

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450367

研究課題名(和文)炭素・窒素安定同位体比とメタゲノムを用いた生態系・種多様性の定量的評価

研究課題名(英文) Quantitative Evaluation of Ecosystem/Species diversity using Carbon/Nitrogen Stable Isotope Ratio and Metagenome

研究代表者

森 淳 (Mori, Atsushi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究部門・教授

研究者番号：10414418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：農業水利施設における生物多様性のうち生態系多様性や種多様性を炭素・窒素安定同位体比とメタゲノムを用いて定量的に評価する可能性が確かめられた。

農業水利施設に生息する魚類個体群の炭素・窒素安定同位体比は、生息環境により分布特性が異なる傾向がみられた。多様な環境要素で構成される生息地ではばらつきが大きく、ばらつきは生態系の多様性を指標していると考えられた。メタゲノム解析は、従来からのクローニング法よりも検出能力が高く、種多様性の評価手法として利用可能であることが例証された。メタゲノム解析による生物群集推定は、種の多様性についての包括的情報を与え得る手法として、農業水利施設への適用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have concluded that Carbon/Nitrogen stable isotope ratios could be used for evaluation of ecosystem diversity, and metagenome for evaluation of species diversity. It was observed that distribution of carbon/nitrogen isotope ratio of fish population in irrigation and drainage facilities varied with environment. Variation of both ratios in habitats consisting of varied environment elements was wide. It was considered that variation of the ratios indicated ecosystem diversity. Metagenome analysis was also illustrated the possibility of use for evaluation of species diversity because its capability was higher than previous cloning method. Adaptation of biological community estimation using metagenome analysis in irrigation and drainage facilities is expected to be a epoch-making method that provide us comprehensive information regarding species diversity.

研究分野：農村生態工学

キーワード：生物多様性 農業農村整備事業 生態系配慮 モニタリング

1. 研究開始当初の背景

農業農村整備事業は 2001 年に環境との調和に配慮して実施することとされた。生態系配慮施設のモニタリングは、保全対象生物の生物を採捕する手法によって行われている。しかし、この手法に利用されている調査員が水辺に入り調査する方法は高額であることから調査回数に限界があり、少ない回数の採捕調査は瞬間的な動態をとらえている恐れがある。農業農村整備事業の規模(事業主体)にもよるが、完了後の調査費がないためモニタリングそのものも行われていないことも珍しくない。

農業農村整備事業にかかる生物における課題を補う手法が開発されれば、十分なデータに基づく事業後のモニタリングと順応的管理も可能となるだけでなく、流域全体を俯瞰した生物多様性保全を行うことが可能となる。

2. 研究の目的

当研究課題では、定量的・安価・継続可能な生態系・種・遺伝子多様性の総合的な評価手法の開発に向けて、特定の農業水路系を対象に炭素・窒素安定同位体比とメタゲノムの両解析を行う。各手法から得られる生態系および種の多様性評価について検討し、評価手法としての利用可能性を考察する。

具体的には、炭素・窒素安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$)解析では、生物の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ を利用して、水域の生息場の多様性、換言すれば生態系の多様性を評価できるかを明らかにする。これは、各々の生物が生息している溜池や農業用排水路など農業水利施設における生産者の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ に固有性があり、農業水利施設における食物網の $\delta^{13}\text{C}$ 、 $\delta^{15}\text{N}$ もこのベースラインの影響を受けていることを利用する。

メタゲノム解析では、生物群集の多様性を網羅的かつ同時に解析し、種多様性の評価手法としての利用可能性を検討する。検出された生物群集の環境選好性を利用して、生態系の多様性に関する情報として利用できるかを考察する。なお、メタゲノムとは、水や土壌等の環境サンプルに含まれている全ての生物(動物、植物、菌、微生物等)の DNA を指す。メタゲノム解析では、環境サンプルから網羅的に得られた DNA 情報を基に、その環境を利用している微生物から哺乳類までの全生物種を推定する。

3. 研究の方法

(1) 研究調査地と採水地点の設定

研究調査地として、岩手県いさわ南部地区の農業水路系を選定した。選定にあたっては、農業農村整備事業における水路改修計画、それに伴い実施された生物調査情報、既往の学術研究状況等を精査し、現地踏査を行った上

で決定した。

(2) 魚類等の安定同位体比解析

水路内に設置した定置網およびタモ網を用いて魚類および餌となる可能性があるベントスを採捕した。採捕したサンプルはエタノール固定し実験室に持ち帰る魚類は解剖し、筋肉を恒温器で乾燥した後脱脂し再度乾燥させた。乾燥させたサンプルを粉碎し、専用のスズカップに試料を充填し、農工研に設置済みの質量分析装置で安定同位体比を分析した。

(3) メタゲノム解析

サンプルとして、農業水路の水を用いることにした。採水地点として、当該地区の原川に 7 地点、白鳥川に 6 地点、十三軒排水路に 1 地点、北股川に 1 地点、これらの比較として農村工学研究部門の農業用水施設に 1 地点を設けた。

採水方法と DNA 抽出：各地点における採水方法として、水路底の堆積物等を攪乱させないように、表層付近の水約 1 リットルを汲みとった。採水後のサンプル処理として、約 12 時間以内に各地点の水 0.5 リットルずつを目合い 1 μm と 8 μm のメンブレンフィルターでろ過した。フィルター上に付着した残渣から DNA を抽出するため、ホモジナイザーを用いて、残渣を DNA 抽出液に溶出させた。残渣が入った抽出液を 95 °C で 20 分間、熱変性処理し、常温冷却したものをメタゲノム解析用の DNA サンプルとした。DNA サンプルの保管は -30 °C で行った。

DNA 分析とデータ解析：DNA 分析として、各地点の DNA サンプルから真核生物が共有する 18S rRNA 遺伝子の約 450bp を PCR 増幅させた。増幅に用いる PCR プライマーとして、フォワード側については 5'-[Tag]TGGAGTGATTTGCTGGTTRATCCG-3'、リバーズ側については 5'-[Tag]TCACCTACGGAAACCTTGTACG-3' を用いた。なお、どの地点のサンプルかを特定するためのタグ配列 [Tag] として、プライマーの 5' 側に 6 塩基からなる配列 (ACAGTG, CAGACA 等) を加えた。PCR 増幅後、生成された産物については精製処理し、全地点の産物を 1 つにまとめて次世代シーケンサーによる網羅的塩基配列解析を行った。シーケンサーから得られた DNA 配列のデータ解析として、正常に決定された配列をスクリーニングし、DNA データバンクの登録配列との相同性検索 (BLAST, SILVA) により、該当する生物を推定した。

4. 研究成果

(1) 魚類の $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$

農業排水路と溜池により構成され、生息環境の多様な農業水利施設系である岩手県奥州市胆沢区国営いさわ南部地区の原川排水

路（いさわ南部地区内の上流部に位置する中沢集落付近）において魚類等を採取し、炭素・窒素安定同位体比を分析し、環境特性との関係を解析した。

原川とこれに接続する溜池2か所で採捕した魚類個体群の $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ 分布特性は種により異なる傾向がみられた。アブラハヤ、ウグイ、オイカワは、採捕地点内では近似した値を示したが、採捕地間の差がみられた。モツゴ、タイリクバラタナゴ、フナは偏差が大きい傾向がみられた。

原川で採捕されたタイリクバラタナゴには、骨の $\delta^{13}\text{C}$ と筋肉の $\delta^{13}\text{C}$ が大きく異なる個体が見られた。これは採捕された地点以外で生育した後、採捕地点に移住して個体群に加わったものと考えられる。この個体の骨は筋肉よりかなり低い $\delta^{13}\text{C}$ 値を示したことから、生育したのは $\delta^{13}\text{C}$ が高い原川ではなく溜池と考えられた。このように $\delta^{13}\text{C}$ の値から生息地の推定を、部位あるいは個体間の値の違いから生息場所の多様性を、それぞれ推定できることが明らかになった。

図1は小林堤（溜池）とその下流にある溜池（この溜池には名称がないため、ここでは便宜上「下池」とする）で採取したモツゴの筋肉の $\delta^{13}\text{C}$ - $\delta^{15}\text{N}$ マップである。小林堤で採取されたモツゴは寒色系（E, F, G）で、下池で採取されたモツゴは暖色系（B, C, D）で表示してある。

小林堤のモツゴの $\delta^{13}\text{C}$ は-28~-32‰程度を示し、下池は-32~-35‰程度だった。両池の $\delta^{15}\text{N}$ には有意な差が認められ、小林堤の方が有意に高かった。

動物の $\delta^{13}\text{C}$ は餌より 1‰程度高くなるから、この差は食物網における生産者の $\delta^{13}\text{C}$ が異なること、つまり $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ のベースラインが異なることが明確に示された。さらに小林堤では、採取地点間にモツゴの $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ の差が認められた。これはモツゴが孵化から採捕された時点まで、池内をあまり移動しなかったことを示唆している。

採取地点ごとの $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ の差が生じた理由として、植物や藻類の相の違い、底質の有機物含有量の差：有機物が多いほどバクテリアによって分解される際に発生する溶存態無機炭素（同位体分別により $\delta^{13}\text{C}$ は低い）の影響を受けると考えられる、など

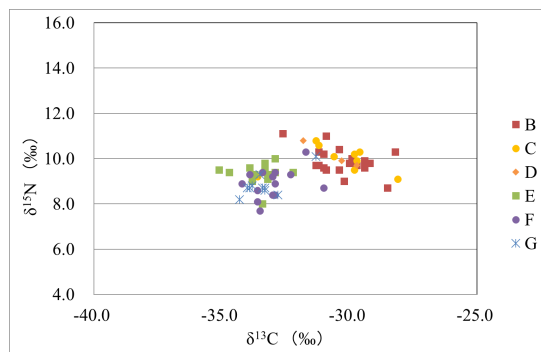


図1 溜池で採捕されたモツゴの ^{13}C - ^{15}N マップ

が考えられる。

小林堤は下池に比べて植生や、トラップを仕掛けた付近の水際の景観が多様であり、この多様性の差がモツゴの $\delta^{13}\text{C}$ 特性となって表れた可能性がある。

図2は堆積した土砂の浚渫によって生態系がリセットされた幅広水路（いさわ南部地区原川排水路）で採捕された代表的魚種の $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ の経年変化である。種多様性の増加は栄養段階の上昇をもたらすとされる。つまり、生物多様性が豊かになると $\delta^{15}\text{N}$ が上昇する。

昆虫や小魚を餌とするギバチの $\delta^{15}\text{N}$ は生態系のリセット後の生態系の遷移に伴って上昇しており、種多様性が増加していることを示している。一方アブラハヤ、モツゴの $\delta^{15}\text{N}$ の変化は認められない。これは、前者は水生昆虫を主とする雑食であるのに対し、後者は動物プランクトン食であり、比較的生態ピラミッドの低い位置にある動物を餌としているため種多様性の変化の影響を受けにくいのではないかと考えられる。

また、ギバチの $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ の標準偏差は経年的に増大する傾向にあり、生態系の遷移・復元にもなって多様な微小生態系（食物網）を利用するようになってきたことを示唆している。

表1は採捕地点ごとのドジョウの $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ を示したものである。生息環境が多様な武名瀬川（栃木県上三川町）本川に生息するドジョウの $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ の標準偏差は、同

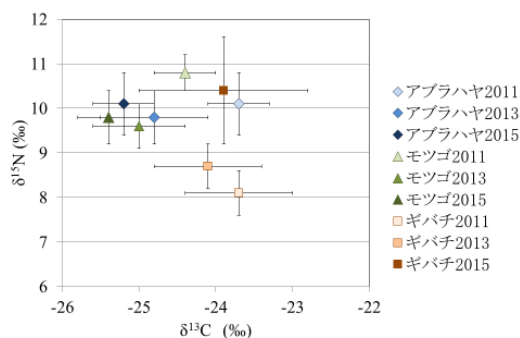


図2 幅広水路における魚類の ^{13}C - ^{15}N 変化

表1 ドジョウの ^{13}C および ^{15}N

		筋肉				骨			
		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
武名瀬川	本川	-24.4	1.5	13.2	2.2	-24.4	1.9	12.7	2.2
	支線	-22.8	1.0	12.8	0.7	-22.9	1.8	11.8	1.4
	末端	-22.4	1.6	12.5	1.1	-22.6	1.9	11.7	1.5
原川	St.1	-21.6	0.7	5.2	0.2	-22.2	0.7	4.7	0.2
	小林堤	-28.6	1.0	9.1	0.3	29.0	1.4	8.3	0.3
小貝川	杉山入	-24.7	1.4	9.1	1.9				
	文谷	-23.6	2.4	8.8	0.6				

川の支川，末端水路に比べて大きい．景観が単調な支線排水路の標準偏差が最も小さい．末端水路は水田と末端排水路で産卵・生育したドジョウが生息しているため比較的標準偏差が大きくなったと考えられる．

原川の St.1 はコンクリート三面張り水路区間にあり， $\delta^{13}\text{C}$ ， $\delta^{15}\text{N}$ の標準偏差が最も小さな値を示している．小貝川流域の文谷は，2次谷津の面積比が大きな谷津地形である．文谷の $\delta^{13}\text{C}$ の標準偏差が大きくなったことは， $\delta^{13}\text{C}$ ， $\delta^{15}\text{N}$ の標準偏差は土地利用の影響を受けることを示している．ここには掲げなかったが，他のフィールドにおいても単調な空間に生息する魚類個体群の $\delta^{13}\text{C}$ ， $\delta^{15}\text{N}$ の標準偏差は小さく，総じて σ (標準偏差) < 1 となる場合は，景観は特に単調だった．

(2)メタゲノム

生物群集の推定状況：全体で約 75,000 本の塩基配列が正常なものとしてスクリーニングされ，相同性検索の結果，約 71,000 本が動物，植物，菌，原生動物のいずれかに相当した．それぞれ特定された生物を網レベルで整理すると，全 4 界 36 門 95 綱のうち，動物では 12 門 16 綱が推定され (表 2)，線形動物門のクロマドラ綱 (10 地点で出現) とエノプルス綱 (5) が中心となった．植物では 5 門 18 綱となり，緑藻植物門緑藻綱 (16) と被子植物門双子葉植物綱 (15) が主体となった．菌と原生生物については，それぞれ 4 門 14 綱と 15 門 47 綱となり，担子菌門ハラタケ綱 (16) ・ ツボカビ門ツボカビ綱 (14) とオク口植物門黄金色藻綱 (16) ・ 珪藻綱 (16) 等が頻出した (表 1)．さらに，次世代シーケンサーによる結果との比較として，同じ PCR 増幅サンプルをクローニングし，従来からの手法を用いて塩基配列解析を行った結果，特定できた生物は 4 界 28 門 49 綱に留まった．結果として，次世代シーケンサーによるメタゲノム解析は，従来からのクローニング法よりも検出能力が高く，種多様性の評価手法として利用可

表 2 推定された生物群集の概要

界	門	綱	出現上位の門と綱 (地点数)
動物	12	16	線形動物門クロマドラ綱 (10)
			線形動物門エノプルス綱 (5)
			脊椎動物門条鰭綱 (4)
			節足動物門顎脚綱 (4)
植物	5	18	緑藻植物門緑藻綱 (16)
			被子植物門双子葉植物綱 (15)
			緑藻植物門トレボウクシア藻綱 (13)
			緑藻植物門アオサ藻綱 (9)
菌	4	14	担子菌門ハラタケ綱 (16)
			ツボカビ門ツボカビ綱 (14)
			担子菌門シロキクラゲ綱 (14)
			担子菌門ミクロボトリウム菌綱 (14)
原生生物	15	47	オク口植物門珪藻綱 (16)
			クリプト植物門クリプト藻綱 (16)
			ケルコゾア門インブリカテア綱 (16)
合計	36	95	

能であることが例証された．

生物群集の地点間比較：各地点の生物群集組成 (表 2 を地点ごとに整理したもの) を図 3 に示す．地点全体における組成の偏りや類似性については特定できないが，原川における地点 3 の保全水路の出現綱数は，地点 2 のため池や地点 7 のコンクリート水路よりも多い傾向にある．このことは，ため池やコンクリート水路等の生息環境 (例えば，水深や流れ) の単調さは，生物群集の綱数の低さに関連すると考えられる．環境の実態を反映するような指標的生物網の選定は将来的な課題であるが，メタゲノム解析による生物群集推定は，生態系の多様性についての包括的情報を与え得る手法として，今後，様々な農業水路系での適用が期待される．

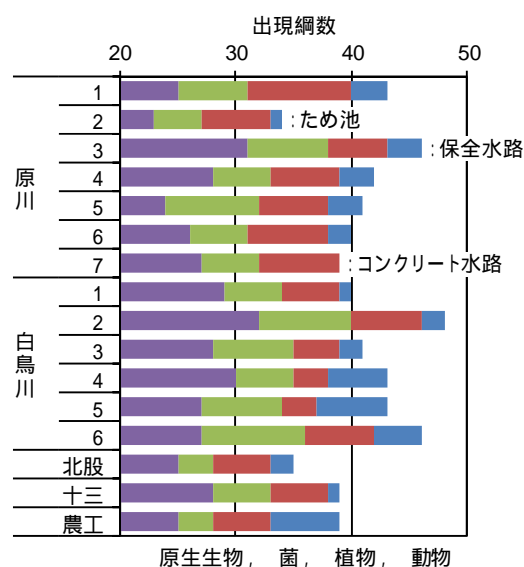


図 3 地点別の生物群集組成 (上図) と原川 3 地点の風景 (下写真)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

森 淳、澤田英司、小出水規行、渡部恵司、竹村武士、農業水路に生息するミシシippアカミミガメの炭素・窒素安定同位体比、農業農村工学会論文集、査読有、84-2、2016、_3- _4

Koizumi, N., Mori, A., Mineta, T. (他 3 名): Exploratory environmental DNA analysis for investigating plant-feeding habit of the red-eared turtle using their feces samples. *Jurnal Teknologi*, 査読有, 78, 9-13, 2016.

DOI: 10.11113/jt.v78.7253

Koizumi, N., Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H., Mori, A. (他 2 名): Preliminary

experiment for detection method of fish inhabiting agricultural drainage canals using environmental DNA. Transactions of The Japanese Society of Irrigation, Drainage and Rural Engineering Journal, 査読有, 297, IV_7-IV_8, 2015.

DOI: 10.11408/jssidre.83.IV_7

Koizumi, N., Moriyama, T., Yoshino, T., Nishida, K., Mori, A. (他 2 名): Development and characterization of microsatellite loci for *Rhinogobius* sp. YB (Gobiidae). Conservation Genetics Resources, 査読有, 7,137-141, 2015.

DOI: 10.1007/s12686-014-0312-7

Mori, A.: Progress of Rural Aquatic Ecosystem Analysis using Stable Isotope Ratios in Japan, *Japan Agricultural Research Quarterly*, 査読有, 49(1), 11-16.2015.

Koizumi, N., Hanamura, Y., Nishida, K., Mori, A. (他 5 名): Development of 18 novel polymorphic microsatellite markers for the mysid crustacean *Mesopodopsis orientalis*. *Conservation Genetics Resources*, 査読有, 7,133-135, 2015.

DOI: 10.1007/s12686-014-0311-8

[学会発表](計 3 4 件)

森 淳、渡部恵司、小出水規行、竹村武士、サギ類の餌起源とコロニーにおける物質フロー、平成 27 年度農業農村工学会大会講演会講演要旨集、202-303、2015 年9月2日、岡山大学(岡山県・岡山市)

Koizumi, N., Mori, A. (他 4 名): Plant-feeding habit of the red-eared turtle based on analysis of environmental DNA extracted from their feces samples. *Proceedings of PAWEES-INWEPF 2015 Joint International Conference*, PIJIC2015-8, 20th August 2015, Kuala Lumpur (Malaysia)

森 淳、農村生態系の変質と生態系配慮の取り組み、自然環境復元学会、2015 年 2 月 11 日、東京農工大学(東京都・府中市)

Koizumi, N., Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H., Mori, A. (他 2 名): Development of a method for detecting inhabitation of the Dojo loach using environmental DNA. *Proceedings of PAWEES 2014 International Conference*, 71, 30th October 2014, Kaohsiung (Taiwan)

森 淳、澤田英司、小出水規行、渡部恵司、カメの爪切り 水田生態系に生息するカメ類の生物化学的分析、第 2 回淡水ガメ情報交換会、2014 年 12 月 20 日、東邦大学(千葉県・船橋市)。

Koizumi, N., Nishida, K., Mori, A. (他 2 名): Development of a simple method of discrimination between the Dojo and

Kara-dojo loaches for the conservation of Japan's rural ecosystem. *Proceedings of PAWEES 2013 International Conference*, 59-66, 30th October 2013, Cheongju (South Korea)

[図書](計 1 件)

Koizumi, N., Mizutani, M., Watabe, K., Mori, A. (他 2 名), InTech, Genetic diversity and population structure of the Hotoke loach, *Lefua echigonia*, a Japanese endangered loach, *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology*, 2013, 349-374

DOI: 10.5772/53022

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 淳 (MORI, Atsushi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究部門・技術移転部・教授

研究者番号: 1 0 4 1 4 4 1 8

(2) 研究分担者

小出水 規行 (KOIZUMI, Noriyuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究部門・水利工学研究領域・上級研究員

研究者番号: 6 0 3 0 1 2 2 2