

# 環境DNAを用いたダム湖における 魚類相の調査法について

Monitoring fish fauna in dam reservoirs using environmental DNA

神戸大学大学院人間発達環境学研究科 源 利文

環境DNAを用いた水中生物相の観測が一般的になりつつあるが、ダム湖への適用についての知見は不足している。本稿では、水源地生態研究会において実施した環境DNA分析を用いたダム湖の生物モニタリング手法の研究の成果の一部を紹介する。三春ダム、大川ダム（いずれも福島県）、菅生ダム（兵庫県）で年間を通して行った調査の結果、ブルーギルなどのサンフィッシュ科外来種を対象とした場合には、春季から夏季にかけて環境DNAの検出頻度が増加すること、岸際での採水が効果的であることが示唆された。同じサンプルを用いてMiFish法による環境DNAメタバーコーディングを行ったところ、春から初夏にかけての岸際でのサンプリングが検出種数を最大化し、秋の補助的な調査が効果的と考えられた。さらに、ダム湖において実施された環境DNA分析による産卵期の推定に関する研究も紹介する。

**キーワード：**環境DNA (eDNA)、魚類相、種特異的検出、網羅的検出、メタバーコーディング

Observation of aquatic fauna using environmental DNA (eDNA) is becoming more common, but knowledge of its application to dam reservoirs is lacking. This paper introduces some results of research on methods for monitoring aquatic macro-organisms in dam reservoirs using eDNA analysis conducted by the Watershed Ecology Research Group. The results of surveys conducted throughout a year at Miharu and Okawa Reservoirs (both in Fukushima Prefecture), and Sugo Reservoir (Hyogo Prefecture) suggested that the frequency of eDNA detection increases from spring to summer and that water sampling near the shore is effective when targeting three Centrarchidae species. Furthermore, eDNA metabarcoding using the MiFish primers indicated that sampling at the shoreline in spring or early summer maximized the number of species detected and that supplemental surveys in the fall would be effective. A study conducted in a dam reservoir on estimation of spawning season by eDNA analysis is presented.

**Key words :** Environmental DNA (eDNA), fish fauna, species-specific detection, exhaustive detection, metabarcoding

## 1. はじめに

環境中に存在するDNAを利用した生物調査手法である環境DNA分析が、現世のマクロ生物の分布調査に利用可能であることが初めて報告されてからまもなく15年になろうとしている (Ficetola et al. 2008)。環境DNAの定義には様々あるが、ここでは、環境媒体中に存在するすべてのDNA (広義の環境DNA: environmental DNA sensu lato [Pawloski et al. 2019]) とすることにしよう。川や湖から採取した水の中には、細菌などの肉眼では見えないサイズの生物や、ミジンコなどの目に見えるサイズの小型生物などが含まれる場合があり、それらの体内には当然DNAがある。また、狭義の環境DNAとも呼ばれる、生体外に放出されたDNAもあるが、本稿ではこれらをまとめて環境DNAと呼ぶ。環境DNA分析が対象とする生物群には目に見えないサイズの微生物(ミクロ生物)

も目に見えるサイズのマクロ生物も含まれるが、ここではマクロ生物、特に魚類を対象にした環境DNA分析について述べる。

この15年の間に、環境DNA分析は著しく発展し、今では特に水中の生物の調査手法としては一定の地位を得たといっていいただろう。一方で、マクロ生物の環境DNA分析は、河川やため池などにおける研究事例が先行していたものの、ダム湖における研究事例は限られていた。日本には2700以上のダムがあるとされており (ダム便覧2021: <http://damnet.or.jp/Dambinran/binran/TopIndex.html>)、ダムが河川をせき止めて作った人工的な湖であるダム湖も河川生態系の一つの類型として捉える必要がある。ダム湖の河川生態系に与える影響としては、生息地の分断化や富栄養化による水質の劣化などネガティブなものが多く挙げられ、河川生態系の現状を正確に捉えるためにもダム湖における生物モニタリングは重要である。そこ

で、水源地生態研究会においては、2014年度から環境DNA分析を用いたダム湖の生物モニタリング手法の研究を続けている。本稿では、水源地生態研究会による研究によってこれまでに明らかにすることができた、ダム湖において環境DNA分析を適用する際に注意すべき点などをまとめるとともに、ダム湖をフィールドとして行われた環境DNA研究の先端を紹介したい。

