

環境DNA分析のご提案

イルミナ株式会社テクニカルスペシャリスト 小林孝史

2019/09/02

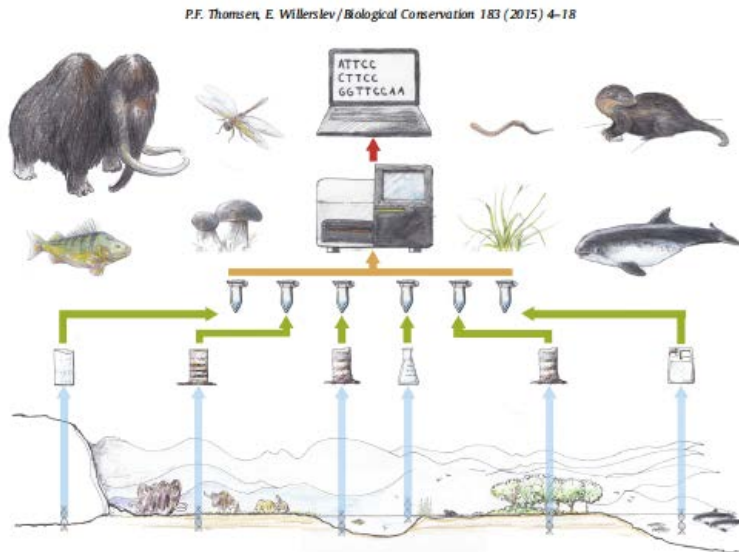


環境DNA分析のご提案

- 環境DNAとは？
- 環境DNA分析から分かること
- 環境DNA解析に対応するイルミナ次世代シーケンサー

環境DNAとは？

- 環境DNAとは環境中に放出された(一般的には細胞外と考えられる)生物由来のDNAの総称
- 環境DNAの配列を解析することで、その環境に存在していた生物種や存在量を推定することができる
- 環境DNAは一定期間(48時間程度)を経て分解消失するので経時的な解析が可能である



古代生物
哺乳動物
鳥類
魚類
昆虫
植物
微生物などに適応

食性調査も可能

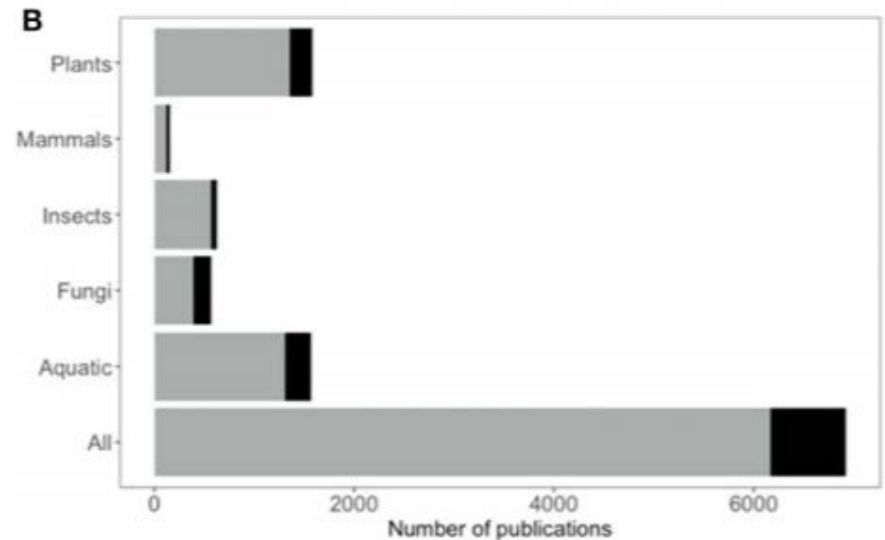
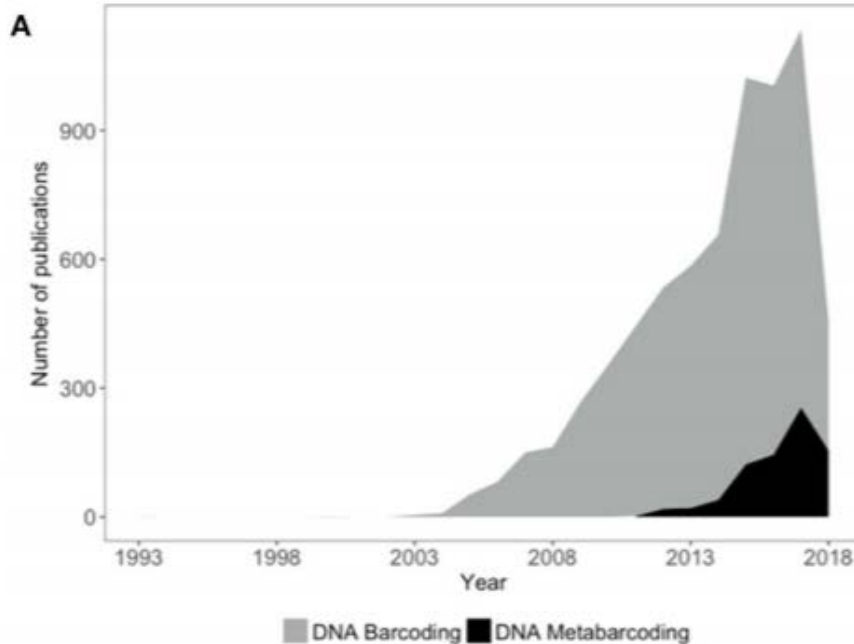
近年の環境DNA(メタ)バーコーディング解析の広がり

