

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289172

研究課題名(和文)大規模DNA情報を活用した正確かつ迅速な種多様性評価技術の開発

研究課題名(英文)Development of DNA-based Technology for Accurate and Rapid Assessment of Species Diversity

研究代表者

渡辺 幸三 (Watanabe, Kozo)

愛媛大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：80634435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：愛媛県重信川の10地点に生息する河川底生動物群集を対象に、大量のDNA塩基配列を一度に解読する次世代シーケンシング解析を活用し、迅速に種数を評価した。従来の顕微鏡を使った形態同定の結果、採取された8,921個体から64分類群が発見された。それに対して、ミトコンドリアDNAのCOI領域(658塩基長)を対象とした次世代シーケンシング解析で得られた165,508配列の内、DNAバーコーディングにより39,337配列から成る128種が同定された。また、各分類群における個体数とDNA配列数に正の相関が見られた。またDNA種分類法(PTPモデル)を適用した結果、298種の存在が推定された。

研究成果の概要(英文)：Using high-throughput Next-generation Sequencing (NGS), we rapidly assessed species richness of stream macroinvertebrate communities among 10 sites in the Shigenobu River catchment in Ehime Prefecture Japan. A conventional morphological taxonomic identification found 64 taxa among 8921 individuals collected from the catchment. Our NGS analysis produced 165,508 reads of mitochondrial COI amplicons. Based on DNA barcoding analysis of the NGS data, 39,337 was hit and 128 species were identified. Further, we found a significant positive correlation between numbers of sequence reads and morphology-based abundance among 33 taxonomic groups (1 class, 3 orders, and 30 families). We also applied DNA taxonomy analysis using PTP model, and the presence of 298 species in the catchment was estimated.

研究分野：応用生態工学

キーワード：DNA種分類 次世代シーケンシング 底生動物 河川 種多様性 系統発生

1. 研究開始当初の背景

河川生態系は治水・利水活動に伴う水量減少、水質悪化、河道改変等の影響を受けて、生物多様性が最も低下している生態系の一つである。近年、生態系保全への社会的要請を受けて、河川水辺の国勢調査や環境アセスメントなど、生物モニタリングが法的根拠に基づいて行われるようになった。生態系を評価する指標の中で、種多様性(種数)は最も基本的な指標となるが、実は下に説明するように、この基本的な生態系情報が適切に評価されていないのが現状である。

まず一番の問題は、河川に生息する水生昆虫(カゲロウ、トビケラ、ホタル等)をはじめとする小動物群の種分類の整備が遅れている点である。このため種レベルで形態同定できず、属や科レベルの荒い記載に止まる分類群(未記載種)が多く残され、種数を正確に評価できない場合が多い。また、従来の評価で行われる顕微鏡観察に基づく形態種同定は、作業時間の長さ(=人件費の増大)や種の誤判定リスクなどの技術的問題を抱える。さらに、この作業には熟練した専門的技術が必要であり、評価事業者(例、コンサルタント会社)の技術レベルの差を反映してデータの質にムラが出ることも、全国均一で大規模な生態系評価を行う際のバイアス要因となる。

これら問題を解決するために、バイオインフォマティクス分野で近年着目されている DNA 塩基配列に基づく種分類(DNA 種分類法)が有効と考えられる。従来、DNA 塩基配列は種間で連続的に変異するため、種間の明確な境界を見いだすのは困難とされてきた。しかし、進化論的アプローチでこの問題を解決する手法を申請者の共同研究グループが開発しつつある。これは進化時間と比例している DNA 領域の塩基配列に基づいて、DNA 系統間の進化関係を再現し、進化・絶滅モデルを適用して種の境界を決める手法である。

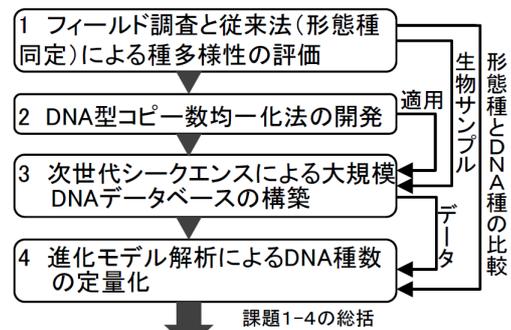
2. 研究の目的

本研究の目的は、顕微鏡観察に替わる手段として DNA 分析を活用することで、正確・迅速・安価に種多様性を評価する新技術を開発することである。この技術は、進化理論を背景として種を新たに定義する DNA 種分類法と次世代 DNA シークエンシング分析を組み合わせることで実現される。流域や地域などの広域スケールから集めた膨大な生物群集標本に含まれる種数を一気に定量化する革新的技術となることが期待される。

