

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12273

研究課題名(和文) 湖沼生態系への温暖化対策の影響解明に向けた環境DNAによる新たな評価手法の構築

研究課題名(英文) Development of a new assessment method using environmental DNA to elucidate the impact of global warming countermeasures on lake ecosystems

研究代表者

槻木 玲美 (Tsugeki, Narumi)

松山大学・法学部・教授

研究者番号：20423618

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)：環境DNAの解析技術を琵琶湖の堆積試料に応用し、魚類の重要な餌資源でありながら、従来の手法では過去情報を得るのが困難であった動物プランクトンのカイアシ類とミジンコ類を復元するための手法を検討した。その結果、カイアシ類の堆積試料中のDNAは、過去100年にわたり連続的に検出され、時代に応じて濃度が変化していた。DNA濃度の変化が何を意味するのか、現場観測の結果と比較したところ、カイアシ類では現存量をミジンコ類は休眠卵量を反映することが判明した。これらの結果は堆積試料のDNAは、動物プランクトンの長期動態を捉える有効なツールになりえること、ただし種ごとに復元できる生物特性が異なることを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

堆積試料に残る環境DNA(堆積物DNA)の活用は、これまで得られなかった過去の生物相を含めた生態系変化の実態解明につながるもので、過去から現在を俯瞰する新たなモニタリング手法としての展開が期待される。本課題は、従来の古生物学的手法では過去情報が得られなかった魚類の餌資源として重要な動物プランクトンのカイアシ類について、堆積物DNAを活用することで現存量を捉えるツールとしての有効性を示し、本分野の進展に大きく貢献した。またミジンコ類に関しては、休眠卵量の変遷を迅速かつ簡便に捉えられることを示し、堆積物DNAによる動物プランクトンの新たなモニタリング手法の実現可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We applied environmental DNA (eDNA) techniques to sediment samples in Lake Biwa to reconstruct the historical dynamics of copepods (*Eodiaptomus japonicus*) and *Daphnia* (*Daphnia galeata*, *D. pulex*), which are important zooplankton as key food resources for fish but their long-term dynamics over several decades remains largely limited due to the lack of long-term monitoring data. Copepod eDNA in the sediments (sedDNA) was continuously detected over the past 100 years, with concentrations varying over time. The sedDNA concentration correlated significantly with in situ production, biomass but not with resting eggs or specific growth rate. While *Daphnia* sedDNA concentrations correlated significantly with their resting egg production rather than the biomass. These results provide evidence that zooplankton sedDNA can be an effective tool for tracking past population dynamics while biological information for the reconstructed sedDNA concentrations differs among species.

研究分野：水域生態学

キーワード：堆積物DNA 動物プランクトン 琵琶湖 過去100年 遺伝的多様性 外来種 植物プランクトン 古陸水学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の進行で懸念される、昨今の極端な大雨の増加により、湖沼は洪水リスクを軽減するための水位操作が実施されている(Klijn et al., 2012)。一方で、水位操作は、湖岸帯や浅瀬に生息する生き物に影響を与えることが知られ(Wantzen et al., 2008)、浅瀬に卵を産む魚類への深刻な影響が報告されている。日本最大の湖である琵琶湖では、1992 年から水位上昇を低減するための水位操作が実施され、湖岸の浅瀬を産卵場として利用する魚類の卵の干出を引き起こし、魚類資源の減少を誘引したと言われている(Yamamoto, Kohmatsu & Yuma, 2006)。水位操作による魚類への影響は、食う—食われる関係を通じ餌生物にも影響がおよび、生態系全体に影響を与えている可能性がある。しかしながら、我が国を代表する琵琶湖でも、30 年以上の長期にわたって魚類の餌となる動物プランクトンのデータを欠損なく連続的に取得するのは困難で、長期的観点から、水位操作等の環境変化が琵琶湖生態系に与えた影響を評価できない状況にある。

