

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K13858

研究課題名（和文）環境DNAを利用した新たな水生昆虫種多様性解析手法の確立と季節変動の評価

研究課題名（英文）Comparison of environmental DNA detection methods and seasonal variation for aquatic insect communities

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、水生生物が水中に放出した環境DNAを利用した生物調査方法が開発された。特に次世代シーケンサーを利用したアンプリコン解析とDNAバーコーディングを組み合わせた網羅的な種多様性調査手法は新たな水圏生物調査手法として注目されている。この手法は魚類では研究開発が進む一方で、水質や流量調節などの人為的環境変化の指標生物となる水生昆虫を対象とした環境DNA研究は少ない。そこで本研究では水生昆虫を対象とした環境DNAバーコーディングの手法を検討し、環境DNA分析による水生昆虫の季節変動の調査を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境DNAを利用した水圏生物調査は採水とDNA分析をもとに行われることから、従来型の調査手法と比べて低労力かつ素早い調査手法として注目されている。この手法は魚類では多く研究開発が行われているが、人為的な水圏環境変化の指標生物として利用される水生昆虫では研究が不足している。そこで本研究では、環境DNAの濃縮方法やPCR手法など、より効果的に水生昆虫群集調査を行うことができる環境DNAのバーコーディング手法を検討した。

研究成果の概要（英文）：Environmental DNA (eDNA) is released into the water by aquatic animals and is employed for biodiversity surveys in an aquatic environment. Especially, the eDNA barcoding method that combines amplicon analysis by high-throughput DNA sequencer and DNA barcoding is getting attention as a new and easy method for surveying aquatic organisms. Although this method has been developed for fish communities, there are a few studies on aquatic insects, which are indicator organisms for anthropogenic disturbance such as water pollution and flow control. In this study, I examined the methods of eDNA barcoding for aquatic insects and investigated their seasonal variation by eDNA barcoding.

研究分野：土木環境システム

キーワード：水生昆虫 環境DNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水圏の生物多様性保全を目的として、河川水辺の国勢調査をはじめとする水生生物のモニタリングが活発に行われている。特にカゲロウ・カワゲラ・トビケラといった水生昆虫を含む底生動物は水質や流量コントロールなどの指標生物として様々な現場で調査が行われている。一般的な水生昆虫類の生物調査ではサンプリングネットなどを用いて生物採集を行い、形態に基づいて種を同定(形態同定)し、種多様性(例:種数、個体数)の情報を得る。しかし、この従来型の調査方法では、希少種など生息個体数の少ない生物の生息状況調査が難しい点、ひとつの調査地点から採集される水生昆虫種が大量(数十~数百)のため形態同定には長時間の作業とそれに伴う人件費を要する点、若齢個体や劣化標本など同定が困難な標本が存在する点、種の分類の研究が進んでいない未記載種が存在する分類群が多く、属・科レベルの粗い分類群同定に止まる場合がある点、などの問題が発生しやすい。

このような問題を受け、従来型の生物調査に変わり、水中に存在している DNA (環境 DNA) を利用した生物調査手法が注目を集めている。環境 DNA とは大気・水・土壌などの環境中に存在している DNA であり、水生生物から排泄などを通して体外に放出された DNA を含む。水中ではそこに生息する雑多な生物由来の環境 DNA が存在する。従って、この環境 DNA の由来を分析することで、そこに生息する生物の情報を得ることができる。

水中の環境 DNA を用いた網羅的な生物調査では、DNA メタバーコーディングが用いられている。この手法ではまず、調査対象地点で採水を行い、それを濾過することで水中に含まれていた環境 DNA を濃縮する。次に濾過物から様々な生物由来の DNA を抽出し、分析したい分類群(例:魚類、昆虫類、哺乳類)由来の DNA をユニバーサルプライマーで増幅する。続いて、ハイスループットシーケンサー(例: Illumina MiSeq)を用いてこの PCR 産物の DNA 塩基配列を一度に解読する。その後、得られた配列を、世界中から DNA 塩基配列情報を集めた 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種名を推定する(DNA バーコーディング)ことができる。

