

止水域における環境 DNA 活用のための基礎研究の事例

応用地質(株)

研究担当者：沖津二郎、稲川崇史、坂本正吾

【要旨】

環境 DNA 技術を野外調査に活用するためには、採水時期や場所、採水前の流況等に対する環境 DNA の応答を理解した上での採水計画の立案や分析結果の解釈が必要である。本研究では、止水域を対象として、出水前後における環境 DNA 濃度の変化や、環境 DNA の平面的な分布を調査した。出水前後の調査の結果、湖岸では出水後に環境 DNA 濃度の変化が不安定になり定量的な調査に適さないこと、沖部では流入河川からの環境 DNA の流入の可能性に注意が必要ながことが判明した。また、平面的な分布調査では、湖岸部では 20m 程度離れていても検出種に大きな違いがないことが明らかとなった。本研究の成果は、環境 DNA を調査する際の注意点の明確化に役立つものと考えられる。

キーワード：環境 DNA 濃度、ダム湖、出水、水平分布

1. はじめに

ダム湖の湖岸と湖心で採水を行った場合、検出種数は湖岸で多いことが報告されている (Hayami et al., 2020)。しかし、止水域における環境 DNA の面的な分布や流況の変化に対する応答については、詳細に報告された事例は少ない。本研究では、三春ダムで出水前後や面的な採水及び分析を行い、止水域に対する環境 DNA 分析技術の適用における留意点を明らかにした。

2. 調査対象地の概要

本研究は、福島県田村郡三春町の阿武隈川水系大滝根川に位置する三春ダムで実施した(図-1)。三春ダムは1998年4月より管理に移行した重力式コンクリートダムで、治水、利水等を目的とした多目的ダムである(表-1)。ダム湖には5つの流入河川があり、うち4つ流入河川には、貯水池内の水質保全を目的とした前貯水池が設置されている。

調査地の気温と降水量については、気象庁の船引観測所の2008～2018年の10ヵ年平均で、気温は年平均11.1℃、年間平均総降水量1,188mmである。

3. 流況に対する応答

3. 1 調査・分析方法等

3. 1. 1 採水地点

流況に対する応答の採水は、三春ダムのダム湖の流入部に配置されている蛇石川前貯水池内の5地点、流入河川の蛇石川の1地点の計6地点で実施した(図-2)。蛇石川前貯水池は越流部の標高(EL. 330m)が三春ダムの平常時最高貯水位(EL. 326.0m)より高く、三

春ダムの本貯水池と水域が連続しない前貯水池である(表-2)。

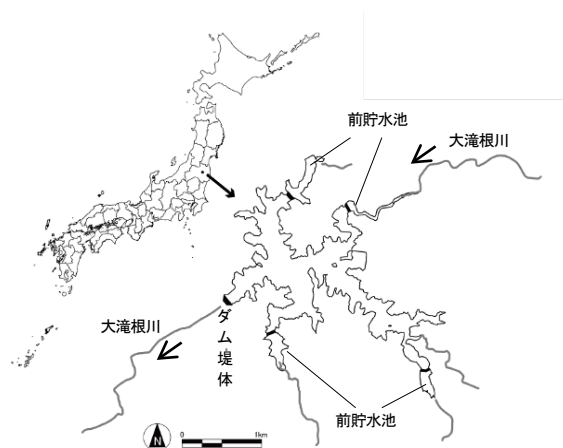


図-1 調査対象地(福島県 三春ダム)

表-1 三春ダムの諸元

項目	諸元
流域面積	226.4km ²
総貯水容量	42,800,000m ³
サーチャージ水位(EL.)	333.0m
平常時最高貯水位(EL.)	326.0m
洪水貯留準備水位(EL.)	318.0m
堤頂標高(EL.)	336.0m
型式	重力式コンクリート

注)三春ダム工事誌(1998)より引用。

3. 1. 2 調査方法

調査は2018年と2019年に実施した。採水は出水前後の2～12日間隔で行い、2018年は蛇石川前貯水池内の5地点(地点1～5)で、9月20日、9月27日、10月3日、10月10日、10月22日の5回採水した。2019年は蛇石川前貯水池内の5地点(地点1～5)と流

