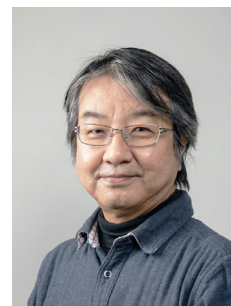


阿寒湖保全のための環境DNAを活用した「近過去100年生物群集まるごと復元」に関する研究

Reconstruction of changes in the community for the past 100 years in Lake Akan using environmental DNA stored in the sediment



占部 城太郎
Jotaro Urabe

北海道阿寒湖において、250年前から現在に至る生物群集の変遷とその要因を明らかにするため、湖底堆積物に残されているDNA(sedDNA)を用いて、過去のマリモやワカサギの密度推定を試みた。ワカサギのsedDNAは、ワカサギが放流された1930年以後の堆積物から確認され、富栄養化とともにワカサギが増加したことが示唆された。堆積物のsedDNAは、1950年以前は減衰が著しいことが、ミジンコのsedDNAと微化石との解析から判明した。そこで、ミジンコsedDNAと微化石を用いた補正式から、マリモのsedDNAのコピー数を補正したところ、1900年頃までのマリモの生息密度は、今よりも10～100多かったが1950年までには減少していたことがわかった。この結果から、マリモの減少は1950年以後の富栄養化によるものではなく、1900年初頭の森林伐採に伴う濁水流入や発電取水によるものであることが裏付けられた。

To elucidate changes in the communities of Lake Akan, Hokkaido, Japan, over the past 250 years, we analyzed the population abundance of Marimo (moss ball) and Wakasagi (pond smelt) using DNA preserved in lake sediments (sedDNA). Wakasagi sedDNA was found in sediments after 1930, when this fish was artificially stocked in this lake. The copy number of Wakasagi sedDNA increased with the eutrophication that started in the 1950s due to the increase in tourists. According to the analysis of *Daphnia* sedDNA and microfossils, it was found that the sedDNA in the sediments was highly attenuated before 1950. Therefore, we corrected the copy number of Marimo sedDNA from the correction equation using *Daphnia* sedDNA and microfossils. The historical changes in the copy number of Marimo sedDNA showed that Marimo was 10 to 100 times more abundant before 1900 than today, but its abundance decreased before 1950. This result confirmed that the decline of Marimo was caused by the influx of muddy water associated with deforestation in the watershed and water level fluctuations caused by power generation intake that occurred in the early 1900s, rather than eutrophication that occurred in this lake after 1950.

研究の背景と目的

カルデラ湖である阿寒湖はマリモを産するだけでなく、ヒメマスの原産地でもあり、我が国を代表する湖沼生態系の1つである (Wakana et al. 2023). しかし、20世紀初頭には集水域森林の伐採による濁水流入や、下流水力発電所設置に伴う水位変化、1930年代以後には漁業資源としてのワカサギやニジマス等の外来種が放流され、さらには1950年代からはじまる高度経済成長期には観光ブームに伴う湖畔開発により富栄養化した (若菜 2008). 現在、集水域の森林は伐採されることなく保全され、発電取水も行われなくなった. さらに釧路市を中心に下水道整備事業など、阿寒湖保全のための取り組みが進められている. しかし、現時点では水質の大幅な改善には至っていない (占部 2017).

阿寒湖は我が国で常に人気上位に入る観光地であり、その生態系の保全は観光資源としての持続的利用のためにも不可欠である. 上述のように、阿寒湖は人為的に大きな攪乱を受けてきたが、生物群集全体への具体的な影響は明らかでない. その理由は、過去の調査がきわめて散発的で、時系列に沿った生物群集の量的変遷に関する知見が断片的なためである. 言うまでもなく、生態系の保全のためには、生物群集変化要因の理解が必要である. 過去の変遷がわからなければ、将来を見通すことは出来ず、望ましい保全目標も学術的に設定することは不可能である. このような背景のもと、申請者は阿寒湖堆積物を利用し、堆積物に含まれる陸上由来有機物や藻類由来色素の分析、安定同位体や花粉分析、さらにはプランクトン遺骸やその休眠卵の遺伝分析を通じ、近過去 (およそ過去100年) に渡る阿寒湖の生物群集の復元を行って来た (占部 2017). しかし、当時最新の方法を駆使しても、復元できるのはプランクトン群集に限られていた. このため、生物群集の変動要因の手がかりは得られているものの、マリモを始めとする様々な生物の変遷やその変化要因の全貌解明には至っていない.

