

## 水をくんで調べれば、生息する魚の種類がわかる新技術を開発 — 魚類多様性のモニタリングを可能にする画期的な手法 —

**概要：**海や川に生息する魚の種類を調べるには、水中に潜って魚を観察したり、網などの漁具を使って魚をとったりなど、大きな労力と費用がかかる上に長期間にわたる調査が必要でした。さらに、日本に生息が確認されている魚だけでも4,000種以上いるため、目視や標本の観察により魚の種類を決めるためには、高度に専門的な知識と経験が必要でした。一方、魚から放出されたDNAが水中にただよっていることが近年の研究で明らかになり、「環境DNA」と呼ばれて大きな注目を集めています。現在、DNAは商品のバーコードのように簡単に読み取ることができ、しかも読み取った情報(DNAの塩基配列)から魚の種類がわかります。今回、千葉県立中央博物館の宮正樹主席研究員を中心に東京大学、東北大学、龍谷大学、神戸大学、北海道大学、沖縄美ら島財団と共同で行った研究により、微量な環境DNAから魚の種類がわかる部分を増幅し、それを最新の機器で分析してDNAの塩基配列を読み取り、DNAを放出した魚の種類を判定する新たな技術を開発しました。この技術を使えば、魚に関する専門的な知識がなくても、水をくんでDNAを分析するだけで生息する魚の種類を推定できます。従来の手法(目視や漁獲)では実現できなかった魚類相(ある水域に生息する魚の多様性)のモニタリングを、大きな労力と時間をかけずに長期間かつ広範囲に行うことを可能にした画期的な手法といえるでしょう。

### ■ 背景

生物多様性の保全や持続可能な生物資源の利用に関する施策を推進することを目的として2008年に「生物多様性基本法」が制定され、その成立を受けて2010年に「生物多様性国家戦略2010」が閣議決定されました。この施策を推進するための基盤となる技術の一つが生物多様性のモニタリングです。ところが、魚の多様性をモニタリングしようとする、水中に潜って観察したり網などの漁具を使ってとったりなど、大きな労力と費用に加えて長期間にわたる調査が必要でした。さらに、日本に生息が確認されている魚だけでも4,000種以上いるため、目視や標本の観察により魚の種類を決めるためには、高度に専門的な知識と経験が必要でした。

一方、最近になって魚を含む水生生物から放出されるDNAが水中にただよっていることが明らかになり、「環境DNA」と呼ばれて大きな注目を集めています。DNAの塩基配列には生きものの種類がわかる情報が含まれており、その情報を読み取ることにより様々な応用が可能になるからです。実際、環境DNAは外来魚であるブルーギルのすむ溜め池の検出、河川に生息するコイの生物量の測定、さらには特別天然記念物であるオオサンショウウオの生息地の検出などに使われ、我が国でも注目すべき成果がいくつか上がっています。

環境DNAには特定の魚のDNAだけでなく、多様な魚のDNAが含まれています。これらを同時並行的に分析する技術を開発すれば、今まで労力や時間や費用の点から困難だった魚類多様性のモニタリングが水を汲むだけで可能になります。環境中のDNAをまとめて分析して生物の種類を判定する技術は「メタバーコーディング」と呼ばれており、次世代シーケンサという最新の分析機器を使ったシステムが、主に微生物を対象にして確立されてきました。この技術を魚の環境DNAに応用する上での問題は、魚の種を特定できるDNAを環境水から選択的に取り出す技術を確認することでした。

本研究は、世界に先駆けて「魚類メタバーコーディング」の技術を開発し、沖縄美ら海水族館の4つの水槽の水をつかってその性能をテストしました。その結果、4つの水槽に飼育されている魚類の9割を越す168種

の検出 (93.3%) に成功しました (DNA のリファレンスデータがないものは除く)。また、隣接するサンゴ礁域からとった天然海水からも亜熱帯性魚類 93 種を検出しました。両者を合わせると、サンゴ礁から深海にかけてのさまざまな環境に生息する魚類計 232 種 (70 科 152 属) を検出できたこととなります。

## ■ 研究方法と結果

魚類のメタバーコーディングを成功させるためには、(1) どんな魚にも共通する 2 つの保存的な領域を DNA の塩基配列から探し出さなければなりません。同時に、(2) その領域に挟まれる DNA の配列は魚の種類が識別可能な十分な「違い」をもっていなければなりません。さらに、(3) 環境 DNA は劣化が進んでいることが多く、(2) の領域の長さは 200 塩基対未満が望ましいと考えられています。

本研究では、これら 3 つの条件を満たす領域を、魚類 880 種から得られたミトコンドリアゲノム全長配列を比較することにより探し出しました。上記 (1) の保存的領域に結合する 1 対のプライマー (短い 1 本鎖 DNA) を設計すればあらゆる魚の DNA に結合し、そこを起点にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で DNA を増幅すれば、2 つのプライマーとそれらに挟まれる (2) の可変領域が必要十分量得られます。さらに、プライマーにさまざまなアダプターと呼ばれる配列をつけることにより、次世代シーケンサで大量のサンプルを超並列分析できるようになりました。

まず最初に、魚類 3 万種の多様性を網羅する 96 種を選び、その組織から抽出した DNA を用いてこれらプライマーの性能を検証しました。その結果、いずれの種からも良好な PCR 産物が増幅されました。次に、沖縄美ら海水族館の 4 つの水槽水 (2~10 リットル; 計 28 リットル) から抽出した DNA を増幅して次世代シーケンサで分析したところ、最も大きな黒潮水槽からは 63 種中 61 種 (97%)、最も多様性が高い熱帯魚水槽からは 105 種中 95 種 (91%)、深海魚を飼育している深層水槽からは 13 種中 13 種 (100%)、そして汽水域のマングローブ水槽からは 8 種中 8 種 (100%) という高い検出率を得ることができました (下図参照; 水槽間で飼育種の重複有り)。多くの種が混在する水槽の種組成を、この方法で 9 割以上再現できたこととなります。



また、隣接するサンゴ礁域からとってきた天然海水からも 93 種を検出しました。水槽水の結果と天然海水の結果を合わせると、亜熱帯のサンゴ礁から深海にかけてのさまざまな環境に生息する魚類計 232 種 (70 科 152 属) を検出できたこととなります。

## ■ 研究の意義

今回開発した手法は、水を数リットル汲んでろ過すれば、後は DNA を抽出して分析するだけの非常に簡単なものです。現在、リファレンスとなる DNA データは 5,000 種近くを網羅していますが、魚類は世界で 3 万種以上います。このリファレンスデータがさらに充実すれば、魚類に関する専門的知識がなくても世界中の海や川で魚類相の調査を行うことができます。従来の手法 (目視や漁獲) では、労力や時間や費用の点で実現できなかった魚類多様性のモニタリングが「いつでも」「どこでも」容易にできるようになったという点で画期的といえ

るでしょう。

今回開発した技術では、1回の分析で1,000サンプル以上(1,000箇所以上の水)のデータを得ることが可能です。ですから将来的には、特定地域の魚類相をさまざまな時間スケール(たとえば毎時・毎日・毎週)でモニタリングしたり、さまざまな空間スケールの魚類相(たとえば日本全国・全世界)を同時多地点でモニタリングしたりなど、これまでの手法では考えられなかった規模でのモニタリングが可能になります。生物多様性モニタリングにビッグデータの時代が来たと言っても過言ではないでしょう。

さらに、深海や未踏の地など魚類相が明らかになっていない水域で調査を行えば、未知の魚を検出できるかもしれません。あるいは、既知の魚でも未知の生息地を発見することが可能になります。今後の幅広い応用範囲に注目すべき手法ともいえるでしょう。

### 発表論文

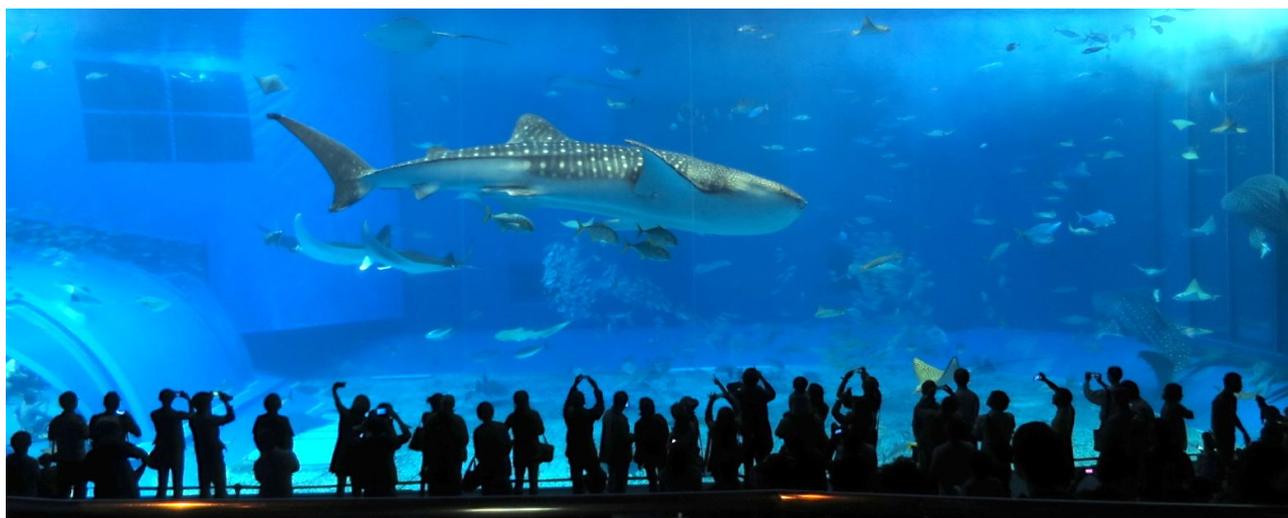
**英文タイトル** : MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species

**和訳** : 魚類環境 DNA メタバーコーディング用ユニバーサルプライマー MiFish : 亜熱帯産魚類を 230 種以上検出

**掲載ジャーナル** : Royal Society Open Science

**Doi**: 10.1098/rsos.150088

**著者** : 宮 正樹 (千葉県立中央博物館)・佐藤行人 (東北大学)・福永津高 (東京大学)・佐土哲也 (千葉県立中央博物館)・J. Y. Poulsen (オーストラリア博物館)・佐藤圭一 (沖縄美ら島財団)・源 利文・山本哲史 (神戸大学)・山中裕樹・近藤倫生 (龍谷大学)・荒木仁志 (北海道大学)・岩崎 渉 (東京大学)



参考写真 : 沖縄美ら海水族館の黒潮大水槽