## 2. ダム湖における魚類 DNA の種特異的な検出

ダム湖において、魚類の環境DNAを適切に検出するため検討すべき要素は何であろうか。これまでに多く研究が実施されてきた河川やため池と比べた特徴としては、深さがあり面積も広い止水であることであろう。特に大きな止水であることから、水の循環状況によっては、季節や採水地点によって結果が左右される可能性が考えられる。そこで著者らは環境DNAの分析の基礎的な手法である種特異的な検出系を用いた

場合に、採水の季節と採水地点（岸か沖か）によって、環境DNAの検出頻度がどのように異なるかを調べることにした。なお、本項で以下に述べるのはJo et al. (2021) の内容の抜粋である。

調査は2015年から2016年にかけて、福島県の三春ダム、大川ダム、兵庫県の菅生ダムによって作られた3つのダム湖で行った。三春ダムで15地点（岸際10地点、沖帯5地点）、大川ダムで9地点（岸際6地点、沖帯3地点）、菅生ダムで5（岸際2地点、沖帯3地点）を設定し（図-1）、三春ダムと菅生ダムでは月に1回、大川ダムでは2ヶ月に1回、各地点で2リットルの採水を行い、環境DNAを抽出した。対象としたのは、ブルーギル、オオクチバス、コクチバスの3種であり、種特異的なプライマー等を混ぜて3種のマルチプレックスリアルタイムPCRによって、対象種のDNA検出を試みた。

