

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16137

研究課題名(和文) 高速DNAシーケンサーによる微小動物の生物多様性モニタリング技術の高精度化

研究課題名(英文) Biomonitoring of microscopic animals by massively parallel sequencing

研究代表者

齋藤 星耕 (SAITOH, Seikoh)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・特命研究員

研究者番号：10623754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子配列から生物の分類同定を行う技術 DNAバーコーディングに、近年普及したDNAを大量に解読する技術を組み合わせ、生物多様性を迅速に明らかにする技術がメタバーコーディングである。しかし、従来この技術では、ある生物が存在するかどうかはわかっても、多いのか少ないのかという量的な情報を得ることが出来なかった。研究代表者らは、「大地のプランクトン」とも呼ばれるトビムシ類を材料として、メタバーコーディングの分析手順を改良した結果、生物の多寡を量的に比較可能となる精度を達成した。これによって、個体群密度の増減の追跡など、従来メタバーコーディングが適用できなかった目的にも利用可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Metabarcoding is a method to assess biodiversity from unsorted specimens or environmental samples based on two technologies, DNA barcoding and massive parallel sequencing. While it has been used to determine which species are present or absent in a sample, metabarcoding has, nonetheless, been poor in quantification of their abundances. We developed a novel protocol for metabarcoding by which a researcher can minimize biases that occur during PCR amplification and obtain a better analytic result by using an internal control material. Our data showed high linearity ( $R = 0.91-0.99$ ) between normalized read count and number of individuals of a species included in samples. This protocol can be applied to monitoring of small organisms whose abundances, rather than present or absent, are of interest.

研究分野：土壌動物学；生物情報学

キーワード：メタバーコーディング 定量性 微小動物 土壌動物 metabarcoding quantification Collembola  
Soil organism

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子配列に基づいて生物種の分類同定を行う技術は、微生物から脊椎動物まで、広く用いられてきた。ある研究者(あるいは市民や企業、行政当局)の手元に分類がわからない生物標本(や微生物株)があるとき、既にその生物がデータベースに登録されていれば、標本の遺伝子配列からその種名を知ることが出来る。こうした目的に利用できる遺伝子配列データベースの蓄積が世界中の生物学者の協力により進められてきた。分類同定に利用される遺伝子は、目的の生物分類群で共通して保存されている遺伝子のうち、種を区別し得る程度に配列が多様化したもの(例えば原核生物では 16S rRNA 遺伝子)が選ばれる。この技術は、DNA バーコーディングと呼ばれる。

大量に遺伝子配列の解読を行うことができる高速並列 DNA シーケンサー(いわゆる次世代シーケンサー Next Generation Sequencer; 以下 NGS と略記)がこの 10 年間で、登場、普及し、これに伴って、NGS を生物の群集組成の決定に用いる手法も普及してきた。これは、複数の種の個体が混ざった状態の標本(群集標本)や、土や水などの環境試料から、生物個体を単離する作業を行うことなく DNA を抽出し、NGS により配列解読を行うものである。大量に解読された配列に基づき、データベースを参照して、どのような生物が存在していたかを決定する。

NGS による群集調査法において現在主流となっている戦略は、分類同定に用いる遺伝子領域のみを PCR 増幅し、その増幅産物を配列解読にかけるというものである。他の戦略に比べて、実験室での分析過程における制約が少なく、また多数の検体を同時に分析できる点で、費用や時間的コストの観点から優れている。こうした手法をメタバーコーディングと呼ぶ。

分子的に生物種、そして生物群集の組成を決定することの利点は、まず、形態その他の特徴によって種同定することが困難(原核生物など)、または要求される技能や労力の点で同定コストが高い生物群(真核藻類や微小な動物など)に対して、作業者の技能を問わずに同定が行えることにある。また、NGS の普及により、費用的にも十分安価となっている。

一方で、分子的手法とりわけメタバーコーディングの問題点は、どの生物種(あるいはその痕跡)が試料中に存在するかを判断すること(定性的)には使えても、量的にどれだけいたか(定量的)はわからないことである。またデータベースが整備されていなければ、出現した配列がどの生物に由来するかを知ることができない。

このうち前者の問題点(定量性がないこと)は、PCR 増幅という過程そのものに原因がある。PCR 増幅では、理想的には、増幅対象の領域の DNA がサイクル毎に 2 倍に増幅