環境 DNA メタバーコーディングでは水生生物の種多様性情報を迅速かつ機械的に得ることができる。これまでに魚類を対象とした環境 DNA 分析では一般化されたマニュアルが広まり、実際の採集による生物調査との整合性が評価されてきた。その一方で、水生昆虫を対象とした場合には効果的な手法の開発やその有効性の評価が進んでいない。これは、水生昆虫用のユニバーサルプライマーでは昆虫由来の DNA のみだけを効果的に増幅することが難しく、藻類など昆虫 DNA 以外の DNA がかなり検出されてしまうこと、効果的に DNA を検出できる時期(例:繁殖期など)の調査が進んでいないこと、DNA の解読が行われていない分類群が多いために DNA バーコーディングの要となる DNA データベースが不足している点などが問題となっているためである。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、以下の点を目的として研究を行なった。

#### (1) 水生昆虫を対象とした効果的な環境 DNA の分析手法の検討

多くの環境 DNA 分析では孔径  $0.7\mu\text{m}$  のフィルターを利用して環境 DNA の濃縮が行われているが、これは魚類を対象とした分析で最適化されたものである。魚類よりも小型の水生昆虫ではよりさらに細かい孔径のフィルターを用いた方が効果的に DNA を濃縮できる可能性がある。一方で、水生昆虫の環境 DNA 分析では藻類やバクテリアなどの様々な DNA が検出されてしまい、昆虫 DNA の検出量が低下する問題もある。そこでまず、孔径の異なるフィルターを用いて濃縮して得られた環境 DNA の分析を行なった。

また、環境 DNA メタバーコーディングではユニバーサルプライマーを用いた PCR を行う。PCR で対象とする DNA 領域や PCR の手法の違いは、データベースの充実度や PCR 増幅に伴うバイアスの差によって検出できる水生昆虫種数に影響を与えることが予想される。そのため、これらの条件の比較を行なった。また、DNA の大量解析技術を利用した DNA データベース拡張手法の検討も行なった。

#### (2) 環境 DNA の季節変動に伴う変動の解析

環境 DNA から得られる水生昆虫種の季節変動を明らかにし、より多様な生物を検出できる採水時期を明らかにする。水生昆虫は成長段階に合わせて脱皮や営巣を行うことが知られている。これらの活動が活発な時期ほど環境 DNA が生成されることが予想される。また、台風による攪乱の影響が、水生昆虫の検出状況に与える影響を評価した。特にダムによる流量コントロールの影響を受けている地点と、ダムが存在しないために自然の出水環境を有する地点で検出される種を比較することで河川の安定性による検出状況の違いも明らかにした。

### 3. 研究の方法

#### 3-1 水生昆虫を対象とした効果的な環境 DNA の分析手法の検討

##### (1) 環境 DNA 濃縮手法の比較

山梨県内の河川で流心部の表層水を採水し、メンブレンフィルター（Mixed Cellulose Ester, ADVANTEC）で 500ml ずつ濾過した。ここではフィルターサイズによる環境 DNA の補足状況の違いを評価するため、フィルターの孔径サイズは 1.0 $\mu$ m, 0.65 $\mu$ m, 0.45 $\mu$ m, 0.20 $\mu$ m の 4 種類を用いた。また、濾過物のサイズによる種の検出状況の評価するため、1.0 $\mu$ m フィルターで濾過した濾過水を 0.6 $\mu$ m フィルターで濾過し（1.0-0.6 $\mu$ m 水）、0.6 $\mu$ m フィルターで濾過した濾過水を 0.4 $\mu$ m フィルターで濾過し（0.6-0.4 $\mu$ m 水）、最後に 0.4 $\mu$ m フィルターで濾過した濾過水を 0.20 $\mu$ m フィルターで濾過した（0.4-0.2 $\mu$ m 水）。これらの濾過フィルターは DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) の動物組織からの DNA 精製プロトコルに従って DNA を抽出した。その際、タンパク質の分解処理は 2 時間とした。その後、OneStep PCR Inhibitor Removal kit (Zymo Research)を用いて DNA の生成を行なった。

