

室内実験水槽内におけるヒゲナガカワトビケラが放出する環境 DNA の変化

東北大学大学院工学研究科 正会員 ○会田俊介

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 学生会員 内田典子

1. はじめに

近年、環境 DNA と呼ばれる短い DNA 短鎖を抽出する技術が発見され、これまでの調査手法の簡略化が期待されている。環境 DNA は流域に生息する生物種の特定や在・不在の検証に有効性がある¹⁾²⁾。また、実験用の水槽において鯉の個体数と環境 DNA の間に相関が得られた研究が報告されている³⁾。河川中上流域に生息するヒゲナガカワトビケラは流況が安定した河川における水生昆虫群集の優占種である。流域バイオマスを推定するうえで、ヒゲナガカワトビケラが放出する DNA 量を把握することは重要である。しかし、鯉と比較すると個体サイズの小さいヒゲナガカワトビケラが、どの程度の DNA を放出し、どれくらいの期間水中に残存しているのかは不明である。本研究では、実験水槽を用いてヒゲナガカワトビケラが放出する環境 DNA を経時的に採取することで、環境 DNA の増加・劣化を把握することを目的とする。

2. 方法

2.1 実験水槽

延長 60cm×幅 30cm×高さ 45cm の水槽内にアクリル板で 15cm かさ上げした模擬河床部分と循環用のプール部分を作製した(図 1)。作製した実験水槽にエアリフト式のポンプを 2 機使用して水を循環させるものとした。流量は一定に保ち、模擬河床部分の水深は 2cm、流速は 5cm/s とした。河床材料は 19mm ふるいを通過する砂礫を敷き詰めた。19mm 以下の粒度分布は採集した実河川に合わせた。



図-1 実験水槽

2.2 対象種の採集とサンプリング方法

実験で用いた水生昆虫は、宮城県名取川水系広瀬川において採集したヒゲナガカワトビケラである。

採集作業は水槽へ投入する前日に実施した。採集したヒゲナガカワトビケラは室内の水温(18℃)に馴致させた後、実験水槽に投入した。投入から 24 時間水槽内で飼育を行い、回収後に電子天秤で乾燥重量を測定した。個体数と環境 DNA の関係を把握するため、10 匹と 25 匹において同様の実験を行った。

サンプリングは実験水槽プール部分から 2L 採水した後、濾紙 1 枚当たり 1L 分の濾過を行いサンプルとした。濾紙は粒子保持機能 0.7μm のガラス繊維濾紙を使用した。投入後 24 時間で計 7 回のサンプリング作業を行った。サンプリングはヒゲナガカワトビケラ投入から 5 時間は 1 時間に 1 回とし、その後 12 時間経過時と 24 時間経過時に行った。

2.3 DNA 分析

得られたサンプルから DNA の抽出・精製を行い、定量 PCR(LightCycler:Roche 社製)を使用して DNA 濃度を測定した。DNA の抽出・精製にはフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール(phenol-chloroform-isoamylalcohol:PCI)法による液相分離とエタノール沈殿法を併用した方法を用いた。抽出・精製後、インターカレーター法による蛍光強度の測定から DNA コピー数を求めた。

キーワード：生態系, 優占種, 生物量, レイノルズ数

連絡先：〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学工学部工学研究科技術部

TEL 022-795-7426

3. 結果と考察

図2に個体数別の結果を示す。横軸に経過時間、縦軸はDNAコピー数(copies/ μ l)を表しており、どちらも実験開始から2時間後に最大値を得た。これはヒゲナガカワトビケラが巣を作り始めた時間帯であるため、営巣の際に多くの環境DNAを放出した可能性がある。しかし、N=25における実験開始から2時間後の値は他の値と比べて非常に高いため、複数回実験を行い、同様の結果が得られるか検証する必要がある。また、3時間後から24時間後の測定結果(図3)に着目すると、N=10:1.37~3.51(copies/ μ l)N=25:3.41~5.90(copies/ μ l)の値で推移しており、ヒゲナガカワトビケラが放出する環境DNAと循環による環境DNAの破壊の関係が一定になったものと考えられる。

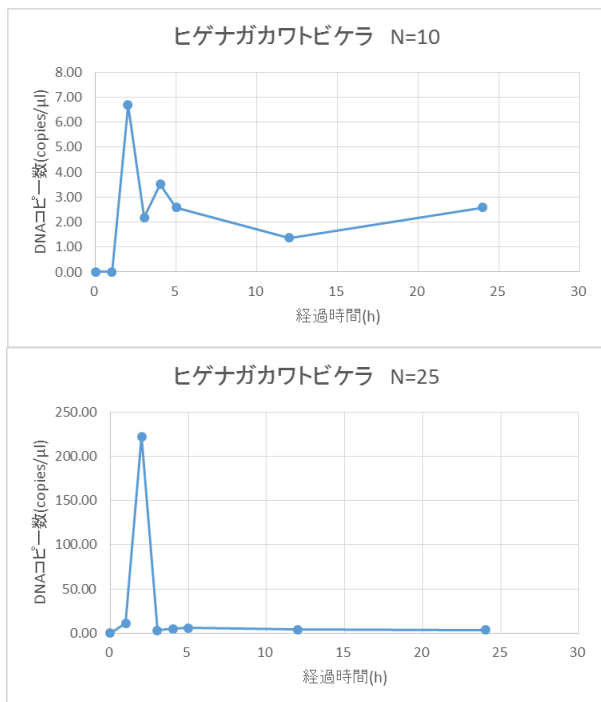


図-2 DNA コピー数の時系列変化

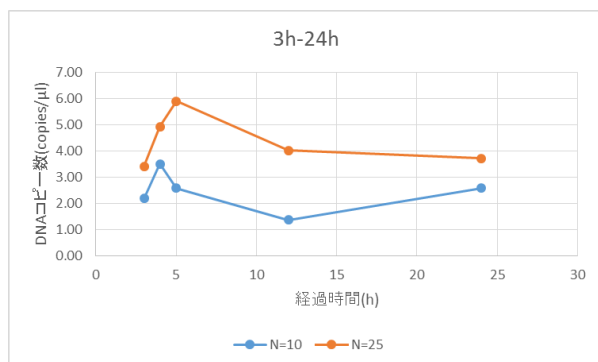


図-3 実験開始 3h-24h 後の DNA コピー数

4. おわりに

個体数を変えて実験を行うことで、DNA濃度に差がみられたが、得られたDNA濃度が低いため、採水方法や河床材料からのDNA抽出を検討する必要があると考える。また、ヒゲナガカワトビケラ回収後の環境DNAの測定を行うことで、残存期間を把握する。流量・水温といった環境条件を変化させた実験も併せて実施することで、環境DNAの増加・劣化の要因を追求していくことが課題である。

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) 高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子: 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 Vol.66(2016)No.3p.583-599
- 2) Helen C. Rees, Ben C. Maddison, David J. Middleditch, James R.M. Patmore :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, pp.1450-1459, (2014)
- 3) Teruhiko Takahara, Toshifumi Minamoto, Hiroki Yamanaka, Hideyuki Doi, Zen'ichiro Kawabata: Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA journal.pone.0035868, (2012)
- 4) 小島夫美子, 岩谷良則, 藤本秀士: リアルタイムPCR-その原理と特徴- 九州産業大学医学部保健学科紀要, 第2号, 95-102, (2003)