

環境 DNA による河川生物群集の時空間特性解析

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, 会田 俊介, 久保田 健吾

1. はじめに

DNA 情報を用いた調査手法は、水域における新しい生態系モニタリングとして注目を集めている。特に生物を直接採捕する必要のない“環境 DNA”¹⁾への期待は高く、北米においては Biomonitoring 2.0²⁾, ヨーロッパにおいては WFD³⁾ のなかに積極的に取り入れられようとしている。日本においても例外ではなく、令和 2 年 1 月には、国土交通省が推進する多自然川づくりにおいて環境 DNA 調査活用の検討開始が告知された⁴⁾。魚類環境 DNA については、研究成果・知見が多く蓄積されており、その検出性能の高さが認められている⁵⁾。他方、底生動物に関して環境 DNA がもたらす情報についての知見は限られている。結果、上記のような環境 DNA の実用化において、魚類相への適用が検討されているが、底生動物はその限りではない。その背景として、保全の観点において重要性が高いこと、かつ従来調査（主に採捕）労力が大きいことが考えられる。しかし、底生動物の採捕調査は比較的容易に実施できるものの、詳細な分類同定のために多くの時間と専門知識が必要であった。底生動物の多様性は環境負荷の指標として、さらに群集組成の時空間的变化は、環境変化に対する生物群集の応答パターンを知るのに有用である⁶⁾。そのため、特定の種に着目するだけでなく、群集全体を把握する手法として環境 DNA が利用できると考えられる。以上の背景より、本研究は、環境 DNA メタバーコーディングを用いて、河川生物群集の時空間的特性の解明を試みた。

2. 手法

2.1 環境 DNA の採集とメタバーコーディング

宮城県名取川水系の上・中・下流に位置する 6 地点において 2016 年 5 月から 12 月にかけ、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 1 L 採水し、実験室にて吸引濾過（ろ紙：GF/F (Whatman), 孔径 0.7 μm , 直径 45 mm) を行った。以降の DNA 抽出、メタバーコーディングライブラリ調整、バイオインフォマティクスは内田ら⁷⁾の

とおりである。概略すると、Folmer ら⁸⁾が開発したミトコンドリア DNA の CO1 領域 (658bp) ユニバーサルプライマーを用い、MiSeq 3.0 (Illumina) により塩基配列を解読した。また以下の解析には Forward 側の解読結果のみを使用した。塩基配列が 97%以上の一致度を持つ場合、同一の系統由来を持つとみなして操作上分類群単位 (Operational Taxonomic Unit, OTU) としてまとめた。各 OTU の最頻出配列を代表配列とし、BLAST (NCBI) による分類名同定を行った。BLAST の結果、主要な水生昆虫 8 目 (カゲロウ目, カワゲラ目, トビケラ目, ハエ目, トンボ目, コウチュウ目, カメムシ目, ヘビトンボ目) に属し、かつ NCBI データベース上の塩基配列と 85%以上の一致率を示すものを取り出した。

2.2 河川における水生昆虫群集の採集

環境 DNA のサンプリングと同時に、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（採集面積 0.18 m^2 ）、その場で 100%エタノールを封入して固定した。水生昆虫の採集と同時に、環境因子（水温, EC, pH, TN, TP）の測定を実施した。虫サンプルは実験室に持ち帰り、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。このとき、特にユスリカ科は個体サイズが小さく、また同定が困難であるため、科レベルにおける同定に留めた。

2.3 群集構造解析

得られた水生昆虫群集について、調査手法ごと（環境 DNA と採捕調査）に群集間の類似度を計算した。環境 DNA から得られたデータは、OTU 種数として換算し、在／不在データとして取り扱い、群集間非類似度は Sorensen 指数により計算した(式 1)。

