

水に含まれる環境 DNA から「どんな魚」が「どれだけいるか」を同時に推定 — 定量的な魚類群集モニタリングを容易に実現 —

研究成果のポイント

- 一般的に用いられる環境 DNA メタバーコーディング^{*1,2}では、分析上の制限により、種の存在を検出できるものの、それらの量を定量的に評価することは困難
- 既知濃度の内部標準 DNA を試料に添加することで、メタバーコーディングにおける(半)定量評価を可能にする定量メタバーコーディング法(以下、qMiSeq 法)が Ushio et al. (2018)により開発された
- 魚類の環境 DNA メタバーコーディングに qMiSeq 法を適用し、推定された環境 DNA 濃度が、調査地に生息する各種の個体数や生物量を反映するか検証した
- 推定された各種の環境 DNA 濃度は、採水調査時に電気ショッカーを用いて捕獲された各魚種の個体数および生物量を反映していることが示された
- 環境 DNA 定量メタバーコーディングは生物多様性の定量的なモニタリングを容易に実現する有用性の高い手法といえる

研究成果の概要

山口大学環境 DNA 研究センターの辻冨月(つじさつき)学術研究員(現・京都大学)と赤松良久(あかまつよしひさ)教授、福岡工業大学の乾隆帝(いぬいりゅうてい)教授らの研究グループは、九州・中国地方の複数河川における大規模な調査により、水に含まれる魚類の環境 DNA を定量的環境 DNA メタバーコーディングにより定量的・網羅的に分析することで、「どんな魚類」が「どれだけ生息しているか」を同時に推定できることを明らかにしました。本成果は、2022 年 12 月 13 日に国際学術誌「Scientific Reports」に掲載されました。

論文発表の概要

研究論文名: Quantitative environmental DNA metabarcoding shows high potential as a novel approach to quantitatively assess fish community

著者: 辻冨月^{1,2*}、乾隆帝³、中尾遼平²、宮園誠二²、齋藤稔^{2,4}、河野誉仁⁵、赤松良久²(*責任著者)

1. 京都大学大学院理学研究科
2. 山口大学大学院創成科学研究科
3. 福岡工業大学社会環境学部
4. 国立研究開発法人 国際農林水産業研究センター
5. 国立研究開発法人 土木研究所

公表雑誌：Scientific Reports

公表日：2022年12月13日

DOI：10.1038/s41598-022-25274-3

研究成果の詳細

(背景)

種の多様性や豊富さ、バランスを同時に監視し、管理・保全することは生物多様性の損失を効果的に減らし、生態系の健康を維持するために重要です。水の中に含まれる生物由来の DNA である環境 DNA を指標として、調査地に生息する対象分類群を網羅的に明らかにする環境 DNA メタバーコーディング（以下、環境 DNA メタバ）は、生物の群集組成を推定する画期的な手法として近年注目を集めています。しかし、環境 DNA メタバは分析上の制限により、種の存在（群集組成）を検出できるものの、それらが「どれだけいるか」という量的な評価を行うことが困難でした。

そこで本研究では、近年 Ushio et al. (2018)により開発された qMiSeq 法と呼ばれる、既知濃度の内部標準 DNA を試料に添加することにより、(半) 定量的なメタバーコーディング解析を可能にする手法を環境 DNA メタバに適用しました。そして、定量化された各魚種の環境 DNA 濃度を、電気ショッカーを用いた捕獲調査で得られた個体数および生物量と比較し、魚類群集の定量的モニタリング手法としての qMiSeq 法の有用性を検証しました。

(研究手法)

本研究では、4つの河川（横道川、久兼川、福地川、猪野川）の合計 21 地点で環境 DNA の回収のための採水と、それに続く電気ショッカーを用いた魚類の捕獲調査を行いました。採水は各地点 1 L の表層水を汲み、フィルターで濾過をして DNA を集めました。捕獲調査では、各地点 3 ライン上で電気ショックを与え、痺れた個体を網で回収して魚種ごとに個体数と総重量を記録しました（図 1a）。

実験室にて、フィルター上に捕捉された環境 DNA を抽出し、魚類の DNA を網羅的に増幅する MiFish-U プライマー（Miya et al. 2015）を用いた PCR を行いました。PCR の際には、3 段階の異なる濃度に調整した内部標準 DNA を試料に添加し、魚類の DNA と同時に増幅しました。増幅した DNA の配列をハイスループットシーケンサー^{*3}で決定し、試料ごとに内部標準 DNA の各添加濃度と得られたリード数に基づく検量線を作成しました。得られた検量線を用い、試料ごとに検出された各魚類 DNA のリード数を DNA 濃度に換算し、捕獲調査の結果（各種の個体数と生物量）と比較しました（図 1b）。

(研究成果)

qMiSeq 法によって定量化された各種の環境 DNA 濃度と、電気ショッカーを用いた捕獲

調査の結果を地点ごとに比較したところ、個体数と生物量の両方で DNA 濃度と有意な正の関係が見られました。さらに、地点間で検出頻度の高かった 11 種について、試料ごとに定量された DNA 濃度と捕獲データを種ごとに集めて比較したところ、7 種で個体数および生物量、またはどちらか一方との間に有意な関係が見られました (図 2)。これらの結果は、qMiSeq 法を環境 DNA メタバに適用することにより、これまでの「どんな魚がいるか」に加え、それらが「どれだけいるか」という量的な情報を同時に得ることができることを示しています。

(今後の展望)

本研究の成果は、qMiSeq 法を用いた環境 DNA メタバが、魚類群集の定量的モニタリングに適した有用な手法となることを示唆しています。環境 DNA 調査は現地での環境試料の採取と一般的な DNA 分析技術のみを要するため、捕獲調査よりも省労力かつ短時間での調査が可能です。この手法により、広域多地点での定量的な生物多様性モニタリングが可能となり、生物多様性の変化をより詳細に理解するための貴重な情報の収集と蓄積に貢献することが期待されます。

参考図表

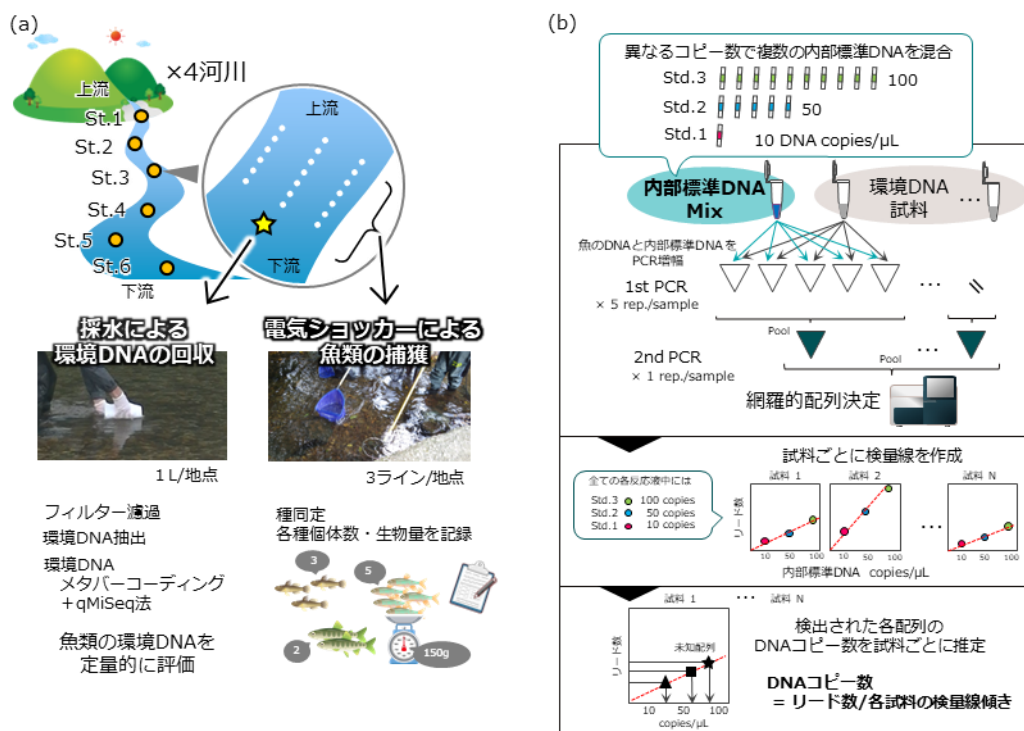


図 1. (a) 野外調査の概略 (b) qMiSeq 法の分析手順

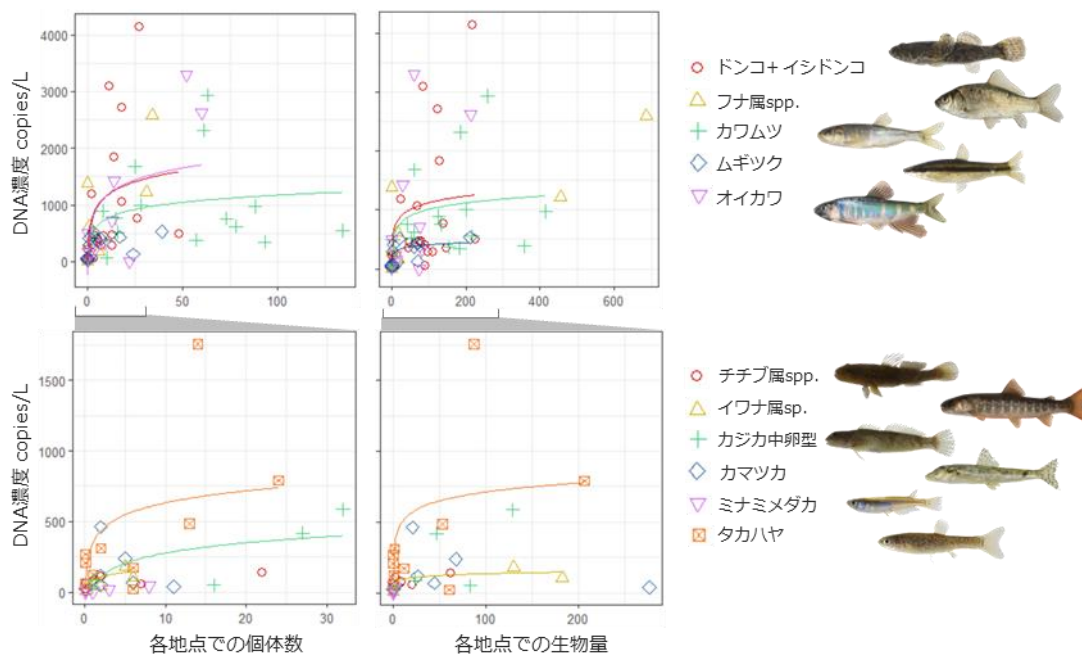


図 2. 地点間で検出頻度の高かった 11 種について、定量化された各種 DNA 濃度と捕獲データ（個体数および生物量）との関係。負の二項分布に基づく一般化線形モデル（GLM）の結果が有意 ($p < 0.05$) な種のみ、関係を実線で示した。

謝辞

本研究は、下記の研究助成を受けて行いました。

- ・公益財団法人河川財団 河川基金 (2019-5211-030)
- ・山口大学 YU プロジェクト
- ・日本工営共同研究講座

用語解説

1. 環境 DNA

生物が自身の生息環境中（水中や土壌中など）に放出した DNA 物質の総称。魚類の場合は、排泄物や粘液、表皮、精子などに由来する。

2. 環境 DNA メタバーコーディング（環境 DNA メタバ）

収集した環境 DNA 試料に含まれる解析対象の生物分類群（本研究では魚類）の DNA を増幅し、網羅的に配列を決定することで、調査地に生息していた対象分類群の種を網羅的に明らかにする解析技術。

3. ハイスループットシーケンサー

数十万から数千万本の DNA の塩基配列を同時に決定できる分析機器の総称。本研究ではハイスループットシーケンサーのひとつである iSeq(Illumina)を使用した。

引用文献

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., & Araki, H. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 150088.

Ushio, M., Murakami, H., Masuda, R., Sado, T., Miya, M., Sakurai, S., Yamanaka, H., Minamoto, T., & Kondoh, M. (2018). Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2, e23297. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.23297>