

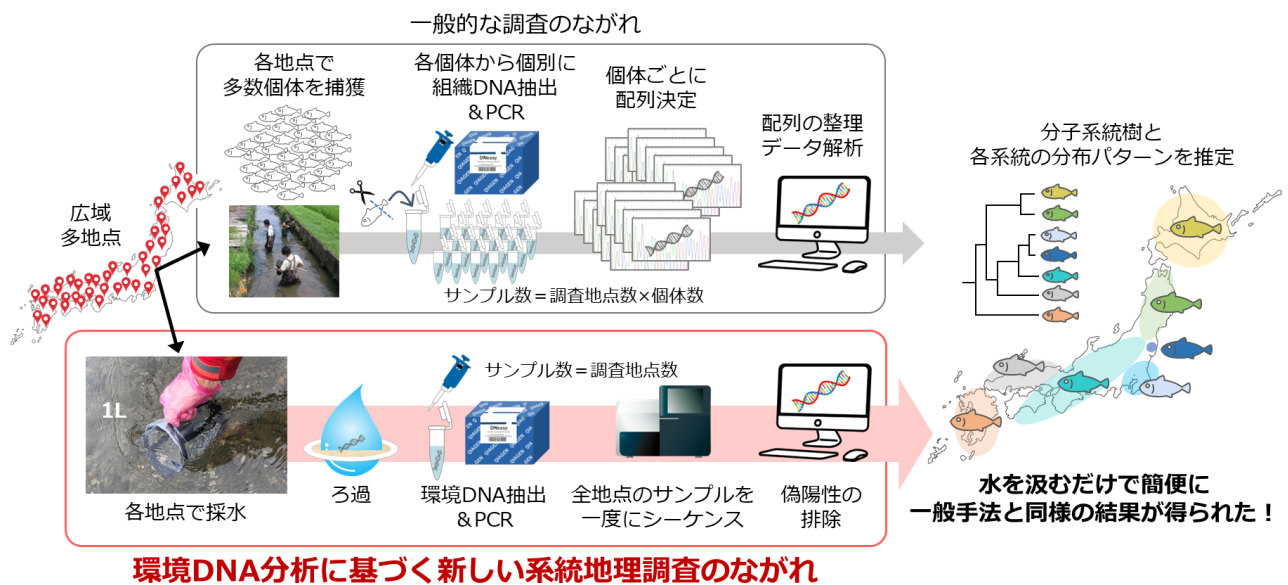
環境 DNA 分析に基づく新しい系統地理調査 — バケツ一杯の水から魚の地域分化を解明 —

概要

京都大学 理学研究科 辻冨月 日本学術振興会特別研究員 PD、渡辺勝敏 同准教授、(株)環境総合リサーチ 芝田直樹 (研究当時、現：タカラバイオ(株))、福岡工業大学 乾隆帝 教授、山口大学 中尾遼平 特命准教授、赤松良久 同教授らの研究グループは、環境水に含まれる生物由来の DNA (環境 DNA)^{注1} を分析するだけで、複数種の系統地理を同時に推定することができる新手法の開発に成功しました。

生物種内における遺伝的な地域性や系統分化は、種の分布や進化の過程を推測するための重要な手がかりです。しかし、この遺伝的な違いを調べる系統地理調査は多地点から対象種を多数個体捕獲し、組織 DNA を個別に分析する必要があるため、多大な労力や時間を要します。そこで本研究では、環境水に含まれる環境 DNA から効率的に正確な系統地理情報を取得する手法の開発を試みました。最大の課題であった偽陽性配列 (実験の途中で必ず生じる本来存在しない配列) の除去のための効果的なデータスクリーニング方法を考案、適用した結果、対象とした淡水魚 5 種すべてについて、一般的な捕獲調査と同様の地域分化パターン (遺伝的集団構造) の情報を得ることに成功しました。本手法は、これまでにない簡便かつ効率的、非侵襲的な調査を実現し、系統地理研究を通じた生物多様性の理解に大きく貢献することが期待されます。

