

環境 DNA を用いた宍道湖・中海における モクズガニ (*Eriocheir japonica*) の季節的な分布の推定

立石 新¹・辻 冨月²・山中裕樹³・乾 隆帝^{2,4}・赤松良久²・高原輝彦^{1,5*}

Seasonal distribution of Japanese mitten crab (*Eriocheir japonica*) in Lake Shinji-Nakaumi based on environmental DNA

Arata Tateishi¹, Satsuki Tsuji², Hiroki Yamanaka³, Ryutei Inui^{2,4},
Yoshihisa Akamatsu² and Teruhiko Takahara^{1,5*}

Abstract: The Japanese mitten crab (*Eriocheir japonica*), which undertakes a migration from freshwaters to the sea for reproduction, is an economically important resource for fisheries in Japan. This species has had a reduced catch in recent years, probably due to human impacts such as fishery pressure and habitat loss. In Lakes Shinji and Nakaumi, which make up a connected brackish lake system in Shimane Prefecture, optimal management of this resource requires knowledge of the distribution and biomass of *E. japonica*. Environmental DNA (eDNA) is increasingly being used to estimate the distribution and biomass of aquatic organisms. In this study, we developed a species-specific eDNA assay to evaluate detection/concentration of eDNA using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) for *E. japonica* in brackish environments. We also confirmed its utility for estimating the seasonal distribution and habitat preferences of *E. japonica* in Lake Shinji-Nakaumi. This eDNA method represents a useful monitoring tool, requiring minimal labor and time, and could be useful for the management of the *E. japonica* fishery.

Key words: brackish lake, crustaceans, environmental DNA (eDNA), migration, salinity

¹ 島根大学生物資源科学部・Faculty of Life and Environmental Sciences, Shimane University, 1060 Nishikawatsu-cho, Matsue, Shimane 690-8504, Japan.

² 山口大学大学院創成科学研究科・Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University, 2-16-1 Tokiwadai, Ube, 755-8611, Japan.

³ 龍谷大学先端理工学部環境生態工学課程・Course of Ecology and Environmental Engineering, Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University, 1-5 Yokotani, Seta-Oe cho, Otsu, Shiga 520-2194, Japan.

⁴ 福岡工業大学社会環境学部・Faculty of Socio-Environmental Studies, Fukuoka Institute of Technology, 3-30-1 Wajiro-higashi, Higashi-ku, Fukuoka, 811-0295 Japan.

⁵ 島根大学エスチュアリー研究センター・Estuary Research Center, Shimane University, 1060 Nishikawatsu-cho, Matsue, Shimane 690-8504, Japan.

* Corresponding Author

受付日：2020年8月2日，受理日：2020年12月16日，WEB掲載日：2020年12月31日

はじめに

モクズガニ (*Eriocheir japonica*) はイワガニ科に属するカニで、朝鮮半島や台湾等に分布しており、日本では北海道から沖縄までの河川等に生息している (Sakai, 1976)。本種は、通し回遊性をもち、降河回遊型 (成熟した個体が川を降って海域で繁殖活動に参加し、海域で生まれた幼体が河川を遡上して陸水域で成長する生活史) の甲殻類である (小林, 1999a, b)。したがって、モクズガニは、成長期を陸水域で過ごし、繁殖期に入ると河口域へと降河し、一部はさらに、浅海域に移動して交接して産卵する。繁殖期における本種は、主に秋から冬にかけて降河し、秋から翌年の初夏にかけての長期間における産卵がみられる。しかし、産卵時期に関する本種の個体差は大きく、産卵を主として秋から冬にかけて行うものと、冬から春にかけて行うものがある (林, 2006)。

モクズガニは、垂直の壁をよじ登ったり、陸上を移動できたりすることから環境適応力が高いことが知られている。例えば、飼育施設から脱走した個体が、5か月後に施設内で生きた状態で発見されたという報告もある (浜野, 2003)。モクズガニは餌の嗜好性も広く、稚ガニか成体か、さらに、水温の高低など様々な状況に応じて嗜好性を変化させるため、食性における競合種が少ないと考えられている (Kobayashi, 2009)。したがって、本種は様々な環境において生息することが可能である。しかし、現在では、モクズガニは強い漁獲圧による個体数の減少が懸念されている (小林, 1999b)。さらに、本種は、海域や汽水域に分布する親ガニのほとんどでは、1回の繁殖期を終えると死亡するため (Kobayashi and Matsuura, 1995)、繁殖参加前の個体 (とくにメス) が多数漁獲されると、個体群の再生産性に大きな負の影響を及ぼしてしまうことが問題である (小林, 1999b)。

島根県の河川漁業において、モクズガニは重要な水産資源の一つとされており (山根, 1988)、連結した汽水湖である宍道湖と中海においても漁獲調査等についての報告がある (石飛ほか, 2000; 寺岡ほか, 2016)。一方で、島根県においてもまた、モクズガニは漁獲圧に加えて、ダムなどの河川横断物などの設置によって天然個体の生息が危ぶまれており (後藤ほか, 1985; 日本シジミ研究所, 2007)、効果的な保全活動と資源管理は重要な課題と考えられる。しかし、本種は回遊する生態的特徴をもち、移動範囲も広いことから再捕獲率が低く、目視や採捕などの通常の生物モニタリング調査は難しい。そのため、漁獲対象で

ある成体の漁獲量の推移をもとに個体数の変動をモニタリングする方法が採用されることがあるが (小林, 1999b)、統計データが乏しい場合、本方法の実施は困難であるため、代替になる簡便なモニタリング手法の開発が望まれる。

環境 DNA 手法は、水棲動物の生息状況を評価する生物モニタリング方法として近年開発が急速に進んでいる (高原ほか, 2016; 山中ほか, 2016; Tsuji et al., 2019)。環境 DNA とは、生物が環境中に放出した生物由来の DNA 断片のことであり、水域に生息する生物は体表組織の代謝や排泄などによって環境中に DNA を放出していることがわかってきている (Barnes and Turner, 2016)。本手法は、野外で採集したわずか 1L ほどの水サンプルなどに含まれる対象種に特異的な DNA 断片の有無を PCR (polymerase chain reaction) 法などによって調べることで、対象種の存在を推定できる優れた手法である。環境 DNA を用いたモニタリング手法の利点は様々あり、目視や捕獲などの従来の調査法と比べて、採水するだけなので広範囲を簡便に調査できる、種同定に DNA 情報を用いるため形態判別などの専門的な技術が不要であることなどがあげられる (高原ほか, 2016)。環境 DNA に関する研究は、2008 年に初めて、フランスで環境水中の DNA を利用したウシガエル (*Lithobates catesbeianus*) の存在と半定量的な結果について報告された (Ficetola et al., 2008)。その後、日本国内においても、外来種 (ブルーギル *Lepomis macrochirus*, Takahara et al., 2013; ミシシッピーアカミミガメ *Trachemys scripta elegans*, Kakuda et al., 2019)、希少種 (オオサンショウウオ *Andrias japonicus*, Fukumoto et al., 2015; アマミイシカワガエル *Odorrana splendida*, Takahara et al., 2020)、そして、水産資源 (ヤマトシジミ *Corbicula japonica*, Takahara et al., 2019; シシヤモ *Spirinchus lanceolatus*, Yatsuyanagi et al., 2020) などを対象にした研究例が報告されている。また、甲殻類の絶滅危惧種ニホンザリガニ (*Cambaroides japonicus*, Ikeda et al., 2016) や外来種ウチダザリガニ (*Pacifastacus leniusculus*, Ikeda et al., 2019) についても環境 DNA 手法が開発されている。さらに、バルト海における外来種のカニ類においても環境 DNA を用いた生物モニタリングの有用性について検証された (Forsström and Vasemägi, 2016)。一方で、Yamanaka and Minamoto (2016) では、一生を海で過ごしたり、海から河川へ遡上したりするなど多様な生活史をもつスズキ (*Lateolabrax japonicus*) やボラ (*Mugil cephalus cephalus*) に加えて、通し回遊性をもつアユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) を対象

にして、河川横断物における魚道の有無が、これら 3 種の遡上に及ぼす影響について、環境 DNA を用いたモニタリングによって評価しており、本手法の利用可能性はとても幅広いと考えられる。