3. 研究の方法

本研究は4つの研究課題から構成される。課題1では、重信川流域(愛媛県)等で河川

生物群集を採取し、最終的に評価される DNA 種数との比較のため、従来法(顕微鏡観察)により分類群数を評価する。課題2では、DNA 種数の評価精度を高める群集 DNA サンプルの前処理法である DNA 型コピー数平準化法を開発する。課題3では、上記前処理を施したサンプルの次世代 DNA シークエンシング解析を行い、流域全体の全種・全遺伝型を網羅する大規模 DNA データベースを高速で作成する。課題4では、作成されたデータベースを進化モデルに基づく DNA 種分類法に適用し、流域内の全 DNA 種数を定量化する。また、流域、流程、蛇行区間スケールで本手法の適用性を検討し、適用可能な空間規模やサンプル数等の限界条件も明らかにする。



迅速・正確・安価な種多様性評価法が提案される

図1 本研究を構成する研究課題

4. 研究成果

課題1「フィールド調査および従来法(形態種同定)による種多様性の評価」

重信川流域(愛媛県)の源流から下流に分布する10リーチにおいて、種多様性評価に用いる底生動物群集のサンプリングと環境調査を実施した。DNA 塩基配列情報に基づく種数と比較するために、顕微鏡観察に基づく形態学的同定により形態学的種(リンネ種)の分類群数も評価した。全リーチから採取された8921個体の形態学的同定の結果、64分類群(1綱, 4目, 2科, 4亜科, 16属, 37種)が確認された。個体数が最も多い形態分類群は3,144個体のコスリカ亜科だった。また、窒素・リンなどの水質、水温、流速、水深等の底生動物の生息に関する環境項目も評価した。

課題2「DNA 型コピー数平準化法の開発」

流域全体の雑多な種が混在する DNA サンプルから検出される DNA 型の種類が多いほど、種多様性が高く評価されやすい。この群集 DNA では、細胞数が多い体サイズが大きい種や群集内で優占する種などの一部の種に由来する DNA 型のコピー数が相対的に高まることが予想される。その結果、希少種や微小サ

イズ種の存在を見逃し、実際よりも低い種数として過少評価する恐れがある。課題2では、この問題を解決するDNA型コピー数平準化法を開発した。

群集DNAサンプル(二本鎖DNA)を一本鎖に熱融解し、適度な温度で保温すると、多コピー由来の一本鎖は単コピーのものよりも接触確率が高いため、速い速度で二本鎖に会合する。この状態から二本鎖画分を除けば、コピー数の平準化がなされることが考えられる。多くの一本鎖DNAが再会合し、わずかの一本鎖DNAが残存した状態がコピー数平準化に最適な会合条件と考え、最適な再会合の温度と時間の条件を実験的に検索した。その結果、70℃で1分間で再会合した後に、それ以上の再会合反応を停止させるために氷上で急冷する操作が最適であることを見出した。この条件下、群集アンプリコンの熱変性-再会合処理を行い、処理を行わない系も比較対象として準備をした。そして、最適再会合条件を平準化効果を評価するために、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)を行い、検出されるバンドの光強度から相対的なバンド数の割合を求めた。仮想群集サンプル(非平準化)と最適再会合条件サンプル(平準化)で比較した結果、熱変性-再会合処理後に割合が大きく低下し、検出されなかったバンドが確認され、平準化効果を確認することが出来なかった。しかし、熱変性-再会合処理後に割合が増加したバンドも見られたことから、再会合条件を再検討することで平準化効果を得ることが期待される結果ともなった。熱変性-再会合処理後に割合を低下させたバンドは他配列との類似度が高く、再会合反応時にヘテロ2重鎖を形成してしまい、平準化効果を得ることが出来なかったと考えられるので、ヘテロ2重鎖を考慮した再会合条件を検討する必要がある。