本成果は、2023 年 3 月 07 日 (現地時間 10 時 01 分) に国際学術誌「*Molecular Ecology Resources*」にオンライン掲載されました。



1. 背景

生物種内に見られる遺伝的な地域性や系統分化は、種の分布変遷史や進化、遺伝的多様性^{注2}の理解のための重要な情報です。遺伝子マーカーを用いてそれらを明らかにする研究分野は「系統地理学」と呼ばれ、地理的分断や分散、種分化などを考慮しながら、ある種や近縁種の分布域形成の歴史的、生態学的プロセスを推測します。また遺伝的多様性は、各地域の在来個体群の保全においても重要な情報となります。しかし、一般的な系統地理の調査では、地理的に離れた多くの地点で対象種を多数個体捕獲し、それぞれの組織 DNA を個別に分析する必要があるなど、1種を対象とした調査でも多大な労力や時間が必要です。さらに、調査者の安全面や法律等による制限、また組織試料の採取に伴う個体への侵襲性など、これまでの系統地理研究では様々な実現上の障壁がありました。

環境 DNA 技術は、環境水中に生物が放出した DNA を採水によって回収して分析するだけで、簡便かつ効率的、非侵襲的に生息種を検出する手法です。しかし、様々な技術的な制約のため、系統地理解析に必要な遺伝的多型性を環境 DNA によって正確に評価するのは極めて困難だとされてきました。本研究では純淡水魚 5 種を同時に対象とし、まず (1) 分析の過程で必ず生成される PCR やシーケンスのエラーに起因する偽陽性配列を効果的に排除し、遺伝的多型性の評価や系統推定の信頼性を向上させるためのデータスクリーニング手法を検討しました。さらに (2) 各種について、環境 DNA 分析により得られた結果を捕獲調査に基づく既知の系統地理情報と比較し、その整合性を検討しました。その結果、環境 DNA を用いて、効率的で信頼性の高い系統地理研究が実現可能であることを示すことができました。

2. 研究手法・成果

対象種は、組織 DNA を用いた先行研究により系統地理情報が明らかにされているドンコ *Odontobutis obscura*、インドンコ *O. hikimius*、カワムツ *Nipponocypris temminckii*、ヌマムツ *N. sieboldii*、オイカワ *Zacco platypus* としました。まず、対象 5 種が自然分布する西日本の広範囲から計 94 地点で河川水を採水し、環境 DNA を抽出しました。一部は過去に収集し、冷凍保存された試料も用いました。そして環境 DNA 試料に含まれる対象種のミトコンドリア DNA ^{注3}の短い断片の塩基配列を 2 種類のグループ特異的プライマーで増幅し、超並列シーケンサー^{注4}を用いて網羅的に塩基配列を決定しました (図 1)。検出された塩基配列について、デノイズ処理と各種への割り当てを行ったのち、次の 3 段階のデータスクリーニングを行い、その結果を段階的に比較しました：(1) 1 copy/L 以下で検出された極めて稀な配列の削除、(2) サンプル中でのコピー数の相対頻度が 1%以下の稀な配列の削除、(3) 各サンプル中での最大コピー数頻度の 1/2 以下の頻度で検出された配列の削除。

データスクリーニングの妥当性を検討するために、各段階で削除されずに残った塩基配列のうち、国際 DNA データベースに登録されている配列 (参照配列) と完全に一致するものの割合を調べました。その結果、データスクリーニングの段階が進むごとにデータに含まれる参照配列と完全一致する配列の割合が増加し、偽陽性の可能性が高い配列を選択的に削除できていることが示されました。

