

次世代シーケンシングを用いた核酸定量法の環境影響評価への適用

○猪又健太郎(海洋研究開発機構), 北橋倫(海洋研究開発機構), 西島美由紀(テクノスルガ・ラボ),
星野辰彦・下田代雅文・山本啓之(海洋研究開発機構)

海底鉱物資源開発の機運の高まりとともに、その環境影響評価法についても関心が集まっている。特に公海上の海底鉱物資源開発については ISA (International Seabed Authority; 国際海底機構) によって管理され、「探査活動に起因して起こりうる環境影響の評価に関する契約者向けの指針 (ISA, IBSA/19/LTC/8)」として規定されている。本指針では、生物調査についての項目も提示されており、中でも底生生物、特にメイオファウナ (目開き 500-1000 μm の篩を通過し、32-63 μm の篩に捉えられる生物群) はその多様性、生物量などから環境影響評価に対して優れたマーカーとなりうるとされているが、従来の調査方法では時間的、人的 (分類同定等の技量) に容易に取り組むことが難しい。我々はこの解決法として次世代シーケンサーによるメタゲノム解析 (アンプリコン解析) とイメージング・フローサイトメーターによるメイオファウナの迅速同定法の開発に取り組んでいるが、その中で特にアンプリコン解析による定量性について検討を行った。

アンプリコン解析は PCR による対象生物遺伝子の増幅産物を用いた解析であるが、PCR ではしばしば生物ごとの塩基配列、GC 含量、二次構造などによって増幅効率に違いが生じ、環境中に本来含まれる生物量の正当な評価が困難な場合がある。Hoshino and Inagaki (2017) はその解決法として細菌群集を対象として Single Primer Extension を利用した核酸定量法を開発した。我々は本手法をメイオファウナ群集に適用し、その生物量推定を試みた。

標的には、真核生物の 18S ribosomal RNA 遺伝子の V1/V2, V3/V4 の可変領域を用いた。まず組成既知のスタンダードを人工遺伝子で作成し、手法の妥当性を確認した。その上で本発表では、中部沖縄トラフに位置する「野甫サイト」において深海調査研究船「かいらい」KR15-17 次航海 (2015 年 11 月)、および KR16-15 次航海 (2016 年 11 月) において、無人探査機「かいこう Mk-IV」を用いて採取した堆積物試料由来の環境 DNA に適用した場合について検証した結果を報告する。