- 植物および水中生物の解析が多い傾向
 - <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2018.00134/full>



Advancing DNA Barcoding and Metabarcoding Applications for Plants Requires Systematic Analysis of Herbarium Collections—An Australian Perspective

Eleanor E. Dormontt^{1*}, Kor-jent van Dijk¹, Karen L. Bell^{2,3}, Ed Biffin⁴, Martin F. Breed¹, Margaret Byrne⁵, Stefan Caddy-Retalić^{1,4}, Francisco Encinas-Viso², Paul G. Nevill⁶, Alison Shapcott⁶, Jennifer M. Young¹, Michelle Waycott^{1,4} and Andrew J. Lowe¹



世界での解析例

- オーストラリア・カーティン大学のMichael Bunce教授のインタビュー
 - NextSeq/MiSeq/iSeq 100を環境DNA解析に使用
 - メタバーコーディングに加え、メタ16S rRNA、メタショットガン解析を組み合わせた解析を実施

January 2019

iCommunity
NEWSLETTER

Environmental DNA Sequencing Offers a Powerful Lens to View Changes in Biodiversity

Next-generation sequencing and eDNA metabarcoding enable researchers to monitor a wide variety of ecosystems accurately.

Introduction

Professor Michael Bunce is a molecular biologist at Curtin University in Perth, Australia. While his research interests are varied, all his projects revolve around extracting, amplifying, and analyzing degraded DNA. His **Trace** and **Environmental DNA** (TrEnD) laboratory performs genetic analysis studies of a broad range of samples, including ancient DNA, herbal medicines, wine, wildlife, and seawater.

For the last decade, Dr. Bunce has studied ecosystem biodiversity using next-generation sequencing (NGS) to analyze environmental DNA (eDNA), the DNA that all organisms shed into their immediate settings. His team uses metabarcoding, a combination of DNA barcoding and high-throughput NGS, to analyze eDNA samples and monitor ecosystem changes over time. Recent studies by his team have assessed biodiversity in marine samples and evaluated rehabilitation success in restoring native ecosystems after mining or oil exploration.

iCommunity spoke with Dr. Bunce to discuss his eDNA studies, their value in environmental and biodiversity research, and how he uses the NextSeq™ 550, MiSeq™, and iSeq™ 100 Systems to study samples from various ecosystems.

Q: When did you begin applying molecular biology techniques to areas traditionally regarded as field biology, such as paleobiology and ecology?

Michael Bunce (MB): In 2003, I published a paper with colleagues that showed that DNA could be extracted from prehistoric Siberian permafrost cores and New Zealand cave sediments and sequenced successfully.¹ This was landmark work demonstrating that we don't need fossils to identify the animals that were present in an area many centuries ago. We can detect DNA that these animals left behind and use the data to study how plants and animals have changed over time.

Q: How has NGS impacted your studies?

MB: Analyzing DNA was difficult when we conducted paleobiology research in the early 2000s. We had to extract DNA from the sample, clone it into bacteria, and then sequence the bacterial plasmids using Sanger sequencing, one bacterium at a time. It was time consuming, costly, and didn't delve deep enough into the species present in the sample.

