



環境DNA分析を用いたユスリカの把握

株式会社 ウエスコ

- ✓ ユスリカは、水環境の生物指標であり、不快被害（洗濯物への付着、飲食物への混入、野外活動時の妨げ等）の要因のひとつである。
- ✓ ユスリカは、幼虫の時点では種の同定が困難であることや、同定・計数に係るコストが河川環境の保全効果（底質環境の改善等）を検証する上で課題となっている。
- ✓ そこで、本研究では、ユスリカの動態把握に着目し、経年的なモニタリングにおける環境DNA解析の有用性を検証することを目的とした。
- ✓ 着眼点は以下の通り。
 - 深い砂泥河床である河口堰湛水域において、採水のみでユスリカの生息状況が取得できるか
 - DNA分析を用い、幼虫の時点でユスリカの同定ができるか
 - 幼虫の現存量とDNA分析結果に相関性がみられるか

研究内容の概要



- ✓ 芦田川河口堰（広島県福山市）により形成されている湛水域の2地点を対象に、採水と環境DNA分析、定量採集と検鏡、群集DNA分析を行った。
- ✓ ユスリカ幼虫の検鏡による同定結果と環境DNA分析、群集DNA分析の結果比較により、DNA分析の有効性について考察を行った。
- ✓ また、ユスリカ幼虫の検鏡で得られた個体数と群集DNA分析で得られた配列数の相関性を確認し、幼虫の現存量把握におけるDNA分析の有効性を確認した。