次に昆虫類のミトコンドリア DNA (mtDNA) の Cytochrome Oxidase I (COI) 領域を増幅するユニバーサルプライマーを用いて環境 DNA の PCR を行った。COI 領域は動物の種分類などの DNA 解析によく用いられている領域であり、他領域よりも DNA データベースが豊富な領域の一つである。PCR には Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolad)を用い、10 mM の BF2 primer および BR2 primer (Elbrecht & Leese, Front. Environ. Sci, 2017, 領域長: 421bp) をそれぞれ 5  $\mu$ l, 10 倍に希釈 DNA 5 $\mu$ l を加え、PCR グレード水で全量が 50  $\mu$ l 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、50°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 30 回行った。最後に、72°C で 5 分間の伸長反応を行い、4°C で保存した。えられた PCR 産物は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (TaKaRa) を用いて精製した。精製した PCR 産物の DNA 塩基配列はハイスループットシーケンサーで解読した。この操作は株式会社生物技研で委託した。ただし、0.4-0.2 $\mu$ m 水は PCR 産物が得られなかったことから DNA 配列の解読を行わなかった。

その後、得られたシーケンスデータの解析を行なった。まず Qiime2 を用いてプライマー配列を除去した。続いて Qiime2 の Dada2 パイプラインを用いてシーケンスクオリティの低い配列および解読領域の短い配列の除去、シーケンスデータの結合、キメラ配列の除去を除去し、代表配列を作成した。得られた代表配列に対して、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベース検索用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて相同性の高い DNA 配列を持つ種を検索した。

## (2)PCR 手法の比較

上記の 0.2 $\mu$ m フィルターで濾過して得られた環境 DNA を用いて、PCR サイクル数の調整（30 回、40 回）および PCR 回数の調整（最終容量 50 $\mu$ l の PCR を 1 回、最終容量 10 $\mu$ l の PCR を 5 回）をした PCR を行い、その後の水生昆虫種の検出状況の比較を行なった。PCR 方法とデータ解析方法は概ね 3-1(1)と同様である。最終容量 10 $\mu$ l の PCR は、上記の PCR 反応液の容量を全て 5 分の 1 として準備した。

また、COI 領域、16S rRNA 領域（16S）、Histon 3 領域（H3）を対象とした環境 DNA バーコーディングを行い、領域間の水生昆虫の検出状況を比較した。COI 領域の PCR は 3-1(1)と同様である。16S rRNA 領域は gInsect プライマー（株式会社生物技研が開発）を用いて、94°C で 2 分加熱した後、94°C で 30 秒、65°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 35 回行った。また、Histon 3 領域は hexAR&hexAF (Ogden & Whiting, Cladistics, 2003) プライマーを用いて、94°C で 2 分加熱した後、50°C で 30 秒、65°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 30 回行った。その後のデータ解析方法は 3-1(1)と同様である。

## 3-2 季節変動に伴う環境 DNA からの水生昆虫の検出状況の評価

2018 年から 2020 年にかけて釜無川本川および支流の塩川流域の上下流の 4 地点から採水した河川水 500ml を採水した。塩川は地点間に塩川ダムを有するが、釜無川ではダムが存在しない。調査期間中の 2019 年 10 月には台風 19 号による大規模な出水が観察された。それぞれの河川水を 0.2 $\mu$ m フィルターで濾過し、3-1 の手順で環境 DNA の DNA バーコーディングを行なった。

## 4. 研究成果

### 4-1 水生昆虫を対象とした効果的な環境 DNA の分析手法の検討

#### (1) 異なる濾過フィルターを用いた水生昆虫 DNA の検出

どの条件を用いた場合でも得られた配列のほとんど全てが水生昆虫以外の DNA 由来となり、水生昆虫の配列は数百配列のみであった。その中で得られた種数は全 24 種であった。最も多くの種が得られた条件は 1.0 $\mu$ m フィルターを用いた場合であり、16 種が得られた。0.65 $\mu$ m フィルター、0.45 $\mu$ m フィルター、0.20 $\mu$ m フィルターを用いた場合はそれぞれ 7, 8, 7 種であった。これは孔径の大きなフィルターを用いたことで微細な藻類やバクテリアなどの DNA や PCR 阻害物質が減少したため、多様な昆虫由来の DNA が検出しやすくなったためと考えられる。その一方で、10 $\mu$ m フィルターでは検出できなかったがより細かいフィルターで検出できた種は 8 種存在した。これらは掘潜型や匍匐型の生物である傾向があり、これらの種の DNA は表層水に出てきにくかった可能性がある。しかしながら、別種で同様の生活型の種が 10 $\mu$ m フィルターで検出できていることから、必ずしも生活型に依存しない可能性もある。この点については今後も検討す