NGS has been pivotal in our ability to analyze environmental samples easily and accurately to determine what species existed there. With bacterial cloning and Sanger sequencing, we saw a

limited DNA snapshot of each sample, typically obtaining 50-100 reads per sample. NGS and its massively parallel sequencing enables us to look at tens to hundreds of thousands of reads per sample, giving us a powerful lens into the assemblage within multispecies environmental samples. Over the last decade, we've used NGS-based metabarcoding extensively to look at many different biological substrates. Our work at TrEnD is more about understanding composition and changes in nonbacterial biological communities than sequencing genomes.

Q: What is eDNA and how can it be used to measure biodiversity?

MB: All organisms shed DNA into their environments. These genetic 'breadcrumbs' enable us to assess the different organisms that are or have been present in any given environment. If we concentrate a liter of seawater down to its organic components and extract DNA from it, we can learn about the biodiversity in that sample. For example, we can design PCR assays that act as molecular magnets, latching onto certain sequences of fish DNA to study what fish were in the seawater. We can build a species list and look at the presence or absence of various taxa and use that to build a holistic picture of the biota in a specific environment and how they interact.

eDNA can also help us study organisms that are difficult to spot. For example, seahorses are one of the most elusive fish in the ocean. However, we've been able to find them in South Africa and Australia by detecting their DNA signatures in seawater. We believe it will revolutionize how we study these and other cryptic species that camouflage themselves so well that they are really difficult to survey in a nondestructive way.



Michael Bunce, PhD, is a Professor in the School of Molecular and Life Sciences, and Head of the TrEnD laboratory at Curtin University in Perth, Western Australia.

770-2018-022-A | 1

<https://jp.illumina.com/science/customer-stories/icommunity-customer-interviews-case-studies/bunce-curtin-interview-edna-nextseq-miseq-iseq.html>

定量PCR法と 次世代シーケンサーを使用したメタバーコーディング法

環境サンプルからのDNA抽出ステップは変わらない

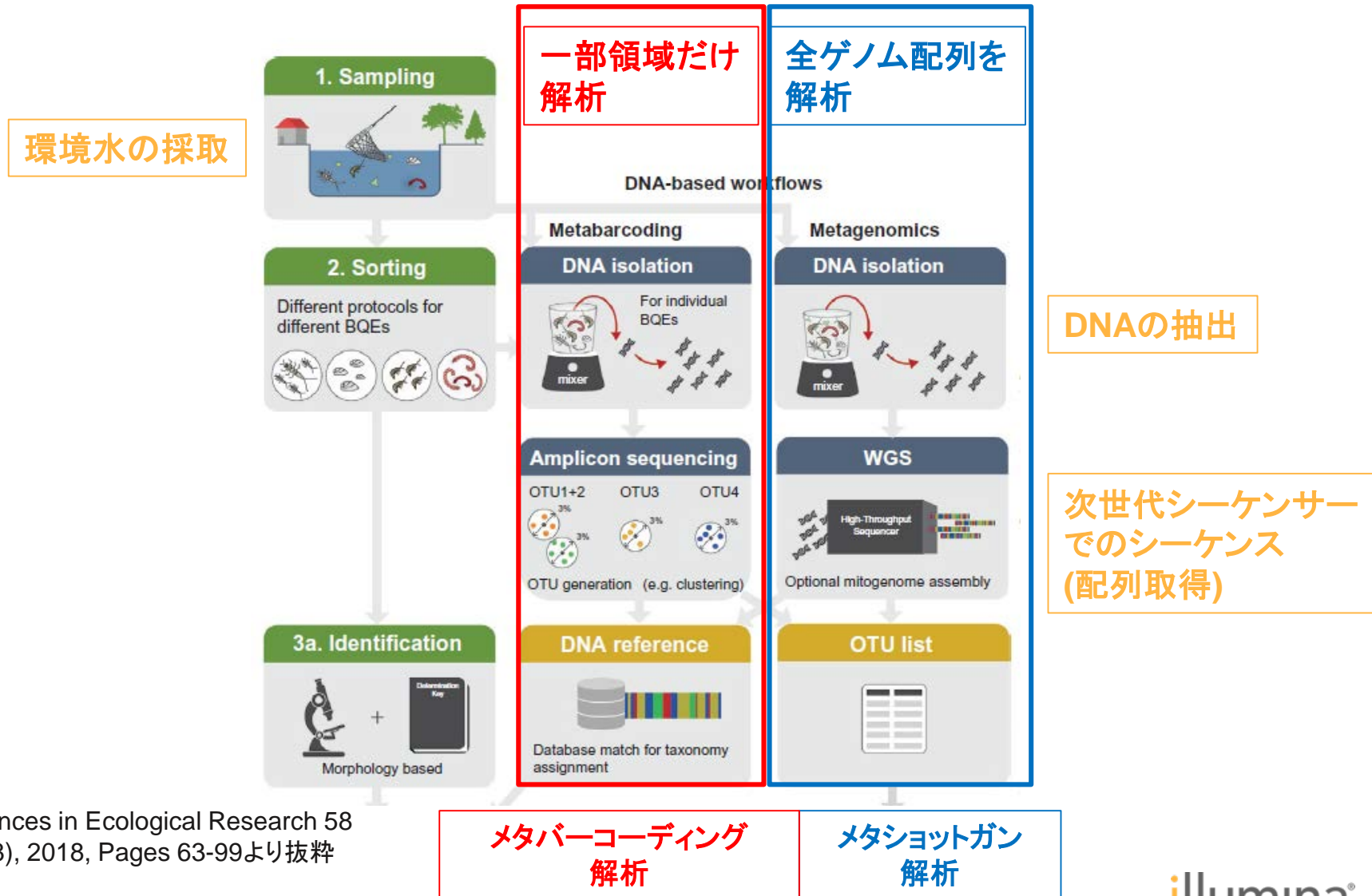
● 定量PCR法

- 特定の種を特異的に検出するのに向く
- 比較的少インプットからの解析が可能
- 多数の種を検出する場合、プローブの設計が難しい、ウェル数が多く実験が煩雑

● メタバーコーディング法




- 複数の種を網羅的に検出するのに向く
- 予想していない種を含む多数の種の検出が可能
- 定量PCRに比べると定量性が低い（インラインコントロールなどを使用することにより軽減可能）

次世代シーケンサーを使用した環境DNA解析の主なステップ(環境水を例に)



Advances in Ecological Research 58 (2018), 2018, Pages 63-99より抜粋

環境DNA解析に使用される卓上型次世代シーケンサー

	 iSeq 100 システム	 MiniSeqシステム	 MiSeqシステム	 NextSeq 550 システム
本体価格	390.4 万円	865 万円	1,730 万円	4,810 万円
データ量	1.2 Gb	7.5 Gb	15 Gb	120 Gb
コスト/ 10万 クラスター	2,750 円 (40 sample)	1,464 円 (196 sample*)	1,454 円 (196 sample**)	336 円 (960 sample***)
ラン時間	7-17 時間	7-24 時間	5-55 時間	11-29 時間
最大クラス ター数	400 万クラスター	2500 万クラスター	2500 万クラスター	4億 クラスター
最大リード長	150 bp x 2	150 bp x 2	300 bp x 2	150 bp x 2
ケミストリー	1蛍光SBS	2蛍光SBS	4蛍光SBS	2蛍光SBS

価格に消費税は含まれません。2019年9月1日現在の価格です。

*: MiniSeq HighOut (300 cycle)使用、 **: MiSeq v3 (600 cycle)使用、 *: NextSeq MidOut (300 cycle)使用

8 それぞれPhiXのインラインコントロールを考慮した一例

日本での活動の例

- **日本バーコードオブライフ・イニシアティブ (~2016)**
 - 世界のコンソーシアムinternational Barcode Of Life (iBOL)と連携
 - <http://www.jboli.org/>
- **環境DNA学会の設立 (2018~)**
 - <http://ednasociety.org/>
 - イルミナMiSeqを使用した魚類メタバーコーディングのユニバーサルプライマー、および解析系として「MiFish」を発表
 - MiFish領域を含む魚類のミトコンドリアゲノムの配列をデータベース化したMitoFish, MiFish pipelineを発表
 - 産学のメンバーが多く、標準化プロトコールなども確立



解析例) MiFish: 環境水サンプルからの魚類同定

- 2回PCRをしてMiSeqシステムで解析する簡単なワークフロー
- ターゲット領域は163-185bpのミトコンドリアDNA 12S rRNA領域
- 880種のミトコンドリア全長のデータ、および160種のミトコンドリアの一部のデータ (2013年)から設計されたユニバーサルプライマー