環境DNA分析を用いたユスリカの把握

- ・対象範囲：芦田川河口堰湛水域
- ・調査対象地点：2地点（St. 1, St. 3）
- ・調査方法

■環境DNA分析による確認

採水日（時期、採水層、時間帯、最水量）

夏季：2022年 7月25日、表層、夜（20時頃）、2L

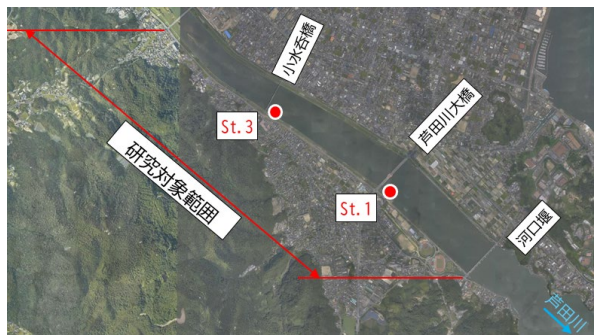
：2022年 7月26日、表層、朝（7時頃）、2L

冬季：2023年 1月 5日、表層および底層、昼間

■検鏡と群集DNA分析による確認

定量採集（時期、採集面積）

冬季：2023年 1月 5日、0.0675m²（15×15cm、3回）

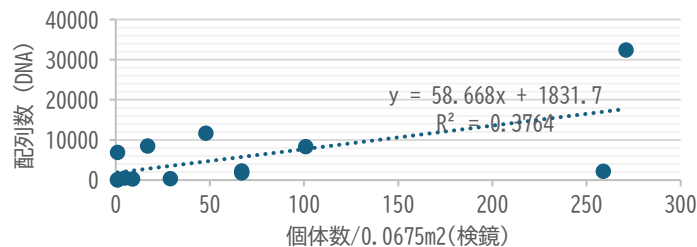


◇検鏡およびDNA分析結果の比較

No.	亜科	検鏡による同定種		個体数		群集DNA分析による同定種		配列数	
		和名	学名	St.1	St.3	和名	学名	St.1	St.3
1	モンユスリカ亜科	カユスリカ属	<i>Procladius</i> sp.	9	48	ウスイロカユスリカ	<i>Procladius choreus</i>	277	1163
2	ヤマユスリカ亜科	トゲヤマユスリカ属	<i>Monodiamesa</i> sp.	1	1	シブタニオオヤマユスリカ	<i>Monodiamesa bathyphila</i>	126	126
3	エリユスリカ亜科	アカムシユスリカ	<i>Propilocerus akamusi</i>	67	5	アカムシユスリカ	<i>Propilocerus akamusi</i>	1770	488
4	ユスリカ亜科	クロユスリカ	<i>Benthalia dissidens</i>	271	17	クロユスリカ	<i>Benthalia dissidens</i>	3242	8468
5		オオユスリカ	<i>Chironomus plumosus</i>	1	1	オオユスリカ	<i>Chironomus plumosus</i>	6919	6919
6		ユスリカ属	<i>Chironomus</i> sp.	1	1				
7						イシガキユスリカ	<i>Cladopselma edwardsi</i>	127	127
8		エダゲヒゲユスリカ属	<i>Cladotanytarsus</i> sp.	101	1	ムナグロエダゲヒゲユスリカ	<i>Cladotanytarsus vanderwulpi</i>	8294	8294
9		カマガタユスリカ属	<i>Cryptochironomus</i> sp.	1	1				
10		オオミドリユスリカ属	<i>Lipiniella</i> sp.	1	1				
11		コガタユスリカ属	<i>Microchironomus</i> sp.	29	1	ヒメコガタユスリカ	<i>Microchironomus tener</i>	379	1596
12		ハモンユスリカ属	<i>Polypedilum</i> sp.	1	1	ハマダラハモンユスリカ	<i>Polypedilum nasudai</i>	4	27
13		ムナグロヒゲユスリカ属	<i>Stempellina</i> sp.	13	1				
14		アシマダラユスリカ属	<i>Stictochironomus</i> sp.	99	1				
15		ヒゲユスリカ属	<i>Tanytarsus</i> sp.	259	67	オナガヒゲユスリカ	<i>Tanytarsus takahashi</i>	675	675
						ウナギヒゲユスリカ	<i>Tanytarsus unagiseptus</i>	26	217
						コニシヒゲユスリカ	<i>Tanytarsus konishi</i>	2160	1337
合計		個体数		639	352	配列数		44073	32882
		種数		9	9	種数		7	8

調査実施日：2023年1月5日 採取面積：0.0675m² ●：DNAのみ確認、■：検鏡のみ確認

◇検鏡およびDNA分析結果の比較



■ 芦田川河口堰（広島県福山市）により形成されている湛水域周辺



■環境DNA分析

• 採水

- 2地点（St.1およびSt. 3）において7月（夏季）と1月（冬季）に採水
- 夏季の採水では夜間（20時頃）および翌朝（7時頃）に表層水を2Lずつ採水
- 冬季の採水では表層水および底層水をそれぞれ2Lずつ採水

• 環境DNA解析

- PCRプライマーは、MtInsect-16SとIlluminaシーケンサー用1st PCR領域を結合したプライマー
- DNA配列の解読と代表配列（Amplicon Sequence Variant : ASV）の作成を行い、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースを用いてDNAバーコーディング
- データベース登録配列と97%以上の一致を同一種とした。

■定量採集、検鏡、群衆DNA分析

・ 定量採集

- 調査日:2023年1月5日
- エクマンバージ型採泥器（15×15cm）を用い採集
- 採集は3回繰り返す、まとめて1サンプルとした
- 無水エタノールで固定

・ 室内分析

- 得られたサンプルを、検鏡により種の同定と計数を行った。
- 検鏡後、無水エタノールに液浸し群集DNA分析の検体とした。

・ 群集DNA分析

- PCRプライマーは、Cytochrome Oxidase I (COI) 領域を対象とした jgHCO/mlCOIintF
- DNA配列の解読と代表配列 (Amplicon Sequence Variant : ASV) の作成を行い、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースを用いてDNAバーコーディング
- データベース登録配列と97%以上の一致を同一種とした。

- ユスリカ科のDNA配列と高い相同性を示した配列は夏の採水サンプルからのみ得られ、3種であった。
- 理由として、以下が考えられる。
 - 参照したNCBIデータベース中にユスリカ科の16S rRNA領域のDNA登録数が少なかった可能性
 - 芦田川のユスリカ個体群のDNA配列が登録されているDNAデータと系統的に異なる傾向にあった可能性
 - PCR時に昆虫類以外の生物のDNAが多数増幅されてしまい、採集的に得られたユスリカ科の配列が減少していた可能性
- 本解析ではユスリカ科と同定できた配列が非常に少なく、季節/採水層/時間帯による検出効率は無評価