環境 DNA を用いた生物モニタリング調査の実施には、対象種の DNA のみを検出・増幅できる特異的なプライマーを開発することが必須であり、一方で、対象種以外の近縁種や生息場所における共存種を誤って検出しないことが重要である。多くの環境 DNA を用いたモニタリング調査では、リアルタイム定量 PCR 装置を用いたプローブ（蛍光色素）法によって、DNA 定量値から対象種の生物量の推定が試みられている（例えば、Takahara et al., 2012; Doi et al., 2017a; Iwai et al., 2019）。その際、検量線の作成のため、対象種の増幅領域を含む既知濃度の人工 DNA（スタンダード）を未知サンプルと同時に分析することで、そのサンプルに含まれる DNA を定量できる。あるいは、PCR 実験の際に同一のサンプルを複数回測定し、対象種の DNA が検出された割合（DNA 検出率）を調べて、定性的な生物量を推定する方法も採用されている（Doi et al., 2017b; Takahara et al., 2020）。

そこで本研究では、島根県の宍道湖と中海を調査フィールドとして、環境 DNA を用いたモクズガニの分布・生態の一端を明らかにすることを目的とした。そのためにまず、モクズガニの広範な生息環境である陸水域から汽水域を含めたフィールドで利用できる本種の種特異的な環境 DNA 用プライマー・プローブの開発を試みた。つぎに、環境 DNA を指標にしたモニタリングによって、2016 年 12 月から 2017 年 11 月までの一年間、宍道湖 - 中海周辺の 14 地点において、モクズガニを対象にした毎月の定点採水調査を実施した。そして、採集した水サンプルに含まれていたモクズガニの環境 DNA の結果から、本種が選好する場所や季節的な移動性などを明らかにすることを試みた。

方 法

モクズガニに特異的なプライマー・プローブセットの設計

本研究では TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR によるモクズガニ種特異的な環境 DNA 検出系の確立を試みた。まず、対象種であるモクズガニ、陸水域で同所的に生息する甲殻類のサワガニ (*Geothelphusa dehaani*)、および、同所的な生息はみられないが食用として国内に流通する近縁種のチュウゴクモクズガニ (*Eriocheir sinensis*) のミトコンドリア

DNA (mtDNA) NADH デヒドロゲナーゼのサブユニット 5 (ND5) 遺伝子領域の塩基配列情報を National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から取得した。環境 DNA 分析による種特異的検出では、ミトコンドリア DNA のチトクローム *b* 遺伝子 (Cyt *b*) やチトクローム脱水素酵素サブユニット I (COI)、調節領域 (D-loop) が遺伝マーカーとして利用されることが多い (Tsuji et al., 2019)。しかし、本研究では上記甲殻類 3 種の配列データが NCBI に登録されており、かつ、モクズガニの種特異的な配列が存在する可能性がみられた ND5 を対象領域として選定した。実際、最近では他の分類群でも ND5 を対象にした環境 DNA 用プライマーが開発されており、その有用性が実証されている（例えば、両生類：Takahara et al., 2020）。上記 3 種の配列を比較し、モクズガニの DNA のみを増幅するように、プライマーのフォワード側とリバース側の 3' 末端付近に種特異的な塩基が挿入されるようプライマーを設計した。その後、Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて、種特異性を確認した。設計したモクズガニ種特異的プライマー・プローブは以下に示す (PCR 増幅産物長：135 塩基対)。

フォワードプライマー (Eja-ND5-F)

: 5'-TGCTAAAAAAGGGAACCCACATAGA-3'

リバースプライマー (Eja-ND5-R)

: 5'-GCGGGTATTATTATTCATAGAGTCGGT-3'

TaqMan プローブ (Eja-ND5-Pr)

: 5'-[FAM]-AAGATACTCTTAGCGGTATAAA-[NFQ]-[MGB]-3'

組織 DNA の抽出

モクズガニのプライマー・プローブの種特異性の検証には、陸水域や汽水域におけるモクズガニの近縁種や同所的に生息する甲殻類 29 種を対象にした (表 1)。そこで、解剖バサミ、ピンセットを使用して、各個体から表面積が約 1mm² になるようにして組織片を用意した。各種の組織からの DNA 抽出には DNeasy Blood & Tissue キット (キアゲン社) を用いた。実験手順はキットに付属のマニュアルに従い、以下の様に実施した。まず、Buffer ATL 180 μL と Proteinase K 20 μL の混合液を入れた 1.5 mL エッペンチューブに組織片を入れてボルテックスにかけた。そのチューブを定温乾燥機に入れて 56 °C で 1 時間インキュベートした。その際、10 分おきに定温乾燥機からチューブを取り出し、ボルテックスにかけて十分に攪拌した。1 時

表1 プライマー・プローブの種特異性の検証に使用したモクズガニと近縁種などの甲殻類 30 種において、リアルタイム PCR 実験に用いた各種の個体数と組織抽出 DNA サンプルの濃度 (ng/μL). 穴道湖と中海, その近辺に生息する可能性のある種については, ○を付した (日本シジミ研究所, 2007 を参照).

Table 1 The 30 species of crustaceans, including Japanese mitten crab (*Eriocheir japonica*) and closely related species, used in the development of the primer-probe set, followed by the number of individuals used in the real-time PCR assays and the concentration (ng/μL) of tissue-extracted DNA samples of each species. The species that inhabit/may inhabit Lake Shinji, Lake Nakaumi, and their vicinity are marked with open circles.

* : リアルタイム PCR 実験に用いた DNA サンプルは, 濃度が 10 ng/μL 以上の場合は 10 倍希釈, 100 ng/μL 以上の場合は 100 倍希釈してから使用した.

* : DNA samples used in the real-time PCR assays were diluted 10-fold when the concentration was 10 ng/μL or higher, and diluted 100-fold when the concentration was 100 ng/μL or higher.

Japanese name	Scientific name	Number of individuals	DNA concentration	Lake Shinji	Lake Nakaumi
1 アカテガニ	<i>Chiromantes haematocheir</i>	3	0.6 – 0.9	○	○
2 アシハラガニ	<i>Helice tridens</i>	3	0.5 – 1.8		
3 ウモレベンケイガニ	<i>Clistocoeloma sinensis</i>	1	3.9		
4 カワスナガニ	<i>Deiratonotus japonicus</i>	3	0.8 – 3.0		
5 ケフサイソガニ	<i>Hemigrapsus penicillatus</i>	3	1.2 – 1.5		○
6 コメツキガニ	<i>Scopimera globosa</i>	3	0.6 – 3.8		
7 タイワンヒライソモドキ	<i>Ptychognathus ishii</i>	6	0.4 – 6.7		
8 タカノケフサイソガニ	<i>Hemigrapsus takanoi</i>	3	13.8 – 22.1		
9 チゴガニ	<i>Ilyoplax pusilla</i>	6	0.6 – 20.3		
10 トリウミアカインモドキ	<i>Sestrostoma toriumii</i>	3	4.9 – 7.8		
11 ハクセンシオマネキ	<i>Uca lactea</i>	3	0.8 – 2.8		
12 マメコブシガニ	<i>Philyra pisum</i>	3	0.9 – 5.4		
13 ハマガニ	<i>Chasmagnathus convexus</i>	3	0.5 – 1.7		
14 ヒメアシハラガニ	<i>Helice tridens wuana</i>	3	0.3 – 10.6		
15 ヒメヤマトオサガニ	<i>Macrophthalmus banzai</i>	3	1.2 – 1.6		
16 ヒメヒライソモドキ	<i>Ptychognathus capillidigitatus</i>	3	0.2 – 0.4		
17 ヤマトオサガニ	<i>Macrophthalmus japonicus</i>	3	0.2 – 2.9		
18 ユビアカベンケイガニ	<i>Parasesarma pictum</i>	1	0.3 – 0.9		
19 クロベンケイガニ	<i>Chiromantes dehaani</i>	3	5.3 – 9.8	○	○
20 ベンケイガニ	<i>Sesarmops intermedium</i>	3	2.3 – 10.5		
21 カクベンケイガニ	<i>Parasesarma pictum</i>	3	2.1 – 28.6		
22 フタバカクガニ	<i>Perisesarma bidens</i>	3	1.1 – 4.9		
23 アメリカザリガニ	<i>Procambarus clarkii</i>	3	2.0 – 20.7		
24 ガザミ	<i>Portunus trituberculatus</i>	2	4.1 – 21.0		○
25 テナガエビ	<i>Macrobrachium nipponense</i>	3	7.0 – 19.7	○	
26 サワガニ	<i>Geothelphusa dehaani</i>	3	9.2 – 28.0		
27 ミナミヌマエビ	<i>Neocaridina denticulata denticulata</i>	3	18.7 – 51.7		
28 スジエビ	<i>Palaemon paucidens</i>	2	6.7 – 88.6	○	
29 チュウゴクモクズガニ	<i>Eriocheir sinensis</i>	3	10.9 – 24.2		
30 モクズガニ	<i>Eriocheir japonica</i>	3	102.7 – 138.9	○	○

