

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（その2）

梅原亮¹⁾ 西嶋渉²⁾ 中嶋昌紀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 総括研究員

[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。昨年度の成果により、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をとらえることができ、またカイアシ類に属する動物プランクトンについては、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バイオマス推定について、存在割合での評価が可能であることがわかった。今年度は、昨年度検出されなかったハルパクチクス目等の未検出種について異なるバーコード領域を用いた検討、定量性の向上のための標準 DNA を用いた内部標準法等の検討、および実際のモニタリング適用のために大阪湾における DNA 分析結果を用いた代表種の季節変動の把握および広域調査を実施した。

[研究方法]

大阪湾 3 地点において毎月動物プランクトンを採集し、サンプルを等量に分割して、それぞれ DNA メタバーコーディング用と検鏡用とした。検鏡サンプルは昨年度同様に同定計数（外注）を実施して各分類群のバイオマスを推定した。DNA メタバーコーディング用サンプルについては、昨年度開発した方法に準じて DNA 抽出、PCR 増幅、および次世代シーケンス解析を実施し、バイオマス推定を試みた。

昨年度の課題であった検出種のカバー率向上のために、昨年度用いた COI 領域におけるプライマーに加え、さらに 3 つの遺伝子領域（COI、18SrRNA、16SrRNA）における 8 つのプライマーセットを用いてハルパクチクス目を含めた未検出種 7 種を対象に検討した。また、定量性向上のためには、PCR 増幅時のサンプル間および種間のバイアスの補正が必要であると考えられたため、標準 DNA（淡水生物等）を用いたサンプル間補正、および大阪湾サンプルから単離された動物プランクトンを用いた種ごとに固有の標準化係数を作成することにより種間補正を行った。現場モニタリングへの適用のために、代表種の季節および地点ごとの出現傾向を把握し、過去文献および検鏡結果と比較することで、DNA 分析結果の妥当性や代表種の時空間的な分布の違いについて評価した。また、大阪湾における広域的な動物プランクトン群集の空間分布解析のために、秋季に大阪湾 11 地点において動物プランクトン採集を実施した。

[結果と考察]

検出種のカバー率向上

大阪湾で多く出現した節足動物門のカイアシ類およびミジンコ類における DNA メタバーコーディングにより 38 種が検出された。また検鏡によって観察された種は 19 種であり、両分析手法にて共通で検出された種は 9 種であった。DNA メタバーコーディングでは捉えることができなかった種について、単離できた 7 種についてこれまでとは異なるプライマーを用いて PCR を行った結果、すべてにおいて、いずれかのプライマーによって増幅が可能であることが分かった（表 1）。現時点では生物種名を決定する際の参照用データベースが不足する遺伝子領域があることから、それらの遺伝子領域におけるデータベースの拡充が必須であり、複数の遺伝子領域を用いた同時定量評価は将来的に検討すべき事項となるが、基本的には本研究の方法に準じて各プライマーに対して定量的メタバーコーディングを行うことで定量が可能になると推測される。

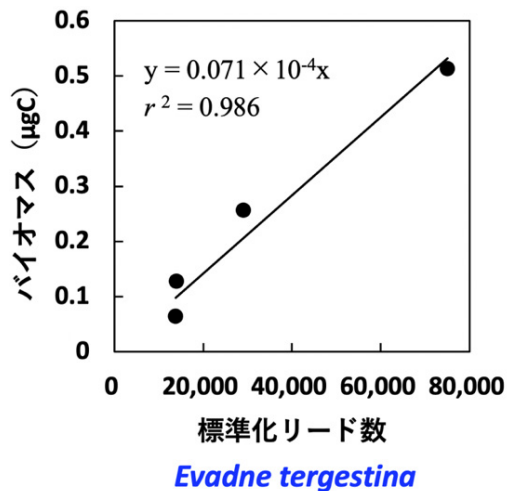
表 1. 9つのプライマーを用いた DNA メタバーコーディング未検出 7 種の評価
(本研究における大阪湾サンプル分析の際には左端のプライマーを使用)

遺伝子領域	COI			18SrRNA			16SrRNA		
	IntF	IntF	LCO1490	1422F	1391F	Uni18SF	MiDecaF	glInsectF	Cop16SF
リバースプライマー	HCOm	HCO2198	III_C_R	1642R	EukBr	Uni18SR	MiDecaR	glInsectR	Cop16SR
<i>Acartia hudsonica</i>	×	○	×	○	○	○	○	×	○
<i>Calanus sinicus</i>	×	×	×	○	○	△	(?)	×	×
<i>Oithona brevicornis</i>	×	×	×	○	○	×	○	×	×
<i>Oithona davisae</i>	×	×	×	○	○	○	○	×	×
<i>Microsetella norvegica</i>	×	×	×	×	×	×	○	×	×
<i>Euterpina acutifrons</i>	×	○	×	○	○	○	×	△	○
<i>Corycaeus affinis</i>	×	○	×	○	○	○	×	×	×

サンプル間および種間補正による定量性の向上

サンプル間補正のために、標準生物 6 種から抽出した DNA のみをテンプレートとしたサンプルを用意し、PCR 増幅および次世代シーケンス解析を実施した結果、リード数はすべてのサンプルにおいてほとんど同じ割合であり、安定した結果を示したことから、これら 6 種から抽出した DNA を標準 DNA とした。また、種ごとに 6 サンプルのリード数の平均値を求め、大阪湾サンプルを標準化するためのリード数の基準値を得た。

種間補正のために、大阪湾サンプルから単離した動物プランクトン 32 種を用いてそれぞれ体長からバイオマスを推定し、同サンプルを用いて DNA 分析を実施したところ 15 種が検出され、種ごとに標準化リード数およびバイオマス (μgC) の関係を把握できた（図 1）。各種の回帰式の傾きを種固有の標準化リード数あたりのバイオマスの補正係数とした。



種名	回帰直線の傾き (×10 ⁻⁴)
<i>Evadne tergestina</i>	0.071
<i>Penilia avirostris</i>	0.066
<i>Acartia pacifica</i>	0.131
<i>Acartia omorii</i>	6.070
<i>Canthocalanus pauper</i>	1.427
<i>Centropages abdominalis</i>	1.869
<i>Centropages furcatus</i>	0.098
<i>Eucalanus crassus</i>	1.265
<i>Paraeuchaeta concinna</i>	2.317
<i>Paraeuchaeta plana</i>	8.480
<i>Acrocalanus longicornis</i>	1.453
<i>Paracalanus parvus</i>	0.124
<i>Paracalanus crassirostris</i>	0.400
<i>Labidocera acuta</i>	0.154
<i>Oithona similis</i>	0.131

図 1. 動物プランクトン 15 種における標準化リード数とバイオマスの関係
(左) *Evadne tergestina* の例 (右) 種ごとの補正係数

DNA 分析結果にサンプル間および種間補正を実施し、大阪湾サンプル中の種ごとの標準化リード数からバイオマスに換算した 7 種について、DNA メタバーコーディングから推定したバイオマスと検鏡から推定したバイオマスを比較した。バイオマス同士の比較において、両者には有意な正の相関関係が認められたが、DNA から推定したバイオマスは検鏡から推定したバイオマスに比べて高い傾向にあった。おおまかな指標ではあるが回帰式の傾きから考えると、DNA 推定バイオマスでは 1.5~10 倍程度過大評価されていた。

代表種の季節変動の把握

DNA メタバーコーディングを用いた動物プランクトンのモニタリング手法の現場適用における重要な課題として、①過去文献による一般的な季節的消長と一致するのか？および②検鏡により推定された動物プランクトンバイオマス量の季節的なトレンドを DNA メタバーコーディングで表現できるか？の 2 点が挙げられた。

過去文献の季節的消長との比較においては、大阪湾サンプルにおいてサンプル間補正を実施し、さらに DNA 分析における種間での補正が可能であった 12 種を対象に評価を実施した。DNA 推定バイオマスの四季変化より、多くの種が夏季から秋季にかけての暖温期に豊富に出現し、また *Centropages abdominalis* や *Oithona similis* のように寒季に豊富に出現する種の特徴を DNA 分析においても表現することができた (図 2 左)。また、外洋性カイアシ類の空間分布から、外洋性種は大阪湾の湾口から湾央にかけてのバイオマスが比較的多く、湾奥ではあまり出現していなかったことがわかった (図 2 右)。外洋性種は黒潮の流れ込みによって紀伊水道側から大阪湾へ流入するため、流入部に近い湾口から湾央にかけて多く検出されたと考えられる。

検鏡による季節変動との比較から、いずれの種においても、暖季および寒季というレベルではほぼ確実に変動傾向を捉えることができ、種によっては四季レベルで精度高く変動傾向を表現できることがわかった。

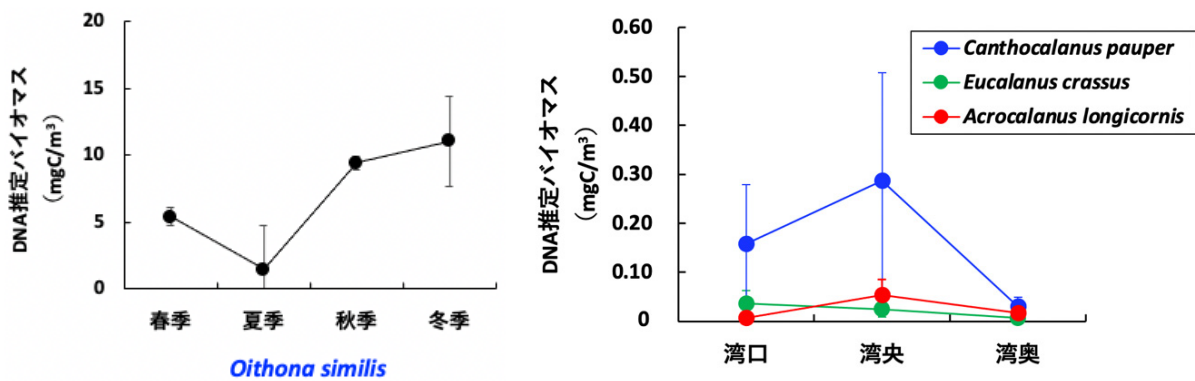


図 2. (左) *Oithona similis* の DNA 推定バイオマスの四季変動 (3 地点平均値) および (右) 外洋性種の空間分布 (年間平均値)

実際のモニタリングへの適用

大阪湾における空間的に高解像度な動物プランクトンデータの取得のために、今年度は 2020 年 11 月 2 日および 5 日に全域をカバーした形で 11 地点における動物プランクトン採集を実施した。本サンプルは、100%エタノール置き換え後に冷凍保管しているが、今年度の次世代シーケンサーの外注予算に含まれておらず、次年度の分析実施としたい。また、次年度も大阪湾において数回の広域多地点調査の実施を予定しており、DNA 分析を用いた面的なデータから、湾全域レベルでの動物プランクトン群集の空間分布について解析を行いたい。

[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。検出種のカバー率向上については、これまでに DNA メタバーコーディングにおいて未検出であった種について、異なるプライマーを用いることで検出することに成功した。サンプル間補正および種間補正により定量性が向上したが、未だにばらつきは大きく、DNA から推定したバイオマスは検鏡から推定したバイオマスに比べて高い傾向にあったため、さらなる改善が必要である。DNA 分析を用いた代表種のバイオマスの季節変動の把握により、過去の生態学的知見と良い対応を示すことがわかり、検鏡による季節変動との比較では、いずれの種においても暖季および寒季というレベルではほぼ確実に変動傾向を捉えることができ、種によっては四季レベルで精度良く変動傾向を表現できた。また、検鏡同定では評価の難しかった外洋性種についても定量的評価が可能となった。