

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34316

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840144

研究課題名(和文)環境DNA分析によるシクリッド魚類群集の多様性把握

研究課題名(英文) Studying diversity of cichlid fish community using environmental DNA analysis

研究代表者

丸山 敦 (Maruyama, Atsushi)

龍谷大学・理工学部・講師

研究者番号：70368033

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)：環境DNA技術を適応した、マラウイ湖シクリッド魚類群集の多様性把握手法の確立を目指した。研究開始早々に同所的に生息する103魚種を入手し、D-loop領域およびITS領域の配列情報を得た。D-loop領域を対象にしたユニバーサルな環境DNAプライマーを作成し、魚類由来の環境DNA採集方法を確立した。シクリッド魚類の組成や多様性が異なるマラウイ湖6地域12地点で採水・濾過を行い、DNA抽出を終えた。D-loop領域のDNA配列における種間変異が想定外に乏しかったため、ITS領域を対象としたプライマーの再設計が進行中である。

研究成果の概要(英文)：The environmental DNA technique was applied to cichlid fish community in Lake Malawi to establish a method for measuring diversity of the community. Sequence data of D-loop and ITS regions were collected from 103 sympatric fish species at the beginning of the study period. Using the sequence data, an eDNA primer targeting D-loop region of cichlids was designed, with which the efficient sampling methods specific to the focal lake was established. Water samples were collected from 12 sites of 6 district of the lake, which differ from each other in cichlid diversity. As interspecific variation in DNA sequence was found to be so poor, I am now trying to design another universal primers that amplify ITS region, with which cichlid diversity will be estimated.

研究分野：魚類生態学

キーワード：環境DNA シクリッド魚類 マラウイ湖 ITS D-loop 定量PCR

1. 研究開始当初の背景

ある地域の自然を理解する上で、そこに生息する生物の種構成を知ることは、最も手取り早い方法のように思われる。ところが現場の生態学者にとっては、特定地域の正確な種リストを短期間のうちに示すことはむしろ非常に困難な課題である。なぜならば、生物は種それぞれに集中分布する。多かれ少なかれ移動もする。個体数の変動も考慮されなければならない。採捕・発見効率もまちまちである。実際、一部の大型植物種を除けば、狩猟・漁獲統計や標識採捕法、区画採取法などに依存する従来の情報は、その信憑性を疑われながら消去法的に使われてきた面がある。本研究は、このように困難な生物多様性の推定に関して、特に魚類に注目し、水中に浮遊する魚類由来の DNA 断片 (環境 DNA) の配列情報から、その水域に生息する魚種組成を推定しようとするものである。すなわち、水を分析するだけでその場所の生息魚類の多様性が把握できるようにすることが本申請の最終到達目標であった。

環境 DNA 分析による生物組成の推定は、小さ過ぎて従来法で評価しようとするのがあかない微生物群集の組成を把握するために発展してきた。先行研究では、逆転の発想でこの技術を魚類に応用し、環境水中から魚類由来の DNA 断片を検出することで生息する魚類の種組成を把握することが可能であることが示された。環境水中の DNA 断片群から mtDNA のチトクロム b 領域のみを PCR 増幅し、その PCR 産物の配列を読むという手法である。ただし、環境 DNA は魚の何に由来するか、どのような時に放出されるか、どのように分解されるのか、など、実用化を目指す上で答えるべき疑問は山積していた。そこで本研究代表者も加わった研究グループでは、環境 DNA による種組成把握やバイオマス推定をより実用的にするため、琵琶湖、ラオス、舞鶴湾などをモデルケースとした共同研究を急ピッチで進めてきた。

2. 研究の目的

アフリカ大地溝帯の古代湖であるマラウイ湖 (図 1) に生息するシクリッド魚類群集に、この環境 DNA の分析技術を適用することで、技術開発の飛躍的加速を狙った。教科書的「適応放散」の舞台であるマラウイ湖にこの技術を持ち込む意義は 2 点あり、これらが本研究の具体的な目的と一致する。

第 1 に、マラウイ湖に生息するシクリッド魚種は、全種の近縁性が著しく高いため、従来よりも挑戦的なユニバーサルプライマーの開発を試みやすい点である。ユニバーサルプライマーとは、特異性を失わせることで複数の生物種の DNA を PCR 増幅のターゲットにできるプライマーである。ただし、欲張って設計すると、非ターゲット生物の DNA を誤って増幅したり、ターゲット種間の親和性にばらつきのある信頼性の低いプライマー