間後, 定温乾燥機から取り出したチューブに Buffer AL 200 μL を添加し, さらに 56 °C で 10 分間インキュベートした. その後, 99.9% エタノール 200 μL を添加して, ボルテックスにかけた. チューブ内のサンプル溶液をピペティングして十分に混合させ, キット付属のカラムにアプライし, 6000 g で 1 分間遠心して, コレクションチューブの濾液を捨てた. 遠心後のカラム

は新しいコレクションチューブに移し, Buffer AW1 500 μL を添加し, 6000 g で 1 分間遠心した. 遠心後のカラムは新しいコレクションチューブに移し, Buffer AW2 500 μL を添加し, 15000 g で 3 分間遠心した. 遠心後のカラムは新しい 1.5 mL エッペンチューブに移し, Buffer AE 100 μL を添加し, 室温で 1 分間静置してから, 6000 g で 3 分間遠心した. カラムから回収された

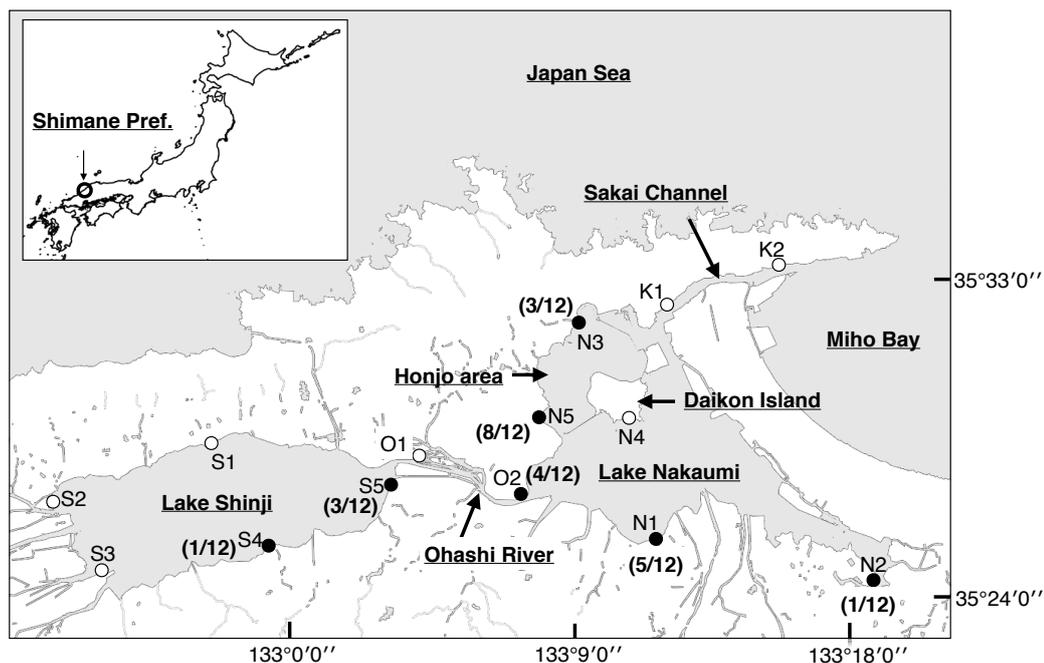


図1 調査地の地図。宍道湖沿岸5地点 (S1–S5)、大橋川沿岸2地点 (O1, O2)、中海沿岸5地点 (N1–N5)、境水道沿岸2地点 (K1, K2)。一年の調査期間を通して、モクズガニのDNAが一度も検出されなかった調査地点は白丸で、DNAが一度でも検出された調査地点は黒丸で示した。また、カッコ内の数字は、12ヶ月(12回)の調査のうち、DNAが検出された調査月の数を示している。地図は、国土地理院 (<http://maps.gsi.go.jp/>) のデジタル地図に基づいて作成した。

Fig. 1 Map of study sites. S1–S5: five sites in Lake Shinji, O1 and O2: two sites along the Ohashi River, N1–N5: sites in Lake Nakaumi, and K1 and K2: two sites along the Sakai Channel. Throughout the survey period (for one year), the survey sites where eDNA of target species was never detected are represented by open circles, and the survey sites where eDNA was detected even once are represented by filled circles. The number in parentheses indicated the number of survey months in which target eDNA was detected in the 12 monthly surveys (i.e., out of 12 sample collections). Maps are based on the Digital Map (Basic Geospatial Information) published by the Geospatial Information Authority of Japan (<http://maps.gsi.go.jp/>).

抽出DNAサンプルはNanoDrop(サーモフィッシャー社)でDNA濃度を測定した後、つぎの使用まで -30°C で冷凍保存した。

リアルタイムPCRによる*in vitro*実験

設計したモクズガニ種特異的プライマー・プローブを用いて、各種の組織抽出DNAの増幅・非増幅を検証するため、リアルタイムPCRによる*in vitro*実験を実施した。その際、リアルタイムPCR装置(StepOnePlus, サーモフィッシャー社)を用いて、1サンプルに対して2ウェル(2回繰り返し)で実施した。1ウェルあたり総量 $20\mu\text{L}$ になるように、純水 $8\mu\text{L}$ 、マスターミックス(TaqMan Environmental Master Mix 2.0:サーモフィッシャー社) $10\mu\text{L}$ 、プライマー・プロー

ブの混合液(フォワードプライマー終濃度: 900 nM 、リバースプライマー終濃度: 900 nM 、プローブ終濃度: 125 nM) $1\mu\text{L}$ 、抽出DNAサンプル $1\mu\text{L}$ を添加した。なお、DNA濃度が $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ 以上のサンプルについては純水で10倍、あるいは、100倍希釈してから実験に用いた(表1)。また、ポジティブ・コントロールとして、モクズガニの組織から抽出したDNAを用いた。PCRの温度条件は 50°C で2分、 95°C で10分の後、 95°C で15秒、 60°C で1分のサイクルを55回の繰り返しで実施した。なお、リアルタイムPCR実験において、55回のサイクル以内で、各サンプルの2ウェル(2回繰り返し)のうち1つでも増幅曲線の立ち上がりを確認されたものを陽性とした。

野外調査

2016年12月から2017年11月まで、毎月1回、宍道湖と中海の採水調査を実施した。調査では、宍道湖沿岸5地点(S1-S5)と大橋川2地点(O1, O2)の計7地点と、中海沿岸5地点(N1-N5)と境水道2地点(K1, K2)の計7地点を(図1, 付録1), それぞれ別日に車を利用して3時間程度で周り、各地点の岸から表層水1Lを採集した(各地点での採水の繰り返しn=1)。その際、DNAフリーの採水用ポリ瓶は1回の調査で8本用意した。そのうちの1本はあらかじめ蒸留水1Lを入れてクーラーボックスで保管した。これは採集した水サンプルへの運搬中における汚染(コンタミネーション)の有無を評価するために用意した(以下、クーラーブランク)。なお、水サンプルは運搬時に高温にならないように、保冷剤を入れたクーラーボックスに保管して持ち帰った。

採水後、各地点で気温(Center 370; 株式会社佐藤商事), 水温(LAQUA act; HORIBA), pH(LAQUA twin B-711; HORIBA), 硝酸イオン濃度(NO_3^-) (LAQUA twin B-743), 塩分(LAQUA twin B-721), 電気伝導度(LAQUA twin B-771)を記録した。

水サンプルの濾過, および, DNA抽出と精製

実験室に持ち帰った水サンプルは、採水ボトルの表面を水道水ですすぎ、濾過器とガラス繊維濾紙(GF/F; サイティバ社)を使用して吸引濾過を行った。1サンプルごとに濾過量1Lになるように実施した。ただし、濁度が高く濾紙1枚で1Lを濾過できない水サンプルの場合、濾紙2枚を用いて濾過量1Lになるように実施した。濾過済みの濾紙はアルミホイルに包み、つぎの作業まで -30°C で保存した。濾過作業後、使用した各器具等は希釈済みのキッチンハイター(花王株式会社)に5分間以上浸してから、水道水と蒸留水で十分にすすいでDNAを除去した。

