

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82627

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K12574

研究課題名（和文）湖底コアのDNA情報から探る宍道湖の水草変遷史

研究課題名（英文）History of the aquatic macrophyte transition in lake Shinji explored by DNA information from lake sediment cores

研究代表者

小室 隆（Komuro, Takashi）

国立研究開発法人海上・港湾・航空技術研究所・港湾空港技術研究所・専任研究員

研究者番号：40782561

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）：湖沼における水草の復元はこれまで、堆積物中の種子や卵胞子を直接取り出して、同定することで行ってきた。しかし、この方法では種子が堆積物中に存在しなければ、存在していなかったことを示す。一方、sedaDNAでは、堆積物中にDNAが存在していれば、その存在を遺伝子情報から解明することができる。本研究では、車軸藻類の*C. braunii*を対象としたプライマー、プローブを設計し、車軸藻類の*chara*属を特異的に増幅できるプライマーを設計した。このプライマー、プローブを用いて、宍道湖堆積物から抽出したDNAに対してPCRを行ったところ1914-1932年頃の宍道湖の湖底堆積物から検出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、宍道湖において1960年代以前の堆積物から車軸藻類の卵胞子が発見されたことと、整合が取れる結果となった。本研究で用いたsedaDNA法は、従来の湖沼における水草の復元方法に、新たな方法として組み込むことが可能であることを示した。今後は、宍道湖だけでなく他の湖沼においてもsedaDNAによる水草の復元が可能かを検討し、将来的にはsedaDNAを用いて、湖沼の水草の変遷情報を明らかにしていくことが湖沼環境を考えるうえで重要になると考える。

研究成果の概要（英文）：Reconstruction of aquatic macrophyte in lakes has been done by directly extracting and identifying seeds and oospores in the sediments. However, this method indicates that if seeds are not present in the sediment, they did not exist. On the other hand, with sedaDNA, if DNA is present in the sediment, its presence can be elucidated from the genetic information. In this study, we designed primers and probes for *C. braunii*, and primers that can specifically amplify the genus *chara* of charales. Using these primers and probes, we performed PCR on DNA extracted from Lake Shinji sediments and succeeded in detecting the species in the lake sediments of Lake Shinji around 1914-1932.

研究分野：自然地理学

キーワード：sedaDNA 車軸藻類 宍道湖 湖沼堆積物 水草

1. 研究開始当初の背景

湖沼堆積物は湖が辿ってきた履歴を保存する歴史的資料であり、古気候、地震、津波の研究などに使用されてきた。古気候の解析には堆積物中に含まれる植物の花粉や珪藻などの微化石が用いられ、これらを利用することで過去の環境を知ることができる。また、地震や津波の解析には採取されたコアの堆積層を観測することで、層に乱れが生じている年代に地震や津波などのイベントがあったと解釈することができる。これらと同様に湖から採取される堆積物は湖内で生産された生物の遺骸や DNA が保存されている。この堆積物中に存在する DNA を読み解くことで、かつて湖に生息していた生物種を特定できる可能性がある。

近年、水域の水を対象として、採水した自ら生物の DNA を抽出・解析する環境 DNA (eDNA) を用いた生物相把握の研究が行われており、研究が加速している。水中に存在する環境 DNA は「現在」の状況を反映しているため、過去のことは水から知ることはできない。一方、堆積物中に存在する eDNA は sedaDNA (sediment ancient DNA) と呼ばれ、古い物では 40~60 万年前の永久凍土の堆積物から植物、の DNA を検出している (Willerslev, 2003)。

研究対象地である島根県の宍道湖では、2008 年頃より維管束植物のオオササエビモ (*Potamogeton anguillanus* Koidz.) が突如として出現し、現在ではツツイトモ (*P. pusillus* L.) とともに湖岸から 300m まで水面まで背を伸ばし、水深 4m 程度まで生息域を拡大するようになった。また藻類であるシオグサ (*Cladophora* sp.) が湖底で繁茂していることも確認されている。これらの水草とシオグサが大繁茂することにより、宍道湖の主要産物であるシジミの生息場が減少、さらには腐ったシオグサが湖底に堆積することで硫化水素が発生し、シジミ漁への影響が懸念されている。宍道湖で 2008 年頃から水草が急激に回復したが、その要因として山室ほか(2014)によると 2007 年度以降の宍道湖周辺での水田除草剤使用量の減少が影響しているとしている。この除草剤使用量の減少が要因とすると、宍道湖で実際に除草剤が使われ始めた以前は現在と同じような状況であったことも可能性として考えられる。さらに小室・山室(2013)によると、高度経済成長期以前の 1947 年撮影の米軍空中写真から、宍道湖の約 3km² に水草が繁茂し、水深 3m まで繁茂していたことが確認されている。また Komuro et al.(2016) は高度経済成長期以前の宍道湖の湖底コアから植物の種子を採取・同定し車軸藻類のシャジクモ (*Chara braunii*)、オウシャジクモ (*C. corallina*)、イトシャジクモ (*C. fibrosa*) の卵胞子を採取した。Kasaki (1964) は 1960 年代の宍道湖に *C. braunii* とオトメフラスコモ (*Nitella hyallina*) が生息していたことを確認していたことから、宍道湖には少なくとも 4 種の車軸藻類が生息し、これらが優占種であった可能性が高い。しかし、オオササエビモやツツイトなどの維管束植物の種子が採取されておらず、現在の爆発的な水草繁茂の状況から鑑みても車軸藻類が優占していた時代の宍道湖にも維管束植物の水草が生息していた可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では今後の宍道湖の水草管理(希少種の保存と水産有用種の生産性のバランス)のためにも、過去から現在に至るまでの宍道湖の水草植生の変遷を明らかにする必要がある。そこで堆積物から分解・断片化した車軸藻類や水草の DNA を取り出すことで、かつての宍道湖が辿ってきた水草植生史を解明できると考えた。本研究では宍道湖を対象に、湖全域から湖底コアを採取し、そこに含まれる車軸藻類及び維管束植物の水草の DNA を抽出することで、宍道湖の水草植生変遷史を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プライマーの設計

対象となる車軸藻類の *C. braunii* に特異的に反応するプライマーの設計を行った。*C. braunii* の配列情報は NCBI に登録されている r18s 領域の配列情報を基に作成した。作成したプライマー情報は以下の通りである。Forward primer 5'-TTCGTTGGTCTTCGGGATTG-3'、Reverse primer 5'-TTTCGCAGAAGTTCGTCATC-3'、probe 5'-AGACGGTTGGGGGCATTCGT-3'。このプライマーが実際に生息する *C. braunii* から採取した DNA 産物に対して増幅するか検証を行った。また、交差反応として、維管束植物の水草が増幅しないかを確認するため、オオササエビモ (*Potamogeton anguillanus* Koidz)、ツツイトモ (*P. pusillus* L.)、ホザキノフサモ (*Myriophyllum spicatum* L.) の抽出 DNA を用いた。

(2) 堆積物の採取、処理

堆積物は、宍道湖において 2018 年~2020 年にかけて 3 回行った。堆積物の採取には内径 KK 式採泥器と内径 10cm のアクリルパイプ使ってダイバーによる採泥を行った。採取した堆積物は、実験室に持ち帰り、2cm ごとに切断し、それぞれ容器に入れ冷凍保存した。なお、採泥に使用した機器は全て、使用する前に次亜塩素酸ナトリウムで洗浄し、DNA フリーの状態にし、現場まで運搬した。

(3) 抽出方法

① エタノール沈殿法による抽出

本研究では、まずエタノール沈殿法を用いて堆積物から DNA の抽出を行った。切り出した堆積物の周囲 1cm はコンタミの可能性があるため削除し、薬匙で均一にした。50mL のファルコンチューブに酢酸ナトリウム (0.3mol) を 15ml 入れ、30ml になるまで堆積物を入れた。さらにエタノールも等量添加した。その後 30 分間冷却し、5、000g で 30 分間遠心を行った。遠心後、DNA を含んだ堆積物表面上の白濁した上澄み液をマイクロピペットで 600 μ L を吸引し、2 回に分けてスピнкаラムに移した。スピнкаラムに移した後に 6000g で 1 分間遠心した。遠心後 AW-1-Buffer を 500 μ L 添加し 6、000g で 1 分間遠心、さらに AW-2-Buffer を 500 μ L 添加し、15、000g で 3 分間遠心、AE-Buffer を 100 μ L 添加して 1 分間静置した後、6、000g で 1 分間遠心を行い、DNA をトラップした。抽出した DNA は PCR 法を用いて、95°C \leftrightarrow 65°C を 55 サイクルで増幅させ、アガロースゲル電気泳動法によって在不在の確認を行った。また、比較のため、宍道湖産の現生 *C. braunii* から抽出した DNA も併せて電気泳動を行った。

