

令和元年6月20日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02380

研究課題名(和文)次世代型生態系観測技術の確立と湖沼生態系への適用

研究課題名(英文) Establishment and application to lake ecosystem of next generation monitoring system

研究代表者

高村 典子 (Takamura, Noriko)

国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・フェロー

研究者番号：80132843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：霞ヶ浦に出現する動植物プランクトン種を対象に、その形態と遺伝子情報の対応付けを終了させ、各タクサの形態計測による存在量(細胞体積、個体数)とDNA塩基配列数との間に相関関係を確認した。次に、以上のDNA情報を活用したプランクトン食魚の消化管内容解析による生物間相互作用の解明、ならびに湖水を対象としたメタバーコーディング解析結果を用いた生態系の時系列変化の動態解析を実施した。また、CCM法による因果関係解析を行い「栄養塩 一次生産量、ワムシ類・ケンミジンコ類」のボトムアッププロセスが、プランクトン食魚の資源量を支える重要なメカニズムとして機能している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では最新の生物観測技術(次世代DNA シーケンス技術・安定同位体技術)とデータ解析技術(因果関係推定解析)を活用することで、野外生態系調査から得られる生物間相互作用ネットワーク情報を飛躍的に増加させる「次世代生態系観測技術」を確立した。特に、次世代DNA シーケンス技術を活用し、生物分類および生物間相互作用情報の取得を大幅に簡便化することで、高精度かつ高解像度の生物間相互作用ネットワーク情報を経時的に取得することが可能となった。それにより、湖沼生態系管理のための情報基盤を大きく進展させることができたため、今後、生態系の長期動態データの蓄積が生み出す生態系理解の深化が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We developed a reference database for DNA metabarcoding analyses (MA) in Lake Kasumigaura. We also examined the relationships between the number of DNA sequences of target plankton taxa, and their abundance, and found significant positive correlations between them. This suggests eDNA MA is applicable to quantitative assessments for the target organisms. By using the reference database, we conducted a high-resolution gut content analysis of a commercially important planktivorous fish species and revealed that its dietary interactions with the prey organisms were highly dynamic seasonally. Further, we demonstrated the eDNA MA is useful to quantify the temporal dynamics of the whole planktonic community. We also applied a convergent cross-mapping to long-term monitoring data elucidating that bottom-up linkages between nutrients, primary production, and rotifers and cyclopoids may be a key mechanism supporting high planktivorous fish abundance in hypereutrophic lakes.

研究分野：陸水生態学

キーワード：生態系観測 メタバーコーディング 生物多様性 湖沼生物モニタリング 因果関係推定解析 湖沼生態系 食物網 霞ヶ浦

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生態系を構成する生物は、生態系内の物質・エネルギー流を担う実体であり、生態系の動態や機能を規定する存在である。しかし、従来の野外生態系の生物間相互作用ネットワーク情報には、技術的あるいは調査労力の限界のために、生態系を構成する生物の分類の解像度がしばしば低い、生態系を構成する生物間の相互作用に関する情報が十分に得られない、生物間相互作用ネットワークの時系列変化(動態)に関する情報が得られないという、同時に解決することが難しい3つの問題点があった。

2. 研究の目的

本研究では最新の生物観測技術(次世代DNA シーケンス技術・安定同位体技術)とデータ解析技術(因果関係推定解析)を統合的に活用することで「次世代型生態系観測技術」を確立し、これまで成し得なかった上記の問題点の同時解決に道を拓くことを目指す。特に、次世代DNA シーケンス技術を活用し、野外生態系における生物分類および生物間相互作用情報の取得を大幅に簡便化することで高精度かつ高解像度の生物間相互作用ネットワーク情報を経時的に取得することを可能にする。本技術を霞ヶ浦長期生物モニタリングに活用し湖沼生態系管理のための情報基盤を大きく進展させる。

3. 研究の方法

(1) 生物種の高解像度分類技術の確立にむけた基盤整備

植物プランクトン種を対象に、次世代シーケンサー解析を行う際のリファレンス配列取得のため、霞ヶ浦の湖水からマイクロピペット法で新規培養株を確立し、確立した培養株についてDNA抽出を行い、ミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子および核 18S rRNA 遺伝子配列のほぼ全長をPCR増幅し、サンガー法または次世代シーケンサーにより塩基配列を取得した。出現種数が多く近縁種が同時に出現する珪藻類は、18S rRNA の塩基配列では必要となる種レベルの精度がないため、葉緑体 rbcL 遺伝子の塩基配列を取得した。

