Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費　終了研究成果報告書

4-2004　環境DNAに基づく希少種・外来種の分布動態評価技術の開発と実践
（ＪＰＭＥＥＲＦ２０２０４００４）

令和２年度～令和４年度

Development and Application of Environmental DNA techniques for Evaluating Distribution and Population Status of Rare/Invasive Species

〈研究代表機関〉
北海道大学

〈研究分担機関〉
龍谷大学
大阪大谷大学
京都大学
愛媛大学

○図表番号の付番方法について
「Ⅰ．成果の概要」の図表番号は「０．通し番号」としております。なお、「Ⅱ．成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。
「Ⅱ．成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号．通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和５年５月

目次

Ⅰ．成果の概要　・・・・・・・・　1
１．はじめに（研究背景等）
２．研究開発目的
３．研究目標
４．研究開発内容
５．研究成果
５－１．成果の概要
５－２．環境政策等への貢献
５－３．研究目標の達成状況
６．研究成果の発表状況
６－１．査読付き論文
６－２．知的財産権
６－３．その他発表件数
７．国際共同研究等の状況
８．研究者略歴

Ⅱ．成果の詳細
Ⅱ－１　生物量・時系列動態・種内変異の情報統合とそれに基づく対策優先度評価手法の確立　・・・・・・・・　16
（国立大学法人北海道大学）
要旨
１．研究開発目的
２．研究目標
３．研究開発内容
４．結果及び考察
５．研究目標の達成状況
６．引用文献

Ⅱ－２　希少種・外来種の生物量推定精度推定と琵琶湖水系を中心とした実践的検証　・・・・・・・・　31
（学校法人龍谷大学）
要旨
１．研究開発目的
２．研究目標
３．研究開発内容
４．結果及び考察
５．研究目標の達成状況
６．引用文献

Ⅱ－３　希少種・外来種の種内変異解析手法の確立　・・・・・・・・　46

（学校法人大谷学園大阪大谷大学）
要旨
７．研究開発目的
８．研究目標
９．研究開発内容
１０．　結果及び考察
１１．　研究目標の達成状況
１２．　引用文献

Ⅱ－４　環境水・水圏堆積物コアの解析を組み合わせた希少種・外来種の時系列解析手法の確立 ・・・・・・・・ 59
（国立大学法人京都大学、国立大学法人愛媛大学）
要旨
７．研究開発目的
８．研究目標
９．研究開発内容
１０．　結果及び考察
１１．　研究目標の達成状況
１２．　引用文献

Ⅲ．研究成果の発表状況の詳細 ・・・・・・・・ 73

Ⅳ．英文Abstract ・・・・・・・・ 81

Ⅰ．成果の概要

課題名　　4-2004　環境DNAに基づく希少種・外来種の分布動態評価技術の開発と実践

課題代表者名 荒木　仁志　（国立大学法人　北海道大学大学院農学研究院　動物生態学研究室教授）

重点課題　　主：【重点課題⑬】生物多様性の保全に資する科学的知見の充実や対策手法の技術開発に向けた研究

副：【重点課題⑭】生態系サービスの持続的な利用やシステム解明に関する研究・技術開発

行政要請研究テーマ（行政ニーズ）

(4-2)　侵略的外来種の早期発見・早期防除技術等の開発
(4-4)　希少野生動植物の保全のための二次的自然の維持管理手法の検討

研究実施期間　令和２年度～令和４年度

研究経費
112,000千円（合計額）
（各年度の内訳：令和２年度：40,000千円、令和３年度：36,000千円、令和４年度：36,000千円）

研究体制
（サブテーマ１）生物量・時系列動態・種内変異の情報統合とそれに基づく対策優先度評価手法の確立（北海道大学）
（サブテーマ２）希少種・外来種の生物量推定精度推定と琵琶湖水系を中心とした実践的検証（龍谷大学）
（サブテーマ３）希少種・外来種の種内変異解析手法の確立（大阪大谷大学）
（サブテーマ４）環境水・水圏堆積物コアの解析を組み合わせた希少種・外来種の時系列解析手法の確立（京都大学）

研究協力機関
研究協力機関はない。

本研究のキーワード　環境DNA、希少種、外来種、個体群動態、遺伝的多様性

１．　はじめに（研究背景等）

生態系サービスを支える生物多様性と地域生態系の健全な維持管理は、国連が掲げる持続可能な開発目標（SDGs）の根幹を成している。しかしながら、捕獲調査に基づく現行の生物多様性評価手法は経費・労力等の制約から局所的・限定的にならざるを得ず、希少種・外来種対策の適切な優先度選定を困難にしている。

近年開発され、次世代の生態学ツールとして脚光を浴びる「環境DNA技術」は、この問題への有効な解決手段となり得る。環境DNAとは、環境媒体（河川水、土壌、空気等）に含まれる生物由来のDNAを指す。これまで我々が実施してきた環境研究総合推進費研究（4RF-1302、4-1602）等により、環境DNAに基づく種特異的検出法や多種を同時検出する環境DNAメタバーコーディング法は飛躍的な進歩を遂げてきた。

一方で環境DNAを用いた希少種・外来種のモニタリングや生物多様性評価には様々な課題が残されている。例えば河川水由来のDNAの場合、環境要因により拡散・分解速度が変動するため、DNA量に基づく生物量推定には現状10倍以上の誤差が生じると考えられているが、その精度が適切に検証されているとは言い難い。また希少種のように生息密度の低い生物種においては環境DNA濃度が検出限界を下回る可能性が高いうえ、既存の環境DNA技術では遺伝的多様性の低下に伴う絶滅リスクの上昇を把握できない。更にスナップショットとしての在不在情報だけでは時系列動態が掴めず、その情報のみから保護・駆除の優先種や優先地域を特定するのは難しい。

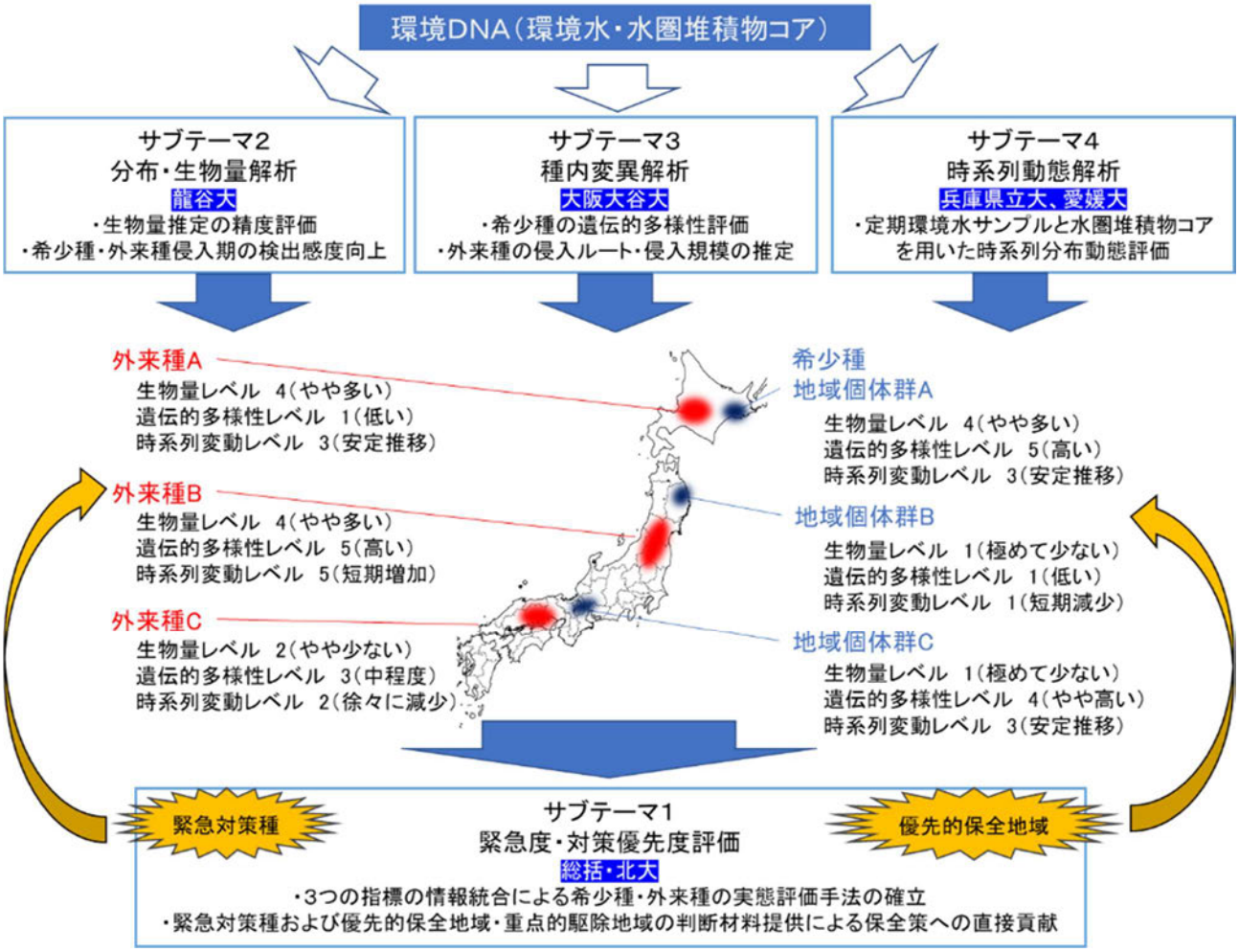

図１　本プロジェクトの目的と概要

２．　研究開発目的

そこで本研究プロジェクトでは、種レベルでの希少種・外来種の生物量推定精度の検証と手法改良に加え、環境DNAを用いて種内変異と集団遺伝構造を解析する技術を開発・改良し、希少種・外来種の現在の生物量のみならず、希少種の遺伝的多様性レベルや外来種の侵入経路等の情報を加味した対策優先度の決定を可能にする技術開発を目的とした（図１）。更に従来の環境水に加え、より長期的な生物動態を反映し得る水圏堆積物コアを用いた環境DNA解析を組み合わせることにより、時系列に沿った個体群動態情報を得ることを目指した。生物量、遺伝的多様性と時系列動態の情報統合を行うことで、希少種の絶滅リスクや外来種分布拡大等の実態をより効率的かつ正確に把握でき、緊急対策を要する種や保全・駆除優先地域をより的確に選定することが可能となる。

３．研究目標

全体目標	本研究の最終目標は、環境DNA技術を用いて希少種・外来種の分布・動態や種内変異に関する情報を多次元的に収集し、それらを統合することで個々の希少種・外来種問題に対する対策優先度を科学的に評価する方法を提案することにある。環境DNA技術を用いた希少種の研究手法についてはすでに検討が始まりつつあるが、種内変異や時系列を含めた解析により、希少種保全の優先度評価がより頑強かつ明確になることが期待される。また外来種についても環境水・水圏堆積物コアサンプル由来の環境DNA解析を組み合わせることにより、既存の環境DNA技術では把握できなかった時系列動態に関する情報を得ることが出来る。そのため、希少種・外来種に特化した生物量推定手法の精度検証および改良を実施しつつ、これを種内変異に応用した集団遺伝解析、同所的な環境水・水圏堆積物コアサンプルの分析からの時系列解析を行い、これらを統合した対策優先度評価手法の確立を目指す。

サブテーマ１	生物量・時系列動態・種内変異の情報統合とそれに基づく対策優先度評価手法の確立
サブテーマリーダー/所属機関	荒木仁志／北海道大学
目標	各サブテーマを有機的に結合させ、環境DNA解析から生物量・時系列動態・種内変異に関する情報を取得し、それらを統合する形で対策優先度を評価する手法を確立する。また北海道をはじめ、全国の希少種・外来種に関する環境DNA調査を実践することで、この手法の制約・問題点の解消と社会実装を実現する。

サブテーマ２	希少種・外来種の生物量推定精度推定と琵琶湖水系を中心とした実践的検証
サブテーマリーダー/所属機関	山中裕樹／龍谷大学
目標	生物量推定の精度評価を実施するとともに、希少種および外来種の検出感度向上をすすめ、環境DNA分析による生物の分布や生物量の推定の信頼性を明らかにすることで、保全の実務における当該分析技術の実用性を高める。

サブテーマ３	希少種・外来種の種内変異解析手法の確立
サブテーマリーダー/所属機関	内井喜美子／大阪大谷大学
目標	希少種および外来種の個体群遺伝構造を推定する種内変異解析手法の開発およびその野外実践を通し、個体群の遺伝的な質に基づいた保全指標を提示する。

サブテーマ４	環境水・水圏堆積物コアの解析を組み合わせた希少種・外来種の時系列解析手法の確立
サブテーマリーダー/所属機関	土居秀幸／京都大学
目標	既存の環境DNA技術では把握できなかった時系列動態に関する情報を得るため同所的な環境水・水圏堆積物コアサンプルを採集し、それらのサンプルの環境DNA分析からのempirical dynamic model (EDM)などによる時系列解析を行い、これらを統合した希少種・外来種の対策優先度評価手法の確立を目指す。

４．研究開発内容

本申請研究においては、主に水圏、特に魚類に関して環境DNAを用いた４つの目標を設定した。

I)希少種・外来種の分布・生物量推定精度の検証と改良（サブテーマ２）
II)希少種・外来種の種内変異解析手法の確立（サブテーマ３）
III)環境水・水圏堆積物コアの解析を組み合わせた希少種・外来種の時系列解析手法の確立（サブテーマ４）
IV)生物量・種内変異・時系列動態の情報統合とそれに基づく対策優先度評価手法の確立（サブテーマ１）

サブテーマ２では龍谷大学の山中を中心に希少種・外来種の環境DNA同定に必須なリファレンスデータの拡充と精査を行うことで、環境DNAメタバーコーディングによる検出感度の向上を進めた。サブテーマ２ではこれに加え、文献精査とメタ解析および水槽実験によって生物量推定の精度の検証を進めた。さらに、環境DNAメタバーコーディングによる保全対象種の選定に関する方法論の提案を行った。

サブテーマ３では種内変異に注目し、大阪大谷大学の内井を中心に環境DNAを用いて１塩基からの僅かな変異を正確に判別するための技術開発を行った。また開発した技術を基に、実際に野外において種内変異を検出・解析することで、外来種における分布拡大経路推定が可能であることの実証実験を行った。

サブテーマ４では水圏の堆積物コアに注目し、京都大学の土居、愛媛大学の加を中心に生物個体群や種内変異の長期時系列動態を推定するための技術開発を行った。そのため、まず堆積物コアからDNAを抽出する手法を確立し、得られたDNAを用いて環境DNAメタバーコーディング解析に供することで過去の生物個体群・種内変異の変遷を解明することを試みた。また個体群の長期時系列動態から環境要因との因果関係を明らかにするため、モデリングを用いた因果推論手法を開発した。

サブテーマ１では北海道大学の荒木を中心にサブテーマ２－４の情報統合を目指した実践的研究を行った。過去に収集した分を含め長期にわたり蓄積した環境DNAサンプルを用い、様々な希少種・外来種について分布・個体群動態・集団遺伝構造に関する環境DNA研究を実践し、生物量・時系列動態・種内変異に関する情報を一元化した手法で有機的に結合させること、希少種・外来種

の対策優先度を議論するうえで重要な科学的根拠の提示・提案を実現させることを目指した。同時に実践の過程において生じる本手法の制約・問題点を明らかにし、改良点の選別を行った。

５．研究成果

５－１．成果の概要

本研究プロジェクトを開始したR2年4月時点において、日本産淡水魚の希少種・外来種には環境DNAでは判別の難しい種が多数存在していた。そこで本プロジェクトではまず、過去に我々が開発に携わった魚類環境DNAメタバーコーディング解析用のプライマー（MiFish[1)]）により増幅されるミトコンドリアゲノム領域において、希少種169分類群、特定外来種26分類群の種判別に必要な情報の取得・確認を行った。

はじめに、MiFish領域の塩基配列の種間での類似性を精査し、種として明瞭に独立なクラスターを形成することを判断基準として種判別が可能かどうかを検討した。新たにデータベース登録されたの塩基配列の収集に加え、組織標本の提供を受けたコシノハゼ、ゴシキタメモトハゼなど9分類群については新規に対象領域の塩基配列を決定した。その結果、今現在169+26分類群のうち134分類群についてはMiFishによる種レベルでの判別が可能で、これに加え20分類群については近縁他種と1塩基の違いしかないため種内変異に要注意ながら種判別自体は条件付きで可能な状態となった（すなわち希少種・特定外来種計195分類群中154分類群、80%が少なくとも条件付きでは種判別可能）。前者にはゴマハゼ、ミナミアシシロハゼ、後者にはアゴヒゲハゼや外来種パイクパーチが含まれる。

一方、希少種ミヤベイワナ（オショロコマの亜種）やホクリクジュズカケハゼを含む27分類群については他種と塩基配列が完全一致しており、本領域を用いた種判別が不可能であることも明らかとなった。このうちイトウやニジマス、オショロコマを含むサケ亜科魚類についてはミトコンドリア上の別領域で種判別を可能にする技術開発を行い、その有効性を実践的に確認した。現状で配列情報がない14分類群については、ドウクツミミズハゼなど絶滅の可能性が極めて高い種や偶来性の南方系魚類が大多数を占めており、コロナ禍で実現には至らなかったものの、今後東南アジア諸国を含め、国内外との連携によるリファレンス拡充を模索すべき課題といえる。

また環境DNAを用いた生物量推定精度評価についても１）河川における環境DNAの流下範囲推定、２）生物量と相関の強いパーティクルサイズ分画推定、３）生物量・環境DNA濃度相関を強める水温条件の推定、４）環境DNA検出感度最適化条件の検討、５）野外河川サンプルを用いた環境DNA検出確率の推定を行い、環境DNAに基づく生物量推定時の不確実性を精査した。１）のメタ解析の結果からは河川における環境DNAはその放出源から2km以内で川底に沈むなどしてそれより下流では殆ど検出されなくなること、平均流下距離は217.6mであることが示され[2)]、２）の水槽実験の結果からは生物量推定には3-10μmのサイズ画分が最適であることが示された[3)]。３）のモデリング解析の結果からは高温域における環境DNAの早いターンオーバーが生物量・環境DNA濃度相関を強める結果が得られた[4)]一方、体サイズや活性の違いに基づく個体間の環境DNA放出量のばらつきが環境DNA濃度による生物量推定に大きく影響することが明らかとなった。加えて４）のDNAポリメラーゼの影響評価の結果、植物プランクトンの混入に伴うPCR阻害の影響は最適なDNAポリメラーゼとPCRサイクル数の選択により、DNA配列間の増幅時のばらつきを一定のレベルに制御可能である可能性が示された。５）については石狩川水系の多数の支川から採集した国内外来種・アズマヒキガエル由来の環境DNA解析に階層的占有モデルを適用し、ろ紙２枚、各３PCR反復での検出試行により、支川単位で流域内繁殖地から放出されるアズマヒキガエルDNAについてほぼ100％の検出確率が得られることを実践的に示すことに成功した[5)]。

本研究プロジェクトの目玉の一つが環境DNA技術を希少種・外来種の種内変異解析技術の一つとして社会実装すべく昇華させることにあった。環境DNAを用いて種内変異を検出する試みは既にいくつかの先行研究事例が発表されているものの、そもそも自然界において低密度に存在することの多い

希少種由来の環境DNAは低濃度であることが予想され、かつ技術的にハードルの高い種内変異の検出には様々な障壁が予想されていた。そこで本研究プロジェクトではまず環境省により絶滅危惧IA類に指定されているホンモロコ、侵略的外来種として個体組織標本を用いた種内変異解析が進んでいるブルーギルをターゲットにした環境DNA種内変異解析手法の開発を行い、その実用性を評価したうえで他の希少種・外来種への適用を目指すこととした。

環境DNAを用いて種内変異を解析する際に最も困難なのは、種内変異と疑似多型（自然界には実在しないDNA塩基配列）を見分ける点にある。後者の多くはPCR増幅時に類似したDNA塩基配列間でキメラ配列が生成されることに由来するが[6]、このキメラ生成を抑制し、誤って生成した配列を除去する手法としてPCRサイクル数の最適化と標準DNA添加によるキメラ配列フィルタリングの手法を開発した[7]。本手法実践のために行った琵琶湖におけるホンモロコの環境DNA解析では、本種繁殖生息地13地点から合計36個の種内変異（ハプロタイプ）の検出に成功した[7]。得られたハプロタイプネットワークはどの生息地においても２つの主要な祖先型ハプロタイプを中心とした星型になっており、過去の個体群動態の変遷が本種琵琶湖個体群の種内変異に強く影響していることが明らかとなった。同時に、琵琶湖北部において遺伝的多様性の低さが認められ、本地域における保全対策の必要性が示唆された。このように、希少種の種内変異解析が、遺伝的多様性に基づく個体群の健全性評価に有用であることが実証された。

外来種ブルーギルの種内変異については先行研究における個体組織由来の集団遺伝解析から国内のハプロタイプ分布が既に明らかになっているため[8]、環境DNAを用いた種内変異解析の精度評価に好適な系となっている。近畿・中国地方の湖沼における採水調査を行い、本研究プロジェクトで開発したハプロタイプ解析手法を実践した結果、国内分布の明らかとなっている全５ハプロタイプが検出されると共に、本種の初期導入地であり供給源と考えられる琵琶湖からの距離と検出ハプロタイプ数の間に強い負の相関が検出された（図２）。この結果は、外来種がその拡散に伴い創始者効果（供給源の一部の個体・個体群が侵入先の創始者となり種内多型を規定する効果）を連続的に発揮していることを示唆しており、外来種の分布拡大経路の推定に環境DNA種内変異解析が有用となることを実証する結果となった。

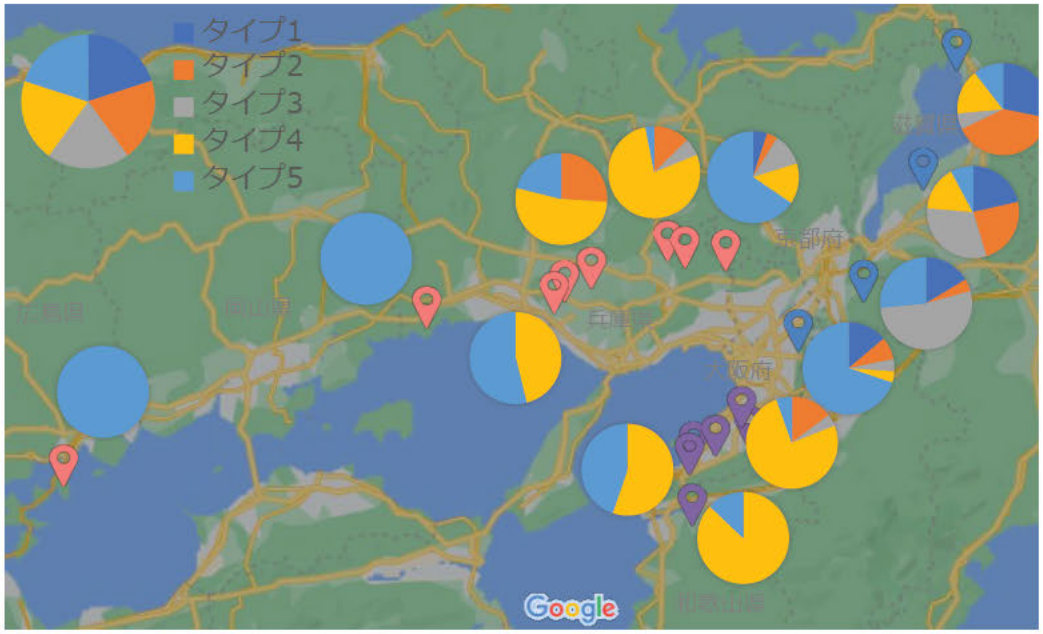

図２（図-3.10）　環境DNAから推定した琵琶湖および近畿・中国地方におけるブルーギルのハプロタイプ組成

ブルーギル研究における成功を受け、侵略的外来種として問題となっているブラックバスについて同様の試みを実施した。国内侵入が確認されているオオクチバス、フロリダバス、コクチバスの３種について本州・四国84湖沼・河川からのハプロタイプ検出を行い、うちオオクチバスについては本州56水域で日本侵入が既知の８ハプロタイプの検出がみられた。この８ハプロタイプのうち琵琶湖とその周辺では１ハプロタイプのみが検出されており、このハプロタイプが琵琶湖を供給源として周辺湖沼・河川に拡散している可能性を示唆する結果となった。フロリダバスについては、ブルーギルと同様に初期導入地からの距離に応じたハプロタイプ数の低下が認められ、さらに近年その急激な分布拡大が懸念されているコクチバスの最新分布情報の取得にも成功した。このように、環境DNA種内変異解析を用いることにより、外来種の分布状況だけでなく、分布拡大経路の推定までをも効率的に実施できることが実証された。

またイワナの一種で特殊な斑紋をもつナガレモンイワナは琵琶湖水系・姉川に生息しており、標高が高く渓相の厳しい沢に生息するためこれまで生物量や集団遺伝構造の理解が限定的であった。そこで本研究では環境DNAを用いた本種の種内変異検出系を開発し、沢の各所の水を用いて環境DNAメタバーコーディング解析に供した結果、ナガレモンイワナの生息が未知であった枝沢からの本種DNA検出がみられ、その後の捕獲調査で実際に本種の生息を確認しただけでなく、二本の源流域それぞれに固有のハプロタイプが分布している可能性を示唆した。この結果は、同じ沢の中でも源流域ごとの希少生物管理を実施する必要性を示唆している[9)]。

本研究プロジェクトのもう一つの目玉は水圏堆積物コア由来のDNA解析による周辺生物の長期時系列動態の推定である。この課題に多くの技術的課題が残されていることは自明である一方、条件が整えば過去数百年にわたる生物相の変遷や資源量動態を推定することが可能となる。そのため、我々はまず水圏堆積物コアから安定的に環境DNAを抽出する技術を開発し、これを実践すると共に、得られた時系列データからサンプリングバイアスを取り除き、CCM (Convergence cross-mapping)と呼ばれる因果推論技術の開発を行った。

水圏堆積物コア由来のDNAを抽出する方法として、環境水由来の典型的なDNA抽出法とは異なり、エタノールを用いて大容量資料からDNAを抽出する手法の開発を行った。この手法を用いた実践課題として[redacted]、琵琶湖のミジンコ・カイアシ類、別府湾のカイアシ類・スナメリ・カタクチイワシを対象とした研究を実施した。このため、各地の堆積物コアを収集すると共に各コア試料を用いた年代推定を行い、[redacted]琵琶湖では約100年、[redacted]におよぶ過去の堆積物を含むコアを入手したことが明らかとなった。またこれらのコアを用いた環境DNA解析から、[redacted]やミジンコ産卵量の激しい増減の様子が明らかとなった。

[redacted]

CCM (Convergence cross-mapping)を用いた因果推論技術開発については堆積物の堆積速度・圧縮度の違いによる時系列の幅のばらつきを考慮し、異なった時系列のコア間でも解析可能な手法の開発に成功した[10)]。この手法は堆積物コアから得られた世界中の長期的な古生態系データに適用され、海面表層の生産性より深海の水温変化が深海生態系により強く影響を与える可能性を示唆することに成功している。同時にCCMを用いた因果推論には長期的な時系列データの入手が不可欠であり、今後堆積物コアを用いた環境DNA時系列解析が個体群動態のみならず、種内変異にも適用されうる可能性も示唆された。本研究では実際に、別府湾の堆積物コアから得られたカタクチイワシの８つのハプロタイプをクラスター解析することで、これらのハプロタイプの起源に関する系統地理的解析の実現に成功している。

上記一連の技術開発に伴う実践研究として、前述したもの以外についても絶滅危惧種イトウの北海道内河川分布推定および外来種ニジマスとの分布重複[11)]、地域絶滅危惧種シシャモの生活史推定[12)]、希少種コシノハゼの分布・生物量推定、知床半島におけるオショロコマ遺伝子浸透現象の機構解明、アメリカミンク分布と魚類相・サケマス放流の関係推定、絶滅危惧種イチモンジタナゴの地域系統群検出、アカハライモリの種特異検出系の開発、オオダイガハラサンショウウオ分布推定、愛媛県・生息地復元サイトにおける保全目標種選定のための環境DNA解析[13)]、モバイルPCRによる迅速環境DNA検出法を用いた外来種ハクレンの分布推定[14)] など、研究プロジェクトとして多岐にわたる実践研究を実施し、学会・論文発表を行った。そのうち多くの学会発表がプロジェクトメンバーや所属学生らによって実施され、多数の学会発表賞を受賞している。

本研究プロジェクトの主たる目的の一つとして「個々の希少種・外来種問題に対する対策優先度を科学的に評価するための手法提案」が挙げられるが、これについては研究代表者（荒木）らが実施した北日本の溜池における外来種の既存生態系への影響評価[15)]がこの目標を達成する上で一つの答えとなるものと考えられる。本研究では秋田県・雄物川水系に点在する溜池を調査地として、外来３種（オオクチバス、カムルチー、タイリクバラタナゴ）の環境DNA検出と合わせて在来魚類相のメタバーコーディング解析を行い、これら外来種が生物多様性や在来の希少タナゴ類にどのような影響を与えているか、統計的な手法を基に議論・評価した（図４）。この研究ではスナップショット的なサンプルを使用したが、ここにサブテーマ３で開発したオオクチバスのハプロタイプ解析やサブテーマ４で開発した堆積物コアに基づく長期個体群動態解析を加え、これらの情報をLineage-level distribution model(LDM)等のモデリング手法により統合することで、これらの外来魚の相対的な影響度を客観的に評価し、それに基づく対策優先度の提言が可能になることが期待される。

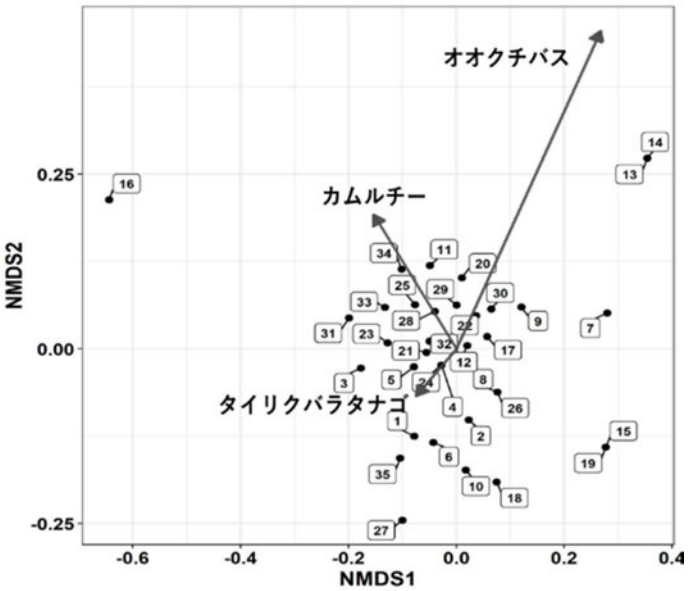

図４（図-1.8）　雄物川水系の溜池において外来３種が在来魚類相に与える影響評価

＊引用文献

1) M. MIYA, Y. SATO, T. FUKUNAGA, T. SADO, J. Y. POULSEN, K. SATO, T. MINAMOTO, S. YAMAMOTO, H. YAMANAKA, H. ARAKI, M. KONDOH and W. IWASAKI: Royal Society Open Science, 2: 150088 (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species.

