

霞ヶ浦の原生生物相：形態観察と環境 DNA 解析からのアプローチ

柳澤 花帆（筑波大学 生物学類）

指導教員：石田 健一郎（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

原生生物は真核生物の系統的多様性のほとんどを占める生物群であり、土壌、海洋、湖沼といった地球上のあらゆる環境に存在する。水圏生態系においては重要な一次生産者、一次消費者、分解者として、微生物ループの一翼を担っているほか、主に底生性・付着性の原生生物は魚類や甲殻類などの直接的な餌として、生態系内の栄養循環に大きく貢献している。そのため原生生物相を把握することは、その環境における生態系全体のより深い理解のために重要である。原生生物相の詳しい解析は、深海や南極、海洋といった環境での報告が多く、陸域のいわゆる身近な普通の環境（普遍環境）では、多くの生物群を網羅した詳しい解析の知見は少ない。霞ヶ浦は日本第2位の面積を有する平均水深が4mの海跡湖で、淡水の普遍環境を代表する湖の一つと言える。1976年から国立環境研究所(NIES)により霞ヶ浦内の10地点で水質や生物群集の長期モニタリングが実施されている。しかし原生生物相の調査はその内2地点で光学顕微鏡による目視による同定しか行われておらず、DNAレベルの詳しい解析の報告はない。またサンプリングでは表層水を採集するのみであるため、底生性・付着性の原生生物については調査が不十分であると言える。

本研究では顕微鏡下での形態観察の他、環境DNA解析を用いて底生性・付着性も含めた原生生物相を調査し、霞ヶ浦の生態系理解のための基盤をさらに充実させることを目的とした。

【方法】

○ 調査地及びサンプリング方法

調査地としてNIESで原生生物相の調査が行われていない霞ヶ浦西岸の古渡地区を選択し、古渡地区の松川、古渡橋、鳩崎の3地点において2023年5月から12月にかけて毎月1回サンプリングを行った。各地点で表層水、湖底の泥、湖岸の人工物への付着藻類、水面に浮遊する枝や葉及びその付着藻類を採集し、プランクトンネットを用いた採集も行った。持ち帰ったサンプルをAF-6培地で粗培養し、顕微鏡下で形態観察を行った。プランクトンネットのサンプルは培養せず直接観察した。また古渡橋で採集した表層水サンプルと泥サンプルは、形態観察に加えて環境DNA解析にも使用した。

○ 形態観察

顕微鏡AXIO ImergerA2 (ZEISS)とCKX31 (OLYMPUS)を用いてサンプルの観察を行った。観察できた細胞は全てAXIO ImergerA2の顕微鏡カメラDP73 (OLYMPUS)で写真記録した。

○ 環境DNAの抽出

環境DNA解析には6月から10月の水サンプルと、7月から10月の泥サンプルを用いた。採集当日中に表層水サンプル約1LをGF/F filter (Whatman)で濾過し、泥サンプルと共に-80℃で保存した。表層水サンプルはDneasy®Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてフィルターからDNAを抽出し、泥サンプルはFastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)を用いてDNA抽出を行った。抽出DNAは冷凍保存し、18S rRNA遺伝子のV8領域を標的としたプライマーを用いたPCR増幅断片のライブラリー作成、及び

MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina)を用いた18Sアンプリコンシーケンシング解析を株式会社生物技研に依頼した。

○ 環境DNAの解析

微生物相解析プラットフォームであるQIIME2 (ver.2022.11.1)を用いて分類群推定を行った。ペアエンドのクオリティを確認した後、DADA2プラグインにてシーケンスエラーの修正及びForward配列とReverse配列のマージ、Amplicon Sequence Variant (ASV)へのグルーピングを行った。得られたASV配列はSILVA (ver.138.1)を参照し、単純ベイズ分類器を利用して各分類群へ割り当てた。その後、得られたASV配列の分類をより正確なものにするため、BLAST検索で確認、修正を行った。

【結果・考察】

○ 形態観察

これまでに11門107属を観察した。最も多くの属が見られたのは緑藻植物門であり、34属を観察した。その他観察できたものは不等毛藻32属、シアノバクテリア13属、ユグレノゾア9属、ストレプト植物6属、繊毛虫4属、クリプト藻2属、コアノゾア1属、太陽虫1属、アメーボゾア1属であった。緑藻植物門は主に5月の水サンプルで多く見られ、特に*Gonium*属と*Lobomonas*属は5月サンプルでのみ観察されたほか、珪藻は水サンプルと泥サンプルで共通して見られたが、*Placoneis*属など泥サンプル及び付着物サンプルでのみ観察されるものもあるなど、季節間、サンプル間で出現原生生物の明確な違いが確認された。

○ 環境DNA解析

合計482,154リードから2305のASVを得ることができ、65門298属の配列を検出できた。原生生物相においては、水サンプル全体では不等毛藻が最も優勢であり、その内8月は不等毛藻が全体のリード数の50%以上を占めていた。泥サンプルでは繊毛虫が最も優勢であったが、クリプト藻の配列は水サンプルと比較してほとんど検出されなかった。データの詳細は卒業研究発表会にて報告する。

これらをもとに発表会では、形態観察と環境DNA解析で得られたデータを統合し霞ヶ浦の原生生物相について、NIESの霞ヶ浦データや他の普遍環境における原生生物相との比較も含めて考察する。

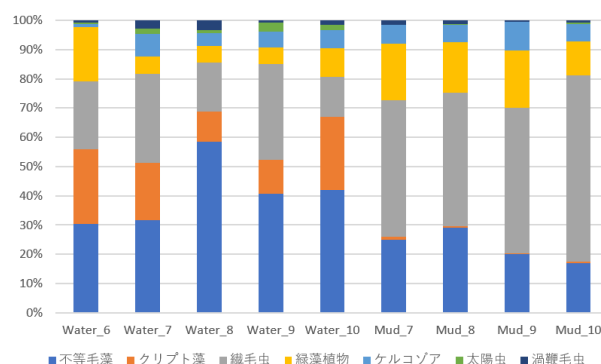


図 6-10月環境水及び7-10月泥における門レベルでの原生生物リード数占有率(上位分類群のみ抜粋)