

魚類の環境DNAメタバーコーディングにおける 採水方法と検出種数の関係についての検討

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

どこにどのような生物が生息しているのかという情報は生物群集の動態を知るうえで最も基礎的な情報であり、生態系の管理や希少種の保全を進めるために不可欠なものである。

近年、環境DNA分析と呼ばれる技術が生物の分布を調査する手法として新たに登場した(Ficetola et al. 2008, Minamoto et al. 2012)。捕獲や観察のような既存の調査手法と比較すると、現地調査では水を採集するだけである環境DNA分析は生物や生息場所に対して非破壊的であり、かつ、捕獲調査などより高感度に生息している生物も検出することができる技術である(Takahara et al. 2013, 高原ら 2016)。土壌や堆積物中の環境DNAと比較すると、水中ではより均一にDNAが分散していることから、水を試料とする環境DNA分析は特に利点が多いと考えられる。これまでは環境DNA分析における主力技術はPCRをもちいた特定種の検出であり、対象となる希少種や少数のいくつかの種を検出する場合には非常に高い感度のおかげで多くの研究において良好な結果が得られている。しかしながら、この高い分析精度の一方で、この手法は対象とする生息場所に棲む生物群集の構成をまとめて明らかにするという事はできない。

ごく最近になって、環境DNA分析に新たなオプションが加わり、これは環境DNAメタバーコーディングと呼ばれている。DNAの特定の領域の塩基配列を読み取ることでバーコードのように種を識別していく方法で、生物群集の種構成を一度に明らかにすることができる。環境DNAメタバーコーディングは種の識別のために同定の専門家が不要であるという点や、サンプル当たりの調査・分析コストが低い事、そして水を試料としていることで、空間的にカバーされる範囲が大きいことなど、様々な利点を持っている。

この新技術をもちいた研究例は急激に増加しており、水族館等の「正解」がわかっている状況でのテストを行った研究では、非常に高い精度で生息する魚類の種構成を推定できることが報告されている。野外調査への展開も進んでおり、淡水域のみならず海域でも魚類の検出に利用され、また、両生類や哺乳類、そして水棲無脊椎動物といった他の分類群への応用も始まっている。この高感度、かつ汎用性の高い環境DNAメタバーコーディング技術は今後、時空間的に広がりを持った広域調査での利用が広がっていくはずである。

広域での生物多様性調査に環境DNAメタバーコーディングを適用する場合、その技術のもつ高い検出能力をできる限り低下させずに、しかし、調査努力量をうまく節約する方法を考案することが必要になる。環境DNA分析は現場では水を汲むだけであるという簡便さがその特色ではあるが、超広域・超長期での調査を実施することになれば、それでも調査の効率化が求

められる。ただ、種を網羅的に検出することを目的とする場合、調査地点数を減らすと生物多様性を過小評価する可能性があり、これはこれまでの水域での環境DNAメタバーコーディングの例が示す、水中の環境DNAは大きな空間規模では空間自己相関をもって分布しているようであるということから推測される。調査・分析の努力量を減らしうるもう一つの候補は、採水した水を混ぜる、という方法である。これは複数地点から採取した水試料を混ぜてから濾過・DNA抽出ことでサンプル数を減らす手法である。このpoolingと呼ばれる方法は土壌微生物などの群集構造の解明を目的とした過去の研究では一般的に利用されてきたものであるが、群集構造が非常に複雑である場合、稀少な種のDNAが相対的に希釈されてしまう事で、無視できない割合で検出されなくなる分類群がでてしまうという問題が指摘されている。ただし、魚類の群集構成は土壌微生物のそれに比べると明らかに単純であるため、poolingは広域的な魚類の生物多様性評価において効率的な手法となりうると考えられる。

本稿では、この省力化の手法と1地点ごとに独立に分析する手法とで検出される魚類群集の情報がどれほど違うのかについて検討した研究例を報告する。調査は滋賀県に位置する琵琶湖へ、水路によって接続している付属水域である内湖のうち、大きさの異なる4つの内湖で実施した。結果の比較から、省略化手法が生物多様性の評価という点で環境DNAメタバーコーディングによる調査の効率を低下させることがないかについて検証した。

調査地と分析方法

採水調査は琵琶湖東部に位置する、面積が大きく異なる4つの内湖を対象として実施した(図1)。野田沼、曾根沼、伊庭内湖、西ノ湖はそれぞれ面積が84K、216K、490K、2219K平方メートルであり、最小である野田沼は西ノ湖のおよそ26分の1の規模である。今回の研究の目的は水域内の魚類相組成を環境DNAメタバーコーディングによって明らかにするにあたって、水試料を混合するという省力化手法が結果にどのように影響するかを知ることにある。対

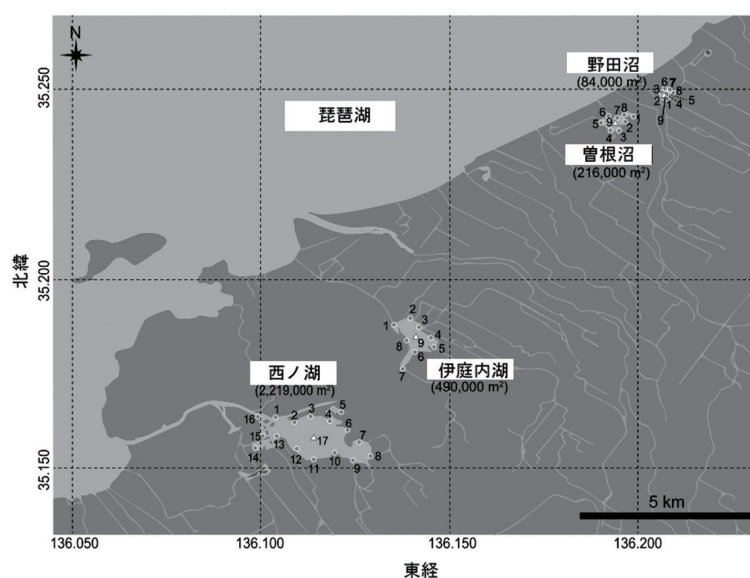


図1. 調査地点を示す。琵琶湖本湖の東岸に位置する4つの内湖。それぞれの内湖の名の下にカッコ書きで面積を示している。丸印は沿岸部の採水地点、三角印は沖の中央部の採水地点を示す。Sato et al. (2017) を改変。

象水域の大きさと採水地点間の距離が独立性を決めていると考えられるため、水域の規模が水試料混合の効果に間接的に影響しているはずである。よって、今回はこれら面積が大きく異なる内湖を対象として選択した。

各内湖では周囲をおおよそ8分割するように8地点の採水地点を設定した（丸印：図1）。ただし、最大の内湖である西ノ湖には16地点を配置した。また、さらに各内湖の沖帯を代表する地点として、おおよそ中央に各1地点を配置した（三角印：図1）。それぞれの地点で0.5リットルの水試料を2検体採取し、一方を個別にGF/Fフィルターによる濾過とDNA抽出を行う試料とし、他方を混合したのちに濾過とDNA抽出を行う試料とした。混合試料では、混合した水試料から0.5リットルを取り出したものを濾過して代表試料とした。

フィルター試料からのDNA抽出はYamanaka et al. 2016に従って実施し、それぞれのフィルター試料から最終的に100 μ lのDNA溶液を得た。これらの環境DNA試料それぞれに対してMiya et al. 2015にはほぼ準じて環境DNAメタバーコーディングを実施した。簡単には、各DNA試料2 μ lに対してMiFishプライマーをもちいた15繰り返しのPCRを行って、できるかぎり各DNA試料中に存在している魚類のDNAを漏れなく増幅することを試みて、それぞれの繰り返しから得られたPCR産物を独立に解析できるよう、次のステップで個別にインデックスを付加した。個別試料、混合試料のすべてに同様の処理を行ってライブラリーを調整した。次世代シーケンシングはillumina社のMiSeqをもちいて150bp $\times$ 2のペアエンドシーケンスを行った。得られたシーケンスデータはMiya et al. 2015の解析パイプラインに従って処理され、BLAST検索によって各試料中（かつ、各PCR反復の中）から得られたシーケンスに種を割り当てて同定作業を行った。

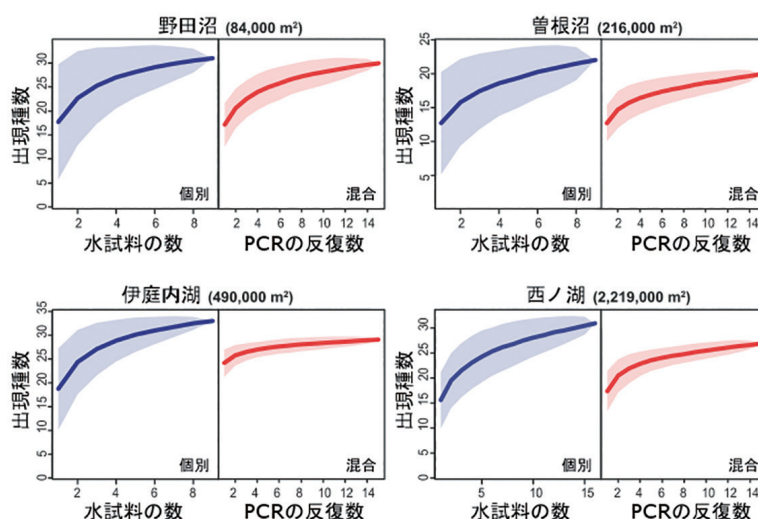


図2. 各内湖から環境DNAメタバーコーディングによって検出された出現種数を示す。それぞれの内湖に個別試料と混合試料の分析結果を示す。前者は横軸に水試料の数、後者は横軸にPCRの反復数をとり、それぞれ努力量（分析試料数と分析回数）の増加による出現種数の変化を表している。Sato et al. (2017) を改変。

結果

最終的に、全体で43種（種のレベルではなく、属レベル等でまとめられている分類群も含む）が検出された。個別試料では、野田沼、曾根沼、伊庭内湖、西ノ湖でそれぞれ31、22、33、31種が検出された一方で、混合試料ではPCRの繰り返し15回の結果として、それぞれ30、20、29、27種の検出であった。個別試料からは検出されるが混合試料からは検出されない種の数、内湖の面積が大きいほど多くなる傾向がみられた。個別試料では内湖ごとの採水地点数を増やすほど、そして混合試料ではPCRの繰り返し数を増やすほど、検出種数が増える傾向があり、それぞれ飽和しつつある状況であった（図2）。この飽和の曲線から推定される最終的な検出種数は、いずれの内湖についても個別試料の場合に大きくなった。次世代シーケンシングで得られたDNAのシーケンスデータのうち、それぞれの内湖で個別試料から0.05%未満の量しか検出されないような種は、混合試料からはほぼ検出されなかった。

おわりに

今回の結果からは、淡水魚類の環境DNAメタバーコーディングでは多くの地点から少量の水を集めて分析していくと、種の検出数が増加していくことが明らかになった。内湖で検出された種数を個別試料と混合試料で比較することで、水試料を混合するという省力化手法は作業努力量の削減には役立つものの、水試料を個別に扱う方法に比べるといくらか検出種数が低下するであろうことが明らかになった。そして、このような効果はより大きな内湖で顕著であった。よって、種の多様度を評価しようとする場合、環境DNAメタバーコーディングではこの省力化手法は使用しない方が賢明であると考えられる。しかしながら、混合手法は採水地点による種構成の違いを平均化するようであり、代表的な魚類の組成を水域間で比較するのには有効であろうことも示された。稀少な種まですべて検出して種多様性を明らかにしようとするような場合には使えないであろうという注意は必要なものの、水を混合する省力化手法はその水域での代表的な種組成の状況を長期的に小労力でモニタリングする場合などに、調査戦略の選択肢となるであろう。なお、本研究例はSato et al. (2017) としてScientific Reportsで発表された。

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.
- Sato H, Sogo Y, Doi H, Yamanaka H (2017) Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities. *Scientific Reports*, 7 : 14860.
- 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.
- 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.

Yamanaka H, Motozawa H, Satsuki S, Tsuji S, Miyazawa RC, Takahara T, Minamoto T (2016) On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. *Ecological Research* 31 : 963-967.