

# 環境DNAを利用したダム湖に生息するサケ科魚類の行動実態把握の基礎的研究

◇札幌開発建設部 雨竜川ダム調査事業所      ○山本 遥輝  
南 尚志  
長原 寛

雨竜川上流に位置する朱鞠内湖及び宇津内湖に生息するイトウやサクラマスは、地域特有の漁業資源であり、生態系の観点からも重要な魚類のため、その行動実態を把握することが求められている。しかし、当該地域は広大で支川が多いため、生息状況の把握は困難であり、既往の魚類調査も少ない。そのため、簡易的な手法で把握する方法を確立するため、環境DNA手法により調査した。その結果、環境DNAの有効性が確認された。

キーワード：環境DNA、種特異的解析、産卵行動

## 1. 研究目的及び調査対象地について

### (1) 朱鞠内湖及び宇津内湖の環境

朱鞠内湖及び宇津内湖は、石狩川水系の雨竜川上流に位置する雨竜第1ダム及び雨竜第2ダム（1943年完成）の人造湖である。朱鞠内湖の湛水面積（2,373ha）は、人造湖として日本最大であり、多数の入り江や湿地環境、流入河川が存在する（図-1、写真-1）。

気候は北海道屈指の寒冷・多雪地域であり、1978年2月17日に朱鞠内湖北東部の母子里で戦後の国内最低気温である $-41.2^{\circ}\text{C}$ を記録、積雪深は1982年3月10日に3.11mが観測されている。

朱鞠内湖及び宇津内湖には環境省レッドリストや北海道レッドリストに記載されている重要種のイトウ・サクラマスが生息していることが知られている<sup>1)</sup>。イトウは環境省のレッドリストで絶滅危惧IB類、北海道レッドリストで準絶滅危惧種、サクラマスは環境省のレッドリストで絶滅危惧IB類、北海道レッドリストで留意種に指定されている。イトウ・サクラマスは主に水生昆虫や木々等から落下した昆虫を餌とし、イトウは全長15cm前後の魚も主な餌とする。このことから2種とも生態系の上位に位置しており、生態系保全の観点から重要である。また、朱鞠内湖と宇津内湖にはイトウやサクラマス等をはじめとした淡水魚を目的に多くの遊漁者が訪れ、地域の重要な資源でもある。

現在、朱鞠内湖及び宇津内湖での遊漁ではイトウ保全の観点からイトウのキャッチ&リリースの徹底やシングル&バーブレスフックのみ使用可等の規則が存在する<sup>1)</sup>。しかし、かつてはそれらの規則はなく、現在よりイトウ



図-1 朱鞠内湖及び宇津内湖



写真-1 周辺の流入河川と湖岸部に点在する湿地の状況  
(上段：盛夏季, 下段：晩秋)

