

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04290

研究課題名（和文）底層環境評価への環境DNA手法適用へ向けた各種起源由来DNAの分解動態解析

研究課題名（英文）Degradation kinetics of various source materials of environmental DNA in sediment

研究代表者

中島 典之（NAKAJIMA, Fumi-yuki）

東京大学・環境安全研究センター・教授

研究者番号：30292890

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：底質中DNAの分解動力学に着目し、ニホンドロソコエビを対象生物と設定して環境DNAの起源となる試料を調製し、それらの室内分解実験を体系的に実施した。対象生物の死骸と上位捕食者の糞を分解実験に供することに成功した。室内分解実験により前者のDNA分解速度は後者よりも大幅に大きく、既報の成長過程での生成物の分解よりも早かった。環境DNA分析で底質から検出されるものとして捕食魚類の糞の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境DNA分析は環境中の何を測っているのか、を知ることは、対象生物の定量的推定や効率的なモニタリング実施において重要な情報であるが、知見が限られている。本研究では、捕食者糞中DNAはほぼ分解されず、死骸由来DNAは環境中でより分解されやすいことが示唆された。今後の調査においては捕食生物も含めた網羅的なDNA分析をすることが望ましい。

研究成果の概要（英文）：This study focused on the DNA degradation kinetics in sediment of water environment. An estuarine amphipod *Grandidierella japonica* was used as a test organism and the potential source materials of environmental DNA was produced to conduct a laboratory test of its biodegradation. We successfully prepared the dead bodies of juvenile amphipods and the feces of fish preying the amphipods and subjected them to the degradation test. As a result, the degradation rate of DNA in the dead bodies was significantly higher than in the fish feces and also in the products of growing phase. The result suggested the importance of predator's feces in the environmental DNA analysis of sediments.

研究分野：都市環境工学

キーワード：環境DNA 底生生物 底泥

1. 研究開始当初の背景

将来の日本の水環境管理において、閉鎖性海域の底層環境の保全、水生生物への影響を考慮した排水管理、「豊かな海」を目指した生態系保全、といった点が重要視されるようになってきている。このような観点では、環境の分析に加えて生態系そのものの調査が不可欠である。現状の水生物保全関連施策は、水域生態系がどうなっているのか、という基礎情報が不十分なまま「有害物質を流さない」という施策を進めている。予防的措置として正しい方向性であるが、本来は水域生態系を明らかにする技術を確立し、その結果に基づいた問題把握と対策立案、施策事後評価を行うべきである。

近年急速に進展している環境 DNA 手法は、生物種の検出を形態ではなく配列情報から判断する点で専門家依存を軽減し、採取・抽出・前処理・解析などの一連の作業の個人差を低減できるため、高頻度、高密度の調査を可能にし、水域生態系を明らかにするという本来あるべき方向性を加速するものと期待できる。

一方、この技術の現状の課題として広く認識されているのは定量性、すなわち環境 DNA の生成と分解の動力学的な理解である。また多くの先行研究は水中 DNA を対象としているが、水環境においては表層底質近傍も重要な評価領域であり、より高濃度で環境 DNA が存在し、時間変化が小さい底質中環境 DNA を見る方が有用である可能性が高い。

そこで、本研究課題では底質中 DNA の分解動力学に着目する。異なった起源に由来する様々な環境 DNA 試料(以下、起源試料とする)を調製し、それらの室内分解実験を体系的に実施し、環境中の DNA 量と生物存在量とを結びつけるための知見の重要な基盤を固めることが目的である。これにより、将来的には底泥試料を用いた底生生態系の簡易なモニタリング手法が確立され、高頻度・高密度の調査が可能になると期待される。

2. 研究の目的

底質中での環境 DNA の起源を複数想定し、それぞれについての分解特性を実験的に明らかにし、定式化を図ることが目的である。本研究課題では以下の3つの研究項目(1)~(3)を設定する。なお対象 DNA 試料は汽水産底生甲殻類のニホンドロソコエビ (*Grandidierella japonica*) を用いる。

- (1)起源試料の調製
- (2)分解実験
- (3)分解機構の解明

3. 研究の方法

(1)起源試料の調製

ニホンドロソコエビを摂食した上位捕食者の糞

上位捕食者としてマハゼ(静岡県内にて餌釣りにより捕獲)を用いた。大きさが同程度で健康な個体5尾を選定し、1尾ずつ計5つの試験容器に投入した。10日間に渡り、各試験容器のマハゼに1日に1回100個体のニホンドロソコエビ(静岡県内の小河川において採取)を給餌し、給餌の2時間後から約1時間おきに飼育容器内の排糞の有無を観察した。排糞が確認された場合は、広口の駒込ピペットを用いて、糞を採取し、ガラス製シャーレに入れてキムワイプで水分を除去した後、ステンレス製ピンセットを使用して50 mL容遠沈管に入れて-30℃で冷凍保存した。

ニホンドロソコエビの死骸

実環境中での死骸の発生要因は貧酸素や有害物質によるもの、物理的ストレス(機械的な切断等)によるものなど多様と考えられる。本研究課題では、その後の分解実験に影響を及ぼしうる有害物質なしに調製することを優先し、乾燥による死骸生成を再現した。実験室内のニホンドロソコエビ飼育水槽より、500 µmの篩を通過し250 µmの篩に捕捉された個体を回収し、人工海水中で表面の付着物等を落とした後、ペーパータオル上に移して数時間放置し、分解試験のための死骸試料とした。

その他の起源試料

本研究課題の実験過程ではさまざまな起源試料を検討し、結果的に分解速度検討が可能となったのは上記ののみであった。それ以外の起源試料については採取できる量(含有DNA量=検出感度)の限界から分解実験に供することはできなかったが、このような詳細調査事例は新規性が高いと考えられるため、4.研究成果で採取方法と検討結果を記す。

(2)分解実験

(1)で調製した起源試料中のニホンドロソコエビの DNA の分解実験を行った。

分解微生物の採取

実験室内のニホンドロソコエビ飼育水槽から底泥を十分量含む水を瓶に 500 mL 採取し、蓋をしてから瓶を強く撹拌した。底泥がある程度沈降（約 3 分静置）した後、比較的孔径の大きいメンブレンフィルター（捕捉効率カタログ値：10 μ m 粒子>99.9%、2 μ m 粒子 98%）を通過したろ液を分解微生物の植種液として採取した。

上位捕食者糞中の DNA の分解試験

(1) のマハゼの糞を一つの容器に入れ、均質になるように混ぜた後、50 mg ずつ 50mL 遠沈管に分取した。植種液を 10 mL ずつ入れボルテックスしたのち、滅菌済みシリコ栓をつけ、バイオシェイカーで 25 $^{\circ}$ C、60 rpm（水平振盪）で分解を行った。約 1 か月間の分解期間の適当なタイミングで遠沈管を開栓し微生物濃度を測定するために上層水を 3 mL 採取し、0.01%となるようグルタルアルデヒドを加えて冷蔵庫に保存した。DNA 分析に供するために、残りの試料を 15 mL 遠沈管に移し、遠心分離（14000 \times g、20 分、10 分）したあと上澄みを捨て、冷凍保存した。

死骸中 DNA の分解試験

50 mL の遠心管（計 5 本）を分解容器とし、人工海水（植種液をさらに孔径 0.2 μ m の膜でろ過したもの）5 mL に(1) のニホンドロソコエビ死骸（50 個体分）を入れ、試料が浮かないように遠心機にかけた後、植種液 5 mL を添加し、シリコ栓をつけ、バイオシェイカーで 25 $^{\circ}$ C、60 rpm（水平振盪）で分解を行った。0、5、19、26、48 時間後に 1 本ずつ開封し試料を採取した。微生物濃度測定用試料として上層 490 μ L を採取した後、遠心分離（14,000 \times g、20 分、10 分）し、上澄み 9 mL を捨て残りを DNA 分析試料として冷凍保存した。なお、試験前後の容器全体の重量を測定することで、試験中の蒸発による濃縮を確認したが、10 mL の試験水 1% 以下であり、実験結果に大きな影響を与えていないと判断した。

ニホンドロソコエビ DNA 濃度測定

DNA 抽出は事前の検討により最大の回収量が得られた方法（CTAB 法のプロトコルでバッファを SDS に変更）を用いた。ニホンドロソコエビの COI 領域を対象としたプライマー126F/126R（Wei et al, 2018）を用いリアルタイム PCR 法によりニホンドロソコエビ由来 DNA の濃度を定量した。

微生物濃度測定

試料水 490 μ L に、5 μ L の 500mM EDTA 及び 5 μ L の SYBR Green I/PI 混合液を加えボルテックスし、暗所で 37 $^{\circ}$ C、10 分間静置した後、フローサイトメーター（BD Accuri C6）で微生物濃度（生菌数）を計測した。

(3)分解機構の解明

分解実験の際の微生物試料に対し、細菌の 16S rRNA 遺伝子の V3V4 領域をターゲットとしたアンプリコンシーケンス（2 \times 300 bp, MiSeq）を実施し、微生物群集構成の定性的な比較を行った。

(2)の分解実験のうち、上位捕食者糞分解試料（0, 3, 6, 24, 72, 168 h、n=4）、ニホンドロソコエビ死骸分解試料（0, 5, 19, 26, 48h、n=1）から DNA を抽出した。比較のために、荒川河口域の小松川干潟の泥より FastDNA SPIN kit for Soil（MP Biomedicals）を用いてプロトコルに従い DNA 抽出を行った。抽出液中の DNA 濃度は NanoDrop もしくは Qubit（いずれも Thermo Fisher Scientific）を用いて定量した。以上の 12 種類の DNA 試料に対し、細菌の 16S rRNA 遺伝子の V3V4 領域をターゲットとしたアンプリコンシーケンスを行った。PCR プライマーには以下の V3V4f_MIX と V3V4r_MIX を用い、Takara ExTaq Hot Start Version キット（タカラバイオ）を用いて 22-30 サイクルの増幅を行った。

V3V4f_MIX : ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-CCTACGGGNGGCWGCAG

V3V4r_MIX : GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-GACTACHVGGGTATCTAATCC

得られた 1st PCR 産物を MiSeq システム（Illumina）を用いて 2 \times 300 bp の条件でペアエンドシーケンシングを行った。得られた配列データは QIIME2（version: qiime2-2021.8、Bolyen et al. 2019）で解析を行い、DADA2 プラグインを用いてクオリティフィルタリング、トリミング、ノイズ配列除去、リード結合、キメラ配列除去を行った後、q2-feature-classifier プラグインを用いて Naive Bayes classifier（gg-13-8-99-515-806-nb-classifier.qza）による系統推定を行った。また、q2-phylogeny プラグインを用いて系統樹を作成した。amplicon sequence variants（ASVs）テーブルと系統樹をもとに、多様性指数（Observed ASVs、Shannon の多様性指数（H'）、Faith の系統学的多様性（PD）、Pielou の均等度）および多様性指標として各サンプル間の距離（Unweighted Unifrac, Weighted Unifrac）を計算した。得られた距離行列をもとに主座標分析を行い、サンプルの類似度を座標上に視覚化した。

4. 研究成果

(1)起源試料の調製

ニホンドロソコエビを摂食した上位捕食者の糞

ニホンドロソコエビを給餌した 5 尾のマハゼから 10 日間で合計 5,677 mg (2018 年度) および 5,074 mg (2019 年度) の糞を回収した。マハゼ 1 個体から 1 回に排泄される糞量は、平均で 116 mg (2018 年度)、111 mg (2019 年度) であった。二年間の結果から、この方法により安定して上位捕食者の糞を実験室で調製できることが示された。回収された糞の外側は透明な薄い膜状物質で覆われており、中に消化物が目視で確認できた。採取した糞の膜状物質を取り除いて内容物を実体顕微鏡下で観察したところ、体内の組織が消化された状態のニホンドロソコエビの外骨格が多く観察された。

ニホンドロソコエビの死骸

分解実験には一容器当たり 50 個体を用意した。これは分解実験後に 2log 程度 DNA 濃度が低下しても十分に定量可能な量という点と、作業手順上で手作業での選別にかかる時間との総合的判断に基づくものである。

その他の起源試料

分解実験には供することができなかった試料についての検討結果を以下に記す。

ニホンドロソコエビ自身の排泄物の採取を試みた。しかしながら、生物の大きさが極めて小さく、その排泄物量もわずかであることから、上位捕食者の糞と同様な方法で糞のみを大量に回収することは技術的に不可能であった。そこで、ニホンドロソコエビ飼育水槽の表層底泥から、できるだけ糞が多くなる画分を集めることを試みた。効率的にニホンドロソコエビ排泄物を得るために飼育槽底泥を沈降分離とふるい分けにより分画した。試行錯誤の結果として、表層底泥を 30mL 採取し、試験管内で 10 分静置後、軽く vortex し、さらに 5 分静置した上層懸濁水 10mL を採取した。この懸濁水を目幅 250 μm の篩を通過し、106 μm の篩に捕捉されるものを回収すると、均質で糞と思われる粒子が多く存在することが確認できた。視野内の糞と思われる粒子の個数から、飼育槽から採取した 30mL の表層底泥から 2×10^5 粒程度の糞が得られると概算された。しかし、この試料から抽出された DNA から推定された DNA 量は 12 copies/mg 以下となり、分解挙動を定量できるだけの初期量を確保できないと判断された。

飼育水槽内を精査したところ、脱皮殻を 2 片採取できた。成長の過程で脱皮を繰り返し、生細胞も付着していると考えられることから、これらの脱皮殻が底泥中の DNA の起源になる可能性もあると考えたが、脱皮殻中のニホンドロソコエビ DNA は検出限界以下であり、詳細な検討を進めるのは困難であると判断した。

ニホンドロソコエビは泥内に U 字状の巣穴を形成する。自然環境由来の底泥ではなく、セルロースを含む人工底質で飼育すると、その巣穴が固まった状態で回収される場合があることから、そこにはニホンドロソコエビ由来の何らかの成分が付着していると考えた。しかし回収された巣穴成分においても脱皮殻と同様にニホンドロソコエビ DNA は検出限界以下であった。

(2) 分解実験

上位捕食者糞中 DNA 分解

ニホンドロソコエビを給餌したマハゼの糞を調製し、分解実験に供した。初年度 (2018 年度) と二年度 (2019 年度) の 2 回実施した。二年度目は、DNA 抽出手法の改善を加えた上での再実験であったが、結果的に 2 回の実験において 72 時間程度では DNA 分解は明確ではなかった。さらに長期の観察を続けたが 30 日でも 1 オーダー程度しか下がらないことが分かった。

この結果は、ニホンドロソコエビを摂食した上位捕食者の糞には餌生物の DNA が含まれ、その排泄後の分解は非常に遅く、水環境中で検出されるものとして一つの候補になりうることを示している。ただし、さらに多毛類等が排泄物の生分解特性を変質させる可能性もあり、今後の更なる検討の余地がある。

死骸中 DNA 分解

ニホンドロソコエビ死骸を分解実験に供したところ、5 hr 以降はニホンドロソコエビ DNA 濃度が指数関数的に低下した。5 hr 以降のデータから分解の一次反応速度係数を求めると 0.13 hr^{-1} となり、これを微生物濃度で除した値は $1.6 \times 10^{-7} \text{ hr}^{-1} \cdot (\text{count}/\text{mL})^{-1}$ となった。既報 (Wei et al., 2018) におけるニホンドロソコエビ成長過程の底泥内残存 DNA 及び前項の上位捕食者糞中 DNA と比較して、死骸由来 DNA は環境中でより分解されやすいことが示唆された。本検討での死骸の生成過程が乾燥であることに現実の環境中との乖離がある可能性は否定できないが、環境 DNA 分析においては当該生物の死骸そのものは大きな寄与はないことが示唆された。

(3) 分解機構の解明

本研究課題では、微生物による分解を想定して実験を行った。そこで微生物群集に関して比較を行った。

系統推定結果 (family レベル) に基づき各試料中の細菌構成を比較した。全サンプルで合計 248 の family が存在し、死骸・上位捕食者糞どちらの分解系においても分解開始後最初のサンプリング (3-5 h) の間に大きく細菌構成が変化した。環境底泥試料を含め、分解実験開始前の方が多様な細菌グループが存在しており、分解実験過程で特定のグループが優占したことが認

められた。分解に伴う多様性の減少は、多様性指数からも確認された。Family レベルでの優占度を比較すると、Proteobacteria 門の Vibrionaceae 科が上位捕食者糞分解試料で特徴的に優占していた。また分解初期に Proteobacteria 門の Comamonadaceae 科が顕著に優占した。

細菌構成の類似性を比較すると、死骸・上位捕食者糞どちらにおいても、分解開始後の 3-6 h で大きく変化したものの、その後の細菌構成には大きな変化がなかったことが示唆された。

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 1件）

1. 発表者名 中島典之、飛野智宏、松山奈央
2. 発表標題 底質中環境DNA評価へ向けた底生生物由来DNAの生分解動態の解析
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 F Nakajima, R Nishigaki, N Wei, T Tobino, T Okamura, N Miyamoto
2. 発表標題 Degradation kinetics of environmental DNA derived from growth and predation of a benthic crustacean
3. 学会等名 IWA Digital World Water Congress (国際学会)
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
研究分担者	飛野 智宏 (TOBINO Tomohiro) (90624916)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師 (12601)	

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
---------	---------