動物プランクトン(橈脚類・枝角類・輪虫類)について、単離した個体からDNAを抽出し、ミトコンドリア COI 遺伝子、核 18S および 28S rRNA 遺伝子についてサンガー法で塩基配列を取得した。魚類と底生無脊椎動物の各個体から抽出したDNAについて、COI と 18S rRNA、加えて魚類のみミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子の塩基配列をサンガー法で取得した。

(2) 次世代型生態系観測技術活用の試行

2-1 メタバーコーディングによる生態系動態モニタリング

植物プランクトンの高解像度群集構造を明らかにするため、湖水を濾過しDNA抽出を行い、得られたDNAを用いて、シアノバクテリアを対象とした16S rRNA および真核藻類を対象とした18S rRNA の部分塩基配列のPCR増幅を行い、次世代シーケンサーを用いて配列を取得した。36カ月のシアノバクテリア・真核藻類の配列に基づき、霞ヶ浦で検出される分類群の動態をクラスタ解析で分類し、その特徴を明らかにした。

2-2 メタバーコーディングによる生物間相互作用の定量化

霞ヶ浦の主要なプランクトン食魚であるワカサギに着目し、投網によるワカサギの捕獲を行い個体ごとに消化管内容物のDNAを抽出した。個体ごとに筋肉組織も採取し炭素・窒素安定同位体を分析した。同時に動物プランクトンを採集し、エタノールで固定後、湖水環境DNAを抽出し、別途、顕微鏡による形態同定も行った。

得られた DNA について、動物の COI の部分塩基配列を増幅するプライマーを用いた PCR 増幅を行い、PCR 産物に対して次世代シーケンサーによるメタバーコーディング解析を行った。消化管 DNA については、ワカサギの COI 塩基配列の増幅を妨げるために、本研究のために新たに設計したプロッキングプライマーを用いて PCR 増幅を行った。得られた塩基配列情報のうち、消化管内容物は各 5 万リード、湖水環境 DNA は各 2 万リードについて分類情報を解析した。分析に際しては、本研究で新たに実施した DNA 基盤の整備で得られた情報も活用した。

ワカサギの採集時期や相対的な体のサイズ、肥満度が消化管内の生物構成に与える影響を冗長性解析 (RDA) とパーミュテーション検定によって調べた。さらに、ワカサギの消化管内容物の DNA から検出された生物種と、湖水中の動物プランクトン相 (個体数と湖水環境 DNA のメタバーコーディング解析から得た塩基配列数) の関係を調べた。

(3) 因果関係に基づいた湖沼生態系動態の理解

従来、長期モニタリングデータの解析には、相関関係に基づいた統計手法が多く使われてきた。しかし、複雑な非線形のシステムにおいては、相関関係と因果関係は必ずしも一致しない。この問題は駆動因を制御する生態系管理に大きな影響を与える。そこで、非線形力学理論を利用した最新の因果関係解析手法である CCM (Convergent cross mapping) 法を霞ヶ浦長期モニタリングデータに適用し、湖沼の重要な生態系機能である一次生産量を制御する要因、一次生産量と高次捕食者との相互作用を明らかにした。一次生産量を定めるボトムアップ要因として、光消散係数・表層水温・リン酸態リン濃度・硝酸態窒素濃度・植物プランクトン群集組成を、トップダウン要因として、大型枝角類・小型枝角類・ワムシ類・ケンミジンコ類・ヒゲナガケンミジンコ類の個体数密度を解析に用いた。これら全ての変数が入手できた 1996~2015 年の毎月湖心観測データを用いて、各変数と一次生産量との因果関係の有無とその方向性について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 生物種の高解像度分類技術の確立にむけた基盤整備

植物プランクトン群集中から新たにシアノバクテリア 34 株および真核藻類 55 株からそれぞれ 16S rRNA 塩基配列、18S rRNA 塩基配列を取得し日本 DNA データバンクに登録した。

光学顕微鏡観察と分子情報から霞ヶ浦の原生生物相を調査し約 600 種を確認した。この中からプランクトンとして出現する原生生物に関して、画像・テキストの WEB 形式データベースを作成し、これと合わせる形で、18S rRNA 塩基配列データをまとめた。

rbcL の塩基配列を用いたメタバーコーディングにより珪藻プランクトンの多くを種レベルで区別することができた。各種の rbcL 塩基配列数を検鏡による計数値と比較したところ細胞体積とよく相関した。一方、相関が悪かった種は光学顕微鏡下では誤同定しやすい種であることが判明した。通年にわたって出現し同定が出来なかった珪藻種を新種として記載した。