ROYAL SOCIETY
OPEN SCIENCE

rsos.royalsocietypublishing.org

Research

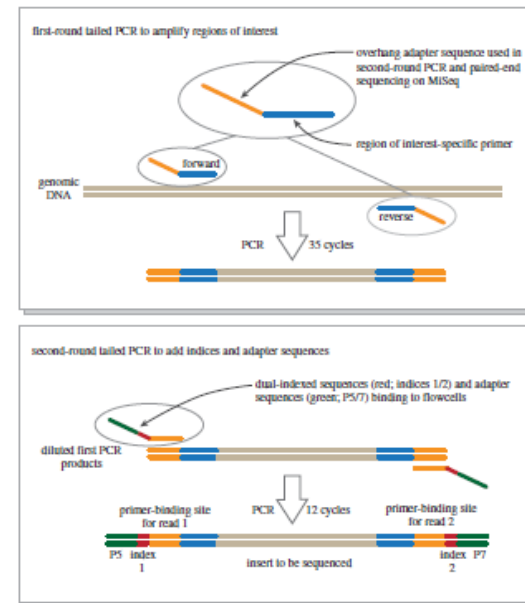


Cite this article: Miya M et al. 2015 MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. open sci.* 2: 150088. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.150088>

Received: 26 February 2015
Accepted: 25 June 2015

MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species

M. Miya^{1,2}, Y. Sato^{2,3}, T. Fukunaga⁴, T. Sado^{1,2},
J. Y. Poulsen^{1,2,5}, K. Sato⁶, T. Minamoto^{2,7},
S. Yamamoto^{2,7}, H. Yamanaka^{2,8}, H. Araki^{2,9},
M. Kondoh^{2,8} and W. Iwasaki^{2,4,10}



