様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ６ 月 ２６ 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：１５Ｋ１８５９０

研究課題名（和文）環境DNAから魚類多様性/新種探索解析を行う総合プラットフォームの開発

研究課題名（英文）The development of computational pipeline for species discovery and diversity analysis of fishes detected from environmental water DNA

研究代表者
佐藤　行人（SATO, Yukuto）

琉球大学・戦略的研究プロジェクトセンター・特命講師

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）：海水や河川水など環境媒質の懸濁物として存在する動物由来物（粘液・鱗・皮膚片・排泄物等）をDNA分析することで、生息する動物を網羅検出する「環境DNA解析」のためのデータ解析パイプラインを作成した。本研究では主に脊椎動物ミトコンドリアゲノムの12S-rRNA部分配列（約170塩基）を種判別マーカーとしたメタバーコーディング解析を行い、次世代シークエンサーで得る1,000万本単位の配列について、クオリティ・フィルタリング等の前処理と、オリジナル配列データベースとの照合解析を自動化した。さらにLODスコアによる結果の定量的評価や分子系統解析の機能を実装し、多様性評価や新種発見に活用できるようにした。

研究成果の概要（英文）：The computational pipeline was developed to comprehensively identify the animal and/or fish species based on DNA analysis of environmental water samples from sea, river, etc. The pipeline conducts animal metabarcoding analysis using partial mitochondrial 12S rRNA gene (170 bp) amplified from fish- and animal-related water suspensions, in which the quality filtering and the Blast-based species assignment of more than ten million sequences were automated. In addition, the pipeline enables LOD score-based evaluation of species assignment results and automatic generation of molecular phylogenetic trees that would be useful for analysis of ecological diversity and discovery of new species.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：環境DNA　魚類　脊椎動物　次世代シークエンサー　ビッグデータ　解析パイプライン

１．研究開始当初の背景

DNA 配列決定技術の発展により、200 塩基から 400 塩基程度の短鎖 DNA については大量安価な配列決定が可能となり普及した。こうした背景から、16S rRNA などのマーカー遺伝子を部分的に PCR 増幅し、その大量配列決定を行うことで微生物叢などを推定するメタバーコーディング解析が盛んになった。この手法を、環境水に懸濁している動物由来物（粘液、皮膚片、鱗、排泄物など）に対して適用し DNA 分析することで、魚類をはじめとする動物相の研究を可能にする「環境 DNA メタバーコーディング解析」(図 1）を着想したことが本研究の背景である。

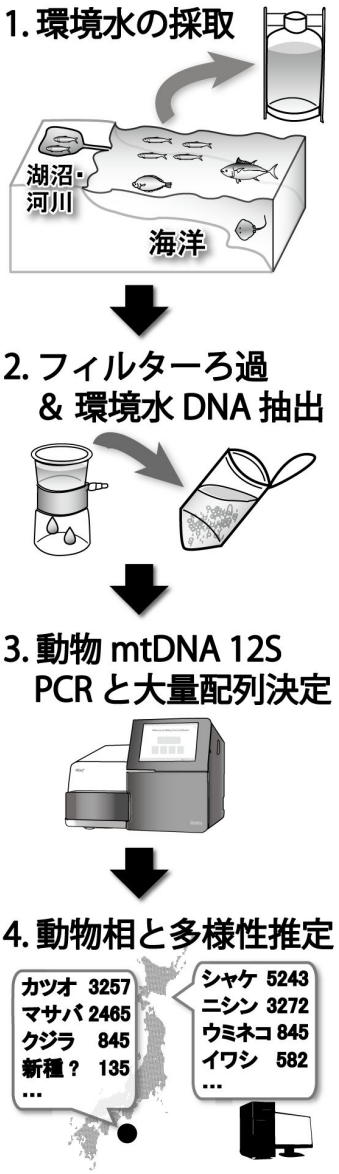


図 1. 魚類などの動物類をターゲットとした環境 DNA 解析の概念図. 海洋・河川・湖沼などから採水・ろ過を行い、採取した懸濁物についてメタバーコーディング分析を行うことで、その環境の動物相を推定する

