

令和 5 年 4 月 7 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12258

研究課題名(和文)環境DNAバンク：動植物相から病原細菌までトランスキングダムなDNA同時分析試行

研究課題名(英文) Environmental DNA biobanking: trans-kingdom parallel analysis of eDNA from fauna/flora to microbiota including pathogens

研究代表者

佐藤 行人 (Sato, Yukuto)

琉球大学・医学部・講師

研究者番号：20566418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、河川水などの環境媒質から直接DNA分析を行う「環境DNA技術」を軸に、動植物相から微生物叢まで生物界を超えた種の検出と、それに基づいた病原体の宿主動物推定などの応用研究、さらには、取得した環境DNAサンプルのバイオバンキングを試行した。対象地域とした沖縄県の本島南部(都市部)、北部(自然保護区)、および離島の西表島、石垣島でサンプルを取得し、網羅的な細菌叢および脊椎動物相の解析を実施した。西表島の人獣共通感染症レプトスピラの病原細菌と宿主動物の推定について国際誌に主著論文を発表した。沖縄本島とパラオ共和国で行った病原体と動物相の相関についても生態疫学的知見を得て、論文化を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、河川水などの環境媒質から病原体や動物などを直接DNA分析することで、未知であることが多い人獣共通感染症病原体の自然分布を解析できることを示しており、疫学的に重要な意義がある。さらに本研究は、環境DNA分析が、動物と細菌の共起関係のような、生物界を超えた同時分析が可能であることを活用し、病原体と同時に検出される宿主候補動物を分析できることを示した。これは世界的にも先端的な環境生態研究であり、このような研究の推進は、新興感染症について迅速に宿主候補動物を推定したり、特定された動物を用いた病原体培養やワクチン開発などの応用へとつながることから、社会的にも意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on environmental DNA (eDNA) metabarcoding analysis targeting from animals and plants to microbiota. Based on such a trans-kingdom DNA analysis approach, I addressed applied ecological issues including host animal estimation of pathogens and prospective biobanking of the eDNA samples. Exhaustive analysis of eDNA-based fauna and bacteriome was conducted on the main island of Okinawa prefecture, and Iriomote and Ishigaki Islands of Yaeyama region, Okinawa. Based on the results, I and co-authors published research papers of the study of zoonosis *Leptospira* and its natural reservoir animals in Iriomote and Sri Lanka on an international peer-reviewed journal. I am also preparing manuscripts of the studies conducted on the Ishigaki and Palau Islands focusing on eco-epidemiology of environmental pathogens and their candidate host animals.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：環境DNA 生態疫学 メタバーコーディング メタゲノム 人獣共通感染症 動物相 環境ゲノミクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

海・川・湖などの環境水に含まれる生物由来の DNA を網羅的に解読し、生息する生物種を高感度で解析する技術が発達し、環境 DNA 分析と呼ばれるようになった。本研究代表者らは 2014 年頃から、魚類などの動物を主とする環境 DNA 分析技術の進展を世界的に牽引する成果を挙げた。具体的には、環境水中の DNA から魚類や動物のミトコンドリア 12S 遺伝子部分配列を強力かつ網羅的に増幅し大量配列解析する一連の枠組み「MiFish プラットフォーム」を開発し、分野を牽引した (Miya et al. 2015 RSOS; Sato et al. 2018 Mol Biol Evol; Tao et al. 2023 Mol Biol Evol など)。環境 DNA 分析の重要な点は、魚類や動物を含む野外の生物を捕獲することなく、採水サンプリングのみによって、ある程度以上網羅的に分析できることである。この特性に基づけば、あらかじめ環境 DNA 試料を集めておくことで、後の時代に、任意のターゲット生物について DNA 分析を実施できることになる (魚類、鳥類、両生爬虫類、哺乳類、後生植物、昆虫/無脊椎動物、細菌、真菌、単細胞真核生物、薬剤耐性遺伝子など)。つまり、環境 DNA のバイオバンキングという概念を提起して体系的に実行することで、『生物界横断的』かつ『時系列縦断的』な生物相 DNA 解析を行うことが、原理的には可能だと期待される。これは、人類が初めて手にする生物相、環境生態、環境疫学における斬新な解析手法となり、また DNA 財産となると考えられる。このような、生物界を超えた時間縦断的な環境 DNA 分析が、果たして実現可能であるのかという問いが、本研究課題の主要な背景である。本研究代表者らが確立してきた、脊椎動物を対象とした環境 DNA 分析を沖縄県内の河川などに適用すると (MiFish プライマー使用; Miya et al. 2015 RSOS)、その高い検出力によって、生息する魚類や動物をほぼ網羅するような生物相データが得られる。さらに代表者らは、植物 (UniPlant プライマー使用)、無脊椎動物 (COI プライマー数組および MiDeca プライマー使用)、細菌 (16S rRNA V4 プライマー使用)、真菌 (ITS-KYO プライマー使用) について同様の解析を軌道に載せつつあり、生物各界について、部分的には実現可能性を確認しつつあった。そこで本課題では、環境 DNA サンプルの収集と保管、および解析の方法論を、より体系的に確立することが中心の課題になると考えた。

