

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

環境DNAを用いた陸水生態系種構成と遺伝的多様性の
包括的解明手法の確立と実践

(4-1602)

平成28年度～平成30年度

Development and Application of Environmental DNA Methods for the Estimation of
Community Composition and Genetic Diversity in Aquatic Systems

〈研究代表機関〉

兵庫県立大学

〈研究分担機関〉

龍谷大学

千葉県立中央博物館

東北大学

神戸大学

島根大学

北海道大学

大阪大谷大学

2019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. 研究開発の方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた主な成果		
6. 研究成果の主な発表状況		
7. 研究者略歴		
II. 成果の詳細		
II-1 湖沼・ため池における環境DNAによる生物多様性推定手法・指標の開発 （兵庫県立大学） 要旨	17
1. はじめに		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた成果		
6. 国際共同研究等の状況		
7. 研究成果の発表状況		
8. 引用文献		
II-2 環境DNAによる生物多様性調査の高効率化を目指した調査・分析手法の検討 （龍谷大学） 要旨	37
1. はじめに		
2. 研究開発目的		
3. 研究開発方法		
4. 結果及び考察		
5. 本研究により得られた成果		
6. 国際共同研究等の状況		
7. 研究成果の発表状況		
8. 引用文献		
II-3 環境DNAメタバーコーディングのためのユニバーサルプライマーとリファレンスデータの充実 （千葉県立中央博物館） 要旨	59

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

II-4 環境DNAメタバーコーディングデータからの多様性指標・群集解析パイプラインの開発 …… 82
(東北大学)

要旨

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

II-5 六甲山周辺地域をモデルとした環境DNAによる水域生物相モニタリング手法の確立 …… 100
(神戸大学)

要旨

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

II-6 汽水流域における環境DNAによる底生動物相モニタリング手法の確立 …… 120
(島根大学)

要旨

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況

7. 研究成果の発表状況

8. 引用文献

II-7 環境DNAを用いた北海道陸水域における固有種・外来種の包括的分布評価と有効集団サイズ推定手法の確立 138

(北海道大学)

要旨

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

II-8 核DNAマーカーを用いた個体群の遺伝的構造の解析 160

(大阪大谷大学)

要旨

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

III. 英文Abstract 175

1. 成果の概要

課題名 4-1602 環境DNAを用いた陸水生態系種構成と遺伝的多様性の包括的解明手法の確立と実践

課題代表者名 土居 秀幸（兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科 准教授）

※平成31年3月時点の所属で記載すること。なお、役職の記載まで必須。

研究実施期間 平成28～30年度

累計予算額 125,083千円

（うち平成28年度：42,401千円、平成29年度：42,401千円、平成30年度：40,281千円）

累計予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 環境DNA、生物調査、生物分布、遺伝的多様性、生物群集、メタバーコーディング

研究体制

- (1)湖沼・ため池における環境DNAによる生物多様性推定手法・指標の開発（兵庫県立大学）
- (2)環境DNAによる生物多様性調査の効率化を目指した調査・分析手法の検討（龍谷大学）
- (3)環境DNAメタバーコーディングのためのユニバーサルプライマーとリファレンスデータの充実（千葉県立中央博物館）
- (4)環境DNAメタバーコーディングデータからの多様性指標・群集解析パイプラインの開発（東北大学）
- (5)六甲山周辺地域をモデルとした環境DNAによる水域生物相モニタリング手法の確立（神戸大学）
- (6)汽水流域における環境DNAによる底生動物相モニタリング手法の確立（島根大学）
- (7)環境DNAを用いた北海道陸水域における固有種・外来種の包括的分布評価と有効集団サイズ推定手法の確立（北海道大学）
- (8)核DNAマーカーを用いた個体群の遺伝的構造の解析（大阪大谷大学）

1. はじめに(研究背景等)

生物保全の実現には、個体数や生物量といった生物分布の詳細かつ広域的把握に加え、その種の絶滅リスクを左右する遺伝的多様性についても正確に把握する必要がある。従来の野外調査では、これらの情報を収集するため、目視で数える、捕獲採集を行うなど、多大な労力と時間をかけてきた。このため、最新のDNA解析技術を利用し、環境水をすくうだけで広域調査が可能な「環境DNA」を用いた手法が、画期的な野生生物調査法として世界的に注目されつつある。

環境DNAとは、湖沼や河川、海洋などの水中に存在するDNA断片のことである。これまでは主に微生物調査に用いられてきたが、近年、魚類などの大型生物の分布や生物量推定に応用されつつある。プロジェクトメンバーらの研究グループでは、環境DNAを用いて、ため池や河川などに生息する大型生物の分布について広域的に把握することに成功した(Takahara et al. 2012、Fukumoto et al. 2015)。更に、これまでの種特異的な手法に加え、次世代シーケンサと呼ばれるDNA解析装置を用いることで、環境水に含まれる全魚種のDNAを同時並行的に解析するメタバーコーディングの手法も開発している(Miya et al. 2015)。これにより、わずか1リットルの水を汲むだけで、何十、何百という魚の種組成を明らかにできるようになった。

本プロジェクトでは、環境DNAを用いて、湖沼、河川、汽水域などの陸水生態系における生物の種組成を推定するとともに、外来種や希少種を早期発見するメタバーコーディングの手法を確立する。さらに、環境DNAから遺伝的多様性を推定し、有効集団サイズを含む集団遺伝学的解析を可能にする。そのために、湖沼、河川、汽水域などの陸水生態系に生息する魚類、昆虫、水草といった多様な生物種の分布や動態を、1リットルの水を汲むだけで把握す

る革新的技術を開発する。この環境DNA技術により、外来種・希少種を含めた生物群集の簡便かつ迅速な生物分布モニタリングが可能となる。

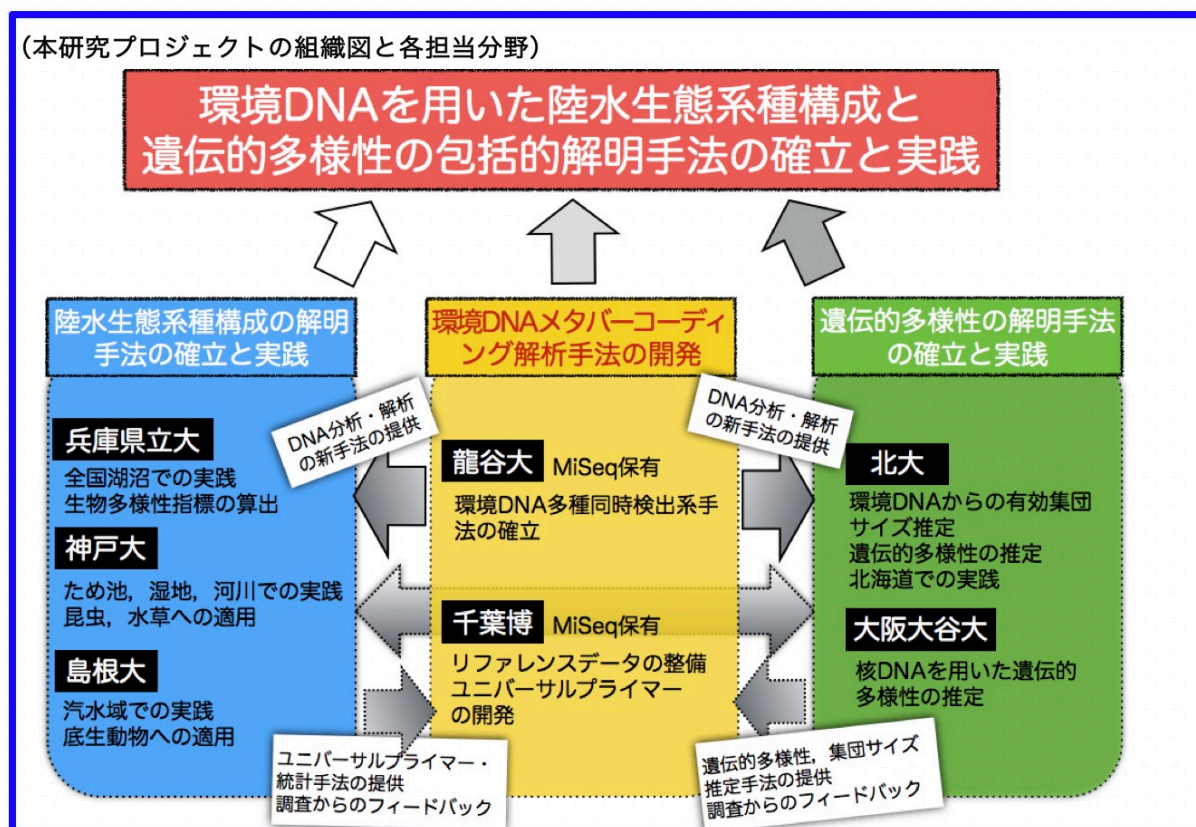


図1 本研究プロジェクトの組織図と各担当分野

2. 研究開発目的

本研究プロジェクトでは、国内の環境DNA研究者を結集し、これらの先駆的な研究をより発展させ、環境DNA解析に基づく生物分布や生物多様性の詳細かつ広域的な推定方法を開発する。更に、魚類に限らず水草や昆虫、甲殻類など、水圏生態系の主要な構成生物を包括的に解析する手法や、種内変異などの遺伝的多様性を評価する手法を開発する。最終的な目標は、1リットルの水を採水するだけで、ある水域の種組成や遺伝的多様性を明らかにする革新的な解析技術を確立することである。この技術の実践により、生物多様性の評価をより低コストでより広範に行うことができるようになる。

本研究の最終目標は、この研究で得られた成果を公開し、環境DNAを用いたメタバーコーディングによる生物種組成の把握、種内遺伝的多様性を含む生物多様性の推定を包括的に行うシステムを提案することである。

そのために、湖沼、河川、汽水域などの陸水域生態系に生息する魚類、昆虫、水草といった多様な生物種の分布や動態を、1リットルの水を汲むだけで把握する革新的技術を開発する。この環境DNA技術により、外来種・希少種を含めた生物群集の簡便かつ迅速な生物分布モニタリングが可能となる。

さらに、ミトコンドリアDNAマーカーや核DNAマーカーを用いて、遺伝的多様性に基づく各種・各集団の絶滅リスクといった「健康状態」を明らかにする手法を開発する。これらの目的を達成するために以下の3つの大きなテーマを設定した。

- 1) 陸水生態系種構成の解明手法の確立と実践
- 2) 環境DNAメタバーコーディング手法の開発
- 3) 遺伝的多様性の解明手法の開発

これらのテーマについて、日本の環境DNA研究グループを結集して組織を形成し、各サブテーマがそれぞれの目標に向けて研究を進めるとともに、サブテーマ同士で、流動的に共同研究を行う。