べき課題である。

#### (2) 濾過水からの水生昆虫 DNA 検出

1.0-0.6 $\mu\text{m}$  濾過水および 0.6-0.4 $\mu\text{m}$  濾過水の両者ともに、得られた水生昆虫由来の DNA の配列数は数十配列にとどまった。1.0 $\mu\text{m}$  フィルターでは 16 種が得られたが、1.0-0.6 $\mu\text{m}$  濾過水では 7 種、0.6-0.4 $\mu\text{m}$  濾過水では 3 種が得られた。1.0-0.6 $\mu\text{m}$  濾過水で得られた 7 種は 1.0 $\mu\text{m}$  フィルターから得られた種とは完全に独立していた。また、0.6-0.4 $\mu\text{m}$  濾過水のみで得られた種は 1 種存在した。より細かいフィルターで得られた種は比較的小型の種(例:ユスリカ科、コカゲロウ科)が多かったことから、彼らの DNA は荒いフィルターでは回収しにくかった可能性がある。またこう言った小型種は環境 DNA の排出量も少ないことが予想されるが、孔径の大きなフィルターで一度濾過したことで多くの有機物が取り除かれ、より存在量の少ない生物由来の DNA が検出できた可能性がある。

#### (3) PCR 条件の検討

サイクル数 30 回の場合に 7 種、40 サイクルでは 1 種の水生昆虫種が検出された。サイクル数が高いほど非特異的 PCR 増幅産物の割合が高まり、水生昆虫種が得られない結果となった。非特異的増幅が顕著なプライマーではサイクル数を下げる方が、対象種を多く検出できると考えられる。

また、PCR 回数を 5 回行なったものでは 7 種が検出された。この 7 種のうち 2 種は PCR 回数が 1 回のもでも検出された。魚類の環境 DNA 分析では 4 回分程度の独立した PCR 産物を混合してバーコーディングすることで、より多くの種を検出する手法がよく用いられる。今回の結果では PCR の回数が増えても種数は増加しなかったが、ほとんど異なる種が検出された。水生昆虫種の場合は魚類よりも多くの独立した PCR 回数を増やさなければ偏りのある結果が得られることとなる可能性がある。

#### (4) PCR 領域の比較

本研究対象となった採水地点では、河川でよく見られる 4 目(カゲロウ・カワゲラ・トビケラ・ハエ)では 29 科が採集されている。そのうち COI 領域では 8 科、16S 領域では 9 科、H3 領域では 10 科が得られた。3 領域合わせて 19 科が得られた。比較的カゲロウ目はどの領域でも検出されやすい傾向にあった。また H3 領域ではカワゲラ目がよく検出できた。領域により検出効率に差があることから、複数領域を合わせた解析でより多くの種を検出できるようになると考えられる。しかし一方でトビケラ目はどの領域でも検出しにくい傾向にあった。これは DNA バーコーディングの基本となる DNA データベースが少ないことや、PCR バイアスに起因する可能性がある。

#### 4-2 節変動に伴う環境 DNA から水生昆虫の検出状況の評価

いずれのサンプルでも水生昆虫 DNA の検出量は少なく、全体を通して 13 種が確認された。実際に採集された水生昆虫種数と比べると半数にも満たない状況であった。これは環境 DNA 分析時にバクテリアや藻類由来の DNA が多く得られてしまったことに起因する。そのため、特定種の検出状況の季節変動を追うことは難しかった。今後は、これらの DNA 増幅を抑えるプロッキングプライマーの併用、より特異性の高い PCR 開発の開発などが必要となる。