2) T. JO and H. YAMANAKA: Freshwater Biology, 67: 1333-1343 (2022) Meta-analyses of eDNA downstream transport and deposition in relation to hydrogeography in riverine environments.

3) T. JO and H. YAMANAKA: Ecology and Evolution, 12: e9234 (2022) Fine-tuning the performance of abundance estimation based on environmental DNA (eDNA) focusing on eDNA particle size and marker length.

4) T. S. JO: Hydrobiologia, 850: 39-50 (2023) Correlation between the number of eDNA particles and species abundance is strengthened by warm temperature: Simulation and meta-analysis.

5) H. MIZUMOTO, O. KISHIDA, K. TAKAI, N. MATSUURA and H. ARAKI: Biological Invasions 24:1199-1211 (2022) Utilizing environmental DNA for wide-range distributions of reproductive area of an invasive terrestrial toad in Ishikari river basin in Japan.

6) J. M. KEBSCHULL and A. M. ZADOR: Nucleic Acids Research, 43, 1-15 (2015) Sources of PCR-induced distortions in high-throughput sequencing data sets.

7) K. WAKIMURA, K. UCHII and T. KIKKO: Environmental DNA, 00, 1-14 (2023) Evaluation of genetic diversity in an endangered fish *Gnathopogon caerulescens* using environmental DNA and its potential use in fish conservation.

8) K. KAWAMURA, R. YONEKURA, O. KATANO, Y. TANIGUCHI and K. SAITOH: Molecular Ecology, 15, 613-621 (2006) Origin and dispersal of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea.

9) H. ARAKI, H. MIZUMOTO, T. KANBE, J. TSUBOI, K. MORITA, K. SUGIHARA, M. HATANO and T. KIKKO: Environmental DNA *submitted.* An eDNA survey on mtDNA haplotypes of Nagaremon-charr, a threatened morphotype of *Salvelinus leucomaenis*

10) H. DOI, M. YASUHARA and M. USHIO: Biology Letters 17: 20200666 (2021) Causal analysis of the temperature impact on deep-sea biodiversity.

11) T. KANBE, H. MIZUMOTO, N. NAKAJIMA and H. ARAKI: Aquatic Conservation *submitted.* Profound understanding of the distribution of Sakhalin taimen in Hokkaido, the second-largest main island in Japan.

12) T. YATSUYANAGI and H. ARAKI: PLOS ONE 15: e0239912 (2020) Understanding seasonal

migration of Shishamo smelt in coastal regions using environmental DNA.

13) G. ITO, H. YAMAUCHI, M. SHIGEYOSHI, K. ASHINO, C. YONASHIRO, M, ASAMI, Y. GOTO, J. J. DUDA and H. YAMANAKA: Global Ecology and Conservation 43: e02448 (2022) Using eDNA metabarcoding to establish targets for freshwater fish composition following river restoration.

14) H. DOI, T. WATANABE N. NISHIZAWA, T. SAITO, H. NAGATA, Y. KAMEDA, N. MAKI, K. IKEDA and T. FUKUZAWA: Molecular Ecology Resources 21:2364-2368 (2021) On-site eDNA detection of species using ultra-rapid mobile PCR.

15) 小粥淳史，八柳哲，神戸崇，井上頌子，荒木仁志： 保全生態学研究(2023) 環境DNAメタバーコーディングを用いた北日本の溜池における外来魚の影響評価 *In Press*

５－２．環境政策等への貢献

＜行政等が既に活用した成果＞

研究分担者（土居）は環境省生物多様性センターの検討委員を務めており、絶滅危惧種分布重要地域抽出のための環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の標準化・一般化に関する検討会において本研究プロジェクトの成果を共有、2022年6月発行の「環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き」改訂第2版「MiFish法に係る誤同定チェックシート」の作成に貢献した。

また研究代表者（荒木）がアドバイザーを務める知床世界自然遺産地域科学委員会・河川工作物アドバイザー会議において、本研究成果の一つである環境DNAメタバーコーディング解析結果を紹介し、行政判断の科学的根拠として本技術に基づくデータ収集を提案した。その結果、2022年より10年にわたり実施中の第二期長期魚類モニタリング計画において環境DNA調査をその中核に置くことを決定し、知床半島全域の約40河川で高頻度・高密度な採水を行い、絶滅危惧種オショロコマ、侵略的外来種ニジマスをはじめとするサケ科魚類の個体群動態を把握可能なモデリング計画の作成に貢献した。またこれらの成果は2022年3月15日に行われたシンポジウム「科学者が見てきた知床の今と昔」における招待講演で一般公開され、本研究プロジェクトの成果の一つとして産官学連携にも貢献した。

＜行政等が活用することが見込まれる成果＞

環境省自然環境局・生物多様性センターとはウェブ会議等を通して情報共有・意見交換を実施しており、環境DNAメタバーコーディング解析時の種判別に必須な希少種・外来種のDNAデータベース充実のための有機的な連携を進めている。またサブテーマ１で掲げた情報統合、対策優先度評価指標の確立が環境保護政策重点地域はもとより、広く地域ベースの保全手段（OECM）の一つとして活用が見込まれる、との提言を受けている。

また種内変異の環境DNA解析を社会実装することにより、外来種の侵入ルートの逆算的推定や希少種分布を含む「本来の生物多様性復元」に向けた学術的根拠を提供することが可能になるものと期待されている。国や地方自治体、市民連携型環境保全政策の策定にも上記指標の活用が期待される。

サブテーマリーダー全員が理事・監事を務める環境DNA学会では、環境DNA技術の標準化を目指してマニュアルを一般公開・更新しているほか、荒木（研究代表者）は同学会の2021年大会大会長、および持続可能な地球社会の実現をめざす国際協働研究プラットフォームFuture Earthネッ

トワークの一つであるEvolvES（旧bioGENESIS）のメンバーとして、環境DNA技術に基づく種内多型解析の国際的な連携を実施している。更に荒木は北太平洋溯河性魚類委員会（NPAFC）と国際サーモン年（IYS）の協同調査ワーキンググループに属しており、2022年冬季に実施された北太平洋網羅的環境DNA観測にも貢献している。また土居（サブテーマリーダー）は、IUCN （国際自然保護連合）の生物モニタリング検討グループのメンバーとして参画しており、今後の世界的な環境DNAモニタリング手法の構築に貢献しているほか、山中（サブテーマリーダー）は環境DNA分析の専門学術雑誌であるEnvironmental DNA (Wiley社)のAssociate Editorを創刊当初から務めており、環境DNA学会と当該雑誌との連携を担い、国内における環境DNA分析の進展の国外への発信に貢献している。

５－３．研究目標の達成状況

全体目標	目標の達成状況
本研究の最終目標は、環境DNA技術を用いて希少種・外来種の分布・動態や種内変異に関する情報を多次元的に収集し、それらを統合することで個々の希少種・外来種問題に対する対策優先度を科学的に評価する方法を提案することにある。環境DNA技術を用いた希少種の研究手法についてはすでに検討が始まりつつあるが、種内変異や時系列を含めた解析により、希少種保全の優先度評価がより頑強かつ明確になることが期待される。また外来種についても環境水・水圏堆積物コアサンプル由来の環境DNA解析を組み合わせることにより、既存の環境DNA技術では把握できなかった時系列動態に関する情報を得ることが出来る。そのため、希少種・外来種に特化した生物量推定手法の精度検証および改良を実施しつつ、これを種内変異に応用した集団遺伝解析、同所的な環境水・水圏堆積物コアサンプルの分析からの時系列解析を行い、これらを統合した対策優先度評価手法の確立を目指す。	目標を大きく上回る成果をあげた 環境DNAメタバーコーディングにおける魚類希少種・外来種の検出精度・種判別能は本研究開始当時、多大な不確実性を有していた。本研究を通し環境DNA・生物量相関の不確実性の程度とその由来が明らかになり、より正確に生物量を推定するための具体的な対策も明らかになりつつある。これは希少種・外来種を対象とした環境DNA調査を社会実装するうえで大変大きな進展といってよい。 加えて環境DNA技術の種内変異解析・堆積物コア解析への応用も予定通り実現し、野外調査に適用することでその有効性を検証することができた。またプロジェクトメンバーによる開発技術の実践研究も多岐にわたり、開発した技術が個々の希少種保全・外来種管理に貢献するだけでなく、その対策優先度決定に不可欠な科学的根拠を提供することも具体的に示すことが出来た。 これらの成果は毎回100-300名の参加者を集め3年連続で実施した一般公開シンポジウムでも紹介され、その活用に向けた活発な議論が行われた。またこの研究成果は環境DNA学会において標準化技術の一部として取り入れられており、学術論文はもとより、和文入門書としても出版・紹介されている。加えて日本生態学会をはじめとする様々な学会で研究発表を行い、その多くで最優秀発表賞を受賞している。これらのことから、本研究プロジェクトが当初予定していた目標を大きく上回る成果を挙げたものと確信している。

サブテーマ１目標	目標の達成状況
各サブテーマを有機的に結合させ、環境DNA解析から生物量・時系列動態・種内変異に関する情報を取得し、それらを統合する形で対策優先度を評価する手法を確立する。また北海道をはじめ、全国の希少種・外来種に関する環境DNA調査を実践することで、この手法の制約・問題点の解消と社会実装を実現する。	目標を大きく上回る成果をあげた 本研究期間に収集したサンプルに加え、研究室で過去に収集した時系列環境DNAサンプルの分析や種内多型解析、サケ亜科種判別技術の開発・改良に成功し、多数の学術論文・学会発表、国民との対話や世界自然遺産・知床における長期環境DNAモニタリング計画を実現することに成功した。また解析面でも種内変異解析を応用して自然界での遺伝子浸透を河川水から高精度に推定する技術や環境DNA検出精度の定量化、複数外来種の相対影響度評価手法の確立に成功するなど、対策優先度を科学的に評価する技術開発にも成功している。

サブテーマ２目標	目標の達成状況
生物量推定の精度評価を実施するとともに、希少種および外来種の検出感度向上をすすめ、環境DNA分析による生物の分布や生物量の推定の信頼性を明らかにすることで、保全の実務における当該分析技術の実用性を高める。	目標を大きく上回る成果をあげた 重要な目標であった希少種・外来種に指定されている淡水魚類のリファレンスデータ（ミトコンドリア12S領域）の拡充と精査を終えることができ、また、希少種のための種特異的検出系を複数設計し、その生息地探索を実行できた。生物量の推定精度の評価では、コロナ禍で手法の変更をしたものの、それによってケーススタディではないより一般的な知見を得ることができ、今後さらに生物量推定の精度を向上させるための注意点や着目点を示すことができた。さらに、生息地新規造成の実例において、環境DNA分析を実用して定着を目指す対象種（分散を期待する在来種）の選定する方法論を提案した。以上のように、環境DNA分析の信頼性向上に寄与する基礎的な成果から、実務における利用法の提案まで、多くの成果を挙げた。

サブテーマ３目標	目標の達成状況
希少種および外来種の個体群遺伝構造を推定する種内変異解析手法の開発およびその野外実践を通し、個体群の遺伝的な質に基づいた保全指標を提示する。	目標を大きく上回る成果をあげた。 希少種については、１～数塩基の遺伝変異の正確な判別を可能とする種内変異解析手法の開発に成功し、その野外実践により包括的な遺伝的多様性評価を実現しただけでなく、遺伝的多様性が個体群の健全性の指標となることを見出した。外来種については、種内変異解析より得られるハプロタイプ組成情報が、分布拡大経路の指標として利用

	できることを実証した。開発したアプローチ法は、水棲の希少種・外来種に広く適用でき、迅速・網羅的かつ持続可能なモニタリング法として実用化できるレベルに到達していることから、上記の評価とした。

サブテーマ４目標	目標の達成状況
既存の環境DNA技術では把握できなかった時系列動態に関する情報を得るため同所的な環境水・水圏堆積物コアサンプルを採集し、それらのサンプルの環境DNA分析からのempirical dynamic model (EDM)などによる時系列解析を行い、これらを統合した希少種・外来種の対策優先度評価手法の確立を目指す。	目標を大きく上回る成果をあげた 特に堆積物DNAからの希少種・外来種の生物個体群や種内変異の時系列動態を復元する手法、またそれを時系列解析する手法を開発した。特に、絶滅危惧種であるスナメリや琵琶湖の外来種・在来種の個体群動態の解明によって、本サブテーマの目標であった希少種・外来種の時系列動態の復元の可能性を示せたことは大きな前進であった。また、種内多型についても、本研究テーマで独自に検出系を開発し、過去数百年にわたる種内多型の動態を鮮明に明らかにできることがわかり始めた。さらには、モバイルPCRによる迅速な外来種検出、堆積物からの環境DNA分析手法に関わる、DNA抽出やメタバーコーディング手法について開発を行ない、これまでよりもはるかに堆積物DNAを活用できる環境を整備できた。これらのことから、目標を大きく上回る成果をあげたものと判断した。

６．研究成果の発表状況

６－１．査読付き論文

＜件数＞

21件

＜主な査読付き論文＞

1) 近藤倫生，土居秀幸　編「環境DNA　―生態系の真の姿を読み解く」共立出版（2021）

2) T. MINAMOTO, M. MIYA, T. SADO, S. SEINO, H. DOI, M. KONDOH, K. NAKAMURA, T. TAKAHARA, S. YAMAMOTO, H. YAMANAKA, H. ARAKI, W. IWASAKI, A. KASAI, R. MASUDA and K. UCHII: Environmental DNA 3: 8-13 (2021) (IF：6.9) An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols.

3) H. MIZUMOTO, T. MITSUZUKA and H. ARAKI: Frontiers in Ecology and Evolution 8: 569425 (2020) (IF：4.493) An environmental DNA survey on distribution of an endangered salmonid species, *Parahucho perryi*, in Hokkaido, Japan.

4) H. MIZUMOTO, O. KISHIDA, K. TAKAI, N. MATSUURA and H. ARAKI: Biological Invasions 24:1199-1211 (2022) (IF：3.606) Utilizing environmental DNA for wide-range distributions of reproductive area of an invasive terrestrial toad in Ishikari river basin in Japan.

5) G. ITO, H. YAMAUCHI, M. SHIGEYOSHI, K. ASHINO, C. YONASHIRO, M, ASAMI, Y. GOTO, J. J. DUDA and H. YAMANAKA: Global Ecology and Conservation 43: e02448 (2022) (IF：3.97) Using eDNA metabarcoding to establish targets for freshwater fish composition following river restoration.

6) T. JO and H. YAMANAKA: Ecology and Evolution 12: e9234 (2022) (IF：3.167) Fine-tuning the performance of abundance estimation based on environmental DNA (eDNA) focusing on eDNA particle size and marker length.

7) K. UCHII, K. WAKIMURA, T. KIKKO, R. YONEKURA, R. KAWAGUCHI, H. KOMADA, H. YAMANAKA, T. KENZAKA and K. TANI: Limnology 23, 49-56 (2022) (IF：2.156) Environmental DNA monitoring method of the commercially important and endangered fish *Gnathopogon caerulescens*.

8) K. WAKIMURA, K. UCHII and T. KIKKO: Environmental DNA 00, 1-14 (2023) (IF：6.9) Evaluation of genetic diversity in an endangered fish *Gnathopogon caerulescens* using environmental DNA and its potential use in fish conservation.

9) H. DOI, M. YASUHARA and M. USHIO: Biology Letters 17: 20200666 (2021) (IF：3.904) Causal analysis of the temperature impact on deep-sea biodiversity.

10) K. NAKANE, X. LIU, H. DOI, G. DUR, M. KUWAE, S. BAN and N. TSUGEKI: Freshwater Biology (2023) (IF：3.835) Sedimentary DNA can reveal past pelagic copepod population dynamics. online available

６－２．知的財産権

特に記載すべき事項はない。

６－３．その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表（査読なし）	6件
口頭発表（学会等）	42件
「国民との科学・技術対話」の実施	13件
マスコミ等への公表・報道等	14件
本研究費の研究成果による受賞	13件
その他の成果発表	2件

７．国際共同研究等の状況

Louis Bernatchez教授（カナダ・Laval大学）は2021年11月20日、研究代表者（荒木）が主催した環境DNA学会第四回大会においてプレナリーセッションを担当、環境DNA技術の生物分布推定から種内変異に基づく集団遺伝学的解析への応用可能性について講演を行った。なお、サブテーマリーダー全員が設立理事（現理事・監事）を務める環境DNA学会（The eDNA Society）は、環境DNA技術の基礎・応用研究および普及・教育に関する世界初の学会組織で、Bernatchez教授は国際学術誌 Environmental DNAの編集長も務めており、同誌にはサブテーマリーダー（山中）もエディターとして参画している。Bernatchez教授とはこれらのネットワークを介して緊密な連携を図っているほか、上記大会の概要はコメンタリー論文の形で同誌に掲載済となっている（Araki, Kanbe, Yamanaka et al. 2022）。これらの活動が本研究の成果の一つである最先端環境DNA技術の世界的な普及と標準化に資することは疑う余地がない。

また、研究代表者（荒木）は国際協働研究プラットフォームFuture Earthネットワークの一つであるEvolvESの主要構成員の一人となっており、環境DNA技術に基づく種内多型解析の国際的な連携において主導的な役割を果たしている(https://futureearth.org/networks/global-research-networks/evolves/)。荒木はまた2019年8月に札幌で主催した日本進化学会において本組織の前・現構成員であるAndrew Hendry教授（カナダ・McGill大学）とLuc De Meester教授（ベルギー・Leuben大学）を招聘し、基調講演の座長を務めるなど国際連携を図っており、2023年度にはサバティカル制度を利用してHendry教授の研究室での環境DNAを用いた種内変異解析に関する共同研究を予定している。

留学生との共同研究：
Abigail Chukwu（ナイジェリア）　北海道大学農学研究院・英語特別コースプログラムにおいて2023年3月、修士号を取得。研究代表者（荒木）が指導教員となり、本研究プロジェクトの一部を担当。同年4月からは研究代表者指導の下、博士後期課程に進学している。

８．研究者略歴

研究代表者：荒木　仁志
九州大学大学院医学系研究科修了、博士（理学）、現在、北海道大学大学院農学研究院教授
研究分担者：
1）山中　裕樹
京都大学大学院理学研究科修了、博士（理学）、現在、龍谷大学先端理工学部准教授
2）内井　喜美子
京都大学大学院理学研究科修了、博士（理学）、現在、大阪大谷大学薬学部助教
3）谷　佳津治
大阪大学大学院薬学研究科修了、博士（薬学）、現在、大阪大谷大学薬学部教授
4）見坂　武彦
大阪大学大学院薬学研究科修了、博士（薬学）、現在、大阪大谷大学薬学部准教授
5）土居　秀幸
東北大学大学院生命科学研究科修了、博士（生命科学）、現在、京都大学大学院情報学研究科教授
6）加　三千宣
大阪市立大学大学院理学研究科修了、博士（理学）、現在、愛媛大学沿岸環境科学研究センター准教授

Ⅱ．成果の詳細

Ⅱ－１　生物量・時系列動態・種内変異の情報統合とそれに基づく対策優先度評価手法の確立

国立大学法人北海道大学
大学院農学研究院　動物生態学研究室　　荒木　仁志

［要旨］

本サブテーマでは希少種・外来種の環境DNA研究実践を通して生物量・時系列動態・種内変異の情報統合とそれに基づく対策優先度評価手法を確立し、環境DNA技術を社会問題解決に役立つ技術として社会実装に近づけることを目標とした。まず技術開発として既存の環境DNA技術が不得手としていたサケ科の網羅的種判別を実現するメタバーコーディングプライマーの開発に成功し、また国内外来種アズマヒキガエルを例に占有モデルを用いた環境DNA検出精度の定量化に成功した。加えて実践研究として絶滅危惧種（イトウ、コシノハゼ、シシャモ、オショロコマ、ナガレモンイワナ）や外来種（ニジマス、オオクチバス、カムルチー、タイリクバラタナゴ、アズマヒキガエル、アメリカミンク）に関する分布とその制限要因、個体群動態や種間相互作用、ひいては種内多型分布の推定を行うことで、目標としていた科学的で包括的な希少種・外来種の対策優先度指標化への道筋を明確にすることに成功した。

これらの開発技術や実践研究の一部については執筆者として貢献し、好評につき増刊も決定している一般向け和書「環境DNA　―生態系の真の姿を読み解く（近藤・土居編、2021、共立出版）」[1)]でも紹介したほか、技術面では環境DNA学会が公開している標準化マニュアル[2)]にも反映されている。加えて研究代表者（荒木）が大会長として主催した環境DNA学会第四回大会[3)]やサブテーマリーダー全員が参加し毎年実施した一般公開イベントを通し、研究者のみならず広く一般の国民とも情報共有を図ることで社会実装の基盤育成に貢献した。なお、本プロジェクトの共同研究を行った学生らが多数学会発表賞を受賞しており（例：日本生態学会2023英語発表最優秀賞[八柳]・2023最優秀ポスター賞[松浦]、環境DNA学会ポスター発表2022最優秀賞[八柳]［加藤］［小澤］・2021優秀賞[池田]、サケ学研究会2022サケ科学奨励賞[小澤]など）、八柳は日本学術振興会研究員にも選出されるなど次世代を担う若手研究者の育成にも貢献している。

１．研究開発目的

河川・湖沼の水や堆積物に含まれる周辺生物由来のDNA（環境DNA）を分析することで生物分布を推定する環境DNA技術は、現場作業が比較的簡便な調査手法として世界的に広く普及しつつある。一方でその生物分布・生物量推定には精度の面で様々な制約が指摘されており、社会実装の障害となっている。また環境DNAから得られる情報には種内変異や長期にわたる生態系変動も含まれており、これらを包括的に分析する技術の開発が急務となっている。

そこで本サブテーマでは環境DNA解析から生物量・種内変異・時系列動態に関する情報を取得し、それらを統合するための基盤となる研究および技術開発を目指す。このため北海道・北日本を中心に環境DNAサンプル収集を行うと共に、既に研究代表者（荒木）らが過去に収集し保管中の環境DNAサンプルについてもDNA分析を行い、希少種・外来種検出の実践と種内変異、長期個体群動態推定への応用可能性について精査する。研究開発内容と結果・考察については以下、項目ごとに記述する。

(1)陸水域を対象とした希少種・外来種の生物分布推定と精度検証

- (1)－１．環境DNAプライマーを用いた希少種・外来種分布推定の精度向上
- (1)－２．MiFishを用いた希少種コシノハゼ分布推定の実践
- (1)－３．環境DNAを用いた絶滅危惧種イトウと外来種ニジマスの分布重複推定
- (1)－４．水産有用種シシャモの絶滅の恐れのある地域個体群における時空間分布推定

(1)－５．北日本の溜池における生物群集への外来魚の影響評価
(1)－６．国内外来種アズマヒキガエルの繁殖地推定と精度検証
(1)－７．知床半島における外来種アメリカミンクの生息域推定

(2)環境DNA技術を用いた種内多型の検出と長期動態解析への応用・実践
(2)－１．種内多型に基づく絶滅危惧種オショロコマの遺伝子浸透率推定法の開発
(2)－２．ナガレモンイワナ（特殊斑紋型集団）におけるハプロタイプ多様性の推定

２．研究目標

各サブテーマを有機的に結合させ、環境DNA解析から生物量・時系列動態・種内変異に関する情報を取得し、それらを統合する形で対策優先度を評価する手法を確立する。また北海道をはじめ、全国の希少種・外来種に関する環境DNA調査を実践することで、この手法の制約・問題点の解消と社会実装を実現する。

３．研究開発内容

本サブテーマでは環境省レッドリストに掲載されている魚類・絶滅危惧種169種および特定外来種26種について、サブテーマ２，４と共同でIn SilicoにおけるDNA塩基配列データベースと環境DNAマーカーの整合性検証を行った。また北海道の希少種であるイトウ・オショロコマ・シシャモ、イシカリワカサギ、本州に生息する希少種コシノハゼ・ゼニタナゴ・イワナ、外来種としてニジマス・オオクチバス・アズマヒキガエル・アメリカミンク・ヌマエビ等を主な対象種として、独自開発したプライマー等を用いた環境DNA検出系の確立と実践により、これら生物の時空間分布やその制限要因、季節動態を推定する解析を行い、対策優先度の評価基準策定に資する研究を行った。

(1)陸水域を対象とした希少種・外来種の生物分布推定と精度検証

(1)－１．環境DNAプライマーを用いた希少種・外来種分布推定の精度向上

研究代表者（荒木）らが魚類相推定のためにかつて開発した魚類ユニバーサルプライマー、MiFish-U[4)]はその高い機能性が評価され、環境DNAメタバーコーディングによる魚類相推定の標準ツールとして世界中で活用されている。一方で希少種・外来種の解析には環境DNAとして得られる短いDNA断片から種内変異の範囲を超えた高い種判別能が求められており、誤同定を防ぐために更なる技術開発が求められている（環境省・生物多様性センター・ホームページ「環境DNA調査」参照。https://www.biodic.go.jp/edna/edna_top.html）。

そこで本サブテーマではIUCNレッドリストでCRに位置付けられている絶滅危惧種イトウ（*Parahucho perryi*）や侵略的外来種ニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）を含むサケ科魚類に注目し、進化の歴史が比較的短く塩基置換の蓄積が限定的であるためMiFish-Uでは判別の難しい日本国内に生息するサケ亜科を正確かつ網羅的に判別可能なプライマーの開発を行った。

(1)－２．MiFishを用いた希少種コシノハゼ分布推定の実践

環境省レッドリスト2020において絶滅危惧IA類（CR）に指定されているコシノハゼ（*Gymnogobius nakamurae*）については未だMiFish-Uプライマーによる DNA増幅配列がデータベース登録されておらず、リファレンスとしての活用が出来ていない。そこで本種について、飼育展示を実施している新潟市水族館マリンピアの協力を得て冷凍保存個体からのDNA抽出を行い、DNA増幅配列の解読を行った。また得られたリファレンス配列を用いて、新潟県・山形県・秋田県・青森県におけるコシノハゼ自然分布に関する環境DNA調査を実施した。採水・濾過については基本的に採水現場においてフィルターカートリッジSterivex-HV （ポアサイズ0.45μm、メルクミリポア社）を用い、フィルターあたり500mlの環境水をろ過後、DNA保存剤として2mLの

RNAlater（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を充填、冷暗条件で研究室へ輸送した。その後のDNA分析については環境DNA学会の標準化マニュアル[2)]に準拠した。

(1)－３．環境DNAを用いた絶滅危惧種イトウと外来種ニジマスの分布重複推定

イトウの自然河川分布推定の第一段階として、先に開発済のイトウ種特異的検出法を用いた北海道内120河川におけるイトウDNA検出を試みた[5)]。環境水サンプルはガラス繊維ろ紙（GF/F）を用いてろ過したのち、研究室内の冷凍庫（-80度）内で保管されたものを用いた。DNeasy Blood & Tissue Kit（キアゲン社）を用いてDNA抽出を行い、q-PCRと先に独自開発した種特異的環境DNA検出プライマー[6)]を用いたイトウDNA定量検出に供した。

次に研究代表者（荒木）らが保有する北海道内約300河川の環境DNAサンプルについて、(1)－１．で開発したサケ科環境DNAメタバーコーディングプライマーSalmon-U4を用いた解析を実施した(図-1.1)。これらのサンプルは（1)－２．同様、Sterivexフィルターを用いた採水現場でのろ過を経て分析を行うまで研究室内の冷凍庫で保管されていた。DNA抽出等は環境DNA学会の標準化マニュアル[2)]に準拠し、ネガティブコントロールとして10地点に1回程度、精製水をろ過したサンプルを作製した。

前者の種特異的検出法ではイトウのみが検出種として判別可能だが、後者の場合は外来種として北海道内にも広く分布が知られているニジマスのほか、複数のサケ科魚類由来のDNAも同時検出が可能となる。そこで、前者においてはイトウ分布域とDNA検出河川の環境をGIS解析を用いて明らかにしたほか、各検出河川のDNA濃度分布から河川個体群サイズのばらつきを推定した。一方、後者においてはイトウ生息河川分布をより高密度で推定したほか、同所的に生息するニジマスの影響についても環境DNA濃度を基に推定を試みた。

図-1.1　北海道内の環境DNAサンプル採集地点

(1)－４．水産有用種シシャモの絶滅の恐れのある地域個体群における時空間分布推定

シシャモ（*Spirinchus lanceolatus*）は世界でも北海道太平洋岸にしか生息しない日本の固有種だが、近年えりも岬以西の個体群サイズの減少が著しく、現在環境省レッドデータリストにおいて絶滅の恐れのある地域個体群（LP）に指定されている。本種については先の環境省推進費プロジェクト（4-1602）で種特異検出系定量PCR用プライマー開発済であったため、本サブテーマではこれを用いて長年にわたり謎とされてきたシシャモ仔稚魚の沿岸分布と移住動態およびその決定要因について解析を行った[8)]。調査対象をえりも岬以西にあたる胆振日高地方の沿岸とし、計7地点でシシャモ稚魚がふ化後、海に下ることが予想される3月から8月にかけて計14回の環境DNA採集調査を行った(図-1.2)。採水・ろ過はYatsuyanagi et al. (2020) [9)]に準拠し、(1)－２．同様、フィルターカートリッジSterivex-HV （ポアサイズ0.45μm、メルクミリポ

ア社）を用い、採水現場においてフィルターサンプルあたり500mlの環境水をろ過後、RNAlaterを充填して冷暗条件で研究室へ輸送した。その後のDNA分析については環境DNA学会の標準化マニュアル[2]に準拠した。

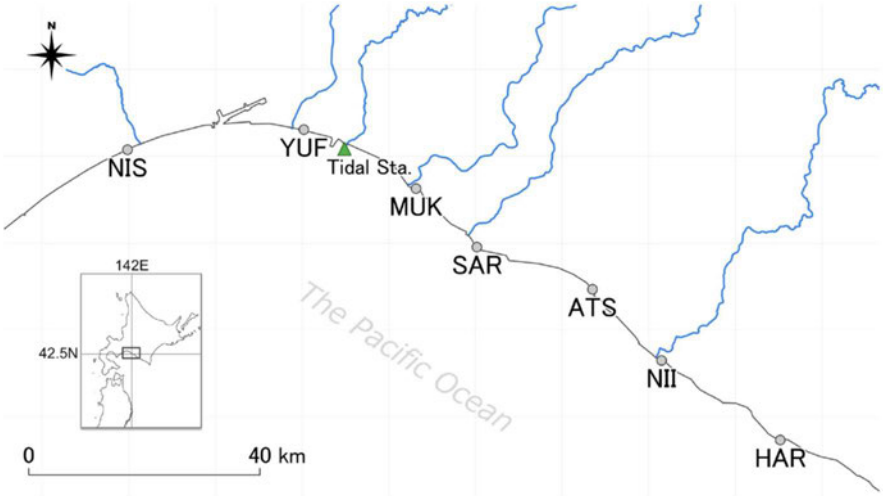

図-1.2　胆振日高地方におけるシシャモ仔稚魚由来の環境DNA調査対象となった地点（丸）。三角の点は潮位観測所を示す。（Yatsuyanagi & Araki 2020[8] より抜粋）