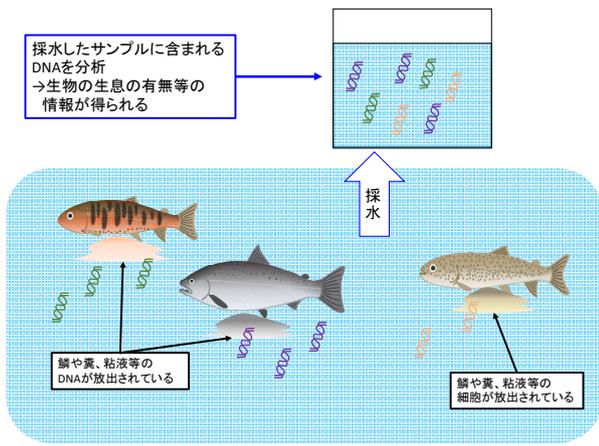


図-2 環境DNAの概要

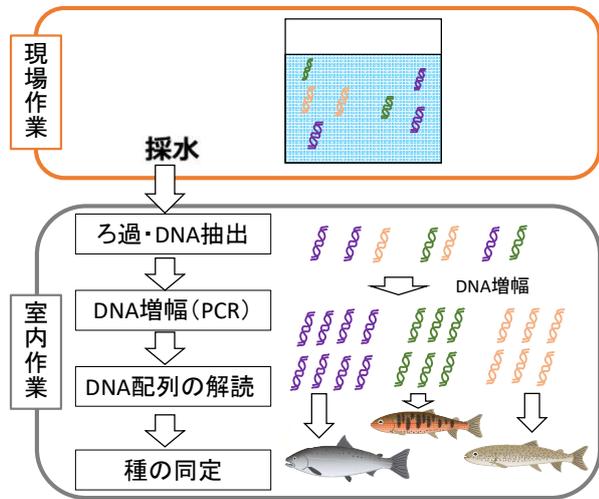


図-3 環境DNAの分析手順

表-1 捕獲調査と環境DNAの比較

	調査員によるばらつき	コスト・時間	生息情報としての根拠
捕獲調査	高	高	高
環境DNA	低	低	低

やサクラマスは少なかった<sup>1)</sup>。現在は朱鞠内湖淡水漁協協同組合（以下、漁協）とNPO法人シュマリナイ湖ワールドセンターが中心に保全活動が行われ<sup>1)</sup>、その個体数は回復傾向にある<sup>1)</sup>。しかし、その分布範囲は朱鞠内湖及び宇津内湖全域と2つの湖に注ぐ流入河川と広く、詳細な行動動態は把握されていない。また、イトウ・サクラマスといったサケ科魚類は産卵のために河川を遡上するが、当該地域の流域は雨竜第1ダム及び雨竜第2ダムにより周辺の水系から隔離されており、他の地域で確認される一般的なイトウ・サクラマスの生活史とは異なる可能性がある。そのため、行動（主に産卵のための遡上）や生活史を把握することはイトウ・サクラマスの保全の観点から重要なデータとなる。

当該地域のイトウ及びサクラマスの行動を把握するう

えでの課題点として、遡上しうる流入河川の多さが挙げられる。漁協によりイトウの産卵床について調査が継続的に行われているが、その中で産卵が確認された河川は22河川あり<sup>2)</sup>、アプローチすることが困難な河川も複数存在する。加えて、地形の複雑さや広大な土地であることから、調査実施時のコストや時間を多く要することが課題である。

本論文では、この課題の解決への試みとして、近年魚類を始めとする水生生物の生息状況等を簡便に把握することができる環境DNAを用いて、イトウ及びサクラマスの遡上行動を把握することを目的に調査を行った。なお、本論文でのDNA分析は環境DNAを用いて魚類の遡上を把握した論文<sup>3)</sup>をもとに実施した。

## (2) 環境DNAについて

環境DNAとは生物から大気中や水中、土壌中に放出される細胞片や糞に含まれるDNAである<sup>4)</sup>（図-2）。

魚類などの水生生物は、産卵や遡上等で体を激しく動かした際に鱗が一部はがれ、また、通常時も糞等が放出される。このような行動によって各生物からDNAが放出されるため、現場での採水とDNA分析によって生物の生息に関する情報が得られ、周囲に生息する生物種を検出することが可能となる（図-3）。

従来の捕獲調査では各調査員の技量によって結果が変動することやトラップなどの設置・回収等により1地点あたりに要する時間が長い（表-1）。一方、環境DNAは現地での作業は採水のみであり、捕獲調査に比べて結果のバラツキも少なく、多数の地点を短期間で調査実施可能である（表-1）。

しかし、環境DNA調査にも課題がある。従来の捕獲調査では調査実施地点周辺に確実に存在していることは確認できるが、環境DNA調査では分析結果検出された魚種が調査実施地点周辺に生息していない可能性がある（偽陽性）。その反対に、調査実施地点周辺に生息しているにもかかわらずDNA分析で検出されない可能性もある（偽陰性）。また、底生魚の検出が難しいことや、DNA配列情報を基に分析するため、近縁種は区別して分析できない場合がある点も課題として残されている。このような課題・検討事項があるものの、捕獲調査結果や各種の生態情報を基に環境DNA調査結果の検証を行うことができる。そのため、河川水辺の国勢調査において、一部河川で捕獲調査と併せて試験的に実施されている<sup>5)</sup>。