### 2. 研究の目的

上記の学術的背景と問いに基づき、本課題では次の 2 課題を目的として設定した。まず課題 1 (直接的課題)として、沖縄県をモデルとした環境 DNA バンキングを試行し、検出される希少種 (メダカ、ヤンバルクイナなど)、外来種 (ティラピア、マングースなど)、家畜・ペット (ブタ、イヌなど)、環境病原体 (レプトスピラ、サルモネラ菌、薬剤耐性菌など) の網羅的データを取得することを目的とした。蓄積したデータに基づいて、検出される生物種間の相互関係 (例: 在来イノシシとレプトスピラ菌の共起、養鶏場排水中のヤモリ類とサルモネラ菌の共起、薬剤耐性菌/遺伝子と家畜ブタの共起関係など) を説明する人的要因 (都市化・外来種頒布・上下水状況・汚染など) を解明する先端的なメタ環境 DNA 研究を行うことを目標とした。次に課題 2 (究極的課題)として、環境 DNA サンプルを体系的に収集し研究基盤として整備していく『環境 DNA バンキング』を試行し創出することを目的とした。環境 DNA バンクを用いて、同一の DNA サンプルから、動物・植物・微生物という生物界を超えた生命情報の同時解析が可能かどうかを検討し、またその技術開発を推進することで、新しい研究分野としての概念提起と確立を進めることを目標とした。これらの課題 1・2 を 3 年間に渡り実行することで、環境 DNA から検出される動植物から細菌類までの多様な生物種について、どのようなデータが得られてどのような解析が可能であるのかの道筋を示し、数年~10 年以上の長期に渡って追跡できるような研究基盤の構築を試みることを大きな目的とした。本課題は、将来に渡って予期される生物多様性の変動、外来種・希少種や潜在的病原体の分布変動、予想される人間活動の負荷増加などへ対処していく上で有用となり得る、生物界横断・時間縦断的な環境 DNA 研究の基盤と分野を創出する、先駆的な取り組みになると考えた。

### 3. 研究の方法

環境 DNA のバイオバンキングと、生物界を超えた網羅的検出 (動物相・植物相・微生物叢) を試行するために、沖縄県をモデル地域として研究を実施した。まず、沖縄本島の代表的な河川・湖沼・海岸の 29 地点 (北部 13 地点・中南部 16 地点) にサンプリングポイントを定め、年 2 回 (夏冬) 3 年間で計 6 回の経時的な環境 DNA バンキングを行った。また、沖縄県離島の石垣島について 16 地点、西表島について 15 地点を設定して、各 2 回のサンプリングを行った。2020 年から 2022 年の間のコロナ禍の影響により、経時的なサンプリングについて一部計画を達成できない時期が生じた。Sterivex フィルターユニットによる現地採水ろ過、DNA iso 溶液浸漬による常温輸送、研究拠点での冷凍保管を試行し、DNA の保管安定性を検証するためにトランスキングダムな PCR 増幅 (脊椎動物、無脊椎動物、細菌・古細菌のプライマーを使用) および大量 DNA 配列解析、各生物界に対応したデータ解析プログラムの作成を行った。上記により、生物界を超えた多様な生命情報が環境 DNA バンクによって保管可能かどうか、さらに、同一の環境 DNA 試料から各界の生物相情報を同時解析することが可能かどうかを検討し、分析プロトコルの確立を進

めた。さらに、各地域の環境 DNA サンプルから推定される生物相情報（微生物叢、動物相など）に基づいて、同時検出される微生物（病原体など）と動物類との相関を体系的・網羅的に分析することで、都市化や人間活動の影響を複合的に評価する方法を模索、試行した。これにより、都市要因と、希少種・外来種・環境病原体を含むトランスキングダムな生物相特質との関連性を追求する先端的な環境 DNA 分析研究を行い、論文発表や一般向けの情報発信を試みた。