になってしまう。マラウイ湖のシクリッド魚類は、大地溝帯の中でも特に若く、わずか 300 万年の間に 300~800 種に適応放散したと考えられている。このように若い単系統の群集であれば、共通かつ固有の配列を見つけやすいはずである。他研究を遥かに凌ぐ、単一の群集組成把握プライマーを開発しやすい。

なお、環境 DNA 分析による多様性研究において、種特異的プライマーではなく、ユニバーサルプライマーを開発・活用する意義は極めて大きい。なぜなら、種特異的プライマーを用いて環境 DNA 分析をする場合、もともと生息していると思しき種のプライマーを投入して、それぞれの種が生存しているかどうかを確認することしかできない。しかし、多種汎用性を高めたユニバーサルプライマーは、その水域にどの種が生息しているかを事前に把握しておく必要がない。「後出しジャンケン」ではない、自立した多様性評価ツールとなり得るのである。

第 2 の意義として、世界一多様性の高い現場で多様性指標が作られることによる信頼性とインパクトが挙げられる。上述のベルギーにおける先行研究でユニバーサルプライマーが検出したのは 10 種程度であるが、これがこの手法の技術的な限界を示すものとは思えない。一方、マラウイ湖シクリッド魚類の種数は、湖全体で 300~800 種と言われ、同所的に生息する魚種数も 50 種を上回る。この多様な水域で、環境 DNA 分析による魚種数推定の上限を理解することは今後の技術開発の方向性を見極め、他国の研究チームに先んずる上で重要である。

他にも、人為的な環境変化が目まぐるしい多様性ホットスポットに簡便なモニタリング手法を提供できること、進化学や生態学が注目する生物群集に対する研究スタイルを大幅に変革する可能性があることなど、この技術をマラウイ湖に持ち込むことは、基礎・応用の両面における発展性を伴う。

研究期間の前半では、マラウイ湖に生息する全シクリッド魚類に由来する環境 DNA を PCR 増幅できるユニバーサル環境 DNA プライマーを作成することを目的とした。研究期間の後半では、環境 DNA 量によって検出される種多様性がどの程度の精度を持っているのか、またどの程度の空間スケールを反映するものなのかを検証することを目指した。潜水士によって魚類の分布が個体単位でマッピングできるマラウイ湖の特性を活かし、野外での実用に不可欠な換算式を得るところまでを研究期間 (2013~2014 年度) 内の目標として設定していた。

3. 研究の方法

環境 DNA 分析による種多様性の推定は、次の手順によって行われる。環境水から濃縮・抽出された DNA 断片サンプルは、ユニバーサルプライマーによってターゲット群集由来のもののみが PCR 増幅される。PCR 産

物は必要に応じて電気泳動で分離された後、シーケンスによって配列が読まれ、種組成の決定に至る。従って、開発するプライマーの性質が第一義的に重要である。

研究代表者はマラウイ大学に客員研究員として 2013 年度の 6 ヶ月をマラウイ湖で過ごし、魚類採集、DNA 配列情報収集、プライマー開発に専念した。DNA 配列情報を蓄積するための魚類試料の収集は、種数、個体数ともに豊富なマラウイ湖国立公園内 Chembe 村で (図 1)、SCUBA 潜水士が刺網を用いて行った。また、沖合を遊泳することの多い魚種は同じ村の漁師から買い取った。ちなみに、この村の沿岸はかつて輸出用観賞魚をストックする水域として使われたため、マラウイ湖各地域のシクリッドが導入されており、シクリッド魚類を網羅的に採集するのに最も適した場所でもある。DNA 情報の収集は、プライマー開発の進捗を考慮して領域を設定し、既存プライマーによる PCR 増幅を経てシーケンスを行った。環境 DNA 分析の対象は、共通配列に挟まれた種間変異に富む領域であることが望ましい。従来は既知情報の多いミトコンドリア DNA チトクロム b 領域から 100bp 程が使われてきたが、シクリッド魚類は近縁性が高いため、より進化速度の速い領域の利用を検討した (mtDNA の D-loop 領域、核 DNA の ITS 領域など)。環境 DNA プライマーの設計時には、対象外の DNA 断片が誤って増幅されないように工夫する。それでも、水中には無数の生物種に由来する DNA 断片が存在しているため、プライマーが上手く働かないことも起こりう

