

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19223

研究課題名(和文) バクテリアからクジラまで、全生物群集構造同時解析法の開発

研究課題名(英文) Development of simultaneous analysis method of whole community structure from bacteria to whale

研究代表者

伊知地 稔(Ijichi, Minoru)

東京都立大学・理学研究科・客員研究員

研究者番号：10633894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：原核生物のバクテリアから真核生物のクジラまで、全生物に共通の遺伝子(転写産物)を全長塩基配列解読により同時検出し、ある環境に生きる全ての生物を特定する手法を開発した。本手法は先行手法と比較し、生物分類や機能情報を高精度に推定でき、PCRによる遺伝子増幅に起因する多様性の偏りを改善できる。本手法は、抽出RNA中にはrRNAが豊富に存在しているので、PCRを介さずにRNAから必要な量のcDNAを逆転写だけで確保し、ロングリードシーケンサーで塩基配列を解読するという要素技術からなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、自然環境に生息する動植物の種類を調査する方法として、環境DNAが注目されている。なぜなら、直接的に動植物を採集する必要が無いので、環境への悪影響が小さいと考えられているからだ。一方、環境DNAで使われている分析手法には改良すべき点がある。それは、魚類や昆虫類など、特定の分類群単位でしか同時に分析できない点である。本研究では、この点を改良し、原核生物のバクテリアから真核生物のクジラまで、全生物を同時に分析できる手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：I have developed a method to simultaneously detect genes (transcripts) common to all organisms, from prokaryotic bacteria to eukaryotic whales, by full-length sequencing, and to identify all organisms living in a given environment. Compared to the previous method, this method can estimate the classification of organisms and functional information with high accuracy, and can improve the bias of diversity caused by gene amplification by PCR. Since rRNA is abundant in extracted RNA, this method consists of the following elemental technologies: securing the necessary amount of cDNA from RNA without PCR by reverse transcription alone, and decoding the nucleotide sequence with a long read sequencer.

研究分野：分子生態学

キーワード：環境RNA 全生物群集構造同時解析 ロングリードシーケンシング

1. 研究開始当初の背景

アンプリコンシーケンスによる群集構造解析や、ショットガン法によるメタゲノミクス・メタトランスクリプトミクスから、海洋環境中の原核生物から真核生物に至る全生物の分布や生態を研究してきた。これらの解析における欠点は、PCR による遺伝子増幅に起因する多様性の偏りや、ショートリードシーケンサーで解読できる塩基配列の長さ(遺伝子の由来生物と機能情報を正確に推定出来ない)である。前者に対してはメタゲノミクス・メタトランスクリプトミクスが、後者に対してはロングリードシーケンサーの利用がその解決策に成り得る。しかし、これらには相対的に存在量が少ない遺伝子(転写産物)を検出し難いという別の欠点がある。そこで応募者は、これら全ての欠点を解決するために、ジーン・キャプチャーによるターゲットメタトランスクリプトミクスをロングリードシーケンサーで行えば良いと構想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、原核生物のバクテリアから真核生物のクジラまで、全生物に共通の遺伝子(転写産物)を全長塩基配列解読により同時検出し、ある環境に生きる全ての生物を特定する手法を開発する。本手法は先行手法と比較し、生物分類や機能情報を高精度に推定でき、PCR による遺伝子増幅に起因する多様性の偏りを改善できる。本目的を達成するためには、遺伝子によって異なる二つの要素技術が必要である。一つは、rRNA を対象とした要素技術である(以後、解析法 1 と呼ぶ)。抽出 RNA 中には rRNA が豊富に存在しているので、PCR を介さずに RNA から必要な量の cDNA を逆転写だけで確保し、ロングリードシーケンサーで塩基配列を解読すれば、目的を達成できると着想した(図 a)。もう一つは、全ての遺伝子(転写産物)を対象とした要素技術であり、一般にターゲットメタゲノミクス(ターゲットメタトランスクリプトミクス)と呼ばれている(以後、解析法 2 と呼ぶ)。この解析法では、遺伝子配列データから作製したプローブで、短断片化した DNA (cDNA) をハイブリダイゼーションで分取後(本手法はジーン・キャプチャーと呼ばれる)に、ショートリードシーケンサーで塩基配列を解読する。そこで応募者は、この解析法を長断片化した DNA もしくは完全長 RNA に適用し、ロングリードシーケンサーで塩基配列を解読すれば、目的を達成できると着想した(図 c)。

