

メタバーコーディングと定量 PCR から得た水生昆虫環境 DNA 量と水生昆虫現存量の関係

内田 典子¹・久保田 健吾²・会田 俊介²・風間 聡²

¹学生会員 東北大学工学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06)

E-mail: noriko.uchida.s8@dc.tohoku.ac.jp

²正会員 東北大学工学研究科 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06)

河川水から抽出した DNA (環境 DNA) をテンプレートとして無脊椎動物の cytochrome oxidase subunit 1 領域の濃度を定量 PCR により定量した。さらに同一の遺伝子領域をメタバーコーディング解析し、得られた全塩基配列数のうち水生昆虫 6 目 (カゲロウ, カワゲラ, トビケラ, ハエ, トンボ, コウチュウ) に属する塩基配列の相対存在比を、定量 DNA 濃度と掛け合わせ、水生昆虫由来の環境 DNA 濃度 (copies/L) を求めた。捕獲調査により得られた水生昆虫の現存量と相関分析した結果、水生昆虫由来の環境 DNA 定量値は全採集個体数密度 (相関係数 0.74, $p < 0.01$)、カゲロウ目、カワゲラ目、ハエ目の個体数密度と正の相関を示した。これらの分類群については回帰式を推定することができ、本手法が環境 DNA を用いた水生昆虫量の定量に有効である可能性を示した。

Key Words: aquatic insect, environmental DNA, metabarcoding, quantitative PCR

1. はじめに

河川生態系は気候変動、流域の人為的開発により顕著に劣化している¹⁾。水生昆虫はその存在量および多様性が環境負荷に鋭敏に応答すると考えられ、河川環境の健全性評価において重要である²⁾。また、水生昆虫は他の水生生物に比べて比較的ライフサイクルが早く、河川生態系における生物量が豊富であるため、魚類・鳥類などの上位捕食者の重要な餌資源である。このため水生昆虫の量的変動を季節・空間的にモニタリングおよび推定することは河川生態系全体の保全に繋がる。一方、水生昆虫種の形態同定は時間的コストが高いことに加え、類似種が多いために専門性が必要とされることが課題とされている。

近年、野生生物調査の強力なツールとして環境 DNA が注目されている^{3,4)}。環境 DNA とは環境サンプルから抽出される生物由来 DNA の総称である⁵⁾。これまで、環境 DNA から種特異的な塩基配列の存在量を定量し、生物量を推定する試み^{6,7)}、種横断的に検出可能なユニバーサルプライマーを用いた生物相の把握⁸⁾などの研究が報告されている。さらには環境 DNA に対してメタバーコーディングを行うことを前提として、様々な大型真核生物分類群のユニバーサルプライマーが開発されている (e.g., 両生類⁹⁾, 魚類¹⁰⁾, 哺乳類¹¹⁾)。水生昆虫において

も、ユニバーサルプライマーは各種提案されている¹²⁾が、環境 DNA における適応例は多くない¹³⁻¹⁷⁾。

ユニバーサルプライマーによるメタバーコーディング解析の出力結果は、種ごとにプライマーへの反応性が異なる「プライマーバイアス」を受けている。このため、環境 DNA 分析においてはメタバーコーディングによる結果は在・不在判定として用いられることが主流である¹⁸⁻²⁰⁾。また、塩基配列数を用いる場合は、読み取ったすべての塩基配列数に対する相対的存在率として議論され、絶対的存在量の推定には踏み込まないことが一般的であった。しかし、採集した虫サンプルすべてを合わせて 1 つの抽出 DNA 溶液を得てメタバーコーディングに供する実験によると、DNA 抽出に供された水生昆虫個体数密度とメタバーコーディングにより得られた増幅産物数 (read 数) の間に有意な正の相関があることが報告されており²¹⁾、メタバーコーディングにより絶対的定量にまで踏み込める可能性を示唆している。また、環境 DNA サンプルにおいてもメソコスムにおける両生類・魚類相⁹⁾、内湾における魚類相²²⁾を対象に同様の傾向が確認されているが、水生昆虫に関して検討した報告は存在しない。

以上の背景より、本項では、河川水中の無脊椎動物の DNA を対象とし、1) 定量 PCR により得た環境 DNA 濃度と河川水中の全水生昆虫現存量の関係、2) 各水生昆虫目由来の環境 DNA 濃度を、メタバーコーディングから得

た各分類群の塩基配列存在比と DNA 定量値を乗じて算出し、従来手法により観察された水生昆虫現存量との関係性を評価した。本技術が水生昆虫を対象に使用できれば、従来の水生昆虫サンプリングが有している諸課題の解決糸口となり、より時空間的に密な生物種数および現存量データを取得できるようになると期待される。

2. 方法

(1) 環境 DNA と水生昆虫のサンプリング

宮城県名取川水系の 6 地点において 2016 年 7 月と 11 月にサンプリングを行った (図-1)。各地点の河川地形は、H1 のみ平坦河床リーチ (Aa - Bb 移行型)、その他は瀬・淵リーチ (Bb 型) である。環境 DNA 分析用の水サンプルは、全地点で採水時に十分な水深が確保できる瀬尻にて河川表面水から 4.5 L 採水し、既往の実験²⁹⁾に従い氷冷保存して実験室に持ち帰り、即日中に吸引濾過した。濾紙は孔径 0.7 μm 、直径 45 mm の GF/F (Whatman) を用い、濾過量は濾紙一枚あたり 1~1.2 L とし、1 サンプリングあたり 3 反復を得た (表-1)。水試料を通水した濾紙は DNA 抽出を行うまでアルミホイルに包み -20°C で保存した。また、各地点のリーチスケールにおける水生昆虫相を捉えるため、採水の直後にコドラート付きサーバーネット (目合 250 μm 、方形枠面積 0.09 m^2) を用いて瀬、淵を 1 箇所ずつ選定し、計 0.18 m^2 から水生昆虫を採集した。採集した虫サンプルはその場で 100% エタノールを用いて固定して持ち帰り、実体顕微鏡を用いて形態同定を行い²⁹⁾、個体数密度を得た。さらに 60°C の乾燥炉にて 24 時間乾燥させたのち、電子天秤を用いて分類群ごとの乾燥重量を測定した。

