

環境DNAモニタリング技術の開発と応用: サンプリング・ラボ実験から配列解析・統計解析まで

Developments and applications of environmental DNA monitoring



今日のアウトライン | Outline

1. 環境DNAとは?

What is environmental DNA?

2. サンプリング: 採水と濾過

Sampling: Water sampling and filtration

3. DNA 抽出からシーケンスまで

From DNA extraction to sequencing

4. 配列解析

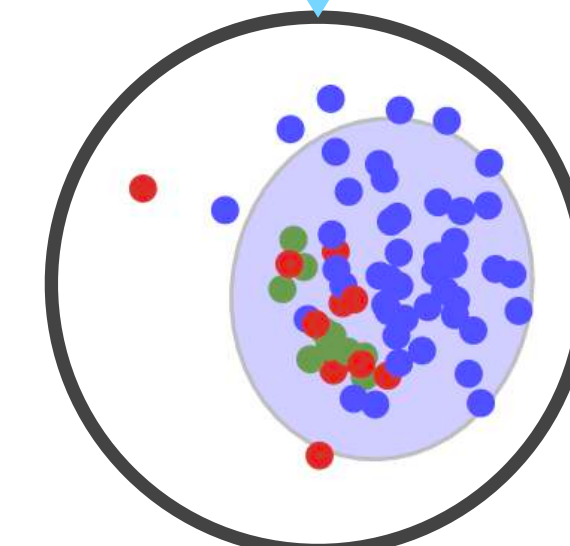
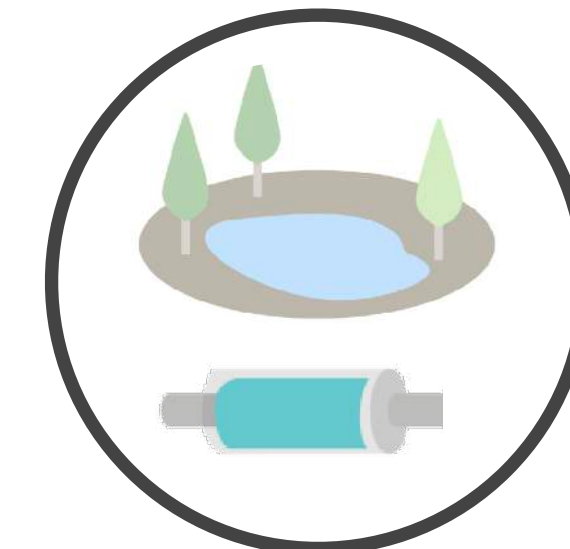
Sequence data analysis

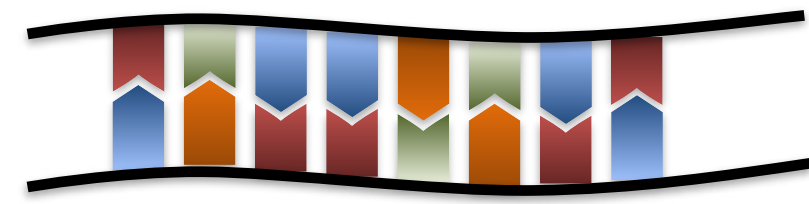
5. 群集生態学的な統計解析

Statistical analysis

6. 将来展望

Future perspectives





環境DNAとは？

What is environmental DNA?

環境DNAとは? | What is environmental DNA (eDNA)?



- **定義** | Definition

“環境DNAとは、環境サンプル中に見いだされる異なる生物由来のDNAの集合”

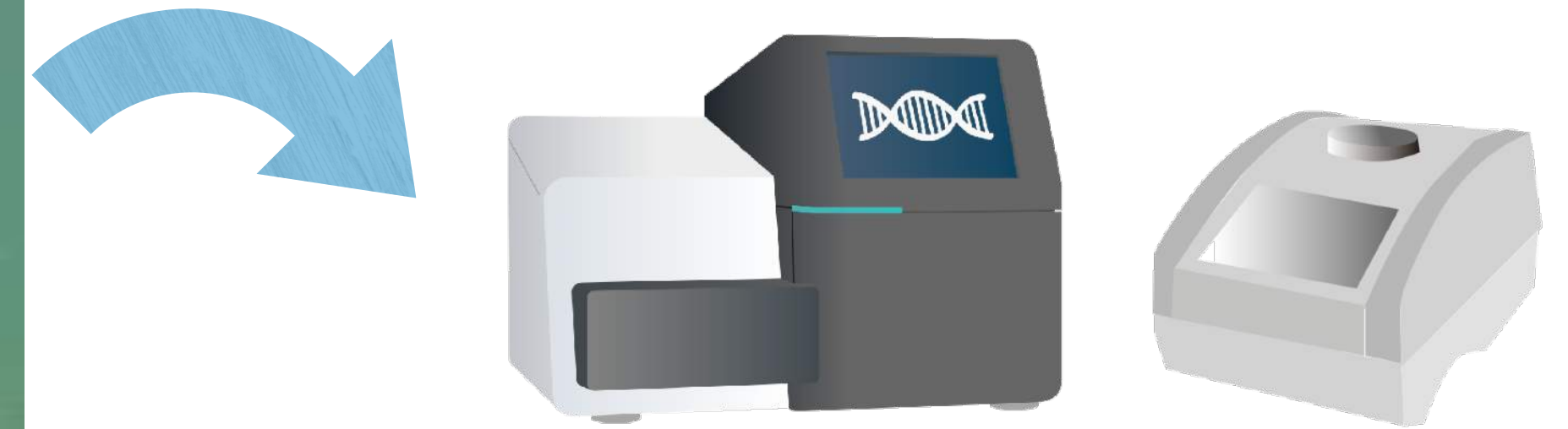
“Environmental DNA (eDNA) is a complex mixture of genomic DNA from many different organisms found in an environmental sample”
(Taberlet et al. 2012, 2018)

- 環境DNAは水・土壌・堆積物・空気などさまざまな環境サンプルから抽出される
eDNA can be extracted from soil, sediment, water, air, feces, and so on.
- 近年の定義では大型生物が放出したDNAに加えて微生物DNAも含めることが多い
Some studies include intracellular DNA (e.g., microbes) (= broad definition) and others do not (narrow definition).

環境DNAとは? | What is environmental DNA (eDNA)?



© R. Masuda



- 高感度に生物の痕跡を検出
Highly sensitive
- 現場での作業が時間的・労力的に楽
Low time- and labour-cost in field (e.g., just collect water samples)
- 生物種の同定に生物ごとの特殊な知識はいらない
(注意: データ解析の技術は必要)
Does not require taxonomic identification skill
(caveat: high-quality reference database that is constructed by experts required)
- **生物多様性のモニタリングツールとして期待**
Promising, innovative tool for biodiversity monitoring

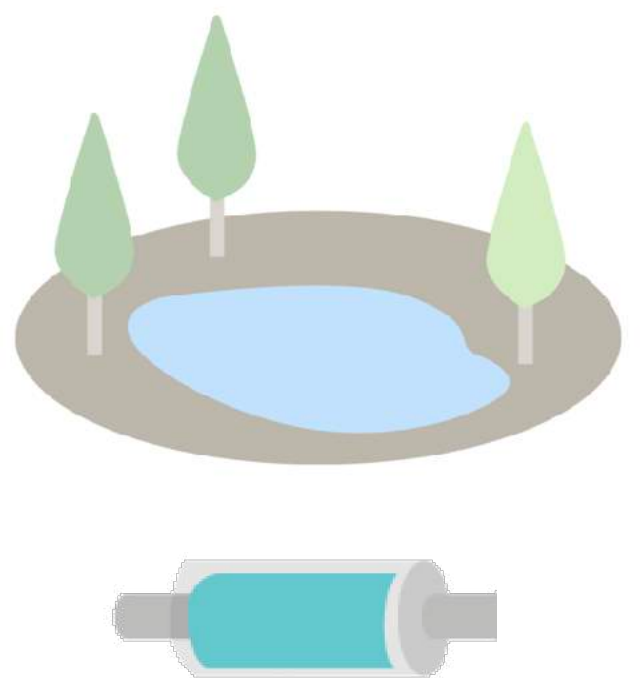
環境DNA分析の流れ | eDNA analysis methods

二つの主要な方法

Two major methods

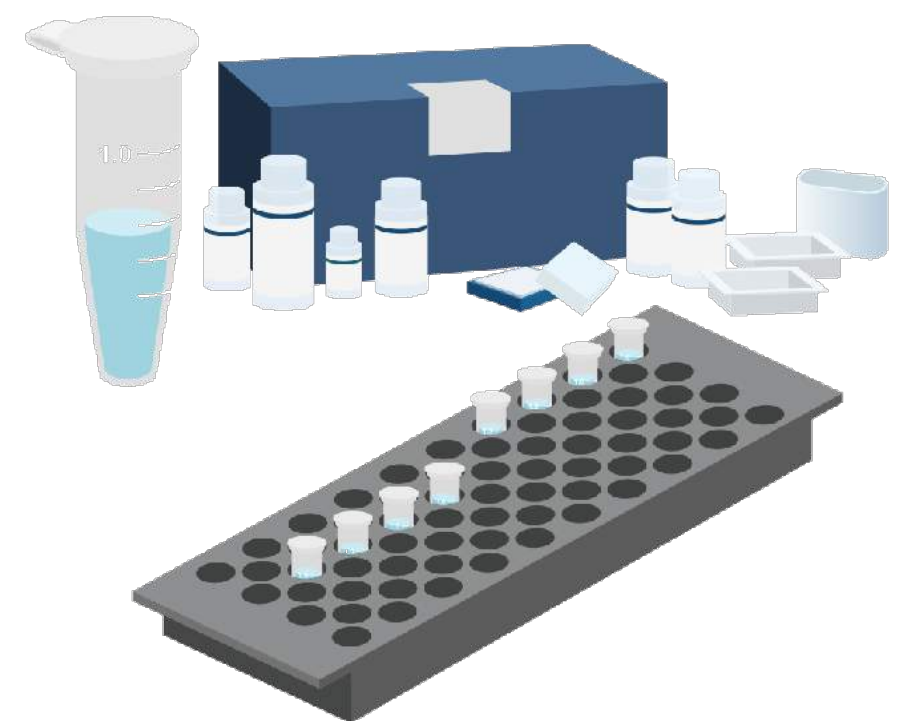
定量PCR | Quantitative PCR

(一種～数種の分析; 種ごとにプライマー設計)



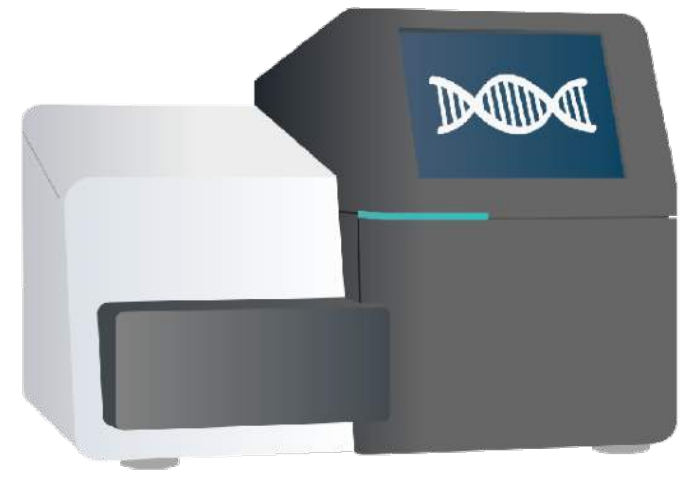
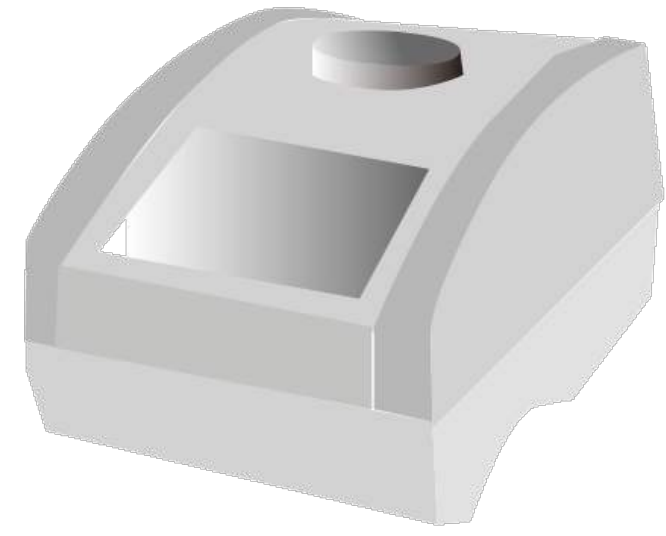
サンプル収集
(例. 水をろ過)

Collect samples
(e.g., water filtration)



市販のキットで
DNA抽出

DNA extraction



配列解析・統計解析

Sequence analysis
Statistical analysis

高出力のシーケンサーで網羅的にDNAを解読

(eDNAメタバーコーディング | eDNA metabarcoding)

Power of eDNA metabarcoding

**ROYAL SOCIETY
OPEN SCIENCE**

rsos.royalsocietypublishing.org

Research



CrossMark
click for updates

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>

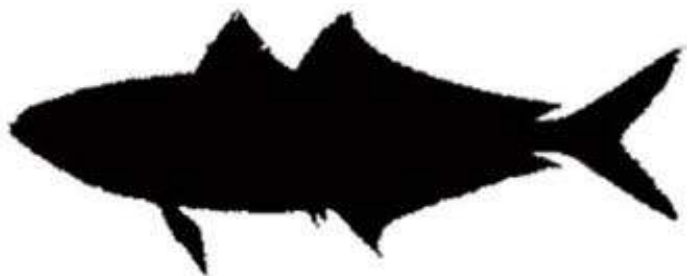
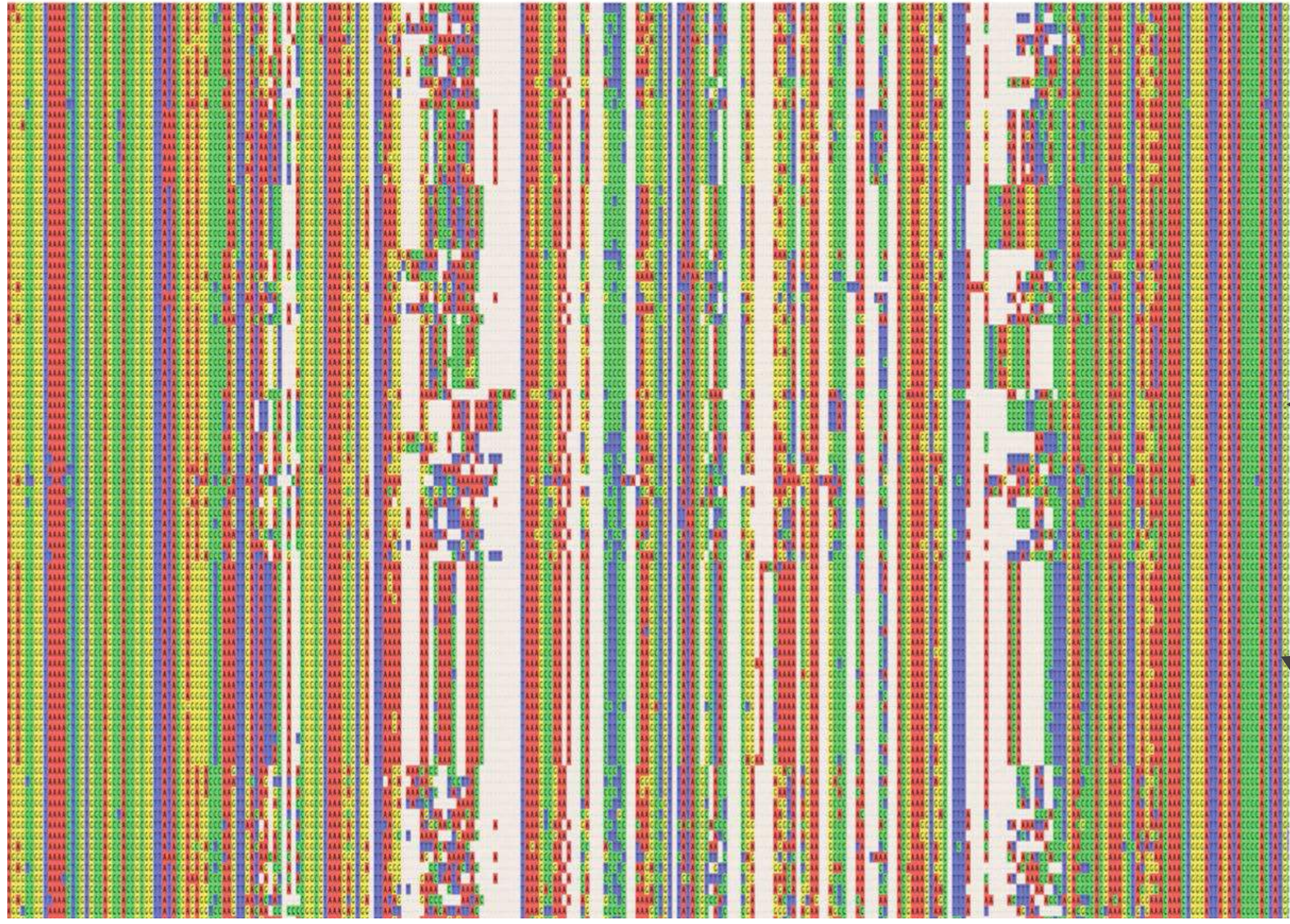
MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species



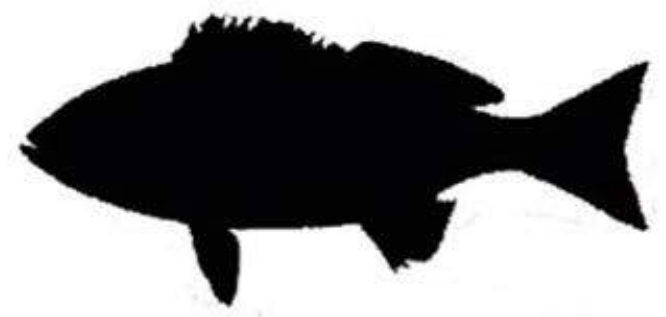
Masaki Miya
(Natural History Museum and Institute, Chiba)

Power of eDNA metabarcoding

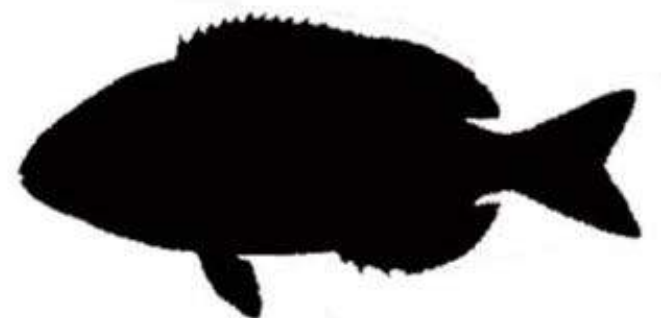
Mitochondrial 12S



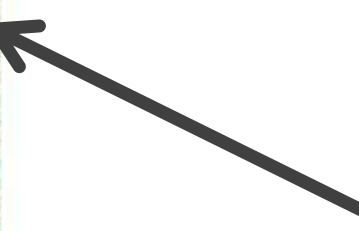
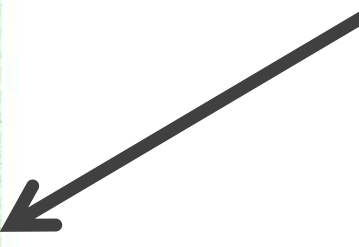
Species A



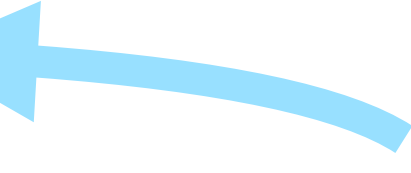
Species B



Species C



Universal primer that binds DNAs of most fish species

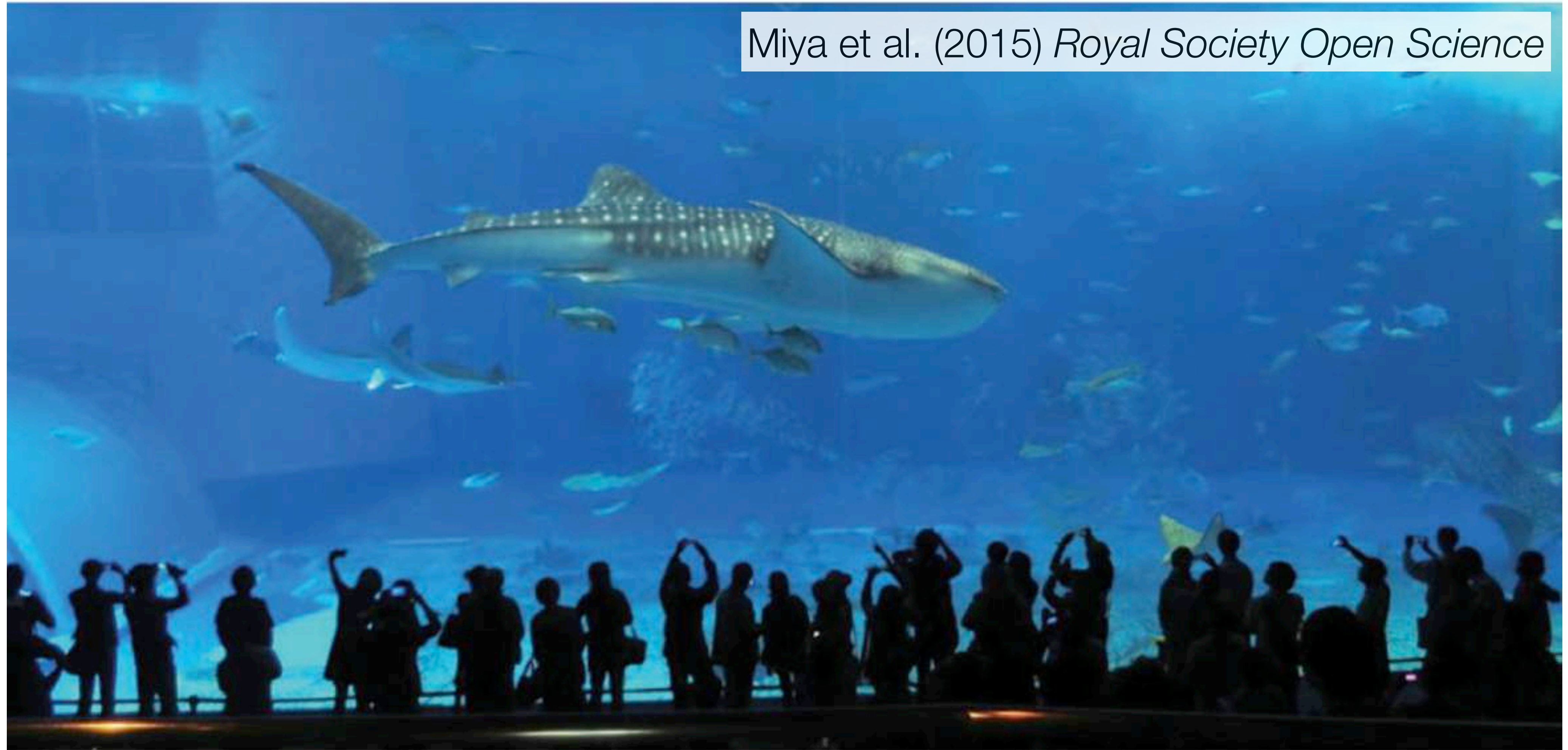


Universal primer that binds DNAs of most fish species



Variable region
= used to identify fish species

Power of eDNA metabarcoding

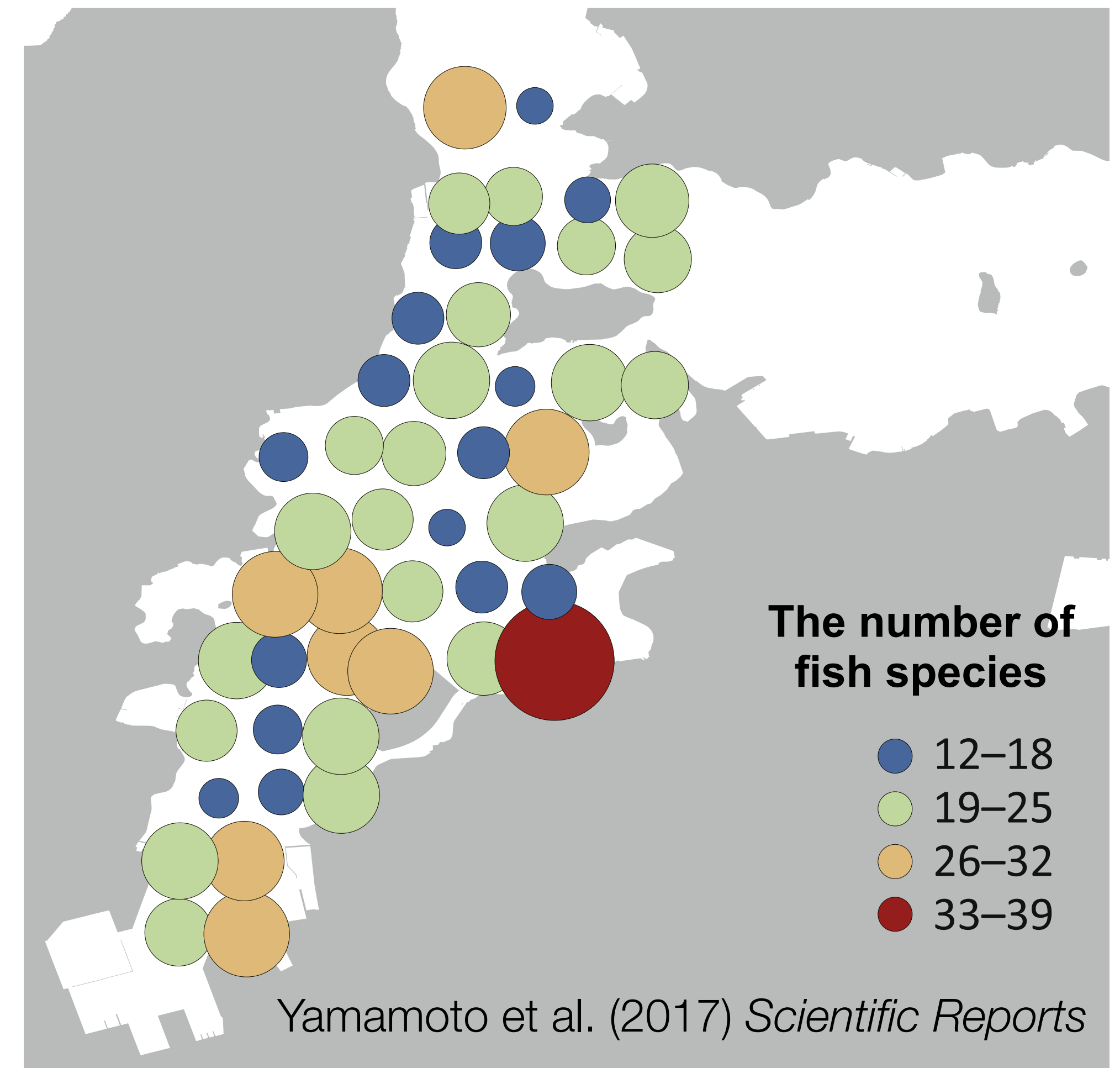
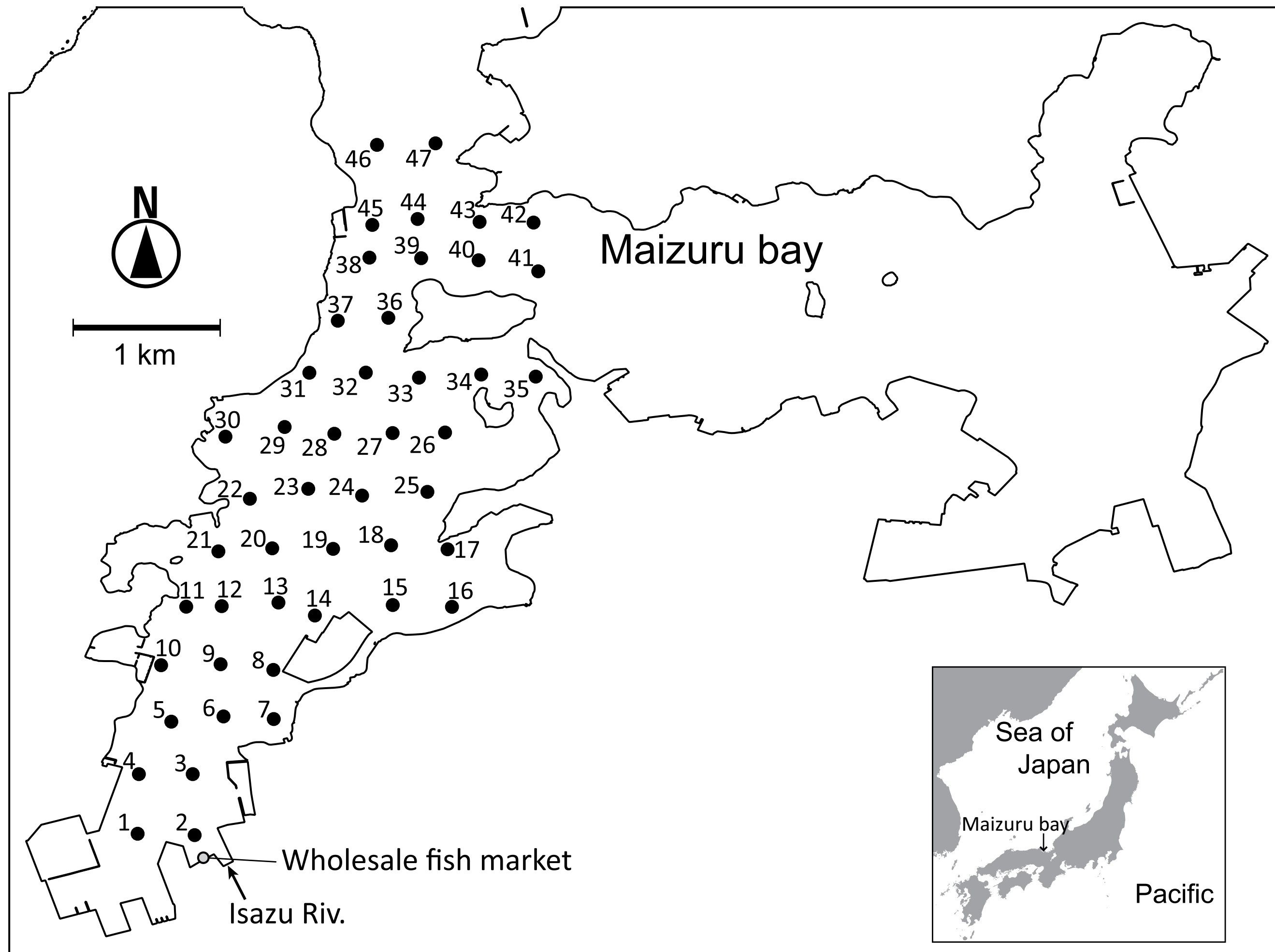


Miya et al. (2015) *Royal Society Open Science*

From ~10 L water / 7,500,000 L ($\approx 0.00013\%$)

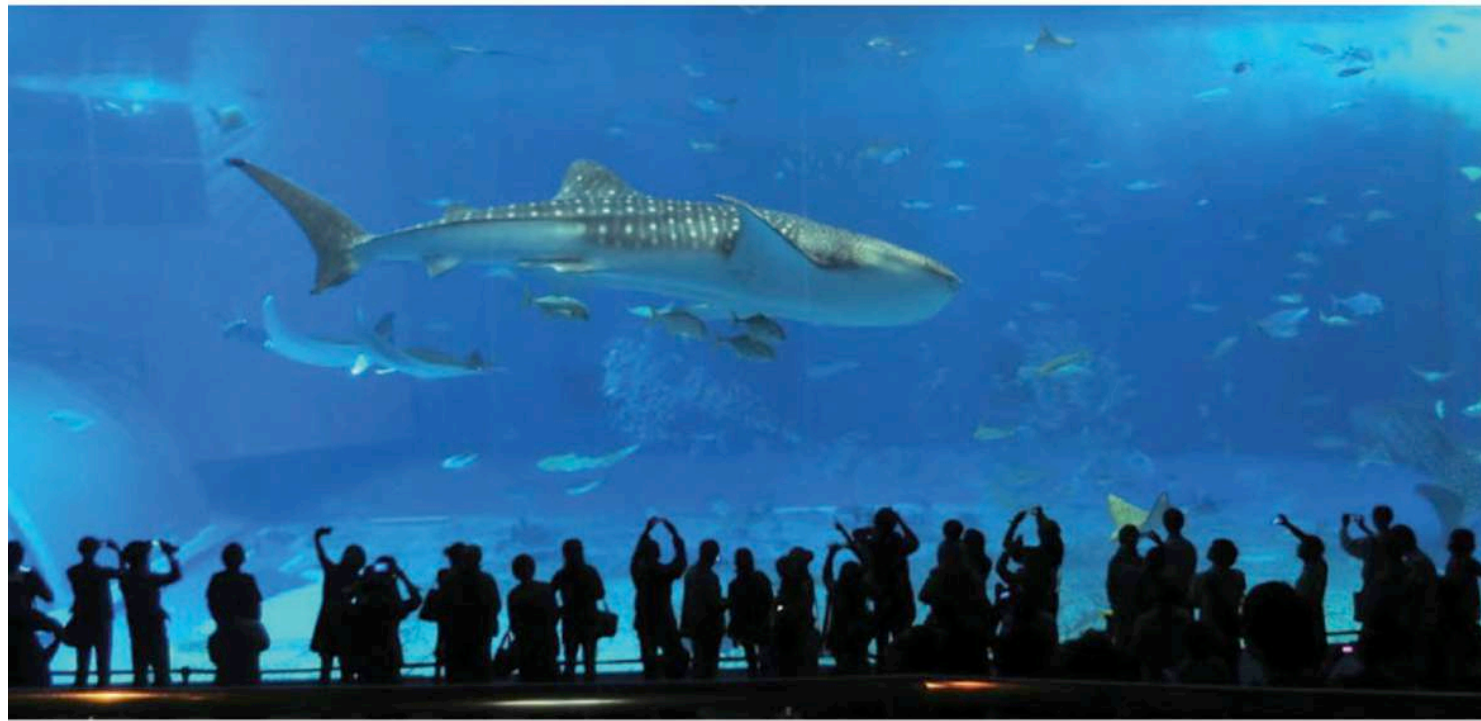
Detected > 90% of fish species!!

Power of eDNA metabarcoding

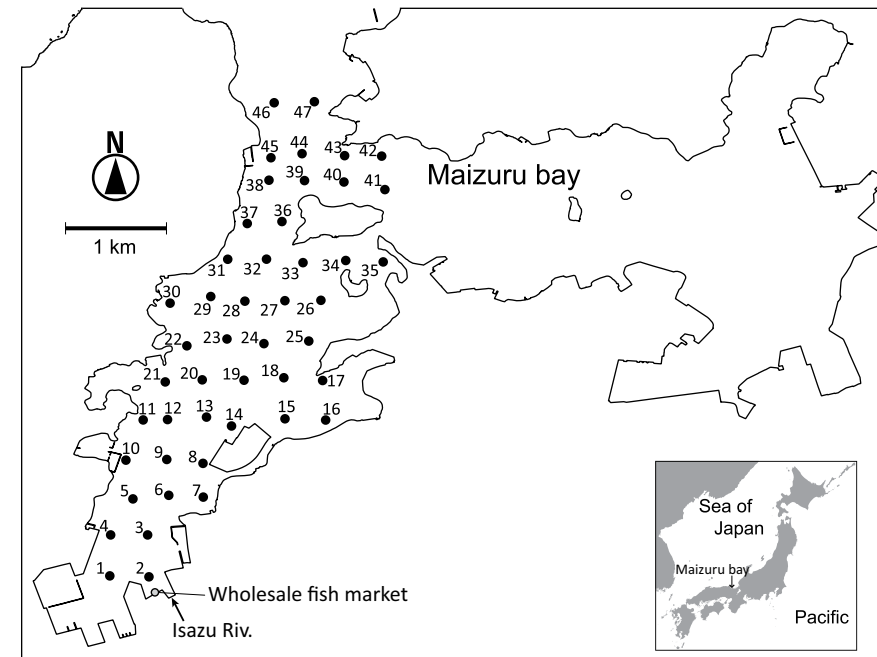


Six hour water sampling and eDNA metabarcoding detected 128 fish species = 60% of fish species observed over a 14-year underwater visual census!

