

令和元年6月7日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19298

研究課題名(和文)パン・アニマリア環境DNA分析による希少・外来動物の検出評価システム構築

研究課題名(英文)Development of detection schemes for endangered and invasive animals based on pan-animalia environmental DNA analysis

研究代表者

佐藤 行人(SATO, Yukuto)

琉球大学・戦略的研究プロジェクトセンター・特命講師

研究者番号：20566418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：海水や河川水などを直接DNA分析して、生息する魚類などの情報を得る環境DNA解析について、魚類だけでなく四足動物(両生類・爬虫類・鳥類・哺乳類)を分析するための研究開発を行った。沖縄県をモデル地域として、環境DNAのサンプリング手法(ろ過器具・試料保管溶液)、DNA実験(PCR酵素・温度条件)、データ解析(解析プログラム・配列照合データベース)を改良し、県内の希少動物(メダカ、ホルストガエル、ヤンバルクイナ等)や外来動物(グッピー、アカミミガメ等)の環境DNA検出に成功した。さらに人獣共通感染症の病原細菌(レプトスピラ)について、その保菌動物を環境DNAから推定できることを示し論文を出版した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、河川水や海水から脊椎動物(魚類・四足類)の生息を検出する環境DNAメタバーコーディングの手法面が改良されたことで、環境DNA解析を、従来主な対象とされてきた魚類だけでなく、広く脊椎動物一般の検出と研究に活用していただける可能性が示された。また本研究は、この環境DNA解析法を、人獣共通感染症の病原体の宿主となっている動物種の推定にも応用し得ることを論文成果として示した。今回、希少種や外来種を含む様々な脊椎動物を環境DNAで検出できたことを踏まえて、今後は検出の定量性や感度などを改良し、さらに遺伝的多様性推定の実現も目指すことで、保全生物学やメタ遺伝解析へ応用していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Methodological aspects of environmental DNA (eDNA) metabarcoding for vertebrates were investigated to detect tetrapods (amphibians, reptiles, avians, and mammals) from water samples. Using the Okinawa Island of Japan as a model system, I improved methods of water filtering, sample preservation, polymerase chain reaction (PCR) including choice of DNA polymerases and annealing temperatures, and data analysis. As a result, I achieved to detect eDNAs of endangered and invasive species of Okinawa Island which included *Oryzias latipes*, *Babina holsti*, *Gallirallus okinawae*, *Poecilia reticulata*, and *Trachemys scripta*. In addition, I showed that potential host animals of zoonotic pathogen *Leptospira* could be estimated based on the developed eDNA metabarcoding methods of river waters through correlated detection of pathogen bacterium and co-occurring vertebrate species.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：環境DNA 大量DNA分析 次世代シーケンサー バイオインフォマティクス 希少種 外来種 メタバーコーディング 遺伝的多様性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

環境 DNA 解析とは、土壌や海水などの環境媒質から直接 DNA を抽出し分析することで、その環境に生息する生物の情報を取得し、生物学的な知見を得る手法・技術ならびに研究分野のことである。研究実施者らは、本研究開始前の 2014 年頃より、海水・河川水などから魚類を主とした脊椎動物の分析を行う環境 DNA メタバーコーディング解析を行ってきた。魚類を含む有顎脊椎動物全般のミトコンドリア DNA 12S rRNA 遺伝子部分配列 (169 塩基長) を増幅するユニバーサルプライマー MiFish を開発し、その増幅産物を次世代シーケンサーで解析する DNA 実験およびデータ解析の枠組みを発表した (Miya *et al.* 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of >230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2, 150088. )。その後、研究実施者は所属する琉球大学において、上記の MiFish プラットフォームを活用した環境 DNA 解析に取り組み、沖縄県内の河川水や沿岸海水を分析してきた (図 1)。すると、当初目的としていた魚類だけでなく、両生類・爬虫類・鳥類・哺乳類 (四足類) がたびたび検出されてくることに気がついた。そこでこの環境 DNA 解析を、四足類を含む脊椎動物全般を検出するための手法として体系的に改良することで、希少動物・外来動物の検出・評価へ応用することを着想した。さらに同手法は、哺乳類や鳥類などが宿主動物となるインフルエンザ、サルモネラ、レプトスピラなどの人獣共通感染症について、それらの病原体と相関して検出される動物種を推定することにも活用できるのではないかとという着想を得た。以上が本研究開始の背景となった。

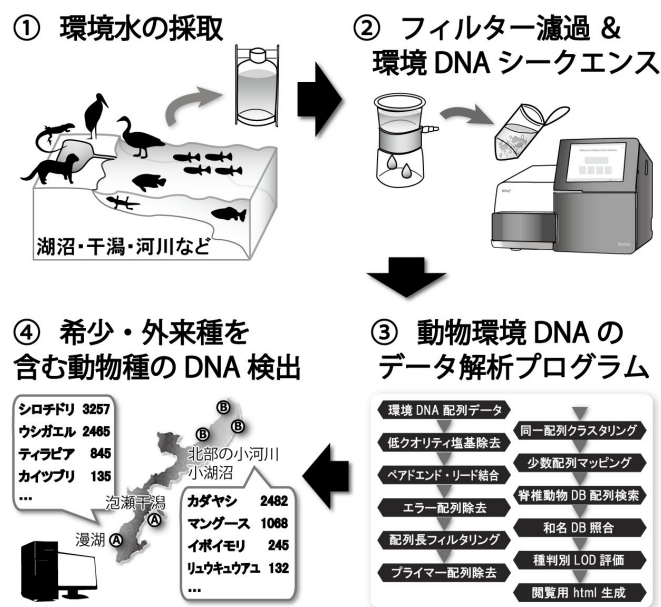


図 1. MiFish プラットフォームを使用した魚類および四足類の環境 DNA 検出の概要

### 2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリア DNA 12S rRNA 遺伝子部分配列 (MiFish) をマーカーとした環境 DNA メタバーコーディング解析を、魚類だけでなく四足類 (両生類・爬虫類・鳥類・哺乳類) にも適用する可能性を検討し、またその手法を改良することで、希少動物・外来動物の検出や、人獣共通感染症の宿主動物推定といった生態学への応用を試みることを目的とした。これらの目的を達成するために、次の 3 つの目標： 環境水のサンプリングとろ過・輸送・保管の手法検討、抽出した環境 DNA からの四足類の分析手法の検討と改良、開発した脊椎動物環境 DNA 解析を活用した生態学研究の実行、を設定した。上記の目標における具体的な課題設定と取り組みの内容について、以降のセクションに記述する。

### 3. 研究の方法

本研究で掲げた 3 つの目標課題 (上記 ~ ) について、研究方法の概要を順番に述べる。まずの環境水サンプリングとハンドリングについては、希少動物が比較的多く生息する沖縄県北部やんばる地域の河川 (奥間川、源河川、座津武川、汀間川など) と、外来動物が比較的多く生息する同県中南部の河川およびビオトープ (宇地泊川、桑江公園ビオトープ、西崎親水公園ビオトープなど) をモデル地域に設定した (図 2)。これらの地域で、従来手法であるガラス繊維ろ紙を使用した採水・ろ過と、より簡便な Sterivex フィルターユニットを使用した採水・現地ろ過を行い、得られる結果を比較した。また、現地ろ過後の Sterivex フィルターに充填する保管剤として DNAiso (タカラバイオ社) と RNAlater (Thermo Fisher Scientific 社) を試用して、研究拠点への常温輸送を行い、得られる結果を比較した。

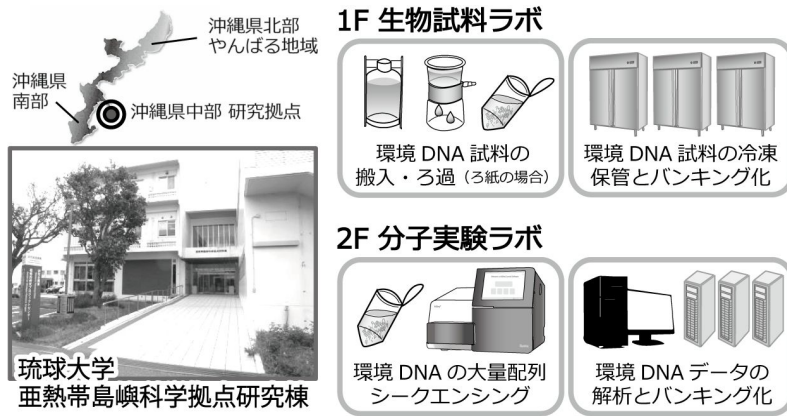


図 2. 沖縄県の北部と中南部をモデル地域とした動物環境 DNA 解析の試行と研究拠点の概要

次に、上記の四足類を含む環境 DNA メタバーコーディング解析の手法検討では、MiFish プラットフォームの論文 (Miya *et al.* 2015) で採用していた PCR 酵素 KAPA HiFi HotStart PCR ReadyMix (KAPA Biosystems 社) に加えて、PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ社) も使用し、またアニーリング温度条件も新たに追加して四足類の検出効率の改良を試みた。また、両生類 (無尾類、有尾類) のミトコンドリア DNA 部分配列を増幅するための環境 DNA プライマーを新たに設計し、無尾類については専用の Blastn 用配列検索データベースを作成した。

上記に記した動物環境 DNA 解析の応用による実地研究として、琉球大学医学系研究科細菌学講座との共同研究により、レプトスピラの生態疫学研究を行った。レプトスピラ症は南西諸島で時おり発生する人獣共通感染症で、スピロヘータ類の細菌レプトスピラが、哺乳類から河川水などを介してヒトに感染することで起こる。そこで、沖縄県北部のレプトスピラ症発生河川において、発症が報告される夏季 (7 月から 10 月) に採水サンプリングを行った。代表的な 2 河川で各 10 回の採水を 4 時点 (7 月, 8 月, 9 月, 10 月) 行い、計 80 の環境 DNA サンプルを得た。抽出した環境 DNA を用いて、レプトスピラを含むバクテリア全般 (河川細菌叢) と、宿主候補である脊椎動物全般 (河川動物相) の環境 DNA メタバーコーディング解析を実施した。

#### 4. 研究成果

本研究の 1 つめの課題とした環境 DNA のサンプリング手法の検討では、環境水のろ過方法と、得たサンプルの常温輸送の方法について、それぞれ有益な知見を得ることが出来た。環境水のろ過では、500 mL から 1,000 mL 程度の環境水を研究拠点に持ち帰って減圧ろ過する従来法 (ガラス繊維ろ過法) と、同容量の環境水を現地ですろ過できるより簡便な方法 (Sterivex フィルターろ過法) を比較し、どちらの手法からも遜色なく同様の魚類相・動物相が推定されることを確認した (図 3)。図 3 に示した宇地泊川での魚類・動物相の推定結果では、ガラス繊維ろ過よりも Sterivex フィルターのほうが、検出種比率の均一性 (シャノンの多様性指数) が高いことが示唆された。一方、座津武川でのカエル類・動物相の推定結果では、Sterivex フィルターよりもガラス繊維ろ過のほうが、希少カエル類 (幼生を含む) の検出感度が高いことが示唆された。これらの手法上の 2 つの選択肢 (ろ紙またはフィルター) は、研究の目的や実施条件、対象種によって、適切に使い分けることが望まれる。

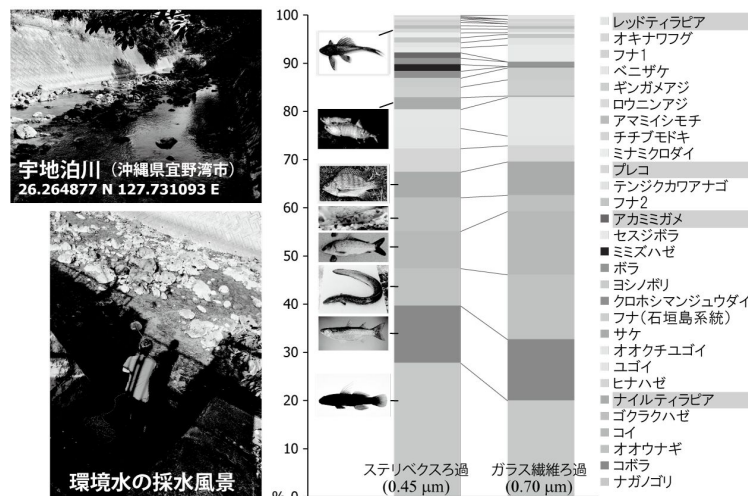


図 3. 沖縄県内河川での採水テストで得られた環境 DNA 解析による魚類相・動物相の推定結果 (Sato *et al.* 2018 *Mol Biol Evol* に基づき作図)



さらに、Sterivex フィルターに充填する環境 DNA の保管剤としては、DNAiso (タカラバイオ社) が適しているという知見を得た。河川水を 500 mL から 1,000 mL 程度、Sterivex フィルターでろ過した後に DNAiso を 2 mL 充填し、県内での常温輸送や、さらには離島や県外からの常温搬送も試行したところ、サンプリング地の魚類相および動物相が問題なく推定されることが示唆された。当溶液が含有するイソプロピルアルコールやタンパク質変性剤の作用によって、環境水からろ過された懸濁物中の DNA (環境 DNA) が、微生物や酵素などで分解されることなくある程度の期間常温で保持されることが示唆された。もう 1 つの保管剤候補である RNAlater (Thermo Fisher Scientific 社) については、保管剤をしない、または DNAiso を使用した場合と比べて、環境 DNA メタバーコーディングの検出力が比較的低下することが示唆された。しかしながら、環境 DNA ではなく RNA を対象とする場合には、この限りではない可能性がある。そのため今後、環境 RNA 解析 (環境メタトランスクリプトーム解析) を検討する場合には、RNAlater が依然として有用な保管剤候補の 1 つであると考えられる。

2 つめの課題とした環境 DNA 解析の手法改良では、DNA 実験面の検討 (PCR 酵素およびアニーリング温度条件の追加) および新しい PCR プライマーの開発により、四足動物の検出力を向上させることが出来た。PCR 酵素については、KAPA HiFi に加えて PrimeSTAR HS DNA Polymerase を追加し、またアニーリング温度については、KAPA HiFi では 65 (従来の条件; Miya et al. 2015) と 60 (新条件) PrimeSTAR については 55 と 50 (ともに新条件) の計 4 条件を実施するようにした結果、県内の代表的な希少動物と外来動物を環境 DNA 検出することに成功した (図 4)。県北部の河川水からは鳥類のヤンバルクイナとカラスバト、哺乳類のケナガネズミ、両生類のイボイモリ、シリケンイモリ、ホルストガエル、ハナサキガエル、魚類のメダカ、タイワンキンギョ (在来トウギョ)、リュウキュウアユ (再移入定着種)、ドジョウとタウンギ (県内では希少種) が検出された。また中南部ではマングース、アカミミガメといった外来動物が検出できた。今後は、これらの希少・外来動物が環境 DNA で検出できたことを踏まえて、検出の定量性や経時観測性、検出感度の改良、遺伝的多様度推定の実現を目指すことにより、保全生物学・保全遺伝学・メタ遺伝解析へと応用していくことが期待される。

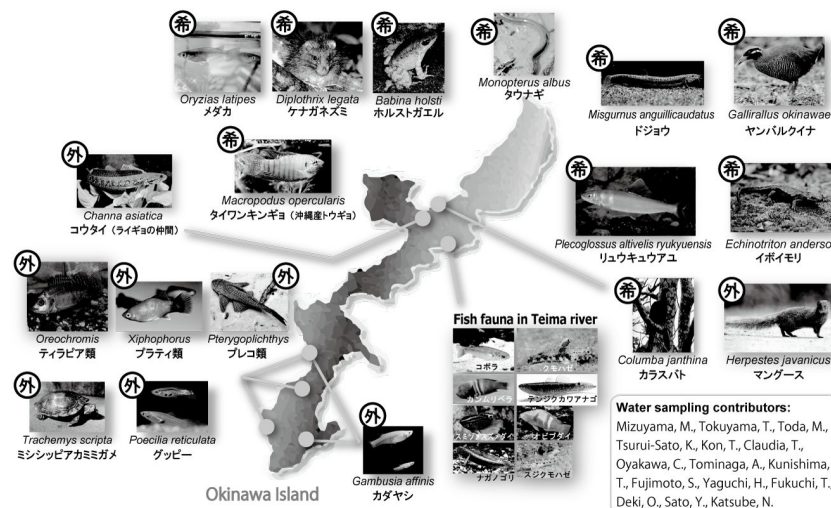


図 4. 沖縄県内での河川水環境 DNA 解析による希少動物・外来動物の検出結果の概要

3 つめの課題とした動物環境 DNA 解析の生態疫学研究では、県内で時おり報告される人獣共通感染症のレプトスピラについて、自然界でレプトスピラの宿主となっている動物 (保菌動物) の候補を、環境 DNA 解析から推定できることを示し論文を出版した (Sato et al. 2019. Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic *Leptospira* and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan. *Scientific Reports*, 9, 6575.). レプトスピラ症が報告されている県内 2 河川の環境 DNA サンプルについて、レプトスピラ属細菌を対象とする 16S rRNA 遺伝子部分配列および *lipL32* 遺伝子部分配列の特異的 PCR プライマーを用いて環境 DNA メタバーコーディング解析を行い、河川水からレプトスピラを直接 DNA 検出することに成功した。また、レプトスピラの環境 DNA 検出度数が、サンプリング時の雨量 (mm) と有意に相関していることも確かめられ、従来の知見 (雨天・洪水時にレプトスピラ症が発生しやすい) と合致することが確認された。さらに、レプトスピラを検出した環境 DNA サンプルを用いて、本研究で開発した動物の環境 DNA メタバーコーディング解析を行ったところ、レプトスピラ検出と有意に相関する保菌動物の候補として、イノシシ、オオコウモリ、シリケンイモリ、ウナギ、ドジョウ、ナマズ類、底生ハゼ類を検出した (図 5)。これらのうち、イノシシは沖縄県において、コウモリ類は海外において、レプトスピラの宿主動物であることがすでに知られている。このことは、同手法による保菌動物推定の確からしさを支持すると考えられ、他の地域や国において、未知の保菌動物を推定することに役立つことが期待される。一方、ウナギやドジョウなどの底生魚類は、環境条件である雨と交絡して検出されたに過ぎない可能性がある (擬

似相関)。しかしながら、イモリ類・魚類ともにレプトスピラの宿主である可能性も残るため、今後の調査が必要と考えられる。また、以上までの環境 DNA 解析のために開発し用いてきた解析プログラム群を、ウェブサービスとして一般に公開・提供する「MiFish pipeline」(<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish>)を開発した(千葉県立中央博物館、東京大学との共同研究)(図6)。このMiFish pipelineに関する論文も出版し(Sato *et al.* 2018. MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1553-1555.)。魚類・動物の環境 DNA 解析を普及するための一端として寄与することが出来た。

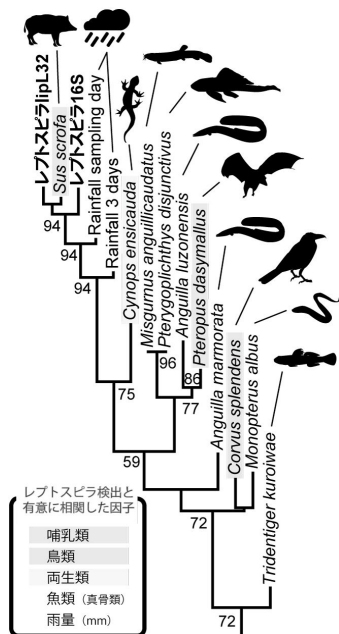


図5. 沖縄県内河川水の環境 DNA 解析によって細菌レプトスピラと有意に関連して検出された魚類および四足類 (Sato *et al.* 2019 *Sci Rep* に基づき作図)

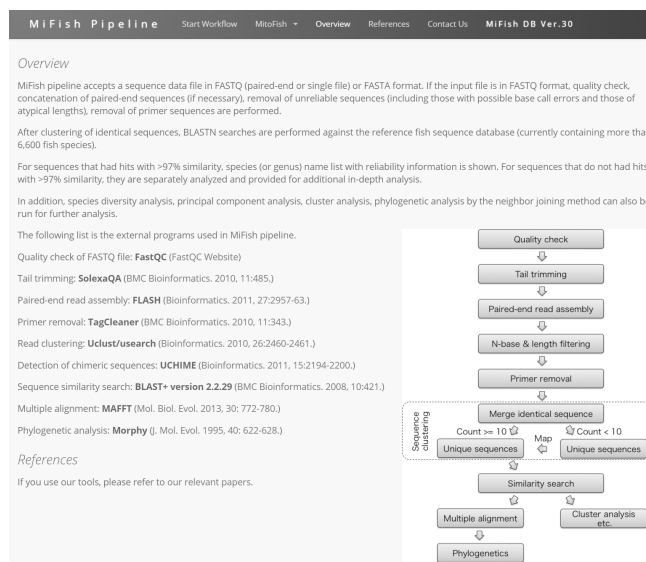


図6. 脊椎動物の環境 DNA データを自動解析する MiFish パイプライン (Sato *et al.* 2018 *Mol Biol Evol*)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Yukuto Sato, Masaru Mizuyama, Megumi Sato, Toshifumi Minamoto, Ryosuke Kimura, and Claudia Toma. 2019. Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic *Leptospira* and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan. *Scientific Reports*, 9, 6575.

Yukuto Sato, Masaki Miya, Tsukasa Fukunaga, Tetsuya Sado, Wataru Iwasaki. 2018. MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 6, 1553-1555.

Hikaru Nakagawa, Satoshi Yamamoto, Yukuto Sato, Tetsuya Sado, Toshifumi Minamoto, Masaki Miya. 2018. Comparing local and regional scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshwater Biology*, 63, 569-580.

[学会発表](計7件)

徳山孟伸・佐藤行人・笹井隆秀・戸田守. 環境 DNA 解析による種内の遺伝的変異性評価の試み-ウミヘビ類を例として. 日本爬虫両棲類学会・第57回大会, 2018年11月.

Idam Hermawan, 松浦千晶, 佐藤 行人, 山城哲, トーマ・クラウディア. 沖縄県における土壌からの病原性レプトスピラの分離. 第59回日本熱帯医学会大会, 2018年11月.

Yukuto Sato, Masaki Miya, Tsukasa Fukunaga, Tetsuya Sado, Wataru Iwasaki. IIBMP2018

生命情報科学若手の会 ハイライトトラック: MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. 第7回生命医薬情報学連合大会, 2018年9月.

Idam Hermawan, Chiaki Matsuura, Yukuto Sato, Claudia Toma. Isolation of environmental pathogenic *Leptospira* from soil collected in the northern part of Okinawa. 第71回日本細菌学会九州支部総会, 2018年9月.

水山 克, 佐藤行人, サトウ 恵, 源 利文, トーマ クラウディア. 沖縄県北部におけるレプトスピラ環境 DNA に関する研究. 第55回レプトスピラ・シンポジウム, 2018年3月.

Yukuto Sato, Kaori Tsurui-Sato, Shingo Fujimoto. Development of environmental DNA (eDNA) analysis platform in the University of the Ryukyus. OIST and Univ. Ryukyus Joint Symposium 2017, 2017年10月.

徳山孟伸, 佐藤行人, 笹井隆秀, 戸田 守. ウミヘビ類を対象とした環境 DNA 分析の有効性の評価. 沖縄生物学会第54回大会, 2017年5月.

〔その他〕

ホームページ等

環境 DNA データ解析のオンラインプログラム MiFish pipeline:  
<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish>

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。