

3. 研究内容

1) 研究目的

昨今の新興感染症の発生・拡大は、近年のグローバル化や環境変化との関連性が指摘されている(e.g., Daszak et al. 2001, *Acta tropica*78:103)。さらなる温暖化の進行に伴い環境悪化が懸念されている今日、環境変化が宿主-感染者の動態に及ぼす影響を明らかにしていくことは、感染症の動向を予測する上で不可欠な知見である。しかし、実際に野外で病原体・宿主が環境変化と共にどのように変化してきたのか、長期にわたる観測例は殆どない。

一方、近年の技術革新により、新たな生物モニタリング手法として環境 DNA を用いた解析技術が注目されているが、古生物学分野においても飛躍的な進展が見られている。例えば、堆積試料に残る環境 DNA を用いて従来の古典的な復元手法では捉えることが難しかった高次栄養段階の魚類 (Kuwaie et al. 2020, *Communication Biology*)、基礎生産を担う植物プランクトン (Capo et al. 2020, *Environmental DNA*, 2:152) の長期動態も捉えられつつある。ただし、これまで食物網の観点から、重要な位置を占める主要な動物プランクトンのカイアシ類やミジンコ類の復元はまだ実現していない。これらカイアシ類やミジンコ類は、共に不敵な条件下になると休眠卵を産卵し厳しい時期を休眠卵で乗り越え、個体群を維持する生活史を営むことが知られている (図 1 上図)。興味深いことに休眠卵を抱えた個体は、より寄生者による感染の影響を受けやすいことが指摘されている。ミジンコ類は、従来の堆積試料に残る遺骸や休眠卵の顕微鏡観察により、休眠卵数と個体数両方の復元が可能であることから (Tsugeki et al. 2009: *J. Paleolimnology*)、環境 DNA 解析技術でミジンコの個体数や休眠卵の復元と共に寄生者の動態を復元できれば、宿主プランクトンと寄生者の両方の長期動態を再現することが可能となる。本研究は、環境変化が宿主プランクトンと寄生者に及ぼした影響を明らかにすることを目指し、まず環境 DNA 解析技術を駆使して観測データが蓄積されている琵琶湖のミジンコ類の復元とその復元の妥当性を明らかにすることを目的とした。

2) 研究内容

これまでに 2017 年と 2019 年に琵琶湖北湖で採取した堆積物コア試料を用いて、堆積試料に残る環境 DNA の抽出と植物プランクトンや動物プランクトン、ミジンコ類の定量的な復元の解析を進めている。本報告書では、動物プランクトンのミジンコ類は、個体数ではなく、休眠卵数の復元が可能であることが明らかになってきたので、その結果を報告する。

2017 年 8 月に琵琶湖安曇川沖の水深約 70m で採取された堆積物コア試料 LB2 コアの環境 DNA 解析を実施した。堆積試料の DNA は Qiagen の

Power Soil Kit を用いて Sakata et al (2020)の改良版の方法で抽出を行った。琵琶湖に生息するミジンコ 2 種のプライマーを使って、Bustin (2009) の手法に従い Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific Inc.社製) の定量 PCR を行った。琵琶湖のミジンコは、申請者らの従来の顕微鏡観察による先行研究から、この 100 年で種組成や現存量、休眠卵の産卵量も大きく変化してきていることが判っている (図 1 下図)。これまでの堆積試料の環境 DNA 解析結果から 2 種のミジンコ類由来の環境 DNA が高濃度で検出されること (図 2 橙色)、しかも、堆積試料の環境 DNA 濃度は、遺骸観察から復元されたミジンコの個体数 (図 2 灰色)ではなく、休眠卵数 (図青色)の変動と驚くほど一致していることが明らかになってきた。今回の結果は、動物プランクトンのミジンコ類に関しては、環境 DNA 解析技術を用いれば、より簡便に休眠卵量の復元が可能であることを示唆している。

なおミジンコ休眠卵の種判別は、休眠卵の顕微鏡観察に基づくサイズ分布と遺伝子解析結果に従って 2 種の判別法を確立した (業績①)。具体的には、湖底泥に残る休眠卵から DNA を抽出し、ミジンコのプライマーを使ってポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction ; PCR) を行った後に PCR 産物のシーケンス解析により種の同定を実施した。さらに、より簡便で安価な RFLP 制限酵素断片長多型 (Restriction-Fragment Length Polymorphism) 法による 2 種の種判別法の開発を行った。また遺伝子解析により判別できた 2 種の休眠卵の形態的特徴を顕微鏡下で観察した結果、在来種カブトミジンコと汎存種のプリカリアミジンコの休眠卵は、長さ約 860 μm を境界とし判別が可能であることを見出した。本研究での休眠卵量の復元は、この方法に従って復元したものである (図 2)。

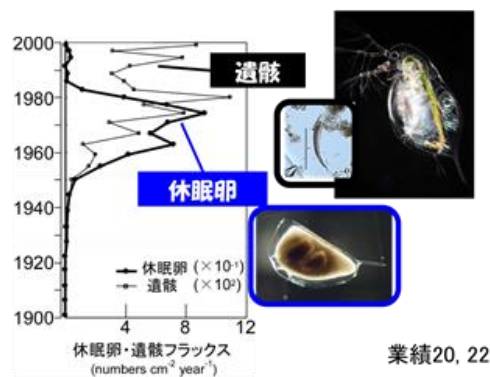
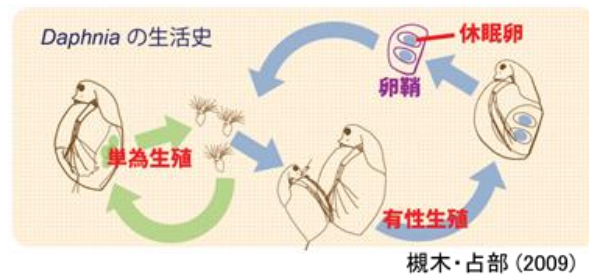