課題3「次世代シーケンサーによる大規模DNAデータベースの構築」

課題1で採取した群集サンプルを使って、重信川流域(愛媛県)に生息する水生昆虫の種数を評価した。次世代シーケンサー-454GS FLX(Roche Diagnostics)を用いて5,527ハプロタイプからなる165,508配列(平均塩基長=約330塩基)が得られた。その内BLASTによるDNAバーコーディングで同定されたのは39,337配列で132種が特定された。最も多く検出された科は43種(23,137配列)のユスリカ科だった。形態同定された34分類群(1綱,3目,30科)の内、DNAバーコーディングで同定されたのは17分類群だった。各分類群における個体数とDNA配列数に正の相関が見られた(図2)。また、スイスの流域から採取した底生動物群集サンプルも同様にメタバーコーディングを行った。7,369個体,27形態分類群(23科+4亜科)を次世代シーケンサーをMiSeqTM(Illumina)で

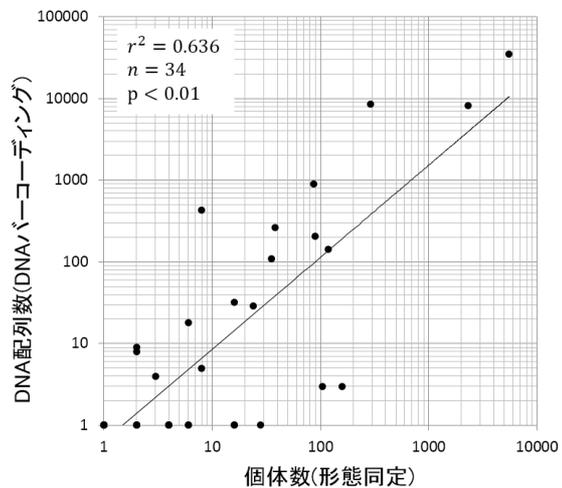


図2 愛媛県重信川の採取された各分類群の個体数とDNA配列数の正の相関

解析した結果、計5,810,864配列が得られた。BLASTによるDNAバーコーディングの結果、24種が検索された。形態同定された27形態分類群のうち、DNAバーコーディングで検出された形態分類群は10分類群(8科と2亜科)であった。これら10形態分類群の平均個体数(=665.1個体数/分類群)は、検出されなかった14形態分類群の平均個体数(=42.2個体数/分類群)よりも有意に高かった(Studentのt検定, P<0.001)。以上の重信川およびスイスの底生動物群集のメタバーコーディングの結果から、群集サンプルに占める個体数の割合が高い形態分類群に由来する配列は検出されやすいが、個体数が少ないマイナーな分類群は検出されることがわかった。

課題4「進化モデル解析によるDNA種数の定量化」

重信川流域(愛媛県)の底生動物群集サンプルの次世代シーケンサー解析で得られた5,527ハプロタイプの165,508配列を使ったDNA種分類を行った。Operational Taxonomic Unit(OTU)法によって204個のOUT種が得られた。進化理論に基づいて種数を推定するPoisson Tree Processes(PTP)法による種数の定量化も行った。PTP法は種間の置換数が種内より著しく大きいという仮定により、分岐率が著しく変化する遷移点から種の境界を推定する方法である。PTP解析の結果、DNAバーコーディングの132種やOTU法の204クラスターよりも多い298種が推定された(表1)。DNA種数が多かったのは地点1,2と6だった。また、プサン大学との共同研究により、ニューラルネットワークの一種である自己組織化マップ(SOM)を用いたアプローチで、集団遺伝構造と共に、河川の水質・物理環境の影響を受けている遺伝子集団を解明することができた。

PTP法によって境界を推定したが、PTP法による種分類が正確に行えない場合があるの

で、PTP の結果の解釈には注意をする必要がある。種分類の精度を高めるために、DNA 配列を高い閾値（例えば 99%）でクラスタリングし、同じクラスターに分類された配列は同じ種由来とする対策が有効かもしれない。種ごとに種内変異の大きさが違うことから OTU 法は進化的に正しくないとしていたが、1% の置換は DNA 解読のミスもしくは種内変異とすることで、進化距離に近い配列が多くなりすぎることを避け、PTP 法の正確性の向上に繋がると考える。

表 1 愛媛県重信川の 10 地点で底生動物群集の形態学的に同定された分類群数、DNA バーコーディング、Operational Taxonomic Unit (OTU) 法、Poisson Tree Processes (PTP) 法によって評価された分類群数

地点	分類群数			
	形態分類群	バーコーディング	OTU	PTP
St. 1	9	13	34	120
St. 2	11	26	53	145
St. 3	15	32	58	75
St. 4	18	28	38	34
St. 5	22	47	60	92
St. 6	22	56	75	122
St. 7	29	56	70	48
St. 8	36	50	68	50
St. 9	29	43	55	42
St. 10	32	50	56	52
合計	64	132	204	298