No.	環境DNA分析による同定種		配列数		
	和名	学名	St.1	St.3	合計
1	ハイイロユスリカ	Glyptotendipes tokunagai	1		1
2	ウスオビツヤムネユスリカ	Microtendipes umbrosus		1	1
3	ハムグリユスリカ属	Stenochironomus sp.	92	23	115
	配列数		94	23	117
	種数		2	2	3

検鏡と群集DNA分析の比較



環境DNAを活用した環境情報の高度化に関する共同研究

研究項目2 環境DNAの活用による環境調査の高度化

No.	検鏡による同定種		個体数			群集DNA分析による同定種		配列数		
	和名	学名	St.1	St.3	合計	和名	学名	St.1	St.3	合計
1	カユスリカ属	<i>Procladius</i> sp.	9	48	57	ウスイロカユスリカ	<i>Procladius choreus</i>	277	11653	11930
2	トゲヤマユスリカ属	<i>Monodiamesa</i> sp.	1		1	シブタニオオヤマユスリカ	<i>Monodiamesa bathyphila</i>	126		126
3	アカムシユスリカ	<i>Prosilocerus akamusi</i>	67	5	72	アカムシユスリカ	<i>Prosilocerus akamusi</i>	1770	488	2258
4	クロユスリカ	<i>Benthalia dissidens</i>	271	17	288	クロユスリカ	<i>Benthalia dissidens</i>	32412	8468	40880
5	オオユスリカ	<i>Chironomus plumosus</i>	1		1	オオユスリカ	<i>Chironomus plumosus</i>	6919		6919
-	ユスリカ属	<i>Chironomus</i> sp.		1	1					0
6				●		イシガキユスリカ	<i>Cladopelma edwardsi</i>		127	
7	エダゲヒゲユスリカ属	<i>Cladotanytarsus</i> sp.		101	101	ムナグロエダゲヒゲユスリカ	<i>Cladotanytarsus vanderwulpi</i>		8294	8294
8	カマガタユスリカ属	<i>Cryptochironomus</i> sp.		1	1				■	
9	オオミドリユスリカ属	<i>Lipiniella</i> sp.	1		1			■		
10	コガタユスリカ属	<i>Microchironomus</i> sp.	29	●	29	ヒメコガタユスリカ	<i>Microchironomus tener</i>	379	1596	1975
11	ハモンユスリカ属	<i>Polypedilum</i> sp.	1	●	1	ハマダラハモンユスリカ	<i>Polypedilum masudai</i>	4	27	31
12	ムナコブヒゲユスリカ属	<i>Stempellina</i> sp.		13	13				■	
13	アシマダラユスリカ属	<i>Stictochironomus</i> sp.		99	99				■	
-	ヒゲユスリカ属	<i>Tanytarsus</i> sp.	259	67	326	オナガヒゲユスリカ	<i>Tanytarsus takahashii</i>		675	675
14						ウナギイケヒゲユスリカ	<i>Tanytarsus unagiseptimus</i>	26	217	243
15						コニシヒゲユスリカ	<i>Tanytarsus konishii</i>	2160	1337	3497
	個体数		639	352	991	配列数		44073	32882	76828
	種数		9	9	13	種数		7	8	12

