

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18610

研究課題名(和文) 魚類個体群の遺伝的多様性を網羅的に分析する新手法の確立と現場応用への展開

研究課題名(英文) Development of a new method for environmental DNA analysis for the evaluation of intraspecific genetic diversity of fish population

研究代表者

山中 裕樹 (Yamanaka, Hiroki)

龍谷大学・理工学部・講師

研究者番号：60455227

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)：個体群内の遺伝的多様性は、希少種保全や水産資源管理には不可欠の情報であるが、生息密度が低い種や活動性が極めて高い種などは1個体ずつ捕獲して遺伝情報を取得するのに相当な労力が必要である。本研究では、水中を漂う環境DNAを分析することによって、対象個体群が持つ遺伝的多様性を個体を捕獲することなく解析し、捕獲では収集困難な多数の個体由来のDNAから遺伝的多様性の情報を簡便かつ大量に取得する技術的基盤を開発した。

研究成果の概要(英文)：Information on genetic diversity in fish populations is essential for rare species conservation and fishery resource management, but the evaluation based on the direct capturing of individuals is difficult to conduct when the population density is low or when the target species are extremely active. In this study, developed basal techniques for new evaluation method for genetic diversity in a fish population using environmental DNA analysis. This method enables us to acquire an enormous volume of genetic information from a number of individuals at once which could not attain by the other conventional capturing methods.

研究分野：水域生態学

キーワード：環境DNA 種内多様性 広域調査 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

環境 DNA とは生物が土や水など自らの生息環境中に放出している DNA であり、過去の研究から、種の同定を行うのに十分な量を環境中から回収できることが明らかになっている。微生物学の分野では以前から環境 DNA 分析が行われていたが、2008 年に生息地の水試料からウシガエルの DNA を検出したという報告 (Ficetola et al. 2008) がなされて以降、脊椎動物由来の環境 DNA を対象とした研究が急速に発展してきた。これまでに多くの分類群に対して環境 DNA 分析が適用され、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類が、生息地から採取した水試料から検出されている。こうした「環境 DNA 分析による種の検出」は分布調査に利用でき、池などの半閉鎖的な環境では生物量の推定も可能で、野生生物の生態学的調査や水産資源の管理への応用が進められている。環境 DNA 分析は、野外では環境試料(土や水)を採取するだけで済み、かつ、種の検出感度が目視や捕獲よりも格段に高いため、保全や水産の分野で大きな期待を寄せられている。また、複数種を同時に検出する手法 (Minamoto et al. 2012) や、生物量の推定手法 (Takahara et al. 2012; Doi et al. 2015) にも利用できるよう検出系が開発された。更に、環境 DNA 試料を次世代シーケンサーで分析することにより、パケツ 1 杯ほどの水から網羅的に魚類相を明らかにできる、圧倒的にパワフルな分析手法が発表された (Miya et al. 2015)。こうした「種」を対象とした環境 DNA 分析に関わる技術は既に実用レベルで、その成熟期に入った感がある。環境 DNA として我々が回収できる試料には、種の情報以外に何か有用な情報は含まれていないのか。これまでの研究動向が、次の新たな展開は「種より細かな解像度」の遺伝情報を探る部分にあると考えられた。環境 DNA 分析は既に多くの生物で分布調査に利用されており、ヨーロッパにおける希少なドジョウや、日本における在来のオオサンショウウオと外来のチュウゴクオオサンショウウオの検出 (Fukumoto et al. 2015)、そして同じく日本でブルーギルの在不在を広域的な溜池調査によって明らかにしている例 (Takahara et al. 2013) などがある。ただし、これらの研究ではやはり「種」の検出が行われているのみであり、どのようなルートで対象種が分布を拡大したのかや、個体群間の独立性などは全く推定できない。アユを対象として河川内での季節的な移動を調査した研究例 (Yamanaka and Minamoto 2016) があるが、天然遡上個体と放流個体の区別などの種より細かな情報が得られないために、人為的な放流効果を除外した解析ができないという課題がある。また、環境 DNA 分析はその検出感度を生かして希少種探索に利用される場面が多いが、「いる」だけではやはり健全な個体群として維持されているかど

うかがわからず、その個体群の遺伝的多様性に次の興味に移る。環境 DNA 分析の次の展開の一つは「種より細かな解像度」を追い求める事で得られる、遺伝的多様性情報の取得であると考えられた。

2. 研究の目的

〔研究全体での方向性〕

個体群内の遺伝的多様性は、感染症等の攪乱への耐性など、個体群の存続可能性に大きく影響する。希少種保全や産業上有用な種の資源管理には不可欠の情報であるが、生息密度が低い種や活動性が極めて高い種などは 1 個体ずつ捕獲して遺伝情報を取得するのに相当な労力が必要で、また、捕獲行為が対象種の生息環境を人為的に攪乱してしまう恐れもある。そこで本研究では、水中を漂う環境 DNA を分析することによって、対象個体群が持つ遺伝的多様性を、個体を捕獲することなく解析する新手法を確立することを大きな目的とした。現在の技術では種を識別するだけに留まっている環境 DNA 分析をさらに進化させ、捕獲では収集困難な多数の個体由来の DNA を網羅的に分析して、個体群の保全に有用な遺伝的多様性の情報を簡便かつ大量に取得する技術を開発する。

〔具体的目的〕

本研究を開始する前から予備的検討を始めていたアユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) を対象とした技術開発を継続し、まず、環境 DNA 分析によって環境水から対象個体群内のハプロタイプを網羅的に検出できる基礎技術を確立する。分析は主に次世代シーケンサーを使用するため、膨大に出てくるデータの中から効率的に PCR エラーやシーケンスエラーによる誤読を排除する実験ステップとデータクリーニングの手法を確定する。次に、アユを対象として、琵琶湖周辺等、ハプロタイプの分布について既存の知見がある水域で分析手法の評価を行う。これと同時に、カワバタモロコ (*Hemigrammocyptris rasborella*) などの希少淡水魚類を対象として他種へ技術の展開を図る。

3. 研究の方法

〔対象遺伝子領域とプライマー開発〕

これまでの環境 DNA 分析はミトコンドリア DNA 上の遺伝子が主な対象であったが、これはミトコンドリア DNA が 1 細胞あたりに多く含まれていることが理由である。魚類の場合は数百から数千コピー/細胞で、ほとんどが 1 コピーである核 DNA と比較すると、かなり希薄である環境 DNA 試料から対象種を検出する上で大きなアドバンテージがある。本研究においても、ミトコンドリア

ア DNA 上の遺伝子の中から個体間で種内変異がみられる領域を選んで課題に取り組んだ。全国の陸水面で有用魚種にあげられるアユを対象とし、各個体の D-loop 領域の塩基配列を環境 DNA 試料から分析可能かを確認するために、次のような 2 組のプライマーセットを設計した。1 組目は D-loop 領域を増幅産物長 541 bp で増幅するもので、サンガーシーケンスによる解析に用いるために作成した。もう 1 組は同領域を同じく 215 bp で増幅するもので、次世代シーケンサーによる解析に使用する目的で作成した。

〔水槽実験 1〕

琵琶湖のエリ漁で漁獲されたアユの仔魚 20 個体(0.92±0.21 g 湿重)を入手し、環境 DNA を含む飼育水から同じ標的領域が増幅できるか実験を行った。1 週間汲置きした水道水 300 mL を入れたプラケース 20 個にアユを 1 個体ずつ入れ、15 分間静置した。その後、個体を取り出し、各飼育水を GF/F フィルターで 250 mL 濾過し、フィルターから Yamanaka et al. (2016) に従って DNA を抽出した。一方で、取り出した個体の体側から筋組織を採取し、DNA を抽出した。アユ仔魚飼育水および組織片から抽出した DNA 試料をそれぞれ、サンガーシーケンス用プライマーを用いて PCR 増幅し、サンガーシーケンスにより塩基配列の両側解読を行った。

〔水槽実験 2〕

水槽実験 1 で用いたアユの仔魚 20 匹分の水槽水を 50 mL ずつ混合した水試料を作成し、水槽実験 1 と同様にフィルターで濾過し、DNA を抽出した。この DNA 試料から次世代シーケンサー用のプライマーセットでアユのミトコンドリア DNA (D-loop 領域) を PCR 増幅し、次世代シーケンサー (Illumina 社 Miseq) を用いてハプロタイプの網羅的な検出を試みた。実験ステップについては複数のライブラリ反復を設定することで、ランダムに生成されるエラーと、どの反復からも得られる真に存在する塩基配列とを区別しやすくする工夫を行った。

