

平成30年6月20日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18174

研究課題名(和文) 水環境DNAを活用した迅速で網羅的な水生昆虫の流域内種多様性の解明

研究課題名(英文) Species Diversity of Aquatic Insects Revealed by Environmental DNA

研究代表者

八重樫 咲子 (YAEGASHI, Sakiko)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：30756648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで多くの地点で水域の生物モニタリングが盛んに行われてきた。従来のモニタリングでは生物採集や目視による生息確認を基本としているが、種名同定の困難さや現場調査の労力などの問題点がある。近年、従来の生物採集を基本とした生物モニタリングにかわり、生物が環境中に放出している環境DNAに着目されている。そこで本研究では、環境DNAの次世代シーケンス(NGS)解析による水生昆虫の種多様性評価を実現することを目的とし、NGS解析を利用した環境DNA分析による水生昆虫の種多様性解析、止水域由来の環境DNAを利用した環境DNAの流下距離の解明、環境DNA抽出方法の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Environmental DNA (eDNA) is a powerful tool to investigate species-diversity of aquatic insects. In this study, first, I performed the meta-barcoding analysis of the eDNA originated from the aquatic insects. In result, most families which were collected from fields were detected from eDNA. The number of reads of each taxon were positively correlated with the abundance of insects from the fields. It supported that the eDNA analysis using NGS predict the abundance of freshwater insects. However, NGS analysis also detected high proportion of non-target taxa (e.g. microorganisms, crustaceans, inland insects). It is needed to design new universal primers targeted aquatic insects. Second, I analyzed the flow distance of eDNA originated from lentic algae. The concentration of the eDNA was decreased until about 3-7 km downstream from dams. It indicated that eDNA drifted down that distance in the study rivers.

研究分野：河川生態

キーワード：水生昆虫 環境DNA

1. 研究開始当初の背景

水域の生物多様性調査を目的として、河川水辺の国勢調査などの生物モニタリングが各地で活発に行われている。一般的な生物モニタリングでは、サンプリングネット等で生物サンプルを採取し、その形態に基づいて種同定することで種多様性(種数)を評価している。しかしこの手法では、

- 1) 希少種・貴重種・絶滅危惧種など個体数の少ない生物の採取が困難である
 - 2) 形態同定には長時間の作業と莫大な人件費を要する
 - 3) 若齢個体や劣化標本は形態同定が困難で誤同定のリスクがある
 - 4) そもそも底生動物などの小動物は図鑑に記載されていない種(未記載種)が多く、属・科レベルの粗い分類群同定に止まり正確な種数が評価できない
- などの問題点が発生しやすい。

このような問題点を解決する手法として従来の形態同定に代わり、環境 DNA を利用した生物モニタリングが注目を受けている。環境 DNA とは大気・水・土壌などの環境中に存在している DNA で、生息する多くの生物が日常的に放出している雑多な DNA である (Taberlet et al. *Molecular Ecology*, 2012)。この環境水中の環境 DNA には、そこに生息する多くの生物の DNA 情報が含まれていることから、環境 DNA を分析することでそこに生息する生物の情報を得ることができる。

環境 DNA 分析では、リアルタイム CR と次世代シーケンス(NGS)解析の2つの手法が主に用いられている。一つ目のリアルタイム PCR による環境 DNA 分析では特定の生物の存在や生物量を簡便にモニタリングできることが示されてきた (Takahara et al. *Plos One*, 2012 など)。この手法は強力な生物モニタリングの手段であるが、種ごとにリアルタイム PCR 用プローブを開発する必要がある。既にリアルタイム PCR の手法が開発されている種や、多くの分類群の DNA 分析が進んでおりリアルタイム PCR 用プローブを開発しやすい種では強力なモニタリング手法となる。一方で、DNA 分析が進んでいない水生昆虫のような分類群には適応しにくいという現状もある。

二つ目の NGS 解析は、次世代シーケンサーを利用して、大量の DNA 断片を同時並行に一気に解読する技術である。従来のサンガー法によるシーケンス解析では 96 配列を数時間で解読していたが、NGS 解析では MiSeq (Illumina) の場合 2,500 万配列を約 3 日間で解析できる。NGS 解析はこれまでに医療分野で多く用いられてきたが、生態学分野で