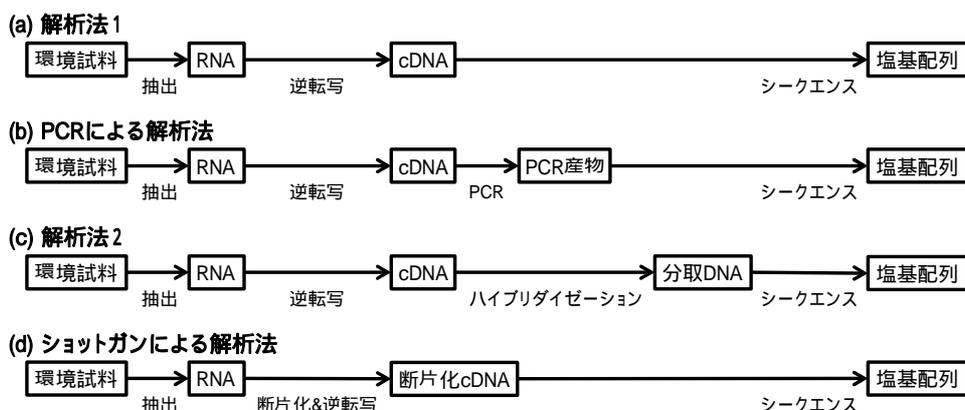


図. 本研究で提案する要素技術と従来法の概略。

3. 研究の方法

解析法 1 を原核生物と真核生物の単一種に適用できるかを検証した。原核生物には海洋細菌分離株である *Vibrio azureus* LC2-005T を、真核生物にはカイアシ類である *Calanus sinicus* を用いた。本検証では、分析に必要な試料量と、RNA を cDNA に逆転写する条件の検討をした。逆転写には、オリゴ dT プライマーを用いる方法(原核生物はポリ A 付加後)と、ランダムプライマーを用いる方法があるが、これまでに行った条件検討から前者を選択した。次に、解析法 1 を海洋生態系に適用できるかを検証した。海水試料は、東北海洋生態系調査研究船(学術研究船)新青丸を利用して採取した大槌湾沖の水深 0 m と 50 m、100 m の 3 試料を使用した。本検証では、試料採取法と RNA 抽出法の検討をした。また、解析法 1 (図 a) と従来の PCR による遺伝子増幅法(図 b)に基づく群集構造との比較から、本解析の有効性を確認した。

解析法 1 で得られた遺伝子配列と既存の遺伝子配列データからプローブを設計し、解析法 2 を海洋生態系に適用できるかを検証する予定だったが断念した。これは、プローブの合成依頼を予定していた会社がヒトを始めとした医学系の受注のみにサービスを縮小した為、その合成依頼が不可能になったためだ。他社にも見積もり依頼をしたが、少なくとも当初予定価格の 10 倍(1,000 万円)以上とのことであった。代わりに、ショートリードシーケンサーの 1 フローセルで 1 サンプルをシーケンシングする試みを行った。試料は琵琶湖の湖水を利用し、水深