２．研究の目的

魚類を中心とした脊椎動物の環境 DNA メタバーコーディング解析は、本研究の成果の一部である Miya, Sato et al. (2015) で開発したユニバーサルプライマーMiFish（下記雑誌論文③）が登場することによって、高感度・網羅的な手法として多く実行されるようになった。本研究の目的は、この MiFish プライマーによって得られる数千万本規模の配列データを自動解析するために、MiFish パイプラインを作成することである。パイプラインの内容としては、大量配列データの前処理（クオリティ・フィルタリング、ペアリード結合など）、および高次解析（類似配列クラスタリング、種判別データベース照合解析、種判別精度評価など）を自動化することが目的である。さらに、パイプラインの利用者が解析結果の詳細を迅速に精査できるようにするために、ユーザーフレンドリーな html ビューワーを自動生成することや、種判別結果を LOD スコアに基づいて定量的に評価する機能を持たせることも目的とした。

３．研究の方法

沖縄県・美ら海水族館の水槽水や、本州沿岸海水などから得られた MiFish メタバーコーディング配列のデータを用いて、Linux/UNIX 環境で動作するコマンドライン・パイプラインを構築した（図 2)。データ

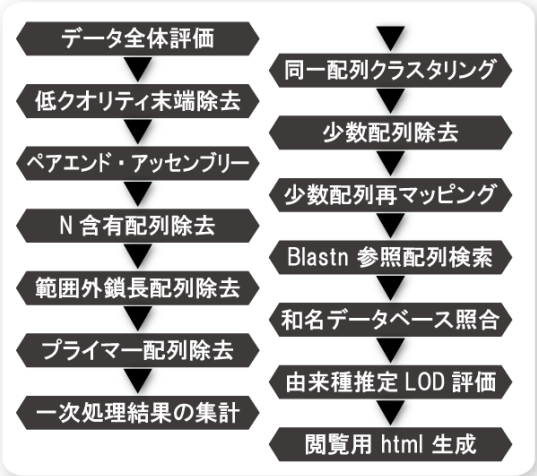


図 2. 作成した MiFish パイプラインの概要。クオリティ・フィルタリングやペアドエンドリードの結合などを行う前処理と、処理済データのクラスタリングやデータベース照合などを行う高次解析を自動化した。大型計算サーバー等の UNIX/Linux 環境での運用が可能となっている

の前処理では、ペアドエンドリードの結合を行うソフトウェア FLASH や、末端配列フィルタリングを行うソフトウェア DynamicTrim などの既存ツールと、自前の perl およびシェルスクリプトを組み合わせて自動化を行っ

た。データの高次処理では、類似配列のクラスタリングなどを行うソフトウェア Uclust や、データベース照合を行うソフトウェア NCBI Blast plus などの既存ツールと自前スクリプトを用いて、MiFish データの解析に適切な条件や順序、パラメーター設定を検討し実装した。さらに、文部科学省による統合データベースプロジェクトの成果の１つである標準和名データベースに基づいて、種判別結果に標準和名を付与するプログラムを作成した。また、結果を迅速に閲覧できる html ビューワーの自動生成プログラムを作成し、パイプラインに組み込んだ。

４．研究成果

本研究で行ったデータ解析パイプラインの作成により、魚類や動物などのメタバーコーディング大量配列データを簡便に解析し、その結果である動物相データを詳細に精査できるようになった。出力される閲覧用 html ビューワー（図 3）では、解析結果の集計や