三春ダムにおけるブルーギルとオオクチバスの結果を図-2に示す。全体的な傾向として、PCR陽性率が夏に高くなり、冬に低くなった。最も陽性率が高くなっ

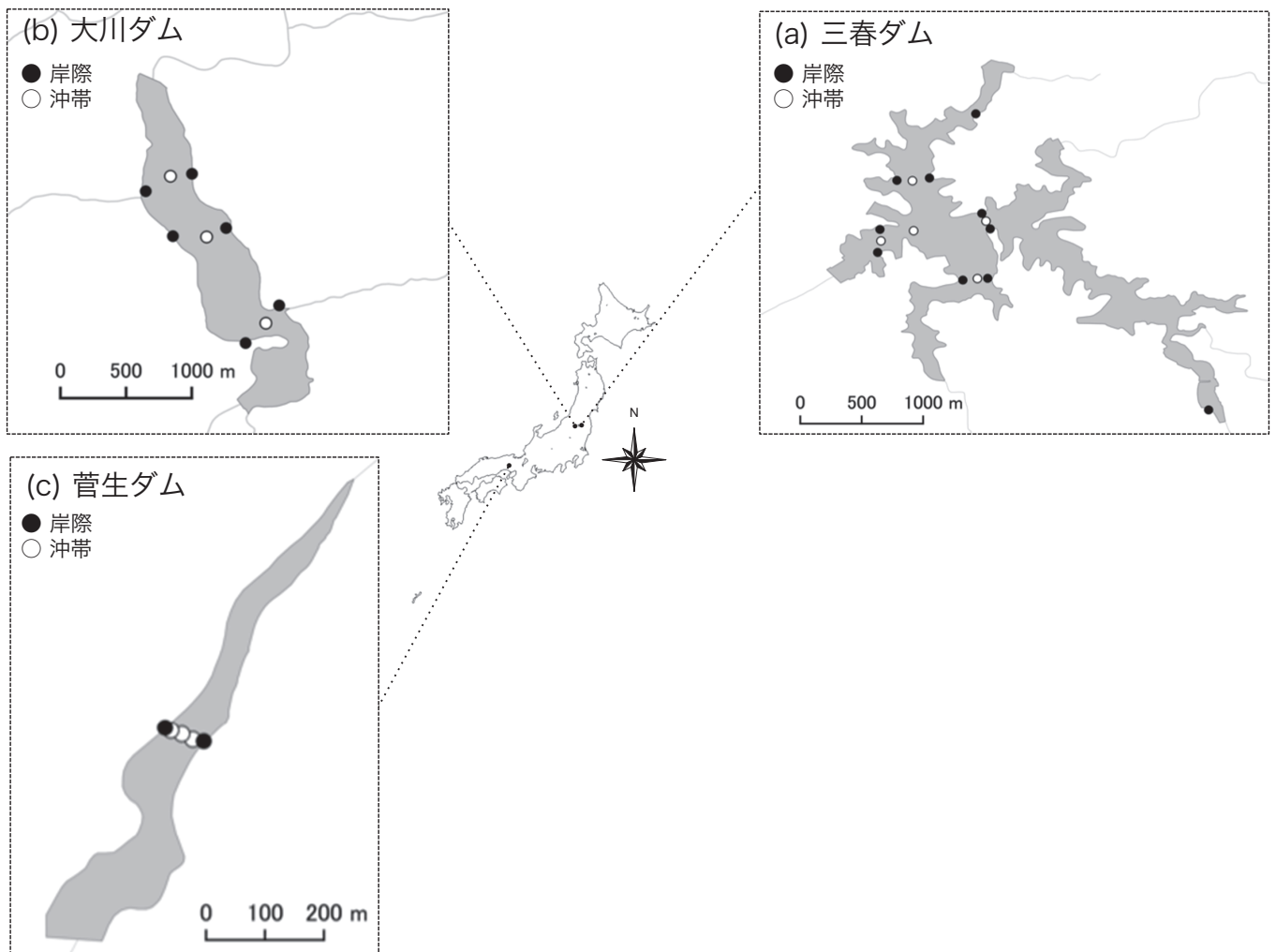


図-1 (a) 三春ダム、(b) 大川ダム、(c) 菅生ダムにおける調査地点の詳細。Hayami et al. (2020) のFigure 1を改変した。

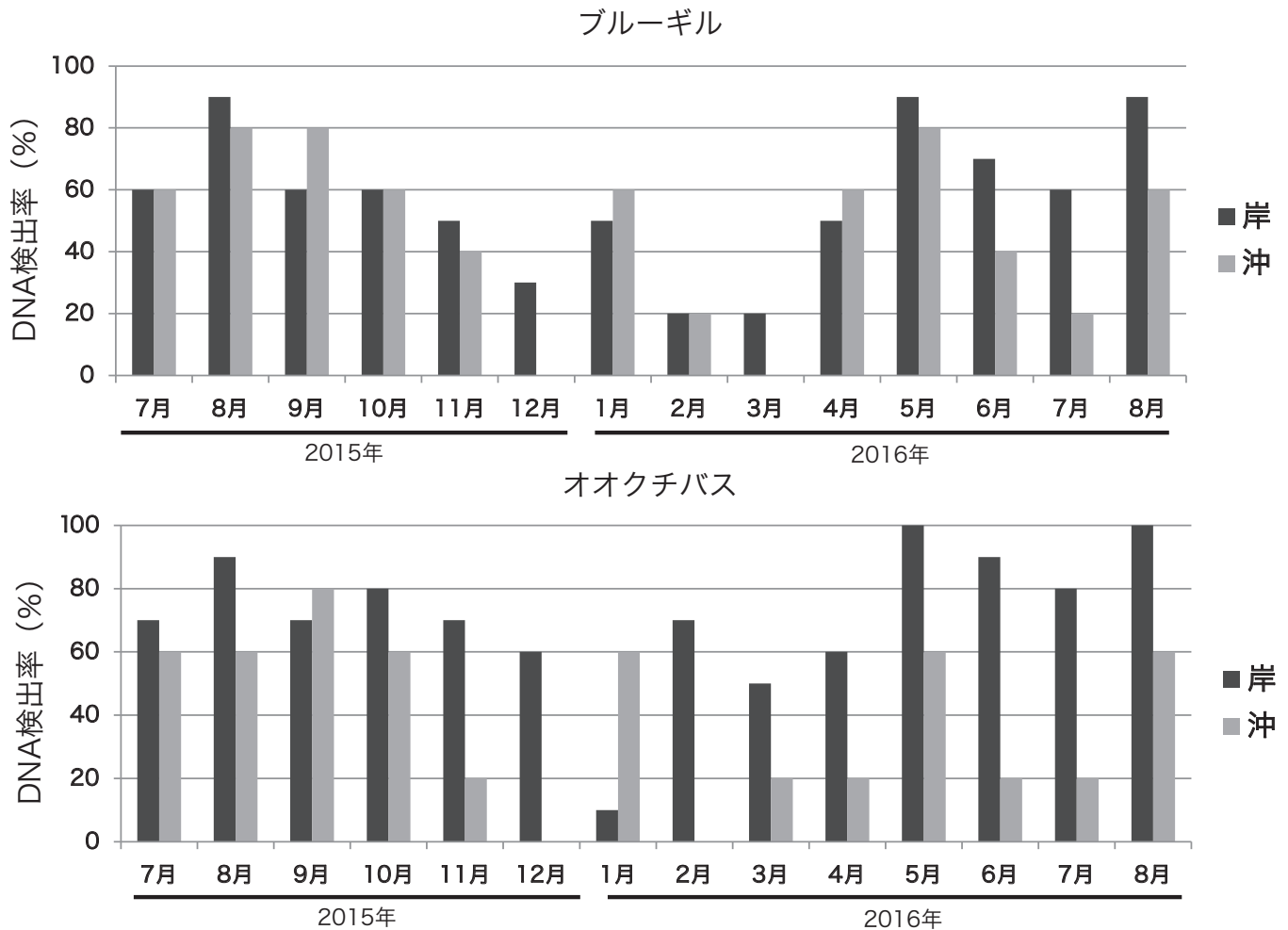


図-2 三春ダムにおけるブルーギルとオオクチバスの環境DNA検出率の時間変化。岸際のサンプルと沖帯のサンプルそれぞれについて、サンプルあたりの検出率を示した。Jo et al. (2021) のデータを再掲。

たのは両魚種とも5月であった。また、オオクチバスについては岸際のサンプルにおけるPCR陽性率が沖帯のサンプルにおける陽性率よりも有意に高く、ブルーギルについても統計的には有意でないものの、同様の傾向が観察された。他のダムの結果も考え合わせると、春から夏にかけて、岸際で採水を行うことで、オオクチバスとブルーギルの検出感度が高まることを見いだされた。コクチバスについては全体的に検出率が低かったため、ここでは検討から除外した。

次に、調査シーズンを夏に固定した上で、全国の30のダム湖において、それぞれ岸際2地点、沖帯1地点の合計3地点のサンプリングを行い、同様の手法によって3種の環境DNA検出を試みた。その結果、ブルーギル、オオクチバス、コクチバスのDNAがそれぞれ9, 13, 4のダム湖から検出された(表-1)。それぞれのダム湖における通常の採捕による3種の分布情報と比較すると、いずれの種についても在、不在を含む結果の一致率は83-90%と比較的高く、採捕による在/不在情報と環境DNAの検出/非検出情報の間には統計的に有意な差は観測されなかった。また、ある種が不在とさ

れるダム湖から当該の種のDNAが検出されることはなかった。

これらの結果をまとめると、少なくともここで対象としたブルーギル、オオクチバス、コクチバスの3種を対象とする場合、春から夏にかけての水温の高い時期に、岸際で採水を行うことで検出確率が高まること、30のダム湖に適用した3箇所での採水を採用すると、高い確率でダム湖における特定の種の在不在を知ることができるということになる。暖かい時期に検出率が高まることは、対象魚種の活性が高まる季節であるこ

表-1 全国の30のダム湖におけるサンフィッシュ科外来魚3種の採捕調査と環境DNA調査の結果の比較

種	採捕調査による 在/不在	環境DNA検出の結果		一致率(%)	P値*
		陽性	陰性		
ブルーギル	在	9	3	90.0	0.250
	不在	0	18		
オオクチバス	在	13	5	83.3	0.625
	不在	0	12		
コクチバス	在	4	3	90.0	0.250
	不在	0	23		

\*マクネマー検定におけるP値  
Jo et al. (2021)のTable 3を改変した。

と、5月にピークを迎えるのは対象種の産卵期に近い季節であることなどが原因であると考えられる。また、岸際で検出感度が高まる傾向があるのは対象種の生態によるところが大きいことなどが想定された。

### 3. ダム湖における 魚類 DNA の網羅的な検出

前項で明らかになった検出率の季節的な変動や、採水位置による検出率の変化は、ブルーギルなどの対象種に特異的なことなのか、それとも他の魚種でも共通することなのか。この疑問に答えるために、前項と同じサンプルを用いて魚類の網羅的検出（環境DNAメタバーコーディング）を実施した。ここで明らかにしたいのは、ダム湖の調査に魚類の網羅的検出法を用いる際にサンプリングの季節や場所をどのように設定すると効率的な調査が可能になるかということである。本項で紹介する内容は、Hayami et al. (2020) からの抜粋である。