環境DNA技術は魚類相の把握にとどまらず、環境DNAによる魚類の遡上や流下行動の把握にも応用されている<sup>3)</sup>。これまでの環境DNAでは生物の生息の有無に関する調査方法（メタバーコーディング法）が主流であったが、近年、特定の対象種に限定し、その環境DNA濃度を定量的に評価する手法が開発されてきた（種特異的解析）。この手法により、特定の種について、周辺に生息する量が推定できるようになった。

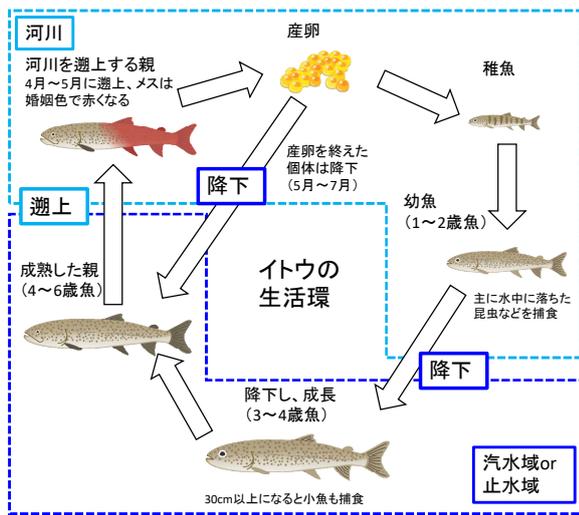


図-4 イトウの生活史

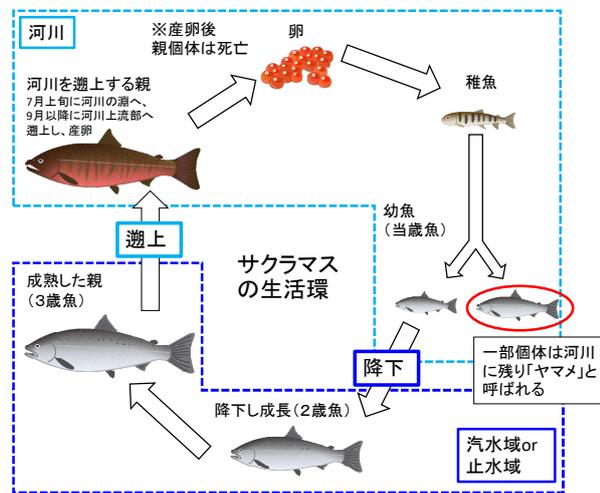


図-5 サクラマスの生活史

## 2. 調査地点・調査時期

調査地点は朱鞠内湖及び宇津内湖の8つの流入河川で実施した。なお、本論文内においてイトウ・サクラマスの保全の観点から調査位置は明記せず、河川A、河川B...と表記する。

調査時期はイトウの産卵時期である4月下旬～7月上旬に8回、サクラマスの産卵時期である8月中旬から10月下旬まで8回、合計16回調査を実施した。また、通常イトウの産卵時期は4月～5月(図-4)<sup>6)</sup>、サクラマスの産卵時期は9月以降(図-5)<sup>6)</sup>とされているが、当該地域は国内でも屈指の寒冷地域であることと、雨竜第1ダム及び雨竜第2ダムの存在により他地域の個体群と交雑することがなく、独自の生活史をとりうるという漁協からの助言により調査時期を設定した。

## 3. 調査方法

### (1) 環境DNAの分析手法について

現在、環境DNAの分析手法として主に2つある。

1つは採水地点周辺に生息する種の有無を網羅的把握するメタバーコーディング法、もう1つは特定の種のみを対象とし、その生物由来のDNAを定量的に把握する種特異的解析がある(図-6)。

これまで環境DNA調査は、簡易的に周辺の生物相を把握できるという点でメタバーコーディング法による解析が主流であった。一方で、サンプルからDNA抽出時のDNA濃度が種ごとに異なることや種ごとにPCRの増幅効率が異なるため定量的なデータが得られないことがたびたび指摘されてきた<sup>8)</sup>。近年、各生物の遺伝子配列に関するデータベースが整備されたことを背景に、特定種だけに注目した種特異的解析が可能になり、環境DNA調査で定量的なデータを取得できるようになった。

このことにより、周辺の生物相だけでなく、周辺の対象種の相対的な生物量を環境DNAを用いて推定することができるようになった。そのため、定量的な時系列データが得られ、そのデータから魚類の遡上等の行動を推定できると考えられる。

本研究では、朱鞠内湖及び宇津内湖の8つの流入河川で定期的に採水を行い、そのサンプルを種特異的解析することでイトウ及びサクラマスの定量的なDNA濃度の時系列データを取得し、遡上時期等について推定した。

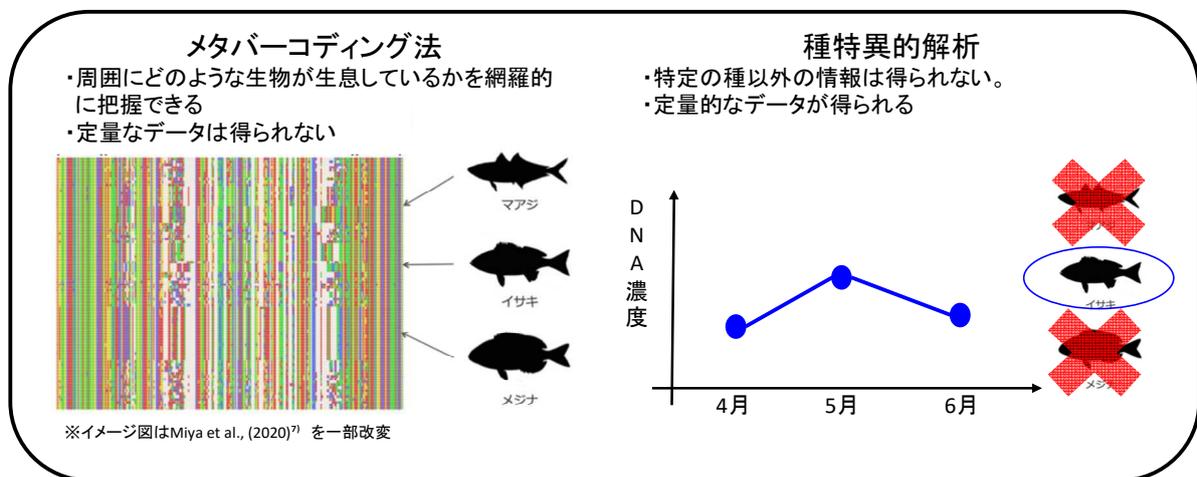


図-6 環境DNA分析のイメージ図(メタバーコーディング法と種特異的解析の特徴)

## (2) 現地作業・分析作業

朱鞠内湖及び宇津内湖の8つの流入河川の各1地点でポリビン1Lに採水を実施した。採水及び採水後のサンプルの保存に関しては「環境DNA調査・実験マニュアル ver.2.2」<sup>9)</sup>に準拠し、採水後はDNAの分解を防ぐためにベンザルコニウム塩化水溶液（オスバン）を約1ml添加し、クーラーボックスで分析室へ持ち込んだ。

分析室に持ち込まれたサンプルは、フィルターろ過・DNA抽出精製が行われた。その後、定量PCR装置を用いて定量解析を行った。

## 4. 調査結果

環境DNA調査結果の解釈の留意すべき点として主に2つある。1つはDNA濃度は必ずしも個体数と一致しないことがある。DNA濃度は一般的に周囲に生息する個体数と相関関係にあることが多いが、産卵行動等の体を激しく動かしした場合や死骸からも多量のDNAが放出される。また、放出されるDNA濃度は一般的に個体のサイズや個体との距離にも依存するため、採水地点近傍に大型の対象生物がいた場合、DNA濃度は高い値を示す<sup>10)</sup>。