(1)－５．北日本の溜池における生物群集への外来魚の影響評価

北日本の溜池には絶滅危惧IA類（CR）に指定されているゼニタナゴ（*Acheilognathus typus*）をはじめ、様々なタナゴ類が生息している。一方で競合が危惧されるタイリクバラタナゴ（*Rhodeus ocellatus ocellatus*）のほか、肉食性のオオクチバス（*Micropterus salmoides*）やカムルチー（*Channa argus*）などの外来種の侵入も報告されており、里山の観点からも生態系の維持管理のため、魚類群集の網羅的な把握と外来種の影響の総合的判断・対策優先順位の明確化が求められている。そこで本研究では、上記三種の外来魚と在来タナゴ類が生息している秋田県雄物川流域の溜池に注目し、35地点から採集した環境DNAサンプルおよびMiFishを用いた環境DNAメタバーコーディング解析を行い、外来種が在来タナゴ類をはじめとする溜池の魚類群集に与える影響を複合的に評価した[10]。環境DNA採集・分析方法の詳細については(1)－２．に準じるものの、溜池の水は濁度が高いためろ過量は100-250mlとなった。一方で本解析では内部標準として濃度既知の人工DNAを添加し、元の環境水中の各DNA配列濃度を推定した。また、各調査地点における魚類群集と外来種の関係を明らかにするため、魚類群集の検出・非検出データを用いてJaccard指数に基づくNMDS（non-metric multidimensional scaling、非計量多次元尺度法）解析を行った。なお、在来タナゴ類についてはゼニタナゴのDNA検出地点数が3地点のみだったため、同様の微生息環境を選好し検出頻度の高かったキタノアカヒレタビラ（*A. tabira tohokuensis*）と併せ「在来タナゴ類」とした。

(1)－６．国内外来種アズマヒキガエルの繁殖地推定と精度検証

石狩川水系で分布拡大する国内外来種アズマヒキガエル（*Bufo japonicus formosus*）はその毒性から北海道の既存種、特に繁殖池を共有する可能性の高い両生類への悪影響が懸念されており、北海道生物多様性保全条例に基づく指定外来種となっている。しかし、本種は陸棲の両生類で、繁殖期前後しか水圏に依存しない。そこで本研究では、アズマヒキガエルの環境DNA検出を可能にする技術開発を行い、繁殖後再生産した幼生が残る5-6月に石狩川水系の支川集水域において環境DNA解析を行った[11]。予備調査の結果、石狩川水系ではオタマジャクシが水圏に留まる6月においてヒキガエル由来のDNA検出確率が高まったことから、この時期に実施した採水調

査で収集した73地点の環境DNAサンプルを用い、広い水系内のどの支川においてどの程度の確率でアズマヒキガエルの繁殖地の有無を判別可能か、MCMCアルゴリズムで検出確率をベイズ推定するMultiscale Occupancy Modellingの実施により北海道が公開している目視記録の情報と合わせた精度検証も併せて行った。環境DNA採集・分析方法の詳細については(1)－２．に準じるものとする。

(1)－７．知床半島における外来種アメリカミンクの生息域推定

アメリカミンク(*Neovison vison*)はかつて毛皮を目的に国内に持ち込まれていたものが野生化し、一部の地域では定着している。知床半島の世界自然遺産地域においてもその姿が目撃されているものの、彼らの生態や分布については不明な点が多い。そこで本研究では、アメリカミンクに特異的な環境DNA検出系を作成し、知床半島内に位置する46河川から採集した環境DNAサンプルを用いて本種の半島内分布とその限定要因を推定した[12)]。環境DNA採集・分析方法の詳細については(1)－２．に準じるものとする。

(2)環境DNA技術を用いた種内多型の検出と長期動態解析への応用・実践

(2)－１．種内多型に基づく絶滅危惧種オショロコマの遺伝子浸透率推定法の開発

生物は様々な方法で環境に適応しているが、これを可能にしているのは遺伝的多様性である。なかでも他種との交雑により適応的な形質を取り込む遺伝子浸透は適応進化のポテンシャルを高めるメカニズムの一つとして注目されている。

知床半島のオショロコマの中には、現在知床には定着が確認されていないアメマス由来のミトコンドリア遺伝子を有する個体が存在しており、過去に両種が交雑し遺伝子浸透を引き起こした可能性が示唆されている。そこで本研究では、環境DNAメタバーコーディング技術を用いて知床半島全域にわたる遺伝子浸透の実態を明らかにすることを目的に捕獲および環境DNA調査を行った。調査対象を知床半島40河川とし、アメマスのミトコンドリア遺伝子が検出された場合にはオショロコマの遺伝子浸透個体とみなして河川間の遺伝子浸透率を推定した[13)]。環境DNA採集・分析方法の詳細については(1)－２．に準じるものとする。

(2)－２．ナガレモンイワナ（特殊斑紋型集団）におけるハプロタイプ多様性の推定

国内のイワナ（*S. leucomaenis*）には特殊な斑紋をもつ希少な地域集団が存在している。琵琶湖水系・姉川支流のイワナもその一つで、険しい山間部の谷に生息していることから捕獲が困難で個体群動態や遺伝的多様性の推定が難しいという問題を抱えている。そこで本研究では、ミトコンドリアのチトクロームb遺伝子上にナガレモンイワナのハプロタイプ解析が可能な種内変異検出用の環境DNA検出系を開発し、川の水からナガレモンイワナとそのハプロタイプ分布を推定することを試みた[14)]。比較のための捕獲調査は先行研究と合わせ5地点、採水は源流部から本川合流点までの10地点とし、環境DNA採集・分析方法の詳細については(1)－２．に準じるものとする。

４．結果及び考察

(1)陸水域を対象とした希少種・外来種の生物分布推定と精度検証

(1)－１．環境DNAプライマーを用いた希少種・外来種分布推定の精度向上

研究代表者（荒木）らは既に開発していたサケ科に特化した環境DNAメタバーコーディングプライマーのプロトタイプ（Salmon-U[15)]）を更に改良し、プロトタイプでは困難であったイトウとイワナ属由来のDNA識別が可能で、かつ国内河川に生息が報告されているサケ科全種（亜種を除く）を網羅的に判別可能なSalmon-U4プライマーの開発に成功した[16)]。

(1)－２．MiFishを用いた希少種コシノハゼ分布推定の実践

[redacted]

(1)－３．環境DNAを用いた絶滅危惧種イトウと外来種ニジマスの分布重複推定

北海道内120河川における環境DNA解析の結果、イトウは道内の広範囲に分布する一方、河川個体群サイズには河川間で大きな偏りがあることが示唆された[5)]。図-1.4に示された6つの振興局（A, B, H, I, M, N）に河口をもつ7水系からイトウ由来のDNA検出がみられたが、推定された環境DNA濃度は道北（A）および道東（I）の河川に局在しており、両者を合わせた環境DNA濃度は全体の95%を上回っていた（表-1.1）。また、GIS（地理情報システム）とPCAとよばれる主成分分析を用いた解析では、現存するイトウ生息河川の特徴として勾配が緩やかであること、水系内にラグーンとよばれる流れの緩やかな水域を有することなどが明らかとなった。

[redacted]

[redacted]

表-1.1　地域単位のイトウDNA検出率と環境DNA濃度分布（Mizumoto et al. 2020[5] より抜粋）

TABLE 2 | Summary of the results of qPCR from 120 river water samples.

Region	Detection	Copies	Ratio
A	2/16	351.69	56.36%
B	1/8	11.73	1.88%
D	0/12	–	–
E	0/12	–	–
F	0/3	–	–
H	1/6	0.67	0.11%
I	1/16	246.40	39.49%
J	0/18	–	–
L	0/7	–	–
M	1/8	8.89	1.42%
N	1/14	4.62	0.74%
Total	7/120	624.01	100%

(1)－４．水産有用種シシャモの絶滅の恐れのある地域個体群における時空間分布推定

シシャモ（*Spirinchus lanceolatus*）は世界でも北海道太平洋岸にしか生息しない日本の固有種だが、近年えりも岬以西の個体群サイズの減少が著しく、現在環境省レッドデータリストにおいて絶滅の恐れのある地域個体群（LP）に指定されている。本種については先の環境省推進費プロジェクト（4-1602）で種特異検出系定量PCR用プライマー開発済であったため、本サブテーマではこれを用いて長年にわたり謎とされてきたシシャモ仔稚魚の沿岸分布と移住動態およびその決定要因について解析を行った[8]。

その結果、沿岸7地点中4地点では春（3-5月）において夏（6-8月）よりシシャモ由来の環境DNA濃度が有意に高い傾向がみられ、7地点全体の春夏比較においてもその差は有意となった（$p < 0.001$，図-1.6）。

また、得られた環境DNA濃度は海水面温度と有意な相関があり（図-1.7）、春に河川でふ化したシシャモ仔稚魚は沿岸に留まり成長するものの、水温の上昇と共に沿岸を離れ、沖合・深部の冷水域へと移動している可能性が示唆された。これらの結果はこれまで未解明だったふ化後のシシャモ仔稚魚の生活史を理解するうえで大きな前進を意味しており、同時にシシャモの沿岸利用期の制限要因、ひいては適切な水産資源種の管理について新たな示唆を与える画期的な研究成果といえる。

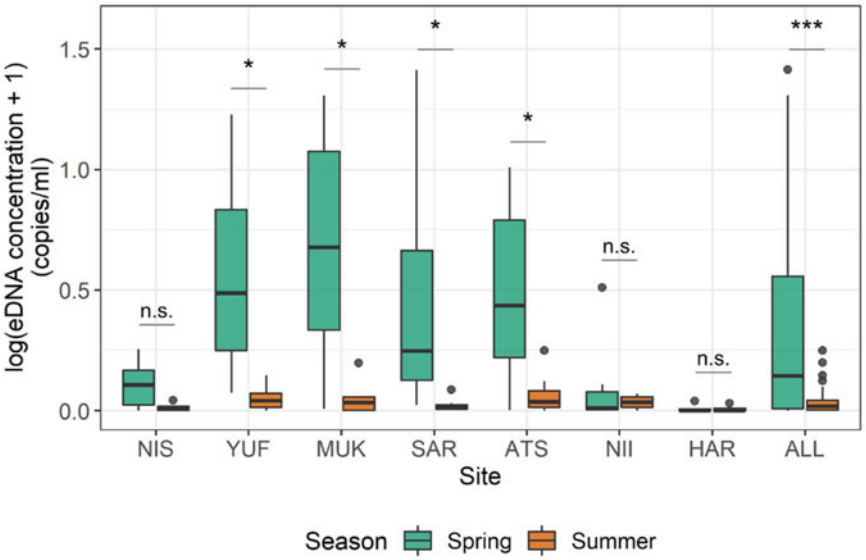

図-1.6　胆振日高沿岸７地点におけるシシャモ環境DNA濃度の春夏比較結果。春サンプル（3-5月、n=49）と夏サンプル（6-8月、n=49）で測定した環境DNA濃度を対数表記し、ウィルコクソンの符号順位検定法を用いて統計検定を行った。（Yatsuyanagi & Araki 2020[8] より抜粋）

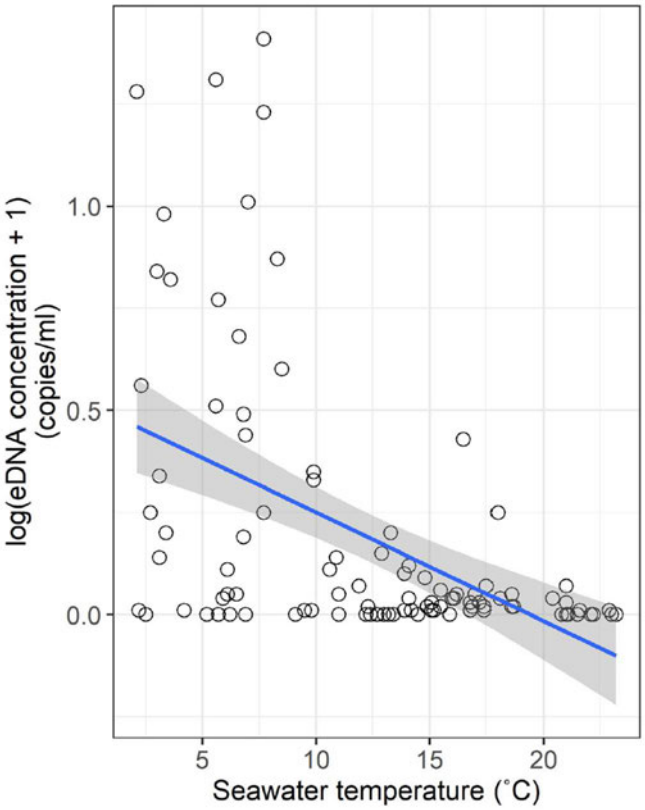

図-1.7　環境DNA濃度と海水面温度の比較結果。直線は線形回帰により両者に有意な負の相関があることを示し（R^2 = 0.273, p < 0.001）、灰色部は95%信頼区間を示す。（Yatsuyanagi & Araki 2020[8] より抜粋）

(1)－５．北日本の溜池における生物群集への外来魚の影響評価

35地点の環境DNAサンプルから、在来18 分類群（OTU）、外来13 OTU、計31 OTUのDNAが検出された[10]。最も高頻度にDNAが検出されたのはフナ属で、35地点中32地点から検出された。外来種由来のDNAとしてタイリクバラタナゴは5地点、オオクチバスは11地点、カムルチーは9地点で検出された。一方、在来種由来のDNAとしてヨシノボリ属は最多の26地点、ジュズカケハゼは12地点、キタノアカヒレタビラは8地点、ゼニタナゴは3地点での検出となった。なお、本研究で作製したネガティブコントロールからはいずれも内部標準DNA以外のDNAは検出されなかった。

NMDSを用いた群集解析においてはオオクチバスの強い影響が示され、本種のDNAが検出された溜池では平均検出在来種数・Shannon-Wienerの多様度指数が共に約4割も減少するなど、在来群集構造を大きく改変している可能性が示された（図-1.8, 図-1.9）。またタイリクバラタナゴは在来タナゴ類と同所的に生息し、タイリクバラタナゴDNAの検出地点では在来タナゴ類の平均DNA濃度がタイリクバラタナゴDNA非検出地点平均のわずか2.4%と有意に低い傾向が確認された（p =0.007）。一方、オオクチバスは在来タナゴとは共存しない傾向があり、オオクチバスとカムルチーのDNA検出地点では有意差はないものの共に在来タナゴ類の平均DNA濃度が低い傾向がみられた（外来種DNA非検出地点平均のそれぞれ6.6%、8.0%）。

これらの結果から、オオクチバスは高い捕食圧によって溜池の魚種群集構造全体に大きな影響を与える一方、タイリクバラタナゴは在来タナゴ類と競合することで後者の生物量に強い負の影響を与えている可能性が示唆された。北日本における溜池の既存生態系保全のためにはオオクチバスの迅速な駆除と拡散防止が最優先となる一方、在来タナゴ類が生息する場所ではタイリクバラタナゴやカムルチーの個体数管理も併せて重要となるものと考えられる。

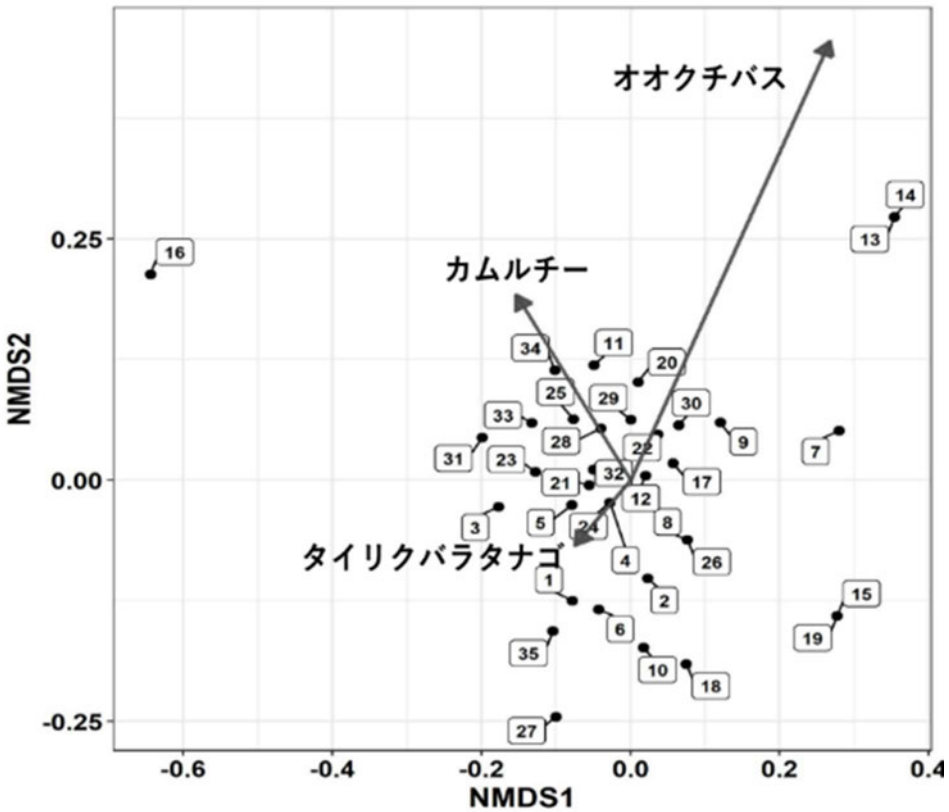

図-1.8　秋田県雄物川水系の35溜池魚類群集と外来3種の影響評価（Stress値 = 0.134）。外来種のうち、群集構造に有意な影響が認められたのはオオクチバスのみだった（タイリクバラタナゴ：p =0.75、オオクチバス：p =0.019、カムルチー：p =0.32）。（小粥ら *in press*[10] より改変）

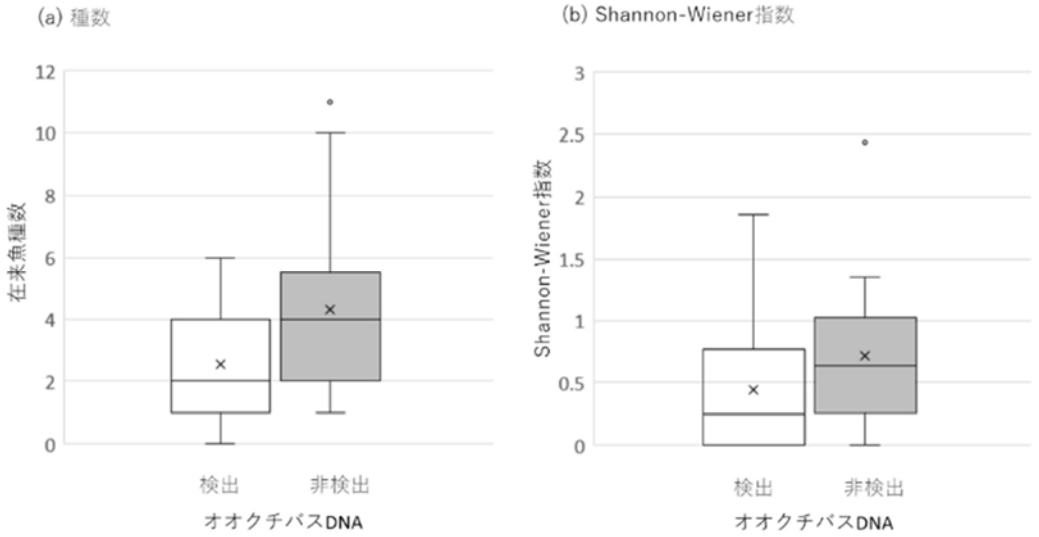

図-1.9　秋田県雄物川水系の溜池における生物多様性へのオオクチバスの影響評価。 (a)在来魚種数、(b) Shannon-Wiener指数について、オオクチバスDNA検出の有無における二群比較でWilcoxonの順位和検定結果はそれぞれp =0.048、p =0.081だった。箱ひげ図中の横線は中央値、×印は平均値、丸印は外れ値を示す。（小粥ら *in press*[10] より抜粋）

(1) －６．国内外来種アズマヒキガエルの繁殖地推定と精度検証

石狩川水系における環境DNA解析の結果、アズマヒキガエル由来の環境DNAは73調査地点中、石狩川下流域を含む32地点から検出された[11]。この結果はかつて放逐が起こった旭川周辺はもとより、アズマヒキガエルの分布が石狩川流域に広く拡散していることを示唆している。

また、目視情報との比較では半径500m以内に本種の目視記録があった11地点の全てで環境DNAが検出され、別の21地点では同様の目視情報がないにもかかわらず環境DNAが検出されていた。これらの環境DNA検出は12河川に及び、石狩川流域に広く分布していた。また本検出系の高い検出精度は階層的占有モデルを用いた統計的検証においても確認された（図-1.10）。本研究の結果は、環境DNA技術によって陸棲ガエルの繁殖域を集水域規模で推定可能であることを示すと同時に、繰り返しサンプルの整合性を基に環境DNAの捕捉確率（capture probability）を推定することで、環境DNA技術に伴う偽陰性の可能性を定量的に評価可能であることを示唆している。

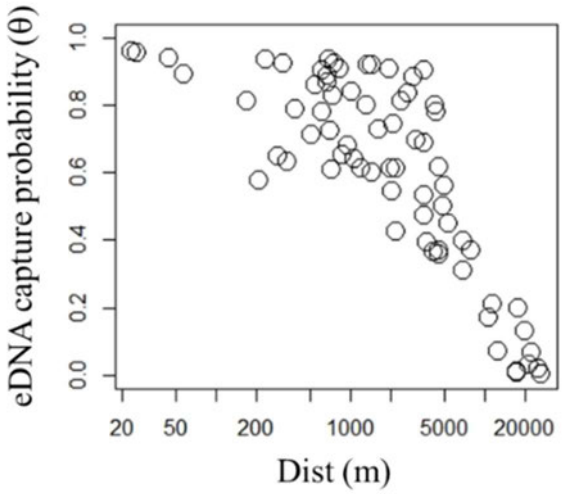

図-1.10　石狩川水系におけるアズマヒキガエル環境DNA解析における環境DNAの捕捉確率（縦軸）と採水・直近目視地点間距離（横軸）の関係。目視情報が半径20-2000m以内の地点では高い確率で環境DNAを捕捉出来ていることが分かる。（Mizumoto et al. 2022[11] より抜粋）

(1)－７．知床半島における外来種アメリカミンクの生息域推定

アメリカミンク由来のDNAは46河川中、10河川で検出された[12)]。アメリカミンクDNAの検出・非検出とこれらのサンプルから推定された餌資源（オショロコマ、サクラマス）由来の環境DNA濃度には相関がみられなかったが、アメリカミンク目視情報のあった9河川を加えた場合、本種もしくは本種由来の環境DNAが検出された河川はサケマスふ化放流事業の実施河川に有意に偏在していることが明らかになった($p < 0.05$)。これらの結果は、外来種であるアメリカミンク個体群の存続に知床河川内の天然餌資源ではなく、人為的に増殖されたサケマス稚魚資源が貢献している可能性を示唆している。

(2)環境DNA技術を用いた種内多型の検出と長期動態解析への応用・実践

(2)－１．種内多型に基づく絶滅危惧種オショロコマの遺伝子浸透率推定法の開発

[redacted]

[redacted]

５．研究目標の達成状況

本サブテーマでは希少種・外来種の環境DNA研究実践を通して生物量・時系列動態・種内変異の情報統合とそれに基づく対策優先度評価手法を確立し、環境DNA技術を社会問題解決に役立つ技術として社会実装に近づけることを目標とした。研究期間前半は新型コロナウイルス感染拡大の影響で一部野外調査の遅れは生じたものの、既に収集・保管していた経年蓄積サンプルの分析や種内多型解析、研究成果の論文化を前倒しすることにより予定より早く学術論文・学会発表、国民との対話を実現することに成功した。また解析面でも占有モデルにより環境DNA検出精度の定量化に成功、非計量多次元尺度法の導入により外来種間で既存生物群集への影響力の相対定量化に成功するなど、対策優先度を定量的に評価する技術開発に成功している。これらのことから、本サブテーマは目標を大きく上回る成果をあげたものと判断した。

６．引用文献

1) 近藤倫生，土居秀幸　編「環境DNA　―生態系の真の姿を読み解く」共立出版 (2021)
2) T. MINAMOTO, M. MIYA, T. SADO, S. SEINO, H. DOI, M. KONDOH, K. NAKAMURA, T. TAKAHARA, S. YAMAMOTO, H. YAMANAKA, H. ARAKI, W. IWASAKI, A. KASAI, R. MASUDA and K. UCHII. Environmental DNA 3: 8-13 (2021) An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols.
3) H. ARAKI, T. KANBE, H. YAMANAKA, Y. MINEGISHI and N. KOIZUMI. Environmental DNA 4:487-491. (2022) edna2021: The fourth annual meeting of The eDNA Society “Species distributions, and beyond”
4) M. MIYA, Y. SATO, T. FUKUNAGA, T. SADO, J. Y. POULSEN, K. SATO, T. MINAMOTO, S. YAMAMOTO, H. YAMANAKA, H. ARAKI, M. KONDOH, and W. IWASAKI. Royal Society Open Science, 2: 150088 (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species.
5) H. MIZUMOTO, T. MITSUZUKA and H. ARAKI. Frontiers in Ecology and Evolution 8: 569425 (2020) An environmental DNA survey on distribution of an endangered salmonid species, *Parahucho perryi*, in Hokkaido, Japan.
6) H. MIZUMOTO, H. URABE, T. KANBE, M. FUKUSHIMA, and H. ARAKI: Limnology, 19: 219-227 (2018) Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid.
7) 速水将人，石山信雄，水本寛基，神戸崇，下田和孝，三坂尚行，卜部浩一，長坂晶子，長坂有，小野理，荒木仁志，中嶋信美，福島路生　応用生態工学 24(1) 61-73 (2021) 北海道の渓流魚を対象とした治山ダムの改良効果の検証：長期モニタリングによる検証と環境DNAの活用可能性
8) T. YATSUYANAGI and H. ARAKI. PLOS ONE 15: e0239912 (2020) Understanding seasonal migration of Shishamo smelt in coastal regions using environmental DNA.
9) T. YATSUYANAGI, R. ISHIDA, M.K. SAKATA, T. KANBE, H. MIZUMOTO, Y. KOBAYASHI, S. KAMADA, S. NAMBA, H. NII, T. MINAMOTO, H. ARAKI. Environmental DNA 2:130-139 (2020) Environmental DNA monitoring for short-term reproductive migration of endemic anadromous species, Shishamo smelt (*Spirinchus lanceolatus*).
10) 小粥淳史，八柳哲，神戸崇，井上頌子，荒木仁志　保全生態学研究(2022)*In Press*
環境DNAメタバーコーディングを用いた北日本の溜池における外来魚の影響評価
11) H. MIZUMOTO, O. KISHIDA, K. TAKAI, N. MATSUURA and H. ARAKI. Biological Invasions 24:1199-1211 (2022) Utilizing environmental DNA for wide-range distributions of reproductive area of an invasive terrestrial toad in Ishikari river basin in Japan.

12) T. TAKABA, M.K. SAKATA, T. KANBE, H. MIZUMOTO, and H. ARAKI *in prep.* Human activity-associated establishment of invasive mink population estimated using environmental DNA.
13) T. OZAWA, T. KANBE, and H. ARAKI *in prep.* Environmental DNA metabarcoding for introgression between two related species, Southern Asian Dolly Varden (*Salvelinus curilus*) and white-spotted charr (*S. leucomaenis*) at rivers in the Shiretoko peninsula, eastern Hokkaido, Japan.
14) H. ARAKI, H. MIZUMOTO, T. KANBE, J. TSUBOI, K. MORITA, K. SUGIHARA, M. HATANO, and T. KIKKO. Environmental DNA *submitted.* An eDNA survey on mtDNA haplotypes of Nagaremon-charr, a threatened morphotype of *Salvelinus leucomaenis*
15) K. MORITA, G. SAHASHI, M. MIYA, S. KAMADA, T. KANBE, and H. ARAKI. Hydrobiologia 840: 207-213 (2019) Ongoing localized extinctions of stream-dwelling white-spotted charr populations in small dammed-off habitats of Hokkaido Island, Japan.
16) T. KANBE, H. MIZUMOTO, N. NAKAJIMA, and H. ARAKI. Aquatic Conservation *submitted.* Profound understanding of the distribution of Sakhalin taimen in Hokkaido, the second-largest main island in Japan.
17) H. ARAKI, T. YATSUYANAGI, and T. KANBE. *In prep.* Revealing distribution of a rare goby species *Gymnogobius nakamurae* in Japan.