(2) DNA 抽出と定量 PCR

DNA 抽出は濾紙ごとに行い、また定量 PCR は濾紙サンプル 1 つにつき 1 回行い、3 反復を得た。通水後の濾紙に Proteinase K 20 mg/ml を加え 56°C で 30 分反応させた後、フェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール法により DNA を抽出した。さらに有機溶媒および夾雑物の除去のため、エタノール沈殿とカラム精製 (PCR Inhibitor Removal Kit, Zymo Research) を行い、1 サンプルあたり 100 μl の DNA 溶液を得た。抽出した DNA 中におけるミトコンドリア DNA の Cytochrome Oxidase subunit 1 (COI) 遺伝子領域の濃度を、定量 PCR により測定した。PCR プライマーには Folmer et al.²⁹⁾ が開発した LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3')、HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') を用いた。本プライマーは無脊椎動物の種判別に利用する目的において一般的に使用されているものである

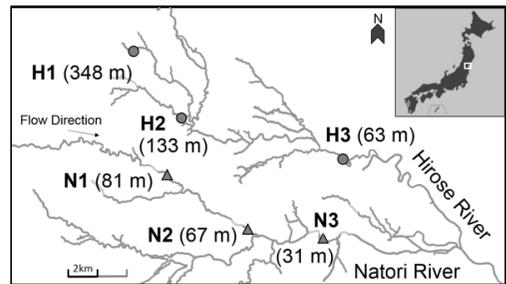


図-1 宮城県名取川流域の調査地点と各地点の標高 (m)。地図上の丸は広瀬川水系 (H1 - H3)、三角は名取川水系 (N1 - N3) の地点を示す。

³¹⁾。定量 PCR 反応は SYBR[®] Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いて、95°C で 20 秒の初期熱変性、続いて 95°C で 5 秒の熱変性、53°C で 30 秒のアニーリング、72°C で 1 分の伸長反応を 40 サイクル、Light Cycler[®] 2.0 (Roche) を用いて行った。定量 PCR のスタンダードには、同流域内から採取したヒゲナガガワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) の体組織から抽出した DNA をテンプレートとして、LCO1490-HCO2198 プライマーセットで上記の条件において増幅し、PCR 産物を精製したものを希釈して用いた。増幅産物の特異性はアガロースゲル電気泳動により確認した。以降の解析には、定量 PCR の 3 反復の平均値を用いた。

(3) メタバーコーディング解析

メタバーコーディングには、各サンプルにおいて最も定量 PCR による定量値が高かったものを用いた。COI 遺伝子配列の増幅には TaKaRa Taq[™] HS Low DNA (TaKaRa) および LCO1490 - HCO2198 プライマーセットを使用し、94°C で 5 秒の熱変性、50°C で 5 秒のアニーリング、68°C で 10 秒の伸長反応を 35 サイクル行った後、最後に 68°C で 7 分の伸長反応の PCR を TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を用いて行った。この PCR は 1 サンプルにつき 3 反復行い、増幅産物をサンプルごとにまとめて以降の分析に用いた。各サンプルの増幅バンドの特異性を Agilent 2100 Bioanalyzer DNA7500 により確認し、増幅産物を AMPure XP (Beckman Coulter) により精製・濃縮した。その後アダプター配列、サンプルの識別配列を結合させ、Qubit dsDNA HS (ThermoFisher Scientific) により最終的な増幅産物濃度を測定した。MiSeq を用いたシーケンシングは、MiSeq Reagent Kit v3 (600 サイクル) を用いて Illumina 社のプロトコルに従って行った。

解析には Reverse 側の解読結果のみを使用した。得られた塩基配列データから、低品質塩基配列および塩基配列長が 150 bp 未満の配列を Trimmomatic v0.36 を用いて除去した。塩基配列が 97% 以上の相同性を持つものを、操

表-1 サンプル中の全塩基配列数における水生昆虫6目の塩基配列の相対存在率(%). 左端に水生昆虫6目 (E:カゲロウ, P:カワゲラ, T:トビケラ, D:ハエ, C:コウチュウ, O:トンボ) について環境 DNA 全 12 サンプルから検出された各目の分類科および総リード数を示す. NDはメタバーコーディングにより検出されなかったデータを表す.

