

# 実験医学

www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/

2016 Vol.34 No.1

1

特集

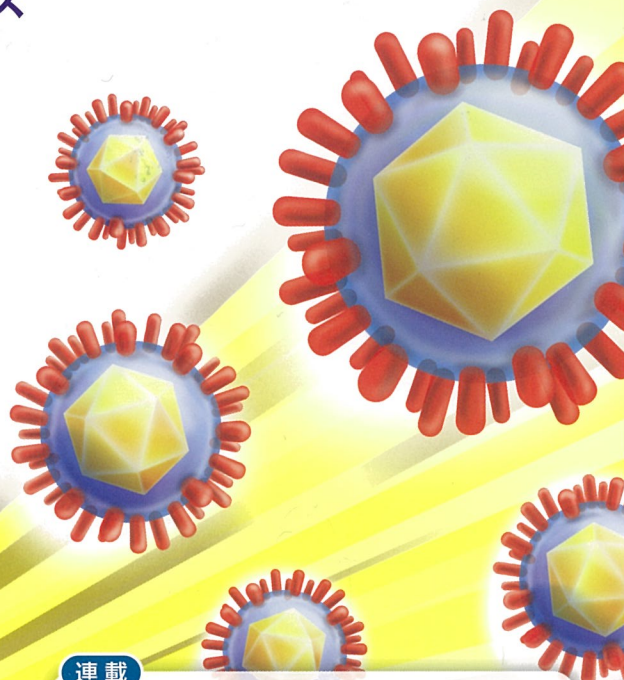
## 新薬認可で治療革命の幕開け

# がんのウイルス療法

### がん細胞だけを破壊する組換えウイルス その作用機序と開発動向

▶企画／藤堂具紀

- 概論—ウイルス療法の夜明け ▶藤堂具紀
- 遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスⅠ型 ▶福原 浩, 藤堂具紀
- テロメラーゼ標的化がん治療・診断用アデノウイルス  
▶田澤 大, 香川俊輔, 重安邦俊, 藤原俊義
- 多因子増殖制御型アデノウイルスの開発と実用化の展望 ▶小駱健一郎
- 麻疹ウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法 ▶甲斐知恵子
- 腫瘍特異的に増殖する遺伝子組換えワクシニアウイルス ▶中村貴史
- コクサッキーウイルスを用いたウイルス療法の開発 ▶谷 憲三朗
- 増殖型レトロウイルスベクター ▶稲垣亮仁, 笠原典之
- **フォーラム** 基礎研究を臨床に進めるために知っておきたいこと  
▶島田 隆/宮田俊男/長村文孝/丸山裕一, 三森重孝/藤堂具紀



#### 連載

**エコ実験** 最終回  
データベース, ウェブツールで遊ぼう 村田茂穂

**実験法**  
CRISPR/Cas9でHDR効率を高める方法 丸山 剛

**Update Review**  
環境DNA解析のインパクト  
岩崎 渉, 佐藤行人, 源 利文, 山中裕樹, 荒木仁志, 宮 正樹

**探訪記**  
細胞老化研究が巡礼の地から世界へ 高橋暁子



# 環境 DNA 解析のインパクト

岩崎 渉, 佐藤行人, 源 利文, 山中裕樹, 荒木仁志, 宮 正樹

**い**ま、生物が環境中に放出し、痕跡として残す DNA—環境 DNA—の解析技術が大きな展開を見せてつある。環境サンプルからその周辺で活動している生物の DNA を検出することが可能なこと、また、それが生態系を解明するうえで有用なツールとなりうることに大きな注目が集まったのは、ここ数年のことである。そしてさらに、幅広い生物種の環境 DNA を増幅できるユニバーサルプライマーの開発と次世代シーケンス技術の活用により、環境 DNA 解析は、生態系を網羅的に捉えるための技術として飛躍を遂げようとしている。本稿では、まず環境 DNA とはどのようなものかその研究小史を述べ、魚類環境 DNA のメタバーコーディング用ユニバーサルプライマー MiFish を用いた魚類相の網羅的解析について紹介し、最後に、この新たな技術の課題と展望について述べる。