されるはずだが、実際には、種ごとに増幅効率率が異なり(2 を下回る)増幅後には元の試料中の存在頻度を忠実に反映していないことが知られている(これには様々な要因が関係している)。この結果として、NGS により解読された配列データにおいても、データ上の種組成はバイアスを受けたものとなる。

メタバーコーディングに定量性がないということは、個体群動態を追跡するなどの、量的な変動に着目した観測に用いることができないことを意味しており、この技術を広く生物多様性のモニタリングに使用していくうえで、技術的な課題となっていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、NGS を用いた生物多様性の調査手法、すなわちメタバーコーディングの定量性の向上を目的として、実験プロトコルの改良とデータ処理パイプラインの開発を行った。テストケースとする生物群として「大地のプランクトン」とも呼ばれるトビムシ類を用いた。

## 3. 研究の方法

(1) トビムシ類を材料として、既往の研究により公開されている遺伝子配列に基づき、ミトコンドリアシトクロム c オキシダーゼサブユニット I (mtCOI) 遺伝子および 16S リボソーム RNA (mt16S) 遺伝子について、それぞれ PCR プライマーを多数設計した。トビムシ類の種によらず PCR 増幅可能であることを条件として、最適なプライマーの組(ペア)を探索した。

(2) 選抜したプライマーペアを使用して、バイアスを低減することを主眼に、NGS 用の DNA ライブラリの調整手順を検討した。特に、PCR 増幅において、予備実験によりプラトーに達しないようにサイクル数を抑えることを手順化した。性能試験として、野外から収集した自然群集の標本 10 点を利用し、NGS により分析を行い、これを顕微鏡下での形態的な種同定の結果と比較することで、検出力を評価した。さらに、複数の種の個体を組み合わせ、個体数組成既知の人工的な群集標本(模擬群集)を作成し、これを NGS により分析した結果から、定量性を検討した。

(3) 配列データから種を同定するためのデータベース構築を進めた。様々な種の標本を収集し、それぞれ mtCOI および mt16S の配列を収集した。この作業では、従来からあるキャピラリーシーケンサーを用いる方法に加えて、標本個体を識別する配列付きの増幅産物を作り、約 200 個体分を NGS で一括して解読する手法も独自に開発して利用した。

## 4. 研究成果

(1) PCR プライマーの設計、選抜により、トビムシ類の mtCOI および mt16S 遺伝子それぞれについて、種によらず PCR 増幅可能なプライマーペアを決定できた。

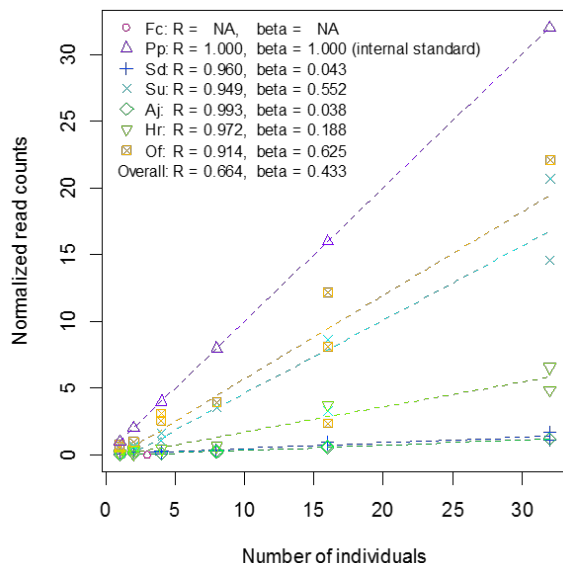
## (2) メタバーコーディング用の DNA ライブラリの調整方法 (プロトコル) の確立

NGS 用のアダプタを付加したプライマー (フュージョンプライマー) では、増幅が弱い、プライマーダイマーが形成される等、PCR 増幅の際に問題が生じやすく、また NGS による配列解読においても出力が出ないという問題が起きた。しかし、フュージョンプライマーの使用を止め、特異的プライマーによる増幅産物に後からアダプタをライゲーションによって付加することでこの問題を回避できることを見出した。

こうして確立されたプロトコルにより、トビムシ類の自然群集の調査を行ったところ、自然群集において優占種となっている種を全て検出することができた。また、OTU (操作的分類単位、データ上「種」として扱う単位) 数と、顕微鏡下で形態的に区別できる種数が概ね一致した。これらの結果は、このプロトコルによってトビムシ類の生物多様性調査を行うことができることを示している。