上述と同じDNA抽出キットを用いて、濾過済みの濾紙からのDNAの抽出と精製処理を以下のとおり実施した(Uchii et al., 2016)。まず、各水サンプルを濾過した濾紙(1枚, あるいは, 2枚)は、DNAフリーのピンセットを使用してサリベット(ザルスタット社)に入れた。つぎに、Buffer AL 400 μL /濾紙数と Proteinase K 40 μL /濾紙数の混合溶液をサリベット内の濾紙に添加した。56 $^\circ\text{C}$ に設定した定温乾燥機に濾紙の入ったサリベットを30分間入れ、インキュベートした。定温乾燥機から取り出したサリベットを5000 gで5分間遠心した。つぎに、サリベット内の濾紙に TE (pH 8.0) 220 μL /濾紙数を添加してから室温で1分間静置

し、再度、5000 gで5分間遠心した。回収された濾液に Buffer AL 200 μL /濾紙数と 99.9% エタノール 600 μL /濾紙数を添加し、溶液を十分にピペティングしてから、付属のカラムにアプライした。そのカラムを6000 gで1分間遠心した後、コレクションチューブの濾液を捨て、濾液がなくなるまで同様の作業を繰り返した。濾液がなくなった遠心後のカラムは新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW1 500 μL を添加し、6000 gで1分間遠心した。遠心後のカラムは新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW2 500 μL を添加し、15000 gで3分間遠心をした。遠心後のカラムは新しい1.5 mL エッペンチューブに移してから Buffer AE 100 μL を添加した。そのカラムを室温で1分間静置した後、6000 gで3分間遠心した。カラムから回収された環境 DNA サンプルは、つぎの実験まで -30°C で保存した。

リアルタイム定量 PCR (定量 PCR)

1ウェルあたり総量 20 μL になるように、純水 7 μL , マスターミックス (TaqMan Environmental Master Mix 2.0) 10 μL , プライマー・プローブの混合液 (フォワードプライマー終濃度: 900 nM, リバースプライマー終濃度: 900 nM, プローブ終濃度: 125 nM) 1 μL , 環境 DNA サンプル 2 μL を添加した。なお、とくに宍道湖の湖水は濁度が高いことから、本実験では PCR 阻害に強い酵素 (マスターミックス) を使用した。定量 PCR 実験は、1サンプルにつき4ウェル(4回繰り返し)で実施した。ポジティブ・コントロールとして既知量の人工合成 DNA を 20000, 2000, 200, 20 コピー/2 μL を2ウェルずつ添加した。ネガティブ・コントロールは純水 2 μL を4ウェル(4回繰り返し)に添加した。PCRの温度条件は 50 $^\circ\text{C}$ で2分, 95 $^\circ\text{C}$ で10分の後, 95 $^\circ\text{C}$ で15秒, 60 $^\circ\text{C}$ で1分のサイクルを55回の繰り返しで実施した。なお、定量 PCR 実験において、55回のサイクル以内で、各サンプルの4ウェル(4回繰り返し)のうち1つでも増幅曲線の立ち上がり確認されたものを陽性とした。また、各サンプルで増幅がみられなかったウェルは DNA 濃度を0として扱い、4ウェルの平均値の DNA コピー数から、各水サンプル1Lあたりの DNA 濃度として算出した。定量 PCR 実験における R^2 値は 0.99 ± 0.01 (平均 \pm 標準偏差), PCR 効率 (Eff%) は $95.71 \pm 10.57\%$ だった。

また、定量 PCR 実験によって増幅がみられた環境 DNA サンプルを用いて (n=4), PCR 増幅産物のダイレクシークエンス (タカラバイオ株式会社), および、配列決定を行い、本研究で開発したプライマー・プロー

ブの特異性を検証した。

結果

リアルタイム PCR による *in vitro* 実験

開発したモクズガニのプライマー・プローブを用いてリアルタイム PCR 実験を実施した結果、モクズガニの近縁種を含む甲殻類 29 種の組織抽出 DNA サンプルすべてに対して DNA の増幅がみられなかった。一方で、ポジティブコントロールとして用いたモクズガニの組織抽出 DNA では必ず DNA の増幅を確認することができた。

野外調査

調査期間中における各調査地点の調査日時、および、水温と塩分の測定結果を表 2 に示した。一年を通じた宍道湖沿岸 5 地点における塩分の平均は、 3.4 ± 2.2 (平均 \pm 標準偏差, $n=60$)、大橋川沿岸 2 地点では、 9.3 ± 6.7 ($n=24$)、中海沿岸 5 地点では、 15.8 ± 8.4 ($n=60$)、境水道沿岸 2 地点では、 22.6 ± 6.7 ($n=19$) だった。また、その他の環境データについては付録 2 としてまとめた。

調査期間中におけるモクズガニの環境 DNA 濃度と DNA 検出率、水温の関係を図 2 に示した。なお、調査を実施した 14 地点のうち、宍道湖南岸 (S4)、宍道湖東岸 (S5)、大橋川下流 (O2)、中海南岸 (N1)、中海東岸 (N2)、中海北岸 (N3)、中海西岸 (N5) 以外の調査地点では、調査期間中にモクズガニの DNA が一度も検出されなかった。ダイレクトシーケンシングと塩基配列決定の結果、定量 PCR 実験による PCR 増幅産物は、本研究で開発したプライマー・プローブでターゲットにした PCR 増幅配列であることを確認した (PCR 増幅産物長: 135 塩基対)。また、ネガティブ・コントロールとして用意したすべてのクーラーブランクからモクズガニの DNA は検出されなかった。

2016 年 12 月、および、2017 年 1 月において、モクズガニの DNA は中海南岸 (N1) のみで検出され、DNA 検出率は 4 ウェルのうち 1 ウェル (= 1/4) だった。2 月はすべての調査地点でモクズガニの DNA は未検出だった。3 月におけるモクズガニの DNA が検出された調査地点と DNA 検出率は、大橋川下流 (O2) で 1/4、中海北岸 (N3) で 1/4、中海西岸 (N5) で 3/4 だった。4 月の DNA が検出された調査地点と DNA 検出率は、中海南岸 (N1) と中海西岸 (N5) は 2/4、中海東岸 (N2) で 1/4 だった。5 月の DNA が検出された調査地点と DNA 検出率は、宍道湖南岸 (S4) で 1/4、

中海南岸 (N1) では 1/4 だった。6 月では、中海西岸 (N5) のみで DNA が検出され、DNA 検出率は 4/4 だった。7 月の DNA が検出された調査地点と DNA 検出率は、宍道湖東岸 (S5) で 1/4、中海西岸 (N5) で 4/4 だった。8 月の DNA が検出された調査地点と DNA 検出率は、宍道湖東岸 (S5) で 1/4、中海南岸 (N1) で 3/4、中海西岸 (N5) で 4/4 だった。9 月の DNA が検出された調査地点と DNA 検出率は、宍道湖東岸 (S5) で 1/4、大橋川下流 (O2) で 3/4、中海西岸 (N5) で 1/4 だった。10 月の DNA が検出された調査地点と DNA 検出率は、大橋川下流 (O2) で 4/4、中海北岸 (N3) と中海西岸 (N5) は 1/4 だった。11 月の DNA が検出された調査地点と DNA 検出率は、大橋川下流 (O2) で 1/4、中海西岸 (N5) で 1/4 だった。

中海西岸 (N5) では、年間を通じた毎月の調査において、モクズガニの DNA が 12 回のうち 8 回検出された (図 1)。また、本種の DNA が検出された他の地点に比べて、N5 地点で検出された DNA の濃度や検出率は高い傾向を示した (図 2)。そして、N5 地点では、水温が上昇した 3 月から 7 月にかけて DNA 濃度が顕著に増加する傾向がみられ、水温が低下した 8 月から 11 月にかけて DNA 濃度も減少して、12 月から 2 月では DNA が検出されなかった (図 2)。一方で、N5 地点以外のモクズガニの DNA が検出された地点では、年間を通じた毎月の調査において、1 回のみ DNA が検出されたのが 2 地点 (S4, N2)、2 回が 1 地点 (N3)、3 回 (S5)、4 回 (O2)、5 回 (N1) がそれぞれ 1 地点ずつだった (図 1)。これらの 6 地点では、年間の水温の上昇や低下と関係なく、検出されたモクズガニの DNA の濃度や検出率は低い傾向がみられた (図 2)。

考察

本研究では、開発したモクズガニの環境 DNA 用のプライマー・プローブが、宍道湖・中海のような汽水環境において有用であることを実証することができた。また、そのプライマー・プローブを用いて、宍道湖 - 大橋川 - 中海 - 境水道の沿岸における計 14 カ所の調査地点において、一年を通じた環境 DNA 調査を実施したところ、モクズガニの DNA が頻りに検出される調査地点や DNA が全く検出されない調査地点の存在が明らかになった。特に中海では、大根島南岸 (N4) 以外の 4 地点でモクズガニの DNA が検出され、中海西岸 (N5) では高濃度の DNA が検出されることがわかった。一方で、中海に比べて、宍道湖周辺では、モクズガニの DNA の検出率や濃度が低い傾向

表 2 各調査地点における調査日時, および、水温 (°C) と塩分の測定結果. (a) 宍道湖沿岸 5 地点 (S1–S5) と大橋川沿岸 2 地点 (O1, O2), (b) 中海沿岸 5 地点 (N1–N5) と境水道沿岸 2 地点 (K1, K2).

Table 2 Survey date/time, water temperature (°C), and salinity at each survey site. (a) five sites in Lake Shinji (S1–S5) and two sites along the Ohashi River (O1 and O2), (b) five sites in Lake Nakaumi (N1–N5) and two sites along the Sakai Channel (K1 and K2).

N/A : 測定機器の不具合による欠損データを示す.

N/A: missing data due to a malfunction of the measuring device.

(a) Lake Shinji and Ohashi River

Date	2016/12/26	2017/1/28	2017/2/27	2017/3/30	2017/4/24	2017/5/25	2017/6/29	2017/7/24	2017/8/31	2017/9/29	2017/10/24	2017/11/22
S1	8:30	12:30	8:45	8:25	14:24	8:30	7:26	14:15	8:34	8:35	9:20	10:57
S2	8:57	12:50	9:09	9:00	14:51	9:09	7:49	14:32	9:53	8:58	9:47	11:18
S3	9:22	13:16	9:32	9:22	15:13	9:30	8:14	15:00	10:16	9:19	10:08	11:39
S4	9:46	13:43	9:59	9:54	15:47	10:00	8:40	15:32	10:46	10:22	10:35	12:06
S5	10:08	14:01	10:25	10:16	16:10	10:20	8:58	15:55	11:08	10:41	10:57	12:24
O1	10:30	14:29	10:43	10:38	16:38	10:37	9:17	16:15	11:27	10:58	11:15	12:46
O2	11:00	14:55	11:00	11:00	17:01	11:00	9:39	16:38	11:53	11:27	11:37	13:09
Water temperature												
	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1	9.4	7.9	6.9	11.1	18.7	22.7	25.1	29.8	28.3	21.6	16.9	11.1
S2	7.8	7.9	6.9	11.2	27.7	22.6	25.5	30.6	28.7	22.5	16.6	9
S3	9.6	6.4	6.8	12.1	20.1	23.4	25.9	29.4	29	23.6	16.8	10.7
S4	9.3	6.5	6.9	12.5	20.5	23.4	25.1	30.3	28	22.9	15.3	10.1
S5	9.2	7.1	7.7	13.6	20.9	24.3	25.7	30.2	29	22.8	16.6	10
O1	9.1	5.4	6.7	12.6	19.4	24.2	25.7	29.6	28.6	23.6	17.3	10.2
O2	9.7	5.8	7.7	14.3	20	25.6	26.7	29	29.1	23.9	18	10.8
Salinity												
	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1	5.7	2.2	1.8	1.2	1.5	3.1	6.3	5.4	4.6	3.9	3	2.2
S2	2	0.8	0.7	1.2	0.5	3	1.1	5.3	2.8	2.8	0.9	2
S3	4.3	3.4	1.5	1.2	1.2	3.3	6.7	5.7	5.6	5.9	0.8	2.6
S4	4.2	0.5	2.1	1.9	1.9	3.5	6.5	6.9	5.4	6.3	0.3	2.9
S5	7.1	3.9	2.6	2.4	2	3.7	7.9	8.2	7.7	6.7	3	2.9
O1	7.7	3.9	2.5	6.2	2.1	8.7	8.2	16	8.3	6.8	3.8	3.2
O2	7.3	4	4.5	16	8.4	23	16	27	19	9.5	3.4	6.7

(b) Lake Nakaumi and Sakai Channel

Date	2016/12/30	2017/1/29	2017/2/28	2017/3/31	2017/4/27	2017/5/26	2017/6/27	2017/7/31	2017/8/24	2017/9/27	2017/10/31	2017/11/24
N1	12:53	9:30	8:29	8:35	9:51	9:15	7:40	9:08	7:50	6:27	8:32	9:32
N2	13:20	9:52	8:59	9:07	10:21	9:39	8:14	9:37	8:28	6:50	9:04	10:02
N3	11:31	11:13	10:20	10:40	11:49	10:55	9:48	10:53	10:29	8:10	10:23	11:29
N4	12:11	11:31	10:43	10:56	12:12	11:20	10:10	11:11	10:51	8:29	10:42	11:49
N5	14:34	11:48	10:55	11:15	12:29	11:37	10:25	11:26	11:19	8:50	10:57	12:11
K1	11:00	10:59	10:07	10:25	11:34	10:44	9:35	10:40	9:56	7:56	10:07	11:14
K2	10:48	10:49	9:54	10:07	11:16	10:28	9:20	10:26	9:11	7:36	9:49	10:54
Water temperature												
	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N1	8.9	5.6	6.2	12.5	17.3	22.2	24.7	29.1	29.4	24	15.1	11.4
N2	9.7	4.4	5.2	12.1	18.1	22	24.8	30.6	30.2	24.5	15.9	10.4
N3	9.9	6.6	8.7	11.6	18.2	22.5	24.9	29.8	30.5	23.2	16.1	11.2
N4	9	5.5	8.2	11.7	17.9	22	26	31	29.9	23.7	16	11.9
N5	11.4	6.3	9.5	11.2	18.4	23.1	25	30.6	29.9	23.6	16.1	13.3
K1	9.6	5.8	8.5	11.7	17.9	21.6	24	29.5	29.9	23.4	17.2	11.9
K2	10.4	7.6	8.7	12.4	17.3	20.5	23.6	29.7	30	23.4	17.4	13.8
Salinity												
	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N1	15	11	4	14	6.7	21	27	16	17	12	5.7	10
N2	14	0.7	4.9	8.1	14	18	15	14	18	12	3.5	11
N3	34	13	18	17	20	30	33	27	24	17	11	16
N4	26	9	9.4	15	19	23	31	24	25	15	8.2	18
N5	5.2	1.4	2.2	10	18	30	19	21	30	16	1.4	17
K1	29	18	17	20	23	25	N/A	27	33	14	11	16
K2	33	23	22	N/A	N/A	N/A	N/A	30	32	17	17	23

