

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11733

研究課題名(和文)環境DNAを用いた個体群遺伝構造解析と保全生態学への応用

研究課題名(英文) Analysis of population genetic structure by environmental DNA and its application to conservation biology

研究代表者

内井 喜美子 (Uchii, Kimiko)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：90469619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コイの交雑個体群をモデルとし、環境DNA分析に用いるための、核遺伝子座における在来遺伝子と外来遺伝子の頻度を定量するリアルタイムPCR法および超並列シーケンス法を開発した。開発した手法を用いた環境DNA分析を野外で実践し、野外交雑個体群について核遺伝子座における在来：外来アレル頻度を定量することに成功した。さらに環境DNA試料と同時に採集した卵の個体毎分析により得られたアレル頻度が環境DNA分析推定結果とよく一致することを実証し、環境DNA分析を用いた交雑個体群の遺伝構造解析が将来の生物多様性保全において有用なツールとなる可能性を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、環境DNA分析が、交雑個体群の遺伝的構造を評価する上で有用なツールとなることを、野外実践を通じて実証することができた。近縁種や同種外来集団の侵入によって引き起こされる在来種との交雑や遺伝子浸透は生物多様性保全において大きな脅威となっているが、本研究で開発したような核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による遺伝構造評価法が、その簡便性・迅速性を活かし、交雑や遺伝子浸透の現状把握やスクリーニングのために活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This project used hybridized populations of Japanese native and Eurasian introduced strains of common carp as a model system and developed environmental DNA (eDNA) methods for quantitative analysis of native and non-native allele frequencies at nuclear loci using real-time PCR and high-throughput sequencing. The developed eDNA methods were tested in the field and successfully quantified the native and non-native allele frequencies in the wild population. The estimation from the eDNA methods well corresponded to the results of DNA analyses of carp eggs collected simultaneously with the eDNA samples, indicating the high potential of the eDNA-based methods for rapid assessment of population genetic structure and hybridization.

研究分野：生態学

キーワード：環境DNA 交雑 保全 核DNAマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水や土壌といった環境媒体には、そこに棲む生物から放出された DNA が含まれており、「環境 DNA」と呼ばれる。2008 年以降、水を主とした環境媒体から直接抽出した DNA の情報を分析することで、そこにどんな生物が生息しているかを推定する手法が急速に発達してきた (Ficetola et al. 2008 Biol Lett)。環境 DNA 分析を用いれば、捕獲や目視探索といった時間と労力のかかる野外作業を行わずとも、採水するだけで、迅速に大量の生物分布情報を得ることができる。これまでに、外来種の早期発見 (Jerde et al. 2011 Cons Lett)、非侵襲的な希少種の分布調査 (Fukumoto et al. 2015 J Appl Ecol)、特定の分類群 (例えば魚類) の網羅的検出 (Miya et al. 2015 Roy Soc Open Sci) など様々なアプリケーションが示されており、生物分布を推定する上で有用なツールとして大きな注目を集めている。

環境 DNA 分析は種の判別に DNA 塩基配列情報を利用する。したがって、当然ながら、種だけでなく種内の遺伝的変異の検出と判別にも有効である。研究代表者は先行研究により、コイ (*Cyprinus carpio*) の日本在来系統 (在来遺伝子型) と、人為導入されたユーラシア大陸産の外来系統 (外来遺伝子型) を、一塩基多型 (SNP) に基づき判別することで、集団における両遺伝子型のアレル頻度を定量する環境 DNA 分析の開発に成功した (Uchii et al. 2016 Mol Ecol Res)。これにより、環境 DNA 分析において、変異の最小単位である SNP を高精度で判別できることが実証され、種内変異検出ツールとしての環境 DNA 分析の可能性が大きく広がった。

これまでの環境 DNA 研究のほぼ全ては、ミトコンドリア DNA (mtDNA) をマーカーとして用いてきた。それは上述の SNP 判別によって種内変異を検出した研究も例外ではない。ところが、mtDNA マーカーは細胞あたりのコピー数が多く検出感度に優れ、またデータベースが充実しているという大きな利点を持つ一方、種内変異を解析する上での短所も併せ持つ。すなわち、mtDNA は母系遺伝をするため、コイを例にとれば、在来系統のメスと外来系統のオスが交雑しても、mtDNA マーカーでは外来遺伝子の流入を検知できないのだ。したがって、より正確に集団の遺伝構造を推定するためには、雌雄の遺伝情報を反映する核 DNA マーカーを用いることが望ましい。そこで本研究では核 DNA 上の SNP マーカーに着目した。ゲノム上に最も豊富に存在する SNP は種内の遺伝的変異を見分ける有用な多型マーカーとなるばかりでなく、その検出のために短いターゲット配列を設計しやすく、劣化した環境 DNA へ適用できる可能性が高い。つまり、核 SNP マーカーの定量的解析を用いた環境 DNA 分析は、個体群遺伝構造や交雑の迅速な推定を可能とする有用な手法となることを見込まれた。