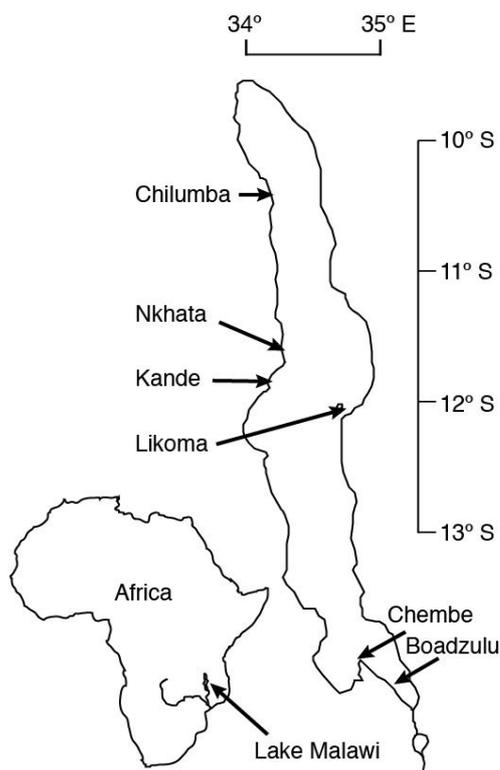


図 1 マラウイ湖と調査地 (6 地域)

る。そこで、上述の魚類試料、およびマラウイ湖国立公園内のシクリッド魚類飼育水槽を用いて、プライマーのテストを行い有効性を確認した。

シクリッド魚類は互いに非常に近縁であるため、共通領域を発見することは比較的容易である。一方、種分化してからの時間経過が短い姉妹種では、種識別をするのに十分な種間変異を見つけ出せないケースも考えられる。この場合、識別可能な分類群レベルまで識別解像度を落とした分析を行わざるを得ない。幸いなことにマラウイ湖では、姉妹種は異所的に分布することが多いので、このような場合であっても実質的な多様性把握は行い得ると考えられた。

野外調査は、マラウイ湖の 6 地域 12 地点で行われた (図 1)。6 つの地域はマラウイ湖を南北に網羅する形で配置され、シクリッド魚類の種多様性や種組成が互いに異なることが先行研究によって示されていた。各調査地には 10m 四方の水中コドラートを設置した。コドラートは 2m 辺のメッシュで分割することで、地形や魚類の位置を正確に記録できるようにした。水中での魚種同定に熟練した SCUBA 潜水士が各コドラートの全メッシュで観察を行い、水深などの環境要素とともに、すべての魚の種名と体長を記録した。体長は、別途種ごとに得た換算式によって体重に換算し、種ごとのバイオマス分布を把握した。観察後、波風の少ない日を選び、SCUBA 潜水によって 3~5L を採水した。水サンプルは即座に Whatman GFF ガラスファイバーフィルターおよびセルロースニトレートメンブレンフィルター (0.45µm メッシュ) によって濾過し、エタノールによって固定した。固定までに要した時間の間に分解された DNA 量が推定できるように、別途分解速度を求める実験も行った。

4. 研究成果

2003 年前半に、マラウイ湖国立公園内 Chembe 村で、魚類 111 種 287 個体が収集された (表 1、表 2)。これらの試料から DNA を抽出し、mtDNA の D-Loop 領域および核 DNA の ITS 領域の塩基配列情報を得た。これは、D-loop 領域における種間変異が想定よりはるかに小さかったことが 2013 年度末に判明したため、2014 年度に ITS 領域の配列情報を追加分析したものである。

表 1 DNA 試料を得た非シクリッド魚類

学名	個体数
<i>Bagrus meridionalis</i>	2
<i>Clarias mossambicus</i>	2
<i>Engraulicypris sardella</i>	3
<i>Labeo cylindricus</i>	3
<i>Opsaridium microcephalus</i>	3
<i>Synodontis njassae</i>	3

表 2 DNA 試料を得たシクリッド魚類

属名	種数	個体数計
<i>Alticorpus</i>	4	11
<i>Aristochromis</i>	1	2
<i>Aulonocara</i>	3	8
<i>Buccochromis</i>	2	4
<i>Chilotilapia</i>	1	1
<i>Copadichromis</i>	6	14
<i>Cyathochromis</i>	1	3
<i>Cynotilapia</i>	1	3
<i>Cyrtocara</i>	1	1
<i>Dimidiochromis</i>	2	4
<i>Diplotaxodon</i>	3	8
<i>Fossorochromis</i>	1	2
<i>Genyochromis</i>	1	3
<i>Hemitylapia</i>	1	3
<i>Labeotropheus</i>	2	6
<i>Labidochromis</i>	4	11
<i>Lethrinops</i>	5	8
<i>Mchenga</i>	3	6
<i>Melanochromis</i>	9	26
<i>Metriaclima</i>	4	11
<i>Mylochromis</i>	5	12
<i>Nimbochromis</i>	3	8
<i>Nyassachromis</i>	1	3
<i>Oreochromis</i>	1	3
<i>Otopharynx</i>	5	16
<i>Petrotilapia</i>	2	6
<i>Placidochromis</i>	3	6
<i>Protomelas</i>	4	13
<i>Pseudotropheus</i>	4	10
<i>Rhamphochromis</i>	1	3
<i>Sciaenochromis</i>	2	4
<i>Serranochromis</i>	1	2
<i>Taeniochromis</i>	1	1
<i>Taeniolethrinops</i>	2	4
<i>Tilapia</i>	1	1
<i>Tramatichromis</i>	1	1
<i>Trematocranus</i>	2	6
<i>Tropheops</i>	8	28
<i>Tyrannochromis</i>	1	5
<i>Copadichromis</i>	1	3
<i>Placidochromis</i>	1	1

D-loop 領域を対象に、シクリッド魚類のみを対象としたユニバーサルなプライマーが設計された。このプライマーを使ってシクリッド魚類から抽出した DNA を PCR に供したところ、確かに DNA の増幅が見られた。続いてマラウイ湖水の環境 DNA を PCR 増幅したところ、やはりシクリッド由来と見られる環境 DNA の増幅が確認できた。

このプライマーを使った定量 PCR によって、湖水の採取方法を様々に変えた場合のシクリッド由来の環境 DNA の回収量を比較したところ、次のような傾向が見られた。

- ・ Whatman GFF ガラスファイバーフィルターよりもセルロースニトレートメンブレンフィルターの方が桁違いに多量の環境 DNA を回収することができた

- ・ 水面・中層・底層で採水して環境 DNA 回収量を比べると、平均値には3者間で有意な差がないものの、中層以外では大きなバラツキや飛び値を示すことが多かった

- ・ 沿岸から沖合に向かってシクリッド魚類の個体数やバイオマスが減少するのに伴い、シクリッド由来の環境 DNA 量も 10m ピッチの空間スケールで減少する

これらの傾向は、直接的に最適な採水方法を示唆するものであり、6 地域での野外調査でもこれらの傾向を踏まえた採水手順を組み直すことが出来た。

野外調査では、すべてのコドラートにおいて、SCUBA 潜水による魚類群集組成の調査と採水を完了した。潜水による組成の比較では、想定通り地域間に大きな種多様性や総バイオマスの違いが見られた(表3)。

表 3 6 地域の 100m² コドラートで観察された種数の比較 (2014 年 9 月の観察 1 回分)

調査地	種数	個体数
Chilumba	33	1,794
Nkhata	33	1,522
Kande	26	1,778
Likoma	41	1,624
Chembe	57	11,141
Boadzulu	23	2,240

当初ターゲットにしていた D-loop 領域の種間変異が想定以上に乏しかったこと、ITS 領域の塩基配列を解読する際に利用した先行研究が推奨していたプライマーが上手く昨日しなかったこと(おそらく試料の高い GC 含有率に対応できなかった)などにより、ITS 領域を対象とした環境 DNA 用プライマーはまだ開発に至っていない。種間変異と種内変異の大きさに大差が見られないシクリッド特有の事情に考慮して、慎重な設計を引き続き行いたい。幸い、上述の通り貴重な環境水試料はすでに分析可能な状態で保存されており、その後の展開はスムーズに進むことが期待される。

なお、このわずか 2 年の間に魚類の環境 DNA に適用可能であることが示された分析技術は、メタバーコーディングの手法やデジタル PCR を使ったものまで実に幅広い。これらの技術は当然、本研究で得られた試料にも適用可能となる。世界一多様な湖棲魚類群集のバイオマス分布情報、DNA 試料、環境 DNA 試料のセットを手に行っていること自体も、本研究の大きな成果だと考えている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Minamoto, T., Naka, T., Moji, K., and Maruyama, A. (2015) Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation,

and extraction. Limnology. Accepted. 査読有

Maruyama, A., Shinohara, K., Sakurai, M., Ohtsuka, T. and Rusuwa, B. (2015) Microhabitat variations in diatom composition and stable isotope ratios of the epilithic algae in Lake Malawi. Hydrobiologia. 748: 161-169. 査読有

Ito, T., Matsumura, K., Kozawa, G., Ozawa, M., Mitsuo, Y., Maruyama, A. and Yuma, M. (2015) Studying the contribution of two types of landlocked Ayu fish in Lake Biwa to the next generation using nitrogen-stable isotope ratio analysis. Ichthyological Research. 62: 357-362. 査読有