2. 研究の目的

そこで本研究は、目覚ましい進展を遂げる環境 DNA 解析技術を堆積試料に応用し、魚類の重要な餌資源でありながら、従来の遺骸ベースの古生物学的手法では過去情報を得るのが困難であった動物プランクトンのカイアシ類やプランクトンに寄生する真菌類を含む真核生物の長期動態を高精度に復元し、水位調節等の環境変化が琵琶湖生態系にどのような影響を与えてきたのかを明らかにすることを目的とし、解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、まず堆積試料に残る環境 DNA、つまり堆積物 DNA から動物プランクトンの長期動態の復元を明らかにする手法開発を行った。琵琶湖の主要な動物プランクトンである、カイアシ類のヤマトヒゲナガケンミジンコ (*Eodiaptomus japonicus*)、ミジンコ類のカプトミジンコとプリカリアミジンコ (*Daphnia galeata*, *Daphnia pulicaria*) を対象に、各種に特異的なプライマーを開発し、開発したプライマー・プローブセットを用いて定量 PCR の解析を行った。そして、過去 100 年にわたる各種の堆積物 DNA 濃度の変化を明らかにした。定量 PCR の分析では、人工遺伝子を用いた標準曲線を 5,000、500、50、5 copies per PCR reaction ($n = 4$) の希釈系列を採用し、全ての試料とネガティブコントロール試料について 4 レプリケートで行った。また DNA 抽出時のネガティブコントロールから DNA が検出されないことを確認した。定量 PCR の増幅産物が対象種と一致することを確認するため、ダイレクトシーケンス解析を実施した。その他、抽出サンプルに含まれる PCR 阻害物質による影響を評価するために分析試料全てを対象に、スパイクテストを実施した。スパイクテストは、PCR の阻害影響評価等に使用する目的で開発された鋳型 DNA (Internal Positive Control, IPC) を標準 DNA として使用した。

また各種の堆積物 DNA 濃度の変化が何を反映するのかを解明するため、ヤマトヒゲナガケンミジンコでは、滋賀県水産試験場が実施してきた琵琶湖の定期観測サンプルに基づく、現存量や生産量・比増殖速度・急発卵・休眠卵と DNA 濃度との関係を解析した。ミジンコ類に関しては、現存量・休眠卵量を反映する遺骸・休眠卵数と堆積物 DNA 濃度を比較した。また堆積試料に残る DNA が間隙水を通じて、鉛直拡散する可能性があるのかを検証するため、堆積試料を 10000×G, 4℃で 15 分間の遠心分離を行うことで、残渣堆積物と間隙水に分離して、残渣堆積物と間隙水、両方について DNA 濃度を分析した。

なお、本研究で用いた堆積試料は、グラビティーコアラーを用いて 2017 年 8 月に北湖の安曇川沖で試料 4 本 (LB1、LB2、LB4、LB7) と 2019 年 8 月に今津沖で採取した試料 2 本 (IM1、IM8)

である(図1)。採取した長さ 30 cm以上の試料は、厚さ 1cm 間隔でスライスし、各層から湿重量 9g を採取し、アルカリ抽出・エタノール沈殿後の沈殿物について、DNeasy Power Soil Kit (QIAGEN 社製)を用いて DNA 抽出・精製を行った。堆積物の年代は、 ^{210}Pb の constant rate of supply (CRS) モデルに基づいて年代を推定した。

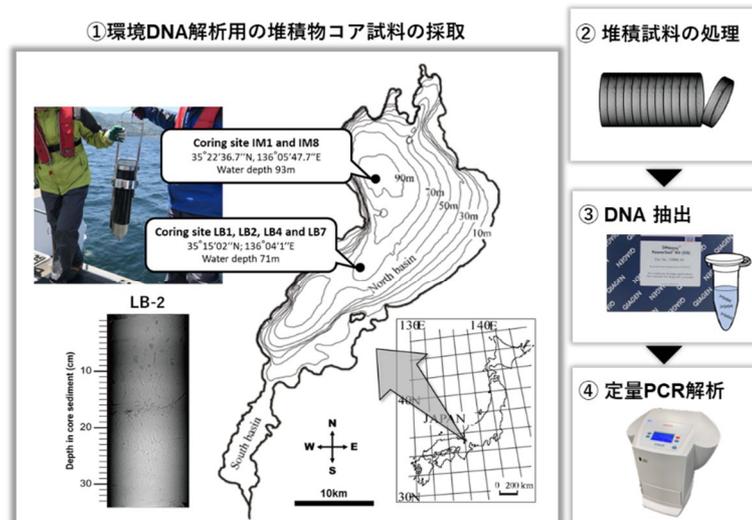


図1. 調査地と分析手順の模式図。堆積試料の採取箇所・試料写真(①)および処理手順(②~④)