確立されたプロトコルを用いて、個体数組成既知の模擬群集 ( $n = 10$ ) の分析を行ったところ、模擬群集に含めた種を全て検出することが出来た。さらに、それぞれの種について、群集標本に含めた個体数と、(内部標準を用いて) 標準化したリード数との間で高い相関が得られた ( $R = 0.91-0.99$ , 各  $n = 10$ ; 下図は mtCOI のデータで、7 種分のデータがプロットされている)。なお、NGS が出力したデータ量に対する一個体あたりの寄与 (下図における種ごとの「傾き」に相当) は、種と使用する遺伝子領域によって異なっていた。

本研究で確立したプロトコルにおいて、種間の様々な違い (一個体あたりの遺伝子のコピー数、プライマーとゲノム DNA 上の会合領域の配列一致度、その  $T_m$  値など) が、一個体あたりの寄与の大きさの違いをもたらしていると考えられた。このことは、一つの群集標本のデータを見たときに、データ量の多寡によって、どちらの種の個体数が多いかという議論はできないことを意味している。



他方で、種ごとにみた場合、群集標本に含まれる個体数とデータ量の間には高い相関があったことは、標本間の比較を行ったときに、どちらの標本で何倍多いといった相対的な定量が可能であることを示している。

本研究で確立したプロトコルは、種の違いがもたらすバイアスそのものは解決できないまでも、実験室内の処理がもたらすバイアスの強さをコントロール (バイアスの程度を標本間で斉一化) することには成功し、結果として、標本間での個体数の定量的な比較が可能となった。すなわち、このプロトコルにより、野外での個体群動態の追跡や、地点間あるいは実験処理の群間の個体数比較などに利用できる定量性を実現できたと考えられた。

(3) 本研究では、プロトコルの開発に並行して参照用のデータベースの構築を進めた。研究期間内に、モデル調査地において出現する種の大半 (個体数ベースで 95% 以上) をカバーするデータベースを構築できた。また、これらの配列データから、本研究で利用した遺伝子領域 (mtCOI および mt16S) は、種間で一定以上の配列の違いが存在し、種を区別する目的に利用可能であることが示された。

これに加えて、NGS を用いたデータベース構築の過程で次のことがわかった: ミトコンドリア上の遺伝子を対象とする PCR 増幅においては、ミトコンドリア起源の偽遺伝子 (核ゲノム上に移行して現在は機能していない過去の遺伝子の残骸) もまた増幅を受け、相対的に低頻度ながらも NGS により取得した配列データ中に出現することがわかった。したがって、偽遺伝子を別種として取り扱った場合には、生物多様性を過大評価する危険があり、NGS データを「種」にまとめるデータ処理の際には注意を要することを提起した。

以上の知見について、学会発表ならびに雑誌論文において報告した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Saitoh, S., Aoyama, H., Fujii, S., Sunagawa, H., Nagahama, H., Akutsu, M., Shinzato, N., Kaneko, N., Nakamori, T. A quantitative protocol for DNA metabarcoding of springtails (Collembola). *Genome* 59, 705–723 (2016).  
doi: 10.1139/gen-2015-0228

〔学会発表〕(計 3 件)

齋藤星耕, 菱拓雄, 武田博清. 土壌小型節足動物の局所群集の形成過程: 移動分散の制限とハビタットの異質性の寄与を

探る. 日本生態学会第 64 回全国大会, 早稲田大学, 新宿区, 2017 年 3 月 16 日. ポスター

Saitoh, S., Aoyama, H., Fujii, S., Park, S., Yamada, A., Shinzato, N., Kaneko, N., Nakamori, T. Multiple mitochondrial sequence types from single collembolan specimens: pseudogenes in Collembola? XIV International Colloquium on Apterygota, Nara, Japan, August 24, 2016. Poster.

Saitoh, S., Aoyama, H., Fujii, S., Sunagawa, H., Nagahama, H., Akutsu, M., Shinzato, N., Kaneko, N., Nakamori, T. DNA metabarcoding of springtails (Collembola). 6th International Barcode of Life Conference. University of Guelph, Guelph, Canada, August 19, 2015. Poster.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 星耕 (SAITOH, Seikoh)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・ポストドク研究員

研究者番号: 10623754

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

中森 泰三 (NAKAMORI, Taizo)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・准教授

研究者番号: 50443081

青山 洋昭 (AOYAMA, Hiroaki)

琉球大学・戦略的研究プロジェクトセンター・特命助教

研究者番号: 20468078

藤井 佐織 (FUJII, Saori)

アムステルダム自由大学・JSPS 海外特別研究員

研究者番号: 50648045