

DNA メタバーコーディングによる 大阪湾の動物プランクトンモニタリング手法の開発

梅原亮¹⁾ 西嶋渉²⁾ 山本圭吾³⁾

¹⁾ 広島大学環境安全センター 助教

²⁾ 広島大学環境安全センター 教授

³⁾ (地独)大阪府立環境農林水産総合研究所水産技術センター 主幹研究員

1. 研究目的

総量規制により水質改善が進む大阪湾において、低次生態系構造解明の鍵を握る動物プランクトンについて、分子生物学的手法を用いた群集評価を試みた。動物プランクトンは、クロロフィル *a* 等の代替指標がある植物プランクトンに比べて存在量の把握が難しく、いまだに専門家による同定計数が主流であり調査データが非常に少ない現状にある。そこで本研究では、近年開発された簡易かつ迅速な分析手法であり、一度の解析で群集全体の種同定が可能である DNA メタバーコーディングに着目した。大阪湾で採集された動物プランクトンサンプルの顕微鏡観察結果と DNA メタバーコーディングの結果を比較することで、検鏡では得られない多くの種を DNA により検出し、湾の生態系における構成者とそれらの時間変動を明らかにした。さらには、主要動物プランクトンであるカイアシ類についてバイオマス推定の可能性についても検討し、今後の課題を交え考察した。

2. 研究方法

DNA メタバーコーディングでは、特定の遺伝子に着目してその塩基配列を分析すれば、対象とする個体の塩基配列を予め作成しておいたデータベースと照合することで、対象とする生物種を特定することが可能になるというものである¹⁾ (図 1)。まずはじめに、参照するデータベースに大阪湾の動物プランクトン種がどれほど記載されているのかを明らかにするために、2013 年の公共用水域調査データを用いて塩基配列の登録状況を整理した。



図 1. DNA メタバーコーディングの手順の概要

実際の動物プランクトンサンプルの採集については、大阪湾東部海域 3 地点 (St. 1, 12, 18) において、2018 年 7~10 月および 2019 年 6~11 月の各月に北原式プランクトンネット (100 μm) を用いて鉛直曳きで採集した (図 2)。サンプルは DNA メタバーコーディング用と検鏡用にプランクトン標本分割器を用いて分割し、それぞれ船上で固定した。検鏡用サンプルについては、大阪水技の方で動物プランクトンの同定計数を実施し、顕微鏡下でカイアシ類の体長と個体数を計測して体長-バイオマス相関式²⁾によって炭素量で表されるバイオマスを推算した。DNA メタバーコーディング用サンプルについては、原則的に Clarke et al., (2017)³⁾の方法に準じて前処理を実施したが、動物プランクトンの DNA 抽出に関しては未だ確立された方法がないため、抽出効率のさらなる向上のために最適な抽出方法を検討し、その抽出方法により大阪湾サンプルの DNA 分析を行った。生物種名の決定については、精製 DNA に対し COI 領域の一部を PCR 増幅した DNA サンプルを生物技研へ送付し、次世代シーケンサーで塩基配列を読み取り、読み取られた塩基配列 (リード) は配列同士を operational taxonomic unit (OTU) クラスタリングした。また、各 OTU に属するリードの中から代表的な配列を選び、既存の塩基配列データである NCBI “nt” データベースと照合することによって、最も類似性の高い生物種へ割当てた。

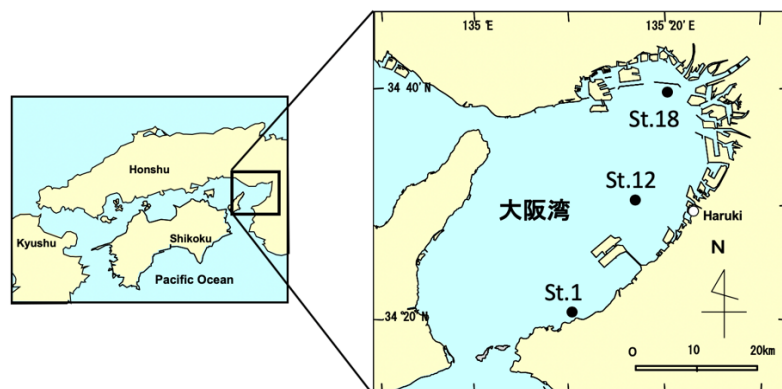


図 2. 本研究における大阪湾のサンプリング地点

3. 結果と考察

データベースへの登録状況に関して、過去の大阪湾における動物プランクトン種を既存の塩基配列データベースで照合した結果、大阪湾で出現数が最も多いカイアシ類を含む節足動物門では、種レベルで 40%が DNA メタバーコーディングで同定でき、科レベルだと 100%までカバーしていることが分かった。データベースは急速に拡充されており、モニタリングのためのプロトコルを確立することの価値は高いと考えられた。

DNA メタバーコーディングにおける抽出方法では、Proteinase K の量、抽出回数、および処理時間の検討や、DNA の抽出効率を向上するための物理破碎におけるビーズの種類 (ガラスビーズおよびジルコニアビーズ) と回数について検討を行った結果、最適な DNA 抽出方法が明らかとなった。

2018年および2019年に大阪湾東部海域3地点において採集された動物プランクトンサンプルについて、2018年についてはSt. 1、18の7、8月のサンプルを除いてDNA分析が終了した。2019年については、現在までに、St. 1、18の7~10月のサンプルの分析を終えた。2018年のサンプルについては、検鏡についてはカイアシ亜綱（カイアシ類）のみ同定計数を実施ため、カイアシ類のみの結果でDNAメタバーコーディングの結果と比較した検鏡では11科11属14種のカイアシ類が同定され、一方DNAメタバーコーディングでは13科14属23種が検出され、生物種数では2倍近くの分類群を検出した。2019年では、検鏡についてもすべての動物プランクトンについて同定計数を実施したため、それらの検出種を比較したところ、検鏡では13門27科44属24種が同定され、一方DNA分析では10門59科70属84種が検出され、種数では4倍近くの分類群を検出した。カイアシ類に絞った場合は、検鏡では13科13属14種のカイアシ類が同定され、一方DNAメタバーコーディングでは12科12属18種が検出され、2018年同様により多くの分類群を検出した。多様性の評価として最もシンプルな指標は生物種数であるが、大阪湾生態系の構成者として重要な動物プランクトンの種類数を測定するためには、これまでは検鏡による種の同定が必須であった。そこで、本研究ではDNAメタバーコーディングを用いた評価を試みたが、大阪湾における動物プランクトン種の検出率においてDNA分析は検鏡より優れていることがわかった。また、本研究期間におけるノープリウス幼生のバイオマスとしての優占度は低かったが、これまで検鏡にて発育段階のため同定できなかったものがDNA分析ではすべて同定可能であった。

図3には、2018年および2019年におけるカイアシ類の科レベルでのリード数割合と検鏡バイオマス割合の関係を示す。ハルパクチクス目などの検鏡のみで検出された種は、そもそもPCRによる増幅がかかっておらず、DNA分析と検鏡の間の精度比較ができないため計算から除外した。

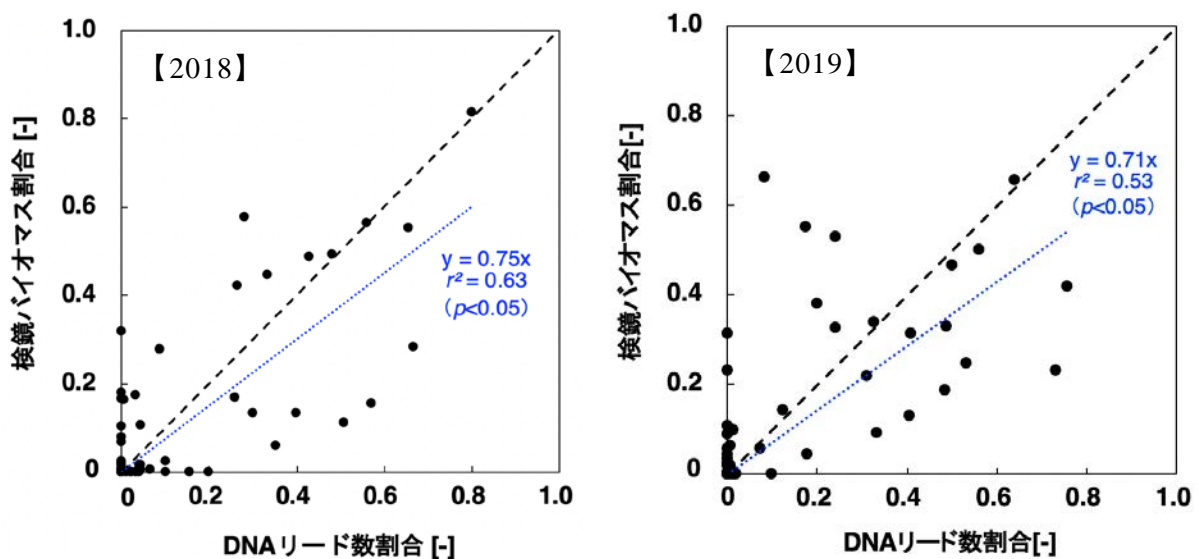


図3. カイアシ類のリード数割合と検鏡バイオマス割合の関係（科）

2018年においては、原点を通る回帰直線の傾きは0.75であり、寄与率は $r^2 = 0.63$ ($p < 0.05$) と高い相関を示し、DNAリード割合がやや過大評価となる傾向にあった。同解析を属レベルで評価した場合は $r^2 = 0.25$ ($p < 0.05$)、種レベルでは有意な関係性はみられなかった。一方2019年では、原点を通る回帰直線の傾きは0.71であり、2018年同様に高い相関を示し ($r^2 = 0.53$, $p < 0.05$)、DNAリード割合がやや過大評価となる傾向にあった。同解析を属レベルで評価した場合は $r^2 = 0.65$ ($p < 0.05$)、種レベルでは相関解析で比較可能な種の減少により関係性をみることができなかった。2019年では属レベルでも寄与率が高かったことから、カイアシ類の科や属レベルでのバイオマス推定が今後できるようになる可能性が示唆された。

大阪湾サンプルの解析では、検鏡にてバイオマスとして優占することがあったハルパクチクス目をDNAでは全く検出することができなかった。そのため、異なるプライマー(18S領域)を用いてハルパクチクス目を検出できるか検討したところ、ハルパクチクス目は検出できたが、現状のデータベース登録状況における照合では優占していたフネガタソコミジンコおよびカワリソコミジンコには照合されず、対象領域の塩基配列情報の拡充による改善の可能性の検討も重要になると考えられた。

4. 結論

本研究では、総量規制により水質改善が進む大阪湾において、低次生態系構造解明の鍵を握る動物プランクトンについて、分子生物学的手法を用いた群集評価を試みた。先にDNAメタバーコーディングにおける最適なDNA抽出方法についての検討を行い、目的のDNA断片の増幅を確認した後、本手法を用いて大阪湾サンプルを分析した。湾で採集された2018年および2019年の動物プランクトンサンプルの検鏡結果とDNA分析結果を比較することで、検鏡では得られない多くの種をDNA分析により検出できることを明らかにし、湾の生態系における主な群集組成とそれらの時間変動を明らかにした。これまで検鏡にて発育段階のため同定できなかったノープリウス幼生についてもDNA分析で全て同定を行うことができたが、検鏡にてバイオマスとして優占することがあったハルパクチクス目を検出することができなかったため、本種の検出についてはさらなる検討が必要である。また、主要動物プランクトンであるカイアシ類については、ハルパクチクス目を除けば現段階においてもDNAメタバーコーディングを用いて科や属レベルでのおおまかなバイオマス推定が可能であることがわかった。今後、照会するDNAデータベースの充足に加え、PCRバイアス等に対する補正手法を組み合わせることで更なる定量性の改善が見込まれる。

- 1) Kress, W. J., Erickson, D. L. (2012) DNA Barcodes: Methods and Protocols, Humana Press, New York. pp 470.
- 2) Uye, S. (1982) Length-weight relationships of important zooplankton from the inland Sea of Japan. J. Oceanogr. Soc. Jpn, 38, 149-158.
- 3) Clarke, L.J., Beard, J.M., Swadling, K.M., Deagle, B.E. (2017) Effect of marker choice and thermal cycling protocol on zooplankton DNA metabarcoding studies. Ecol. Evol., 1-11.