#### 4. 研究成果

沖縄本島での環境 DNA バイオバンキングについては、県が実施する水質調査結果に基づいて、汚濁度指標値が比較的高い BOD75% >1.0 の 3 河川（安里川、報得川、雄樋川）を対象とした。上流から下流にかけて各 5~6 地点、合計 16 地点でのサンプル採取を行い、Sterivex フィルターによる採水・現地ろ過（平均 482 ml）、環境 DNA の抽出、細菌 16S rRNA および動物ミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子部分配列の網羅的配列解析を行った。合計 1,480 種相当の細菌が検出され、ヒトに対する発癌性や病原性を示す細菌としてピロリ菌 *Helicobacter pylori* (29.6 cpm)、ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* (237~304 cpm)、破傷風菌 *C. tetani* (19.6 cpm)、Q 熱起因菌 *Coxiella sp.* (82.5 cpm) などが検出された。さらに、家畜伝染病予防法の対象である豚丹毒菌 *Erysipelothrix sp.* (20.3 cpm~37.0 cpm)、ウシ流産や食中毒に関連する *Arcobacter cryaerophilus* (183~9,064 cpm) が検出され、後者はウシの DNA 検出と有意な相関を示した (Pearson's  $r = 0.596$ ,  $d.f. = 14$ ,  $p = 0.012$ )。また、人間活動・畜産業による環境負荷を推定するために、動物 DNA の検出と有意な相関を示す細菌種の数（割合）を推定した所、ウシと相関する細菌種数（割合）は 233 (15.7%)、ヤギでは 188 (12.7%)、ブタでは 110 (7.4%)、ヒトでは 42 (2.8%) であった。このように沖縄本島中南部（都市部）では、ピロリ菌をはじめとするヒト病原細菌が、低強度であるものの検出され、さらに、1980 年代以降に急発展した養牛業からの環境細菌負荷が存在することが示唆された。一方、浄化槽整備が義務付けられている人家および養豚場からの環境負荷が比較的低いことも示された。これらの結果は、本課題が目標とした生物界を横断した環境 DNA 解析によって得られる河川細菌叢と動物 DNA の相関に関する情報が、環境衛生管理方針の検討に有用であることを示唆している。本課題では、沖縄本島北部（自然保護区やんばる地域）についても、13 地点のサンプリング採水地点を設けて、合計 4 回のサンプル採取を行った（2020 年から 2022 年の間のコロナ禍の影響で、サンプリング計画について一部達成できない時期が生じた）。今後は、上述した沖縄本島都市部の結果と、北部やんばる地域の環境 DNA 解析を進めた結果を併せて比較解析を行い、地域間や人口密度、都市化指標値と生物相の関連性について分析を進める予定である。

さらに、同県の離島である八重山地域の西表島と石垣島についても分析を行い、成果を得た。まず、近年に世界遺産登録がなされた西表島では、人間の生活圏に近い東部ユツン川と、人間の生活圏から遠い（奥地）の西部ウダラ川、アヤンダ川において、合計 15 地点のサンプル採取地点を設け、2020 年の冬季（1 月）と夏季（7 月）にサンプル採取を行った。同じく Sterivex フィルターによる採水・現地ろ過と、環境 DNA の抽出を行い、細菌 16S rRNA、人獣共通感染症の病原細菌レプトスピラ属の 16S rRNA、および動物ミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子部分配列の PCR と大量配列解析を行った。その結果、病原性レプトスピラとして合計 10 種に相当する配列が検出され、強い病原性を示す種が東側のユツン川から 3 種、中程度の病原性を示す種がユツン川、西側のウダラ川、アヤンダ川から合計 7 種検出された。レプトスピラの検出強度および多様度は、人間生活圏との近さよりも、むしろ季節（冬季・夏季）と関連している傾向が見られ、また、レプトスピラと同時に検出される哺乳類としてヒト、クマネズミ類、イノシシが確認された。それらのうちクマネズミ類では統計的に有意な相関関係が示された（ピアソンの積率相関係数、 $p < 0.05$ 、Benjamini & Hochberg 法による多重検定補正  $q < 0.01$ ）。この結果については、西表島土壌からのレプトスピラの培養およびヒト培養細胞への感染実験を行った結果と併せて、熱帯医学のトップ誌の 1 つ PLOS Neglected Tropical Diseases に主著論文として発表した (Sato et al. 2022 PLOS Negl Trop Dis)。この論文成果については、一般向けとして琉球大学からプレスリリースを行うとともに、その日本語解説記事を作成して大学ホームページに掲載した。また、同じ西表島の採水サンプルを用いた分析では、甲殻類（MiDeca プライマー使用）および魚類（MiFish プライマー使用）についても併せて分析を行っており、テナガエビ類、ハリガネウミヘビ類、テッポウオ類などの希少な現地生息種の検出に成功している。これらの生物多様性解析についても、論文発表の原稿準備を進めている。

