

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04284

研究課題名(和文) 沿岸堆積物コアでの環境DNAメタバーコーディングによる近過去魚類群集の復元

研究課題名(英文) Reconstruction of Past Fish Communities Using eDNA Metabarcoding in Coastal Sediment Cores

研究代表者

土居 秀幸 (Doi, Hideyuki)

兵庫県立大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：80608505

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)：これまでの魚類に関する古海洋学的研究では、堆積物中で鱗が残るイワシ類に限られ、その他の魚類群集全体については復元する手立てがこれまでなかった。本研究では、堆積物コア中に残存する環境DNAに着目し、海底堆積物を対象に魚類のDNAを網羅的に増幅するMiFishユニバーサルプライマーを用いて環境DNAメタバーコーディングを行った。その結果、いくつかの魚種が海底堆積物のさまざまな年代層から検出できることを確認した。またさらに、同じ堆積物サンプルから哺乳類や、真菌類、植物のユニバーサルプライマーによるメタバーコーディングによる群集復元も可能であることが実証できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、環境DNAを用いて、海洋における過去数百年の魚類群集の変動について、堆積物コア試料による近過去復元が可能であることを明らかにした。これは今後の水産資源管理、生態系管理において、生態系変動予測に利用できるデータを得ることができる有力な手法となったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Paleoceanographic studies on fish have been limited to the presence of scaled rock lobsters in sediments, and there has been no way to reconstruct other fish communities as a whole. Our project focuses on environmental DNA (eDNA) remaining in sediment cores. The eDNA refers to DNA fragments from various organisms contained in the environment, and by collecting and analyzing these fragments, it will be possible to determine what species live in the environment. We collected sediment core samples from the deepest part of Beppu Bay and conducted eDNA analysis. We conducted the eDNA metabarcoding using MiFish universal primers which comprehensively amplify fish DNA. Then, we confirmed that these fish species can be detected in the recent-past layers of the sediment cores. We demonstrated that metabarcoding is possible for sediment samples using MiFish universal primers.

研究分野：生態学

キーワード：環境DNA 堆積物 海洋 魚類

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

堆積物コア試料による近過去の生態系情報の復元は、近過去の気候変動や地形変化、災害前後による生態系状態について考察し、生態系変動予測に利用できるデータを得ることができる有力な手法である。さらに、こうした長期時系列データは、個体群動態、環境変化と生物群集の関係、群集集合則などの生態学の基本的な命題について答えうる非常に重要な情報源でもある。しかし、これまでの魚類に関する古海洋学的研究では、堆積物中で鱗が残るイワシ類に限られ、その他の魚類群集全体については復元する手立てがこれまでなかったことから、生物群集としての長期変動を捉えることは困難であった。

今後の地球温暖化による海水温の上昇や海流の流れの変化などにより、魚類の分布は大きく変わることが予想されているが、その根拠・参照とすべき過去の時期における分布範囲については、その痕跡となるウロコが見られる種以外では、これまで全く情報を得ることができなかった。このような困難を打破するため、本研究では堆積物コア中に残存する環境 DNA に着目する。環境 DNA とは環境中（水中、堆積物中）に含まれる様々な生物由来の DNA 断片のことであり、これを採集し、解析することによって、環境中にどんな生物種が生息しているかを明らかにすることができる。

2. 研究の目的

本研究では、環境 DNA メタバーコーディング手法を適用することにより、堆積物の環境 DNA から全く未解明だった魚類群集の変動を明らかにする。これまで、環境 DNA を用いて堆積物コアから魚類群集を復元した例は世界的にも皆無であり、全く新しい研究であるという点で学術的独自性がある。さらに、本研究は、我が国発祥の環境 DNA 技術、つまり環境 DNA メタバーコーディング技術を世界で初めて堆積物に適用して群集を解明する極めて画期的な研究といえる。本研究で得られた魚類群集の復元は、個体群動態、環境変化と生物群集の関係、群集集合則などの生態学の基本的な命題に答えうる貴重なデータを初めて提供することになる。

3. 研究の方法

堆積物への環境 DNA メタバーコーディングの試行

貧酸素環境下にある別府湾最深部から堆積物コア試料を採取して、環境 DNA 解析を行う（図 1 参照）。すでに萌芽研究で得られている冷凍試料も用いて、過去 300 年を対象に 50 試料について分析する。切り出した堆積物については、アルカリ試薬と混ぜて遠心し、その上澄みを分取し、堆積物からの DNA を抽出する専用キットである PowerSoil kit を用いて、DNA を抽出する。採取できる DNA 量によって、大型遠心機などを用いた大容量での抽出手法を検討し、実際のサンプルで検証する。

