

水生昆虫のメタバーコーディングのための DNA データベースの拡充

山梨大学 学生会員 ○濱本 碧海 山梨大学 正会員 金子 栄廣
山梨大学 正会員 八重樫 咲子

1. はじめに

近年、水生昆虫の種同定の方法として DNA メタバーコーディングが注目されている。DNA メタバーコーディングとは、分析したい生物サンプルの体組織から DNA を抽出し、次世代シーケンス技術 (NGS) を用いて大量の DNA 塩基配列を一度に解析し、得られた配列データを既存の DNA データベースと照らし合わせることで、DNA の由来となった生物の分類群を同定する技術のことである。従来から行われてきた形態的特徴に基づく分類キーを頼りに種の同定を行う方法 (形態同定) に比べて、DNA メタバーコーディングでは機械的な種の同定ができる。そのため、同定作業の時間短縮や人件費の削減につながる可能性がある。また、形態同定では同定が難しかった若齢個体や、破損した個体であっても DNA 配列を頼りに種を同定することが可能となる。

しかし水生昆虫の種の同定に DNA メタバーコーディングを用いるには、DNA データベースの不足がボトルネックとなる。DNA メタバーコーディングを行う上で DNA データベースは必要不可欠である。しかし、2022 年時点で世界最大の DNA データベースである National Center for Biotechnology Information 上には、河川でよく見られる水生昆虫 EPT 種 (カワゲラ目、カゲロウ目、トビケラ目) の日本からの登録データはカワゲラ目で 51 属中 26 属、カゲロウ目で 38 属中 31 属、トビケラ目で 105 属中 72 属のみである。登録されているデータの種は偏りが見られ、網羅的な種のデータ登録には至っていない。EPT 種は日本に 900 種が存在していると言われているが、その多くの DNA 情報は未だ不足している。もし種の DNA 情報が存在したとしても、地域個体群間の変異が大きい場合には DNA メタバーコーディングで種の同定をすることは難しい。従って、DNA メタバーコーディングを利用した種同定のためには、様々な地域から得られた多様な種の DNA データを解読して DNA データベースを充実させる必要がある。

そこで本研究では、次世代シーケンサー (NGS) を利用して大量の水生昆虫の DNA データベースを構築する技術を開発することを目的とした。また、ここで得られた DNA データベースを実際の DNA メタバーコーディングに利用した場合の有用性の評価を行なった。

2. 研究方法

2-1 採集と形態同定

2018 年 5 月、8 月、11 月に山梨県甲府盆地内の 10 箇所 of 河川で底生生物の採集を行った。底生動物の採集はサーバーネット付きコドラートサンプラー (25cm x 25cm, メッシュサイズ 250 μ m) を用いた定量サンプリングと、D-フレームサンプリングネットを用いた定性サンプリングを行なった。採取したサンプルはプラスチックボトルに入れ、99.5%エタノールで液浸して 4 $^{\circ}$ C で保存した。

得られた底生動物は実態顕微鏡 (OLYMPUS SZ61) を用い、「日本産水生昆虫 科・属・種への検索 第二版」(河合&谷田 2018) および「河川生物の絵解き検索」(環境省 2017) に基づき可能な限り細かく形態同定を行った。その中から採集時期および分類群を網羅した 192 個体を DNA データベース用に取り出し、株式会社いであ、および、地域自然財産研究所の篠田授樹氏に依頼して分類を行なっていただいた。また、96 個体は科レベルで同定し、後述の Pooled DNA を用いた DNA バーコーディングに用いた。

2-2 DNA データベースの整備

192 個体 DNA を DNeasy Blood and Tissue kit 96 (Qiagen) を用いて抽出した。そして、これらの DNA を PCR グレードウォーターで 10 倍に希釈した。

ミトコンドリア DNA の Cytochrome Oxidase I (COI 領域) の PCR 増幅を行った。この領域は DNA バーコーディングでよく使われている領域である。PCR 反応液は、DNA グレードウォーター (ThermoFisher Science) を 4.95 μl , 10x ex Taq Buffer (TaKaRa) を 1 μl , 25mM MgCl_2 (TaKaRa) を 1.2 μl , 2.5mM dNTP (TaKaRa) を 0.8 μl , 10% Tween20 (関東化学) を 1 μl , TaKaRa Tag (TakaRa) を 0.05 μl , 10 倍希釈した DNA 1 μl , 0.5 μM の PCR プライマーである jgHCO¹⁾ および IntF²⁾ の混合液 1 μl を混ぜ、全 10 μl とした。この際、PCR プライマーそれぞれの 5' 末端部には 8bp の識別タグを付加し、全 48 種類の組み合わせの primer セットを作成した。このプライマーセットを用いて 48 個体ずつ 4 回の PCR を行った。PCR 反応には TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TAKARA) を用いた。PCR サイクルは、95°C で 3 分間加熱した後、95°C で 30 秒の熱変性、50°C で 30 秒のアニーリング、72°C で 30 秒の伸長反応をサイクル回数 35 回で行った。最後に 72°C で 5 分間の伸長反応を行い、4°C で保管した。

得られた PCR 産物は AMPure XP (BECKMAN COULTER) で精製し、株式会社生物技研に委託して MiSeq (Illumina) による解析を行なった。得られたデータは Qiime2 を用いて代表配列の作成を行い、各 primer に付与したタグを用いて整理することで 192 個体の DNA データベースを整備した。

2-3 Pooled DNA を利用した DNA バーコーディング

DNA メタバーコーディングに基づく水生昆虫の種多様性評価は、複数の昆虫サンプルを由来とする bulk DNA を用いることが想定できる。これによりサンプル数の多い水生昆虫の分野とも相性がよく、従来のように 1 サンプルずつ形態同定を行う必要はなく、大幅に労力や時間を削減できる可能性がある。

そこで、複数の水生昆虫から個別に抽出した DNA を混合した pooled DNA を 4 種類作成した。1 種類目の pooled DNA は、DNA データベースに用いた個体とは独立した 96 個体の DNA を等量ずつ混合して作成した。DNA は NucleoSpin DNA tissue kit (TaKaRa) を用いて抽出した。2-4 種類目の pooled DNA はそれぞれ DNA データベースに用いた個体を 48 個体、96 個体、192 個体分ずつ等量で混合することで作成した。

これらの Pooled DNA は DNA データベース作成時の PCR と同様の条件で増幅、精製、解読した。得られたデータは Qiime2 を用いてクオリティフィルタリングと代表配列の作成を行い、2-2 で作成した DNA データベースを利用して BLAST による DNA バーコーディングを行なった。最後に、各 pooled DNA の由来となった分類群のうち、検出できた分類群数を整理した。

3. 結果と考察

NGS 解析を行なった結果、DNA データベース用サンプルで 53751 配列から 60860 配列、Pooled DNA サンプルで平均 93082 配列から 98668 配列が得られた。今後、DNA データベースを整理して、Pooled DNA に対する DNA メタバーコーディングを行うことで、DNA データベースの整備の有用性を評価する。

参考文献

- 1) Geller, J. et al., Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys, *Molecular Ecology Resources*, 13, 851-861, 2013.
- 2) Leray, M. et al. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents, *Frontiers in Zoology*, 10, 34, 2013.

謝辞

本研究は科学研究費補助金 (番号: 19KK0107), 環境研究総合推進費 (5-2006) およびダイバーシティ研究環境イニシアティブ、山梨大学学術・社会変革研究プロジェクト、神奈川県環境科学センターからの資金援助を受けました。また、底生動物の同定にあたり、株式会社いであおよび地域自然財産研究所篠田授樹氏の協力を得ました。ここに謝意を表します。