用いたサンプルは前項で紹介した、三春ダム、大川ダム、菅生ダムの1年間のサンプルである。これらのサンプルを魚類の網羅的検出用のプライマーセットであるMiFish-U (Miya et al., 2015) で増幅し、次世代シーケンスによってサンプルに含まれる魚類由来の塩基配列を調べた。環境DNAメタバーコーディングを行う際には、コンタミネーションの防止が重要となるが、ここでは環境DNA学会発行のマニュアルに則ってコンタミネーションを予防した（環境DNA学会, 2020）。環境DNAメタバーコーディングの有効性を評価するため、三春ダムおよび大川ダムについては河川水辺の国勢調査の結果と比較した。河川水辺の国勢調査は概ね5年に一度行われており、三春ダムについては1999, 2004, 2009, 2014年のデータ、大川ダムについては1999, 2006, 2011, 2015年のデータを河川環境データベース (<http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/>) より取得した。菅生ダムは河川水辺の国勢調査の対象となっていないので、結果の比較は実施しなかった。

三春ダムおよび大川ダムにおける検出魚種は合計で27種と28種であった。そのうち三春ダムにおいては14種、大川ダムにおいては22種が約15年にわたる4回分の河川水辺の国勢調査で報告されている魚種と一致した。河川水辺の国勢調査で報告されているが、環境DNAメタバーコーディングでは検出されない魚種が三春ダムで6種、大川ダムで4種あり、逆に河川水辺の国勢調査で報告されていないが環境DNAメタバーコーディングで検出された魚種は三春ダムで

7種、大川ダムで2種であった（図-3）。環境DNAで検出されなかった種を詳細に検討すると、例えば三春ダムにおけるタイリクバラタナゴのように本研究で調査を行った本貯水池ではなく、前貯水池のみで僅かな個体数が報告された種や、大川ダムにおけるハスのように10年ほど前の調査で一度だけ報告されている種など、今回の採水地点付近には生息しない可能性がある種や、個体数がごく少ないことが想定される種がほとんどであった。逆に、環境DNAメタバーコーディングでのみ検出された魚種には、三春ダムにおけるソウギョやカムルチーのように、河川水辺の国勢調査では報告がないものの、それ以外の調査や観察によって生息することが確認されている種が含まれていた。ただし、三春ダムにおけるコクチバスやサケのように、それぞれの種の生態やこれまでの調査の実施状況から生息する可能性が極めて低く、コンタミネーションが疑われる種も検出されている。このように、環境DNAメタバーコーディングで得られるデータは概ね妥当であるが、一方で偽陽性や偽陰性が疑われるデータが含まれることには注意が必要である。

次に、環境DNAメタバーコーディングで検出される魚種の季節性について検討した。検出される魚種の数には明瞭な季節性があり、調査を行った3つのダムのいずれにおいても、3-6月頃の春から初夏にかけて検出される種数が最大となり、10月から11月頃の秋にも小さなピークが観測された（図-4）。春から初夏はコイ目の種の多くの魚種が産卵期を迎える季節であり、秋はサケ目の種の多くが産卵期を迎えることから、前項でブルーギルやオクチバスで観測されたことと同様に、それぞれの種の産卵期に検出頻度が高まることがうかがえる。

さらに、サンプリングの場所（岸際か沖帯か）が検出魚種数に与える影響を検討した。三春ダムにおいては岸際の方が沖帯よりも有意に多くの魚種を検出でき

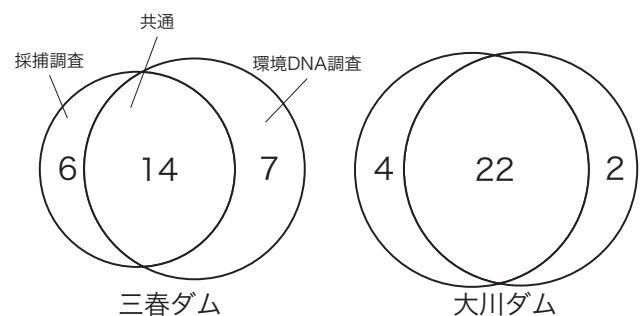


図-3 三春ダムと大川ダムにおける河川水辺の国勢調査（約15年分）と環境DNA調査（1年分）の結果の比較。多くの魚種が共通して検出された。Hayami et al. (2020) のFigure 2を改変した。