の応用例も増加傾向である。環境 DNA 解析に NGS 解析を用いる場合、まずは 12s rRNA 領域や Chytochrome Oxidase I (COI) 領域を対象としたユニバーサルプライマーにより PCR を行い、得られた PCR 産物の塩基配列を解読する (Miya et al. *Plos One* 2015)。得られた配列を DNA データベースで検索することで、環境 DNA の由来となった生物のリストを得ることができる。しかし、リアルタイム PCR と同様に水生昆虫のように DNA データの乏しい分類群には不向きである可能性がある。

また、環境 DNA 分析は生物モニタリングの有効な手段であるが、河川においては水の流動により採水地点の水に含まれる DNA 情報が必ずしもその地点の生物群集の動態を表しているとは限らない。このため、河川中での環境 DNA 移動距離を明らかにする必要がある。さらに、環境 DNA の抽出手法に関する基本的な研究は充分ではない。

2. 研究の目的

上記のような背景を受けて、本研究では、以下の3点を目的として研究を行った。

(1) NGS 解析を利用した環境 DNA 分析による水生昆虫の種多様性解析

河川水中の DNA の次世代 DNA シークエンシング(NGS)解析を利用して、水生昆虫の流域内種多様性を一気に網羅的に明らかにする技術を開発する。従来の形態同定による種分類、DNA データベースを利用したメタバーコーディング、DNA の進化速度の変化を起点とした DNA 種分類 (Zhang et al. *Bioinformatics* 2013) を利用した生息水生昆虫リストを作成する。

(2) 止水域由来の環境 DNA を利用した環境 DNA の流下距離の解明

富栄養化したダム湖で増殖することが知られている止水性藻類の一種 *Microcystis* sp. を対象に、環境 DNA のリアルタイム PCR を行うことで、ダム湖とその下流域で対象種の環境 DNA 濃度を測定する。そして、流程中の DNA 濃度の変化から環境 DNA の流下距離を推定する。

(3) 環境 DNA 抽出方法の検討

る過によって得られる環境 DNA の多くは生物から分離した細胞中に含まれていることが予想される。細胞分解手法の検討を行う

ことで、効果的に DNA を抽出する手法を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NGS 解析を利用した環境 DNA 分析による水生昆虫の種多様性解析

愛媛県の河川の上流から下流までの 12 地点において河川水 2L を採水し、11 地点で水生昆虫の定量採集 (コドラート 25 cm × 25 cm, メッシュ 0.6 mm) を行った。底生動物は 99.8% エタノールで固定し、実体顕微鏡と日本産水生昆虫一科・属・種への検索を用いて科レベルまでの同定した。

河川水はメンブレンフィルター (Mixed Cellulose Ester, 孔径 0.22 μm, ADVANTEC) を用いて 1L ずつろ過した。フィルターが目詰まりした場合には、フィルターを交換し、1L 分毎にまとめて -20°C で保管した。

次にフェノール・クロロホルム法により DNA 抽出を行なった。河川水 1L 分をろ過したメンブレンフィルターを、エタノールランプで焼却滅菌したハサミとピンセットを用いて細かく裁断した。次に、遠心管に 10 ml の HMW buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) を加え、vortex で 1 分攪拌した。攪拌後、タンパク質分解酵素 proteinase K (QIAGEN) と 10% SDS 溶液をそれぞれ 100 μl 加えて、56°C で一晩静置した。続いて TE 飽和フェノール 10 ml を加え、vortex で攪拌し、遠心分離した (10000 × g, 10 min)。得られた上清を新しい 50 ml 遠心管に移し、5 ml の CIA (クロロホルム: イソアミルアルコール = 24:1 の混合液) と 5 ml の TE 飽和フェノールをそれぞれ加え、再び同様に遠心分離した。その後得られた上清を回収し、エタノール 20 ml (99.5%) と 3 M 酢酸ナトリウム 100 μl (pH 5.2) を入れて攪拌し、-20°C で 30 分静置した後に、遠心分離 (10000 × g, 15 min) した。上清をゆっくりと流し捨て、70% エタノール 20 ml を加えて、再び遠心分離 (10000 × g, 15 min) した。そして、上清を取り除き、室温で乾燥させた後、TE buffer (1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0) 500 μl で DNA を再懸濁させた。最後に、DNA 中に含まれる PCR 阻害物質を取り除くため、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて再度 DNA の精製を行った。

