

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14481

研究課題名（和文）メダカ種群における環境DNA手法を用いた外来遺伝子の新規モニタリング手法の確立

研究課題名（英文）Development of environmental DNA method for detection of genetic introgression in medaka species complex

研究代表者

中尾 遼平（Nakao, Ryohei）

山口大学・大学院創成科学研究科・准教授（特命）

研究者番号：10814618

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）：本研究では、メダカ種群における遺伝的攪乱の新規モニタリング手法として、環境DNA分析を用いたメダカ外来遺伝子の検出手法の開発を目的とした。本研究では、野生メダカおよびヒメダカの核DNAを対象とした検出系を開発し、河川や用水路のような環境水からメダカ2種の環境DNAをそれぞれ検出することができた。さらに、飼育水槽のような閉鎖的な環境であれば、2種の環境DNA濃度は、それぞれの対立遺伝子頻度と正の相関を示した。本研究で開発した手法は野外適用できることが示されたが、野外で検出された環境DNA濃度が非常に薄かったことから、検出率の向上や偽陰性の低減にむけた手法の改善が必要となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝的攪乱の進行は、全国に生息する純粋な野生メダカを絶滅させかねない現象であり、メダカの遺伝的多様性を保全するためには、各地における遺伝的攪乱の早期発見が求められる。本研究で開発した手法は、ヒメダカによる遺伝的攪乱を環境水から迅速に検出できることから、遺伝的攪乱を検出するためのツールとして非常に有用であると考えられる。また、メダカは童謡にもなるほど日本人にとって馴染み深い魚類であり、水田環境のシンボルフィッシュでもある。遺伝的攪乱の防止と野生メダカの保全は、日本にメダカの生息する水環境を未来まで存続していくことにつながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a novel tool for monitoring the genetic introgression in wild medaka *Oryzias latipes* species complex using environmental DNA (eDNA) analysis. We developed the eDNA markers to detect the nuclear DNA of wild medaka and artificial strain called as "himedaka", and could detect the eDNA of two medaka species from the field water (rivers and canals) using these DNA markers. Furthermore, in a closed water environment, such as a breeding tank, eDNA concentrations of the two species were positively correlated with their allele frequencies, respectively. However, the eDNA concentrations of two species detected in the field were much lower, and the improvement of detection method should to be necessary to increase the detection rate and decrease of false negative rate.

研究分野：保全遺伝学

キーワード：メダカ種群 環境DNA 遺伝的多様性 保全 遺伝的攪乱 外来遺伝子

1. 研究開始当初の背景

遺伝的攪乱は、人為的な影響によって外来集団が侵入することで、在来集団中の遺伝子構成を変化させる現象である。本現象は、遺伝子レベルでの固有性の低下や喪失を引き起こし、種の遺伝的多様性に重大な影響を与えると考えられている。

メダカ種群 *Oryzias latipes* species complex はダツ目メダカ科の淡水魚類であり、広い生息域のなかで 10 の地域集団に分かれることから、高い遺伝的多様性を有している (Takehana et al. 2003, 図 1)。近年、メダカ種群では人為的な個体の放流などによる遺伝的攪乱が生じており、メダカ種群のもつ遺伝的多様性の喪失が懸念されていたが、詳細な現況はまったくの不明であった。そこで、申請者は全国 105 地点のメダカ野生集団の DNA 解析を行い、メダカ種群における遺伝的攪乱の現況を全国レベルで解明した (Nakao et al. 2017)。さらに、移入遺伝子の大部分は改良品種「ヒメダカ」由来であったことから、メダカ種群における遺伝的攪乱の主要因がヒメダカであることが判明した。



図 1 野生メダカの分布と地域集団

集団内の遺伝子構成は繁殖や淘汰、人為的な移入によって常に変化していることが予想され、在来集団だからといってこの先も維持され続ける保証はない。攪乱集団についても、時間経過によって外来遺伝子の割合が減少し、在来集団として復元されている可能性も考えられる。在来・攪乱集団にかかわらず、メダカ種群の保全において外来遺伝子の時空間的な動態を把握する必要がある。しかし、連続でのモニタリングを行なうには、各生息地で継続的に個体を採集する必要があり、絶滅危惧種であるメダカ種群にとって、集団の絶滅リスクを増加させる恐れがある。また、定期調査を行なうには人的・時間的に多大な労力を要するため、迅速かつ簡便な手法でメダカ種群の遺伝的攪乱を把握できる手法の実装が求められる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、近年生物モニタリングの手法として利用が進む環境 DNA (eDNA) 手法を用いて、(1)メダカ種群における外来遺伝子の検出手法の開発と(2)時系列的なモニタリングによる外来遺伝子の動態の把握を目的とする。メダカ種群における遺伝的攪乱の主要因はヒメダカであることから、本研究はヒメダカ遺伝子をターゲットとした eDNA 検出手法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) eDNA 分析手法の開発