② 抽出キット Power soil Pro を用いた抽出

キットを用いた抽出には Qiagen の Power Soil Pro を使用した。堆積物の処理については①と同様に行い、抽出に用いたサンプルは 0.25g/サンプルである。堆積物サンプルを Power Bead Pro Tube に入れ、CD1 を 800 μ l 加えて、10 分間最速でボルテックスした。15000xG で 1 分間遠心し、上澄みを 2mL のマイクロチューブに移し、CD2 を 200 μ l 加えて、ボルテックスで 5 秒攪拌した。15000xG で 1 分間遠心し、沈殿物を取らないように注意して、上澄みを 700 μ L を 2mL チューブに移した。そして CD3 を 600 μ L 加え、ボルテックスで 5 秒攪拌した。上澄みを MB Spin Column に移し、15000xG で 1 分間遠心し、上澄液が無くなるまで繰り返して行った。MB Spin Column を 2mL チューブに移し、Sol. EA を 500 μ L 加え、15000xG で 1 分間遠心した。2mL チューブに補足された濾液は捨て、Sol. C5 を 500 μ L 加え、15000xG で 1 分間遠心した。2mL チューブに補足された濾液を捨て、新しい 2mL チューブに MB Spin column を乗せ、16000xG で 2 分間遠心した。遠心後、MB Spin Column を 1.5mL チューブに寄せ替え、Sol. C6 を 100 μ L 加え、15000xG で 1 分間遠心した。MB Spin Column をすて、1.5mL チューブを-20°C以下で保存した。

③ エタノール沈殿法と抽出キットを組み合わせた抽出

①と②の方法に加え Sakata et al.(2020)の方法を用いて堆積物から DNA の抽出を行った。この方法はエタノール沈殿法と市販の抽出キットを使用した方法である。市販の抽出キットを用いた方法では使用する堆積物のサンプル量が圧倒的に少ないため、抽出キットをする前にエタノール沈殿法を用いることで DNA の収量を確保することができる。

堆積物サンプルを 9 g、50mlTube へ入れ、6 mL の NaOH と 3 ml の TE buffer、500 μ l (0.5m) の G2 を加えてボルテックスした。次に、94°C で 50 分間、恒温倉で保温した。その後、5000xG 30sec 遠心した。遠心後、新しい 50mlTube に上澄みを 7.5 mL とり、同量の Tris-HCl (1M) で中和した。1.5 mL の NaAc、30 mL の ETOH を加えてよく混ぜ、-20°C以下で 1 H 以上保冷した。保冷後、50mlTube 周りの結露を拭いて、5、350xG、20min 遠心した。上澄みを捨て、Tube の口を下にして数分放置した。スパチュラで沈殿を物理的に抽出キットの PowerBeadsTube へ移す。100 μ L の DW で残った沈殿を溶かし、溶けたものを PowerBeadsTube へ移した。

Sol.C1 60 μ L 加えて 10 分間最速のボルテックスしその後 10、000xG で 30sec 遠心した。上澄みを 2mL Tube へ移し、Sol.C2 250 μ L 加え、ボルテックスして 4°C 5min 安置した。その後 10、000xG 1min 遠心を行った。上澄み 600 μ L を新しい 2mL Tube へ移し、Sol.C3 200 μ L 加え、ボルテックスして 4°C 5min 安置し、その後 10、000xG で 1 分遠心を行った。上澄み 750 μ L を新しい 2mL Tube へ移し、Sol.C4 1.2mL 加えボルテックスをした。液が全てなくなるまで「675 μ L を spin filter に移し 10、000xG 1min 遠心して濾液を捨てる」を繰り返した。SpinFilter に Sol.C5 500 μ L 加え、10、000xG 30sec 遠心し濾液を捨てる。濾液を捨てたのち、再び 10000xG で 1 分間遠心し、SpinFilter を新しい 1.5ml Tube (保存用) に移し、Sol.C6 100 μ L 加え、10、000xG 30sec 遠心した。SpinFilter を捨て、1.5ml Tube を-20°C以下で保存した。

(4) 年代測定

年代測定は、放射性炭素同位体と鉛 210/セシウム 137 法を用いた。年人大測定に使用したサンプルは湿重量で 5~10g を用いた。年代測定は、*C. braunii* の DNA を対象に PCR を行い、増幅が確認された層を対象として行った。

4. 研究成果

(1) プライマー、プローブ

本研究で作成したプライマーは交差反応の結果、維管束植物のオオササエビモ、ツツイトモ、ホザキノフサモの DNA は増幅させないことがわかった (図 1)。また、*C.braunii* から抽出した DNA を基に、プライマーの確認をしたところ、図 2 に示したように 25~30cycle あたりから増幅曲線が立ち上がり、綺麗な増幅曲線を描いた。そのため、プライマーの性能には問題がない事を確認した。しかし、*C.braunii* を特異的に増幅させるように設計したものの、BLAST 検索の結果、*C.braunii* 以外の Chara 属の種も増幅させてしまう可能性があった。しかし、*C.braunii* は国内で最も多く生息している Chara 属の 1 種であるため、本研究では作成したプライマーを *C.braunii* として使用した。

