

DNA メタバーコーディングによる底生ワムシの食性解析

吉田 伊吹（筑波大学 生物学類）

指導教員：中山 剛（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

水圏の底生環境は様々な生態系機能を有していると考えられており、その一つが上層水と下層水間の栄養循環である。これは非生物学的なプロセスの他、底生生物による生物学的なプロセスが関わっているとされ、特にデトリタスや細菌、原生生物、藻類、メイオ/マクロベントスを含む食物網を介した栄養循環が考えられている (Covich et al., 1999)。従って底生生物の食性を調査することは底生環境の生態系機能を評価する上で重要である。

ワムシは体長 1 mm 以下の微小な動物であり、プランクトン性の種と底生性の種が含まれる。淡水環境中の存在量も多く、細菌や細菌食性原生生物からなる microbial loop と、より大型の動物による食物網間のエネルギー流を仲介する役割があるとされるなど (Moore et al., 2019; Schmid-Araya and Schmid, 2000)、水圏の生態系において重要な役割をもつと考えられる。しかし、現在のワムシに関する知見の多くはプランクトン性ワムシに関する研究によって得られたものであり (Ricci and Balsamo, 2000)、食性研究においても底生ワムシに関しては十分でない (Gilbert, 2022)。最近、プランクトン性ワムシの広範な食性を調査するために DNA メタバーコーディングが用いられるようになったが (Novotny et al., 2021 など)、底生ワムシではほとんど行われていない。

本研究では霞ヶ浦における 4 グループの底生ワムシの餌生物の種類を、DNA メタバーコーディングを用いて検出し、基礎的知見を得ることを目的とした。その結果から、底生ワムシの食性ニッチや底生環境での役割の理解を目指した。

【方法】

1) サンプリング

サンプリングは 6 月から 9 月の各月に 1 回ずつ、霞ヶ浦南の古渡橋と、6・7 月は鳩崎第一揚排水管、8・9 月は鳩崎第三揚排水管付近で行った。底生生物の採集は、まず鋤簾を用いて沿岸の河床の上層数 cm を、採集容器 (135 × 155 × 210 mm) に深さ 5 cm 程度採集した。そしてポンプで河床水を約 2L 注いで良く攪拌した後、上清をふるい (53 μm) にかけて、再び採集容器に河床水を入れた。これを 5 回繰り返した後、ふるいを河床水で洗い、45 ml の濃縮液を得た。濃縮液はその場でエタノール (終濃度 70 %) で固定し、クーラーボックスで実験室へ持ち帰り、4℃で保存した。

2) ワムシの選別と DNA メタバーコーディング

実験にはヒルガタワムシ 2 種と *Lecane* spp., *Monostyla* spp. を用いた。サンプルは光学顕微鏡下で選別し、個体をエタノールで 5 回洗った。6 月のサンプルはサンプル間のばらつきの確認とワムシ間の比較のため、各種 9-14 個体をそれぞれマイクロチューブに入れ、これを 3 回行った。7-9 月のサンプルは季節を経た全体の傾向を確認するため、各種 9-100 個体をそれぞれマイクロチューブに入れ、これを 1 回行った。

DNA は DNeasy blood & tissue kit (Qiagen) で製造元のプロトコルによって抽出した。また、環境中の潜在的な餌生物の確認のため、古渡橋同所の表層水からの抽出 DNA を同研究室の柳沢氏より提供してもらった。ワムシを標的としたブロッキングプラ

イマーの作成、及びこれらの抽出 DNA の 18S rRNA V8 領域を標的とした MiSeq によるシーケンシング解析を依頼した。

ヒルガタワムシ 2 種は固定した状態では種同定できないため、抽出 DNA の COI 領域を PCR で増幅して TA クローニングを行い、Seq-studio でシーケンシングした。その後ヒルガタワムシのデータセット (Fontaneto et al., 2007) を用いて最尤法系統樹を作成し、*Rotariacf. neptunia* と *Rotariacf. rotatoria* と同定した。

3) データの解析

配列データは QIIME2 パイプライン (Bolyen et al., 2019) を用いて解析した。配列は DADA2 プラグインを用いてノイズ除去し、Amplicon Sequence Variant (ASV) を取得した。そして feature-classifier プラグインを用い、Silva 18S データベース (Pruesse et al., 2007) を参照して単純ベイズ分類器により ASV 配列の分類群への割り当てを行った。また、ワムシサンプルにおいて、Eukaryote など分類学的解像度が低いものは NCBI ヌクレオチドデータベースを用いた Blast 検索によって手動で確認した。データの可視化前に、ワムシの配列は除去した。

【結果・考察】

合計 1,062,079 配列から 1,374ASV が生成され、532 の Taxa が割り当てられた。その内、環境水からは 389、ワムシサンプルからは 227 の Taxa が割り当てられた。

6 月のワムシサンプルからは、輪形動物門と未分類の真核生物を除き 28 門 60 綱が検出された。全体的に、緑藻綱や黄緑藻綱、クリプト藻綱といった藻類も 5 %前後のリードが検出されたが、上位に多く検出されたのはユスリカのようなデトリタス由来と考えられるものと真菌、及びケルコゾアや繊毛虫、アーケアメーバ、襟鞭毛虫、パーキンサス類といった原生生物であった。7 月以降についても、概ね同じ傾向にあった。従って、これらの底生ワムシは底生環境において腐食連鎖的な食物網へより関与している可能性が示唆された。

卒業研究発表では検出された種について生態的な面も含め詳しく考察するとともに、ワムシ間の餌の重複について β 多様性解析を行った結果と合わせて底生ワムシ間の食性の相違も考察する予定である。

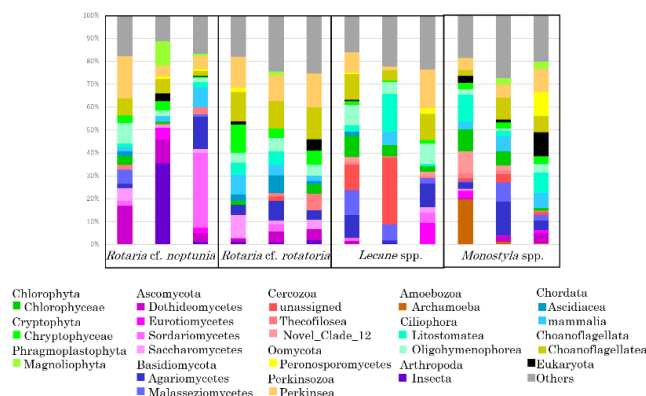


図 1: 6 月の各ワムシサンプルから検出された綱レベルの 18S rRNA リードの占有率。各グラフにおける上位 5 綱を示す。