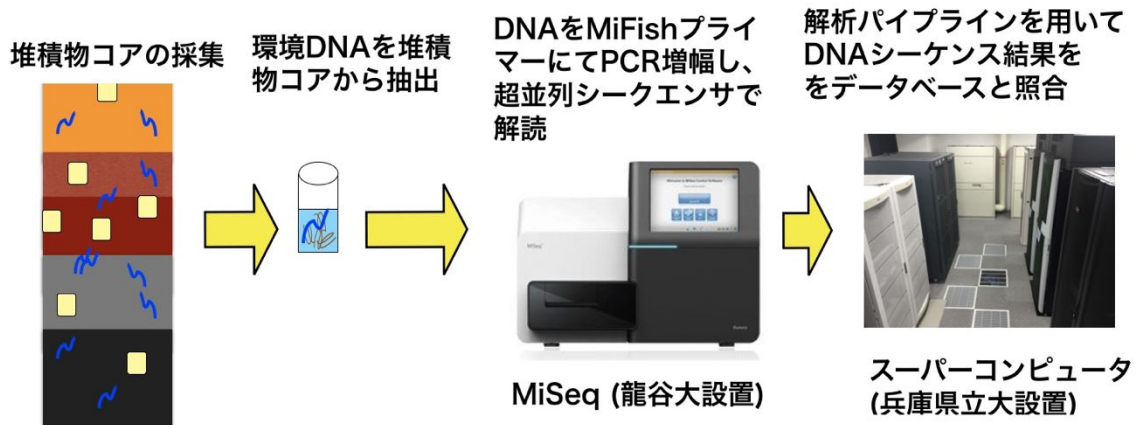


図 1 堆積物試料からの環境 DNA メタバーコーディング手法の概略図

メタバーコーディング

抽出した DNA は魚類のミトコンドリア DNA12S 領域を網羅的に増幅するユニバーサルプライマー MiFish (Miya et al. 2015) により PCR 増幅し、ライブラリ調整後、イルミナ MiSeq による超並列シーケンスを行う。シーケンスデータについては、すでに土居研究室で構築されている Claident+DADA2 による解析パイプラインにて解析を行い、解読した DNA データと MitoFish, NCBI などの DNA データベースを照合して種を特定する。

環境 DNA と同時に、堆積物コア中に含まれる、主要な元素の同位体比 (炭素、酸素、水素同位体比) や植物色素、魚類のウロコなどについても測定を行い、過去の環境データや検証データとして用いる。

定量シーケンス

Ushio et al. (2018) による超並列シーケンスに標準 DNA を入れて行う定量シーケンスを行う。それによって、各魚類の半定量的な環境 DNA 量も明らかにする。

堆積物年代測定

海底コア試料については愛媛大学沿岸環境科学研究センターのガンマ線測定システムを用いて Pb-210 を測定して、Constant rate of supply model (CRS) モデルにて年代を決定する。また、コア試料は高知大学海洋コア総合研究センターにおいて CT 画像や密度、帯磁率等の堆積物物性試験を行い、堆積層や生物擾乱等の情報を得る。

4. 研究成果

[2019 年度]

海底堆積物を対象に哺乳類、真菌類および真核生物の DNA をそれぞれ網羅的に増幅するユニバーサルプライマーを用いて環境 DNA メタバーコーディングを行い、それらの種が実際に海底堆積物から検出できることを確認した。DNA 濃縮により回収できる種数や種組成に大きな変化はなかったが、リード数は一定値を検出できていた。堆積年代の変化が DNA 組成の割合に反映されているか調べるために、サンプル間の類似度を元にクラスターに分類し、類別したグループご

とに代表種の抽出を行った。結果として菌類と真核生物の対象 DNA 断片の両方から、柱状試料の表層付近でのみ確認される群集を再現することができると考えられた。また、いずれの分類群においても陸上種の DNA 断片を確認した。

[2020 年度]

この海底堆積物を対象に魚類の DNA をそれぞれ網羅的に増幅する MiFish ユニバーサルプライマーを用いて環境 DNA メタバーコーディングを行い、それらの種が実際に海底堆積物から検出できることを確認した。さらに、魚類については、堆積物から 3 倍の泥を使って抽出をするなど抽出方法を検討し、定量メタバーコーディングの実験を行った。その結果、定量できるほどの DNA が得られることが予備的にわかった。

[2021 年度]

