

The eDNA Society International Meeting 2023 における報告

磯 部 大 輔

Daisuke ISOBE

環境ソリューション工学専攻修士課程 2 年

1. はじめに

私は 2023 年 5 月 17 日から 19 日にピアザ淡海で行われた The eDNA Society International Meeting 2023 に参加し、『Multiplex approach to ameliorate primer bias in MiFish environmental DNA metabarcoding: a case study of Ayu, *Plecoglossus altivelis* (MiFish 環境 DNA メタバーコーディングにおけるプライマーバイアスを改善するためのマルチプレックスなアプローチ：アユの事例研究)』について口頭発表を行った。

2. 概要

2.1 Introduction

水サンプルから検出された種の配列情報を取得できる環境 DNA メタバーコーディングでは、さまざまなステップを踏む必要がある。「PCR Dropouts」は偽陰性に影響を与える問題の一つであり、PCR 増幅中に種や分類群が増幅されないことを指す。これはプライマーバイアスによるものが多く、主に「プライマーミスマッチ」が原因とされている。したがって、「PCR Dropouts」は環境 DNA 分析に基づく生物多様性評価の偏りを引き起こす。

MiFish-Universal プライマー (MiFish-U; Miya et al., 2015) は 3'末端が多くの魚類と一致しているため、高い分類群カバー力と識別力を持ち、幅広く魚類を増幅させる。そのため、MiFish-U を使用した環境 DNA メタバーコーディングは、世界中で広く使用されている。しかし、MiFish-U とのプライマーミスマッチによる増幅効率の低下やそれに伴う偽陰性が、一部の種において知られている。

そこで、対象の分類群や種に適合するプライマーを追加するマルチプレックスなアプローチを採用することにより、プライマーバイアスによる偽陰性を改善することができる。日本の河川で非常に重要な漁業対象であるアユ (*Plecoglossus altivelis*) は、MiFish-U のフォワード側と 3 箇所でミスマッチが報告されている (Miya et al., 2020)。そして、これらのミスマッチは増幅を困難にさせ、リード数が著しく減少することが知られている。

本研究では、アユに特異的な MiFish フォワードプライマーである『MiFish-Paa』を開発した。さらに、MiFish-U と MiFish-Paa を用いたマルチプレックス手法の効果をテストし、アユのリード数はどれだけ増加するか、検出種数にはどのような影響があるかを調査した。

2.2 Material and Methods

知内川 1 地点で 500 mL を 19 回繰り返し採水した。そして、アユのリード数および検出種数に影響があるかどうかを明確にするために、3 つのプライマーセット間 (MiFish-U, MiFish-Paa, 2 種のプライマーを混合したマルチプレックス) でシーケンス結果を比較した。そして、統計解析を用いて群集組成をプライマーセット間で評価した。

2.3 Results and Discussion

サンプリング地点では多くのアユが観察されたため、アユの環境 DNA 濃度は高いと予想される。しかし、MiFish-U のみではアユのリード数は非常に低かった。一方、MiFish-Paa およびマルチプレックスでは、アユのリード数が 2 桁以上大幅に増加した (Fig. 1)。結果として、MiFish-Paa の使用により、アユのリード数が増加したことが確認された。プライマーセットごとにそれぞれ MiFish-U で 17 種、Multiplex で 16 種、MiFish-Paa で 11 種が検出され、MiFish-U と Multiplex は MiFish-Paa よりも多くの種を検出した。さらに、MiFish-U と Multiplex の繰り返しごとの群集組成は非常に似ていることがわか

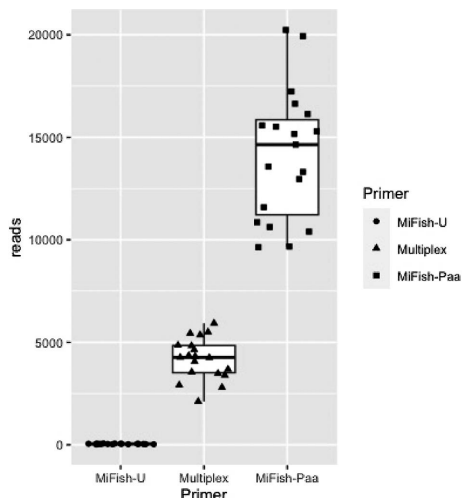


Fig. 1 プライマーセットごとに 19 回繰り返して検出されたアユのリード数の箱ひげ図

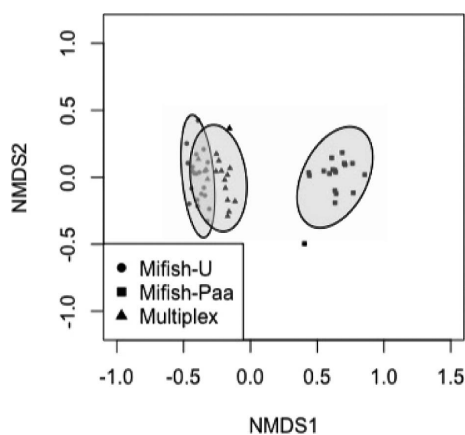


Fig. 2 各プライマーセットの群集組成を示した NMDS

った (Fig. 2). アユのリード数の増加を考慮すると, Multiplex な手法は有益な方法であると言える.

3. 口頭発表を終えて

私は今回初めて学会に参加し, もちろん初めての口頭発表であった. 学会には論文を目にする国内外の研究者も参加し有意義な時間を過ごした. 発表終了後, すぐにデータの示し方についてご意見を頂き有益な時間を過ごせたとともに, 多くの時間を費やした研究に短時間でアドバイスを貰い, 研究に対しての取り組みを考え直す良い機会になった. 最後に, 研究や学会発表に関して指導して頂いた山中裕樹准教授及び共同研究者の皆様に深く感謝申し上げる.