

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550089

研究課題名(和文)環境DNAから多種多様な生物種を同定する新規手法への挑戦

研究課題名(英文)Development of a novel method for identifying a wide variety of species from environmental DNA

研究代表者

佐藤 哲也(Sato, Tetsuya)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：00457425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：湖沼や河川では、生物の排泄物などから生じたと考えられる環境DNAが検出される。このようなDNAは環境中に生息する生物の種類を同定するために利用できるが、既存の方法では生物種特異的なプライマーを利用するため限定された生物種しか調べることができない。そこで本研究では、ユニバーサルプライマー配列を設計して、環境中に生息する多種多様な生物種を同定する新規手法を開発した。本研究の成果から、生物多様性の調査や保全への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Environmental DNA (eDNA), most likely derived from feces and so on, is detected in lakes and rivers. Although the eDNA can be used to investigate the types of organisms that live in the environment, a conventional method using species-specific primer sequences can only be identified limited species. In this study, by designing original universal primers, we successfully developed a new method to identify a wide variety of living species in the environment. The results in this study would be expected to the biodiversity survey and assessment.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：生物多様性 環境DNA 環境保全 次世代シーケンサー ユニバーサルプライマー

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然環境中の土壌や河川水などの環境サンプルには、様々な生物由来の DNA 断片が存在する。これらは『環境 DNA』と呼ばれ、生物の排泄物、分泌物および様々な組織などから生じたものと考えられている。これまでに土壌サンプルについては、国内外問わず多くの研究報告が成されてきたが、最近になって環境水サンプル（湖沼、河川および海）においても、欧米の研究グループを中心に両生類や魚類を同定した研究が報告されている。

もし、環境中に生息する「生物の種類」の詳細が解明されれば、外来種や絶滅危惧種の存在の把握に繋がる。また、どのような生物がどのような割合で生息しているかという「生物の存在比」についても明らかになれば、生物多様性保全のための基礎データとして活用できるだけでなく、生物群集の組成に関する生態学的新規発見が期待される。したがって、環境中に生息する多種多様な生物種を可能な限り同定する試みは、極めて重要で意義のあることである。

多種多様な生物種を同定する既存技術として、生物種間で保存された領域に対してユニバーサルプライマーを設計して利用する DNA バーコーディングがある。DNA バーコーディングは、ミトコンドリアゲノムのマーカー遺伝子、cytochrome oxidase I (*COI*) にコードされている DNA 断片を配列決定して生物種を同定する手法であり、プライマーのターゲット配列は約 600 bp の長さが必要となる。生体から直接 DNA を抽出することができれば、未切断の長い DNA が得られるために DNA バーコーディング技術が適用できるのだが、環境水サンプルの場合その事情が異なる。一般的に環境水サンプルから調製される環境 DNA は、様々な環境ストレスに曝されるため DNA 損傷が激しく、おおよそ 100 bp から 150 bp の長さしかない場合が多い。そのため、DNA バーコーディング用プライマーは環境 DNA 解析では使用できないことから、環境 DNA に特化した全く新しいユニバーサルプライマーの設計が望まれている。

2. 研究の目的

環境 DNA から生物種を同定する既存の方法は、目的とする特定の生物種を対象にして設計されたプライマー（生物種特異的プライマー）を使って、PCR 法や次世代シーケンサーにより行われている。したがって、特定の生物種を同定するための解析、例えば特定種のモニタリング等には適している

が、網羅的に不特定多数の生物種を対象とした解析は困難である。

一方、本研究では、生物種を越えて配列が保存されている領域の間に、生物種の多様性が観察される非保存領域が含まれる領域に注目する。そのような保存領域に対してユニバーサルプライマーを設計することにより、不特定多数の生物種を対象にした解析が可能となる。もし、多くの生物種に適用可能なユニバーサルプライマーが存在すれば、環境中に生息する生物種を一網打尽に同定することができる。そこで、バイオインフォマティクス技術を駆使してユニバーサルプライマーを設計することにより、これまで解析困難とされてきた不特定多数の生物種を同定するための新規手法の開発を計画した。

3. 研究の方法

本研究では、環境 DNA から多種多様な生物種を同定するために、DNA 配列の保存領域を使用したユニバーサルプライマーの設計を行い、その実用性を確認する。まず、公共データベースから遺伝子配列データ入手した後、ユニバーサルプライマー配列の設計と、コンピュータシミュレーションによるテストを行った。また、設計したプライマー配列を可視化して確認するために、ゲノム配列をアライメントしたデータを閲覧できるウェブサーバを開発した。