また、上記の研究成果を報告する場として、以下二つの研究集会を愛媛大学で開催した。

1) H25 年 1 月 31 日に、本科研プロジェクトを中心とする研究グループが愛媛大学に集まり、一般公開の形で「流域と生態系ワークショップ 2014- 水文生態学、生息場学、分子生物学の新しい研究アプローチ-」を開催した。当日は 9 件の研究発表を行った。

2) H26 年 10 月 31 日に、国際ワークショップ「River Ecosystem and Environment」を愛媛大学で一般公開の形で開催した。当日はスイスから招聘した研究者による基調講演と共に、5 件の研究発表を行い、学生や若手研究者を含む 33 名が集まった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Bin Li, Kozo Watanabe, Dong-Hwan

Kim, Sang-Bin Lee, Muyoung Heo, Heui-Soo Kim and Tae-Soo Chon, Identification of Outlier Loci Responding to Anthropogenic and Natural Selection Pressure in Stream Insects Based on Self-Organizing Map, *Water*, 8(5), 188, 2016, DOI: 10.3390/w8050188, 査読有

2. Kei Wakimura, Yasuhiro Takemon, Atsushi Takayanagi, Shin-ichi Ishiwata, Kozo Watanabe, Kazumi Tanida, Nobuyoshi Shimizu, Mikio Kato, Characterization of genes for histone H3, 18S rRNA, and cytochrome oxidase subunit I of East Asian mayflies (Ephemeroptera). *DNA Barcodes*, 4, 1-25, 2016, DOI: 10.1515/dna-2016-0001, 査読有
3. 糠澤桂, 風間聡, 渡辺幸三, 水文モデルと底生動物の生息場モデルを用いた河川健全度パターンの評価, *土木学会論文集 B1(水工学)*, Vol.72, No.4, I_433-I_438, 2016, 査読有
4. 八重樫咲子, 不破直人, 山崎久美子, 三宅洋, 渡辺幸三, ダムおよび瀬切れによる河川分断化がエルモンヒラタカゲロウの地域間交流に及ぼす影響の遺伝的評価, *土木学会論文集 G(環境)*, Vol.71, No.7, III_115-III_122, 2015, 査読有
5. Kei Nukazawa, So Kazama, and Kozo Watanabe, A Hydrothermal Simulation Approach to Modelling Spatial Patterns of Adaptive Genetic Variation in Four Stream Insects, *Journal of Biogeography*, 42, 103–113, 2015, DOI: 10.1111/jbi.12392, 査読有
6. Kozo Watanabe, Sakiko Yaegashi, Hiro Tomozawa, Shunichi Koshimura, and Tatsuo Omura, Effects on River Macroinvertebrate Communities of Tsunami Propagation after the 2011 Great East Japan Earthquake, *Freshwater Biology*, Vol. 59, No. 7, 1474–1483, 2014, DOI: 10.1111/fwb.12359, 査読有
7. Kozo Watanabe, So Kazama, Tatsuo Omura, and Michael T Monaghan, Adaptive Genetic Divergence along Narrow Environmental Gradients in Four Stream Insects, *PLoS ONE*, 9(3), e93055, 2014, 査読有
8. Sakiko Yaegashi, Kozo Watanabe, Michael T Monaghan, and Tatsuo Omura, Inferring Fine-scale Dispersal in the Caddisfly *Stenopsyche marmorata* (Trichoptera: Stenopsychidae) Using Spatial Autocorrelation of Microsatellite Markers, *Freshwater Science*, Vol. 33, No. 1, 172-180, 2014, 査読有

