

名取川流域における無脊椎動物環境 DNA 量と水生昆虫現存量の季節変動解析

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

流域開発や気候変動等の環境負荷による生態系の劣化を監視するため、生態系を時空間的に連続かつ持続的に把握し、生態系を定量的に評価する必要がある。とくに水環境においては、水質、水温、河床材料等の変化に鋭敏な底生無脊椎動物相のモニタリングが有効である。一方、目視による同定分解能には限界があり、また同定技術の習熟は時間的・労力的負担が大きい。これらを軽減し調査を加速させる方法として、水中に浮遊する DNA から由来生物を特定する「環境DNA」の適用が効果的である。また、種特異的な DNA 量の定量により、生物現存量の推定も試みられている（たとえばコイ²⁾、アユ³⁾）。一方、水生昆虫において開発された種特異的 PCR プライマーは限られている。また生物多様性を評価するためには分類群網羅的かつ定量的な生物情報が求められる。本研究は、無脊椎動物を網羅的に検出するユニバーサルプライマーを用いて、河川水中の無脊椎動物の環境 DNA 濃度を定量した。さらに、水生昆虫の現存量との関係性を調べることで、生物群網羅的な DNA 情報から目的生物の定量的情報の推定可能性を検討した。

2. 手法

河川水中の水生昆虫の現存量と環境 DNA 濃度の関係を把握するため、環境 DNA 測定用の採水と水生昆虫の採集を実施した。昆虫量・環境 DNA の濃度に広がりを持たせるため、調査地点は宮城県名取川水系の広瀬川 3 地点、名取川 5 地点を、河川の上流から下流を網羅するように設定し、2016 年 8 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）。各地点において河川表面水を 4 L ずつ採水した。水サンプルは既往の実験⁴⁾に従い氷冷保存して実験室に持ち帰り、孔径 0.7 μm の GF/F 濾紙 (Whatman) を用いて即日に吸引濾過を行った。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 により無脊椎動

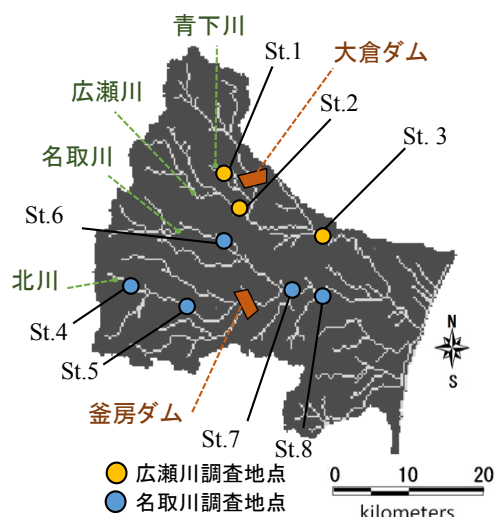


図 1 名取川流域と調査地点

物群 DNA のコピー数を定量した。プライマーは Folmer ら (1994) により開発された無脊椎動物群のユニバーサルプライマー LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'), HCO2198 (5'-TAA ACT TCAGGG TGACCA AAAA ATCA-3') を用いた (増幅産物長: 658 bp)。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。

各地点にて採水したのちに水生昆虫を定量サンプリングした。採集は目合い 250 μm のサーバーネットつきコドラー (30cm×30cm) を用い、一河川区間内において無作為に選んだ流水 2 箇所、止水 2 箇所にて実施した (採取面積: 0.36m²/地点)。採取した水生昆虫は流水と止水に分けてポリビンに封入し、100%エタノールを用いて固定して持ち帰った。電子顕微鏡を用いて可能な限り細かい分類群まで形態同定し、各分類群の個体数を計上した。その後、乾燥重量の測定のために 60°C で 24 時間乾燥させ、電子天秤を用いて測定した。解析のため、水生昆虫の分類群をカゲロウ目、カワゲラ目、トビケラ目、ハエ目、コウチュウ目に区分した。また、比較的種数が少なく観察されたトンボ目、アミメカゲロウ目、ヒル目を「その他」としてまとめた。

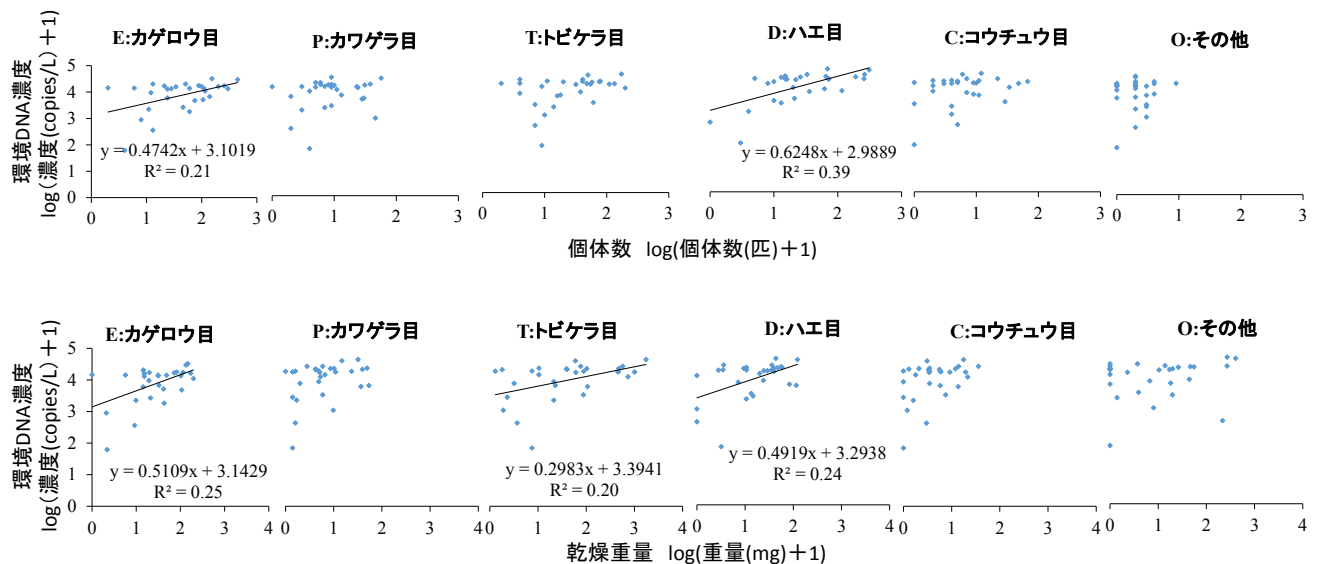


図2 無脊椎動物の環境 DNA 濃度と各水生昆虫分類群の定量値（上段：個体数，下段：乾燥重量）の相関関係
決定係数 $R^2 > 0.2$ の場合のみ，グラフ中に回帰式 y と決定係数 R^2 を示した。

3. 結果・考察

無脊椎動物の環境 DNA 濃度と各水生昆虫分類群の相関関係を，散布図および単回帰分析により調べた。統計解析には R 3.4.0 (R Project) を使用した。図 2 より，回帰線の描かれたグラフを見ると，虫の現存量の増大に従って回帰線からのばらつきが小さくなっている。これは，虫の現存量が小さい場合は環境 DNA の検出自体が困難になり，DNA の定量精度が低下したことに起因すると考えられる。単回帰分析による決定係数 R^2 は総じて小さく示され，最も大きいものはハエ目の個体数 ($R^2 = 0.39$) であった。さらに，6 分類群を独立な説明変数とし，変数選択により最適な多変量モデルを求めた。その結果，説明変数：個体数の場合，ハエ目のみ ($P < 0.01$) が変数として統計的に選択され，モデルの決定係数は 0.371 を示した。また説明変数：乾燥重量の場合はカゲロウ目 ($P < 0.05$)，コウチュウ目 ($P < 0.1$) が変数として統計的に選択され，このモデルの決定係数は，単回帰における乾燥重量のみによるモデルの決定係数を上回った ($0.270 > 0.250$)。以上より，今回対象とした DNA の濃度は，ハエ目の個体数と最も相関が高いことが示された。ハエ目以外の分類群は，生活環や生息場の好適性が種毎に細かく異なる。とくに冬季において，多くの水生昆虫の活性は低下する。一方，ハエ目の主たる構成種であるユスリカ科，ブユ科は時期を問わず孵化，羽化を行い高い活性を維持する。この性質が環境 DNA の増加背景（e.g. 水温低下に伴う DNA 分解速度の低下⁴⁾）と比較的よく応答し，正の相関を示したと考えられる。

4. おわりに

無脊椎動物群を対象としたユニバーサルプライマーにより増幅された DNA 配列の量は，6 水生昆虫分類群のうちハエ目の個体数により最もよく説明されることが示された。環境 DNA 濃度は，生物生活環や活性の大小に影響する可能性が示された。

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），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) Millennium Ecosystem Assessment: Ecosystems and Human Well-Being Synthesis, Island Press, Washington D.C., 2015
- 2) Takahara, T., Minamoto, T., Tamanaka, H., Doi, H., Kawabata, Z.: Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA, *PLoS ONE*, Vol.7, Issue 4, e35868, 2012.
- 3) Doi, H., Inui, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T., Minamoto, T.: Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, *Freshwater Biology*, doi:10.1111/fwb.12846, 2016
- 4) 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.