動物プランクトンの優占タクサについては、上記の遺伝子領域の塩基配列をほぼ取得し終え、今後、次世代シーケンサーを用いた霞ヶ浦の動物プランクトンモニタリングに必要なリファレンスデータが十分に揃ったと判断された。今回取得した DNA 塩基配列のうち、橈脚類・枝角類 37 ハプロタイプと輪虫類 132 ハプロタイプの COI については公表した。また、タクサごとに顕微鏡による計数値と湖水 DNA 解析の結果を比較し有意な相関が得られたため、DNA 解析で得られた塩基配列頻度は、その動物タクサの存在量を反映していると考えられた。

魚類について、COI は 53 種、12S rRNA は 65 種、18S rRNA は 52 種の部分配列情報を得た。

また、貧毛類 11 種、軟体動物 1 種、ユスリカを除く節足動物 15 種について COI と 18S rRNA の塩基配列を取得した。本研究で得た塩基配列について霞ヶ浦生物データベース（仮）による公開準備を進めた。

(2) 次世代型生態系観測技術活用の試行

2-1 メタバーコーディングによる生態系動態モニタリング

シアノバクテリアを対象とした 16S rRNA 遺伝子のメタバーコーディング解析で得られた配列を用いて非計量多次元尺度法に基づく解析を行った結果、シアノバクテリアの組成、存在量は 6-11 月、12-5 月の 2 パターンに大別され、5-6 月、11-12 月の間にその組成、存在量が大幅に変化することが示唆された。この傾向は真核藻類を対象とした 18S rRNA 遺伝子のメタバーコーディング解析でも同様であった。また、これまで顕微鏡観察では把握仕切れていなかった種が多数存在することが明らかとなった。

上記の分析により得られた多数の分類群の動態データについて、動態の特徴にもとづきクラスタリングを行ったところ、明確な季節性のある振動パターンを示す 9 つのグループが識別された。特に、真核生物と原核生物では動態を要約するクラスターが明確に分かれた。一方で、それより下の分類レベルについては、系統樹上の近さと時系列動態の類似性の間には有意性のある関係はみいだされなかった。これまで、生態系動態の把握は、分類群を基礎に行われてきたが、今回の結果は、「動態群」とも呼ぶべき単位で生態系動態を理解するという新たな可能性について示唆を与えるものである。

2-2 メタバーコーディングによる生物間相互作用の定量化

ワカサギの「採集時期」、相対的な「体サイズ」、「肥満度」が消化管内の生物構成に与える影響を冗長性解析とパーミュテーション検定によって調べた。餌生物の種構成は採集時期に正の相関していた。イサザアミは、採集時期、相対的な体サイズ、肥満度のいずれとも正の相関がみられたのに対し、ワムシ類は負の相関がみられる傾向にあった。6 月から 9 月にかけてワカサギの炭素同位体比に変化が見られ、この短い期間に食性が変化したことが示唆された。

湖水環境 DNA と消化管内容物 DNA の解析からは、それぞれ 17 と 24 タクサが検出され、そのうち 13 が共通していた。13 タクサについて、湖水中と消化管内の平均塩基配列頻度を比較したところ、イサザアミは好んで捕食されるが、ワムシのタクサはあまり捕食されないことが示された。メタバーコーディングで得られる胃内容の塩基配列頻度をもとに、これまで困難であった高分類群解像度の食性解析が可能になることが示された。

(3) 因果関係に基づいた湖沼生態系動態の理解

CCM 法による因果関係解析の結果、霞ヶ浦の一次生産量は、溶存態窒素と植物プランクトンの群集組成によって駆動されていた。大型動物プランクトンからの捕食の影響（トップダウン効果）を検出されず、むしろ、一次生産量がワムシ類、ケンミジンコ類の動態に影響を及ぼしていること、ワムシ類がケンミジンコ類にも影響を与えていることが明らかになった。既存研究では、ワムシ類の生態的役割についてほとんど注目されてこなかったが、本研究から、富栄養湖においてはワムシ類が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

