

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25281029

研究課題名(和文) 次世代シーケンス解析に基づく土壌動物の生物多様性および機能性評価システムの開発

研究課題名(英文) The development of systems for evaluation of biodiversity and functioning of soil animals based on next-generation sequencing analysis

研究代表者

中森 泰三 (Nakamori, Taizo)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・准教授

研究者番号：50443081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：小型土壌動物の一群であるトビムシ類を対象に、群集サンプルから次世代シーケンサーを用いて種多様性、系統的多様性、および機能的多様性を評価する手法を開発するための基盤を築いた。すなわち、日本産トビムシ類約100種についてDNAバーコーディングと分子系統推定を行うとともに、一部の種については文献調査および室内外の観察により機能形質データを収集し、さらに、次世代シーケンサーを用いた群集解析のプロトコルを提示した。

研究成果の概要(英文)：This project contributed to the development of methods for evaluating species, phylogenetic, and functional diversities from community samples of Collembola, a major group of soil arthropods, based on next-generation sequencing. DNA barcoding was performed for about 100 species and their phylogenetic tree was estimated. Trait data were obtained by literature surveys and laboratory and field observations for some species. A quantitative protocol for community analysis using next-generation sequencing was provided.

研究分野：動物・微生物生態学

キーワード：DNAバーコード

1. 研究開始当初の背景

土壌生態系は生物の種やその遺伝的な多様性の宝庫として貴重な資源であるだけでなく、陸上生物が存続するための基盤となる機能(有機物の分解とそれとともなう養分のリサイクル)を担っている。人類の持続可能な発展に向けて土壌環境の保全と管理が必須であり、世界各地で土壌生物群集のモニタリングによる影響評価が求められるようになってきた。

陸のプランクトンとも呼ばれる体長 1mm 程度の中型土壌動物は種多様性が高く、その多様性は環境指標として利用されている。また、それらの動物は摂食排泄活動を通して養分のリサイクルに貢献しており、種ごとに餌や摂食量が異なるので、構成種の顔ぶれにより他の生物や物質循環に与える影響が異なる。したがって、種の性質(形質)についての情報があれば、環境変化によりどの種が増減し、それが生態系の機能性においてどのような意味をもつのかを知ることができる。しかしながら、同動物群を同定するためには顕微鏡下で一個体ずつ形態を観察する必要があり、さらにそれらを同定できる分類学者が少なくなっているため、研究の進展が遅れている。一部の専門家だけでなく、環境評価者にも広く利用可能な土壌動物多様性評価ツールが国際的に求められている。

次世代シーケンサーは膨大な数の DNA 鎖の塩基配列を一度に短時間で決定できる技術であり、迅速簡便な生物群集解析ツールとして期待されている。しかし、これを土壌動物を用いた環境評価に広く使えるものとするためには、シーケンスと種および機能形質の対応、土壌動物群集に適用するための実験手法、および、多量なシーケンスデータから意味のある情報を引き出すためのバイオインフォマティクスの要素からなる一連の解析手法をシステムとして構築する必要がある。

種とシーケンスの対応づけは DNA バーコーディングと呼ばれ、DNA バーコード(ゲノム DNA の短い領域のうち、種の違いを識別できる変異を含むもの)を利用した種同定が世界的に注目されている。これを利用するためには、まず、どの種がどのような配列を有しているかというデータを蓄積し、その証拠となる生物標本を保管する作業が必要である。ひとたびこのようなデータが揃えば、バーコードを読み取る(塩基配列決定)という機械的な作業で種同定が行えるようになり、さらに次世代シーケンサーを適用すれば生物群集をまとめて解析できるために、一個体ずつ解析しなくても済むようになる。しかし、中型土壌動物の DNA バーコードに関する情報は不足しており、データの収集が待たれている。

2. 研究の目的

トビムシ類について DNA バーコーディン

グを行うとともに、遺伝的多様性の評価を可能にするために種間の系統遺伝学的距離を明らかにする。

トビムシ各種の形態形質についての情報を文献調査により整理する。加えて、室内実験や野外観察により生態学的形質を明らかにする。

次世代シーケンサーによる中型土壌動物群集解析手法を開発する。また、次世代シーケンスデータから多様性および機能性を評価するための計算ツールを開発する。さらに、事例研究により本解析システムの適用可能性を検証する。

3. 研究の方法

DNA バーコーディングと系統関係の解析：京都大学上賀茂試験地をモデル試験地とし、同試験地から重点的に多様なトビムシ類を採集した。また、地理的変異などをみるために、北海道から沖縄にかけてトビムシ類を採集した。全身を写真に撮影し、その後、標本を残したまま DNA を抽出し、ミトコンドリアチトクロームオキシダーゼ I 遺伝子(mtCOI)、ミトコンドリア 16S リボソーム遺伝子(mt16S)、核 28S リボソーム遺伝子(nr28S)の一部の領域の DNA 塩基配列を決定した。得られた DNA 塩基配列データをもとに分子系統関係を推定した。

機能形質データの収集：文献から形態情報を抽出し整理した。加えて、室内実験や野外観察により食性や生活史などの生態学的形質を明らかにした。

中型土壌動物群集解析手法の開発および計算ツールの開発：土壌から分離されたトビムシ試料およびトビムシを含む土壌試料を用いて DNA 抽出の最適条件を検討した。既知数のトビムシ(飼育個体群)を用いて、次世代シーケンサーによるリード数と個体数の関係性を検証した。動物の DNA バーコードを次世代シーケンサー(Roche 454)で解読するためのプローブ(プライマー)を新たに開発し検討した。モデル試験地のトビムシ類を採集して、配列データベースを整備し、これに基づいて群集サンプルの DNA 塩基配列から種同定をおこなった。

適用事例研究：京都大学上賀茂試験地に試験区を設けた。温暖化による根からの炭素源(グルコース)供給量の変化による群集への影響を模した野外実験を行った。2014年7月にグルコース水溶液あるいは水を林床に天下しそれらの処理の違いによるトビムシ群集組成の違いを評価した。

4. 研究成果

簡易 DNA の抽出方法の検討

小型土壌動物 1 個体の標本から、外部形態形態を保持したまま DNA を抽出する手法を検討し、迅速で簡便な手法が適用可能であることを示した。これにより形態標本と DNA 標本の対応づけ、迅速な DNA 解析が可能となり、

DNA 情報の網羅的収集が可能となり、必要に応じて得られた標本とデータをもとに新種記載もできるようになった。

DNA バーコーディング

京都大学上賀茂試験地より約 50 種、それ以外に北海道から沖縄にかけて採集された約 50 種、合計約 100 種の標本(図 1)についておよび DNA 塩基配列の情報を得た。従来、動物の DNA バーコードとして提案されている mtCOI に加え、mt16S も種の識別に有効であることがわかった。また、mtCOI、mt16S、nr28S の配列より系統関係を推定し、これまで形態情報をもとに考えられていた類縁関係を修正する必要があることがわかった。

さらに、この過程で未記載種や日本発記録となる種がいくつか見つかった。そのうち、ツチトビムシ科 1 種、イボトビムシ科 2 種、アヤトビムシ科 1 種については現在新種記載を進めている。また、ヤマトビムシ科 1 種、ムラサキトビムシ科 1 種については日本発記録の報告の準備を進めている。

トビムシ類は植物遺体が豊富に存在する森林土壌に多く生息しているが、礫河原などにも存在している。河原に生息する種についても環境指標生物として有効に利用するために、採集方法を検討し、河岸ではピットフォールトラップが効率的な採集方法であることがわかった。また、河岸からも未記載種の可能性がある種が得られており、その種の分類学的位置については海外産種についての文献を参照しつつ検討中である。



図 1. DNA バーコーディングに供試されたトビムシ種の標本の一部(バーは 1mm)

形質データの整理

これまでに日本から報告されたトビムシ類の記載文をもとに、形態情報を整理した。日本産約 400 種のうち、約 40 種の情報整理に本プロジェクトが貢献した。

口器の形態の違いにより、同じ菌種を利用

していても菌類の孢子散布者としての役割が違うことを明らかにした。

また、生態が類似する近縁種間に生活史形質に違いがあることを明らかにした。すなわち、ある種は年間を通して幼体のみであったのに対し、別の種は秋のみ、また別の種は春のみ、また別の種は春と秋にみられた。また、分子系統推定の結果から、このような生活史形質の違いはいくつかの系統で何回か進化してきたことが明らかになった。特に同所的に生息する近縁種に季節性に顕著な違いが見られた。

今後新たに注目される機能形質として、ミトコンドリアコピー数、リボソーム RNA 遺伝子コピー数、歩行速度などがあると考えられた。そこで、それらの形質データを得るために測定方法を検討した。トビムシ類における遺伝子コピー数を定量するための DNA 抽出方法や定量 PCR プライマーを検討した。飼育個体群を用いて行動形質の違いを計測し、トビムシ種間の歩行速度などの違いを明らかにした。

次世代シーケンサーによる群集解析の方法

ミトコンドリアの COI 遺伝子および 16S リボソーム RNA 遺伝子のそれぞれについて、次世代シーケンサーで解析するためのプライマーをデザインした。次に、プロトコルを検討し(図 2)、トビムシ自然群集に同手法を適用できることを示した。さらに、トビムシ類 7 種の飼育個体群を用いて模擬群集を作成し、同一種の個体数とシーケンスリード数の間に高い相関が得られたことを示した。群集サンプルから抽出した DNA バーコードを解析するメタバーコーディングにおいては、出力された次世代シーケンスデータ中での種ごとの配列の存在頻度が群集中の個体数やバイオマスをあまり反映しておらず、データの定量性に乏しいという課題があった。本研究はこの課題に対して改善をもたらすプロトコルを提案するものであり、同一の種組成であればこれまでメタバーコーディングでは困難だった個体数密度の変動の追跡などにも利用できる可能性を示した。

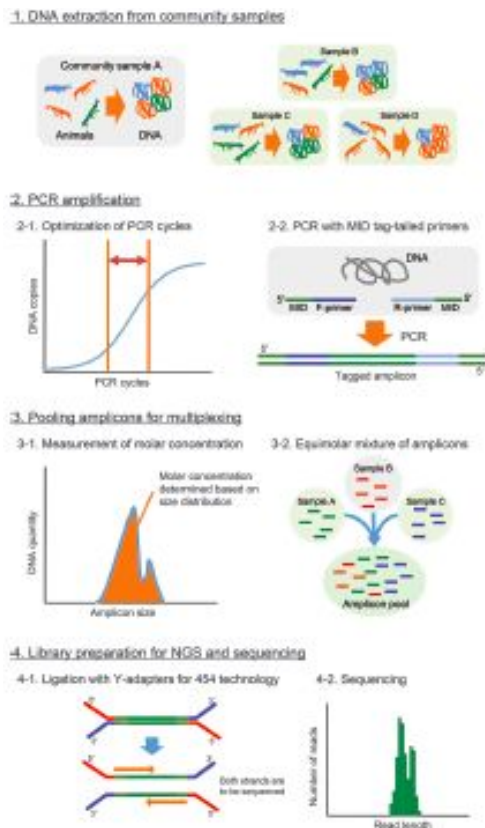


図 2. 次世代シーケンサーによる群集解析のプロトコル (Saitoh et al. 2016 より)

適用事例研究

グルコース添加試験を実施したものの、土壌より得られたトビムシが極度に少なかった。少雨により乾燥が続いたためだと考えられた。野外実験で得られたサンプルの一部を次世代シーケンサーで解析することを計画していたが、全てのサンプルを同じ方法で解析し繰り返し数を増やした方が有用な科学的知見が得られると判断した。しかしながら、想像以上にトビムシ類の種数・個体数が少なく、処理の違いによる影響が有意には見られなかった。次世代シーケンサーによる群集解析の精度を評価するために、模擬群集の数を増やすことで対応した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Nakano, M., Ochiai, A., Kamata, K., Nakamori, T. The preference of *Morulina alata* (Collembola: Neanuridae) feeding on some fungal sporocarps and the effects of passage through the gut on spores. *European Journal of Soil Biology* (in press). 査読有
Saitoh, S., Aoyama, H., Fujii, S., Sunagawa, H., Nagahama, H., Akutsu,

M., Shinzato, N., Kaneko, N., Nakamori, T. A quantitative protocol for DNA metabarcoding of springtails (Collembola). *Genome* 59, 705-723 (2016). doi: 10.1139/gen-2015-0228. 査読有

Kawaue, T., Nakamori, T., Iwasaki, Y., Potapov, M. Comparison of sampling methods for Collembola on a cobble-dominated riverbank. *Edaphologia* 98, 21-27 (2016). 査読有
Aoyama, H., Saitoh, S., Fujii, S., Nagahama, H., Shinzato, N., Kaneko, N., Nakamori, T. A rapid method of non-destructive DNA extraction from individual springtails (Collembola). *Applied Entomology and Zoology* 50:419-425 (2015). doi: 10.1007/s13355-015-0340-0. 査読有
中森泰三, 一澤圭, 田村浩志. 日本産ミズトビムシ科およびムラサキトビムシ科(六脚亜門:内顎綱:トビムシ目)の分類. *Edaphologia* 95, 43-82 (2014). 査読有

[学会発表](計 16 件)

