

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3）

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。昨年度までの成果により、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。しかしながら、大阪湾における主要種である *Microsetella norvegica* や *Calanus sinicus* は DNA 分析において検出できておらず、それらを検出できるプライマーの探索が必須であった。そのため今年度は、検出種の網羅性向上のために様々なバーコード領域を用いた検討を行った。

定量性の向上については、PCR 以降の補正（サンプル間補正）および DNA 量からのバイオマス換算における種間補正により定量性が向上したが、検鏡および DNA から推定されたバイオマスは未だにばらつきが大きかった。そこで今年度は、さらなる定量性向上のために、標準生物を用いた DNA 抽出効率の補正により内部標準法を改良した。

モニタリングへの適用に関しては、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。しかしながら、四季レベルではまだ実用化は難しいと考えられたため、さらなる DNA 分析精度の向上により、月レベルでの出現傾向を捉えることを目的とした。また、実用化に向けた最終段階として、大阪湾における代表月において空間的に高解像度な調査を実施し、DNA 分析を用いて主要動物プランクトンの空間分布を明らかにした。

[研究方法]

播磨灘 3 地点において 2020 年 4 月～2021 年 3 月の毎月、および大阪湾 11 地点の 2021 年 5, 8, 11, 2022 年 2 月に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。検鏡サンプルは同定計数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（PCR 前に内部標準物質として既知量の淡水プラ

ンクトン由来 DNA を添加し PCR 以降の増幅率の差を補正) に新たに DNA 抽出効率の補正 (DNA 抽出前に内部標準として既知量の淡水プランクトン由来生物体を添加) を追加し、DNA 抽出、PCR 増幅、および次世代シーケンス解析を実施し、季節変動の把握およびバイオマス推定を試みた。

また、昨年度の課題であった検出種のカバー率向上のために、新たに COI 遺伝子 Zplank 領域および 18S rRNA 遺伝子 Hirai 領域の 2 つのバーコード領域を対象に DNA メタバーコーディングを実施した。また、定量性向上のためには、標準生物を用いた DNA 抽出効率の補正により内部標準法を改良した。現場モニタリングへの適用のために、DNA 分析精度の向上により、播磨灘において月レベルでの出現傾向を捉えることを目的とし、検証を行った。また、大阪湾における代表種の分布を DNA 分析のみで推定した。

[結果と考察]

検出種のカバー率向上

今年度新たに選ばれた 2 つのバーコード領域について検出の可否を検討した結果、大阪湾および播磨灘サンプルの主要 10 種中 9 種が検出された。また、検鏡バイオマス基準でも 95% の検出率となり、複数バーコード領域の併用により大幅に検出率を改善することができた。特に、大阪湾および播磨灘においてバイオマスが優占する *Microsetella norvegica* は 18S rRNA 遺伝子 Hirai 領域で、*Calanus sinicus* は COI 遺伝子 Zplank 領域で検出することができたことの意義は大きい。主要種検出の網羅性の向上により、実際のモニタリングへの適用が現実的となった。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、理論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、プライマー間で比較可能な定量化手法量が確立できると考えられる。

定量性の向上

COI 遺伝子 Leray 領域を用いた従来補正法 (PCR 以降の補正) および新規補正法 (DNA 抽出以降の補正) における代表 4 種の補正済 DNA 量と検鏡バイオマスの関係を明らかにした。DNA 抽出効率の補正を新たに取り入れることで、*Oithona similis* では明確な変化は見られなかったが 4 種中 3 種においては決定係数が大幅に上昇した。それら 3 種については、95% 信頼区間の幅も小さくなり、ばらつきを抑えることができた。

種が既知で DNA 検出 (COI 遺伝子 Leray 領域) 可能なモデル生物であるアルテミアの添加量を変えた実験によって、補正済リード数とアルテミアバイオマスの関係を見た。アルテミア添加量を増やすことで補正済リード数も増加し、両者の間には線形の関係が得られた ($r^2 = 0.91$)。モデル生物を用いた場合、本研究における DNA 分析

手法により正確にバイオマスを推定できることがわかった。

野外から採集した5種のカイアシ類における補正済リード数とバイオマスの関係を明らかにした。*Acartia pacifica*、*Acartia omorii*、および *Paracalanus parvus* では COI 遺伝子 Leray 領域で、*Canthocalanus pauper* および *Calanus sinicus* では COI 遺伝子 Zplank 領域にて回帰式が作成できた。原点を通る回帰式を用いた場合、5種すべてにおいて有意 ($p < 0.05$) な正の相関関係が得られた。決定係数 (r^2) は 0.61~0.98 の範囲であった。各種の回帰式の傾きを補正済リード数あたりのバイオマスの補正係数とした。今回、残念ながら十分量のバイオマスが確保できず解析ができなかった種についても、今後十分量の種既知サンプルが入手できれば種ごとの補正係数を大幅に増やすことは可能である。

