

論文の内容の要旨

氏名：竹内 綾

博士の専攻分野：博士（生物資源科学）

論文題名：環境 DNA によるウナギ産卵イベントの探索に関する研究

1. 緒言

降河回遊魚のウナギ属魚類はその 19 種亜種全てが外洋で産卵すると考えられている。このうちニホンウナギでは、すでに産卵場の決定的な証拠となる卵や親魚が発見されているが、その他の種では一切見つかっていない。しかし、研究の進んだニホンウナギでさえ、実際の産卵行動は未だ観察されたことはない。そこで、本研究では、水を取るだけで生物の存在を調査できる環境 DNA 法を、ウナギ産卵イベントの探索に適用することにした。目的は、環境 DNA 法がウナギ産卵イベントの探索に有用か否かを検討し、本法を用いてニホンウナギの産卵地点を発見することにある。

2. ウナギ環境 DNA 法の検討

ウナギ属魚類の環境 DNA を正確に検出するため、ウナギ属全種を一挙に検出できる次世代シーケンサー用プライマーを開発した。ミトコンドリア DNA 内にある ATP6 領域に新プライマー“MiEel”を設計した。MiEel を用いた PCR ではウナギ属全種の DNA を増幅できた。その増幅領域には、亜種を除き 5~22 塩基の種間差がみられた。これより、MiEel は本属魚類を種レベルで識別可能であると判断した。実際に MiEel を用いて、2~16 種のウナギ属魚類の DNA を混合して調製した計 6 つの試験用サンプルを分析したところ、全 16 種を正確に検出することができた。本研究で開発した MiEel は、世界的に資源減少が問題となっているウナギ属魚類の非侵襲的調査を可能にし、その生態研究や保全・管理に役立つものと期待される。

次に、外洋調査を想定してニホンウナギの微量な環境 DNA を特異的に検出するための定量 PCR 法を検討した。まず既報のリアルタイム PCR 用プライマーを使って、ニホンウナギ 1 尾(全長 70 cm)を収容した水槽(100 L)の水 500 ml から抽出した DNA 溶液を 1000 倍に希釈して分析した結果、平均 0.53 copies/μl と微量な環境 DNA が検出された。この PCR 産物を大腸菌 CJ236 でクローニングした結果、ニホンウナギと 100%の類似性を示す配列が得られた。これより、リアルタイム PCR で陽性反応を示したが頻用の精製法ではシーケンシングできない希薄環境 DNA から、塩基配列を得てニホンウナギと確認することができるようになった。つまり、海水中の希薄なウナギ DNA も検出可能な“ウナギ環境 DNA 法”を確立できた。

3. 環境 DNA の放出と分解

野外調査で得られる環境 DNA データを正しく解釈するため、ニホンウナギの卵、仔魚、稚魚、親魚を用いて室内実験を行なった。環境 DNA の放出量に関する 3 つの室内実験の結果、(a)産卵行動が起こったり、(b)発育段階が進んだり、(c)尾数が増えたりすることにより、環境 DNA 放出量が急増することが明らかになった(図 1)。

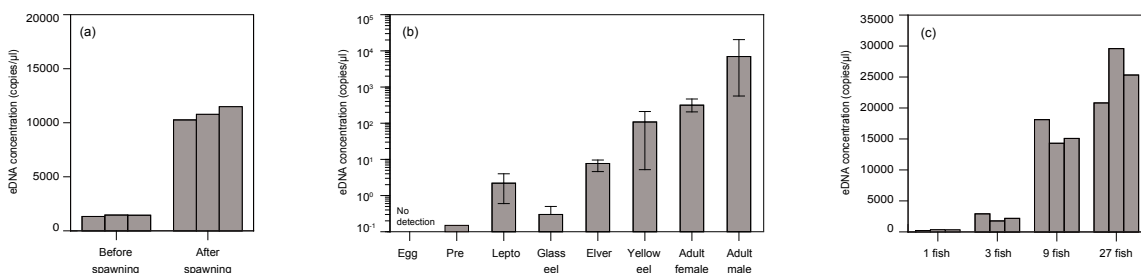


図 1. (a) 産卵前後と環境 DNA 放出量の関係、(b) 各発育段階における環境 DNA 放出量、(c) 尾数と環境 DNA 放出量

次に、環境 DNA の分解過程を明らかにするため、5°C と 25°C の室温で水サンプルをそれぞれ保存し、7 日間にわたって環境 DNA の消長を観察した。その結果、いずれの温度でも環境 DNA は 1 日間の内に急激に分解されることが分かった。また、7 日後、5°C では平均 59.1 copies/μl の環境 DNA が検出されたのに対し、25°C では非検出または、0.26 と 3.6 copies/μl の微量環境 DNA のみ検出されたことから、高水温中の環境 DNA は分解が早いものと推測された。以上より、外洋で産卵行動が起きた場合、産卵当日と翌日であれば、かなり高濃度の環境 DNA が検出されるものと予想された。