入河川1地点(地点6)の計6地点で、9月5日、9月8日、9月10日、9月12日、9月18日、9月25日、10月2日の7回採水した。

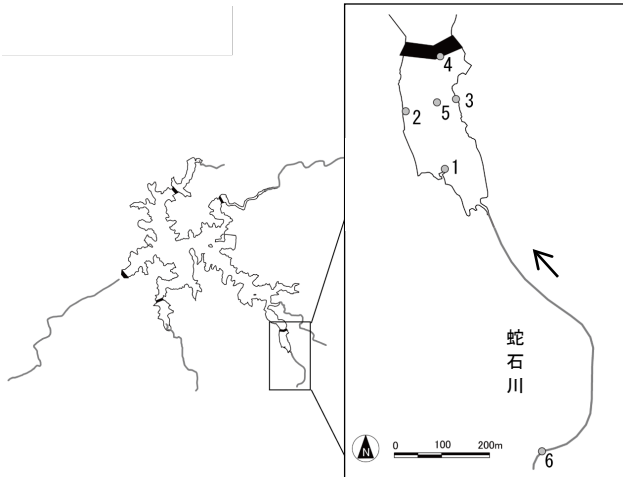


図-2 採水地点位置図

表-2 蛇石川前貯水池の諸元

項目	諸元
流域面積	10.89km ²
貯水容量	152,700m ³
越流部標高(EL.)	330.0m
基礎地盤標高(EL.)	317.5m
最深部水深	7.0m
滞留日数	7日

注)三春ダム工事誌(1998)より引用。

各採水地点では表層水を1L採水し、DNAの分解防止のために塩化ベンザルコニウム溶液を添加し(Yamanaka et al., 2017)、原則として翌日に室内でろ過した。採水サンプルのろ過には、2018年はポリフッ化ビニリデンフィルター(0.22μm, ステリバックス, メルクミリポア社)を、2019年はグラスファイバーフィルター(0.7μm, Whatman, GEヘルスケアジャパン社)を用いた。出水に伴う濁りが環境DNAの分析に影響を及ぼす可能性もあるため、採水時にはポータブル濁度計TB-31(東亜ディケーター株式会社)を用いて濁度を測定した。

3. 1. 3 分析方法

採水サンプルからのDNA抽出は、Miya et al. (2016)の手法で行った。抽出したDNA溶液は、蛇石川前貯水池に生息情報のあるオオクチバス、コイ、ドジョウを対象にリアルタイムPCRを行い、溶液中に含まれる各種のDNAコピー数を算出した。オオクチバス、コイ、ドジョウの種特異的なプライマー及びプローブは、源ら(未公表)を用いた。

3. 2 結果

3. 2. 1 流況等

採水開始5日前～採水終了日の三春ダムの流況と、調査時に測定した濁度を図-3、図-4に示す。調査期間中、2018年は10月1日に瞬間最大流入量81.4m³/s、2019年は9月9日に瞬間最大流入量77.8m³/sが発生した。出水直後の採水時の濁度は2018年は35.1NTU、2019年は56.8NTUであった。

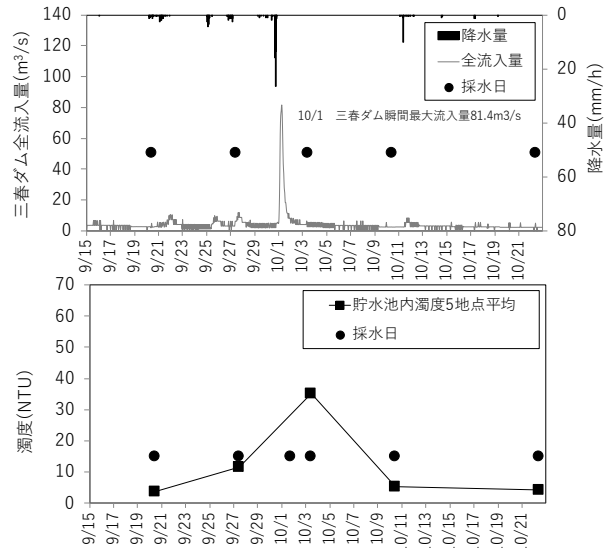


図-3 採水期間の流況及び採水日の濁度(2018年)

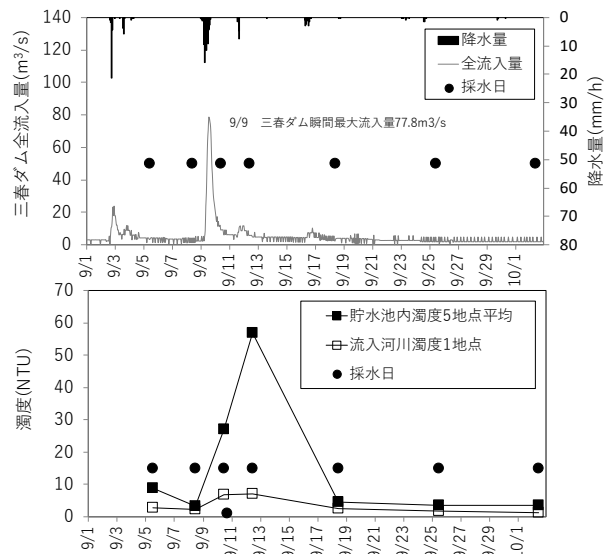


図-4 採水期間の流況及び採水日の濁度(2019年)

3. 2. 2 DNA分析結果

蛇石川前貯水池での採水サンプルのDNA分析結果を図-5に示す。

オオクチバスとコイのDNA濃度については、2018年は出水直後に湖岸で増加したものの、湖心では大きな変化は認められなかった。2019年は出水直後に湖岸・湖心ともに、両種のDNA濃度が減少した。また、

2018 年は出水 9 日後の採水で、2019 年は出水 15 日後の採水で、DNA 濃度は出水前と近い値となった。なお、2019 年における流入河川での分析では、流入河川におけるオオクチバスの DNA 濃度は未検出で、コイの DNA 濃度は 150 コピー数/L 以下であった。

ドジョウの DNA 濃度については、2018 年、2019 年ともに、出水後に湖心で増加した。2019 年における流入河川の分析では、出水後に流入河川でドジョウの DNA 濃度が約 6 倍に増加した。

3. 3 考察

今回の調査では、オオクチバス、コイ、ドジョウの 3 種ともに出水前後で DNA 濃度が変化し、これは出水に伴う変化と推定される。ドジョウよりも DNA 濃度が多かったオオクチバスとコイでは、2018 年は DNA 濃度が増加し、2019 年は減少した。兩年のこの違いは、出水直後は複数の要因により、DNA 濃度の増減が一定の傾向を示さない可能性があることを示唆している。DNA 濃度の把握を目的とした調査では、出水直後の採水は避けることが望ましいと考える。

直後に湖心の DNA 濃度が増加した。ドジョウの主な生息場は蛇石川のような小規模河川、用水路等であり、蛇石川前貯水池のような止水域では河川よりも生息密度は低いと推定される。また、ドジョウは好んで泥の中に潜って生息する（桜井・渡辺、2000）ことから、ドジョウの DNA 濃度は底質との距離が近い湖岸で高くなると考えられるものの、出水後は湖心で DNA 濃度が増加し、流入河川でも出水に応じた DNA 濃度の増加を確認した。よって、湖心でのドジョウの DNA 濃度の増加は、流入河川からの DNA の流入が原因であると考えられ、出水直後の止水域では、流入河川からの DNA の流入も考慮して採水を行う必要があることを示唆するものといえる。

今回の採水では、オオクチバス、コイ、ドジョウの 3 種ともに、出水後、約 10 日後の採水で、DNA 濃度は出水前と近い値となった。このことは、今回調査と同規模の出水や滞留日数の前貯水池では、出水後に約 10 日の期間を空けて採水を行うと、出水による DNA 濃度の変化の影響をできるだけ低減した採水

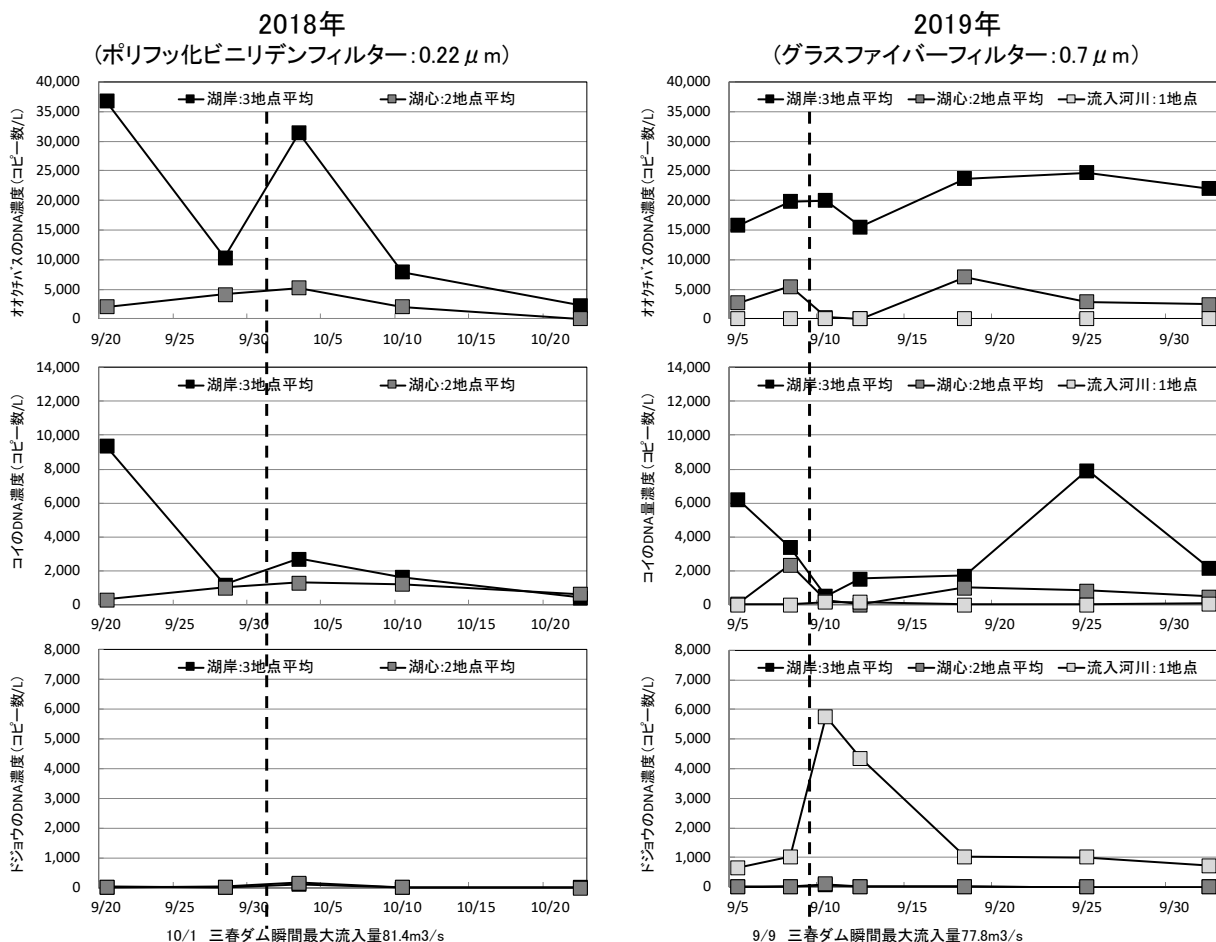


図-5 DNA 分析結果

ドジョウについては、2018 年、2019 年ともに、出水

が可能と考えられる。濁度も同様の期間（約 10 日）

で同程度になっており (図-3、4)、出水後の濁度が出水前の数値に概ね戻ることが、出水の影響を避けた採水の簡易な一つの目安となる可能性もある。

4. 止水域における環境 DNA の水平分布

4. 1 調査・分析方法等

4. 1. 1 採水地点

本研究の採水地点は三春ダムの本前貯水池の 21 地点とした(図-6)。採水地点は、湖岸と沖部に設定した。湖岸では岸に沿って 5m 間隔で 5 地点、沖部では湖岸から約 30m 間隔を基本に地点を設定し、表層水を 1L 採水した。左右岸は水際付近の傾斜も考慮して選定し、右岸は左岸よりも傾斜の緩い湖岸である。

4. 1. 2 調査方法

採水は、2019 年 9 月 24 日に行った。なお、三春ダム流域の平均降水量について、採水日の約 1 週間前には最大 3mm/h の降雨があったが、その後は採水日まで、1mm/h を超える降雨はなかった。採水及びろ過は「3. 1. 2 調査方法」の 2019 年と同様の手法で行い、ろ過にはグラスファイバーフィルター (0.7 μm, Whatman, GE ヘルスケアジャパン社) を用いた。

4. 1. 3 分析方法

DNA の抽出は、「3. 1. 3 分析方法」の 2019 年と同様の手法で DNA を抽出するとともに、Miya et al. (2016) の MiFish プライマーを用いて、メタバーコーディング法により魚種を検出した。

4. 2 DNA 分析結果

DNA は、コイ科、ドジョウ科、サンフィッシュ科等の 18 種が検出された(表-3)。

湖岸では、右岸は各検体あたり 7~13 種で計 15 種、左岸は各検体あたり 5~8 種で計 8 種を検出した。検出種数は右岸で多かった。

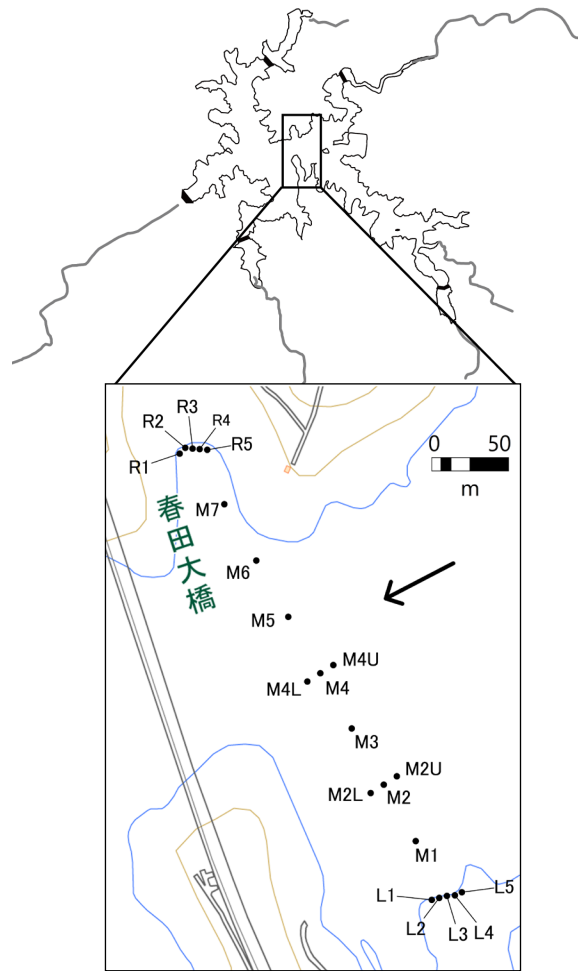


図-6 採水地点位置図

沖部では、0 種の地点を除くと、6~13 種で計 18 種を検出した。沖部では、湖岸で検出された魚種の全種が検出された一方で、カワムツ、フクドジョウ、サケ科といった三春ダム周辺では主に流入河川で生息する魚種が検出された。また、左右岸の多くのサンプルで検出されたブルーギル、オオクチバス、ウキゴリといった種について、沖部のサンプルでは湖

表-3 環境 DNA の検出結果

科名	種名	DNA検出																			三春ダムでの主な生息場所					
		右岸(緩傾斜)					沖部							左岸(急傾斜)					ダム湖	流入河川						
		地点	R1	R2	R3	R4	R5	M1	M2	M2L	M2U	M3	M4	M4L	M4U	M5	M6	M7	L1	L2	L3	L4	L5			
コイ科	フナ属		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○						○	○	
	コイ		○	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○						○	○	
	ニゴイ				○		○	○	13.3	9.4	21.8	10.7	18.6	22.0	21.0	22.7	12.5	5.9	○	○	○	○	○	○	○	
	カワムツ													○					○	○	○	○	○	○	○	
	カマツカ																								○	
	モツゴ				○																					○
	アブラハヤ						○							○	○	○										○
ウグイ		○		○					○		○		○	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	
オイカワ		○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	
ドジョウ科	ドジョウ							○	○	○	○	○	○	○	○				○	○	○	○	○	○	○	
	フクドジョウ				○	○				○	○	○	○	○	○										○	
サケ科	イワナ類								○		○														○	
	サクラマス(ヤマメ)																								○	
サンフィッシュ科	ブルーギル		○	○	○	○	○				○	○	○	○	○				○	○	○	○	○	○	○	
	オオクチバス		○	○	○	○	○			○				○					○	○	○	○	○	○	○	
カジカ科	カジカ																								○	
ハゼ科	ウキゴリ		○	○	○	○	○			○	4								○	○	○	○	○	○	○	
	ヨシノボリ属		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
5科	18種		8種	7種	13種	8種	11種	8種	7種	11種	13種	6種	10種	10種	9種	7種	0種	11種	7種	6種	8種	6種	5種	12種	15種	
																									8種	