Miya et al. *R Soc Open Sci.* 2015 Jul 22;2(7):150088

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4632578/> より抜粋

魚種の特定のためのMiFishプライマーの選定

- 千葉県立博物館 宮正樹先生らが選定

- 12S rRNAやCOX I領域の中から選定→12S rRNAの一部

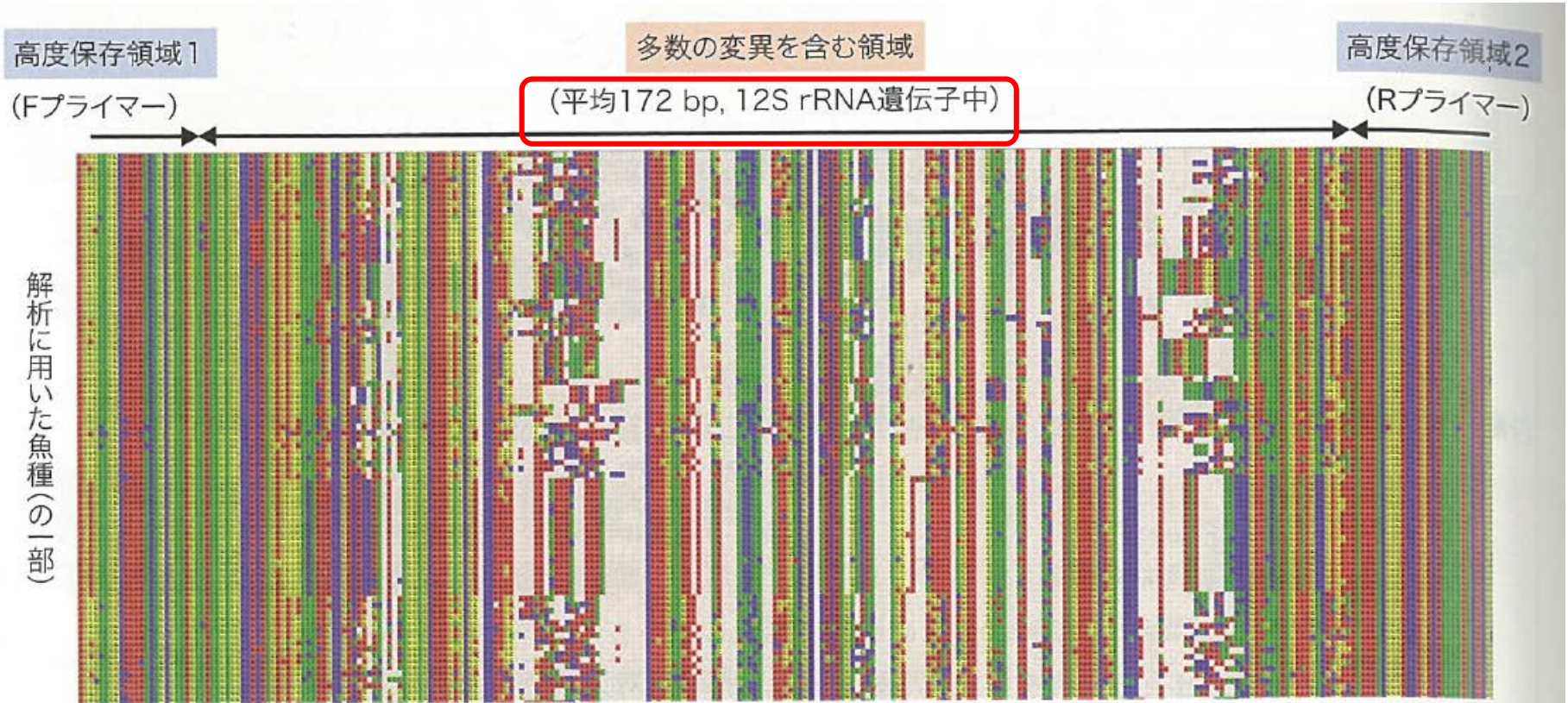


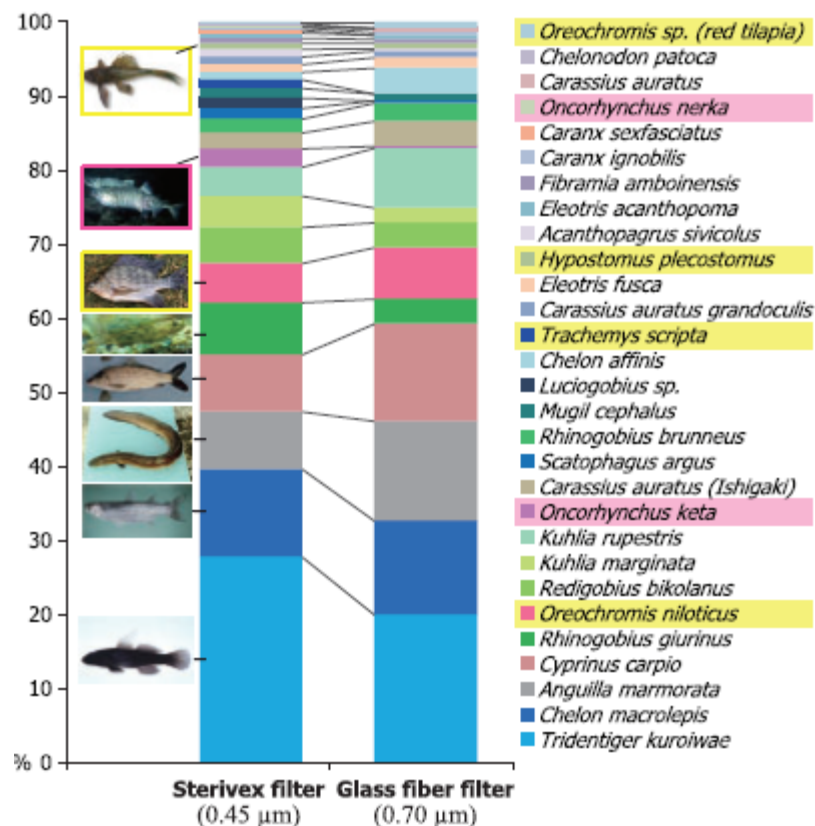
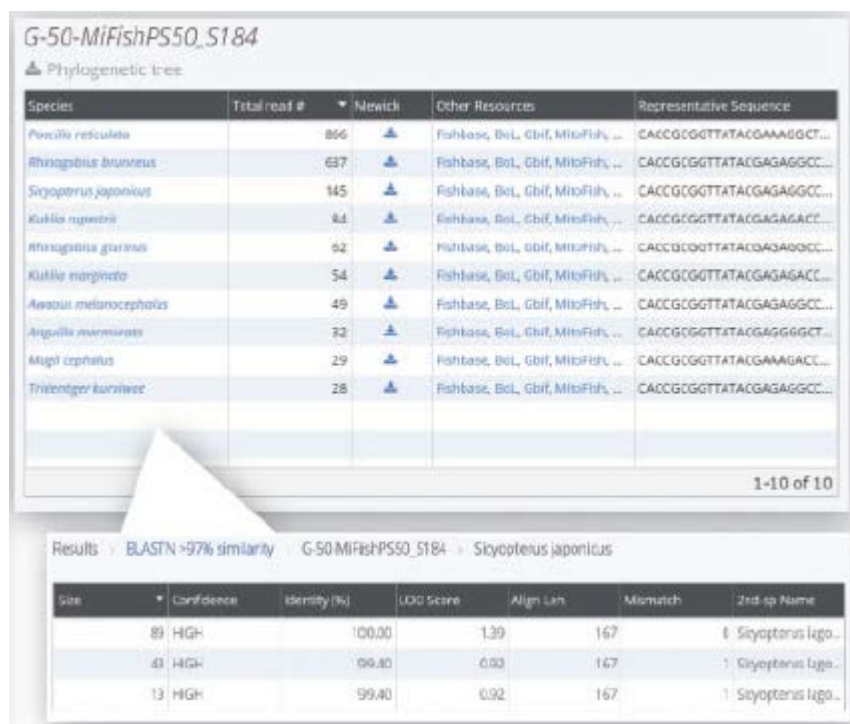
図1 全魚種に有効な環境DNA解析用ユニバーサルプライマーMiFishの設計

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。

岩崎渉 他 2016 実験医学 34 (1), 103-107 より

MiFish pipelineで出力されるデータ例

- htmlレポートとして出力され、配列情報に触れることなく解析可能



Sato et al. Mol Biol Evol. 2018 Jun; 35(6): 1553–1555.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5967551/> より抜粋

環境DNAメタバーコーディング解析の応用例

- **メタバーコーディングに使用されるユニバーサルプライマー**
 - BOLDなどの国際コンソーシアム
 - MiFish (2016), MiMammal (2017), MiBird (2018), MiDeca (2019)...など
- **環境DNA調査・実施マニュアル、技術セミナー（環境DNA学会）**
 - 定量PCR法、メタバーコーディング法の両方を網羅
 - 必要準備品、装置なども含め記載
 - <http://ednasociety.org/manual>

環境 DNA 調査・実験マニュアル

Ver. 2.1 (2019年4月25日発行)

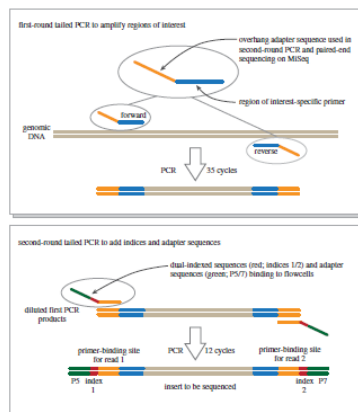
一般社団法人環境 DNA 学会

© 2019 一般社団法人環境 DNA 学会
© 2019 The eDNA Society

メタバーコーディングに使用する次世代シーケンサーの選び方

- MiFishプライマー解析であれば300 cycleキットを使用
- 一部のバーコード(今後開発されてくるものも含む)に対しては600 cycleキットを使用
 - どのような種類を解析したいかによって次世代シーケンサーの種類は変わる
 - 一度に複数サンプルを混ぜて解析できる(目安は1サンプル当たり10万リード程度←環境条件によって変わる)
 - 1サンプルに必要なクラスター数(=断片数)を決める
- 標準化プロトコールで使用されているのは現状MiSeq(2019年現在)
- ラン間のキャリーオーバーが少ないiSeq100

12S rRNA 配列解析 ワークフロー (MiFishを例)



G-50-MiFishP550_S184

Phylogenetic tree

Species	Total read #	Novels	Other Resources	Representative Sequence
<i>Pseudis reticulata</i>	896	▲	Fishbase, BSL, GSI, MiFishP5...	CAACCGCGTTTACGAGAGGCT...
<i>Amphiprion biocellatus</i>	887	▲	Fishbase, BSL, GSI, MiFishP5...	CAACCGCGTTTACGAGAGGCT...
<i>Scorpaeno japonicus</i>	145	▲	Fishbase, BSL, GSI, MiFishP5...	CAACCGCGTTTACGAGAGGCT...
<i>Kuhlia opercularis</i>	84	▲	Fishbase, BSL, GSI, MiFishP5...	CAACCGCGTTTACGAGAGGCT...
<i>Amphiprion gurnax</i>	62	▲	Fishbase, BSL, GSI, MiFishP5...	CAACCGCGTTTACGAGAGGCT...
<i>Kuhlia marginata</i>	54	▲	Fishbase, BSL, GSI, MiFishP5...	CAACCGCGTTTACGAGAGGCT...
<i>Acanthurus melanoccephalus</i>	49	▲	Fishbase, BSL, GSI, MiFishP5...	CAACCGCGTTTACGAGAGGCT...
<i>Amphiprion melanocentrus</i>	12	▲	Fishbase, BSL, GSI, MiFishP5...	CAACCGCGTTTACGAGAGGCT...
<i>Mitriichthys crinitus</i>	29	▲	Fishbase, BSL, GSI, MiFishP5...	CAACCGCGTTTACGAGAGGCT...
<i>Thalassoma korrover</i>	28	▲	Fishbase, BSL, GSI, MiFishP5...	CAACCGCGTTTACGAGAGGCT...