〔野外試料水の分析〕

安曇川 (滋賀) の水を 0.5 L ずつフィルターで 20 反復濾過した。その後、環境 DNA を抽出し、次世代シーケンサー用のプライマーセットでアユのミトコンドリア DNA (D-loop 領域) を PCR 増幅し、試料ごとに計 15 反復のライブラリを調整した。その後、次世代シーケンサーを用いて網羅的に塩基配列を決定した。また、採水地付近のヤナで同日に捕獲されたアユ 96 個体の筋組織から得た DNA の配列をサンガーシーケンスにより決定した。環境 DNA 分析と組織 DNA から得られた配列のハプロタイプを比較し、両種法の整合性を確認するとともに、環境 DNA 分析におけるフィルターおよびライブラリ反

復間での各ハプロタイプの検出頻度を比較した。

〔次世代シーケンスデータの解析〕

ライブラリ調整時に設けた計 15 回のライブラリ反復について、検出されたハプロタイプごとに反復間での出現頻度を比較し、各ハプロタイプについてライブラリ反復間で検出された出現頻度と塩基の並びパターンに基づくデータクリーニング (denoising) を試みた。

〔他魚種への展開〕

カワバタモロコの D-loop 領域を対象とした種内多様性評価のための環境 DNA プライマーセットの開発を試みた。

〔更なる技術的展開〕

より高解像度な種内多型情報を環境 DNA 試料から得るため、魚類のミトコンドリア DNA (総塩基配列長: 約 16000 bp) をひとつながりでシーケンスすることを目指し、PCR によって環境 DNA 試料中からミトコンドリア DNA を全長増幅できるプライマーセットの選定と PCR 条件の検討を行った。

4. 研究成果

〔基礎的分析手法の確立〕

水槽で 1 個体ずつを飼育し、各水槽水から得られた環境 DNA 試料から得た対象領域の塩基配列と、飼育個体の肉片由来の DNA 試料から得た D-loop 領域の塩基配列を決定し、両者が完全に一致することを確認した。これによって、種内の遺伝的多型も環境 DNA 分析により解析できることが示された。次に、アユを対象として次世代シーケンサーによる解析の安定的な実施体制と、膨大な出力データの妥当な解析 (エラーシーケンスのクリーニング) 手法の確立を行った。次世代シーケンサーでは類似した塩基配列の試料をシーケンスするときエラーを含んだデータが生成されるため、膨大に出てくるデータの中から効率的に PCR エラーやシーケンスエラーによる誤読を排除する実験ステップとデータクリーニングの手法を模索する必要があった。実験ステップについては複数のライブラリ反復を設定することで、ランダムに生成されるエラーと、どの反復からも得られる真に存在する塩基配列とを区別しやすくする工夫を行った。

平成 28 年度に実施した基礎研究で、こうしたデータクリーニング (denoising) の手法の開発はかなり進んだ。しかし、独自に開発した denoising 手法よりも高精度な手法が存在していることが判明し、平成 29 年度にはその検証を進めた。結果として、新たな denoising 手法である DADA2 は環境 DNA に基づくハプロタイプ評価の場面でも適切な

データクリーニングが可能であることが明らかになった。結果として、水槽実験で試用した 20 個体もつ 9 つのハプロタイプのうち 8 つのハプロタイプを検出できた一方で、31 の実在しないハプロタイプ（エラー由来）も検出された。しかし、15 反復のライブラリの繰り返しすべてから検出されたデータだけに絞り返すと、8 つの真のハプロタイプは検出しつつ、実在しないハプロタイプの検出数は 7 つにまで減少させることができた。

〔野外個体群への応用〕

本研究ではアユを対象種としており、ハプロタイプ情報について既存の知見がある琵琶湖への流入河川から得た環境 DNA 試料の分析に用いて、本研究で確立した方法が野外試料に応用できるかを試した。まだ改善の余地は残されているものの、本研究で目指していた環境 DNA 分析によるハプロタイプ多様性の評価の実施が十分可能な手法が確立できた。結果、偽ハプロタイプ全体の 99% を偽データとして排除することに成功した。本研究により、膨大なデータの真偽を判別する方法論のひとつを全く新たに確立した意義は大きく、環境 DNA 手法が既存の種の検出から、更に種内の遺伝的変異を評価するための新しい強力なツールとしても利用できなる可能性が示された。