(2) 堆積物サンプルを用いた解析

①のエタノール沈殿法を用いて堆積物サンプルから抽出した DNA と作成したプライマーを用いて PCR を行い電気泳動で目的のバンドが増幅しているか確認した (図 3)。表層付近で反応している様子が見取れたため、定量 PCR を行ったところ、電気泳動で反応が見られた層からは検出されなかった。この要因として、抽出した DNA に夾雑物が多く、上手く目的の断片が増幅しなかった可能性があった。次に方法②の抽出キットを用いた方法で、同じように PCR を行ったところ、目的の断片が増幅されなかった。そこで、Sakata et al.(2020)で用いられていたエタノール沈殿法と抽出キットを組み合わせることで抽出を行った。この方法ではエタノール沈殿法を使う際に、抽出キットで使用する堆積物サンプルよりも多量のサンプルを使用できる利点があり、さらには G2 enhancer を加える事で、粒子などに吸着している DNA を剥がす効果がある。この方法で抽出した DNA に対して PCR を行ったところ、堆積物下層 28-30、30-32、32-34cm の堆積物から反応があり、3 回繰り返しで、2 回~3 回の反応が見られた (図 4)。この 3 つの層に対して年代測定を行ったところ鉛 210/セシウム 137 法で 1914~1932 年頃の堆積層であることがわかった。この結果は、Komuro et al(2016)で示された 1960 年代以前の堆積層から *C.braunii* を含む 4 種の車軸藻類の卵胞子が検出されていたことから、車軸藻類が実際にいた事を決定づける結果であると考えられる。

(3) まとめ

本研究の当初の研究計画では堆積物から *C.braunii* 以外に、これまで宍道湖で確認された *C.corallina*、*C.fibrosa*、*Nitella hyallina* の 4 種を解析の対象としていたが、*C.braunii* のみしかプライマーの作成ができなかった。これには、堆積物からの DNA 抽出が水から抽出するほど容易ではないことが大きな要因であり、まずは国内で最も広く生息している *C.braunii* を対象とすることで、堆積物からの検出が可能かを目指した。堆積物中の DNA は、その多くが粒子に付着して存在している。そのため、①のエタノール沈殿法では粒子から DNA を引き剥がすことができず、検出ができなかった。②の抽出キットを用いた方法では、ビーズを使用して粒子から DNA を物理的に剥がす工程を含んでいるが、使用する堆積物資料が非常に少ないことが問題であった。これらの問題を解決するために③の方法を用いたところ、目的の *C.braunii* の DNA を検出することができた。