Order	assigned families	assigned reads	site	H1		H2		H3		N1		N2		N3		
				season	Jul.	Nov.	Jul.	Nov.	Jul.	Nov.	Jul.	Nov.	Jul.	Nov.	Jul.	Nov.
				water volume (L)	1.2	1.2	1.0	1.1	1.1	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
			total reads	56,697	163,677	122,384	168,413	145,593	145,639	59,396	155,025	52,681	50,728	61,479	53,464	
E	8	14,861	%E	2.674	0.338	1.163	1.201	0.811	0.667	0.980	3.243	1.564	0.859	0.493	0.037	
P	4	275	%P	0.088	0.092	0.008	0.012	ND	0.004	ND	0.002	0.063	0.004	ND	ND	
T	15	2,502	%T	1.037	0.244	0.366	0.042	0.045	0.046	0.333	0.052	0.913	0.055	0.127	ND	
D	40	82,939	%D	1.490	0.872	4.557	15.917	2.404	2.119	4.686	16.864	10.486	8.833	4.060	0.505	
C	9	662	%C	0.011	0.043	0.078	0.004	0.040	0.255	0.062	0.005	0.002	0.004	0.011	ND	
O	3	70	%O	0.074	0.002	0.014	0.002	ND	ND	ND	ND	ND	0.006	ND	ND	
Total	79	101,309	%Aq.Ins.	5.37	1.59	6.19	17.18	3.30	3.09	6.06	20.17	13.03	9.76	4.69	0.54	

作上同一の分類群 (operational taxonomic unit, OTU) としてグルーピングし, 各 OTU の代表配列について BLAST 検索により生物名の同定を行った. このとき 12 サンプル中にて 1 個しか存在しなかった配列 (Singleton), およびキメラ配列は除去した. このうち, NCBI データベース上の塩基配列と 85%以上かつ e-value < 1.0E-50 の一致率を示すものについて, 科レベルにおいて分類群名を同定した. 水生昆虫の主要な 6 目であるカゲロウ目 (Ephemeroptera, E), カワゲラ目 (Plecoptera, P), トビケラ目 (Trichoptera, T), ハエ目 (Diptera, D), トンボ目 (Odonata, O), コウチュウ目 (Coleoptera, C) であると同定された塩基配列の個数を取り出し, 各サンプルにて得られた塩基配列の総数に対する割合を求め, 6 分類群それぞれの相対存在比を得た.

(4) 環境 DNA 解析による絶対定量値の計算

定量 PCR により得られた無脊椎動物 DNA (COI 遺伝子) 濃度に塩基配列の出現割合 (相対存在比) を乗じて, 各サンプルにおける全水生昆虫または水生昆虫目分類ごとの DNA 濃度を算出した. 以降, この値を本報告における全水生昆虫 DNA 濃度, または各分類群 DNA 濃度とする. 水生昆虫の分類は主要な 6 目 (カゲロウ, カワゲラ, トビケラ, ハエ, トンボ, コウチュウ) とし, 計算式は以下のとおりである.

$$DNA_{ij} = DNA_{obs\ i} \times \frac{Read_{ij}}{Read_i}$$

DNA_{ij} (copies/L):

サンプル i における分類群 j の DNA 濃度

$DNA_{obs\ i}$ (copies/L):

定量 PCR により得たサンプル i の DNA 濃度

$Read_{ij}$: サンプル i に出現した分類群 j の塩基配列片数

$Read_i$: サンプル i に出現した総塩基配列数

各水生昆虫分類群の DNA 濃度と, 採集した水生昆虫の個体数密度および乾燥重量間について, Spearman の順序相関分析を行った. また, 環境 DNA 濃度から個体数

密度および乾燥重量の予測が可能かについて, 単回帰分析により検討した. 各変量は対数変換し, 以上の統計解析には R package 'stats'²⁵⁾を用いた.

3. 結果

(1) メタバーコーディングによる水生昆虫相対存在比

水生昆虫として同定された塩基配列 101,309 配列のうち, 全体の内訳は, ハエ目 81.87%, カゲロウ目 14.67%, トビケラ目 2.47%, コウチュウ目 0.65%, カワゲラ目 0.27%, トンボ目 0.07%であった (表-1). 水生昆虫 6 目として同定された分類科数は全 12 サンプルを通して 79 科であり, そのうち 29 科がサーバーネットにより採集された科と共通していた. 特にハエ目は 36 科, コウチュウ目は 8 科環境 DNA のほうが多く検出したが, これらは水辺に生息するものの河床から採集しにくい種類 (eg. ハエ目イェバエ科, コウチュウ目ゾウムシ科) であったため, サーバーネット法では確認できなかったと考えられる.

水生昆虫 6 目の平均相対存在比を比較すると, 最大はハエ目の平均 6.07% (最大 16.86%/11月 N1, 最小 0.51%/11月 N3) であり, 最小はトンボ目の平均 0.02% (最大 0.07%/7月 H1, NDを除く最小 0.002%/11月 H1 と 11月 H2) であった. カワゲラ目, コウチュウ目は 0.01%以下の値を示すサンプルが多く, トンボ目は検出されず ND となるサンプルが多く存在した. また, 相対存在比は同じ地点でも季節間で異なり, 多くの地点において 7 月のほうが高かったが, 流域の中流部に位置する H2 地点, N1 地点は 11 月の方が水生昆虫割合が高かった.