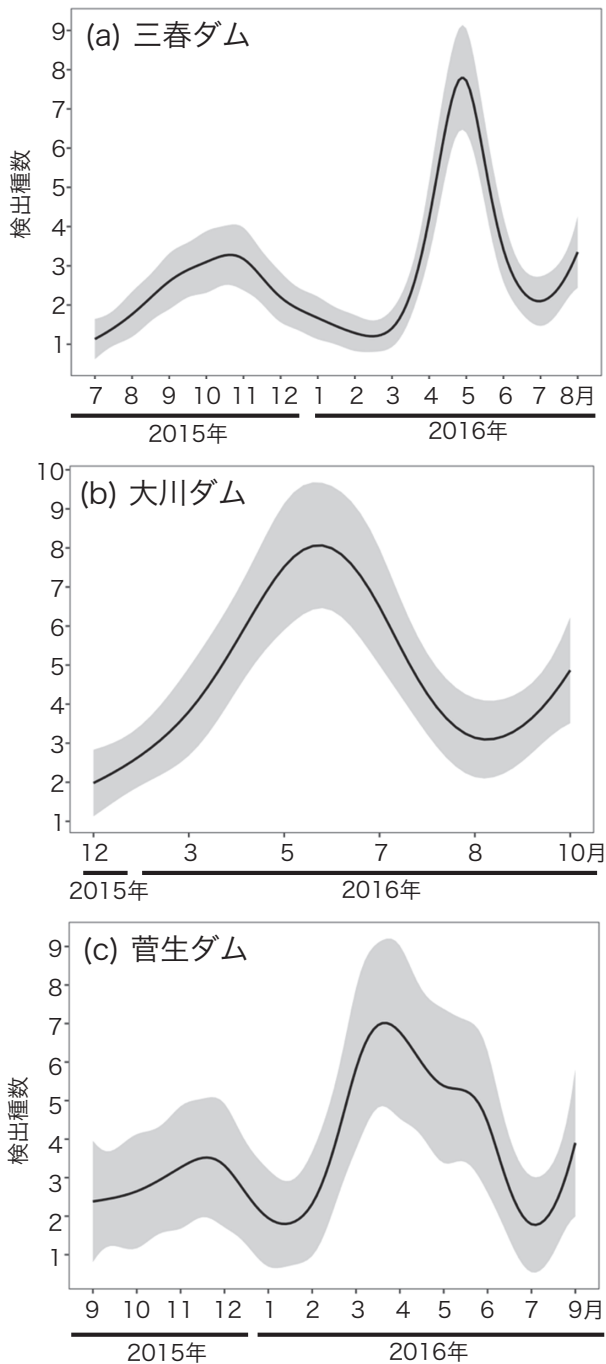


図-4 (a) 三春ダム、(b) 大川ダム、(c) 菅生ダムにおける、MiFishを用いた環境DNAメタバーコーディングで検出された種数の変動。実線が平滑化した曲線で、灰色の影は95%信頼区間を示す。Hayami et al. (2020) のFigure 3を改変した。

た。大川ダムと菅生ダムでは統計的な有意差はないものの、岸際で多くの魚種が検出される傾向にあった(図-5)。このことには、ダム湖が河川をせき止めて人為的に作られた湖であるため、そこに生息する魚種のほとんどが本来河川性の魚であることが影響しているのかもしれない。

これらのことから、ダム湖において環境DNAメタバーコーディングによって魚類相を推定しようとする場合、春から初夏にかけて、岸際での採水を行うこと

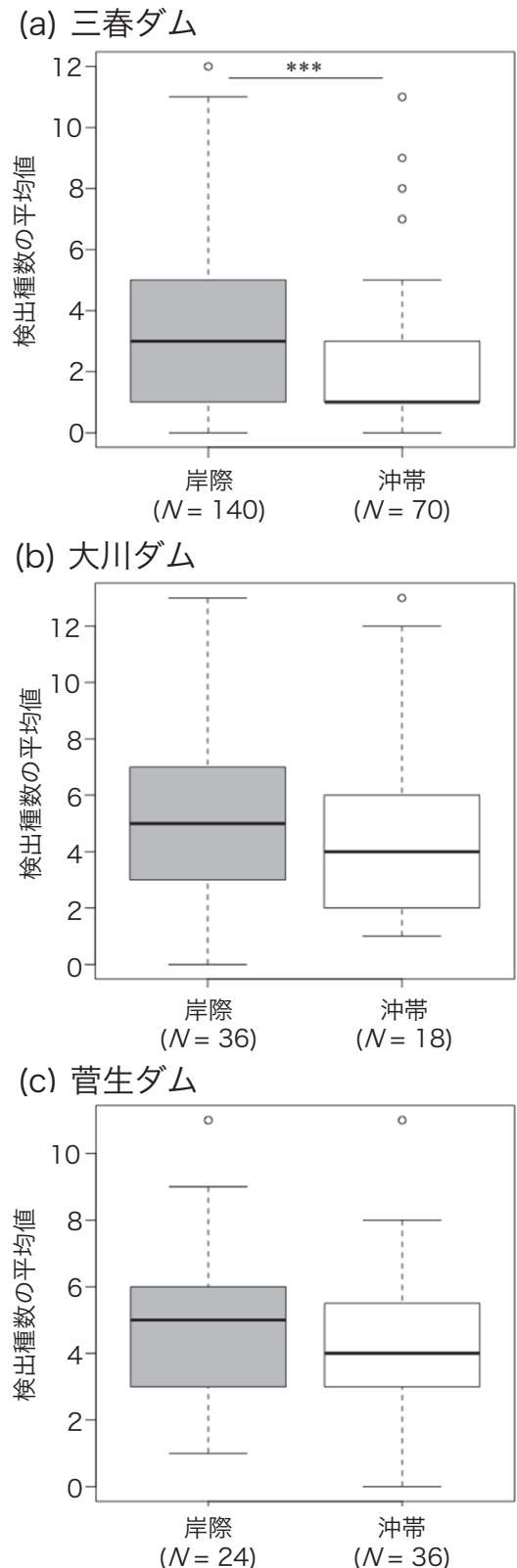


図-5 (a) 三春ダム、(b) 大川ダム、(c) 菅生ダムにおける、サンプリングサイト(岸際か沖帯か)と検出種数の関係。三春ダムにおいては、岸際のサンプルから有意に多くの種が検出された。Hayami et al. (2020) のFigure 5を改変した。

で効率的な調査が可能であると考えられる。秋産卵の魚種が多い地域では秋にも補助的な採水を行うことで網羅率を高めることにつながるだろう。

## 4. 現時点での課題

ここまで紹介してきたように、水源地生態研究会による調査研究によって、ダム湖の魚類調査に環境DNA分析を導入するための重要な基礎的知見が収集できた。一方で、まだ明らかになっていない課題も残る。ここでは2つの課題について述べよう。

第一に、ダム湖の多くは深く、魚類分布に鉛直構造があることが想定されるが、鉛直方向のサンプリングの重要性についての知見はほとんどない。例えば琵琶湖で実施した環境DNA分析の結果では、底層の水サンプルから底生の動物種のDNAが検出されるなど、生物の鉛直分布と対応した環境DNAのデータが得られることなどがわかっている。特に、夏場に成層するようなダム湖において、表層水と深層水から検出される環境DNAは異なることが想定され、現在の調査研究で主に行われている表層水の採水のみでは底生の種を見落とすことがあるかもしれない。今後、環境DNAの鉛直分布に関する研究も進める必要があるだろう。その際には、近年急速に発展しているバイオリングの技術と組み合わせることでより効果的な調査が可能となると思われる。

第二の課題としては、魚類相を網羅するためには、調査・実験のどのステップにどの程度の努力をかけるのが良いかが明確でない点が挙げられる。例えば、1年間の調査回数、1回の調査におけるサンプル数、解析におけるPCRの繰り返し数、サンプルあたりの解析リード数など、努力量（予算）をどこに振り分けるのが効率的かという情報はまだ少ない。このような解析には多種サイト占有モデルを用いることが有効と考えられ（Fukaya et al., 2022）、今後このような情報が蓄積されることで、より効率的な調査が可能になるだろう。

## 5. 終わりにかえて

このように、2014年度から進めてきたダム湖における環境DNA研究の結果から、河川水辺の国勢調査に代表される生物モニタリングの実施に向けた基礎的な情報を得ることができた。しかし、これまでに実施されてきた採捕を伴う通常のモニタリング手法と比べると、環境DNA分析による生物モニタリングには、生物の生育段階が把握できないなどの欠点がある。近年では、このような欠点を補うための技術開発も進められており、例えば環境DNA分析によって生息する生物種の繁殖期や繁殖地を知ることが出来る可能性が