4. 研究成果

琵琶湖の主要な動物プランクトンであるカイアシ類のヤマトヒゲナガケンミジンコやミジンコ類のカプトミジンコ・プリカリアミジンコを対象に、堆積試料中の環境 DNA を分析した所、各種の DNA が過去 100 年前の堆積試料からも検出されること、時代により、濃度が大きく変化することを明らかにした。ヤマトヒゲナガケンミジンコでは、分析した全ての堆積層から、本種の DNA が連続的に検出され、その濃度は富栄養化が進行する 1970 年代に一時的に急増するが、その後、低濃度が維持され、再び 1990 年頃より 2010 年頃まで増加していることを突き止めた(Nakane et al., 2023; Freshwater Biology)。堆積試料に残る DNA 濃度の変化が何を反映するのかを解明するため、現場観測サンプルの観察に基づく現存量・生産量・比増殖速度・急発卵・休眠卵との対応関係を解析したところ、堆積層中の DNA 濃度は、生産量、現存量、急発卵と有意な正の相関関係を示していることを見出した(Nakane et al., 2023)。つまり、堆積物に残る DNA 濃度が当時のカイアシ類の現存量を反映している可能性が高いことを示した。

一方、ミジンコ類は、対象とした 2 種共に堆積試料中の DNA 濃度が、当時の現存量ではなく、休眠卵量を反映する可能性が高いことを見出した(Tsugeki et al., 2022; Scientific Reports)。つまり、環境 DNA の分析を堆積試料へ適用することで、ミジンコ類では、産卵(休眠卵)量を、より簡便に把握できる可能性を、またカイアシ類では生産量や現存量の長期動態を捉える有効なツールになりえることを示した(Tsugeki et al., 2022, Nakane et al., 2023)。

また間隙水を介した堆積後の DNA の鉛直拡散の可能性について検討するため、間隙水と残渣堆積泥に含まれる DNA を分析した。その結果、間隙水から、ヤマトヒゲナガケンミジンコの DNA は検出されなかった(Table 1, Nakane et al., 2023)。一方、残渣の堆積泥からは、高濃度の DNA が検出された。ミジンコ類に関しても同様の結果が得られたことから(Tsugeki et al., 2022)、堆積試料の DNA は、間隙水を通して鉛直移動することは考えにくいことが判明した。つまり、各種の DNA 濃度の堆積年代に応じた変化は、堆積後の攪乱による鉛直移動では説明がつかないと考えられた。

表1. 琵琶湖堆積試料の間隙水と残渣泥のヤマトヒゲナガケンミジンコのDNA濃度。
Nakane et al 2023 *Freshwater Biology* (<https://doi.org/10.1111/fwb.14096>)のTable 1を改変して引用

Sample ID (estimated age in sample depth and its age error; yr)	Core depth		間隙水 (mean copies g ⁻¹ dry)	SD	Detection / total replicates	残渣泥 (mean copies -1g dry)	SD	Detection / total replicates
	Top (cm)	Bottom (cm)						
LB17-5-3 (2014 ± 0.1)	2	3	ND	-	0/4	725030	98992	4/4
LB17-5-11 (1994 ± 1.3)	10	11	ND	-	0/4	2665	608	4/4
LB17-5-20 (1964 ± 9.3)	19	20	ND	-	0/4	12	21	1/4

本研究では、上述の定量 PCR の解析以外に、メタバーコーディング解析も実施し、琵琶湖の過去 100 年にわたる真核生物の変遷を明らかにした。これら真核生物の変遷に、どのような環境要因が影響を及ぼした可能性が高いのかを検討した結果、水位操作や栄養塩濃度が大きな影響を与えた可能性が高いことを支持する結果が得られた（投稿中）。