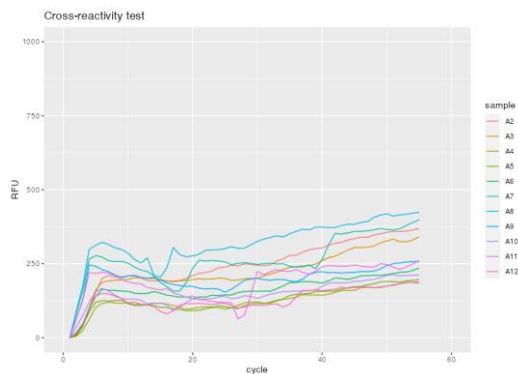


図 1 維管束植物の DNA を用いた交差反応

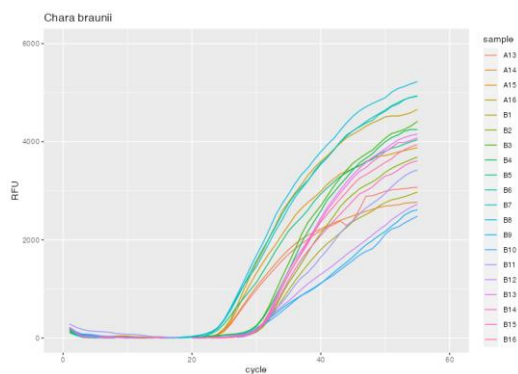


図 2 *C. braunii* から抽出した DNA の増幅曲線

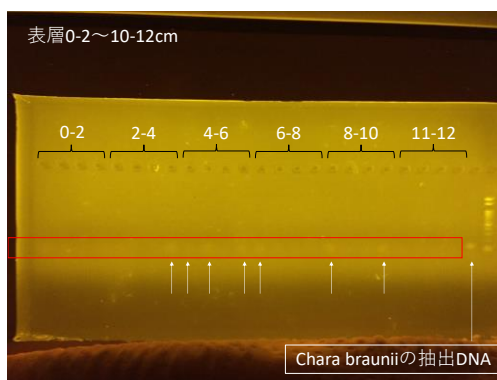


図 3 堆積物から抽出した DNA の電気泳動結果

現在の宍道湖には、*C.braunii* を含む車軸藻類は生息しておらず、維管束植物が大量繁茂している。しかし、このような状況は過去からあったわけではなく、2009 年ごろから始まったことである。過去の水草に関する情報は宍道湖に限らず、多くの湖沼で不明である。本研究で得られた結果は、今後の湖沼における車軸藻類および維管束植物の水草層を過去から現在に至るまで、どんな種が生息していたかを明らかにできる可能性を示した。過去から現在までの湖沼の植生情報を得るには堆積物からの種子や卵胞子を採取して、顕微鏡の下で同定しながらリスト化する必要があるため、専門的な知識や技術が求められる。しかし、本研究で行った sedaDNA を用いた方法では、堆積物を採取し、直接 DNA の配列を読むため、精度が非常に高く、個人の能力に左右されない。本研究で用いた sedaDNA ではプライマー・プローブの設計と最適な堆積物からの DNA 抽出方法を見つけるのに時間を

要したが、プライマー、プローブの設計と堆積物から DNA を抽出することができれば、誰でもが扱える方法である。今後は、様々な湖沼の堆積物サンプルを用いて同様の手法により、水草の DNA を検出できるかについて、対象地を増やして検証を行っていき、各湖沼の水草の変遷に関する基礎的資料を構築していくことが湖沼にとって重要である。

(4) 参考文献

- Willerslev et al. (2003) Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments. *Science*. 300 (5620) :791-795. doi:10.1126/science.1084114
 Kasaki H. 1964. The Charophyta from the lakes of Japan. *J. Hattori Bot. Lab.*, 27, 217-314.
 Komuro et al. (2016) Reconstruction of the charophyte community of Lake Shinji by oospore collection. *Knowl Manag Aquat Ecosyst.* 417. doi:10.1051/kmae/2015045
 Sakata et al. (2020) Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environ DNA.* 00:1-14. doi:10.1002/edn3.75

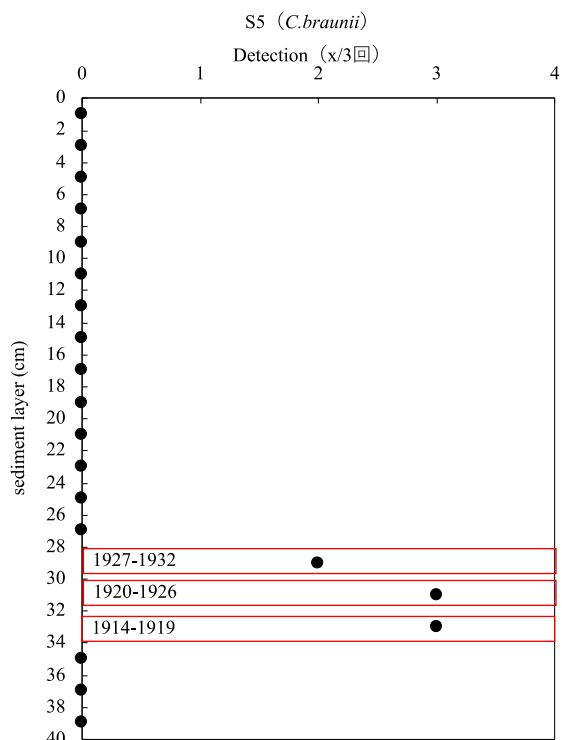


図4 S5 地点堆積物を用いた *C. braunii* の検出結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小室隆, 後藤益滋, 加藤季晋, 嵯峨友樹, 神谷宏, 山室真澄, 赤松良久
2. 発表標題 宍道湖堆積物からの車軸藻類DNAの抽出
3. 学会等名 日本陸水学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小室隆, 神門利之, 加藤季晋, 引野愛子, 山岸聖, 高原輝彦, 後藤益滋, 坂田雅之, 源利文
2. 発表標題 sedaDNAを用いた宍道湖における過去の車軸藻類の復元
3. 学会等名 日本地理学会2022年春季学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸聖, 下田莉奈, 小室隆, 坂田雅之, 源利文, 高原輝彦
2. 発表標題 宍道湖における堆積物コアを指標にした水生動植物の過去の時系列変動の解明
3. 学会等名 第29回汽水域研究発表会 汽水域研究第10回例会 汽水域合同研究発表会2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------