4. ニホンウナギ産卵場における環境 DNA の検出

ニホンウナギの産卵イベントを見つけるため、2015 年のなつしま航海(NT15-08)と 2017 年のよこすか航海(YK17-10)に参加して、環境 DNA 調査を実施した。

なつしま航海では、天然卵や親ウナギの採集実績がある地点“カイヨウポイント”に計 9 測点を設けた。各測点で水深 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 m の計 11 層から海水を 2L 採水し、リアルタイム PCR で分析したところ、3 測点の水深 250 m と 400 m から微量な環境 DNA が検出された。このことから本航海では、外洋におけるニホンウナギ環境 DNA の初検出に成功し、また、本法の全過程、すなわち採水、濾過、環境 DNA 抽出、リアルタイム PCR が船上にて実施可能であることを確認した。

よこすか航海では、塩分フロントと海底山脈の交点直南で内部潮汐エネルギーが高いパッチを探し、ここで産卵が起これると予想してパッチ内に計 5 測点を設けた(図 2)。各測点で水深 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000 m の計 8 層から海水を 10 L ずつ採水した。海水を船上で分析した結果、新月 6 日前の朝 8:42 に St.3 の水深 600 m から、昼 13:33 に St.5 の 400 m から、それぞれ 0.99 と 14.5 copies/μl の環境 DNA が検出された(図 2, 3)。同日の夜 21:41 には、St.3 から北西方向に約 3.22 km 離れた地点で親ウナギと思われる映像も得られた。さらに、ニホンウナギの産卵ピークである新月 3 日前の翌朝 7:54 には、St.3 の水深 400 m から 3 回の定量 PCR 分析で平均 55.3 copies/μl と高濃度の環境 DNA も検出された(図 2, 3)。この高濃度の環境 DNA は、産卵イベント直後の親ウナギが明け方に深所へ潜る途中に放出したものと考えられた。以上の結果を総合的に解釈すると、親ウナギは少なくとも新月 6 日前から産卵地点付近に集まり、新月 3 日前の深夜に内部潮汐エネルギーが最大の地点(St.3)付近で産卵したものと推測された(図 3)。

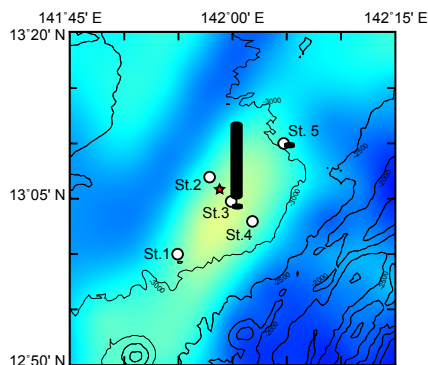


図 2. よこすか航海における環境 DNA 採水点(○). 円柱は環境 DNA 検出点、高さはその濃度を示す。星は親ウナギらしき映像が撮影された地点を示す。

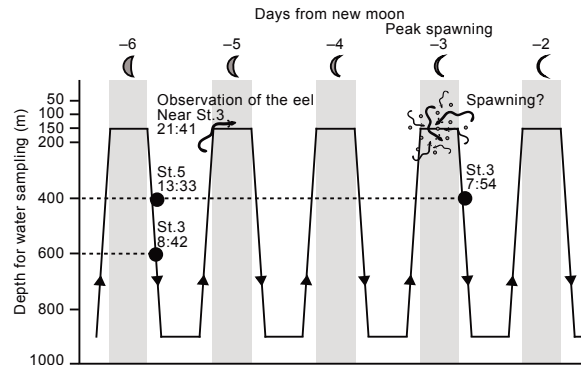


図 3. 環境 DNA 検出から推定するニホンウナギの行動。親ウナギは、昼に水深約 200 m、夜に約 800 m を泳ぐという日周鉛直移動をする。灰色は夜の時間帯を表す。

5. 総合考察

本研究では、実際の調査航海でニホンウナギの産卵行動に由来すると思われる環境 DNA のシグナルを得ることができた。これによって環境 DNA 法を用いてニホンウナギの産卵イベントが探索できることを示せた。今後、この環境 DNA 法がニホンウナギの産卵行動の発見に繋がり、さらには他のウナギ属魚類の産卵場調査にも展開されていくことによって、ウナギ産卵生態の解明が大きく進むものと期待される。