そして得られた DNA に対してミトコンドリア DNA (mtDNA) の COI 領域のユニバーサルプライマーを用いた PCR 増幅を行った。この領域は動物群集の DNA 解析によく用いられる領域であり、DNA データベースが最も豊富な領域の一つである。PCR プライマーは昆虫綱用ユニバーサルプライマー (HCO_2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA

CCA AAA AAT CA-3') と LCO_1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') を用いた (Folmer et al. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994)。PCR には Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolab) を用い、10 mM の HCO_2198 primer および LCO_1490 primer 1 μl, 10 倍に希釈 DNA 1 μl を加え、PCR グレード水で全量が 20 μl になるよう調整した。PCR 反応には TM100™ Thermal Cycler (Bio-RAD) を用い、94°C で 2 分加熱した後、94°C で 30 秒、45°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 25 回行った。最後に、72°C で 10 分間の伸長反応を行い、4°C で保存した。ただしこの条件で PCR 増幅が確認できない、または非特異的増幅が見られる場合には、DNA の希釈倍率、付属の Buffer、PCR サイクル数を調節した。得られた PCR 産物は AMPure XP (Beckman Coulter) で精製した。精製 PCR 産物の最終溶出には TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit (illumina) に付属の Resuspension Buffer (RSB, illumina) 20 μl を用いた。

その後、NGS 解析を行なった。NGS 解析用 DNA ライブラリを準備するため、精製済み PCR 産物に TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit Set A (illumina) を用いて DNA アダプターを付加した。作成したライブラリの評価のため、Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent) の Agilent High Sensitivity DNA キット (Agilent) を用いた分画分析を行なった。また、KAPA Library Preparation Kits for illumina (KAPA) を用いて各地点のライブラリ濃度を定量 PCR により測定した。その後、各地点の DNA ライブラリ濃度を 2 nM に調整し、MiSeq Reagent Kit v3 (illumina) を用いて、片側 300 bp を解読した。DNA ライブラリはプロトコル通りに調整した。Phi X Control v3 (illumina) は 50% で DNA ライブラリに混合し、Phi X 混合ライブラリの最終濃度が 6 pM になるように調整した。DNA 配列の解読終了後、Phi X 配列を含む全シーケンスデータを回収した。

続いて得られた DNA データの解析を行なった。まず、シーケンスクオリティの低い領域、配列の除去を行なった。また、シーケンス長が短い配列も情報量が少ないため削除した。次に、PCR に用いたプライマー領域を使用して配列のスクリーニングを行なった。続いて DNA 配列の相同性解析により、97% の相同性を持つ operational taxonomic unit (OTU) を作成した。DNA データベースの一つである National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベース検索用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて、各 OTU 配列と相同性の高い生物種を検索した。最後に水生昆虫各科由来の DNA 配列数と水生昆虫標本の科ごとの個体数の相関分析を行った。最後に、

OTU ベースで作成した水生昆虫の進化系統樹に対し、DNA 種分類法 (Zhang et al. Bioinformatics 2013) を適応することで DNA ベースの種数を明らかにした。

(2) 止水域由来の環境 DNA を利用した環境 DNA の流下距離の解明

愛媛県の 2 河川において、ダム湖水とその下流域の 7 地点で 2L の河川水を採水した。(1)と同様の方法で、河川水 400ml を 3 回ろ過した。

各フィルターから CTAB 法により DNA 抽出を行なった。まず、メンブレンフィルターを、エタノールランプで焼却滅菌したハサミとピンセットを用いて細かく裁断した。650 μ l の CTAB バッファー (10 mL 1M Tris-HCl pH 8.0, 28 mL 5M NaCl, 20 mL 0.5 M EDTA pH 8.0, 1 gr Proteinase K90, 2 gr CTAB, 1 mL 2-mercaptoethanol) を加え 55 で 30 分静置した。次に、650 μ l の CIA を加え、遠心分離 (13,000 rpm, 10 min) した。得られた上清にイソプロパノールと 5M 塩化ナトリウムを加え、-20 で 1 時間静置した。その後、遠心分離 (13,000 rpm, 10 min) し、上清を破棄した。続いて、70%エタノールを添加し、再度遠心分離し、上清を破棄した。その後、チューブを常温で乾燥させたのち、TE buffer (1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0) 500 μ l で DNA を再懸濁させた。最後に、DNA 中に含まれる PCR 阻害物質を取り除くため、One Step PCR Inhibitor Removal kit (ZYMO RESEARCH) を用いて再度 DNA の精製を行った。