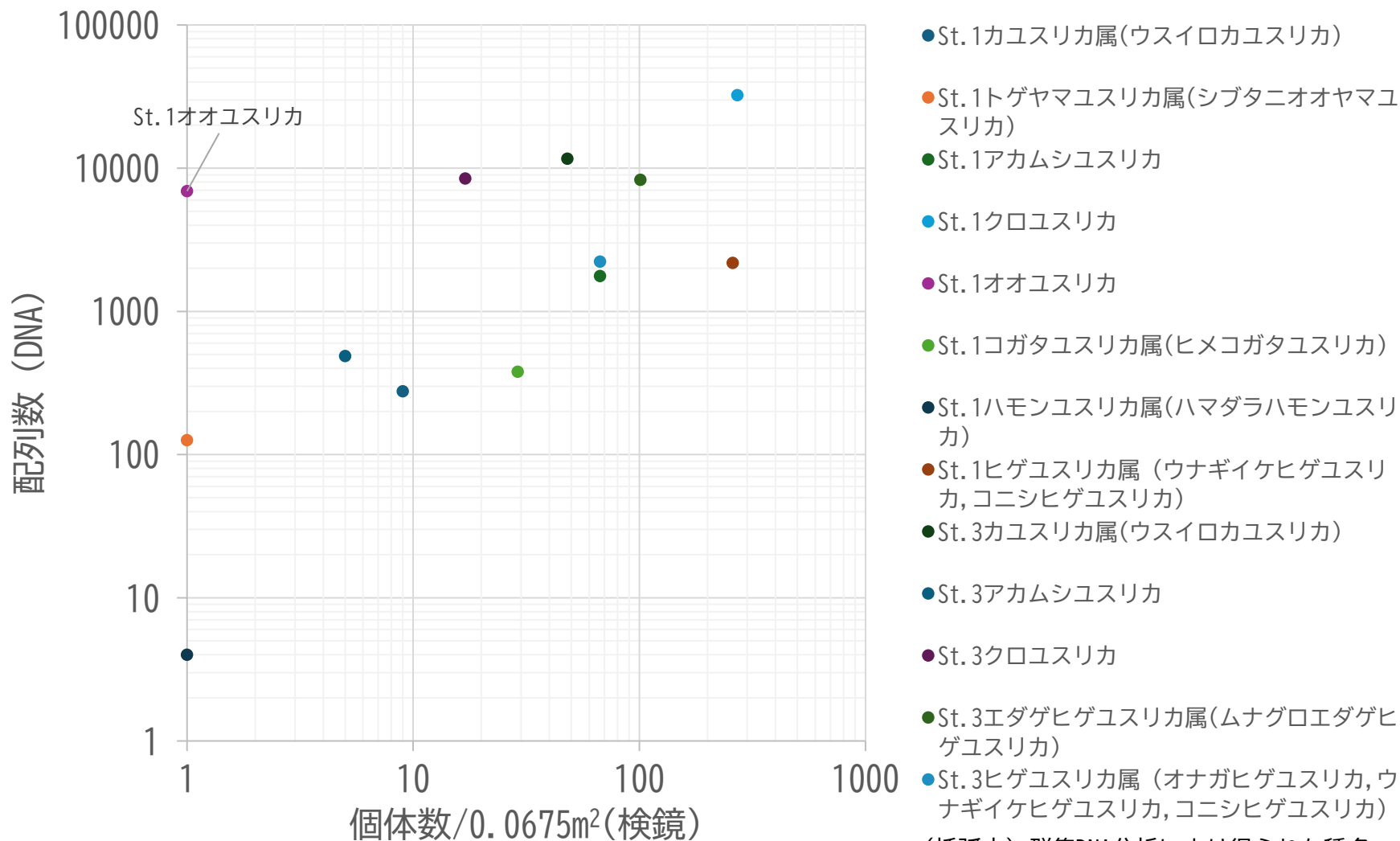
調査実施日: 2023年1月5日 採取面積: 0.0675m² ●: DNAのみ確認、■: 検鏡のみ確認