1-10 of 10

Results · BLASTN · 97% similarity · G-50-MiFishP550_S184 · *Scorpaeno japonicus*

Seq	Confidence	Identity (%)	COI Score	Align Len	Mismatch	2nd by Name
89	HIGH	100.00	1.39	167	0	<i>Scorpaeno japo...</i>
48	HIGH	99.40	6.93	167	1	<i>Scorpaeno japo...</i>
13	HIGH	99.40	6.92	167	1	<i>Scorpaeno japo...</i>

サンプル
抽出

最適なゲノムDNA
抽出キットで抽出
(論文などを参照)

ライブラリー
調製

2ステップPCRで、
163-185bpのミトコン
ドリアDNA 12S rRNA
領域を増幅

シーケンス

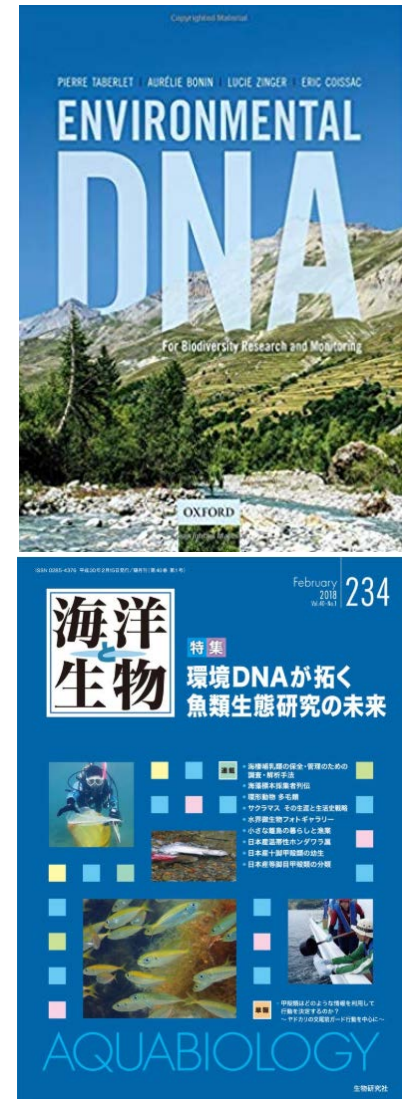
サンプルあたり
100,000リードを産出

データ解析

MitoFish- MiFish
pipelineを用いて魚種を
同定

まとめ

- イルミナ次世代シーケンサーは環境DNA解析のメタバーコーディング解析に使用される
- 先行論文、環境DNA学会のマニュアルなどからプロトコルを選定・確立
- バーコードの長さによってシーケンサーを選定
- 参考書籍
 - Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring
 - 海洋と生物 234 Vol.40-No.1 2018
 - オンラインジャーナル “environmental DNA”
 - <https://onlinelibrary.wiley.com/journal/26374943>
 - 環境DNA調査・実験マニュアル（環境DNA学会）
 - <http://ednasociety.org/manual>



イルミナウェブサイトの関連情報(2019年9月時点)

- 環境DNA特集ページ

- <https://jp.illumina.com/destination/s/environmental-dna.html>

- お客様インタビュー 生物多様性の変化を見ることのできる強力なレンズとなり得るeDNAシーケンス

- <https://jp.illumina.com/science/customer-stories/icomunity-customer-interviews-case-studies/bunce-curtin-interview-edna-nextseq-miseq-iseq.html>

- 環境DNA分析に基づく新しい生物調査法【イルミナiSchool プロフェッショナル】

- <https://jp.illumina.com/events/webinar/2019/webinar-pro-190221-j.html>

- MiSeq製品ページ

- <https://jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>

- iSeq100製品ページ

- <https://jp.illumina.com/systems/sequencing-platforms/iseq.html>

- イルミナiSchool Online

- https://jp.illumina.com/events/ilmn_support_program/ilmn-ischool.html#seminar-a

ご清聴ありがとうございました。

お問合せは

contactJPN@illumina.com まで

