

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K20056

研究課題名（和文）見えないもの見える化して保全する - 環境DNAを用いた水草稀少種の生育状況の解明

研究課題名（英文）Application of environmental DNA methods to detect aquatic plants

研究代表者

牧 雅之（Masayuki, Maki）

東北大学・学術資源研究公開センター・教授

研究者番号：60263985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：水草には稀少な種が多数含まれるが、その実態を明らかにすることは容易ではない。しかし、近年、発展の著しい環境DNA手法を用いれば、調査対象地から取水して、そこに分布する水草を検出できる可能性がある。本研究は、環境DNAを水草の検出に応用する手法の確立とその応用可能性を野外湖沼で検討することを目的とした。

植物のDNAバーコーディングには、葉緑体DNAが用いられることが多いが、湖沼の水には藻類が多数含まれ、それも検出されてしまう。本研究ではPCRプライマーを工夫し、効率的に維管束植物を検出するようにした。この方法を野外に応用したところ、実際に生育している水草を含めて、検出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水中の水草を検出することは困難が伴うが、取水を行って、そこに微量ながら存在する遺伝物質（環境DNAという）の情報を得ることによって、存在する水草を知ることが可能であると考えられる。この研究では、そのような方法の確立を行って、実際に野外における湖沼の水から存在する水草を検出できるかどうかを検討した。その結果、効率的に維管束植物（藻類ではない普通の植物）を同定することができ、稀少植物の検出にも応用できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）： Although there are many rare species in aquatic plants, it is not easy to identify them. However, there is a possibility that the environmental DNA method, which has been rapidly developed in recent years, can be used to detect aquatic plants in water samples taken from surveyed areas. The purpose of this study was to establish a method to apply environmental DNA to the detection of aquatic plants and to investigate its applicability in lakes and ponds in wild.

Chloroplast DNA is often used for plant DNA barcoding, but the water in lakes and ponds contains a large number of algae, which can also be detected. In this study, we developed PCR primers to detect vascular plants efficiently. When we applied this method to the field lake and ponds, we were able to detect vascular plants, including those that were actually growing in the lakes and ponds.

研究分野：植物分類学

キーワード：在来種保全

1. 研究開始当初の背景

日本は淡水性の水生植物の多様性が高いが、かなりの割合が沈水性（湖沼の底に生育する）であって、岸から目で見てもその存在を確認することはできない。また、沈水性植物には絶滅危惧種としてレッドリスト（絶滅を危惧される種のリスト）に掲載されている種が多数含まれる。絶滅に瀕する希少な植物の保全のためには、まずその生育状況を知ることが大前提になるが、沈水性植物の場合は現状把握が困難である。

このような沈水性の植物のどのような種がどれくらい存在するかを知るためには、これまでは偶発的な機会（稀な濁水時に確認する、あるいは、漂流物を発見する）に恵まれるか、ボートなどを利用して探索するかの方法しかなかった。このような従来の方法では、短期間に十分な調査を行うことは容易ではなく、もっと省力的な方法の開発が必要であると考えられた。

湖沼の水から生息する種を特定したり、現存量を推定したりすることを可能とした環境 DNA の手法は、2010 年代になって確立されたきわめて新しいものである。これまでのところ、魚類や両生類に関する研究が大部分であり、植物を対象にした研究例はほとんどない。数少ない植物の環境 DNA の研究例においても、存在が既知の普通種を用いて、実際に環境 DNA 手法を用いて種の存在を確認できることと、現存量の推定ができることを示すことにとどまっており、未知の植物相とその現存量の推定に適用するという観点からの研究は限られている。また、環境 DNA から植物相を明らかにするためには、存在可能性のある種の DNA 塩基配列情報がすでに分かっているなければならない。この手法が確立されれば、国内に多数見られる湖沼の植物相を短期間に省力的に調査することができるようになり、多様性生物学および保全生物学的に大きな意義をもたらすだけでなく、環境保全施策にも利用できることが期待される。