検鏡では未確認であるが、群集DNAで検出

検鏡で確認され、群集DNAで未検出

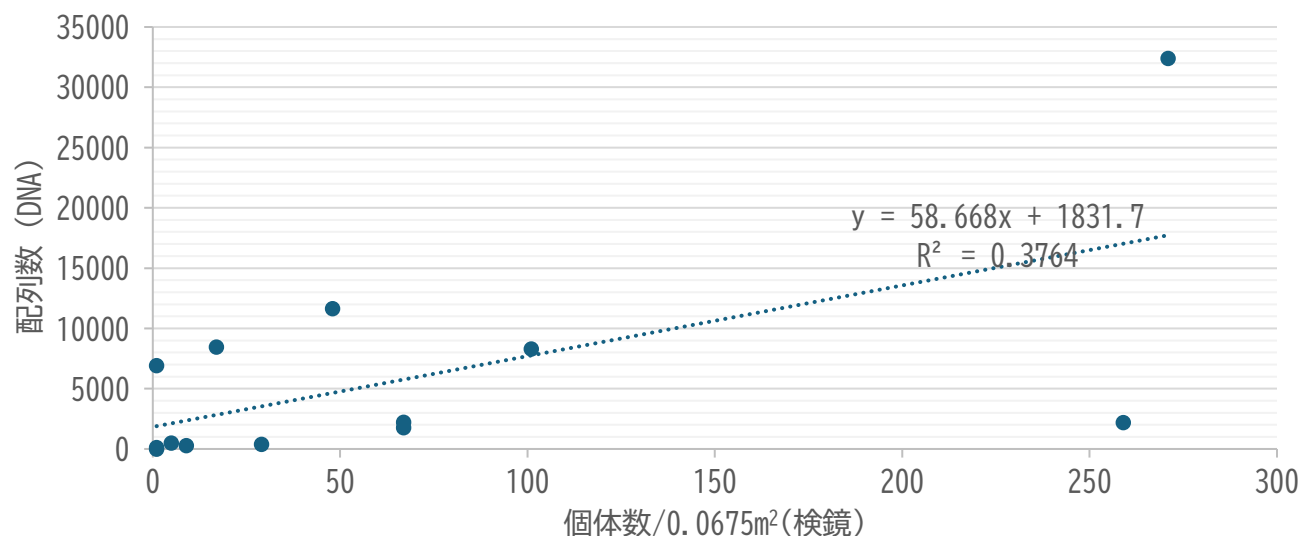
- 検鏡では未確認であるが、群集DNAで検出された種
 - St.3のサンプルでは、検鏡では確認されなかったイシガキユスリカ、ヒメコガタユスリカ、ハマダラハモンユスリカが群集DNA分析のみ検出
 - 配列数が少なく、僅かな破片等に反応したと想定
- 検鏡による同定種のうち、群集DNAで検出されなかった種
 - カマガタユスリカ属、オオミドリユスリカ属、ムナコブヒゲユスリカ属、アシマダラユスリカ属は、群集DNA分析では検出されなかった。
 - 考えられる要因
 - 個体数が少ない
 - 地域個体群のDNAが特徴的

■ 検鏡（個体数）と群集DNA分析（配列数）の比較



(括弧内) 群集DNA分析により得られた種名
※検鏡と群集DNAの双方で確認された種を対象

- 概ね、個体数が多いと群集DNA分析により得られた配列数も多い傾向が確認された。
- オオユスリカは検鏡で1個体の確認であるが、配列数は高い
- オオユスリカの幼虫は大型であり、現存量が多いことが要因であると考えられる。
- 群集DNA分析により、ユスリカの現存量を把握できる可能性が示唆された。



- ✓ 芦田川河口堰湛水域における環境DNA分析、定量採集と検鏡、群集DNA分析の比較により、ユスリカ幼虫の把握におけるDNA分析の有効性を確認した。
- ✓ 採水サンプルの環境DNA分析では、ユスリカ幼虫の把握には不十分であった。
- ✓ 検鏡と群集DNA分析結果の比較により、定量採集のサンプルにおける群集DNA分析は、種の同定の効率化や現存量の把握に有効であることが示唆された。
 - ✓ 種の同定の効率化における課題は、検鏡による確認種が群集DNA分析により未検出の場合があることである。
 - ✓ 現存量の把握における課題は、現存量（個体数）と配列数の関連性が種毎に異なることである。
 - ✓ 今後、分析数を増やすことにより、精度の向上が期待できる。。

謝辞

DNA分析の実施にあたり、山梨大学大学院総合研究部、八重樫 咲子准教授および同研究室所属の学生にご協力いただきました。また、研究や解析の方向性について熱心にご助言いただきました。本当にありがとうございました。