F03-Nzaki-1701-PS55_S51.Univ

Phylogenetic tree of species from the F03-Nzaki-1701-PS55_S51.Univ

Species	和名	Total read #	Fishbase	BoL	Gbif	MitoFish	NCBI	Newick	Representative sequ
Oreochromis niloticus	ナイルティラピア	1781	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG
Oreochromis sp. "red tilapia"	カワスズメと同じ属名の種	1030	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG
Oreochromis aureus	カワスズメと同じ属名の種	322	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG
Ophiocara porocephala	ホシマダラハゼ	288	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG
Bos javanicus	バンテン	226	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTCATACG
Oreochromis mossambicus	カワスズメ	129	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG
Scarus rubroviolaceus	ナガブダイ	90	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG
Homo sapiens	ヒト	92	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTCACACG
Thunnus alalunga	ビンナガ	65	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG
Thunnus albacares	キハダ	79	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG
Bos taurus	ウシ	61	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTCATACG
Dentex hypselosomus	キダイ	54	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG
Pelodiscus sinensis	ニホンスッポン	41	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACA
Poecilia reticulata	グッピー	38	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG
Diagramma picta	コロダイ	26	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGTTATACG

Back to list

F04-MachiMain-1701-KAPA60_S4.Univ

Phylogenetic tree of species from the F04-MachiMain-1701-KAPA60_S4.Univ

Species	和名	Total read #	Fishbase	BoL	Gbif	MitoFish	NCBI	Newick	Representat
Gambusia affinis	カダヤシ	138	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Mus musculus domesticus	ハツカネズミ	61	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Oreochromis niloticus	ナイルティラピア	33	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Rhinogobius brunneus OKINAWA	アヤヨシノボリと同じ属名の種	26	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Homo sapiens	ヒト	28	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Gallinula chloropus	バン	17	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Canis lupus familiaris	イヌ	17	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Rattus norvegicus	ドブネズミ	13	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Zosterops erythropleurus	チョウセンメジロ	10	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT

Back to list

F04-MachiMain-1701-PS55_S52.Univ

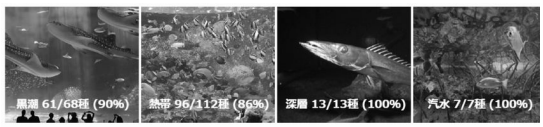
Phylogenetic tree of species from the F04-MachiMain-1701-PS55_S52.Univ

Species	和名	Total read #	Fishbase	BoL	Gbif	MitoFish	NCBI	Newick	Representat
Gambusia affinis	カダヤシ	204	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Rhinogobius brunneus OKINAWA	アヤヨシノボリと同じ属名の種	155	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Gallinula chloropus	バン	135	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Anguilla marmorata	オオウナギ	17	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT
Homo sapiens	ヒト	16	Fishbase	BoL	Map	MitoFish	NCBI	Tre	CACCGCGGT

図 3. MiFish パイプラインが出力する html ビューワー。図に示したメイン画面では、各採水サンプルから検出された種の学名、和名、検出リード数、FishBase などへのリンク、代表塩基配列等を表示する。各種にリンクされたサブページに、種判別 LOD score、2nd hit 種の学名、各検出配列などを表示する

検出種のリスト、各種の分布データベースへのリンクなどに加えて、種判別結果の妥当性を定量的に評価するための LOD スコアも参照することが出来る。また、それぞれの検出種や、各サンプルが含んでいた構成種については、該当配列に対する一連の自動解析を経て分子系統解析樹が生成されている。それらの系統樹へのリンクも、html ビューワーに出力されている。また、検出種とそのリード数の集計表（tsv 形式）も併せて出力される。そのデータ行列を用いることで、主成分分析やクラスター解析などの多変量解析、多様性指標値や生物相距離の推定といった生態学的解析を迅速に行うことが出来る。

この MiFish パイプラインによるデータ解析を活用し、沖縄県・美ら海水族館の水槽水を用いた MiFish プライマーの性能評価に関する論文を出版した（図 4; Miya, Sato et al. 2015; 雑誌論文③）。この論文は、発表後２



項　目	黒潮	熱帯魚	深層	汽水
MiSeq の5回のランで得られた総リード数	2,192,340	1,279,571	248,620	273,416
各水槽で飼育されている種数 (A)	74	160	15	8
飼育種 (A) のうちリファレンスがある種	68	112	13	7
MiSeq で検出された種数 (一致率97%以上)	61 (90%)	96 (86%)	13 (100%)	7 (100%)
各水槽の容積 (m^3)	7,500	700	230	35.6

