

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650144

研究課題名(和文)大規模DNAバーコーディングで食物網解析を革新する

研究課題名(英文)High-throughput DNA barcoding for foodweb analysis

研究代表者

東樹 宏和 (Toju, Hirokazu)

京都大学・人間・環境学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60585024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、次世代シーケンシングに基づく大規模DNAバーコーディングによって、微小な捕食性節足動物類の体内に存在する餌種の検出技術の構築を行った。この新しい研究アプローチの確立には、サンプリングからDNA抽出、PCRプライマー設計、PCR増幅、シーケンシング、バイオインフォマティクス処理、および、群集生態学的統計解析と、多くのステップでの技術革新が求められ、当初、複数の問題から、技術開発が難航した。しかし、ひとつひとつの過程での技術改良を進めた結果、研究対象とする生物群を選ばずに、捕食-被食網といった生物間相互作用ネットワークを大規模に解明する一連の手法を開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I developed a pipeline for detecting prey DNA in predator samples through high-throughput DNA barcoding based on next-generation sequencing. The pipeline consists of improved methods of sampling, DNA extraction, PCR, next-generation sequencing, bioinformatics, and community ecological statistical analyses. Because the pipeline is based on the universal DNA barcoding system (<http://www.claident.org/>), it is applicable to various types of interspecific interaction systems (e.g., food webs) involving various taxonomic groups of organisms.

研究分野：生態学

キーワード：生態学 群集 食物網 ネットワーク DNAバーコーディング

1. 研究開始当初の背景

従来の食物網研究は、肉眼観察が比較的容易な植食性昆虫と捕食動物(昆虫・脊椎動物)の関係や、胃内容分析が適用できる魚類とその餌種の関係で得られたデータなどを主な土台として発展してきた。しかし、これらの食物網は野外の生物群集のほんの一部であり、微細な生物たちが構成する多様な食物網へと、野外研究の対象を拡大していく必要がある。

DNA バーコーディングを用いて微細な生物間の食物網解析を行う試み自体は、これまでも行われてきた。しかし、分類群特異的な PCR プライマー設計やバイオインフォマティクス処理上の難しさ、DNA シーケンサーごとの特性による情報精度の問題等により、食物網解析への本格的な応用に至っていない。

研究代表者はこれまで、ゲノム科学と生態学の間分野横断プロジェクトを主導し、次世代シーケンシングがもたらす膨大な生物情報を群集生態学に導入する新手法を開発してきた。この技術開発の成功により、自動化された大規模 DNA バーコーディング・システムをもとに巨大な群集行列のデータ・セットを解析する道が拓けた (Toju et al. 2013a,b Ecol Evol; Tanabe & Toju 2013 PLoS ONE; Toju et al. PLoS ONE 2013)。

DNA さえ得られれば、原理的にどんな生

物間相互作用にも適用可能な技術であり、対象とする生物群や相互作用タイプに最適化されたサンプリング法・分子実験法と組み合わせることで、食物網に限らず、相利共生ネットワークの野外研究を革新すると期待されている。

2. 研究の目的

生物種間の食う-食われる関係(食物網)に関する野外研究は、生物群集の動態に関する理論の発展において中心的な役割を果たしてきた。一方で、従来の食物網研究では、野外で起こる捕食-被食関係の中で、肉眼観察や胃内容物観察が可能なものに対象が限定されがちであった。

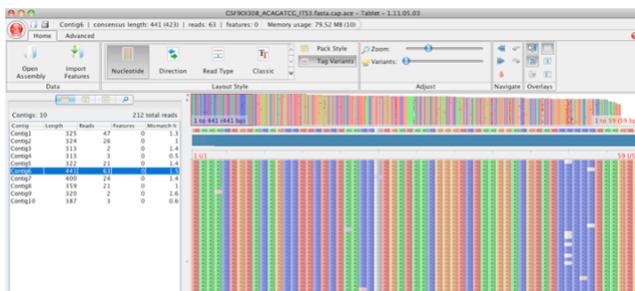
本研究では、従来の研究法では食物網構造の詳細な研究が不可能であった土壤中の節足動物群集に着目し、大規模 DNA バーコーディングを基に網羅的に食物網構造を解明する新手法を確立することを目指した。