$$\text{Sorensen index} = \frac{2S_{AB}}{S_A + S_B} \quad (\text{式 1})$$

S_A: 群集 A に出現した種数S_B: 群集 B に出現した種数S_{AB}: 群集 A および B に共通して出現した種数

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

3. 結果とまとめ

メタバーコーディングの結果，参照塩基配列との一致度 85%以上において水生昆虫として同定された塩基配列は 529,682 個であり，これは得られた塩基配列全体の 5.86%であった．全 71 サンプルから水生昆虫に属する OTU は計 9,777 個であった．内訳として，ハエ目 7,732 OTUs，カゲロウ目 1,044 OTUs，トビケラ目 479 OTUs，カメムシ目 223 OTUs，コウチュウ目 152 OTUs，カワゲラ目 90 OTUs，トンボ目 50 OTUs，ヘビトンボ目 7 OTUs であった．生物群集の違いは水温と相関し（環境 DNA; $R^2=0.81$, $p=0.001$, 採捕法; $R^2=0.58$, $p=0.013$ ），さらに環境 DNA により得られた群集は TN と相関する（ $R^2=0.51$, $p=0.046$ ）ことが判明した．水温は季節的な違い，TN は下流ほど高い濃度を示したことから，環境 DNA は群集の時間的および空間的な違いを評価できる可能性を示した．環境 DNA は環境中におけるその性質（放出・減衰，運搬，保存）のより詳細な理解が必要であるが，環境 DNA を用いた群集解析は水生昆虫においても有用であることが示された．

謝辞：本研究は，科学研究費補助金（16H02363，風間聡；17J02158，内田典子）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) 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～．日本生態学会誌 **66**, 583–599 (2016)．

2) Baird, D. J. & Hajibabaei, M. Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Mol. Ecol.* **21**, 2039–2044 (2012)．

3) Leese, F. *et al.* Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries, Disciplines, Cultures and Generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: A Perspective Derived From the DNAqua-Net COST Action. in *Advances in Ecological Research* vol. 58 63–99 (2018)．

4) 国土交通省．(2020 年 1 月 24 日確認)．
http://www.nilim.go.jp/lab/fbg/ksnkankyo/kankyoDNA_200110.pdf．

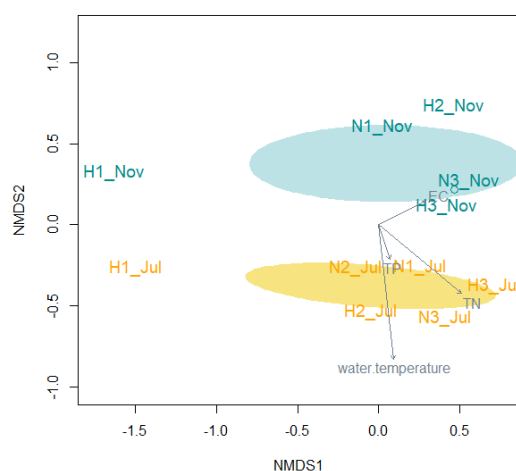
5) Hering, D. *et al.* Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Res.* **138**, 192–205 (2018)．

6) Bush, A. *et al.* Studying Ecosystems With DNA Metabarcoding: Lessons From Biomonitoring of Aquatic Macroinvertebrates. *Front. Ecol. Evol.* **7**, (2019)．

7) 内田典子，久保田健吾，会田俊介 & 風間聡．メタバーコーディングと定量 PCR から得た水生昆虫環境 DNA 量と水生昆虫現存量の関係．土木学会論文集(G 環境) **75**, III_281-III_288 (2019)．

8) Black, M., Hoch, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **6** (1994)．

(a)



(b)

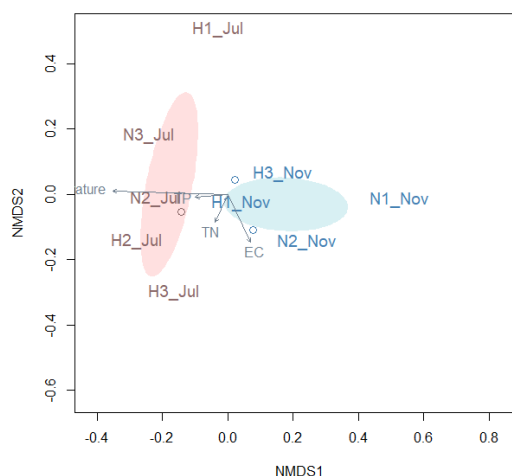


図 1 環境因子と (a) 環境 DNA から得られた群集と (b) 採集法により得られた群集の関係．

広瀬川上・中・下流地点 (H1, H2, H3) および名取川上・中・下流地点 (N1, N2, N3) の 7 月と 11 月について示す．

季節異なる群集は異なる色で示し (7 月；明色，11 月；暗色)，環境因子のベクトル長さは相対的な決定係数の大小を示す