

環境 DNA を用いたウナギ産卵生態研究の新展開

○竹内 綾・河邊真子・山 梨津乃・渡邊 俊（日大生物資源），
山本哲史・源 利文（神戸大院人間発達），宮 正樹・佐土哲也（千葉県博），
三輪哲也・福場辰洋（海洋研究開発機構），塚本勝巳（日大生物資源）

2009 年 5 月、世界初のニホンウナギ *Anguilla japonica* の天然卵がマリアナ諸島西方海域で発見され、産卵場問題は一応の結着を見たが、産卵集団形成機構や産卵地点の物理化学的特性、産卵親魚数など、ウナギの産卵生態の諸課題は依然未解明のまま残っている。これらの問題を解決するには、まず産卵が起こるピンポイントの地点を正確に予想し、産卵行動を実際に観察する必要がある。このため本研究では環境 DNA 手法に着目し、産卵行動が起こる地点とタイミングを正確に予測することを目的とした。

環境 DNA とは、水中や土壌などの環境中に存在する生物由来の微量な DNA 断片で、これを採取・増幅・解読することで生物種の特異性と分布状態の把握が可能になる。この手法を絶滅危惧種に指定されたニホンウナギの産卵生態研究に船上適用できれば、採水するだけで非侵襲的、且つ迅速簡便に親ウナギの集合地点を予測でき、産卵行動の直接観察が実現するものと期待される。

2015 年 5 月 19 日と 20 日『なつしま』研究航海(NT15-08)において、ニスキン採水器を用い西マリアナ海嶺南端部海域の計 9 測点(図 1)から採水(水深 3.6 m、100 m、200 m、250 m、300 m、400 m、500 m、600 m、700 m、800 m、900 m、1000 m の計 12 層)した。各測点各層の海水 2L を濾過して、それぞれの濾紙から DNA を抽出し、これを鋳型としてリアルタイム PCR を行った。プライマーとプローブは、これまで計 5 回のニホンウナギの卵発見で実績のあるミトコンドリア DNA16S リボソーム RNA 保存領域の全長 154bp に設けた (Minegishi et al, 2009)。黄ウナギの飼育水について実施した環境 DNA 予備実験から、リアルタイム PCR システムにおける環境水中の有効基準を蛍光強度 1 以上と定めた。

解析した計 136 サンプルの中で有効基準を満たしたものが 3 サンプル見つかった。このうち測点 C6t 400m のサンプルはダイレクトシーケンズで 34bp の配列を読むことができた。これと BLAST 検索で 100%の相同性を示したニホンウナギとドンコ属 3 種、およびオオウナギの既知の配列を比較したところ、ニホンウナギは全て一致したが、ドンコ属 3 種は 3 塩基、オオウナギは 2 塩基の不一致があった(図 2)。さらに、DDBJ データのオオウナギ 42 個体の C6t 400m の塩基配列相当部分には 2 塩基の不一致が必ず存在し、且つ種内変異は全く見られなかったことから、C6t 400m の環境 DNA はニホンウナギ由来の可能性が高いと考えられた。現在、さらに次世代シーケンサーを用いた確認を行っている。本研究から DNA が著しく希薄な海域でも環境 DNA 手法はウナギ産卵地点の予測に有効であると考えられた。

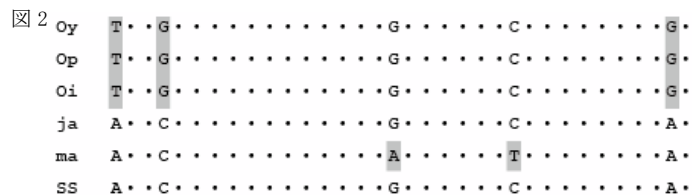
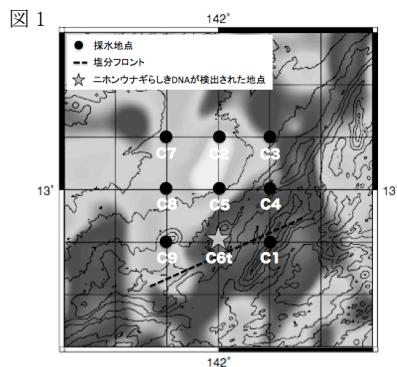


図 1. なつしま研究航海(NT15-08)において環境 DNA を観測した 9 測点
図 2. 塩基配列 (34bp) のアライメント結果。ドンコ属 3 種 Oy: *Odontobutis yaluensis*, Op: *O. potamophia*, Oi: *O. interrupta*, ニホンウナギ ja: *A. japonica*, オオウナギ ma: *A. marmorata*, SS: 測点 C6t 400m の塩基配列。
・は塩基が一致したことを、灰色部分は塩基の不一致を示す。