図 1 ミジンコの生活史 (上図)・堆積物コアの解析に基づく在来種 *Daphnia galeata* の遺骸・休眠卵数の変動 (下図)

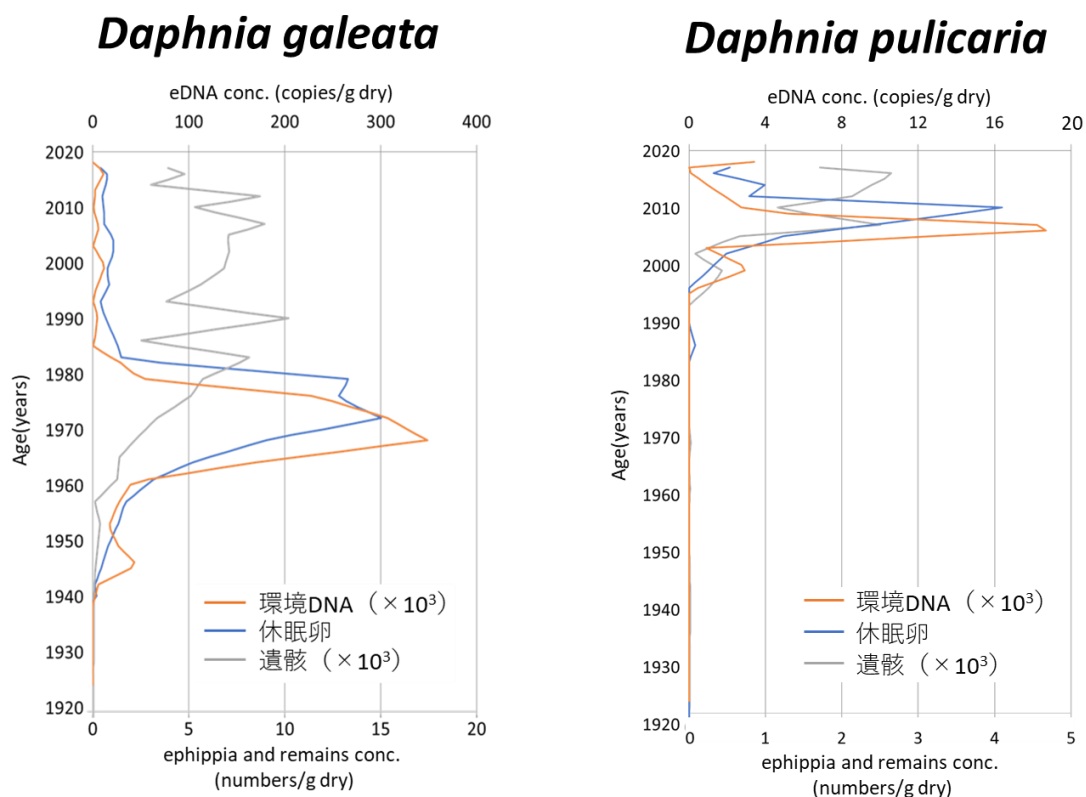


図 2 琵琶湖に生息する在来種 *Daphnia galeata* (左図) と *D. pulicaria* (右図) の休眠卵サイズに基づく休眠卵数 (青線) と環境 DNA 解析に基づく各種の DNA 濃度 (橙色) および遺骸解析に基づく個体数 (灰色) の変遷

3) 成果発表

- ① Tsugeki NK, Honjo MN, Kuwae M. Interspecific variation in ephippial size among different subgenera of *Daphnia galeata* and *D. pulicaria* from Lake Biwa, Japan. *Limnology* (in press)
- ② 坂田雅之, 槻木玲美, 加三千宣, 越智梨月, 速水花奈, 源利文. (2021) 琵琶湖における堆積物環境 DNA を用いた過去情報の復元. 日本生態学会大会第 67 回全国大会

4) 今後の問題点

上述のように、宿主ミジンコの休眠卵量は、堆積試料の環境 DNA 解析から、より簡便かつ迅速に再現できる可能性が見えてきた。今回環境 DNA 解析で用いた泥量は、従来の休眠卵ピックアップ作業で用いた泥量と比べ 50 分の 1 以下程の非常に僅かな量で分析に要した時間は従来のピックアップ作業の時間よりはるかに短い期間である。今後、さらに①複数の堆積

物コア試料・1層あたりのサンプル数を増やし定量 PCR の解析を行うこと、②休眠卵 1 個あたりの DNA コピー数を求め環境 DNA 解析から推察される休眠卵数と観測により得られた休眠卵数の変動を比較し、環境 DNA 解析による復元の妥当性を評価することで環境 DNA 解析による休眠卵量復元の手法を確立させていきたいと考えている。

一方、寄生者の動態についても、環境 DNA やミジンコから長期動態を捉える情報が検出できるかを検証していく必要がある。ミジンコの寄生者については、これまでにミジンコ個体から DNA 抽出を行い、超遠心機を用いてウイルスゲノムを検出する解析を進めており、今年度シーケンスの結果が得られた段階で、今後、さらなる解析を進めて行く予定である。また環境 DNA 解析技術により、寄生者の長期動態を追跡できるかどうか合わせて検証していく必要があるだろう。