

# 次世代 DNA シーケンシング解析に基づく水生昆虫タガメの餌資源の推定

愛媛大学大学院 正会員 渡辺幸三

愛媛大学 非会員 手古祥太

Berlin Center for Genomics in Biodiversity Research 非会員 Camila Mazzoni

Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries 非会員 Michael T Monaghan

## 1. はじめに

自然生態系は様々な人為影響を受けているが、特に生物の生息可能性と密接に関わる餌資源が劣化した場合には深刻なダメージを受ける。したがって、餌資源の健全性評価は、生態系保全における重要な課題となっている。今日、環境アセスメントなどにおいても、胃（腸管）内容物や糞内容物の顕微鏡観察、捕食行動の野外観察などの食性解析が活発に実施されており、これら解析技術の向上が期待されている。

本研究では、従来の食性解析が抱える評価の不確実性を解決する手法として、胃腸管内容物の DNA 分析に基づく食性解析法を新たに提案する。この方法では、まず胃腸管に含まれる雑多な餌生物の DNA を抽出し、マルチプレックス PCR で共通の DNA 領域を増幅する。そして、これら雑多な餌生物の PCR 産物の塩基配列を次世代 DNA シークエンサーで同時並行的に解読し、解読した配列データを国際 DNA データベースに照合して餌生物種を特定する。本研究では、餌を体外消化するため餌資源の推定が困難とされてきた淡水昆虫タガメ (*Naucoris* sp.) を対象に、DNA 技術を適用して餌資源を推定し、技術の有効性について検討した。

## 2. 方法

タガメ標本は 2009 年 8 月 10 日にアフリカのガーナ東区の Saduase 村付近の 1 か所のため池から採取し、60 個体を解剖して胃腸管を取出し、胃腸管を含むすべての内容組織から DNA を抽出した。そして、マルチプレックス PCR で 60 の DNA サンプルをまとめてミトコンドリア DNA の *CoxI* 領域 (672 塩基長) を増幅した。この PCR 産物を次世代シーケンサーの一つである Roche 454 Sequencer FLX System の 1/16 プレートを使って DNA 塩基配列を解読した。その結果、胃腸管内容物 DNA から 591 個の塩基配列が検出された。解読された配列の長さは、71 塩基長から 1164 塩基長の範囲で大きく変動していた。

検出された 591 個の塩基配列について、国際 DNA データベース GenBank にそれぞれ照合し、アプリケーション Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて、データバンク上でもっとも適合する種名（一部属名）を検索した。その結果、次世代シーケンシング解析で得られた塩基配列が短かった配列を中心に、海に生息しているスズキ目やタガメが捕食すると考えるのが難しい哺乳類のチンパンジーやイノシシ等が多く検索されるなど、信頼できない検索結果も一部見られた。

この問題を解決するために、胃腸管 DNA サンプルの塩基配列と DNA データベース上の塩基配列の一致塩基数にある基準値を与え、一致数が低いサンプルは信頼できない結果として削除することにした。試行的に様々な基準値に基づいて信頼できるサンプルを抽出した結果、250 塩基数よりも一致していた場合に生息地に生息している可能性が高い種が検索されることが多いことがわかった。したがって、この 250 塩基数を基準値として、基準に満たなかったサンプルデータは信頼できないデータとして以降の解析から除外した。

## 3. 結果

250 の一致塩基数の基準を満たす胃腸管内容物の配列数は 591 のうち 292 配列であった (表 1)。これら 292 配列から 14 の分類群名が特定された。11 分類群が種レベルで、残りの 3 分類群が属レベルで分類群名が推定された。内訳はタガメ 1 種、トンボ目 7 分類群、カゲロウ目 4 分類群、カ科 1 種、ハエ目 1 種であった。292 個の塩基配列データのうち、137 (46.9%) はタガメ、130 (44.5%) はトンボ目の分類群であった。

#### 4. 考察

胃腸管内容物から検索された DNA 配列は、データベース上のタガメと最も類似する配列が繰り返し検索された。これは、捕食者の胃腸管組織から抽出された DNA が次世代シーケンシング解析によって検出された結果として考えられ、妥当な分析結果となったものとして理解される。タガメそのものの DNA が検出されたことは、タガメの食性を評価する上で重要な知見を与えるものではないが、DNA 抽出や次世代シーケンシング解析などの一連の実験が精度良く行われた証拠となっている。また、タガメの次に繰り返し多くの配列が検出されたのはトンボ目の 7 分類群であった。トンボ目のほとんどの幼虫は今回タガメサンプルを採取したため池のような止水性淡水域が最適な生息場となっており、高密度で生息する場合もある。したがって、トンボの DNA がタガメの胃腸管内容物から多く検出された結果は、調査地で生息していることが予想される潜在的な餌生物（トンボ）から考えて、妥当な結果であったと考えられる。

#### 5. おわりに

本研究で次世代 DNA シーケンスを利用して生物の胃腸管から餌資源を世界で初めて推定することに成功した。タガメが調査地のため池に生息しているトンボ目を多く捕食している結果から、本手法は信頼性が高いものと考えられる。本手法は、タガメに限らず、陸上生物を含めた動物全般に汎用的に適用しうる技術となりえる。従来の食性解析では正確な餌資源を推定できなかったり、調査分析に多くの時間と費用が必要だった問題を解決する新技術として、環境アセスメントなどの現場で広く普及されることが期待される。

#### 6. 謝辞

本研究は、科学研究費補助金 基盤研究 A（21254003）、基盤研究 B（22360192）研究活動スタート支援（24860045）の援助を受けて行われました。ここにこれを記し、深く感謝の意を表します。

表 1 BLAST 解析結果。Taxon が種名、Identities がサンプルの DNA 配列情報とデータベースの配列情報との一致率、Query がサンプル DNA の塩基配列の長さ、length がデータベース上の塩基配列の長さ、N (Number of reads) が塩基配列のデータ数、GenBank Accession がデータベース上の登録番号を表している。

| 分類群名                          |        | Identities | Query   | length  | N   | GenBank Accession |
|-------------------------------|--------|------------|---------|---------|-----|-------------------|
| <i>Naucoris</i> sp.           | 半翅目の一種 | 73-98%     | 271-499 | 302-529 | 137 | FN263067          |
| <i>Anopheles braziliensis</i> | カ科     | 75-77%     | 265-267 | 347-352 | 2   | DQ913857          |
| <i>Baetis baksan</i>          | カゲロウ目  | 78-81%     | 340-405 | 421-508 | 4   | JN164290          |
| <i>Cetoptilum minor</i>       | 〃      | 80-81%     | 404-427 | 498-535 | 3   | JQ662700          |
| <i>Labobaetis tricolor</i>    | 〃      | 73-83%     | 361-410 | 439-524 | 14  | JN164313          |
| <i>Proclonia</i> sp.          | 〃      | 73%        | 421     | 575     | 1   | JQ662920          |
| <i>Agriocnemis femina</i>     | トンボ目   | 75-84%     | 372-396 | 457-512 | 14  | AB708461          |
| <i>Agriocnemis pygmaea</i>    | 〃      | 76-90%     | 265-399 | 316-488 | 78  | AB708464          |
| <i>Bradinopyga geminata</i>   |        | 80-85%     | 332-457 | 413-539 | 2   | JN817424          |
| <i>Gomphidae</i> sp.          | 〃      | 81-86%     | 429-453 | 519-536 | 18  | JN419778          |
| <i>Ischnura heterosticta</i>  | 〃      | 80-86%     | 425-451 | 521-537 | 15  | FJ812817          |
| <i>Libellula cyanea</i>       | 〃      | 84%        | 254     | 301     | 1   | AF195739          |
| <i>Trithemis furva</i>        | 〃      | 73-80%     | 447-448 | 558-611 | 2   | FJ358481          |
| <i>Drosophila hypocausta</i>  | ハエ目    | 74%        | 255     | 346     | 1   | EU493585          |
| 合計                            |        |            |         |         | 292 |                   |