次にリアルタイム PCR により、止水性藻類の一種である *Microcystis* sp. の生物量の定量を行なった。*Microcystis* sp. は主に湖沼で生産される藻類であり、夏季には富栄養化したダム湖でしばしば異常増殖することが知られている。リアルタイム PCR プライマーには Micro233f (5'-CTA ATT GGC CTG RAG AAG AGC-3') および Cyano349r (5'-GCT CGG TCC CGT AGG AGT-3') を用いた (Tomioka et al. Microbes and Environments 2008, Tomioka et al. Journal of Plankton Research 2011)。また、リアルタイム PCR 反応には KAPA Cyber Fast qPCR Master Mix を用いた。PCR サイクルは 95 5 分の後、95 10 秒、60 20 秒、72 10 分のサイクルを 40 回行い、72 10 分のステップを行なって終了させた。スタンダード DNA には *Microcystis* sp. の培養産物を離昇した。PCR 増副産物は電気泳動により非特異的増幅産物の確認を行った。得られたデータから、ダム湖からの各サンプリング地点までの DNA 濃度の変化を明らかにした。

(3) 環境 DNA 抽出方法の検討

環境 DNA の回収は主にろ過により行われ

ている。このため、多くの環境 DNA 分析で利用されている DNA は環境水中に放出された細胞中に存在していると考えられる。ここでは、(1)にある方法で河川水をろ過し、フィルターをエタノールランプで焼却滅菌したハサミとピンセットを用いて細かく裁断した後、タンパク質分解酵素 Proteinase K、植物細胞壁分解に用いる CTAB、細胞の構成要素の一つである脂質を分解するリパーゼによる分解処理を行なった。その後、(1)と同様にフェノール・クロロホルム法により DNA 抽出を行なった。

その後、得られた DNA の濃度を 2 本鎖 DNA の蛍光標識法により DNA 濃度を測定した。また、水生昆虫用ユニバーサルプライマーを利用した PCR 効率の検討を行った。

4. 研究成果

(1) NGS 解析を利用した環境 DNA 分析による水生昆虫の種多様性解析

環境 DNA から得られた水生昆虫由来の DNA 配列数と従来の水生昆虫採集で得られた個体数の間に有意な正の相関が見られた。また、従来の生物モニタリングで確認されたにもかかわらず環境 DNA から配列が得られなかった分類群は 3 科に止まった。これは、NGS 解析を利用した環境 DNA 分析により、その地点に生息している生息分類群リストとその生物量を一気に解明できる可能性を示唆する。

また、DNA 種分類により得られた分類群数は従来の水生昆虫サンプリングから得られた分類群数と同等程度であり、環境 DNA を利用したシステムティックな水生昆虫種多様性評価に対して一定の効果があったと考えられる。

本研究では水生昆虫のユニバーサルプライマーを用いて環境 DNA 解析を行なった。その結果、藻類、プロテオバクテリア、クモ綱などの昆虫以外の分類群がかなりの割合で出現した。また、得られた昆虫綱の配列中でも半数は陸生のチョウ類が得られるなど、水生昆虫の配列数は全体の 2.4%に止まった。この結果から、今後、同様の環境 DNA 解析を行う場合には水生昆虫を優先的に増幅する新たなユニバーサルプライマーを設計する必要があることが明らかとなった。

(2) 止水域由来の環境 DNA を利用した環境 DNA の流下距離の解明

ダム湖とその下流域から環境 DNA を抽出し、*Microcystis* sp. を対象とした DNA 濃度の測定を行なった結果、ダム湖から約 3-7 km の地点まで DNA 濃度が低下することが判明した。これはつまり、ダム湖で生産された DNA が流程に沿って分解されていたことを