そこで、本研究では、湖底堆積物に保存されているDNA情報を利用することで、これまで復元が困難であった、マリモ (*Aegagropila linnaei*) やワカサギ (*Hypomesus nipponensis*) など非プランクトン生物の過去の変遷を復元することを目的とした. 生物から溶出し環境中に遊離したDNAを環境DNAと呼ぶが、それらは水中のみならず、湖底堆積物にも保存される (Sakata et al. 2020). 特にDNA分子は鉱物粒子に吸着すると、微生物による分解を受けにくい. よって、年代測定をした湖底堆積物 (sediment) に含まれる環境DNA、すなわち sedDNA を調べることで、マリモなど、従来の近過去復元方法では困難であった生物群の動態と変遷を明らかに出来る可能性が高い. ただし、その方法論の妥当性には、検証が必要である. sedDNA量 (コピー数) は分解され、経時的に減衰している可能性があり、過去の sedDNA を定量出来たととしても、それが過去の生物量を反映しているとは限らない. 幸いなことに、堆積物には、ミジンコ等の微化石など分解しにくい生物の遺骸が含まれている (Tsugeki et al. 2003, Ohtsuki et al. 2015). それら微化石とその生物由来の sedDNA を比較すれば、sedDNAの減衰速度を見積もることが出来るかも知れない. そこで、本研究ではミジンコの遺骸を指標として sedDNAの減衰速度を調べるとともに、その結果を用い、マリモやワカサギの sedDNA 量を分析することで過去のそれら生物量の変遷について調べた.

研究経過

2021年7月5日に阿寒湖最深部 (水深約35m) にて深さ約1mの底泥コア3本を、潜水ダイバーにより採集し、1cm厚刻みで堆積泥をスライスした. 底泥コア3本のうち1本 (21 ak1) を標準コアとし、そのコアから年代測定、化学分析、sedDNA分析用の試料を分取した. 年代測定については、2022～2023年にかけて実施し、まず58cm層、81cm層、90cm層に含まれていたテフラ (火山灰) の特定を行うため、その鉱物組成をエネルギー分散型X線アナライザーにより元素分析を行った. 次いで、愛媛大学沿岸海洋センターのγ線検出機材を利用して、210鉛及びセ137シウムを測定し、その値を用いてCYC法による年代推定を行った (加 2014). これらテフラと同位体測定の結果から、堆積泥各層の堆積年代を推定した. 推定した年代値から、各年代の堆積速度 (SR: g sediment cm⁻² year⁻¹) を下記により計算した:

$$SR = (W_i + W_{i+1}) / [2(Y_{i+1} - Y_i)]$$

ここで*i*は堆積深度 (cm)、*W_i*と*Y_i*は、それぞれ1cm³あたりの堆積泥重量と推定年代である.

これら年代測定と平行して、2021年から2023年にかけて、堆積泥の化学分析と sedDNA 分析を行った. 化学分

析は阿寒湖の過去の栄養状態を把握するために行い、堆積泥に含まれる全リン及び植物プランクトン由来のクロロフィル濃度（クロロフィル *a*+フェオフィチン）を定量した。これらの分析は、Ohtsuki et al. (2015) にしたがって分析した。

湖底泥に含まれる sedDNA の抽出は Sakata et al. (2020) の方法で行った。この抽出した DNA 試料を用い、ミジンコ (*Daphnia dentifera* + *D. galeata*) については 12S rRNA 遺伝子の部分塩基配列（約 150 bps）を、ワカサギについては、cyt b 遺伝子に含まれる塩基配列の一部を、マリモについては 18S rRNA 遺伝子の部分塩基配列（約 150 bps）を対象に、単位堆積泥あたりの塩基コピー数を定量 PCR(qPCR) により測定した。また、本研究で現生のマリモ群体を調べたところ、ネンジュモ科のシアノバクテリア（種不明）が共生していることがわかった。そこで、そのシアノバクテリアの 23S rRNA 遺伝子の部分塩基配列（約 200 bps）についても、単位堆積泥あたりの塩基コピー数を qPCR により測定した。

各堆積泥に含まれる微化石であるミジンコの尾爪 (abdominal clows) は、Tsugeki et al. (2003) の方法により、顕微鏡下で計数し、単位堆積泥あたりの尾爪を計数した。これら単位堆積泥あたりの塩基コピー数や微化石数に、各年代の堆積速度を乗じることで、各フラックス（1 年あたりの沈降量）を算出した。

研究成果及び考察

年代測定

年代測定は 210 鉛 280 及び 137 セシウムの放射同位体に加え、1857 年の駒ヶ岳、1739 年の樽前山での火山爆発の際に堆積した火山灰を同定することで行った（図 1）。これにより、250 年前までの湖沼堆積物の堆積年代を精度良く推定することが出来た。

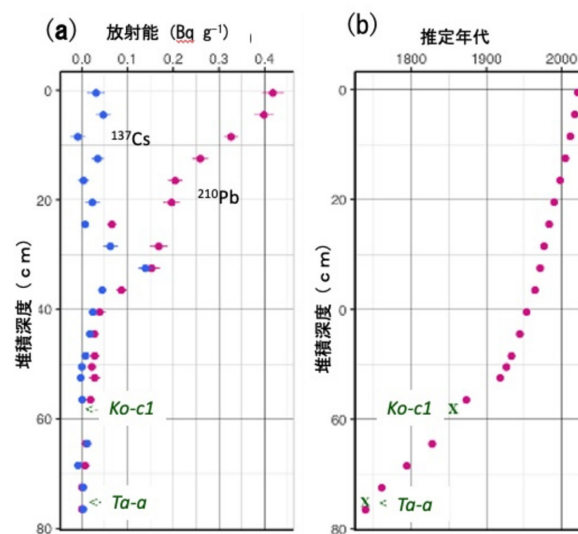


図1. 阿寒湖の堆積物から得られた放射同位体測定値とテフラの記録(a)及び、それらから推定された堆積物の沈降年と堆積深度との関係(b). Ko-c1は駒ヶ岳、Ta-aは樽前山の噴火を起源とするテフラを示す。

Fig.1. Results of radioisotope measurements and tephra records from Lake Akan sediments (a) and the relationship between sedimentation year and sedimentation depth (b); Ko-c1 and Ta-a indicate tephra originating from the eruptions of Mt Komagatake and Tarumae, respectively.

栄養状態

堆積物のクロロフィル量と全リン量を分析したところ、それらのフラックスは、1900 年以前は低く、阿寒湖は確かに貧栄養湖であったことが伺われた（図 2）。しかし、水位変動が大きくなった 1900 年頃からクロロフィルと全リンのフラックスはともに徐々に上昇し、観光化が進んだ 1950 年以後は特に大きくなった。1980 年代になると湖畔の市街地で公共下水道が整備された。その結果全リンのフラックスは減少した。しかし、クロロフィルのフラッ

クスは、それ以後も大きいままであった。

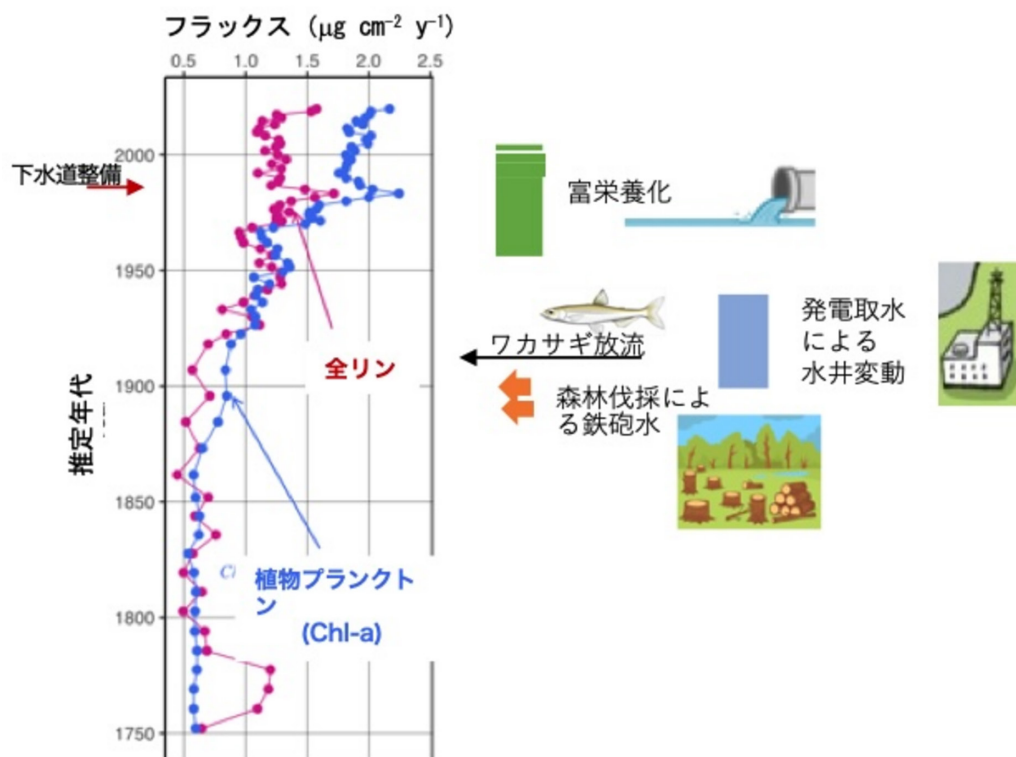


図2. 阿寒湖の堆積物から得られた全リンとクロロフィル量のフラックス及び各年代で記録されている環境変動要因
Fig.2. Fluxes of total phosphorus and chlorophyll pigments from Lake Akan sediments and environmental variables recorded at various ages.

ワカサギ

堆積物から得られた DNA 試料を分析した結果、1930 年代のワカサギ導入後に相当するサンプルからは安定的にワカサギの sedDNA が検出された。しかし、導入以前の試料からはワカサギの sedDNA は全く検出がされなかった (図 3a)。この結果から、魚類の DNA は堆積物に良く保存されていることが明らかとなった。また、観測されたワカサギの sedDNA コピー数の増加は、一次生産量指標であるクロロフィルフラックスの急激な上昇の時期と一致していた (Fig. 3b)。これは、阿寒湖が富栄養化した時期とも一致する (図 2)。つまり、この時期に阿寒湖が富栄養化し一次生産量 (植物プランクトン) が増え、それを餌とする動物プランクトンの生産量も増加したため (占部 2017)、それらを餌とするワカサギも増加したと考えられる。これらの結果は、下記のマリモで示すように補正の検討は行っていない。ただし、次項で示すように、ワカサギ sedDNA が増大する 1950 年代以後であれば sedDNA の減衰量も小さいと考えられることから、補正していないフラックスでもワカサギ個体群の全体的な動向は示していると考えられる。

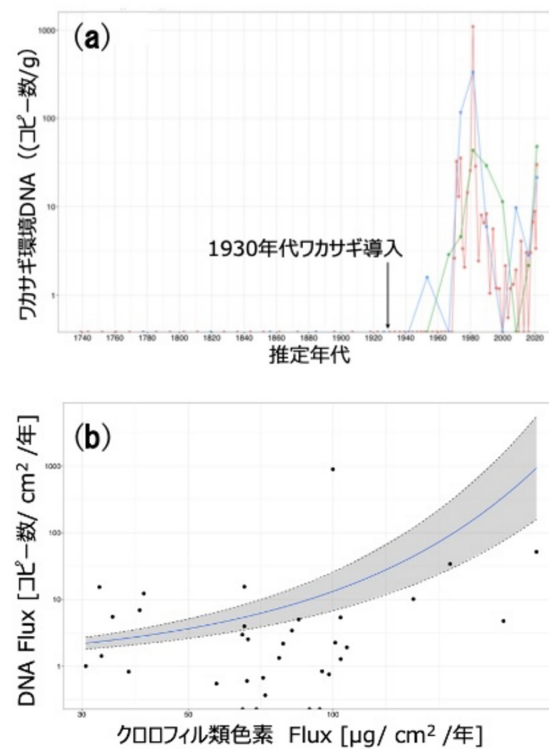


図3. 阿寒湖の堆積物から得られたワカサギのsedDNAのコピー数(a)及び、そのフラックスとクロロフィルのフラックスとの関係(b). 負の二項分布による一般化線形モデルで解析したところ、sedDNAコピー数のフラックスはクロロフィルのフラックスと有意な正の相関がみられた ($p<0.001$)

Fig.3. Copy number of Wakasagi sedDNA from Lake Akan sediments (a) and its flux plotted against chlorophyll flux (b). When analyzed using a generalized linear model with a negative binomial distribution, the flux of sedDNA copy number showed a significant positive correlation with the chlorophyll flux ($p<0.001$).

マリモ

堆積物に保存されていたマリモの 18S rRNA のコピー数を調べたところ、そのフラックスの経時変化は、TP やクロロフィルと良く似ていた (図 4)。すなわち、18S rRNA のフラックスは 1900 年頃までは小さく、1900 年以後に増加した。また、マリモ群体に共存しているネンジュモ科シアノバクテリアの 23S rRNA コピー数のフラックスも、マリモの sedDNA と同様に 1950 年以後増加した。この良く似たパターンは、ネンジュモ科シアノバクテリアがマリモと強固に共存してきたことを示唆している。また、この結果は、マリモの生息密度はかつて少なく、富栄養化にともなって増加したことを示唆している。しかし本当だろうか？堆積物中の sedDNA が分解されることなく長期に保存されているとは限らない。むしろ、時間とともに分解が進むため、過去に DNA が多かったとしても分解により減少している可能性がある。

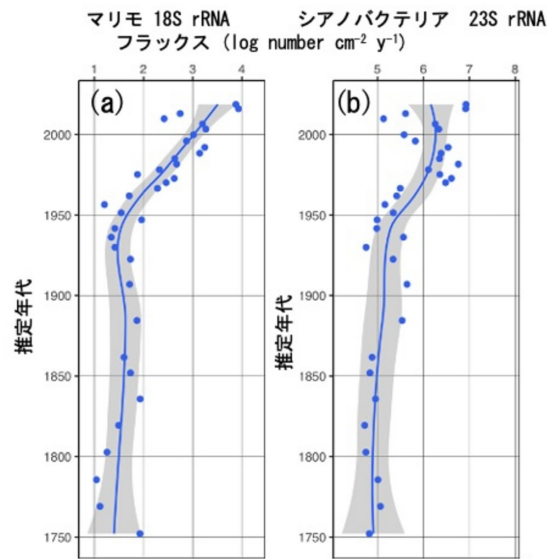


図4. 阿寒湖の堆積物から得られたマリモ(a)とその共生シアノバクテリアのsedDNAコピー数のフラックス(b). 95%信頼限界値を灰色で示した.

Fig.4. Fluxes of Marimo sedDNA (a) and its symbiotic cyanobacteria edDNA from Lake Akan sediments (b). 95% confidence limits are shown in gray areas.

そこで、DNAの分解速度を見積もるため、堆積物中に長期間保存されることが知られているミジンコの尾爪とそのミジンコの12S rRNAのDNAコピー数を定量しフラックスを計算した(図5a)。なお、調べたミジンコの遺伝子座はマリモと異なるが、DNAの長さは150pbs前後と同程度である。ミジンコの尾爪のフラックス(P)とsedDNAコピー数のフラックス(D)を比較したところ、sedDNAと尾爪のフラックスの時間変化は1950年から現在までは似たようなパターンを示した。しかし、1950年以前は両者の経時変化は大きく異なり、DNAフラックスは低かったが尾爪のフラックスはむしろ大きかった。この結果は、DNAは分解され、時間とともに堆積物中で減衰していくことを示している。

両者のフラックスを現在の値(D_0 , P_0)で補正し、その比、すなわちDNAコピー数と尾爪の数との比(f)と経過年数(y)との関係を調べたところ、次の式で表された(図5b)。