2. 研究の目的

水中に生息する生物からは微量の DNA が放出されている。すでに実験手法としては確立されている PCR 法を用いれば、きわめて微量な DNA であっても増幅が可能であり、DNA を放出した生物が何であるかを特定することができる。さらに、放出された DNA 量と存在する生物の個体数に相関があることも立証されている。この手法は、主として魚類や両生類において利用されてきたが、近年、植物においても有効であるという報告がなされた。

湖沼から微量の採水をするだけで、十分な情報量が得られるのであれば、現地調査の労力を少なくすることが可能になるだけでなく、多数の地点から情報を得ることができる。また、あらかじめ日本産の沈水性植物の遺伝子情報を決定しておくことにより、DNA バーコーディング（DNA の配列情報から種を特定する）に基づいて、環境 DNA から種を同定することが容易になる。

本研究では、「水を汲んできて、実験室で DNA を増幅して、塩基配列を決定する」ことで、「どのような沈水性の植物種がどれくらい存在するのか」を明らかにする技術を確立し、特に稀少種の保全に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

一般に野外の湖沼においては、維管束植物以外に藻類も多数存在する。本研究では、主として維管束植物を対象とした研究を行うため、藻類の情報を可能な限り削減したい。植物の DNA バーコーディングでは、葉緑体 DNA の塩基配列情報が用いられることが多いが、植物の葉緑体 DNA は保存性が低くなく、維管束植物用に設計した PCR プライマーが藻類の葉緑体 DNA を増幅させてしまう可能性が高い。

一方、保存性の低い部分にプライマーを設計すると、一つのプライマーセットで多くの維管束植物を検出することが難しい。そこで、維管束植物の葉緑体 DNA の大部分を増幅させる一方、藻類の葉緑体 DNA を可能な限り増幅させないようなプライマーを、試行錯誤によって探し出す必要がある。本研究では、これまでに発表されている維管束植物の葉緑体 DNA を増幅させるプライマーを多数試し、その中から藻類をあまり増幅させないものを選び、さらにその領域内でプライマーを多数設計して、もっとも効率よく（藻類の葉緑体 DNA を増幅させることの少ない）ものを選び出して用いた。このプライマーを用いて、湖沼から採水したサンプルを増幅させて、次世代型 DNA オートシーケンサー（NGS）によって、メタバーコーディングを行った。

環境 DNA 手法を用いて、存在する種の同定を行うためには、リファレンスとなる配列情報が必要となる。そこで、日本産の水草について、可能な限り多数の種について、上記で設計したプライマーによって塩基配列を決定して、リファレンス配列として用いることとした。

4. 研究成果

本研究では、まず Taberlet et al. (2007)による trnL イントロン内の一部領域を増幅するプライマー (g, h プライマー; 図 1) が、水生の維管束植物を同定するのに十分な変異を持っていることを確かめた。しかし、このプライマーをそのまま取水サンプルに用いると、圧倒的に藻類の DNA が多量に増幅されてしまい、本研究で目的とする水生の維管束植物の DNA を検出することが困難になる。

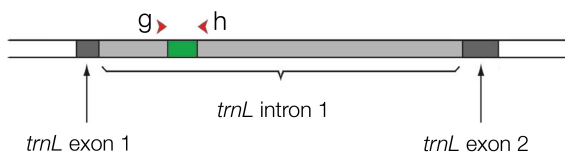


図 1: 本研究で用いた葉緑体遺伝子間領域

そこで、その外側にさらにプライマーを複数設計し、その組み合わせのうち藻類が増幅されないようなものを選び出した (trnL_1, trnL_2)。この新たなプライマーセットは、水生の維管束植物の DNA を大部分増幅でき、かつ、維管束植物の DNA 以外は増幅しにくいことが明らかとなった。

本研究では、宮城県内の 4 つの湖沼から採水を行い、上記で設計したプライマーを用いて増幅を行い、次世代型 DNA オートシーケンサーで配列を決定した。また、近年、維管束植物の環境 DNA 解析用に設計されたプライマーも用いて、PCR 増幅を行って配列情報を得た (Coghlan et al., 2020)。これは、Coghlan et al. (2020)のプライマー (orbcl2) と比較して、本研究で設計したプライマーの有効性を比較するためである。

