

# 「環境DNA」

特定の環境に生存する生物種の種類と量を推定するための手法の開発と検証

安江 博

## これまでの報告

### Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys

Hideyuki Doi<sup>1\*</sup>, Kimiko Uchii<sup>1,2</sup>, Teruhiko Takahara<sup>3</sup>, Saeko Matsushashi<sup>1</sup>, Hiroki Yamanaka<sup>4</sup>, Toshifumi Minamoto<sup>5</sup>

#### Abstract

An environmental DNA (eDNA) analysis method has been recently developed to estimate the distribution of aquatic animals by quantifying the number of target DNA copies with quantitative real-time PCR (qPCR). A new quantitative PCR technology, droplet digital PCR (ddPCR), partitions PCR reactions into thousands of droplets and detects the amplification in each droplet, thereby allowing direct quantification of target DNA. We evaluated the quantification accuracy of qPCR and ddPCR to estimate species abundance and biomass by using eDNA in mesocosm experiments involving different numbers of common carp. We found that ddPCR quantified the concentration of carp eDNA along with carp abundance and biomass more accurately than qPCR, especially at low eDNA concentrations. In addition, errors in the analysis were smaller in ddPCR than in qPCR. Thus, ddPCR is better suited to measure eDNA concentration in water, and it provides more accurate results for the abundance and biomass of the target species than qPCR. We also found that the relationship between carp abundance and eDNA concentration was stronger than that between biomass and eDNA by using both ddPCR and qPCR; this suggests that abundance can be better estimated by the analysis of eDNA for species with fewer variations in body mass.

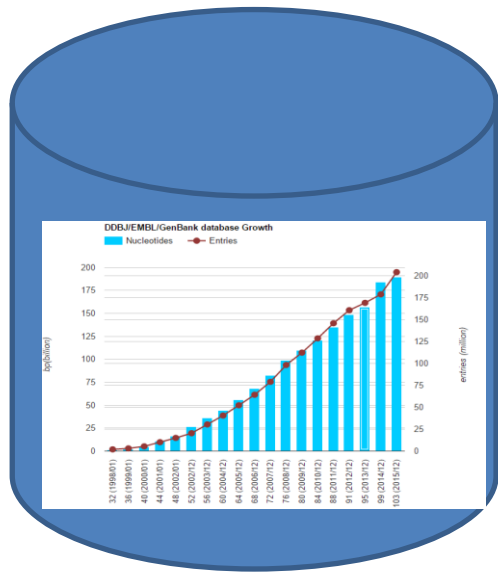
PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0122763 March 23, 2015

この報告から、特定環境内での、生物数(ここでは、コイを使って検証)とqPCR、そして、ddPCRの結果と極めて強い正の相関があることが判った。このことから、環境採取DNA中の特定生物種のDNA量は、その生物種の環境内の数と極めて強い正の相関があると判断される。



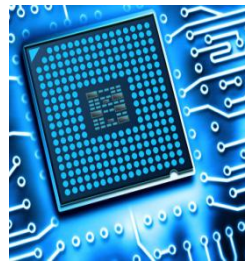
NGSのデータ解析により、環境中の生物種とその相対量の推定が可能

# 世界に登録されている塩基配列を分類し、生物種特異的塩基配列のライブラリーの構築

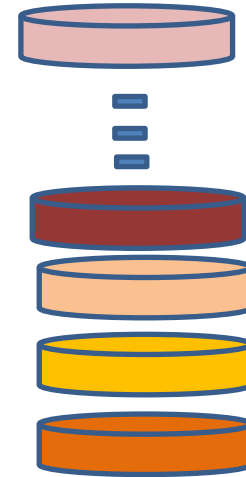
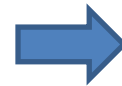