石垣島については、過去にレプトスピラの発症報告があった宮良川、名蔵・白水川、荒川の滝を含む 16 カ所について、2 回のサンプル採水を行った（コロナ禍の影響で、サンプリング計画について一部達成できない時期が生じた）。Sterivex フィルターによる河川水の採水・ろ過（平均 381 mL）、環境 DNA の抽出を行い、細菌およびレプトスピラ 16S rRNA、動物 mt-12S rRNA 遺伝子の部分配列を PCR 増幅して、次世代シーケンサーによる大量配列解析を行った。その結果、合計 6 種のレプトスピラ属細菌を検出し、うち 2 種は強病原性、4 種は中病原性であった。名蔵・白水川中流域と島北部で強病原性種が検出された一方、宮良川ではレプトスピラの検出がほとんど無かった。レプトスピラの検出総数は、島北部の山沿いに多い傾向が見られた (Mann-Whitney  $U$  test,  $p = 0.0064$ )。さらにレプトスピラと同時に検出される動物を分析したところ、イノシシ *Sus scrofa* と *Leptospira wolffii* (中病原性種) の DNA 検出の間に、有意ではないものの共起関係が認められた ( $r = 0.4499$ ,  $n = 16$ ,  $d.f. = 14$ ,  $p = 0.0804$ )。これらの結果

から、石垣島では、平野部と比べて山間部でレプトスピラ感染のリスクが高く、その感染源は、沖縄本島でも主要な保菌動物として知られるイノシシである可能性が示唆された。レプトスピラ感染のリスクがある川や滝でのウォーターレジャーは、石垣島の主要な観光資源の一つであるため、レプトスピラ症についての啓蒙や予防対策が求められる。また研究期間全体を通して、魚類や動物についても、在来のフナ類や多種のハゼ類、テナガエビ類、ニホンスッポンなどが検出された一方、ティラピアやグッピー、カダヤシなどの外来種も検出された。今後、これら在来種、希少種、外来種の生物多様性と人間活動負荷指標との関連について解析を進める。必要に応じてリプリケートの採水と実験・解析を加えて、国際誌へ投稿する論文の作成や、一般向け情報公開（論文ニュースリリース記事の大学 HP 掲載など）を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yukuto Sato, Idam Hermawan, Tetsuya Kakita, Sho Okano, Hideyuki Imai, Hiroto Nagai, Ryosuke Kimura, Tetsu Yamashiro, Tadashi Kajita, Claudia Toma	4. 巻 16
2. 論文標題 Analysis of human clinical and environmental Leptospira to elucidate the eco-epidemiology of leptospirosis in Yaeyama, subtropical Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0010234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0010234	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 該当する

1. 著者名 Chandika D. Gamage, Yukuto Sato, Ryosuke Kimura, Tetsu Yamashiro, Claudia Toma	4. 巻 14
2. 論文標題 Understanding leptospirosis eco-epidemiology by environmental DNA metabarcoding of irrigation water from two agro-ecological regions of Sri Lanka	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0008437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0008437	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 該当する

1. 著者名 Zhu Tao, Sato Yukuto, Sado Tetsuya, Miya Masaki, Iwasaki Wataru	4. 巻 40
2. 論文標題 MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish Pipeline: Updates in 10 Years	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 msad035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molbev/msad035	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田鶴愛・佐藤行人
2. 発表標題 環境DNAに基づく沖縄本島都市河川における病原細菌の分布と宿主候補動物の同時検出解析
3. 学会等名 令和3年度・琉球大学「医科学研究」発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天願大成・佐藤行人
2. 発表標題 環境DNAに基づく石垣島における人獣共通感染症レプトスピラの病原体分布とその宿主候補動物の推定
3. 学会等名 令和4年度・琉球大学「医科学研究」発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内間庸一郎・佐藤行人
2. 発表標題 パラオ共和国における人獣共通感染症レプトスピラの環境DNA解析に基づいた宿主候補動物および気候リスク因子の解析
3. 学会等名 令和4年度・琉球大学「医科学研究」発表会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>顧みられない熱帯病「レプトスピラ症」の感染源を環境DNAから推定  <a href="https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/14997/">https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/14997/</a></p> <p>世界遺産・西表島における「レプトスピラ症」の病原体を 土壌培養と環境DNAから総合分析  <a href="https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/32817/">https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/32817/</a></p> <p>魚類の生態・進化・環境DNA研究を加速するデータプラットフォーム 「MitoFish Suite」の機能強化  <a href="https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/41932/">https://www.u-ryukyu.ac.jp/news/41932/</a></p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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
研究協力者	吉田 鶴愛  (Yoshida Tsurua)	琉球大学・医学部医学科・学部学生  (18001)	医科学研究実習により従事

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	天願 大成  (Tengan Taisei)	琉球大学・医学部医学科・学部学生  (18001)	医科学研究実習により従事
研究協力者	内間 庸一郎  (Uchima Yoichiro)	琉球大学・医学部医学科・学部学生  (18001)	医科学研究実習により従事
研究協力者	渡慶次 道生  (Tokeshi Michinari)	琉球大学・医学部医学科・学部学生  (18001)	医科学研究実習により従事

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			
スリランカ	University of Peradeniya			
パラオ	パラオ共和国 農業・漁業・環境省 農務局			