### 2. 研究の目的

本研究は、環境 DNA 分析を、同種外来集団の侵入による在来集団の遺伝的特徴の喪失や、個体群縮小による種内の遺伝的多様性の減少という生物多様性保全における重要な課題に取り組む上での有用なツールへと発展させることを目指し、日本におけるコイ交雑個体群をモデルとし、個体群遺伝構造解析のための核 SNP マーカーを用いた環境 DNA 手法の確立と、その野外実践による保全学的応用法の提示を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデル生物とマーカーの選定

モデル生物として用いたコイ (*Cyprinus carpio*) は、mtDNA 分子年代推定より、日本で独自に進化した日本在来系統とユーラシア大陸系統が数百万年前に分岐したと推定されている (Mabuchi et al. 2005 J Fish Biol)。本種については、核 DNA における 7 つの遺伝子座において、在来系統と外来系統を判別する SNP が報告されている (Mabuchi et al. 2012 Conserv Genet Res)。本研究では、これら既報の核 DNA 遺伝子座の中から c25 遺伝子座と c52 遺伝子座をマーカーとして選定した。

#### (2) TaqMan MGB プローブリアルタイム PCR を用いた核遺伝子座におけるアレル頻度推定法の開発

SNP に基づく遺伝子型判別と定量のため、c25 遺伝子座と c52 遺伝子座それぞれについて、一塩基の違いを高感度に識別できる TaqMan MGB プローブを用いたリアルタイム PCR 法を開発した。各遺伝子座の 1 つの SNP 部位を標的とし、在来 SNP と外来 SNP それぞれに特異的な TaqMan MGB プローブと、プローブ配列を含む DNA 断片を増幅するコイ特異的なプライマーセットを設計した。在来遺伝子と外来遺伝子それぞれのプローブを異なる蛍光色素で標識し、二つのプローブを同時に用いたリアルタイム PCR を行うことにより、プローブごとに Ct 値を得た。この手法で在来 : 外来遺伝子頻度を正しく定量できるかを確かめるため、コイの在来遺伝子と外来遺伝子の標準 DNA を 15:1, 7:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:7, 1:15 の割合で混合した DNA 溶液をプレートとしてリアルタイム PCR を実施し、在来 : 外来 DNA の割合とプローブ間の Ct 値の差 (Ct) の間に信頼性の高い検量線を作成できるか検討した。

### (3) 超並列シーケンスを用いた核遺伝子座におけるアレル頻度推定法の開発

上述の TaqMan MGB プローブリアルタイム PCR 法では、プローブにより、それぞれの遺伝子座について 1 つの SNP のみに基づいてアレル頻度が推定される。一方、超並列シーケンス (HTS) を用いれば、対象とする核遺伝子座の塩基配列に基づいて在来遺伝子と外来遺伝子が判別される。そこで、HTS を用いた在来：外来アレル頻度の定量法の開発を行った。まず、c25 遺伝子座と c52 遺伝子座について、コイ DNA を特異的に増幅するプライマーペアを、2 箇所の SNP 部位が含まれるように設計した。コイ特異的プライマー配列の 5' 末端側に 2nd PCR プライマー相補配列とシーケンシングプライマー配列を付加し、このプライマーペアを用い 1st PCR を行った。1st PCR 産物を磁性ビーズを用いて精製し、精製済 1st PCR 産物をテンプレートとして、Nextera XT Index Kit v2 (illumina) を用いて 2nd PCR を行うことで、サンプル毎に固有のインデックス配列を付加した。2nd PCR 産物を E-gel システム (Thermo Fisher Scientific) を用いて電気泳動し、ターゲットバンドを回収した後、Qubit 4 Fluorometer を用いて DNA 濃度を測定し、HTS に供するライブラリを調整した。HTS は iSeq (illumina) を用いて行った。HTS を用いた手法によりアレル頻度が正しく推定されるかを検証するために、コイの在来遺伝子と外来遺伝子の標準 DNA を 15:1, 7:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:7, 1:15 の割合で混合した DNA 溶液を 1st PCR のテンプレートとして用い、在来：外来 DNA の割合と HTS 解析により得られた在来：外来アレル頻度との関係を回帰分析により検証した。