GenBankに登録されている  
塩基配列

2015年12月までに、 $2.04 \times 10^{11}$ 塩基のデータが  
登録された 985万生物種

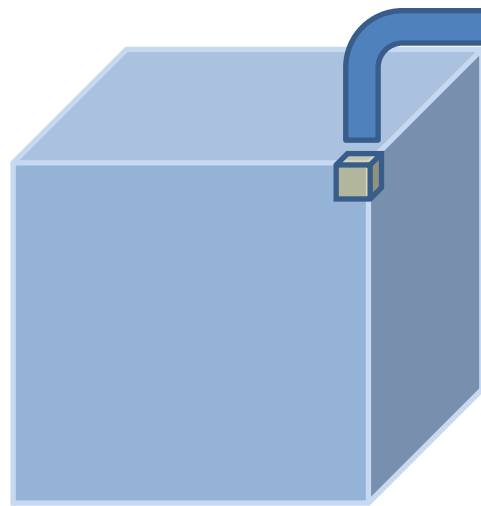


コンピュータを用  
いた並列演算



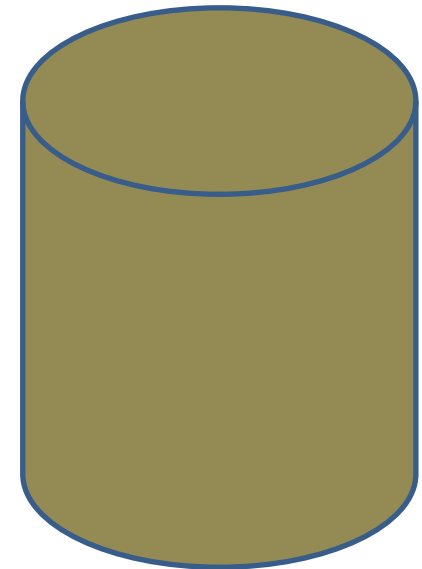
生物種特異的塩基配列  
のライブラリーの構築

特定環境(例:湖沼)



特定環境の一部から  
全DNAを抽出

DNAの塩基配列解析

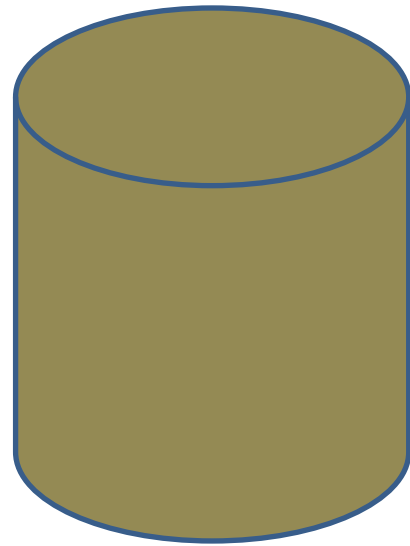


DNAの塩基配列データ

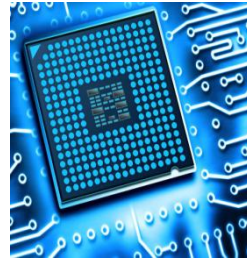


特定環境(例:湖沼)に生存する生物の  
種類と量を推定

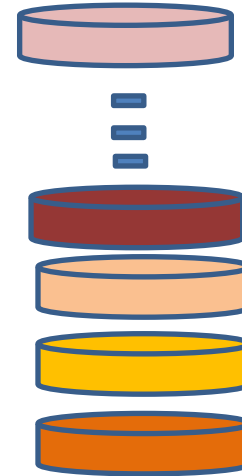
# 特定環境(例:湖沼)に生存する生物の 種類と量を推定



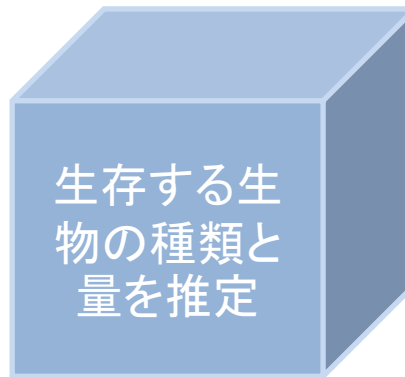
特定環境中のDNA  
塩基配列データ



コンピュータを用  
いた並列演算



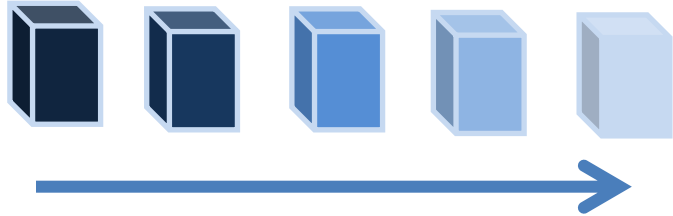
生物種特異的塩基配列  
のライブラリーの構築



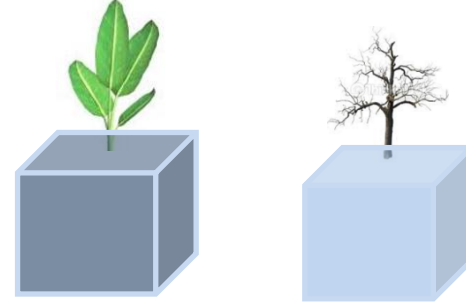
生存する生  
物の種類と  
量を推定

# 解析の応用例

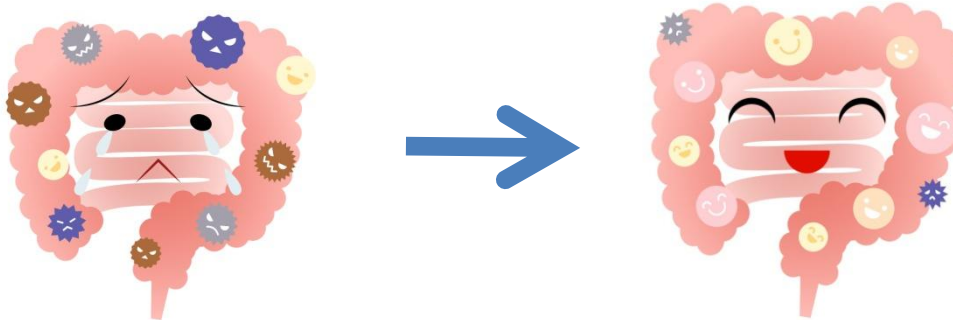
## 1. 湖沼の生態の経時的変化



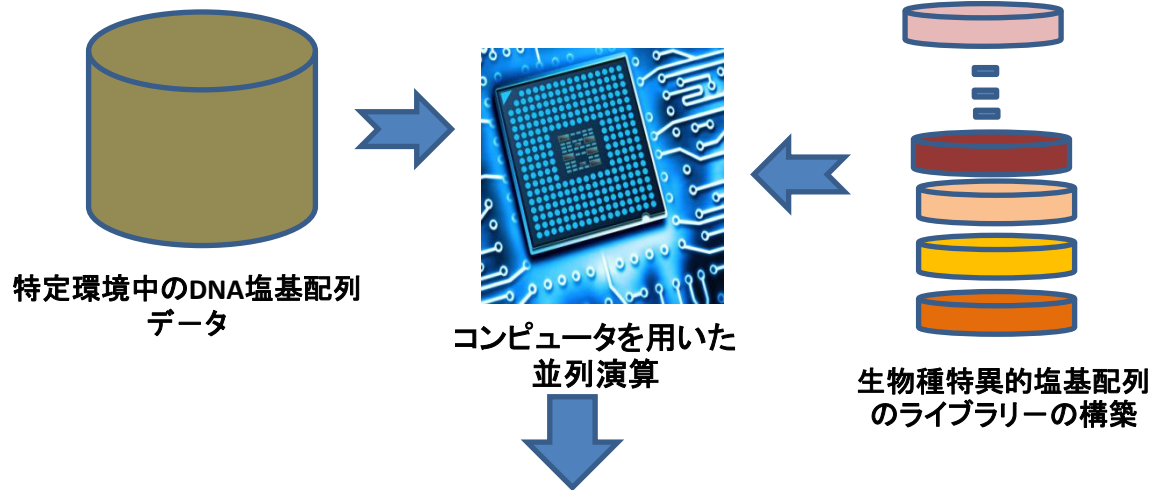
## 2. 土壌生物の差異



**3. 腸内フローラ:** うつ病の人は健康な人と比べて、ビフィズス菌など「善玉菌」の数が腸内に少なく、菌数が一定以下だとうつ病患者の割合が高くなるとの研究結果を、国立精神・神経医療研究センターとヤクルトの共同チームがまとめ、オランダの科学誌に発表した。腸内細菌は近年、脳の機能に影響を与えるとの研究発表が相次いでおり、チームは善玉菌の減少がうつ病発症のリスクを高める可能性があると考えている。



## 具体的な解析手法



1. 20塩基単位での比較→対応候補
2. 相同であれば、間違いの確率は $1 / 4^{20}$
3. 念のため対応するリードとGenbankの登録配列と比較
4. 上記の結果を基に、DNAの由来生物種を特定
5. 単位塩基配列当たりのカウント数から、生物種の量を推定

