

バケツ一杯の水で棲んでいる魚が判る技術の開発

革新的な魚類群集調査法, 環境DNAメタバーコーディング法の誕生

宮 正 樹

はじめに

科学技術が発展した今日においても、「どこにどんな生きものがあるのか?」という問いに答えるのは容易でない。水生生物である魚類の場合には、潜水観察をしたり漁具を使って採捕したりなど、多大な労力と費用がかかるうえに長期間の調査が必要となる。さらに、日本産魚類だけでも 4,300 種以上いるため、種の同定を行うには高度に専門的な知識と経験が必要となる。そんな面倒な調査を、いつでも、どこでも、誰にでもできるようにしたのが、本稿で紹介する「魚類環境 DNA メタバーコーディング法」だ。

環境 DNA とは?

DNA (デオキシリボ核酸) は親から子へと受け渡される遺伝子の本体である。その実態は、4 種類の「塩基」(A, C, G, T) と呼ばれる物質が鎖状に連なったもので、生命活動に必要な情報を蓄積している。

たとえば我々ヒトは 31 億もの塩基 (実際には二本鎖となって対をなしている) を使ってさまざまな情報を蓄積しており、そこには個人を特定する情報や、ヒトがヒトであることを特徴づける情報が刻まれている。

環境 DNA とは、本来生物本体に収められているはずの DNA が、水や空気や土の中に放出されたものを指す。魚の場合は、体表の粘液や糞を通じて体外に DNA が放出されることが多いようだが、水中にそのような DNA が漂っていることがわかったのはごく最近のことだ。

メタバーコーディング法とは?

先ほど、DNA にはヒトがヒトであることを特徴づける情報が刻まれていると述べた。もちろん、これはどんな生物種にでも当てはめることができる。そして、この ACGT の連なり (DNA 塩基配列) を「商品バーコード」になぞらえて「生物バーコード」と呼ぶ。

ある種がその種であることを特徴づける生物バーコード (=短い DNA 塩基配列) を決定すれば、それを調べるだけで簡単に種の特定ができてしまう。専門的知識が無くても種の特定ができるこの手法を「バーコーディング法」と呼ぶ。

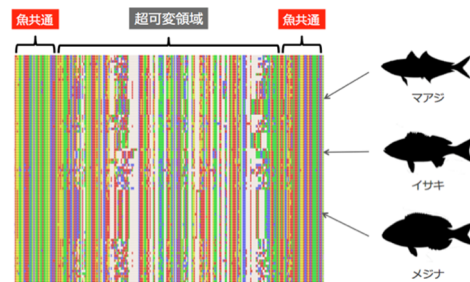
それでは、環境メタバーコーディング法とは何か。この手法は、バーコーディング法のように単一種を相手にするのではない。水や土や空気などの環境中に存在する多様な種の DNA を分析可能な量に増やし、最新の分析機器で同時並列的にまとめて多種を検出する方法

である。

環境 DNA メタバーコーディング法の概要

魚類の環境 DNA がどこにでも漂っているとはいえ、その量はわずかなもので、そのままでは分析できない。一定量の水 (たとえば 1 リットル) を汲んで、それをろ過してフィルター上に集め、そのフィルターから DNA のみを抽出する。そうやって濃縮しても、まだまだ量が足りない。そこで、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) をつかって分析可能な量まで増やしてやる。

PCR に必要なのがプライマーと呼ばれる分子ツールだ。魚類全体に共通する配列を両端にもつ超可変領域を選び出す (下図)。そして、両脇の保存領域にくっつくプライマーという配列を設計する (塩基 A は T に、C は G にくっつく)。この配列を人工的に合成したものがプライマーで、これを一組つかって PCR という反応により分析可能な量に増やすことができる。



私が設計したのが、この分子ツールであるプライマーで、2015 年に発表した論文で MiFish と名づけた (Miya et al. 2015)。この MiFish という人工合成塩基配列の両端にさまざまなアダプターと呼ばれる配列を尻尾のようにつけると、次世代シーケンサ (NGS) という最新の分析機器で異なるサンプル (異なる場所からとれた環境 DNA) を同時並列的に分析できる。NGS を使うと、異なる 1,000 以上のサンプルから得られた数千万本の塩基配列を一昼夜で決定できる。

この大量の塩基配列をコンピュータで解析して魚種を決定すれば、そこに棲んでいた魚が判ることになる。もちろん、それが判るためには、リファレンス配列といって魚の種類と DNA 塩基配列が紐付けされていなければならない。そのようなデータベースがあって初めて魚の種類が判ることになる。

MiFish 法の種検出能力

以下、本稿では MiFish プライマーをつかった環境 DNA

メタバーコーディング法を MiFish 法と呼ぶ。

この手法がどのくらいの種検出能力をもつのか、まずは飼育種が判っている水族館で検証してみた。選んだ水族館は沖縄の美ら海水族館で、ジンベエザメを飼育している黒潮水槽、熱帯魚水槽、深海水槽、そしてマングローブ水槽の4つの水槽だ。

各水槽から水を汲んでそれをろ過、ろ過に使ったろ紙から環境 DNA を抽出、抽出 DNA から MiFish プライマーを用いて魚の DNA のみを1回目の PCR で増幅、増幅産物に2回目の PCR で各種のアダプターを付加するとライブラリと呼ばれる次世代シーケンサで分析可能な分子となる。

このライブラリを次世代シーケンサで分析したところ、黒潮水槽ではリファレンス配列をもつ種の 93% に相当する 61 種を検出できた。種数が多い熱帯魚水槽では若干検出率が落ちたが (91%)、水槽の容積が小さい深海ならびにマングローブ水槽で、100%の種を検出できた (下図)。



もちろん、実際のフィールドでも種の検出力を試してみた。京都府の舞鶴湾でグリッド状に配置した計 48 の測点を6時間かけて採水し、MiFish 法でメタバーコーディングを行ったところ、過去 14 年間で潜水観察された 80 種を大きく上回る 128 種を検出することができた (Yamamoto et al. 2017)。また、琵琶湖に流入する河川で同様の調査を行ったところ、過去に文献上に記録された魚類の 9 割近い種を、わずか 1 人が 10 日間で行った調査で検出した (Nakagawa et al. 2018)。

環境 DNA の空間的検出範囲

環境 DNA で検出された魚は、実際はどこにいた魚なのだろうかとよく聞かれる。一方向に流れる河川であれば、上流にすむ魚が下流で検出されてもおかしくはない。また、潮流が速い場所であれば環境 DNA が遠くから流されてくることもあるはずだ。さらに、環境 DNA はいずれ分解されて検出できなくなると思われるが、その寿命はどのくらいなのだろうか。

いずれの問いに対しても、環境条件によって大きく変化するため、明確な答えは得られていない。ただし、水槽内での実験によれば、環境 DNA の寿命はせいぜい数日という結果が得られている。また、河川で調査を行うと上流にいる魚は上流で検出され、遠く離れた下流で検出されることはない。

海で調査しても場所ごとに際だった個性をもつ魚類群集が検出される。こうして得られたデータを見てみ

ると、どうやら環境 DNA で検出された魚は、すぐそばにいたものから放出されたものだと推察される。

実際、舞鶴湾で行われた「いけす実験」(舞鶴湾に生息しない魚を湾内のいけすに入れて、その環境 DNA をさまざまな条件で検出する実験)によれば、海域で検出された環境 DNA は、対象生物が 1 時間以内に採水地点から半径 30m 以内にいたことを反映するという結果が得られている (益田ほか 2018)。

MiFish 法がもつ可能性

環境 DNA 調査の一番の利点は、バケツ一杯の水を汲みさえすれば事足りることである。上記の一連の実証的研究により、環境 DNA を MiFish 法で分析すれば「いつ・どこに・どんな魚種がいるのか」判ることが示された。ということは、誰もこれまで考えもしなかったような、大規模な時空間スケールの調査ができるのではないだろうか...と思いついた。

そこで、JST の戦略的創造研究事業 (CREST) から支援を受けて 2017 年の夏に全国一斉魚類相調査を行った。延べ 114 名の人が参加して、北は宗谷岬、東は納沙布岬、西は与那国島、南は南硫黄島まで全国の 528 地点で採水を行い、MiFish 法により全国各地の魚類相を調査した。この結果については現在解析中だが、日本全国の魚類相を俯瞰できる素晴らしいデータが得られている。

一方、環境 DNA 調査の機動性を生かして、現在房総半島南部の岩礁海岸に 11 個の測点を設けて隔週サンプリングを行っている。この調査で得られた結果も大変興味深いもので、房総半島の魚類群集の動態が手に取るようにわかるデータが得られている。データを蓄積することにより、魚類群集の動態の短期予測ができるのではないかという手応えを得つつある。

MiFish 法は国内だけでなく、広く国外でも利用されている。私の知る限り五大陸すべてで MiFish 法を用いた調査が行われている。また、国内では各省庁が行っている海や河川の調査で MiFish 法が試行されている。さらに、複数の民間企業が MiFish 法の受託分析を開始しており、この流れは海外企業にも見られる。

このように、MiFish 法は、国内のみならず海外でも魚類群集をモニタリングする便利なツールとして広まり始めている。千葉中央博で生まれたこの技術が、世界標準の技術になる日も遠くないかもしれない。

引用文献

- 益田ほか (2018) 海洋と生物 40:17-22.
- Miya et al. (2015) Royal Society Open Science 2:15088.
- Nakagawa et al. (2018) Freshwater Biology 63:569-580.
- Yamamoto et al. (2017) Scientific Reports 6: 40368.

(生態・環境研究部)