

河川水中環境 DNA のメタバーコーディングと定量 PCR から迫る水生昆虫群集の現存量推定

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, 会田 俊介, 久保田 健吾

1. はじめに

河川生態系は気候変動、流域の人為的開発により顕著に劣化している¹⁾。水生昆虫は河川生態系において魚類・鳥類などの上位捕食者の重要な餌資源であり、この量的変動を季節・空間的に推定することは河川生態系全体の保全に繋がる。近年、長期・広域な生物調査において環境DNA法の利用が適していると考えられている²⁾。環境DNA（environmentalDNA, eDNA）とは生物の細胞片、粘膜等の生物痕跡物を由来として環境中に存在するDNAを指す²⁾。環境DNAから種特異的な塩基配列の存在量を定量し、生物量を推定する試み³⁾、種横断的に検出可能なユニバーサルプライマーを用いて生物相の把握⁴⁾が行われている。本項では、河川水中の無脊椎動物のDNAを対象とし、定量PCRによる無脊椎動物DNA濃度およびメタバーコーディングにより得られた目的生物群集のDNA含有割合を用い、実際の水生昆虫個体数を再現できるか検討した。

2. 手法

2.1 環境DNAと水生昆虫のサンプリング

宮城県名取川水系の6地点において2016年8月から12月にかけて、約毎月1回の頻度でサンプリングを行った。環境DNA分析用に各地点の瀬尻にて河川表面水を4.5L採水し、既往の実験^{2,5)}に従い氷冷保存して実験室に持ち帰り、即日中に吸引濾過した。濾紙は孔径0.7 μm 、直径45 mmのGF/F（Whatman）を用い、濾過量はサンプルあたり1~1.5Lとした。サンプルを捕捉させた濾紙はDNA抽出を行うまでアルミホイルに包み、20℃で保存した。また同時に、コドラート付きサーバーネット（目合250 μm ）を用いて瀬と淵にて1か所ずつ水生昆虫を採集した。採集サンプルはその場で100%エタノールを封入して固定したのち、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を行った。

2.2 定量PCR

濾紙上に捕捉したDNAを、内田ら⁵⁾に従い抽出・定量PCRにより無脊椎生物DNA濃度を測定した。本手

法を摘要すると、Proteinase K 20 (mg/ μm) を加え 56℃/30min の恒温処理後、PCI 法により抽出した。さらに有機溶媒および夾雑物の除去のため、エタノール沈殿とカラム精製（Zymo Research）を行い、1 サンプルあたり 100 μl の DNA 溶液を得た。抽出した DNA 中における無脊椎動物 DNA 濃度を、インターカレーター法 PCR により定量した。PCR プライマーは、ミトコンドリア DNA の CO1 領域 (658bp) を標的として Folmer ら (1994) が開発した LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'), HCO2198 (5'-TAA ACT TCAGGG TGA CCA AAA AAT CA-3') を用いた。

2.3 メタバーコーディングのライブラリ調整

MiSeq 3.0 (Illumina) により塩基配列を解読するためのライブラリ調整を行った。標的配列の増幅のため、試薬に TaKaRa Taq™ HS Low DNA (TaKaRa) を使用し、熱変性 94℃/5sec, サイクリングとしてアニーリング 50℃/5sec, 伸長反応 68℃/10 sec を 35 回, 伸長反応 68℃/7 min の条件にて PCR を行った。この PCR は 1 サンプルにつき 3 反復行い、増幅産物をサンプルごとにまとめて以降の分析に用いた。各サンプルの増幅バンドの特異性を Agilent 2100 Bioanalyzer DNA7500 により確認し、増幅産物を AMPure XP (Beckman Coulter) により精製・濃縮した（最終溶出量 20 μl ）。その後、FASMAC⁶⁾ のプロトコルを参照して MiSeq 機器へのアダプター配列、サンプルの識別配列を結合させた。前述の方法により精製・増幅特異性を確認後、Qubit dsDNA HS (ThermoFisher Scientific) により最終的な増幅産物濃度を測定した。1 サンプルあたりの濃度が 4 nM になるよう EB Buffer を用いて希釈調整し、Illumina MiSeq v3 にロードした。ライブラリは MiSeq v3 のプロトコル通りに調整した。塩基配列の解読終了後、全シーケンスデータを回収し、後述の解析に用いた。

2.4 メタバーコーディング結果の情報解析

得られた塩基配列データから、シーケンスアダプター、低品質塩基配列を Trimmomatic v 0.36. を用いて除去した。読まれた塩基配列長が 150bp 未満の配列は、情報量が少ないため削除した。また以下の解析には