(2) 水生昆虫現存量と定量 DNA 濃度

サーバーネット採集面積 0.18m²における水生昆虫の個体数および乾燥重量は, 7 月において平均 198 匹 (最大 317匹/N1, 最小 16匹/H1), 平均 196.8mg (最大 363.0

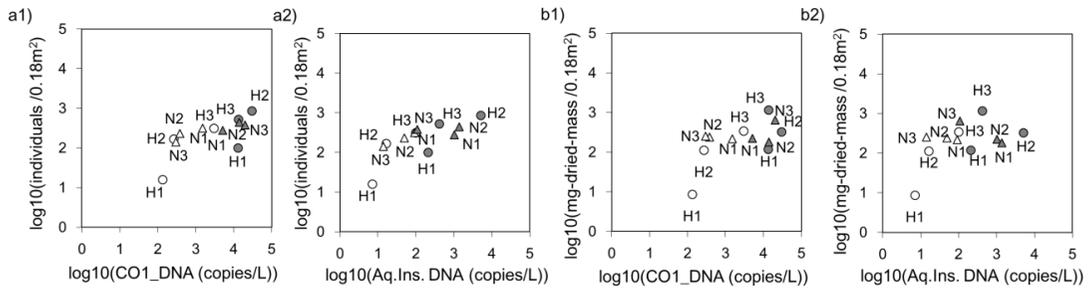


図-2 水生昆虫総個体数密度 (0.18m²) と a1)COI 領域 DNA 濃度 (COI_DNA, copies/L), a2)全水生昆虫環境 DNA 濃度 (Aq.Ins. DNA, copies/L), 総乾燥重量密度 (mg/0.18m²) と b1)COI 領域 DNA 濃度 (copies/L), b2)全水生昆虫環境 DNA 濃度 (copies/L) の関係。各プロットは白抜き: 七月, 灰色: 十一月, 丸: 広瀬川水系 (H1-H3), 三角: 名取川水系 (N1-N3) を示す。

mg/H3, 最小 10.1 mg/H1) であり, 11 月において平均 431.83 匹 (最大 865 匹/H2, 最小 101 匹/H1), 平均 534.72 mg (最大 1,167.9 mg/H3, 最小 128.9 mg/H1) であった。以上より, 11 月においてより高い個体数密度および乾燥重量密度が示された。環境 DNA から定量された COI 領域の DNA 濃度は, 7 月において平均 929 (copies/L) (最大 2,990 (copies/L)/H3, 最小 131 (copies/L)/H1), 11 月において平均 15,873 (copies/L) (最大 29,600 (copies/L)/H2, 最小 5,140 (copies/L)/N1) となり, 現存量と同様にすべての地点において 11 月に高い濃度で検出された。水生昆虫 DNA 濃度は, 7 月において平均 46.16 (copies/L) (最大 98.66 (copies/L)/H3, 最小 7.09 (copies/L)/H1), 11 月において平均 1,369.7 (copies/L) (最大

5,085.0 (copies/L)/H2, 最小 109.03 (copies/L)/N3) であり, COI 遺伝子の DNA 濃度と同様に 11 月の方が高い濃度となった。各 DNA 濃度と水生昆虫現存量の関係について (図-2), Spearman の順序相関分析を行った結果, 個体数密度は, COI 領域 DNA 濃度 (相関係数 $r=0.79, p=0.004$) および水生昆虫 DNA 濃度 ($r=0.74, p=0.008$) と 1% 有意水準において正の相関を示した。他方, 乾燥重量は COI 領域 DNA 濃度と 10% 有意水準において正の相関を示したが ($r=0.55, p=0.067$), 水生昆虫 DNA 濃度とは相関が認められなかった ($r=0.36, p=0.25$)。以上より, COI 遺伝子領域の DNA 断片および水生昆虫由来の DNA が多く存在するとき, 河川水中に多くの個体数が存在することが示唆された。また, COI 遺伝子の DNA 濃度との相関

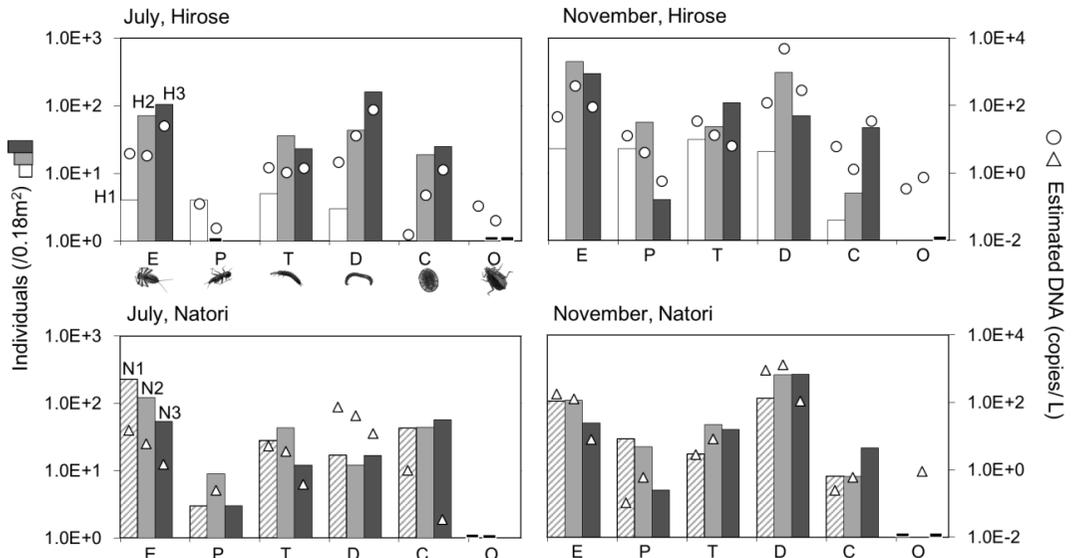


図-3 各分類群の DNA 濃度と個体数の空間変動。横軸は水生昆虫 6 目 (E:カゲロウ, P:カワゲラ, T:トビケラ, D:ハエ, C:コウチュウ, O:トンボ) を示す。パーは個体数密度 (採集面積 0.18 m²) を示し, 各々広瀬川水系 (H1-H2-H3), 名取川水系 (N1-N2-N3) の順に示されている (左側縦軸)。丸: 広瀬川水系, 三角: 名取川水系の水生昆虫各目の環境 DNA 濃度を示す (右側縦軸)。