メダカでは、核 DNA やミトコンドリア DNA を対象として遺伝的攪乱の有無を判別してきた。核 DNA マーカーの体色遺伝子 (B 遺伝子) は、野生メダカ (B 型) とヒメダカ (b 型) の変異が明瞭な領域である (図 2)。また、黄体色の発現によって捕食者に見つかりやすく、野外で淘汰されやすいことがわかっている (Nakao and Kitagawa, 2015)。したがって、サンプリングによる集団中の時間的なアリル頻度の変動を読み取りやすい遺伝子領域であると予想される。本研究では、B 型と b 型のそれぞれのアリルを特異的に検出可能なプライマーを設計し、リアルタイム定量 PCR 法による各アリルを検出および定量可能な検出系として開発した。また、種特異性の確認には、メダカ種群と同所的に生息している種を選定し、それぞれの体組織から抽出した DNA を用いた。

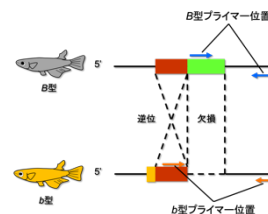


図 2 eDNA マーカーの概略図

(2) eDNA 濃度とアリル頻度の関係の把握

水槽実験として、メダカとヒメダカの混成集団 10 個体を飼育する水槽の水サンプルから、それぞれの遺伝子の検出と定量を試みる。水槽で飼育する集団内のアリル頻度は、B 型:b 型 = 10:0-0:10 までの 6 段階で設定し、設定したメダカおよびヒメダカのアリル頻度とリアルタイム定量 PCR の B 型および b 型の定量値を比較することで、アリル頻度ごとの定量値を算出した。また、得られた eDNA 濃度から算出したアリル頻度と実際のアリル頻度との相関係数を算出し、

eDNA とアリル頻度との関係を検討した。

(3) 河川における eDNA 手法の野外適用と時間動態の把握

野外適用では1ヶ月に1度の採水調査を実施し、(1)で開発した eDNA マーカーによる B 型と b 型の eDNA 分析を適用した。また、先行研究で開発されたミトコンドリア DNA 環境 (mtDNA) を対象とした検出系 (Tsuji et al. 2019) も同時に分析し、核 DNA と mtDNA の検出感度の違いについても検証した。採水地域には、申請者らが過去に遺伝的攪乱を報告している東京都 (多摩川水系野川) および奈良県 (大和川水系) を選定した。東京都では野川の流程にそって8地点を採水地点に設定し、2年間の定点調査を行なった。奈良県では、大和川水系の河川およびため池を対象に12地点を選定した。eDNA 分析によって得られた eDNA 濃度を各調査時期および各地点で比較することで、外来遺伝子である b 型がどのような場所で、どのような時期に検出されやすいのかを検討した。

なお本研究では、野外調査において、野川では1年目の冬季より河川の浚渫工事が開始されたこと、冬季の極端な渇水により上流部でのサンプリングが困難であったことから、東京都での調査を中断し、冬季以降は奈良県でのみ調査を実施した。

4. 研究成果

(1) eDNA 分析手法の開発

本研究では、環境 DNA 分析で主に用いられている TaqMan プロローブ法とインターカーレーター法の2種類の検出系について開発を試みた。TaqMan プロローブ法はプライマーと DNA プロローブを作成することで種特異性を高く保持できるが、配列の自由度が低くなる傾向にある。一方で、インターカーレーター法は配列の自由度が高くなるが、プライマーのみで種特異性を確保しなければならないため、検出系のハードルが高くなる。本研究では、それぞれの検出系を検討したところ、インターカーレーター法で種特異性を担保することができたため、インターカーレーター法の検出系を採用した。表中の+は対応する検出系で検出された種を、-は検出されなかった種をそれぞれ示している。この結果、B 型の検出系ではミナミメダカ (野生メダカ) のみを、b 型の検出系ではヒメダカのみをそれぞれ特異的に検出できていた。

表1 種特異性の確認結果

種名	Primer Set (B type)	Primer Set (b type)
ミナミメダカ	+	-
ヒメダカ	-	+
カダヤシ	-	-
グッピー	-	-
オイカワ	-	-
カワムツ	-	-
ヌマムツ	-	-
ウグイ	-	-
タイリクバラタナゴ	-	-
ヤリタナゴ	-	-
フナ	-	-
モツゴ	-	-
タモロコ	-	-
ドジョウ	-	-
シマドジョウ	-	-
トウヨシノボリ	-	-
カワヨシノボリ	-	-

(2) eDNA 濃度とアリル頻度の関係の把握

開発した検出系を用いて、飼育水槽から採水したサンプル中に存在する野生メダカおよびヒメダカの環境 DNA を検出したところ、B 型と b 型ともに水槽中の集団を構成するアリル頻度と正の相関を示した (Spearman's correlation test, $p < 0.01$)。これにより、水中に存在する eDNA の濃度は、集団のもつアリル頻度とある程度反映することが示唆され、eDNA 濃度を用いた集団の遺伝子構成を明らかにできる可能性が示された。一方で一部の集団ではアリル頻度との乖離がみられており、攪拌不足など採水時の影響や飼育環境中のストレスなどの可能性が考えられるが、その原因を特定することはできなかった。

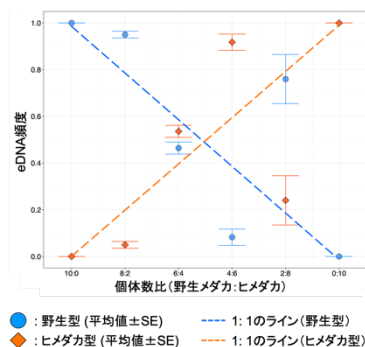


図3 アリル頻度と eDNA 濃度の関係

(3) 河川における eDNA 手法の野外適用と時間動態の把握

開発した検出系を用いて、奈良県大和川水系の河川および農業用水路から採水したサンプルの eDNA 分析を実施したところ、12 地点中 9 地点から B 型が、4 地点から b 型が検出された。これにより、野生メダカおよびヒメダカ由来の遺伝子を検出することができ、eDNA 分析でヒメダカによる遺伝的攪乱の有無を検出することが可能となった。また、b 型がもっとも多く検出された地点は、N1 であった (図 4)。この地点は、奈良県においてメダカやキンギョの養殖場が多く存在する大和郡山市周辺であり、養殖場から逸出したヒメダカ由来、または養殖池からの排水に含まれているヒメダカ由来の DNA を eDNA 分析で検出したと思われる。また、この地点は 4 月から 9 月まで継続して b 型が検出されていた。これは、コンクリート堀りまたは素掘りの野外養殖池で主に利用される時期であり、用水路にメダカの eDNA が流れ込みやすくなっている状況になったこと、養殖の規模が大きくなっていることから、eDNA が検出されやすくなったと考えられる。さらに、N1 においては、ヒメダカの目視観察情報とも一致している地点も多かった。また、

B型についてはb型よりも多数の地点で見つがっていることから、大和川水系において多くの水域で野生メダカが生息している可能性が示唆された。

一方で、同時に分析を行なったmtDNAの結果と比較すると、本研究で開発した検出系の検出地点は、非常に少なくなっていることが示された。この原因として、核DNAの検出系で検出されたeDNA濃度が非常に低かったことがあげられる。2手法間のeDNA濃度を比較すると、核DNAの濃度はmtDNAの約1/100程度であった。これは、細胞中に存在するDNAのコピー数そのものが、核DNAにくらべてmtDNAが圧倒的に多いためであると考えられる。特に、本研究で開発した検出系はシングルコピーのDNAであったことから、コピー数の影響の少なさによる影響が直接的に検出感度へと響いたと思われる。

また、検出された季節では、夏期にもっとも検出地点数が高くなっており、次に秋季となっていた。eDNA濃度は魚類の生態や活性と密接に関わっており、活性が高い時期ほど放出されるDNA濃度も高くなることが知られている。そのため、夏期に検出率が増加したことは、コピー数の少ない核DNAであったとしても、活性の高い時期であれば検出感度は増加する可能性を示していると考えられる。

本研究で開発したいeDNA分析の検出系は、環境水からヒメダカ由来のDNAを検出することができ、水をくむだけでヒメダカによる遺伝的攪乱を検出するための有用なツールとなることが示唆された。一方で、環境水から検出できるDNA濃度が非常に低くなっていることから、水槽水で示されたようなそれぞれの遺伝子型のアレル頻度の推定等を行なうことはできないのが現状である。今後、環境水から検出できるeDNA濃度の向上にむけて、環境中のDNAの濃縮効率の改善や、検出感度の向上につながる分析条件の検討などを行なっていく必要がある。

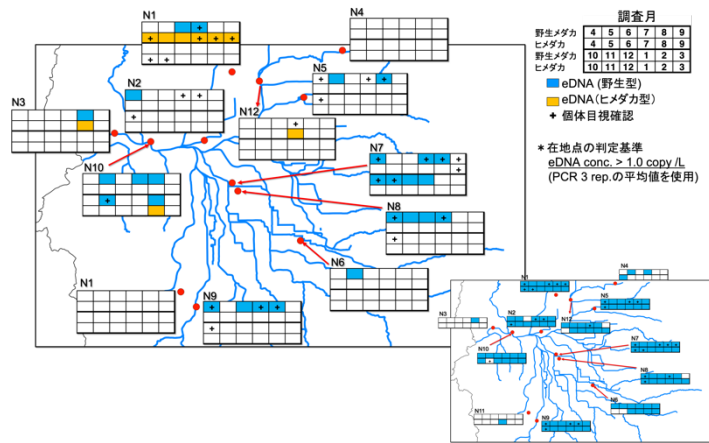


図4 奈良県大和川水系におけるeDNA分析結果

上が本研究で開発した核DNA、下がmtDNAの結果を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中尾遼平・北川忠生・源利文
2. 発表標題 環境DNA手法によるヒメダカによる遺伝的攪乱の検出
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中尾遼平・北川忠生・源利文
2. 発表標題 環境DNAを用いたメダカにおける遺伝的攪乱の検出
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------