9. Kei Nukazawa, So Kazama, Akihiko Takase, Kozo Watanabe, A hydrological approach to revealing relationship between physical habitat and genetic diversity of stream invertebrates, Proceedings of the 19th Congress of the Asia and Pacific Division of the International Association for Hydro-Environment Engineering and Research (IAHR-APD), 9, CDROM, 2014, 査読有
 10. 平祥和, 竹門康弘, 谷田一三, 脇村圭, 加藤幹男, 紀伊半島におけるコイズミエグリトビケラ *Neophylax koizumii* (Iwata) (トビケラ目, クロツツトビケラ科) の新産地, 陸水学雑誌, 75, 173-177, 2014, 査読有
 11. 高橋真司, 竹門康弘, 大村達夫, 渡辺幸三, ダム下流河川の流水性・止水性ハビタット間に見られる微粒状有機物の起源の違い, 土木学会論文集 G (環境), Vol.69, No.7, III.547-III.555, 2013, 査読有
 12. Kristin Scharnweber, Kozo Watanabe, Jari Syvaranta, Thomas Wanke, Michael T Monaghan and Thomas Mehner, Effects of predation pressure and resource use on morphological divergence in omnivorous prey fish, BMC Evolutionary Biology, Vol.13, 132, 2013, 査読有
 13. Kawanishi R, M Inoue, R Dohi, A Fujii and Y Miyake, The role of the hyporheic zone for a benthic fish in an intermittent river: a refuge, not a graveyard, Aquatic Sciences, 75(3), 425-431, 2013, DOI: 10.1007/s00027-013-0289-4, 査読有
 14. 三宅洋, 荻原啓司, 金沢康史, 集水域の土地利用および河畔林伐採が山地河川の刈取食者に及ぼす影響, 土木学会論文集 G (環境), Vol.69, No.2, 74-83, 2013, 査読有
- 〔学会発表〕(計 71 件)
1. D. Muranyi, W.H. Li, M. Gamboa, K. Watanabe, Different ways of sperm transfer among the Capniidae (plecoptera), and its importance in the generic system of the family, The 3rd Symposium of Benthological Society of Asia, Vladivostok (Rossia), 2016. 8.27-29
 2. David Muranyi, Maribet Gamboa, Jeong Mi Hwang, Yeon Jae Bae, Kozo Watanabe, Systematic revision of the Asian Capniidae (Plecoptera), Annual Meeting of the Entomological Society of Korea, Kyungpook National University, Daegu (Korea), 2016.05.12
 3. Kozo Watanabe, Advancement of genome analysis in aquatic insects, Seminar for Genetics-Ecology-Evolution-Modeling, Busan (Korea), 2016. 3.19
 4. Kozo Watanabe, Climate change detected by molecular ecology and evolution, Seminar for Genetics-Ecology-Evolution-Modeling, Busan (Korea), 2016. 3.18
 5. 八重樫咲子, 戸高涼太郎, 三宅洋, 渡辺幸三, 次世代シーケンシングを用いた河川水生昆虫の遺伝的多様性の評価, 第 50 回日本水環境学会年会, アスティとくしま (徳島県・徳島市), 2016. 3.16
 6. 脇村圭, 竹門康弘, 吉田徹彦, 工藤純, 稲井公二, 渡辺幸三, 加藤幹男, 大規模 DNA 配列データ解析に資する水生昆虫種判別マーカーデータベースの構築と解析, 日本陸水学会近畿支部会第 27 回研究発表会, 兵庫県立大学 (兵庫県・姫路市) 2016.3.6 .
 7. Zaki Sharawy, Eman Abbas, Hamdy Ahmed, Rania Khedr, Khaled Geba, Mikio Kato, DNA barcoding detects the presence of *Metapenaeus monoceros* in the Egyptian coasts of the Mediterranean and Red Seas. Aquaculture 2016, World Aquaculture Society Meeting, Las Vegas (USA), 2016.02.22 - 26.
 8. Mikio Kato, An Approach to discrimination between wild populations (amphidromous migratory populations) and released hatchery populations of Japanese sweetfish (*Ayu*), *Plecoglossus altivelis*, based on mitochondrial DNA sequences, Fifth International Conference on Aquatic Resources: ICAR-15 "Challenges, Development and Sustainability", Alexandria (Egypt), 2015.11.29-30.
 9. 福田航平, 加藤幹男, 八重樫咲子, 渡辺幸三, 塩基配列コピー数標準化法によるメタゲノムを用いた種多様性評価の改善, 応用生態工学会第 19 回大会, 日本大学 (福島県・郡山市), 2015. 9.10
 10. 泉昂佑, Maribet Gamboa, 三宅洋, 渡辺幸三, 次世代シーケンシングと DNA 種分類法を用いた河川底生動物群集の種多様性評価, 応用生態工学会第 19 回大会, 日本大学 (福島県・郡山市), 2015. 9.10
 11. Sakiko Yaegashi, Shunsuke Kondoh, Kozo Watanabe, Species diversity of Trichoptera in a semi-natural Tagliament River (Italy) revealed by Poisson Tree Processes model, The 5th China-Japan-Korea Colloquium on Mathematical Biology, 同志社大学 (京都府・京都市), 2015. 8.27