図 4. 沖縄県・美ら海水族館水を用いた MiFish 環境 DNA 分析とデータ解析パイプラインの実証テスト。美ら海水族館内にある黒潮水槽、熱帯水槽、深海水槽、汽水域水槽の水槽水をテストサンプルとして、各水槽で飼育されている魚種をどの程度（%）検出できるかを実証の基準としている。各水槽で 86%～100%（平均 94.3%）の検出率を達成した

年間の被引用件数が 50 報近くに達し（2017 年 6 月現在 47 報）、魚類の環境 DNA メタバーコーディング解析を行う上での重要論文の１つとして位置づけられている。この論文において、本パイプラインの一部を出版、公開した（Analytical pipeline for DNA sequences amplified by MiFish primers. DOI: 10.5061/dryad.54v2q.2）。さらに、本解析パイプラインを用いた魚類環境 DNA 研究の成果として、沿岸性魚類相の解析（Yamamoto et al. 2017; 雑誌論文②）、哺乳類など四足類の検出への応用（Ushio et al. in press; 雑誌論文①）に関する論文を出版した。

今後は、上記の MiFish プライマーと本研究で開発した MiFish パイプラインを用いることで、魚類を始めとした脊椎動物の環境 DNA メタバーコーディング分析の実例研究が増加し推進されていくと見込まれる。とくに、Ushio et al.（雑誌論文①）によって MiFish シリーズの検出ターゲットが四足類に拡大されたことで、野外フィールドにおける様々な環境水サンプル、例えば水飲み場水、雨後の貯留水、水たまり水、排水口水などで環境 DNA メタバーコーディング解析を行い、希少動物の分布調査や、外来種の検出、いわゆる害獣のモニタリングや捕獲前のジェノタイピング等に応用できる可能性がある。また魚類においても、これまで調査が困難であった深海や外洋水などにも環境 DNA メタバーコーディング解析を適用していくことで、魚類分布の全球的実態、遺伝的多様度の時空間分布、

地球上での生物多様度 α の偏りや時系列変遷などにアプローチ出来るようになり、人類の将来を考える上でも重要な資源生物の集団サイズ推定や資源量推定の手法発展に寄与していく可能性がある。

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３件）
① Ushio M, Fukuda H, Inoue T, Kobayashi M, Kishida O, Sato K, Murata K, Nikaido M, Sado T, Sato Y, Takeshita M, Iwasaki W, Yamanaka H, Kondoh M< Miya, M. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. Molecular Ecology Resources, in press. 査読有、印刷中.

② Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, Sado T, Araki H, Kondoh M, Minamoto T, Miya M. 2017. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. Scientific Reports, 7, 40368. 査読有.

③ Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto T, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of >230 subtropical marine species. Royal Society Open Science, 2, 150088. 査読有.

〔学会発表〕（計２件）
① 佐藤行人、荒木仁志、宮正樹、佐土哲也、峰岸有紀、岩崎渉．環境 DNA メタバーコーディング解析のためのパイプライン開発．日本進化学会第 17 回大会・W-06『環境 DNA：NGS がもたらす生態情報を進化学にどう活かすか』，中央大学・後楽園キャンパス，東京都文京区，2015 年 8 月 20 日.

② 佐藤行人．環境 DNA から魚類を検出するデータ解析パイプライン構築．ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会，岡崎カンファレンスセンター，愛知県岡崎市，2015 年 8 月 19 日.

〔図書〕（計 1 件）
岩崎渉、佐藤行人、源利文、山中裕樹、荒木仁志、宮正樹. 2016. 環境 DNA 解析のインパクト. 実験医学, Vol.34, No.1, 103-107, 総頁数 161 頁.

６．研究組織
(1)研究代表者
佐藤　行人（SATO, Yukuto）
琉球大学・戦略的研究プロジェクトセンター・特命講師
研究者番号：２０５６６４１８