注)三春ダムでの主な生息場所は、三春ダムの河川水辺の国勢調査(魚類)の調査成果(三春ダム管理所, 2015)と魚類の一般的な生態を基に区分した。

岸よりも検出頻度が低かった。

4. 3 考察

湖岸での採水サンプルについて、左右岸では右岸で検出種が多かった。右岸では、左岸で未検出であったコイが全てのサンプルで検出された。右岸は左岸よりも傾斜の緩い湖岸であり、兩岸の地形の違いで生息魚種が異なり、検出種に違いが生じた可能性がある。このことは、ダム湖で環境 DNA を活用して魚種を検出する場合には、種の生息環境も考慮して採水地点を選定する必要があることを示唆する。

また、同じ湖岸側の採水地点 5 地点について、検出種数に違いはあるものの、ダム湖を主な生息場所としている利用する種は概ね共通して検出された。よって、今回の事例を参考にすると、ダム湖を主な生息場として利用する種の検出を目的として湖岸で採水する場合、湖岸沿い 20m 程度の地点位置の違いは、採水で留意しなくても良い可能性がある。

一方、沖部では、湖岸で検出されていないカワムツ、カマツカ、カジカが検出された。河川水辺の国勢調査（魚類）の調査成果も参考にすると（三春ダム管理所, 2015）、沖部でのみ検出された種は、流入河川を主な生息場とする種であった。このことは、ダム湖の沖部では流入河川から流入する環境 DNA も検出される可能性があることを示唆している。前述した「3. 流況に対する応答」のドジョウの事例からも、その可能性は高いと考えられる。したがって、ダム湖の沖部で採水した環境 DNA からの生息種を推定する場合には留意が必要である。

5. まとめ

本研究では、野外の止水域における出水に対する環境 DNA 濃度の応答と、環境 DNA 濃度の水平分布について検討を行い、ダム湖で環境 DNA を活用して魚種を検出する場合は、以下に留意が必要であることが明らかとなった。

- ①ダム湖での環境 DNA 濃度は出水の影響を受ける。
このため、ダム湖で環境 DNA 濃度を調査する場合は、採水前の出水に留意する必要がある。
- ②ダム湖を主な生息場として利用する種をメタバーコーディング手法で検出する際には、魚類の生息環境が概ね同じと考えられる場合は、ダム湖岸では採水地点の場所が 20m 程度異なっても検出種数に大きな差はない。
- ③一方で、沖部での採水サンプルから生息種を推定する場合には、上流からの環境 DNA の流入の可能

性も考慮し、活用を検討する必要がある。

謝辞

本研究は、国土交通省東北地方整備局三春ダム管理所に調査の了解を得て実施した。また、神戸大学の源利文准教授や、共同研究者の国立研究開発法人土木研究所の中村圭吾上席研究員、村岡敬子総括主任研究員には、計画の立案、分析等について指導・助言を頂いた。ここに記して感謝の意を表する。

参考文献

- 1) Hayami K, Sakata MK, Inagawa T, Okitsu J, Katano J, Doi H, Nakai K, Ichianagi H, Gotoh RO, 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*, Web Online (<https://doi.org/10.1002/ece3.6279>).
- 2) 三春ダム工事誌(1998)財団法人東北建設協会.
- 3) Yamanaka H, Minamoto T, Matsuura J, Sakurai S, Tsuji S, Motozawa H, Hongo M, Sogo Y, Kakimi N, Teramura I, Sugita M, Baba M, Kondo A (2017) A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology* Vol. 18, pp. 233-241.
- 4) Miya M, Minamoto T, Yamanaka H, Oka S, Sato K, Yamamoto S, Sado T, Doi H (2016) Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA, *Journal of Visualized Experiments* (117) e54741.
- 5) 桜井淳史・渡辺昌和(2000)淡水魚ガイドブック, 株式会社永岡書店.
- 6) 三春ダム管理所(2015)平成 26 年度三春ダム水辺現地調査(魚類等)業務報告書.