丸山 敦 (2015) マラウイへの誘い. 龍谷大学理工ジャーナル. 27: 25-31. 査読無

Maruyama, A., Shimonaka, H., and Ito, T. (2015) Quick change in ^{15}N values of fish mucus confirmed in the field using a migratory goby. Ecology of Freshwater Fish. 24: 162-164. 査読有

Rusuwa, B., Ngochera, M. and Maruyama, A. (2014) *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea) infection of *Engraulicypris sardella* (Pisces: Cyprinidae) in Lake Malawi. Malawi Journal of Science and Technology. 10: 8-14. 査読有

Maruyama, A., Zatha, R. and Rusuwa, B. (2014) Weight-length relationships for twelve cichlid species from Lake Malawi, Africa. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 2: 124-127. <http://fisheriesjournal.com/vol2issue1/Pdf/38.1.pdf>. 査読有

Shinohara, K., Maruyama, A., Rusuwa, B., and Ohtsuka, T. (2014) Taxonomic revision of three diatoms found in Lake Malawi: *Afrocymbella brunii* (Fricke) comb. nov., *Afrocymbella rossii* (Kociolek & Stoermer) comb. nov., and *Aulacoseira euareolata* (O. Müller) comb. nov. et nom. nov. Phycological Research. 62: 9-15. 査読有

Noda, H. and Maruyama, A. (2014) The relationship between an introduced predator-prey pair, largemouth bass and bluegill, and the chlorophyll concentration in farm ponds. Ichthyological Research. 61: 159-164.

査読有

神松 幸弘, 船津 耕平, 丸山 敦, 門司 和彦 (2014) 生態学からみたエコヘルズ: 稲作栽培様式の近代化に伴う水田生態系と感染症リスクの変容. IN. 連載「エコヘルズという視点」Vol.14. 医学のあゆみ. 250: 517-524. 査読無

Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M. and Minamoto, T. (2014) The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. PLoS ONE 9(12): e114639. DOI: 10.1371/journal.pone.0114639. 査読有

[学会発表](計 6 件)

丸山 敦, 野田 日奈子. 河川性魚類の種多様性と淵での餌消費率の関係. 日本生態学会第 62 回全国大会, 2015 年 3 月 21 日, 鹿児島大学 郡元キャンパス, 鹿児島県鹿児島市

Moji, K., Maruyama, A., ほか 19 名. Impact of expansion of wet rice fields on the risk of liver fluke infection in Lao P.D.R. EcoHealth 2014, August 11-15, 2014, Montreal, Canada.

Minamoto T, Masuda R, Takahashi K, Maruyama A, Yamanaka H, Kasai A, Kondoh M. Marine fish survey using environmental DNA. Ecological Society of America Annual Meeting, 2014 Aug 10-15, Sacramento, USA.

辻 咲恵・小山 奈々・大塚 泰介・池田町農業公社・ネイチャースケープ・岩井 紀子・丸山 敦. 生物がいると水田の群集組成はどう変化するか ~ ドジョウ, タニシ, オタマジャクシが果たす役割 ~. 日本生態学会第 61 回全国大会, 2014 年 3 月 14 日~2014 年 3 月 18 日, 広島国際会議場, 広島県広島市

Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, Kondoh M, Minamoto T. Environmental DNA release velocity from different sized fish. 日本生態学会第 61 回全国大会, 2014 年 3 月 17 日, 広島国際会議場, 広島県広島市

篠原 耕平・丸山 敦・Bosco Rusuwa・大塚 泰介. Taxonomic revision of three diatoms found in Lake Malawi; *Afrocymbella brunii* (Fricke) comb. nov., *Afrocymbella rossii* (Kociolek & Stoermer) comb. nov., and *Aulacoseira euareolata* (O. Müller) comb. nov. et nom. nov. 日本珪藻学会研究集会, 2013 年 11

月 16 日 ~ 2013 年 11 月 17 日 , 琉球大学熱帯生物圏研究センター, 沖縄県那覇市

[図書] (計 2 件)

丸山 敦 (2015) 環境 DNA 分析. In にぎやかな田んぼ(夏原由博編), 京都通信社, p 134-135.

丸山 敦、船津 耕平、神松 幸弘 (2015) ラオスの農村で実感! 「魚が躍る田んぼ」に秘められた可能性. In にぎやかな田んぼ(夏原由博編), 京都通信社, p 126-133.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 敦 (MARUYAMA, Atsushi)
龍谷大学・理工学部・講師
研究者番号 : 7 0 3 6 8 0 3 3