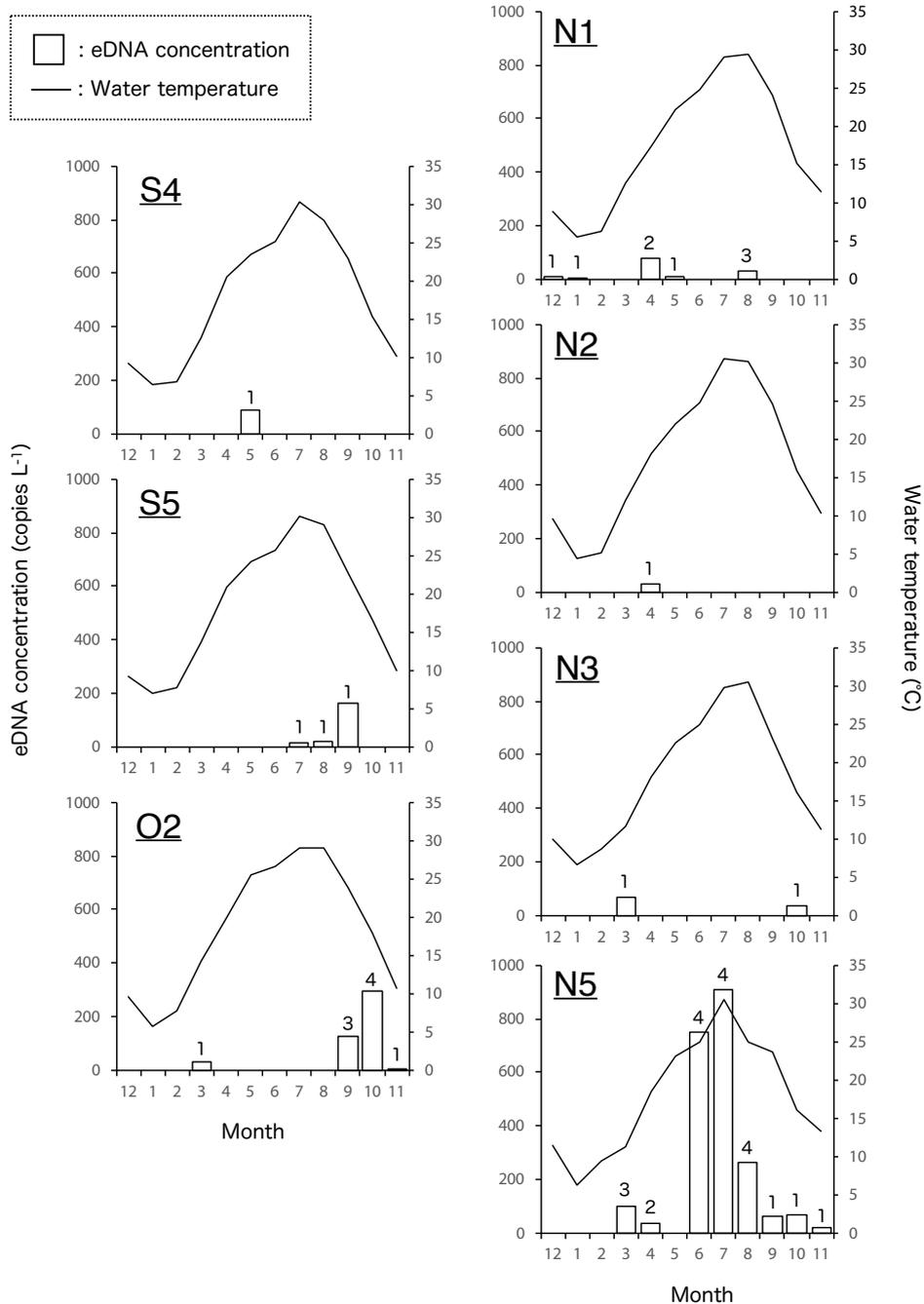


図2 2016年12月から2017年11月におけるモクズガニの環境DNA調査結果と水温の関係。(S4)宍道湖南岸, (S5) 宍道湖東岸, (O2) 大橋川下流, (N1) 中海南岸, (N2) 中海東岸, (N3) 中海北岸, (N5) 中海西岸. これら以外の調査地点では, 調査期間中にモクズガニのDNAが未検出だったため, グラフは省略した. 棒グラフは, 各調査日のDNAの濃度, 各棒グラフの数値は, リアルタイム定量PCR (qPCR) 実験において各サンプルに対する4ウェル(4回繰り返し)時のDNA検出回数, 折れ線グラフは各調査日における水温を示す.

Fig. 2 Relationship between environmental DNA (eDNA) of Japanese mitten crab (*Eriocheir japonica*) and water temperature from December 2016 to November 2017. (S4) south shore and (S5) east shore of Lake Shinji; (O2) lower reach of the Ohashi River; (N1) south shore, (N2) eastern shore, and (N5) western shore of Lake Nakaumi. The graphs are omitted for the other eight sites, because eDNA of the crab was not detected during the survey period. The numerical value on each bar graph denotes the number amplified eDNA out of four replications in the real-time quantitative PCR (qPCR) assays. The line graph shows the water temperature on each survey day.

があった。さらに、宍道湖北岸 (S1) と宍道湖西岸 2 地点 (S2, S3) に加えて、大橋川上流 (O1), および、境水道 (K1, K2) においては、年間を通してモクズガニの DNA が検出されないことも明らかになった。

宍道湖沿岸においてモクズガニの環境 DNA が検出されたのは、5 月に南岸 (S4), 7 月から 9 月の計 3 ヶ月に東岸 (S5) のみであった。宍道湖におけるモクズガニの DNA の検出率や濃度が非常に低かったことから、本種は宍道湖を回遊などであまり利用していない、あるいは、宍道湖に生息する個体数が少ないことが推測される。宍道湖でモクズガニの生息数が少ない可能性については、宍道湖の塩分の低さが関係していると考えられる。孵化して間もない本種の幼生は、短期間の飼育実験環境下では、塩分が低いと生存率が低下し (石田, 1976), また、孵化時においても塩分が低いほど生存率が低下することが報告されている (Yamazaki et al., 1995)。したがって、塩分の高い中海に比べて (海水の約 1/2), 塩分の低い宍道湖 (約 1/8) は、中海よりも本種の定着に適していないのかもしれない。実際、中海よりも宍道湖の方が本種の漁獲量が少ないことが報告されている (Ishitobi et al., 2000)。このことから、環境 DNA の検出率や濃度は対象種の生物量を評価するのに有用であると考えられる。ただし、宍道湖ではモクズガニを漁獲対象としていないため、環境 DNA の結果と漁獲量のデータを比較する際にはとくに注意が必要である。

中海西岸 (N5) では、3 月、4 月と 6 月～11 月までの計 8 ヶ月でモクズガニの DNA が検出された。加えて、中海西岸側と大橋川の接続地点になる大橋川下流 (O2) では、3 月と 9 月～11 月の計 4 ヶ月間でモクズガニの DNA が検出された。これらのことから、モクズガニは中海の西岸側に比較的多く生息していることが考えられる。とくに、N5 地点では、水温が上昇する夏季にかけてモクズガニの DNA 濃度が高くなり、水温の低下に伴って本種の DNA 濃度が低下する顕著な傾向がみられた。一方で、N5 と O2 の両地点では、12 月から 2 月までの冬季にはモクズガニの DNA が検出されなかった。これらの環境 DNA の検出・非検出の時期から、上記 2 地点付近に生息していたモクズガニは、冬季は河川などを遡上して越冬し、水温が上昇し始める 3 月頃から降河を始めたのかもしれない。実際、今回の調査の数年後に実施した 5 月の野外調査中に、N5 地点において成熟していたと思われる大型のモクズガニ個体が目視で確認されたことがあった (高原, 未発表データ)。あるいは、冬季における水温の低下とともに、本種はより深い水域に移動したり、摂

餌や代謝などの活性が低下したりすることで、この時期の環境 DNA は非検出になったのかもしれない。一方で、鹿児島県の神之川では、モクズガニの成体は、9 月から 1 月にかけて川を下り、河川感潮域から海域にかけての水中で交尾・産卵することが報告されている (小林・松浦, 1991)。加えて、モクズガニの 12 月頃に成熟する個体は、12 月から 6 月の間に複数回産卵することが推定されている研究例もある (Kobayashi and Matsuura, 1995)。したがって、本種は、上述したように宍道湖に比べて塩分の高い中海を選好している可能性に加えて、個体の成熟の有無、および、調査場所の水温や底質などの複合的な要因が関係して、環境 DNA の検出頻度や本種の分布を決定していると考えられる。

その他の中海の調査地点においては、南岸 (N1) では、12 月、1 月、4 月、5 月、8 月の計 5 ヶ月間でモクズガニの DNA の検出がみられた。また、モクズガニの DNA は、中海東岸 (N2) では 4 月のみ、中海北岸 (N3) では 3 月と 10 月で検出がみられた。道根ほか (2013) によって、中海の本庄水域 (中海北側の一部) と南岸において設置した小型定置網を用いた地元漁師の漁獲データ (2006 年～2011 年) に関する報告では、本研究においてモクズガニの DNA が検出された N1 地点 (南岸付近)、および、N3 と N5 の両地点付近 (本庄水域) それぞれにおいてモクズガニの漁獲が確認されている。しかし、その報告では、中海の南岸に比べて本庄水域の漁獲量は少なく、本研究の N1 地点、および、N5 地点における環境 DNA の濃度や検出率の傾向とは一致していなかった。このことは、2006 年～2011 年の漁獲量データと 2016 年・2017 年の環境 DNA 結果では、調査年が異なっていたことが関係しているのかもしれない。あるいは、N5 地点は、すぐ南に設置された道路によって潮が堰き止められやすい地形になっている可能性があり、そのような人工物によって、N5 地点付近には環境 DNA が集積しやすくなったことから環境 DNA の検出頻度や濃度が高くなったのかもしれない。したがって、今後、シミュレーションによって潮の流れや潮汐などが環境 DNA の移動・滞留に及ぼす影響を明らかにすることで、より正確なモクズガニの分布や生息量が推定可能になると思われる。