定量メタバーコーディングについては、やはり抽出 DNA 量の少なさからか、解析に至るほどの精度での解析はできなかった。しかし、2020, 2021 年度の検証から MiFish ユニバーサルプライマーを用いて堆積物サンプルについてメタバーコーディングが可能であることは実証できた。さらに、今年度は新たにカタクチイワシ特異的な遺伝的多様性を評価する領域 (チトクロム b) に新規にプライマーを設計し、それを用いて遺伝的多様性を評価した。その結果、8 つのハプロタイプが検出できた。主に表層で多くのハプロタイプが検出されたが、深部からのサンプルでもいくつかのハプロタイプが検出された。こちらの遺伝的多様性の研究はまだ完成していないため、今後さらに研究を展開したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13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 Takahara Teruhiko, Taguchi Junya, Yamagishi Satoshi, Doi Hideyuki, Ogata Shigeki, Yamanaka Hiroki, Minamoto Toshifumi	4. 巻 18
2. 論文標題 Suppression of environmental DNA degradation in water samples associated with different storage temperature and period using benzalkonium chloride	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Limnology and Oceanography: Methods	6. 最初と最後の頁 437 ~ 445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lom3.10374	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 Matsuoka Shunsuke, Doi Hideyuki, Masumoto Shota, Kitagawa Ryo, Nishizawa Keita, Tanaka Kaho, Hasegawa Motohiro, Hobara Satoru, Osono Takashi, Mori Akira S., Uchida Masaki	4. 巻 27
2. 論文標題 Taxonomic, functional, and phylogenetic diversity of fungi in a forest-tundra ecotone in Qu?bec	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polar Science	6. 最初と最後の頁 100594 ~ 100594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.polar.2020.100594	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 Kuwae Michinobu, Tamai Hiromichi, Doi Hideyuki, Sakata Masayuki K., Minamoto Toshifumi, Suzuki Yoshiaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Sedimentary DNA tracks decadal-centennial changes in fish abundance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01282-9	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 Doi Hideyuki, Akamatsu Yoshihisa, Goto Masuji, Inui Ryutei, Komuro Takashi, Nagano Mariko, Minamoto Toshifumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Broad-scale detection of environmental DNA for an invasive macrophyte and the relationship between DNA concentration and coverage in rivers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological Invasions	6. 最初と最後の頁 507 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10530-020-02380-9	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 Wada Toshifumi, Doi Hideyuki, Togaki Daisuke, Kaida Ryotaro, Nagano Mariko, Katano Izumi, Suzuki Masami, Ohtani Tetsuya, Mitsuhashi Hiromune	4. 巻 167
2. 論文標題 Exploring a legendary giant squid: an environmental DNA approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Biology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00227-020-03773-z	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 Oka Shin ichiro, Doi Hideyuki, Miyamoto Kei, Hanahara Nozomi, Sado Tetsuya, Miya Masaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Environmental DNA metabarcoding for biodiversity monitoring of a highly diverse tropical fish community in a coral reef lagoon: Estimation of species richness and detection of habitat segregation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 55 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.132	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 Hoshino Tatsuhiko, Nakao Ryohei, Doi Hideyuki, Minamoto Toshifumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Simultaneous absolute quantification and sequencing of fish environmental DNA in a mesocosm by quantitative sequencing technique	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83318-6	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 Minamoto Toshifumi, Miya Masaki, Sado Tetsuya, Seino Satoquo, Doi Hideyuki, Kondoh Michio, Nakamura Keigo, Takahara Teruhiko, Yamamoto Satoshi, Yamanaka Hiroki, Araki Hitoshi, Iwasaki Wataru, Kasai Akihide, Masuda Reiji, Uchii Kimiko	4. 巻 3
2. 論文標題 An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 8 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.121	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 Tsuji Satsuki、Takahara Teruhiko、Doi Hideyuki、Shibata Naoki、Yamanaka Hiroki	4. 巻 1
2. 論文標題 The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis?A review of methods for collection, extraction, and detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 99 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.21	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 Matsuoka Shunsuke、Sugiyama Yoriko、Sato Hirotohi、Katano Izumi、Harada Ken、Doi Hideyuki	4. 巻 3
2. 論文標題 Spatial structure of fungal DNA assemblages revealed with eDNA metabarcoding in a forest river network in western Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metabarcoding and Metagenomics	6. 最初と最後の頁 e36335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3897/mbmg.3.36335	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 Matsuhashi Saeko、Minamoto Toshifumi、Doi Hideyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Seasonal change in environmental DNA concentration of a submerged aquatic plant species	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Freshwater Science	6. 最初と最後の頁 654 ~ 660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1086/704996	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 Ikeda Kousuke、Doi Hideyuki、Terui Shigeharu、Kato Atsuko、Mitsuzuka Takashi、Kawai Tadashi、Negishi Junjiro N.	4. 巻 38
2. 論文標題 Estimating native and invasive crayfish distributions in relation to culvert barriers with environmental DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Freshwater Science	6. 最初と最後の頁 629 ~ 641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1086/704998	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 Uchii Kimiko, Doi Hideyuki, Okahashi Teruyuki, Katano Izumi, Yamanaka Hiroki, Sakata Masayuki K., Minamoto Toshifumi	4. 巻 1
2. 論文標題 Comparison of inhibition resistance among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 359 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.37	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 土居秀幸
2. 発表標題 環境中に漂うDNAの情報から何がわかってきたか?
3. 学会等名 第64回日本生態学会 公開講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideyuki Doi
2. 発表標題 Environmental DNA methods for macroorganism populations
3. 学会等名 The 1st DNAqua-Net international conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海田竜太郎, 土居秀, 永野真理子, 加三千宣, 玉井大道, 倉田純
2. 発表標題 海底堆積物からの環境DNA検出による 近過去生物群集の再現
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 一般社団法人 環境DNA学会、土居 秀幸、近藤 倫生	4. 発行年 2021年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 300
3. 書名 環境DNA	

〔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	加 三千宣 (Kuwae Michinobu) (70448380)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授 (16301)	

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