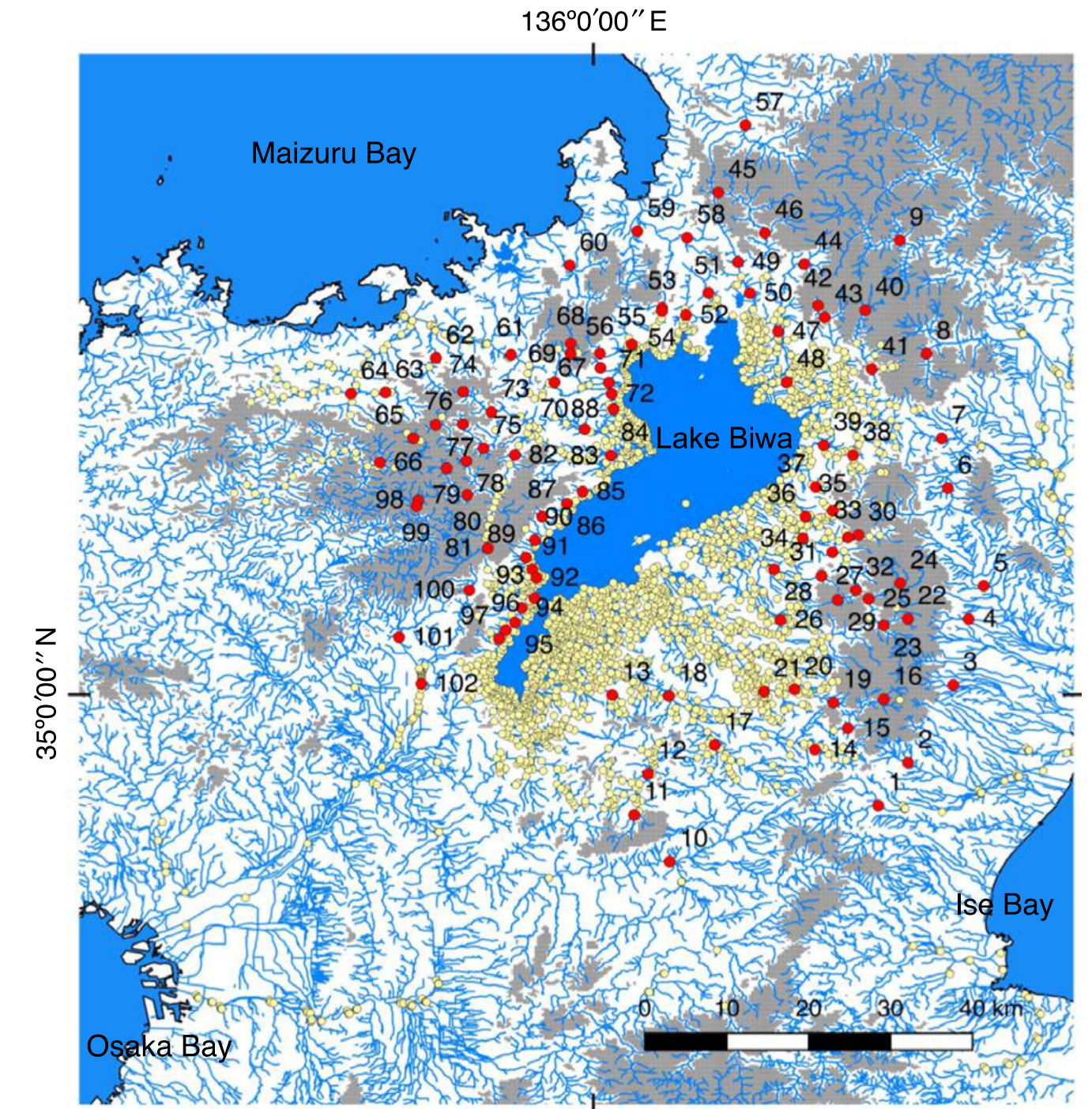
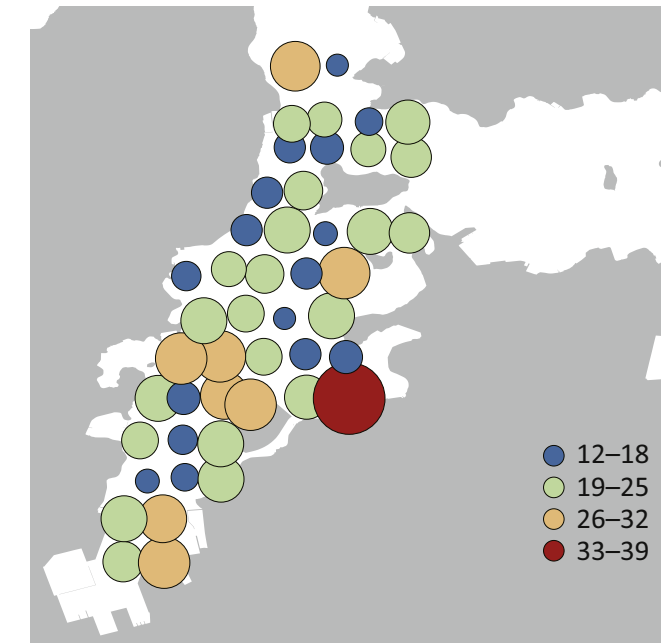
環境DNAの応用事例 | Examples of eDNA applications



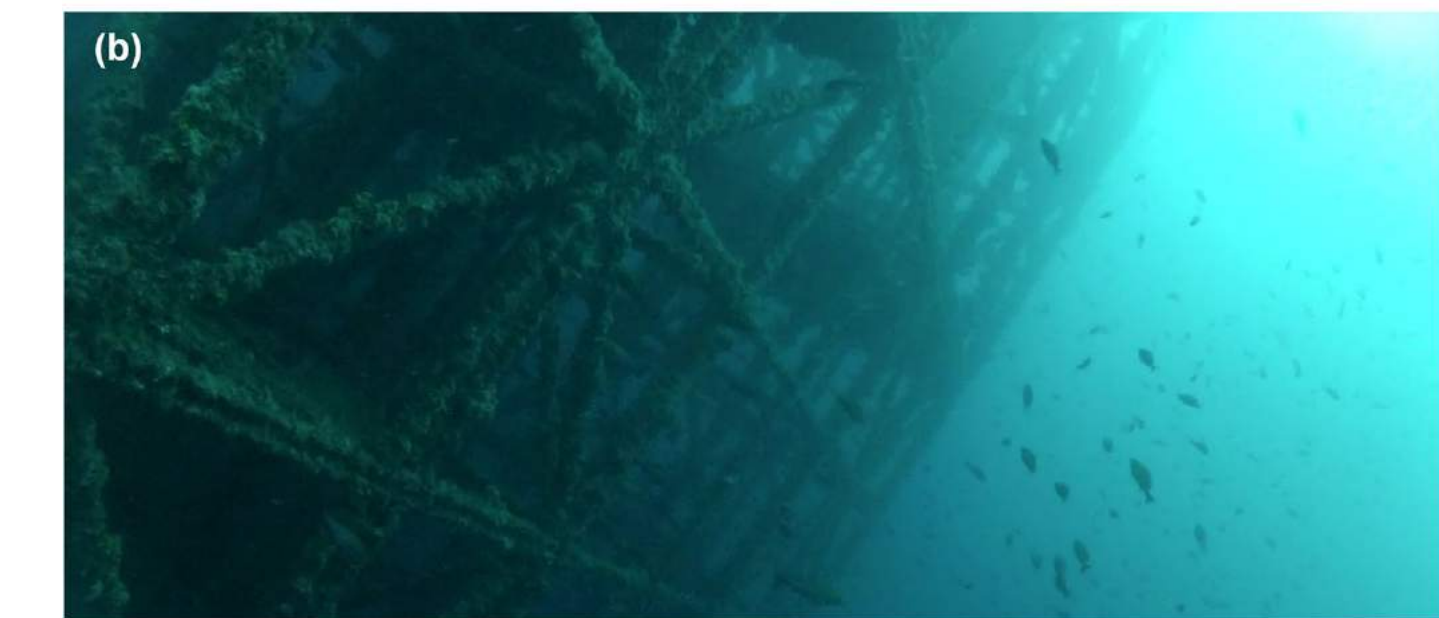
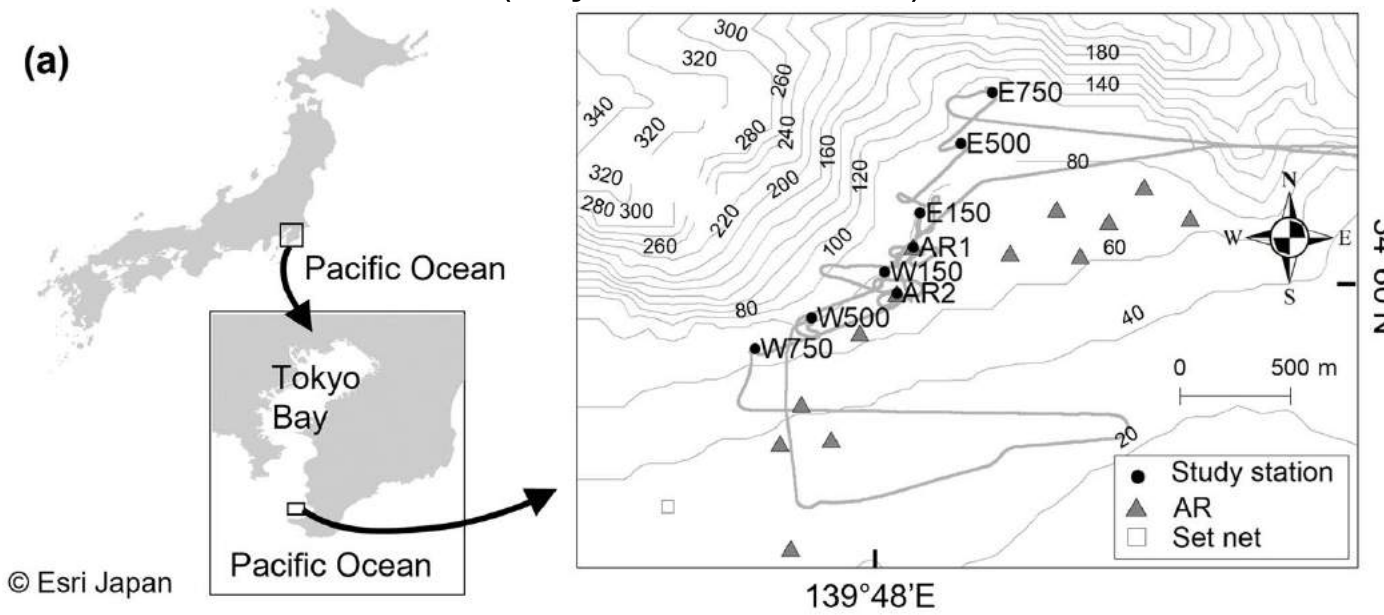
MiFish プライマーの開発 | MiFish primer development
(Miya et al. 2015)



舞鶴湾での魚類の多様性把握 | Evaluations of fish community diversity
(Yamamoto et al. 2017)



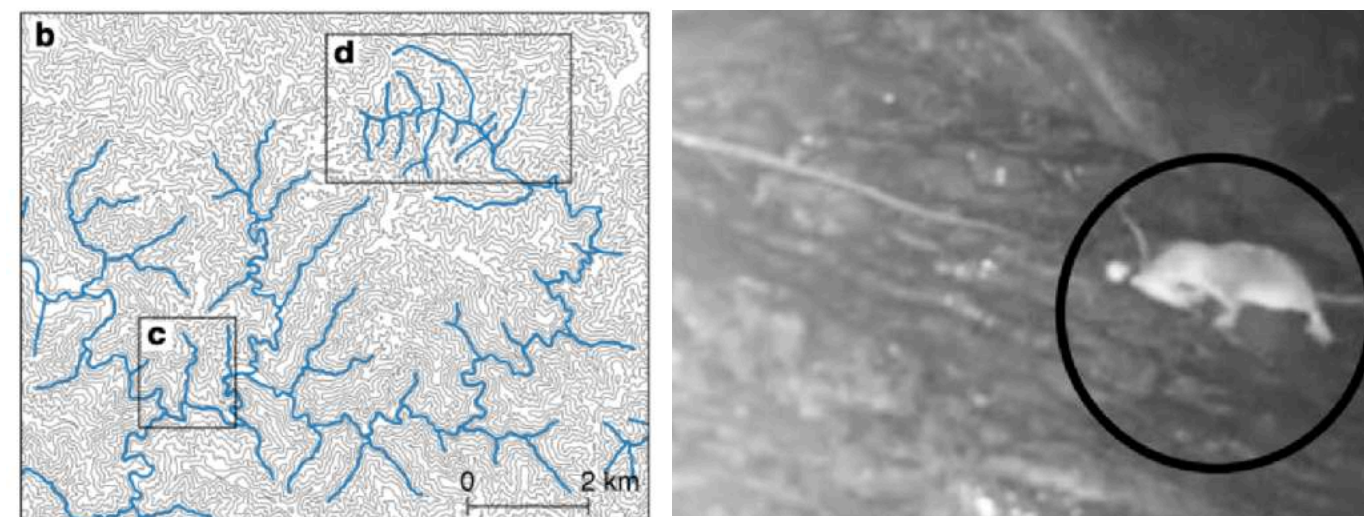
琵琶湖流域での魚類相の把握 | Evaluations of
freshwater fish community diversity
(Nakagawa et al. 2018)



館山での人工魚礁の効果定量 | Quantifying effects of artificial reef
(Sato et al. 2021)



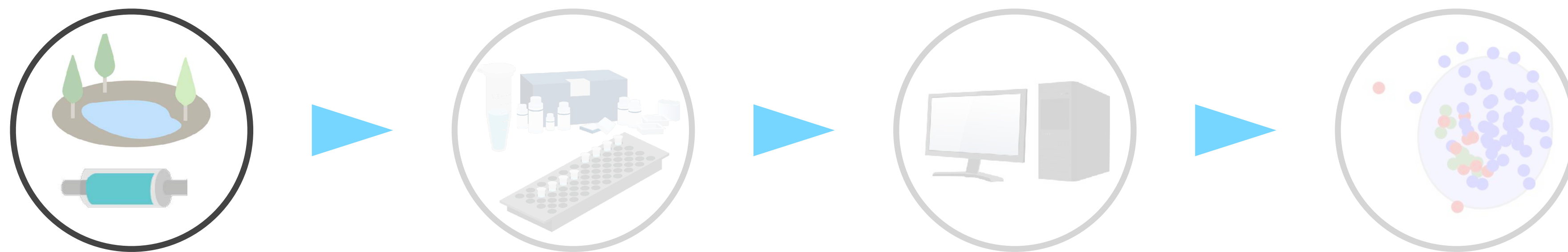
ボルネオ島熱帯低地林での哺乳類相の把握 | Detecting terrestrial mammals in
tropical forests (Ishige et al. 2017)



京都府芦生演習林での希少哺乳類の生息地発見 | Discovery of a rare, small
mammal species in a temperate forest (Yonezawa et al. 2020)

- その他 | Others
- 陸域昆虫 | Terrestrial insects
- 温帯域の哺乳動物 | Mammals in temperate regions
- 甲殻類 | Crustacean
- クラゲ | Jellyfish

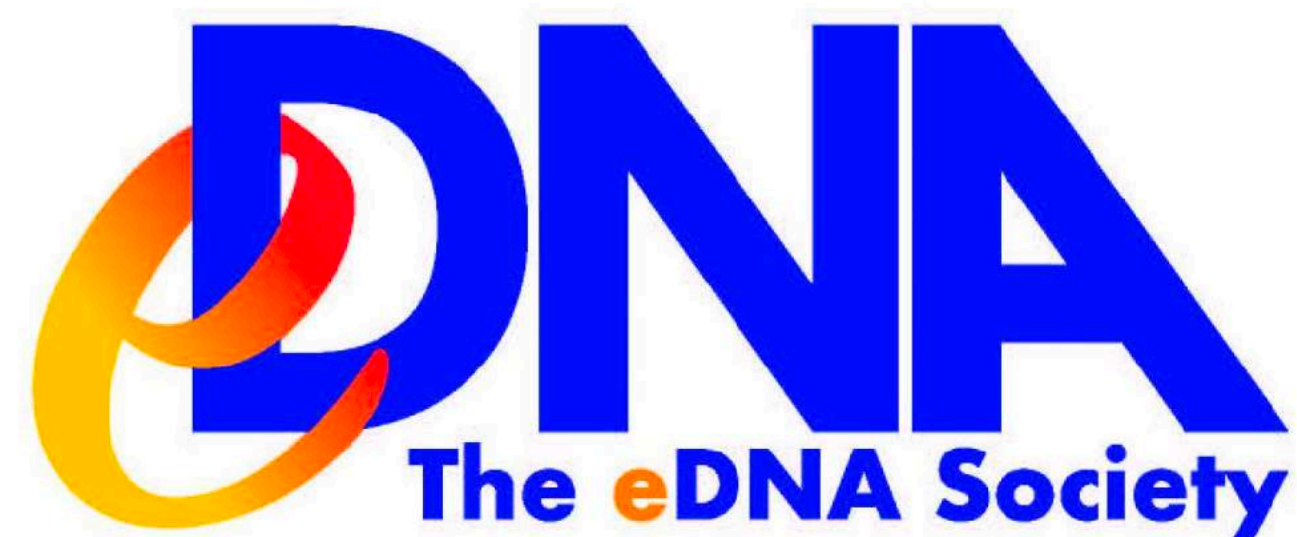
...



サンプリング: 採水・濾過

Sampling: Water sampling and filtration

マニュアルはこちら



環境 DNA 調査・実験マニュアル

Ver. 2.2 (2020年4月3日発行)



eDNA Sampling (aquatic eDNA)

- **安全に採水を行うために**

環境 DNA のサンプリング (=採水) は、季節や場所によってさまざまな環境下で行うことになる。夏には熱中症や日焼け対策が、冬には防寒対策が必要となり、磯や濡れた突堤、貯水池の護岸などでは転倒や落水に注意しなくてはならない。また、水際の作業であるために濡れても良い撥水性や速乾性の高い衣類を着用することも重要である。フィールドでの調査・作業は不測の事態に備えて原則として複数名で行う。さらに、特に海岸や大規模な河川においては安全を確保するためライフジャケットの着用は必須である。万が一、水難事故が起きてしまった場合は、川や池であれば警察へ110番に、海であれば海上保安庁のホットライン 118番に速やかに通報する。

eDNA Sampling (aquatic eDNA)

日本生態学会「野外調査の安全マニュアル案」<http://www.esj.ne.jp/safety/manual/>

総論 基本的心得

安全に野外調査を行うために、もっとも重要なことは、あきらめることである。データが十分とれないともちろん困るのだが、データはとれたものの死んでしまっっては元も子もない。データがとれずに留年するのと、認定で学位はとれたものの死んでしまうのと、どちらが良いかと聞かれたら、本人・友人・指導教員・そして学生の親・兄弟の全員が、留年しても生きて帰るのが良いと言うはずである。生きて帰ることが何よりも大事である。

指導に当たる立場の人間は、**データよりも命が大切である**ことを、明確な言葉として学生に確実に伝える義務がある。学生は、データを採取することに、教員が想像する以上のプレッシャーを感じている。このプレッシャーが、学生に過度の無理を強いることになる。「データよりも命が大

eDNA Sampling (aquatic eDNA)

- 採水道具 | Collection tools
- 濾過道具 | Filtration tools
- 輸送手段 | Transportation
- 保存手段 | Storage

eDNA Sampling (aquatic eDNA)

- 採水道具 | Collection tools

ハイターでコンタミ防止 投げる



<https://www.k-engineering.co.jp/general/>

アイボーイ 500 ml の角ボトル

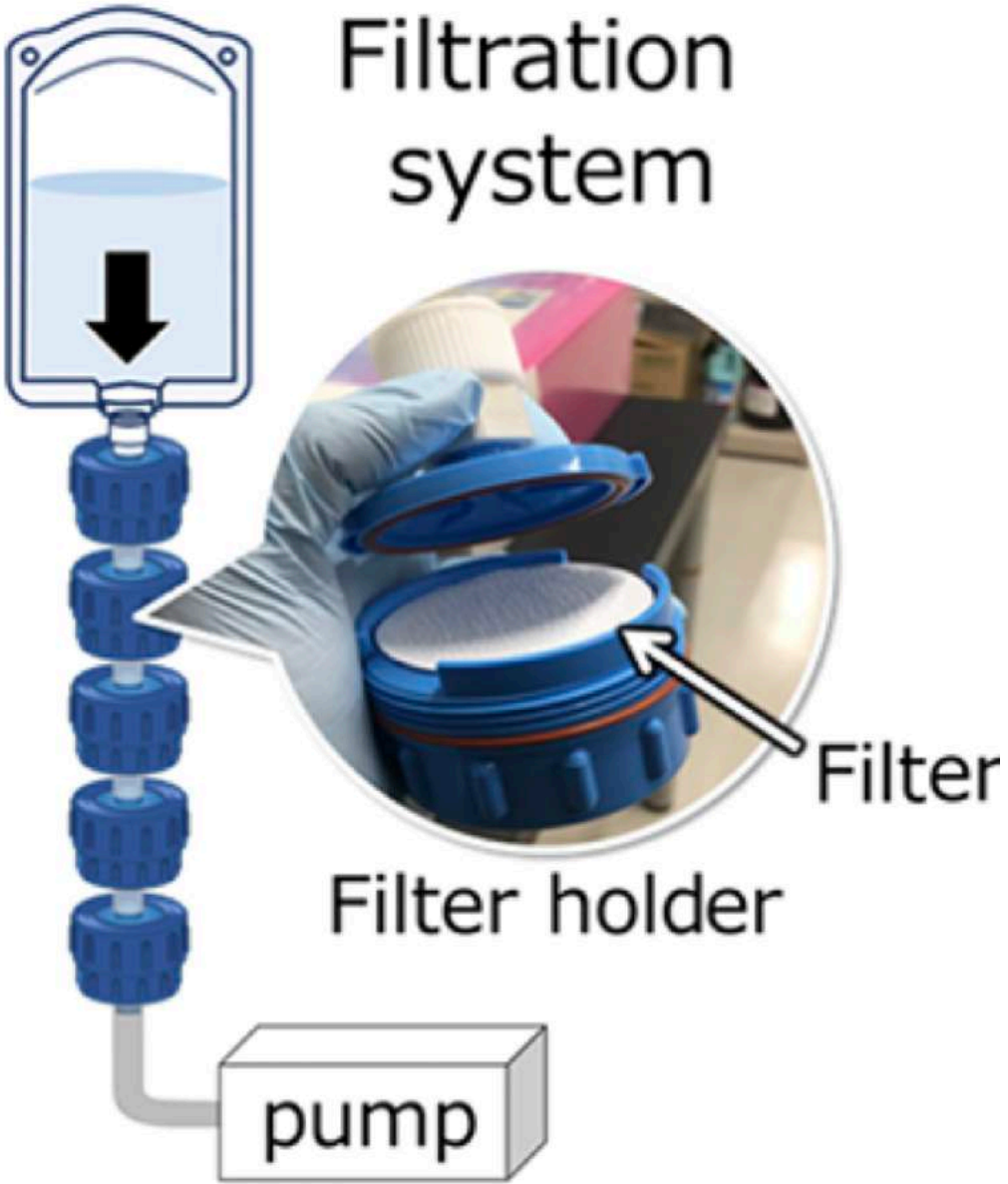


https://ednasociety.org/wp-content/uploads/2022/06/eDNA_manual_ver2_2.pdf

eDNA Sampling (aquatic eDNA)

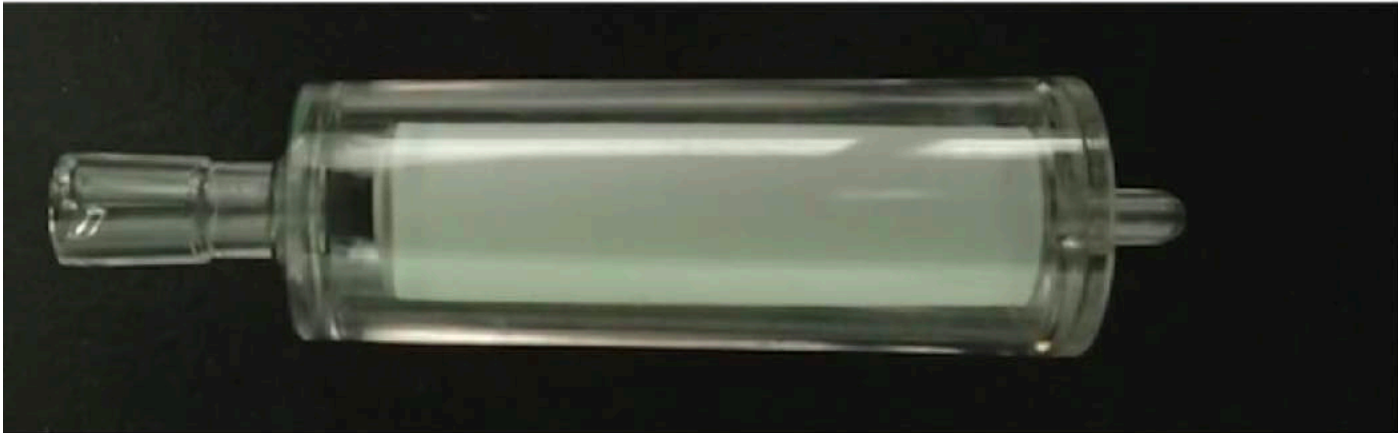
- 濾過道具 | Filtration tools

メンブレンフィルター (e.g., 0.7 μm)



Tsuji et al. (2022)
Environmental Science & Technology

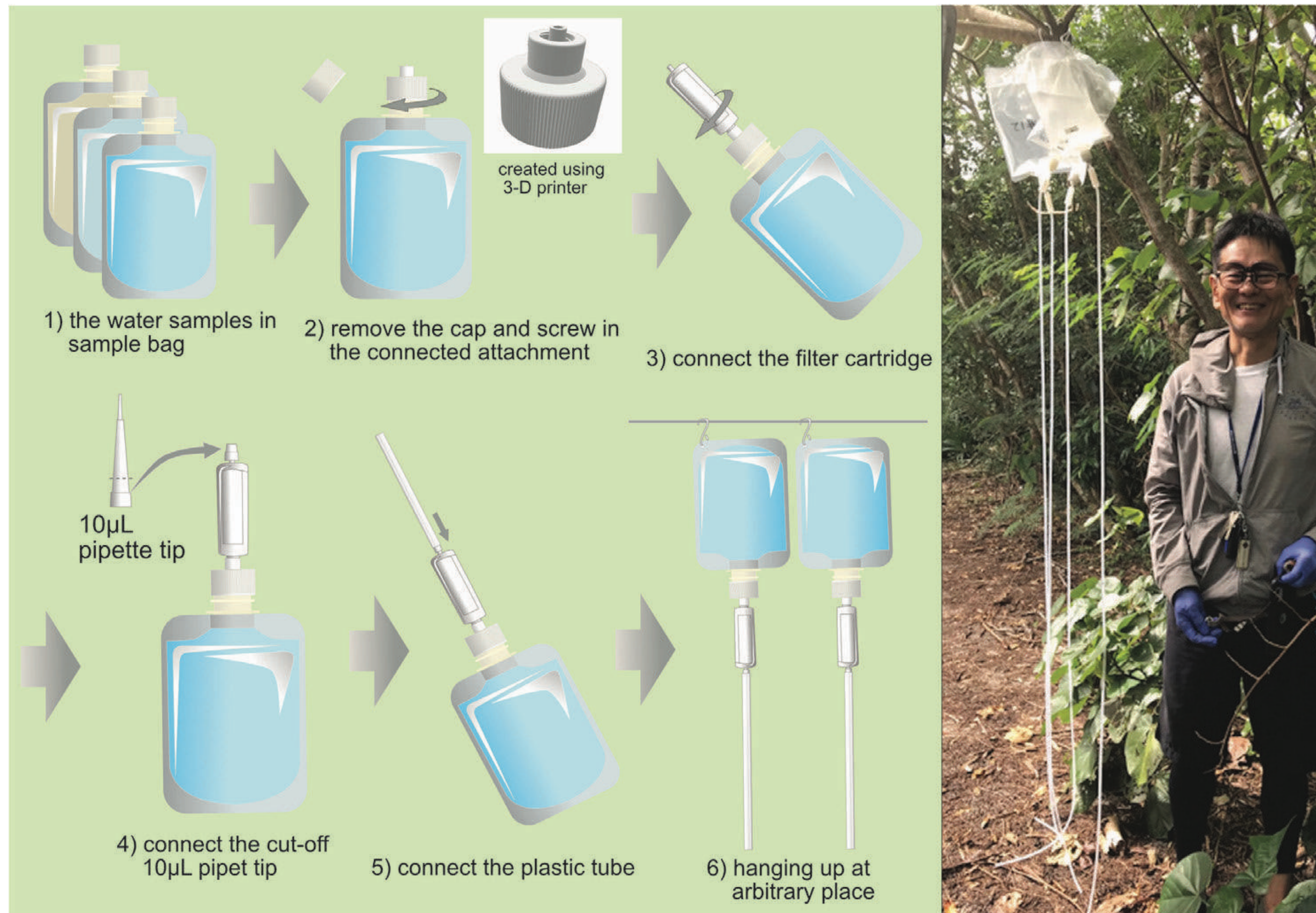
ステリベクス (0.22 or 0.45 μm)



eDNA Sampling (aquatic eDNA)

- 濾過道具 | Filtration tools

重力濾過



eDNA Sampling (aquatic eDNA)

- 輸送手段 | Transportation
- 保存手段 | Storage

クーラーボックスに保冷剤を入れて



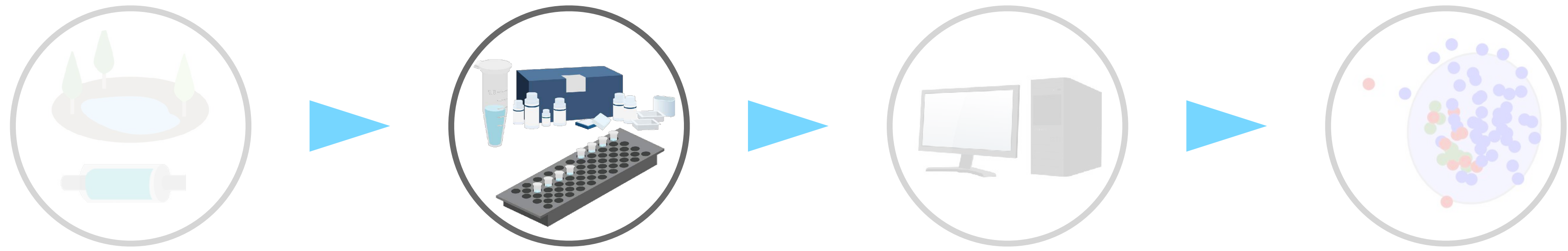
ステリベクス内に RNAlater を充填



Benzalkonium chloride (0.01%) Yamanaka et al. (2017) *Limnology*

A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant

Hiroki Yamanaka¹ · Toshifumi Minamoto² · Junichi Matsuura³ · Sho Sakurai⁴ ·
Satsuki Tsuji⁴ · Hiromu Motozawa⁴ · Masamichi Hongo⁴ · Yuki Sogo⁴ ·
Naoki Kakimi⁴ · Iori Teramura¹ · Masaki Sugita¹ · Miki Baba¹ · Akihiro Kondo⁵



DNA抽出からシーケンスまで

From DNA extraction to sequencing

eDNA extraction, qPCR and eDNA metabarcoding

- DNA 抽出 | DNA extraction
- 定量 PCR | Quantitative PCR
- eDNA メタバーコーディング | eDNA metabarcoding
- 定量 eDNA メタバーコーディング |
Quantitative eDNA metabarcoding

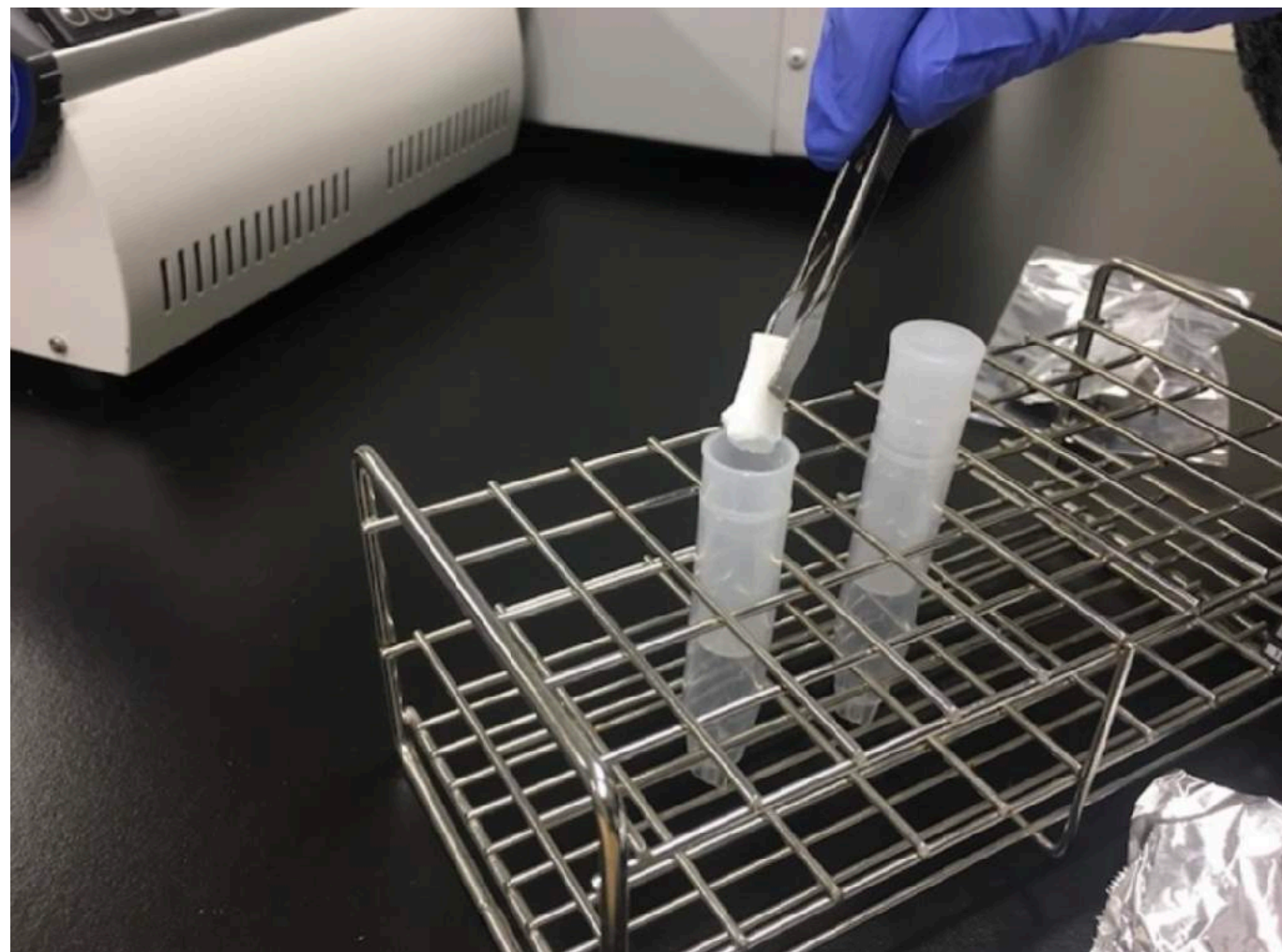
DNA 抽出 | DNA extraction

- DNA 抽出 | DNA extraction



DNeasy Blood & Tissue Kit

グラスファイバーフィルター (e.g., 0.7 μm) ステリベクス (0.22 or 0.45 μm)

