

名取川流域における無脊椎生物の環境 DNA 動態解析

東北大学大学院工学研究科	学生会員	○内田	典子
東北大学大学院工学研究科	正会員	風間	聡
東北大学大学院工学研究科	正会員	久保田	健吾
東北大学大学院工学研究科	正会員	会田	俊介

1. はじめに

開発や気候変動等による環境負荷の増大は在来生物の生息場の劣化をもたらす。これらの影響を定量的に評価するためには、一流域規模における生態系の質と量を把握することが効果的である。このため広域における生物分布や生物量等の情報を取得する必要があるが、従来生物調査は時間的・労力的負担が大きい点、生物種の同定に専門知識が必要な点等が課題である。近年これらの課題を解決しようとして環境 DNA 手法が期待されている²⁾。本手法は水生生物から放出され水中に浮遊している DNA を検出することで目的の生物種の生息有無、生物量、また範囲は限定的であるが生息圏の生物相を解析することが可能である。

本稿では、河川生態系の安定性に寄与する低次消費者に着目し、環境 DNA 研究では知見の少ない無脊椎生物群を目的 DNA として検出を試みた。また観測した環境 DNA 量から季節変化、空間分布より動態を解析した。

2. 手法

対象地域は宮城県名取川水系とし、河川区間が等間隔になるように広瀬川 6 地点、名取川 7 地点を設定し、2016 年 5 月から 12 月に月に 1 回の頻度でサンプリングを行った（図 1）。各地点の河川区間内（～10 数 m）において無作為に選定した 3 箇所の河川表面水を合計 4 L になるよう採水した。水サンプルは既往の実験^{3,4)}に従い氷冷保存して実験室に持ち帰り、その日の内に孔径 0.7 μm の GF/F 濾紙 (Whatman) を用いて吸引濾過を行った。濾紙は DNA 抽出を行うまで -20°C で保存した。DNA 抽出は Proteinase K 溶液にて 56°C で 30 分間インキュベートを行ったのち、フェノール・クロロホルム法により除タンパク質を行い、エタノール沈殿処理により行った。抽出 DNA の精製は PCR inhibitor removal kit (Zymo) を用いて行い 100 μl の最終溶液を得た。溶液中 DNA の濃度は Quant-iT dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) を用いて蛍光定量した。抽出した DNA を用いて定量 PCR により無脊椎生物群 DNA のコピー数を定量した。プライマーは無脊椎生物群のユニバーサルプライマーである LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'), HCO2198 (5'-TAA ACT TCAGGG TGACCAAAAAT

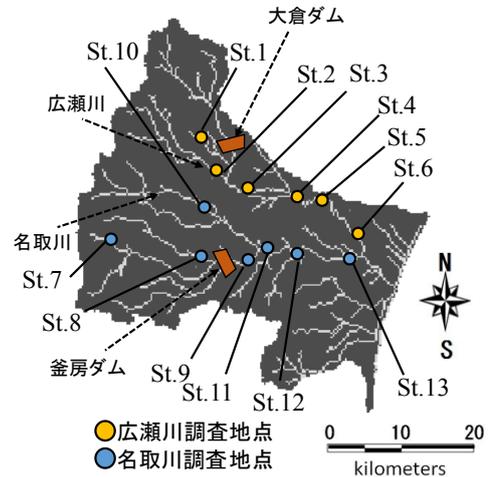


図 1 調査地点

CA-3') を用いた (増幅産物長: 658 bp)⁵⁾。定量 PCR は SYBR[®] Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて初期熱変性を 95°C で 20 秒行った後、95°C で 5 秒、53°C で 30 秒、72°C で 1 分間の PCR40 サイクルを LightCycler[®] 2.0 (Roche) を用いて行った。増幅産物の特異性はアガロースゲル電気泳動により確認した。

環境 DNA は上流で生産された DNA とソースとの関連性を調べるため、HSI (Habitat Suitability Index, 生息場適正指数) データを分布型生物情報として用いた。使用した HSI は Nukazawa ら (未発表) により 2006 年実施の名取川流域調査に基づき水生昆虫 41 分類群に対して構築されたものであり、底生動物量の年間の平均値となっている。

3. 結果・考察

図 2 に定量 PCR によって増幅した無脊椎生物 DNA コピー数の全地点平均値を広瀬川および名取川それぞれ示す。広瀬川は全期間を通じて名取川よりも無脊椎生物 DNA コピー数が大きいことが確認された。広瀬川および名取川の合流点までの各河川の WUR (Weighted Usable Ratio, 対象地域に占める生息適正地面積の割合。流域内 HSI 総和を対象の全面積で除した値) を比較すると、広瀬川 0.296、名取川 0.277 となり、広瀬川の方が大きいことが示される。無脊椎生物の生息場として広瀬川の方が適していることを環境