3. 研究開発の方法

(1) 湖沼・ため池における環境DNAによる生物多様性推定手法・指標の開発

全国の18湖沼で環境DNAを採取し、それから魚類群集を対象として、MiFishによるメタバーコーディングを行う。全国の湖沼で実験を行うことで、全国の魚類群集の把握が可能であるかをテストする。中四国の5河川で環境DNAを採取し、それから魚類群集を対象として、MiFishによるメタバーコーディングを行う。さらに、環境DNA採取と同時に従来の調査手法である、潜水目視と採捕調査を行うことで、メタバーコーディングと従来の調査両手法によって把握できる魚類群集の比較を行う。河川水には、降雨や降下により直接的あるいは表層流を通じて間接的に、集水域で生育する陸生菌類の組織や散布体が加入している。そのため河川水中の環境DNAを対象としてDNAメタバーコーディングを行うことで、水生の菌類のみならず、陸生を含めた菌類相調査が調査可能であると考えられる。そこで本研究では、以下の2項目を評価することを目的とした。(1)DNAメタバーコーディングによって河川水中の菌類DNAを検出可能か、可能な場合どのような分類群・機能群が含まれるのか。(2)河川水環境DNAを対象とした菌類DNAメタバーコーディングによって菌類相の空間・時間構造が評価可能かを検討した。動物プランクトン相を明らかにするための環境DNA手法を確立するために、①プランクトンネットを用いた現在の手法との比較と、②環境DNA手法におけるサンプリング手法と解析手法の検討を行った。プランクトンのDNAは、既存のプライマーのうちどれがもっとも精度良くプランクトンを把握できるかについて調べた。また環境DNAで得られたDNAが、同定されていない可能性について注目して、データベース間の影響を調べた。さらにプランクトン相の把握のために、現地でどのようなサンプリングがもっとも適しているかを調べるために、手法を変えてプランクトンを採集した。以上を検証することによって、プランクトン相を把握するための、精度の高い環境DNA手法の確立を目指した。

(2) 環境DNAによる生物多様性調査の高効率化を目指した調査・分析手法の検討

本サブテーマでは特に「直接捕獲との検出率の違い」、そして「採水の方法」に注目して各種検討を行った。まず、基礎となる検出感度について、河川において直接捕獲と環境DNAメタバーコーディングとの比較を行い、直接捕獲によって確認された種のうち90%を環境DNA分析によって確認した。次に、池沼で種の検出を行う際に、対象水域の周囲に配置した各地点のサンプルをすべて個別に分析する場合と、各地点の水サンプルを混合して1つのサンプルとして分析する場合とで、環境DNA分析による結果の差を比較した。さらに、プロジェクトの年限を通して3年間にわたって季節ごとの採取を行った、琵琶湖沿岸、周辺内湖、流入する一級河川、のサンプルを環境DNAメタバーコーディングに供して、滋賀県内の魚類相の分布とその特性について明らかにすることを目標とした。

(3) 環境DNAメタバーコーディングのためのユニバーサルプライマーとリファレンスデータの充実

環境DNAメタバーコーディング(多種同時並列検出法)のための魚類ユニバーサルプライマー MiFish(Miya et al. 2015)の改良を行った。また、魚類に加えて哺乳類用のユニバーサルプライマー(MiTpod)を同じ領域(ミトコンドリアの12S rRNA 遺伝子)上に設計し、動物園の水飲み場ならびに北海道大学演習林内の水系で採取した水を用いてそのパフォーマンスを検証した。また、鳥類のユニバーサルプライマー(MiBird)も同じ領域に設計した。さらに、環境DNAの濃度が薄い天然水を用いる場合の実験プロトコルを見直した。これらの実験ツールや実験法の改良と並行して、環境DNAメタバーコーディングに欠かせないリファレンスデータの充実にも努めた。本サブテーマでは、魚類群集調査で大きな注目を集めている環境DNAメタバーコーディング法(多種同時並列決定法:MiFish法)を他の脊椎動物や無脊椎動物に適用することにより、湖沼・河川・汽水域などの陸水生態系における生物群集の種組成をより広い動物群で推定することを目的に技術開発を行った。

(4) 環境DNAメタバーコーディングデータからの多様性指標・群集解析パイプラインの開発

霞ヶ浦や琵琶湖を含む、日本各地の湖沼やため池、水田から網羅的に採取した動物プランクトンについて、環境DNAメタバーコーディングに最適な遺伝子領域候補としてミトコンドリアDNAのCOI遺伝子領域(以後、mtCOIと表記)に着目し、その配列ライブラリーの充実に努めた。さらに、mtCOIバーコードを補完するものとして、核DNAの18SrDNA・V9領域(以後、nr18S-V9と表記)についても配列ライブラリーを作成するとともに、nr18S-V9バーコードに基づく種判別結果が、mtCOIバーコードでの種判別結果と一致するか否かを確認した。

(5) 六甲山周辺地域をモデルとした環境DNAによる水域生物相モニタリング手法の確立

本サブテーマでは、六甲山周辺地域をモデルとして、近年注目されている環境DNA手法を用いた水生生物相のモニタリング手法の確立およびそれらの手法を野外環境に適用したモニタリングの実践を行った。新規モニタリング手法の開発では、トンボ目、水生コウチュウ目、両生類、水生植物についてメタバーコーディング手法による網羅的な種の検出手法を検討した。これらの手法では、実験条件の検討から配列情報の集積など、メタバーコーディング手法の確立にかかる情報の蓄積についても同時に行った。また、新規手法の開発として、土壌堆積物からの環境DNAの抽出および分析手法の確立を行った。

(6) 汽水流域における環境DNAによる底生動物相モニタリング手法の確立

本サブテーマでは、宍道湖に高密度で分布する二枚貝ヤマトシジミ(*Corbicula japonica*)を対象にして、環境水と底泥におけるDNA回収率を比較し、汽水域における底生動物の最適な環境DNAモニタリング法の確立を試みた。汽水域における環境DNA分析手法の確立を目指し、鳥根県の宍道湖に高密度で分布する二枚貝ヤマトシジミ(*Corbicula japonica*)などの環境DNA定量用のプライマー・プローブを作成した。次に、ヤマトシジミを汽水に生息する底生動物のモデル生物の一つとして、宍道湖から採取した水試料と泥試料におけるDNA回収率などを比較し、汽水域における最適な環境DNAサンプリング手法について検討した。

(7) 環境DNAを用いた北海道陸水域における固有種・外来種の包括的分布評価と有効集団サイズ推定手法の確立

本サブテーマでは環境DNA技術を改良し、北海道の陸水域を対象とした魚類相の解明と固有種・外来種の包括的分布評価を第一の目的とした研究を行った。その結果、北海道の河川においてはイトウやエゾホトケなどの希少種の分布が明らかになると共に、ニジマスやブラウントラウトといった外来サケマス類の分布域も明らかとなった。一方、石狩川流域に数多く残された河跡湖においては、コイ科魚類に代表される国内外来種・カムルチーに代表される国外外来種など、道内の河川とは著しく異なる魚類相が検出され、過去の河川改修が外来種の温床となっていることが示唆された。

本サブテーマの第二の目的には環境DNA技術の種内多型推定およびそれに基づく有効集団サイズ推定が挙げられる。これには既存の環境DNA技術の主流となっているミトコンドリアゲノム由来の遺伝情報解析から核ゲノム由来の遺伝情報解析への技術革新が求められる。核ゲノムはミトコンドリアゲノムに比べ細胞当たりのコピー数が少ないため、より感度の高い環境DNA検出技術を目指した技術改良を行った。

(8) 核DNAマーカーを用いた個体群の遺伝的構造の解析

環境DNA分析は特定の種や分類群の分布を迅速に推定する手法として急速な発展を遂げる一方、種内変異の定量的な検出に環境DNA分析を適用した事例は未だ極めて限定的である。本研究ではコイをモデル生物とし、在来コイと外来コイを区別する一塩基の変異(一塩基多型)を指標として用いることにより、個体群遺伝構造を迅速に推定する環境DNA手法の開発を行った。環境DNA分析において従来より標的とされてきたミトコンドリアDNAマーカーは

母由来の遺伝情報しか反映しないという欠点があるため、本研究では、標的をミトコンドリアDNAから核DNAへと拡張することにより、両親の遺伝情報を反映する個体群遺伝構造の推定を試みた。本目的を達成するために、まず、核における有用多型マーカーの多くがシングルコピーDNAである点に着目し、検出が極めて困難と予測される核シングルコピーDNAを環境DNAから検出する方策を検討した。さらに、希薄なDNAを用いた定量的解析において、結果の信頼性を大きく損なわせるPCR阻害への抵抗性に優れたPCR検出系の検討を行った。以上2点の検討結果を踏まえ、核遺伝子座における一塩基多型のアレル頻度を定量的に解析するリアルタイムPCR法を開発し、その野外適用を実践した。

4. 結果及び考察

(1) 湖沼・ため池における環境DNAによる生物多様性推定手法・指標の開発

全国の湖沼での実験から、東洋紡のKOD FX NEO PCR mixという土壌成分などからのPCR阻害に強いものを用いてメタバーコーディングするのが良いことがわかった。湖沼の魚類群集の種数を解析したところ10-30種程度の種数が得られた。魚類のこれまでの採捕情報や図鑑の情報などと照らし合わせても妥当な種数であると考えられた。5つの河川で調査した結果、合計で53種類が、環境DNAメタバーコーディングから検出された。一方で従来の潜水目視・採捕調査による検出(合計)は、38種類であった。結果より、すべての調査の河川、また河川流程において、環境DNAメタバーコーディングにより得られた魚類種数は、従来の調査を上回ることがわかり、河川での魚類群集調査における環境DNAメタバーコーディングの有用性が確かめられた。また生物多様性を把握する上で、より多くの種類を検出できる環境DNA手法の優位性が明らかとなった。本研究によって、河川水中の環境DNAは分類学的にも機能的にも多様な菌類DNAを含んでおり、DNAメタバーコーディングによってこうした多様な菌類のDNAを検出可能であること、さらに環境DNAメタバーコーディングは、水中にとどまらず陸域を含む包括的な菌類多様性調査やモニタリングを行う上で有用であることが示された。環境DNAによるプランクトン相の解明は、上記に挙げたCOIプライマーを用いることで科レベルの分類であれば把握できることがわかった。しかしながら実際にプランクトン調査で環境DNA手法が使えるようになるためには、精度の向上が求められるだろうと考えられる。解明すべき点としては、得られたプランクトンの環境DNAを同定できるようになることと、プランクトンの環境DNAを採集できるようになることが重要であることがわかった。

(2) 環境DNAによる生物多様性調査の高効率化を目指した調査・分析手法の検討

環境DNA検出感度について、河川において直接捕獲と環境DNAメタバーコーディングとの比較を行い、直接捕獲によって確認された種のうち90%を環境DNA分析によって確認できた。次に、池沼で種の検出を行う際に、対象水域の周囲に配置した各地点のサンプルをすべて個別に分析する場合と、各地点の水サンプルを混合して1つのサンプルとして分析する場合とで、環境DNA分析による結果の差を比較した。結果として、サンプルを個別に扱ったほうがよりマイナーな種まで検出できる一方で、混合したサンプルは主要な種の構成を反映することが示された。最後に、プロジェクトの年限を通して3年間にわたって季節ごとの採取を行った、琵琶湖沿岸、周辺内湖、流入する一級河川、のサンプルを環境DNAメタバーコーディングに供して、滋賀県内の魚類相の分布とその特性について明らかにした。佐久良川での調査の結果、環境DNA分析による検出数は28種、直接捕獲では20種であった。即ち、両手法での合計検出数は36種であった。直接捕獲で捕獲された種のうち、環境DNA分析でも検出された種の割合は90%であった。一般により高感度とされる環境DNA分析によってのみ検出された種が6種いた一方で、直接捕獲でしか検出されなかった種も2種いた。結果として、両手法で得られた魚類相データは高い割合で一致すること、そして、若干ながらやはり環境DNAメタバーコーディングによって得られる種数の方が多い事が確認された。

内湖での採水・分析手法の検討では、分析全体を通して4内湖から43種が検出された。個別サンプルの分析の結果、1内湖の中でもサンプルを増やす、つまり様々な地点から採取した水を用いた方がより多くの種が検出できること

が示された。これは、4内湖のうち最小の野田沼(8.4 ha)でも最大の西ノ湖(222 ha)でも同様の傾向がみられた。いずれの内湖でも、今回設定した採水地点数(沖を含めて9もしくは17地点)ではまだ種数が完全に飽和するには至らなかった。個別のサンプルを集約したサンプルではPCRの繰り返しを増やすほどに検出される種数が増加する傾向が見られたものの、各内湖の個別サンプルから検出された総種数よりも少ない種数しか検出できなかった。

(3) 環境DNAメタバーコーディングのためのユニバーサルプライマーとリファレンスデータの充実

プライマーのアニーリング温度を上げた新たな魚類ユニバーサルプライマー MiFish-E-F/R v2 を設計し、現在さまざまな環境 DNA を用いてそのパフォーマンスを検討した。脊椎動物については哺乳類と鳥類で、無脊椎動物では十脚甲殻類(エビやカニのなかま)で環境 DNA メタバーコーディング法の開発に成功した。また、環境 DNA から増幅・検出された魚類由来の断片配列(ミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子の平均長 172 bp; MiFish 配列)の種判定に必要なリファレンス配列(証拠標本と MiFish 配列が紐付けされたもの)を充実させるために、日本全国各地の河川から魚類標本を収集した。これら魚類標本の種同定を行い千葉県立中央博物館に証拠標本として登録すると共に、全魚種の MiFish 配列をサンガー法により決定した。その結果、日本産淡水魚類(汽水域も含める)約 300 種のほぼ 80% に相当する 47 科 113 属 236 種のリファレンス配列を得ることができた。これらのリファレンス配列については、国際 DNA 塩基配列データベースである DDBJ/EMBL/GenBank に登録して即時公開した。

(4) 環境DNAメタバーコーディングデータからの多様性指標・群集解析パイプラインの開発

形態による種判別の難易度が、他の動物群よりも高いと一般にみなされている、動物プランクトンについては、mtCOIを用いたDNAバーコーディングによる種判別が、極めて有効であることが示された。例えば霞ヶ浦においては、輪虫類の*Polyarthra*属のように従来は種判別できなかったタクサが3-8種を含むことを見出し、DNAバーコーディングを使えば、従来よりも高い解像度で動物プランクトン相を記述できることを示した(Makino et al. 査読中)。またカラノイダ目の橈脚類については、日本に分布する全ての種について、mtCOIのライブラリー配列を作成できた(Makino, Tanabe, Urabe 査読中)。さらに、代表的な動物プランクトンでありながら、形態による種判別が最も難しい動物プランクトンである、ミジンコ(*Daphnia*)属とゾウミジンコ(*Bosmina*)属についても、日本産種を網羅するライブラリー配列を構築できた。2017年4月14日現在、橈脚類18タクサ(ヒゲナガケンミジンコ類13タクサ、ケンミジンコ類5タクサ)、枝角類39タクサ、輪虫類53タクサについて、ライブラリー配列を整えることができた。これらのタクサには、我が国の湖沼で優占する種の大半が含まれている。本サブテーマでは、環境DNAメタバーコーディングが、我が国の淡水動物プランクトンの多様性解析に使用可能となるよう、手法開発を行った。

本研究により、種判別に使える形態形質を欠く卵や幼生においても、遺伝子情報による種判別が可能となった。また本研究で作成したライブラリー配列は、本邦湖沼での、将来の動物プランクトンモニタリングにて、担当機関により有効に活用されることが見込まれる。

(5) 六甲山周辺地域をモデルとした環境DNAによる水域生物相モニタリング手法の確立

野外環境における環境DNAモニタリング手法の実践においては、主に六甲山周辺地域の河川、ため池、水田地帯で魚類、水生昆虫類、両生類、水生植物の環境DNAメタバーコーディング手法を適用した。魚類では、六甲山周辺地域の225地点の河川、100地点のため池、8地域90地点の水田地帯にてメタバーコーディングを行い、在来種、外来種を含む58種の淡水魚類を検出した。さらに、河川では魚類の分布情報と周辺の環境要因から淡水魚類の分布に周辺の土地利用が関係することを明らかにし、淡水魚類の生息環境の保全における水田環境の重要性を示した。水生昆虫のうち、水生コウチュウ目については水田の水サンプルから水生コウチュウの検出ができた。しかし、生息が確認されたにもかかわらずDNAの検出されない種もいるなど改善の余地がある。トンボ目では、兵庫県内のため池約100地点を対象として行った調査で、62OTUと多くのトンボ目を検出できた。ため池の環境要因や魚類の出現情報から、ため池におけるトンボ目の多様性には、植物構造の有無や人工護岸の割合、魚類の種数が影響を与

えていることが明らかとなった。両生類では六甲山周辺の2地域の水田地帯において、5種の無尾目と1種の有尾目の検出し、目視で判別の困難な種や目視できていない種まで検出できた。水生植物では、六甲山周辺のため池を中心とした約150地点で環境DNAメタバーコーディングを適用し、絶滅危惧種を多く含むイバラモ属の生息するため池群を明らかにした。また、イバラモ属の分布にはため池周辺の森林環境の有無が重要であることが示唆された。以上のように、サブテーマ5では環境DNA手法を用いて多くの分類群のモニタリングを実践し、手法の確立を行った。また、一部の分類群については、多地点・高頻度な調査が可能な環境DNA手法の利点を活かし、周辺環境と種の多様性の関係を明らかにするなど、水生生物相のモニタリングにおける環境DNA手法の有用性を示した。

(6) 汽水流域における環境DNAによる底生動物相モニタリング手法の確立

宍道湖のヤマトシジミを対象に検討したところ、沼泥試料よりも、水試料に含まれるDNA濃度の方が島根県の目視資源量調査結果と相関する傾向があることがわかった。このことから、汽水における環境DNA測定用のサンプルは水試料を採取する方が適切であることが示唆された。さらに、いくつかの淡水魚で既報のDNA分解抑制試薬が、汽水性の水生動物3種(ヤマトシジミ、スズキ、ニホンウナギ)に由来する環境DNAの保存においても効果的であることが確認された。加えて、宍道湖全域122箇所の一斉採水調査を行った結果、ヤマトシジミの環境DNA濃度の分布と島根県の目視資源量調査結果と傾向が一致していることが示唆された。また、宍道湖-中海を利用する魚類・鳥類を含む生物群集を対象にした環境DNAメタバーコーディング法の有用性を検証した。その結果、絶滅危惧種など希少種11種を含む魚類168種、および、鳥類23種が検出された。さらに、宍道湖から中海に分布する魚類相は、湖水の塩分濃度勾配が関係しており、また、鳥類が越冬地として利用する場合に、各湖内においても選好する場所が存在することが示唆された。以上のことから、本サブテーマによって、汽水域における環境DNA分析手法(種特異的検出系、及び、メタバーコーディング法)の有用性の一端を明らかにできたと考えている。

(7) 環境DNAを用いた北海道陸水域における固有種・外来種の包括的分布評価と有効集団サイズ推定手法の確立

本サブテーマでは環境DNA技術を改良し、北海道の陸水域を対象とした魚類相の解明と固有種・外来種の包括的分布評価を第一の目的とした研究を行った。その結果、北海道の河川においてはイトウやエゾホトケなどの希少種の分布が明らかになると共に、ニジマスやブラウントラウトといった外来サケマスの分布域も明らかとなった。一方、石狩川流域に数多く残された河跡湖においては、コイ科魚類に代表される国内外来種・カムルチーに代表される国外外来種など、道内の河川とは著しく異なる魚類相が検出され、過去の河川改修が外来種の温床となっていることが示唆された。内別川における環境DNA定量解析では、サケ親魚の遡上・産卵が認められた9月から1月にかけて、またサケ稚魚の浮上と降河が予想される2月から5月にかけてのサケDNA検出が認められた。また、同河川の次世代シーケンサーによる環境DNAメタバーコーディングを試みたところ、サケの他にヤマメ、カラフトマス、ハナカジカ、外来種であるニジマス、ブラウントラウトのDNAが検出された。内別川には2メートルほどの堰堤が存在するが、この上下では魚類相が大きく異なり、ニジマスは堰堤上にも生息する一方、ブラウントラウトは堰堤下にしか生息しておらず、外来種間でも堰堤の影響に差が生じていることが分かった。

環境DNA技術の種内多型推定およびそれに基づく有効集団サイズ推定については、核ゲノムはミトコンドリアゲノムに比べ細胞当たりのコピー数が少ないため、より感度の高い環境DNA検出技術を目指した技術改良を行った。その結果、河川内においても生物密度の高い場所においては核ゲノム由来の遺伝情報を安定的に抽出することが可能となり、同種個体群間の集団遺伝特性についても解析が可能となる事が示唆された。

(8) 核DNAマーカーを用いた個体群の遺伝的構造の解析

核シングルコピーDNAを環境DNAから検出する方策を検討したところ、繁殖期に繁殖地において水試料を得ることにより、定量分析が可能な濃度の環境DNAサンプルを得られることが明らかとなった。さらに、希薄なDNAを用いた

定量的解析において、結果の信頼性を大きく損なわせるPCR阻害の問題を解決するために、環境DNAサンプルに混入するPCR阻害物質への抵抗性に優れたPCR検出系について検討を行ったところ、特定のPCR反応試薬を用いることによりPCR阻害作用が大幅に軽減されることを見出した。これら2点の検討結果を踏まえ、核遺伝子座における一塩基多型のアレル頻度を定量的に解析するリアルタイムPCR法を開発し、さらに開発したアレル頻度定量法を用いた環境DNA分析を野外において実践した。その結果、環境DNA分析により推定された在来遺伝子と外来遺伝子のアレル頻度は、捕獲したコイ個体における分析結果とよく一致し、核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による個体群遺伝構造解析が野外において十分実施可能であることが実証された。本成果は、生物多様性保全における難題である、同種の外来遺伝子型の侵入や個体群縮小による遺伝的多様性の低下といった問題について、迅速かつ広汎な調査を可能とする有用な手段として活用されることが期待される。

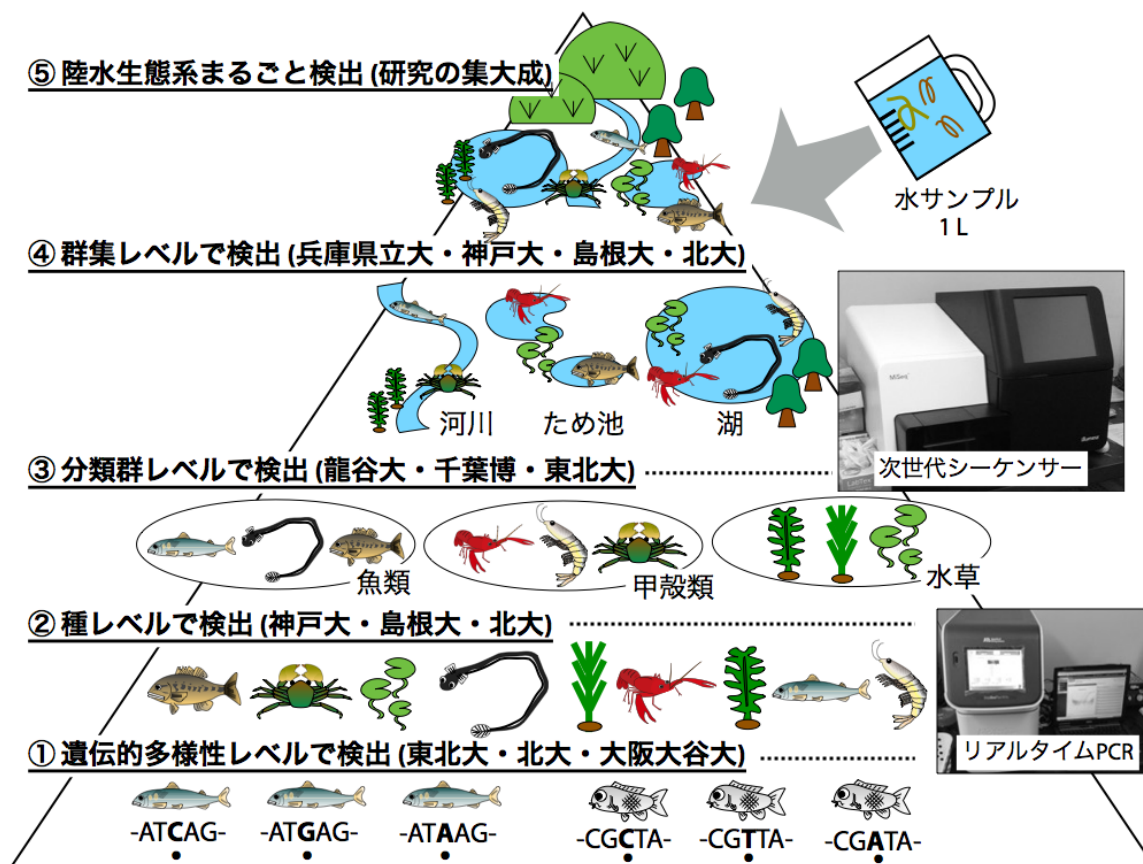
5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究開発により得られた成果の重要な科学的意義として、大きく以下の3点が挙げられる。まず、サブテーマ1、2、4、5、6、7などで様々な水域環境において、MiFishプライマーによる環境DNAメタバーコーディング解析を試みて、多くの部分で種リストの作成に成功した。いくつかの問題点としては、PCRによる増幅が難しいことがあること、網羅できない種があることなどが挙げられ、次年度以降の開発により解決する予定である。次に、サブテーマ3、4、5などを中心に、日本各地から魚類や、哺乳類、鳥類、動物プランクトン、水生昆虫類を中心とした陸水生物の採集とDNA配列の決定を行い、それらの標本からリファレンスとなるDNA塩基配列を取得した。それらのデータを今後のメタバーコーディングに生かすことが可能である。そして、サブテーマ7、8では、核DNA上の多型マーカーへの環境DNA手法の適用法の検討を行い、コイにおいては、実験室や野外の湖沼・河川において、上手く検出できることが明らかとなってきた。今後はこれを超並列シーケンスによる解析にも応用していく予定である。

本研究プロジェクトでは、様々な環境DNA技術が個別に開発されてきたようにもみえる。しかし、これらの多種多様な分類群のDNAを増幅するユニバーサルプライマーによる環境DNAメタバーコーディング解析とその関連技術は、本研究で目指した1リットルの水から生態系を丸ごと診断することを達成できる技術になっていると考えられる。つまり下図に示すように、遺伝的多様性から個別の生物種の把握、生物群集の把握までができる総合的な環境DNA技術の構築ができたと考えられる。また、世界に先駆けて、これほど多様なユニバーサルプライマーによる環境DNAメタバーコーディング解析技術とその調査法や野外適応を進めていることは国際的にも大変高く評価されており、代表者を含めてヨーロッパやアメリカとの共同研究や環境DNA技術に関連する会議への招聘からもうかがえる。

これらの科学的な意義については国内においても高く評価されており、多くの報道や市民向けの講座依頼などがなされている。また2018年5月には、一般社団法人環境DNA学会が設立され、9月には東京にて第1回大会が行われた、この設立には、代表者、分担者7名が発起人となって立ち上げ、理事や、専務理事、副会長となって大きく貢献している。



(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省では「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」を開いている。この検討会の委員として、代表者(土居)と分担者(源)が参画している。環境省の事務局と実験マニュアルやリファレンスデータベースに関して情報交換を行っており、本課題の成果が既に活用されている。

2018年度神戸市生物多様性の保全にかかる希少種生息調査(ヒダサンショウウオ)に環境DNA分析が用いられた。

環境省、林野庁、北海道および学識経験者などの構成員からな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、オショロコマ長期モニタリング調査結果の一部として本研究成果の一つである知床半島の河川環境DNA調査の結果が示され、今後知床半島のオショロコマモニタリングにこの技術を活用していくことが承認された。(オショロコマ長期モニタリング調査結果資料にこの解析結果の一部が採用されている)。

国土交通省では「環境DNAの河川事業への適用を目指した共同研究に着手 一水をすくって川の生き物を特定」とする報道発表を平成30年4月24日に行い、土木研究所と民間会社が共同研究(平成30~32年)を行うことを発表した。国交省ならびに民間会社とは、実験マニュアルやリファレンスデータベースに関して情報交換を行っており、本課題の成果が既に活用されている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

環境省では上記の絶滅危惧種を対象にした調査に加え、様々な場所での今後の生物モニタリングに環境DNAの活用を考えているため、本研究成果の活用が欠かせない。上記の検討会についてもあと3年間引き続き検討され

るということで、本研究成果の活用が大いに期待される。

国土交通省では上記の技術開発を「河川水辺の国勢調査」に取り込むことを目指されておりすでに代表者や分担者との議論が進んでいる、本研究成果の活用は必須となる。

水産庁では平成31年度水産予算概算要求の資料で「スマート水産業推進事業」を掲げており、その中で環境DNA解析の技術を取り入れ、資源変動要因や環境変化の解析を行うとともに、解析データを蓄積し、資源評価に活用するためのデータベースを構築すると明記している。したがって、本研究成果が鯨や水鳥に加えて十脚甲殻類の資源評価に使われる可能性が高い。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) A. FUJIWARA, S. MATSUHASHI, H. DOI, S. YAMAMOTO, T. MINAMOTO: *Freshwater Science* 35, 748–754 (2016)
“Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds”
- 2) S. MATSUHASHI, H. DOI, A. FUJIWARA, S. WATANABE, T. MINAMOTO: *PLOS ONE* 11, e0156217 (2016)
“Evaluation of the environmental DNA method for estimating distribution and biomass of submerged aquatic plants”
- 3) H. YAMANAKA, H. MOTOZAWA, S. TSIJI, R. C. MIYAZAWA, T. TAKAHARA, T. MINAMOTO: *Ecological Research*, 31, 963–967 (2016)
“On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation”
- 4) 高原輝彦、山中裕樹、源利文、土居秀幸、内井喜美子: *日本生態学会誌*, 66, 583–599 (2016)
「環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心に～」
- 5) 山中裕樹、源利文、高原輝彦、内井喜美子、土居秀幸: *日本生態学会誌*, 66, 601–611 (2016)
「環境DNA分析の野外調査への展開」
- 6) 福岡有紗、高原輝彦、松本宗弘、兵庫県立農業高校生物部、丑丸敦史、源利文: *日本生態学会誌*, 66, 613–620 (2016)
「在来希少種カワバタモロコシの環境DNAによる検出系の確立」
- 7) M. MIYA, T. MINAMOTO, H. YAMANAKA, S. OKA, K. SATO, S. YAMAMOTO, T. SADO, H. DOI: *Journal of Visualized Experiment* 117, e54741 (2016)
“Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA”
- 8) H. DOI, R. INUI, Y. AKAMATSU, K. KINNO, H. YAMANAKA, T. TAKAHARA, T. MINAMOTO: *Freshwater Biology* 62, 30–39 (2017)
“Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish”
- 9) S. TSUJI, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO: *Limnology* 18, 1–8 (2017)
“Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples”
- 10) H. DOI, K. UHCII, S. MATSUHASHI, T. TAKAHARA, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO: *Limnology and Oceanography Methods* 15, 212–218 (2017)
“Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA”

- 11) T. MINAMOTO, K. UCHII, T. TAKAHARA, T. KITAYOSHI, S. TSUJI, H. YAMANAKA, H. DOI: *Molecular Ecology Resources* 17, 324–333 (2017)
“Nuclear internal transcribed spacer–1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*”
- 12) H. YAMANAKA, T. MINAMOTO, J. MATSUURA, S. SAKURAI, S. TSUJI, H. MOTOZAWA, Y. SOGO, N. KAKIMI, I. TERAMURA, M. SUGITA, M. BABA, A. KONDO: *Limnology*, 17, 233–241 (2017)
“A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant”
- 13) S. TSUJI, M. USHIO, S. SAKURAI, T. MINAMOTO and HIROKI YAMANAKA: *PLOS ONE*, 12, e0176608 (2017),
Water temperature–dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance.
- 14) H. SATO, Y. SOGO, H. DOI and H. YAMANAKA: *Scientific Reports*, 7, 14860 (2017), Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities.
- 15) M.USHIO, H.FUKUDA, T.INOUE, K.MAKOTO, O.KISHIDA, K.SATO, K.MURATA, M.NIKAIDO, T.SADO, Y.SATO, M.TAKESHITA, W.IWASAKI, H.YAMANAKA, M.KONDOH and M.MIYA: *Molecular Ecology Resources* 17, 6, e63–e75 (2017) Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water
- 16) T.ISHIGE, M.MIYA, M.USHIO, T.SADO, M.USHIDA, K.MAEBASHI, R.YONECHI, P.LAGAN and H.MATSUBAYASHI: *Biological Conservation* 210, 281–285 (2017) Tropical–forest mammals as detected by environmental DNA at natural saltlicks
- 17) I. KATANO, K. HARADA, H. DOI, R. SOUMA, T. MINAMOTO: *PLOS ONE* 12(5): e0176541 (2017) Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods.
- 18) K. UCHII, H. DOI, H. YAMANAKA, H., T. MINAMOTO: *Ecology and Evolution* 7(20): 8515–8522 (2017) Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and non–native genotypes of common carp estimated by environmental DNA.
- 19) H. DOI, K. UCHII, S. MATSUHASHI, T. TAKAHARA, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO: *Limnology & Oceanography: Methods*, 15, 2, 212–218 (2017), Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA.
- 20) H. DOI, Y. AKAMATSU, Y. WATANABE, M. GOTO, R. INUI, I. KATANO, M. NAGANO, T. TAKAHARA, T. MINAMOTO: *Limnology and Oceanography: Methods* 15, 939–944 (2017) Water sampling for environmental DNA surveys by using an unmanned aerial vehicle.
- 21) T. CHAMBERT, D. S. PILLIOD, C. S. GOLDBERG, H. DOI and T. TAKAHARA: *Ecology and Evolution*, 8, 6, 3468–3477 (2018), An analytical framework for estimating aquatic species density from environmental DNA.
- 22) H.NAKAGAWA, S.YAMAMOTO, T.MINAMOTO, Y.SATOH, T.SADO and M.MIYA: *Freshwater Biology*, 63, 6, 569–577 (2018), An analytical framework for estimating aquatic stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods
- 23) Y.SATO, M.MIYA, T.FUKUNAGA, T.SADO and W.IWASAKI: *Molecular Biology and Evolution*, 35, 6, 1553–1555 (2018) MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding
- 24) M.USHIO, K.MURATA, T.SADO, I.NISHIUMI, M.TAKESHITA, W.IWASAKI and M.MIYA: *Scientific Reports* 8 4493–4493 (2018) Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species
- 25) M.USHIO, H.MURAKAMI, R.MASUDA, T.SADO, M.MIYA, S.SAKURAI, H.YAMANAKA, T.MINAMOTO, M.KONDOH: *Metabarcoding and Metagenomics* 2, 6, 1–15 (2018) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high–throughput sequencing

- 26) Q. WU, K. KAWANO, Y. UEHARA, N. OKUDA, M. HONGO, S. TSUJI, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO: *Freshwater Science* 37 (2), 307–314 (2018) Environmental DNA reveals non-migratory individuals of *Palaemon paucidens* overwintering in Lake Biwa shallow waters.
- 27) H. MIZUMOTO, H. URABE, T. KANBE, M. FUKUSHIMA, and H. ARAKI: *Limnology*, 19(2), 219–227. (2018), Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid.
- 28) *T. TAKAHARA, *T. IKEBUCHI, H. DOI and T. MINAMOTO: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 221, 15–20 (2019), Using environmental DNA to estimate the seasonal distribution and habitat preferences of a Japanese basket clam in Lake Shinji, Japan. (*Both authors equally contributed.)
- 29) *N. IWAI, *K. YASUMIBA and *T. TAKAHARA: *Royal Society Open Science*, 6, 181798 (2019), Efficacy of environmental DNA to detect and quantify stream tadpoles of *Odorrana splendida*. (*All authors equally contributed.)
- 30) H. DOI, K. FUKAYA, S. OKA, K. SATO, M. KONDOH, and M. MIYA *Scientific Reports* 9:3581(2019) Evaluation of detection probabilities at the water-filtering and initial PCR steps in environmental DNA metabarcoding using a multispecies site occupancy model.
- 31) K. FUJII, H. DOI, S. MATSUOKA, M. NAGANO, H. SATO, and H. YAMANAKA *PLOS ONE* 14: e0210357 (2019) Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods.

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) T. MINAMOTO: International Symposium of Probiotics Application on Aquaculture, Kaohsiung, Taiwan (2016)
“Application of environmental DNA analysis to ecological surveys”
- 2) T. MINAMOTO, S. HIDAKA, K. KATSUHARA, S. TOMITA, S. YAMAMOTO, A. USHIMARU: 2016 ESA Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA (2016)
“Estimating the distribution of the Japanese giant salamander (*Andrias japonicus*) by ecological niche modeling based on environmental DNA detection”
- 3) H. DOI, R. INUI, K. UCHII, Y. AKAMATSU, K. KANNNO, S. MATSUHASHI, T. TAKAHARA, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO: 2016 ESA Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA (2016)
“Environmental DNA method for estimating fish abundance and biomass”
- 4) 荒木仁志:平成 28 年度日本進化学会年会(2016、東京)
「環境DNAを用いた生物フロンティアの開拓」
- 5) 本郷真理、加納光樹、苅部甚一、平山拓弥、山中裕樹:日本陸水学会第81回大会、那覇(2016)
「環境DNA分析を用いた小規模河川へのアメリカナマズの侵入モニタリング」
- 6) 辻冨月、寺村伊織、中井量暉、本澤大生、山中裕樹:日本陸水学会第81回大会、那覇(2016)
「近縁種を判別する: Multiplex PCRによる日本産メダカ属2種の同時検出」
- 7) 十河勇樹、土居秀幸、山中裕樹:日本陸水学会第81回大会、那覇(2016)
「環境DNA分析におけるデジタルPCRの定量精度とPCR阻害耐性について」
- 8) 内井喜美子、土居秀幸、源利文、山中裕樹:日本陸水学会第81回大会(2016)
「環境DNA研究におけるSNPマーカーの活用」
- 9) 坂田雅之、山本哲史、宮正樹、源利文:日本陸水学会第 81 回大会(2016)

- 「堆積物中の環境DNAを用いた魚類DNAのメタバーコーディング」
- 10) 源利文: 日本陸水学会第 81 回大会 (2016)
「環境DNA分析の現状と課題」
 - 11) 本澤大生、山中裕樹: 日本哺乳類学会2016年度大会、筑波(2016)
「環境DNA分析を用いた特定外来生物ヌートリアの検出」
 - 12) 荒木仁志: 平成 28 年度第二回千歳管内事務所業務打合せ会議(2016、千歳)
「環境DNA技術を用いた水圏生物分布と生態の解明」
 - 13) HITOSHI ARAKI: Japan-Taiwan Ecology workshop (2016、Kyoto)
“Environmental DNA analysis for identifying multiple species: A scoop of water for biodiversity?”
 - 14) 荒木仁志: 平成 28 年度魚類系統学研究会(2016、苫小牧)
「フィールドリサーチツールとしての環境DNA: 現状と課題」
 - 15) 荒木仁志: 第 15 回北海道海洋生物科学研究会(2017、札幌)
「見えない生物多様性を見る: 環境DNA技術の可能性」
 - 16) 荒木仁志: 第 36 回時計台サロン(2017、札幌)
「小さくても力持ちなDNAの話」
 - 17) 本多託也: 平成 28 年度日本生態学会・北海道地区大会(2017、札幌)
「自然河川における環境DNAメソッドを用いたサケ科魚類および冷水病細菌 *Flavobacterium psychrophilum* の生態学的研究」
 - 18) 池山昭太: 石狩川流域 湿地・水辺・海岸ネットワーク設立記念フォーラム(2017、札幌)
「環境DNAを用いた石狩川流域の生物多様性評価(計画)」
 - 19) W. MAKINO, Y. MATSUKI, Y. SUYAMA, J. URABE: ASLO Aquatic Sciences Meeting, Honolulu, USA, 2017.
“Applying multiplexed inter-simple sequence repeat genotyping by sequencing to a small-sized freshwater zooplankter *Diaphanosoma* in Japan.”
 - 20) HIROKI MIZUMOTO: 平成 28 年度日本生態学会年会(2017、東京)
“Can we detect distribution and quantify biomass of Itou (*Parahucho perryi*) by using eDNA?”
 - 21) HITOSHI ARAKI: 平成 28 年度日本生態学会年会(2017、東京)
“Environmental DNA as an ecological tool for salmonid fish distribution”
 - 22) 源利文: 第64回日本生態学会大会 (2017)
「環境DNA分析を用いた生物多様性調査法の進展と応用可能性」
 - 23) 鵜俣信、石川俊之、辻冨月、山中裕樹、高見泰興、源利文: 第64回日本生態学会大会 (2017)
「eDNA分析で明らかになった琵琶湖産スジエビの時空間的分布」
 - 24) 中尾遼平、山本哲史、宮正樹、源利文: 第64回日本生態学会大会 (2017)
「環境DNAメタバーコーディングによる魚類相の把握 -六甲山系の小河川群における事例- 」
 - 25) FUJIWARA, K. UCHIDA, H. SATO, N. HAYASHI, T. MINAMOTO, T.: 第64回日本生態学会大会 (2017)
“A large scale study of aquatic plants according to eDNA analysis”
 - 26) 牧野渡、丸岡奈津美、中川恵、高村典子: 第 64 回日本生態学会大会(2017)
「DNAバーコードを用いた日本淡水産動物プランクトンの種判別」
 - 27) 山中裕樹、佐藤博俊、本郷真理、芝田直樹、渡邊和希、與座梨里子、十河勇樹、櫻井翔、垣見直希 : 第64回日本生態学会、東京(2017)
「環境DNAメタバーコーディングによる琵琶湖沿岸魚類相の分析」
 - 28) 辻冨月、宮正樹、潮雅之、佐藤行人、山本哲史、源利文、山中裕樹: 第64回日本生態学会、東京(2017)
「環境DNAを用いた種内変異の評価: NGS解析に由来する偽ハプロタイプを除去する新手法」
 - 29) 垣見直希、山中裕樹 : 第64回日本生態学会、東京(2017)
「環境水からの魚類由来RNAの回収抽出手法」
 - 30) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文: 第64回日本生態学会 (2017)
「核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による交雑個体群の遺伝構造解析」