### (4) 野外実践

選定した核 DNA マーカーは、ゲノム上に 1 セットのみが存在するシングルコピー DNA であるため、従来の mtDNA マーカーと比較して環境中における濃度が低いことが予想された。そこで核シングルコピー DNA が実際にどの程度の濃度で環境中に存在するかを把握するために、2017 年 3 月から 2018 年 4 月の間に琵琶湖に接続する伊庭内湖および西の湖において採取された環境 DNA 試料を用い、コイの mtDNA (マーカー: シトクロム *b* 遺伝子) と核シングルコピー DNA (マーカー: グルコキナーゼ遺伝子) の濃度をリアルタイム PCR により定量した。その結果、環境水中の核シングルコピー DNA 濃度は、mtDNA 濃度の 1/100 倍ほどと非常に希薄であることが明らかとなった。とくに 6 月から翌 3 月にかけての核シングルコピー DNA 濃度は、ほとんどの試料において定量的解析を実施するレベルに達しなかった。一方、4 月に採取した環境 DNA 試料の中には、核シングルコピー DNA を 100 (コピー/ $\mu$ L) 以上の濃度で含むものが多くあった。伊庭内湖および西の湖はコイの重要な繁殖地であるが、繁殖のために集まったコイから放出された粘液、細胞片、精子などに由来し、濃度の高い環境 DNA 試料が得られたと考えられた。

そこで、核遺伝子座におけるアレル頻度推定法の野外実践に際しては、繁殖地である西の湖において、コイの繁殖期に合わせて環境 DNA 試料を採取するという方策を取った。また環境 DNA 分析結果の妥当性を検証するため、環境 DNA 試料採取と同時に採集した卵の個体毎遺伝子解析を実施し、環境 DNA 分析と卵分析により推定されたアレル頻度の比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) TaqMan MGB プローブリアルタイム PCR を用いた核遺伝子座におけるアレル頻度推定法の確立

図 1 に、c25 遺伝子座と c52 遺伝子座のそれぞれについて設計した TaqMan MGB プローブリアルタイム PCR において、在来 DNA と外来 DNA の比率 (在来 DNA / 外来 DNA) と在来プローブと外来プローブの Ct 値の差 ( $C_t$ ) の間に得られた検量線を示す。どちらの遺伝子座についても、テンプレート DNA 濃度の大小に関わらず信頼性の高い ( $R^2 > 0.9$ ) 検量線が描けたことより、開発した TaqMan MGB プローブリアルタイム PCR により、SNP に基づいて在来：外来遺伝子頻度を正しく定量できることが示された。

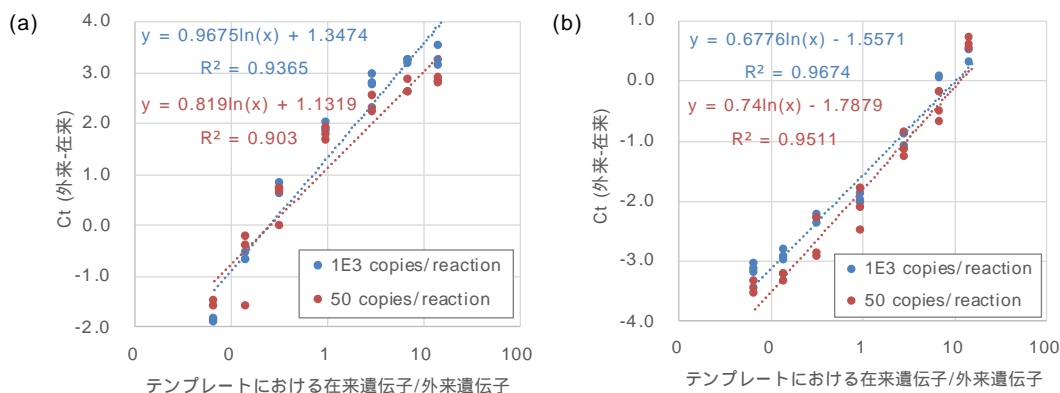


図 1. TaqMan MGB プローブリアルタイム PCR において、テンプレート中の在来・外来遺伝子の比率と  $C_t$  値の間で得られた検量線。(a)に c25 遺伝子座の、(b)に c52 遺伝子座の結果を示す。

### (2) 超並列シーケンスを用いた核遺伝子座におけるアレル頻度推定法の確立

図 2 に、1st PCR のテンプレートとして用いた在来 DNA・外来 DNA 混合液における在来 DNA の割合と、HTS 解析より出力された塩基配列データにおける在来遺伝子の割合の関係を示す。両者の間には有意な強い正の関係が検出され ( $R^2 > 0.98$ ,  $P < 0.001$ )、また得られた回帰直線は 1 に近い傾きと 0 に近い切片を持った。つまり両者の間にはほぼ 1:1 の関係が認められた。したがって、本手法により、在来：外来遺伝子のアレル頻度を正確に定量できることが示された。

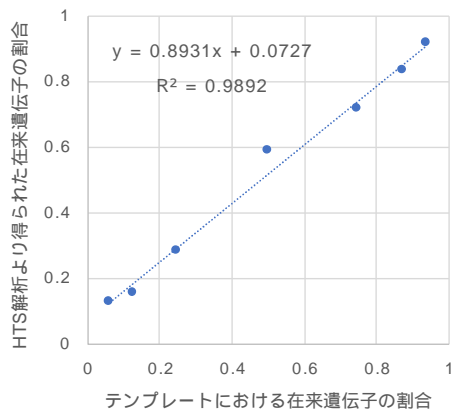


図 2. c25 遺伝子座を標的とした HTS 解析における、1st PCR テンプレート中の在来遺伝子の割合と HTS より出力された塩基配列データにおける在来遺伝子の割合の関係

### (3) 環境 DNA 分析を用いた核遺伝子座におけるアレル頻度推定

図 2 に、本研究で開発した TaqMan MGB プロブリアルタイム PCR 法および HTS 法を用いた環境 DNA 分析より推定された西の湖コイ個体群における在来：外来遺伝子頻度を、卵の個体毎分析結果と共に示す。在来遺伝子頻度は、TaqMan MGB プロブリアルタイム PCR 法で 30%、HTS 法で 33% となり、両者はよく一致した。また卵分析における在来遺伝子頻度は 40% であったことから、環境 DNA 分析による推定結果は実際の遺伝子頻度をよく反映することが実証された。

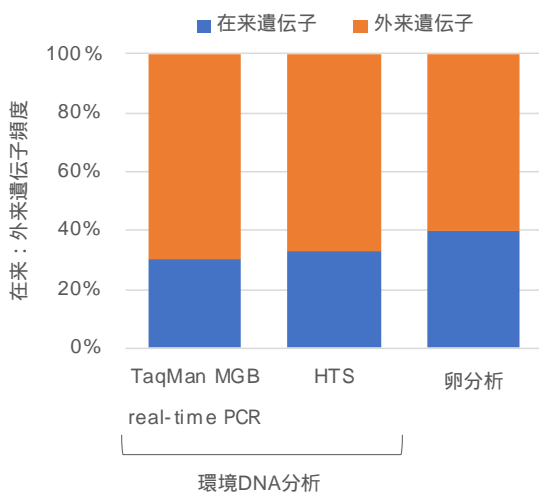


図 3. 西の湖コイ個体群について環境 DNA 分析により推定された c25 遺伝子座における在来：外来遺伝子頻度。卵の個体毎分析より得られた在来：外来遺伝子頻度を共に示す。

本研究では、環境 DNA 分析が、交雑個体群の遺伝的構造を評価する上で有用なツールとなることを、野外実践を通じて実証することができた。近縁種や同種外来集団の侵入によって引き起こされる在来種との交雑や遺伝子浸透は生物多様性保全において大きな脅威となっているが、本研究で開発した核 DNA マーカーを用いた環境 DNA 分析による遺伝構造評価法が、その簡便性・迅速性を活かし、交雑・遺伝子浸透の現状把握やスクリーニングのために活用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Doi H, Minamoto T, Takahara T, Tsuji S, Uchii K, Yamamoto S, Katano I, Yamanaka H	4. 巻 36
2. 論文標題 Compilation of real-time PCR conditions toward the standardization of environmental DNA methods	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ecological Research	6. 最初と最後の頁 379 ~ 388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1440-1703.12217	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 Minamoto T, Miya M, Sado T, Seino S, Doi H, Kondoh M, Nakamura K, Takahara T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Iwasaki W, Kasai A, Masuda R, Uchii K	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 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 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 内井 喜美子
2. 発表標題 核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による交雑レベルの推定
3. 学会等名 日本生態学会第67回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内井喜美子, 土居秀幸, 山中裕樹, 源利文
2. 発表標題 SNPマーカーを用いた環境DNA分析による遺伝変異の検出
3. 学会等名 日本生態学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Uchii K, Doi H, Yamanaka H, Minamoto T
2. 発表標題 The use of SNP markers in environmental DNA to detect intraspecific genetic variation
3. 学会等名 103th ESA Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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

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