キーワード 河川環境, 環境 DNA, 水生生物, 流域管理

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 TEL:022-795-7455

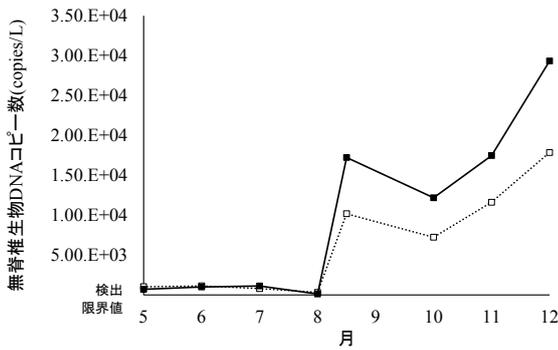


図2 名取川・広瀬川の無脊椎生物 DNA コピー数の全地点平均。白抜きが名取川，黒塗りが広瀬川を示す。

DNA 分析によっても示唆されたと考えられる。また、図3に各地点の集水面積平均 HSI と DNA 濃度、抽出 DNA 1ng あたりの無脊椎生物 DNA コピー数の散布図を示す。これらに対し Spearman の相関分析を行った結果、前者にて弱い負の相関が得られた（相関係数 $r = -0.47$, 5% 有意水準）。DNA 濃度は抽出した総 DNA であり、今回用いたプライマーで増幅されない生物相（e.g. 魚類, 植物）の DNA を包含していることが影響していると考えられる。一方、目的 DNA 含有割合は全体では有意な相関が得られなかったが、12 月サンプルのみにおいて $r = 0.78$, 1% 水準で有意性が確認された。これは季節における DNA を分解する環境要因（e.g. 微生物, 水温等）の動態が影響していると考えられる。

4. おわりに

河川水サンプルから抽出した DNA を用い、無脊椎生物群全体を対象としたユニバーサルプライマーにより目的 DNA を検出することに成功した。総 DNA 量および定量 PCR による分析結果を用い、広域の河川生物量を把握できる可能性が示された。今後、遺伝子配列解析などにより明らかになる当該環境の生物相情報と組み合わせることで、河川生態系を包括的に理解する手法および指標を提示できる可能性が見出された。

謝辞: 本研究の一部は、科学研究費補助金 (16H02363, 風間聡; 25241024, 竹門康弘; 26630247, 渡辺幸三; 26820196, 糠澤桂), および文部科学省博士課程教育リーディングプログラム「グローバル安全学トップリーダー育成プログラム」の助成を受けて実施されました。ここに深く謝意を表します。

参考文献

1) Hurlbert, A. H., Jetz, W.: Species richness, hotspots, and the scale dependence of range maps in ecology and conservation, *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol.104,

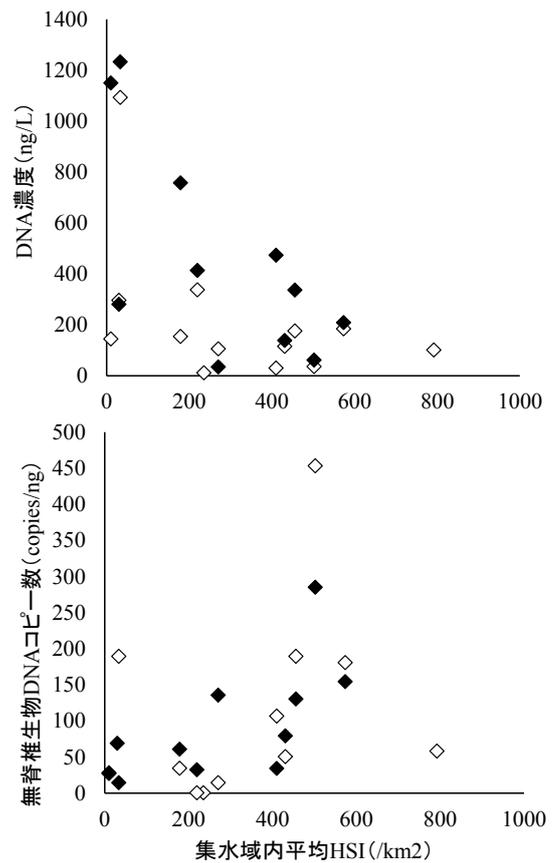


図3 集水域内平均 HSI と DNA 指標の散布図
白抜きは 8 月サンプル, 黒塗りは 12 月サンプルである

No.33, 13384-13389, 2007

2) Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., Gough, K. C.: The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology, *Journal of Applied Ecology*, vol. 51, 1450-1459, 2014

3) Fukumoto, S., Ushimaru, A. and Minamoto, T.: 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*, Vol.52, 358-365, 2015.

4) Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., and Waits, L. P.: Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples, *Canada Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 70, pp.1123-1130, 2013

5) Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R.; DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, vol.3 (5), pp. 294-299, 1994