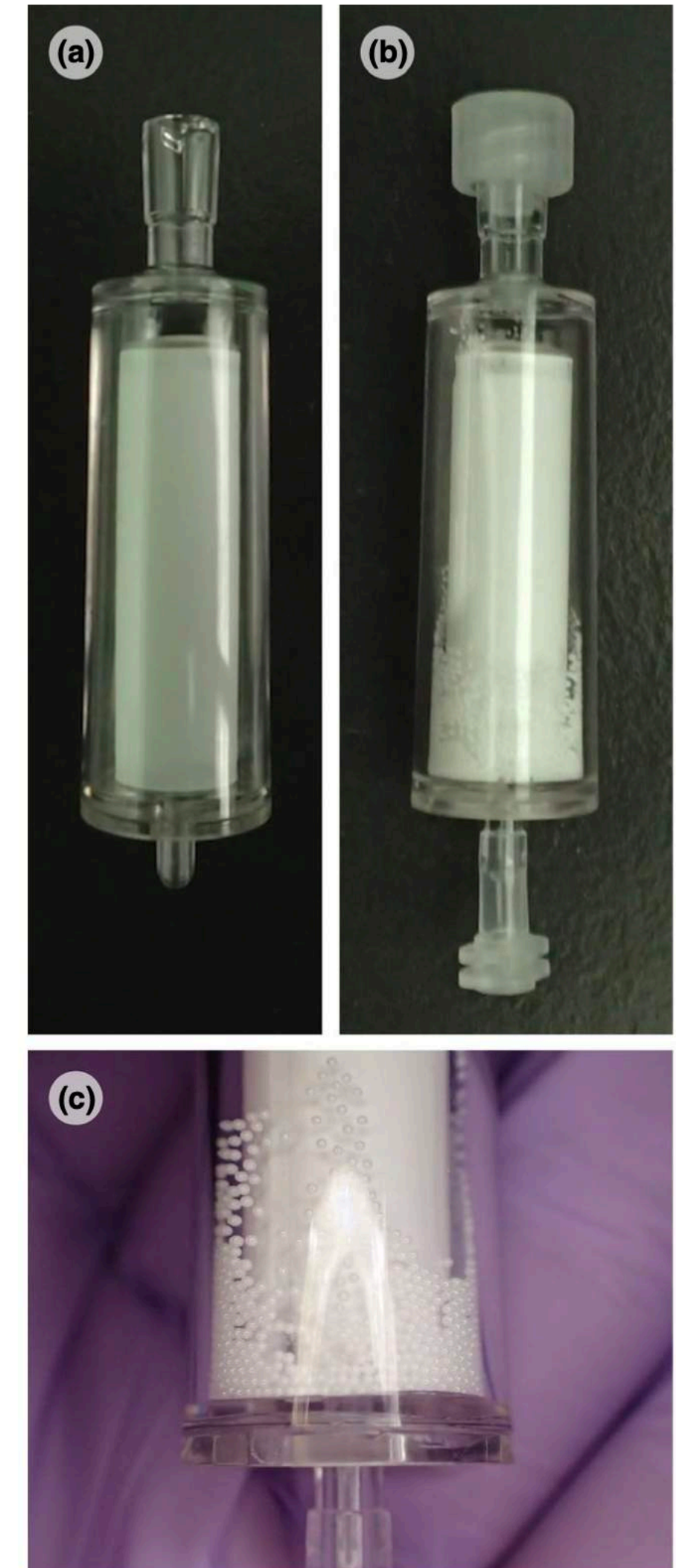
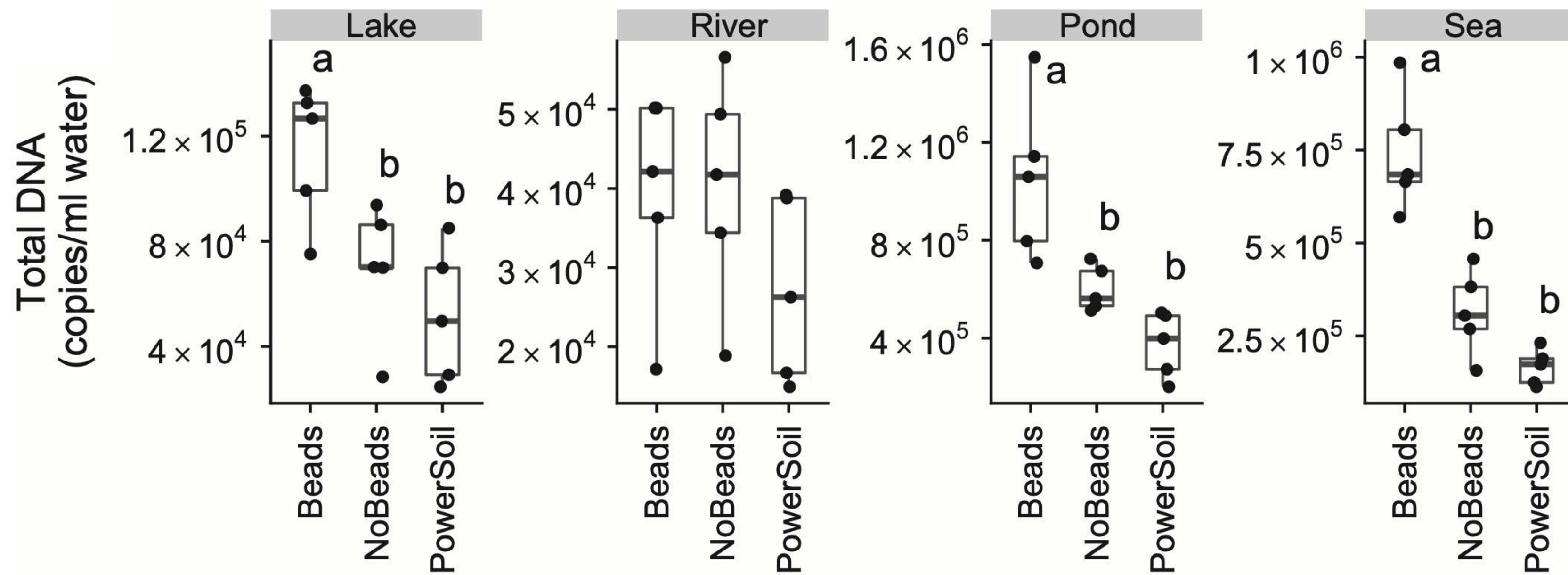


- Miya et al. (2016) *Journal of Visualized Experiments*
- Ushio (2019) *Methods in Ecology & Evolution*
- Wong et al. (2020) *Scientific Reports*

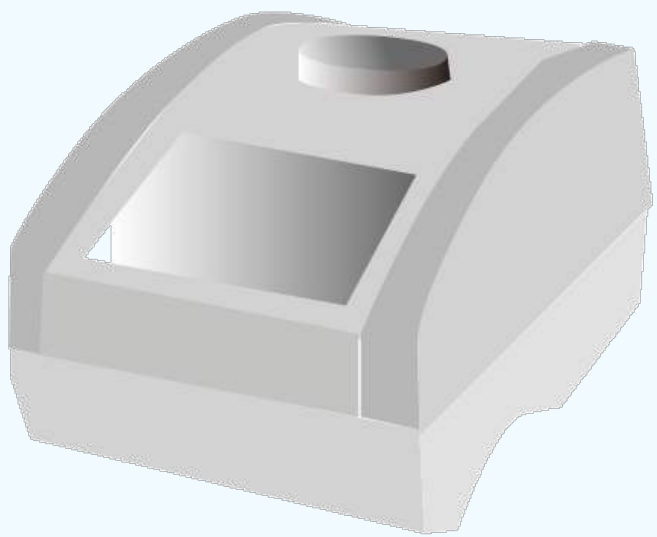
DNA 抽出 | DNA extraction

- DNA 抽出 | DNA extraction

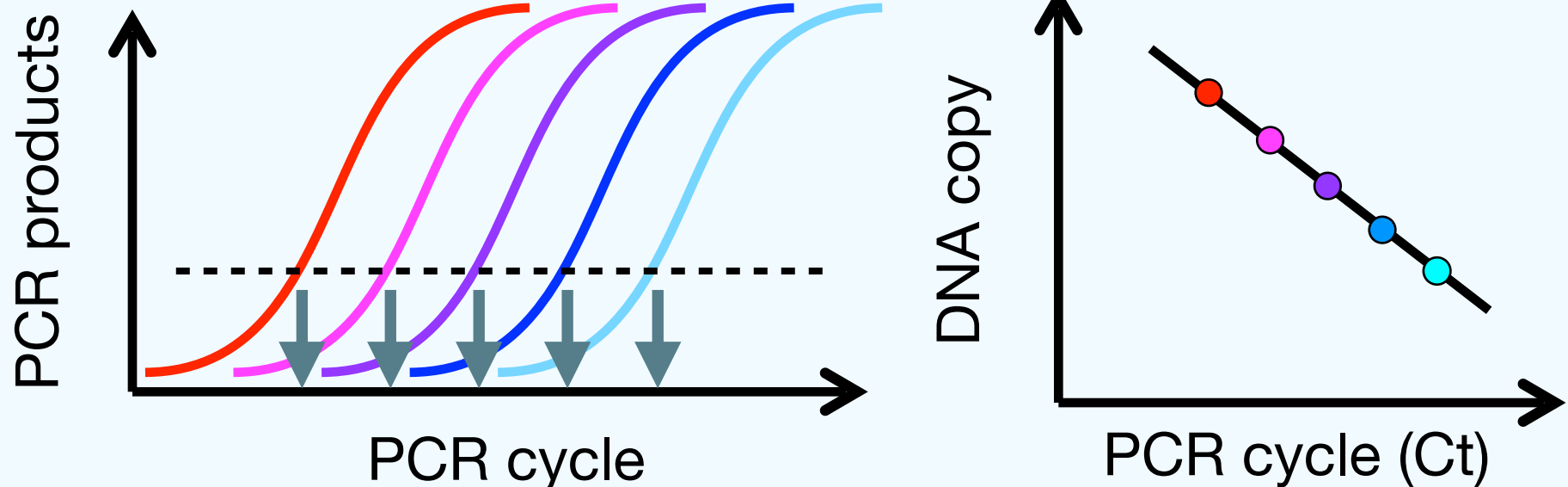
ステリベクス (0.22 or 0.45 μm) + Bead-beating



Quantitative PCR v.s. eDNA metabarcoding

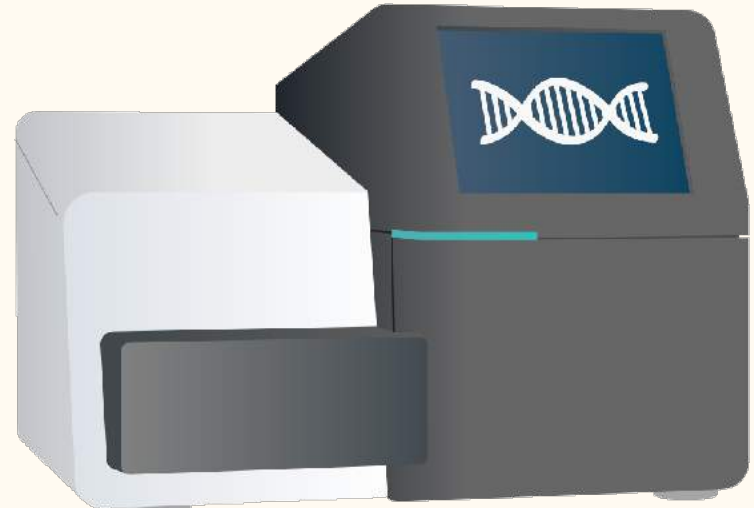


qPCR



定量 PCR | qPCR

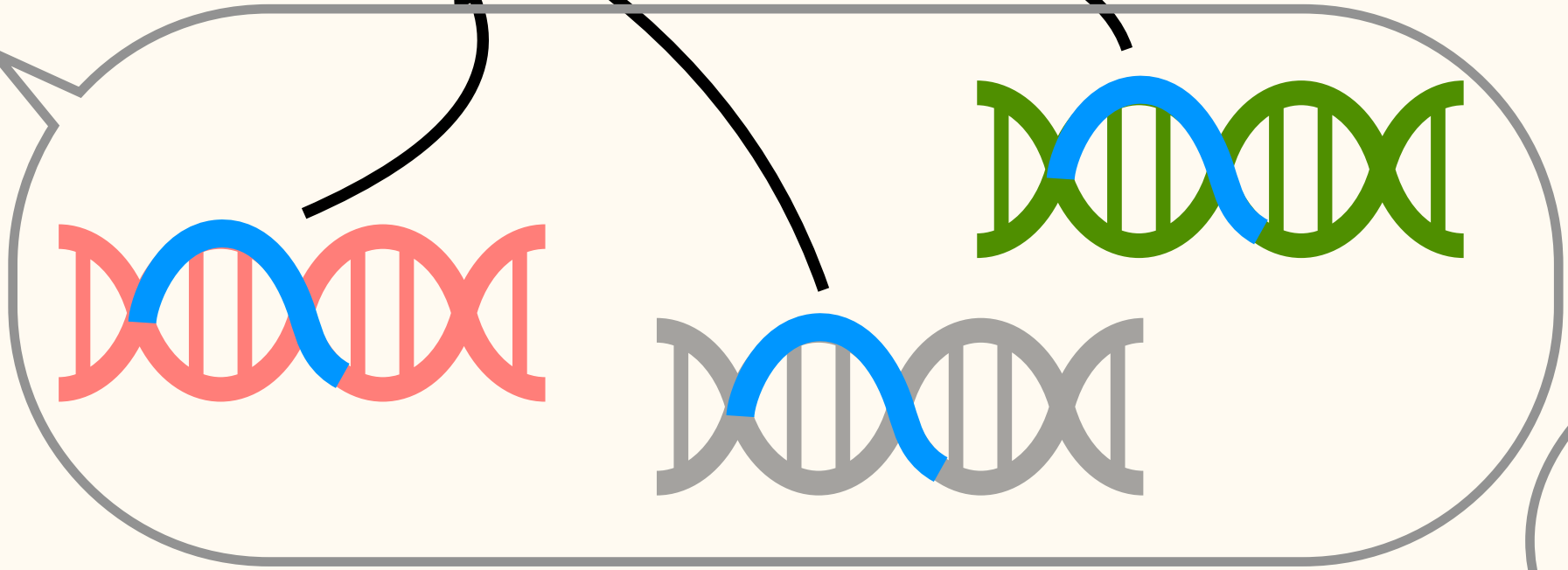
- 種特異的プライマーを用いて DNA を定量
Quantify DNA concentrations using species-specific primer
- プライマーは種ごとにデザイン
Primer should be designed for each species
- 高い定量性 | High quantitative capacity



eDNA metabarcoding

種同定に適するDNA領域 (= バーコード領域) を増幅
Amplify a suitable region of DNAs for species identification

ライブラリ
Library



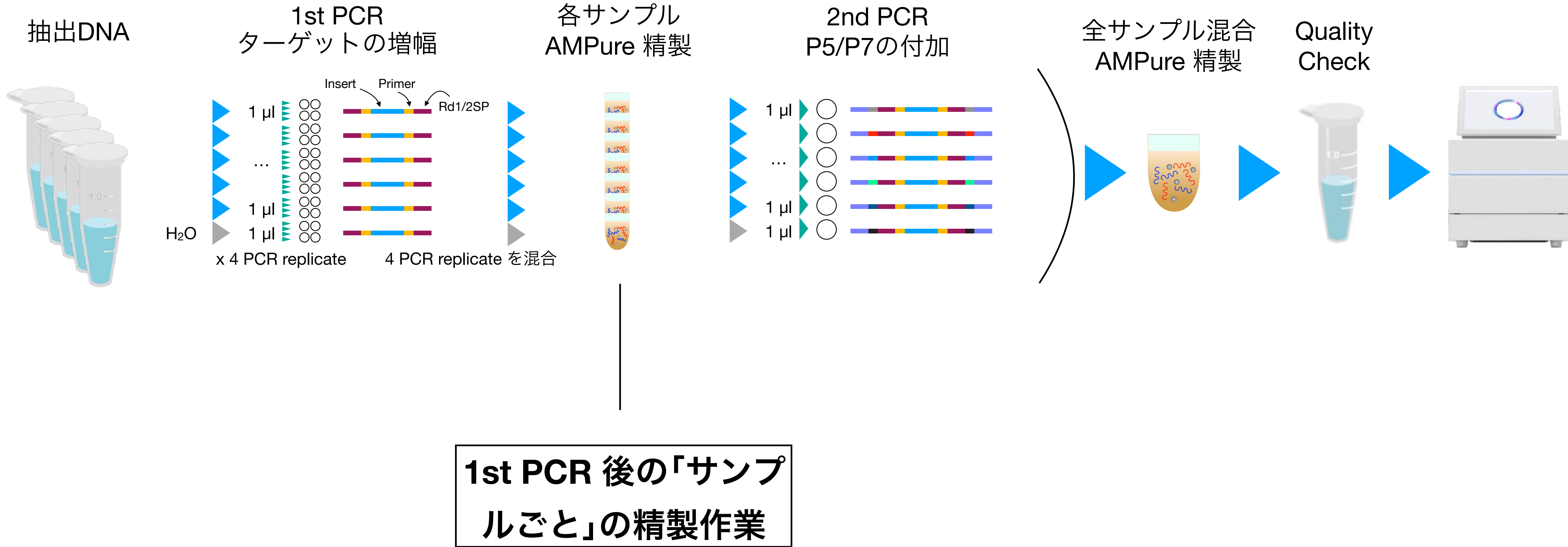
ライブラリ調整
Library preparation



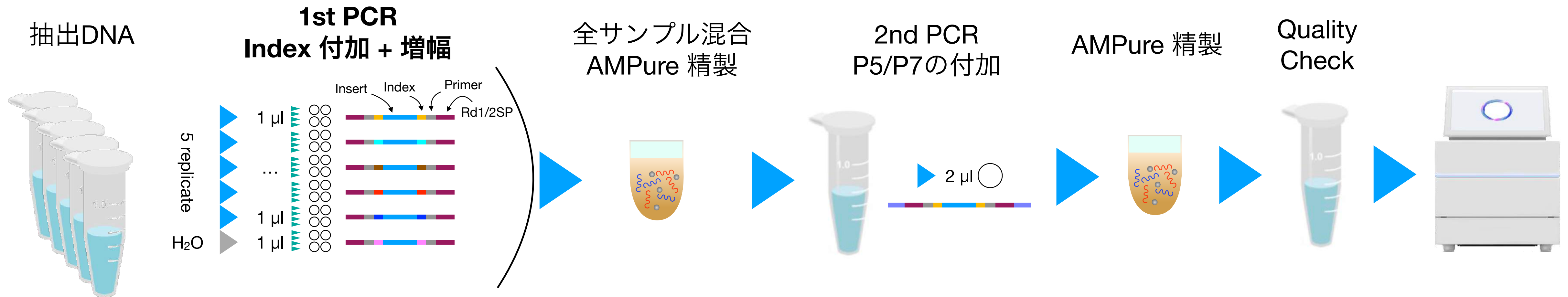
環境DNA メタバーコーディング

- ユニバーサルプライマーを用いて多種を同時検出
Detection of multiple species using “universal” primer
- 多数のサンプルを同時に分析 (> 数百サンプル以上も可能)
Multiplexing samples by adding a unique “index” sequence
- 低い定量性 | Low quantitative capacity

eDNA metabarcoding: 2-step PCR method



eDNA metabarcoding: Early-pooling method



ポイント

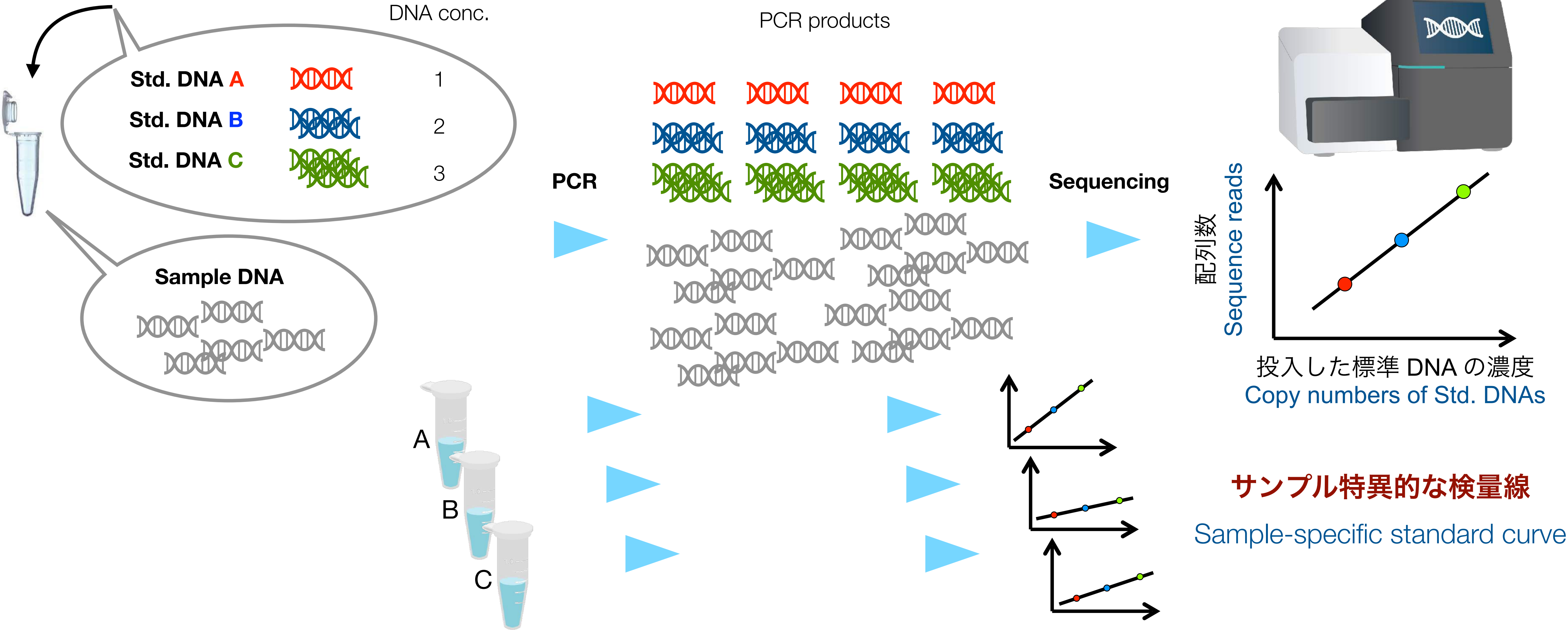
1st PCR 時にインデックスを付加してしまい、その後すぐに全てのサンプルを混合
以後、1チューブのサンプルとして扱える → 時間・手間・コストを大幅に削減

2-step PCR 法と同等の結果 → Ushio et al. (2022) *Environmental DNA*

Quantitative eDNA metabarcoding using standard DNAs

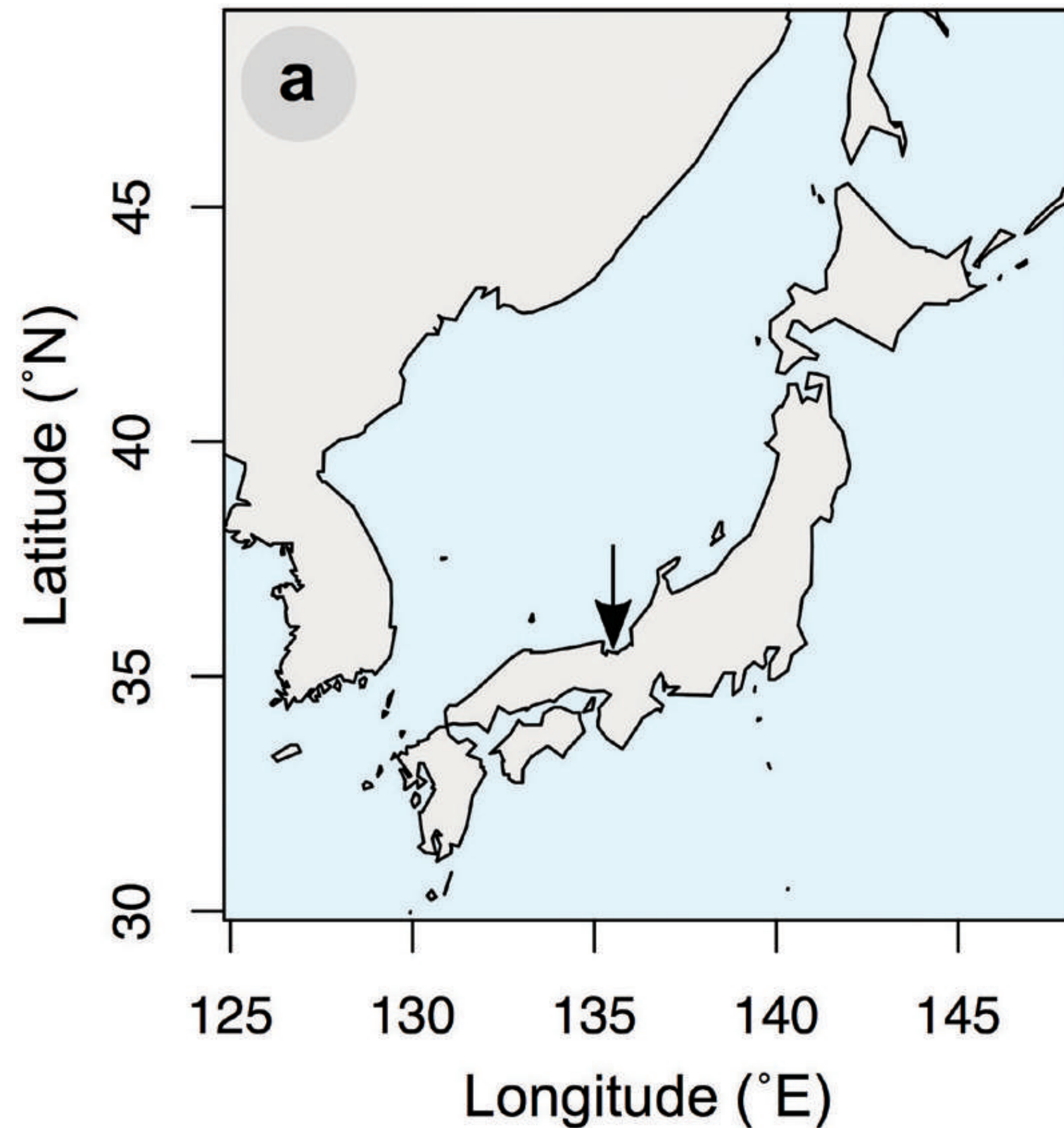
アイデア: ライブラリ調整に濃度既知の「標準 DNA」を添加する

Idea: Adding "Standard DNA" of which concentrations are known



Quantitative eDNA metabarcoding using standard DNAs

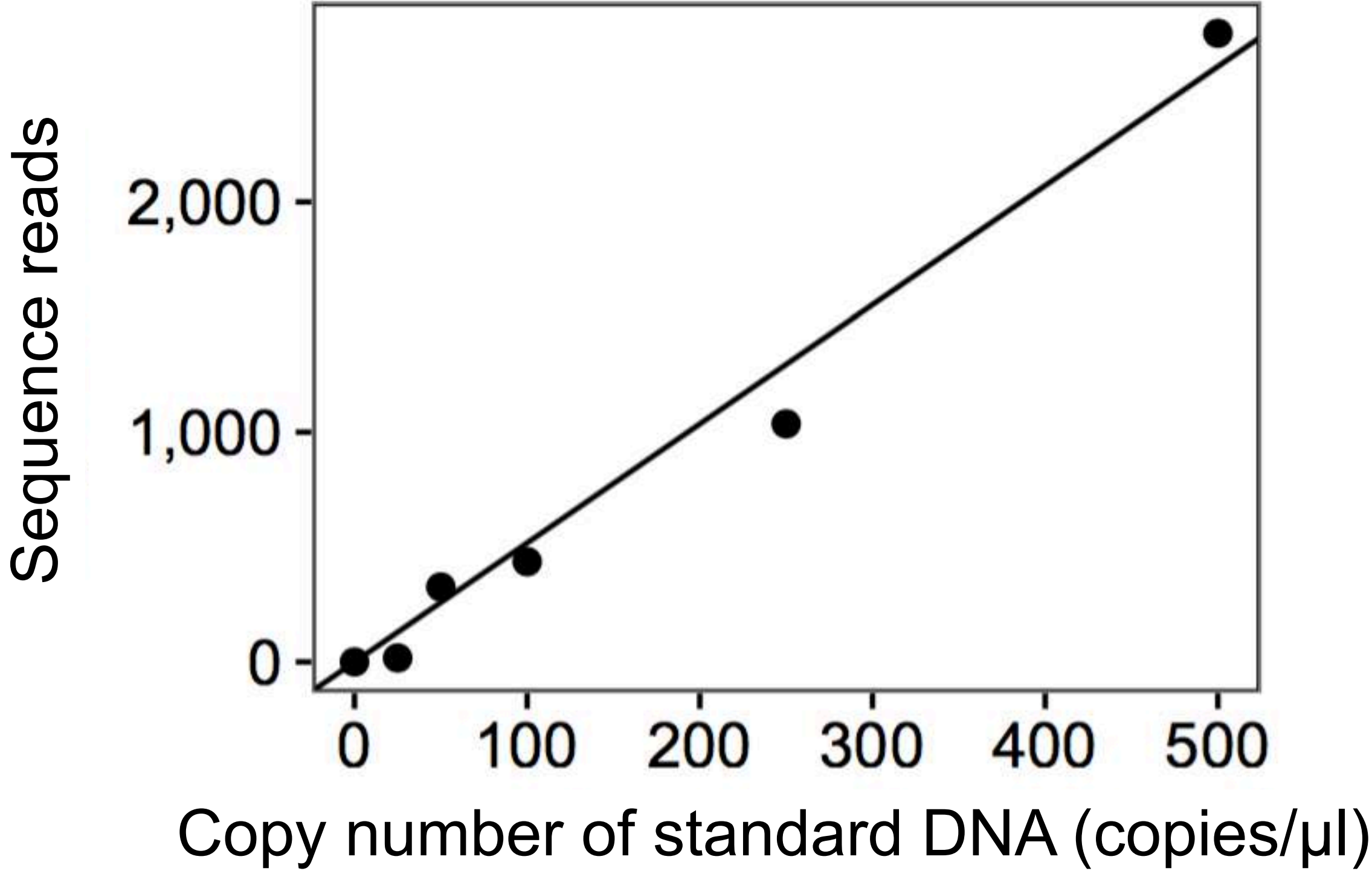
Ushio et al. (2018) *Metabarcoding & Metagenomics*



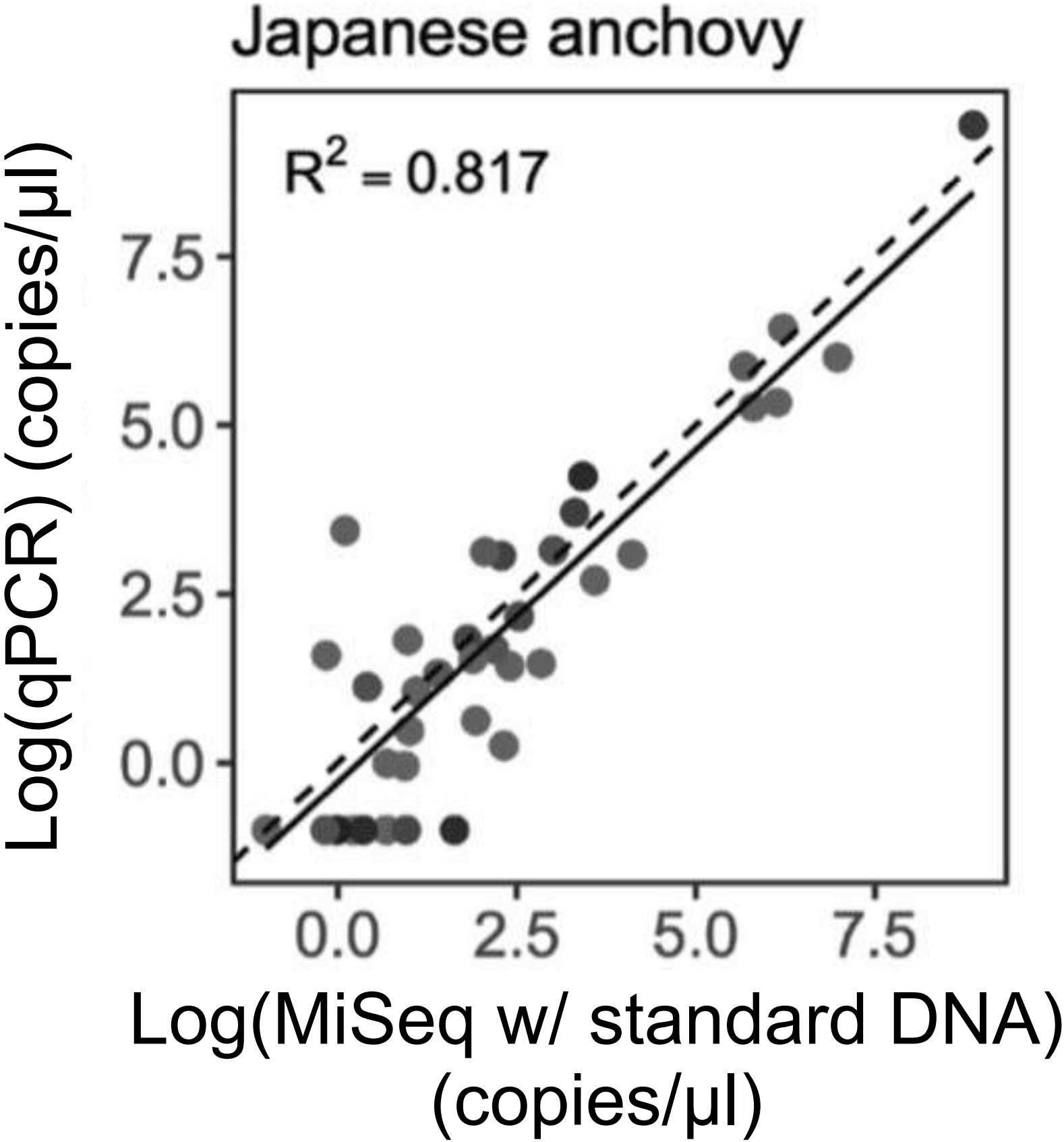
- 週 1 回 棧橋からの採水・環境DNAメタバーコーディング: 2015年4月 – 2016年3月 (52 サンプル)
Weekly water sampling from the pier in April 2015 – March 2016 (52 samples)

Quantitative eDNA metabarcoding using standard DNAs

Ushio et al. (2018) *Metabarcoding & Metagenomics*



Check its accuracy!



標準 DNA と取得配列数との間の線形な関係

Linear relationship between sequence reads and standard DNA concentrations in a single sample. Each sample has its own linear regression ($R^2 > 0.8$).

定量 eDNA メタバーコーディングと定量 PCR の結果
MiSeq sequencing with standard DNA quantifies eDNA conc. reasonably well

定量的eDNAメタバーコーディングの注意点

Caveats for quantitative eDNA metabarcoding

1. 標準 DNA を準備 (デザイン) しなければならない

Standard DNAs must be appropriately designed.

2. 投入する標準 DNA の濃度を予め決めなければならない

The concentrations of standard DNAs should be appropriately pre-determined.

3. 解読される配列のうちいくらかが標準 DNA に“喰われる”

A large proportion of generated sequences could be standard DNAs.

4. 実験室が標準 DNA に汚染される恐れがある

Standard DNAs could be a source of contamination.

その他の方法 | Other methods

1. Unique Molecular Identifier (UMI; 固有の分子識別子) を利用する方法 (Hoshino & Inagaki 2017; Hoshino et al. 2021)

Use of unique molecular identifier (UMI)

2. 定量 PCR などでのどのサンプルからも出てくる種の DNA を定量して補正する (Ushio et al. 2022 *bioRxiv*)

Estimate DNA concentrations based on DNA concentrations of “common” species that occurs all (or most) of samples.

3. Long-read sequencing による個体識別??

Identify individuals using long-read sequencing??

情報リソース | Information

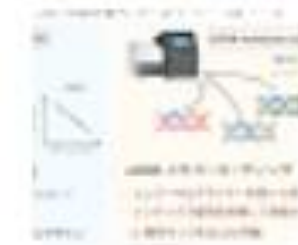
Ushio's blog

環境DNA・データ解析について書いてます | [My Weblog](#)

<https://ushio-ecology-blog.blogspot.com/>



Blogger



定量的な環境 DNA メタバーコーディング

公開済み・8月14日

ushio

0 486



phyloseq による DADA2 処理後の統計解析

公開済み・4月28日

ushio

0 277



核酸配列に基づかない微生物群集の分析方法

公開済み・2020/01/29

ushio

0 484

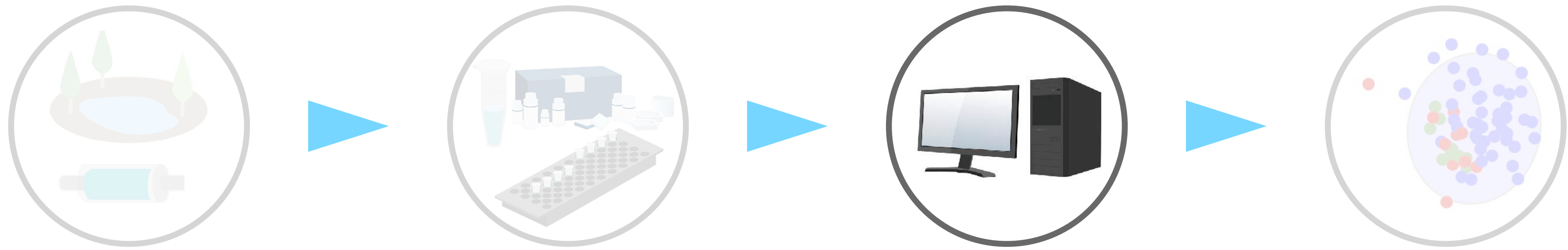


iSeq による環境サンプルのアンプリコンシーケンス...

公開済み・2020/08/01

ushio

0 826



配列解析

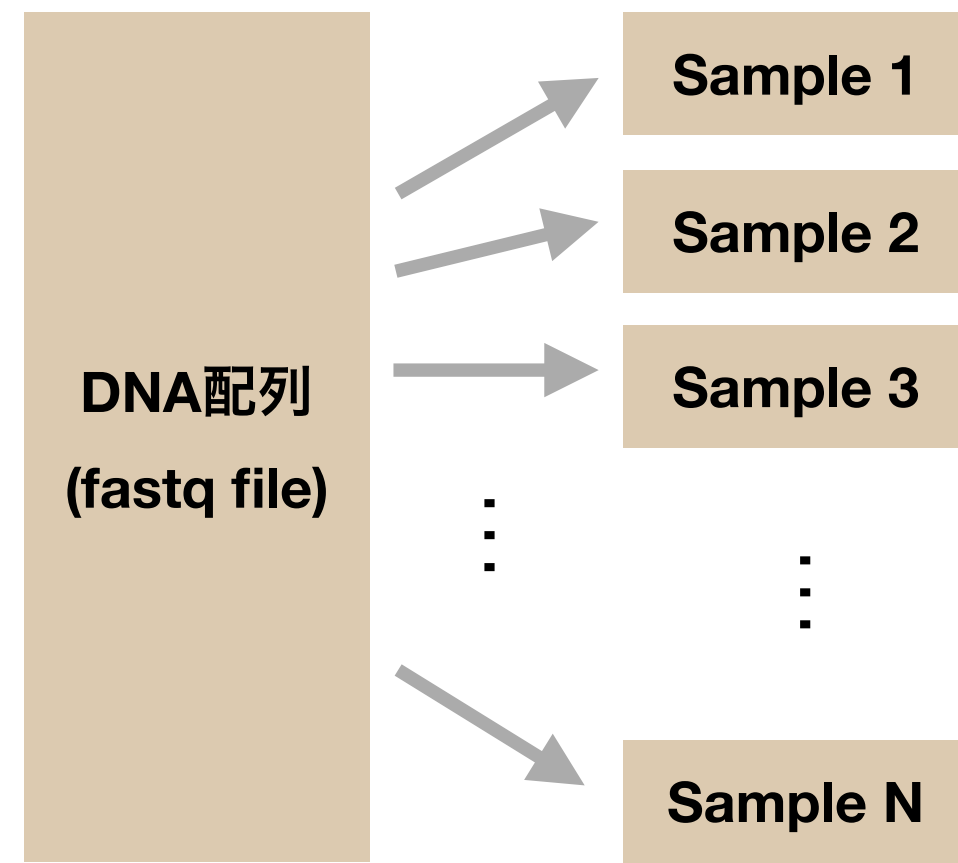
Sequence data analysis for eDNA metabarcoding

配列解析 | Sequence analysis

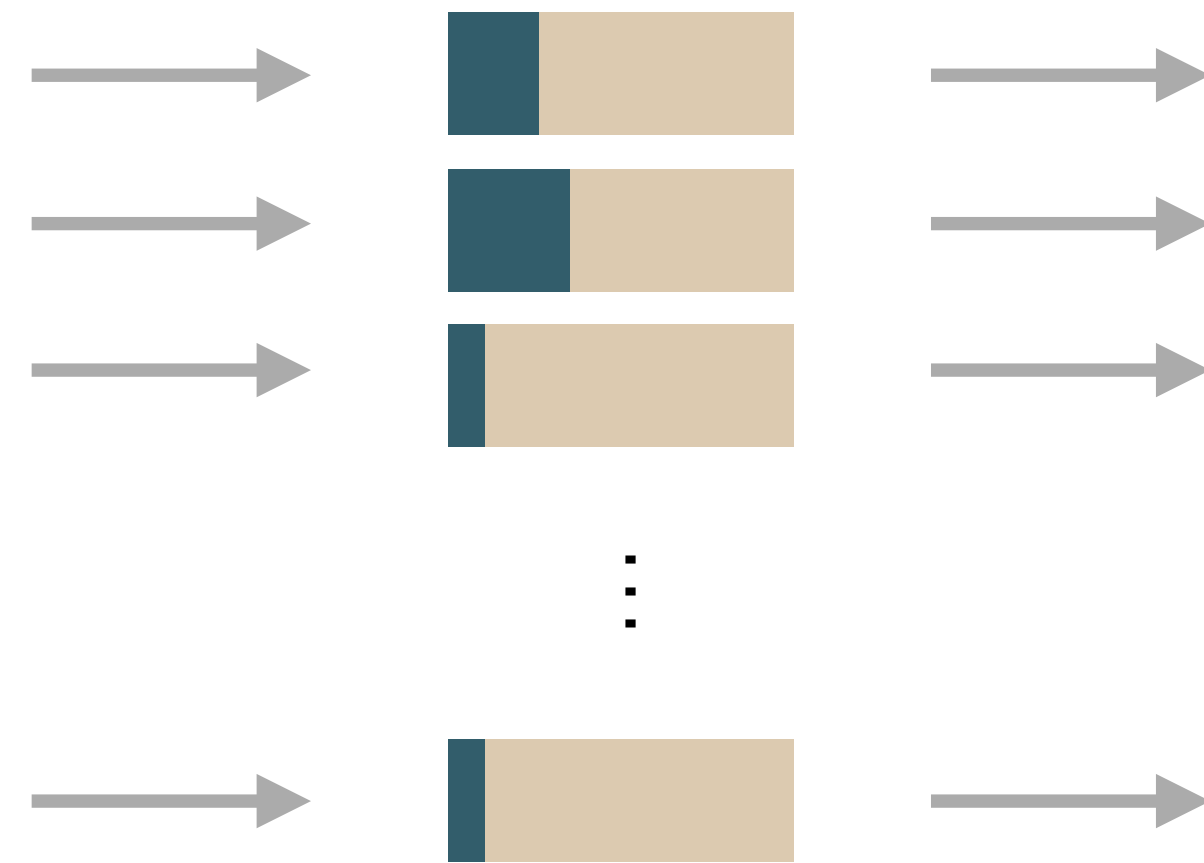
- 前処理 | Pre-processing
- デノイズ・クラスタリング | Denoising, Clustering
- 分類群推定 | Taxa assignment
- 後処理 | Post-processing

配列解析 | Sequence analysis

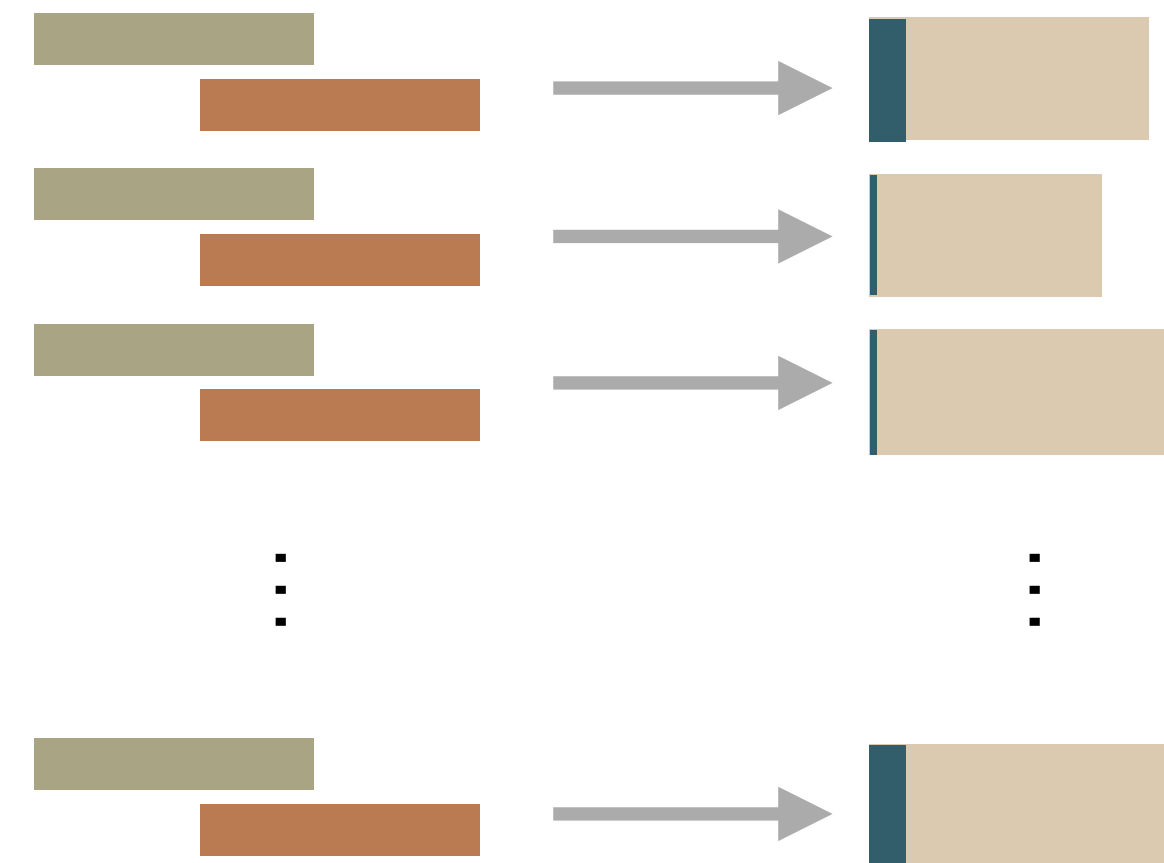
1. Demultiplex



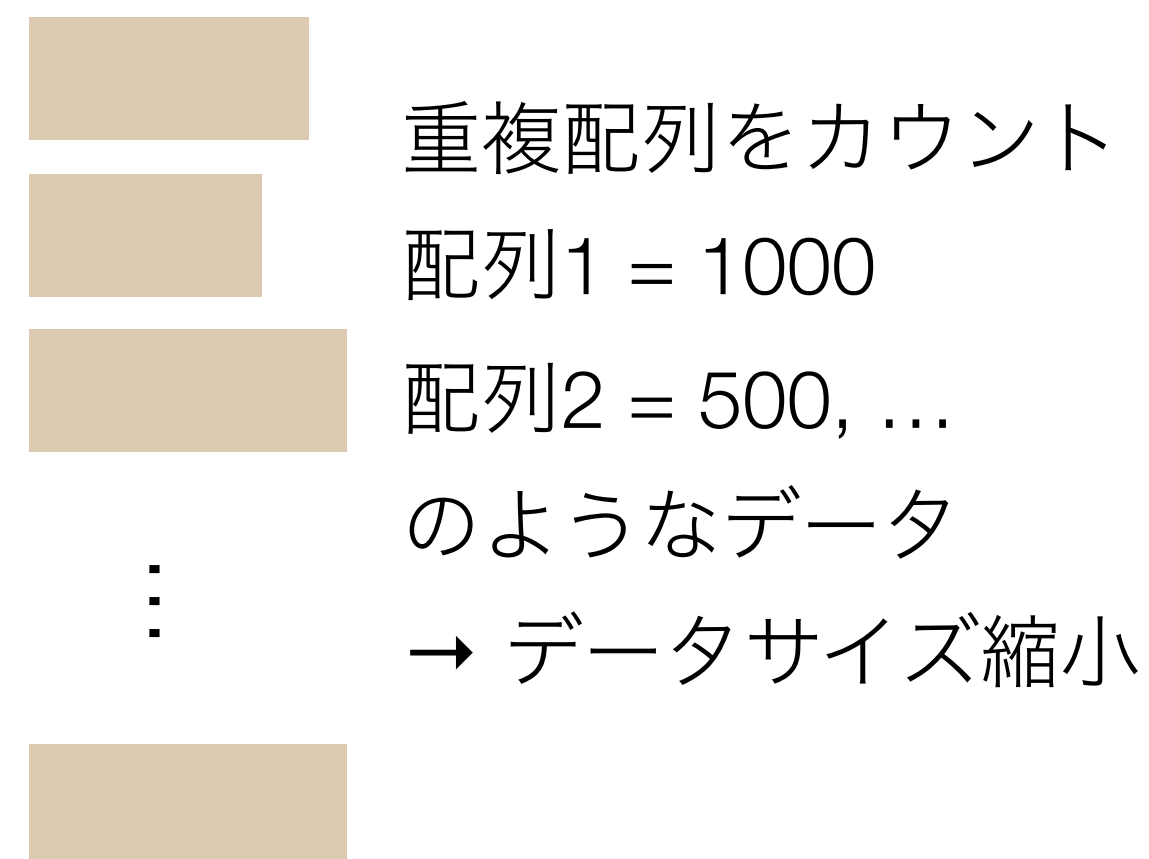
2. Quality filtering



3. Denoising, Merge paired-reads



4. Dereplication



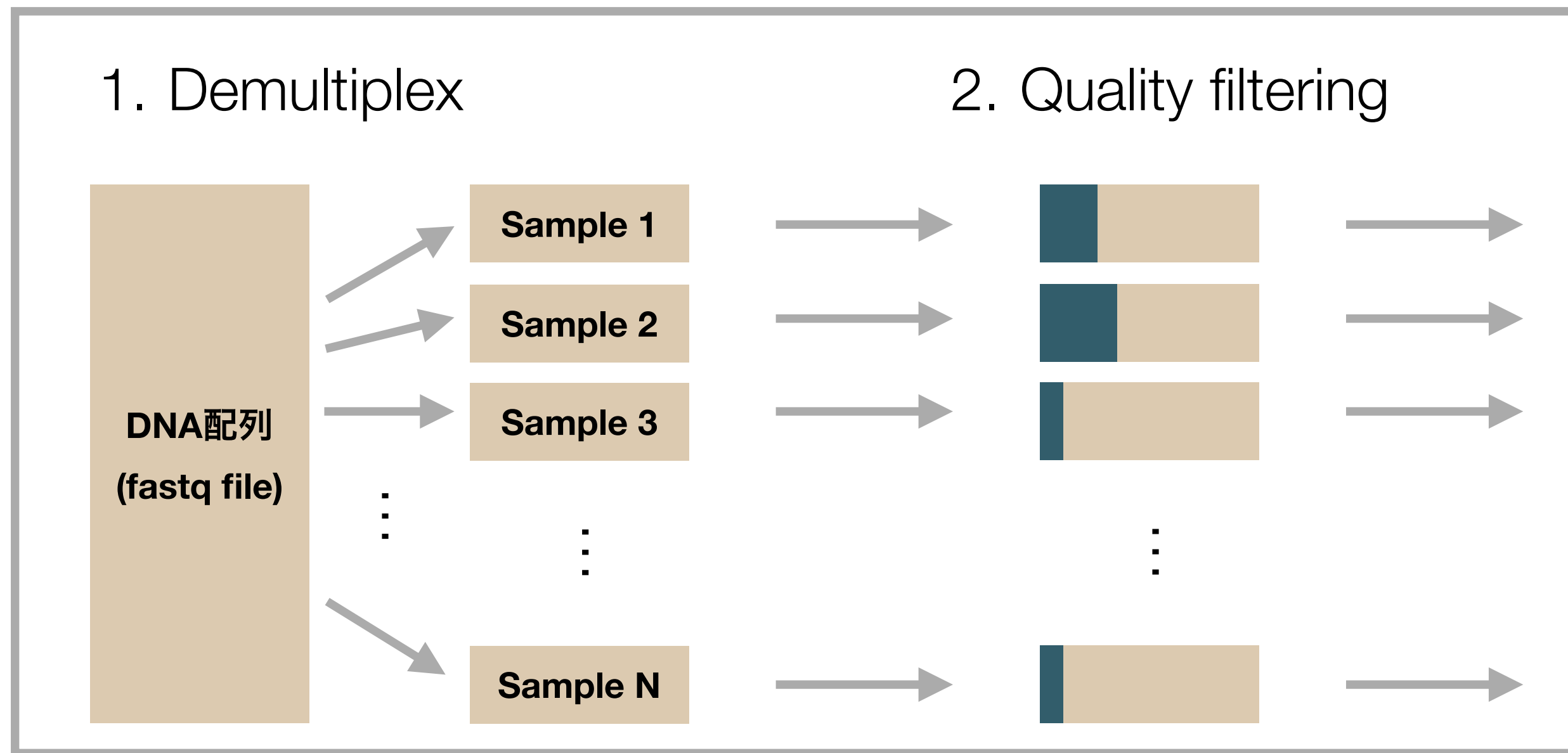
5. Remove chimera



6. Assign taxonomy

	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6
S1						
S2						
S3						
S4						
S5						
S6						
S7						
S7						

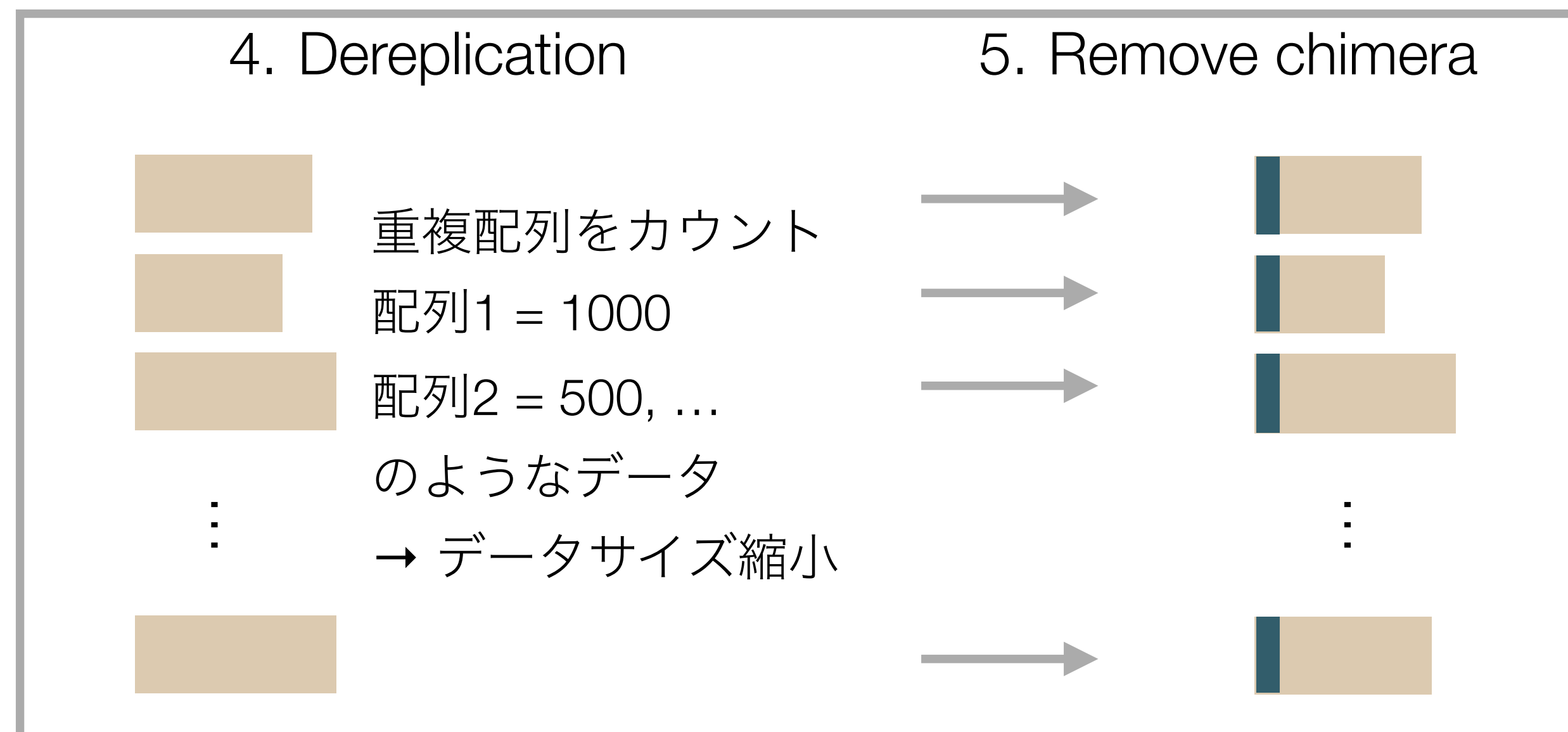
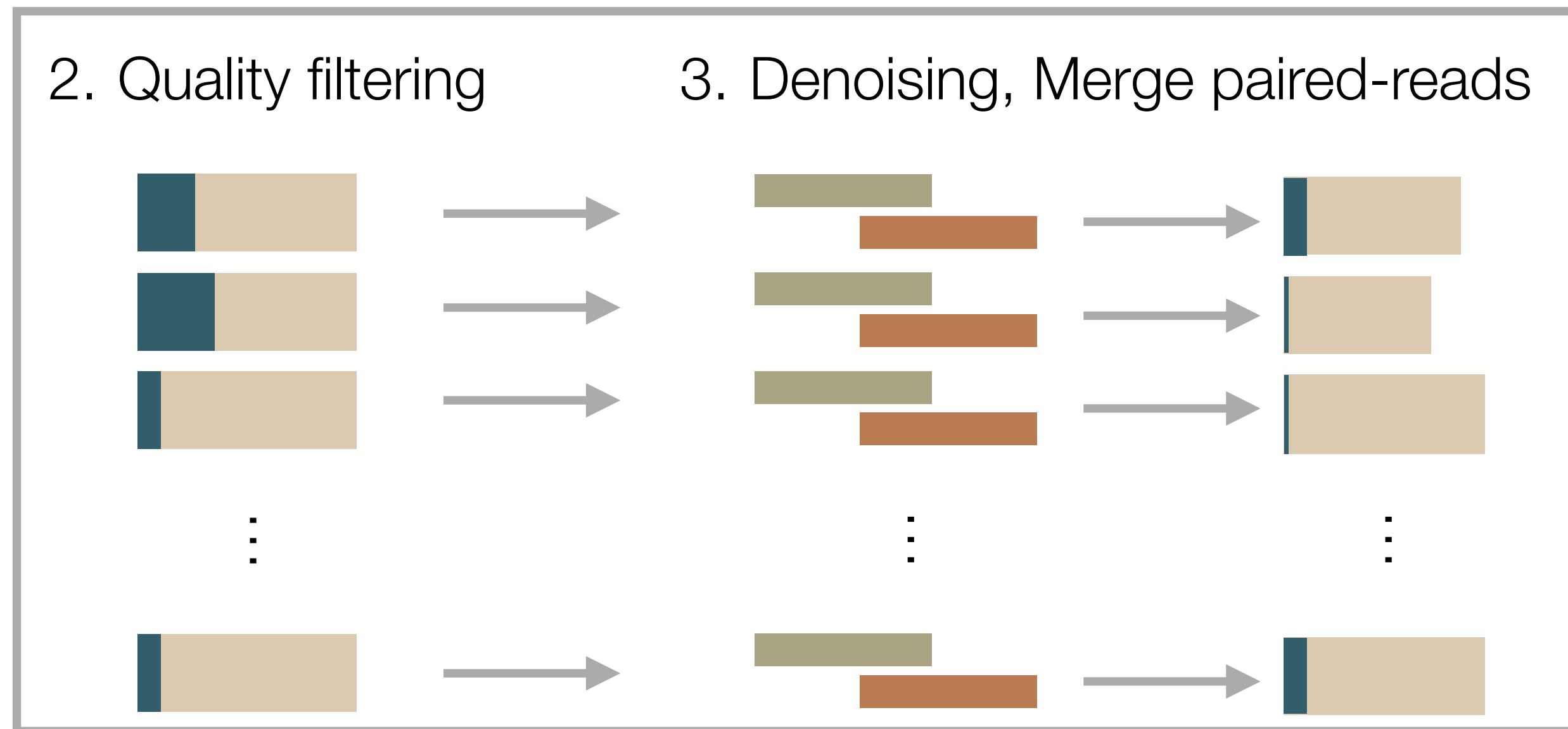
配列解析 | Sequence analysis



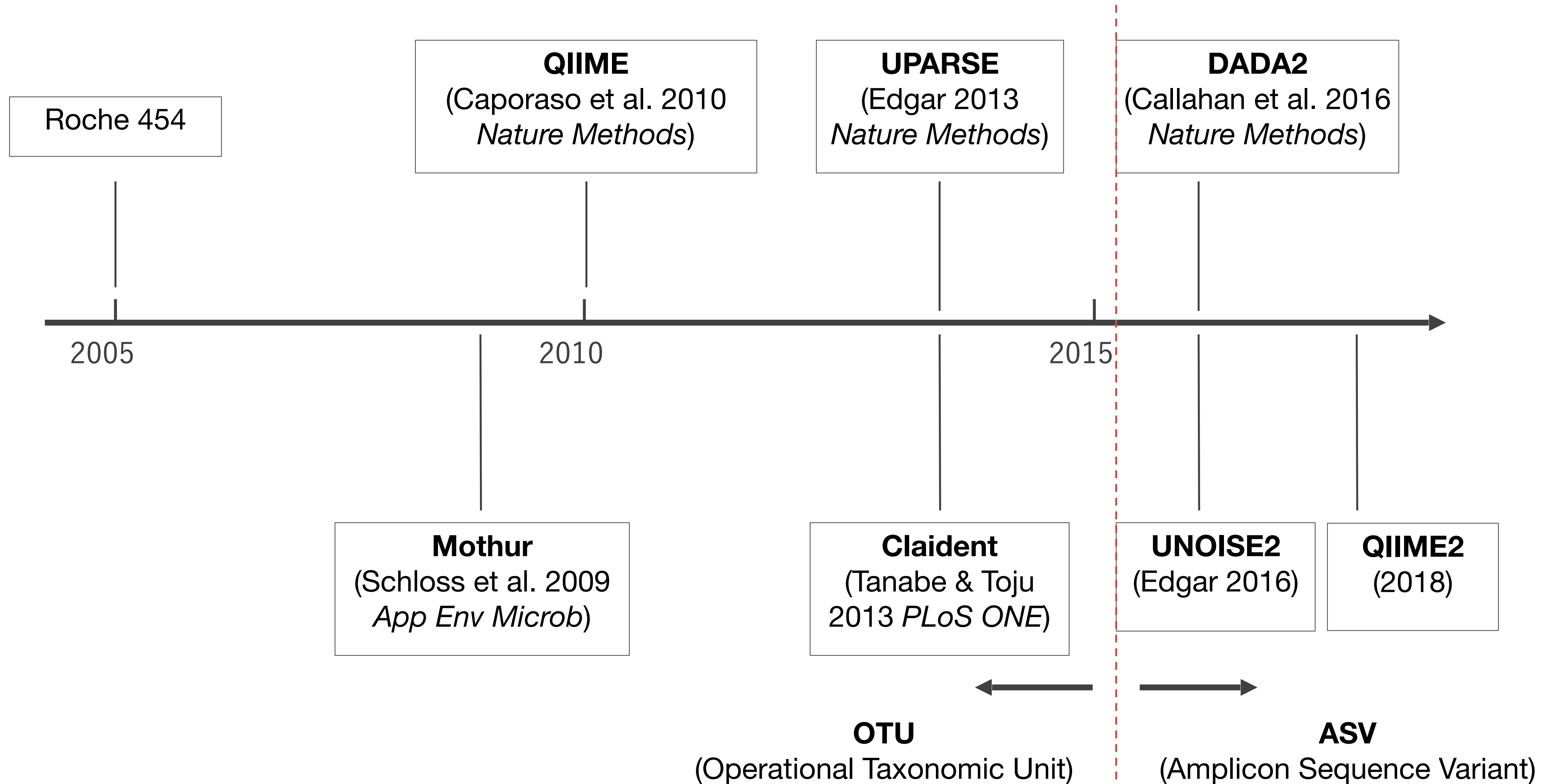
1. 通常、多数のサンプルを混ぜてシーケンスするので (multiplex)、配列をサンプルごとに振り分け直す作業が必要 (demultiplex)
2. イルミナシーケンサーの場合、Basespace というプラットフォーム内で自動で行われる
3. カスタムのライブラリを作った場合は自前で demultiplex. もしくは、cutadapt (Martin et al. 2011), Claident (Tanabe & Toju 2013) などを利用
4. Quality filtering は fastp (Chen et al. 2018) が便利

配列解析 | Sequence analysis

- 様々な解析方法が存在
- 現在、Amplicon Sequence Variant (ASV; Callahan et al. 2016 *Nature Methods*) という方法がメジャー

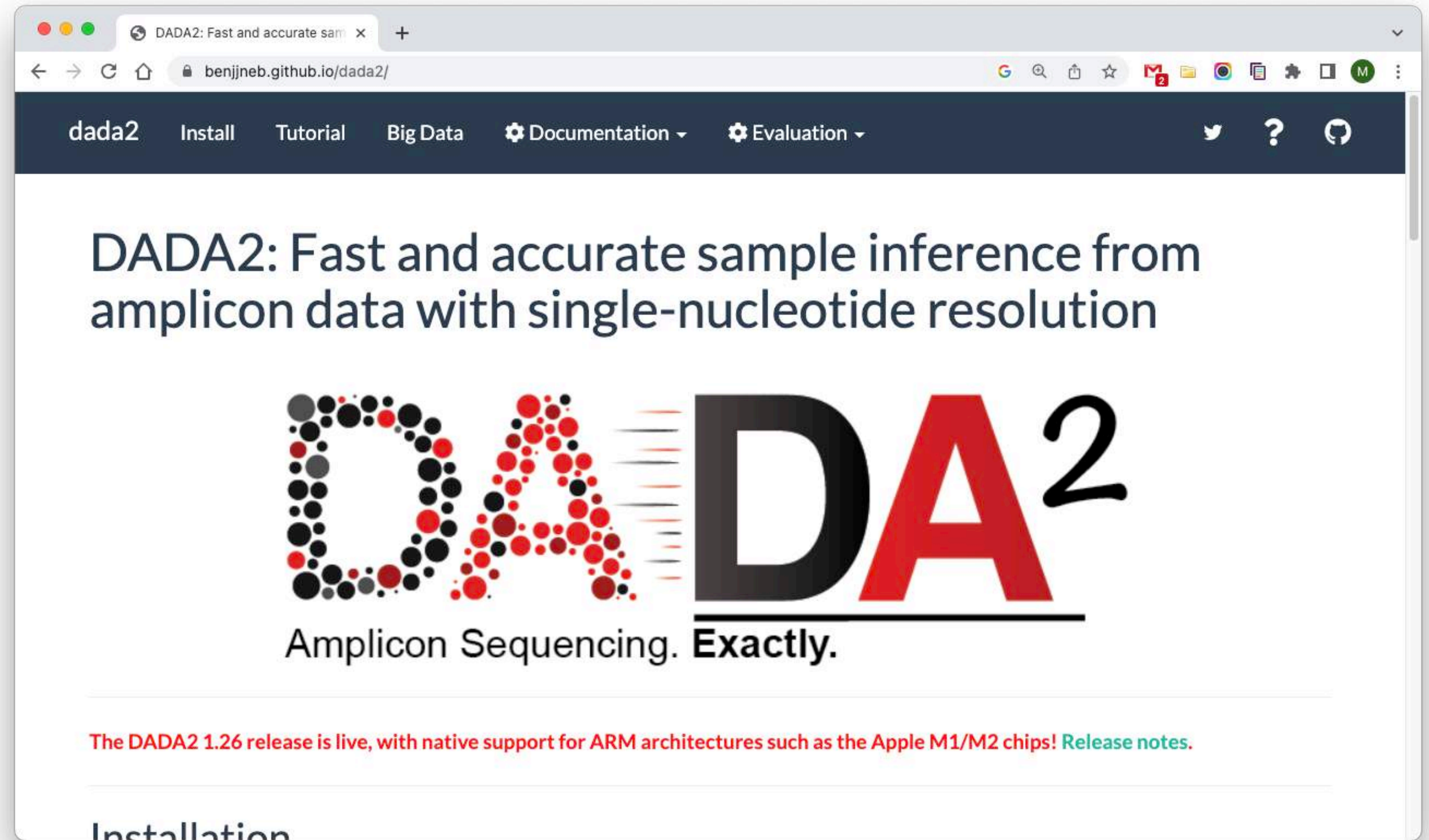


配列解析 | Sequence analysis



配列解析 | Sequence analysis

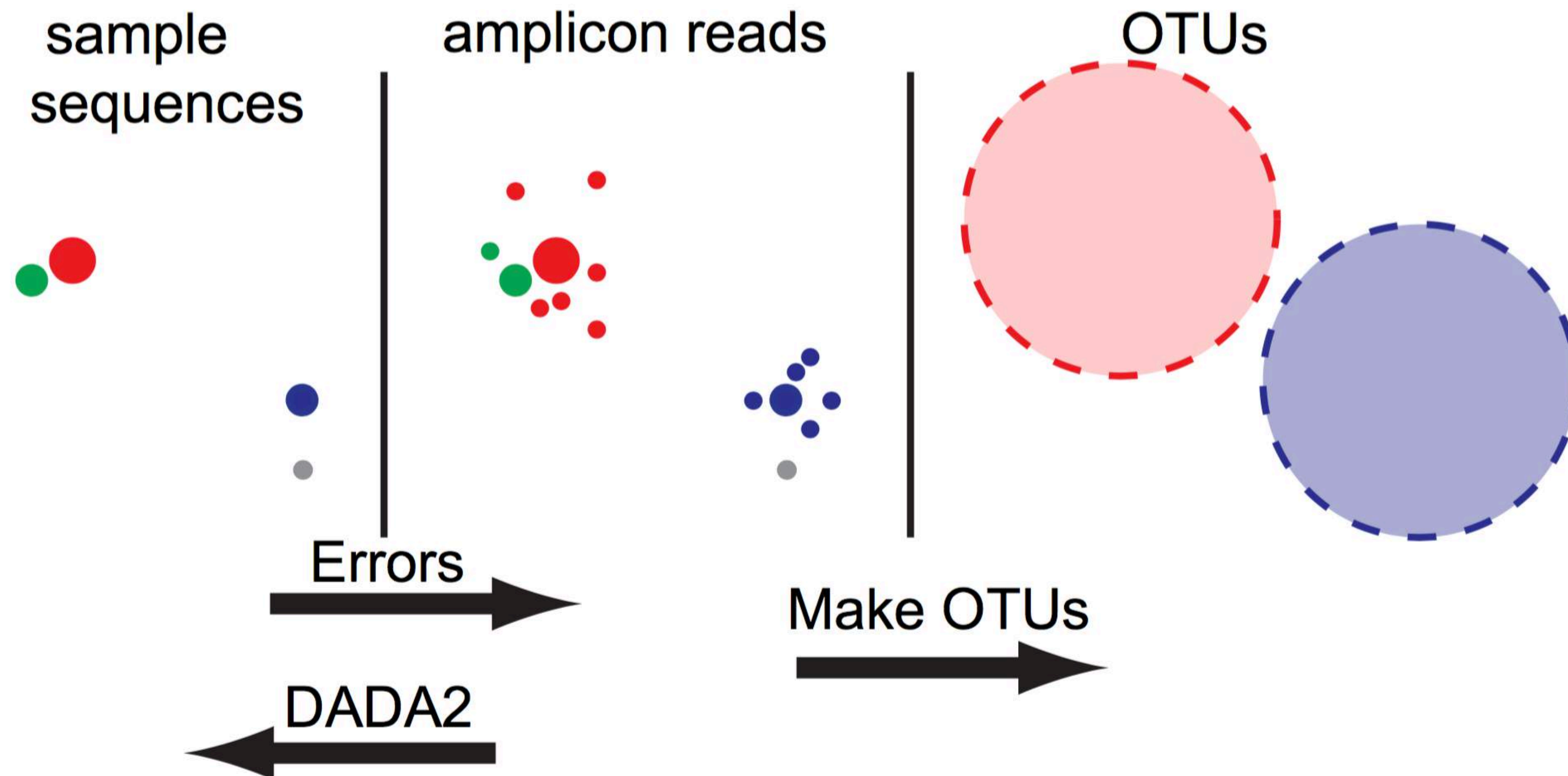
- DADA2 は dada2 という R のパッケージから利用可能 (<https://benjjneb.github.io/dada2/>)
- クオリティフィルタリング
- **デノイジング**
- 配列マージ
- キメラ除去
- 分類群の推定



デノイジング | Denoising

Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2)

DADA2 does not make OTU, but detect and correct errors.



デノイジング | Denoising

Error rate: λ_{ji} (e.g., 0.1%)

Sequence j : ATGCCCATGG



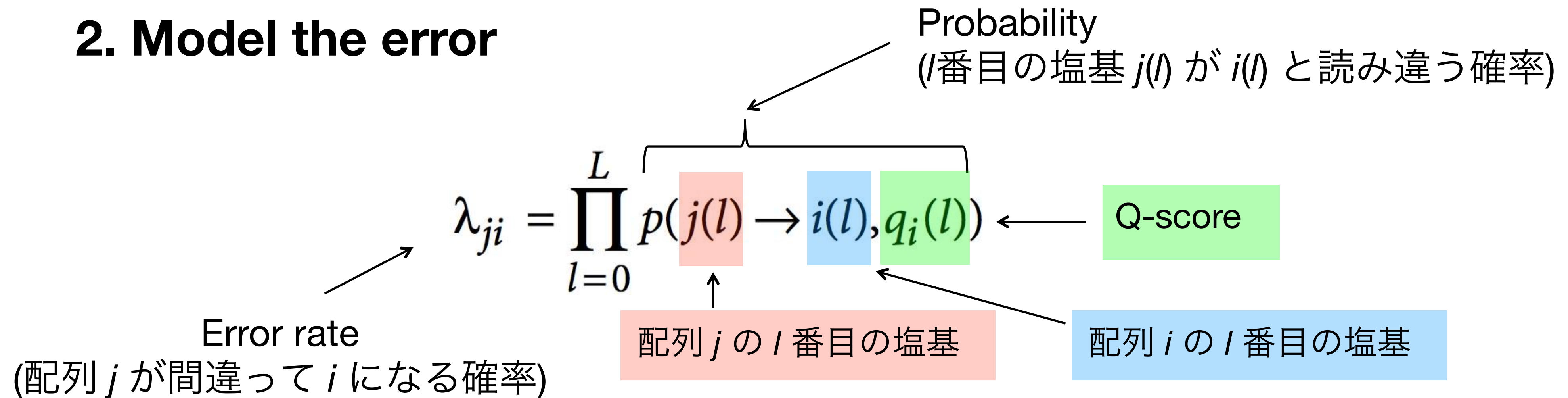
Sequence i : ATGCC**G**ATGG

1. Alignment

Sequence j : ATGCCCATGG

Sequence i : ATGCC**G**ATGG

2. Model the error



$$= p(A \rightarrow A, 99.9\%) \times p(T \rightarrow T, 99.9\%) \times \dots \times p(C \rightarrow \mathbf{G}, 90\%) \times \dots$$

デノイジング | Denoising

3. The abundance p-value

If sequencing errors are independent across reads, # of amplicon reads with sequence i that will be produced from sample sequence j is **Poisson distributed**.

$$p_A(j \rightarrow i) = \frac{1}{1 - \rho_{\text{pois}}(n_j \lambda_{ji}, 0)} \sum_{a=a_i}^{\infty} \rho_{\text{pois}}(n_j \lambda_{ji}, a)$$

P-value
(低い P 値 = 配列 j からのエラーで生成したと期待されるよりも多くの配列 i が存在した)

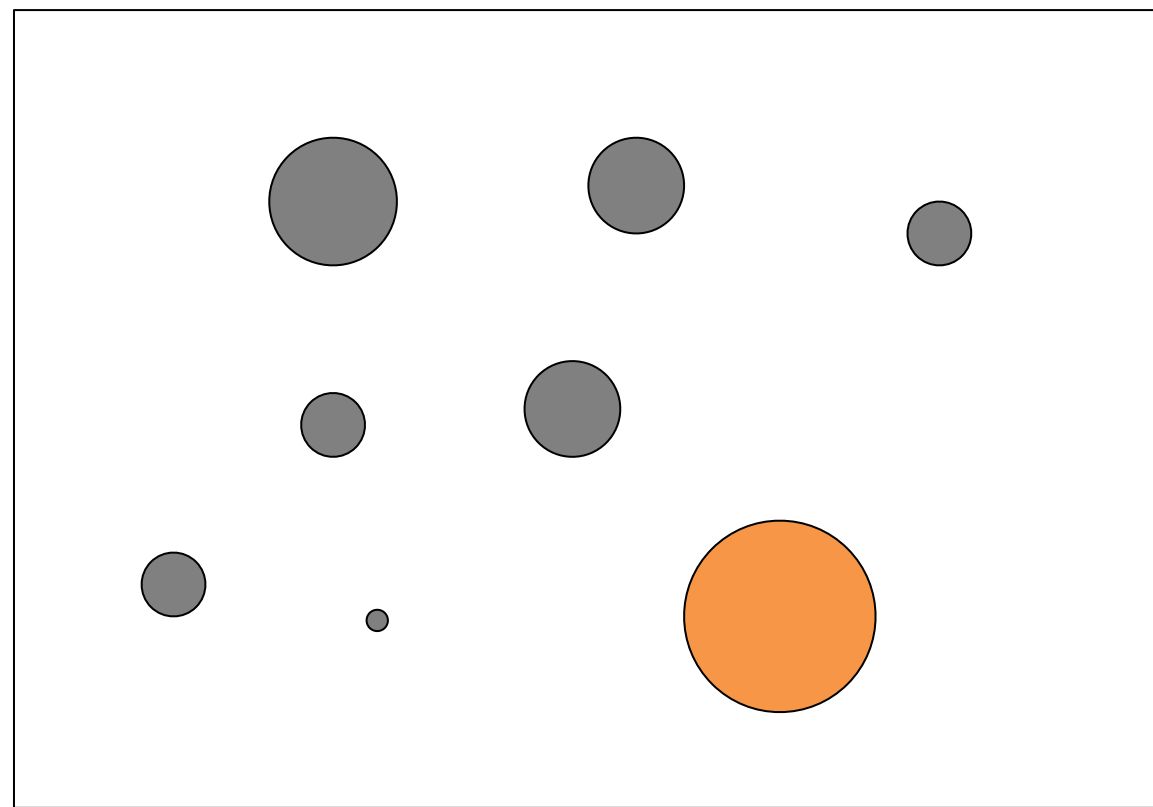
少なくとも 1 個以上観察された配列に限定して計算

ポアソン密度関数
(配列 j が n_j 個、エラー率 λ_{ji} のときに i が a 個以上生成される確率)

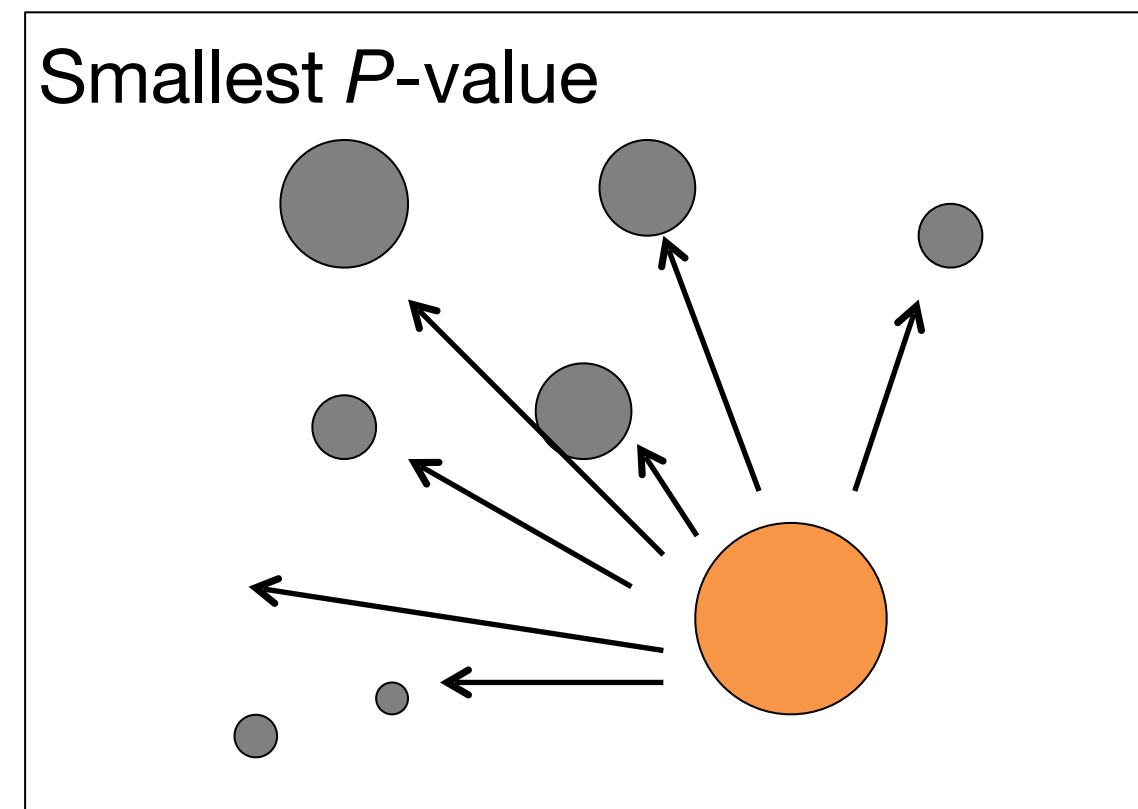
デノイジング | Denoising

4. The divisive partitioning algorithm

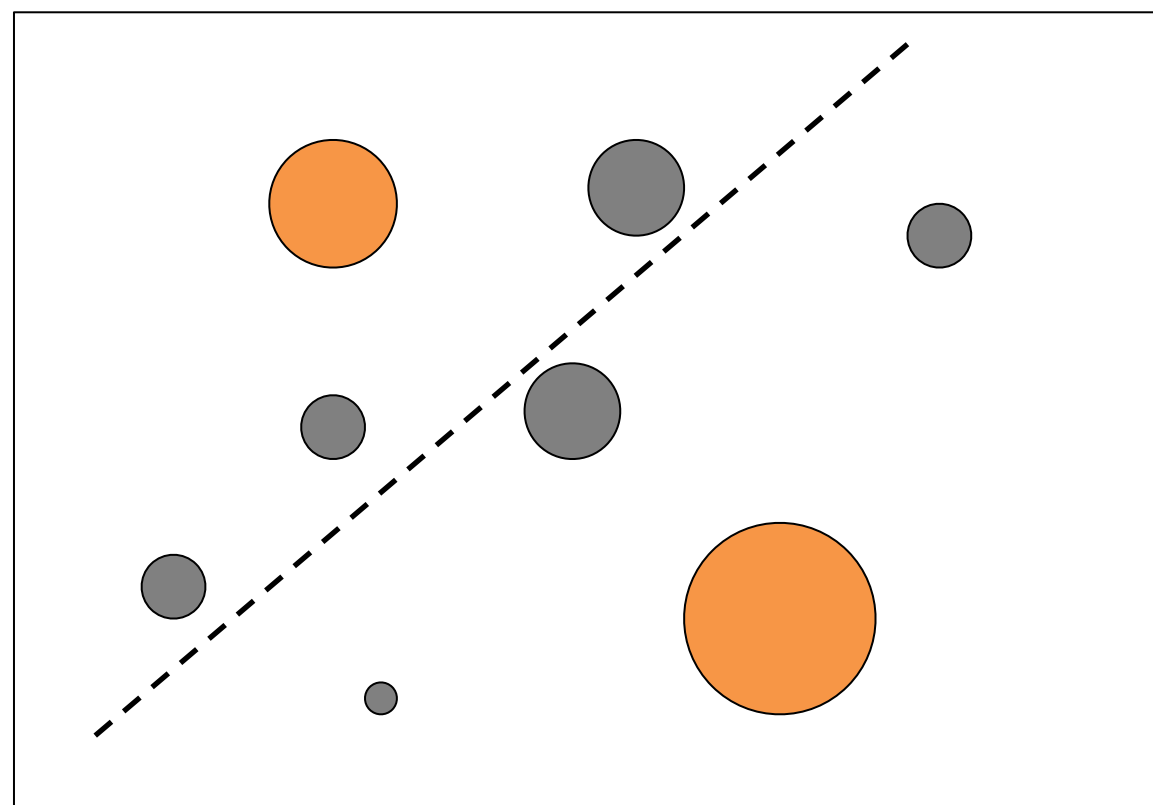
1. Put all seqs into a single partition



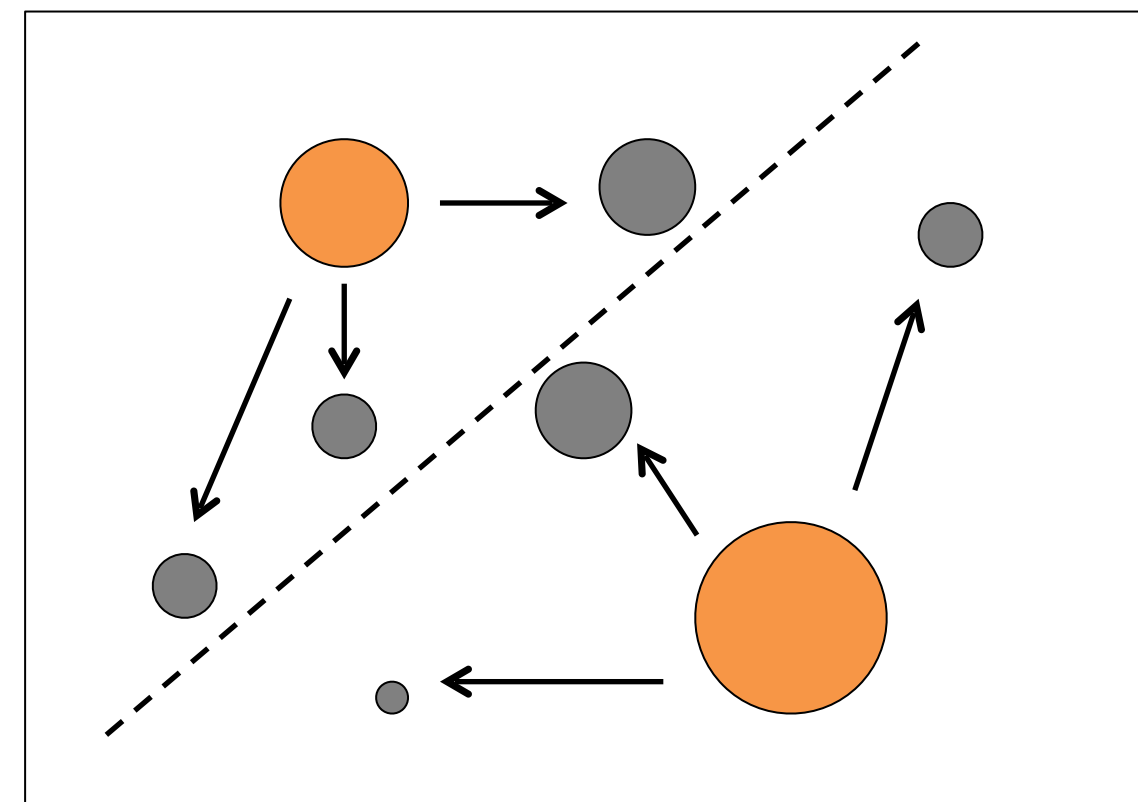
2. Calculate the abundance p-value



3. Make a new partition using a new center



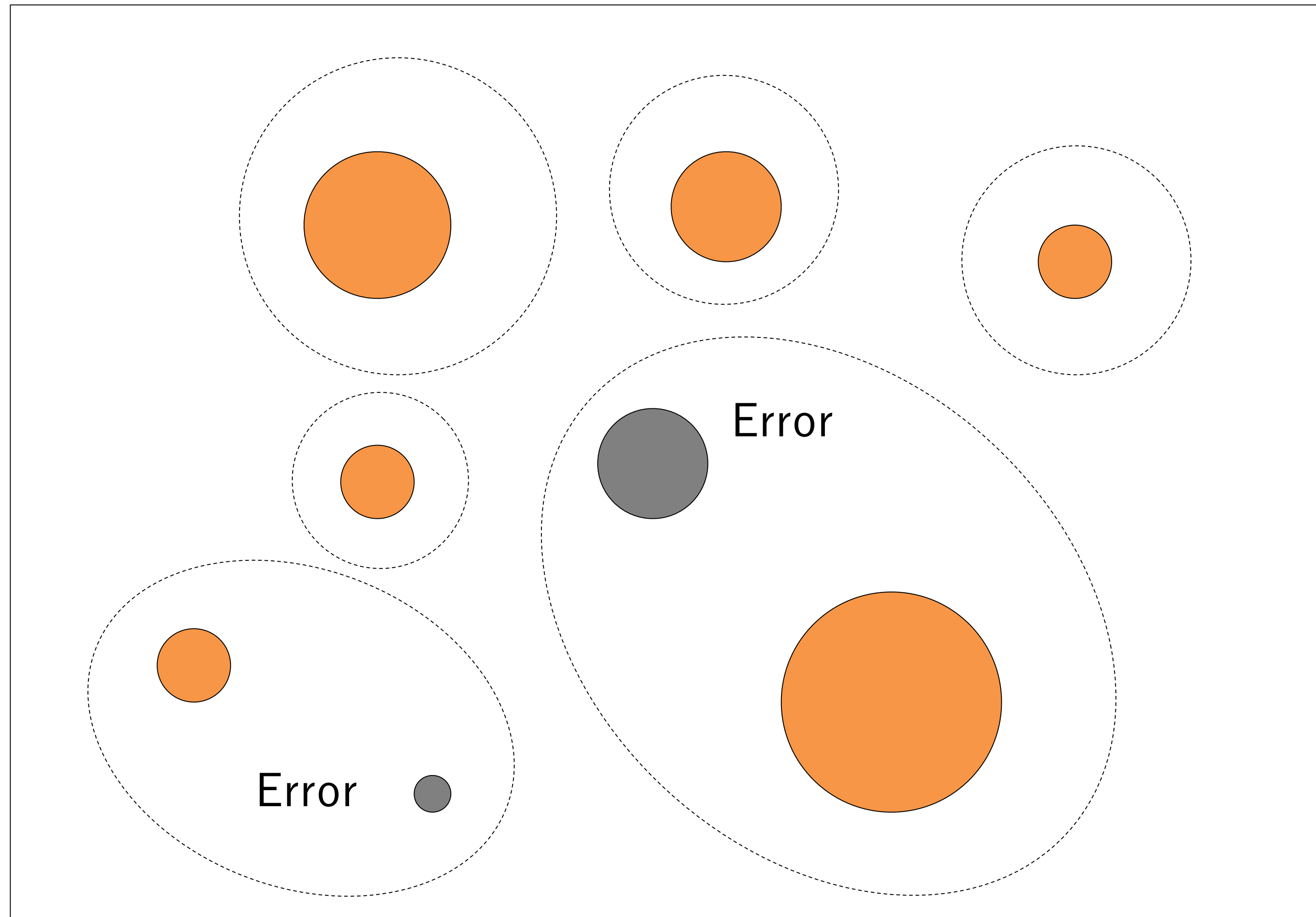
4. Calculate the abundance p-value



Iterate these processes until all P -values are larger than a predefined threshold

デノイジング | Denoising

4. The divisive partitioning algorithm

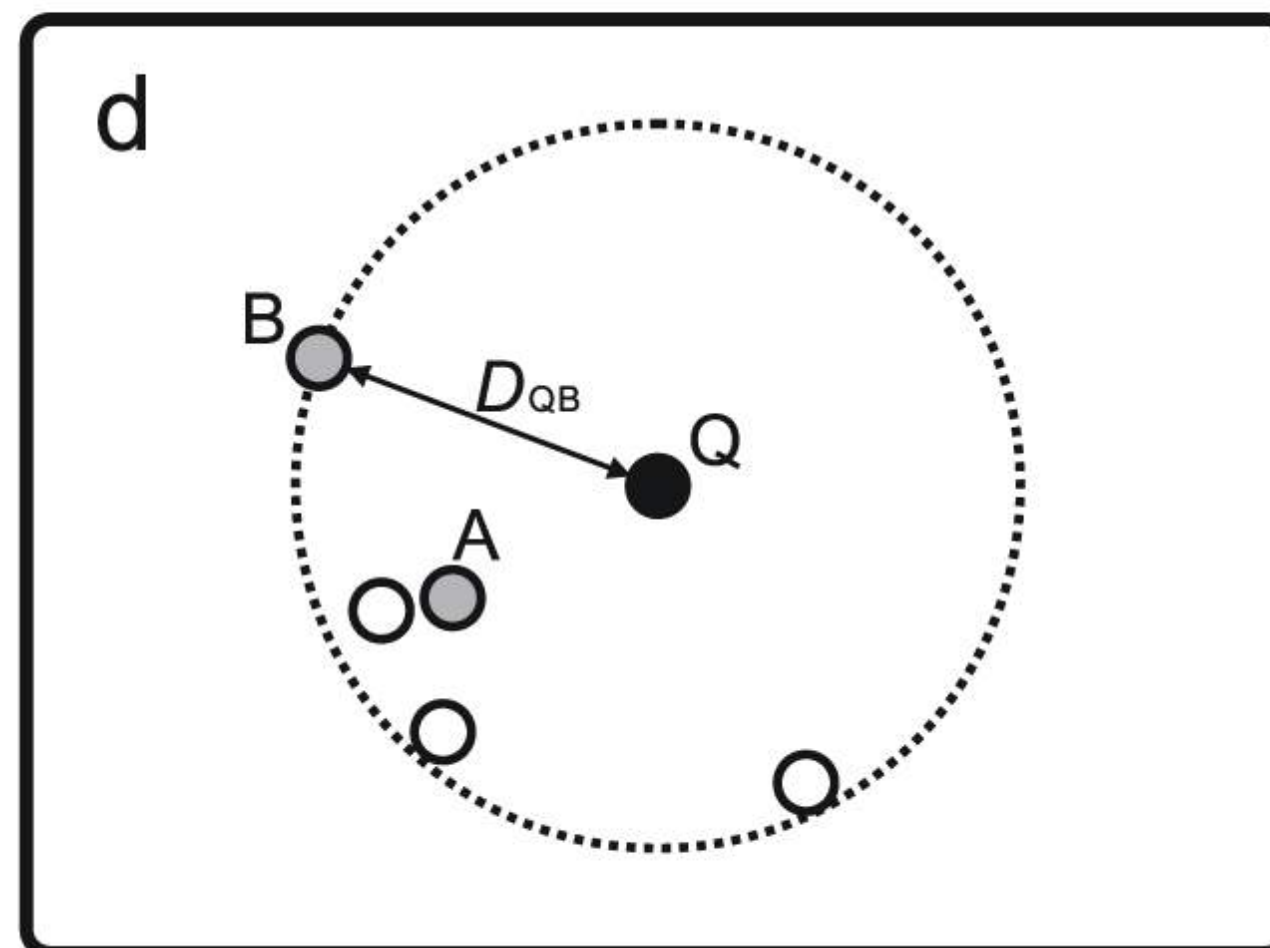
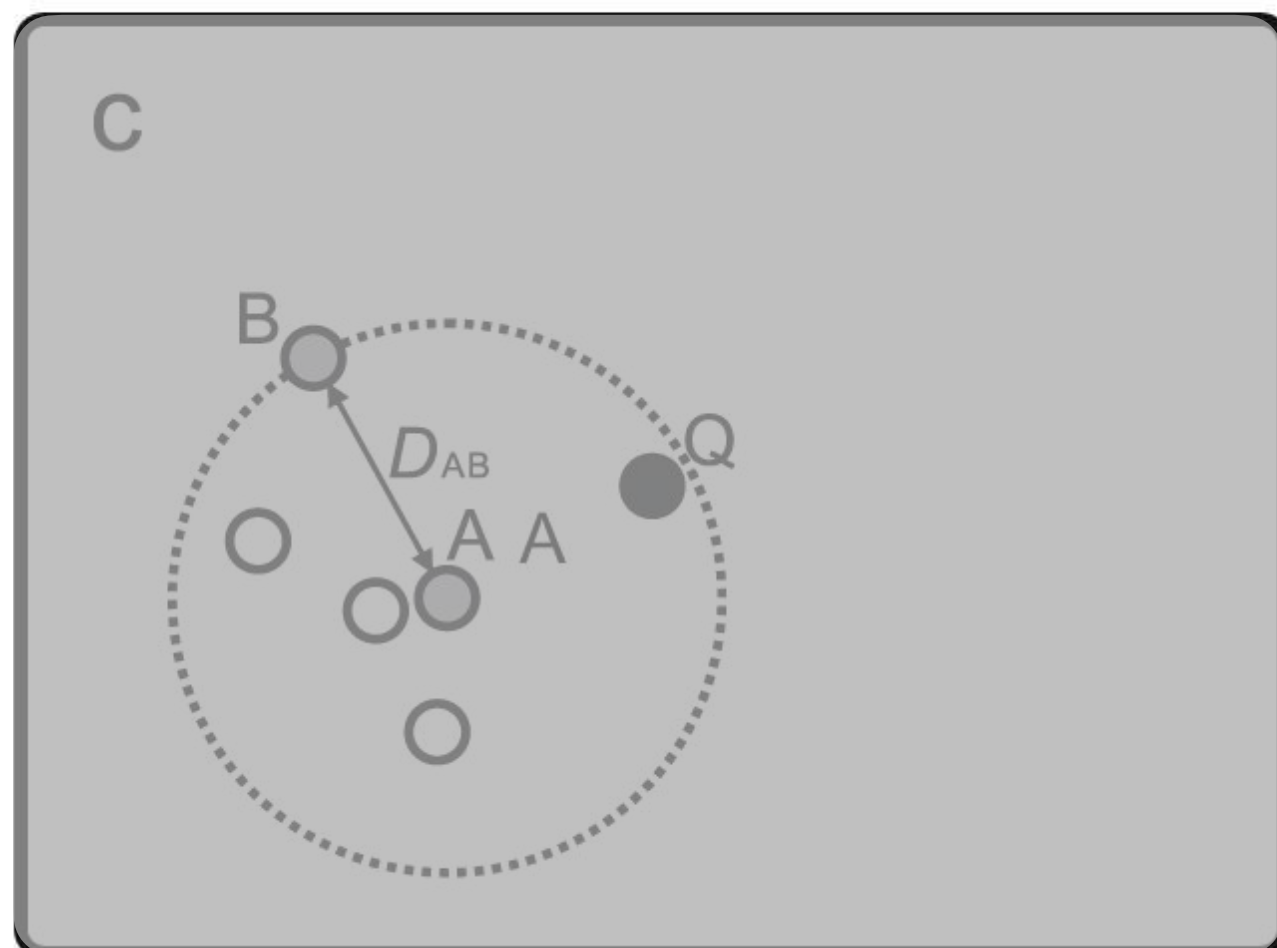
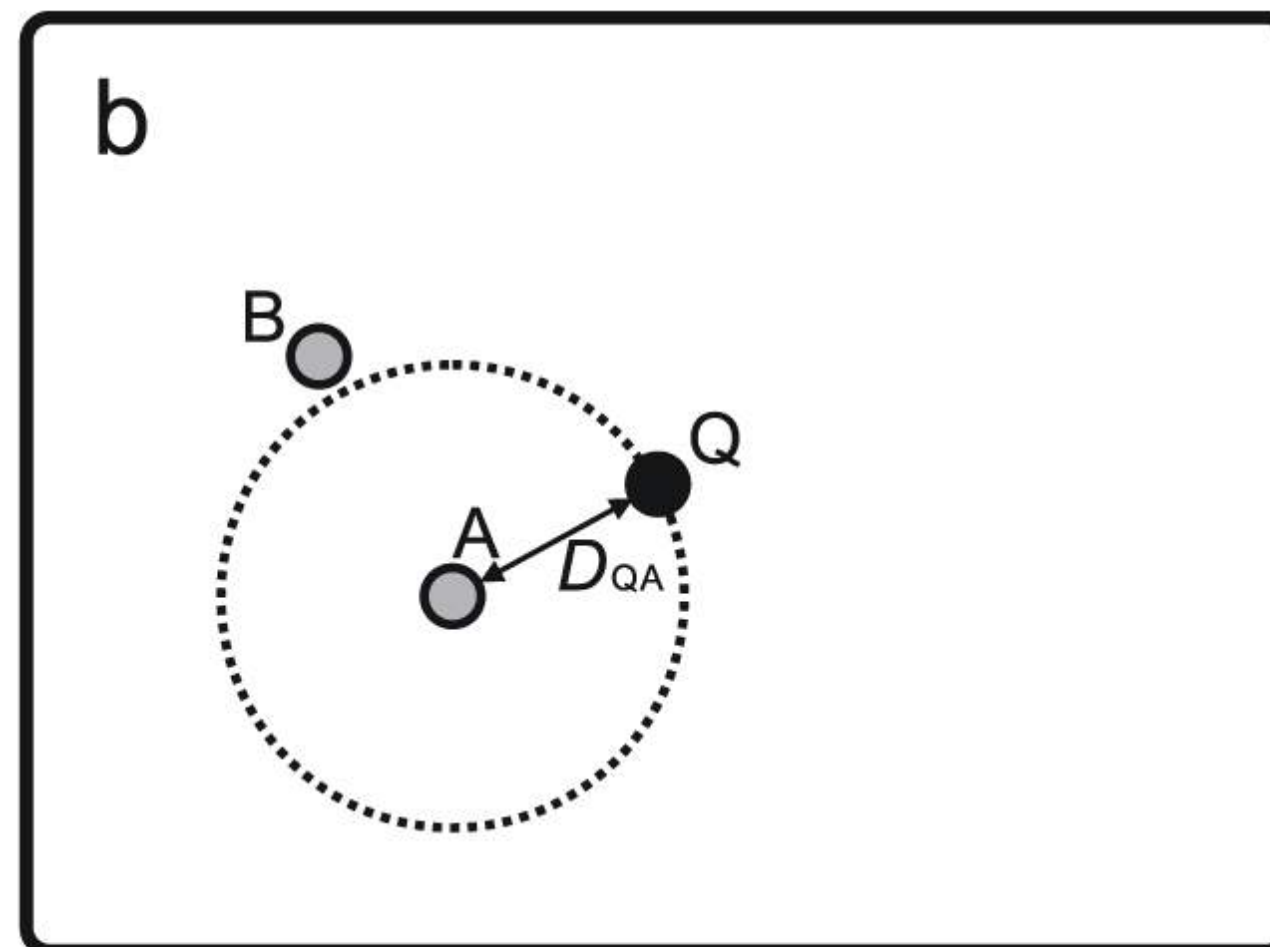
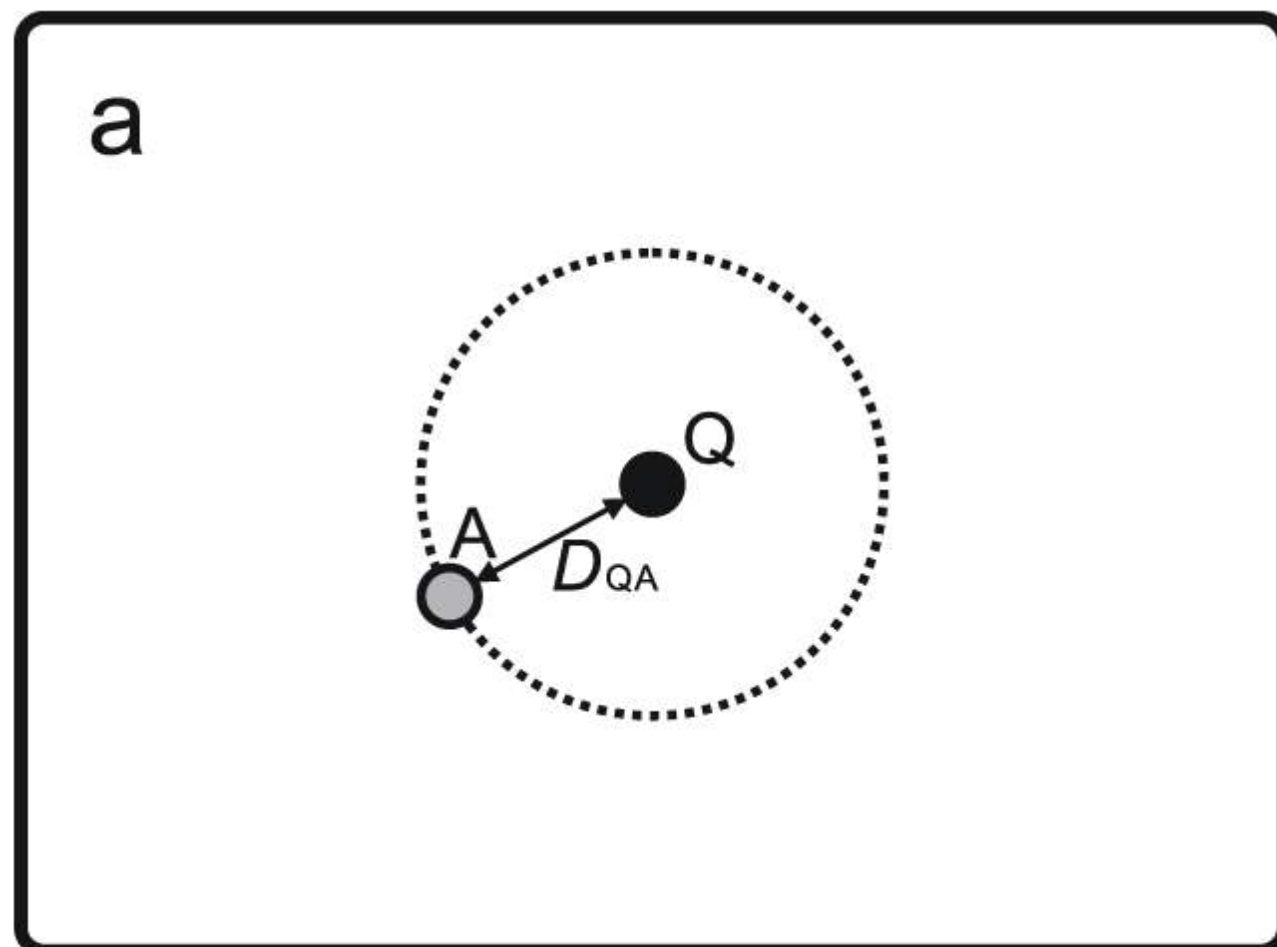


分類群推定 | Taxa assignment

- BLAST の top-hit に頼ると誤同定が生じやすい
- 特に、reference 配列が不足しているような分類群で問題
- (その生態系で出現する可能性がある生物が、データベース内で全て網羅されていれば top-hit でも可)

分類群推定 | Taxa assignment

Query-Centric auto-k-nearest neighbor (QCauto) method



Claident

<https://www.claident.org/>

○ 内の全ての配列が同じ分類群
(e.g., 同じ属名) であったときだけその名前を返す → 非常に低い偽陽性

後処理 | Post-processing

	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6
S1						
S2						
S3						
S4						
S5						
S6						
S7						
S7						

取得配列数



せっかく OTU/ASV テーブルができたのに、サンプルごとに取得配列数が大きくばらつく...

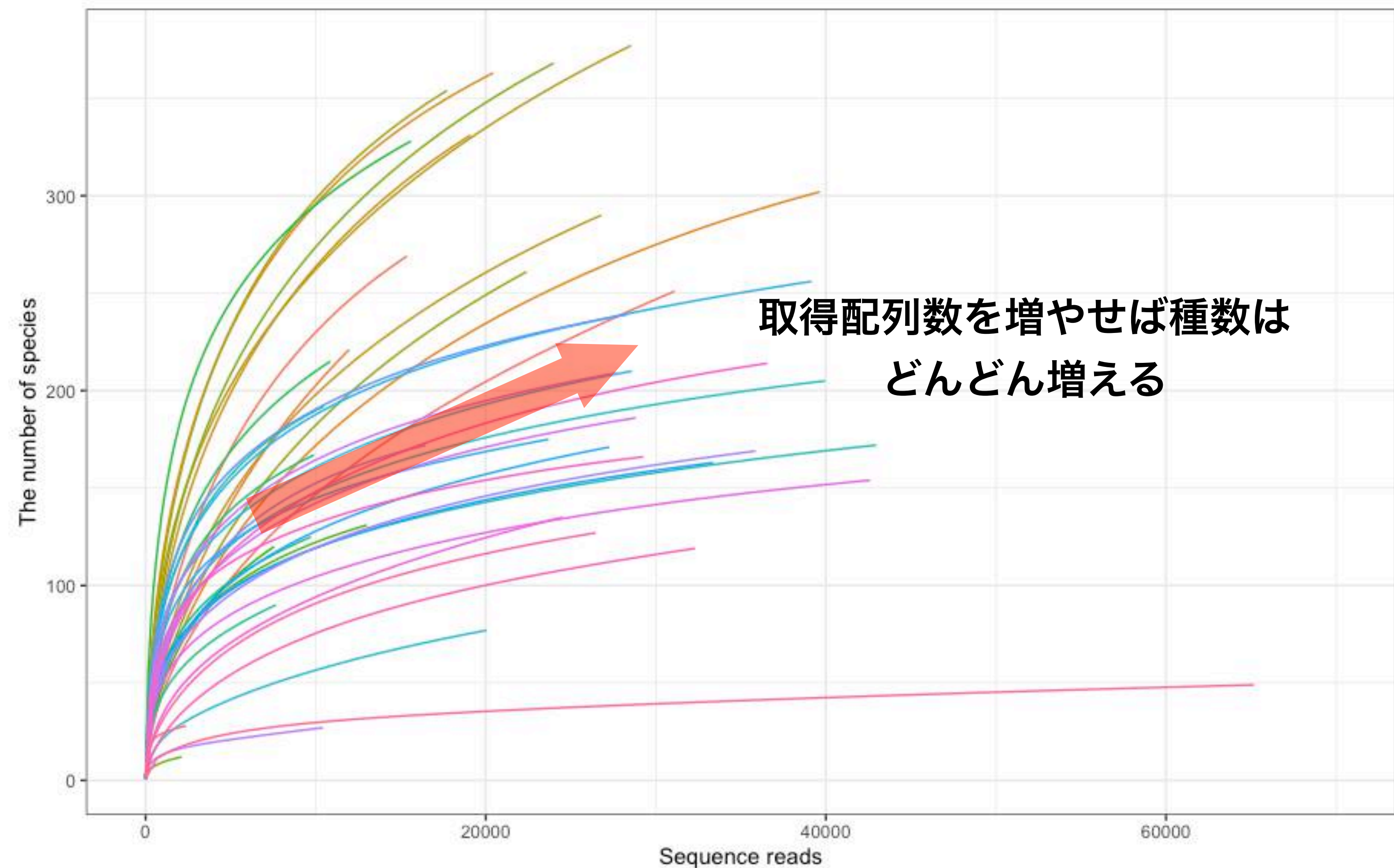
- サンプルごとに取得配列数がばらついてしまった
- 相対優占度 (%) にすれば群集組成の比較はできるかも？
- 多様性 (検出種数) は？ 取得配列数 = 調査努力量

後処理 | Post-processing

Coverage-based rarefaction

Chao et al. (2014) *Ecological Monographs*

多様性比較の際に問題となる
シーケンス深度の補正



後処理 | Post-processing

Coverage-based rarefaction

Chao et al. (2014) *Ecological Monographs*

多様性比較の際に問題となる
シーケンス深度の補正

同じカバレッジ (= 傾き) の点で
そろえる

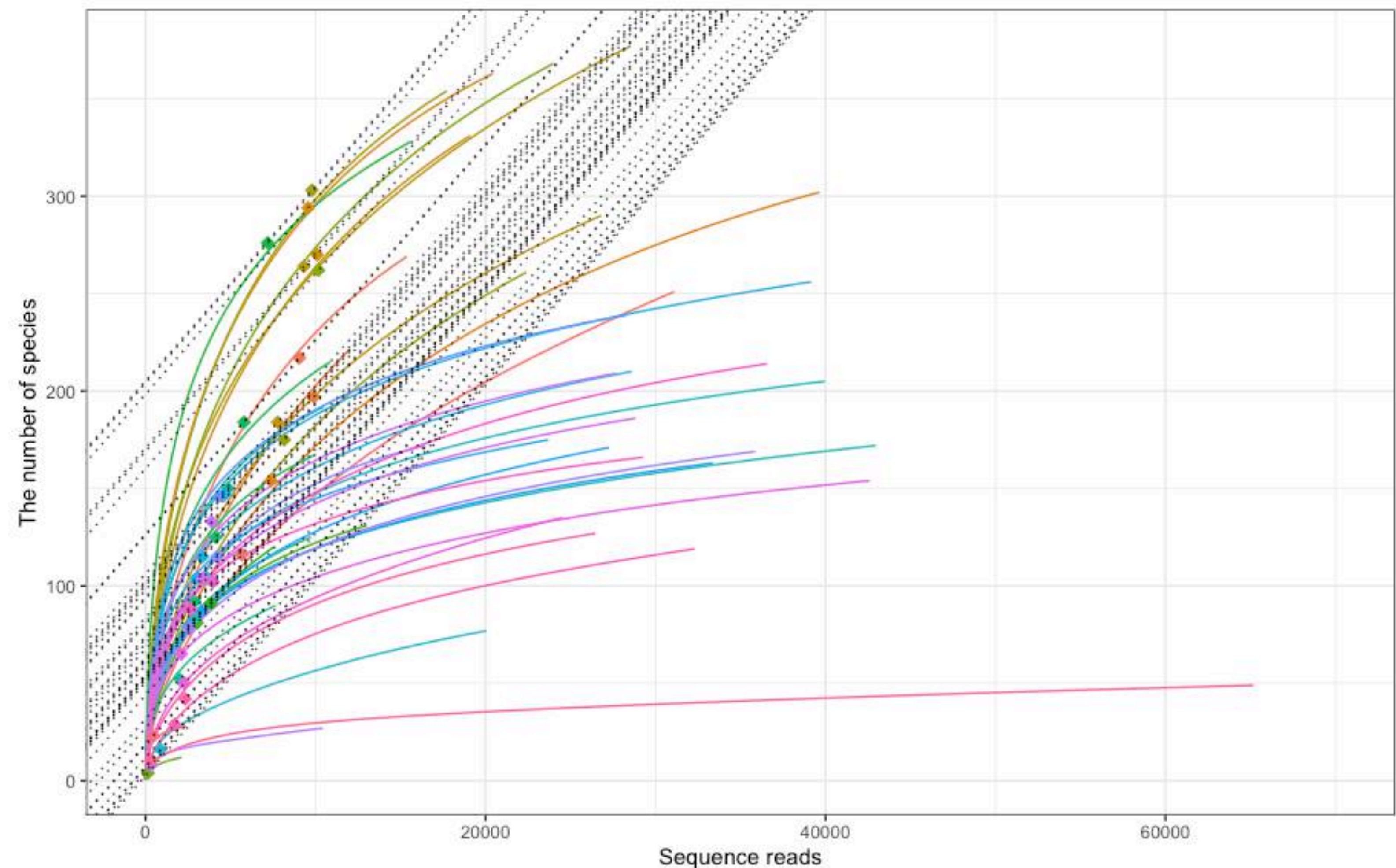
なぜ傾き? →

傾き = (増えた種数)/(取得配列)

0.01 = 1/100 →

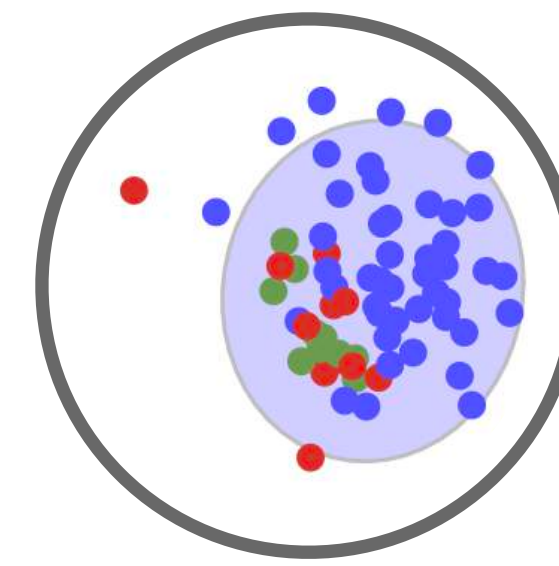
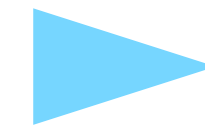
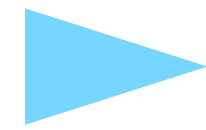
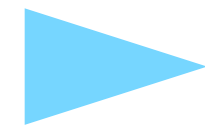
100 配列とると 99 配列既知 →

99% のカバレッジ



その他の情報 | Other information

1. 他の ASV パイプライン: Deblur (Amir et al. 2017), UNOISE3 (<https://www.drive5.com/>)
2. MiFish 特化のウェブ解析パイプライン (Sato et al. 2018; <http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/mifish/>)



統計解析

Sequence data analysis

統計解析 | Statistical analysis

- “phyloseq” | “phyloseq”
- 多様性比較 | Comparing diversity
- 次元圧縮 | Dimension reduction
- 統計モデリング | Statistical modeling

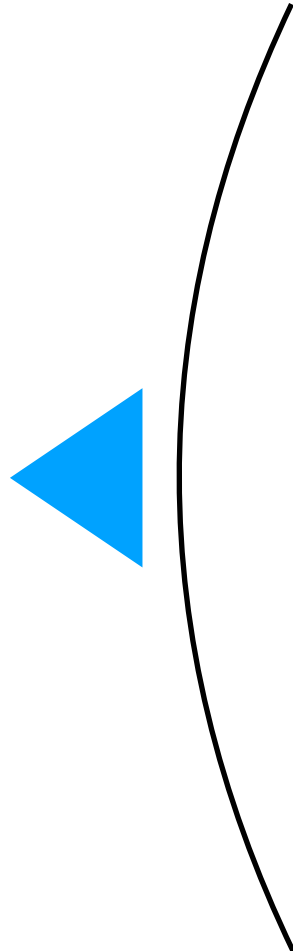
環境 DNA データの構造

分類群情報

	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6
Family						
Genus						
Species						

サンプル情報

	Site	Date	pH
S1			
S2			
S3			
S4			
S5			
S6			



	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6
S1						
S2						
S3						
S4						
S5						
S6						

群集行列

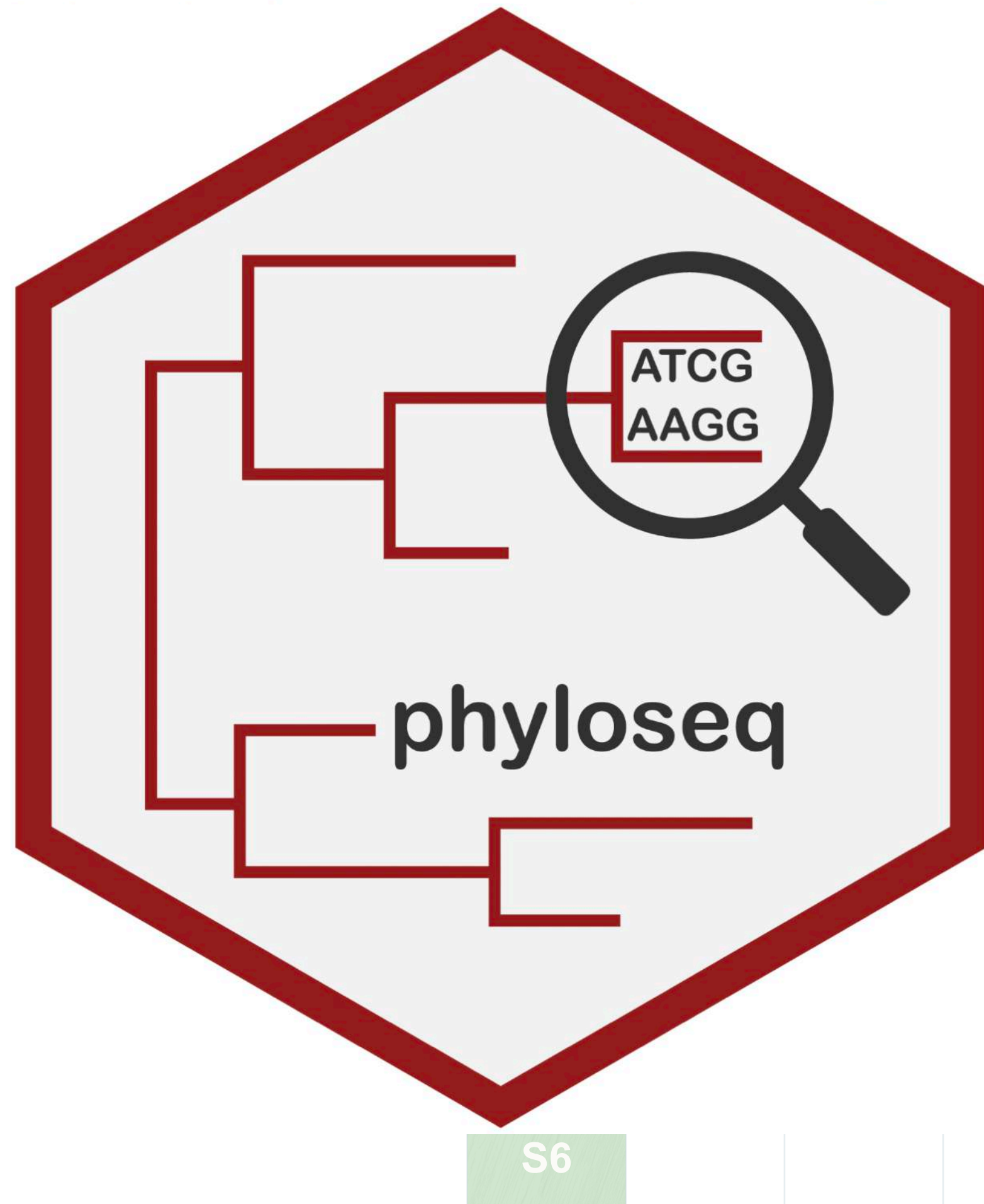


phyloseq

群集行列 + サンプル情報 + 分類群情報を統一的に扱うための R パッケージ

McMurdle & Holmes (2013) *PLoS ONE*

phyloseq: Explore microbiome profiles using R



分類群情報

	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6
Family						
Genus						
Species						

	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6
S1						
S2						
S3						
S4						
S5						
S6						

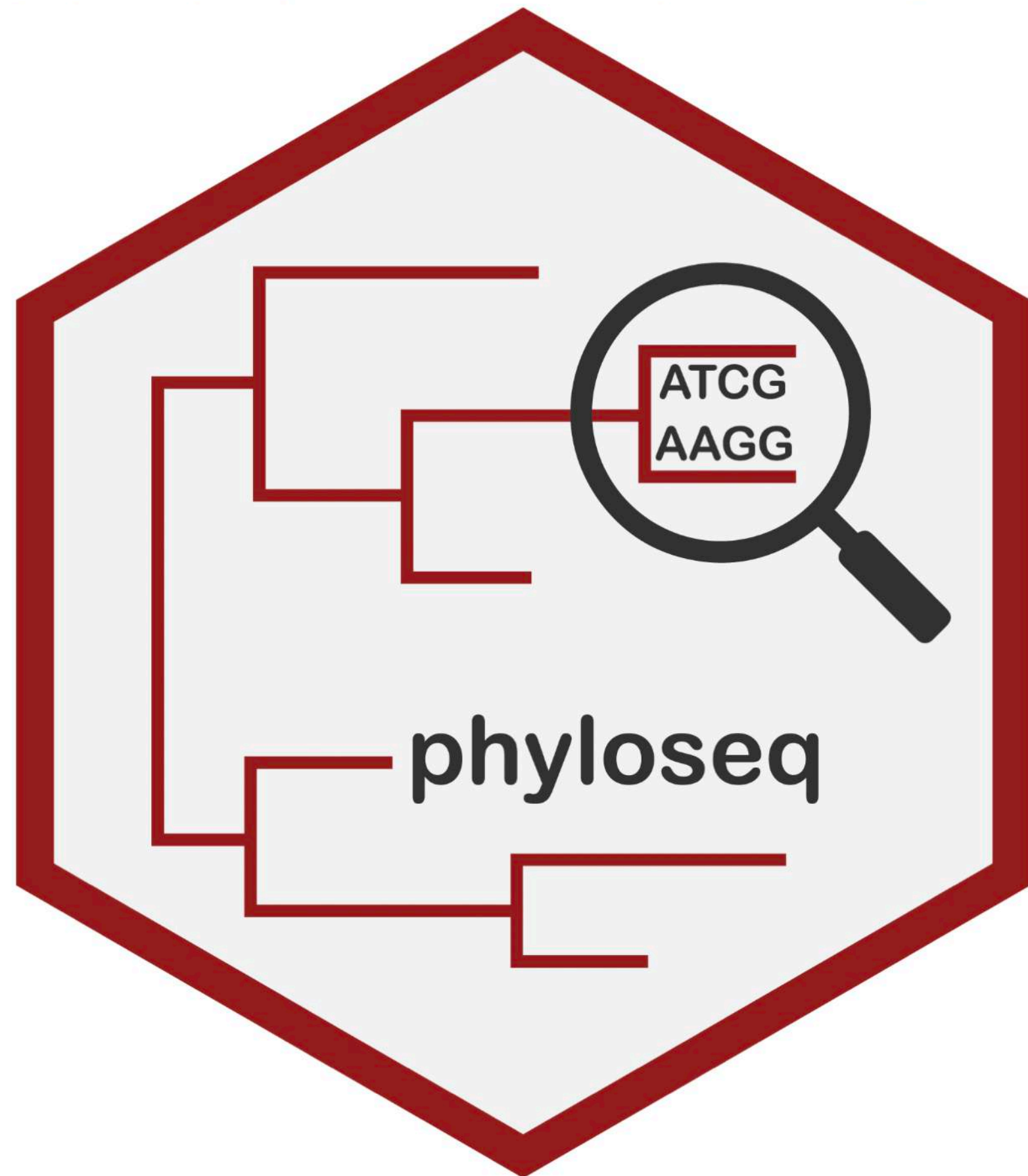
群集行列

phyloseq

群集行列 + サンプル情報 + 分類群情報を統一的に扱うための R パッケージ

McMurdle & Holmes (2013) *PLoS ONE*

phyloseq: Explore microbiome profiles using R



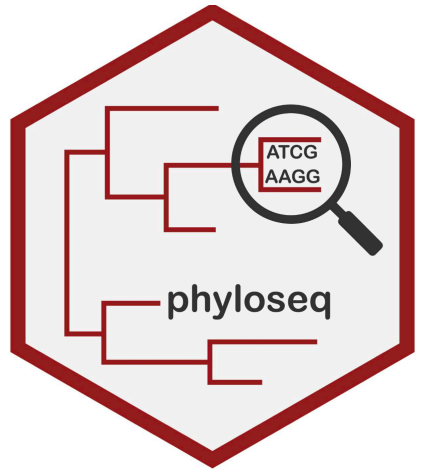
```
# Import to phyloseq  
ps_all <- phyloseq(otu_table(seqtab_data, taxa_are_rows = FALSE),  
                  sample_data(sample_sheet),  
                  tax_table(as.matrix(tax_sheet)))
```

群集行列

分類群情報

サンプル情報

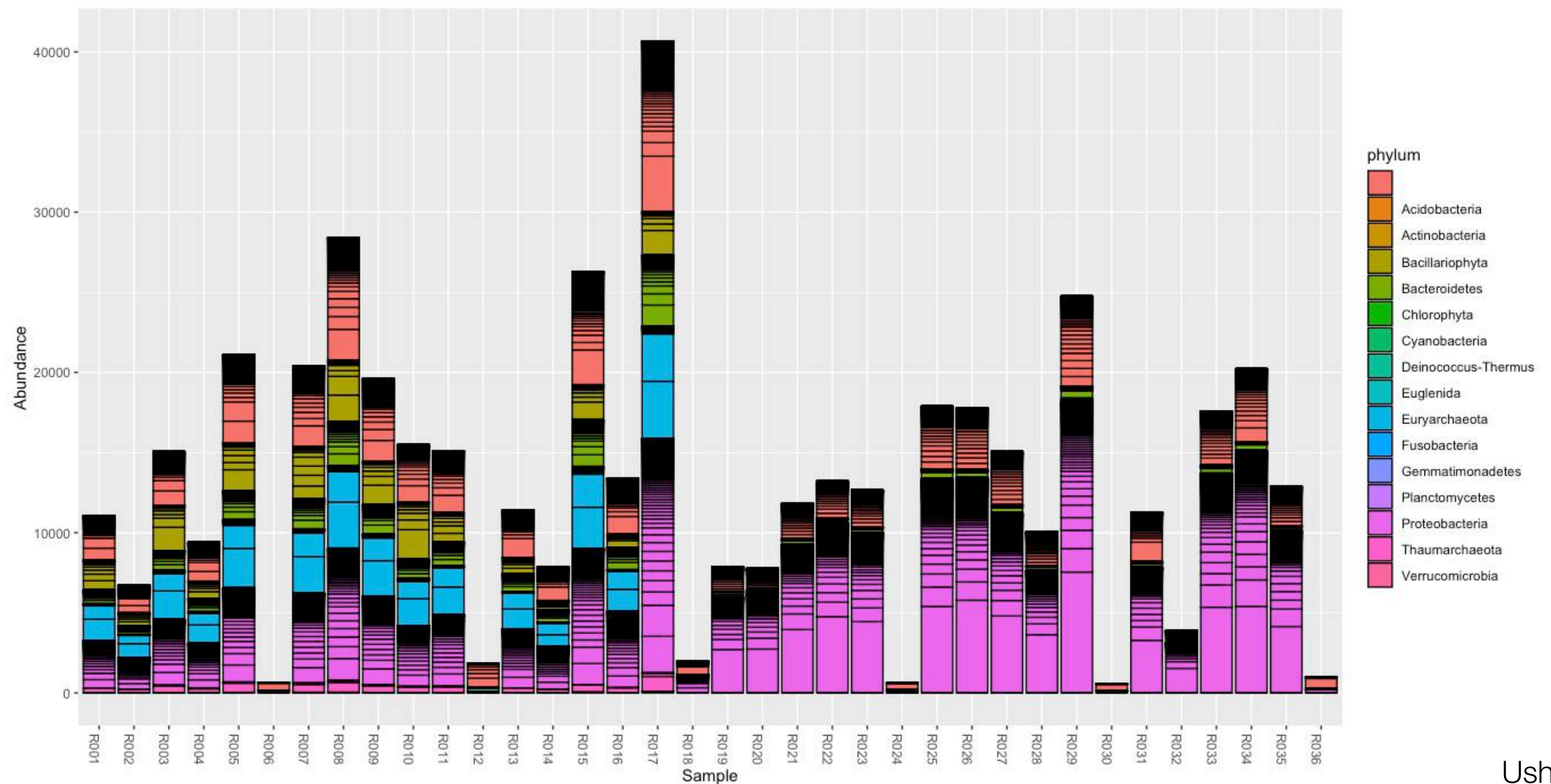
群集組成 | Community composition



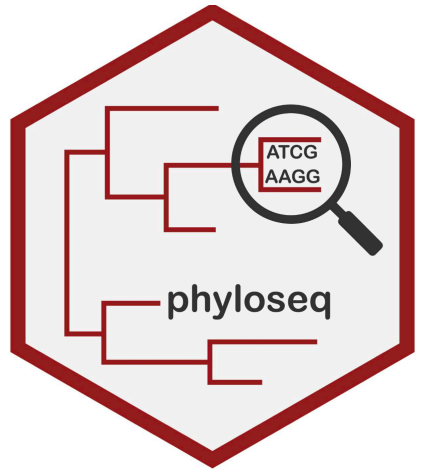
```
# plot_bar
```

```
p1 <- plot_bar(ps_all, x = "Sample", fill = "phylum")
```

```
p2 <- plot_bar(ps_all, x = "replicate", fill = "phylum") + facet_wrap(.~ Site+Method)
```



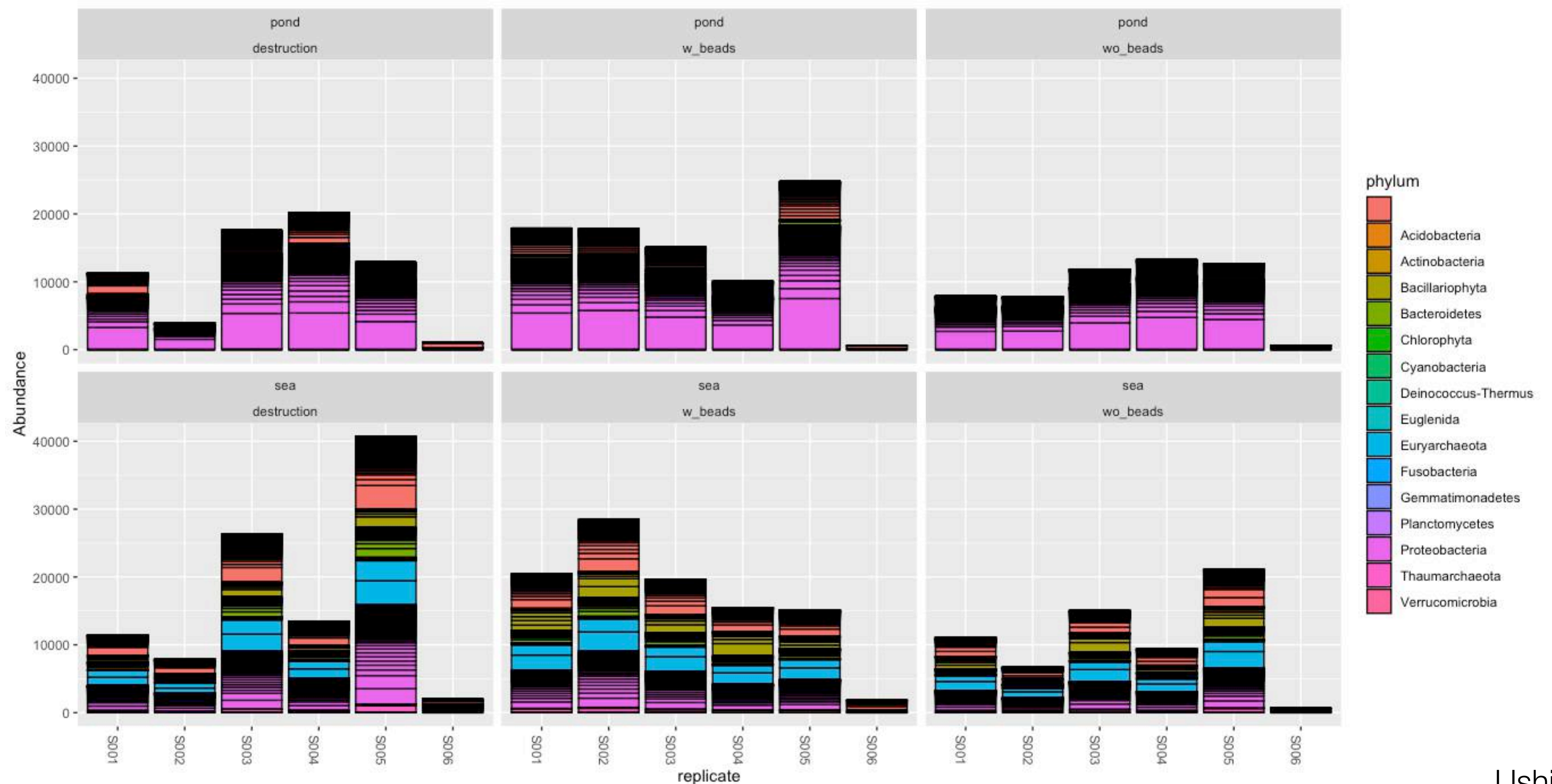
群集組成 | Community composition



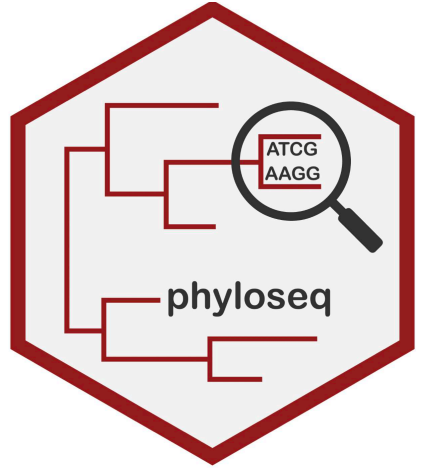
```
# plot_bar
```

```
p1 <- plot_bar(ps_all, x = "Sample", fill = "phylum")
```

```
p2 <- plot_bar(ps_all, x = "replicate", fill = "phylum") + facet_wrap(.~ Site+Method)
```

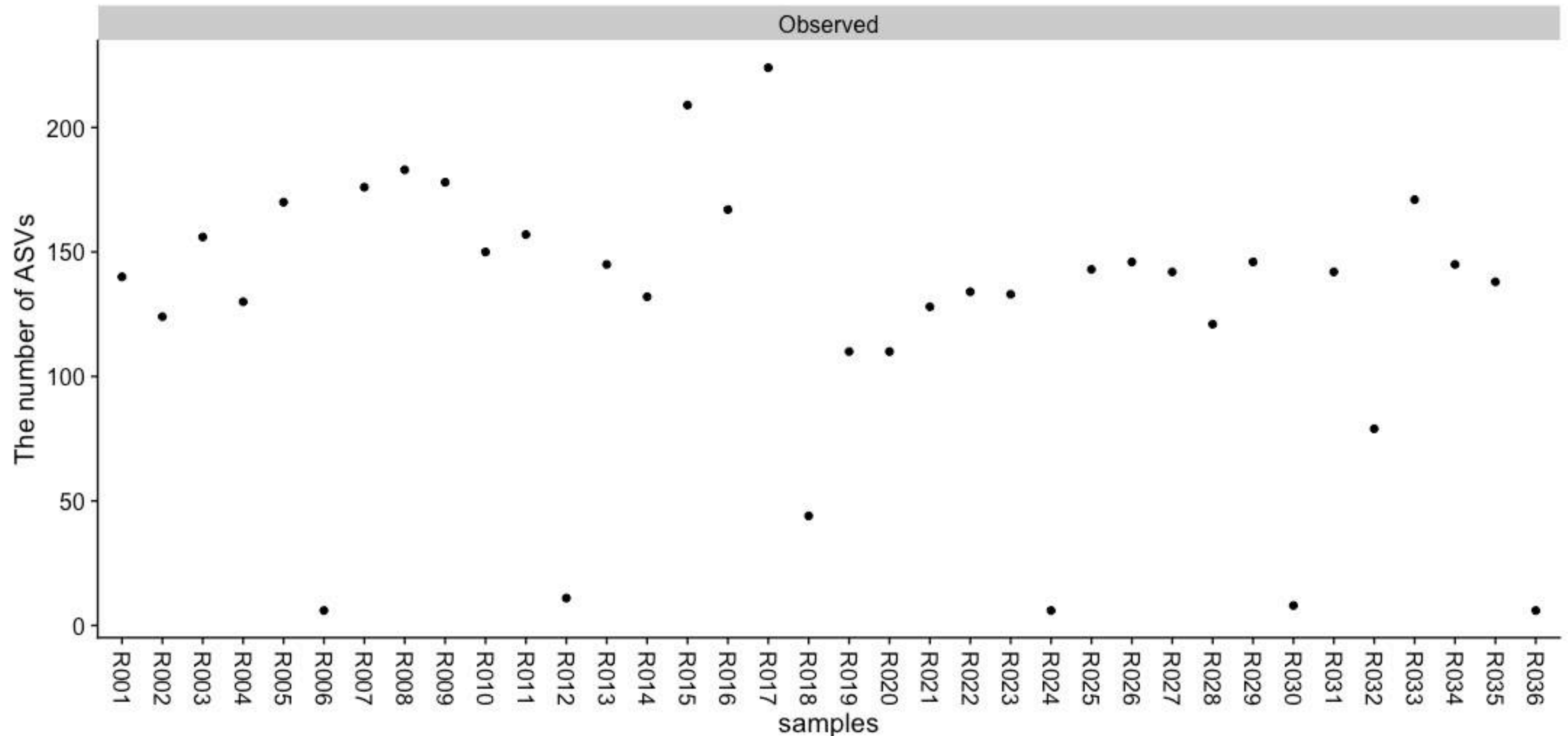


多様性比較 | Comparing diversity

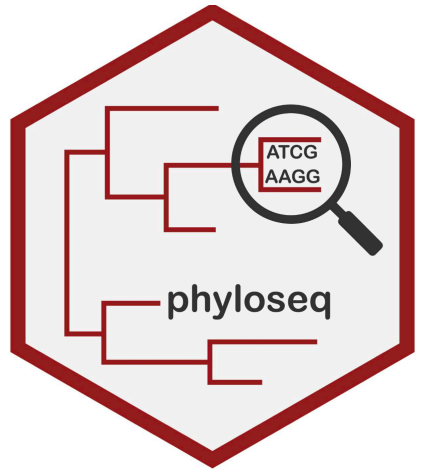


```
# plot_richness
```

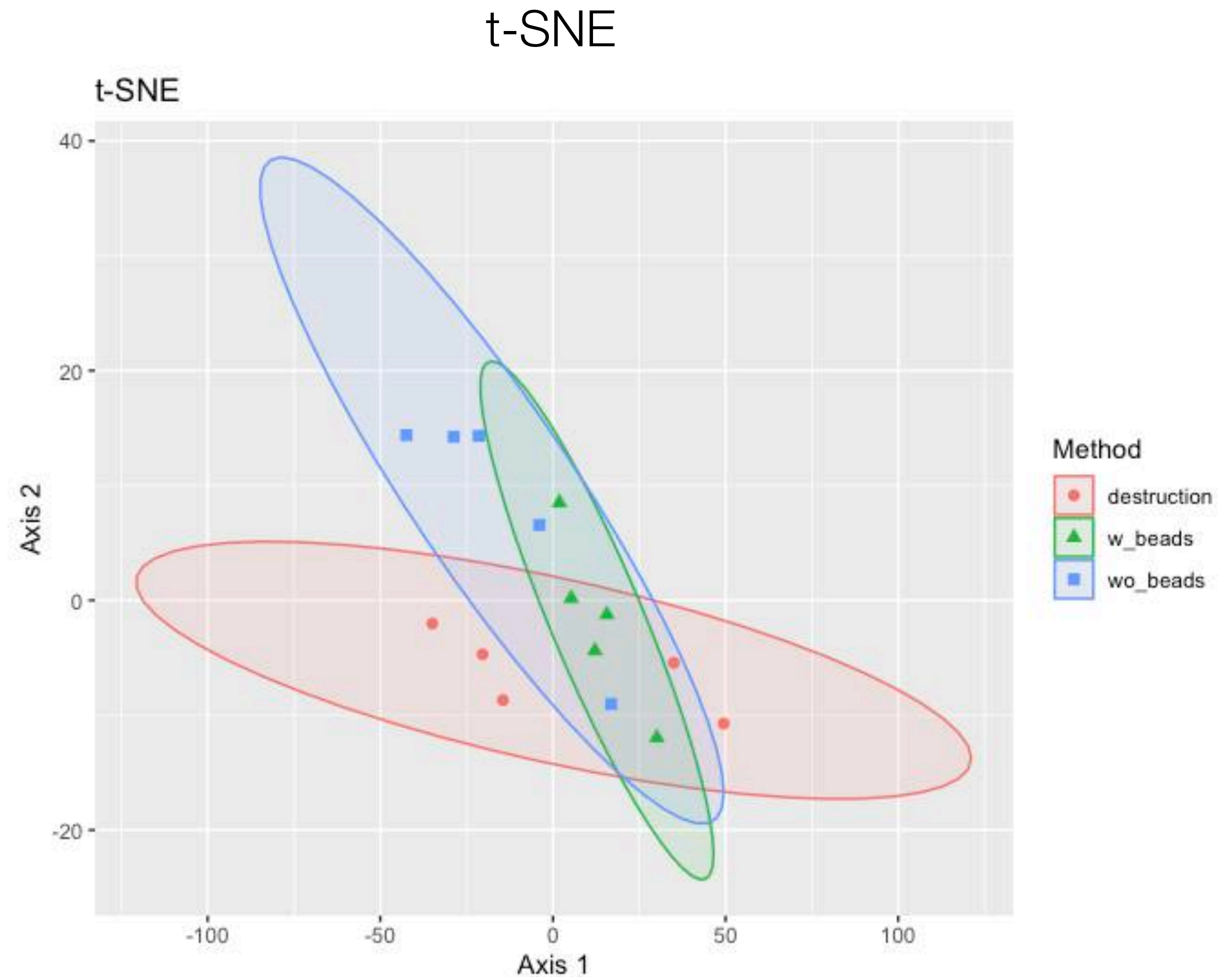
```
p3 <- plot_richness(ps_all, measures = "Observed") + ylab("The number of ASVs")
```



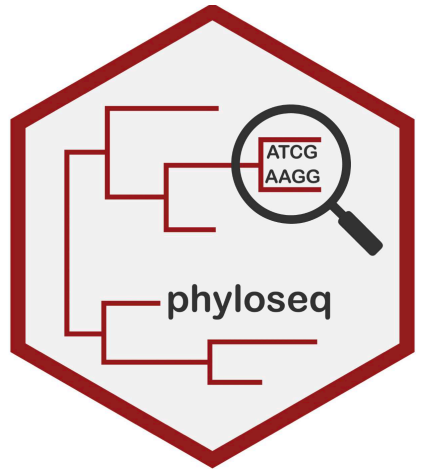
次元圧縮 | Dimension reduction



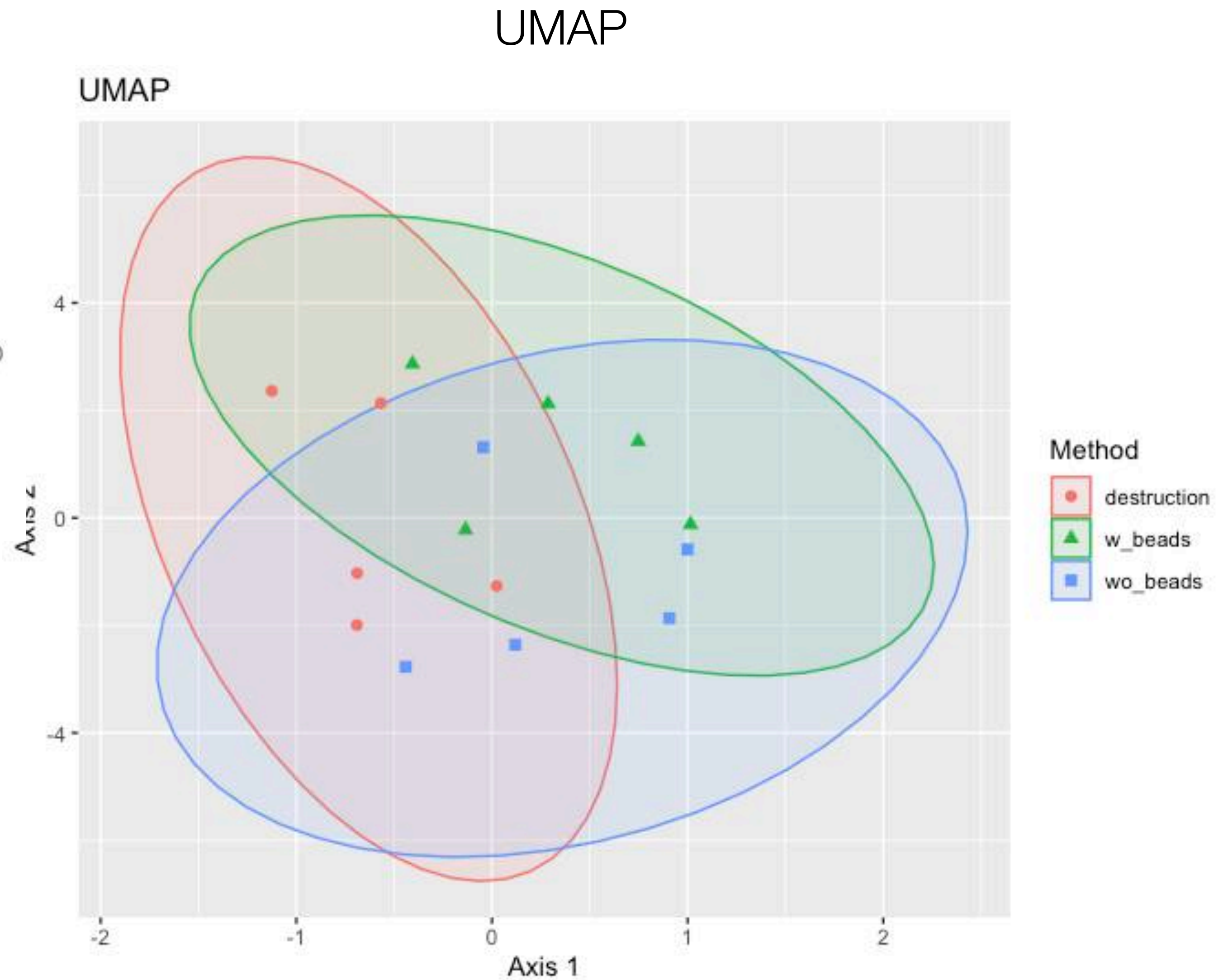
```
library(tsnemicrobiota)
tsne_res <- tsne_phyloseq(ps_sea, distance='bray',
                          perplexity = 5, rng_seed = 1234)
p7 <- plot_tsne_phyloseq(ps_sea, tsne_res,
                         color = "Method", shape = "Method") +
  stat_ellipse(geom = "polygon", alpha = 0.1, aes(fill=Method)) +
  geom_point(size = 2) + xlab("Axis 1") +
  ylab("Axis 2") + ggtitle("t-SNE")
```



次元圧縮 | Dimension reduction



```
library(uwot)
umap_res <- tumap(otu_table(ps_sea)@.Data,
                 n_neighbors = 5, n_components = 2)
umap_df <- cbind(data.frame(sample_data(ps_sea)), umap_res)
colnames(umap_df)[(ncol(umap_df)-1):ncol(umap_df)] <- c("UMAP1", "UMAP2")
p8 <- ggplot(umap_df, aes(x = UMAP1, y = UMAP2,
                        color = Method, shape = Method)) +
  stat_ellipse(geom = "polygon", alpha = 0.1, aes(fill=Method)) +
  geom_point(size = 2) + xlab("Axis 1") + ylab("Axis 2") +
  ggtitle("UMAP")
```

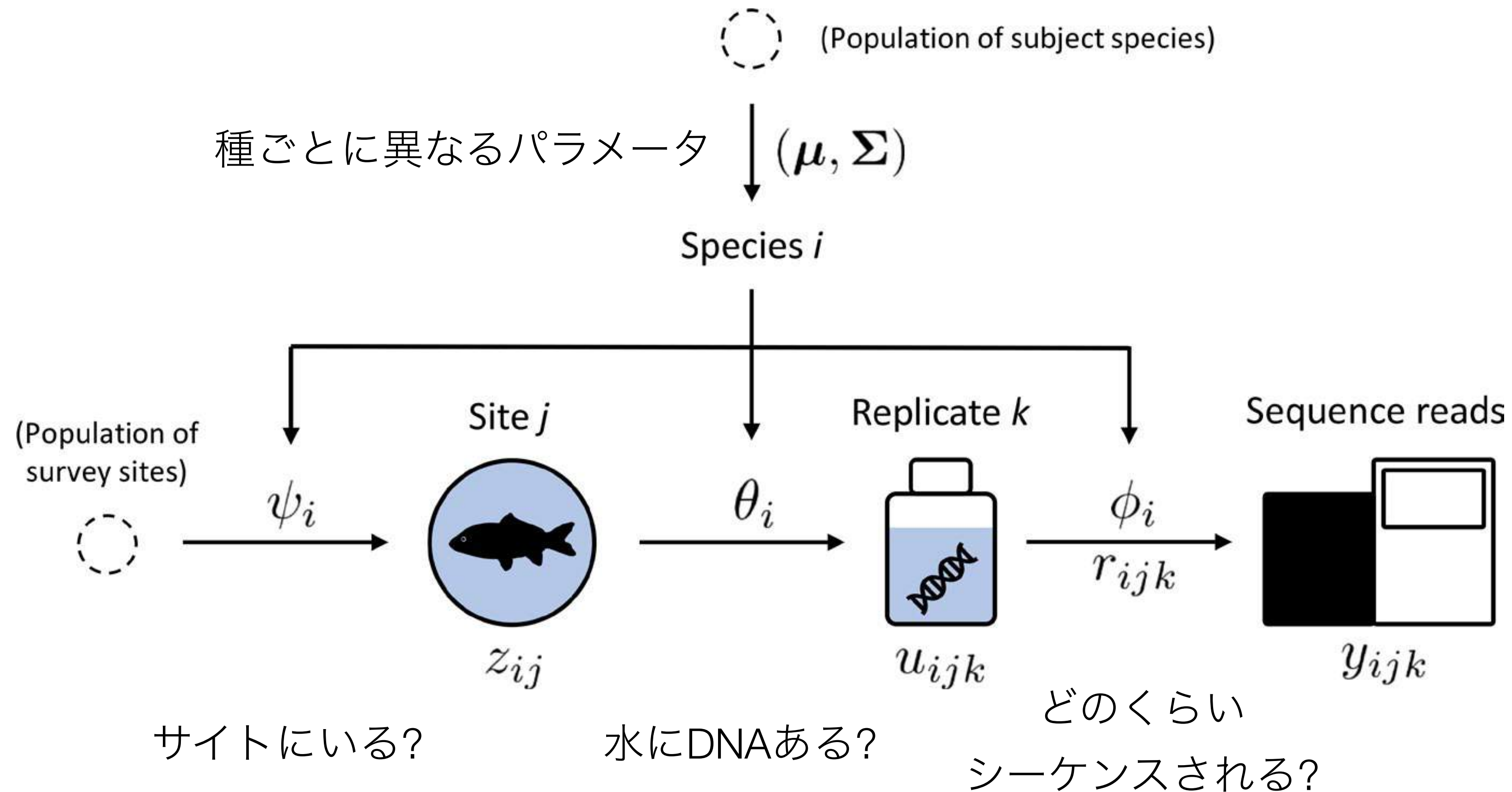


統計モデリング | Statistical modeling

Fukaya et al. (2021) *Methods in Ecology & Evolution*

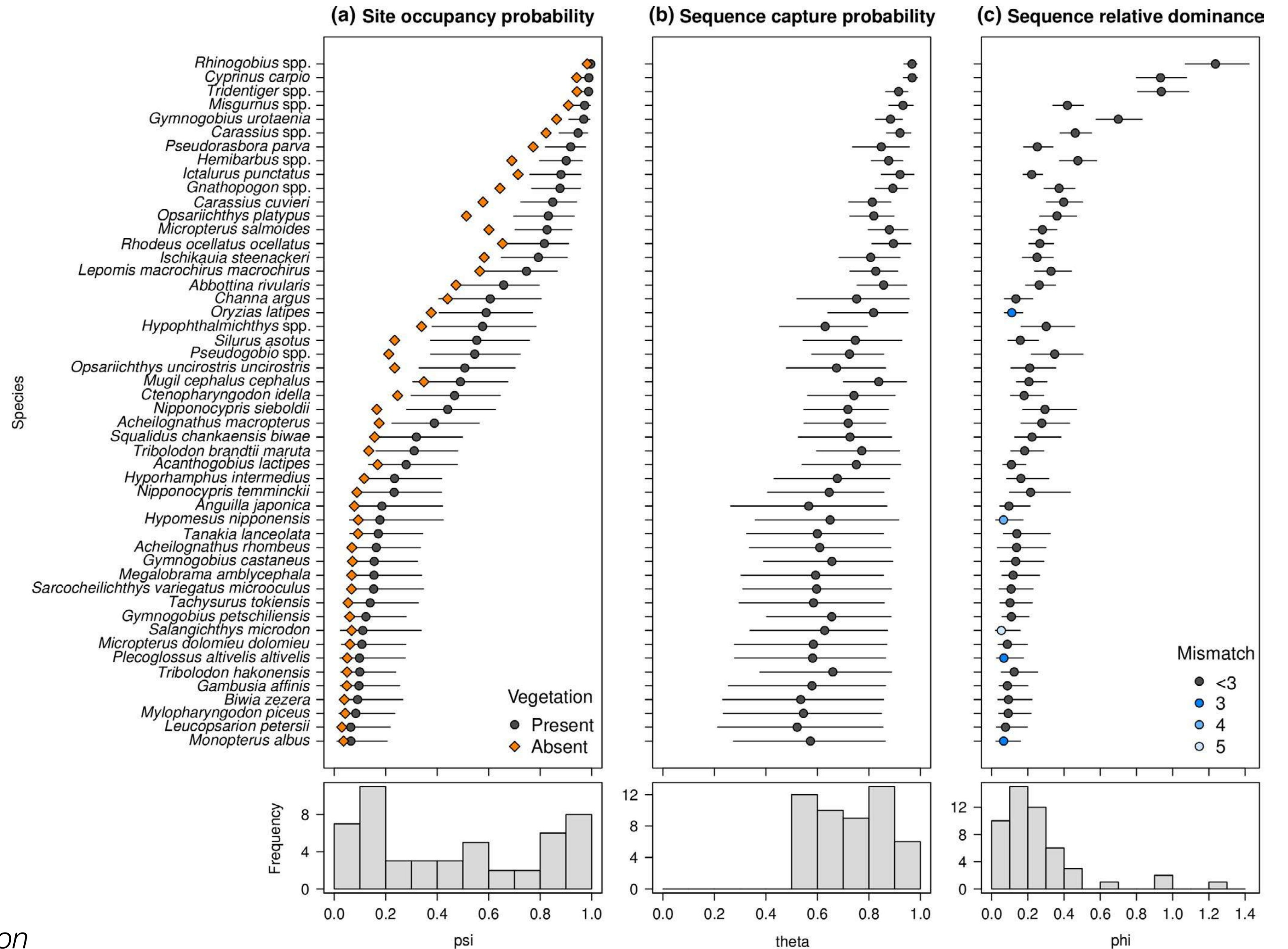
検出確率の推定

環境 DNA による検出は、様々なステップの積み重ね。
一つ一つを丁寧にモデリング



統計モデリング | Statistical modeling

検出確率の推定

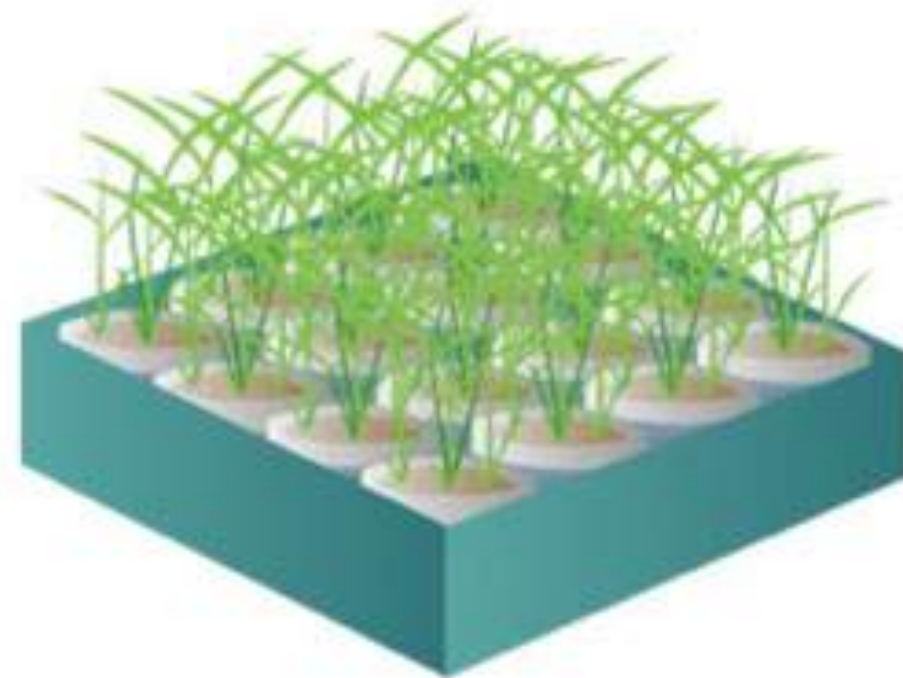


統計モデリング | Statistical modeling

Ushio (2022) *Proceedings of the Royal Society B*

時系列解析

1. water sampling



2. filtration



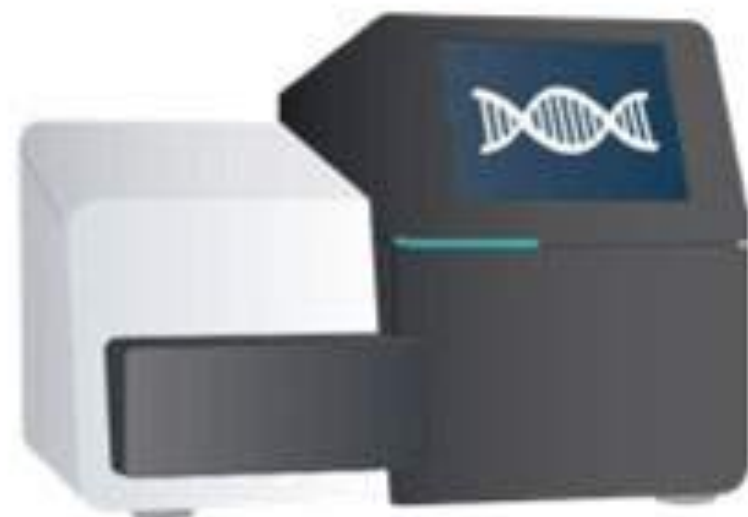
3. DNA extraction



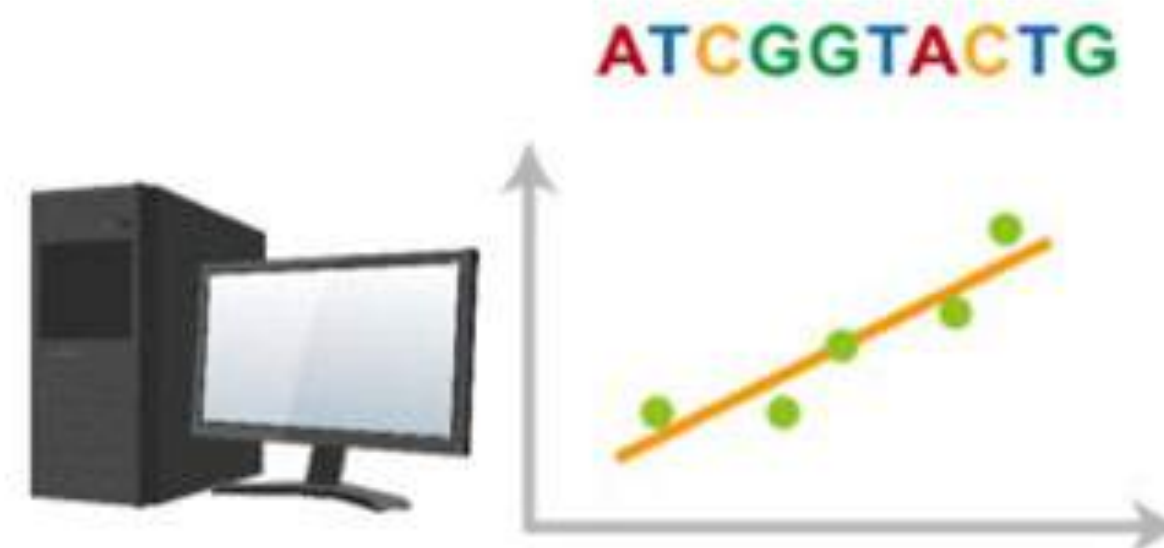
4. library preparation



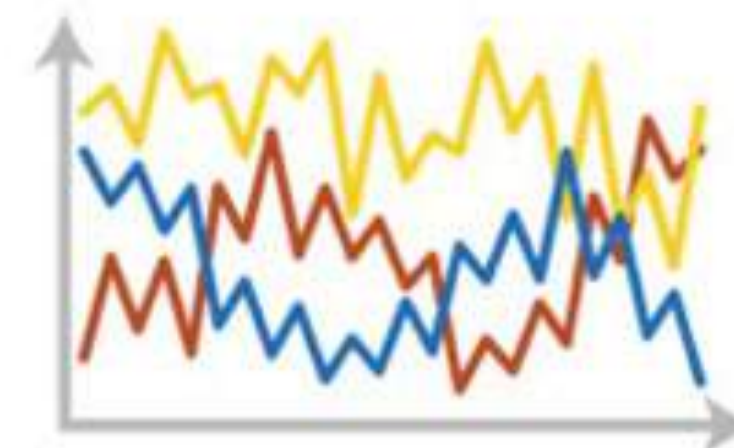
5. Miseq sequencing



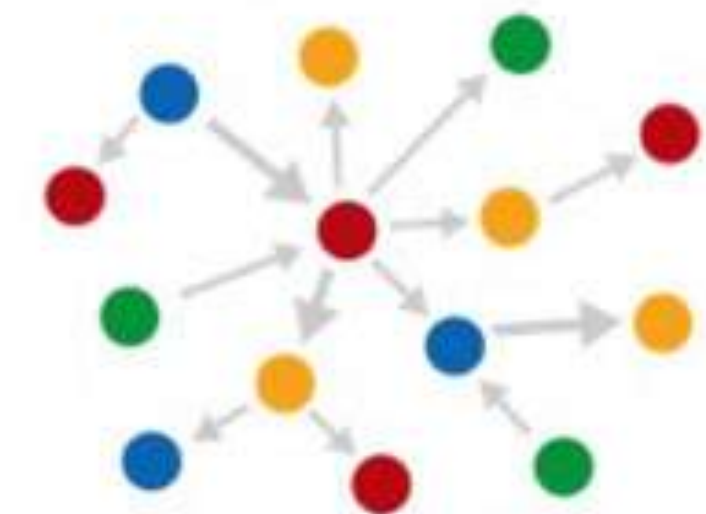
6. sequence processing



7. time series analysis



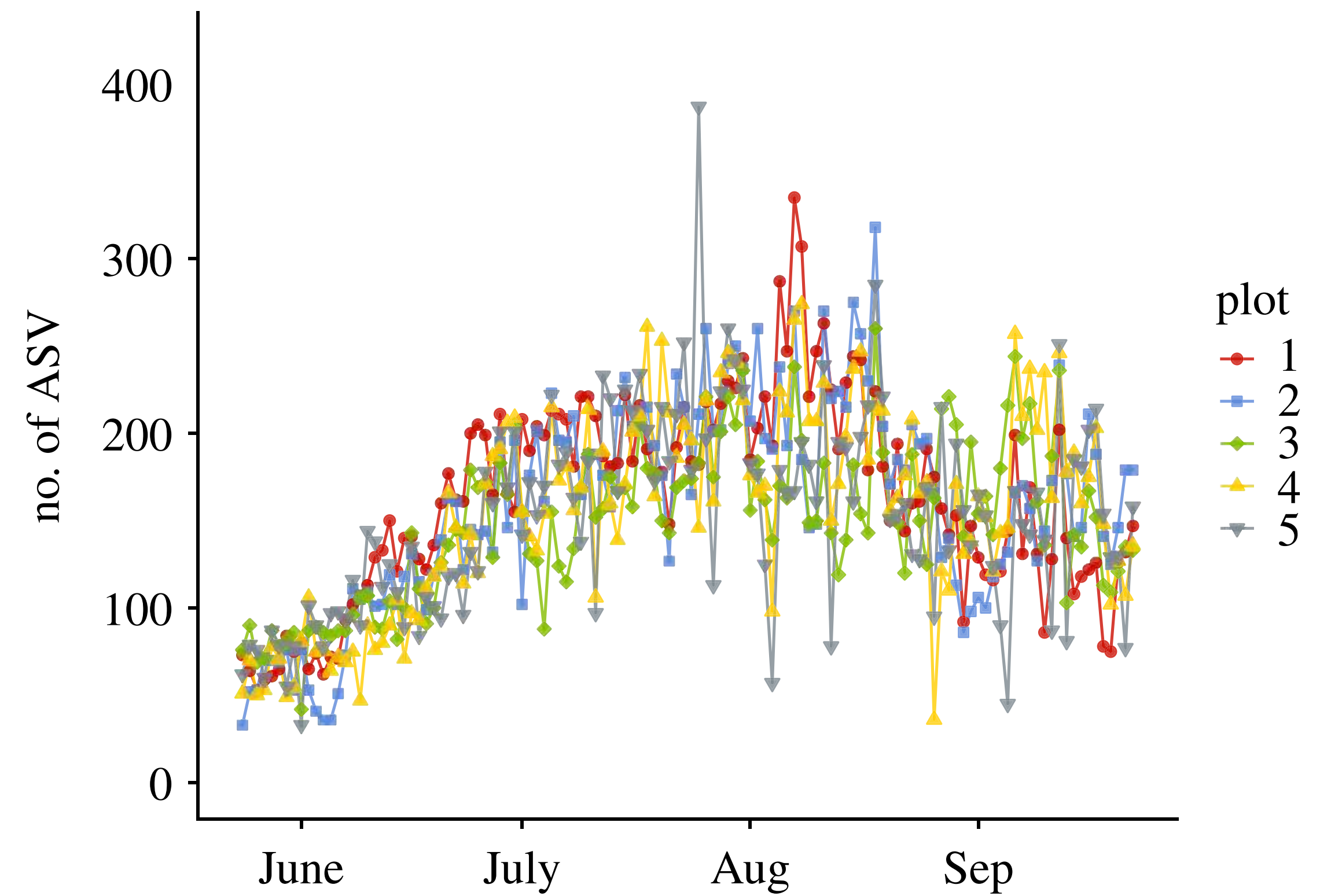
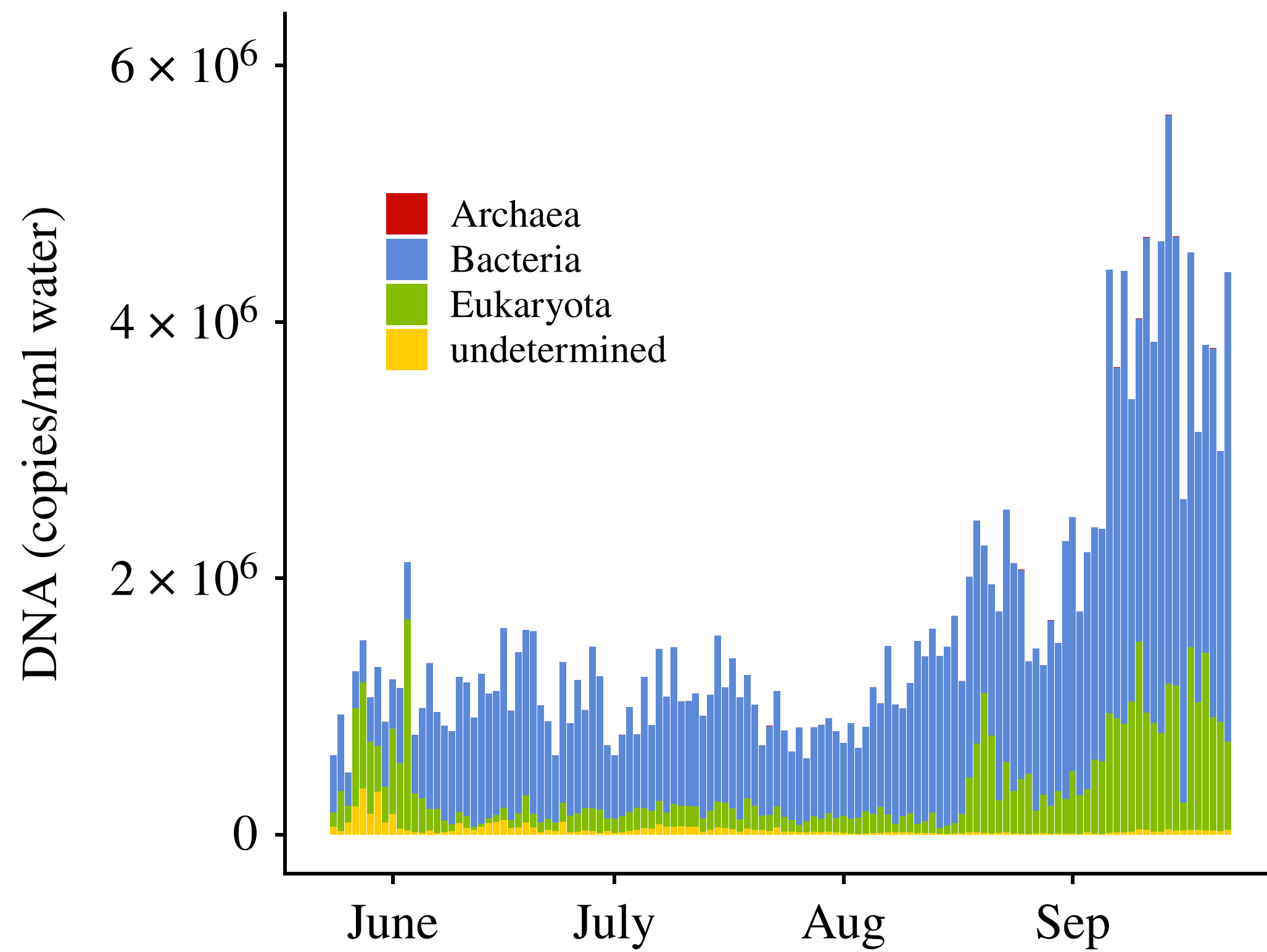
8. network reconstruction



統計モデリング | Statistical modeling

時系列解析

Ushio (2022) *Proceedings of the Royal Society B*



統計モデリング | Statistical modeling

時系列解析

時系列データ →

背後にあるメカニズムの情報をより多く含む

- 因果関係の検出
- 相互作用強度の推定
- 近未来予測

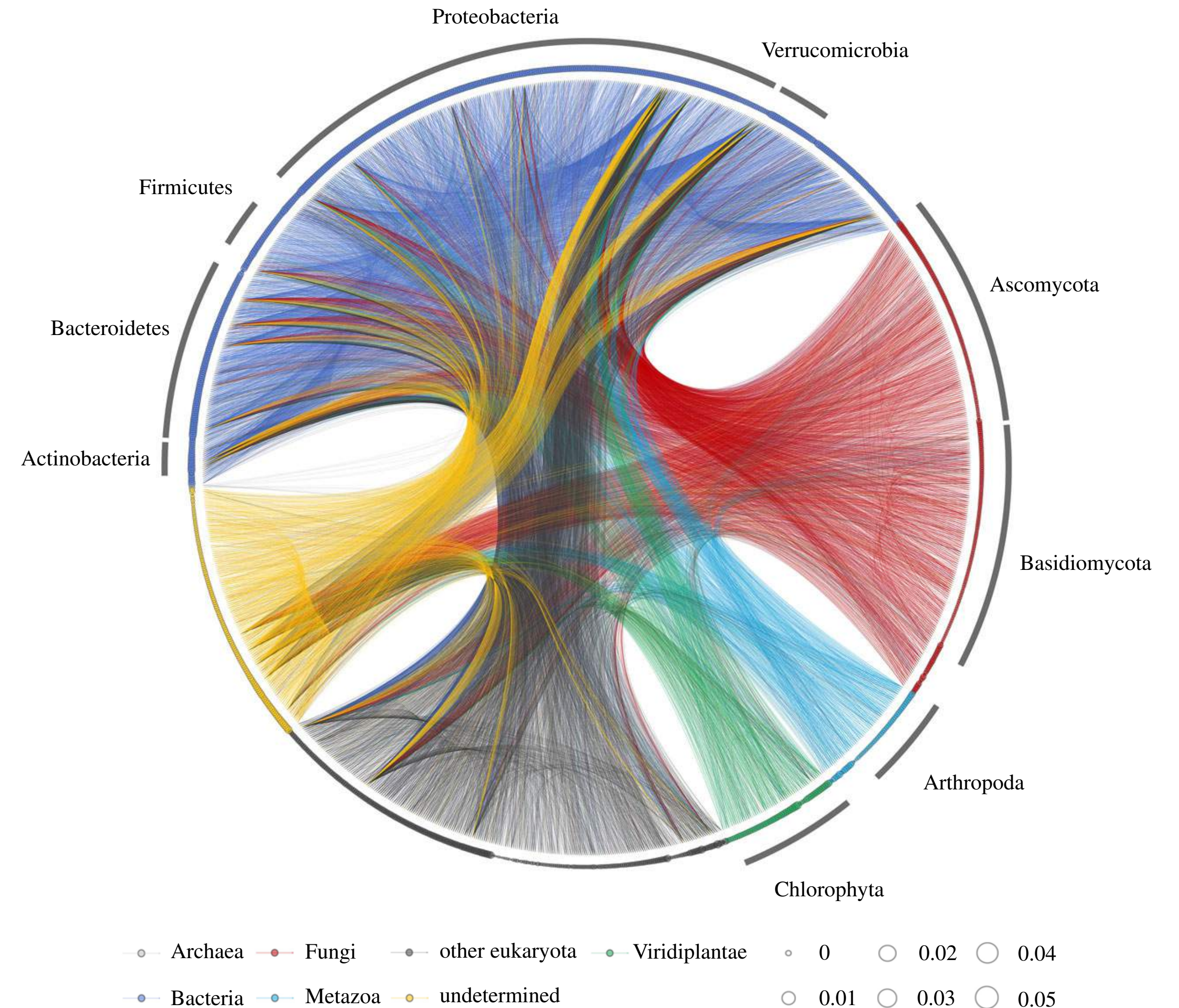
状態空間モデル

非線形時系列解析

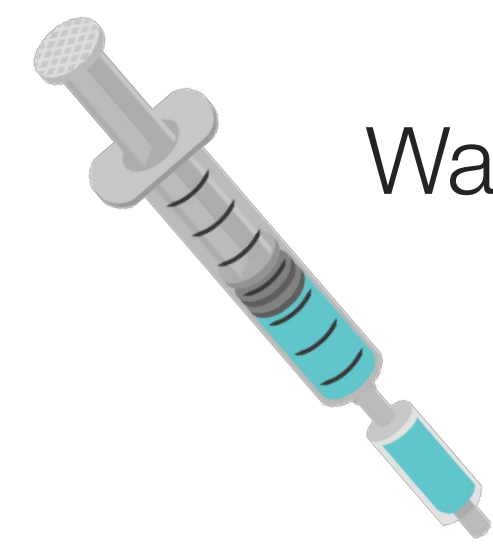
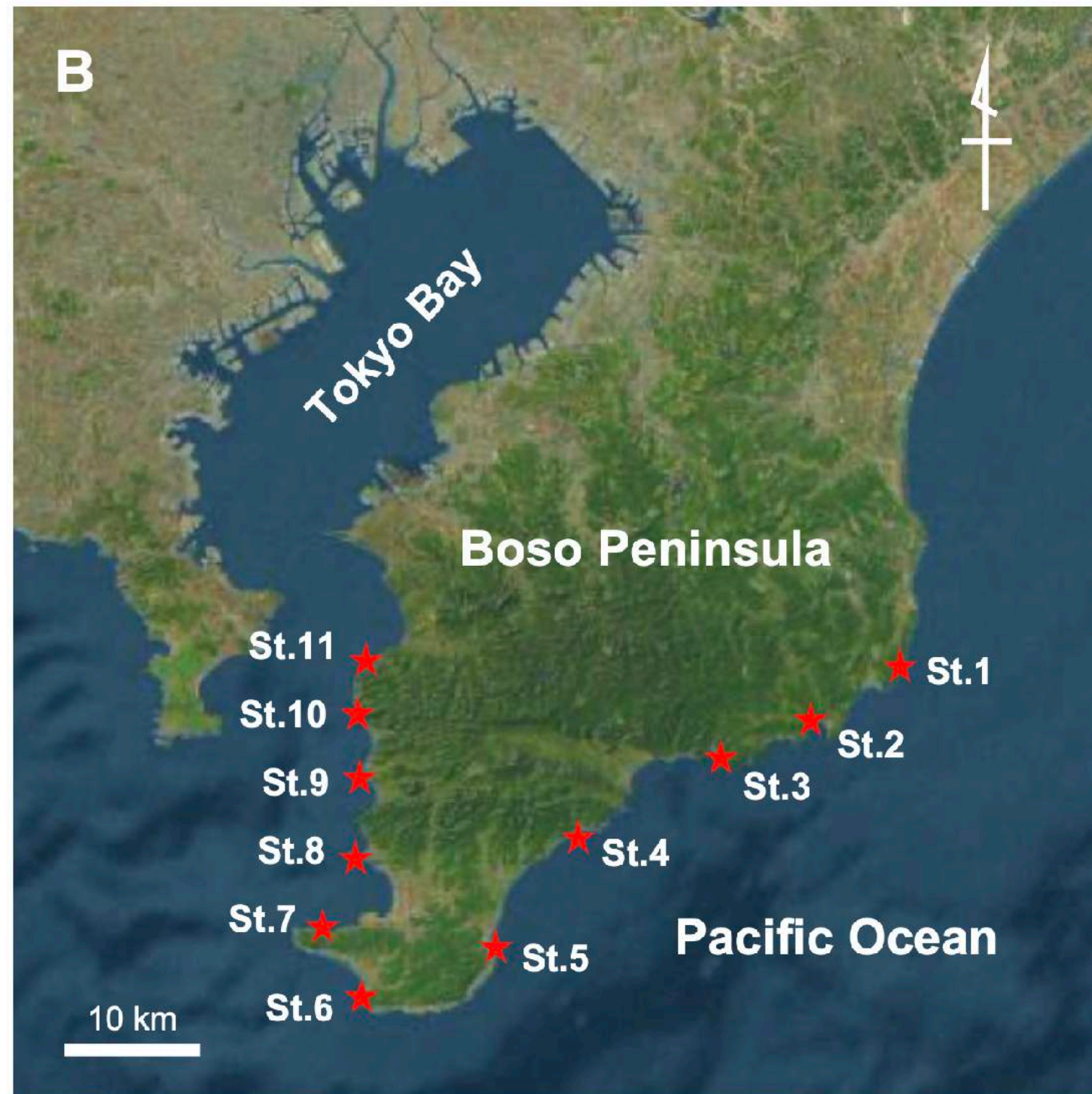
Empirical Dynamic Modeling (Sugihara et al. 2012)

Transfer Entropy (Schreiber 2000)

Ushio (2022) *Proceedings of the Royal Society B*



統計モデリング | Statistical modeling

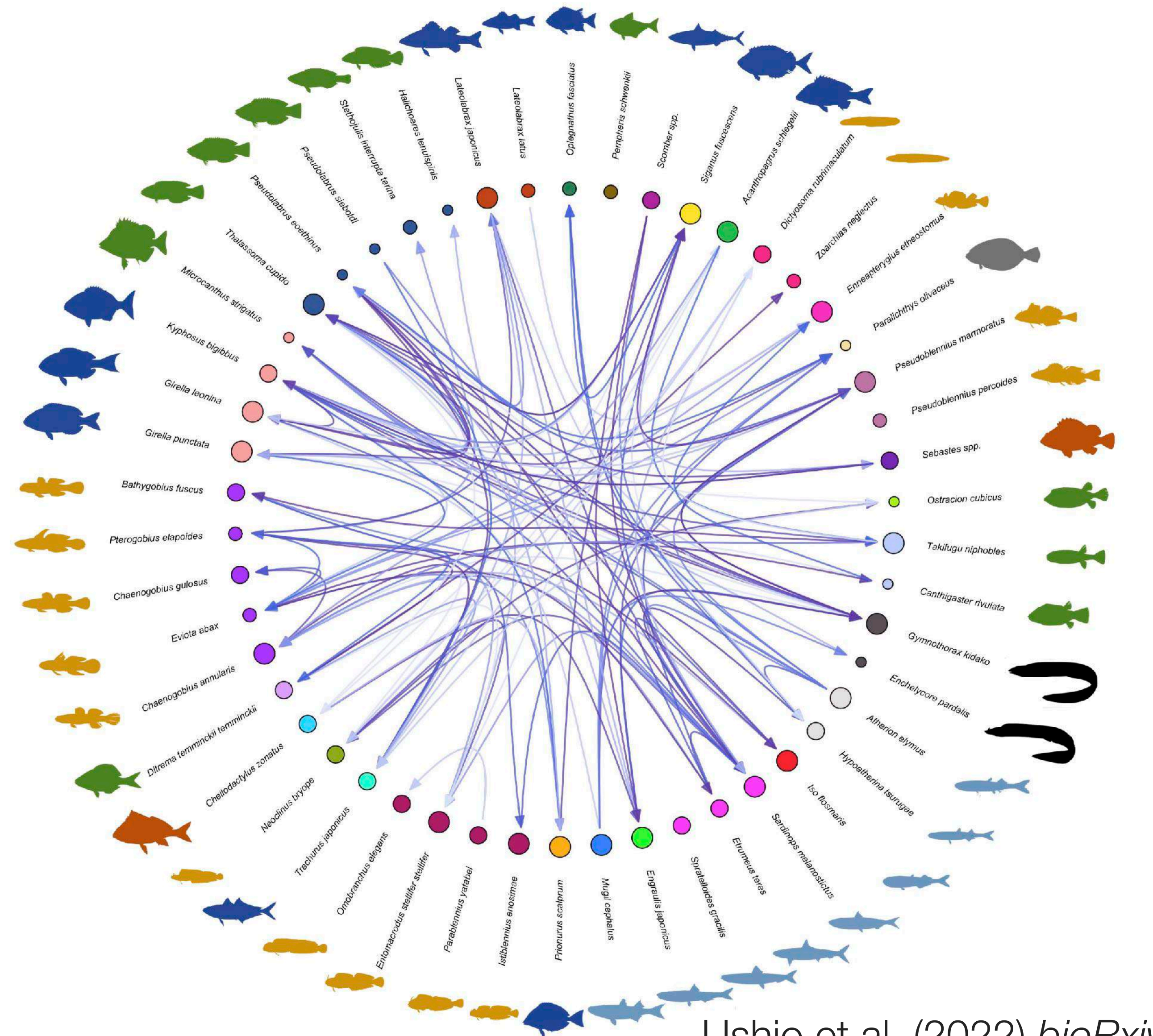


Water sampling



??

eDNA time series
Time series analysis



Ushio et al. (2022) *bioRxiv*

今後の展望 | Future direction

今後の展望 | Future direction

- 系の拡大 | Application to other systems
- 自動化 | Automation
- 大規模化 | Larger-scale study
- 高解像度化 | Finer resolution
- 小型化・高速化 | Portable tools, real-time monitoring

系の拡大 | Application to other systems

Terrestrial ecosystems

Ishige et al. (2017) *Biological Conservation*

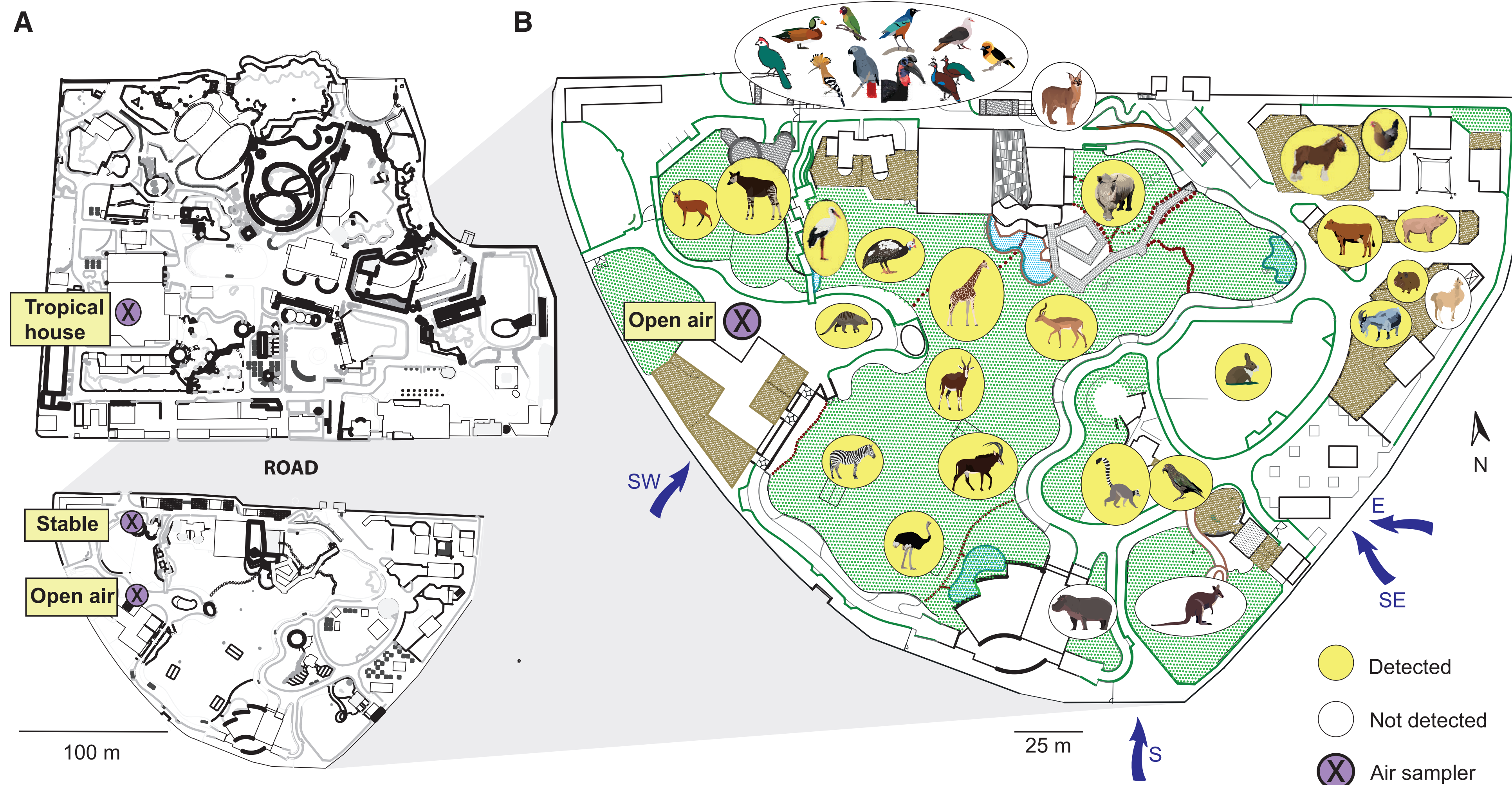
The natural saltlicks may work as “**a natural trap**” of mammal eDNA...



系の拡大 | Application to other systems

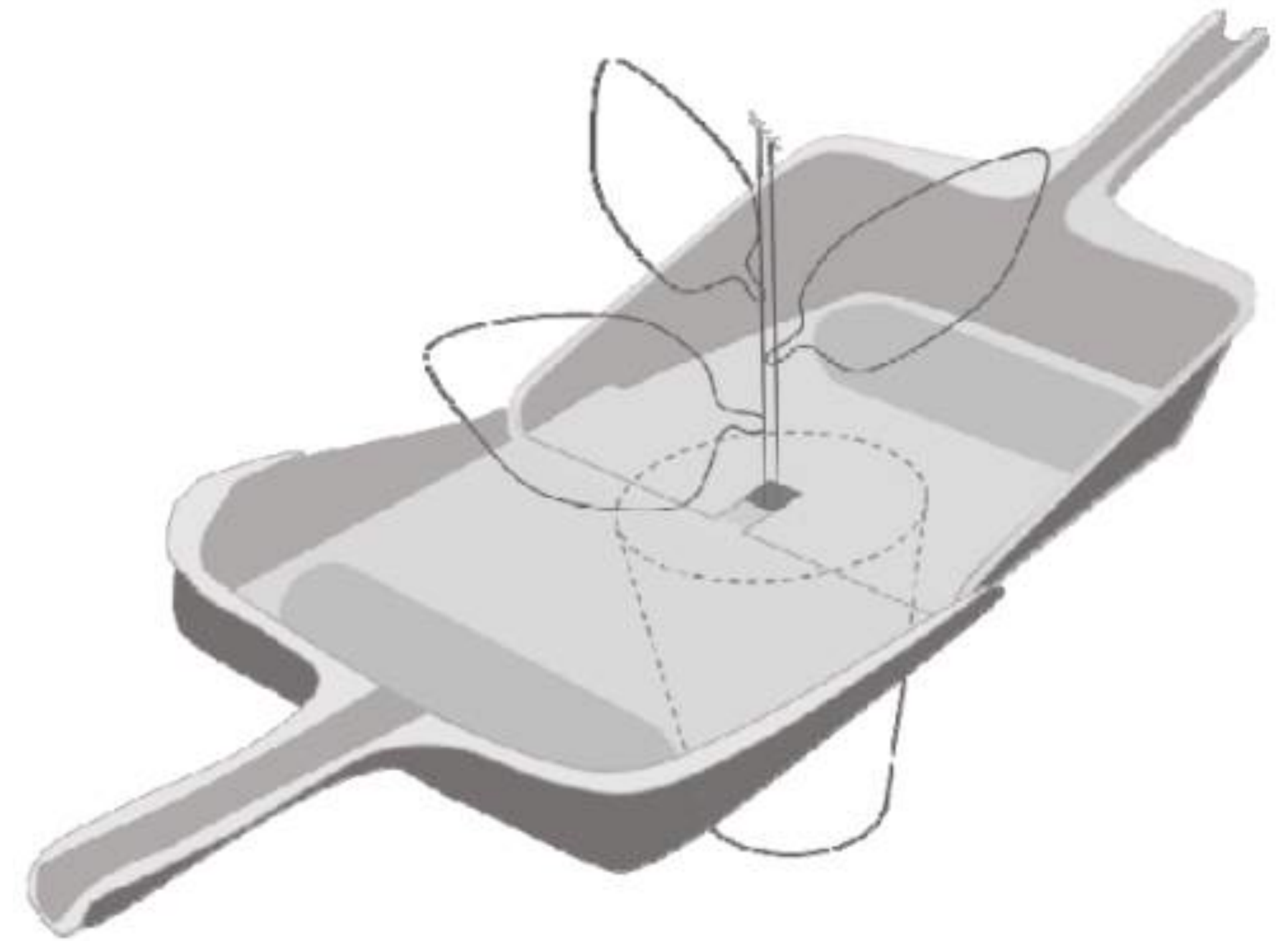
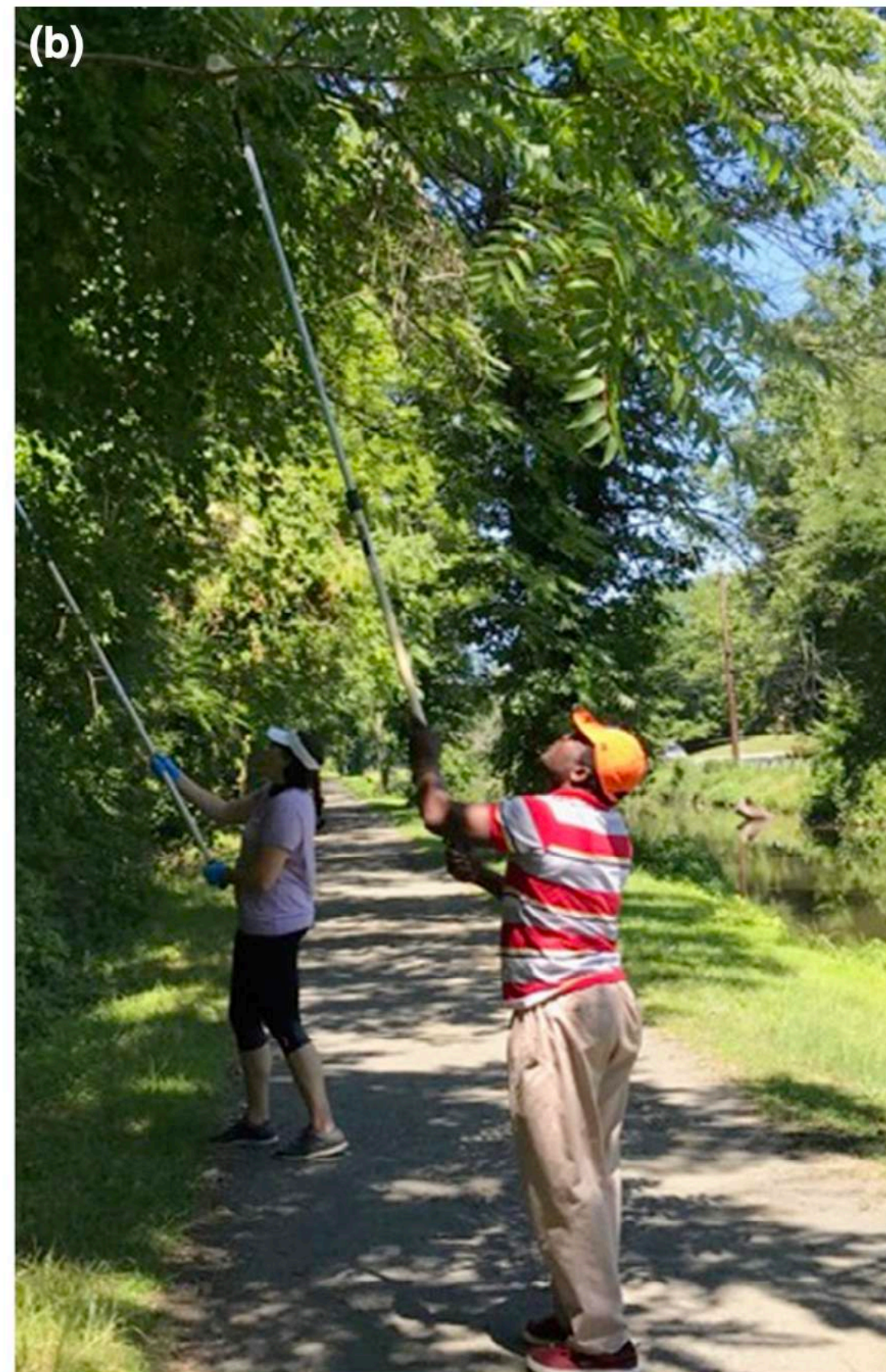
Terrestrial ecosystems

Lynggaard et al. (2022) *Current Biology*



系の拡大 | Application to other systems

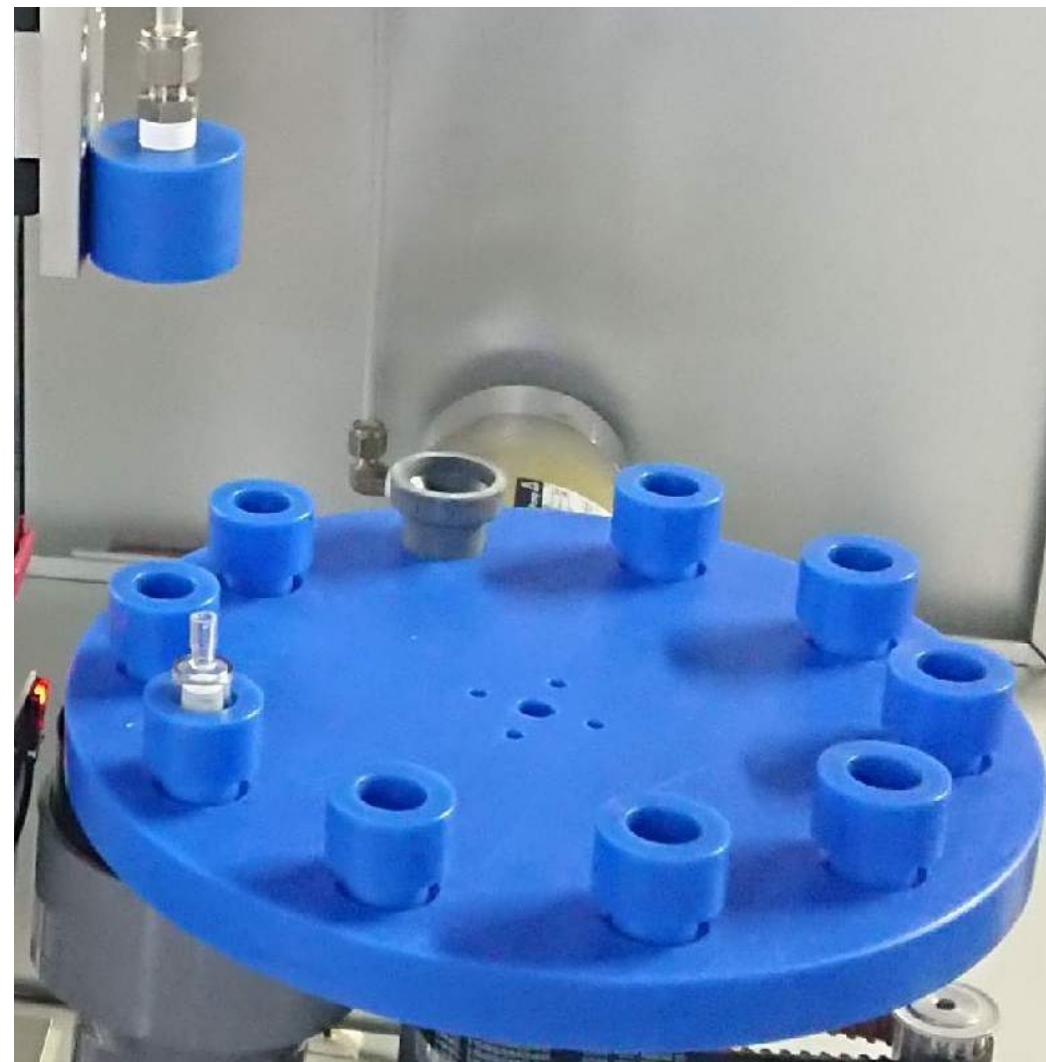
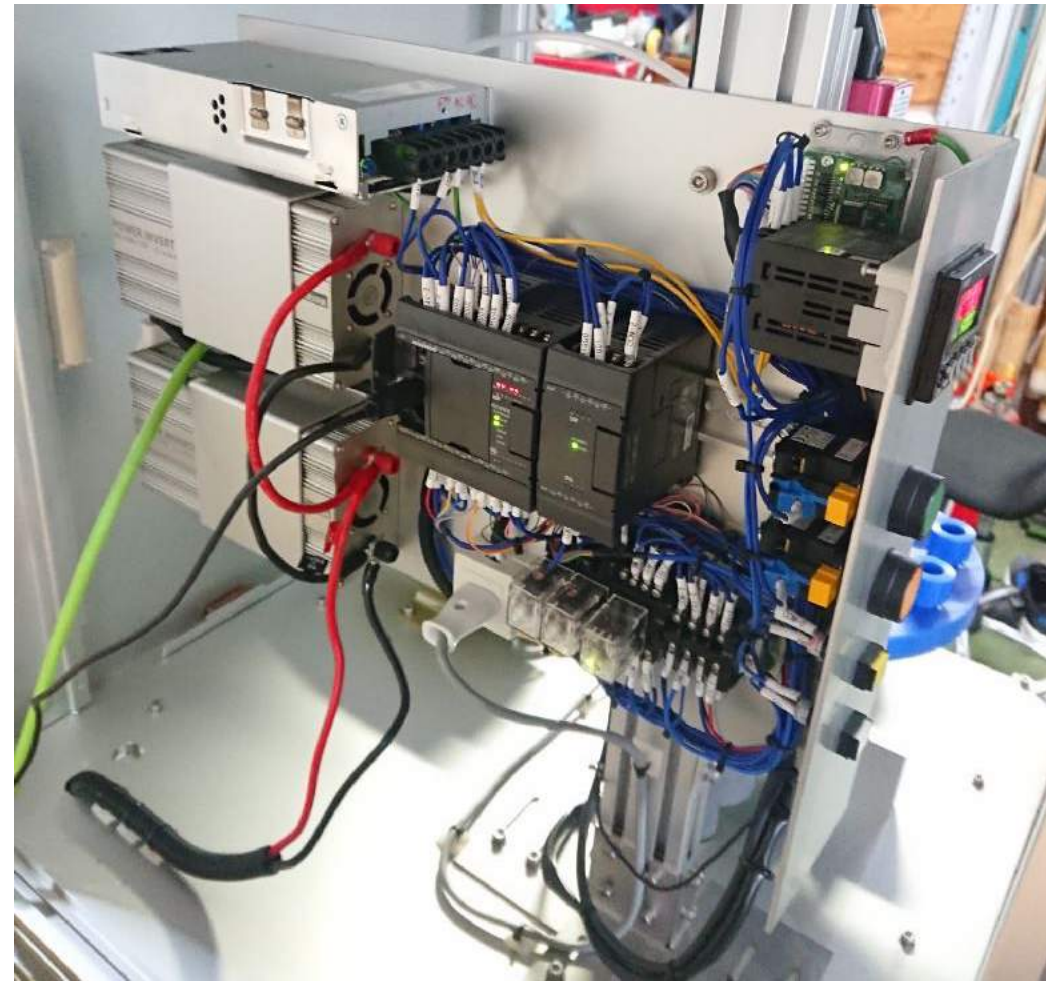
Terrestrial ecosystems



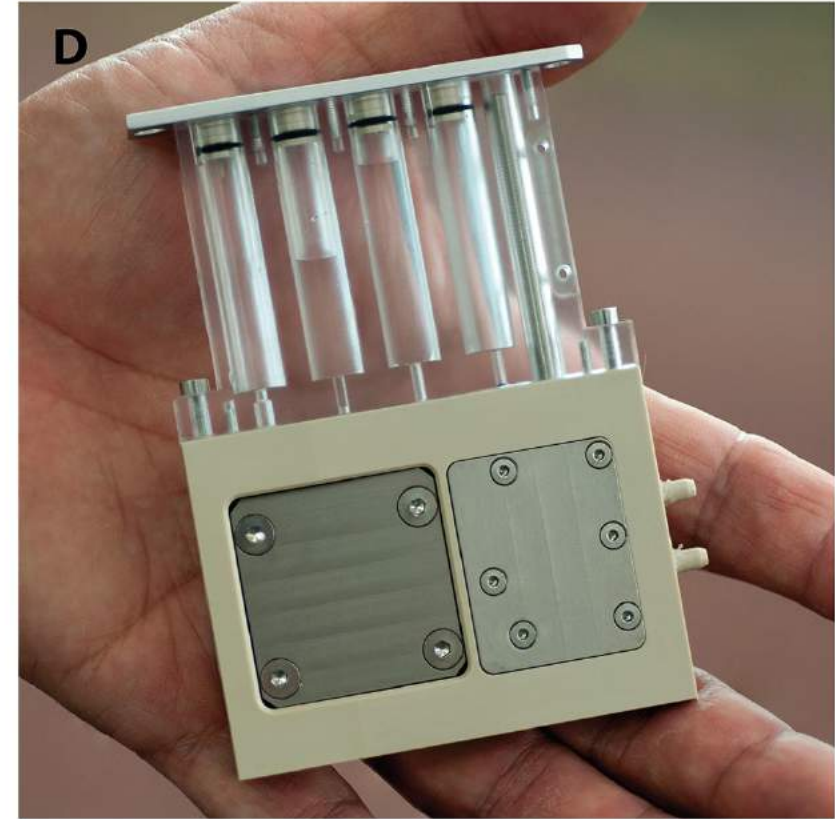
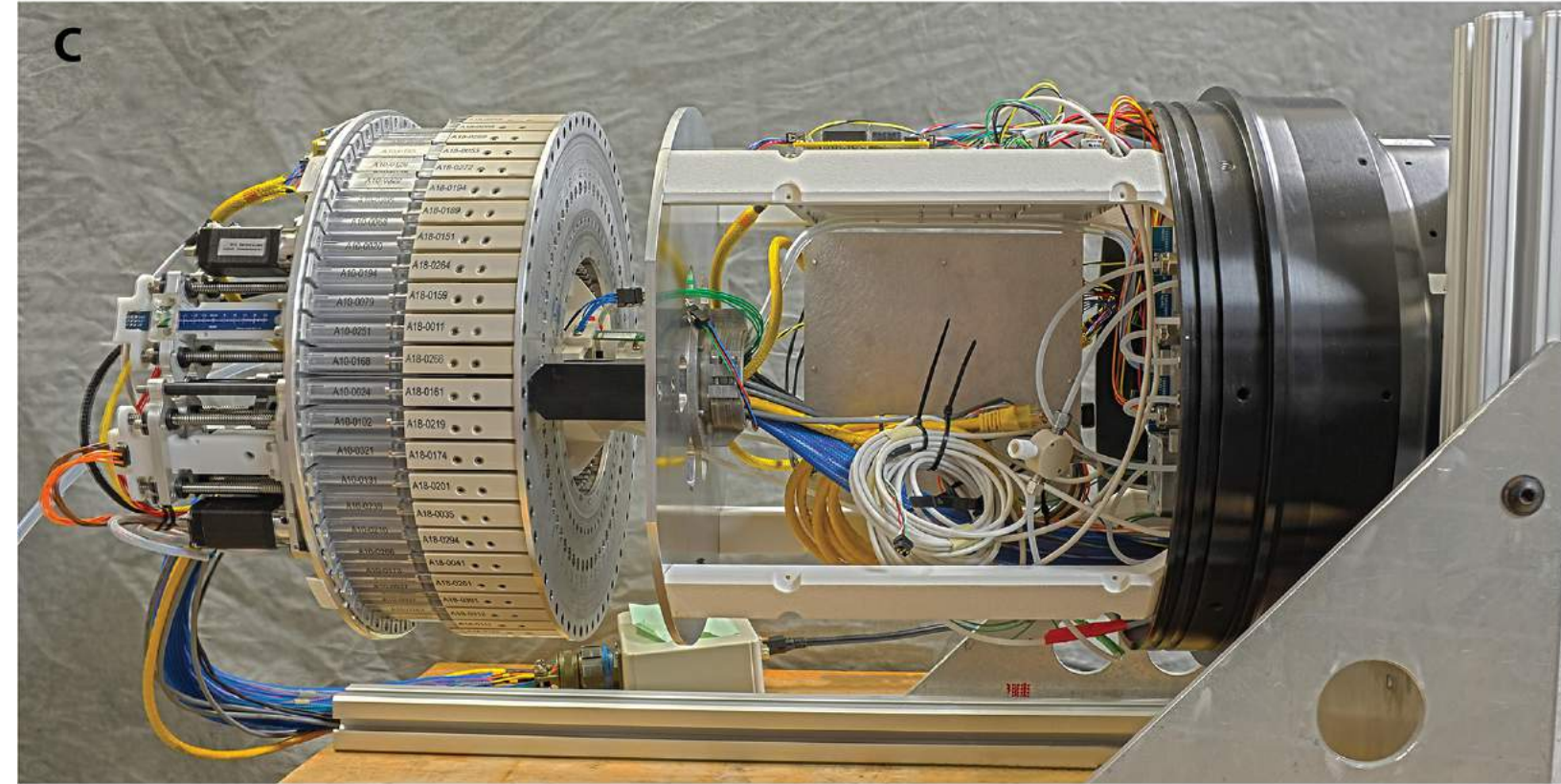
Valentin et al. (2020) *Molecular Ecology Resources*

Yoneya et al. (2022) *bioRxiv*

自動化 | Automation



Ushio lab



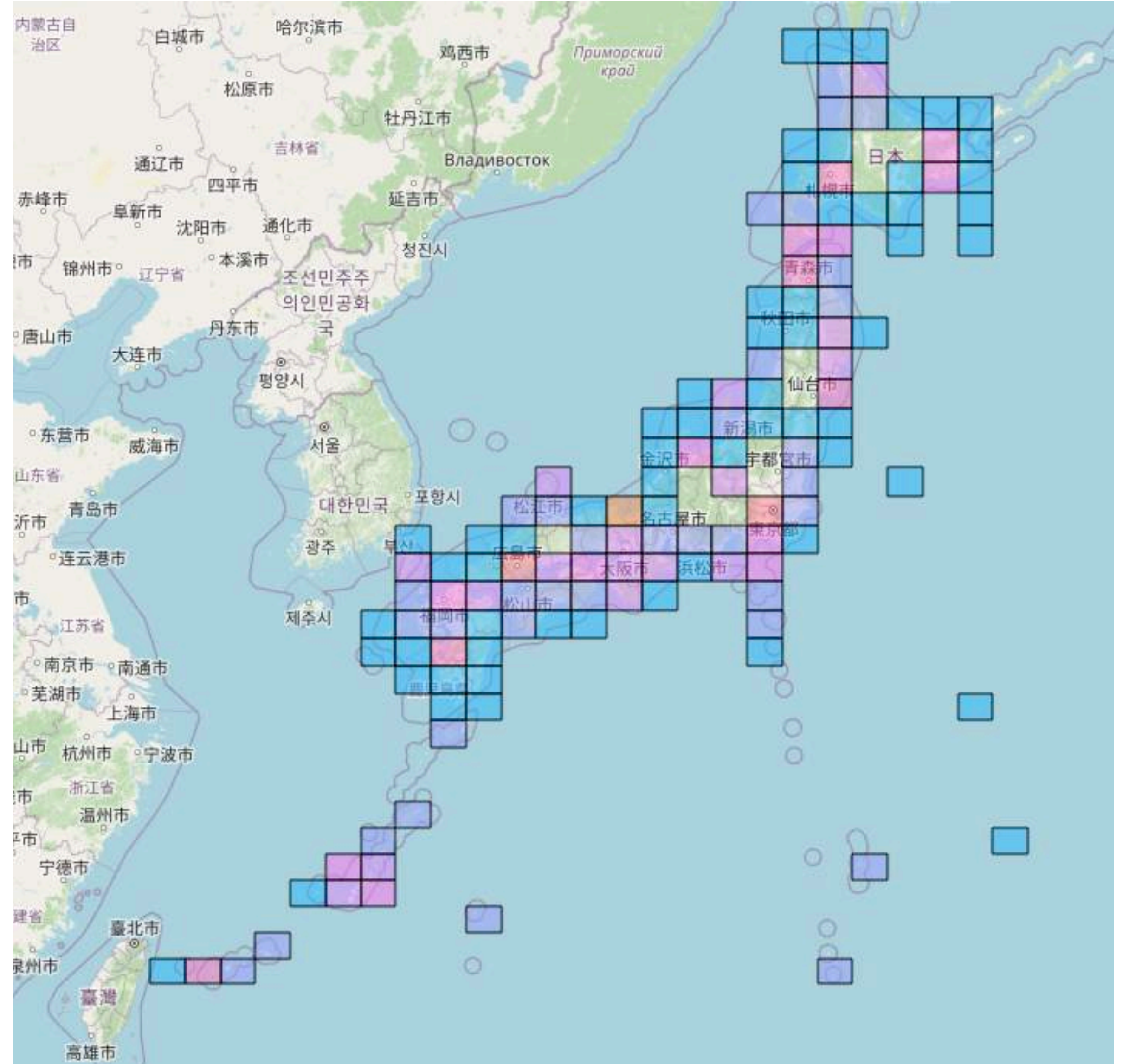
Yamahara et al. (2019) *Frontiers in Marine Science*

大規模化 | Larger-scale study

ANEMONE DB

<https://db.anemone.bio/>

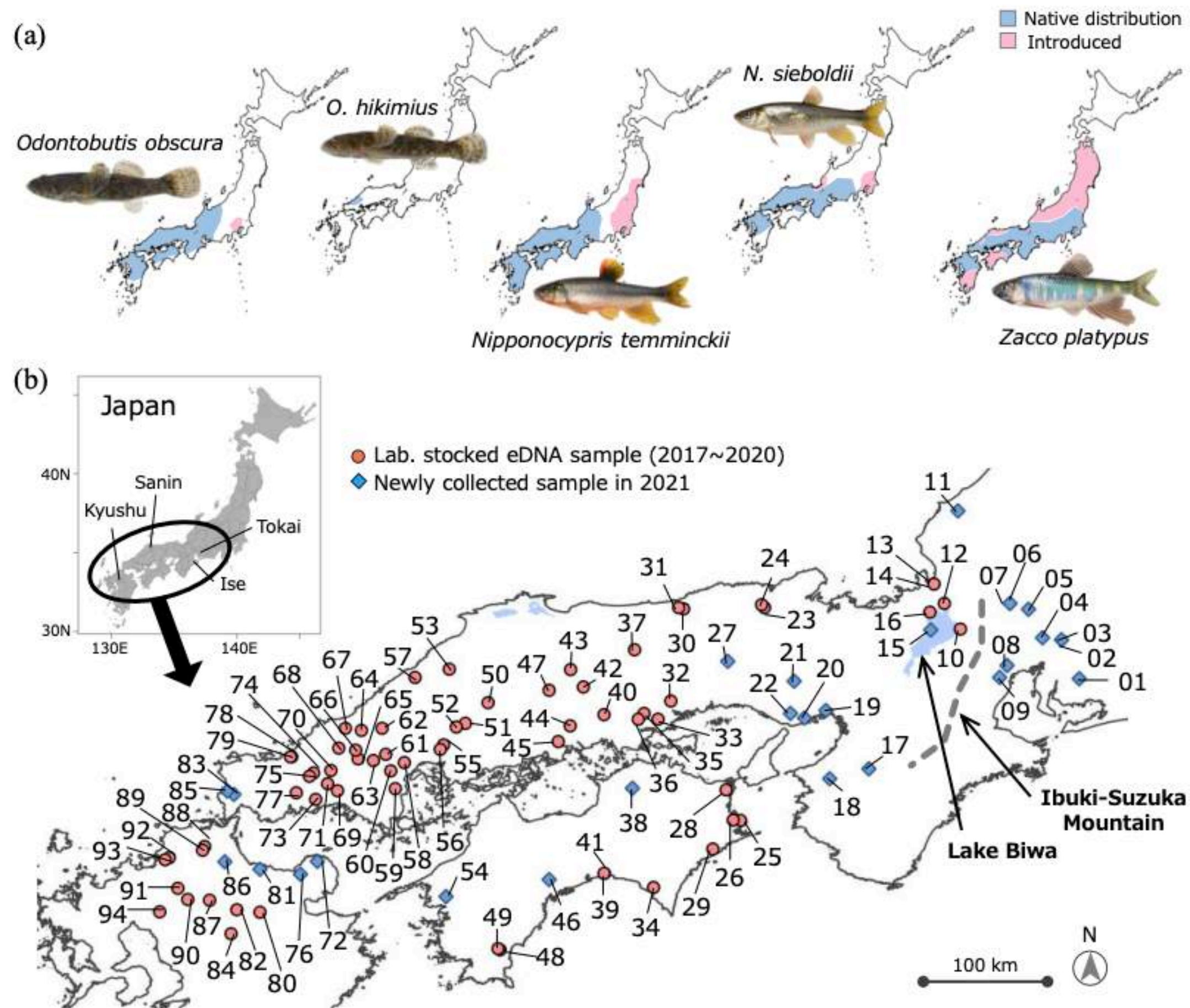
現場採水が簡単であるがゆえ
に可能な大規模調査



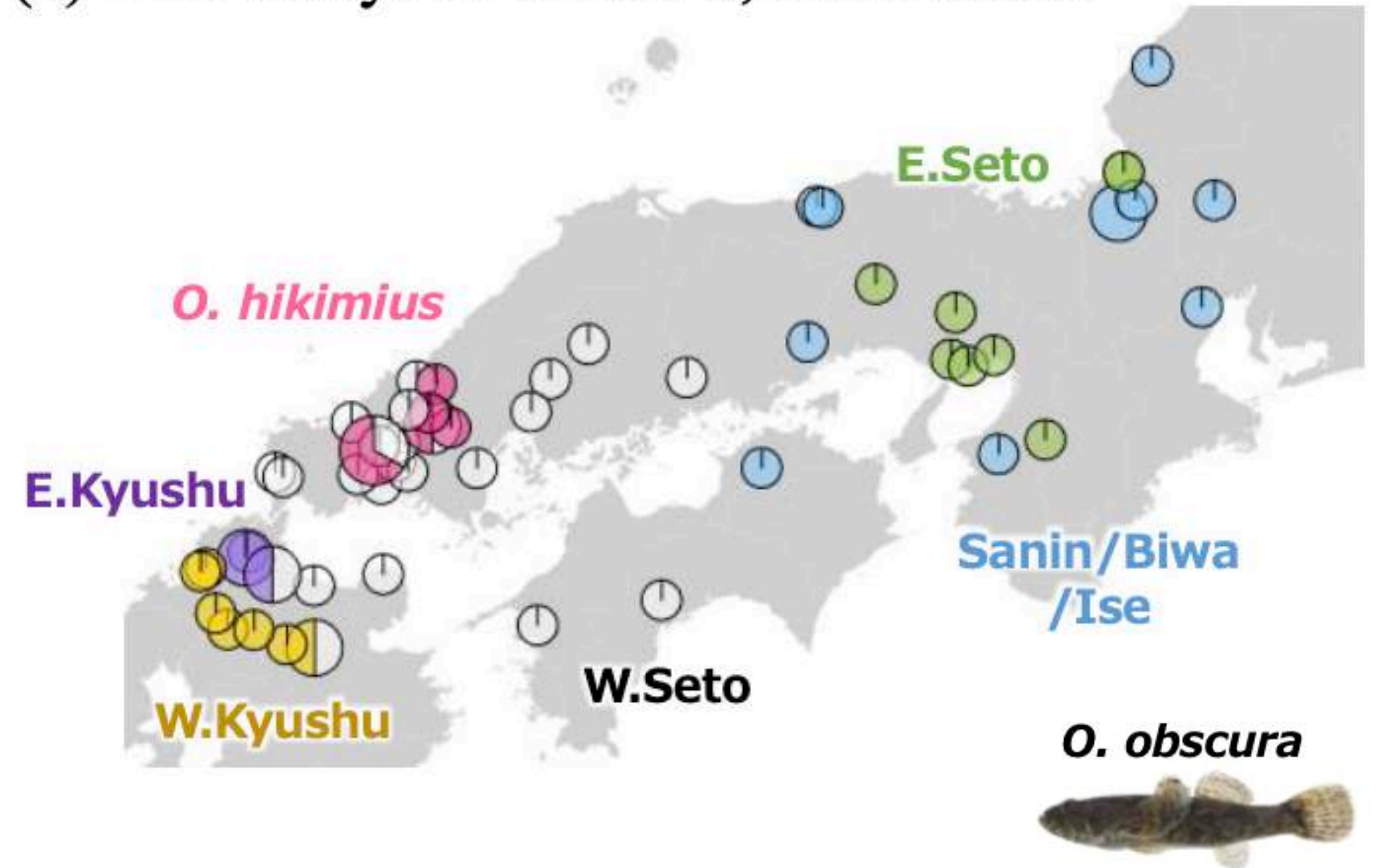
高解像度化 | Finer resolution

Genetic variation

Tsuji et al. (2022) *bioRxiv*



(a) This study: *O. obscura*, *O. hikimius*



小型化・高速化 | Portable tools, Real-time monitoring

PicoGene (PCR1100)



NSG GROUP

2018-12-11 17:23

測定時間: 00:00 測定完了: 00:00

CE: 23.0 24.0 24.0

10 20 30 40 50

CANCEL OK

START

軽量・コンパクトなモバイル リアルタイムPCR
その場で、スピードDNA分析

ご購入・お問い合わせ

The image shows a hand holding a white and blue PicoGene (PCR1100) device. The device has a color LCD screen displaying a real-time PCR amplification curve with three colored lines (red, green, blue) rising over time. The screen also shows the date and time (2018-12-11 17:23), measurement time (測定時間: 00:00), and completion time (測定完了: 00:00). Below the screen are several control buttons: CANCEL, OK, a directional pad (up, down, left, right), and a START button. The background of the advertisement is a dark, misty landscape with mountains.

パシフィックコンサルタンツ・ゴーフォトン・日本板硝子

<https://edna.biz/>

まとめ | Summary

環境 DNA 分析 | Environmental DNA analysis

1. 全ての生物を同一の方法で検出しうる革新的技術

An innovative method to monitor ecological communities

2. サンプル取得・ラボ実験・配列解析・統計解析、など必要とされる技術が幅広い

Requires a wide range of expertise

3. 各ステップにフォーカスした研究を行うにしても、他のステップで何が行われているかの理解はある程度必要

Need to understand overall workflow

4. 工学的技術・シーケンス技術・データ解析技術の発展に伴って、まだまだ分野が飛躍的に発達する可能性

There is room for development (both in experiments and statistical analyses)