2つ目は環境DNA濃度のみで対象魚種の河川間の比較はできないことである。各河川において、DNAが河川内を拡散していく過程は異なり、それは河川規模や流速等の様々な要因に影響を受けるため、河川間でのDNA濃度を比較することは困難である<sup>11)</sup>。

以上のことに留意して調査結果からイトウとサクラマス<sup>12)</sup>の遡上行動を検討した。

### (1) イトウに関する結果

イトウに関する環境DNA結果を図-7に示す。

一般的には、イトウの遡上・産卵期は4月の融雪期～5月とされているが、当該地域のイトウの産卵期である4月

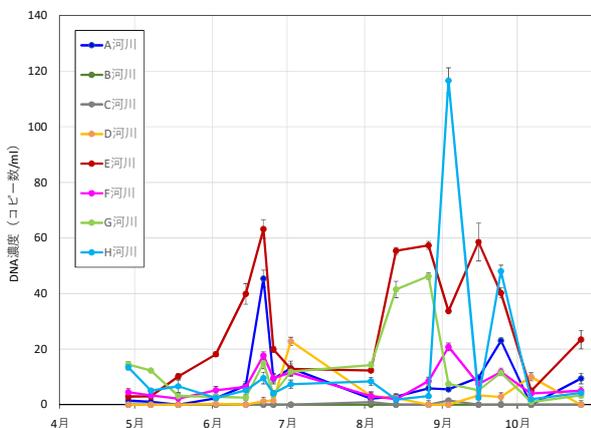


図-7 イトウの環境DNA結果  
(エラーバーは標準誤差を示す)

～7月（漁協からヒアリングによる）において、多くの流入河川（8河川中6河川）で6月中旬頃にDNA濃度のピークが確認されたことから、この時期にイトウの遡上・産卵が最も行われていると推定された。推定されたピークは一般的な産卵期より約1か月半遅れてピークが確認された。このことは当該地域の寒冷な環境や雨竜第1ダム及び雨竜第2ダムによって周辺地域の個体群と交雑する機会がないため、独自の生活史に進化した結果と考えられる。いくつかの河川では8月中旬以降もDNA濃度が高い値を示した。この現象として考えられる要因は以下の2つである。

- ① イトウは成熟するまでの1～2年間を河川で過ごす。そのため、産卵河川には稚魚のみならず、孵化後1年～2年の個体が存在するため、夏季水温が上昇し、それらの個体が活動期に入り、その際に放出されたDNAが検出された可能性。
- ② 一部採水地点では湖の水位によっては止水域に類似した環境を有する地点もあり、産卵後、湖に戻った個体が周辺に存在していた可能性。

ただし、複数地点（E河川、G河川、H河川）で高頻度<sup>13)</sup>に高濃度のDNAが検出されていることから②で考えられるように偶発的に採水地点付近に個体<sup>14)</sup>がいた可能性は低い。

以上のことから8月に一部の河川で確認されたDNA濃度の上昇は、上記で挙げた①の要因と考えられる。

### (2) サクラマスに関する結果

サクラマスに関する環境DNA調査の結果を図-8に示す。

多くの流入河川で6月下旬～7月上旬、8月下旬～9月下旬、10月下旬の3回DNA濃度の上昇が確認された。サクラマスの生活史は通常、初夏に一度河川を遡上し、河川の淵等で夏季を過ごす。秋季に入ると河川の最上流へ遡上し、体を河床にぶつけて産卵床を作り、産卵したの

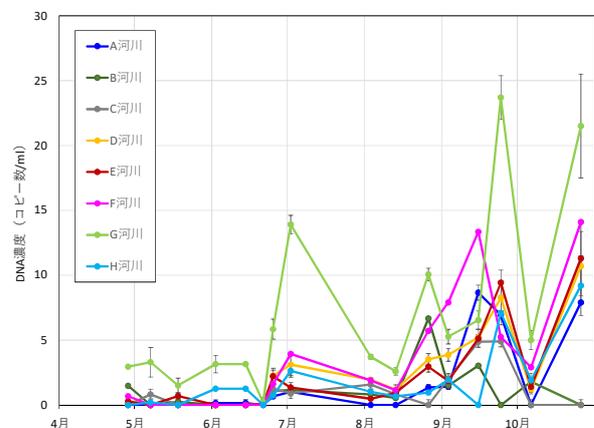


図-8 サクラマスの環境DNA結果  
(エラーバーは標準誤差を示す)

ちに死亡する（図-5）。

その生活史を踏まえると、6月下旬～7月上旬のDNA濃度の上昇は湖から河川の淵環境への移動によるものと推測される。8月下旬～9月下旬のDNA濃度の上昇は各河川の最上流部に移動し、産卵床の形成と産卵によるものと考えられる。河川間でばらつきはあるものの概ね9月中旬が産卵の最盛期であると考えられる。最後、10月下旬にDNA濃度が上昇している。これは、産卵を終えた個体が死亡し、その死骸から放出されたDNAによるものと考えられる。

## 5. 捕獲調査と環境DNA結果の比較検証と考察

環境DNA調査は簡便である一方、PCR解析により偽陽性や偽陰性等の生物の生息情報に関する不確実性がある。そのため、環境DNA調査結果だけではなく、捕獲調査結果と比較して結果を検討した。また、漁協が行っているイトウの産卵床調査<sup>2)</sup>で確認されたデータも用いて環境DNA調査結果を検証した（表-2）。

漁協によるイトウの産卵床調査で産卵床が確認されている河川では、環境DNA調査で6月中旬頃にDNA濃度のピークが検出された。このことはイトウが産卵のために遡上することでDNA濃度のピークが生じたという推測結果を裏付けるものである（表-2）。

6月下旬～7月上旬にサクラマス<sup>3)</sup>のDNA濃度のピークが確認された河川では、夏季の魚類調査時（令和3年7月中旬実施）にサクラマスが複数地点で捕獲された。このことはサクラマスが夏季に湖から河川の淵環境に遡上し

表-2 環境DNA結果と捕獲調査結果の比較

種名	環境DNA結果の特徴	捕獲調査結果との比較
イトウ	6月中旬に濃度のピーク	漁協独自の産卵床調査結果と概ね一致
サクラマス	6月下旬～7月上旬に濃度上昇	環境DNA調査実施河川で夏季魚類調査で捕獲実績あり
	8月下旬～9月下旬に再び濃度上昇	環境DNA調査実施河川で秋季魚類調査に産卵床確認



写真-2 確認されたサクラマスの産卵床跡（赤枠内）

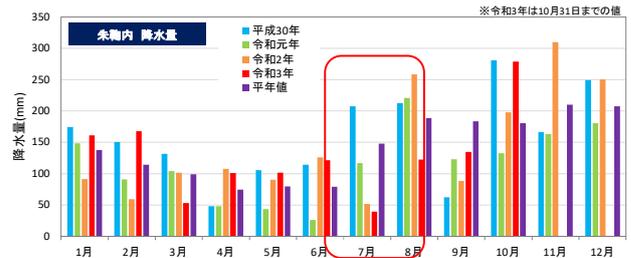


図-9 朱鞠内月別降水量の変化

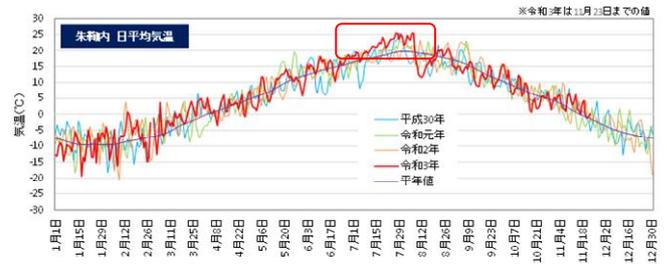


図-10 日平均気温の変化

ているという推測結果を裏付けるものである（表-2）。また、秋季の魚類調査時（令和3年9月中旬実施）に、サクラマスの産卵床跡が確認された（写真-2）。このことはサクラマスのDNA濃度が産卵行動等により8月下旬～9月下旬で上昇したという推測結果を裏付けるものである。

以上のことから、環境DNA調査結果はイトウ及びサクラマスの遡上動態や産卵行動を反映している可能性が高い。また、この結果はイトウ・サクラマスをはじめとするサケ科魚類の遡上動態を把握する手法の一つとして環境DNA調査の有効性を示すものである。

## 6. まとめ

本研究により朱鞠内湖及び宇津内湖の流入河川におけるイトウ・サクラマスの行動について以下のことが明らかになった。

- ① イトウは今回調査した朱鞠内湖及び宇津内湖に流入する8河川のうち6河川で遡上・産卵を行っており、そのピークは6月中旬頃と推定された。
- ② サクラマスもイトウ同様に今回調査した8河川のうち8河川で遡上・産卵していると推定された。また、河川の淵環境への遡上は6月下旬～7月上旬、産卵行動のピークは9月中旬であることが推定された。

今回の調査結果は漁協が実施した産卵床調査などと概ね一致する結果であり、サケ科魚類の遡上動態を把握する手法として環境DNA調査の有効性を示すものである。

なお、今年度は夏季に小雨、高温が続き（図-9、図-10）例年とは異なる環境であったため、異なる行動パターンを示していた可能性が考えられる。また、既往の魚類調査データも少ない当該地域においてイトウ・サクラ

マスの基礎データ蓄積の観点から、次年度以降も調査を継続し、環境DNAによる遡上動態の精度向上を図りたいと考えている。

environmental DNA. Ecology and Evolution 6:3468-3477

**謝辞**：本研究を実施するにあたってイトウ・サクラマスに関する情報、論文公開へのご理解とご協力をいただいた朱鞠内湖淡水漁協協同組合の皆様には謝意を表す。

#### 参考文献

- 1) 川野輪真衣 (2020年) 朱鞠内湖における希少魚の持続的利用と地域振興：ステーキホルダー間の協働に着目して
- 2) 朱鞠内湖淡水漁業協同組合 (2021年) 近縁の朱鞠内湖淡水漁業協同組合による様々なイトウ利活用の取組について
- 3) Yatuyanagi T, Ishida R, Sakata M K, Kanbe T, Mizumoto H, Kobayashi Y, Kamada S, Namba S, Nii H, Minamoto T, and Araki H (2019) Environmental DNA monitoring for short-term reproduction and migration of endemic anadromous species, Shishamo smelt (*Spirinchus lanceolatus*). Environmental DNA 2:130-139
- 4) 土居秀幸, 近藤倫生 (2021年) 環境DNA 生態系の真の姿を読み解く 共立出版
- 5) 北川哲郎, 村岡敬子, 山田拓也, 中村圭吾 (2020年) 河川水辺の国勢調査(魚類)における環境DNAメタバーコーディング解析の試行事例分析 河川技術論文集
- 6) 藤田朝彦, 武内啓明, 川瀬成吾 (2019年) 山溪ハンディ図鑑 増補改訂 日本の淡水魚 山と溪谷社
- 7) Miya M, Gotoh R O, and Sado T (2020) MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. Fisheries Science 86:939-970
- 8) Kelly R P, Shelton A O, and Gallego R (2019) Understanding PCR processes to draw meaningful conclusions from environmental DNA studies. Scientific Reports 9:12133
- 9) 一般社団法人環境DNA学会 (2020年) 環境DNA調査・実験マニュアルVer2.2
- 10) Mizumoto H, Urabe H, Kanbe T, Fukushima M, and Araki H (2018) Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid. Frontiers in Ecology and Evolution 8:569425
- 11) Chambert T, Pilliod D S, Goldberg C S, Doi H, and Takahara T (2018) An analytical framework for estimating aquatic species density from