係数は、乾燥重量よりも個体数密度の方が高いことが示された。

(3) ネットサンプリング法と環境 DNA 解析による水生昆虫現存量の比較

各水生昆虫目の DNA 濃度と、採集された水生昆虫個体数密度の空間変化を河川・季節毎に示した (図-3)。カゲロウ目に着目すると広瀬川は下流ほど個体数密度が高く、名取川は下流ほど個体数密度が減少し、それぞれ環境 DNA 濃度の空間的増減傾向と一致していた。カワゲラ目は7月 N1, N3 地点および11月 N3 地点において採集されたが、環境 DNA では検出されなかった。トビケラ目は多くの地点で多数捕獲されており (平均 37 匹)、環境 DNA も同様に比較的高い値で検出されたが、11月 N3 地点において環境 DNA では検出されなかった。ハエ目は広瀬川、名取川双方の中～下流域において総じて個体数密度が高く、環境 DNA 濃度も高く検出されたが、特に広瀬川において個体数密度との増減傾向の一致が確認された。コウチュウ目は広瀬川・名取川双方において下流域ほど個体数密度が増加した。また、7月 H1 地点にて低濃度ではあるが環境 DNA によってのみ検出が確認された一方、7月 N2 地点、11月 N3 地点にて環境 DNA による検出が見られなかった。トンボ目は全体的に採集により得られた個体数密度自体が小さく、環境 DNA による検出も7月 H3・N1・N2・N3 地点、11月 H3、

11月 N1, N3 地点において確認されなかった。以上の各水生昆虫目の DNA 濃度と分類群ごとの個体数密度について Spearman の順序相関分析を行った結果 (図-4)、カゲロウ目 (10%有意水準)、カワゲラ目 (5%有意水準)、ハエ目 (1%有意水準)、トンボ目 (1%有意水準) において正の相関が示されたが、トビケラ目、コウチュウ目においては相関が認められなかった。また、各分類群の DNA 濃度と乾燥重量における相関分析の結果、ハエ目に正の相関 ($r=0.69, p=0.016$, 5%有意水準)、コウチュウ目に負の相関 ($r=-0.78, p=0.005$, 1%有意水準) のみが確認された。

4. 考察

環境 DNA メタバーコーディングにより、11月は7月に比べて水生昆虫の塩基配列が検出される割合が少なかったが、11月は定量された COI 領域 DNA 濃度が高かったため、水生昆虫の環境 DNA 濃度が高くなる傾向にあった。水生昆虫の DNA 濃度が高いとき、水生昆虫の個体数密度が高く、両者には有意な正の相関が見られた。一方で、水生昆虫の DNA 濃度と、乾燥重量密度の間には相関は認められなかった。水生昆虫の乾燥重量密度が大きくなる状況として、個体数密度自体が大きい場合、または、個体数密度は小さいが終齢幼虫として成長し、

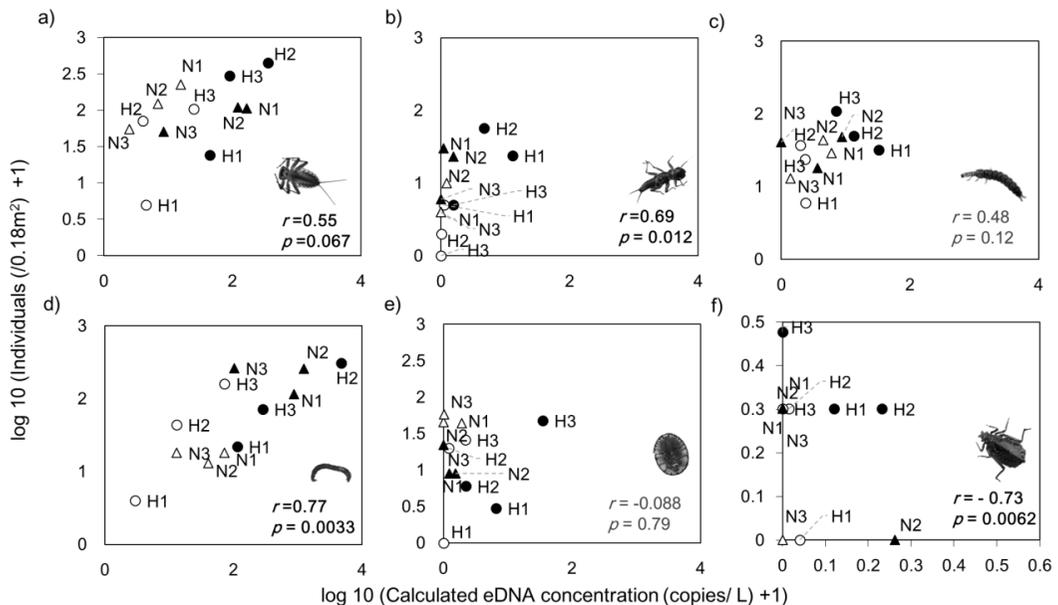


図4 環境 DNA メタバーコーディングと定量 PCR により算出した各分類群の DNA 濃度と河川から採集した水生昆虫個体数密度 (0.18m²) の関係。両軸は対数変換している。a) カゲロウ目, b) カワゲラ目, c) トビケラ目, d) ハエ目, e) コウチュウ目, f) トンボ目である。各プロットは、白抜き：7月、黒塗り：11月、丸：広瀬川水系、三角：名取川水系地点を示す。各図右下に Spearman の順序相関係数 (r) および p 値を示し、10%以下の有意水準を満たしたものを太字で示す。

個体あたりの重量が増加している場合が考えられる。DNA の放出速度は成長段階や生活環における時期により異なる²⁶⁾。たとえば、魚類では成魚は幼魚よりも代謝が衰えるため、体重あたりの DNA 放出速度は成魚よりも稚魚の方が大きいと報告されている²⁷⁾。水生昆虫においても魚類と同様の生理があると仮定すると、終齢幼虫により乾燥重量が多くても、環境 DNA 放出量が減り濃度が低くなることで、相関が弱くなったと考えられる。

カゲロウ目、カワゲラ目、ハエ目、トンボ目において個体数密度と環境 DNA 濃度間に相関が確認された。これは、今後環境 DNA を用いてこれら分類群の個体数密度を推定できる可能性を示している。そこで、単回帰分析を行った結果(表-2)、データ間に相関の認められたカゲロウ目、カワゲラ目、ハエ目、トンボ目について有意な単回帰式が得られたが、コウチュウ目、トビケラ目においては得られなかった。この要因として、コウチュウ目は河川水中における個体存在量がそもそも少なかったため、河川水中に放出される環境 DNA 量も少なくなり、DNA の検出が困難であったと考えられる。一方、トビケラ目の採集個体数密度はカゲロウ目と同程度であったが、有意な回帰式は得られなかった。この2目の回帰式を比較すると、トビケラ目の傾き 0.29 に対して、カゲロウ目の傾きは 0.40 と大きく、カゲロウ目のほうが個体数密度の変化に対して環境 DNA 濃度の変化が大きいいとえる。この理由として、水中における活動量の違いが考えられる。環境 DNA の放出量は活動量や生理的な活性にも影響される²⁸⁾と考えられている。この点を加味すると、カゲロウ、カワゲラ、ハエ目、トンボ目は遊泳や匍匐等により比較的水中をよく移動するのに対し、流水に生息するトビケラ目やコウチュウ目は河床に固着する性質のものが多く、水中への DNA 放出量が少なかったため、環境 DNA による検出が難しかった可能性が考えられる。以上のことから、分類群ごとの生活様式や生活環の違いにより DNA 放出量の違いを考慮して、検出下限値の理解を深めることが実用上重要になると考えられる。

さらに、環境 DNA 分析過程における問題により、DNA 濃度と現存量の間に関係性が見られなかったと考えられる。その一つとして、プライマーの結合位置における塩基配列にミスマッチが生じている可能性が挙げられる。この課題の解決のために、比較的保存領域の高いミトコンドリア DNA の 16S rRNA 遺伝子領域を標的とした新しいプライマーが開発されている²⁹⁾が、日本においては水生昆虫の 16S rRNA 遺伝子領域のデータが不十分であるため現状では適用が難しい。

そのほか、相同性検索の過程において非検出となったことが考えられる。COI 遺伝子領域は種内変異が小さいが、同一種であっても地理的に離れた場所から採取され

表-2 目的関数を各水生昆虫分類群の個体数密度(0.18m²)、説明変数を各水生昆虫の DNA 濃度(copies/L)とした単回帰分析結果。傾き a、切片 b、自由度調整済み決定係数、p 値を示す。10%有意水準以下を太字、5%有意水準以下を太字と下線で示す。

Order	a	b	adjusted-R ²	p-value
E (カゲロウ目)	0.40	1.37	0.23	0.06
P (カワゲラ目)	0.92	0.71	0.31	0.03
T (トビケラ目)	0.29	1.29	0.07	0.21
D (ハエ目)	0.53	0.66	0.58	0.00
C (コウチュウ目)	0.12	1.13	-0.09	0.75
O (トンボ目)	-1.12	0.24	0.42	0.01

た個体間では塩基配列の一致度が低いことが確認されている。たとえば、モンテネグロとドイツで採集されたエグリトビケラ科の一種 *Drusus discolor* の種内一致度は 51.7%に留まる。このため、全世界からデータを集積している NCBI データベースの情報を日本産水生昆虫に対して利用した場合、塩基配列と一致度が低いことが考えられる。特に、環境 DNA は環境中において劣化するため、種・属名を特定できる高品質な配列が少ないと考えられ、今回のようにデータベースとの一致度 85%や、90%¹⁵⁾の閾値を用いて科レベルにて同定しなければ、棄却される配列が多量に発生することとなる。データベースの拡充が進んでいる魚類においては 97%一致度を用いて属または種レベルの結果が得られる¹⁰⁾ことから、水生昆虫においても日本に特化した DNA データベースの構築が望ましい。データベース構築は膨大な人的・経済的資源を要するが、環境 DNA による水生昆虫多様性および絶対的存在量の推定は環境保全において重要な情報を提供する³⁰⁾と考えられることから、実施の価値は十分あると考えられる。

また、環境 DNA の分析として定量 PCR、メタバーコーディングの双方を行う場合、特に経済的負担を考慮する必要があるが、多数のサンプルを一挙に解析できる点、多岐に渡る分類群を対象とし、同一手法によって比較することができる点において拡張性の高い手法だといえる。例えば、本報告においては水生昆虫 6 目のみを対象としたが、同一のデータを用いて他の無脊椎動物の解析も可能である。また、様々な報告で述べられている通り^{3,5,17)}、遺伝子実験技術の習得は形態同定の経験蓄積に比べて短時間で可能であり、実験者間の差異が軽減できるため、分析・解析速度を高速化できることは特筆すべき展望である。今後、環境中に低濃度に存在する DNA を効率よく回収する方法や、遺伝子データベースの充実によって、推定可能な現存量のレンジの拡大およびより細かい分類群への応用が可能になると考えられる。