土壌節足動物群集の動態は、土壌圏のみならず、地上を含めた陸上生態系全体の動態に大きな影響をおよぼすと考えられる。陸上生態系では、純一次生産量の 20%が、植物から菌根菌に流れる。この膨大な菌根菌バイオマスの相当な割合が菌食性の多様なトビムシ類へと流れ、さらに、捕食者であるカニムシやクモ類へと栄養段階を登っている。しかし、被食者・捕食者ともに非常に高い種多様性を

大規模DNAバーコーディング

次世代シーケンスデータ

→ 生態学のデータファイルに変換



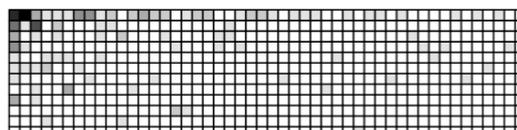
1回の解析で 300~1000 bpほどの配列が10万~2500万個得られる

“Claident”

次世代シーケンシングの生データ解析から生物同定、集計表作成まで

種間相互作用を表現する行列
餌種

捕食者種



示す上、肉眼で行動を追うのが非常に難しい研究対象であるため（地中性で体サイズが小さい）、こうした土壌動物を対象とした精細な食物網構造は未知のままである。

土壌圏の食物網構造の解明は、群集生態学の基礎理論を検証する上で重要なだけでなく、農地での害虫管理や里山・里地の生物相調査など、幅広い応用面でも重要である。トビムシ類に代表される土壌中の被食者に支えられて、クモ類は高いバイオマスを持つ。このクモ類は土壌圏の餌種だけでなく、地上の植食性昆虫の主要な捕食者として、特定の害虫の個体群成長を抑制することが知られている。また、クモ類自体がカエルや鳥といった上位捕食者に捕食されることで、地下から地上への物質循環をもたらす。上記の新技术をさらに拡張することで、簡便かつ精密に地上と地下の食物網動態の関連性を解析可能になると考えられ、半自然生態系の管理において、NPO や農家、企業に新たな情報源を提案できるようになると期待される。

申請時点までの研究で、次世代シーケンシングを用いた自動生物同定システムと生物種間ネットワークの統計解析の統合に成功しており、土壌圏のブラックボックスである食物網に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでに、内閣府の「最先端・次世代研究開発支援プログラム」のプロジェクト・リーダーとして、次世代シーケンシングによる超並列サンプル処理手法や自動生物同定（DNA バーコーディング）プログラムの開発を行った（Tanabe & Toju 2013）。こうした技術開発の成功により、これまでにない規模の生態ネットワーク・データを群集生態学に提供する道が拓けた。

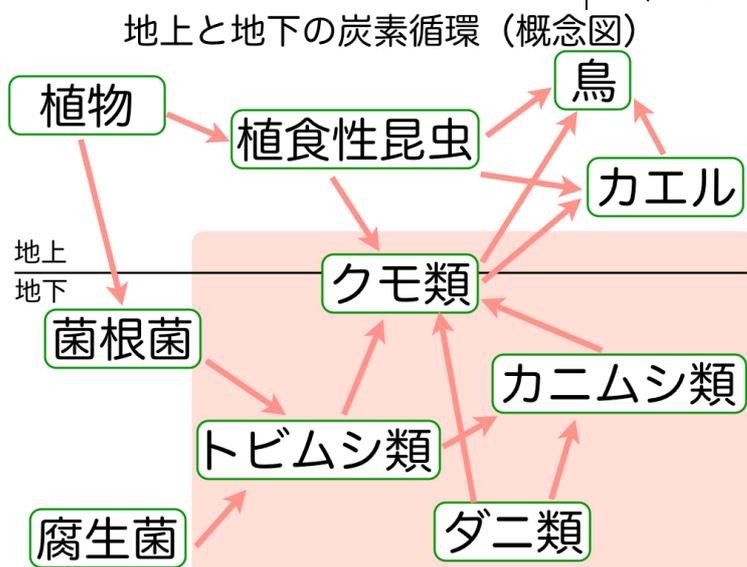
この新技术群を用いれば、微細な組織・個体サンプルをもとに、生物種間の共生関係や捕食-被食関係を推定することが可能である。数百から 1000 サンプルほどのサンプル処理であっても、簡便かつ高速に次世代シーケンシングをこなすことができ（Toju et al. 2013a, b Ecol Evol; Toju et al. PLoS ONE 2013）、また、自動化された DNA バーコーディング・システム（プログラム；“Claident”；<http://www.claident.org/>にて入手可能）により（Tanabe & Toju 2013 PLoS ONE）、共生関係や捕食-被食関係に関する膨大な群集行列データを収集することが可能となった。また、NCBI に蓄積された膨大な DNA データベース配列情報を用いて、PCR プライマーを設計し、そのプライマーのユニバーサル性や分類群特異性をコンピュータ上で計算することも可能となっている（Toju et al. 2012 PLoS ONE）。

こうした世界に先駆けたゲノム科学と生態学の融合研究によって、研究者がその構造を解明できる食物網や共生ネットワークの種類が、飛躍的に増加すると期待される。本研究では、食う-食われる関係の目視による観察が難しい土壌節足動物群集を対象に、上記技術を応用することを目指した。

4. 研究成果

本研究では、次世代シーケンシングに基づく大規模 DNA バーコーディングによって、微小な捕食性節足動物類の体内に存在する餌種の検出技術の構築を行った。この新しい研究アプローチの確立には、サンプリングから DNA 抽出、PCR プライマー設計、PCR 増幅、シーケンシング、バイオインフォマティクス処理、および、群集生態学的統計解析と、多くのステップでの技術革新が求められ、当初、複数の問題から、技術開発が難航した。しかし、ひとつひとつの過程での技術改良を進めた結果、研究対象とする生物群を選ばずに、捕食-被食網といった生物間相互作用ネットワークを大規模に解明する一連の手法を開発することに成功した。

まず、サンプリングにおいては、サンプリング後における捕食者間のギルド内捕食を防ぐため、捕食者個体を個別のサンプリングチューブに採集した。また、実験室に持ち帰る前に捕食者体内の餌種 DNA が分解されるのを防ぐため、クーラーボックス内でサンプルを急冷した。



持ち帰ったサンプルは、小型の捕食者個体であればまるごとバッファーの中ですりつぶし、また、大型の捕食者個体であれば、腹部のみをすりつぶすことで、捕食者自身とその餌種のゲノム DNA 両方を抽出のターゲットとした。ハイスループットな解析のため、DNA 抽出法はできるだけ工程の少ないものを選んだ。

その上で、次世代シーケンシング用に開発されたフュージョン PCR プライマーを使用して、PCR 増幅を行った。ターゲットとしたのはともに核に存在する 18S rDNA 領域と、internal transcribed spacer (ITS) 領域である。節足動物に DNA バーコーディングにおいては、ミトコンドリアの cytochrome oxidase subunit 1 (COI) 領域が使用されることが多い。しかし、本研究において COI プライマーを試したところ、増幅できないサンプルの割合が非常に高い傾向にあった。新たな COI プライマーの設計も試みたが、ごく最近の関連研究からも COI プライマー領域におけるユニバーサル PCR プライマーの設計可能性について疑義が提起されていることを鑑みて、核領域のプライマーを使用することとした。

なお、使用した 18S 領域は、比較的上位分類階層での同定に適している。いっぽうの ITS 領域は、変異速度が速いために種レベルの同定が潜在的に可能であるが、動物における DNA 配列データベース情報の蓄積が今後の課題となる。それでも、レファレンスとして自前の ITS 配列データベースを用意しておけば、情報量の多い領域として、汎用できると期待される。

上記の PCR においては、研究代表者が試行錯誤を重ねた末に最適化した、2-step PCR を行った。1st PCR においては、上記の選択的 18S/ITS プライマーを含むフュージョンプライマー (MiSeq シーケンシングプライマー部位を含む) を利用し、35 サイクルに設定した。2nd PCR においては、1st PCR で付加されたシーケンシングプライマー部位をターゲットとした 3' 末に加えて、サンプル識別インデックス配列と MiSeq シーケンシングアダプターを含むフュージョンプライマーが使用された。2nd PCR 産物の精製後、次世代シーケンシングを行った。

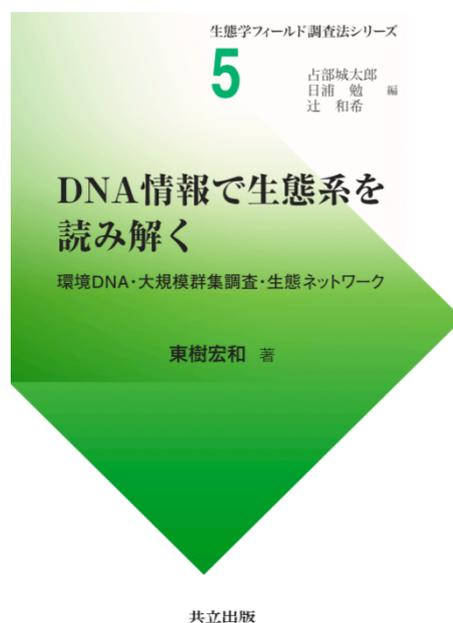
得られた次世代シーケンシングデータは、all-in-one 解析プログラムである Claident で解析した。最新版の Claident では、正確なインデックス配列認識による demultiplexing ののち、VSEARCH を用いた正確かつ高速な clustering が行われる。その上で、サンプル x operational taxonomic unit (OTU) 行列や、各 OTU 配列のファイルが出力される。本研究の場合、この出力行列に

おいて、行が捕食者サンプル、列がそのサンプルから得られた OTU となる。

OTU 配列のファイルは、UCHIME プログラムによるキメラチェックののち、Claident が提供する query-centric auto-k-nearest-neighbor 法 (Tanabe & Toju 2013 PLOS ONE) による自動分類群同定に供された。

この一連の手法を適用した、クモ (捕食者) を中心とする陸上生態系の食う-食われる関係では、期待されたとおり、各サンプルから得られる大量の次世代シーケンシングリードの大半がクモのものであった。しかし、餌種と思われる他の節足動物のシーケンシングリードも得られることが明らかになり、これまで直接観察が不可能であった微小な節足動物を含む食う-食われる関係の推定を可能にする技術と位置づけることができた。

なお、本研究で開発された一連の解析技術の詳細を、書籍の形で公表した (東樹 宏和著、共立出版、「DNA 情報で生態系を読み解く - 環境 DNA・大規模群集調査・生態ネットワーク-」)。この書籍は、サンプリングから PCR プライマー設計、次世代シーケンシング、バイオフィォマティクス処理、および、群集生態学的解析の全工程を解説したものであり、世界的にみても類書の存在しない独自の内容となっている。



また、DNA バーコーディングを用いた生物種間相互作用ネットワーク解析技術に関するレビュー論文を、英文雑誌に発表した (以下参照)。

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 1 件)

① 東樹 宏和、High-throughput DNA barcoding for ecological network studies. Population Ecology、査読有、57 巻、2015、37-51
<http://link.springer.com/article/10.1007/s10144-014-0472-z>

[学会発表] (計 2 件)

① 東樹 宏和. 「次世代シーケンサーで相互作用ネットワークを描く」. 応用動物昆虫学会小集会「複合共生系をひもとく」企画：菊池義智. 2015 年 3 月 27 日. 山形大学.

② 東樹 宏和. 企画責任 [瀧本岳・東樹宏和]. 「エコミメティクス」の創成；ミクロ生命圏の異分野融合研究プロジェクトが目指す生態学の発展と応用」. 第 62 回日本生態学会. 2015 年 3 月 22 日. 鹿児島大学.

[図書] (計 1 件)

① 東樹 宏和、共立出版、DNA 情報で生態系を読み解く -環境 DNA・大規模群集調査・生態ネットワーク-、2016、224

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/toju/Home>

[/japanese-nihongo](#)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東樹 宏和 (TOJU, Hirokazu)
京都大学・人間・環境学研究科・助教
研究者番号： 60585024

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし