

次世代 DNA シーケンシングを用いた河川底生動物群集の 種多様性評価技術の開発

愛媛大学大学院 学生会員 ○泉昂佑 愛媛大学大学院 非会員 Maribet Gamboa
愛媛大学大学院 正会員 三宅洋 愛媛大学大学院 正会員 渡辺幸三

1. はじめに

今日、顕微鏡を用いる形態同定に基づいて種多様性が評価されている。しかし、形態が崩れていると同定が困難である。種の同定基準は細かいため、作業に時間と人件費がかかり、更に誤同定リスクの問題がある。従来法に代わり、種間で異なる DNA 塩基配列情報を使って種同定する方法が注目されている。これは専門家が同定した標本と未知のサンプルの DNA 塩基配列を比較し、最も類似する種を同定結果とする方法で、DNA バーコーディングと呼ばれる。

群集サンプルの DNA 配列はアンプリコン解析によって迅速に得られる。まず、鋳型 DNA の目的領域を PCR 増幅する。増幅した DNA 断片をアンプリコンと言い、シーケンス解析で DNA 配列が解読される。次世代シーケンサーの導入で、従来のサンガー法では困難だった大量の個体を同時並行で解析することが可能になった¹⁾。また、生物群集サンプルを一つの容器の中ですり潰し、複数個体の DNA 断片をマルチプレックス PCR 増幅することで、試薬コストが減少し時間の短縮につながった。

本研究は、大量の群集サンプルの DNA 配列を一度に解析できる次世代シーケンスによって、流域スケールで種多様性を評価することを目的としている。従来の形態学的手法で評価された種多様性との比較、および形態同定された個体数と次世代シーケンス解析で得られた配列数を比較した。

2. 方法

2012 年 8 月 6 日、愛媛県の重信川本流 10 地点でサーバーネット（コードラート 25cm×25cm、目合い 0.36 mm²）を用いて底生動物を採取した（図 1）。実体顕微鏡（×112.5）と日本産水生昆虫図鑑を用いて同定した。調査地点ごとの群集サンプルをまとめてすり潰し、DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) で DNA を抽出した。ミトコンドリア DNA の Cytochrome c Oxidase subunit I (COI) 領域の 658 塩基長をマルチプレックス PCR で増幅した。種を特定しやすくするため、1 リードあたりの平均読み取り塩基長が長い 454 GS FLX システムで DNA 配列を解読した。

DNA バーコーディングでは、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) で種を検索した。サンプルの DNA 配列と国際 DNA データベース上の DNA 配列間で類似度が最も高い結果を検索するソフトである。しかし、サンプルの DNA 配列が短いと本来特定されるはずの種以外が検出される可能性がある。そこで、DNA 配列間の塩基一致数に 250 という閾値を設定し、条件を満たす場合にその種であるとした。

3. 結果

形態同定の結果、重信川流域では 8,921 個体から 64 分類群が発見された。個体数が最も多い分類群は 3,144 個体のユスリカ亜科だった。次世代シーケンス解析で 165,508 配列が得られた。その内、DNA バーコーディングで種同定されたのは 77,453 配列で 669 種が特定された（表 1）。最も多く検出された科は 96 種 (35,382 配列) のユスリカ科だった。

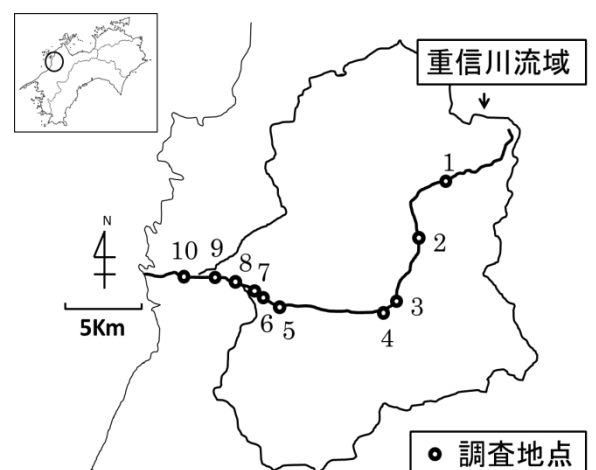


図 1 調査地点図（数字は調査地点名）

形態同定では 64 分類群（1 綱，4 目，2 科，4 亜科，16 属，37 種）に分類されたが，DNA データベースに未登録の種がいるため，34 分類群（1 綱，3 目，30 科）にまとめた．DNA バーコーディングの種同定の結果が 34 分類群に属するのは 62,725 配列だった．個体数と DNA 配列数に正の相関が見られた（図 2）．しかし，34 分類群中 9 分類群の DNA 配列が検出されなかった．

4. 考察

体サイズが小さい生物，特に幼虫は形態学的同定が困難である．DNA バーコーディングで種まで特定されたため，形態同定より分類群数が多く評価された．ただし，St. 10 で 165 個体から 168 種が検出されてしまっている．シーケンスエラーによって本来特定されるはずの種以外が検出されたか，別の調査地点のサンプル DNA が混入した可能性が考えられる．

生物量が大きいほど鋳型 DNA 量が多くなるため，PCR 増幅する DNA 断片が増える．よって，シーケンス解析で得られる DNA 配列数が多くなる²⁾．生物量が小さいと PCR 増幅が上手くいかず，DNA 配列が得られない場合があった．先行研究のバクテリアを対象とした次世代シーケンス解析は，個体数の定量化に難があり DNA 配列数に相関がなく，本研究で相関を示したのは世界初の発見である．形態同定せず，群集サンプル中の個体数を評価出来る可能性を示唆している．

5. おわりに

本研究で，次世代 DNA シーケンシング解析を用いて，愛媛県重信川で採取した底生動物群集サンプルの種多様性を迅速に評価できた．今後，生物量が小さな種の DNA 配列を検出できる方法を見つけたい．

表 1 採取した底生動物の個体数，次世代シーケンスによって得られた DNA 配列数，および形態学的手法と DNA バーコーディングで同定された分類群数

調査地点	個体数	配列数	分類群数	
			形態同定 (従来法)	DNA (本研究)
St. 1	624	18,867	9	67
St. 2	270	31,300	11	141
St. 3	248	8,593	15	176
St. 4	596	15,033	18	114
St. 5	1,421	12,598	22	253
St. 6	1,131	31,291	22	219
St. 7	600	17,510	29	242
St. 8	2,979	10,626	36	165
St. 9	887	8,784	29	125
St. 10	165	10,906	32	168
合計	8,921	165,508	64	669

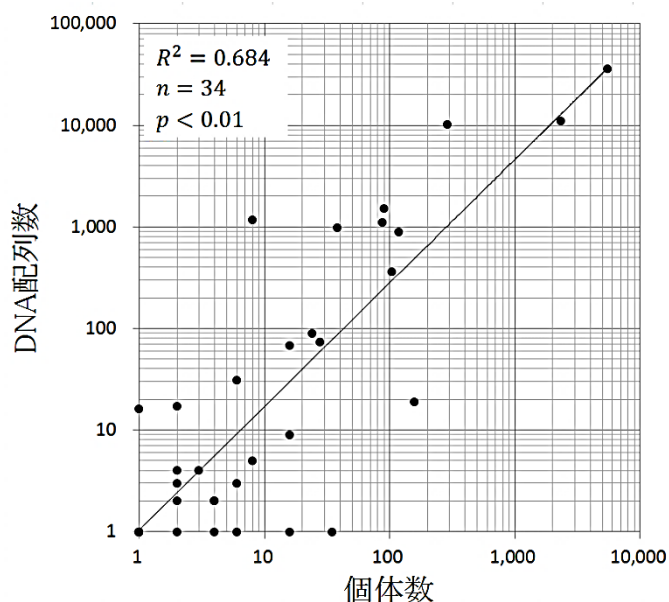


図 2 形態学的手法と DNA バーコーディングで同定された個体数と DNA 配列数の相関

6. 参考文献

- 1) Thudi, M. *et al.* (2012) Briefings in Functional Genomics, 11, elr045, 3-1
- 2) Andersen, J. C., & Mills, N. J. (2012) PLoS ONE, 7(10), e45549