

環境DNAメタバーコーディングによる魚類相解析

龍谷大学理工学部・講師/里山学研究センター・研究員
山中 裕樹

はじめに

滋賀県東近江市地域を集水域とする愛知川とその周辺水域を対象として、環境DNAメタバーコーディングによる魚類相の調査を実施している。環境DNAとは土中、水中などの環境中に含まれるDNA全般を指す用語で、微生物のみならず、魚類などの大型生物が体外に放出したDNAも含まれている。放出源は未だ明確にはなっていないが、これら大型生物の上皮組織（体表面や腸管の内壁など）が更新されて剥がれ落ちた細胞が環境中を漂っていると考えられる。微生物学の分野では、古くから環境DNAの分析によってその場に生息する微生物群集を明らかにするような手法が用いられてきていたが、2011年にフランスの研究チームが外来種であるウシガエル*Rana catesbeiana*のDNAをため池の水から検出できたとする報告（Ficetola et al. 2011）をして以降、大型生物の検出への環境DNA分析の適用例が急速に増加している（高原ら2016）。単純には環境中から集めたDNAをPCRやシーケンシングといった既存の分子生物学的手法によって分析し、種を識別するための適切なマーカー遺伝子を使って同定・検出を行う技術である。初期の研究ではウシガエルをはじめとして、コイ*Cyprinus carpio*（Takahara et al. 2012）、ブルーギル*Lepomis macrochirus*（Takahara et al. 2013）など、特定の種を対象に分析する「種特異的な検出」がほぼすべてを占めていた。その一方で、Minamoto et al. (2012) に始まる、複数種を同時に検出する試みも進んできた。2015年になり、Miya et al. (2015) では魚類全般のDNAを環境DNA試料中からユニバーサルに増幅し、次世代シーケンサーでの分析と組み合わせる種組成を網羅的に明らかにできる分析技術が確立され、このような環境DNAメタバーコーディングを用いた研究・調査が一般化しつつある。本研究報告では、簡単に環境DNAメタバーコーディングの方法論を解説したのち、伊庭内湖と、それにほど近い琵琶湖本湖の湖岸に位置する長命寺で採取した環境DNA試料から得られたデータを紹介する。

環境DNAメタバーコーディングの原理と方法

商品に貼られたバーコードのようにDNA塩基配列の一部を「ピット」と読み取って種を同定するのが、バーコーディングであり、大量の同定作業をハイスループットに行うことをメタバーコーディングと呼ぶ。バーコーディングの要諦は、効率よく種を識別できる遺伝子領域を選定することにある。Miya et al. (2015) においては、ミトコンドリア12S領域をバーコーディング領域として利用している。Miya et al. (2015) はこの12S領域の中に「超可変領域」、すなわち種間での塩基配列の差異が明瞭に読み取れる、非常に変異に富んだ領域を発見して、種の同定に用いている。ただ、このようにバーコードとして優秀な領域を見つけたとしても、それ

だけではバーコーディングには利用できない。次の段階では、このような領域を「挟む」形で、DNAをPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）によって高濃度に増幅する必要がある。特に環境DNAの場合は水中を漂うDNAの濃度は極めて低く、一旦PCRによって増幅しなくては、塩基配列を決定するシーケンシングに供することができない。Miya et al. (2015) では超可変領域のちょうど外側に、多くの魚種で共通する塩基配列があることに着目し、PCRで増幅する領域を指定する役割を持つ「プライマー」（MiFishプライマーと名付けられている）をこの部分に設計した。つまり、種の識別に使うバーコードを挟んだ領域を、どの種でも構わず増幅したのちに、次世代シーケンサーで網羅的なシーケンシングを行うという事である。バーコードの中身は変化に富んでいて種の識別に便利でありながら、PCRの段階では1セットのプライマーで種を選ばず増幅できる、というのがポイントである。

本研究ではMiFishプライマーと、里山学研究センターで購入した次世代シーケンサーMiSeq（illumina社）を利用して、環境DNAメタバーコーディングを実施している。今回用いた環境DNA試料は、2016年11月に伊庭内湖で採取したもの、そして、比較として2015年12月に琵琶湖本湖の湖岸（近江八幡市長命寺町）で採取したものである。調査時には現地では0.5Lの湖水を採取して直ちにろ過し、ろ紙を冷凍保存で研究室へ持ち帰った。このろ紙から、水中を漂っていた環境DNAをYamanaka et al. (2016) の方法に従って抽出して試料を得た。得られた環境DNA試料は冷凍すれば半永久的に保存・利用が可能である。これらの試料をMiya et al. (2015) のプロトコルに従ってMiFishプライマーでPCR増幅し、次世代シーケンサーで網羅的なシーケンシングを行った。得られた塩基配列情報をMiya et al. (2015) が整備したデータベース、すなわち各魚種のDNA塩基配列情報が格納されたデータベースに照会し、種の同定を行った。

