

環境 DNA を用いた広島県芦田川のユスリカの多様性解析

山梨大学 学生会員 ○野村 虹之介 株式会社ウェスコ 非会員 藤原 正季
株式会社ウェスコ 非会員 佐貫 方城
山梨大学 正会員 金子 栄廣 山梨大学 正会員 八重樫 咲子

1. はじめに

ユスリカとは、世界中の水域に広く分布している小型の昆虫であり、水陸間の物質循環を担う生物でもある。ユスリカの種数は日本全国で 933 種類が記録されており、非常に多様性の高い分類群である。ユスリカの幼虫は、塩分濃度や温度、水質などの環境変動に対して順応性が高く、様々な環境の生物指標として利用される。一方で、ユスリカは不快害虫や衛生害虫としても知られている。ユスリカが形成する群飛によって洗濯物への付着、飲食物への混入、野外活動時の妨げなどの被害が起きている。さらに、接触することでアレルギー反応を起こして湿疹が出てしまう場合や、吸入による喘息を引き起こす場合がある。

これまでユスリカの生息状況の調査は、羽化トラップやライトトラップで成虫を採集する手法、底質中に生息する幼虫をサーバーネットなどで採集する方法などで調査が行われてきた。しかしこれらの従来型の生物調査は、ユスリカの形態に基づく種同定（形態同定）に労力や専門的な知識を要する。また、ユスリカのような小型の個体では、幼虫時や成虫のメスでは形態同定のための分類キーが整備されておらず、正確な種分類とそれに続く種多様性調査は不可能である場合がある。

そこで本研究では、環境 DNA を用いた生物調査に着目した。この環境 DNA とは、さまざまな生物由来の DNA のうち、生物の体から離れて水中などの環境中に存在する DNA のことである。環境 DNA を用いた調査では、調査地点で採水を行い、その水を濾過することで水中の有機物を回収する。そして、その有機物から DNA を抽出し、特定の分類群の DNA を増幅する PCR を行う。得られた PCR 産物中の DNA 配列を次世代 DNA シーケンサー（NGS）で大量解読する。そして、最後に得られた配列を国際的な DNA データベース中で検索して、由来となった生物種名を明らかにする（DNA バーコーディング）。この方法は採水と DNA 分析をもとにした生物多様性解析手法であり、従来型の調査と比べて、素早くかつ調査・分析者の実力に左右されない安定した結果を得ることができる。

本研究では、環境 DNA 分析を用い貯水池内に生息するユスリカの種を明らかにし、ユスリカの多様性について把握するため、従来型の調査により優占種等ユスリカの生息情報が豊富である広島県の芦田川河口堰貯水池を対象として調査を行った。

2. 研究方法

2-1 採水と濾過

ユスリカの確認状況に着目し広島県芦田川河口堰貯水池内の 2 地点（St.1 および St.3）で、朝と夜の時間帯に表層水 1L の採水を 2 回行った。採水した水には 1L あたり 10% オスバン消毒液 1ml を添加し、山梨大学へ冷蔵輸送した。

次に、採水した河川水の濾過を行った。濾過には 2 種類の孔径（1.0 μ m, 0.65 μ m）の MIXED CELLULOSE ESTER 素材のメンブレンフィルター（ADVANTEC）を用いた。各サンプルの採水、および濾過条件を表 1 に記す。

キーワード 環境 DNA, PCR, DNA バーコーディング, ユスリカ

連絡先 〒400-8510 山梨県甲府市武田 4 丁目 4-37 TEL : 090-7933-1558 E-mail: sakikoy@yamanashi.ac.jp

表1 濾過フィルターの条件

サンプル名	地点名	採水時間帯	濾過フィルターの孔径 (μm)
HCM1-1	St.1	朝	0.65μm
HCM1-2			1.0μm
HCN1-1		夜	0.65μm
HCN1-2			1.0μm
HCM3-1	St.3	朝	0.65μm
HCm3-2			1.0μm
HCN3-1		夜	0.65μm
HCN3-2			1.0μm

2-2 DNA 解析

DNA 抽出は DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) を使用し, OneStep PCR Inhibitor Removal Kits (Zymo research) で精製した.

次に昆虫類のミトコンドリア DNA の 16s rRNA 領域を増幅するユニバーサルプライマーを利用した PCR 増幅を行った. 1 サンプルあたり, 10 倍に希釈した DNA 5μl, PCR グレードの水(ThermoFisher Science) 15.5μl, 2.5mM dNTP (TaKaRa) 4.0μl, 5xHF Buffer (New England Bio Lab) 10μl, 10μM MtInsects-16S primer³⁾ F および R それぞれ 5.0μl, 10%Tween20 (関東化学) 5.0μl を混合し, 全 50μl に調整して PCR をおこなった. PCR 反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TAKARA) を用いた. PCR サイクルは, 95°C 3 分の変性反応の後に, 95°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 30 秒のサイクルを 30 回行い, 72°C 5 分の伸長反応を経て, 4°C で保存した.

得られた PCR 産物は AMpure XP (Beckman Coulter) を用いて精製した. PCR 産物の解析は株式会社生物技研に委託し, MiSeq (Illumina) を用いて分析した. 得られた DNA 情報から Qiime2 を用いて代表配列を作成し, BLAST を利用して各代表配列の由来となった生物種名を検索した.

3. 結果・考察

NGS 解析を行った結果, 平均 78,227 配列 (68,423-85,741 配列) が得られた. 今後, 採水時間帯および濾過フィルターの違いによる DNA の検出状況の比較を行う.

参考文献

- 1) 近藤繁生, 平林公男, 岩熊敏夫, 上野隆平, ユスリカの世界, 培風館, 2001.
- 2) 近藤繁生, 山本優, 小林貞, 平林公男, 河合幸一郎, 上野隆平, 大野正彦, 粕谷志郎, 北川禮澄, 中里亮治, 図説日本のユスリカ, 文一総合出版, 2010.
- 3) Takenaka, M., K. Yano, T. Suzuki and K. Tojo, Development of novel PCR primer sets for DNA metabarcoding of aquatic insects, and the discovery of some cryptic species, *bioRxiv*, 2021.

謝辞

本研究は科学研究費補助金 (番号: 19KK0107), 環境研究総合推進費 (5-2006) およびダイバーシティ研究環境イニシアティブ, 山梨大学学術・社会変革研究プロジェクトからの資金援助を受けました. また, 土木研究所の協力を得ました. 謝意を表します.