## はじめに

環境 DNA (environmental DNA, eDNA) とはその名の通り、水や土壌といった環境試料中に含まれる DNA のことを指す。特に本稿では、メタゲノミクスなど環境試料中に含まれる微生物群集の DNA を解析するアプローチに対して、(その個体自体が試料中に含まれるわけではない) 大型生物由来の DNA を解析するアプローチを指して環境 DNA 解析とよぶ。近年の研究によって、環境試料中にはそのような DNA が分析可能な濃度で含まれていることが明らかになり、生態系を解明するうえで画期的なツールとして大きな注目を集めつつある。

近年の環境 DNA 解析の盛り上がりの源流は、2008 年に発表された Ficetola らの論文にある<sup>1)</sup>。この短い

論文では、ヨーロッパの湖沼で採取した水試料から、外来種であるウシガエルの環境 DNA を種特異的プライマーによる PCR によって検出したところ、その結果が実際に対象生物種の在・不在の情報と整合していたことが報告された。この研究を契機として、アメリカザリガニ<sup>2)</sup>、ブルーギル<sup>3)</sup>、オオサンショウウオ<sup>4)</sup> などさまざまな生物種を対象とした解析が急速に進み、現在では、環境 DNA 解析は当該環境における対象生物種の在・不在に関する情報を得るうえで有効な技術として受け入れられつつある。特に水試料を対象とした解析においては、DNA が環境中を拡散することを仮定できるほか、現場においては水を汲むだけで生態系に関する調査を行うことが可能であるという意味で、簡便かつ強力な手法といえる。

さらには、在・不在に限らず、リアルタイム PCR な

## Impact of environmental DNA analysis

Wataru Iwasaki<sup>1)~3)</sup>/Yukuto Sato<sup>4)</sup>/Toshifumi Minamoto<sup>5)</sup>/Hiroki Yamanaka<sup>6)</sup>/Hitoshi Araki<sup>7)</sup>/Masaki Miya<sup>8)</sup> : Graduate School of Science, the University of Tokyo<sup>1)</sup>/ Graduate School of Frontier Sciences, the University of Tokyo<sup>2)</sup>/Atmosphere and Ocean Research Institute, the University of Tokyo<sup>3)</sup>/Tohoku Medical Megabank Organization, Tohoku University<sup>4)</sup>/Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University<sup>5)</sup>/Faculty of Science and Technology, Ryukoku University<sup>6)</sup>/Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University<sup>7)</sup>/Department of Zoology, Natural History Museum and Institute<sup>8)</sup> (東京大学大学院理学系研究科<sup>1)</sup>/東京大学大学院新領域創成科学研究科<sup>2)</sup>/東京大学大気海洋研究所<sup>3)</sup>/東北大学東北メディカル・メガバンク機構<sup>4)</sup>/神戸大学大学院人間発達環境学研究所<sup>5)</sup>/龍谷大学理工学部<sup>6)</sup>/北海道大学大学院農学研究院<sup>7)</sup>/千葉県立中央博物館動物学研究所<sup>8)</sup>)



高度保存領域1

多数の変異を含む領域

高度保存領域2

(Fプライマー)

(平均172 bp, 12S rRNA遺伝子中)

(Rプライマー)

解析に用いた魚種(の一部)

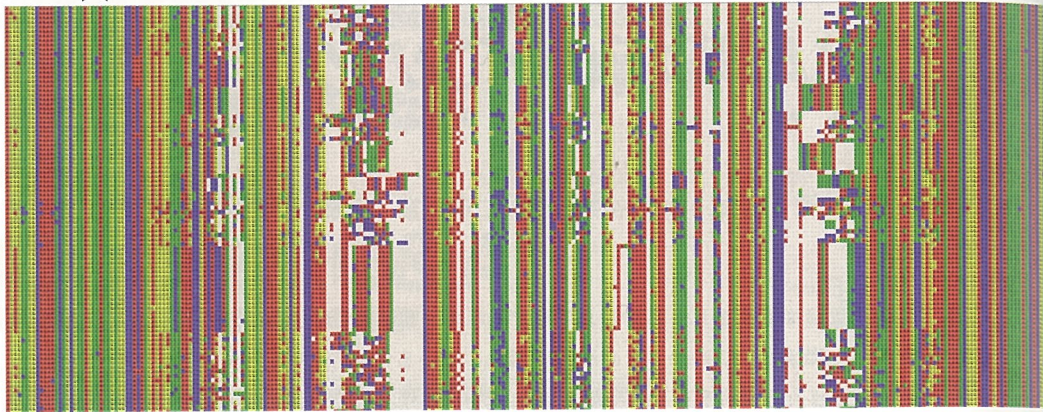


図1 全魚種に有効な環境DNA解析用ユニバーサルプライマー MiFishの設計

ミトコンドリア12S rRNA遺伝子を対象とし、環境試料中の微量な環境DNAを感度よく増幅することが可能。

どによって環境DNAの濃度を定量し、対象生物種の生物量や個体数をも推定しようとする研究も進みつつある。例えば高原らは、コイを用いた水槽実験と小型の池での操作実験により環境DNA濃度と生物量との間に正の相関を見出し、これをもとに野外でのコイの生物量の分布推定を試みている<sup>5)</sup>。また土居らは、デジタルPCRによって高精度な環境DNAの定量を行っている<sup>6)</sup>。野外での生物量・個体数の推定にあたって、小規模な系で得られた相関関係をどの程度・どのように適用できるかについてはまだ多くの検討課題もあるものの、今後も技術開発が続くと考えられる。

### ユニバーサルプライマーによる環境DNA解析

さて、特定の生物種を対象とした環境DNA解析に対して、もし環境試料中に含まれる多数の生物種の環境DNAをまとめて解析することができれば、当該環境に存在する生物群集の全体像に関する情報を一挙に取得することが可能になり、これまで労力、時間、費用の点から困難であったような大規模なモニタリングへとこの技術を応用できることが期待される。

こういったメタバーコーディング解析の初期の試みとしては、源ら<sup>7)</sup>が河川から、またThomsenら<sup>8)</sup>が海

から、それぞれ数種から十数種の魚類環境DNAの同時検出に成功している。これらの解析においては、ミトコンドリア *cyt-b* 遺伝子を対象として、各水域の魚類相を参考に設計された“ローカルな”多生物種対応プライマーが用いられた。またその後、脊椎動物全般のミトコンドリア12S rRNA遺伝子を対象としたユニバーサルプライマー *ecoPrimer*<sup>9)</sup>を用いた研究が行われた<sup>10)</sup>。この研究では、「正解」となる魚類相が既知であるというメリットがある水族館(具体的にはモンタレー湾水族館)の水槽の水試料からの環境DNAの検出が試みられ、結果、計11種の魚類のうち7種の検出に成功している。一方でプライマーの汎用性に難があり、軟骨魚類(サメ・エイのなかま)や硬骨魚類のマンボウを含む計4種の魚類を検出することはできなかった。

こうした初期の研究における問題点を克服すべく、われわれは最近、全魚種に有効なユニバーサルプライマー MiFishを設計し、その環境DNA解析における有効性を実証した<sup>11)</sup>。設計にあたっては、著者らの一部が開発・維持を行っている魚類ミトコンドリアゲノムデータベース MitoFish<sup>12)</sup>からダウンロードした880種の魚類のミトコンドリアゲノム全長配列データを解析し、全魚類に共通する2つの保存的領域に挟まれ、かつ、平均172塩基対と短いながらも種の違いを識別するために必要な多くの変異を蓄積している領域を12S

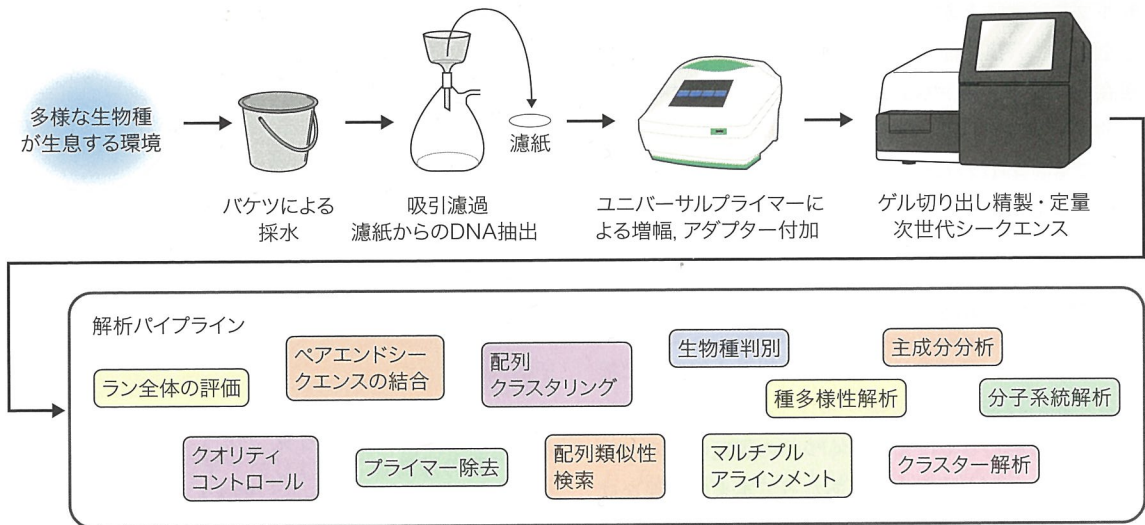


図2 ユニバーサルプライマーを用いた環境DNA解析のワークフロー

rRNA 遺伝子中に見出した (図1)。増幅配列長は環境DNA解析において重要なポイントであり、より長い配列を用いれば情報は増えるが、一方で、環境中でDNAが徐々に分解されていくためにPCRで増幅できる可能性が小さくなるほか、読みとり配列長の短い超並列シーケンサー (いわゆる次世代シーケンサー) での解析が困難になる。増幅されたPCR断片は、インデクス配列を付加することで、多数のライブラリを並行して超並列シーケンスに持ちこむことができる (具体的には、MiSeqを用いた $2 \times 150$ 塩基対のペアエンドシーケンスを行っている)。

解析パイプラインはニーズに合わせて改良を重ねていくことになるが、現在構築しているパイプラインでは、超並列シーケンサーから得られたデータはまず一次処理に供され、ラン全体の評価、末端の低品質シーケンスの除去、ペアエンドシーケンスの結合、結合の結果信頼度の低いシーケンスの除去、プライマー配列の除去、同一配列のクラスタリングが行われる。これに引き続き、独自に構築した配列データベース (現在、魚類およそ6,600種を含む。なお、現生魚類の総種数は3万を超える程度とされている) に対する配列類似性検索が行われる。現在の設定では、類似度が97%以上のヒットがあったリードについて、種または属の情報を信頼度のスコアとともに示すようになっ

ている。また、97%未満の類似度しか示さない配列についても別途その後の解析に用いることができるようになっている。さらに、種多様性解析、主成分分析、クラスター解析、近隣結合法による分子系統解析などによって、結果をより深く評価したり多角的に解釈したりすることが可能となっている。

さて、ユニバーサルプライマー MiFishによって水中の魚類環境DNAをどの程度“一網打尽”にすることができるのか、また、そもそも実際にどれくらい多様な種の環境DNAが限られた量の水試料中に存在しているかを明らかにするため、われわれは、世界最大級の規模をもち70種近い魚種が飼育されている沖縄美ら海水族館の「黒潮の海」水槽ほか、計4つの水槽から4~10リットルの水を孔径 $0.7 \mu\text{m}$ のフィルターをつかって吸引濾過し、フィルター上に残った環境DNAを対象として解析を行った (図2)<sup>11)</sup>。その結果、4つの水槽で飼育されている魚類 (そもそもリファレンスシーケンス情報がないものを除く) 180種のうち、驚くべきことに、実に168種の配列を検出することに成功した (これら168種は59科123属にわたり、分類学的・生態学的にもきわめて多様であった)。このことは、水槽全体の水量から考えれば数万分の一にも満たないごく微量の水試料のなかに、水槽中の魚種の9割を越える魚の環境DNAが含まれていること、そして、ユニバー



サルプライマーと超並列シークエンサーによってそれらを一度に検出可能であることを示している。さらに、現在までの研究で、水族館のように魚の密度の高い人工的な環境に限らず、日本全国の沿岸水、河川水、湖水等でも、われわれの手法によって魚類環境DNAが検出可能であることを確認しつつある。

## 環境DNA解析の未説明課題

このように、環境DNA解析は生態系を網羅的に捉えるための技術として飛躍を遂げようとしているが、その活用にあたってはまだいくつかの課題がある。とりわけ、データを解釈するにあたって本来は必要なはずの基礎的な情報がまだ十分に蓄積されておらず、ブラックボックスとなっている部分が多いことに注意を払う必要がある。

そもそも、環境DNAとして検出されるDNAが実際にどのような状態で環境中に存在しているのかについても、まだ不明な点が多い。魚類をはじめとする大型脊椎動物由来の環境DNAが $0.7\mu\text{m}$ のフィルターによる濾過により効率的に収集できる<sup>13)</sup>ことから、その実体は、体表から剥がれ落ちた細胞や、腸管内の上皮組織が糞の排出とともに環境中に放出されたものなどであろうと考えられているが、詳細は明らかになっていない。また、このこととも関係するが、環境DNAがどのように環境中で分解・拡散するのかについても、わかっていない部分が多い。水中では、種によって分解の速度は違うものの指数関数的に減少し、数日から1週間ほどで検出不可能な濃度まで低下するとする報告がある<sup>8)</sup>。われわれの実験でも、水温依存性はあるものの1日のうちに90%ほど減少するケースも確認されていることから、採水後の試料の保存等を手早く行う必要があることは確かである。

さらには、野外で採取した環境DNAがどれほどの空間スケール内に生息している生物相を反映しているのかという点も、まだ明確にされていない。前述の分解の速さを考慮すれば、極端に離れた地点の個体由来する環境DNAを検出することは難しいと考えられ、実際、両生類や魚類では個体のいる地点から数mから数百mで検出できなくなると報告されている<sup>14)15)</sup>。これらの数値は水の動態や水温・水質に依存する分解速



図3 羅臼の深層水から見つかったコンニャクウオ属の深海魚と、はじめて手にする感触に興奮している筆者の一人(荒木)

度などに強く影響を受けるはずであり、調査対象地点ごとに下調べをする必要があるであろう。

## 環境DNA解析のフロンティア

ユニバーサルプライマーの実用化などの新規技術開発は、環境DNA解析の応用可能性を多方面に広げる可能性がある。ここでは、そのような例として、著者らのなかでも特に荒木らが進めている研究を2例ほど紹介しよう。

日本のサケ(シロザケ)の多くは冬に日本の川で生まれ、春には海へ下り、その後成長しながらオホーツク海、ベーリング海、アラスカ湾あたりを回遊して数年後に生まれた川へ戻り産卵、その一生を終える。その過程で彼らはどんな生物を捕食し、被食され、どんな生物と資源競争し、どんな生物と共存しているのか。こういった、本質的だがこれまで迫ることが難しかった疑問に対しても、環境DNA解析は多くの情報を与えてくれる。実際にサケを追いかける形で各地の水の分析を行ってみると、外洋での魚類相は驚くほどシンプルな一方、河川・沿岸域の生物多様性がきわめて高いことが改めて浮き彫りとなる。サケ学の分野では近年「一部のサケ科魚類には降海型と河川残留型の種内多型が生じており、じつは、大きくなって戻ってくる降海型ではなく川で十分に餌がとれる河川残留型の方が有利である」という説が唱えられつつあるが、まさ

に、サケが海へ降りるのは海に餌が豊富だからというよりも、天敵や競争相手となる種が希薄だからという“消極的な”理由によるのかもしれない。川で競争に負けた個体が高いリスクを負いつつも海に降りて敗者復活を期している、というわけだ。今後、環境DNAを使った種内多型解析などができるようになれば、このような仮説も検証可能となるだろう。

また、光の届かない深層・深海域は人類にとっての“ラストフロンティア”とも言われる。その生態系は多くの謎に満ちているが、高い水圧下かつ光のない状況での直接的な生物探索は簡単ではない。そこで現在、各自治体などの協力を得つつ、北海道近海の水深200 m以深の海洋深層水を対象とした環境DNA解析を進めている。生命の希薄な深層・深海域における分析には困難も予想されたものの、これまでに、クサウオやゲンゲの仲間を中心にじつに個性的で地域性溢れる深層の世界を垣間見ることに成功しつつある。また興味深いことに、同じ地域でも季節ごとに魚類相が変化しているように見えることから、深層の生態系はこれまで考えられていたように変化の少ない静的なものではなく、時空間的に揺らいでいるという可能性も示唆されつつある。そしてもちろん、環境DNA解析をもとに深層・深海域の未発見生物に迫るロマンにも、最後に触れないわけにはいかない(図3)。

## おわりに

このように、未解明の本質的な疑問も残されているものの、環境DNA解析は強力な技術として確立しつつあり、例えば、アメリカやヨーロッパの希少種保全や外来種駆除のプログラムではすでに実用化されはじめている。もちろん、最終的には個体そのものを捕獲せねばわからない情報も多いが、重点的に人員と予算を投入すべき保全対象地域や駆除対象地域を絞り込む

といった広域的な調査は、環境DNA解析によって革命的に効率化されることが期待されている。今後も走りながらブラックボックス部分の解明を進めることで、さまざまな目的で野生生物調査にかかわる誰もが、生物相調査手法の一選択肢として環境DNA解析を気軽に利用できるようになり、そして、多様な生態系の在り様を環境DNAが鮮やかに語り出す日が来ることを期待している。

## 文献

- 1) Ficetola GF, et al : Biol Lett, 4 : 423-425, 2008
- 2) Tréguier A, et al : J Appl Ecol, 51 : 871-879, 2014
- 3) Takahara T, et al : PLoS One, 8 : e56584, 2013
- 4) Fukumoto S, et al : J Appl Ecol, 52 : 358-365, 2015
- 5) Takahara T, et al : PLoS One, 7 : e35868, 2012
- 6) Doi H, et al : PLoS One, 10 : e0122763, 2015
- 7) Minamoto T, et al : Limnology, 13 : 193-197, 2012
- 8) Thomsen PF, et al : PLoS One, 7 : e41732, 2012
- 9) Riaz T, et al : Nucleic Acids Res, 39 : e145, 2011
- 10) Kelly RP, et al : PLoS One, 9 : e86175, 2014
- 11) Miya M, et al : Roy Soc Open Sci, 2 : 150088, 2015
- 12) Iwasaki W, et al : Mol Biol Evol, 30 : 2531-2540, 2013
- 13) Minamoto T, et al : Limnology, published online (doi : 10.1007/s10201-015-0457-4), 2015
- 14) Pilliod DS, et al : Mol Ecol Resour, 14 : 109-116, 2014
- 15) Jane SF, et al : Mol Ecol Resour, 15 : 216-227, 2015

## Profile

筆頭著者プロフィール

岩崎 渉 : 2005年、東京大学理学部生物化学科卒業。'09年、東京大学大学院新領域創成科学研究科情報生命科学専攻博士後期課程修了。博士(科学)。同専攻助教、東京大学大気海洋研究所講師を経て、'14年より東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻准教授。