中海から日本海への唯一の通り道となる境水道の 2 地点 (K1, K2) においては、一年を通してモクズガニの DNA が検出されなかった。これらのことから、中海に生息するモクズガニが冬季に海域に移動していた可能性は低いと考えられた。春先から秋頃まで中海に

生息していたモクズガニの多くは、冬季においては中海の流入河川や水路等へ遡上して越冬していたのかもしれない。それによって、冬季の中海においてモクズガニの DNA がほとんど検出されなかったと思われる。そして、繁殖に参加するなどのため、3月頃から降河したモクズガニ個体が中海沿岸域に移動し始めたことで、この時期から本種の DNA が検出されるようになったのかもしれない。しかしながら、本研究は一年間の調査のみを実施したため、実際に毎年モクズガニが境水道を利用していないのか、あるいは、冬季は河川に遡上していたのかなどについて明らかにする継続的な調査が望まれる。

また、モクズガニなどの甲殻類の場合、脱皮の直後などによる代謝活性の変化によって、環境中に放出される DNA の量が多くなるかもしれない。一方で、冬季は、低温環境になるため代謝活性が下がり、本種の脱皮もほとんど行われないことが考えられる。もしそうならば、このような代謝活性の違いは、野外におけるモクズガニの環境 DNA の濃度や検出率に少なからず影響を及ぼしていると思われる。したがって、今後は、本種の脱皮などによる代謝活性の変化と環境 DNA の濃度や検出率との関係についても明らかにする必要があるだろう。

本研究によって、降河回遊型の甲殻類モクズガニの生息状況を把握する生物モニタリング手法として、宍道湖・中海のような連結系汽水湖において、環境 DNA を利用できる可能性を実証することができた。季節や成長に応じて生息場所が変わる回遊種においては、各種の繁殖シーズンなどの生態的特徴に応じて、環境 DNA 調査用の水サンプルを採集する地点や時期、また周辺の地形や水質条件などを考慮することで、より効果的なモニタリング調査が可能になると思われる。

謝 辞

小山彰彦氏(熊本大学大学院先端科学研究部)には、甲殻類の採集と種同定に多大なご支援をいただいた。増成伸文氏(岡山県農林水産総合センター)、桑原正樹氏(宍道湖漁業協同組合)、福井克也氏(島根県水産技術センター)には、草稿におけるとても貴重なご助言をいただいた。竹本浩之氏(岡山県農林水産部水産課)と草加耕司氏(岡山県農林水産総合センター)にはプライマーの種特異性検証に必要なサンプルをご供与いただいた。また、島根大学生物資源科学部の山岸聖氏、尾形茂紀氏、田口淳也氏には

野外調査を補助していただいた。組織抽出 DNA の濃度測定の際には、島根大学総合科学研究支援センター遺伝子機能解析部門の機器を使用させていただいた。査読者 2 名の方々からは本原稿に対してとても有益なご助言をいただいた。ここに感謝申し上げます。

引 用 文 献

- Barnes, M.A. and Turner, C.R. (2016) The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17: 1–17.
- Doi, H., Inui, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T. and Minamoto, T. (2017a) Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology*, 62: 30–39.
- Doi, H., Katano, I., Sakata, Y., Souma, R., Kosuge, T., Nagano, M., Ikeda, K., Yano, K. and Tojo, K. (2017b) Detection of an endangered aquatic heteropteran using environmental DNA in a wetland ecosystem. *Royal Society Open Science*, 4:170568.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F. and Taberlet, P. (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4: 423–425.
- Forsström, T. and Vasemägi, A. (2016) Can environmental DNA (eDNA) be used for detection and monitoring of introduced crab species in the Baltic Sea? *Marine Pollution Bulletin*, 109: 350–355.
- Fukumoto, S., Ushimaru, A. and Minamoto, T. (2015) A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology*, 52: 358–365.
- 後藤悦郎・川島隆寿・鈴木博也・山本孝二(1985) モクズガニの成熟と幼生の飼育に関する研究. 島根県水産試験場研究報告, 第 4 号, 38–61.
- 浜野龍夫(2003) モクズガニの陸上移動能力を示す二つの事例. *CANCER* 12: 15–17
- 林 勇夫(2006) 水産無脊椎動物学入門. 恒星社厚生閣, 東京, 294p.
- Ikeda, K., Doi, H., Tanaka, K., Kawai, T. and Negishi, J.N. (2016) Using environmental DNA to detect an endangered crayfish *Cambaroides japonicus* in streams. *Conservation Genetics Resources*, 8: 231–234.
- Ikeda, K., Doi, H., Terui, S., Kato, A., Mitsuzuka, T., Kawai, T. and Negishi, J.N. (2019) Estimating native

- and invasive crayfish distributions in relation to culvert barriers with environmental DNA. *Freshwater Science*, 38: 629–641.
- 石田雅俊 (1976) モクズガニの生態と増殖に関する研究. 昭和 49 年度福岡県豊前水産試験場研究業務報告, 1–40.
- Ishitobi, Y., Hiratsuka, J., Kuwabara, H. and Yamamuro, M. (2000) Comparison of fish fauna in three areas of adjacent eutrophic estuarine lagoons with different salinities. *Journal of Marine Systems*, 26: 171–181.
- 石飛 裕・平塚純一・桑原弘道・山室真澄 (2000) 中海・宍道湖における魚類および甲殻類相の変動. *陸水学雑誌*, 61: 129–146.
- Iwai, N., Yasumiba, K. and Takahara, T. (2019) Efficacy of environmental DNA to detect and quantify stream tadpoles of *Odorrana splendida*. *Royal Society Open Science*, 6: 181798.
- Kakuda, A., Doi, H., Souma, R., Nagano, M., Minamoto, T. and Katano, I. (2019) Environmental DNA detection and quantification of invasive red-eared sliders, *Trachemys scripta elegans*, in ponds and the influence of water quality. *PeerJ*, 7: e815.
- 小林 哲 (1999a) 通し回遊性甲殻類モクズガニの生態 – 回遊過程と河川環境 –. *生物科学*, 51: 93–104.
- 小林 哲 (1999b) モクズガニ *Eriocheir japonica* (de Haan) の繁殖生態 (総説). *日本ベントス学会誌*, 54: 24–35.
- Kobayashi, S. (2009) Dietary preferences of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* in a river and adjacent seacoast in north Kyushu, Japan. *Plankton Benthos Research*, 4: 77–87.
- 小林 哲・松浦修平 (1991) 鹿児島県神之川におけるモクズガニの流程分布. *日本水産学会誌*, 57: 1029–1034.
- Kobayashi, S. and Matsuura, S. (1995) Reproductive ecology of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicas* (DE HAAN) in its marine phase. *Benthos Research*, 49: 15–28.
- 道根 淳・三浦常廣・佐々木正 (2013) 中海における小型定置網で漁獲された魚介類の出現特性. 島根県水産技術センター研究報告, 5: 53–65
- 日本シジミ研究所 (2007) 宍道湖と中海の魚たち. 山陰中央新報社, 松江, 211p.
- Sakai, T. (1976) Crabs of Japan and the adjacent seas. Kodansha Ltd., Tokyo, 773p.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H. and Kawabata, Z. (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE*, 7: e35868.
- Takahara, T., Minamoto, T. and Doi, H. (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE*, 8: e56584.
- 高原輝彦・山中裕樹・源 利文・土居秀幸・内井喜美子 (2016) 環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～. *日本生態学会誌*, 66: 583–599.
- Takahara, T., Ikebuchi, T., Doi, H. and Minamoto, T. (2019) Using environmental DNA to estimate the seasonal distribution and habitat preferences of a Japanese basket clam in Lake Shinji, Japan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 221: 15–20.
- Takahara, T., Iwai, N., Yasumiba, K. and Igawa, T. (2020) Comparison of the detection of 3 endangered frog species by eDNA and acoustic survey across 3 seasons. *Freshwater Sciences*, 39: 18–27.
- 寺岡誠二・山口勝秀・越川敏樹 (2016) 宍道湖の魚類相: 寒冷期と温暖期における魚類の出現状況 (定置網漁獲物から). 平成 27 年度ホシザキグリーン財団環境修復プロジェクト報告書, 25–36.
- Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N. and Yamanaka, H. (2019) The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis – a review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1: 99–108.
- Uchii, K., Doi, H. and Minamoto, T. (2016) A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources*, 16: 415–422.
- Yamanaka, H. and Minamoto, T. (2016) The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators*, 62: 147–153.
- 山中裕樹・源 利文・高原輝彦・内井喜美子・土居秀幸 (2016) 環境 DNA 分析の野外調査への展開. *日本生態学会誌*, 66: 601–611.
- 山根恭道 (1988) 淡水魚増殖試験 モクズガニ種苗生産試験. 昭和 61 年度島根県水産試験場事業報告書, 223–229.
- Yamazaki, S., Sakamoto, H. and Hirata, H. (1995) Influences of salinity on hatching and zoeal growth of a catadromous crab, *Eriocheir japonicus*. *Aquaculture Science*, 43: 423–428.
- Yatsuyanagi, T., Ishida, R., Sakata, M.K., Kanbe, T.,

Mizumoto, H., Kobayashi, Y., Namba S., Nii H., Minamoto, T. and Araki, H. (2020) Environmental DNA monitoring for short-term reproductive migration of endemic anadromous species, Shishamo smelt (*Spirinchus lanceolatus*). Environmental DNA, 2: 130–139.

付録 1 各調査地点における位置情報。(S1–S5) 宍道湖沿岸 5 地点, (O1, O2) 大橋川沿岸 2 地点, (N1–N5) 中海沿岸 5 地点, (K1, K2) 境水道沿岸 2 地点.

Appendix 1 Location information for each survey site. S1–S5: five sites in Lake Shinji, O1 and O2: two sites along the Ohashi River, N1–N5: five sites in Lake Nakaumi, and K1 and K2: two sites along the Sakai Channel.

Site	Latitude	Longitude
S1	35°28'25.7"N	132°57'01.8"E
S2	35°26'49.9"N	132°52'00.8"E
S3	35°25'04.8"N	132°53'33.7"E
S4	35°25'52.7"N	132°59'01.0"E
S5	35°27'32.8"N	133°03'04.7"E
O1	35°28'07.0"N	133°03'59.8"E
O2	35°27'09.7"N	133°07'30.7"E
N1	35°25'59.9"N	133°11'42.7"E
N2	35°24'41.8"N	133°18'43.9"E
N3	35°31'48.7"N	133°09'09.7"E
N4	35°29'06.7"N	133°10'46.9"E
N5	35°29'17.9"N	133°07'55.9"E
K1	35°32'08.9"N	133°11'55.0"E
K2	35°33'19.8"N	133°15'55.8"E

付録2 各調査地点の気温(°C), pH, 電気伝導度(EC, mS/cm), 硝酸イオン濃度(NO₃⁻, mg/L)の測定結果。(a) 共通湖沿岸5地点(S1-S5)と大橋川沿岸2地点(O1, O2), (b) 中海沿岸5地点(N1-N5)と境水道沿岸2地点(K1, K2).

Appendix 2 Temperature (°C), pH, electrical conductivity (EC, mS/cm), and NO₃⁻ (mg/L) at each survey site, December 2016 to November 2017. (a) the five sites in Lake Shinji (S1-S5) and the two sites along the Ohashi River (O1 and O2), (b) the five sites in Lake Nakaumi (N1-N5) and the two sites along the Sakai Channel (K1 and K2).

(a) Lake Shinji and Ohashi River												
Temperature	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1	6.9	9	7.9	12.6	25.9	24	25.4	29.8	28.2	22.6	16.2	10.7
S2	7.3	10.6	6.7	12.3	24.2	26	25.3	28.7	31.4	24.6	18.9	9.3
S3	6.7	8.2	7.7	12.6	21.1	25	26.7	28.7	34.1	24.4	17.6	9.3
S4	7.8	10.9	6.9	12	21.6	26.6	26.7	29.9	31.4	24.7	17.9	9.4
S5	8.6	11	7.8	13.8	23	26.2	27.3	30.1	30.2	24.4	19.2	9.8
O1	8.5	11.1	8.9	14.6	24.6	27.6	28.9	31.9	29.7	27	23	10.3
O2	10.2	7	8.8	18.8	20.1	25.4	26.1	29.9	31	24.3	21.9	9.5
(b) Lake Nakaumi and Sakai Channel												
Temperature	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N1	8.3	4.4	5	11.3	17.2	18.5	23.8	31.8	31.2	22.5	10.8	8.5
N2	10.7	4.1	5.6	10.6	19	20.9	24.5	33.8	31.5	24.1	13.6	7.8
N3	10.7	7.6	7.4	8.8	20.6	21.5	25.3	33.1	33.7	23.4	23.5	8
N4	8.3	7.1	9.4	8.3	21.5	20.9	26.6	36	33.1	24.3	20.6	9.8
N5	13.1	7.6	9.4	8.2	22.2	22.6	25.2	31	36.4	22.4	21	9.1
K1	8.2	7.1	9.5	8.8	19.4	21.8	25.6	34.7	33.6	23.4	25.8	7.7
K2	7.4	8.3	8.4	9.6	16.8	19.8	23.3	32	30.3	22.4	15.6	11
(c) Lake Shinji and Ohashi River												
pH	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N1	8.9	8.2	8.3	8.2	9.2	8.3	7.8	8.3	8	8.3	7.2	8.1
N2	8.1	8	8.1	8.3	8.7	8.2	7.6	8.2	8.1	8	7.4	8.6
N3	8.3	8.3	8.5	8.4	8.5	8.1	7.9	8.4	8.5	8.6	8.3	8.5
N4	8.5	8.4	8.5	8.5	9.4	8.7	8.2	8.4	8.4	8.6	8.3	8.4
N5	8	8.4	8.7	8.3	8.7	8.3	8	8.2	7.9	7.7	8	8.2
K1	8.8	8.3	8.7	8.4	8.6	8.3	8	8.2	8.4	8.8	8.7	8.5
K2	8.4	8.4	8.7	8.1	8.6	8.2	8.1	8.2	8.3	8.4	8.1	8.5
(d) Lake Nakaumi and Sakai Channel												
pH	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
EC	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N1	9.4	12.8	4.7	20	9.8	30	33	22	27	20	9.3	20
N2	11.8	1.11	5.6	130	16.3	24	29	26	26	19	5.7	20
N3	25	15.4	18.5	26	23	35	35	34	31	25	16.7	24
N4	17.7	11.4	8.3	22	20	34	34	31	31	21	11.1	26
N5	5	21	12.6	14.9	19.7	35	24	26	33	24	2.1	25
K1	20	20	16.4	28	24	37	39	35	32	22	14.2	25
K2	28	25	23	51	31	45	42	38	39	26	21	32
(e) Lake Nakaumi and Sakai Channel												
NO ₃ ⁻	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1	81	45	35	20	36	53	84	90	62	39	36	24
S2	36	23	28	16	10	37	22	75	27	22	13	22
S3	57	58	34	22	13	44	30	76	47	36	11	25
S4	54	32	43	31	20	43	31	77	51	35	9	38
S5	82	91	45	32	20	45	32	94	59	35	30	38
O1	74	75	49	67	18	78	34	150	64	38	28	34
O2	90	76	34	130	59	160	63	190	100	49	32	69
(f) Lake Nakaumi and Sakai Channel												
NO ₃ ⁻	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N1	110	110	48	110	44	170	220	150	110	110	50	110
N2	160	38	55	94	58	130	160	140	120	87	27	110
N3	170	160	120	170	65	150	190	180	130	90	66	75
N4	190	100	74	120	67	150	180	170	110	78	86	60
N5	75	66	34	96	65	150	140	150	120	73	16	38
K1	140	180	120	170	76	160	200	160	120	79	56	92
K2	210	160	140	210	87	210	220	200	140	99	74	140