5 m と 15 m、50 m、72 m の 4 試料を使用した。

4 . 研究成果

解析法 1 を原核生物と真核生物の単一種に適用できるかを検証した結果、有効な配列数が得られた効率は悪いが、本解析法は実施可能であると分かった。次に、解析法 1 を海洋生態系に適用できるか検証した。ロングリードシーケンサーからの出力配列数は合計 1,287,735 であった。リファレンスデータベースマップされた配列数は、リファレンスデータベースによって多少違うが合計 50,000 程度であり、ほとんどの配列はマップされなかった。マップされたリファレンス数は、リファレンスデータベースによって多少違うが 7,000 程度であり、全ての水深でバクテリアと真核生物由来の配列が同程度、これら以外にアーキアが 1%前後検出された。バクテリアで多く検出されたのは肺炎レンサ球菌 *Streptococcus pneumoniae*、真核生物で多く検出されたのは珪藻類 *Conticribra weissflogiopsis* であったが、海島綿 *Gossypium barbadense* のクロロプラスト由来配列も多く検出されていた。

ショートリードシーケンサーの 1 フローセルで 1 サンプルをシーケンシングする試みでは、優占している系統は琵琶湖でよく見られる真核藻類や、原生生物、甲殻類の動物プランクトン(ミジンコやカイアシ)に由来する配列が多かった。真核生物に混ざって、バクテリアも上位に食い込んでおり、琵琶湖で良く見られる種類が多かった。興味深い点としては、ハゼやマスなど、魚類由来の配列もそれなりの数が検出されていた。変わったところでは、ネズミやコウモリにアサインされた配列もあった。また、湖底直上のサンプルは多様性が高く、ベントスらしきものも検出されていて、ワムシやウズムシやミズムシやカイメンやイトミミズの配列もあった。

本研究で再確認させられたことは、大型動植物の遺伝子配列が思っていた以上に調べられていないという点である。生息している筈がないモデル生物にアサインされた配列や、何にもマップやアサインされた配列が、それらを裏付けている。現在、猛烈な勢いで非モデル生物のゲノムが決められている。近い将来、本研究のデータを再解析すると、今回よりも多くの配列がマップやアサインされると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ijichi Minoru, Itoh Hajime, Hamasaki Koji	4. 巻 201
2. 論文標題 Vertical distribution of particle-associated and free-living ammonia-oxidizing archaea in Suruga Bay, a deep coastal embayment of Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of microbiology	6. 最初と最後の頁 1141 ~ 1146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00203-019-01680-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Minegishi Yuki, Wong Marty Kwok-Shing, Kanbe Takashi, Araki Hitoshi, Kashiwabara Tomomi, Ijichi Minoru, Kogure Kazuhiro, Hyodo Susumu	4. 巻 14
2. 論文標題 Spatiotemporal distribution of juvenile chum salmon in Otsuchi Bay, Iwate, Japan, inferred from environmental DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shiozaki Takuhei, Ijichi Minoru, Fujiwara Amane, Makabe Akiko, Nishino Shigeto, Yoshikawa Chisato, Harada Naomi	4. 巻 33
2. 論文標題 Factors Regulating Nitrification in the Arctic Ocean: Potential Impact of Sea Ice Reduction and Ocean Acidification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Global Biogeochemical Cycles	6. 最初と最後の頁 1085 ~ 1099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1029/2018GB006068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 伊知地 稔	4. 巻 73
2. 論文標題 これから環境DNAによる調査・研究を始める方へ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本海水学会誌	6. 最初と最後の頁 273 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takano Tsuyoshi, Ijichi Minoru, Itoh Hajime, Fukuda Hideki, Yoshizawa Susumu	4. 巻 4
2. 論文標題 Complete mitochondrial genome sequences of a deep-sea holothurian species of the genus Scotoplanes (Elasipodida: Elpidiidae)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mitochondrial DNA Part B	6. 最初と最後の頁 112 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23802359.2018.1536462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wong Shu-Kuan, Ijichi Minoru, Kaneko Ryo, Kogure Kazuhiro, Hamasaki Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 Ammonia oxidizers in the sea-surface microlayer of a coastal marine inlet	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0202636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiozaki Takuhei, Fujiwara Amane, Ijichi Minoru, Harada Naomi, Nishino Shigeto, Nishi Shinro, Nagata Toshi, Hamasaki Koji	4. 巻 63
2. 論文標題 Diazotroph community structure and the role of nitrogen fixation in the nitrogen cycle in the Chukchi Sea (western Arctic Ocean)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Limnology and Oceanography	6. 最初と最後の頁 2191 ~ 2205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lno.10933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ijichi Minoru, Takano Tsuyoshi, Hasegawa Masumi, Yashiki Haruka, Kogure Kazuhiro, Kojima Shigeaki, Yoshizawa Susumu	4. 巻 3
2. 論文標題 The complete mitochondrial genome of the longfin dragonfish <i>Tactostoma macropus</i> (Stomiiformes: Stomiidae)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mitochondrial DNA Part B	6. 最初と最後の頁 486 ~ 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23802359.2018.1464411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 半田 佳宏、伊知地 稔、山口 晴代、諸橋 伸行、阿部 洋子、河地 正伸、中野 江一郎
2. 発表標題 カビ臭産出藍藻類のゲノム解析
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会（2019年度）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊知地 稔
2. 発表標題 はじめての環境 DNA から、その未来像まで
3. 学会等名 第2回NPO法人有明海再生機構ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊知地 稔
2. 発表標題 分析会社の視点から：元大学研究者からみた環境DNAの将来
3. 学会等名 応用生態工学会第23回広島大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 進一、由上 龍嗣、上村 泰洋、渡邊 千夏子、吉澤 晋、伊知地 稔、伊藤 幸彦、石川和雄、郭 晨穎、榎本 めぐみ
2. 発表標題 OceanDNAを用いた黒潮統流前線付近の魚類部分に関する考察
3. 学会等名 2019年度水産海洋学会研究発表大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本 友、奥山 永、田畑 諒一、伊知地 稔、勝又 啓史、川内 智裕、中野 江一郎、高橋 純一
2. 発表標題 日本産ナマズ属の種判定およびマイクロサテライトDNAマーカーの開発
3. 学会等名 日本DNA多型学会第28回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Marty Wong, Yuki Minegishi, Tomomi Kashiwabara, Minoru Ijichi, Susumu Hyodo
2. 発表標題 Technical improvement for salmon eDNA quantification: From clean laboratory to dirty field
3. 学会等名 Seminars on sustainable aquaculture, resource enhancement and conservation of salmon and other species (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuhei Shiozaki, Minoru Ijichi, Akiko Makabe, Amane Fujiwara, Koji Sugie, Shigeto Nishino, Chisato Yoshikawa, Naomi Harada
2. 発表標題 Significant decrease in nitrification rates by Arctic environment changes
3. 学会等名 第32回日本微生物生態学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田秀樹、伊知地稔、高巢裕之、楊燕輝、佐藤菜央美、永田俊
2. 発表標題 三陸沖における水塊の起源と原生生物の分布特性
3. 学会等名 日本海洋学会2018年度秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊知地稔、吉澤晋、Shu-Kuan Wong、高野剛史、木暮一啓、岩崎渉
2. 発表標題 環境RNA と環境DNA 間で検出できる種数の違い
3. 学会等名 第1回環境DNA学会東京大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 峰岸有紀、黄國成、伊知地稔、兵藤晋
2. 発表標題 環境DNAによる大槌湾シロサケの時空間変動解析
3. 学会等名 クレストサイトビジット
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊知地稔、武島弘彦、熊谷洋平、小林陽子、吉澤晋、福田秀樹、木暮一啓
2. 発表標題 三陸沿岸において有光層の窒素循環はNitrosopumilus maritimus-like clusterに属するアンモニア酸化古細菌が駆動する
3. 学会等名 平成30年度東北マリンサイエンス拠点形成事業全体会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊知地稔
2. 発表標題 遺伝子検査による水環境の健康診断を迅速・簡便化する装置の開発
3. 学会等名 第2回マリンテックグランプリ(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊知地稔
2. 発表標題 遺伝子情報を用いた微生物・水生動物の資源や動態、生息環境の把握と保全（仮題）
3. 学会等名 平成30年度日本海水学会 環境・生物資源研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019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