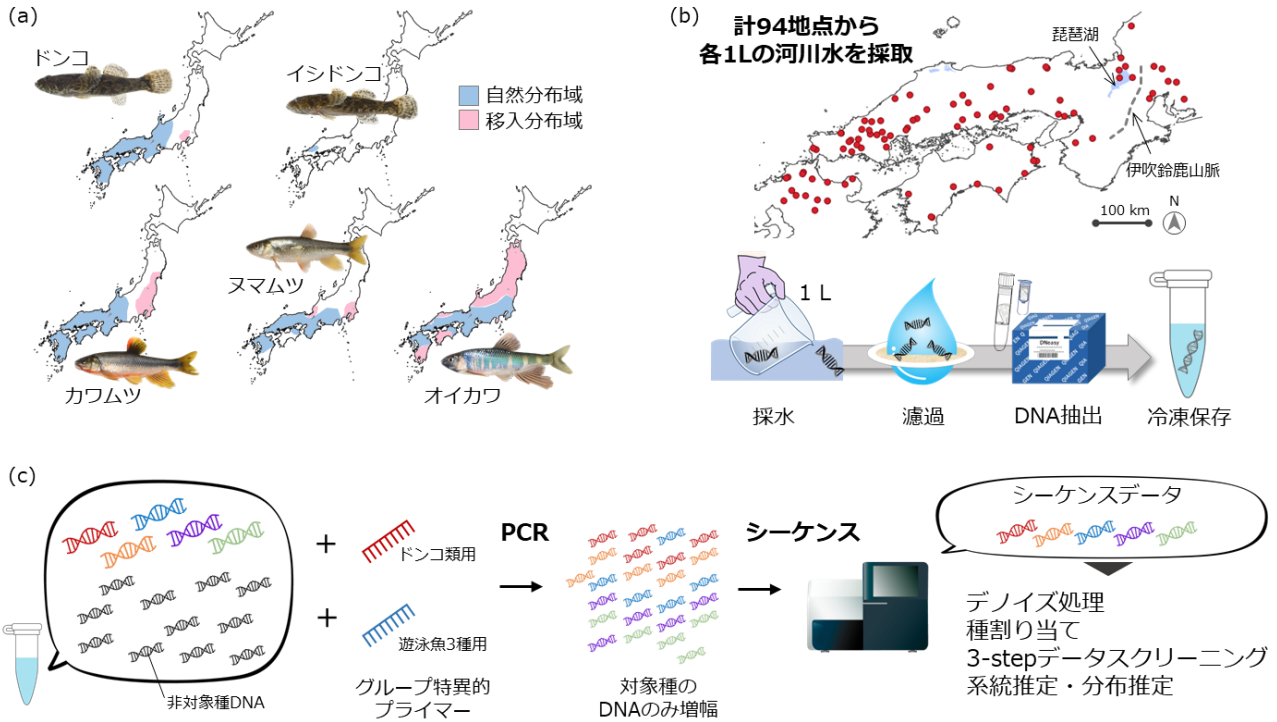


図 1 (a) 各対象種のおおよその分布域、(b) 調査地点および環境 DNA 試料の収集手順、(c) 環境 DNA 系統地理における分析の流れ。

最後に、3段階のデータスクリーニングで残った各種の塩基配列を用いて分子系統樹^{注5}を推定し、地域系統の分布パターンを調べました。そしてそれらの結果が、先行研究で示された各種の系統地理情報と一致するかを検討しました。その結果、すべての対象種について、環境 DNA 解析による結果は、一般的な捕獲調査に基づく先行研究による結果をほぼ完全に反映していることが確認されました (図 2)。さらに、ドンコ類では、先行研究で見逃されていた系統が九州東部で新たに検出され、その存在が後に実施した捕獲調査に基づく調査からも証明されたほか、従来ひとまとまりに考えられてきた山陰・琵琶・伊勢集団内に遺伝的に明確に区別される複数の地域集団が含まれることなどが示されました。カワムツ・ヌママツ・オイカワでは、3種間で共通して伊吹・鈴鹿山脈を境とした東側に東海集団の存在が示されました。またオイカワでは、琵琶湖から検出された遺伝子型が西日本全域からも検出され、琵琶湖産アユの放流に伴う本種の国内移入の実態が環境 DNA でも明らかにされました。

いくつかの技術的限界と今後の課題は残っているものの、本研究の結果は、環境 DNA 分析を用いた系統地理学が調査の時間と労力を大幅に削減し、非侵襲的に複数種の系統地理調査を容易に実現し得ることを示したといえます。

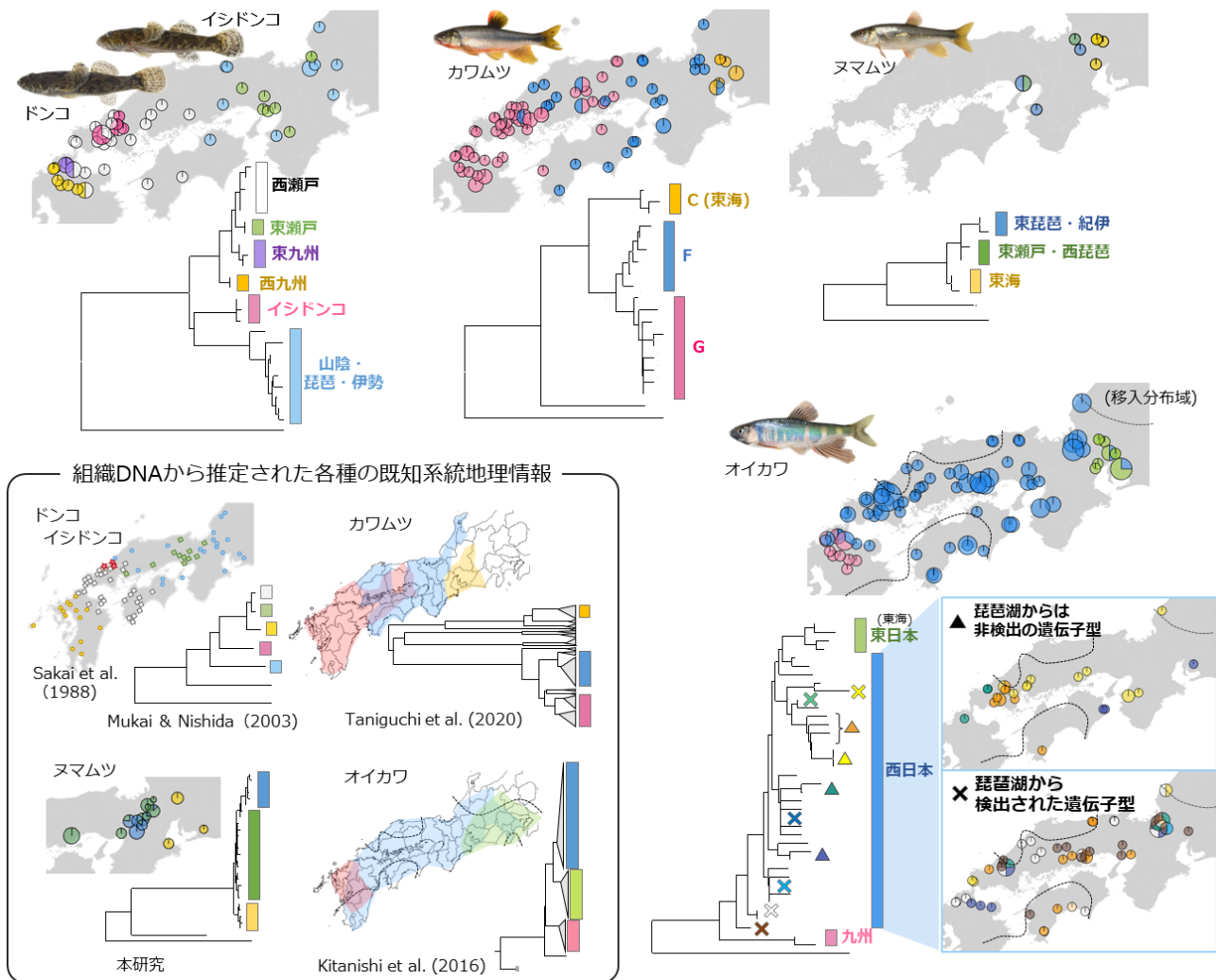


図 2. 環境 DNA 分析に基づいて明らかにされた各種内の分子系統樹とそれから明らかにされた地域グループの分布。各種について、各色がそれぞれの地域グループとその分布を示している。左下の枠内は、従来の方で調べられた結果であり（各先行研究で示された図を改変）、今回の結果とほぼ完全に一致した。

3. 波及効果、今後の予定

本研究は、これまで種レベルの多様性評価の手法として発展してきた環境 DNA 分析技術を、種内の遺伝的多様性レベルの解析を要する系統地理学に適用するための手法の開発に成功しました。この成果は、生物の分布域形成や群集の成立史を解明するための重要なアプローチである系統地理学に、新しい強力な調査手法を提供するものです。また、環境 DNA 分析技術全体の発展においても大きな一歩であると言えます。

昨年末の国連生物多様性条約第 15 回締約国会議で採択された「昆明・モントリオール生物多様性枠組」では、遺伝的多様性の保全を重視した内容が盛り込まれるなど、これからの社会において遺伝子レベルでの生物多様性の把握および適切な保全が重要な課題となることは明らかです。系統地理学で扱う地域系統は、各種が長い年月をかけて獲得してきたものであり、一度失われてしまうと二度と元に戻すことができない貴重な遺伝資源です。そのため、まずは地域系統の存在や分布、現時点での遺伝的かく乱状況を迅速かつ詳細に把握することが喫緊の課題であり、それに対して本研究で開発された環境 DNA 分析に基づく系統地理調査手法が大き

く貢献することが期待されます。今後は、より長い配列や核 DNA を標的とした分析に挑戦し、環境 DNA 系統地理学の適用範囲や可能性を広げていきたいと思ひます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本科学協会笹川科学研究助成（202-5001）およびエスベック地球環境研究・技術基金、山口大学 YU プロジェクトの研究助成を受けて実施されました。

<用語解説>

- （注1）**環境 DNA**：生物が自身の生息環境中（水中や土壤中など）に放出した DNA 物質の総称。魚類の場合は、排泄物や粘液、表皮、精子などに由来する。
- （注2）**遺伝的多様性**：生物多様性を構成する要素のひとつで、種内で各集団や個体が示す遺伝的な違い。
- （注3）**ミトコンドリア DNA**：ミトコンドリアの中にある DNA で、1 細胞内に多数のコピーがあり、進化速度が核 DNA よりも速く、かつ組換えを起こさないという特徴をもつ。
- （注4）**超並列シーケンサー**：数十万から数千万本以上の DNA の塩基配列を同時に決定できる分析機器の総称。本研究では超並列シーケンサーのひとつである MiSeq（Illumina 社）を使用した。
- （注5）**分子系統樹（系統樹）**：生物が共通の祖先から分岐を繰り返して多様化してきた様子を、DNA の塩基配列の情報に基づいて樹木のような形で表現したもの。

<研究者のコメント>

本研究の野外調査中は各地点で水を汲んでまわるだけのドライブなので、自身が系統地理を調べていることを忘れてしまうほどでした。しかし、解析が進むにつれ、各種の地域分化の状況がくっきりと浮かび上がってきたときはとても興奮したのを覚えています。今後も、各地域で息づいてきた生物たちを遺伝子レベルで把握・保全することに貢献するとともに、それらの辿ってきた歴史を解明していくことを目指したいと思ひます。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Environmental DNA phylogeography: successful reconstruction of phylogeographic patterns of multiple fish species from cups of water（環境 DNA 系統地理：水から複数種の系統地理パターンを明らかにする）

著者：Satsuki Tsuji, Naoki Shibata, Ryutei Inui, Ryohei Nakao, Yoshihisa Akamatsu, Katsutoshi Watanabe

辻冨月（京都大学大学院理学研究科、山口大学大学院創成科学研究科）

芝田直樹（(株)環境総合リサーチ）

乾隆帝（福岡工業大学社会環境学部）

中尾遼平（山口大学大学院創成科学研究科）

赤松良久（山口大学大学院創成科学研究科）

渡辺勝敏（京都大学大学院理学研究科）

掲載誌：*Molecular Ecology Resources* DOI：10.1111/1755-0998.13772