モニタリングへの適用

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を現場適用可能とするために、今年度はさらなる DNA 分析精度の向上により月レベルでの出現傾向を捉えられるのか播磨灘において検証を行った。補正済 DNA リード数と検鏡推定バイオマスの季節変動を比較した場合、*Microsetella norvegica*、*Paracalanus parvus*、*Oithona similis*、*Acartia pacifica*、*Acartia omorii*、*Centropages tenuiremis*、および *Centropages abdominalis* の7種については月レベルで詳細な季節変動を捉えられることがわかった（下図に一例を示す）。一方、*Calanus sinicus* では月レベルの変動は捉えられておらず、春に増加し夏に低下するという四季変動の評価にどどまった。*Pseudodiaptomus marinus* に関しては、検鏡にて観察された個体数が少なくバイオマスが著しく低く、また地点間の違いも大きかったため DNA 分析にて季節的消長を捉えることができなかった。DNA 分析にてバイオマス推定可能な4種 (*Calanus sinicus*、*Paracalanus parvus*、*Acartia pacifica*、および *Acartia omorii*) については、*Calanus sinicus* を除く3種において月レベルでのバイオマスの変動を把握することが可能であったが、*Calanus sinicus* については四季変動の評価にどどまった。今回、種間補正において絶対値として定量が可能となった種は *Acartia omorii* のみであるため、*Paracalanus parvus* および *Acartia pacifica* の2種については、現状は補正済リード数による相対評価が良いと考えられる。ここでは成体を用いた評価であったため、さらに幼体を含めた季節変動解析およびその他の季節の DNA 分析が必要であるため引き続き行っていく。

Microsetella norvegica

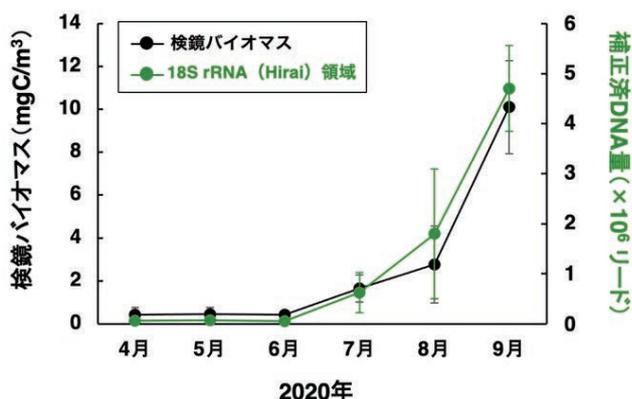


図. 播磨灘における

Microsetella norvegica の鏡検推定バイオマスおよび DNA 分析結果（補正済みリード数）の月変動。図中のプロットは播磨灘 3 地点の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

上記の播磨灘における結果より、DNA 分析によりカイアシ類 8 種のバイオマスの変動を捉えることに成功したため、さらに空間的に高解像度なネット動物プランクトンサンプリングを行い、大阪湾にて出現した 6 種を対象に DNA 分析に基づいた動物プランクトン群集の評価を行った。これまでに 2021 年 5 月の 11 地点における分布調査の DNA 分析が終了した。今回の分析においては外洋性種の *Canthocalanus pauper* 等は鏡検および DNA 分析において検出されなかった。*Microsetella norvegica* および *Acartia omorii* は明石海峡付近の湾西側にて比較的高密度に分布しており、*Oithona sumilis* は湾西側に多く分布していた。*Paracalanus parvus* について紀淡海峡付近および湾中部に多く分布しており、*Centropages abdominalis* は湾中部に分布していた。*Centropages tenuiremis* については湾東部に特徴的に分布しており、湾内における各種の分布の違いが詳細に把握できた。

[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主要カイアシ類について、複数の遺伝子領域を用いた分析により網羅性を向上することができ、鏡検バイオマス基準でも 95% の検出率となった。今年度は標準生物を用いた DNA 抽出効率の補正を新たに加え、2 段階の内部標準法に改良することで定量性を向上させることができ、代表カイアシ類 7 種について月レベルでの季節変動を DNA リード数の形で正確に捉えられ、3 種においては DNA 推定バイオマスの形で示すことができた。その中でも *Acartia omorii* については、DNA および鏡検推定バイオマスの絶対値がほとんど一致しており定量化に成功した。今年度の成果により、モニタリングへの適用がさらに現実味を増した。