霞ヶ浦の主要なプランクトン食魚であるワカサギの相対資源量指標（CPUE）を推定し、それと動物プランクトン密度との関係を線形回帰によって分析した。その結果、ワムシ類とケンミジンコ類の個体数のみ、ワカサギ資源量と正の有意な相関が認められた。他の動物プランクトングループとワカサギ資源量の間には、有意な相関は認められなかった。

以上のことから、霞ヶ浦のような富栄養湖では、「栄養塩 一次生産量 ワムシ類・ケンミジンコ類」のボトムアッププロセスが、プランクトン食魚の資源量を支える重要なメカニズムとして機能している可能性が示唆された。本研究で用いた長期動態データにもとづいた因果関係分析は、生態系内の因果ネットワークの定量化に非常に有用なツールであることが示された。今後、この解析技術に、本課題で検討を行った次世代型観測の拡充による高分類群解像度の個体数・密度動態や食性動態情報の蓄積が加わると、複雑系である生態系の動態を駆動するメカニズムの理解が飛躍時に進展することが期待された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 28 件)

Matsuzaki SS, Suzuki K, Kadoya T, Nakagawa M, & Takamura N. (2018) Bottom up linkages between primary production, zooplankton, and fish in a shallow, hypereutrophic lake. Ecology 99:2025-2036. 査読有 10.1002/ecy.2414

Kadoya T, Gellner G, McCann K S. (2018) Potential oscillators and keystone modules in food webs. Ecology Letters 1330-1340. 査読有 10.1111/ele.13099

Yamaguchi H, Suzuki S, Osana Y, Kawachi M (2018) Complete Genome Sequence of *Microcystis aeruginosa* NIES-2481 and Common Genomic Features of group G *M. aeruginosa*. Journal of Genomics 30-33. 査読有 10.7150/jgen.24935

Tuji A, Nakagawa M, Sato M, Yamaguchi H (2018) A new planktonic diatom, *Craticula pseudocitrus* sp. nov., *Naviculales*, Bacillariophyceae found in Lake Kasumigaura, Japan Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., ser B. 15-22. 査読有

http://www.kahaku.go.jp/research/publication/botany/download/44_1/BNMNS_B44-1_15.pdf

Makino W, Maruoka N, Nakagawa M, Takamura N (2017) DNA barcoding of freshwater zooplankton in Lake Kasumigaura, Japan Ecological Research 32 481-493. 査読有 10.1007/s11284-017-1458-z

〔学会発表〕(計 46 件)

今藤夏子、メタゲノム解析を用いたワカサギの食性に関わる要因の解析、日本陸水学会、2018

〔図書〕(計 3 件)

中山 剛、山口 晴代 プランクトンハンドブック 淡水編、文一総合出版、2018、144

〔その他〕ホームページ等

霞ヶ浦のプロチスタ <http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~algae/PoK/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：今藤 夏子

ローマ字氏名：Natsuko I. Kondo

所属研究機関名：国立研究開発法人国立環境研究所

部局名：生物・生態系環境研究センター

職名：主任研究員

研究者番号(8桁): 10414369

研究分担者氏名：角谷 拓
ローマ字氏名：Taku Kadoya
所属研究機関名：国立研究開発法人国立環境研究所
部局名：生物・生態系環境研究センター
職名：主任研究員
研究者番号(8桁)：40451843

研究分担者氏名：松崎 慎一郎
ローマ字氏名：Shin-ichiro Matsuzaki
所属研究機関名：国立研究開発法人国立環境研究所
部局名：生物・生態系環境研究センター
職名：主任研究員
研究者番号(8桁)：40548773

研究分担者氏名：山口 晴代
ローマ字氏名：Haruyo Yamaguchi
所属研究機関名：国立研究開発法人国立環境研究所
部局名：生物・生態系環境研究センター
職名：研究員
研究者番号(8桁)：20722672

研究分担者氏名：中山 剛
ローマ字氏名：Takeshi Nakayama
所属研究機関名：筑波大学
部局名：生命環境系
職名：准教授
研究者番号(8桁)：40302369

研究分担者氏名：辻 彰洋
ローマ字氏名：Akihiro Tsuji
所属研究機関名：国立研究開発法人国立科学博物館
部局名：植物研究部
職名：研究主幹
研究者番号(8桁)：40356267

研究分担者氏名：牧野 渡
ローマ字氏名：Wataru Makino
所属研究機関名：東北大学
部局名：生命科学研究科
職名：助教
研究者番号(8桁)：40548773