アユ 96 個体の組織 DNA から計 42 ハプロタイプが得られ、組織から得られたものと同じ 33 タイプを含む計 441 ハプロタイプが環境 DNA 分析により検出された。特に、2 尾以上のアユから検出された 11 ハプロタイプは 1 つを除き、フィルターのすべての反復から検出された。一方、環境 DNA 分析では高頻度でフィルターやライブラリの反復間で検出されたにも関わらず、組織 DNA からは検出されなかったハプロタイプがあった。しかし、分析個体数と検出されたハプロタイプ数の累積曲線は定常状態に至っておらず、調査河川には組織 DNA 分析では検出できなかったハプロタイプを持つ個体がまだまだ多数存在していたと考えられる。このことは当初より想定されていたことで、96 個体程度の直接捕獲によるハプロタイプの検出では、網羅的に個体群内の遺伝的多様性を記述するのは困難であろうと思われる。これらの結果より、環境 DNA 分析を用いた本手法は 0.5 L の水から、調査地に 2/96 尾、またはそれより低い割合で存在する個体のハプロタイプを検出する力を有していることが示唆された。

〔他種への展開〕

本研究で予定していた希少種への本分析手法の展開であるが、これは実地での検証まで進むことはできなかったが、カワバタモロコを対象として遺伝的多様性を評価するためのプライマーセットを完成させた。今後、野外試料をもちいた分析を試みたい。

〔更なる技術的展開〕

16S rRNA 領域に設計された魚類のミトコンドリア DNA を一度の PCR で全長増幅できる既存のプライマーセットと PCR 酵素 KOD FX Neo を用いたステップダウン PCR（アニリング温度：74~68 °C）による増幅で目的産物の単一バンドが確認された。次に、京都市の宇治川と木幡池で採取した環境水からの増幅試験を行った。35, 40, 45, 50 サイクルで PCR を行ったところ、45, 50 サイクルの増幅産物では両試料から目的断片長の増幅が確認された。非特異的増幅やスミアが少なかった 45 サイクルの増幅産物を元試料として、どのような魚類の DNA が含まれているのかを知るためにメタバーコーディングを行った。その結果、宇治川の試料ではコイ（*Cyprinus carpio*）やカワヨシノボリ（*Rhinogobius flumineus*）など 5 種が検出され、木幡池の試料ではゲンゴロウブナ（*Carassius cuvieri*）やモツゴ（*Pseudorasbora parva*）など 4 種が検出された。これにより、環境 DNA 試料に全長サイズの魚類ミトコンドリア DNA が含まれていることが明らかになった。全長に渡るミトコンドリア DNA の塩基配列を環境 DNA 試料から読み取れるように可能性が示された意義は大きく、「これ以上は不可能」な高い解像度で、魚類のミトコンドリア DNA の多様性情報を得られる技術を開発すべく研究を継続する。

〔今後の展望〕

本研究で開発した環境 DNA 分析による種内の遺伝的多様性の評価手法を使って希少魚類等の調査を行えば、これまでに知られていなかったハプロタイプが検出される可能性が高く、これまでにない広域かつ詳細な種内多様性の空間分布情報が得られると考えられる。ハビタットの特徴や空間配置等各種条件との関係解析などにも展開が可能である。種の検出を目的とした環境 DNA 分析は生物モニタリングの現場で既に実用化プロセスに入っているが、これに加えて本研究で提案した「環境 DNA からの遺伝的多様性の分析技術」が実用化できれば、希少種保全や水産資源管理に大きな進展を期待することができる。例えばイタセンパラなど、生息域外保全が行われているようなレッドリスト種については、野生個体群の遺伝的な構成を網羅的に知ることで、追加放流予定の飼育個体群とのマッチングの確認等に即座に寄与できる。こうした保全生物学的なテーマについて、本技術を適用できる機会を常に求め、今後、実用的応用を進めていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1) Satsuki Tsuji¹, Yuka Iguchi, Iori Teramura, Naoki Shibata, Tadao Kitagawa,

Hiroki Yamanaka. (印刷中) Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of multiple species from environmental DNA: an application on two Japanese medaka species. Scientific Reports. 査読有.

(2) Kimiko Uchii, Hideyuki Doi, Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto. (2017) Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and non-native genotypes of common carp estimated by environmental DNA. Ecology and Evolution 7:8515-8522. 査読有.

(3) Satsuki Tsuji, Masayuki Ushio, Sho Sakurai, Toshifumi Minamoto, Hiroki Yamanaka. (2017) Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. PLOS ONE 12:e0176608. 査読有.

(4) Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto, Junichi Matsuura, Sho Sakurai, Satsuki Tsuji, Hiromu Hotozawa, Masamichi Hongo, Yuki Sogo, Naoki Kakimi, Iori Teramura, Masaki Sugita, Miki Baba, Akihiro Kondo. (2017) A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. Limnology 18:pp233-241. 査読有.

(5) Hiroki Yamanaka, Hiromu Motozawa, Satsuki Tsuji, Ryohei C Miyazawa, Teruhiko Takahara, Toshifumi Minamoto. (2016) On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. Ecological Research 31:963-967. 査読有.

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 平尾陽平, 佐藤博俊, 源利文, 山中裕樹(2017)環境 DNA からの魚類ミトコンドリア全長配列取得に向けた PCR 条件の検討, 第 65 回日本生態学会, 札幌

(2) 辻冨月, 宮正樹, 潮雅之, 佐藤博俊, 佐藤行人, 源利文, 山中裕樹 (2017) 環境 DNA 分析を用いた遺伝的多様性検出: アユ野外個体群への適用と検出力の検討, 第 65 回日本生態学会, 札幌

(3) 山中裕樹 (2017) 「生態情報記憶媒体」としての水 ~ そこにある学術的・産業的価値 ~, 第 7 回超異分野学会本大会シンポジウム「未知なる海から新たな価値を汲み上げる」, 東京

(4) 山中裕樹 (2017) 環境 DNA 分析による大型水棲生物検出のこれまで, 第 77 回分析化学討論会 日本分析化学会, 京都

(5) 辻冨月, 山中裕樹, 宮正樹, 潮雅之, 佐藤行人, 源利文 (2017) 環境 DNA 手法に基づくアユ個体群におけるミトコンドリア DNA ハプロタイプ多様性の評価, 第 77 回分析化学討論会 日本分析化学会, 京

都

(6) 辻冨月, 宮正樹, 潮雅之, 佐藤行人, 山本哲史, 源利文, 山中裕樹(2017) 環境 DNA を用いた種内変異の評価: NGS 解析に由来する偽ハプロタイプを除去する新手法, 第 64 回日本生態学会, 東京

(7) 辻冨月, 入口友香, 寺村伊織, 北川忠生, 山中裕樹 (2017) 環境 DNA 分析による日本産メダカ属 2 種の同時検出に向けた Real-time Multiplex PCR 検出系の開発, 平成 29 年度第 1 回近畿地区会例会, 神戸

(8) 辻冨月, 入口友香, 寺村伊織, 芝田直樹, 北川忠生, 山中裕樹 (2017) 環境 DNA 分析を用いた複数種の同時検出: 日本産メダカ属 2 種を対象とした Real-time Multiplex PCR 検出系の開発と野外適用, 2017 年度日本魚類学会年会, 函館

(9) 辻冨月, 寺村伊織, 中井量暉, 本澤大生, 山中裕樹 (2016) 環境 DNA 分析による日本産メダカ属 2 種の判別に向けた Multiplex PCR 検出系の開発, 2016 年度日本魚類学会年会, 岐阜

(10) Satsuki Tuji, Iori Teramura, Kazuki Nakai, Hiromu Motozawa, Hiroki Yamanaka (2016) Species identification of closely related two Medaka species from aqueous environmental DNA using multiplex PCR, 5th Japan-Taiwan Ecology Workshop, Kyoto

(11) 辻冨月, 寺村伊織, 中井量暉, 本澤大生, 山中裕樹 (2016) 近縁種を判別する: Multiplex PCR による日本産メダカ属 2 種の同時検出, 日本陸水学会第 81 回大会, 那覇

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.est.ryukoku.ac.jp/est/yamanka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 裕樹 (YAMANAKA HIROKI)

龍谷大学・理工学部・講師

研究者番号: 60455227