(1) 環境 DNA 用ユニバーサルプライマー配列の設計

本研究では、まず公共データベースに登録されている DNA 配列データ（ミトコンドリア DNA）を取得した。取得した配列を系統的（種、属、科、目、綱、門）に分類した後、マルチプルシーケンシングアライメントを行った。アライメント配列から、保存領域と非保存領域を見つけ出してプライマー配列の候補を探した。また、プライマーに混合塩基を使用することで、保存領域内に 1 もしくは 2 塩基までミスマッチを許可する条件で候補領域を調査した。

(2) *in silico* テストの実施

設計したプライマー配列で生物種同定が可能かどうかを確認するために、コンピュータ上でテストを行った。公共データベースに登録されているゲノム配列データをランダムに 100 bp から 200 bp のサイズに断片化した配列データを生成する。それら配列データを環境 DNA に模して、設計したプライマーセットと一致する DNA 断片から生物種が特定できるかどうかを検証した。

(3) データの可視化

設計したプライマー配列と DNA 保存領域との間の関係について、データの可視化など研究を支援するためのウェブツールを作成した。設計したプライマー配列が種を超えてどれくらい保存されているかは、ゲノム配列をアライメントして（並べて）確認する必要がある。より確実に信頼性あるプライマー配列を設計するために、全てのプライマー候補配列を実際に可視化して確認した。

4. 研究成果

(1) 環境 DNA 用ユニバーサルプライマー配列の設計

公共データベースから遺伝子配列データ入手した後、ユニバーサルプライマー配列の設計を行った。まず MitoFish データベース (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp>) に登録されている魚類のミトコンドリア DNA 配列 1,647 種分を取得した。

次に、増幅対象の DNA 断片長を 100-200 bp に設定して、取得した DNA 配列から断片長が 20 bp 前後となる 20 カ所の保存領域 (E-value < 1.0E-100) を抽出した。異なる 2 カ所の保存領域に挟まれる非保存領域は、ちょうどプライマー配列によって増幅される DNA 配列に対応する。また、抽出された保存領域は、1 もしくは 2 塩基まで mismatches を許した。

抽出した 20 カ所の保存領域に注目し、全ての組み合わせペア (190 ペア) に挟まれる領域 (増幅領域) の平均値をそれぞれのペアで計算した。最終的に、増幅領域の長さが、20 bp 以上、100 bp 未満を満たすペアは 13 個あり、これらのペアをプライマー配列の候補とした。

さらなる絞り込みのため、プライマー配列として物理化学的な特徴を有しているかを確認するために、Primer3Plus プログラムを利用した。プライマー候補に対して、融解温度 (T_m 値)、GC 含量、ヘアピンループ形成の可能性、プライマー配列の方向 (5' → 3') を確認した。また、ミトコンドリアゲノム配列だけにユニークに一致し、核ゲノムには不一致となる配列を選択するために、UCSC In-Silico PCR で確認作業を行った。最終的に、6 種類のプライマー配列ペアを設計することができた (図 1)。

また、保存領域のプライマーの設計に際して、全ての生物種で共通な保存領域に注目するのではなく、一部の生物種集団で共通した保存領域に注目することにより、これまでに報告がないユニークなプライマー配列の設計を可能にした。

設計したプライマー配列の妥当性を評価するために、プライマー配列ペアによって増幅される領域のカバー率を調べた。その結果、MitoFish データベースから入手したミトコンドリア配列は 1,647 種に対して、

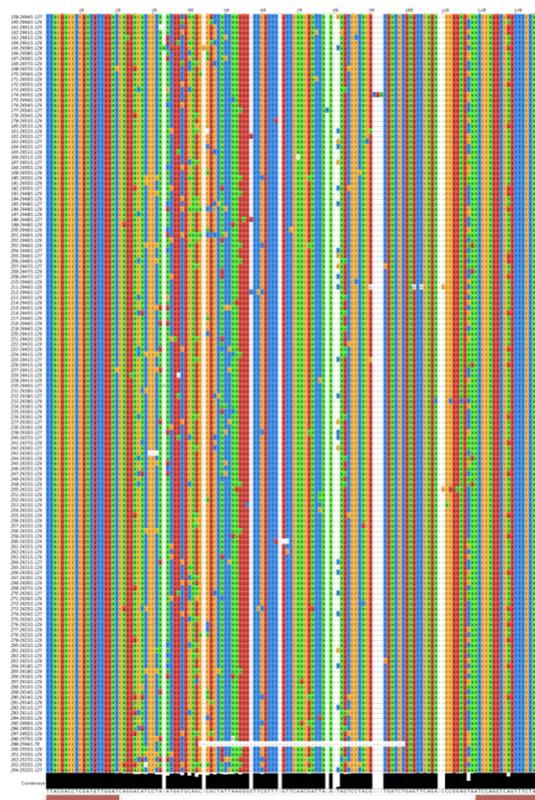


図 1 プライマー配列と保存領域の例
下部にある 2 カ所の赤色ボックスはプライマー配列セットを示す

設計したプライマーで増幅可能な生物種は 1,644 種となり、カバー率にして 98.8% と高い成績を取めた。

(2) *in silico* テストの実施

得られたプライマー配列から多種多様な生物種が同定できるか否かを確認するために、コンピュータ上でのテストを実施した。テストには 6 種類の魚 (Tetraodon, Fugu, Tilapia, Medaka, Stickleback, Zebrafish) のゲノム配列を使用し、それぞれの配列から、100 bp から 200 bp のゲノム断片をランダムに生成させ、これらを疑似環境 DNA とした。疑似環境 DNA は、6 種類の魚類ゲノムそれぞれから 10,000,000 個を生成し、合計 60,000,000 個の疑似環境 DNA に対してプライマー配列ペアで増幅できるか否かを確認した。

その結果、増幅対象となった疑似環境 DNA は、ミトコンドリアゲノム配列に一致し、核ゲノム配列には不一致であった。また、テストは複数回にわたって繰り返行われ、増幅対象となった疑似環境 DNA の割合は毎回全体の 0.1% を示し、安定した成績を残した。以上の結果から、種分類に必要な領域が増幅可能であることが検証でき、ユニバーサルプライマー配列の設計に成功したことを確認した。

(3) データの可視化

設計したプライマー配列と DNA 保存領域との関係が容易に確認できるように、複数の生物種の配列を可視化し比較するためのウェブサーバ「GenomeCons」を構築した。このサーバは、複数のゲノム領域に対して、進化的に重要な配列保存領域を可視化して調べることができる。調査対象となる生物種は、現在 4 種類（ヒト、マウス、メダカ、ショウジョウバエ）であり、例えばヒトを中心とした 100 生物種に対して配列保存度を高速で調べることができる。また、高度に保存された領域だけを抽出して、テキストファイルとして入手できる機能も含まれており、設計したプライマー配列との一致パターンを詳細に調べることができる。

設計したプライマー配列部分をこのウェブサーバで確認したところ、2 カ所の保存領域の間に非保存領域が挟まれることを可視化して確認することができた。また、設計したプライマー配列の生物学的機能の解釈を支援するウェブサーバ「ChromContact」も構築した。

また、魚類だけでなく原生生物及び脊椎動物に対しても遺伝子配列データを入手し、同様な方法でユニバーサルプライマー配列を設計した。本研究の結果は、これまで解析対象とならなかった多種多様な生物種を同定する道筋をつけることができたことから、今後は生物多様性の調査や保全への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

① Sato T, Suyama M.

ChromContact: A web tool for analyzing spatial contact of chromosomes from Hi-C data. *BMC Genomics* 16: 1060, 2015 査読有
DOI: 10.1186/s12864-015-2282-x

② Sato T, Suyama M.

GenomeCons: a web server for manipulating multiple genome sequence alignments and their consensus sequences. *Bioinformatics* 31(8): 1293-1295, 2015 査読有
DOI: 10.1093/bioinformatics/btu803

〔学会発表〕（計 1 件）

① 佐藤哲也、大川恭行、須山幹太

環境 DNA から多種多様な生物種を同定する新規手法
日本生態学会第 62 回全国大会 2015 年 3 月 21 日 鹿児島大学（鹿児島）

〔その他〕

ホームページ等

<http://bioinfo.sls.kyushu-u.ac.jp/genomecons/>

<http://bioinfo.sls.kyushu-u.ac.jp/chromcontact/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 哲也 (SATO Tetsuya)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：00457425

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし