

第5回研究助成

北の海に未知なる生命と生物多様性を探る

プロジェクトリーダー

荒木仁志 北海道大学

プロジェクトメンバー

宮 正樹 千葉県立中央博物館

池田 実 東北大学

矢部 衛 北海道大学



波も凍る知床の海で採水調査中の荒木(上)と学生(下) (写真提供:阿部幹雄)

1. 研究の背景と達成目標

生物多様性の重要性が世界規模で叫ばれる一方、680万種ともいわれる世界の動物種の把握は困難を極め、人知が及ぶのはそのうちわずか2割程度、水圏生物に至ってはその殆どに関して正確な実態が掴めていないのが現状である。本研究では、野生生物調査の大きな障壁となっている「生物個体の捕獲」に依らない革新的な野生生物検出手法を開発し、一般に多様性が低いとされている北方海洋域に未知なる生命の可能性と生物多様性を探る。具体的達成目標は以下の通りである。

- ① 北太平洋において網羅的な採水を計30地点で実施し、これら水サンプルから抽出した環境DNAをq-PCR法、およびメタバーコーディング法により解析する。
- ② 魚類全体をカバーするユニバーサルプライマーの開発を行い、上記サンプルから生物群集構造を解明する。
- ③ Ion PGM シーケンサーを用いた1分子DNA単離解読技術を開発する。
- ④ メタバーコーディング法で解析された魚類相情報を照合するため、仮査定バウチャー標本のスクリーニングとDNA解析により大幅なリファレンスデータベース拡充を図る。
- ⑤ 環境DNAにより位置情報が得られた未記載種・隠ぺい種を入手し、新種記載の可能性を探る。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

・環境DNAメタバーコーディング技術の開発

本研究プロジェクトではこれまでの対象種指定型の環境DNAツールと違い、事前に生物情報がない水圏においてもその魚類相を網羅的に推定することが可能な新規環境DNA解析ツール「MiFish」を開発した。その精度検証のために行った美ら海水族館での実験では、黒潮大水槽等を含む大小の水槽の水を汲んでMiFish解析を行い、実に9割以上もの魚種を僅かバケツ1杯ほどの水から検出するなど、予想を大きく上回る精度を確認することが出来た。この技術は様々な省庁や地方自治体に注目されており、汎用化によりこれまで捕獲に頼っていた希少種・外来種の検出はもちろん、水産有用種などの資源量推定にも革新的な効率化が期待されている。

・環境DNAを用いた北太平洋沿岸・外洋における魚類相推定

日本沿岸をはじめ、ベーリング海やアメリカ西海岸における計50地点での採水調査を実施し、本研究プロジェクトにより開発された新規環境DNAツール「MiFish」を用いた解析に供した。その結果、北太平洋域は水域ごとの魚類種数こそ南方沿岸域と比べれば少ないものの、水域間で多様な魚類相を形成していることが分かってきた。また、アマモ場などの魚類生息に好適な水域では局所的に多くの魚種が検出され、それぞれの水域の特性が魚類の種数やその構成に大きく寄与していることも明らかにした。更に水深の異なる水サンプルを用いることで、各層における魚類相の違いも本技術で推定できることが期待されている。

・魚類ミトゲノムリファレンスデータベースの拡充

本プロジェクトを中心とするミトゲノム情報の解析と集約により、上記MiFish解析に必要な魚種ごとのDNA塩基配列リファレンスデータベースはここ数年で5倍以上拡充された。これにより、これまでデータ欠損により種判別が曖昧となっていた多くの魚種についても、環境DNAを用いてよりの確に種判別が出来るようになった。

3. 研究成果

「バケツ一杯の水から生態系を読み解く」ー水圏生物における環境 DNA 研究は、そのような夢物語に端を発した。環境 DNA 技術がその萌芽期にあった 2014 年、この技術を用いた生命探索を謳った本プロジェクトが「理想の追求」というキヤノン財団研究助成に採択されたのも、この夢物語と無縁ではない。

しかしながら、生物が環境媒体に放出する DNA を解析して持ち主となる生物の情報を得る「環境 DNA」という技術は当時、まだその存在すら殆ど知られておらず、大きな可能性と共に多くの不確定性要素や問題点を内包していた。まずもって野外の環境媒体としての海洋水から何らかの DNA が見つかったとしてもその持ち主を特定する手段(=正解となる DNA 情報)が限られていたし、どの程度の時空間スケールの生物がその DNA を供給しているのか、当時は見当もついていなかった。「バケツ一杯の水から生態系を読み解く」ために必要とされていたのは、これらの不確定要素を一つ一つ検証していくことであった。

我々はまず、既知の魚類の DNA 情報を基に、環境 DNA アンプリコン解析に最適な遺伝子領域の選定を行った。ここで求められる主要条件は以下のとおりである。

- ① 環境 DNA は持ち主から離れると断片化されると考えられるため、検出には短い DNA 配列が必要である
- ② その短い DNA 断片中に各魚種を特定し得るユニークな DNA 配列情報を含む
- ③ 各種の DNA を取りこぼしなく増幅するため、上記 DNA 配列の両端に魚種普遍的な配列を含む

このような試みに前例が無いわけではなかったが、本プロジェクト以前はその精度が低く、実用段階とは言い難かった。そこで、プロジェクトメンバーの宮らを中心にミトコンドリアゲノム領域の再検証を進め、これまで環境 DNA アンプリコン解析には用いられてこなかった 12S と呼ばれる遺伝子領域を標的にした DNA 配列増幅を試みた。

MiFish と命名したこのプライマーは、約千種の魚類 DNA データベースから得られた DNA 配列を基に 12S 遺伝子の超可変領域に設計された。その予想断片長は 163-185bp ほどだが、超可変領域には高度の種特異性が見られ、理論上は上記の条件を十分に満たしうるものだった。その実効性と精度を検証するため、我々は巨大水槽を有し、そこに含まれる魚種が正確に把握されている美ら海水族館(沖縄)の協力の下、黒潮大水槽・熱帯魚水槽・深海魚水槽・マングローブ水槽の 4 水槽から飼育水を採水、ろ過・DNA 抽出・DNA 増幅を経て MiFish を用いた環境 DNA 解析実験を行った(Miya et al. 2015、図1)。

様々な条件調整の後、次世代シーケンサー MiSeq (illumina 社) を用いたアンプリコン解析を行った。その結果、430 万以上の有用 DNA リード(飼育水由来の 12S 遺伝子増幅断片)が得られた。そのうち 9 割以上の DNA が予想通り 4 水槽で飼育されている魚種由来だったが、特筆すべきはその内訳である。180 の検出可能飼育種(当時の DNA データベースに登録のあった飼育魚種)のうち、実に 168 種(93.3%)がこれらの DNA リードに含まれていた(表1)。空間的制約のある水槽とはいえ、元はと言えば水をすくっただけでここまで詳細に生息魚種が判明することは、この技術に高い期待をかけていた我々自身にとっても大変衝撃的で、MiFish プライマーの高い実効性と精度を示して余りある結果となった。ちなみに、この実験で検出された 1 割弱の DNA は飼育魚以外に由来することになるが、これらの由来については未だに明確な原因が掴めていない。おそらく飼育時に使用される餌由来の DNA や実験中のコンタミネーションなど、複数の由来に因るものと考えられるが、これらは環境 DNA アンプリコン解析の想像を超える高い感度の代償とも言える。今後これらのノイズを最小化し、生息魚種由来の DNA のみをどうやって判別するかが本技術の有用性・発展性を左右するものと考えられる。

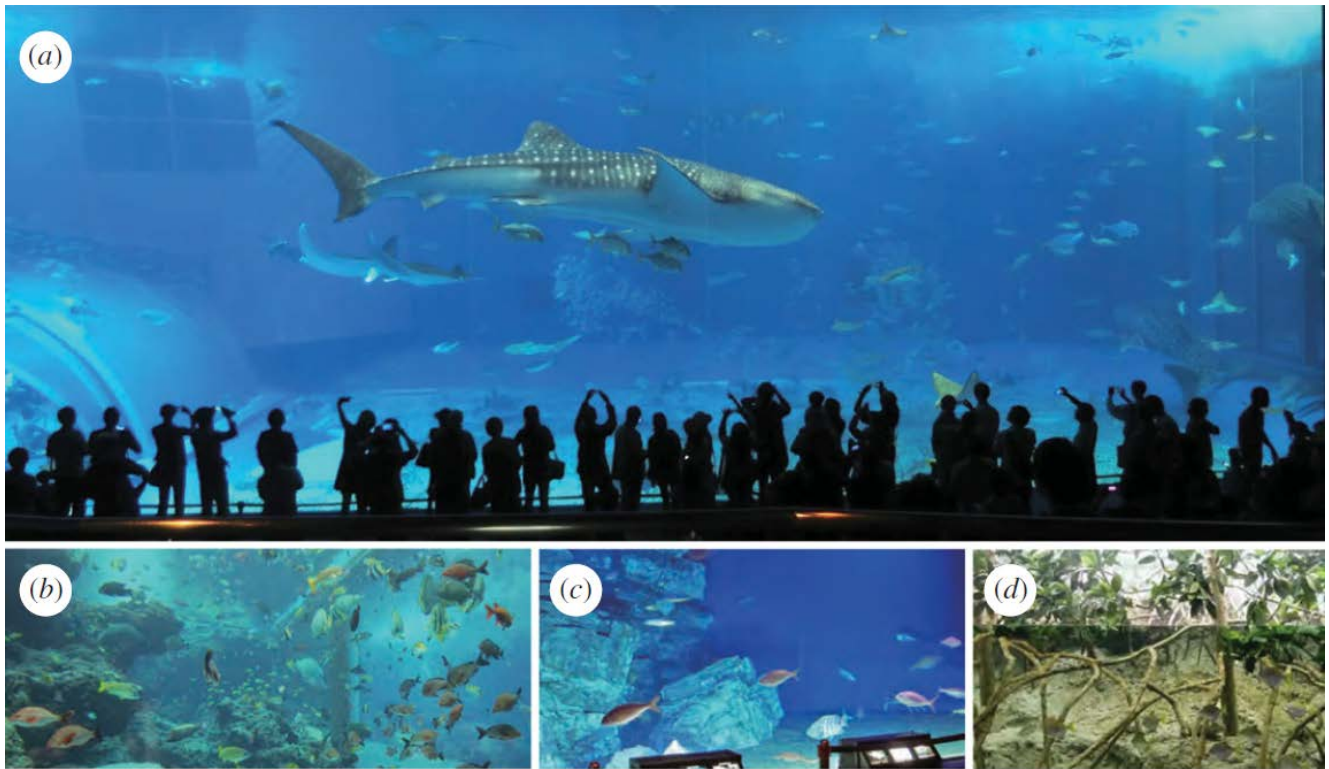


図1 美ら海水族館で採水を行った4水槽
 (a)黒潮大水槽、(b)熱帯魚水槽、(c)深海魚水槽、(d)マングローブ水槽。(Miya et al. 2015 より抜粋)

number of reads ^a	total	Kuroshio	tropical fish	deep-sea	mangrove
more than or equal to 97% identity with reference sequences (number of libraries)	4 322 882 (14)	2 568 008 (5)	1 299 788 (4)	259 191 (3)	212 643 (2)
tank fish	4 053 184 (93.4%)	2 375 892 (92.5%)	1 237 546 (95.2%)	245 201 (94.6%)	194 545 (91.5%)
non-tank fish	286 446 (6.6%)	192 116 (7.5%)	62 242 (4.8%)	13 990 (5.4%)	18 098 (8.5%)
number of tank species	249	75	159	15	8
number of tank species with reference sequences	180	63	105	13	8
number of tank species detected in MiSeq analysis	168 (93.3%)	61 (96.8%)	95 (90.5%)	13 (100%)	8 (100%)
water volumes of tank (m ³)	8465	7500	700	230	35.6

^aThose reads with less than 97% sequence identity are excluded from the above table for simplicity. They are 285 172 reads in total; 57 572 reads from the Kuroshio, 222 897 reads from the tropical fish, 1093 reads from the deep-sea and 3610 reads from the mangrove tanks, respectively.

表1 美ら海水族館で採水を行った4水槽より検出されたDNAリード数とその内訳。(Miya et al. 2015 より引用)

上記の実験で明らかになったことは、MiFish プライマーを用いた環境 DNA アンプリコン解析の実効性、その高い感度の代償としての高いコンタミネーションリスクという留意点であった。次のステップとして野外検証を試みることになるが、そこには通常、正解がない。そこで我々は同じく環境 DNA 研究を推進する京大・神戸大・龍谷大などの研究者らと共同で、京都・舞鶴湾における環境 DNA 調査を行うことにした。舞鶴湾においては過去 14 年に渡り潜水による定期目視調査が実施されており、湾内の魚類分布が詳細に記録されていたためである。

我々はまず、調査船を用いて約 6 時間、湾内 47 地点(約 11km²)での採水調査を行った。その結果、潜水目視調査で検出されていた魚種の 6 割以上が検出されたほか、淡水魚を含めて 23 種の「潜水目視調査では確認されていない魚」も検出された(Yamamoto et al. 2017、図 2)。またこのサンプルを用いた追加解析では、各地点での検出魚種が周囲数百メートルの範囲に生息していた可能性が高いことが示唆されており(Yamamoto et al. 2016)、本プロジェクトで採水した北太平洋の沿岸域からも予想を超える感度での魚類相解明が進みつつある。

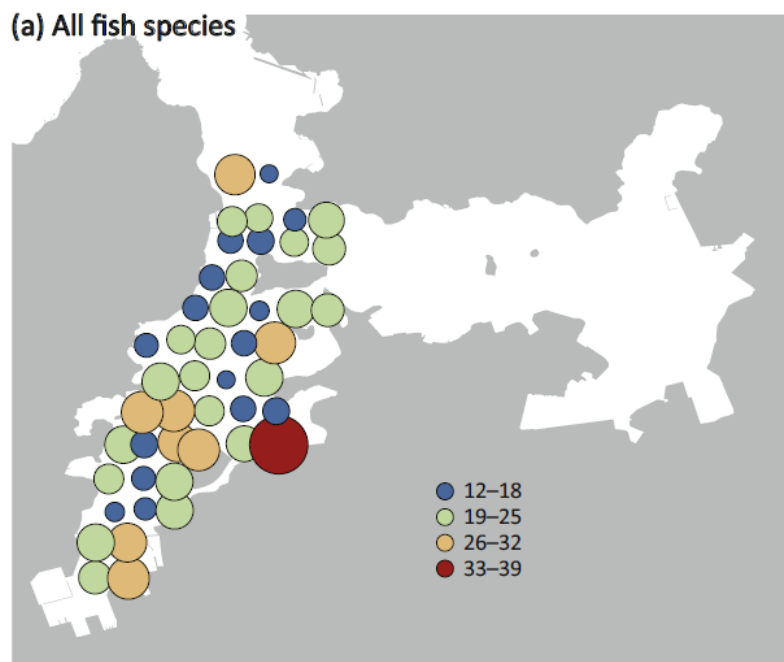


図 2 舞鶴湾の環境 DNA 調査で検出された魚種数とその分布。(Yamamoto et al. 2017 より抜粋)

加えて環境 DNA 技術の検証・実践で明らかになったことの一つが「DNA リファレンスデータベースの重要性」である。言うまでもなく、如何にこの技術が高感度で生息種由来の DNA を検出したとしても、その持ち主が分からなければ意味を成さない。そのため、我々は既存のミトコンドリアゲノム DNA データベース「MitoFish」の大幅な拡充を行った。北大水産学部の協力の下、未査定標本を含む個体・組織標本から DNA を抽出し、持ち主を特定するための解析を行ったのである。本プロジェクトを中心とした国際協力により、このデータベースはこの 4 年間で該当 DNA 配列の登録が約 5 倍に増え、現在では 7000 種以上の魚の環境 DNA アンプリコン解析が可能となっている。

4. 今後の展開

環境 DNA 研究は今、その隆盛期に入ったといえる。生態学系の学会ではもはやこの単語を聞かぬ日はなく、各省庁や地方自治体でもこの技術を社会実装し、効率的かつ効果的に生物多様性の現状を把握しようと盛んに議論されるようになりつつある。殊水圏生物に関して、環境 DNA 研究初期に本プロジェクトで開発された技術

が果たした役割は大きい。今年度にはこの技術の更なる発展を期して環境 DNA 学会を設立、日本発の技術を世界規模での生物多様性モニタリング技術へと標準化することも視野に入れつつある。その技術進展は目覚ましく、絶滅危惧種の分布推定などへの応用はもちろん(Mizumoto et al. 2018)、今後世界自然遺産・知床や深海など、人知の及ばない領域への応用と未知なる生命の発見や生態解明に中心的な役割を担うことが期待される。

5. 発表実績

【論文発表・出版】

- 1) M. Miya, Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J.Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh, and W. Iwasaki. *Royal Society Open Science* 2:150088 (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species.
- 2) S. Yamamoto, K. Minami, K. Fukaya, K. Takahashi, H. Sawada, H. Murakami, S. Tsuji, H. Hashizume, S. Kubonaga, T. Horiuchi, M. Hongo, J. Nishida, Y. Okugawa, A. Fujiwara, M. Fukuda, S. Hidaka, K.W. Suzuki, M. Miya, H. Araki, H. Yamanaka, A. Maruyama, K. Miyashita, R. Masuda, T. Minamoto and M. Kondoh. *PLoS One* 11:e0149786 (2016) Environmental DNA as a ‘Snapshot’ of fish distribution: a case study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan.
- 3) S. Yamamoto, R. Masuda, Y. Sato, H. Araki, M. Kondoh, T. Minamoto and M. Miya. *Scientific Reports* 7:40368 (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea.
- 4) H. Mizumoto, H. Urabe, T. Kanbe, M. Fukushima and H. Araki. *Limnology* 19:219-227 (2018) Establishing an Environmental DNA Method to Detect and Estimate the Biomass of Sakhalin taimen, a Critically Endangered Asian Salmonid
- 5) 荒木、宮、池田、矢部 「北の海に未知なる生命を求めて –環境 DNA の挑戦」(日本生態学会北海道地区会 編 「生物学者、地球に行く」 pp.24-31、2018)
- 6) 宮 「魚類環境 DNA メタバーコーディング:新たな技術開発がもたらす革新的な魚類群集調査法」(生物研究社「海洋と生物」234 号 pp.9-16、2018)
- 7) 荒木、水本 「環境 DNA を通して観る北海道の水圏生物」(生物研究社「海洋と生物」234 号 pp.35-39、2018)

【学会・シンポジウム講演】

- 1) 荒木、神戸、鎌田、源、佐藤、宮、第63回日本生態学会 企画集会「環境 DNA が開く、生態学の未来」(2016、仙台) 環境 DNA 研究の実践と課題
- 2) H. ARAKI, International Symposium “Promotion of global network studies on seagrass ecosystem based on innovative new technology” (2018、東京) Environmental DNA as a monitoring tool for aquatic biodiversity
- 3) 荒木、神戸、水本、鎌田、佐藤、平成 30 年度日本水産学会春季大会シンポジウム第 47 回北洋研究シンポジウム(2018、函館) 環境 DNA によるサケの資源・生態研究