得られたシーケンスデータは、すでに遺伝子バンクに登録されている配列ならびに本研究で新たに得られた配列と照合し、98%以上の一致度を基準として、属レベルで同定した。

表 1 に本研究によって、1 地点で得られた配列に関する結果を示す。Coghlan et al. (2020) と比較して、本研究で開発したプライマーの方が多数の維管束植物を検出できた。

	trnL_1	trnL_2	orbcl2
Acorus		○	
Carex	○		
Hydrilla		○	
Iris	○		○
Limnophila	○	○	
Nelumbo	○	○	○
水草		○	
Persicaria	○	○	
Phragmites	○	○	
Pontederia	○	○	
Potamogeton		○	
Trapa	○	○	○
Zizania		○	
Aeschynomene	○		○
Commelina	○	○	
Glycine		○	
他の陸上植物		○	
Hydrangea	○	○	
Sacciolepis		○	
Salix			○
Trifolium	○		
他の緑色植物			○
Chaetosphaeridium			○

表 1. 本研究で開発したプライマーと先行研究の比較

4 地点における結果では、すでにこれまでに記録されている水生維管束植物のかなりの種を検出できただけでなく、報告がなされていない種も検出することができた。すでに報告がありながら、検出できなかった種については、その存在量が小さい可能性、環境中に DNA が残りにくい性質がある可能性、すでにこれらの湖沼から消失している可能性があげられる。一方、新たに検出できた種については、これまでの調査で見過ごされてきた可能性、近年新たに分布した可能性が考えられる。維管束植物以外は、1 地点で藻類が 1 種確認されただけで、本研究で設計したプライマーが非常に効率よく水生維管束植物を検出できることが明らかとなった。

問題点としては、水生維管束植物以外の種が複数検出されたことである。この理由としては、湖沼近辺に生育する種の栄養体もしくは花粉などが湖沼に移動したものを検出した可能性と実験室内におけるコンタミネーションの可能性があげられる。環境 DNA 手法においては、コンタミネーションの問題は非常に深刻であり、実験においては、非常に慎重な操作が求められるといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujii, S., Yamashiro, T. and Maki, M.	4. 巻 70
2. 論文標題 Crassula peduncularis and C. saginoides (Crassulaceae), newly naturalized plants in Japan, and their genetic differences from C. aquatica.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Phytotaxonomica et Geobotanica	6. 最初と最後の頁 119-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18942/apg.201818	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 Fukatsu, M., Horie, S., Maki, M. and Dohzono I.	4. 巻 305
2. 論文標題 Hybridization and possible reproductive inference between native Oxalis corniculata and alien O. dillenii in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Systematics and Evolution	6. 最初と最後の頁 127-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00606-018-1557-5	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 Fujii, S., Tokuda, Y. and Maki, M.	4. 巻 71
2. 論文標題 Leaf morphology of Saxifraga fortunei var. obtusocuneata and var. suwoensis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Phytotaxonomica et Geobotanica	6. 最初と最後の頁 231-242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18942/apg.202001	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 Kyan Ryuuta, Kimura Takuma, Yamashiro Tadashi, Fujii Shinji, Sakaguchi Shota, Ito Motomi, Nagano Atsushi J., Kudoh Hiroshi, Maki Masayuki	4. 巻 126
2. 論文標題 Phylogeographic and demographic modeling analyses of the multiple origins of the rheophytic goldenrod Solidago yokusaiana Makino	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heredity	6. 最初と最後の頁 831 ~ 845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41437-021-00408-x	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 軒原開・藤井伸二・伊東拓朗・松尾歩・陶山佳久・牧雅之
2. 発表標題 日本産イバラモ属の分子系統解析－見過ごされてきた日本新産分類群についての検討－
3. 学会等名 日本植物分類学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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	藤井 伸二 (Fujii Shinji) (40228945)	人間環境大学・人間環境学部・准教授 (33936)	
研究分担者	森長 真一 (Morinaga Shinichi) (80568262)	日本大学・生物資源科学部・助教 (32665)	

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