

第6回研究会

次世代シーケンサーによる環境DNA分析でできること 里山里湖の生物相解析に向けた応用

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

概要

これまでの生物調査は現地に出向き、対象生物を直接捕獲したり長時間滞在して目視観測するなどの作業が必要なために多大な労力が必要であり、また調査者の能力（捕獲技量など）によってデータにばらつきがあった。しかし、環境DNAを調べる方法により小労力で生息種の推定が可能であり、その検出力も高く、また調査者の能力による影響などが小さくすむ。環境DNAとは、生物からでる粘液や排泄物などの中にあるDNAが水中に溶け込んだ状態のものをいう。この環境DNAをうまく回収すると種の同定が可能となるが、環境DNA自体が水に溶け込んでいる量が非常に少なく（どれだけ多くとも0.01ng/L程度）、かなりの濃縮が必要である。そこで重要となってくるのがPCRの技術である。PCRとはとても量の少ないDNAを増幅させる技術である。DNAは温度を上げると二重螺旋構造が解け、一本鎖になる。そこに特定の種のDNAだけに合うプライマーを結合させ、ついになる鎖を合成し、再び温度を上げて分解してプライマーを結合させるというPCRの行程を繰り返すことにより、特定の種だけのDNAを増幅させることが可能となる。よって特定の種だけに合うプライマーの作成がとても重要となってくる。これまでの研究例としては、天然記念物の為肉片の採取が困難であるオオサンショウウオが京都の桂川のどの支流に生息しているか環境DNAを使って調査を行っている。これにより生息の有無だけでなく日本産のものと中国産のものととの区別も可能である。またヌートリアでも研究が行われており、環境DNAの検出データと地理データを合わせることで、ヌートリアがどのような特徴の地形に侵入しているのかを推定することが可能である。DNAは分解スピードが速いため、河川などで調査を行っていても上流のものが下流でも採取されるという可能性は低い。

そして、本プロジェクトでは次のステップとして「次世代シーケンサー」を用いてこれまでの種ごとの解析から網羅的な解析へ進めようと考えている。この技法は実際に沖縄の美ら海水族館の水槽の中の水をバケツで1杯すくい、その中の環境DNAを分析したところ水槽内にいる種の90%を検出している。DNAを構成している塩基配列というのは言い換えれば生物のバーコードである。そのバーコードを一斉に全部読み取るのが次世代シーケンサーである。またこのバーコードには、魚が共通に持っている部分と種毎に異なっている部分が存在している。そこで魚共通のプライマーを作成することにより、魚のみのDNAを増殖させることが可能となる。この様子をNHKの番組で取り上げられた様子を研究会では視聴した（<http://cgi4.nhk>。

or.jp/eco-channel/jp/movie/play.cgi?did=D0013773421_00000)。魚のDNA解読はおよそ3万種の内6000種がすでに終わっている。現在はそれぞれの生物グループ（分類群）に最適化したプライマーの開発が進行している。魚が共通に持っている部分のプライマー（MiFishプライマー）を用いた研究では琵琶湖、内湖、水田、河川な生活史ないに複数の環境を利用する種の持続性評価やすべての種の季節変動などを知ることができる。現在の研究の進歩としては内湖での季節的採水を開始、全主要河川での採水を終了し、安定的運転に向けて習熟中である。発表後、質疑応答の時間が設けられ、環境DNAの検出範囲や他生物（貝や水草など）でも分析は可能なのか、過去の水や地層からの分析の可否などの質問が上がった。海や琵琶湖など大きな湖の場合、流れは日によって時間によって異なる上に、DNAの残存率には温度依存性もある。河川であると数キロで消えてしまう感覚であるので、それよりは数百メートル範囲内ものは拾えていると思われる。過去の水でも環境DNAが存在していれば可能だが、保存されている大抵のサンプルにはホルマリンが入っているため不可能。ホルマリンが入っていないサンプルを募集中。泥や地層からは理論上可能であるが水中でもごく少量しか入っておらずかなり濃縮しているので現段階では異物の多い泥などからは困難であるとのことであった。またオオタカのように里山的動物のような里湖的魚の特徴づけは可能かという質問に対して、いくつかのハビタッドがかかわる生物種がいるが、それを里湖とどのように絡めるかが難しい。メダカやドジョウが当てはまるのではとの意見も出ていた。他にも多くの多種多様な質問が挙がり、有意義な研究会ができたと思われる。

発表会後には林先生から前日に行われた3班の会議の内容と牛尾先生からオープニングシンポジウムについての話し合いの場が設けられた。