

次世代 DNA シーケンシングと DNA 種分類法を用いた 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、顕微鏡を用いた形態同定に基づいて種多様性が評価されている。しかし、形態の特徴が類似している事や小型であるために種まで同定するのは困難で作業に時間がかかる。同定作業の迅速化を図るために、DNA 配列に基づいた分類法が有効である。サンプルから得られた DNA 配列とデータベースに登録された DNA 配列を比較し種同定する方法を DNA バーコーディングと言う。しかし、データベースに登録されていない種の場合同定が失敗する。このような背景から、採取したサンプルの DNA 塩基配列のみを用いて、進化理論に基づき種を定義する Poisson Tree Processes (PTP) モデルが開発された¹⁾。これは種間の塩基置換数が種内より著しく大きいという仮定により、進化系統樹上の枝分かれの分岐率が著しく変化する種の境界を推定するモデルである。

採取された生物群集サンプルの DNA 塩基配列は、次世代シーケンシング (NGS) によって迅速に得られる。この際、鋳型 DNA の目的領域だけを増幅させる PCR 反応によって検出や解析を容易にしている。生物群集サンプルを一つの容器の中ですり潰した DNA ミックスを用意して PCR 増幅することで、試薬コストの減少と時間短縮につながった。

DNA 塩基配列に基づいて種を定義する PTP モデルを活用し、大量の生物群集サンプルを一度に解析できる NGS 解析と組み合わせることで、広域スケールでの種多様性を評価した。

2. 方法

2012 年 8 月、愛媛県の重信川本流 10 地点でサーバーネット (コドラート 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可能な限り下位の分類階級まで同定した。調査地点ごとにサンプルを混合・均一化し、DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) で DNA 抽出した。ミトコンドリア DNA の COI 領域 (658 塩基長) を PCR 増幅し、454 GS FLX システム (Roche Diagnostics) で DNA 配列を解読した。DNA バーコーディングは Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて種同定した。しかし、サンプルの DNA 配列が短いと誤検出の可能性があるので、300 塩基長以上の場合にその種であるとした。PTP モデルによって推定された種数と比較した。

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 (1 綱, 4 目, 2 科, 4 亜科, 16 属, 37 種) 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。NGS 解析で得られた 165,508 配列の内、DNA バーコーディングで同定されたのは 39,337 配列で 128 種が同定された (表 1)。最も多く検出された科は 43 種 (23,137 配列) のユスリカ科だった。DNA バーコーディングで同定された各地点の種数は PTP で推定された種数と近い値を示した (表 1)。

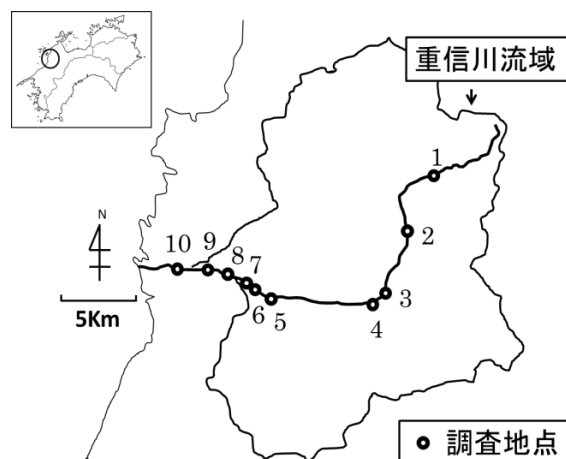


図 1 調査地点図

形態同定された 64 分類群にデータベース未登録の分類群があったため、34 分類群（1 綱，3 目，30 科）にまとめた。その内、DNA バーコーディングで同定されたのは 17 分類群（37,197 配列）だった。各分類群における個体数と DNA 配列数に正の相関が見られた（図 2）。

4. 考察

小型の生物，特に幼虫は形態学的同定が困難であるが，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。個体数が多いほど鋳型 DNA 量が多くなるため，NGS 解析で得られる DNA 配列数が多くなる。しかし，種ごとに異なる体サイズと PCR プライマーの相性によって個体数と DNA 配列数の相関は失われるとされている。線形動物を対象生物にした NGS 解析で個体数と DNA 配列数の相関を示した研究はあるが²⁾，流域スケールで採取された底生動物群集サンプルにおいて相関を示したのは本研究が初である。DNA バーコーディングと PTP の種数が近い数字を示したが，DNA バーコーディングの種同定の結果には日本に生息していない種が含まれていた。データベースに登録されていないため，国外の類似種が誤って検出されたと考えられる。

5. おわりに

本研究で，次世代 DNA シークエンシングを用いて，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。

表 1 採取した底生動物の個体数，DNA 配列数
および，形態学的手法，DNA バーコーディング，
PTP 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	DNA	PTP
St. 1	624	6,685	9	14	16
St. 2	270	7,484	11	28	33
St. 3	248	2,010	15	35	31
St. 4	596	1,660	18	27	25
St. 5	1,421	1,614	22	53	42
St. 6	1,131	8,100	22	51	44
St. 7	600	3,082	29	49	40
St. 8	2,979	3,078	36	42	40
St. 9	887	2,929	29	38	36
St. 10	165	2,695	32	40	41
合計	8,921	39,337	64	128	127

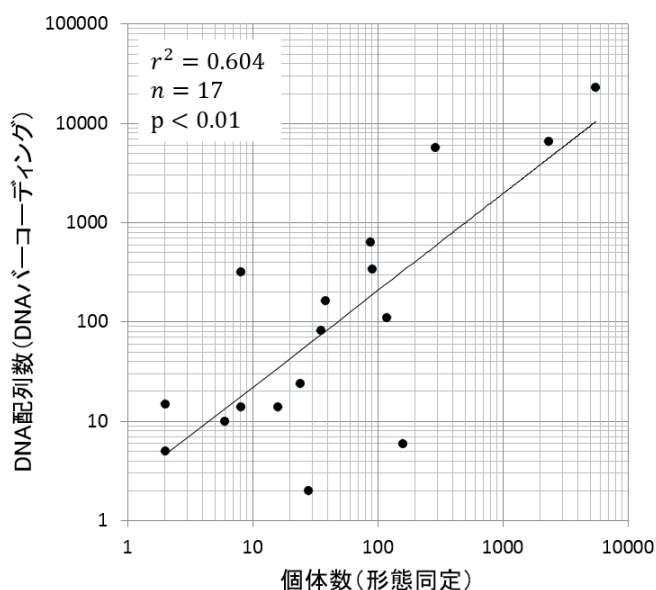


図 2 各分類群の個体数と DNA 配列数の相関

6. 参考文献

- 1) Zhang J *et al.* (2013), A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements, *Bioinformatics*, 29, 2869-2876
- 2) Porazinska DL *et al.* (2010), Reproducibility of read numbers in high-throughput sequencing analysis of nematode community composition and structure, *Molecular Ecology Resources*, 10, 666-676