Ⅱ－２　希少種・外来種の生物量推定精度推定と琵琶湖水系を中心とした実践的検証

学校法人龍谷大学
先端理工学部　環境生態工学課程　　山中　裕樹

［要旨］

本サブテーマでは日本産淡水魚の希少種及び外来種について、環境DNAメタバーコーディング法における検出感度の向上に向け、その基礎となるDNA配列情報の整理と新規の収集を行った。MiFishプライマー[1)]を用いたメタバーコーディングで利用される12S領域について、希少種169分類群、外来種26分類群に加え、一部の魚種については種内系統の識別可否も検討した。同定可否の検証が済んでいなかった12分類群について追加検証を行い、ゴマハゼ、ミナミアシシロハゼなど10分類群の同定が可能であることを確認した。一方で、不可能だったのはミヤベイワナとパイクパーチの2分類群であった。ゴシキタメトモハゼなどの希少種について標本の提供を受けて新規に配列決定を進め、絶滅した可能性が高いきわめて希少な種や南洋から本邦に遇来するハゼ類などを除き、現実的に入手が可能な種についてはDNA配列の収集を完了した。希少種や外来種の分布推定によって注目すべき地点を絞り込むという環境DNAメタバーコーディングの実行例として、琵琶湖南湖での調査を行い、これまで生息が確認されていなかった外来種のシグナルを検出した。こうしたメタバーコーディングを用いた研究開発の一方で、種よりも細かな種内系統の区別によってより実用度の高い希少種の検出を行うため、イチモンジタナゴの近畿系統と東海系統の区別を行える検出系を新規に設計した。滋賀県及び三重県において野外調査を行い、検出系の実用性を確認した。

本サブテーマでは各種の検出手法の開発や利用と並行して、環境DNA分析による生物量推定の精度を評価した。初期計画では野外での操作実験によって生物量の推定精度を直接評価する予定であったが、コロナ禍にあって予定を変更し、過去の文献情報に基づくメタ解析や水槽実験による評価を行った。流水環境においては、そもそも環境DNAがどの程度の範囲にまで移流しているのかついて明らかになっていなかったところ、メタ解析によって、長くとも2 kmを超える距離まではほとんど流下しないことが明らかになった。また、水槽実験においていくつかのサイズ画分に分けて環境DNAを測定し、どの画分で生物量との相関が強くなるのかを検証した。結果として、3-10 μmに区分した中程度のサイズ画分で相関が強くなることを見出し、「生物量の推定に適したサイズ画分」がある可能性を示唆した。更に、環境DNAの分解の主要因である水温について、生物量の推定与える間接的な効果をシミュレーションによって検討し、より高い温度条件下で相関が強くなる傾向を示した。これは分解速度の速い条件下では環境DNAが「より新鮮な情報」を持つことが要因ではないかと考えられた。

こうした主要な研究成果と合わせて、種特異的な検出系に利用するプライマー設計の自動化プログラムの開発、大台ケ原や渥美半島における希少両生類の探索、市民参加による大規模な生物多様性調査プログラムの立ち上げ（びわ湖100地点環境DNA調査）、生息地復元プロジェクトにおける環境DNA分析を用いた対象種（再定着を目指す種）の選定など、環境DNA分析の基礎から社会実装、社会貢献に至るまで、多くの成果を挙げた。

１．研究開発目的

環境中に存在する生物由来のDNA（環境DNA）を手掛かりとして、対象生物を捕らえることなくその分布を推定する環境DNA分析は、生物多様性のモニタリング技術として実用化されている。しかし、DNA配列の情報を読み取って利用する技術においては、生物種ごとのDNA配列が明らかでなければ種を同定することができず、日本国内の淡水域に生息する生物種においても未だその参照配列（種のDNA配列情報）が不足しているものがある。一方、環境DNAの濃度を手掛かりとして対象生物の生物量（もしくは個体数）を推定する試みもなされているが、生物から放出されたあとの拡散・流下等の影響については不明

な点も多く、その推定精度についての評価が十分に行われていない。環境DNA分析は今後の希少種保全や資源管理の実務でのさらなる活躍が期待されているが、これらの課題がこの技術の信頼性や拡張性に制限をかけている。

そこで本サブテーマではまず、環境DNA分析が抱える上記の二つの課題の解決に取り組むこととした。始めに(1)環境省レッドリストに掲載されている魚類・絶滅危惧種169種および特定外来種26種について、サブテーマ１，４と参照配列の拡充と、配列情報に基づく種同定の可否の確認を行い、希少種及び外来種の検出感度向上に資する情報の収集と精査を進めた。関連して、絶滅危惧IA類の魚類であるイチモンジタナゴ等、数種について種特異的な検出系を新規に設計することでも検出感度の向上を進めた。また、(2)生物量の推定精度について評価を行うべく、既往研究の情報を取りまとめて、不明な点が多く残されていた環境DNAの流下の効果やサイズ画分の影響に関する解析を行った。さらに、(3)琵琶湖や大台ケ原等で生物多様性観測や生息地復元の実例で環境DNA分析の活用を進めた。研究開発内容と結果・考察については以下、項目ごとに記述する。

２．研究目標

生物量推定の精度評価を実施するとともに、希少種および外来種の検出感度向上をすすめ、環境DNA分析による生物の分布や生物量の推定の信頼性を明らかにすることで、保全の実務における当該分析技術の実用性を高める。

３．研究開発内容

本サブテーマで実施した研究開発内容を、次の通り(1)希少種および外来種の検出感度向上、(2)環境DNA分析による生物量推定精度の評価、(3)生物多様性観測や生息地復元の実例における環境DNA分析の活用の３つの区分に分けて解説する。(1)についてはMiFishプライマーを用いた環境DNAメタバーコーディングにおける種の検出感度の向上を目指したデータベースの精査や拡充、そして希少生物種を高感度に検出する種特異的な検出系もしくは種内系統を区別できる検出系の開発、更に種特異的な検出系で用いるプライマーの自動設計プログラムの開発を行った。(2)では過去の文献情報からのメタ解析や水槽実験によって、環境DNAの流水環境における流下距離や、環境DNAのサイズ画分の違いや水温が生物量推定に与える効果などについて検証を行った。(3)では市民参加の生物多様性観測プログラムの立ち上げや、生息地復元の実例における環境DNA分析の活用など、社会貢献や技術の社会実装に関わる活動を実施した。

(1)希少種および外来種の検出感度向上

(1)－１．参照配列(MiFish領域)のデータ拡充と同定可否の確認

環境DNA分析を行うにあたって、分析されたDNAがどの生物に相当するかを判断するために必要なリファレンス配列の拡充と整備は必要不可欠である。日本において環境DNA分析例の多い淡水魚類においても、未だリファレンス配列が不足している状況である。そこで、環境DNAメタバーコーディング法として使用例の多いMiFishプライマーの対象領域である12s rRNA領域を対象に、環境省レッドリストに掲載されている魚類・絶滅危惧種169種および特定外来種26種について、リファレンス配列の拡充と、配列情報に基づく種同定の可否の確認を行った。

(1)－２．絶滅危惧IA類イチモンジタナゴの地域系統別検出系の開発と実践

日本列島に生息する純淡水魚類の多くは、地域によって遺伝的に異なる。そのため、他地域由来の系統が在来系統の生息域に侵入した場合、形態的な特徴で両系統を区別することは困難である。環境DNAにより他地域由来の系統の侵入をいち早く検出できれば、在来系統の保全地域と外来系統の駆除地域の迅速な把握につながる。イチモンジタナゴは、絶滅危惧IA類であるが、様々な地域に移植されている。イチモンジタナゴは近畿地方と東海地方で遺伝的に

分化しており、特に東海地方の系統は三重県[redacted]にしか生息しておらず、常に近畿系統の移入の危機に晒されている。そこで本研究では、イチモンジタナゴの保全活動で実績のある三重県総合博物館および琵琶湖博物館と協力し、イチモンジタナゴの東海系統と近畿系統を識別できる検出系の開発と野外での検出実践を行なった。

本研究では、イチモンジタナゴを対象にした種特異的なプライマーを開発し、プローブで両系統の一塩基多型(SNP)をジェノタイピングすることで、東海および近畿系統の判別を試みた（図-2.1）。開発した検出系を用いて、まず組織DNAを用いて両系統を問題なく識別できるかを確認した。次に東海系統が唯一生息する[redacted]において、東海系統の詳細な分布域と外来系統の侵入レベルを推定するために、[redacted]の2支流14地点および、保護池として活用しているため池6地点で野外実践を行なった。また、比較用に滋賀県に位置する近畿系統の保全池からも採水を行なった。なお、希少種保護の観点から、採水地点の詳細は控える。1000 mlの採水を行い、0.7 umポアサイズのGF／Fフィルターで濾過を行なった。

イチモンジタナゴ

プライマーを種特異、プローブを系統特異的に設計し、SNPを検出する手法

図-2.1　本研究で開発した検出系の概要

(1)－3．準絶滅危惧アカハライモリの種特異検出系の開発と実践

図-2.2　本研究で対象としたアカハライモリ渥美種族

アカハライモリは日本固有種であり、各地域で形態変異や繁殖行動とも関連した遺伝的分化が進んでいる。愛知県の知多・渥美半島には、形態的、行動学的特徴に独自性が見られる渥美種族と呼ばれる地方種族が知られているが（図-2.2）、現在確認されている地域は知多半島の数地点のみであり、発見地の渥美半島では絶滅したとされている。本種族は愛知県条例に基づく指定希少野生動植物種に指定されていることから捕獲調査が憚られ、また相当に生息密度が低いことが想定される。環境DNA分析は、広範囲の調査が簡便であり、かつ採集より高感度に生息の有無を推定できることから、本種族の調査に適した手法である。

本研究では、愛知教育大学、豊橋総合動植物公園、豊橋市自然史博物館との共同で、アカハライモリの種特異的なリアルタイムPCR検出系を開発し、知多・渥美半島から採水を行い渥美種族の新規生息地の探索を実施した。なお、希少種保護の観点から、採水地点の詳細は控える。1000 mlの採水を行い、0.7 umポアサイズのGF／Fフィルターで濾過を行なった。

(1)－4．より感度の高いMiFish分析条件の検討

環境DNAメタバーコーディング手法は、対象の生物群を網羅的に検出できる点に魅力があるが、しばしばPCR阻害によりDNAの増幅が妨げられる問題に見舞われる。特にため池などの止水環境では、植物プランクトンが大量に発生し、このプランクトンに由来すると考えられる阻害物質によりDNAが増幅されない場合が多い。そこで本研究では、琵琶湖周辺にある小規模な湖沼である10地点の内湖から採水したサンプルを対象に、PCRエラーが生じにくいとされるKOD FX Neo（東洋紡社）、Q5 High-Fidelity DNA Polymerase（New England Biolabs社）、

Super Fi II DNA Polymerase（Thermo Fisher社）の３つのDNAポリメラーゼを用いて、MiFishプライマーを用いたメタバーコーディングを行い、得られた検出種数とリード数の比較を行なった。1st PCRのサイクル数は35サイクルとした。なおSuper Fi IIにおいては、30サイクルも行ない比較に用いた。採水は1000 mlで行い、0.7 umポアサイズのGF／Fフィルターで濾過を行なった。その他の実験手法については、環境DNAマニュアル Ver. 2.2に従った。

(1)－５．種特異検出系の自動設計プログラムの開発

メタバーコーディングでは種判別が困難な種や種内系統の判別は、検出対象に応じて特異的なプライマーを設計する必要がある。環境DNA分析においてこうした特異的な検出系を設計する場合には、対象の分類群もしくは系統だけをPCR増幅し、他の生物由来のDNAは増幅しないプライマーを適切に設計・選抜せねばならないが、この開発は基本的に手作業によって行われてきた。ここでは、魚類のミトコンドリアDNAを対象として、対象種及び非対称種（近縁だが増幅させてはならない種）の学名を指定すれば、対象種のDNAだけを特異的にPCR増幅できるプライマーを自動的に設計できるプログラムの開発を行った。

対象は魚類とし、ミトコンドリア上の遺伝子のうち、12S、16S、Cytochrome *b*、COI、D-loopについてNCBIから全データをダウンロードしてカスタムデータベースを作成した。Bashスクリプトで次の設計ステップをプログラミングした。

1) インプットされた学名に基づいてデータベースから対象種及び非対称種の指定された遺伝子領域のDNA配列データを切り出し
2) Primer3によって対象種のDNAをPCR増幅できるプライマー候補を多数設計
3) 非対称種のDNA配列とプライマー配列とのミスマッチ（塩基の不一致）の数を算出
4) 特異性が高いと判断されるプライマーセットについて、Primer BLASTでntデータベース（魚類以外の生物種も含めたDNAデータベース）に対して*in silico* PCRを行って種特異性の確認

(2)環境DNA分析による生物量推定精度の評価

(2)－１．河川における環境DNAの流下距離についてのメタ解析

河川環境での環境DNA分析では、検出された環境DNAには上流から流されてきたものも含まれうるため、環境DNAがどれくらい流下するのかを把握しておく必要がある。幾つかの先行研究は河川における環境DNAの最大流下距離を報告してきたが、これは生物量や環境DNA放出量、また採水地点の設定方法によって大きく変動してしまうため、他の河川や研究への一般化は困難であった。一方、流下距離と環境DNA濃度の関係から推定される平均的な移流距離（S_w）は、こうしたバイアスに頑健であり、かつ任意の割合の環境DNA粒子の流下距離も容易に計算できるため、河川間での流下距離の比較や研究結果の統合により適した指標であると考えられる。このアプローチに基づき本研究は、環境DNAの最大流下距離を調べた先行研究から、環境DNAの平均流下距離を再計算し、これらSwを用いたメタ解析を行った。

(2)－２．環境DNAの存在状態と生物量推定精度との関係の多角的評価

環境DNA分析では一般的に、短鎖ミトコンドリア（mt）DNAマーカーが用いられることが多いが、水中の長鎖DNAや核DNAも検出可能であり、かつ短鎖mtDNAとは異なる時空間解像度・生物情報を示すことが期待されている。また、環境DNAは極めて多様な粒径サイズを有しており、粒径サイズ間で環境DNAの存在量や残存性が異なることも知られている。そのため、こうした環境DNAの存在状態（DNA断片長、遺伝子領域、粒径サイズ）は、環境DNAに基づく生物量推定精度にも何らかの影響を及ぼす可能性があるものの、その実証例は極めて限られていた。そこで本研究では、環境DNA濃度と生物量の相関性に対するこれら環境DNAの存在状態の影響を、水槽実験

先行研究の再解析によって検証した。第一に、様々な個体数密度で飼育されたゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）の水槽水を異なる孔径サイズのフィルターでろ過し、異なる長さの核・mtDNA断片を増幅するマーカーを用いてこれら環境DNAを定量した。第二に、幾つかの魚類の環境DNA濃度を比較した過去のデータセットを再解析し、環境DNA濃度と生物量の相関性を核・mtDNA間ならびにサイズ画分間で比較した。

(2)－３．環境DNA分析に基づく生物量推定精度に対する水温の間接的影響の評価

野外での多様かつ複雑な環境DNAの放出後動態（移流・沈降・分解）のために、環境DNA濃度と生物量の相関性は、水槽など実験系に比べて野外系では弱まることが知られている。こうした環境DNAの動態は環境条件に強く依存するが、この相関性にどの環境要因が具体的にどのように影響するのかはよく分かっていない。本研究では、環境DNA分解の主な要因の一つである水温に着目し、異なる水温下での環境DNA濃度と生物量の関係性の違いを調べた。第一に、任意の水温における環境DNAの分解速度をモデリングし、異なる温度条件および環境DNA放出シナリオの下での環境DNA濃度と生物量の関係性の数値シミュレーションを行った。第二に、このシミュレーション結果の妥当性を評価するために、環境DNA濃度と生物量の相関性を調べた先行研究を収集し、この相関性と平均水温の関係を調べた。

(3)生物多様性観測や生息地復元の実例における環境DNA分析の活用

(3)－１．琵琶湖における市民参加型生物多様性観測の実践

龍谷大学の生物多様性科学研究センターおよび滋賀県と共同で、2021年及び2022年に「びわ湖の日チャレンジ！みんなで水を汲んでどんな魚がいるか調べよう！ 100地点環境DNA調査」（略称：びわ湖100地点環境DNA調査）を実施した。地元企業やNPO団体、近隣の大学に呼びかけ、2-3 km間隔で琵琶湖湖岸部に設定した100地点から、簡便に汚染なく採水できる専用開発のサンプリングキット（図-2.3）を用いて採水と水の郵送を行ってもらい、龍谷大学でMiFishメタバーコーディングによって分析を行った。調査はどちらの年も8月を中心に行い、分析結果は滋賀県と龍谷大学の共催である「びわ湖の日滋賀県提携 龍谷講座」で市民向けにオンラインで報告した。

図-2.3　使用したサンプリングキットの内容

(3)－２．MiFishによる琵琶湖での魚類検出と注目地点検出の実践

琵琶湖は日本有数の魚類の多様性を誇る水域であるが、近年ではオオクチバスなどの外来種の影響が大きく多様性の減少の危機がある。また、観賞魚由来の外来種の遺棄事例も多いが、琵琶湖は日本でもっとも広い湖であることから、採集による魚類相の把握は容易ではない。琵琶湖を構成する南部の湖（南湖）は、約10年前にはオオクチバス、ブルーギル、コイ、フナ類が確認される程度の極めて貧弱な魚類相であり、著しく種多様性が減少していた。しかし、近年の南湖の網羅的な魚類相調査はなされていない。

そこで本研究では、株式会社日吉、滋賀県水産試験場、琵琶湖博物館との共同により、南湖の魚類相を環境DNAメタバーコーディングにより把握し、現在の魚類の多様性の評価を試みた。2021年7月に南湖を網羅するように30地点から採水を行いMiFishプライマーで魚類を検出した。

(3)－３．大台ケ原における絶滅危惧II類オオダイガハラサンショウウオの分布調査

大台ヶ原は、トウヒやブナなど紀伊半島本来の森林生態系を残しており、原生的な自然環境が残る数少ない地域である。また、オオダイガハラサンショウウオなどの希少種の保全のために定期的なモニタリングが行われている。このような地域での生物調査は、なるべく生物や環境に負荷をかけず、また調査労力をかけない手法が望まれる。環境DNA分析は、その両懸念点を払拭する手法として適している。そこで本研究では、河川源流域に生息し、天然記念物として採集調査が憚られるオオダイガハラサンショウウオを対象に、種特異的検出法によって、大台ヶ原での生物モニタリングの環境DNAの有用性を検証した。

2021年10月18から19日に、株式会社KANSOテクノスと共同して、三重・奈良県境の大台ヶ原において3つの支流（支流A-C）を含む21地点から採水を行なった。採水は500mlとし、0.45 umポアサイズのステリベクスフィルターを用いて現場で濾過を行った。既存のプライマー・プローブセットを使用し、リアルタイムPCRで分析を行なった。

(3)－４．生息地復元サイトでの保全目標種選定に対する環境DNA分析の活用

[redacted]

河川再生プロジェクトの効果を評価するためには、魚類群集組成の現実的な目標種を設定する必要がある。目標種については、過去の周辺の捕獲記録を参考に決めることが一般的であるが、この方法では戻ってきそうもない種の選定や、逆に本当は戻ってくる種がとりこぼされている可能性がある。そこで、迅速かつ高感度・広範囲にデータを収集できる環境DNAを使用することで、自然再生エリアへ現実的に出現する可能性のある魚類群集を目標種として選定することを試みた。

愛媛県の重信川水系に位置する自然再生エリア（開発霞）を対象に、上流から河口までを含む合計17地点（図-2.4）で500 mlの表層水を採水し、0.45 umポアサイズのステリベクスフィルターを用いて現場で濾過を行った。MiFishプライマーを用いたメタバーコーディング解析を行い、非計量多次元尺度法（nMDS）による群集解析を行った。また、採水と同時期に行われた捕獲調査や、過去の文献情報によって選定された目標種との比較を行った。

[redacted]

４．結果及び考察

(1)希少種および外来種の検出感度向上

(1)－１．参照配列(MiFish領域)のデータ拡充と同定可否の確認

MiFish領域の塩基配列の種間での類似性を精査し、種として明瞭に独立のクラスターを形成するかどうかを判断基準として種判別が可能かどうかを検討した。データベースからの塩基配列の収集に加えて、組織標本の提供を受けてコシノハゼ、ゴシキタメモトハゼなどの希少種について新規にMiFish領域の配列を決定した。精査の結果、希少種ミヤベイワナ（オショロコマ

の亜種）やホクリクジュズカケハゼ等27分類群については本領域を用いた種判別が不可能であること、外来種パイクパーチやアゴヒゲオコゼ等20分類群では条件付きで種判別可もしくはさらに塩基配列データの蓄積が必要であることが明らかとなる一方、ゴシキタメトモハゼ、ヒルギギンポ等を含めた残りの多くの分類群については種判別が可能となることを確認した。この結果、今現在169+26分類群のうち134分類群の種判別がMiFishにより実現可能な状態となった。現状で配列情報がないのは14分類群であるが、ドウクツミミズハゼなど絶滅の可能性が極めて高い種もしくは偶来性の南方系魚類が多数を占めており、入手は困難であった。

一方で、対象分類群には含まれていなかったゼゼラの地域個体群ごとの塩基配列や希少種区分が情報不足(DD)である分類群等も含めて、沖縄科学技術大学院大学、琉球大学、琵琶湖博物館、マリンピア日本海や氷見市の協力を得て、さらに配列データの拡充を行った。NCBIに未登録であった分類群のうち、18分類群の配列を決定した。種の識別が可能な魚種は5分類群、種内系統の識別が可能な魚種が1分類群、種としては識別できるが種内系統の識別が困難な魚種が3分類群、種の識別が困難な魚種が1分類群、同属他種のリファレンスが不足しており識別可否が検討できなかった魚種が8分類群であった（表-2.1）。

表-2.1　配列データがNCBIに未登録であった18分類群の識別能。

和名	学名	ランク	識別能	識別能についての説明
カワクモハゼ	*Bathygobius* sp.	絶滅危惧IA類（CR）	○	
ゴシキタメトモハゼ	*Giuris* sp. 2	絶滅危惧IB類（EN）	○	
アゴヒゲハゼ	*Glossogobius bicirrhesus*	絶滅危惧IA類（CR）	△	同属未登録種の情報が必要
コシノハゼ	*Gymnogobius nakamurae*	絶滅危惧IA類（CR）	△	同属に１塩基違いの種がいるため、条件付きで識別可
タニヨウジ	*Microphis retzii*	絶滅危惧IA類（CR）	△	同属未登録種の情報が必要
ヒルギギンポ	*Omox biporos*	絶滅危惧IA類（CR）	○	
コマチハゼ	*Parioglossus taeniatus*	絶滅危惧IA類（CR）	△	同属未登録種の情報が必要
コンテリボウズハゼ	*Stiphodon atropurpureus*	絶滅危惧IA類（CR）	△	同属未登録種の情報が必要
ヒゲソリオコゼ	*Tetrarogе nigra*	絶滅危惧IA類（CR）	○	
ヤリタナゴgroupD-3	*Tanakia lanceolata*	準絶滅危惧（NT）	△	種としては区別できるが、種内系統であるgroupD-1、Cと区別できないハプロタイプが存在
デメモロコ（琵琶湖型）	*Squalidus japonicus japonicus*	絶滅危惧II類（VU）	×	スゴモロコ、コウライモロコとの区別が不可
ゼゼラ（山陽型）	*Biwia zezera*	絶滅危惧II類（VU）	△	種としては区別できるが、種内系統である琵琶湖形と区別が困難なハプロタイプが存在
ゼゼラ（九州型）	*Biwia zezera*	絶滅危惧II類（VU）	△	種としては区別できるが、種内系統である琵琶湖形と区別できないハプロタイプが存在
ホトケドジョウ（山形型）	*Lefua echigonia*	絶滅危惧IB類（EN）	○	種内系統としても区別可能
エリトゲハゼ	*Belobranchus belobranchus*	情報不足（DD）	○	
クジャクハゼ	*Parioglossus caeruleolineatus*	情報不足（DD）	△	同属未登録種の情報が必要
マイコハゼ	*Parioglossus lineatus*	情報不足（DD）	△	同属未登録種の情報が必要
ワカケサラサハゼ	*Amblygobius linki*	準絶滅危惧（NT）	△	同属未登録種の情報が必要

(1)－２．絶滅危惧IA類イチモンジタナゴの地域系統別検出系の開発と実践

組織サンプルを対象にイチモンジタナゴの種特異的プライマーおよび、イチモンジタナゴ東海・近畿系統に特異的に反応する各プローブを用いてリアルタイム PCR を行ったところ、東海・近畿系統用プローブはイチモンジタナゴの各対象系統を誤検出なく識別できた。また、近縁のタナゴ類の誤増幅もなかった。

[redacted]で採水したサンプルを用いて開発したプライマー・プローブセットを用いてリアルタイム PCR を行った結果、近畿系統プローブによる陽性反応は得られず、東海系統プローブによる反応がため池3地点と支流3地点で得られた（表-2.2）[3)]。この結果から、[redacted]には東海系統のみが生息し、近畿系統が侵入している可能性は現時点では低いと考えられた。近畿系統の保全池から採水したサンプルについては、すべて近畿系統のみが検出されたことから、野外で近畿系統プローブも問題なく使用できると考えられる。本検出系は簡便に外来集団の侵入状況の把握が可能であることから、各地域における保全にかかる費用や労働力を軽減でき、持続的な保全活動を行う上で有用である。

[redacted]

(1) －３．準絶滅危惧アカハライモリの種特異検出系の開発と実践

組織サンプルを対象にアカハライモリの種特異的プライマー・プローブを用いてリアルタイム PCR を行ったところ、近縁の両生類の誤増幅はなく、アカハライモリも種特異性が確認できた。2022年5月に渥美半島20地点、知多半島32地点から採水を行い、開発した検出系を用いてリアルタイムPCRを行なったところ、知多半島から2地点、渥美半島から１地点の陽性反応を得た（図-2.5：0.98-1.5 copies/2ul）。いずれの地点も、現在アカハライモリの生息が確認されていないとされる地点である。陽性反応が得られたサンプルをサンガーシーケンスにより塩基配列を解析したところ、いずれのサンプルもアカハライモリの塩基配列であることを確認した。今後渥美半島の陽性反応が得られた地点から個体が採集されれば、約50年ぶりの渥美半島からの再発見となる[4)]。

図-2.5　渥美・知多半島でのアカハライモリ検出結果。

(1) －４．より感度の高いMiFish分析条件の検討

3つのDNAポリメラーゼを用いて内湖10地点のサンプルのメタバーコーディング解析を行なった結果、KODでは3地点、Q5では7地点、Super Fi IIでは10地点からリード数が得られた。また、Super Fi IIにおいて、30サイクルの1st PCRによる解析も行なったところ、9地点からリード数が得られた（表-2.3）。このことから、Super FI IIが最も多くのサンプルを増幅したことが示され、PCR阻害を受けにくい可能性が示唆された。Super Fi IIの30および35サイクル間で確認された種数を比較したところ、35サイクルでは平均9.7種、30サイクルでは平均11.2種が検出され、6地点で30サイクルのほうが検出種数を多く示した。このことは、サイクル数が多いことで相対的に多いリード数を持つ魚種がさらに増幅され、相対的に少ない魚種のリード数が検出されにくくなるものと推測される。

表-2.3　3種類のDNAポリメラーゼを使用したリード数および種数の比較。
Super Fi IIのみ、30サイクルでの解析も行なっている。

サイクル数	x35						x30	
酵素	KOD		Q5		Super Fi II		Super Fi II	
No.	リード数	種数	リード数	種数	リード数	種数	リード数	種数
1			1192	6	73723	8	27901	8
2					76959	10	50822	13
3	89413	15	13182	6	92130	12	78198	16
4			4540	9	99320	10	49247	11
5			958	12	65512	14	39708	16
6			6008	12	77779	13	47260	16
7	38670	14	5594	11	91111	11	43628	13
8	123144	13	29501	12	82989	13	76190	14
9					21324	1	0	0
10					63204	5	7880	5
Total	251227.0	42.0	60975.0	68.0	744051.0	97.0	420834.0	112.0
ave.	83742.3	14.0	8710.7	9.7	74405.1	9.7	42083.4	11.2

最大値

(1)－５．種特異検出系の自動設計プログラムの開発

魚類を対象として、ミトコンドリア上の遺伝子のうち、12S、16S、Cytochrome *b*、COI、D-loopについてNCBIから全データをダウンロードしてローカルデータベースを作成した。Bashスクリプトに Primer3やUsearch等の外部プログラムを組み込んで、上記の研究開発内容で示したステップを実行できるα版を完成した。このプログラムでは種特異的な検出系を作成したい対象種の学名と近縁種であってPCRで誤増幅されるのを避けるべき非対称種の学名と、遺伝子の名称を入力すれば、自動でプライマーセットの候補が生成され、非対称種とのミスマッチ（塩基の不一致）の数が算出され、特異性が高そうなプライマーセットについてオンラインのin silico PCRであるPrimer BLASTで最終的な特異性のチェックを自動実行できる。このプログラムを用いて、国内外の共同研究で実際に種特異的なプライマーを設計し、そのいくつかは学術論文としてまとめつつある研究プロジェクトの中で活用されている。特異的プライマーセットを設計した対象種は次のとおりである。

1) ビカーラウナギ（*Anguilla bicolor*：12S領域） Larashati *et al. in prep.*
2) プロトプテルス・エチオピクス（*Protopterus aethiopicus*：16S領域）
3) イチモンジタナゴ（*Acheilognathus cyanostigma*：Cytb領域）Ito *et al. in prep.*[3]（本プロジェクト）
4) カムルチー（*Channa argus*：Cytb領域）Oyabu *et al. in prep.*

さらに、データベースを個別に作成することによって、他の分類群でも利用できるため、魚類以外の次のような対象種についてもプライマーを設計し、一部は野外での検出も試行した。は次のとおりである。

5) ニホンカワウソ・ユーラシアカワウソ同時検出系（*Lutra nippon*・*Lutra lutra*：Cytb領域）
6) キイロネクシハムシ（*Macroplea japonica*：Cytb領域）

(2)環境DNA分析による生物量推定精度の評価

(2)－１．河川における環境DNAの流下距離についてのメタ解析[5]

先行研究から再計算されたS_wの平均値は217.6 m（95%信頼区間: 111.5-424.8 m）と推定された（図-2.6）。これは、放出された環境DNA粒子のおよそ36.8%（$=e^{-1}$）が到達する距離であり、言い換えればおよそ63.2%の環境DNA粒子は、このS_wの推定距離までに川底に沈み検出されなくなると考えられる。このS_wによると、放出された環境DNAの99%が到達する流下距離は513.5-1956.4 m（95%信頼区間）と推定され、環境DNAのほとんどは長くとも2 km以上遠くへは流下しないことが示唆された。また、S_wは河川流量と有意な正の相関関係にあり（図-2.7）、流れの速い河川や規模の大きな河川ほど、検出される環境DNAには流下の影響が含まれやすいことが示唆された。今後、環境DNAの流下に関する実証研究が蓄積されるにつれ、より多くの環境パラメータとの関わりが明らかになり、河川環境における環境DNAの移流動態のより良い理解、そしてより効率的なサンプリングデザインの提案が可能になることが期待される。

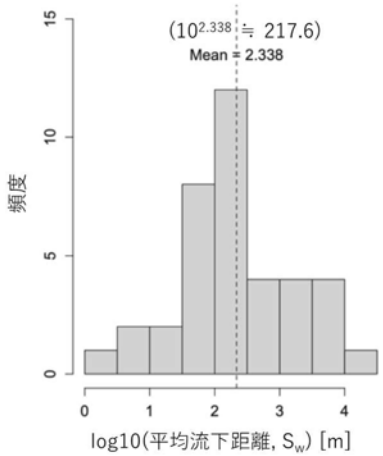

図-2.6 再計算されたSwのヒストグラム。破線はSw（常用対数変換）の平均値を示す。

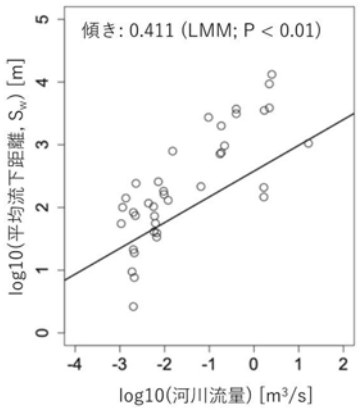

図-2.7 環境DNAの平均流下距離（Sw）と河川流量の関係（ともに常用対数変換）。線形混合モデル（LMM）で統計的に有意な正の関係が検出された。

(2)－２．環境DNAの存在状態と生物量推定精度との関係の多角的評価

ゼブラフィッシュを用いた水槽実験および先行研究の再解析の結果、環境DNA濃度と生物量の間の回帰直線の決定係数（R^2値）は概してmtDNAよりも核DNAの方が高い傾向にあった（図-2.8）[6]が、恐らく研究例の乏しさゆえに、有意差は検出されなかった。また、より長いDNA断片を分析対象にすることも、環境DNA濃度と生物量の相関性は低下する傾向にあった。さらに、生物量推定の精度（回帰のR^2値）は、3-10μmのサイズ画分の環境DNAを分析することで高くなったのに対して、10μm以上のサイズ画分の環境DNAではむしろは低下した。粗孔径フィルター（10μm以上）の使用は、フィルター目詰まりを防ぎ環境条件によってはろ過量を増やすための有力な選択肢の一つであるが、環境DNAに基づく生物量推定には適していない可能性がある。この結果を踏まえ、環境DNA濃度と生物量の関係における、環境DNAの粒径サイズ・空間分布の不均質性・残存性の複雑な相互作用を新たに議論した（図-2.9）[7]。環境DNAの存在状態の違いが環境DNA分析においてどのような意味を持つのか、さらなる実証研究の蓄積が求められる。

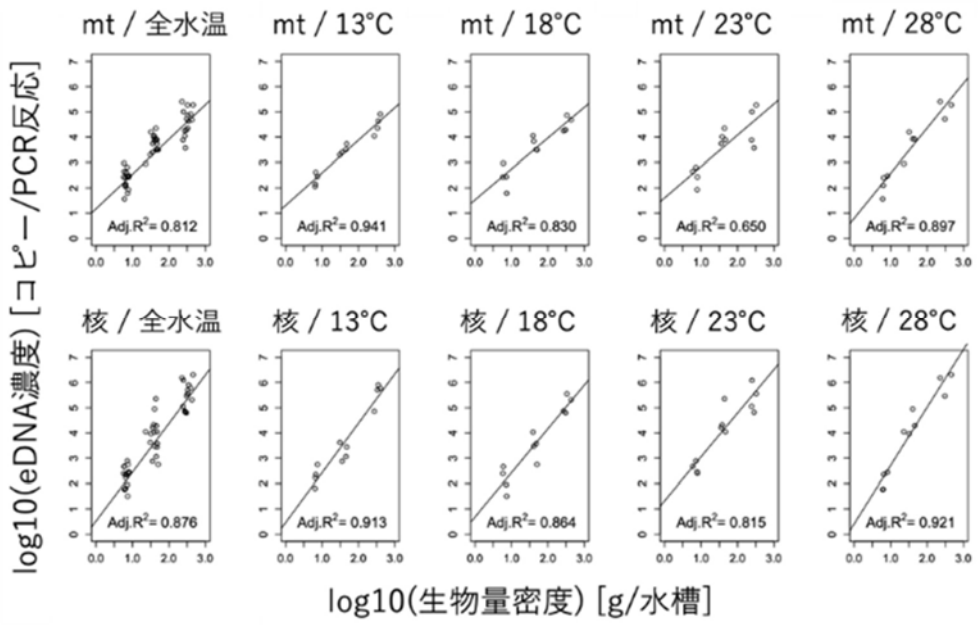

図-2.8 魚類環境DNA濃度と生物量の関係性に関する再解析の一例。異なる水温・生物量で飼育されたマアジ（*Trachurus japonicus*）の水槽水に含まれる環境DNA濃度を、mt（cytochrome *b*遺伝子）および核（ITS1領域）DNAマーカーでそれぞれ定量し、回帰直線のR^2値を比較した。最も左の「全水温」のグラフには、13-28℃の結果がまとめて表示されている。

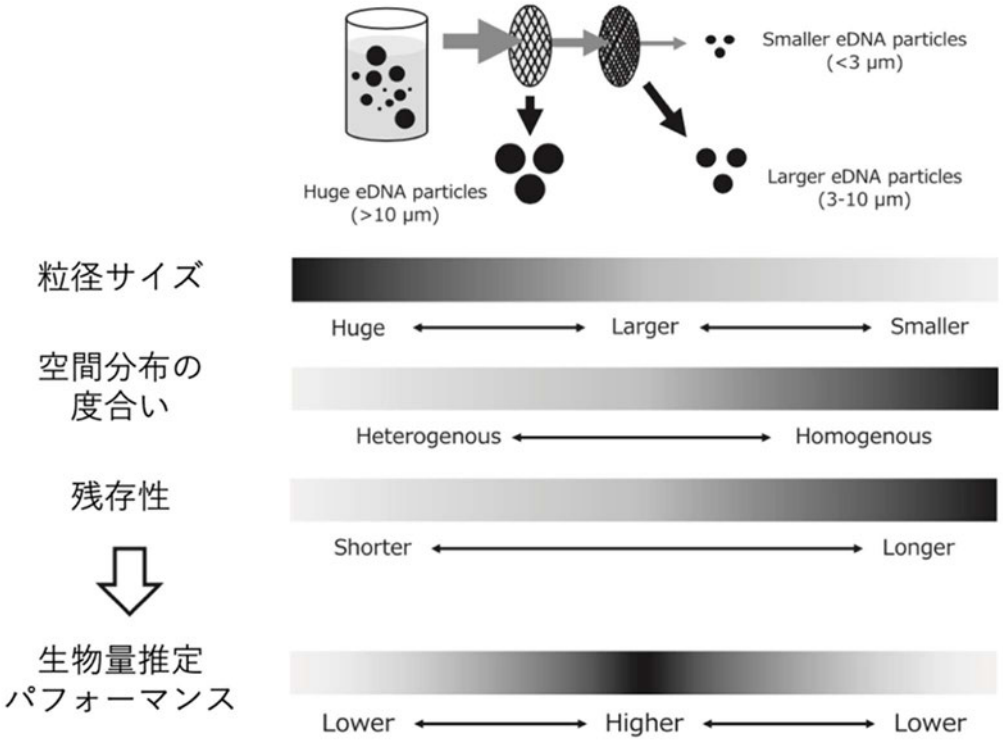

図-2.9 本研究より新たに示唆された、環境DNA濃度と生物量の関係性に対する環境DNAの粒径サイズの影響。より大きな環境DNA粒子ほど拡散しにくく、より不均質に水中に存在すると考えられ、環境DNA濃度の推定誤差は増大しうる。一方で、より小さな環境DNAほど見かけの残存性は長く、環境DNA濃度は過大に推定されうる。したがって、いわば「適度に」大きな環境DNA粒子が、より精度の高い生物量推定に適している可能性がある。

(2)－３．環境DNA分析に基づく生物量推定精度に対する水温の間接的影響の評価[8)]

環境DNA放出シナリオに関わらず、より高い温度帯で回帰直線のR2値は高くなった（図-2.10）。環境DNAの急速な分解がその水中でのターンオーバーを早め、より新しい/ソース個体に近傍の環境DNAが検出されやすくなることが、この結果をもたらしたと考えられる。また、環境DNA放出量の大小は推定精度に影響しなかった一方、個体間での放出量のばらつきが大きいほど推定精度は低下した。この結果は、環境DNA濃度と生物量の関係性における個体の体サイズや活動量の影響を間接的に示唆している。この水温依存的な環境DNA濃度と生物量の相関性は、先行研究のメタ解析でも同様に確かめられた（図-2.11）。しかしながら、シミュレーションにおけるR²推定値は概して高くなく、水温以外にも環境DNAの動態に影響する様々な環境パラメータの影響を考慮することが、環境DNAに基づく生物量推定の信頼性にとって非常に重要であると考えられる。

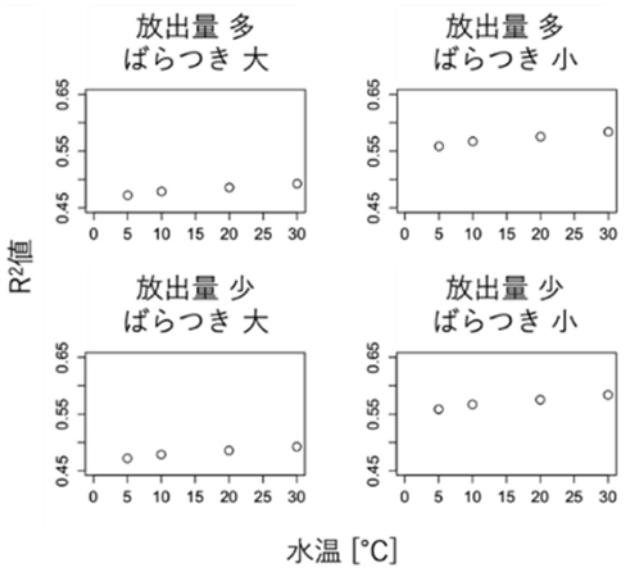

図-2.10. 異なる水温および環境DNA放出シナリオ（放出量・ばらつき）における環境DNA濃度と生物量の関係性（回帰直線のR²値）。

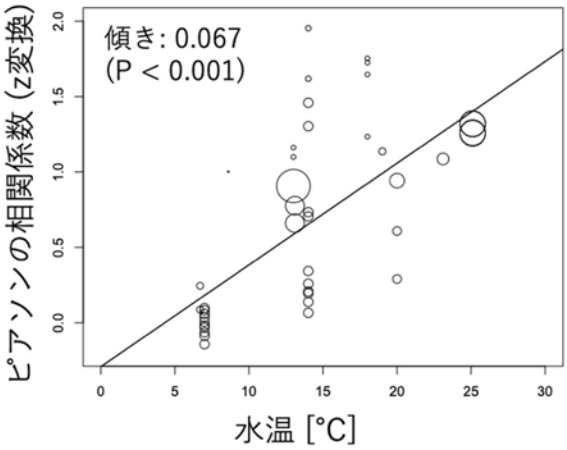

図-2.11 先行研究における環境DNA濃度と生物量の相関性（ピアソンの相関係数、z変換）と平均水温の関係性。線形混合モデル（LMM）で統計的に有意な正の関係が検出された。プロットの大小はLMMにおける重み（z値のばらつきの逆数）を示す。度と生物量の関係性（回帰直線のR²値）。

(3)生物多様性観測や生息地復元の実例における環境DNA分析の活用

(3)－１．琵琶湖における市民参加型生物多様性観測の実践

2021年度には合計44分類群、2022年度には38分類群が検出された。ヌマチチブ、オオクチバス、ブルーギルをはじめとして、カムルチーやワカサギ、タイリクバラタナゴなど、多くの国内外来種・国外外来種が検出された。特に前者3種は琵琶湖の湖岸部全周にわたって7-8割の地点から検出され、その分布の広がりが明瞭になった。一方で、シロヒレタビラやワタカ、イサザなどの絶滅危惧種もわずかな地点数ではあるが検出された。こうしたモニタリングを継続することで琵琶湖の生物多様性における変化（希少種の分布域の縮小や、外来種の分布の広がり、新たな外来種侵入の可能性の検知）などが可能になるため、今後もこのモニタリングは滋賀県と共同で継続していく。この意義についての解説も含めたオンライン講座（滋賀県・龍谷大学共催）には、100名以上の一般受講者の参加があった。

(3)－２．MiFishによる琵琶湖での魚類検出と注目地点検出の実践[9)]

MiFishによるメタバーコーディングの結果、南湖から39魚種が検出された。ほとんどは過去に琵琶湖（または流入河川・水路）で採集記録のある魚種であったが、北部の1地点から[redacted]を検出した（図-2.12：48 reads）。[redacted]は、[redacted]に原産し、日本の[redacted]の淡水魚類である。日本には観賞魚として流通していることから、今回検出された[redacted]は観賞魚個体の遺棄に由来するものと考えられる。[redacted]の野外からの確認事例は琵琶湖を含めて日本では存在しないため、本研究の結果は日本における新たな外来種の侵入を示唆するものである。なお、分析を行なった龍谷大学の研究室で過去に[redacted]を扱った分析を行なった例がないこと、[redacted]の生体・組織サンプルを保持していないこと、採水コントロールからの増幅も確認されなかったことから、コンタミネーションの可能性は低いものと考えている。また、ゼゼラ、ホンモロコ、ヒガイ類が南湖のほぼ全域から確認された（図-2.12）。これらの在来種は、10年前にはほとんど採集されていなかった魚種であり、南湖における個体数の回復が示唆された。

図-2.12　MiFishメタバーコーディングにより南湖から検出されたゼゼラ、ホンモロコ、[redacted]の地点図。各丸印が採水地点を表し、黒色が検出地点、白色が非検出地点を表す。

(3)－３．大台ケ原における絶滅危惧II類オオダイガハラサンショウウオの分布調査[10)]

大台ヶ原で採水した21地点中、9地点から陽性反応が得られた。そのうち1地点では、調査中に目視でオオダイガハラサンショウウオの幼生が1個体確認された。支流AからCのいずれからも陽性反応が得られたことから、オオダイガハラサンショウウオは、本水域に広く分布していることが示された。なお、オオダイガハラサンショウウオは、生体になると陸上で生活し、2月から５月の繁殖期に水中で産卵する。本研究は10月に調査を行なったため、検出されたDNAはほと

んど幼生に由来すると考えられる。本研究により、定期的なモニタリングを行う必要がある希少種の保全地域において、簡便な希少種モニタリングが可能であることが示された。

(3)－４．生息地復元サイトでの保全目標種選定に対する環境DNA分析の活用

環境DNA調査から得られた群集組成は、開発霞とその周辺の河川流域が、上流域、中・下流域、河口域の3つのクラスターに分けられることを示した。開発霞は、再生エリアに近い流入・流出河川の中・下流域を含むグループに含まれた（表-2.4）。このグループでは、21種の在来種と5種の外来種の合計26種を検出した。したがって、この21種の在来種は、開発霞に分散する可能性の高い目標種として適していると考えられた。これに対し、捕獲調査や文献から対象種として選ばれたのは、わずか14種であった。また、捕獲調査では見逃されていたドジョウの在来・外来系統の存在も確認できた。これらの結果は、環境DNAメタバーコード法が、捕獲調査よりも包括的かつ現実的な目標種の選定を可能にし、さらに種内系統の検出による高解像度のモニタリングも提供できることを示すものである。

表-2.4　nMDSに基づく各クラスターの魚種。開発霞を含むクラスター2は、重信川中流域の合計13地点を含み、26種を検出した。Ito *et al.*(2023)[2)]より抜粋。

Family	Species	Cluster 1	Cluster 2			Cluster 3
		S1–3	S4–8	U1–3	K1–5	S9
Anguillidae	*Anguilla japonica*		+		+	+
Cyprinidae	*Cyprinus carpio**		+	+	+	+
	Carassius spp.		+		+	
	*Tanakia limbata**				+	
	Opsariichthys platypus	+	+	+	+	+
	Candidia temminckii	+	+	+	+	+
	Phoxinus oxycephalus jouyi	+	+	+	+	
	Pseudorasbora parva		+			
	Gnathopogon elongatus elongatus		+		+	
	Pseudogobio esocinus		+	+	+	+
Cobitidae	*Misgurnus anguillicaudatus* (Clade C)		+		+	
	Misgurnus anguillicaudatus (Clade B)*		+		+	
	Cobitis shikokuensis		+			
	Cobitis sp. BIWAE type A		+		+	
Siluridae	*Silurus asotus*		+		+	
Plotosidae	*Plotosus japonicus*					+
Plecoglossidae	*Plecoglossus altivelis altivelis*		+			+
Salmonidae	*Oncorhynchus* spp.	+	+			
Mugilidae	*Mugil cephalus*					+
Adrianichthyidae	*Oryzias latipes*		+		+	
Centrarchidae	*Lepomis macrochirus**		+			
	Micropterus salmoides salmoides			+		
Haemulidae	*Plectorhinchus cinctus*		+			
Sparidae	*Acanthopagrus schlegelii*					+
Blenniidae	*Omobranchus punctatus*					+
Odontobutidae	*Odontobutis obscura*		+	+	+	
Gobiidae	*Luciogobius pallidus*					+
	Luciogobius spp.					+
	Acanthogobius flavimanus					+
	Tridentiger spp.		+	+	+	+
	Tridentiger trigonocephalus					+
	Rhinogobius flumineus	+	+	+	+	
	Rhinogobius similis					+
	Rhinogobius spp.		+	+	+	+
	Favonigobius gymnauchen					+
	Gymnogobius breunigii					+
	Gymnogobius scrobiculatus					+
Tetraodontidae	*Takifugu* spp.				+	+
	Total	5	23	10	19	21

*non-native species

５．研究目標の達成状況

本サブテーマでは生物量推定の精度評価を実施するとともに、希少種および外来種の検出感度向上をすすめ、環境DNA分析による生物の分布や生物量の推定の信頼性を明らかにすることで、保全の実務における当該分析技術の実用性を高めることを目標とした。研究期間前半は新型コロナウイルス感染拡大の影響にさらされ、生物量推定の精度評価の手法を野外における操作実験から、既存の文献からの情

報を用いたメタ解析やシミュレーション、水槽実験等に変更して実施したが、生物量推定に関わるばらつきやその原因をより包括的かつ一般的に明らかにすることができた。希少種及び外来種の検出感度向上については、現状で現実的に組織試料やDNA試料を入手しうる種については12Sのバーコーディング領域の配列をほぼ網羅して取得し、配列に基づく種判別の可否についての精査も終えることができた。また、いくつかの希少種や外来種（魚類以外も含む）について種特異的もしくは種内系統特異的な検出系も設計に成功し、それぞれの生物の実地での検出に利用が進みつつある。また、琵琶湖においては市民参加型の調査等の社会実装を進めるなかで、希少種および外来種の分布を詳細に明らかにするデータが得られ、これまでに本邦で記録のない外来種のシグナルを検出するなど、保全に関わる今後の活動の指針となる重要なデータを得ている。実務に近い成果としては、生息地の新規造成の現場で造成後に定着を目指す対象種（周辺水域から自然分散してきうる在来種）の選定に、環境DNA分析を活用する方法論を提案した。これらの成果から、本サブテーマは目標を大きく上回る成果をあげたものと判断した。

６．引用文献

1) M. MIYA, Y. SATO, T. FUKUNAGA, T. SADO, J. Y. POULSEN, K. SATO, T. MINAMOTO, S. YAMAMOTO, H. YAMANAKA, H. ARAKI, M. KONDOH, and W. IWASAKI. Royal Society Open Science 2: 150088 (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species.
2) G. ITO, H. YAMAUCHI, M. SHIGEYOSHI, K. ASHINO, C. YONASHIRO, M, ASAMI, Y. GOTO, J. J. DUDA, and H. YAMANAKA. Global Ecology and Conservation 43: e02448 (2022) Using eDNA metabarcoding to establish targets for freshwater fish composition following river restoration.
3) G. ITO, J. KITAMURA, S. KAWASE, M. ASAMI, Y. GOGO, and H. YAMANAKA. Development of an environmental DNA detection system for highly sensitive detection of intraspecific regional lineages in *Acheilognathus cyanostigma*. *In prep*.
4) G. ITO, T. SHIMADA, T. DEGUCHI, S. YAMADA, and H. YAMANAKA. Development of species-specific primers in *Cynops pyrrhogaster* and rediscovery of the Atsumi race from the Atsumi Peninsula, Aichi Prefecture, Japan. *In prep*.
5) T. JO, and H. YAMANAKA. Freshwater Biology 67: 1333-1343 (2022) Meta-analyses of eDNA downstream transport and deposition in relation to hydrogeography in riverine environments.
6) T. S. JO, K. TSURI, and H. YAMANAKA. The Science of Nature 109: 38 (2022) Can nuclear aquatic environmental DNA be a genetic marker for the accurate estimation of species abundance?
7) T. JO, and H. YAMANAKA. Ecology and Evolution 12: e9234 (2022) Fine-tuning the performance of abundance estimation based on environmental DNA (eDNA) focusing on eDNA particle size and marker length.
8) T. S. JO. Hydrobiologia 850: 39-50 (2023) Correlation between the number of eDNA particles and species abundance is strengthened by warm temperature: Simulation and meta-analysis.
9) G. ITO, A. KONDO, D. ISHIZAKI, S. KAWASE, and H. YAMANAKA. Restoration of freshwater fish fauna in Lake Biwa (south basin) revealed by environmental DNA metabarcoding. *In prep.*
10) G. ITO, T. HIGUCHI, T. OKUMURA, T. HIROHARA, and H. YAMANAKA. Attempts to detect *Hynobius boulengeri* using environmental DNA in Odaigahara, Central Honshu, Japan. *In prep.*

Ⅱ－３　希少種・外来種の種内変異解析手法の確立

学校法人大谷学園大阪大谷大学
薬学部　衛生・微生物学講座　　内井　喜美子
谷　佳津治
見坂　武彦

［要旨］

サブテーマ３は、環境DNA技術を用い、希少種の遺伝的多様性および外来種の遺伝構造を推定する種内変異解析手法を開発すること、さらに開発手法の野外実践により、希少種および外来種の遺伝的な質に基づいた保全指標を提示することを目的とした。まず希少種については、絶滅危惧種に指定されている琵琶湖固有種ホンモロコをモデルとし、次世代シーケンンシングを用いた網羅的多様性解析により、１～数塩基というわずかな変異を正確に判別しながら、低頻度の遺伝子型をも高感度かつ定量的に検出する環境DNA分析法の開発に成功した。さらに開発手法の野外実践により、琵琶湖ホンモロコ個体群の包括的な遺伝的多様性評価を実現し、環境DNA分析より推定された遺伝的多様性が、過去の個体群縮小の程度の指標となりうることを実証した。外来種については、侵略的外来種であるブルーギルおよび日本生息ブラックバス３種（オオクチバス、フロリダバス、コクチバス）をモデルとし、その遺伝構造を明らかにするため、次世代シーケンンシングを用いたハプロタイピング法を開発した。近畿地方を中心としたブルーギルの環境DNAハプロタイピングの野外実践からは、琵琶湖からの距離に応じたハプロタイプ多様性の減少により、琵琶湖を供給源とした分布拡大経路を再現することに成功した。ブラックバス３種同時の環境DNAハプロタイピングの野外実践においては、四国地方から東北地方にまたがる広域調査を実施した。これにより、３種の最新分布情報を明らかにするとともに、同時に取得したハプロタイプ情報が、ブラックバス類の分布拡大経路を推定する上で有用であること実証した。本サブテーマで得られた成果により、環境DNA技術を用いた種内変異解析手法が、遺伝的多様性に基づく希少種個体群の健全性評価や、遺伝構造に基づく外来種の分布拡大経路推定において有用であることが実証された。種内変異を検出する環境DNAアプローチ法が、これからの生物多様性保全において、迅速・網羅的かつ持続可能なモニタリング法として実用化されることが大いに期待される。

１．研究開発目的

環境DNA技術は、生物分布を迅速に推定するツールとして急速な発展を遂げ、主として「種」の分布把握に用いられてきた。しかし、種の分布情報だけでは、希少種保全や外来種防除を行う上で重要となる、遺伝的多様性に基づく個体群の健全性評価や、遺伝構造に基づく分布拡大推定を行うことはできない。そこで本サブテーマでは、DNA塩基配列に基づき生物を判定する環境DNA技術の特性を活用し、希少種の遺伝的多様性および外来種の遺伝構造を推定する種内変異解析手法を開発すること、さらに開発手法の野外実践を通し、個体群の遺伝的な質に基づいた保全・防除指標を提示することを目的とした。

２．研究目標

希少種および外来種の個体群遺伝構造を推定する種内変異解析手法の開発およびその野外実践を通し、個体群の遺伝的な質に基づいた保全指標を提示する。

３．研究開発内容

(1) 希少種の遺伝的多様性を推定する種内変異解析手法の開発

希少種のモデルとして、環境省により絶滅危惧IA類に指定されているホンモロコ（*Gnathopotn caerulescens*）[1)]を選定し、その遺伝的多様性を評価するために、ミトコンドリアDNA（mtDNA）のシトクロム*b*遺伝子を標的とした、次世代シーケンシング（NGS）を用いたアンプリコン解析法の開発を行った。ホンモロコについては多数のハプロタイプが報告されているが、ほとんどが１～数塩基の違いしかなく[2,3)]、塩基配列の多様性に乏しい。このような遺伝的背景は他の希少種にも当てはまる可能性があるため、本研究では、少ない変異を正確に判別した上で、遺伝的多様性を定量的に評価できる環境DNA分析法の確立を目指した。

環境DNA分析では、環境DNAサンプルからターゲットDNAをPCR増幅する際に、35回以上のサイクル数を用いる場合が多い。しかし、PCR過程でのキメラ配列の生成は、数塩基の変異を正確に検出する際に大きな問題となり、このキメラ配列の生成率は、PCRサイクル数が多くなるほど増加することが知られる[4)]。種内変異解析においてキメラ配列が生成すると、それが存在しないはずのハプロタイプとして検出されてしまうため、遺伝的多様性を正しく推定することができない。遺伝的多様性解析におけるこの障壁を解決するため、まず、キメラ配列の生成を抑制するため、PCRサイクル数を減らす効果の検討を行った。同時に、NGSにより得られた塩基配列データの解析プロセスにおいて、キメラ配列を適切に除去するフィルタリング法の開発を行った。フィルタリングの方策として、PCRテンプレートにターゲットDNAとおおよそ等量の標準DNAを添加した上でPCR増幅を実施した。これにより、理論的には、生じるキメラ配列は標準DNA由来のものが最も多くなる。したがって、最終的に得られるNGS配列データから、標準DNAに由来するキメラ配列の最大のリード数よりも少ないリード数を持つ配列を除去すれば、キメラ配列を真のハプロタイプとして検出する危険性を排除できると考えられた。また、PCR時の塩基取り込み間違いによるエラー配列のうち、標準DNAに由来する配列を特定することにより、PCRの繰り返し中において、エラー配列が生じる確率を算出した。これにより、遺伝的多様性解析の際に設けるべきPCRの繰り返し数を決定した。最終的に、10種のホンモロコ人工合成DNAを様々な割合で含む疑似個体群試料を用い、開発手法で推定された遺伝的多様性の正確性の検証を行なった。開発手法の野外における有効性の確認は、環境DNA調査と同時・同所的に卵および成魚の採捕調査を行い、環境DNA分析と個体毎分析より得られた遺伝的多様性解析結果を比較することにより行った。

(2) 希少種ホンモロコの遺伝的多様性評価の野外実践

琵琶湖一円におけるホンモロコの地域個体群の遺伝的多様性を評価するため、2021年から2022年にかけ、琵琶湖の北部４地点、東部５地点、南部４地点の計13地点において、ホンモロコ繁殖期に合わせて環境DNA調査を実施した（表-3.1）。各地点で５回以上に分けて合計1-2 Lを採水し、水サンプルは、現場で加圧ポンプを用いステリベクスフィルター（孔径0.45 μm）にろ過した（0.3-1 L/フィルター）。フィルターは冷凍状態で輸送、保存し、Uchii et al. (2022)[5)]の方法でDNA抽出を行なった。抽出した環境DNAは、３-(1)で開発した種内変異解析に供し、遺伝的多様性データを取得した。地域個体群における遺伝的多様性を正確に推定するため、同一地点で複数回の調査を行い（表-3.1）、同一地点で得られた複数のデータはプールした上で遺伝的多様性の推定を行なった。まず、検出されたハプロタイプの塩基配列およびハプロタイプ組成に基づき、地域個体群の分化の程度をΦ_{ST}に基づいて評価した。さらに、各地域個体群のハプロタイプネットワーク図を作成するとともに、ハプロタイプ多様度（*h*）とハプロタイプ数を算出した。また、同一地点で得られたデータをプールせず、各地点の調査毎に得られたハプロタイプ組成データを用い、各地点・各時点における個体群遺伝構造の類似度を、Bray-Curtis指数を用いたノンパラメトリック多次元尺度法（NMDS）により視覚化した。

表-3.1　琵琶湖のホンモロコ繁殖生息地における環境DNA調査。地点コードは図-3.6および図-3.8と一致する。

琵琶湖の地域	地点コード	2021年の調査日	2022年の調査日
北部	EN	5/11, 5/28, 6/10	4/28, 5/16, 6/7
	AM	5/28	4/28, 5/16, 6/7
	HR	5/28, 6/10	4/28, 5/16, 6/7
	MT	5/11, 5/28	4/28, 5/16, 6/7
東部	IB1	4/9, 4/23	4/13
	IB2	4/9, 4/23, 5/28	3/17, 4/13
	NS1	4/9, 4/23, 5/28	4/13
	NS2	4/9, 4/23	3/17, 4/13
	YM	6/10	4/13
南部	IH	4/23	4/12
	TJ	4/9, 4/23	4/12
	AK	4/9, 4/23, 5/28	4/12
	SN	4/9, 4/23, 5/28	4/12

(3) 外来種のハプロタイピング法の開発

外来種のモデルとして、侵略的外来種であるブルーギル（*Lepomis macrochirus*）およびブラックバス３種［オオクチバス（*Micropterus salmoides*）、フロリダバス（*M. floridanus*）、コクチバス（*M. dolomieu*）］を選定した。まず、ブルーギルについては、日本には５つのハプロタイプ（ミトコンドリアのD-loop周辺領域とND1周辺領域における変異により判別される）が導入されたことが分かっている[6)]。そこでD-loopとND1の２領域をマルチプレックスPCRにより同時増幅し、NGSを用いたアンプリコン解析に供することにより、５つのハプロタイプの頻度を推定するハプロタピング法の開発を行った。開発手法の野外における有効性は、５つすべてのハプロタイプの存在が確認されている琵琶湖の２つの内湖（伊庭内湖、西の湖）において、環境DNAハプロタイピングを実施することにより確認した。

オオクチバス、フロリダバス、コクチバスについても、NGSを用いたアンプリコン解析を用いたハプロタイピング法の開発を行った。これら３種については、mtDNAのD-loop領域において多数のハプロタイプが報告されおり、日本国内ではオオクチバス８タイプ、フロリダバス10タイプ、コクチバス３タイプが存在することが報告されている[7-9)]。そこで、国内に生息する３種の全21ハプロタイプを同時に検出かつ判別できるプライマーの開発を下記の手順で行った。まず、３種のD-loop領域配列を、DDBJ/EMBL/GenBankデータベースより全て取得した。それらをリファレンスとし、全21ハプロタイプを判別できる領域をマニュアルで探索した後、その領域の外側に、日本未報告のハプロタイプも検出できるよう、国内外の全既報ハプロタイプを増幅するプライマーペアを設計した。設計したプライマーペアの特異性は、Primer BLASTを用いたin silico PCRにより確認した。

(4) 外来種ブルーギルのハプロタイピングの野外実践

日本へのブルーギルの導入は1960年に一度だけなされ、その子孫が日本全国に分布を拡大した[10)]。初期導入地であった琵琶湖は環境収容力が高く、国内におけるブルーギル供給源として機能したことが示唆されている。すなわち、琵琶湖においては全５ハプロタイプが存在するが、琵琶湖からの距離が大きくなるほどハプロタイプ数が減少しており、一般に少ない個体数で起こる新規生息地への移入の過程で、ハプロタイプ多様性が失われていったと考えられている[6)]。このように、ハプロタイプ多様性は、外来種の分布拡大経路を推定する上で有用な指標となりうる。そこで本研究では、まずブルーギルをモ

デルとした概念実証研究として、環境DNAハプロタイピングにより、供給源からの距離の効果を検出できるかどうか検証した。2020年から2021年にかけ、琵琶湖および近畿・中国地方の湖沼において、３-(3)で開発したハプロタピング法を用いた環境DNA調査を実施し、得られたハプロタイプデータを用い、各地点におけるハプロタイプ多様性（ハプロタイプ数）と琵琶湖からの距離の関連を解析した。

(5) 外来種ブラックバス３種の広域分布推定およびハプロタイピングの野外実践

侵略的外来生物として全国に分布しているオオクチバス（1925年以降、複数回の導入[10,11]）に加え、近年はフロリダバス（1988年、奈良県池原貯水池に導入[8]）およびコクチバス（1925年に芦ノ湖に導入されたが定着せず、1990年頃より各地で確認され始めた[12]が、導入経緯は不明）の分布域拡大が確認され[13]、在来生態系への影響が懸念されている。そこで本研究では、ブラックバス３種の最新分布データとハプロタイプデータを同時に取得するため、2021年から2023年にかけ、３-(3)で開発した環境DNAハプロタイピングを用いた広域調査を、四国地方から東北地方までの28都府県の合計84の湖沼および河川（ただし同一河川の上流・下流を含む）で実施した。各湖沼・河川における採水は互いに離れた３地点（ただし最も離れた２地点間の距離を1 km以内とした）で行い、それらを混合して１サンプルとした。水サンプルはステリベクスフィルター（孔径0.45 μm）を用いてろ過（0.5-1.2 L/フィルター）し、その後、DNA抽出、そしてハプロタイピングを行なった。得られたハプロタイプの広域分布情報と、各種についての導入記録を照らし、ブラックバス類の分布拡大経路の推定を試みた。

４．結果及び考察

(1) 希少種の遺伝的多様性を推定する種内変異解析手法の開発

NGSを用いたアンプリコン解析において、キメラ配列および塩基取り込み間違いにより生じたエラー配列（ここでは両者を合わせて偽ハプロタイプと呼ぶ）を除去することは、遺伝的多様性を正確に評価する上で非常に重要である。本研究では、遺伝的多様性評価の対象領域を増幅する際のPCRサイクル数を、環境DNA分析で通常用いられる35サイクルから30サイクルまで減らすことにより、キメラ配列の生成が大幅に抑制されることを確認した（図-3.1）。また、塩基の取り込み間違いによるエラー配列が生じる確率が、６繰り返し中、常に２以下であることを確認した（図-3.2）。次に、ホンモロコ疑似個体群試料（10ハプロタイプを様々な比率で含む）を用い、標準DNA添加によるキメラ生成率の把握に基づくフィリタリング法の検証を行なった。標準DNAを添加した上で30サイクルのPCRを行い、アンプリコン解析により得られたNGS配列データから、標準DNA由来のキメラ配列の最大リード数より低いリード数を持つ配列を除去し、さらに繰り返し中１／３以下の検出率であった配列を除去したところ、偽ハプロタイプの検出はゼロであった（図-3.3）。一方、相対頻度が0.4%の真のハプロタイプはフィルタリングの過程で除去されることなく検出されていたことから、本フィルタリング法により、真のハプロタイプ組成が精度良く再現されることが確認された（図-3.3）。これらの結果より、NGSアンプリコン解析におけるPCR条件を、(1)ターゲットDNA増幅を30サイクルのPCRで行うこと、(2)３繰り返しを設けること、(3)解析試料に含まれるホンモロコDNA（ホンモロコ特異的リアルタイムPCR[5]により定量）と等量の標準DNAをPCRに添加することと決定した。さらに、わずかに生じるキメラ配列およびエラー配列を確実に除去するためのフィルタリング法として、（1）NGS配列データから、標準DNA由来キメラ配列の最大リード数より少ないリード数を持つ配列をフィルターアウトすること、(2)３繰り返し中、１繰り返しのみで検出された配列をフィルターアウトすることと決定した。この最適化された種内変異解析手法を琵琶湖において実践したところ、環境DNA分析より推定されたハプロタイプ多様性は、同時採取した成体の個体毎分析により得られたハプロタイプ多様性とよく一致しただけでなく、卵分析では検出されなかったレアハプロタイプを高感度に検出できることが明らかとなった（図-3.4）。迅速性・感度の両面において、環境DNAによる遺伝的多様性解析が優れた方法であることが実証された。

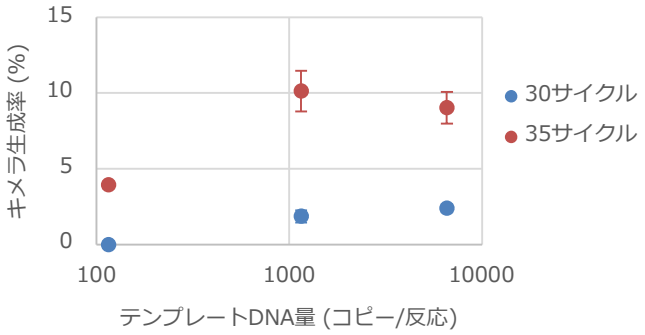

図-3.1　PCRサイクル数の違いによるキメラ生成率（平均 ± 1SD）の比較。35サイクルに比べ、30サイクルのPCRではキメラ生成率が大幅に抑制された。（Wakimura et al. 2023 Environmental DNA[14]のデータより作成）

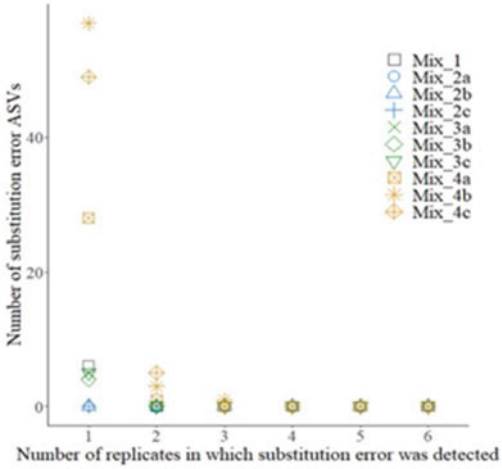

図-3.2　６繰り返し中、同一の塩基置換エラーが検出された頻度。３繰り返し以上で検出された塩基置換エラーは存在しなかった。（Wakimura et al. 2023 Environmental DNA[14]のサプリメンタルデータより引用）

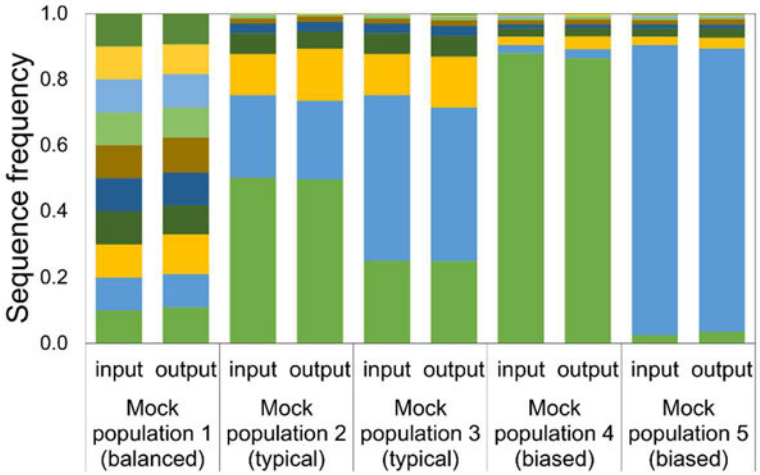

図-3.3　ホンモロコ疑似個体群試料の解析により得られたハプロタイプ組成。元のハプロタイプ組成が精度良く再現され、また偽ハプロタイプの検出はなかった。（Wakimura et al. 2023 Environmental DNA[14]より引用）

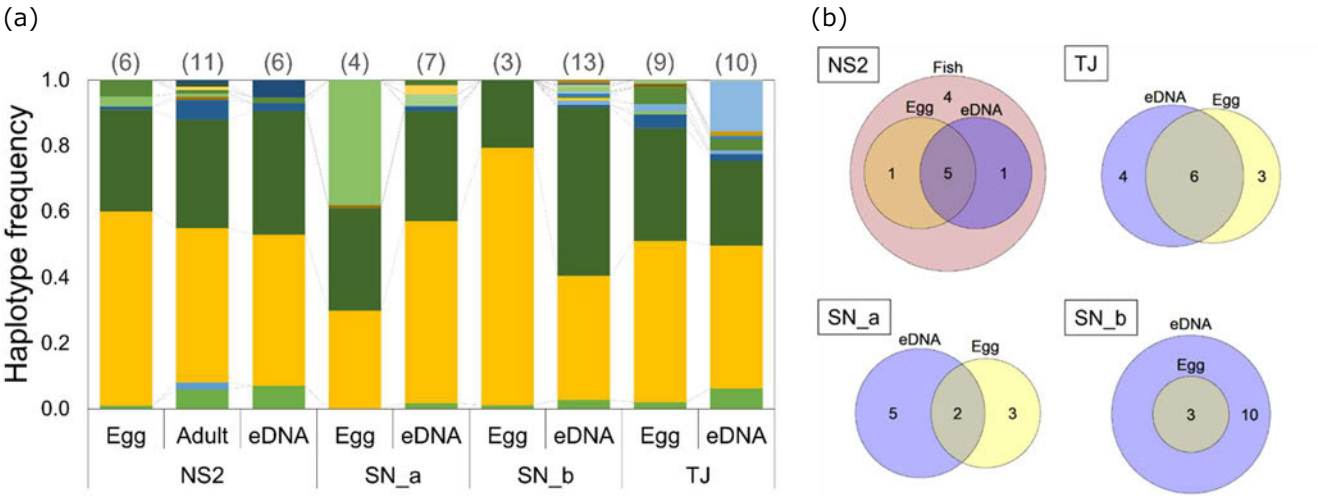

図-3.4　(a) 琵琶湖の３地点におけるのべ４回の調査において、環境DNA分析より推定されたハプロタイプ組成と、同時に採取された成体（NS2のみ。N = 100）および卵（N = 100, 100, 92, 96）の個体毎分析より推定されたハプロタイプ組成の比較。棒グラフ上の数字は検出ハプロタイプ数を示す。 (b) 環境DNA、成体、卵のそれぞれの方法で検出されたハプロタイプをベン図で表したもの。成体および卵の解析において2個体以上で検出されたハプロタイプのほとんどが、環境DNA分析においても検出された（Wakimura et al. 2023 Environmental DNA[14]より引用）

(2) 希少種ホンモロコの遺伝的多様性評価の野外実践

繁殖期に合わせて環境DNA調査を実施することにより、ホンモロコ繁殖生息地13地点すべてにおいて、濃度の高い、すなわち多数個体由来のDNAを含む環境DNA試料を採取することに成功した。開発した種内変異解析法を用い、環境DNA分析により遺伝的多様性データを取得したところ、合計で36個のハプロタイプが検出され、そのうち16個は本研究により初めて検出されたハプロタイプであった。地域個体群間の遺伝的差異を評価するため、地域個体群のペアワイズΦ_{ST}を算出した結果を図-3.5に示す。どの地域個体群間においてもΦ_{ST}の値は小さく（範囲: 0.00026-0.02817）、遺伝的分化の程度は低いことが示唆された。各地域個体群の遺伝的多様性を、ハプロタイプネットワークを用いて視覚化したところ、どの地域個体群も、２つの祖先型ハプロタイプを中心とした星型のハプロタイプネットワークを示した（図-3.6）。星型のハプロタイプネットワークは、一般に、過去に急激な個体群拡大が起こったことを示す[15]。ホンモロコは1990年代中頃に個体群縮小が起こったが[16]、現在の個体群において低頻度のハプロタイプが比較的多く検出されたことから、個体群縮小は、低頻度ハプロタイプを排除するほど強いボトルネック効果を及ぼさなかったことが示唆された。しかしハプロタイプ数とハプロタイプ多様度からは、琵琶湖北部において、南部や東部に比べ遺伝的多様性が低い傾向が認められ（図-3.7）、個体群縮小が北部において顕著であった可能性が示唆された。この理由としては、1992年に瀬田川洗堰で開始された水位操作が影響したと考えられた。すなわち、梅雨の増水に備えた琵琶湖の水位低下操作が、コイ科魚類の産卵を阻害することは各所で指摘されているが、産卵ピーク[17]が南部（４－５月）に比べて遅い（５－６月）北部のホンモロコ個体群は、水位低下に伴う卵の干出等の影響を受けやすかったと考えられた。図-3.8には、各調査地点、各調査時点における個体群遺伝構造の類似度を、NMDSにより視覚化した。東部および南部では、地点や調査時期に関わらず、地域内で良く似た遺伝構造を持っていたのに対し、北部においては、地点と調査時期により個体群遺伝構造が大きく異なっていた。琵琶湖では数年前よりホンモロコ個体数の回復傾向が報告されているが[18]、NMDSより検出された北部における遺伝構造の不安定さは、個体群サイズの小ささによる確率的なハプロタイプ組成の変動を示唆し、北部にお

いては個体群の回復が遅れている可能性が考えられた。

環境DNA分析を用いた遺伝的多様性評価法の利点は、ある場所で採取した環境DNAサンプルを分析すれば、そこに生息する多数個体のDNA情報を一挙に取得できることである。つまり、従来の一個体ごとの遺伝子解析に比べ、非常に効率よく集団の遺伝的多様性を推定することが可能となる。保全において重要となる迅速性・広域性を実現できるだけでなく、労力やコストの面で持続可能な方法であることから、希少種や絶滅危惧種個体群の健全性モニタリング法として実用化が進むことが期待される。

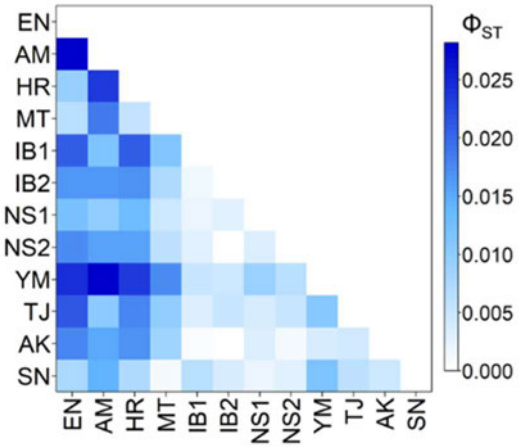

図-3.5　各地域個体群間の遺伝的分化（Φ_{ST}）をヒートマップで示した。青色が濃いほど遺伝的分化の程度が大きい。（Wakimura et al. 2023 Environmental DNA[14]より引用）

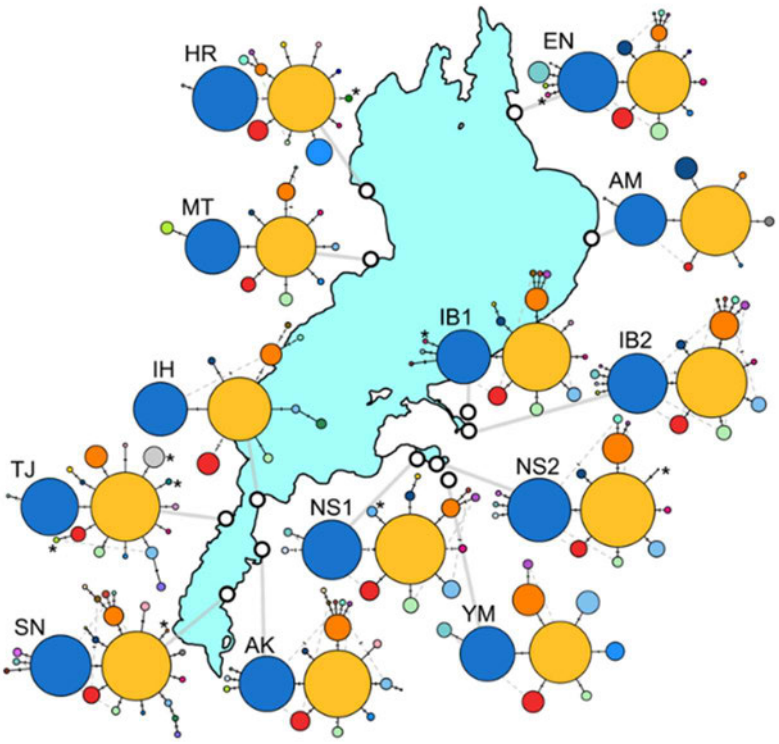

図-3.6　琵琶湖のホンモロコ地域個体群におけるハプロタイプネットワーク。円の色はハプロタイプの違いを、円の大きさは、各地域個体群における出現頻度を示す。（Wakimura et al. 2023 Environmental DNA[14]より引用）

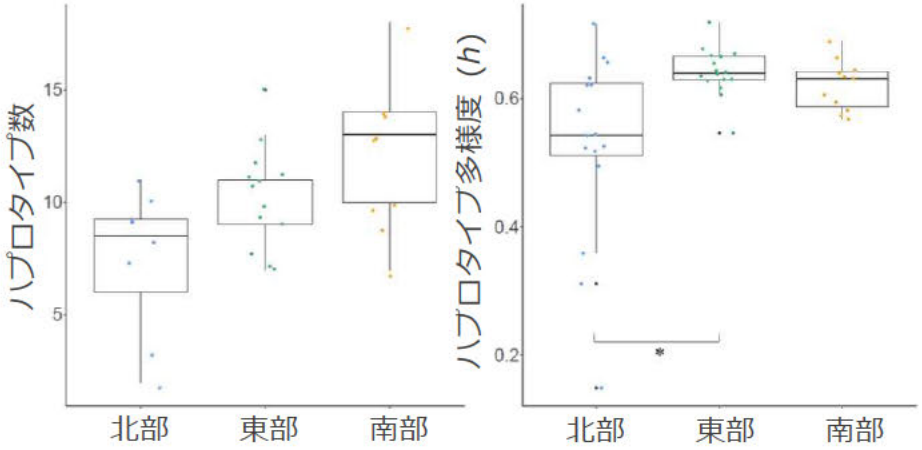

図-3.7　琵琶湖の北部、東部、南部の地域個体群において検出されたハプロタイプ数（左パネル）およびハプロタイプ多様度（右パネル）。*p<0.05。（Wakimura et al. 2023 Environmental DNA[14]のサプリメンタルデータより引用・改変）

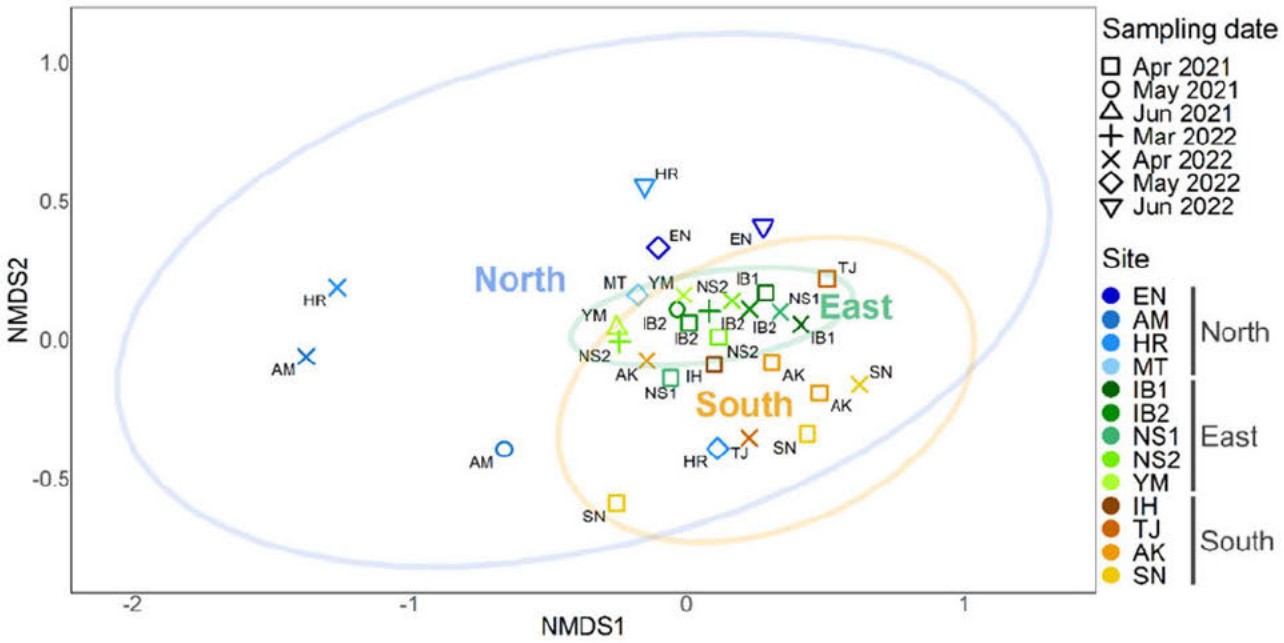

図-3.8　琵琶湖の各調査地点において、調査毎に推定されたホンモロコの遺伝構造。調査日の違いをシンボルにより、地域および地点の違いを色で表している。楕円は、北部、東部、南部の集団の95% 信頼区間を示す。（Wakimura et al. 2023 Environmental DNA[14]より引用）

(3) 外来種のハプロタイピング法の開発

ブルーギルの日本生息５ハプロタイプを区別するため、D-loopとND1の２領域のマルチプレックスPCRを開発した。開発したプライマーペアの配列は、D-loop領域については、5'-CCAGTCTTGTAAACTGGACG-3'および 5'-ATGTATGAATGGGGTAATCCTAGT-3'、ND1領域については、5'- CATGCCCCTTTGCCGAAG-3'および 5'- ATATAGCCCAAGACTTTACGTTCA-3'であった。本ハプロタイピング法を、５つのハプロタイプ全てが存在することが知られる琵琶湖の２つの内湖（伊庭内湖、西の湖）において実践したところ、どちらの内湖においても５ハプロタイプを検出することに成功し、開発した環境DNAハプロタイピング法の野外における有効性が確認された。

ブラックバスについては、日本生息３種の全21ハプロタイプを同時判別できるD-loop部分領域（約214 bp）が存在することを確認し、その領域の外側に３種を同時に増幅するプライマーペアを設計することができた（図-3.9; Fプライマー: 5'-AGGATTTCCCCATTCATTCATCA-3'、Rプライマー: 5'-ACYGTGTGAAACCCCCAC-3'）。このプライマーペアの特異性はin silico PCRにより確認された。またRプライマーの一塩基変異（プライマーには縮重塩基を使用）により、３種のPCR増幅効率に差が出ないことも確認され、３種21ハプロタイプの同時検出および判別を可能とするハプロタイピング法の開発に成功した。

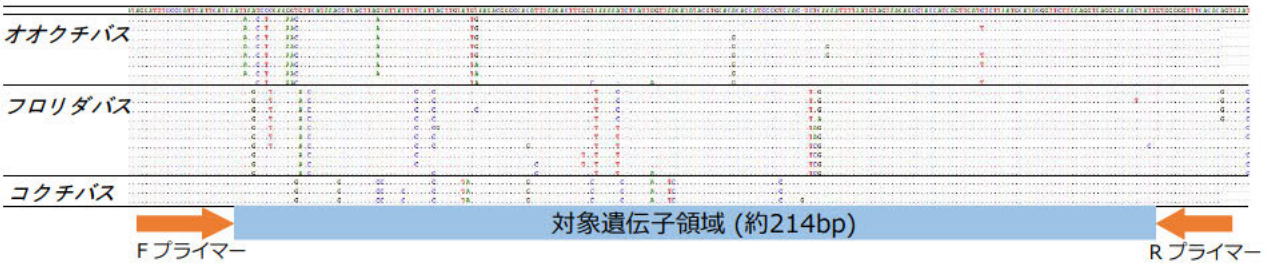

図-3.9　オオクチバス、フロリダバス、コクチバスの日本生息全ハプロタイプを区別する領域と、その外側の保存領域に設計されたプライマーペア。

(4) 外来種ブルーギルのハプロタイピングの野外実践

図-3.10に、近畿・中国地方で実施した環境DNAハプロタイピングによって得られたブルーギルのハプロタイプ組成を、図-3.11に、琵琶湖からの距離と検出ハプロタイプ数の関係を示す。供給源と考えられる琵琶湖においては全５ハプロタイプが検出されたのに対し、琵琶湖からの距離が大きくなるにつれ、検出ハプロタイプ数は減少した。琵琶湖からの距離とハプロタイプ数の間には強い負の相関が検出され（スピアマン順位相関係数 = -0.93、$p<0.01$）、先行研究[6]で示された、供給源からの距離とハプロタイプ数の負の相関が、環境DNAハプロタイピングによっても再現された（ただし、対象とした水域は先行研究と本研究で異なる）。一般に、外来種の新規生息地への移入は小さな集団サイズで起こるため、移入集団（創始者）の遺伝的多様性はボトルネック効果によって低下する。本研究で得られた結果は、先行知見[6]と合わせ、琵琶湖からの分布拡大過程で、創始者効果（供給源の一部の個体・個体群が侵入先の創始者となり種内多型を規定する効果）により遺伝的多様性の低下が連続的に生じたことを示唆した。このように、環境DNAハプロタイピングは、外来種の分布拡大経路推定において有用であることが実証された。

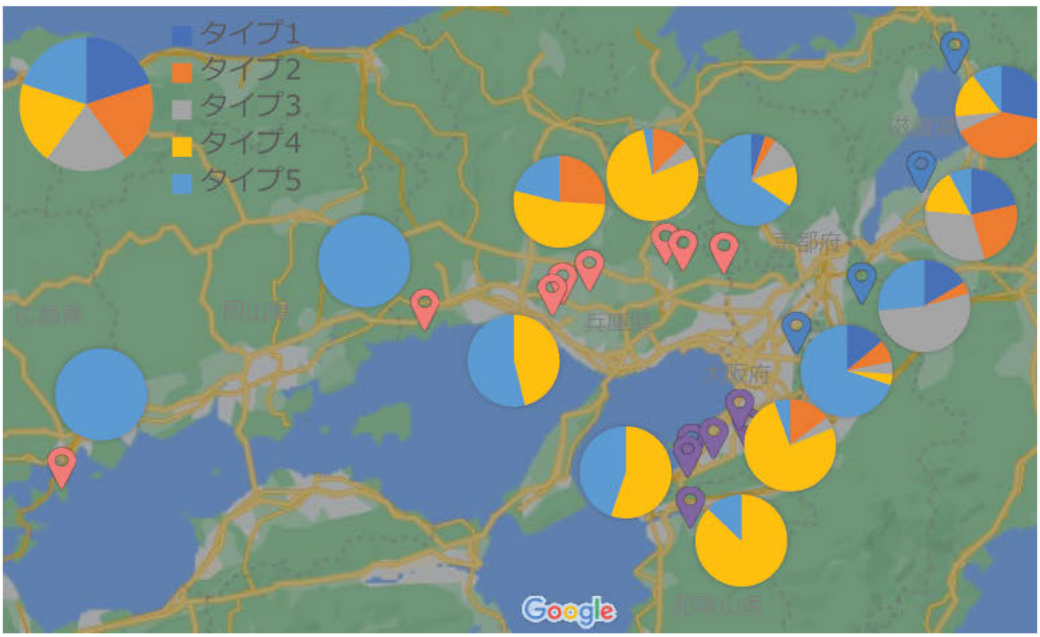

図-3.10　供給源と考えられる琵琶湖と、近畿・中国地方におけるブルーギルのハプロタイプ組成。淀川水系に属する調査地点を青、それより南に位置する地点を紫、西に位置する地点をピンクで示した。

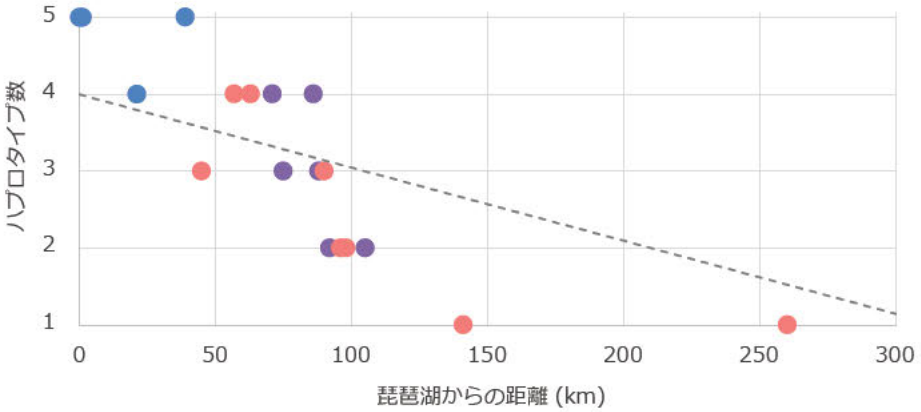

図-3.11　各調査地点の琵琶湖からの距離と、検出されたハプロタイプ数の関係。点の色分けは図-3.10の調査地点の色分けと一致する。

(5) 外来種ブラックバス３種の広域分布推定およびハプロタイピングの野外実践

環境DNA調査を実施した84湖沼・河川のうち、76湖沼・河川についてハプロタイプデータの取得に成功し、日本における存在が確認されているオクチバス８タイプ、フロリダバス10タイプ、コクチバス３タイプのうち、それぞれ８タイプ、９タイプ、２タイプが検出された。図-3.12にオオクチバス、フロリダバス、コクチバスおよびそれら３種のハプロタイプの広域分布状況を示した。オオクチバスは全国に広く分布し、56水域で検出された。検出されたハプロタイプ数は、兵庫県権現池と山梨県西湖において４と最も多かった。兵庫県はオオクチバスの初期（1930年代）導入地の一つである[10]ため、また西湖ではオオクチバスの漁業権が設定され、積極的な放流がなされてきたためと考えられた。琵琶湖においては１ハプロタイプのみが検出されたが、同一のハプロタイプが近畿・中部地方の多くの水域で検出されており、琵琶湖が周辺への供給源となっている可能性が考えられた。フロリダバスは、近畿地方を中心として14水域で検出された。フロリダバスについて唯一の導入記録がある奈良県の池原貯水池においては、８ハプロタイプが検出された。１度の調査でフロリダバス全９ハプロタイプのうち８ハプロタイプが検出されており、環境DNAハプロタイピングの感度の高さが際立つ結果となった。検出ハプロタイ

プ数は、池原貯水池の近隣に位置する奈良県津風呂湖（３ハプロタイプ）と和歌山県切目川（５ハプロタイプ）において多く、これは供給源である池原貯水池からの距離の効果によるものと考えられた。一方、琵琶湖でも３ハプロタイプが検出されており、何者かにより積極的な放流がなされたことが示唆された。また愛知県庄内川と石川県前川支流では、琵琶湖に存在するフロリダバスハプロタイプが１つ検出されており、琵琶湖を経由した分布拡大が進んでいる可能性も示唆された。コクチバスは、東北、関東、中部地方の29水域で検出され、分布がすでに広範囲に拡大していることが確認された。検出の最西端は和歌山県紀ノ川であった。環境DNA調査から得られたオオクチバスとコクチバスの最新分布状況は、河川水辺の国勢調査６巡目までの結果[13]とよく一致した。なお、全３種が検出されたのは三重県櫛田川のみであった。

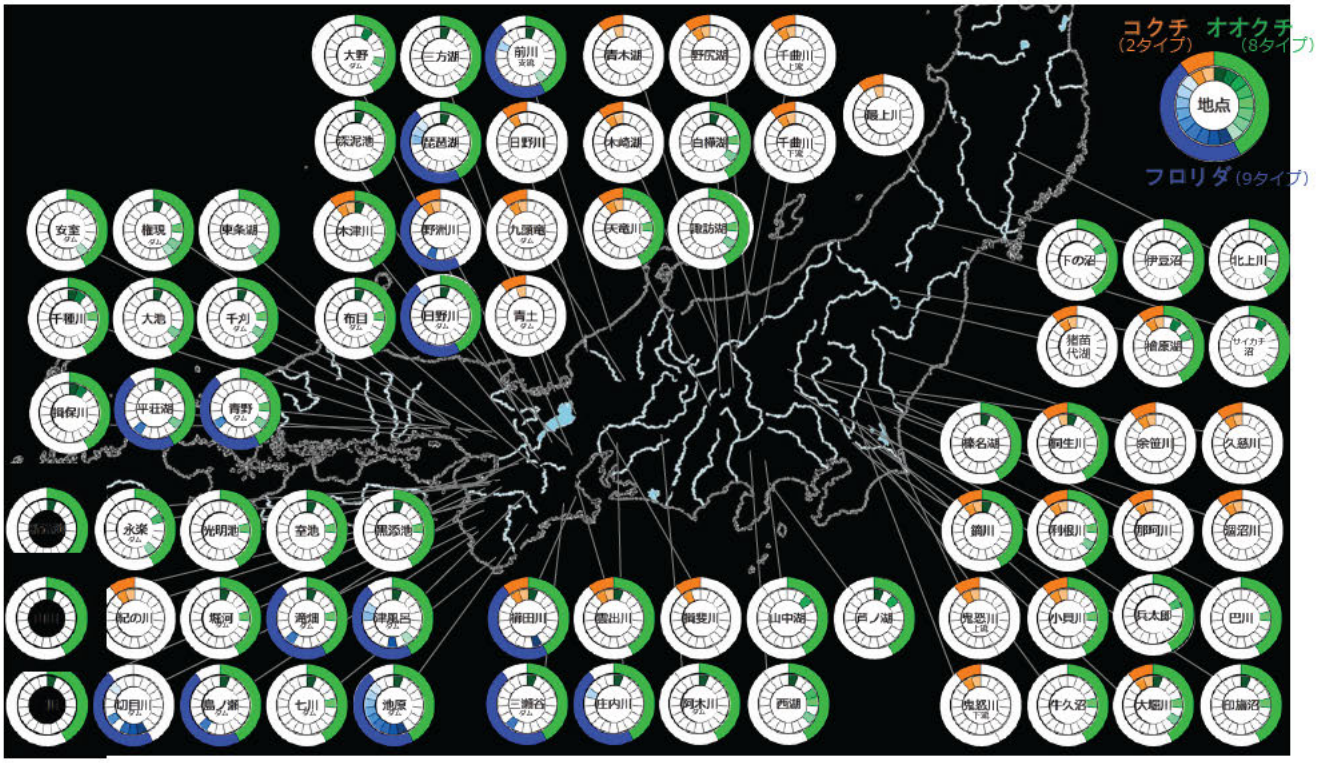

図-3.12　環境DNA広域調査により得られた国内生息ブラックバス３種の最新分布状況およびそのハプロタイプ分布。ドーナツチャートは各ハプロタイプの在／不在を表しており、それらの比率を示すものではない。またドーナツチャートが示されていない地点は、どの種のDNAも検出されなかったことを示す。

５．研究目標の達成状況

サブテーマ３では、希少種および外来種の個体群遺伝構造を推定する種内変異解析手法を開発し、その野外実践を通し、個体群の遺伝的な質に基づいた保全指標を提示することに成功した。

まず希少種については、遺伝的変異に乏しい琵琶湖固有種ホンモロコをモデルとし、従来は難しいとされてきた、次世代シーケンンシングを用いた１～数塩基の変異の正確な判別を可能とする環境DNA分析法の開発に成功した。さらに本手法を琵琶湖一円のホンモロコ繁殖生息地に適用することにより、包括的な遺伝的構造・多様性評価を実現した。それだけでなく、環境DNA分析により検出された遺伝的多様性の低下が、過去の個体数縮小の程度を示す指標となりうることを見出した。本研究で開発したアプローチ法は、集団繁殖をする水棲生物に広く適用でき、また正確なハプロタイプ判別により遺伝的多様性低下が進んだ種にも適用できる点で優れている。本成果により、環境DNA分析による遺伝的多様性評価が、迅速・網羅的かつ持続可能な希少種モニタリング法として実用化できるレベルへと到達したと考

えている。

外来種については、急速な分布拡大が問題となる侵略的外来種の分布推定法および分布拡大経路推定法としての、環境DNAハプロタイピングの有用性を、日本の外来種の代表格ともいえるブルーギルおよびブラックバス３種をモデルとして実証した。まず、ブルーギルを用いた概念実証研究により、環境DNAハプロタイピングが、外来種の供給源の特定と、そこからの分布拡大経路の推定に有用であることを証明した。またブラックバス３種を対象としたのべ43日間の環境DNAハプロタイピング調査により、河川水辺の国勢調査と完全に一致する分布情報を取得しただけでなく、同時に得られるハプロタイプ情報より分布拡大経路推定までが可能であることを実証した点は、特筆すべき成果である。本開発手法が日本生息ブラックバス３種のモニタリングにそのまま適用できる点で、近い将来の実用化も視野に入る。このように、環境DNAハプロタイピングというアプローチにより、該当種の分布を把握できると同時に、ハプロタイプ組成を分布拡大経路の指標として利用できることが実証された。外来種の効果的な防除に向け、外来種モニタリング法として実用化されることが大いに期待される。

これらの理由より、本サブテーマは目標を大きく上回る成果をあげたものと評価した。

６．引用文献

1) S. KANAO and K. HASEGAWA. The IUCN Red List of Threatened Species, e.T114640023A114640052 (2019) *Gnathopogon caerulescens*. https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-2.RLTS.T114640023A114640052.en

2) R. KAKIOKA, T. KOKITA, R. TABATA, S. MORI and K. WATANABE. Environmental Biology of Fishes 96: 631-644 (2013) The origins of limnetic forms and cryptic divergence in *Gnathopogon* fishes (Cyprinidae) in Japan.

3) T. KIKKO, H. OKAMOTO, M. UJIIE, T. USUKI, M. NEMOTO, J. SAEGUSA, D. ISHIZAKI, Y. FUJIOKA, Y. KAI and K. NAKAYAMA. Fisheries Science 82: 269-278 (2016) Genetic evaluation of hatchery stocks of Honmoroko *Gnathopogon caerulescens* by mitochondrial DNA sequence for stock enhancement.

4) M. A. SZE and P. D. SCHLOSS. mSphere 4: e00163-19 (2019) The impact of DNA polymerase and number of rounds of amplification in PCR on 16S rRNA gene sequence data.

5) K. UCHII, K. WAKIMURA, T. KIKKO, R. YONEKURA, R. KAWAGUCHI, H. KOMADA, H. YAMANAKA, T. KENZAKA and K. TANI. Limnology 23: 49-56 (2022) Environmental DNA monitoring method of the commercially important and endangered fish Gnathopogon caerulescens.

6) K. KAWAMURA, R. YONEKURA, O. KATANO, Y. TANIGUCHI and K. SAITOH. Molecular Ecology 15: 613-621 (2006) Origin and dispersal of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea.

7) 高村健二. 魚類学雑誌 52: 107-114 (2005) 日本産ブラックバスにおけるミトコンドリアDNAハプロタイプの分布.

8) 青木大輔、中山祐一朗、林正人、岩崎魚成. 保全生態学研究 11: 53-60 (2006) 琵琶湖におけるオオクチバスフロリダ半島産亜種（*Micropterus salmoides floridanus*）のミトコンドリアDNA調節領域の多様性と導入起源.

9) 北野聡、武居薫、川之辺素一、上島剛. 長野県環境保全研究所研究報告 4: 75-78 (2008) 長野県内で確認されたオオクチバス及びコクチバスのミトコンドリアDNAハプロタイプ.

10) 全国内水面漁業共同組合連合会 (1992) ブラックバスとブルーギルのすべて～外来魚対策検討委託事業報告書～.

11) 丸山為蔵、藤井一則、木島利通、前田弘也. (1987) 外国産新魚種の導入経過.

12) 淀太我、井口恵一朗. 水研センター研報 12: 10-24 (2004) バス問題の経緯と背景.

13) 国土交通省. (2022) 河川水辺の国勢調査1～6 巡目調査結果の経年変化（生物調査[魚類・底生動物]編）河川版.

14) K. WAKIMURA, K. UCHII and T. KIKKO. Environmental DNA 00: 1-14 (2023) Evaluation of genetic diversity in an endangered fish Gnathopogon caerulescens using environmental DNA and its potential use in fish conservation.
15) M. SLATKIN and R. R. HUDSON. Genetics 129: 555-562 (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations.
16) 藤岡康弘. 魚類学雑誌 60: 57-63 (2013) 琵琶湖固有（亜）種ホンモロコおよびニゴロブナ・ゲンゴロウブナ激減の現状と回復への課題.
17) 寺井章人. 滋賀県水産試験場事業報告 令和3年度: 28 (2023) 水位低下がホンモロコ産着卵に与える影響について.
18) 滋賀県 (2023) ホンモロコ. https://www.pref.shiga.lg.jp/ippan/shigotosangyou/suisan/18669.html

Ⅱ－４　環境水・水圏堆積物コアの解析を組み合わせた希少種・外来種の時系列解析手法の確立

国立大学法人京都大大学院情報学研究科　　土居　秀幸

国立大学法人愛媛大学沿岸環境科学研究センター　　加　三千宣

［要旨］

本サブテーマでは、希少種・外来種について、特に堆積物コアから採取されたDNAを用いて、生物個体群や種内変異の時系列動態を復元し解析できる手法を開発し、環境DNA技術を社会問題解決に役立つ技術として社会実装に近づけることを目標とした。まず技術開発として、これまでそのDNA分析が困難とされていた、堆積物コアDNAを取り扱って、それらのDNA抽出やメタバーコーディング手法を開発した。さらに、各種の個体群動態を堆積物DNAから把握する手法を開発した。さらに、サブテーマ１、２、３で開発されてきた種内多型検出手法を応用し、堆積物コアから過去数百年にわたる種内多型の変遷について捉えることができた。さらに、堆積物という特殊な時系列において、empirical dynamic model (EDM)による時系列からの因果推論手法を開発し、堆積物コアから得られる時系列データにより、環境要因との因果関係を明らかにできることを示した。これらの開発技術や実践研究の一部については、編集者・執筆者として日本初の環境DNAの一般向け書籍の刊行に貢献した（「環境DNA　―生態系の真の姿を読み解く（土居・近藤編、2021、共立出版）」[1)]）。さらに、兵庫県立大学、愛媛大学の大学院生らが、日本陸水学会大会ポスター賞（最優秀賞）、日本生態学会近畿地区会奨励賞、日本陸水学会近畿地区会優秀発表賞などを受賞し、さらに、兵庫県立大学では博士学位を1名取得し、今後の環境DNA研究を担う後進の育成にも努めた。

１．研究開発目的

本プロジェクトの全体の最終目標は、環境DNA技術を用いて希少種・外来種の分布・動態や種内変異に関する情報を多次元的に収集し、それらを統合することで個々の希少種・外来種問題に対する対策優先度を科学的に評価する方法を提案することにある。そのためには、過去の生物動態を把握する必要がある。そこで、本サブテーマにおいては、水圏堆積物コアサンプル由来の環境DNA解析を組み合わせることにより、既存の環境DNA技術では把握できなかった時系列動態に関する情報を得ることを目的とした。そのため、堆積物からの希少種・外来種に特化した生物量推定手法の精度検証および改良を実施しつつ、これを種内変異に応用した集団遺伝解析、これらから得られる時系列データからの要因把握、時系列解析手法の開発を行うことを目的とした。既存の環境DNA技術では把握できなかった時系列動態に関する情報を得るため、各所から堆積物コアサンプルを採集し、それらのサンプルの環境DNA分析からのempirical dynamic model (EDM)などによる時系列解析を行い、これらを統合した希少種・外来種の対策優先度評価手法の確立を目指す。

２．研究目標

既存の環境DNA技術では把握できなかった時系列動態に関する情報を得るため同所的な環境水・水圏堆積物コアサンプルを採集し、それらのサンプルの環境DNA分析からのEmpirical Dynamic Model (EDM)などによる時系列解析を行い、これらを統合した希少種・外来種の対策優先度評価手法の確立を目指す。

３．研究開発内容

(1)堆積物コアデータに適用するEmpirical Dynamic Model (EDM)による時系列解析手法[2)]

Empirical Dynamic Model (EDM)による時系列解析手法は、特にConvergent Cross-Mapping (CCM)において (Sugihara et al. 2012)、多くの環境からの時系列データに適応されてきた。しかし、堆積物コアの時系列は、その採取方法からバイアスがかかることがわかっている。それは、堆積物はそれをスライスすることによって、例えば、10年などが１つのサンプルとして収集され、さらに堆積速度や圧縮の違いによってその１スライスごとの時系列の幅が異なる。そこため、時系列データ間の間隔が一定にはならない。これは、一定の時系列間隔から力学系アトラクタを再構築することを前提にした、EDMにそのまま適応することはできない。そこで、本研究では、堆積物コアデータに適用するEDMによる時系列解析手法、特にCCMによる因果推論を開発し、異なった時系列を持つコア間においても解析可能な手法を見出した。それは、各堆積物時系列のデータを補完、補正して、時系列間隔を一定に統一することにより達成できた。その手法について、４つの海底堆積物データを用いて検証を行なった[2)]。

(2)モバイルPCRによる迅速検出法の外来種検出の適用[3)]

環境 DNA 法はこれまで、その研究や実践の多くについて、DNA の抽出や測定については実験室で行われてきた。そのため、現場ですぐに環境 DNA による結果を知るということはこれまで不可能とされていた。そこで、日本板硝子（株）が開発した超高速モバイル PCR（PicoGene® PCR1100）を用いて[3)]、現場での濾過方法も含めて[4)]、環境 DNA 測定のための革新的な新手法を開発した。その結果、野外で採水から DNA 抽出、検出までわずか 30 分で解析が完了できた[3),4)]。

(3) 堆積物コア試料中のDNAを用いた希少種・外来種の長期動態推定法の確立

堆積物コア試料中のDNAを用いた希少種・外来種の長期動態を解明する方法を確立するため、本研究では主に５つの研究を行った。１）網走湖堆積物を用いたワカサギ個体群の変遷の解明、２）琵琶湖堆積物からの在来・外来動物プランクトン個体群の変遷の解明[5)]、３）琵琶湖堆積物からの在来種カイアシ類個体群の変遷の解明[6)]、[redacted]１）については、湖底が貧酸素で堆積後のDNAの保存状態が良好と考えられる網走湖からコア試料を採取し、堆積物中のワカサギDNAの定量PCR分析を行った。２）については、近年*Daphnia pulicaria*という外来種のミジンコが優占し、在来種*Daphnia galeata*が減少している琵琶湖において、どのような個体群の変遷をたどってきたかを明らかにするため、共同研究者（槻木玲美、松山大学・中根快、愛媛大学）の共同研究で、両種のDNAについて定量PCR分析を行った。また、同じく槻木・中根との共同研究として、３）琵琶湖の魚の主要な餌となる在来種カイアシ類*Eodiaptomus japonicus*の個体群変遷を明らかにするために、定量PCR分析を行った。２）・３）については、学術誌として公表され[5,6)]、環境DNA学会や日本陸水学会で最優秀ポスター賞を受賞した（中根2021[7)]、中根2022[8)]）。[redacted]

(3)-1. 堆積物コア試料の採取と年代決定

コア試料は，[redacted]

[redacted]
２）及び３）で用いた琵琶湖北湖堆積物コア試料は、2017年8月17日に、離合社製HR型コアラーを用いて約30cmのコア試料を採取した試料（LB-2、LB5、35° 15’ 1.0” N, 136° 04’ 0.78” E）を用いた。
[redacted]琵琶湖では、^{210}Pb法による年代を用いた[6] [redacted]

(3)-2. 堆積物コアからのDNA抽出法、メタバーコーディング手法の確立

堆積物試料からの環境DNAの抽出・精製は、Sakata et al. (2020) [12]のアルコール抽出・エタノール抽出法を大容量試料用に改良した手法を開発した[13]。堆積物DNAのメタバーコーディング解析は、そのDNA量が少ないこと、またPCR阻害の原因である物質が多く含まれることからかなり困難であった。そのため、DNAサンプルを希釈してからPCRする希釈法、PCRのテンプレート量を増やす、PCRサイクルを伸ばす、PCR試薬を変更するなど、様々な試行を行った。

(3)-3. 各種のリアルタイムPCR用のプライマー・プローブの開発

本研究の個体群動態復元の対象とした種は、[redacted]琵琶湖ではミジンコ類*Daphnia galeata*及び*Daphnia pulicaria*とカイアシ類*Eodiaptomus japonicus*、[redacted]である。

４．結果及び考察

(1)堆積物コアデータに適用するEmpirical Dynamic Model (EDM)による時系列解析手法

堆積物コアデータに適用するEmpirical Dynamic Model (EDM)による時系列解析手法、特にCCM (Convergence Cross -Mapping)による因果推論を開発し、異なった時系列を持つコア間においても解析可能な手法を見出した。その手法について、４つの海底堆積物データを用いて（図4.4の時系列）を用いて検証を行なった。図-4.1にCCM での結果を示した。CCMの結果は、Temp->Rich（水温から種数への因果的影響）では、Twinサロゲートによる帰無仮説となる範囲を超えて、実線の解析結果が示されており、有意に因果的な影響があることを示している。よって、CCMによって、堆積コアから得られる時系列から因果推論が可能であることが明らかとなった。さらに，今回解析する生態学に関連するデータセット以外にも，本研究で提示される手法はそのまま応用できる。特に時系列解析としてこれまで扱えなかった，時間間隔が揃っていない「汚い」データにも対応することから環境DNAで得られる堆積コアからの時系列解析に本手法を活かすことができる。なお、この研究成果は、Biology Letters[2]により出版され、兵庫県立大学からプレスリリースを行なった。

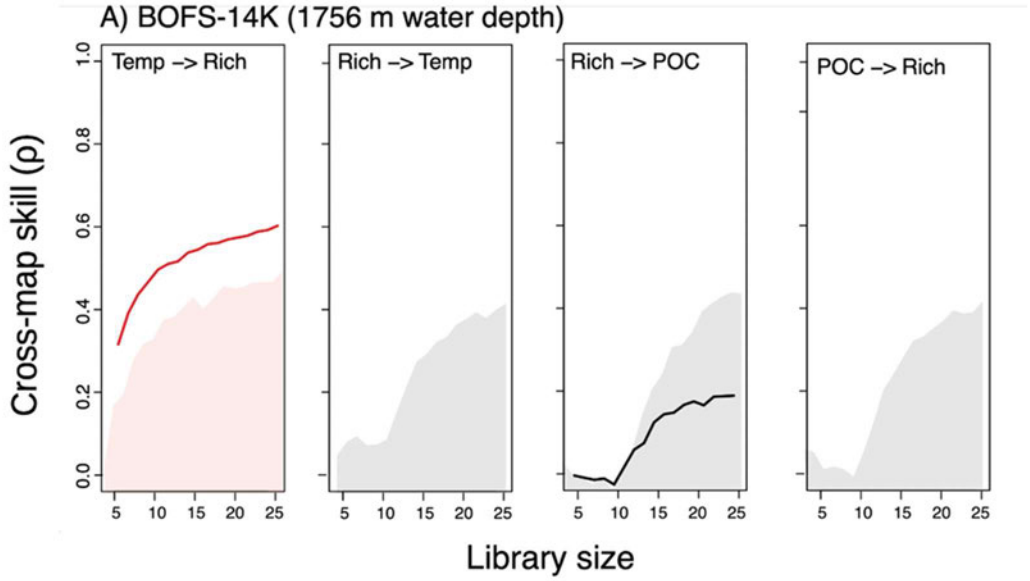

図-4.1 １つのコア（BOFS-14K)におけるLibrary size とCross-map skill の関係[2)] Temp->Richは水温から種数へ与える因果的影響を示す。実線がコアデータから得られた解析結果、シャドー部分はTwinサロゲート法から得られたサロゲートデータによる解析結果を示す。

(2) モバイルPCRによる迅速検出法の外来種検出の適用

ハクレン（*Hypophthalmichthys molitrix*）の分布を検出するために、この方法の有用性を検証した[3)]。その結果，様々な漁網を用いた捕獲調査と比べて、ほぼ同様にハクレンを高い確率で検出することができた。さらにマイクロファイバーチップを用いることでの現場迅速濾過方法も開発した[4)]。これらの結果では、卓上型のリアルタイムPCR装置を用いた実験室での抽出・検出に比べても同様の検出率を示した。今回開発した現場環境DNA手法は、テストしたハクレンに特化したものではなく、PCRを行う試薬（プライマー）を変更することで、様々な分類群（魚、両生類、昆虫、プランクトン、細菌など）や、環境（海域、湿地など）にすぐに適用することができる。　さらに、モバイルPCR装置は、同時に３種類のDNA測定をすることが可能であり（マルチプレックスPCR）、複数種を30分で検出することも今後可能になると考えられる。　なお、この研究成果は、水を汲むだけで生物調査が可能な環境DNA調査を現場にて30分で行うことができる迅速現場測定手法として、Molecular Ecology Resources誌に発表し[3)]、兵庫県立大学、環境再生保全機構を通じてプレスリリースを行なった。

(3) 堆積物コア試料中のDNAを用いた希少種・外来種の長期動態の解明

(3)-1. 堆積物コアからのDNA採取・メタバーコーディング手法の確立

大容量DNA抽出法について、様々なステップでのDNA収率を検討した結果、堆積物試料を9gあるいは27gにする、アルカリ溶液量を減らす、エタノール量を増やす、ビーズビーティングの時間を減らすことで、最終抽出溶液中のDNA収率が増加することがわかった。また、最終抽出液はスパイクテストにより阻害がないことが確認できた[13)]。メタバーコーディング手法において、堆積物DNAのPCRについては、CRのテンプレート量を現状よく行われていた２/12 μL PCRから、15-20/ 120 μL PCR増やし、さらに５サイクルほど、1st,2ndのPCRサイクルを伸ばすことによって、以下種内多型解析などが可能になるメタバーコーディング手法を確立した。

(3)-2. 各種についてのリアルタイムPCRによる個体群動態検出

[redacted]

ミジンコ類：堆積物コア試料におけるミジンコ類2種のDNA濃度の過去100年間の時系列変化を明らかにした（図-4.3）。どちらの種においても個体数を反映する堆積物試料中の遺骸数とは一致せず、むしろ堆積物試料中の休眠卵（卵鞘）数の濃度変化と一致していた[4)]。堆積物試料中の休眠卵(卵鞘)や遺骸を除去した細粒画分ではDNA濃度が高い傾向を示し、細粒画分の粒子サイズにミジンコ類のeDNAが多く含まれることが明らかとなった。このことは、堆積物DNAは、産卵に関連するDNAの沈降過程が堆積物DNA濃度を決定していることを強く示唆している。本研究の成果は、産卵量を堆積物DNAからより迅速かつ簡便に明らかにできることを示唆しており、卵生産の長期モニタリングツールとして、堆積物DNAが有効な手段であることがわかった[5)]。卵生産は、在来種が1960から70年代にピークを迎えた後減少し、外来種*D. pulicaria*は2000年代に増加するが、2010年代に減少していることがわかった[5)]。両種ともに卵生産が増加後に減少しているという結果は生態学上興味深い。卵を産まない生活史に変わる原因の解明が個体群動態の現在の状態を把握する上で重要かもしれない。

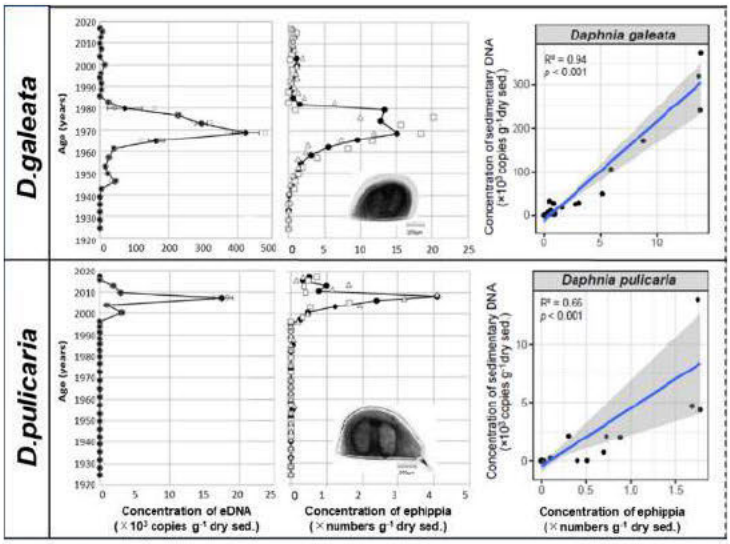

図-4.3 琵琶湖湖底堆積物コア試料から得られたミジンコ類のDNA濃度の時系列変化
図は、Tsugeki et al. (2022) [5)]から引用。

琵琶湖カイアシ類：*E. japonicus*の過去100年間のDNA濃度変化を明らかにした[6]（図-4.4）。その結果、1990年以降増加する傾向があることがわかった。堆積物DNA濃度とバイオマス、比成長率、生産量、孵化直後卵、休息卵の長期データセットと比較した結果、堆積物中の*E. japonicus*のDNA濃度は、観測における生産量、バイオマス、孵化直後卵の生産量と有意な相関があったが、休息卵や比成長率とは相関がなかった（図-4.5）[6]。本研究は、過去のカイアシ類の生産変動の追跡ツールとして、堆積物DNAが使用できることを初めて示した[6]。

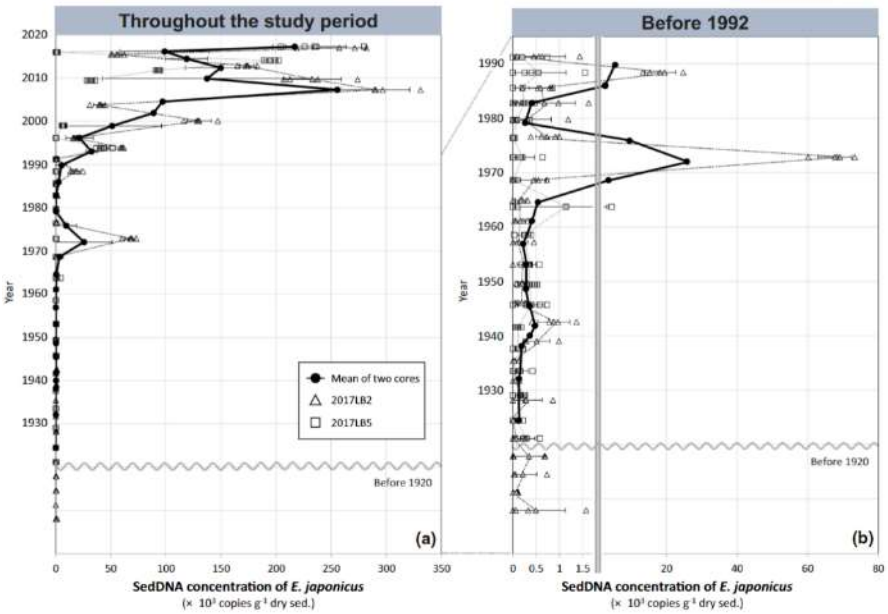

図-4.4 琵琶湖湖底堆積物コア試料から得られたカイアシ類：*E. japonicus*のDNA濃度の時系列変化
図は、Nakane et al. (2023) [6]から引用。

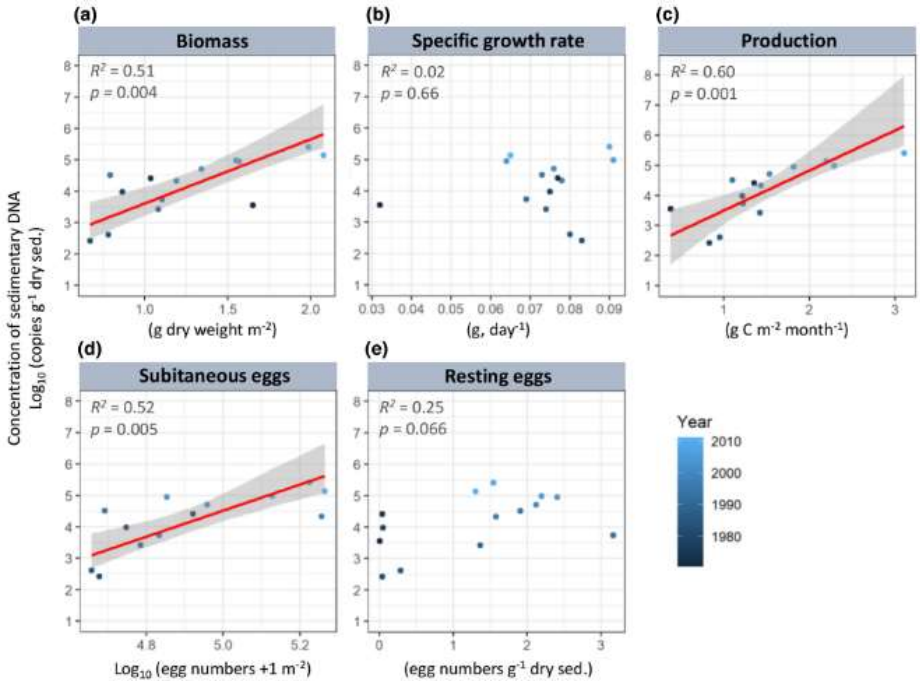

図-4.5　カイアシ類*E. japonicus*のDNA濃度とバイオマス、比成長率、生産量、孵化直後卵、休息卵とのType II解析結果。図は、Nakane et al. (2023) [6]から引用。

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

５．研究目標の達成状況

本サブテーマでは、特に堆積物DNAからの希少種・外来種の生物個体群や種内変異の時系列動態を復元する手法、またそれを時系列解析する手法を開発してきた。研究期間前半は新型コロナウイルス感染拡大の影響で一部堆積物コアの採取などの野外調査の遅れは生じたものの、既に収集・保管していた経年蓄積サンプルの分析や種内多型解析、研究成果の論文化を前倒しすることにより予定より早く学術論文・学会発表、国民との対話を実現することに成功した。特に、絶滅危惧種であるスナメリや琵琶湖の外来種・在来種の個体群動態の解明によって、本サブテーマの目標であった希少種・外来種の時系列動態の復元の可能性を示せたことは大きな前進であった。また、種内多型についても、本研究テーマで独自に検出系を開発し、過去数百年にわたる種内多型の動態を鮮明に明らかにできることがわかり始めた。さらには、モバイルPCRによる迅速な外来種検出、堆積物からの環境DNA分析手法に関わる、抽出やメタバーコーディング手法について開発を行ない、これまでよりもはるかに堆積物DNAを活用できる環境を整備できた。これらのことから、本サブテーマは目標を大きく上回る成果をあげたものと判断した。

６．引用文献

1) 近藤倫生，土居秀幸　編　(2021)「環境DNA　―生態系の真の姿を読み解く」共立出版
2) H. DOI, M. YASUHARA, and M. USHIO. Biology Letters 17: 20200666 (2021) Causal analysis of the temperature impact on deep-sea biodiversity.
3) H. DOI, T. WATANABE N. NISHIZAWA, T. SAITO, H. NAGATA, Y. KAMEDA, N. MAKI, K. IKEDA, and T. FUKUZAWA. Molecular Ecology Resources 21:2364-2368 (2021) On-site eDNA detection of species using ultra-rapid mobile PCR.
4) T. FUKUZAWA, Y. KAMEDA, H. NAGATA, N. NISHIZAWA, and H. DOI. Molecular Ecology Resources 22: 2651-2661 (2022) Filtration extraction method using microfluidic channel for measuring environmental DNA.
5) N. TSUGEKI, K. NAKANE, H. DOI, et al: Scientific Reports 12, 1741 (2022) Reconstruction of 100-year dynamics in Daphnia spawning activity revealed by sedimentary DNA.
6) K. NAKANE, X. LIU, H. DOI, et al.: Freshwater Biology (2023) Sedimentary DNA can reveal the past population dynamics of a pelagic copepod. online available
7) 中根 快，土居秀幸，越智梨月，加 三千宣，槻木 玲美：環境DNA学会大会．北海道大学・オンライン開催．2021年11月20日（2021）「堆積物DNAにより復元された動物プランクトンの過去100年にわたる産卵量の変動」（ポスター発表最優秀賞）
8) 中根 快，刘 鑫，土居 秀幸，伴 修平,デュア・ガエル，加 三千宣，槻木 玲美:日本陸水学会第86回兵庫大会、2022年9月16日(金)～19日(月)（2022）「堆積物DNAに基づくカイアシ類の長期変動に関する研究」（日本陸水学会最優秀ポスター賞）
9) 須佐周子：愛媛大学理学部卒業論文（2023）網走湖堆積物を用いた過去100年間のワカサギ個体数の復元に関する研究.
10) M. KUWAE, M. YAMAMOTO, K. IKEHARA, et al.: Journal of Asian Earth Science 69, 133–148 (2013) Stratigraphy and wiggle-matching-based age-depth model of late Holocene marine sediments in Beppu Bay, southwest Japan.
11) M. KUWAE, B. FINNEY, Z. SHI, et al.: The Anthropocene Review 1-38 (2022) Beppu Bay, Japan, as a candidate Global boundary Stratotype Section and Point for the Anthropocene series.
12) M.K. SAKATA, S. YAMAMOTO, R.O. GOTOH, et al.: Environmental DNA 2, 505-518 (2020) Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA.
13) 倉田純：愛媛大学大学院理工学研究科修士論文(2022)大容量試料を用いた堆積物DNA抽出法の開発.
14) 中根快：愛媛大学大学院理工学研究科修士論文(2023) 海洋堆積物DNAを用いた過去数百年にわたる海棲哺乳類スナメリの個体群復元.
15) 野々山：愛媛大学理学部卒業論文（2022）別府湾堆積物によるカタクチイワシの種内多型.
16) 土居秀幸・加　三千宣：一般公開シンポジウム「野生生物モニタリングの現在・未来～研究者たちの挑戦」（主催：本推進費プロジェクト、2022年11月20日、オンライン/札幌エルプラザ）(2022)「環境DNAのタイムカプセル―海や湖の底にたまった堆積物―」
17) M. KUWAE, M. YAMAMOTO, T. SAGAWA, et al.: Progress in Oceanography 159, 86-98 (2017) Multidecadal, centennial, and millennial variability in sardine and anchovy abundances in the western North Pacific and climate–fish linkages during the late Holocene.