米川雅也, 中野将和, 中森泰三. きのこ胞子のトビムシ体表への付着頻度. 日本土壤動物学会第 40 回記念大会, 横浜. 2017 年 5 月 21 日. ポスター.
 松本直幸, 須摩靖彦, 中森泰三. ホソゲツチトビムシにおける成長に伴う形態変化. 日本土壤動物学会第 40 回記念大会, 横浜. 2017 年 5 月 20 日. 口頭.
Nakamori, T. Colorful fungus-Collembola interactions in brown ecosystems. ICSZ-ICA Joint Symposium--Soil biodiversity for our future earth, Nara, August 26, 2016.
Nakamori, T., Kamata, K. Reinforcement and adaptation to insecticidal mushroom in Collembola. XIV International Colloquium on Apterygota, Nara, August 24, 2016. Oral.
Nakamori, T., Sawada, K., Tanaka, S., Saitoh, S., Aoyama, H., Fujii, S. Is a *Lobella* species (Collembola: Neanuridae) endemic to Lake Biwa? XIV International Colloquium on Apterygota, Nara, August 24, 2016. Poster.
Saitoh, S., Aoyama, H., Fujii, S., Sanghwa, P., Yamada, A., Shinzato, N., Kaneko, N., Nakamori, T. Multiple mitochondrial sequence types from single collembolan specimens: pseudogenes in Collembola? XIV International Colloquium on Apterygota, Nara, August 24, 2016.

Poster.

Ichisawa, K., Nakamori, T.
Morphological details and molecular data of *Homidia nigrocephala* Uchida, 1943 (Collembola: Entomobryidae) from Japan. XIV International Colloquium on Apterygota, Nara, August 24, 2016. Poster.

Kamata, K., Nakamori, T., Pham, D.H., Yoshie, T. Lethal effects of *Strobilurus* fungi on collembolans. XIV International Colloquium on Apterygota, Nara, August 24, 2016. Poster.

Nakano, M., Tanaka, A., Kamata, K., Nakamori, T. Preference of *Morulina alata* (Collembola: Neanuridae) for fungal sporocarps and effects of gut passage on spores. XIV International Colloquium on Apterygota, Nara, August 24, 2016. Poster.

鎌田耕作, 中森泰三, 寺嶋芳江, Nguyen Duc Hoang Pham, 出川洋介. マツカサキノコ属菌におけるトビムシに対する殺虫作用の種間比較. 日本菌学会 60 周年記念大会, 京都. 2016 年 9 月 17-18 日. ポスター.

中森泰三. 食虫菌オオキツネタケの子実体に対するトビムシの選好性. 日本土壤動物学会第 39 回大会, 弘前. 2016 年 6 月 4-5 日. ポスター.

齋藤星耕, 青山洋昭, 藤井佐織, 朴相和, 山田明德, 新里尚也, 金子信博, 中森泰三. 遺伝子配列によるトビムシ群集調査法の課題: 偽遺伝子由来配列の出現とその対策. 日本土壤動物学会第 39 回大会, 弘前. 2016 年 6 月 4-5 日.

中森泰三, Nguyen Duc Hoang Pham, 寺嶋芳江, 青山洋昭, 齋藤星耕, 藤井佐織, 金子信博. 沖縄のきのこから得られたトビムシ類の分類学および生態学的特徴. 日本土壤動物学会第 38 回大会, 香川. 2015 年 5 月 23-24 日. ポスター.

齋藤星耕, 青山洋昭, 藤井佐織, 砂川春樹, 長濱秀樹, 阿久津雅子, 新里尚也, 金子信博, 中森泰三. トビムシ類の DNA バーコーディングとメタバーコーディング手法の開発. 日本土壤動物学会第 38 回大会, 香川. 2015 年 5 月 23-24 日.

中森泰三, 田中葵. カラマツ林における大型菌類と菌食トビムシ類の相互作用ネットワークの構造. 日本菌学会第 59 回大会, 那覇. 2015 年 5 月 16-17 日. ポスター.

青山洋昭, 齋藤星耕, 藤井佐織, 砂川春樹, 長濱秀樹, 阿久津雅子, 新里尚也, 金子信博, 中森泰三. 第 2 世代 DNA シーケンサーによる土壤小型節足動物群集の解析手法の開発. 日本土壤動物学会第 37 回大会, 飯能. 2014 年 5 月 25 日.

〔図書〕(計 1 件)

一澤圭, 伊藤良作, 須摩靖彦, 田中真悟, 田村浩志, 中森泰三, 新島溪子, 長谷川真紀子, 長谷川元洋, 古野勝久. トビムシ目. 青木淳一(編著)日本産土壤動物第二版: 分類のための図解検索. 東海大学出版. p 1093-1482 (2015).

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中森 泰三 (NAKAMORI, Taizo)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・准教授

研究者番号: 5 0 4 4 3 0 8 1

(2) 研究分担者

齋藤 星耕 (SAITOH, Seikoh)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・研究員

研究者番号: 1 0 6 2 3 7 5 4

青山 洋昭 (AOYAMA, Hiroaki)

琉球大学・戦略的研究プロジェクトセンター・特命助教

研究者番号: 2 0 4 6 8 0 7 8

金子 信博 (KANEKO, Nobuhiro)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授

研究者番号: 3 0 1 8 3 2 7 1

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし