

ベンチトップ次世代シーケンサーで加速するアクアゲノミクス

# 水や土壌に含まれる環境 DNA から 生物種と存在量を推定

- 水や土壌などの環境サンプルに含まれる DNA をデジタル化することで、生物種と存在量を推定
- 観察に頼らない多サンプル同時分析で、環境モニタリングを効率化
- 測定者の主観や経験によるバラつきを抑え、客観的な生物多様性調査

海洋や河川など水中の生態系調査や環境モニタリングは従来、潜水、捕獲などにより目視、検鏡で観察する手段を用いてきました。これは手間と時間がかかるだけでなく、測定者によって結果がばらつくなどの課題がありました。

水や土壌、大気中に存在している遊離の DNA は**環境 DNA**と呼ばれています<sup>1</sup>。その配列を解析することで生物種を判別し、存在量を推定することができます。環境サンプルから抽出した DNA を次世代シーケンサー（NGS）で解析すると、種特異的なプライマーなど事前情報に基づく準備なしで環境中の生物種の網羅的特定ができるため、手間と時間の節約だけでなく、主観によらない客観的な判定が行えます。

環境 DNA 解析は、魚類の判定にとどまらず哺乳類<sup>2</sup>、鳥類<sup>3</sup>にも応用できることが報告されています。現在、環境 DNA 解析プロトコルの標準化が進められており、生態系調査などの手法として注目されています。



## 応用が期待される用途例

- 魚種判定による多様性調査
- プランクトン分析による環境モニタリング

## 環境 DNA 解析ワークフロー

サンプリング



水や土壌など、調査地点の環境サンプルを採取

DNA 抽出と  
ライブラリー調製



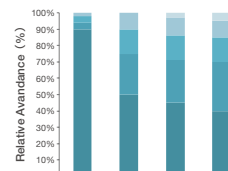
抽出した DNA のターゲット領域を 2 段階 PCR 増幅し、アダプターとインデックスを付加

シーケンス



複数のライブラリーをまとめてベンチトップ次世代シーケンサーで同時解析

データ解析



データベースと照合して生物種を同定し、リード数から存在量を推定

最新の情報はウェブから

<https://jp.illumina.com/edna>

illumina®

## 魚種判定による多様性調査<sup>4</sup>

海や河川などの調査地点で環境水を採取し、ろ過。そこから抽出される水中の環境 DNA に対し、ミトコンドリアの **12S rRNA 遺伝子** をターゲットとしたユニバーサルプライマーで増幅したアンプリコンを、ベンチトップ次世代シーケンサーで解析。  
得られた配列（リード）情報をデータベースに照合し、魚種を判定。目視による魚種判定結果と高い一致を示し、従来法では検出できなかった魚種も多く判定できる。



## 解析結果の一例：MiFish Pipeline<sup>5</sup> を用いた環境 DNA 解析結果のレポート

MiFish Pipeline Start Workflow MitoFish Overview References Contact Us MiFish DB Ver. 3.0

MiFish Results Download Results Statistics report of pre-processing steps

BLASTN >97% similarity BLASTN 80-97% similarity BLASTN no hits

MiFish-example-02\_S73\_L001\_R

Phylogenetic tree

Species	Family	Order	Japanese Name	Total read*	Rank	Other Resources	Representative Sequence	MiFish BLAST Search
<i>Tridemiger obscurus</i>	Gobiidae	Gobiiformes	チチブ	1,075	▲	Fishbase, Bol., Gbit, ...	CACCCGGTTATACGAGAGC Copy	MiFish BLAST Search
<i>Anguilla japonica</i>	Anguillidae	Anguilliformes	オオウナギ	721	▲	Fishbase, Bol., Gbit, ...	CACCCGGTTATACGAGAGC Copy	MiFish BLAST Search
<i>Pseudorasbora parva</i>	Cyprinidae	Cypriniformes	モツゴ	705	▲	Fishbase, Bol., Gbit, ...	CACCCGGTTATACGAGAGC Copy	MiFish BLAST Search
<i>Eso macrolepis</i>	Mugilidae	Mugiliformes	コボラ	682	▲	Fishbase, Bol., Gbit, ...	CACCCGGTTATACGAGAGC Copy	MiFish BLAST Search
<i>Kuhlia rupestris</i>	Kuhliidae	Centrarchiformes	オオクチユゴイ	433	▲	Fishbase, Bol., Gbit, ...	CACCCGGTTATACGAGAGC Copy	MiFish BLAST Search
<i>Oreochromis niloticus</i>	Cichlidae	Cichliformes	ニルティラピア	372	▲	Fishbase, Bol., Gbit, ...	CACCCGGTTATACGAGAGC Copy	MiFish BLAST Search
<i>Carassius gibelio</i>	Cyprinidae	Cypriniformes	ブルーギル	208	▲	Fishbase, Bol., Gbit, ...	CACCCGGTTATACGAGAGC Copy	MiFish BLAST Search

公開されている MiFish Pipeline を使うことにより、MiFish プライマーで増幅したアンプリコンの配列（リード）情報をアップロードするだけで、魚種の判定結果レポートが得られる。

## 1 サンプルあたりのコスト試算

ベンチトップ次世代シーケンサーで、20～2,000 サンプルを、1 サンプルあたり約 900～6,000 円で解析

システム	iSeq	MiniSeq	MiSeq	NextSeq
サンプル数 / ラン <sup>※1</sup>	20	120	120	2,000
カタログ番号	20021533	FC-420-1003	MS-102-3003	FC-404-2004
シーケンス試薬キット	iSeq 100 i1 Reagent (300 Cycles)	High Output Kit (300 Cycles)	v3 Kit (600 Cycles)	High Output Kit v2 (300 Cycles)
コスト / サンプル <sup>※2</sup>	約 6,000 円	約 2,700 円	約 2,700 円	約 900 円

※ 1. 1 サンプルあたり 10 万リードの場合

※ 2. ライブラリー調製（約 500 円 / サンプルとして計算）とシーケンスのコストの合計

## 参考文献

1. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183 (2015) 4–18
2. Tropical-forest mammals as detected by environmental DNA at natural saltlicks in Borneo. *Biological Conservation* 210 (2017) 281-285
3. Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports* (2018) 8:4493
4. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. open sci.* 2015. June 2: 150088.
5. MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding. *Mol. Biol. Evol.* 2018 April 14

## イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階  
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810  
jp.illumina.com

www.facebook.com/illumina

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件：jp.illumina.com/tc

Pub. No. 6011-180912-02

© 2018 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc または各所有者に帰属します。  
商標および登録商標の詳細はjp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。  
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。