



MtInsects-16Sプライマー対応の河川用DNAデータベース「River16S」の開発

-神奈川県で開発したDNAデータベースは果たして全国の河川で使えるのか?-

“River16S”, a DNA database for rivers that can be used with Mtinsects-16S primers.

-Can the DNA database developed in Kanagawa Prefecture really be used in rivers nationwide?-

長谷部勇太(神奈川県環境科学センター調査研究部)
Yuta Hasebe(Kanagawa Environmental Research Center)

背景・目的(Background and Objectives)

- ✓ 神奈川県環境科学センター(KERC)では河川環境の生態学的な評価等を目的として、昆虫類の環境DNA調査手法開発に取り組んでいる。
- ✓ 信州大学の竹中氏が開発したMtInsects-16Sプライマーは、従来使われてきたCOI領域の昆虫用プライマーに比べて昆虫類特異性や検出率に優れていることが明らかとなった。
- ✓ 一方で、種名情報と結びついた参照用の公共DNAデータベース(Genbank)については、16S領域の登録数が少なく、種まで同定することができないという課題があった。
- ✓ そこで、神奈川県内の昆虫類を中心にMtInsects-16Sプライマー領域のDNA配列を取得し、独自のDNAデータベースを整備した。また、公共DNAデータベースからもDNA配列を取得し、精度チェックなどを行ったうえで、上記データベースと統合し、MtInsects-16Sプライマー対応の河川用DNAデータベース「River16S」を開発することとした。
- ✓ また、開発した「River16S」が全国の河川で利用可能か検証を行った。
- ✓ The KERC has been working on the development of an environmental DNA survey method for insects for the purpose of ecological evaluation of river environments.
- ✓ The MtInsects-16S primer developed by Dr. Takenaka of Shinshu University was found to have superior insect specificity and detection rate compared to the conventionally used primers for insects in the COI region.
- ✓ On the other hand, the number of 16S regions registered in the public DNA database (Genbank), which is linked to species name information for reference, was small, and it was not possible to identify them to species.
- ✓ Therefore, we obtained DNA sequences of MtInsects-16S primer regions mainly from insects in Kanagawa Prefecture, and developed our own DNA database. We also obtained DNA sequences from public DNA databases, checked their accuracy, and integrated them with the above databases to develop "River16S," a DNA database for rivers compatible with MtInsects-16S primers.
- ✓ We also verified whether the developed "River16S" could be used in rivers nationwide.

神奈川県独自DNAデータベースの整備

Development of Kanagawa Prefecture's own DNA database

対象分類群(target taxon)

- ✓ 主に昆虫綱(Mainly Insecta)

方法(Method)

- ✓ 生体サンプルを入手し、可能な限り非破壊でDNAを抽出し、NGSを用いて、ミトコンドリア16SrRNA領域の配列を取得
- ✓ 得られた配列についてBLAST解析、系統樹により誤同定等のチェックを実施
- ✓ Obtain biological samples, extract DNA as nondestructively as possible, and sequence the mitochondrial 16SrRNA region using NGS.
- ✓ BLAST analysis and phylogenetic trees are used to check for misidentification of the obtained sequences.

結果(Result)

- ✓ 昆虫綱を中心に749データ(749 data mainly on Insecta)

公共DNAデータベースからの配列取得

Sequence retrieval from public DNA databases

対象分類群(target taxon)

- ✓ 昆虫綱を含めた25綱(25 classes, including the Insecta)

方法(Method)

- ✓ GenBankから「16S」と「分類群名」をキーワードに配列を取得
- ✓ 昆虫綱については、MtInsects-16S領域の抜き出し
- ✓ MtInsects-16S領域の抜き出しに成功した配列はBLAST解析により誤同定等のチェックを実施
- ✓ Sequences were obtained from GenBank using the keywords "16S" and "Class".
- ✓ For Insecta, extract the MtInsects-16S region. The successfully extracted sequences of MtInsects-16S region are checked for misidentification by BLAST analysis.

結果(Result)

- ✓ 25綱384,898データ(25 classes, 384,898 data)

River16S ver1.1

class	綱	データ数
Insecta	昆虫綱	87,203
Amphibia	両生綱	63,722
Actinopteri	魚類	54,883
Gastropoda	腹足綱	43,402
Malacostraca	軟甲綱	40,663
Mammalia	哺乳綱	31,542
Arachnida	クモ綱(蛛形綱)	23,486
Bivalvia	二枚貝綱	13,354
Aves	鳥綱	7,652
Clitellata	環帯類	5,675
Hydrozoa	ヒドロ虫綱	5,222
Branchiopoda	鯀脚綱	2,665
Reptilia	爬虫綱	1,307
Chilopoda	ムカデ綱	1,121
Gymnolaemata	裸喉綱	924
Diplopoda	ヤスデ綱	771
Enopla	有針綱	675
Collembola	トビムシ目	623
Ostracoda	貝虫綱	358
Demospongiae	普通海绵綱	190
Phylactolaemata	被喉綱	145
Cladistia	魚類	34
Diplura	コムシ目	16
Ichthyostiraca	ウオヤドリエビ綱	9
Catenulida	小鎖状目	5
	合計	385,647

DBのDLは→



全国の河川で試行調査(Trial survey in rivers nationwide)

方法(Method)

- ✓ 全国の河川でMtInsect16Sを用いた環境DNA調査を実施。種判定閾値(pident*qcovs)の違いにより、検出率にどのような違いが生じるか検討を行った。
- ✓ Environmental DNA surveys using MtInsect16S were conducted in rivers nationwide. We examined how different species determination thresholds (pident*qcovs) would result in different detection rates.

結果(Result)

- ✓ 現状のデータベースでも通常の捕獲調査より種数は多い。閾値は0.97≧とするのが検出率と誤検出のバランスが良いと考えられた。
- ✓ Even with the current database, the number of species is higher than in a normal capture survey. Currently, a threshold value of 0.97≧ was considered to be a good balance between detection rate and false positives.