示されている。ここでは、ダム湖で実施されたそのような取り組みを紹介し、環境DNA分析手法の将来を展望したい。

魚類の多くは体外受精を行うため、繁殖行動の際に大量の精子を環境中に放出する。精子の中にもDNAが含まれているため、一度繁殖行動が起きると、環境DNA濃度が急上昇する。さらに、一般に精子には通常の体細胞と比べるとミトコンドリアが少ないという特徴がある。そのため、体外受精によって精子が大量に放出されると、環境DNA中における核DNAとミトコンドリアDNAの比率（核・ミトコンドリア比）が上昇すると考えられ、そのような分析手法の可能性がオーストラリアの研究チームによって指摘されていた（Bylemans et al., 2017）。そこで、著者らの研究グループでは、三春ダムの前貯水池において2年間にわたる継続的な調査を行い、環境DNAの分析データから特定の魚種の産卵行動を把握する手法の開発を試みた。なお、本項で紹介する内容はWu et al.（印刷中）からの抜粋である。

この研究では、三春ダムの前貯水池の一つである蛇沢川前貯水池において、2019年と2020年にそれぞれ春から夏にかけて毎週の採水調査を実施した。これに加えて、2020年の6月から7月にかけて11日間の毎日の採水調査も実施した。この環境DNAサンプルを用いて、コイ、オオクチバス、ブルーギルの3種を対象に環境DNAサンプル中の核DNA濃度およびミトコンドリアDNA濃度を測定した。この測定データを水質などの環境データとともに繁殖期の推定モデルを作成したところ、推定された繁殖期は既知の繁殖期と概ね一致したが、高精度の推定については改善の余地があった。つまり、この研究によって、水サンプルの定期的な採取によって魚類の繁殖期や繁殖地をラフに推定することが可能であることが示された。時空間的な解像度を高めるにはもう少し情報が必要であるが、このような手法を網羅的解析に応用することで、生息するすべての魚種の繁殖期と繁殖地をまとめて把握することも今後は可能になるかもしれない。

このような、環境DNA分析によって、単にある生物がいるかないかだけでなく、生理的な状態や行動を把握しようとする取り組みはこれからの数年の間に大きく前進することが予想される（Minamoto, 2022）。そのような環境DNAの分析技術の発展やバイオリングに代表される新技術、そして従来の採捕に基づく情報を組み合わせることで、生物の生態に関わるより詳細な情報を手に入れることが可能になるだろう。ダム湖は自然湖沼より管理が行き届いているため、この

ような研究をすすめる上ではフィールドとして有用である可能性もある。ダム湖を積極的にフィールドとして利用することで、環境DNAに限らず、様々な新技術が発展し、魚類を中心とした水生生物の生態がより良く理解されることにつながるかもしれない。

## 参考文献

- 1) Bylemans, J., Furlan, E. M., Hardy, C. M., McGuffie, P., Lintermans, M., Gleeson, D. M. (2017) An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Methods in Ecology and Evolution* 8 (5), 6467-655.
- 2) Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4 (4), 423-425.
- 3) Fukaya, K., Kondo, N. I., Matsuzaki, S. S., Kadoya, T. (2022) Multispecies site occupancy modelling and study design for spatially replicated environmental DNA metabarcoding. *Methods in Ecology and Evolution* 13 (1), 183-193.
- 4) Hayami, K., Sakata, M. K., Inagawa, T., Okitsu, J., Katano, I., Doi, H., Nakai, K., Ichiyangi, H., Gotoh, R. O., Miya, M., Sato, H., Yamanaka, H., Minamoto, T. (2020) Effects of sampling seasons and locations on fish environmental DNA metabarcoding in dam reservoirs. *Ecology and Evolution* 10 (12), 5354-5367.
- 5) Jo, T., Ikeda, S., Fukuoka, A., Inagawa, T., Okitsu, J., Katano, I., Doi, H., Nakai, K., Ichiyangi, H., Minamoto, T. (2021) Utility of environmental DNA analysis for effective monitoring of invasive fish species in reservoirs. *Ecosphere* 12, e03643.
- 6) Minamoto, T. (2022) Environmental DNA analysis for macro-organisms: Species distribution and more. *DNA Research*, 29, dsac018.
- 7) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., Iwasaki, W. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2, 150088.
- 8) Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology* 29 (22), 4258- 4264.
- 9) Wu, L., Wu, Q., Inagawa, T., Okitsu, J., Sakamoto, S., Minamoto, T. (印刷中) Estimating the spawning activity of fish species using nuclear and mitochondrial environmental DNA concentrations and their ratios. *Freshwater Biology*.
- 10) 環境DNA学会 (2020) 環境DNA調査・実験マニュアル ver. 2.2. (<https://ednasociety.org/manual/>)