

次世代シーケンシング解析による排砂バイパス付きダム上下流における水生昆虫群集の生物多様性解析

愛媛大学 正会員 ○八重樫咲子 愛媛大学 学生会員 泉昂佑
愛媛大学 学生会員 近藤俊介 愛媛大学 正会員 渡辺幸三

1. はじめに

ダムによる河川の分断化は、流域内に生息する河川生物の群衆構造に大きな影響を及ぼす。例えば、ダムは、その上下流に存在する生物集団間の移動を阻害する。ダム下流域では流況の変化により、河川生物の生息場が消失し、群集構造が変化する。

近年、ダム湖への土砂流入を防ぐために排砂バイパストンネルがダム湖に設置されている。この排砂バイパストンネルが分断された上下流群集間の連続性を回復させる可能性がある。排砂バイパストンネルは、上流から流出してきた土砂を下流域へ輸送する。現在、この排砂バイパストンネルを有するダムは、11箇所のみ存在している（スイス6箇所、日本5箇所）。排砂バイパストンネルが上流から下流へ土砂を供給することで、ダム下流側の生息場の再生やトンネルを介した上下流集団の交流の復活の可能性がある。それにもかかわらず、これまでに排砂バイパストンネルの生態学的影響効果の解明は行われていない。

これまで、水生生物の群集構造の評価は採取された標本の形態同定により行われてきた。しかし、形態同定では長時間の作業と莫大な人件費を要する。また、誤同定のリスクも高く、正確な群集構造の解明には専門的な知識を要する。さらに、水生昆虫のような小型の生物はそもそも種特有の形態的な特徴が整理されていないため、科や属レベルでの分類となり、正確な種数を評価できないという問題点もある。

そこで本研究では、従来の形態に基づいた種同定に代わり、DNA配列を用いて水生昆虫を分類する。ま

ず、各地点から採取された群集サンプルから一度にDNAを抽出し、次世代DNAシーケンス（NGS）解析により一度に大量のDNA配列を得る。その後、標本からDNA配列をDNAデータベースと照合させて、未同定のサンプルの種名を明らかにするDNAバーコーディングを行うことで、短時間・低コストで水生昆虫の群集構造を明らかにする。

以上の背景より本研究では、1) 通常のダムによって分断化された河川、2) 排砂バイパストンネルを持つダム河川、3) ダムのない河川、の3河川における上下流を対象に、NGS解析とDNAバーコーディングを組み合わせて、水生昆虫群集構造の解析を行った。

2. 方法

2014年8月にスイスアルプスの通常のダム有り河川、排砂バイパス付きダム河川、ダムなし2河川の上下流16地点で底生動物の採取を行った（図1）。底生動物はDフレームネットを用いて定性的に採取し、直後に99.5%のエタノールでサンプル容器に詰め4℃で保存した。標本は実体顕微鏡（×112.5）を用いて科まで同定した。次にDNeasy 96 Blood & Tissue kit（QIAGEN）を用いてDNA抽出を行った。各地点から得られた水生昆虫群集を科まで同定して、乾燥重量を計量した。その後、乾燥重量が最大の科と最小の科の重量比が100倍を超えないように調整し、粉碎した。粉碎物の60%を10mgずつ各ウェルに分注してから、一晩および二晩proteinase K処理した後、プロトコル通りにDNAを抽出した。抽出したDNAは等量ずつ混合した。

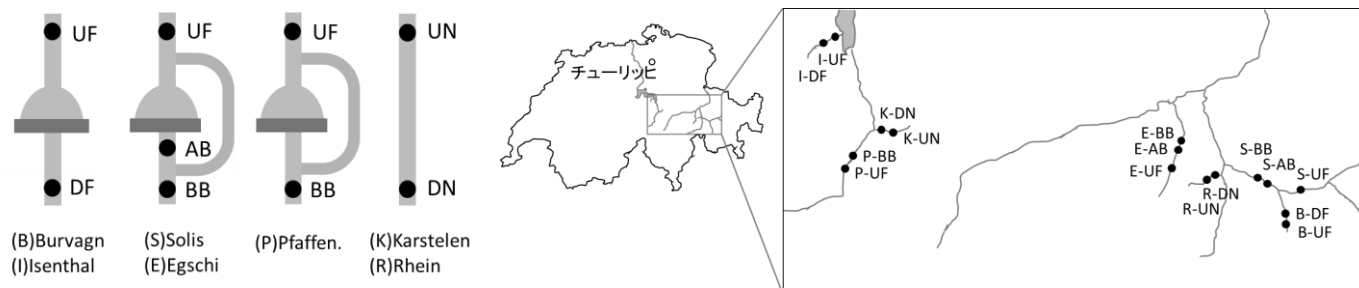


図1 各河川の調査地設定。赤色で示す調査地がダム河川、黄色がバイパス有ダム河川、緑色が自然河川を表す。UF: Upper site at Fragmented river（分断河川上流）、DF: Down site at Fragmented river（分断河川下流）、AB: Above Bypass out（バイパス排砂口上流）、BB: Below Bypass out（バイパス排砂口下流）、UN: Upper site at Natural river（自然河川上流）、DN: Down site at Natural river（自然河川下流）。