得られた結果と解説

結果として、表1の通り、長命寺では23種、伊庭内湖では20種、総計では28種の魚類が確認された。オオクチバスやブルーギル、フナ*Carassius sp.*などのように琵琶湖でも内湖でも確認された種がいる一方で、一方でしか確認されない種もいた。琵琶湖でのみ確認されたのはシロヒレタビラ*Acheilognathus tabira tabira*やウグイ*Tribolodon hakonensis*などで、内湖でのみ確認されたのはタモロコ*Gnathopogon elongates*やモツゴ*Pseudorasbora parva*などであった。ある季節（今回は晩秋）のみのデータ、かつ、採取した年が異なるサンプルでの比較であるのでこうした種組成の地点間差がどういった意味を持つのかについては確たる解釈ができない状況ではあるが、東近江市の愛知川下流域に位置する両水域で、1季節だけで見ても30種近い魚類が生息していること、そして、琵琶湖と内湖とでは種組成に多少の差があるかもしれないことが示唆された。すでに愛知川を含めた周辺の琵琶湖流入河川では昨年夏に、そして琵琶湖と内湖においては継続した季節的なサンプリングを実施しており、今後の分析によって愛知川周辺水域での種組成やその季節変化情報、そしてそこから推測される、河川、内湖、琵琶湖の間での魚類の移動について知見が得られる見込みである。なお、2015年から2016年にかけての琵琶湖本湖の全周囲で4季節に採取した試料をすべて分析したところ、全体で50種が検出されている。

なお、表1の和名欄を見るとわかる通り、種のレベルまで同定できない分類群もあった。これは、今回利用しているバーコーディング領域では、種間で塩基配列が重複してしまい区別で

きない種がいるという事を示している。例えばフナであればゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri* とフナ属という区分になっており、琵琶湖にいるフナ属 3 種のうち、ギンブナ *C. auratus langsdorffii* はニゴロブナ *C. a. grandoculis* と区別できないということである。こうした分類群は正確には複合種やlineageなどと呼ぶのが適切で、種と呼ぶのは間違であるが、本報告文の中では簡便のために種という語を用いた。こうした複合種の問題はバーコーディング領域を変えることでしか解決されることはないため、より高解像度の同定ができる領域へ乗り換えることも必要かもしれない。しかし、どの種のDNAも押しなべて増幅できるようなプライマーを設計可能、かつ、更に種間での差が大きい領域を見つけるというのは困難を極める。本研究では今後も、現時点でもっとも高いバーコーディング能力を持つMiFishプライマーを基本として利用することになるだろう。

流域一貫で健全な水系の接続性が保たれることが、多様な空間利用をしている琵琶湖淀川水系の魚類群集の健全な生活史の維持につながる。今後もプロジェクトの中で広い空間スケールでのモニタリングを続け、種ごとの移動や空間利用について、そしてそこに人為が関わる不都合が起こっていないかについて、明らかにしていきたい。

引用文献

- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4 : 423-425.
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN, Kawabata Z (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 13 : 193-197.
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes : detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2 : 150088.
- Takahara T, Minamoto T, Doi H (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLOS ONE*, 8 : e56584.
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLOS ONE*, 7 : e35868.
- 高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子 (2016) 環境DNA技術の現状と手法確立に向けた展望. 日本生態学会誌66 : 583-599.

表1. 長命寺と伊庭内湖の試料を用いた環境DNAメタバーコーディングの結果。
学名が太字となっている種は、どちらか一方の地点でしか検出されなかった種を示す。

長命寺 (2015年12月)	伊庭内湖 (2016年11月)	
学名	学名	和名
<i>Acheilognathus rhombeus</i>	<i>Acheilognathus rhombeus</i>	カネヒラ
<i>Acheilognathus tabira tabira</i>		シロヒレタビラ
<i>Anguilla japonica</i>		ニホンウナギ
<i>Biwia zezera</i>	<i>Biwia zezera</i>	ゼゼラ
<i>Carassius cuvieri</i>	<i>Carassius cuvieri</i>	ゲンゴロウブナ
<i>Carassius</i> sp.	<i>Carassius</i> sp.	フナ属 (ニゴロブナおよびギンブナ)
<i>Cottus reinii</i>		ウツセミカジカ
	<i>Channa argus</i>	カムルチー
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	コイ
<i>Gnathopogon caerulescens</i>	<i>Gnathopogon caerulescens</i>	ホンモロコ
	<i>Gnathopogon elongatus</i>	タモロコ
<i>Gymnogobius isaza</i>		イサザ
<i>Gymnogobius urotaenia</i>	<i>Gymnogobius urotaenia</i>	ウキゴリ
<i>Hemibarbus</i> sp.		ニゴイ属 (ニゴイおよびコウライニゴイ)
<i>Lepomis macrochirus</i>	<i>Lepomis macrochirus</i>	ブルーギル
<i>Micropterus</i> sp.	<i>Micropterus</i> sp.	オオクチバス属 (オオクチバスおよびフロリダバス)
	<i>Odontobutis obscura</i>	ドンコ
<i>Opsariichthys uncirostris</i>	<i>Opsariichthys uncirostris</i>	ハス
	<i>Paramisgurnus dabryanus</i>	ドジョウ類 (広義)
<i>Plecoglossus altivelis</i>	<i>Plecoglossus altivelis</i>	アユ
<i>Pseudogobio esocinus</i>		カマツカ
	<i>Pseudorasbora parva</i>	モツゴ
<i>Rhinogobius</i> sp.	<i>Rhinogobius</i> sp.	ヨシノボリ属の1種
<i>Sarcocheilichthys</i> sp.	<i>Sarcocheilichthys</i> sp.	ヒガイ属 (ビワヒガイおよびカワヒガイ)
<i>Silurus</i> sp.		ナマズ属 (ナマズである可能性が高い)
<i>Tribolodon hakonensis</i>		ウグイ
<i>Tridentiger</i> sp.	<i>Tridentiger</i> sp.	チチブ属 (ヌマチチブと思われる)
<i>Zacco platypus</i>	<i>Zacco platypus</i>	オイカワ
23種	20種	全28種