

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18485

研究課題名(和文) 環境DNA解読によるニホンウナギ生息場所の重要性評価手法の開発

研究課題名(英文) Development of the method for evaluating habitat importance of Japanese eels by using environmental DNA sequencing

研究代表者

田邊 晶史 (Tanabe, Akifumi)

神戸大学・理学研究科・学術研究員

研究者番号：40549044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ニホンウナギは河川の上流域から海洋の沿岸域のどこにでも見られることから、ニホンウナギの成長過程においてどのような場所が重要なのかははまだ判然としていない。これは、ニホンウナギの保護に向けて生息場所の環境改善を目指す際に問題となる。そこで、ニホンウナギの環境DNAを検出することで、河川の中流域、下流域(感潮域)、海洋沿岸部の生息場所としての重要性を評価する手法を開発した。その結果、テスト河川では河川の中流域がニホンウナギにとって最も重要な生息場所と推定された。この結果は、ニホンウナギの資源回復には河川中流域の環境改善、および中流域への遡上しやすさの回復の必要性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Because Japanese eels can be found in broad area including headwater stream to coastal area, we cannot determine which area is the most important habitat for Japanese eels. This should be solved for improving habitat environment of Japanese eels. Here, I developed the method for evaluating habitat importance of Japanese eels based on environmental DNA sequencing. In the test field, it is indicated that the upper area of estuarine basin is the most important habitat for Japanese eels. This result suggest that restoration of the upper area of estuarine basin and improvement of accessibility of this area from the lower area are required for recovering Japanese eel population.

研究分野：バイオインフォマティクス・群集生態学

キーワード：遺伝的多様度 ハプロタイプ D-loop

1. 研究開始当初の背景

ニホンウナギは近年、シラスウナギの漁獲量が激減し(図1)、環境省やIUCNのレッドリストでも絶滅危惧種として掲載されるに至っている。ニホンウナギの資源量回復に向けて、様々な策が講じられるか、または講じられようとしているが、ニホンウナギの生態にはまだ未解明の点が多く、産卵、シラスウナギとして接岸、クロコ・黄ウナギとなって成長、海へ下って産卵場所へ移動、いずれの過程でもどこで何をしているのかほとんどわかっていない。

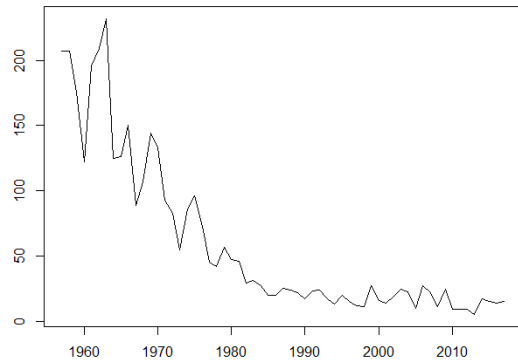


図1: シラスウナギ国内採捕量の推移。横軸は西暦、縦軸は採捕量(単位はトン)。水産庁 Web サイト「ウナギに関する情報」ページの公開データより作成。

このうち、日本国内で対処できるのはシラスウナギとして接岸、およびクロコ・黄ウナギとなって成長の段階であり、これらの段階での生存率を向上させることが喫緊の課題である。シラスウナギとして接岸する時期の生存率を上げるにはシラスウナギの禁漁が効果的なのは明らかであるが、クロコ・黄ウナギとなって成長する時期は河川の上流部から下流部、さらには海洋沿岸部の様々なエリアで見られ、それゆえにニホンウナギにとって重要な生息場所はどこのかが判然としていない。これは、ニホンウナギの資源回復に向けて解決すべき課題の一つである。というのも、もしも河川よりも海洋沿岸の方で多くのウナギが生活しているのなら、河川環境改善の効果は限定的となり、海洋沿岸部の環境改善の方がニホンウナギの資源回復にはより効果的ということになるからである。

2. 研究の目的

河川・海洋のいずれでも適用可能な、ニホンウナギにとっての生息場所としての重要度の評価方法を開発すること。そのために、膨大な労力が必要な採集調査を必要としない環境 DNA を対象として、水量による希釈効果の影響が小さいと期待できる特定遺伝子座のハプロタイプ数を利用する。

3. 研究の方法

(1) 種内多型の検出に適した領域の探索

公開データベース上のニホンウナギの塩基配列データから変異の激しい部分を特定し

た。具体的には、INSD に登録されている全てのニホンウナギのミトコンドリア DNA の塩基配列を収集し、遺伝子座ごとに 10 配列当たりのユニーク配列数(完全一致する配列をひとまとめにした後の配列数)を算出して最もユニーク配列の多い領域を選択した。

(2) 選択領域を増幅できる種特異的プライマーの設計

まず、INSD に登録されている、選択した領域の塩基配列をウナギ属の他種のものまで含めて収集し、多重整列した。その上で、ニホンウナギの種内で変異に富む領域の外側にある保守的な領域を探索し、さらにその中で種間では変異がある領域を探し出して種特異的プライマーを作成した。

なお、高スループットシーケンサで解読できるように増幅産物長は 400bp 以下となるようにした。これは、断片化の進んでいる環境 DNA でも増幅できるようにする意味もある。

(3) 野外環境 DNA サンプルの採集

ニホンウナギが生息していることが確認されている和歌山県富田川水系高瀬川から 2017 年 10 月に環境 DNA を濾過採集した。この際、ニホンウナギ DNA の発見率を推定できるように、1L の濾過を 4 繰り返し(合計 4L 濾過)行った。これは、河川と海洋ではその水量差からニホンウナギ DNA の濃度が大きく異なると考えられ、ニホンウナギ DNA の発見率の差を考慮したデータ解析を適用するためである。採集地点は河口の外側にある磯の 2 地点、河口から続く感潮域 4 地点、感潮域よりも上流に 9 地点の計 15 地点とした(図2)。



図2: 環境 DNA 採集地点の地図。青い旗の立っている地点が採集地点、丸数字が地点番号を表している。河口で富田川と合流しているのが高瀬川である。国土地理院 Web サイト「地理院地図」の地図画像より作成。

(4) 野外環境 DNA サンプルでの増幅確認

作成したプライマーを使用した PCR によって増幅試験を行った。この PCR はサンプルごとに 8 繰り返し行っている。これは、サンプルの鋳型 DNA 濃度が極めて低いため、検出率を少しでも上げる目的で行っている。環境 DNA 分析では、単純に鋳型として加える液量を増やした場合は増幅阻害物質も増加してしまうため、このように PCR の繰り返し数を増やすのが効果的であることがわかってい

る。

(5)高スループットシーケンサ用ライブラリの作成と MiSeq によるシーケンス
通常の PCR による増幅産物 8 繰り返しをひとまとめにして鋳型とし、Illumina 社シーケンサ用シーケンシングアダプターを PCR によって付加した。さらに、サンプル識別用インデックス配列と Illumina 社シーケンサー用の P5・P7 アダプターを PCR で付加した。3 回の PCR の合計 PCR サイクル数は 60 サイクルとなっている。合成エラーによる新奇配列の生成を抑制するため、高正確性酵素である NewEngland BioLabs 社の Q5 HotStart ポリメラーゼを用いた。また、キメラ配列生成を抑制するため、熱変性温度からアニーリング温度への冷却速度を 0.5 /秒に制限して PCR を行った。こうして作成したライブラリを Agilent 社 Bioanalyzer および ThermoFisher 社 Qubit で品質確認・濃度測定した上で Illumina 社 MiSeq シーケンサで 250bp ペアエンドで解読を行った。

(6)シーケンスデータからのハプロタイプ数推定方法の開発

高スループットシーケンサの出力データには非常に多くの読み間違いが含まれていることが知られており、配列がより多く読まれたサンプルほど読み間違いによるハプロタイプ数の過大評価は大きくなる。全サンプル間で過大評価程度が一定であれば問題はないが、実際には大きくばらついてしまう。そこで、シーケンスデータから読み間違い配列を検出、除去して正確なハプロタイプ数を推定する新たな方法を開発した。公表されている答えのわかっているシーケンスデータを複数用いてこの方法で正確なハプロタイプ数が推定できるかどうかを検証した。

4. 研究成果

(1)ニホンウナギ種内多型の検出に適した種特異的プライマーの開発

INSD 上のニホンウナギの塩基配列データより、ミトコンドリア D-loop 領域に非常に多くの変異が見られることがわかったため、その領域を高スループットシーケンサで解読可能な長さで増幅が可能な種特異的プライマーを開発した。

(2)ニホンウナギ D-loop 領域部分配列の増幅とシーケンス

開発したニホンウナギ種特異的プライマーを用いて、ニホンウナギとその他の魚が棲息する河川の水環境 DNA サンプルで単一のバンドしか増幅しないこと、ニホンウナギのいない水域の水環境 DNA サンプルでは増幅が見られないことを確認した。

また、2017 年 10 月に採集した和歌山県富田川水系高瀬川と河口付近の沿岸を含む 15 地点の水環境 DNA サンプルで各 8 繰り返しの

PCR を行った。その結果、濃度が低いと考えられるいくつかのサンプルではバンドが視認できなかった(図 3,4)。

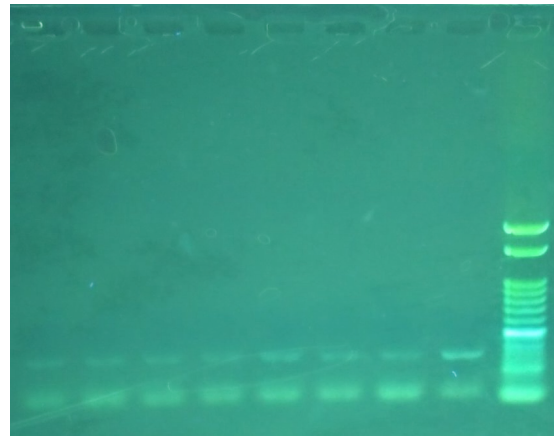


図 3: 増幅に成功したサンプルの電気泳動像。右端のレーンはラダーマーカースで、最短(下端)が 50bp、最長(上端)が 1500bp である。8 つのサンプルの全てで単一の増幅バンドとプライマーダイマーのバンドが見えている。プライマーダイマーは AMPureXP で処理することで除去できる。

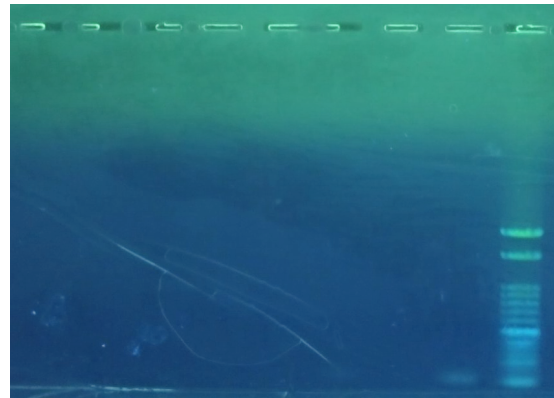


図 4: 増幅できなかったサンプルの電気泳動像。右端のレーンはラダーマーカースで、最短(下端)が 50bp、最長(上端)が 1500bp である。8 サンプルの全てで増幅が見られない。右から 2 番目のレーンのみプライマーダイマーのバンドが見える。

増幅できたサンプルを用いてライブラリ調製を行い、MiSeq にてシーケンスしたが、解読品質向上を目的として付加した人工塩基 N (A,C,G,T のいずれもあり得る)が T に偏っていたため、質の良いシーケンスデータが得られなかった。しかし、8 繰り返し PCR では沿岸や河口、感潮域のサンプルで増幅成功率が明らかに低かったことから、ニホンウナギにおける河川内の多様性の中心は感潮域よりも上流にあり、したがってニホンウナギの資源回復には感潮域よりも上流の河川環境と、下流からそこまでのアクセス性の回復が有効と考えられる。

今後、別の時期に採集したサンプルと共に再度シーケンスを行う予定である。

(3)シーケンスデータからのハプロタイプ数推定方法の開発

非常に多くの読み間違いが含まれている高

スループットシーケンサのデータから、正確なハプロタイプ数を得るには新規のデータ解析手法を開発する必要があった。そこで、読み間違い配列は正しい配列よりもコピー数がずっと少なくなること、読み間違い配列と正しい配列の中間に PCR の過程で誤って合成された配列があること、さらに PCR の過程で誤って合成された配列は PCR の 1 サイクル目以降で生じ、2 サイクル目以降で増幅されることから、増幅効率 100% の場合は正しい配列の半分以下のコピー数となる(図 5) ことに基づいて、読み間違い配列と合成エラー配列を検出、除去する方法を開発した。この手法は代表者がこれまで開発してきた Claident という解析プログラム集に実装し、既に公開している。

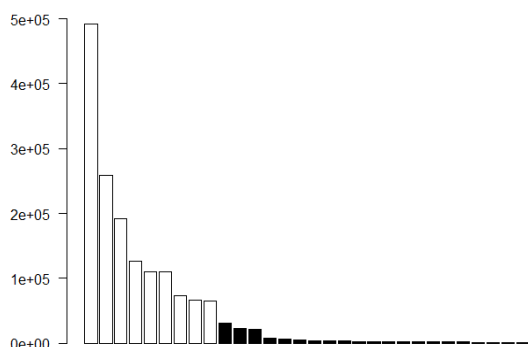


図 5: 9 ハプロタイプを含むライブラリのシーケンサデータにおけるランクアブundance。各バーが 1 つのハプロタイプを表しており、縦軸はコピー数(アブundance)である。白で示した左の 9 つのハプロタイプがサンプルに含まれている配列で、黒で示した残りの配列は読み間違いか PCR の合成ミスによって生じた人工配列である。この境目ではコピー数が大きく変化している。なお、コピー数 1000 未満のハプロタイプは図から除外している。

この手法の妥当性を検証するため、正しい配列がわかっている公開データを用いて正確なハプロタイプを復元できるかどうか調査した。その結果、本手法では、競合する手法に比べ、圧倒的に偽陽性が少ないことが示された(図 6,7)。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. 田辺晶史 高スループットシーケンサのコモディティ化が変えた分類学と系統学の研究サイクル 日本進化学会第 19 回京都大会進化学夏の学校「加速する分類学と系統学」2017 年 8 月

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

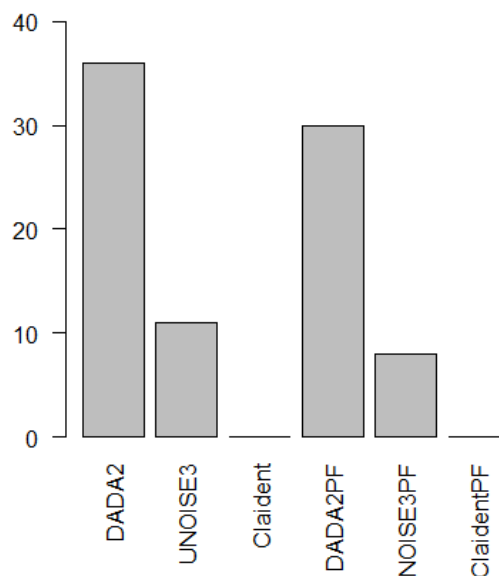


図 6: 新しく開発した方法と競合する既存手法における偽陽性件数の比較。Sigsgaard et al. (2016) のジンベエザメ 3 ハプロタイプの配列データに対して適用した結果。今回開発した手法では偽陽性はゼロであった。また、偽陰性はいずれの手法でもゼロである。つまり、このデータでは今回開発した手法で完全に正しい結果を復元できている。なお、手法の末尾の「PF」は、配列の処理前に配列の品質スコアに基づいて期待読み間違い数が 1 を超える配列を予め除去したものの「PF」の付いていない方法では、品質スコアに基づく事前の配列フィルタリングは全く行っていない。

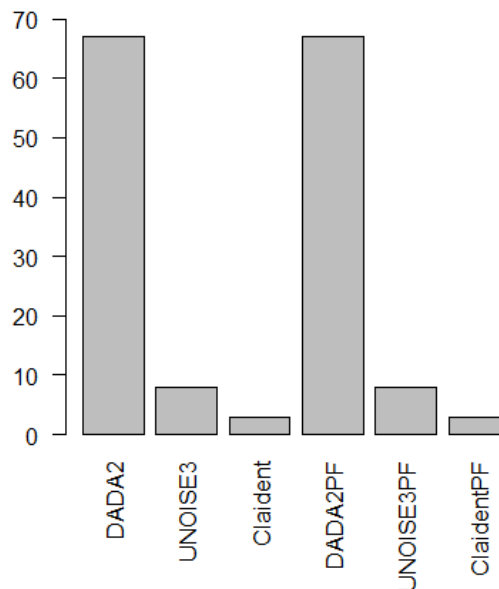


図 7: 新しく開発した方法と競合する既存手法における偽陽性件数の比較。未公開のある魚の 9 ハプロタイプの配列データに対して適用した結果。なお、手法の末尾の「PF」は、配列の処理前に配列の品質スコアに基づいて期待読み間違い数が 1 を超える配列を予め除去したものの「PF」の付いていない方法では、品質スコアに基づく事前の配列フィルタリングは全く行っていない。

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.clident.org/>

<https://www.fifthdimension.jp/documents/metabarcodingtextbook/>

6．研究組織

(1)研究代表者

田邊晶史 (TANABE AKIFUMI)

神戸大学大学院理学研究科学術研究員

研究者番号：40549044