$$f = \log[(D_y/P_y)/(D_0/P_0)] = \beta - y^\alpha,$$

$$\alpha (M \pm 95\%CL) = 0.300 \pm 0.053,$$

$$\beta (M \pm 95\%CL) = 1.327 \pm 0.706,$$

$$r^2 = 0.637$$

ここで、回帰係数 α と β の値は非線形最小二乗法により、またその95%信頼限界値はブートストラップ法(iteration=999)により算出した。

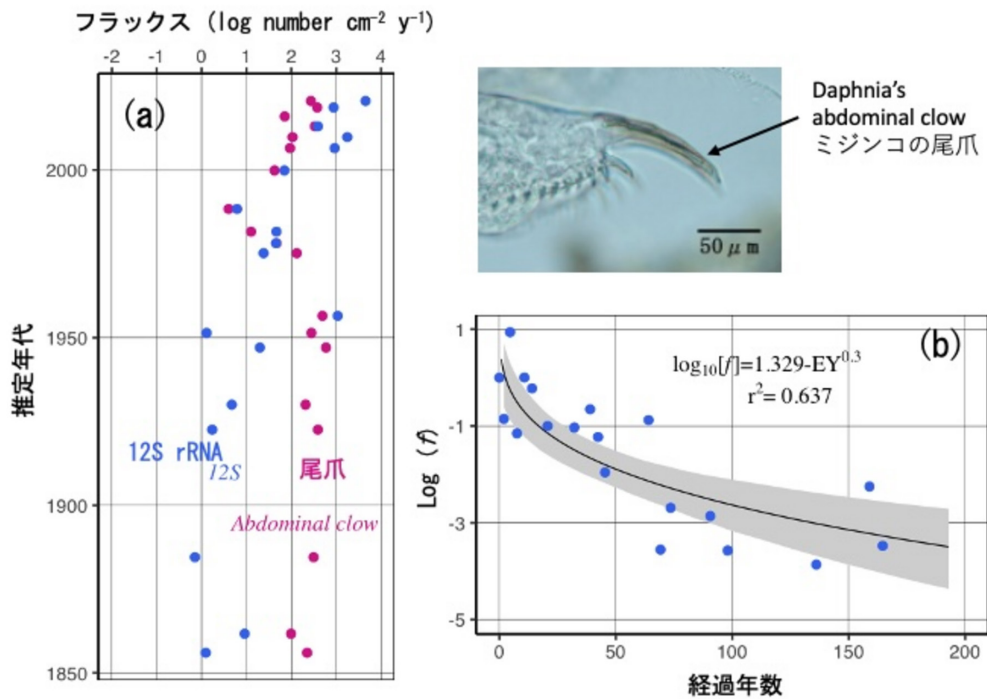


図5. 阿寒湖の堆積物から抽出されたミジンコ (*D. dentifera* + *D. galeata*) の12S rRNAコピー数(D)と尾爪(P)のフラックス(a)及び、D/P比と堆積物の経過年数との関係(b).

Fig.5. Fluxes of 12S rRNA copy number (D) and tail claw (P) of *Daphnia magna* (*D. dentifera* + *D. galeata*) extracted from Lake Akan sediments (a) and the relationship between D/P ratio and sediment age (b).

この f 値を用いて、マリモとシアノバクテリアのDNAフラックスを補正した。この補正値の96%信頼限界値は上述したブートストラップ法により算出した。その結果、マリモも共在シアノバクテリアともに、1900年頃までは今よりも10～100倍多く生息していたことが示唆された(図6)。実際、マリモを天然記念物に指定した吉井義次は、1919年に阿寒湖で調査を行い、マリモが生息する複数の場所を報告している(若菜2008)。この報告をもとにマリモは特別天然記念物に指定された。しかし、DNA量を補正した結果では、マリモは1900年以後減少していた。吉井は、1950年にはマリモの生息場所がチュウルイ湾だけになり、個体群が大きく減少したことを報告しており、今回の結果は、吉井の報告を定量的に裏付けるものである(若菜2008)。阿寒湖では、1950年頃までは、観光化はまだ進んでおらず、富栄養化は顕著ではなかった。1900年頃に比べて1950年代までにマリモが減少した要因として、森林伐採による濁水の流入は発電取水による水位変動をあげられる。1900年前後、阿寒湖集水域では製紙資源として森林が伐採され、濁水の流入が頻繁に生じたという。また、1919年には下流の水力発電所を稼働させるため水位低下することがあった。この水位変動は、湖岸のマリモを干あげてしまったため、個体群を減少させる結果になる。さらにマリモの盗掘も問題となった(若菜2008)。本研究結果は、水位変動や森林伐採に伴う濁水の流入がマリモを減少させたという推定(若菜2008)を裏付けるものである。しかし、1950年には森林の伐採は行われなくなり、水力発電による取水もおこなわれなくなった。それに関わらず、1950年以後にマリモが回復しなかったのは、観光化による富栄養化による可能性が高い。阿寒湖のマリモは観光客をひきつける観光資源であったが、この結果は、観光化による富栄養化によってマリモの回復が阻まれていたことを示唆している。

近年、マリモはさらに減っている兆候があり、sedDNAの結果もそれを裏付けている。2000年以後は、沿岸域での枕水植物や浮葉植物の繁茂、温暖化による呼吸代謝の増加(Nakayama et al.2003)や結氷期間の減少による紫外線の影響(Obara et al. 2022)、波浪による湖岸の打ち上げ(若菜2008)が減少要因として指摘されている。マリモは湖沼生態系のユニークな生物であり、かつては欧州の湖沼に広く分布していたという。しかし、マリモの生息が記録されていたほとんどの湖沼で、マリモは絶滅しており(Boedek 2010)、現在では、大きな球状の群体が生息してい

るのは阿寒湖だけである。本研究で示されたように、集水域の森林伐採による濁水や水位変動、富栄養化などの人為期限の環境変化により、多くの湖沼でマリモは減少したり、あるいは絶滅したりしたのであろう。その意味で、マリモは湖沼の健全性を指標する重要な生物である。現在では生息湖沼は阿寒湖などきわめて限られており、保全していくことが喫緊の課題である。

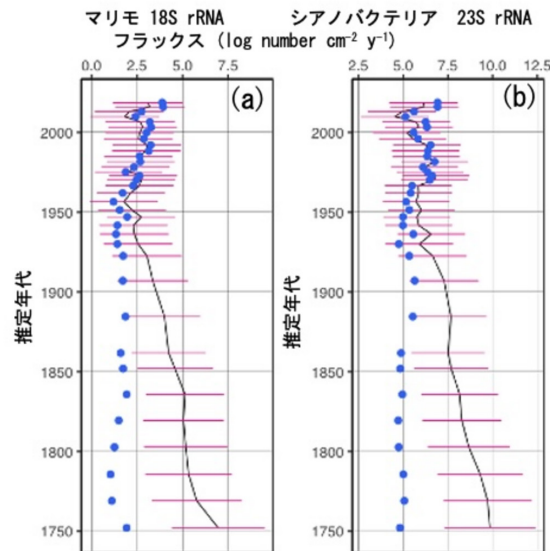


図6. 阿寒湖の堆積物から得られたマリモ(a)とその共生シアノバクテリアのsedDNAコピー数のフラックス補正值(b)。測定値は青点で、補正值は実線で示し、その95%信頼限界値を赤の横線で示した。

Fig.6. Flux-corrected values of sedDNA copy numbers of Marimo (a) and its symbiotic cyanobacteria from Lake Akan sediments (b). Measured values are shown as blue dots, corrected values as solid lines, and their 95% confidence limits as red horizontal lines.

今後の展望

本研究では、sedDNAは堆積物中で分解するため、それ自体は必ずしも過去の生物の量を反映しないことがわかった。本研究で報告したワカサギの結果については、マリモで行ったようなsedDNAの減衰を補正していないが、1960年以後はsedDNAの分解量は限られていることから、過去50年程度であれば補正しなくてもおよその傾向はつかめていると考えられる。しかし50年以上を経過した堆積物では、sedDNAの分解はかなり進行していることから、本研究のマリモで示したような補正が必要であろう。

本研究の最大の成果は、湖底堆積物には過去に生息していた生物のDNAが保存されていることが明らかとなったこと、さらに化石として残る生物を用いてsedDNAの分解速度を測定すれば、化石とならない生物でも湖沼に堆積しているsedDNAから過去の生物量を良く再現出来ることが示されたことである。本研究では、ミジンコの尾爪を微化石の指標として用いたが、珪藻も微化石として長期間保存される、それらもsedDNAと組み合わせることで、過去の生物群集を再現することが可能になるだろう。本研究で得られたこれら新規知見は、湖底堆積物を用いた過去の生物群集の復元に関する研究が更に進展する嚆矢になると考えられる。

謝辞

本研究は、釧路国際ウェットランドセンター・阿寒湖沼群マリモ研究室の若菜 勇氏、神戸大学・人間発達環境の源 利文氏、坂田雅之氏（現北海道大学農学部）、東北大学生命科学研究科の大槻 朝氏、大竹裕里恵氏（現：京大生態学研究センター）、市毛陵太郎氏と共同で行ったものである。調査において、釧路市教育委員会マリモ研究室の使用に便宜を図っていただいた尾山洋一氏に感謝いたします。