Ⅲ．研究成果の発表状況の詳細

（１）誌上発表

＜査読付き論文＞

【サブテーマ１】

1) T. YATSUYANAGI and H. ARAKI. PLOS ONE 15: e0239912 (2020) (IF：3.752) Understanding seasonal migration of Shishamo smelt in coastal regions using environmental DNA.
2) H. MIZUMOTO, T. MITSUZUKA and H. ARAKI. Frontiers in Ecology and Evolution 8: 569425 (2020) (IF：4.493) An environmental DNA survey on distribution of an endangered salmonid species, *Parahucho perryi*, in Hokkaido, Japan.
3) T. MINAMOTO, M. MIYA, T. SADO, S. SEINO, H. DOI, M. KONDOH, K. NAKAMURA, T. TAKAHARA, S. YAMAMOTO, H. YAMANAKA, H. ARAKI, W. IWASAKI, A. KASAI, R. MASUDA and K. UCHII: Environmental DNA, 3, 8-13 (2021) (IF：6.9) An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols.
4) H. MIZUMOTO, O. KISHIDA, K. TAKAI, N. MATSUURA and H. ARAKI. Biological Invasions 24:1199-1211 (2022) (IF：3.606) Utilizing environmental DNA for wide-range distributions of reproductive area of an invasive terrestrial toad in Ishikari river basin in Japan.
5) H. ARAKI, T. KANBE, H. YAMANAKA, Y. MINEGISHI and N. KOIZUMI. Environmental DNA, 4, 487-491 (2022) (IF：6.9) edna2021: The fourth annual meeting of The eDNA Society “Species distributions, and beyond”.
6) 【予定】小粥淳史，八柳哲，神戸崇，井上頌子，荒木仁志　保全生態学研究（2023）環境DNAメタバーコーディングを用いた北日本の溜池における外来魚の影響評価　*in press*

【サブテーマ２】

1) T. MINAMOTO, M. MIYA, T. SADO, S. SEINO, H. DOI, M. KONDOH, K. NAKAMURA, T. TAKAHARA, S. YAMAMOTO, H. YAMANAKA, H. ARAKI, W. IWASAKI, A. KASAI, R. MASUDA and K. UCHII: Environmental DNA, 3, 8-13 (2021) (IF：6.9) An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols.
2) H. ARAKI, T. KANBE, H. YAMANAKA, Y. MINEGISHI and N. KOIZUMI. Environmental DNA, 4, 487-491 (2022) (IF：6.9) edna2021: The fourth annual meeting of The eDNA Society “Species distributions, and beyond”.
3) H. DOI, T. MIMAMOTO, T. TAKAHARA, S. TSUJI, K. UCHII, S. YAMAMOTO, I. KATANO, and H. YAMANAKA: Ecological Research, 36, 379-388 (2021) (IF：2.056) Compilation of real-time PCR conditions toward the standardization of eDNA methods.
4) K. UCHII, K. WAKIMURA, T. KIKKO, R. YONEKURA, R. KAWAGUCHI, H. KOMADA, H. YAMANAKA, T. KENZAKA, and K. TANI: Limnology, 23, 49-56 (2022) (IF：2.156) Environmental DNA monitoring method of the commercially important and endangered fish *Gnathopogon caerulescens*.
5) G. ITO, H. YAMAUCHI, M. SHIGEYOSHI, K. ASHINO, C. YONASHIRO, M, ASAMI, Y. GOTO, J. J. DUDA, and H. YAMANAKA. Global Ecology and Conservation, 43: e02448 (2022) (IF：3.97) Using eDNA metabarcoding to establish targets for freshwater fish composition following river restoration.
6) T. JO, and H. YAMANAKA. Freshwater Biology, 67: 1333-1343 (2022) (IF：3.835) Meta-analyses of eDNA downstream transport and deposition in relation to hydrogeography in

riverine environments.

7) T. S. JO, K. TSURI, and H. YAMANAKA. The Science of Nature, 109: 38 (2022) (IF : 2.645) Can nuclear aquatic environmental DNA be a genetic marker for the accurate estimation of species abundance?
8) T. JO, and H. YAMANAKA. Ecology and Evolution, 12: e9234 (2022) (IF : 3.167) Fine-tuning the performance of abundance estimation based on environmental DNA (eDNA) focusing on eDNA particle size and marker length.
9) T. S. JO. Hydrobiologia, 850: 39-50 (2023) (IF : 2.822) Correlation between the number of eDNA particles and species abundance is strengthened by warm temperature: Simulation and meta-analysis.

【サブテーマ３】

1) T. MINAMOTO, M. MIYA, T. SADO, S. SEINO, H. DOI, M. KONDOH, K. NAKAMURA, T. TAKAHARA, S. YAMAMOTO, H. YAMANAKA, H. ARAKI, W. IWASAKI, A. KASAI, R. MASUDA and K. UCHII. Environmental DNA, 3, 8-13 (2021) (IF : 6.9) An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols.
2) H. DOI, T. MIMAMOTO, T. TAKAHARA, S. TSUJI, K. UCHII, S. YAMAMOTO, I. KATANO, and H. YAMANAKA. Ecological Research, 36, 379-388 (2021) (IF : 2.056) Compilation of real-time PCR conditions toward the standardization of eDNA methods.
3) K. UCHII, K. WAKIMURA, T. KIKKO, R. YONEKURA, R. KAWAGUCHI, H. KOMADA, H. YAMANAKA, T. KENZAKA, and K. TANI. Limnology, 23, 49-56 (2022) (IF : 2.156) Environmental DNA monitoring method of the commercially important and endangered fish *Gnathopogon caerulescens*.
4) K. WAKIMURA, K. UCHII, and T. KIKKO. Environmental DNA, 00, 1-14 (2023) (IF : 6.9) Evaluation of genetic diversity in an endangered fish *Gnathopogon caerulescens* using environmental DNA and its potential use in fish conservation. DOI: 10.1002/edn3.408

【サブテーマ４】

1) H. DOI, T. MIMAMOTO, T. TAKAHARA, S. TSUJI, K. UCHII, S. YAMAMOTO, I. KATANO, H. YAMANAKA. Ecological Research 36: 379-388 (2021) (IF:2.056) Compilation of real-time PCR conditions toward the standardization of eDNA methods.
2) H. DOI, R. INUI, S. MATSUOKA, Y. AKAMATSU, M. GOTO and T. KONO. Freshwater Biology online (2021) (IF : 3.835) Estimation of biodiversity metrics by environmental DNA metabarcoding compared with visual and capture surveys of river fish communities. available DOI:10.1111/fwb.13714
3) T. SAITO and H. DOI. Frontiers in Ecology and Evolution: 9:623831 (2021) (IF : 4.493) A model and simulation of the influence of temperature and amplicon length on environmental DNA degradation rates: A meta-analysis approach.
4) T. MINAMOTO, M. MIYA, T. SADO, S. SEINO, H. DOI, M. KONDOH, K. NAKAMURA, T. TAKAHARA, S. YAMAMOTO, H. YAMANAKA, H. ARAKI, W. IWASAKI, A. KASAI, R. MASUDA and K. UCHII: Environmental DNA, 3, 8-13 (2021) (IF : 6.9) An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols.
5) H. DOI, M. YASUHARA, and M. USHIO. Biology Letters 17: 20200666 (2021) (IF : 3.904) Causal analysis of the temperature impact on deep-sea biodiversity.
6) H. DOI, T. WATANABE N. NISHIZAWA, T. SAITO, H. NAGATA, Y. KAMEDA, N. MAKI, K. IKEDA and T. FUKUZAWA. Molecular Ecology Resources 21:2364-2368 (2021)(IF: 8.678) On-site

eDNA detection of species using ultra-rapid mobile PCR.

7) T. FUKUZAWA, Y. KAMEDA, H. NAGATA, N. NISHIZAWA and H. DOI. Molecular Ecology Resources 22: 2651-2661 (2022) (IF: 8.678) Filtration extraction method using microfluidic channel for measuring environmental DNA.

8) S. OGATA, H. DOI, T. IGAWA, S. KOMAKI and T. TAKAHARA. Ecological Research 37: 701-710 (2022) (IF:2.056) Environmental DNA methods for detecting two invasive alien species (American bullfrog and red swamp crayfish) in Japanese ponds.

9) K. NAKANE, X. LIU, H. DOI, et al.: Freshwater Biology (2023) (IF: 3.538) Sedimentary DNA can reveal the past population dynamics of a pelagic copepod. online available

＜査読付き論文に準ずる成果発表＞

特に記載すべき事項はない。

＜その他誌上発表（査読なし）＞

【サブテーマ１】

1) 土居秀幸、近藤倫生編：環境DNA -生態系の真の姿を読み解く、共立出版、83-106 (2021)
「回遊魚研究とモニタリング（執筆担当：八柳哲、峰岸有紀、水本寛基、荒木仁志）」

【サブテーマ２】

1) 土居秀幸、近藤倫生編：環境DNA -生態系の真の姿を読み解く、共立出版、36-55 (2021)
「種特異的環境DNA手法（執筆担当：山中裕樹）」

2) 土居秀幸、近藤倫生編：環境DNA -生態系の真の姿を読み解く、共立出版、69-106 (2021)
「コイ科魚類ハスの分布モニタリングと生物量の推定（執筆担当：山中裕樹、丸山敦）」

【サブテーマ３】

1) 土居秀幸、近藤倫生編：環境DNA -生態系の真の姿を読み解く、共立出版、106-119 (2021)
「種内変異検出（執筆担当：内井喜美子）」

【サブテーマ４】

1) 土居秀幸、近藤倫生編：環境DNA -生態系の真の姿を読み解く、共立出版、106-119 (2021)

2) 加(2022) 古生物学の百科事典 日本古生物学会編 丸善出版 環境DNA

（２）口頭発表（学会等）

【サブテーマ１】

1) H. ARAKI: Illumina Webinar 招待講演 (2020)
Environmental DNA for Eco-evo monitoring of aquatic organisms in the new era.

2) H. ARAKI, H. YAMANAKA, K. UCHII, M. KUWAE and H. DOI: PICES 招待講演 (2020)
Environmental DNA for Identifying “Red Zone” of endangered/invasive species.

3) H. ARAKI: The eDNA Society Satellite Session “eDNA to study biodiversity in Mangrove” 招待講演 (2020)
Environmental DNA for Biodiversity monitoring.

4) H. MIZUMOTO and H. ARAKI: NPAFC-IYS Virtual Workshop (2021)
Hokkaido-wide eDNA Monitoring for Sakhalin Taimen, Endangered Salmonid Species.

5) H. ARAKI, H. MIZUMOTO, T. YATSUYANAGI and T. KANBE: The NPAFC-IYS Workshop (2021)
Anadromous fish monitoring using environmental DNA.
6) 荒木仁志　全国湖沼河川養殖研究会 招待講演 (2021)
「環境DNAを用いた生物相モニタリングとその活用」
7) 荒木仁志　日本動物学会北海道支部主催2021年度シンポジウム「野生動物のゲノム研究最前線」招待講演 (2021)
「環境DNAを透して見る北方水圏生態系の生き物たち」
8) 荒木仁志　環境DNA学会第四回大会自由集会「環境DNA技術の社会実装：効果的な生物多様性モニタリングに向けて」(2021)
「希少種・外来種管理への応用」
9) 荒木仁志　第42回魚類系統研究会 (2021)
「環境DNA2021」
10) H. MIZUMOTO, O. KISHIDA, K. TAKAI, N. MATSUURA and H. ARAKI: 日本生態学会第69回全国大会 (2022)
An eDNA survey on toxic invasive toad in Hokkaido.
11) 八柳哲、神戸崇、藤井和也、井上頌子、荒木仁志　第43回魚類系統研究会(2022)
「環境DNAで系統地理 ― 水を汲んで歴史を探る」
12) 小澤徹也、神戸崇、荒木仁志　第43回魚類系統研究会(2022)
「知床におけるオショロコマの遺伝子浸透と第3イワナの生息可能性」
13) 荒木仁志　第43回魚類系統研究会 (2022)
「環境DNA2022」
14) 荒木仁志　信州大学・東京大学・北海道大学・水産技術研究所　合同研究セミナー　招待講演 (2022)
「河川・湖沼の環境DNAアプリケーション」
15) 荒木仁志　サケ学研究会・基調講演　招待講演 (2022)
「サケに触れずにサケを知る　～環境DNAの挑戦」
16) 小澤徹也、神戸崇、荒木仁志　サケ学研究会・一般講演 (2022)
「知床におけるオショロコマの遺伝子浸透と第3イワナの生息可能性」（サケ科学奨励賞受賞）
17) H. ARAKI: Australian & New Zealand eDNA Conference (2023)
eDNA applications to rare and invasive species in northern biosphere of Hokkaido, Japan.
18) T. YATSUYANAGI, T. KANBE, K. FUJII, S. INOUE and H. ARAKI: 第70回日本生態学会 (2023)
Phylogeography of Siberian stone loach revealed by environmental DNA. (Best English Presentation Award 受賞)
19)【予定】H. ARAKI: The eDNA Society International Meeting 2023, Otsu, Japan, 2023 “Monitoring aquatic ecosystems in Hokkaido as a salmonid diversity hotspot in Japan”
20)【予定】T. YATSUYANAGI, T. KANBE, H. MIZUMOTO, S. INOUE and H. ARAKI: The eDNA Society International Meeting 2023, Otsu, Japan, 2023 “Unique assemblages and species richness of *Sebastes* rockfishes along the coasts of northern Japan”
21)【予定】K. WAKIMURA, S. MATSUZAKI, H. ARAKI, S. KITANO, Y. TSUDA, J. TSUBOI, T. YATSUYANAGI, T. KANDO and K. UCHII: The eDNA Society International Meeting 2023, Otsu, Japan, 2023 “The distribution and dispersal of invasive black basses in Japan revealed by eDNA haplotyping”
22)【予定】T. OZAWA and H. ARAKI: The 10th International Charr Symposium, Nikko, Japan,

2023 “Mitochondrial Introgression of Southern Asian Dolly Varden in the Shiretoko Peninsula”

【サブテーマ２】

1) 徐寿明、山中裕樹：第4回環境DNA学会（2021)「環境DNAの性質および動態をメタ解析から探る」
2) T. JO: American Fisheries Society 151st Annual Meeting 2021 ″Understanding eDNA characteristics and dynamics for fisheries management and conservation.″
3) H. YAMANAKA: American Fisheries Society 151st Annual Meeting 2021 ″Basic knowledge accumulation in eDNA/eRNA analysis for mining more biological information from the environmental medium with more reliability″
4) 伊藤玄：第73回魚類自然史研究会（2021）「タビラ類の地理的変異と放流問題」
5) 徐寿明、山中裕樹：日本生態学会第69回（2022)「環境DNA量と生物量の関係は環境DNAの性質と分析方法に依存する」
6) 島田知彦、田上正隆、藤谷武史、富永　篤、伊藤　玄、山田紗友美、出口太一、山中裕樹：第61回日本爬虫両生類学会（2022）「アカハライモリ渥美種族は生き残れるか？」

【サブテーマ３】

1) 内井喜美子：環境DNA学会第四回大会（2021）「環境DNAによる種内変異解析と保全への展開」
2) 脇村圭、内井喜美子、亀甲武志：環境DNA学会第四回大会（2021）「環境DNA分析によるホンモロコ地域個体群の遺伝的多様性評価」
3) 脇村圭、内井喜美子：日本陸水学会第86回大会（2022）「環境DNAを用いた希少種個体群の健全性評価の可能性」
4) 岡田経太、内井喜美子：日本生態学会第70回大会（2023）「核rDNA-ITS領域を対象とした環境DNA分析によるコイの交雑レベル推定」
5) 【予定】K. WAKIMURA, S. MATSUZAKI, H. ARAKI, S. KITANO, Y. TSUDA, J. TSUBOI, T. YATSUYANAGI, T. KANDO, and K. UCHII：The eDNA Society International Meeting 2023, Otsu, Japan, 2023 “The distribution and dispersal of invasive black basses in Japan revealed by eDNA haplotyping”

【サブテーマ４】

1) 土居秀幸 The 1st DNAqua-Net International Conference、基調講演（国際、オンライン）、2021年3月9日. Environmental DNA methods for macroorganism populations
2) 土居秀幸　日本生態学会第24回公開講演会「環境DNAの衝撃－生き物たちの過去・現在・未来を解き明かす」（国内、オンライン），2021年3月21日. 環境中に漂うDNAの情報から何がわかってきたか？
3) 加　三千宣.日本生態学会第24回公開講演会「環境DNAの衝撃－生き物たちの過去・現在・未来を解き明かす」（国内、オンライン），2021年3月21日. 海洋堆積物コアの環境DNAから過去300年に遡って魚類生息状況を復元する.
4) 加 三千宣、玉井 大道、土居 秀幸、坂田 雅之、源 利文、鈴木 克明.日本地球惑星科学連合2021年大会（国内、オンライン）. 2021年6月5日. 堆積物DNAは、十年から百年スケールの魚のバイオマス変動を捉えられるか？
5) 中根 快、土居 秀幸、越智 梨月、加 三千宣、槻木 玲美　環境DNA学会第四回大会（国内、オンライン）（2021）堆積物 DNA により復元された動物プランクトンの過去 100 年にわたる産卵量の変動
6) 中根 快、刘 鑫、土居 秀幸、伴 修平、デュア・ガエル、加 三千宣、槻木 玲美　日本陸水学

会第86回兵庫大会（オンライン）（2022）堆積物DNAに基づくカイアシ類の長期変動に関する研究

7）【予定】H. DOI: The eDNA Society International Meeting 2023, Otsu, Japan, 2023 “Environmental DNA moving from knowledge into practice”

8)【予定】T. SAITO and H. DOI: The eDNA Society International Meeting 2023, Otsu, Japan, 2023 “Modeling and simulation of environmental DNA dynamics”

9)【予定】N. TSUGEKI, K. NAKANE, H. DOI, K. TADOKORO, M. KUWAE: The eDNA Society International Meeting 2023, Otsu, Japan, 2023 ″Zooplankton sedimentary DNA as an effective tool for tracking past population dynamics″

（３）「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ１】

1) 公開集会「環境DNA・環境RNA研究の新たな挑戦」（主催：京都大学生態学研究センター、2020年12月15日、オンライン、観客約180名）にて講演

2) 一般公開シンポジウム「環境DNA市民科学ー参加型調査で地域の生態系を見つめる」（主催：環境DNA学会、2021年11月21日、オンライン/北海道大学/南三陸ネイチャーセンター/九州大学、観客約300名）にて講演

3) 一般公開シンポジウム「野生生物モニタリングの現在・未来～研究者たちの挑戦」（主催：本推進費プロジェクト、2022年11月20日、オンライン/札幌エルプラザ、観客約250名）にて講演

4) 公開シンポジウム「科学者が見てきた知床の今と昔」（主催：知床世界自然遺産地域科学委員会、2023年3月15日、オンライン/北海道立道民活動センター　かでる２・７、観客約220名）にて講演

【サブテーマ２】

1) 公開集会「環境DNA・環境RNA研究の新たな挑戦」（主催：京都大学生態学研究センター、2020年12月15日、オンライン、観客約180名）にて講演

2) 公開講座「びわ湖の日滋賀県提携　龍谷講座」（共催：滋賀県、龍谷大学、2021年10月16日、オンライン、観客約120名）にて講演

3) 一般公開シンポジウム「野生生物モニタリングの現在・未来～研究者たちの挑戦」（主催：本推進費プロジェクト、2022年11月20日、オンライン/札幌エルプラザ、観客約250名）にて講演

4) 公開講座「びわ湖の日滋賀県提携　龍谷講座」（共催：滋賀県、龍谷大学、2022年10月17日、オンライン、観客約80名）にて講演

【サブテーマ３】

1) 公開集会「環境DNA・環境RNA研究の新たな挑戦」（主催：京都大学生態学研究センター、2020年12月15日、オンライン、観客約180名）にて講演

2) 日本学術会議公開シンポジウム「縮退時代において、20年後のまち・社会を考える～宇宙×都市×遺伝子×生態～」（主催：日本学術会議若手アカデミー越境する若手科学者分科会、2022年3月1日、オンライン、観客約300名）にて「環境DNAから考える20年後のまち・社会：環境DNAによる生物多様性観測と自然共生社会実現への道」と題する講演

3) 一般公開シンポジウム「野生生物モニタリングの現在・未来～研究者たちの挑戦」（主催：推進費プロジェクト4-2004、2022年11月20日、オンライン/札幌エルプラザ、観客約250名）にて「環境DNAで遺伝的多様性をみる」と題する講演

【サブテーマ４】

1)　公開集会「環境DNA・環境RNA研究の新たな挑戦」（主催：京都大学生態学研究センター、2020年12月15日、オンライン、観客約180名）にて講演

2)　一般公開シンポジウム「野生生物モニタリングの現在・未来～研究者たちの挑戦」（主催：本推進費プロジェクト、2022年11月20日、オンライン/札幌エルプラザ、観客約250名）にて講演

（４）マスコミ等への公表・報道等

【サブテーマ１】

1)　日本経済新聞（2020年11月16日、全国版「イトウの生息場所　水中DNAで推定」）

2)　読売新聞（2020年11月16日、全国版「イトウ生息「痕跡」確認」）

3)　北海道新聞（2020年11月16日、地方版「イトウ7河川に生息」）

4)　共同通信（2020年11月16日、オンライン版「幻の魚イトウ、7河川に生息か　北大、水からDNA検出」）

5)　日本経済新聞　かがくアゴラ（2020年12月18日、全国版「幻の魚イトウ　生息域を探る」）

6)　子供の科学（2021年1月9日、全国版「幻の魚イトウはどこにいる？」）

7)　日経サイエンス2021年3月号（2021年1月25日、「“幻の魚”イトウ，道内7河川に～」）

8)　北海道新聞（2021年12月27日、地方版「外来種アズマヒキガエル繁殖地 環境DNAで推定」）

9)　科学新聞（2021年1月14日、全国版「国内外来種ヒキガエル　繁殖地推定手法を開発」）

10)　学士会会報（2021年7月、全国版「環境DNAに基づく新・生態学の夜明け」）

【サブテーマ２】

1）特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ３】

1)　日刊工業新聞（2023年4月12日、23頁）「大阪大谷大・近大、ホンモロコの遺伝的多様性評価に新手法」

【サブテーマ４】

1)　産経新聞（2020年11月5日、全国版）「海底の泥から魚のDNA300年分採取、個体数変遷追う」

2)　子供の科学（2021年1月号）　「堆積物DNA」

3)　環境展望台，国立環境研究所（2020年10月16日）「愛媛大など、環境DNA分析により魚の長期個体数変動を解明」

（５）本研究費の研究成果による受賞

1）兵庫県立大学第１回研究活動特別賞　兵庫県立大学、2021年10月28日、土居秀幸

2）兵庫県立大学最優秀研究活動賞　兵庫県立大学　　2021年7月28日　土居秀幸

3）北海道大学総長表彰（研究）　北海道大学、2022年2月16日、荒木仁志

4）第39回村尾育英会学術賞　村尾育英会　2022年3月4日　土居秀幸

5）2022年度第70回日本生態学会大会 Best English Award「Phylogeography of Siberian stone loach revealed by environmental DNA」、北海道大学、2023年3月17日(金)～21日(火)　T. Yatsuyanagi, T. Kanbe, K. Fujii, S. Inoue, H. Araki

6) 2022年度第70回日本生態学会大会・ポスター賞最優秀賞「シカのヌタ場が両生類の繁殖に与える影響」、北海道大学他、2023年3月17日(金)～21日(火)　松浦なる、岡宮久規、八柳哲、坂田雅之、岸田治、荒木仁志
7) 2022年度環境DNA学会ワークショップ・発表賞最優秀賞「環境DNAに基づく純淡水魚フクドジョウの系統地理推定」、北海道大学、2022年11月19日(土)　八柳哲、神戸崇、藤井和也、井上頌子、荒木仁志
8) 2022年度環境DNA学会ワークショップ・発表賞最優秀賞「キタノスジエビの河川下流域への産卵回遊とその適応的意義」、北海道大学、2022年11月19日(土)　加藤優樹、神戸崇、荒木仁志
9) 2022年度環境DNA学会ワークショップ・発表賞最優秀賞「環境DNAハプロタイピングにもとづくオショロコマの遺伝子浸透率推定」、北海道大学、2022年11月19日(土)　小澤徹也、神戸崇、荒木仁志
10) 2022年度サケ学研究会大会・サケ科学奨励賞「知床におけるオショロコマの遺伝子浸透と第3イワナの生息可能性」、北海道大学、2022年12月17日(土)　小澤徹也、神戸崇、荒木仁志
11) 2021年度環境DNA学会大会12回ポスター発表優秀賞「北海道におけるワカサギ２種の季節性異所的分布」、北海道大学、2021年11月20日（土）～21日(日)、池田崇人、神戸崇、荒木仁志
12) 日本陸水学会第86回兵庫大会最優秀ポスター賞「堆積物DNAに基づくカイアシ類の長期変動に関する研究」、愛媛大学他、2022年9月16日(金)～19日(月)、中根 快,　刘 鑫,　土居 秀幸,　伴 修平, デュア・ガエル,　加 三千宣,　槻木 玲美
13) 2021年度環境DNA学会大会12回ポスター発表最優秀賞「堆積物DNAにより復元された動物プランクトンの過去100年にわたる産卵量の変動」、愛媛大学他、2021年11月20日（土）～21日(日)、中根 快・土居秀幸・越智梨月・加 三千宣・槻木 玲美

（６）その他の成果発表

1) ニュースキャスト（2023年4月7日）「琵琶湖の重要魚種ホンモロコの遺伝的多様性を環境DNAで瞬時に評価！保全への活用に期待」
2) 日本の研究.comニュース（2023年4月7日）「【注目プレスリリース】琵琶湖の重要魚種ホンモロコの遺伝的多様性を環境DNAで瞬時に評価！保全への活用に期待／大阪大谷大学、近畿大学」

Ⅳ. 英文Abstract

Development and Application of Environmental DNA techniques for Evaluating Distribution and Population Status of Rare/Invasive Species

Principal Investigator: Hitoshi Araki
Institution: Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, JAPAN
Tel: +81-11-706-3893 / Fax: +81-11-706-2494
E-mail: arakih@agr.hokudai.ac.jp
Cooperated by: Ryukoku University, Osaka Ohtani University, Kyoto University, Ehime University

[Abstract]

Key Words: environmental DNA, rare species, invasive species, population dynamics, genetic diversity

Maintenance of biodiversity and local ecosystems is crucial for ecosystem services. However, the extent of monitoring biodiversity and ecosystems, particularly for rare and invasive species, has been constrained due to the costs and time limitations associated with traditional catch surveys. On the other hand, recently developed environmental DNA (eDNA) methods, which utilize DNA in environmental media for estimating distributions, can significantly reduce the costs and time required for wildlife monitoring. In this project, we aimed to further develop the eDNA methods for estimating distributions, biomass, intra-genetic variations and long-term population dynamics of rare and invasive aquatic organisms at the same time. For now, its applicability is rather limited to the presence/absence of wild organisms, but with the technical advances we aimed for, we believe that one can apply an eDNA method to estimate not only distributions of rare/invasive animals but also their status and past population dynamics based both on water and aquatic sediment core samples. Our results indeed suggest that our new methods can be used for estimating haplotype distributions of both rare and invasive species, from which we understand their distribution histories without catching them. Analyses of sediment core samples also suggest historical changes in biodiversity as well as population/genotype dynamics of target species. We illustrated such a capability by applying the eDNA methods to real-world problems with a variety of endangered species such as Sakhalin taimen (*Parahucho perryi*) and Honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*), and invasive species such as Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and Bluegill (*Lepomis macrochirus*). Overall, we show the great capability of eDNA as a tool to provide a scientific basis of management priorities on rare or invasive species, simply by collecting environmental media.