12. Kozo Watanabe, Kei Nukazawa, Aita S, Kazama So, Estimating periphyton dynamics in a temperate catchment using a hydrological simulation, 26th International Union of Geodesy and Geophysics (IUGG) general assembly, Prague (Czech Republic), 2015. 6.22
 13. 泉昂佑, Maribet Gamboa, 三宅洋, 渡辺幸三, 次世代 DNA シークエンシングと DNA 種分類法を用いた河川底生動物群集の種多様性評価技術の開発, 土木学会四国支部第 21 回技術研究発表会, 香川大学 (香川県・高松市), 2015. 5.23
 14. 福田航平, 加藤幹男, 渡辺幸三, 次世代 DNA 解析による種多様性評価の正確性向上を目的とした DNA 型コピー数標準化法の開発, 土木学会四国支部第 21 回技術研究発表会, 香川大学 (香川県・高松市), 2015. 5.23
 15. Maribet Gamboa, Kozo Watanabe, New adaptive perspective in insects, International symposium for frontier of Bioinformatics, 東京工業大学 (大田区・東京都), 2015. 4.16
 16. Sakiko Yaegashi, Kozo Watanabe, Michael T Monaghan, Tatsuo Omura, Gene flow and genetic structure in a stream caddisfly *stenopsyche marmorata* revealed by both nucleic and mitochondrial DNA, 2014 ASLO Aquatic Sciences Meeting, Granada (Spain), 2015. 2.25
 17. Kohsuke Izumi, Maribet Gamboa, Yo Miyake, Kozo Watanabe, Next-Generation Sequencing Based Assessment of Species Diversity of Stream Invertebrate Community, International Workshop on River Ecology and Environment, 愛媛大学 (愛媛県・松山市), 2014. 10.31
 18. Nukazawa Kei, Kazama So, Takase Akihiko, Watanabe Kozo, A hydrological approach to revealing relationship between physical habitat and genetic diversity of stream invertebrates, 19th Congress of the Asia and Pacific Division of the International Association for Hydro-Environment Engineering and Research (IAHR-APD), Hanoi (Vietnam), 2014. 9.23
 19. Bin Li, Kozo Watanabe, Heui-Soo Kim, Tae-Soo Chon, Applying self-organizing map in AFLP data analysis in aquatic insects, The 2nd Symposium of Benthological Society of Asia, Busan (Korea), 2014. 6.6
 20. Shunsuke Kondoh, Xavier-Francois Garcia, Yasuhiro Takemon, Klement Tockner, Michael T Monaghan, Kozo Watanabe, DNA Taxonomy Reveals Species Diversity of Chironomidae (Diptera) in a Semi-natural River in the Alps, The 2nd Symposium of Benthological Society of Asia, Busan (Korea), 2014. 6.6
 21. Kozo Watanabe, Kohsuke Izumi, Maribet Gamboa, Yo Miyake, DNA-based assessment of species richness of stream macroinvertebrate community using next generation sequencing, The 2nd Symposium of Benthological Society of Asia, Busan (Korea), 2014. 6.6
 22. 福田航平, 加藤幹男, 渡辺幸三, 次世代 DNA 解析を用いた種多様性評価を正確にする塩基配列コピー数標準化法の開発, 土木学会四国支部第 20 回技術研究発表会, 徳島大学 (徳島県・徳島市), 2014. 5.31
 23. 泉昂佑, Maribet Gamboa, 三宅洋, 渡辺幸三, 次世代 DNA シークエンシングを用いた河川底生動物群集の種多様性評価技術の開発, 土木学会四国支部第 20 回技術研究発表会, 徳島大学 (徳島県・徳島市), 2014. 5.31
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
ホームページ等 なし
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
渡辺 幸三 (WATANABE, Kozo)
愛媛大学・理工学研究科・准教授
研究者番号 : 80634435
- (2) 研究分担者
大村 達夫 (OMURA, Tatsuo)
東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授
研究者番号 : 30111248
- 加藤 幹男 (KATO, Mikio)
大阪府立大学・高等教育推進機構・教授
研究者番号 : 30244499
- 三宅 洋 (MIYAKE, Yo)
愛媛大学・理工学研究科・准教授
研究者番号 : 90345801
- (3) 連携研究者
なし