台風が通過する前の 2018 年 11 月と台風通過後の 2019 年 11 年を比較すると、2018 年には水生昆虫が 8 種検出されていたが 2019 年には 2 種まで低下した。これは台風による攪乱で水生昆虫の生息数が大きく低下したためと考えられる。その後の回復過程を見ていくと、釜無川の上流域では 2020 年 11 月まで水生昆虫が検出されなかった。その一方で、塩川流域では数種が検出されていた。これはダムが存在することで、流量の安定化やダムからの栄養塩の供給が水生昆虫の増加に寄与したためと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yaegashi Sakiko, Omura Tatsuo, Watanabe Kozo	4. 巻 12
2. 論文標題 Spatial genetic structure of the invasive tree Robinia pseudoacacia to determine migration patterns to inform best practices for riparian restoration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AoB PLANTS	6. 最初と最後の頁 plaa043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/aobpla/plaa043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tahir Mohd Saifu Farhan Bin, Sakiko Yaegashi, Hidehiro Kaneko, Hirokazu Haga	4. 巻 22
2. 論文標題 The effect of storm event on detection the species diversity of insects using environmental DNA meta-barcoding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the 22nd IAHR-APD Congress 2020	6. 最初と最後の頁 3-1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakiko YAEHASHI, Kozo WATANABE, Michael T. MONAGHAN, Tatsuo OMURA	4. 巻 12
2. 論文標題 GENETIC STRUCTURE AND GENE FLOW BETWEEN ALTITUDINALLY ISOLATED POPULATIONS OF STENOPSYCHE MARMORATA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 12th International Symposium on Ecohydraulics	6. 最初と最後の頁 S1-5-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 八重樫咲子・細川大樹・渡辺幸三
2. 発表標題 環境DNAバーコーディング解析を用いた河川水生昆虫の種多様性の解明 高知県四万十川を例として
3. 学会等名 応用生態工学会第23回広島大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石谷直渡・八重樫咲子・Joeselle M. S・Somar I. F.・渡辺幸三
2. 発表標題 四万十川と仁淀川の環境DNA及び底生動物群集のメタバーコーディング解析
3. 学会等名 応用生態工学会第23回広島大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八重樫咲子
2. 発表標題 環境DNAを利用した水生昆虫調査
3. 学会等名 第43回水生昆虫研究会岐阜・恵那大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八重樫咲子、新井涼介、金子栄廣
2. 発表標題 山梨県富士川水系における水生昆虫の流域内種多様性の評価
3. 学会等名 環境工学研究フォーラム講演集
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tahir Mohd Saifu Farhan Bin, Sakiko Yaegashi, Hidehiro Kaneko, Hirokazu Haga
2. 発表標題 Investigating the effect of storm on estimating aquatic insect community in water stream using environmental DNA
3. 学会等名 第47回関東支部技術研究発表会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金子 栄廣・有賀 廣弥・八重樫 咲子
2. 発表標題 塩川ダムによる河川環境の変化が水生昆虫群集に与える影響
3. 学会等名 第47回関東支部技術研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新井涼介、清水隆二、金子栄廣、八重樫咲子
2. 発表標題 ダムによる流量変化が水生昆虫種多様性にもたらす影響の評価
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水隆二、新井涼介、金子栄廣、八重樫咲子
2. 発表標題 山梨県内におけるヒゲナガカワトビケラの集団遺伝特性の解析
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八重樫咲子、清水隆二、村松和十
2. 発表標題 マイクロサテライトマーカーを利用した環境DNAの種特異的PCRによる水生生物の生息域検索
3. 学会等名 応用生態工学会第22回東京大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakiko YAEGASHI, Kozo WATANABE, Michael T. MONAGHAN, Tatsuo OMURA
2. 発表標題 GENETIC STRUCTURE AND GENE FLOW BETWEEN ALTITUDINALLY ISOLATED POPULATIONS OF STENOPSYCHE MARMORATA
3. 学会等名 12th International Symposium on Ecohydraulics (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakiko YAEGASHI, Kazuto MURAMATSU
2. 発表標題 The search for the Habitats of Aquatic Caddisfly <i>Stenopsyche marmorata</i> (Trichoptera) from Environmental DNA using Species-specific Microsatellite Markers
3. 学会等名 The Water and Environment Technology Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八重樫咲子、村松和十
2. 発表標題 環境DNAを利用した水生昆虫の生息域検索
3. 学会等名 第5回環境水質工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学 教員情報検索 <a href="http://nerdb-re.yamanashi.ac.jp/Profiles/338/0033748/profile.html">http://nerdb-re.yamanashi.ac.jp/Profiles/338/0033748/profile.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------