引用文献

- [1]Boedeker, C., Eggert, A., Immers, A., & Smets, E. (2010). Global decline of and threats to *Aegagropila linnaei*, with special reference to the lake ball habit. *BioScience*, 60(3), 187-198.
- [2]Nakayama, K., Komai, K., Amano, M., Horii, S., Somiya, Y., Kumamoto, E., & Oyama, Y. (2023). Ideal water temperature environment for giant Marimo (*Aegagropila linnaei*) in Lake Akan, Japan. *Scientific Reports*, 13(1), 16834.
- [3]Obara, A., Ogawa, M., Oyama, Y., Suzuki, Y., & Kono, M. (2022). Effects of high irradiance and low water temperature on photoinhibition and repair of photosystems in Marimo (*Aegagropila linnaei*) in Lake Akan, Japan. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 60.
- [4]Ohtsuki, H., Awano, T., Tsugeki, N. K., Ishida, S., Oda, H., Makino, W., & Urabe, J. (2015). Historical changes in the ecosystem condition of a small mountain lake over the past 60 years as revealed by plankton remains and *Daphnia* ephippial carapaces stored in lake sediments. *PLoS One*, 10(3), e0119767.
- [5]Sakata, M. K., Yamamoto, S., Gotoh, R. O., Miya, M., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2020). Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA*, 2(4), 505-518.
- [6]Tsugeki, N., Oda, H., & Urabe, J. (2003). Fluctuation of the zooplankton community in Lake Biwa during the 20th century: a paleolimnological analysis. *Limnology*, 4, 101-107.
- [7]Wakana, I., Kadono, Y., Urabe, J., Tamura, Y., Suzuki, Y., Yamada, H., ... & Ohara, M. (2023). Varying stages of ecological succession in lakes subdivided by volcanic eruptions at Akan Caldera, Japan. *Hydrobiologia*, 850(18), 3919-3933.
- [8]加 三千宣 (2014)In 湖沼近過去調査法：より良い湖沼環境と保全目標設定のために（占部城太郎編集），pp16-30: 共立出版
- [9]占部城太郎 (2017) 湖沼堆積物から阿寒湖の歴史を再現する． In 阿寒湖の自然：最新研究が解き明かす「火山・森・湖」とアイヌ民族の物語（佐藤 謙・日野修次・和田恵治・若菜 勇 監修），pp57-80: 釧路叢書 第 37 巻
- [10]若菜 勇 (2008) 阿寒湖におけるマリモの打ち上げ現象－保全対策の歴史・現状と課題 北海道の自然 第 46 号 33-41

本助成研究にかかわる成果

〔口頭／ポスター発表〕

- 1.Sakata M. K., Kuwae M., Ohtsuki H., Wakana I., Minamoto T., Urabe J. (2023) Fish population dynamics in Lake Akan associated with eutrophication reconstructed by sedimentary DNA. The eDNA Society International Meeting, Ohtsu 2023 年 5 月 Poster
- 2. 坂田雅之, 加 三千宣, 大槻 朝, 若菜 勇, 源 利文, 占部城太郎 (2023) 堆積物 DNA を用いた阿寒湖における魚類個体群動態の復元」日本陸水学会第 87 回大分大会, 2023 年 10 月, 口頭発表

3. Sakata M. K., Kuwae M., Ohtsuki H., Wakana I., Minamoto T., Urabe J. (2023) Fish population dynamics in Lake Akan associated with eutrophication reconstructed by sedimentary DNA. SedaDNA Meeting Potsdam 2023 年 6 月 poster
4. 占部城太郎 (2023) 阿寒湖の近過去復元プロジェクト 浅虫セミナー, 青森県浅虫 [2023 年 9 月 12 日] 口頭発表
5. 占部城太郎, 大槻 朝, 大竹友里恵, 市毛陵太郎, 源 利文・坂田雅之, 若葉 勇 (2023) マリモの過去 150 年をミジンコで復元する 日本生態学会東北地区会 (福島), 2023 年 11 月, 口頭発表
6. Urabe, J., I. Wakana, M. Kuwae, T. Minamoto, M. Sakata, H. Ohtsuki, Y. Ohtake, R. Ichige. (2023) Reconstruction of the Lake Ball (Mariomo) population in Lake Akan for the last 150 years using *Daphnia*: A study with sedDNA. A special Seminar, College of Urban Science, Yokohama National University, 13 Nov. 2023