続いて、昆虫網用 cytochrome oxidase I 領域増幅プライマーを用いて、PCR 増幅を行った。PCR 反応液は Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF buffer を用いた。PCR サイクルは 98°C30 秒の後に、98°C10 秒、43°C30 秒、72°C30 秒のサイクルを 20 回行い、5 分 72°Cでの伸長反応後、4°Cで保存した。PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) で精製した。

各地点の PCR 産物にアダプターをライゲーションした。まず Takara Ex Taq を用いて PCR 産物の 3' 末端に dATP を付加した。反応は T100TM Thermal Cycler (BioRad)を用いて、72°C1 時間行い、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) で精製した。次に、可能な限りすばやくアダプターと PCR 産物の TA ライゲーションを行った。末端に相補領域を持つ 2 種の DNA 配列をアニーリングさせることで、あらかじめ Y 字アダプターを作成した。ライゲーションには T4 DNA ligase を用いて行い、PCR 産物とアダプターの mol 非が 1:100 となるように調整した。ライゲーション反応は 16°C19 時間静置し、65°Cで 2 分静置し、反応を止めた。その後 AmpureXP を用いて精製した。

アダプターの付いたライブラリ濃度を上げるため、アダプター配列を用いて PCR 増幅を行った。PCR 反応液は Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF buffer を用いた。PCR サイクルは 94°C30 秒の変性反応後、94°C10 秒、60°C30 秒、72°C1 分で 15 サイクル行い、72°C5 分で伸長反応を行った。PCR は 6 回行った。この PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動して、目的産物のみを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製した。

切り出し産物は、Agilent High Sensitivity DNA kit を用いて、バイオアナライザ (Agilent) で定性評価を行った。また KAPA SYBR FAST q PCR Master Mix を用いた定量 PCR により各地点の DNA mol 濃度を測定し

た。PCR サイクルは 95°C5 分の後、95°C30 秒、60°C90 秒のサイクルを 30 回行った。最後に 65°Cから 95°Cまで 30 秒ごとに 0.5°Cずつ上昇させてメルトカーブ解析を行った。その後、各地点の DNA を当 mol 量ずつ混合し、再度定量 PCR を行い、最終的な DNA mol 濃度を測定した。次世代シーケンス解析には MiSeq と MiSeq Reagent Kit v3 を用いた。DNA サンプルには最終濃度 30%となるように phiX を混合した。混合物の最終濃度が 6pM となるように調整した。

得られたデータは、まず Trimmomatic を用いて、塩基長が 20bp 未満の配列を削除し、各 DNA 配列の 3' 末端がクオリティ値 20 未満の場合にトリミングした。次に、FASTX-Toolkit v0.0.13 を用いて、50%以上の塩基でクオリティ値が 25 に満たない DNA 配列を削除した。アダプター配列とプライマー配列を取り除いた。

次に、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて DNA 解読のエラー補正 (アライメント) をした。続いて 230bp の DNA 配列データを用いて、DNA バーコーディングによって種を同定した。このとき、サンプルとデータベースの塩基配列間で、一致数が 200bp 以上、一致率が 93%以上、5 配列以上ヒットしている種を信頼できる結果とした。最後院地点間の群集構造の分化を明らかにするため、群集距離 Bray-Curtis (BC) 指数を算出した。

3. 結果と考察

採取した個体は合計 7,369 個体、27 形態分類群 (23 科、4 亜科) が採取された。DNA 解析により 16 調査地で全 5,810,864 配列を得た。そのうち正しくアライメントされた配列は 891,427 配列だった。DNA バーコーディングによって 24 種が同定された。

クラスター分析によって、ダムなし河川は同じグループに、またダム有り河川は上下流の地点で違うグループに分類される傾向が見られた (図 2)。3 種河川の上下流間群集構造を比較した結果、Pfaffen.ダムと Egschi ダムにおいて、排砂バイパスによる下流域への生態影響の緩和効果が見られた。

謝辞

本研究は、科学研究費補助金 (番号 25289172, 26257304, 26630247), および河川環境管理財団河川整備基金 (番号 26-1215-029) の資金的援助を受けました。ここに謝意を表します。

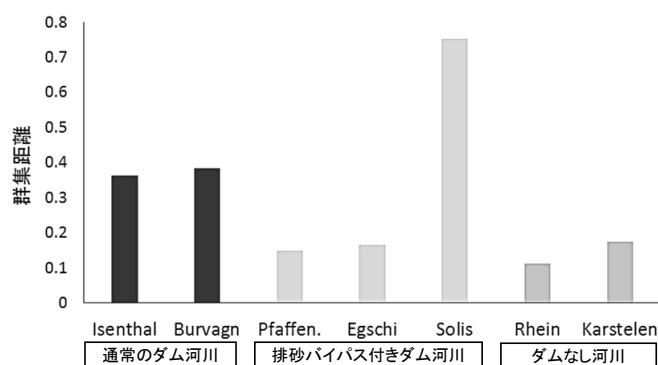


図2 各河川における群集距離Bray-Curtis (BC) 指数