キーワード 環境 DNA, 水生昆虫群集, 生物量, 定量 PCR, メタバーコーディング

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

Forward 側の解読結果のみを使用した。塩基配列が 97% 以上の類似度を持つものを 1 つのクラスタ (OTU) とし、各 OTU の代表配列を BLAST⁺ (NCBI) により種名同定を行った。このうち、NCBI データベース上の塩基配列と 97%以上の一致率を示し、かつ水生昆虫に決定された塩基配列の個数を取り出し、塩基配列の出現割合をサンプルごとに求めた。

3. 結果とまとめ

各サンプルにおける水生昆虫目分類ごとの DNA 濃度を、定量 PCR により得られた無脊椎動物 DNA (CO1) 濃度および塩基配列の出現割合を用いて推計した。水生昆虫の分類は主要な 5 目 (カゲロウ, カワゲラ, トビケラ, ハエ, トンボ, コウチュウ) とし、計算式は次のとおりである。

$$DNA_{ij} = DNA_{obsi} \times \frac{R_{ij}}{R_i}$$

DNA_{ij} (copies/L): サンプル i における分類群 j の推定 DNA 濃度
 DNA_{obsi} (copies/L): 定量 PCR により得たサンプル i の DNA 濃度
 R_{ij} : サンプル i に出現した分類群 j の塩基配列片数
 R_i : サンプル i に出現した総塩基配列数

各水生昆虫分類群の推定 DNA 濃度と、採集した水生昆虫の個体数の相関分析を行った。各変量は変換し、分析には R (R Core Team.) を用いて Spearman の順位相関係数を算出し、有意な正の相関を示したカゲロウ, カワゲラ, ハエ目について図 1 に示した。環境 DNA による DNA 定量値および分類群ごとの塩基配列含有割合を用いて、水生昆虫群集の個体数推定に応用できる可能性が示された。

謝辞: 本研究は、科学研究費補助金 (16H02363, 風間聡; 17J02158, 内田典子) 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た。ここに深く謝意を表す。

参考文献

- 1) Sala E., Chapin F. S., Armesto J. J. (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. Science. 287: 1770-1774.
- 2) Rees C., Maddison B., Middleditch D.J., Gough K.C.H. (2014) REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. Journal of Applied Ecology. 51: 1450-1459.
- 3) Doi, H., Inui, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T., Minamoto, T. (2016) Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, Freshwater Biology, doi:10. 1111 /fwb. 12846.
- 4) Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J. Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M., Iwasaki W. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. Royal Society Open Science. 2 (7): 150088.
- 5) 内田典子, 風間聡, 久保田健吾, 会田俊介 (2018) 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, 平成 29 年土木学会東北支部技術研究発表会講演概要集, VII-23.
- 6) 株式会社 FASMAC, 次世代シーケンス解析(MiSeq)アンプリコン解析のサンプル調整について(最終閲覧日 2019. 1. 16.) http://fasmac.co.jp/ngs_miseq_techinfo

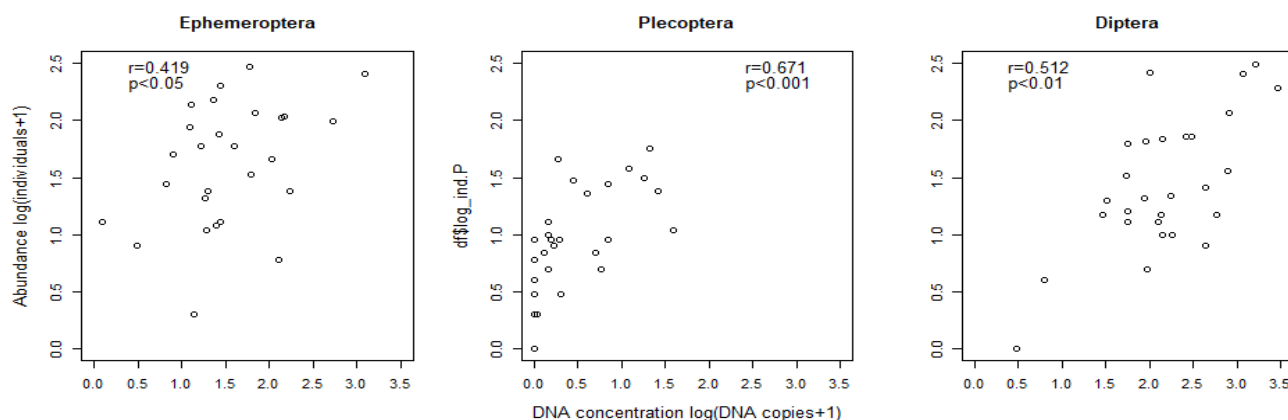


図 1 分類群ごとにおける推定 DNA 濃度と採集個体数の関係。