5. 結論

本研究によって得られた主な結果を以下に示す。

- 1) 全水生昆虫の個体群密度は、COI 領域 DNA 濃度 (Spearman の順序相関係数 $r = 0.79, p < 0.01$) および全水生昆虫 DNA 濃度 ($r = 0.74, p < 0.01$) と有意な正の相関を示した。他方、乾燥重量密度は、全水生昆虫 DNA 濃度との関係性を見出すことが困難であった。
- 2) 環境 DNA メタバーコーディングと定量 PCR により算出した各分類群の環境 DNA 濃度は、カゲロウ目、カワゲラ目、ハエ目、トンボ目と正の相関を示した。特にハエ目は強い正の相関を示すことが判明し ($r = 0.77, p < 0.01$)、回帰分析においても高い有意性のある予測式が示された (決定係数 0.58, $p < 0.01$)。

以上より、水生昆虫由来の環境 DNA 濃度は、水生昆虫現存量と主に正の相関を持ち、本手法は環境 DNA 分析により水生昆虫の分類群ごとの現存量の定量に有効である可能性を示した。

謝辞：本研究は、科学研究費補助金 (16H02363, 風間聡: 17J02158, 内田典子) および文部科学省博士課程教育リーディングプログラム「グローバル安全学トップリーダー育成プログラム」の助成を受けて実施された。ここに深く謝意を表す。

参考文献

- 1) Sala, O. E., Chapin, F. S., Iii, Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D. M., Mooney, H. A., Oesterheld, M., Poff, N. L., Sykes, M. T., Walker, B. H. and Walker, D. H.: Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100, *Science*, Vol. 287, Issue 5459, pp. 1770–1774, 2000.
- 2) 糠澤桂, 風間聡, 渡辺幸三: 水文モデルと底生動物の生息場モデルを用いた河川健全度パターンの評価, 土木学会論文集 B1 (水工学), Vol. 72, I_433-I_438, 2016.
- 3) Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière - Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., Vere, N., Pfrender, M. E. and Bematchez, L.: Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities, *Mol. Ecol.*, Vol. 26, No. 21, pp. 5872–5895, 2017.
- 4) Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D. W. and Bruyn, M.: Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring, *Trends Ecol. Evol.*, Vol. 29, No. 6, pp. 358–367, 2014.
- 5) Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M. and Gough, K. C.: REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology, *J. Appl. Ecol.*, Vol. 51, No. 5, pp. 1450–1459, 2014.

- 6) Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M. N. and Kawabata, Z.: Surveillance of fish species composition using environmental DNA, *Limnology*, Vol. 13, No. 2, pp. 193–197, 2012.
- 7) Doi, H., Inui, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T. and Minamoto, T.: Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, *Freshw. Biol.*, Vol. 62, No. 1, pp. 30–39, 2017.
- 8) Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., Deiner, K., Mahon, A. R., Bruescke, M. A., Shirey, P. D., Pfrender, M. E., Lodge, D. M. and Lamberti, G. A.: Estimating species richness using environmental DNA, *Ecol. Evol.*, Vol. 6, No. 12, pp. 4214–4226, 2016.
- 9) Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A., Turner, C. R., Li, Y., Jerde, C. L., Mahon, A. R., Pfrender, M. E., Lamberti, G. A. and Lodge, D. M.: Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding, *Mol. Ecol. Resour.*, Vol. 16, No. 1, pp. 29–41, 2016.
- 10) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M. and Iwasaki, W.: MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species, *R. Soc. Open Sci.*, Vol. 2, No. 7, 150088, 2015.
- 11) Ushio, M., Fukuda, H., Inoue, T., Makoto, K., Kishida, O., Sato, K., Murata, K., Nikaïdo, M., Sado, T., Sato, Y., Takeshita, M., Iwasaki, W., Yamanaka, H., Kondoh, M. and Miya, M.: Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water, *Mol. Ecol. Resour.*, Vol. 17, No. 6, e63–e75, 2017.
- 12) Elbrecht, V. and Leese, F.: Validation and Development of COI Metabarcoding Primers for Freshwater Macroinvertebrate Bioassessment, *Front. Environ. Sci.*, Vol. 5, 2017.
- 13) Deiner, K., Fronhofer, E. A., Mächler, E., Walser, J.-C. and Altermatt, F.: Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information, *Nat. Commun.*, Vol. 7, 12544, 2016.
- 14) Bista, I., Carvalho, G. R., Walsh, K., Seymour, M., Hajjibabai, M., Lallias, D., Christmas, M. and Creer, S.: Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity, *Nat. Commun.*, Vol. 8, 14087, 2017.
- 15) Fernández, S., Rodríguez, S., Martínez, J. L., Borrell, Y. J., Ardura, A. and García-Vázquez, E.: Evaluating freshwater macroinvertebrates from eDNA metabarcoding: A river Nalón case study, *PLoS ONE*, Vol. 13, No. 8, 2018.
- 16) Macher, J.-N., Vivancos, A., Piggott, J. J., Centeno, F. C., Matthaei, C. D. and Leese, F.: Comparison of environmental DNA and bulk-sample metabarcoding using highly degenerate cytochrome c oxidase I primers, *Mol. Ecol. Resour.*, Vol. 18, No. 6, 2018.
- 17) 八重樫咲子, 細川大樹, 渡辺幸三: 河川水中の環境 DNA の次世代シーケンス解析を利用した水生昆虫の群集構造および生息個体数推定の可能性: 従来型定量評価手法と比較して, 土木学会論文集 G (環境), Vol. 73, III_139-III_147, 2017.

- 18) Hering, D., Borja, A., Jones, J. I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., Bruce, K., Drakare, S., Hänfling, B., Kahlert, M., Leese, F., Meissner, K., Mergen, P., Reyjol, Y., Segurado, P., Vogler, A. and Kelly, M.: Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive, *Water Res.*, Vol. 138, pp. 192–205, 2018.
- 19) Elbrecht, V. and Leese, F.: Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias and Biomass—Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol, *PLoS ONE*, Vol. 10, No. 7, e0130324, 2015.
- 20) Emilson, C. E., Thompson, D. G., Venier, L. A., Porter, T. M., Swystun, T., Chartrand, D., Capell, S. and Hajibabaei, M.: DNA metabarcoding and morphological macroinvertebrate metrics reveal the same changes in boreal watersheds across an environmental gradient, *Sci. Rep.*, Vol. 7, No. 1, 2017.
- 21) Serrana, J. M., Yaegashi, S., Kondoh, S., Li, B., Robinson, C. T. and Watanabe, K.: Ecological influence of sediment bypass tunnels on macroinvertebrates in dam-fragmented rivers by DNA metabarcoding, *Sci. Rep.*, Vol. 8, No. 1, 2018.
- 22) Ushio, M., Fukuda, H., Inoue, T., Makoto, K., Kishida, O., Sato, K., Murata, K., Nikaido, M., Sado, T., Sato, Y., Takeshita, M., Iwasaki, W., Yamanaka, H., Kondoh, M. and Miya, M.: Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water, *Mol. Ecol. Resour.*, Vol. 17, No. 6, e63–e75, 2017.
- 23) 川合禎次, 谷田一三: 日本産水生昆虫: 科・属・種への検索 (第2版), 東海大学出版会, 2018.
- 24) Folmer, O., Black, M. B., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. C.: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, Vol. 3, No. 5, pp. 294–299, 1994.
- 25) R core team: R: A language and environment for statistical computing, <http://www.R-project.org/>, 2018.
- 26) Takeuchi, A., Iijima, T., Kakuzen, W., Watanabe, S., Yamada, Y., Okamura, A., Horie, N., Mikawa, N., Miller, M. J., Kojima, T. and Tsukamoto, K.: Release of eDNA by different life history stages and during spawning activities of laboratory-reared Japanese eels for interpretation of oceanic survey data, *Sci. Rep.*, Vol. 9, No. 1, 6074, 2019.
- 27) Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M. and Minamoto, T.: The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish, *PLoS ONE*, Vol. 9, No. 12, e114639, 2014.
- 28) Ghosal, R., Eichmiller, J. J., Witthuhn, B. A. and Sorensen, P. W.: Attracting Common Carp to a bait site with food reveals strong positive relationships between fish density, feeding activity, environmental DNA, and sex pheromone release that could be used in invasive fish management, *Ecol. Evol.*, Vol. 8, No. 13, pp. 6714–6727, 2018.
- 29) Elbrecht, V., Taberlet, P., Dejean, T., Valentini, A., Usseglio-Polatera, P., Beisel, J.-N., Coissac, E., Boyer, F. and Leese, F.: Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects, *PeerJ*, Vol. 4, e1966, 2016.
- 30) Leese, F., Bouchez, A., Abarenkov, K., Altermatt, F., Borja, Á., Bruce, K., Ekrem, T., Čiampor, F., Čiamporová-Zaf'ovičová, Z., Costa, F. O., Duarte, S., Elbrecht, V., Fontaneto, D., Franc, A., Geiger, M. F., Hering, D., Kahlert, M., Kalamujić Stroil, B., Kelly, M., Keskin, E., Liska, I., Mergen, P., Meissner, K., Pawlowski, J., Penev, L., Reyjol, Y., Rotter, A., Steinke, D., Wal, B., Viteček, S., Zimmermann, J. and Weigand, A. M.: Chapter Two - Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries, Disciplines, Cultures and Generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: A Perspective Derived From the DNAqua-Net COST Action, *Adv. Ecol. Res.*, Vol. 58, pp. 63–99, 2018.

(Received May 24, 2019)
(Accepted Sep 27, 2019)

RELATIONSHIP BETWEEN STREAM INSECTS' BIOMASS AND ENVIRONMENTAL DNA DERIVED BY METABARCODING AND QUANTITATIVE PCR

Noriko UCHIDA, Kengo KUBOTA, Shunsuke AITA, So KAZAMA

Invertebrate species DNA of the cytochrome oxidase subunit I region were quantified using environmental DNA (eDNA) extracted from river water using quantitative PCR (qPCR). Subsequently, metabarcoding was conducted to obtain the proportion of stream insects of six taxonomic orders (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Diptera, Odonata, Coleoptera) in the community. Finally, eDNA concentrations of the six taxonomic groups were calculated by multiplying the proportion of each taxonomy and the quantified invertebrate DNA concentration. As a result, aquatic insect eDNA concentrations displayed significant positive correlations with aquatic insect individuals collected by the conventional surber net sampling (Spearman's rank correlation = 0.74, $p < 0.01$). Furthermore, positive correlations were observed between the population densities and eDNA concentrations for orders Ephemeroptera, Plecoptera, and Diptera. These results indicate that the combination of eDNA metabarcoding and qPCR can be an effective way to estimate the abundance of stream insect.