意味する。この結果から、河川の環境 DNA から得られた情報は、DNA が採取された地点から上流約 3-7km までの結果が反映されていると考えられる。

一方で、調査河川が田畑などを流れてきた他河川や河川規模が異なる河川に合流することで、*Microcystis* sp. DNA の濃度は高まった。これは他流域からの流入や流速が小さく水質が悪化している地点で対象種が再生産の影響と予想される。

(3) 環境 DNA 抽出方法の検討

3 種の手法で DNA 抽出を行なった結果、タンパク質分解処理を行なった場合に、DNA 濃度が最も高くなった。水生昆虫を対象とした PCR をおこなった結果、タンパク質分解処理で PCR 産物が確認できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- 1) 八重樫 咲子, 細川 大樹, 渡辺 幸三, 河川水中の環境 DNA の次世代シーケンス解析を利用した水生昆虫の群集構造および生息個体数推定の可能性:従来型定量評価手法と比較して、土木学会論文集 G(環境), 73 巻, III_139 - III_147, 2017, 査読あり。
- 2) 八重樫 咲子, 泉 昂佑, 三宅 洋, 渡辺 幸三, 次世代シーケンス解析による瀬切れ河川の水生昆虫複数種を対象とした流域内交流パターンの網羅的評価, 土木学会論文集 G(環境), 72 巻, III_489 - III_496, 2016, 査読あり。

[学会発表](計 9 件)

- 1) ○村松 和十, 金子 栄廣, 平山 けい子, 八重樫 咲子, 環境 DNA を利用したヒゲナガカワトビケラの生息地検索, 第 45 回関東支部技術研究発表会, 山梨, 2018 年 3 月。
- 2) ○八重樫 咲子, 細川 大樹, 渡辺 幸三, 河川水中の環境 DNA の次世代シーケンス解析を利用した水生昆虫の群集構造および生息個体数推定の可能性:従来型定量評価手法と比較して, 第 54 回環境工学研究フォーラム, 岐阜, 2017 年 11 月。
- 3) ○八重樫 咲子, 渡辺 幸三, 河川水中の環境 DNA メタバーコーディングを利用した流域内の水生昆虫多様性調査, ELR 2017, 2017 年 9 月。
- 4) ○Joeselle SERRANA, Sakiko

YAEGASHI and Kozo WATANABE, Metabarcoding- based assessment of the influence of sediment bypass tunnels on the macroinvertebrate communities in dam-fragmented rivers, 4th Environmental Water Quality Engineering Symposium, Frontier Applied Science Research, Hokkaido, Japan, June 2017.

- 5) ○八重樫 咲子, 渡辺 幸三, 環境 DNA のメタバーコーディングによる水生昆虫の流域内種多様性の評価、第 4 回環境水質工学シンポジウム, 札幌, 2017 年 6 月。
- 6) ○Joeselle SERRANA, Sakiko YAEGASHI and Kozo WATANABE, Metabarcoding- based assessment of the influence of sediment bypass tunnels on the macroinvertebrate communities in dam-fragmented rivers, 2nd International Workshop on Sediment Bypass Tunnels, Kihada Hall, Uji Campus, Kyoto University Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011, Japan, May, 2017.
- 7) ○Sakiko YAEGASHI, Kozo WATANABE: Metabarcoding analysis of water environmental dna to reveal species diversity of aquatic insects using next generation sequencing, The Association for the Sciences of Limnology and Oceanography (ASLO) 2017 Aquatic Science Meeting, Honolulu, Hawaii, March, 2017.
- 8) ○八重樫 咲子, 泉 昂佑, 三宅 洋, 渡辺 幸三, 次世代シーケンス解析による瀬切れ河川の水生昆虫複数種を対象とした流域内交流パターンの網羅的評価, 第 53 回環境工学研究フォーラム, 2016 年 12 月。
- 9) ○八重樫 咲子, 渡辺 幸三, 河川水中に存在する DNA を活用した重信川の流域内水生昆虫種多様性解析, 応用生態工学会第 20 回大会, 2016 年 9 月。

6. 研究組織

- (1)研究代表者
八重樫 咲子 (YAEGASHI, Sakiko)
山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号: 30756648

- (2)研究分担者
なし

- (3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし