

令和元年5月19日現在

機関番号：82503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07494

研究課題名(和文) 沿岸内性十脚甲殻類の網羅的探索：環境DNAによるモニタリングに向けた基盤形成

研究課題名(英文) Inventory of shallow coastal infaunal and cryptic decapod crustaceans:
Development of faunal monitoring method using eDNA metabarcoding

研究代表者

駒井 智幸 (Komai, Tomoyuki)

千葉県立中央博物館・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：20260242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：地域の生物相を明らかにするには、採集調査を実施し、集めた標本を同定するという一連の作業が必須であった。さらに水生生物については、採集調査には水中に潜って観察したり、網などの道具・機材を使って採集したりなど、大きな労力と費用に加えて長期間にわたる調査が必要であった。種同定には高度に専門的な知識や経験が必要とされてきた。

本研究では、生物由来の「環境DNA」に注目し、十脚目甲殻類を対象として種の同定を可能とするDNAの塩基配列を特定し、それを増幅するためのPCRプライマーを開発した。バケツ一杯の水を解析すれば、その中に含まれるDNA断片からエビ・カニ類の種を検出できるようになったのである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発した技術では、1回の分析で1,000サンプル以上(1,000箇所以上の水)のデータを得ることが可能であり、ある場所にどんなエビ・カニ類がいるのか調べることが大幅に簡略化されることが期待される。さらに、深海や未踏の地など生物相が明らかになっていない水域で調査を行えば、未知の種類を検出する可能性が高い。あるいは、これまで知られていた種類でも新しい生息地を発見することが可能になると考えられる。環境アセスメントや外来種のモニタリングなど、今後幅広く応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to document local fauna, field investigation and subsequent identification process have been necessary. In particular, for aquatic fauna, various sampling methods, for example, SCUBA diving in sublittoral waters, or various kinds of sampling gears (dredges, trawls, tangle nets, gill nets), have been yielded generally. Furthermore, identification process requires deep experience and knowledge on various taxonomic groups by specialists. In this project, a protocol for environmental DNA (eDNA) metabarcoding for decapod Crustacea has been developed. A new set of PCR primers for this purpose (MiDeca) was successfully developed. eDNA metabarcoding using the set of primers successfully detected multiple species from natural seawaters in volume of 2 little. As with standard DNA barcoding, significantly more taxonomic work, including building of verified reference sequence databases, is necessary to optimise the effectiveness of eDNA approaches.

研究分野：生物多様性

キーワード：環境DNA 十脚目甲殻類 分類 プライマー 16S rRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海や川での水生生物の多様性モニタリングにあたっては、水中に潜って観察したり、網などのさまざまな道具・機材を使って採集したりなど、大きな労力と費用に加えて長期間にわたる調査が必要である。さらに、目視や採集した標本の観察により生物の種類を同定するためには、分類学に関する高度に専門的な知識や経験が必要とされる。

一方、水生生物の体(体表の粘液や糞などから由来)から放出された DNA が水中をただよっていることが明らかになり、「環境 DNA」と呼ばれて大きく注目されるようになってきた。DNA の塩基配列には生物の種に特異的な情報が含まれていて、その情報を読み取ればその DNA を放出した種が特定できる。環境 DNA には多様な水生生物の DNA が含まれているが、これらの中から目的とする分類群の DNA だけを選び出し、それらを同時並列的に検出する技術を開発すれば、今まで労力や時間や費用の点から困難だった水生生物多様性のモニタリングが分類群ごとに可能になるはずである。環境中の DNA をまとめて分析して生物の種類を判定する技術は「メタバーコーディング法」(多種同時並列検出法)と呼ばれており、次世代シーケンサーを使ったシステムが魚類などの脊椎動物を対象にして確立されてきた。この技術を他の水生生物にも応用すれば、より広範囲の分類群をカバーする種多様性モニタリングが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、十脚目甲殻類を対象として、①種特異的な変異を持つ DNA の配列(ターゲット領域)を探索し、そのターゲット領域を増幅することのできるプライマーを開発すること、②開発したプライマーを使ったメタバーコーディングが野外で採集された海水で実際に可能かどうかを検証することを目的として行われた。さらに、より精度の高いモニタリングを可能にするにはデータベースのリファレンス配列の拡充が不可欠である。そのため、新規標本の採集と DNA の抽出～ターゲット領域の配列決定、および分類学的な検討を同時並行的に進めることも目的とした。

3. 研究の方法

ある分類群のメタバーコーディング法を確立するためには、①どんな種類にも共通する2つの保存的な領域を DNA の塩基配列から探し出さなければならない。同時に、②その領域に挟まれる DNA の塩基配列は種類が識別可能な十分な「違い」を持っていなければならない。さらに、③環境 DNA は劣化が進んで短くなっていることが多く、②の領域の長さはできるだけ短い方が望ましいと考えられている。

本研究では、これら3つの条件を満たす領域を、十脚甲殻類約200種から得られたミトコンドリアゲノム全長配列を比較することにより探索した。

上記①の保存的領域に結合する一対の PCR プライマーを設計すれば、プライマーがあらゆる十脚甲殻類の保存的領域に結合する。そして、そこを起点にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で DNA を増幅すれば、2つのプライマーとそれらに挟まれる②の変領域が分析可能な量まで得られる。さらに、プライマーにさまざまなアダプターと呼ばれる配列を付加することにより、次世代シーケンサーで大量のサンプルを同時並列分析できるようにした。

十脚甲殻類には現在のところ15,000種あまりが知られているが、その多様性をカバーする幅広い分類群から250種を使い、その組織から抽出した DNA を用いてこれらプライマーの性能を検証した。その結果、いずれの種からも良好な PCR 産物が増幅された。

次に、国内各地の海岸(青森県～福島県沿岸、房総半島、相模湾、駿河湾、三重県沿岸、熊野灘、南紀沿岸、宮崎県～鹿児島県南部、長崎県南部～熊本県天草地方、種子島、沖縄本島、石垣島)で採水調査を実施した。海岸でバケツを使用したり、あるいは海面から直接採水した海水(合計2リットル)をステリベクスフィルターを使ってろ過し、DNA 劣化防止剤を添加して実験室に持ち帰り、冷凍保存した。一部のサンプルから環境 DNA を抽出し、抽出 DNA を用いて PCR を行い、ターゲット領域を増幅して次世代シーケンサー(MiSeq)で分析した。

さらに、リファレンスとなる配列データを増やすために、上記の国内各地で新規に標本の採集を行った。採集した標本は冷凍状態で博物館に持ち帰り、冷凍保存し、その後、解凍し、写真撮影・DNA 抽出用の組織片を切り出した。標本の本体は70%エタノールに保存し、同定を行い、博物館資料(CBM)として登録した。DNA 抽出用の組織片は99%エタノールに液浸し、冷凍状態で保存し、その後の抽出および配列決定に備えた。

4. 研究成果

(1) GenBank データベースに登録されている約200種のミトコンドリアゲノムを検討したところ、16S rRNA 遺伝子上に好適な領域があることが判明した。種レベルでの変異を示す可変領域を増幅するための1対のプライマー(MiDeca)を設計した。プライマーの配列は以下の通りである。フォワード側 Deca16S-F2: 5'-GGACGATAAGACCCTATAAA-3' (Length = 20);

Deca16S-F2: 5'-GGACGATAAGACCCTATGAA-3' (Length = 20)

リバース側 Deca16S-R: 5'-ACGCTGTTATCCCTAAAGT-3' (Length = 19)

(2) 上記のプライマーを使って、約260種の十脚類のターゲット領域の PCR とシーケンスを行ったところ、ほぼ全種について配列を得ることができた。

(3) さらに、千葉県館山市坂田の沿岸水、久米島の沿岸および海洋深層水、石垣島の沿岸水を使って、次世代シーケンサ Miseq により環境 DNA メタバーコーディングを実施した。館山市坂田の海水 2 リットルからは 40 種を超える十脚類が検出された。テッポウエビ科やアナジャコ科など内在的・隠蔽的な生息型の種も検出できたことは注目され、本研究の意義を高めるものである。当該海域の浅海域 (<水深 5 m) からは約 90 種の十脚類が記録されているが、1 日で採取した 2 リットルの水を分析により 4 割近い種が検出できたことになる。抽出 DNA の PCR 時のアニーリング温度を変える実験によると、60°C が最適であることが判明した。ただし、58°C での実験では、60°C では検出できなかった種が検出されていて、アニーリング温度により検出される種に違いが見られることが判明した。PCR 時の温度を変えた実験系列を併走させることにより、より多くの種を検出できることが示唆される。さらに、採水時期や採水時の潮汐なども考慮すればより精度の高いモニタリングが可能になるかもしれない。

(4) 研究期間中に野外調査を実施し採水調査と平行して、DNA 抽出・分類学研究用の標本の収集を進めた。収集された標本は随時分類学的な研究に供され、新種記載や分類学的な再検討が実施された。環境 DNA メタバーコーディングのリファレンスデータベースを充実させるために、約 270 種の DNA 配列データを追加した。さらに、分類学的研究の結果、2 新属 9 新種が記載・命名された（詳細は発表論文参照）。加えて、テッポウエビ科、スナモグリ科、アナジャコ科、カクレガニ科マメガニ属について分類学的な再検討（分子系統解析を含む）を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 11 件）全て査読あり

- ① Komai, T. & Y. Fujita. In review. A new species of the mud shrimp genus *Axianassa* Schmitt, 1924 (Decapoda: Gebiidea: Laomediidae) from the Ryukyu Islands, southern Japan. *Zootaxa*.
- ② Komai, T., H. Yokooka, Y. Henmi & G. Itani. 2019. A new genus for “*Neocallichirus*” *grandis* Karasawa & Goda, 1996, a ghost shrimp species (Decapoda: Axiidea: Callianassidae) heretofore known only by fossil materials. *Zootaxa* 4604(3): 461–481.
- ③ Komai, T., R. O. Gotoh, T. Sado & M. Miya. 2019. Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding and Metagenomics* 3: 1–19. DOI 10.3897/mbmg.3.33835.
- ④ Komai, T. & M. Hibino. 2019. Three new species of the pandalid shrimp genus *Pandalopsis* Spence Bate, 1888 (Crustacea: Decapoda: Caridea) from the southwestern Sea of Okhotsk, with supplemental note on *P. glabra* Kobjakova, 1936. *Zootaxa* 4545(1): 1–31.
- ⑤ Komai, T. & Y. Fujita. 2018. A new genus and new species assigned to Macrophthalmidae (Decapoda: Brachyura: Thoracotremata) from the Ryukyu Islands, Japan. *Zootaxa* 4531(1): 109–116.
- ⑥ Sepahvand, V., T. Komai, F. Montazi & Shahabi, S. 2018. A new species of the ghost shrimp genus *Neocallichirus* Sakai, 1988 from Iran, and new record of *N. manningi* Kazmi & Kazmi, 1992 (Decapoda: Axiidea: Callianassidae). *Zootaxa* 4527(2): 239–254.
- ⑦ Komai, T. & J. Ohtomi. 2018. A new deep-sea species of the snapping shrimp genus *Alpheus* (Decapoda: Caridea: Alpheidae) from Kagoshima Bay, Japan. *Zootaxa* 4434: 99–110.
- ⑧ Komai, T., M. Osawa, T. Maenosono, Y. Fujita & T. Naruse. 2018. Records of the callianassid ghost shrimp *Lepidophthalmus tridentatus* (von Martens, 1869) (Crustacea: Decapoda: Axiidea: Callianassidae) from the Ryukyu Islands, Japan. *Fauna Ryukyuan* 42: 9–27.
- ⑨ Komai, T. 2018. A new species of the alpheid shrimp genus *Thuyllamea* Nguyen, 2001 (Crustacea: Decapoda: Caridea) from the Yatsushiro Sea, Kyushu, Japan. *Zootaxa* 4378(3): 387–396.
- ⑩ Komai, T. 2017. *Gilvossius chichijimaensis* Sakai, 2015 (Crustacea: Decapoda: Axiidea: Callianassidae), a junior subjective synonym of *Paratrypaea bouvieri* (Nobili, 1904).

Zootaxa 4291: 391–395.

- ⑪ Komai, T. 2017. *Gebiacantha sagamiensis*, a new species of upogebiid shrimp (Crustacea: Decapoda: Gebiidea) from Sagami Bay, central Japan. Zootaxa 4263: 578–586.

〔学会発表〕（計 件）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮 正樹

ローマ字氏名：Miya

所属研究機関名：千葉県立中央博物館

部局名：生態環境研究部

職名：部長

研究者番号（8桁）：30250137

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。