さらに本研究は、基礎生産と魚類資源をつなぐ琵琶湖生態系の鍵を握る生物ともいえる、外来種のプリカリアミジンコについて、なぜ 1990 年代頃に侵入し、その後、定着できたのか、堆積試料の解析やプランクトン食魚類の漁獲データを用いて、捕食者・競争関係にあるミジンコ種との関係、侵入時からの遺伝的多様性を含めた多角的観点から、侵入成功の要因を検証した。その結果、本種の定着を可能にしたのは、主要な捕食者であるプランクトン食魚類の減少に起因する可能性が高いことを見出した(Tsugeki *et al.*, 2024; *Hydrobiologia*)。

これらの結果から、琵琶湖は富栄養化問題が収束した 1990 年代以降もさらなる栄養塩濃度の変化や水害リスクの管理を目的に実施されている水位操作により、魚類だけでなく、生物相全体が変化し続けていることが明らかとなった。

< 引用文献 >

Klijn F., De Bruijn K.M., Knoop J. & Kwadijk J. (2012). Assessment of the Netherlands' flood risk management policy under global change. *Ambio* 41, 180–192. <https://doi.org/10.1007/s13280-011-0193-x>

Nakane K., Liu X., Doi H., Dur G., Kuwae M., Ban S., Tsugeki N. (2023). Sedimentary DNA can reveal the past population dynamics of a pelagic copepod. *Freshwater Biology* 68, 1917–1928. <https://doi.org/10.1111/fwb.14096>

Tsugeki N., Hashimoto I., Nakane K., Honjo M.N. & Uchii K. (2024). Establishment success of alien *Daphnia* in the ancient Lake Biwa: insights from sedimentary archives. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-024-05519-0>

Tsugeki N., Nakane K., Doi H., Ochi N. & Kuwae M. (2022). Reconstruction of 100-year dynamics in *Daphnia* spawning activity revealed by sedimentary DNA. *Scientific Reports* 12, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03899-0>

Wantzen K.M., Rothhaupt K.O., Mörtl M., Cantonati M., G.-Tóth L. & Fischer P. (2008). Ecological effects of water-level fluctuations in lakes: An urgent issue. *Hydrobiologia* 613, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9466-1>

Yamamoto T., Kohmatsu Y. & Yuma M. (2006). Effects of summer drawdown on cyprinid fish larvae in Lake Biwa, Japan. *Limnology* 7, 75–82. <https://doi.org/10.1007/s10201-006-0172-2>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kai Nakane, Xin Liu, Hideyuki Doi, Gael Dur, Michinobu Kuwae, Syuhei Ban, Narumi Tsugeki	4. 巻 68
2. 論文標題 Sedimentary DNA can reveal the past population dynamics of a pelagic copepod	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Freshwater Biology	6. 最初と最後の頁 1917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/fwb.14096	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 Barouillet Cecilia, Monchamp Marie Eve, Bertilsson Stefan, Brasell Katie, Domaizon Isabelle, Epp Laura S., Ibrahim Anan, Mejbil Hebah, Nwosu Ebuka Canisius, Pearman John K., Picard Mailys, Thomson Laing Georgia, Tsugeki Narumi, Von Eggers Jordan, Gregory Eaves Irene, Pick Frances, Wood Susanna A., Capo Eric	4. 巻 68
2. 論文標題 Investigating the effects of anthropogenic stressors on lake biota using sedimentary DNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Freshwater Biology	6. 最初と最後の頁 1799-1817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/fwb.14027	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 該当する

1. 著者名 Tsugeki Narumi, Nakane Kai, Doi Hideyuki, Ochi Natsuki, Kuwae Michinobu	4. 巻 12
2. 論文標題 Reconstruction of 100-year dynamics in Daphnia spawning activity revealed by sedimentary DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-03899-0	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 Tsugeki Narumi, Hashimoto Isana, Nakane Kai, Honjo Mie N., Uchii Kimiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishment success of alien Daphnia in the ancient Lake Biwa: insights from sedimentary archives	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hydrobiologia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10750-024-05519-0	査読の有無 有
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 Yamamoto Shinya, Kuwae Michinobu, Tsugeki Narumi, Tani Yukinori	4. 巻 850
2. 論文標題 Implication of atmospheric nutrient inputs and warming effects for the ecosystem of Lake Yamanaka, Japan, revealed by sedimentary analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hydrobiologia	6. 最初と最後の頁 1487 ~ 1501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10750-022-05071-9	査読の有無 有
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 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 中根 快, リュウ キン, 土居 秀幸, 伴 修平, デュア・ガエル, 加 三千宣, 槻木 玲美
2. 発表標題 堆積物DNAに基づくカイアシ類の長期変動に関する研究
3. 学会等名 日本陸水学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 槻木 玲美, Eric Capo, 越智 梨月, 鏡味 麻衣子, 土居 秀幸, 早川 和秀, 加 三千宣
2. 発表標題 堆積物記録から復元された琵琶湖の動・植物プランクトン動態 : 水位管理・気象と栄養塩変化の影響
3. 学会等名 日本陸水学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田雅之, 槻木 玲美, 加 三千宣, 土居 秀幸, 源 利文
2. 発表標題 堆積物環境DNAによる琵琶湖魚類の過去復元
3. 学会等名 日本陸水学会 第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sakata M. K., Tsugeki N., Kuwae M., Doi H., Minamoto T.
2. 発表標題 Environmental DNA in lake sediment provides fish information on reconstructing past fauna in lake ecosystems.
3. 学会等名 British Ecological Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中根快, 土居秀幸, 越智梨月, 加三千宣, 槻木玲美
2. 発表標題 堆積物DNAにより復元された動物プランクトンの過去100年にわたる産卵量の変動
3. 学会等名 環境DNA学会 第4回
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 槻木玲美, 中根 快, 土居 秀幸, 加 三千宣
2. 発表標題 堆積物DNAにより復元されたミジンコの過去100年にわたる産卵量の変動
3. 学会等名 日本生態学会第69回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eric Capó, Stefan Bertilsson, Kai Nakane, Maiko Kagami, Michinobu Kuwae, Narumi Tsugeki
2. 発表標題 Environmental-driven changes in the microbial eukaryotic community of Lake Biwa over the last 120 years
3. 学会等名 Joint Aquatic Science Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Narumi Tsugeki, Kai Nakane, Xin Liu, Hideyuki Doi, Gael Dur, Michinobu Kuwae, Syuhei Ban
2. 発表標題 Sedimentary DNA can reveal past pelagic copepod population dynamics
3. 学会等名 XXI INQUA Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Narumi Tsugeki, Kai Nakane, Hideyuki Doi, Kazuaki Tadokoro, Michinobu Kuwae
2. 発表標題 Zooplankton sedimentary DNA as an effective tool for tracking past population dynamics
3. 学会等名 The eDNA Society International Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鏡味麻衣子
2. 発表標題 琵琶湖から広がる泳ぐカビの世界：ツボカビの謎に迫る
3. 学会等名 第22回 生態学琵琶湖賞授賞式および受賞記念講演 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Duangmany Phongsa, Tatsuro Hashizume, Kensuke Seto, Ban Syuhei, Kagami Maiko
2. 発表標題 Role of saprotrophic chytrids on two large desmids (Staurastrum and Micrasterias) in Lake Biwa
3. 学会等名 日本陸水学会第87回
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鏡味麻衣子
2. 発表標題 泳ぐカビの世界：ツボカビの謎に迫る
3. 学会等名 明治大学科学技術研究所 公開講演会「パラサイト；生態系の舞台裏」（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Environmental-driven changes in the microbial eukaryotic community of Lake Biwa over 120 years</p> <p>https://www.researchgate.net/publication/360484687_Environmental-driven_changes_in_the_microbial_eukaryotic_community_of_Lake_Biwa_over_the_last_120_years</p>
--

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
研究分担者	鏡味 麻衣子 (Kagami Maiko) (20449250)	横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授 (12701)	
研究分担者	土居 秀幸 (Doi Hideyuki) (80608505)	京都大学・情報学研究所・教授 (14301)	
研究分担者	本庄 三恵 (Honjo Mie) (30450208)	京都大学・生態学研究センター・准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	加 三千宣 (Kuwaie Michinobu) (70448380)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授 (16301)	

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			
スウェーデン	Umea University			