本研究ではイトウに特異的な環境 DNA 検出系を開発すると共に、水槽実験を用いてイトウの生物量と検出される環境 DNA 量に相関があるかを精査することを第一目標とした。本研究では更にこの結果を野外河川にも適用し、実際にイトウの生息が確認されている河川のほか、未確認河川についてもその検出を試みた。



図1. 道北・猿払川水系で捕獲された絶滅危惧種、イトウ
Fig.1. Sakhalin taimen captured in a northern part of Hokkaido

研究経過

流水系においてイトウと同じサケ科魚類の環境 DNA 検出が可能であることは申請者がシロザケ (*Oncorhynchus keta*) を用いて行った先行研究でも確認されていた。しかし、イトウについては本研究を実施するまで環境 DNA 検出系も確立されておらず、さらには成魚の体長が1 mを超えることもあるイトウの環境 DNA 検出量がイトウ生物量とどのように相関するのかは野外調査を実施する前に確認しておく必要があった。そこで、本研究ではまずイト

ウ特異的な環境 DNA 検出系を確立し、水槽実験により生物量との相関を精査したのち、野外河川におけるイトウ環境 DNA 検出を試みた。

1. イトウ特異的環境 DNA 検出系の確立

野外の環境水にはイトウの DNA 以外にもシロザケやサクラマスなどの近縁種を含む様々な生物の DNA も含まれているため、イトウ以外の DNA が検出されないような道具が必要不可欠である。この道具を開発するために、様々な生き物の DNA 塩基配列情報が登録されているデータベース (NCBI) からサケ科魚類に分類される 10 属 52 種、計 599 個体分の DNA 塩基配列を収集した。この情報をもとにイトウにしか存在しない DNA 塩基配列を見つけ出し、イトウの DNA のみを増幅するプライマーおよびプローブを設計した。さらにこの設計した道具が本当にイトウの DNA のみを検出することができるかを検証するため、イトウを含む日本国内に生息するサケ科魚類計 9 種 (シロザケ *O. keta*, サクラマス *O. masou*, ニジマス *O. mykiss*, ベニザケ *O. nerka*, カラフトマス *O. gorbuscha*, ブラウントラウト *Salmo trutta*, オシヨロコマ *Salvelinus malma*, アメマス *Salv. leucomaenis*) の体組織から抽出した DNA サンプルを用いて種特異性の検証を行った。

2. 水槽実験によるイトウの生物量・環境 DNA 検出量の相関関係評価

飼育実験は 2015 年から 2016 年にかけて 2 年間、地方独立行政法人北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場恵庭本場の協力の下、2 種類の大きさの異なる水槽 (40L 水槽と 2000L 水槽) を用いて行った (図 2)。実験に使用したのは 0 歳、1 歳、2 歳の稚魚と 20 歳以上の親魚で、40L 水槽には 0 歳、1 歳、2 歳魚を、2000L 水槽には 0 歳、2 歳、親魚を収容し、それぞれ収容尾数を変化させて飼育した。すべての水槽には水槽上部のホースから飼育水がかけ流しになっており、飼育水が注がれた分、水槽から水槽水が排出される仕組みになっている。この実験では水槽からあふれ出る水槽水をサンプルとして使用し、採水に際して魚が採水者を認識して動き回ることを防ぐため、水槽にカーテンをかけたうえで魚からこちらが見えないような低い位置から採水を行うよう工夫した。水槽水は各水槽から 2L 採集し、Whatman 社製ろ過フィルターを用いて濾紙 1 枚につき 1L 濾過した。得られたサンプルは同試験場にて冷凍保存し、実験最終日に北海道大学農学部動物生態学研究室に持ち帰り、DNA 抽出専用のキットを用いて DNA 抽出を行ったのちに定量 PCR による DNA コピー数推定の解析に供した。このとき水槽水を濾過する前に精製蒸留水をバックグラウンドチェック用に濾過してネガティブコントロールサンプルとした。また水槽に注がれている飼育水にイトウの DNA が含まれていないかどうかを確かめるために飼育水を直接採水した濾紙サンプルも解析に供した。

3. 野外河川におけるイトウ環境 DNA 検出

江戸 (2007) や福島ら (2008) により報告されたイトウの分布情報を統括した Fukushima et al. (2011) によると、かつてイトウは日本の 46 河川に分布していたとされているが、この報告時点でそのうち安定した個体群が維持されているのはわずか 7 河川であり、全体のうち 36 河川で絶滅してたとされている (図 3)。さらに図 3 において白色で示されている地点は過去にイトウの調査が行われたことのない地点であり、半分以上の地域でイトウの在・不在に関する情報が欠落していることを意味している。生物の保全を行う上で対象種の分布が明らかでないことは、保全活動に係る労力をどこに集中すべきかの判断を遅らせてしまう可能性があるだけでなく、分布情報がないゆえに保全活動が後回しにされてしまった地域に我々に知られずに生息していた生物の地域絶滅を引き起こしてしまう可能性すらある。しかしながらこれまで行われてきた生物の、特に水圏生物の分布調査はかかる時間的あるいは人的労力が膨大で広域な調査を行うことが極めて困難であった。そこでこの調査では、従来の調査方法に比べて調査労力を格段に削減することができるとされる環境 DNA 技術を持ちいて、北海道全域におけるイトウの分布域および生物量を同時にかつ網羅的に把握することを目的とした。サンプリングは 2015 年 4 月から 2018 年 4 月までの間に北海道中の 125 河川で行った。採水地点は河川の河口に統一し、各地点で 2L の環境水を採集したのちに、濾過道具を設置した最寄りの拠点に持ち帰り Whatman 社製ろ過フィルターを用いて濾紙 1 枚につき 1L 濾過した。得られた濾紙サンプルについて、調査中は拠点にて冷凍保存し、調査最終日にまとめて北海道大学農学部動物生態学研究室に持ち帰り、上記水槽実験同様の手法で DNA コピー数推定の解析に供した。解析に際して、環境水サンプルか

らイトウの DNA が検出されたとしてもネガティブコントロールサンプルからもイトウの DNA が検出された場合は、擬陽性の可能性があるため推定から除外した。イトウ環境 DNA の量からイトウの生物量を推定するにあたり、先行研究において生息するイトウ親魚数が推定されている猿払川水系のデータを基準にして、他の河川で得られた環境 DNA の量からイトウ親魚数を推定した。

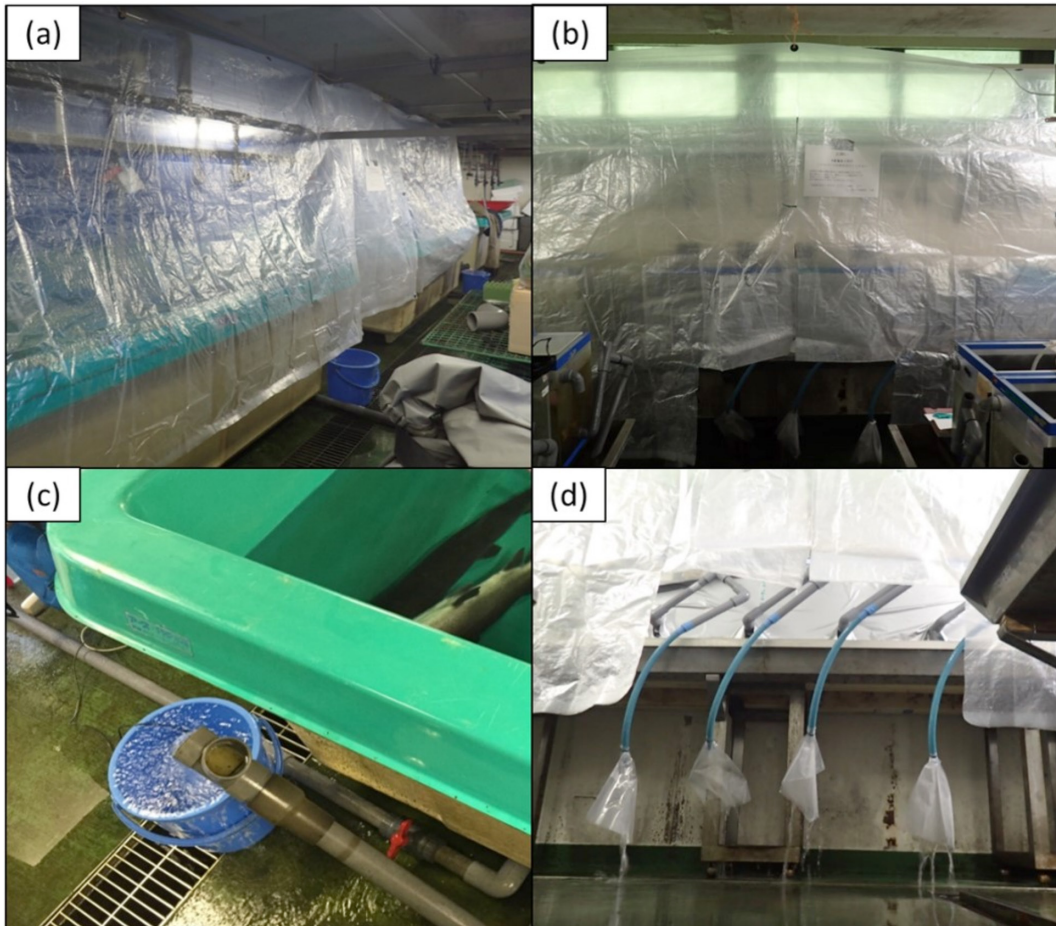


図2. イトウ飼育実験に用いた水槽の写真. (a) 2000L水槽, (b) 40L水槽. 飼育水はそれぞれ (c), (d) に示されている排水パイプから採集した.

Fig.2. Pictures of aquaria for the rearing experiment. (a) 2000L tanks, (b) 40L tanks. Overflowing water samples were taken from the outlet pipes shown in (c) and (d), respectively.

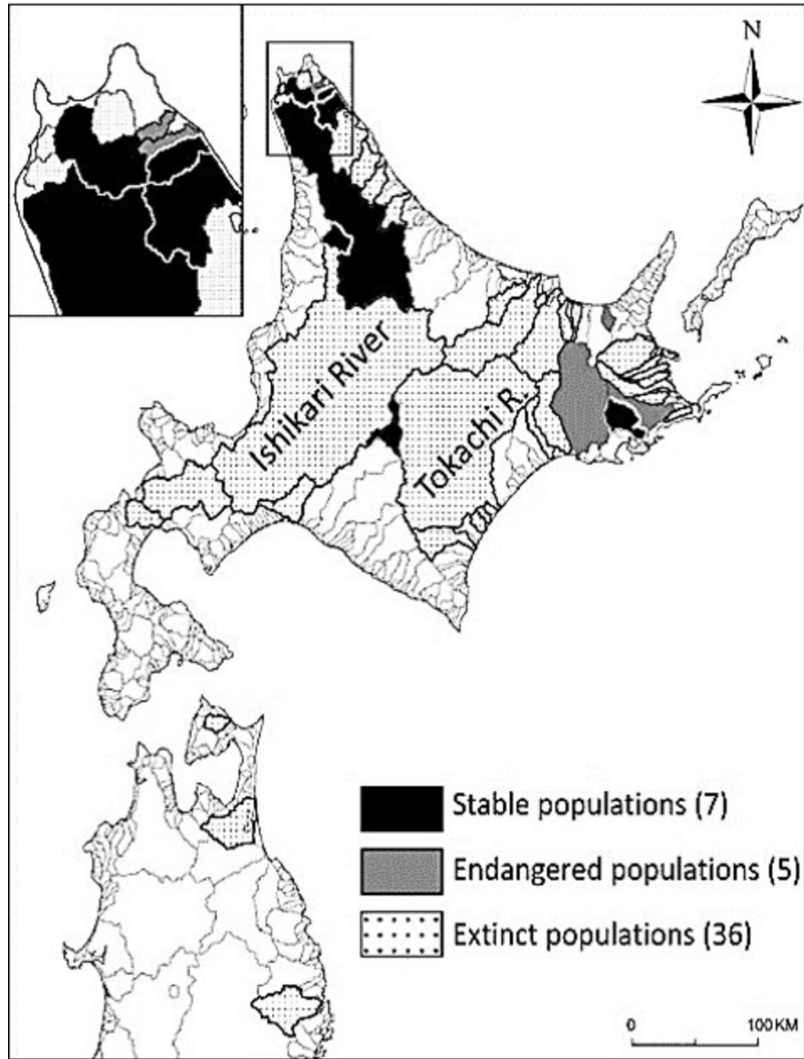


図3. 日本のイトウ分布域を示したマップ (Fukushima et al., 2011より抜粋). 黒で塗りつぶされている箇所は安定した個体群, グレーで塗りつぶされている箇所は絶滅が危ぶまれる個体群, 点が打たれている箇所は絶滅したとされる個体群, 白抜きの箇所は未調査の地域をそれぞれ示している.

Fig.3. Reported Sakhalin taimen distribution map (from Fukushima et al. 2011). Black indicates stable populations, gray indicates endangered populations, dots indicates extinct populations, and white indicates no records.

研究成果及び考察

1. イトウ特異的環境 DNA 検出系の確立

イトウおよび日本国内に生息する上記9種の体組織から抽出したDNAサンプルを用いて種特異性の検証を行った結果, イトウ以外の組織DNAからはDNA増幅が見られず, この検出系を用いることでイトウのDNAのみを検出可能であることが確認された(図4). 以降イトウの環境DNA解析にはすべてこの検出系を使用した.

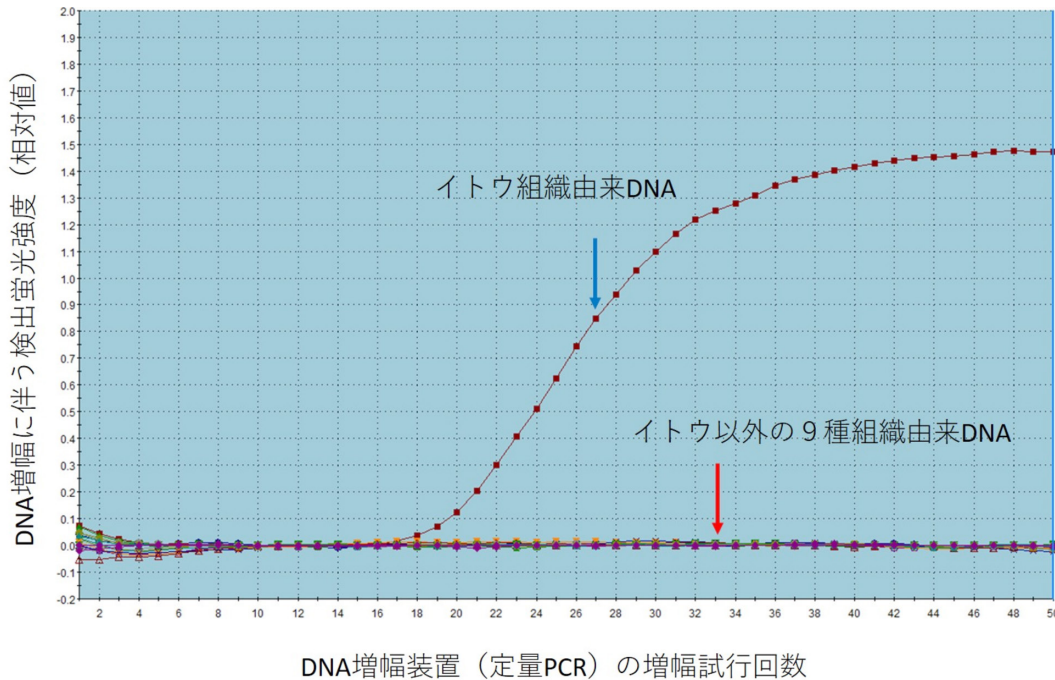


図4. イトウ環境DNA検出系の検証結果。横軸はDNA増幅装置（定量PCR）の増幅試行回数，縦軸はDNA増幅に伴う検出蛍光強度の相対値を示す。この装置内では増幅試行回数に伴いDNAの増幅量が増加するが，解析した10種内ではイトウ由来のDNAのみでDNA増幅が起こっていることがわかる。

Fig.4. Confirmation test of species specificity of the Sakhalin taimen environmental DNA detection system. PCR cycles on the X-axis, and the fluorescence intensity on the Y-axis. The result shows that the detection system reacts only to the DNA template from Sakhalin taimen, confirming the species specificity.

2. 水槽実験によるイトウの生物量・環境DNA検出量の相関関係評価

定量PCRによるイトウ環境DNA量推定の結果，0歳魚を収容した2000L水槽を除くすべての水槽水サンプルからイトウのDNAが検出されただけでなく，イトウ収容尾数とイトウDNAの量に有意な正の相関が認められた（図5，Mizumoto et al. 2018）。飼育水及びネガティブコントロールサンプルからはイトウDNAが検出されなかったため，この解析で得られたイトウDNAはすべて水槽に飼育されていたイトウ由来のものであることも確認した。また各年齢の尾叉長と魚体重量当たりのDNA量を比較してみると，尾叉長，魚体重量とイトウDNA量に有意な正の相関が認められた（ $p < 0.001$ ）。これらのことは，イトウ環境DNAの量がイトウの生物量の増加に伴って増加することを示唆している。さらに年齢の異なるイトウが同じ魚体重量で存在していると仮定したとき（例えばイトウ親魚1匹の魚体重量は0歳魚23200匹分に相当），得られるイトウDNA量が異なるかどうか検証したところ，両者の間に有意差は認められなかった（図6）。このことは，環境水サンプルから得られるイトウDNAの量はイトウの魚体総重量を反映しており，その年齢構成にはほとんど影響を受けないことを示唆しており，野外環境下でイトウの在・不在や生物量の調査を行う上で極めて有用な情報といえる。

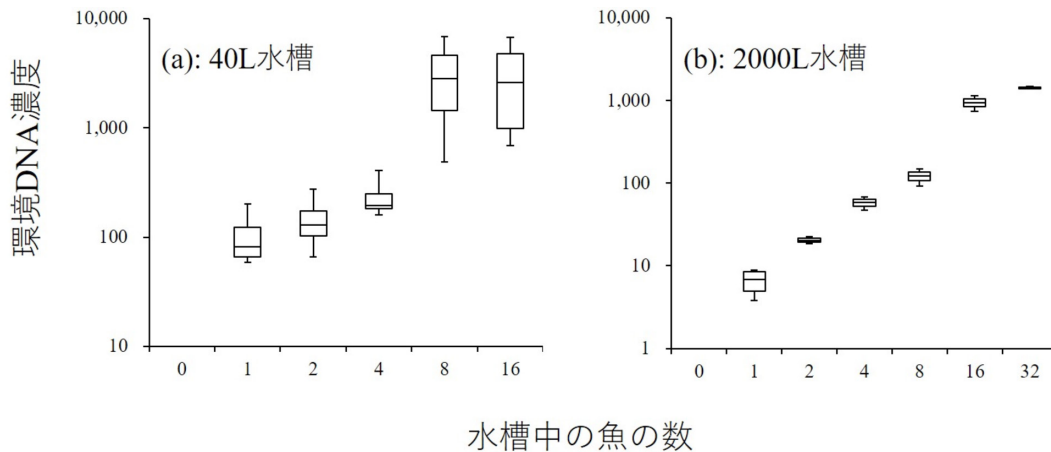


図5. 環境DNA濃度と飼育魚体数の関係. (a)が40L水槽に, (b)が2000L水槽にイトウ2歳魚を入れて測定した結果を示す. いずれも飼育魚体数が増えるにつれて環境DNA濃度が増加しているのが分かる.
 Fig.5. EnvironmentalDNA - Number of fish relationship in the rearing experiment. (a) 40L tank, (b) 2000L tank with 2+ Sakhalin taimen. Positive relationships were observed in both cases.

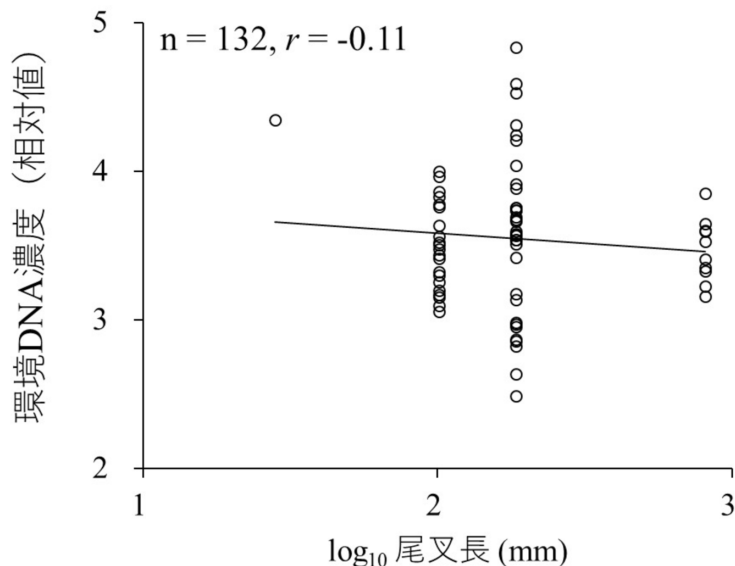


図6. 総重量を統一した場合の環境DNA濃度と体サイズの関係 (予測値)
 Fig.6. Expected relationship between environmental DNA and size of fish, when the total weight (kg) was adjusted.

3. 野外河川におけるイトウ環境DNA検出

野外調査の結果, 全道 125 河川中 8 河川 (6.4%) からイトウ環境 DNA が検出された (図 7). この 8 河川にはこれまでにイトウの分布情報がなかった 3 河川が含まれており, 本研究を通して新たにイトウが生息している可能性のある河川を発見することができた. またイトウ環境 DNA が検出された地点について環境 DNA の量から生物量推定を行ったところ, 北海道全域で約 1600-2000 匹のイトウ親魚が生息していると推定された. このうち特にイトウ環境 DNA が多く検出された A 地区と I 地区にはイトウが安定的に分布しているとされる猿払川水系と別寒辺牛川水系がそれぞれ含まれており, この 2 地区での検出量の合計がイトウ環境 DNA の検出があった河川の検出量の総計の 95% を超えていた. このことはイトウが北海道内でごく限られた河川に局所的に分布していることを示唆している. 一方で, 目視や捕獲調査によってイトウの分布が確認されている一部の河川からイトウの DNA が検出されな

かった。これらの河川には河川規模が大きいという共通した特徴がみられたため、河川規模に対してイトウの生物量が小さいと検出限界を下回ってしまう可能性があることも示唆された。しかしながらこのことは今回の北海道全域におけるイトウ生物量はあくまで過小評価であり、今後環境DNA技術の更なる進歩や反復サンプリングによってより正確な推定ができるようになる可能性を示唆している。

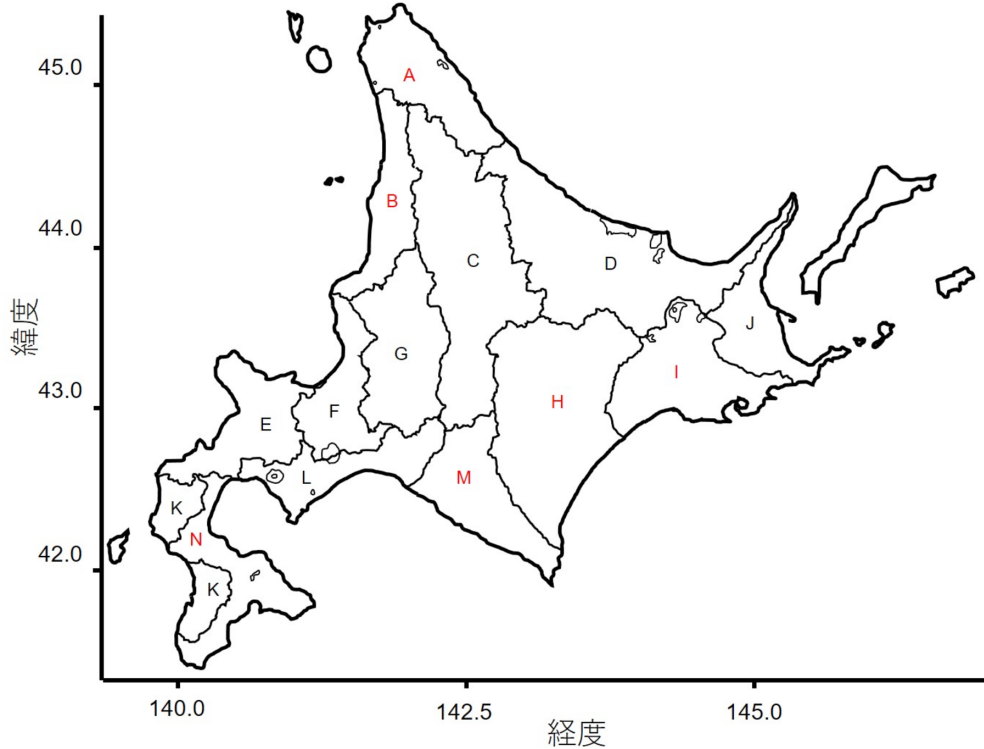


図7. 全道14区域（振興局）およびイトウ環境DNA検出区域のマップ。赤で示した6区域内の8河川からイトウ環境DNA検出が見られた（Mizumoto et al. *in prep.*）。なお乱獲の恐れがあるため、調査各河川は北海道振興局区分に割り振った。

Fig.7. Detection map of Sakhalin taimen's environmental DNA (from Mizumoto et al. *in prep.*). We detected them at 8 rivers in 6 regions shown in red (A, B, H, I, M, N). The map is categorized by the regions of Development and Promotion Bureau because of the threats of overfishing.

今後の展望

環境DNAを用いた絶滅危惧種イトウの研究は未だその創成期にある。本研究では検出システムの確立と定量性検証、および野外河川におけるイトウ環境DNA検出を目標にして大きな成果を得たが、今後は河川内におけるイトウの分布とその季節性、エサや捕食者となる生物の分布やダム、堰堤などの河川工作物との関係、種内の遺伝的多様性の検出・評価など、多岐にわたる応用可能性が期待される。

謝辞

本研究は、旭硝子財団近藤記念グラントによる助成を受けて実施された。本研究遂行にあたり、北海道立総合研究機構・卜部浩一主査、国立環境研究所・福島路生主任研究員、プリンスウィリアムサウンドサイエンスセンター・Pete S. Rand博士、イトウ保全協議会・小山内浩一氏、川原満氏ほか、多数の協力者に多大なるご支援をいただいたことに感謝する。

引用文献

- [1] 江戸謙顕, 2007. 北海道の自然, 45: 2-10.
- [2] 福島路生, 帰山雅秀, 後藤 晃, 2008. 魚類学雑誌, 55(1): 49-53.
- [3] M. Fukushima, H. Shimazaki, P.S. Rand, and M. Kaeriyama, 2011. Trans. Am. Fish. Soc., 140(1): 1-13.
- [4] H. Mizumoto, H. Urabe, T. Kanbe, M. Fukushima and H. Araki, 2018. Limnology, 19(2): 219-227.

本助成研究にかかわる成果

〔論文発表〕

1. H. Mizumoto, H. Urabe, T. Kanbe, M. Fukushima and H. Araki, 2018. Limnology, 19(2): 219-227.
2. 荒木仁志, 水本寛基, 2018. 海洋と生物 vol. 40: 35-39.

〔口頭／ポスター発表〕

1. H. Araki, H. Mizumoto and T. Kanbe. Environmental DNA for studying intra-specific variations. The 66th Annual meeting of the Ecological Society of Japan. Kobe, 2019.3.17
2. H. Mizumoto, K. Ikeda, and H. Araki. Understanding the distribution and biomass of Sakhalin taimen using environmental DNA. The 66th Annual meeting of the Ecological Society of Japan. Kobe, 2019.3.16.
3. 水本寛基, 荒木仁志. 環境 DNA 技術を用いた絶滅危惧種イトウの分布域・生物量の全道推定. 第1回環境 DNA 学会大会, 東京, 2018.9.29.
4. 荒木仁志, 水本寛基, 神戸 崇, 鎌田頌子, 南波聡子. 環境 DNA を用いた北海道河川魚類相の解明と展望. 第1回環境 DNA 学会大会, 東京, 2018.9.29.
5. 水本寛基. 環境 DNA を透して見るイトウの自然分布と生息状況. 応用生態工学会金沢, 金沢, 2018.11.16.
6. 荒木仁志. 環境 DNA を用いた魚類分布・資源量推定の実例紹介. 環境アセスメント協会技術セミナー, 札幌, 2018.8.29.
7. H. Mizumoto, H. Araki. Estimating the seasonal migration of Sakhalin taimen using environmental DNA. The 43rd Annual meeting of the Western Division American Fisheries Society, Anchorage AK, USA, 2018.5.23.
8. 荒木仁志. 環境 DNA 技術を用いた水圏生物相推定および河川横断工作物影響評価の可能性. 魚道研究会, 札幌, 2018.10.16.
9. 荒木仁志, 神戸 崇, 水本寛基, 南波聡子. 環境 DNA 2018. 第40回魚類系統学研究会, 札幌, 2018.12.9.
10. 荒木仁志, 水本寛基. 環境 DNA を透して見るイトウの自然分布と生息状況. 猿払イトウ保全協議会, 猿払, 2018.5.6.
11. 荒木仁志, 神戸 崇, 水本寛基, 鎌田頌子, 佐藤俊平. 環境 DNA によるサケの資源・生態研究. 水産学会特別シンポジウム, 東京, 2018.3.26.
12. 水本寛基, 荒木仁志, 宮正 樹. 環境 DNA 技術を用いたイトウの季節回遊行動の推定. 第65回日本生態学会大会, 札幌, 2018.3.15.
13. H. Araki. Environmental DNA as a monitoring tool for aquatic biodiversity. International symposium "Promotion of global network studies on seagrass ecosystem based on innovative new technology", Tokyo, 2018.2.18.
14. 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. 海洋生物科学研究会, 札幌, 2017.1.20.
15. 水本寛基, 荒木仁志. 環境 DNA を用いたイトウの分布調査速報. 第39回魚類系統研究会, 赤平, 2017.12.3.
16. 水本寛基, 荒木仁志, 福島路生, 卜部浩一. 環境 DNA を用いた自然河川におけるイトウの生物量推定への試み. 第11回サケ学研究会, 札幌, 2017.7.8.

17. 荒木仁志, 神戸 崇, 本多託也, 水本寛基, 鎌田頌子, 南波聡子, 宮 正樹. 環境 DNA を通して観る北海道の水圏生物. 水産海洋学会地域研究集会北洋研究シンポジウム, 札幌, 2017.6.17.
18. 水本寛基, 荒木仁志, 宮 正樹. 環境 DNA から見る絶滅危惧種イトウの回遊行動. 水産海洋学会地域研究集会北洋研究シンポジウム, 札幌, 2017.6.17.
19. H. Araki. Environmental DNA as an ecological tool for salmonid fish distribution. The 64th Annual meeting of the Ecological Society of Japan, Tokyo, 2017.3.15.
20. H. Mizumoto, H. Araki, H. Urabe, and M. Fukushima. Can we detect distribution and quantify biomass of Itou (Parahucho perryi) by using eDNA? The 64th Annual meeting of the Ecological Society of Japan, Tokyo, 2017.3.15.
21. 荒木仁志. 環境 DNA を用いた水圏生物研究. 第五回流域環境研究会, 札幌, 2017.9.11.
22. H. Araki. Environmental DNA analysis for identifying multiple species: A scoop of water for biodiversity? Japan-Taiwan Ecology Workshop, Kyoto, 2016.11.13.
23. 荒木仁志. 環境 DNA を用いた生物フロンティアの開拓. 第 17 回日本進化学会, 東京, 2016.8.26.
24. 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, 札幌, 2016.12.7.
25. 荒木仁志. フィールドリサーチツールとしての環境 DNA 研究. 第 38 回魚類系統研究会, 苫小牧, 2016.12.11.
26. 水本寛基, 荒木仁志, 福島路生, 卜部浩一. イトウ保全ツールとしての環境 DNA 技術の開発. 第 38 回魚類系統研究会, 苫小牧, 2016.12.11.
27. H. Mizumoto. A challenge for developing the system that aimed to detect distribution and quantify biomass of endangered species Itou (Parahucho perryi) simultaneously by using eDNA technique. 32nd Annual meeting of the Society of Population Ecology, Sapporo, 2016.11.3.