生存する生物の種類と量を推定

# 2014-01-31に公開 Illumina 100bp pair-end reads シャンプレーン湖

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN04005876>

Name	txid	Reads
freshwater metagenome	449393	119297
Limnohabitans sp. 103DPR2	1678129	98867
Limnohabitans sp. 63ED37-2	1678128	53408
Curvibacter putative symbiont of Hydra magnipapillata	667019	36190
Rhodoluna lacicola	529884	33141
uncultured actinobacterium	152507	9857
beta proteobacterium CB	543913	8350
Polynucleobacter asymbioticus QLW-P1DMWA-1	312153	8015
Polynucleobacter necessarius subsp. necessarius STIR1	452638	7853
Acidovorax sp. KKS102	358220	7602
Curtobacterium sp. MR_MD2014	1561023	6363
uncultured proteobacterium DelRiverFos06H03	311783	6084
Polynucleobacter asymbioticus	576611	4987
uncultured bacterium	77133	4973
uncultured proteobacterium DelRiverFos13D03	311564	4616
Verrucomicrobia bacterium IMCC26134	1637999	4576
Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444	279238	4292
Sphingomonas taxi	1549858	4265
Microbacterium testaceum StLB037	979556	4106
Caulobacter sp. K31	366602	3752
Leptothrix cholodnii SP-6	395495	2953
fish metagenome	496924	2339
marine metagenome	408172	2262
Mycobacterium sp. EPa45	1545728	2224
Caulobacter henricii	69395	2209
Cyanobium gracile PCC 6307	292564	2165
Microbacterium sp. CGR1	1696072	2025
Caulobacter segnis ATCC 21756	509190	2016
Brevundimonas subvibrioides ATCC 15264	633149	1941
Mycobacterium rhodesiae NBB3	710685	1873
Ramlibacter tataouinensis TTB310	365046	1667
Polaromonas sp. JS666	296591	1584
Polaromonas naphthalenivorans CJ2	365044	1560

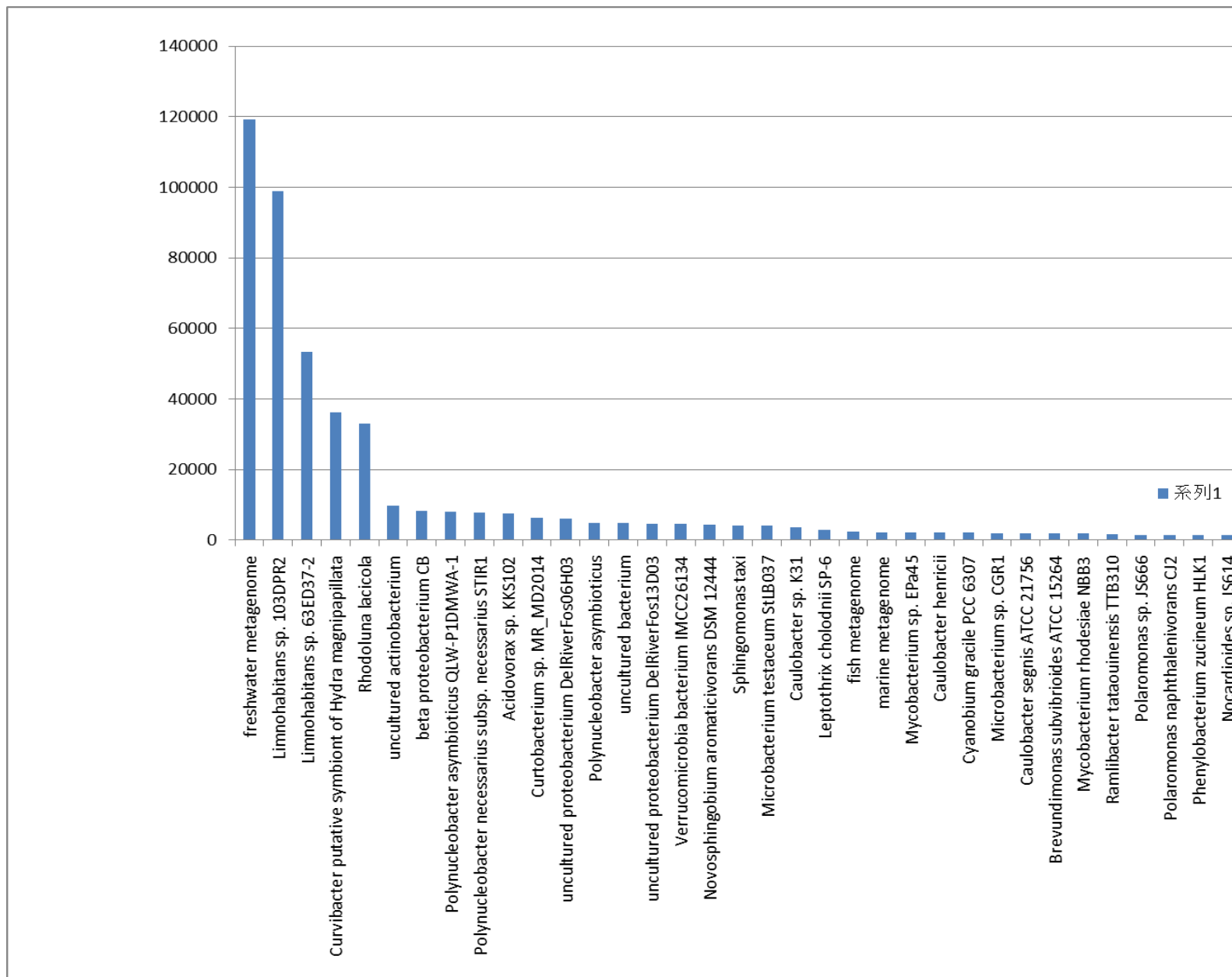
Brevundimonas sp. DS20	1532555	1171
Pimelobacter simplex	2045	1064
Homo sapiens	9606	1043
Rhodococcus sp. PBTS2	1653479	1020





# 2014-01-31に公開 Illumina 100bp pair-end reads シャンプレーン湖

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN04005876>



種の解析は学名で表示されるので理解しにくい>>>和名データベースを作成  
 約10万種の和名/学名対応データベースを作成

	和名	学名	出典			
	A	B	C	D	E	F
1	オオハシタイランチョウ	Megarynchus pitangua	サイエンスミュージアムネット			
2	ハルカゼガイ	Melo melo	サイエンスミュージアムネット	東海大学出版会	TaxonMetainfo_eukarya	
3	クリシマミズキ	Corylopsis glabrescens	サイエンスミュージアムネット	北隆館		
4	メズロサ目	Medullosales	allplants.htm			
5	アセトバクター・パスツリアヌス 亜種 パラドクス	Acetobacter pasteurianus paradoxus	南山堂			
6	オオアワダチソウ	Solidago gigantea var. leiophylla	サイエンスミュージアムネット			
7	ヤナギバヒメジョオン	Erigron pseudo-anuus	サイエンスミュージアムネット			
8	ハヤシノウマオイ	Hexacentrus japonicus japonicus	サイエンスミュージアムネット			
9	ウマオイ	Hexacentrus japonicus japonicus	サイエンスミュージアムネット			
10	トウゴロウイワシ	Atherina valenciennesii	TaxonMetainfo_eukarya			
11	ミヤマキンポウゲ	Ranunculus acris var. nipponicus subvar. nipponicus	サイエンスミュージアムネット			
12	ツラナガハギ	Paramonacanthus nipponensis	サイエンスミュージアムネット	TaxonMetainfo_eukarya		
13	ガボンジャコウネズミ	Suncus remyi	平凡社			
14	オリーブオウギセッカ	Bradypterus sylvaticus	大学書林			
15	ガマズミ	Viburnum erosum	サイエンスミュージアムネット			
16	コバノガマズミ	Viburnum erosum	サイエンスミュージアムネット	北隆館		
17	ミヤマセラタハムシ	Gastrolina peltoidea	サイエンスミュージアムネット	北隆館		
18	オオマダラコクヌスト	Leperina tibialis	サイエンスミュージアムネット	北隆館		
19	カエデヅウクラゲ	Cardiopoda placenta	東海大学出版会			
20	ツノクダマキガイ	Clavus experatus	サイエンスミュージアムネット			
21	ツマリマツカサ	Myripristis woodsi	サイエンスミュージアムネット			

学名で登録されている数は985万種で、そのうち、和名があるのは約10万種

# Deaths from unsafe water, sanitation and hygiene