- 31) 松岡俊将、佐藤博俊、土居秀幸:第64回日本生態学会 (2017)
「菌類メタバーコーディングによる河川水中の菌類相評価」
- 32) 土居秀幸、永野真理子、CHANG, KWANG-HYEON、高原輝彦、牧野渡、松岡俊将:第64回日本生態学会 (2017)
「環境DNA分析によるプランクトン群集の解析」
- 32) 水本寛基, 荒木仁志: 第1回環境DNA学会大会, 東京 (2018)
「環境DNA技術を用いた絶滅危惧種イトウの分布域・生物量の全道推定」
- 33) 荒木仁志, 水本寛基, 神戸崇, 鎌田頌子, 南波聡子: 第1回環境DNA学会大会, 東京 (2018)
「環境DNAを用いた北海道河川魚類相の解明と展望」
- 34) 水本寛基: 応用生態工学会金沢, 金沢 (2018)
- 35) 荒木仁志: 環境アセスメント協会技術セミナー, 札幌 (2018)
「環境DNAを用いた魚類分布・資源量推定の実例紹介」
- 36) H. MIZUMOTO and H. ARAKI: The 43rd Annual meeting of the Western Division American Fisheries Society, Anchorage AK, USA (2018)
“Estimating the seasonal migration of Sakhalin taimen using environmental DNA”
- 37) 荒木仁志, 神戸崇, 水本寛基, 鎌田頌子, 佐藤俊平:水産学会特別シンポジウム, 東京(2018)
「環境DNAによるサケの資源・生態研究」
- 38) 水本寛基, 荒木仁志, 宮正樹: 第65回日本生態学会大会, 札幌 (2018)
「環境DNA技術を用いたイトウの季節回遊行動の推定」
- 39) H. ARAKI: International symposium “Promotion of global network studies on seagrass ecosystem based on innovative new technology”, Tokyo (2018)
“Environmental DNA as a monitoring tool for aquatic biodiversity”
- 40) 中尾遼平、山本哲史、宮正樹、源利文: 第65回日本生態学会大会 (2018) 「環境DNAメタバーコーディングによる六甲山周辺地域の魚類相の解明」
- 41) 山中裕樹:第65回日本生態学会、札幌(2018)「近年の環境DNA分析の進展と応用可能性」
- 42) H. YAMANAKA: 6th Taiwan-japan Ecology Workshop, Tainan (2018)
“Environmental DNA analysis for ecology and conservation”
- 43) 芝田直樹、佐藤博俊、山本大輔、山本敏哉、櫻井翔、山中裕樹:2018年度日本魚類学会、函館 (2018)
「環境DNAメタバーコーディング法を用いた1年間の調査から得た矢作川の魚類群集構造の季節変化」
- 44) 坂田雅之、内田圭、佐藤博俊、山中裕樹、中尾遼平、源利文: 第65回日本生態学会大会 (2018)
「環境DNA分析を用いたため池の生物多様性を規定する要因の解明 ―トンボ類および魚類を用いた事例―」
- 45) K. UCHII, H. DOI, T. MINAMOTO, H. YAMANAKA: 2018 ESA Annual Meeting (2018)
“The use of SNP markers in environmental DNA to detect intraspecific genetic variation”
- 46) 中尾遼平、山本哲史、宮正樹、源利文: 第1回環境DNA学会東京大会 (2018)
「環境DNAメタバーコーディングによって明らかになった六甲山周辺地域の淡水魚類相」
- 47) 坂田雅之、内田圭、佐藤博俊、山中裕樹、中尾遼平、源利文: 第1回環境DNA学会東京大会 (2018)
「トンボ目を対象とした環境DNAメタバーコーディング検出系の開発」
- 48) 河田萌音、倉林敦、N. Ramamonjisoa、夏原由博、山中裕樹、源利文: 第1回環境DNA学会東京大会 (2018)
「16SrRNAメタバーコーディングを用いた両生類の環境DNA検出」
- 49) 坂田雅之、源利文: 日本陸水学会第83回大会 (2018)
「堆積物由来環境DNA抽出法の改善と過去復元への展望」
- 50) H. ARAKI, H. MIZUMOTO, T. KANBE and S. SATO: The 2nd NPAFC-IYS Workshop on Salmon Ocean Ecology in

a Changing Climate, Portland OR, USA(2019).

“Evaluation of an environmental DNA method as a potential tool for monitoring salmonid fishes in the wild”

- 51) 井上碧、中尾遼平、源利文、篠原忠: 第66回日本生態学会大会 (2019)
「水生コウチュウ目の環境DNAメタバーコーディング手法の確立」
- 52) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文: 第66回日本生態学会大会 (2019)
「SNPマーカーを用いた環境DNA分析による遺伝変異の検出」
- 53) 坂田雅之、源利文: 第66回日本生態学会大会 (2019)
「堆積物からの環境DNA抽出法の効率化」
- 54) 河田萌音、倉林淳、N. RAMAMONJISOA、夏原由博、山中裕樹、佐藤博俊、坂田雅之、源利文: 第66回日本生態学会大会 (2019)
「メタバーコーディング解析を用いた両生類の環境DNA検出」
- 55) 中尾遼平、平岩将良、山本哲史、宮正樹、源利文: 第66回日本生態学会大会 (2019)
「環境DNAから読み解く六甲山周辺の土地利用と淡水魚類相の関係性」
- 56) 宮正樹: 第 66 回生態学会大会シンポジウム「環境 DNA 研究のフロンティア:生態学と分子生物学からのアプローチ」(2019)
「多地点・高頻度環境 DNA 観測に基づく魚類多様性モニタリングでわかったこと」
- 57) 土居秀幸: 第 66 回生態学会大会シンポジウム「環境 DNA 研究のフロンティア:生態学と分子生物学からのアプローチ」(2019)「環境 DNA による陸水生態系の生物種構成と遺伝的多様性の解析」
- 58) 源利文: 第 66 回生態学会大会シンポジウム「環境 DNA 研究のフロンティア:生態学と分子生物学からのアプローチ」(2019)「種特異的な環境 DNA 分析を用いたマクロ生物の検出と定量への試み」

7. 研究者略歴

研究代表者

土居 秀幸

東北大学大学院生命科学研究所修了、博士(生命科学)、現在兵庫県立大学シミュレーション学研究所准教授

研究分担者

2) 山中 裕樹

京都大学大学院理学研究科修了、博士(理学)、現在龍谷大学理工学部講師

3) 宮 正樹

東京大学大学院農学系研究科博士課程修了、農学博士、現在千葉県立中央博物館生態・環境研究部部長

4) 牧野 渡

北海道大学大学院水産学研究科修了、博士(水産学)、現在東北大学大学院生命科学研究所助教

5) 源 利文

京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了、博士(理学)、現在神戸大学大学院人間発達環境学研究科准教授

6) 丑丸敦史

京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了、博士(理学)、現在神戸大学大学院人間発達環境学研究科 教授

7) 高見泰興

東京都立大学大学院理学研究科生物学専攻博士課程修了、博士(理学)、現在神戸大学大学院人間発達環境学研究科 准教授

8) 佐藤拓哉

三重大学 大学院生物資源学研究科博士後期課程修了、博士(学術)、現在神戸大学大学院理学研究科 准教授

9) 高原 輝彦

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科博士後期課程修了、博士(学術)、現在島根大学生物資源科学部助教

10) 舞木 昭彦

北海道大学水産科学院海洋生物資源科学専攻博士課程修了、博士(水産科学)、現在島根大学生物資源科学部准教授

11) 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

12) 内井 喜美子

京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了、博士(理学)、現在、大阪大谷大学薬学部助教

II. 成果の詳細

II-1 湖沼・ため池における環境DNAによる生物多様性推定手法・指標の開発

公立大学法人兵庫県立大学

大学院シミュレーション学研究科

准教授・土居秀幸

平成 28～30年度累計予算額：25,929千円

(うち平成28年度：8,182千円、平成29年度：9,101千円、平成30年度：8,646千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本サブテーマでは、環境DNAを用いて、湖沼、河川などの陸水生態系における生物の種組成を推定するとともに、外来種や希少種を早期発見するメタバーコーディングの手法を確立する。特に陸水域生態系に生息する魚類、動物プランクトン群集を対象とし、さらに、周辺の森林も含めた真菌類（キノコ類）といった多様な生物種の分布や動態を、1リットルの水を汲むだけで把握する革新的技術を開発する。この目的のために以下の4つの研究に取り組んだ。1) 全国18湖沼での採水、魚類メタバーコーディング、2) 中四国・九州地方5つの河川での、魚類メタバーコーディングと採捕との比較、3) 森林河川での真菌類の環境DNAメタバーコーディング、4) ため池などでの動物プランクトンのメタバーコーディングであった。全国の湖沼での実験から、東洋紡のKOD FX NEO PCR mixという土壌成分などからのPCR阻害に強いものを用いてメタバーコーディングするのが良いことがわかった。湖沼の魚類群集の種数を解析したところ10-30種程度の種数が得られた。魚類のこれまでの採捕情報や図鑑の情報などと照らし合わせても妥当な種数であると考えられた。5つの河川で調査した結果、合計で53種類が、環境DNAメタバーコーディングから検出された。一方で従来の潜水目視・採捕調査による検出(合計)は、38種類であった。結果より、すべての調査の河川、また河川流程において、環境DNAメタバーコーディングにより得られた魚類種数は、従来の調査を上回ることがわかり、河川での魚類群集調査における環境DNAメタバーコーディングの有用性が確かめられた。また生物多様性を把握する上で、より多くの種類を検出できる環境DNA手法の優位性が明らかとなった。本研究によって、河川水中の環境DNAは分類学的にも機能的にも多様な菌類DNAを含んでおり、DNAメタバーコーディングによってこうした多様な菌類のDNAを検出可能であること、さらに環境DNAメタバーコーディングは、水中にとどまらず陸域を含む包括的な菌類多様性調査やモニタリングを行う上で有用であることが示された。環境DNAによるプランクトン相の解明は、上記に挙げたCOIプライマーを用いることで科レベルの分類であれば把握できることがわかった。しかしながら実際にプランクトン調査で環境DNA手法が使えるようになるためには、精度の向上が求められるだろうと考えられる。解明すべき点としては、得られたプランクトンの環境DNAを同定できるようになることと、プランクトンの環境DNAを採集できるようになることが重要であることがわかった。

[キーワード]

環境DNA、生物多様性、全国調査、河川、魚類、真菌、動物プランクトン

1. はじめに

陸水域の生物群集保全の実現には、個体数や生物量といった生物分布の詳細かつ広域的把握が必要である (Dudgeon et al. 2006)、従来の野外調査では、これらの情報を収集するため、目視で数える、捕獲採集を行うなど、多大な労力と時間をかけてきた。このため、最新のDNA解析技術を利用し、環境水をすくうだけで広域調査が可能な「環境DNA」を用いた手法が、画期的な野生生物調査法として世界的に注目されつつある。これまでの種特異的な手法に加え、次世代シーケンサと呼ばれるDNA解析装置を用いることで、環境水に含まれる全魚種のDNAを同時並行的に解析するメタバーコーディングの手法も開発された (Miya et al. 2015)。これにより、わずか1リットルの水を汲むだけで、何十、何百という魚の種組成を明らかにできるようになった。

本サブテーマでは、環境DNAを用いて、湖沼、河川などの陸水生態系における生物の種組成を推定するとともに、外来種や希少種を早期発見するメタバーコーディングの手法を確立する。特に陸水域生態系に生息する魚類、動物プランクトン群集を対象とし、さらに、周辺の森林も含めた真菌類 (キノコ類) といった多様な生物種の分布や動態を、1リットルの水を汲むだけで把握する革新的技術を開発する。

環境DNA分析を生物のモニタリングに用いる利点は、生物の形態学的な種同定が必要ないことや、メタバーコーディング法により1検体の水試料だけで多種を検出できる点にある。これまでの分類同定には、顕微鏡による形態的判別が一般的である。菌類は生態系において有機物の分解や動植物への寄生・共生を通じて、水域・陸域生態系の物質循環をはじめとする生態系機能の駆動者の一端を担う生物グループである。特に近年、菌類の多様性(種数や種組成)と様々な生態系機能の間に関連が見出されてきており、菌類多様性及びその環境変動応答に関する知見は、生態系機能の環境変動応答を予測する上でも不可欠な要素の一つである。これまで、菌類は場所や時間に応じて種数や種組成が変化することが知られている。しかし、菌類は局所的な環境においても生息場所(例えば土壌、水中、植物体など)が多様である。さらに一つの生息場所に着目した場合でも菌類多様性の空間的・時間的な異質性は非常に高い。そのため、従来の個々の菌体の分離培養を必要とする多様性解析手法では、広域的あるいは長期的な菌類の多様性調査やモニタリングには膨大な時間的・金銭的なコストが必要である。特にこれらの生物種群について、この環境DNA技術により、外来種・希少種を含めた生物群集の簡便かつ迅速な生物分布モニタリングが可能となることは非常に意義があると考えられる。

2. 研究開発目的

本サブテーマの目的は、1リットルの水を採水するだけで、ある水域の魚類、真菌類、動物プランクトンの種組成を明らかにする革新的な解析技術を確立することである。そのために、4つの研究に取り組んだ。

1) 全国18湖沼での採水、魚類メタバーコーディング、2) 中四国・九州地方5つの河川での、魚類メタバーコーディングと採捕との比較、3) 森林河川での真菌類の環境DNAメタバーコーディング、4) ため池などでの動物プランクトンのメタバーコーディングである。

全国湖沼

全国の湖沼で環境DNAを採取し、それから魚類群集を対象として、MiFishによるメタバーコーディングを行う。全国の湖沼で実験を行うことで、全国の魚類群集の把握が可能であるかをテストする。また、全国で調査を展開することで、データベースについて確認し、データベースに掲載が必要な種類を抽出することを目的とした。

5つの河川での調査

多くの河川で環境DNAを採取し、それから魚類群集を対象として、MiFishによるメタバーコーディングを行う。さらに、環境DNA採取と同時に従来の調査手法である、潜水目視と採捕調査を行うことで、メタバーコーディングと従来の調査両手法によって把握できる魚類群集の比較を行う。そのことで、河川、しかも各流域（上中下流）において、環境DNAメタバーコーディングも有意性を確かめる。

真菌類

河川水には、降雨や降下により直接的あるいは表層流を通じて間接的に、集水域で生育する陸生菌類の組織や散布体が加入している。そのため河川水中の環境DNAを対象としてDNAメタバーコーディングを行うことで、水生の菌類のみならず、陸生を含めた菌類相調査が調査可能であると考えられる。そこで本研究では、以下の2項目を評価することを目的とした。(1)DNAメタバーコーディングによって河川水中の菌類DNAを検出可能か、可能な場合どのような分類群・機能群が含まれるのか。(2)河川水環境DNAを対象とした菌類DNAメタバーコーディングによって菌類相の空間・時間構造が評価可能かを検討する。

動物プランクトン

プランクトン相を明らかにするための環境DNA手法を確立するために、①プランクトンネットを用いた現在の手法との比較と、②環境DNA手法におけるサンプリング手法と解析手法の検討を行った。プランクトンのDNAは、既存のプライマーのうちどれがもっとも精度良くプランクトンを把握できるかについて調べた。また環境DNAで得られたDNAが、同定されていない可能性について注目して、データベース間の影響を調べた。さらにプランクトン相の把握のために、現地でのようなサンプリングがもっとも適しているかを調べるために、手法を変えてプランクトンを採集した。以上を検証することによって、プランクトン相を把握するための、精度の高い環境DNA手法の確立を目指した。

3. 研究開発方法

・全国湖沼

全国の18湖沼を対象に各湖沼において、周囲の6地点の表層水(1リットル)の採水を行った(図1-1)。なお、これらの採水調査については(株)パシフィックコンサルタンツにより行われた。試料水は冷蔵で輸送し、GF/Fガラスフィルター(GE HealthCare)に1リットルをろ過した後、Uchii et al. (2016)により、ろ紙からサリベットとDNA抽出キット(QIAGEN、DNeasy Blood & Tissue kit)を用いて全DNAを抽出した。MiFish-Uプライマーを用いて各試料を繰り返し数8のPCRに供し、サンプルを識別するためのindexタグを付加してライブラリーを作成した。以降、サブテーマ3より提案された方法、およびMiya et al. (2015)のプロトコールに従って次世代シーケンサー(MiSeq、Illumina)によるシーケンシング、得られたシーケンスデータの処理、BLAST検索による種同定を行った。自動分子同定ソフトウェアClaidentによって、配列の相同性は98.5%でOUT(操作的分類群)にまとめた。同定用のデータベースとしては、サブテーマ3から提供されたカスタムデータベースの遺伝子配列を用いた。

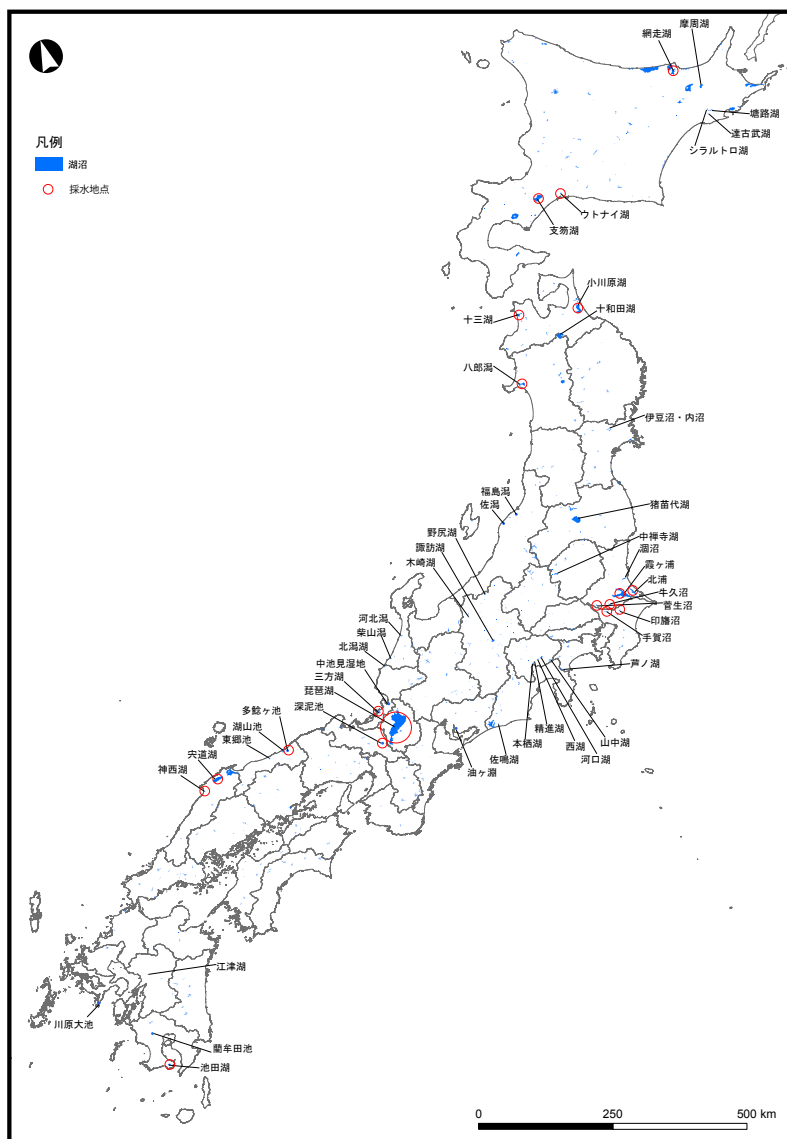


図 (1) - 1 全国湖沼の地図 赤丸が採水湖沼

・ 5 河川での調査

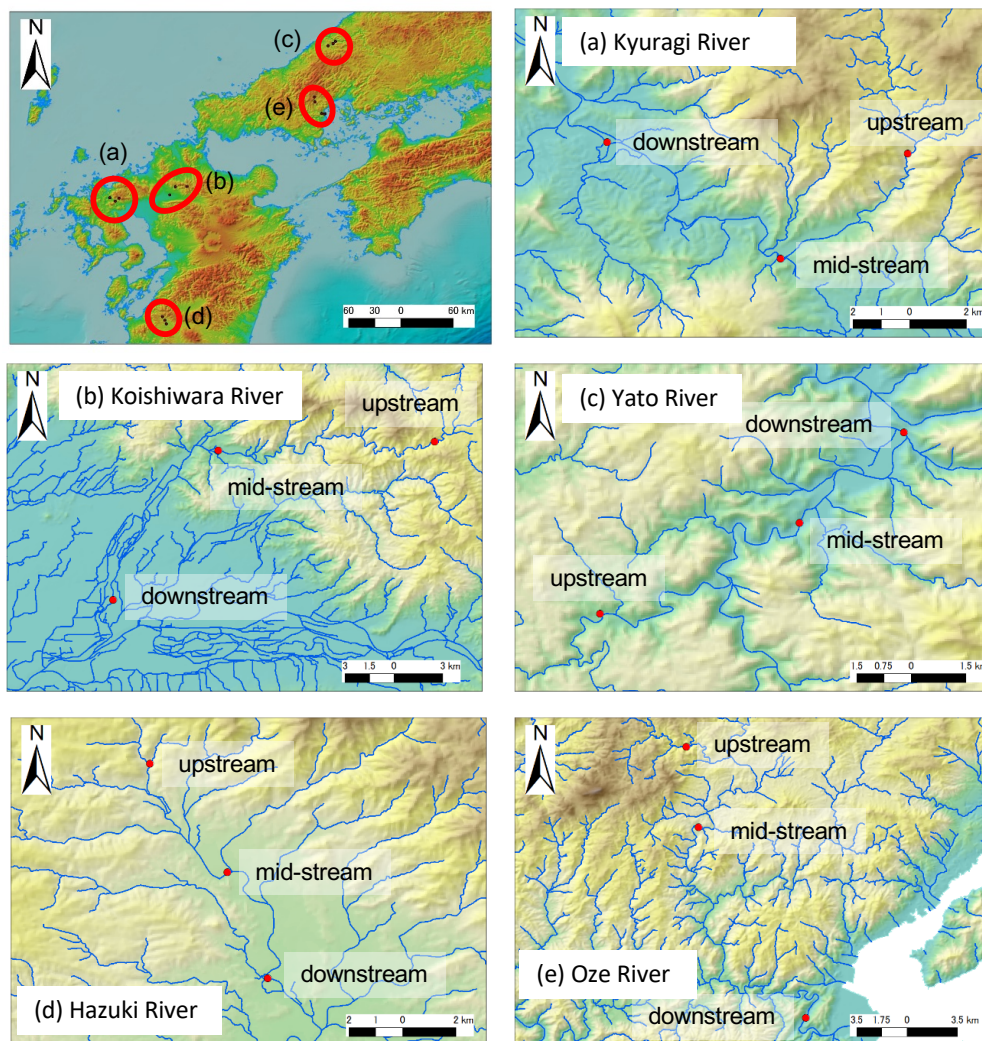
中国・四国地方の 5 河川、上中下流の 3 地点、合計 15 地点を対象に調査を行なった(図1-2)。最初に、各地点の流心 1 箇所と岸際 1 箇所の 2 箇所に置いて、表層水(1リットル)の採水を行った。

採水後には、採水地点上流 1 0 0 m 区間において、1 名 (山口大学工学部・乾隆帝氏) により潜水目視調査とタモ網による採捕調査を網羅的に行い、採捕魚種を記録した。

試料水は冷蔵で持ち帰り、GF/F ガラスフィルター (GE HealthCare) に 1 リットルをろ過した後、Uchii et al. (2016) により、ろ紙からサリベットと DNA 抽出キット (QIAGEN、DNeasy Blood & Tissue kit) を用いて全 DNA を抽出した。なお、これらの採水、採捕調査については、山口大学工学部赤松研究室により行われた。

抽出した DNA は、MiFish-U プライマーを用いて各試料を繰り返し数 8 の PCR に供し、サンプルを識別するための index タグを付加してライブラリーを作成した。以降、サブテーマ 3 より提案された方法、および Miya et al. (2015) のプロトコールに従って次世代シーケンサー (MiSeq、Illumina) によるシーケンシング、得られたシーケンスデータの処理、BLAST 検索による種同定を行った。

自動分子同定ソフトウェア Claident によって、配列の相同性は 98.5% で OUT (操作的分類群) にまとめた。同定用のデータベースとしては、サブテーマ 3 から提供されたカスタムデータベースの遺伝子配列を用いた。

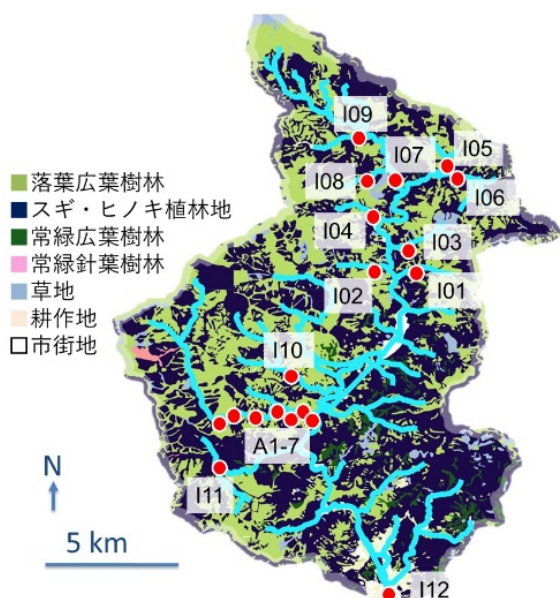


図（1）-2 5河川調査地点の地図

・真菌類

(実験1) 兵庫県 の揖保川上流域の河川において、河川水中の菌類相の空間構造を調査

菌類相は周囲の環境や移動分散の履歴を反映し、場所によって異なることが知られている。特に数十キロメートル以上の空間スケールでは、しばしば緯度経度に伴って菌類相が変化するという地理構造が報告される。環境DNAを解析することで、こうした菌類相の空間構造を検出できるのかを調べるために調査を行った。調査は環境兵庫県の揖保川上流域において行った。約20キロメートルの範囲で複数の支流にまたがるように19地点の表層水(1リットル)の採水を行った(図1-3)。水はガラスフィルターにろ過した後、ろ紙からキット(QIAGEN、DNeasy Blood & Tissue kit)を用いて全DNAを抽出した。各サンプルについて、rDNAのITS領域を対象とした菌類特異的プライマーを用いたPCR増幅を行い、MiSeqによる配列解析を行った。得られた配列について、97%以上の相同性を持つ配列同士をまとめて操作的分類群(OTU)を作成することで、多様性の評価を行った。各OTUはデータベースを用いて属する分類群と機能群の推定を行った。



図(1)-3 採水地点と集水域の植生・土地利用

(実験2)復元型ビオトープにおいて、河川水中の菌類相の時間変化を調査

菌類は植物遺体(落葉など)の分解や他の生物に寄生あるいは共生して生活するため、植物遺体の加入や他の生物のフェノロジーに合わせて出現する菌類も時間的に変化することが知られる。こうした菌類相の時間変化について、環境DNAを解析することでモニタリングできるのかを調べるために調査を行った。京都市にある復元型ビオトープ(約0.6ヘクタール、コナラを中心とする森林)において、河川水の時系列サンプリングを行った。サンプリングは2016年の12月から2018年の5月まで月に1度、ビオトープ内に流れる河川の表層水を3か所で1リットルずつ採水することで行った(図1-4)。水はガラスフィルターにろ過した後、ろ紙からキット(QIAGEN、DNeasy PowerSoil Kit)を用いて全DNAを抽出した。各サンプルについて、rDNAのITS領域を対象とした菌類特異的プライマーを用いたPCR増幅を行い、MiSeqによる配列解析を行った。得られた配列について、97%以上の相同性を持つ配列同士をまとめてOTUを作成することで、多様性の評価を行った。各OTUはデータベースを用いて属する分類群と機能群の推定を行った。また、リファレンスにするため、採水時にビオトープ内の菌類子実体(きのこ)の採集も併せて行った。



図(1)-4 ビオトープ内の採水地点(左、10メートルメッシュ)と採水地点の様子(右)。

動物プランクトン

①サンプリング手法間の比較

プランクトンのサンプリングは、東広島にあるため池のうち9池を対象として、2012年5月と6月に行っ

た。形態分類による同定のために、プランクトンネットを用いて、1m鉛直引きした。形態分類には、顕微鏡で種同定を行った。同時に個体数を計数した（個体／1L）。一方、環境DNA分析のために、表層水を1L採水したものを、ろ紙（限外ろ過、メンブレンフィルター、3.0μm、φ142mm、Advantec）を用いてろ過し、DNA抽出（DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen）を行った。その後COI領域の塩基配列についてプライマー（動物ミトコンドリアCOI領域対象、313シーケンシングmICOIintF-MiSeqF 5'-

GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC-3'、jgHCO2198-MiSeqR 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA-3'）を用い、超並列シーケンサーで（Illumina MiSeq）解析した。フィルタリングによりPCRキメラやノイズ配列を除去した。その結果得られた629,359リード、1,107 OTU（操作的分類群）を以降の解析に用いた。ため池の平均リード数は21,826だった。

自動分子同定ソフトウェアClaidentによって、配列の相同性は97%でOUT（操作的分類群）にまとめた。同定用のデータベースとしてNCBIに登録されている全生物のCOI遺伝子配列を用いた。本研究では1107個のOTUが得られた。このうち総リード数が11以下の558 OTU（3,008リード）は解析から除外し、残りの549 OTU（626,351リード）を解析に用いた。

②環境DNA手法におけるサンプリング手法と解析手法

プライマー間の比較

サンプリングは、2017年5月に琵琶湖唯一の流出河川の瀬田川と湖の西側2地点（堅田、近江舞子）において、表層水を1L採水した。各サンプリング地点の湖水と、クーラーブランクとろ過ブランクである蒸留水を、ろ紙（GF/F、0.7μm、φ47mm、Whatman）を用いてろ過した。DNA抽出はキット（DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen）を用いて行い直ちに冷凍した。DNAのメタバーコーディングは超並列シーケンサー（Illumina MiSeq）を用いた。プライマーは領域の異なるものを含む既存の6種類を使用した（COI、16S rDNA、18S rDNAは4領域でV4、V5、V9_1、V9_2）。自動分子同定ソフトウェアClaidentによって、配列の相同性は99%でOTUにまとめた。同定用のデータベースとしてNCBIに登録される全生物の各領域の遺伝子配列を用いた。

データベース間の比較

サンプルは、東広島におけるため池と琵琶湖（上記）で得られたデータを用いた。同定方法は、得られたOTUについて、NCBIとローカルデータベースに対してBLAST検索を行い、97%以上の塩基配列相同性をもつものを採用した。そのうちプランクトン（ミジンコ目、ケンミジンコ目、カラヌス目、ワムシ）に該当するOTUを数えた。種名、または「種名 sp.」の名前がついたOTUを、1種として同定できたとみなした。ローカルデータベースは、合計678配列の日本産淡水プランクトンが対象で、配列数の内訳はそれぞれミジンコ目で191、ケンミジンコ目で30、カラヌス目で275、ワムシ門で179あるものを用いた。

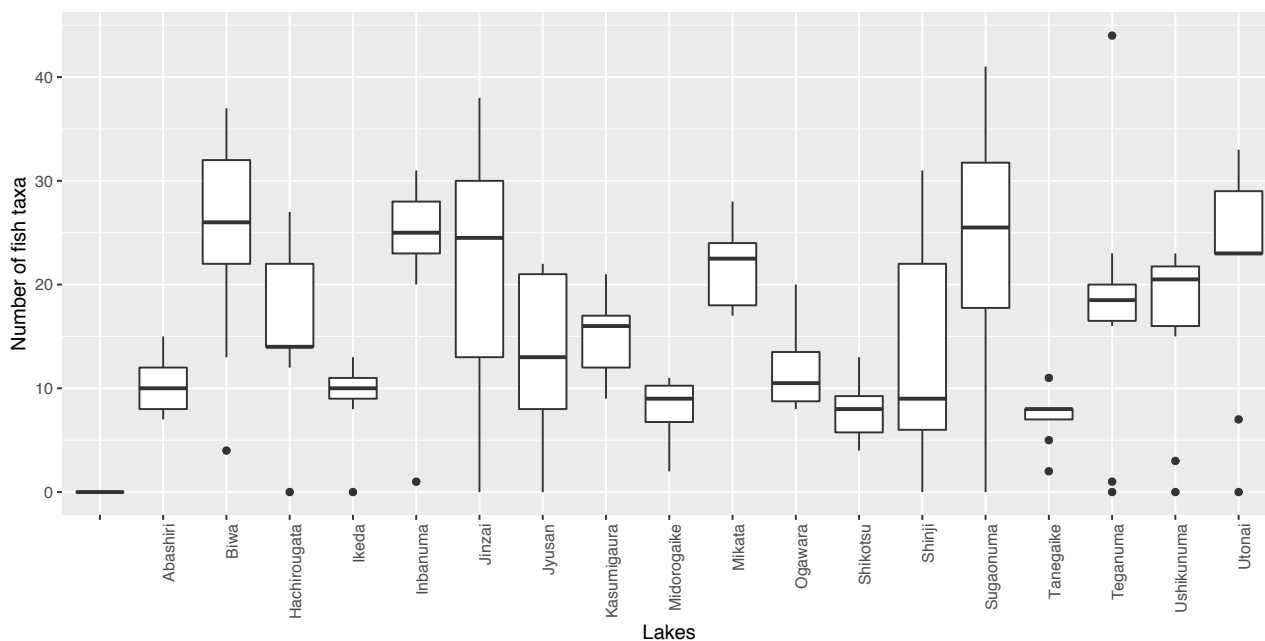
4. 結果及び考察

全国湖沼

全国の湖沼で環境DNAを採取しそこからPCRを行う段階で、多くのサンプルでPCR増幅が得られないことがわかった。そのためこれまで環境DNAメタバーコーディングで主に用いられていたKAPPA HIFI PCR mixから東洋紡のKOD FX NEO PCR mixという土壌成分などからのPCR阻害に強いものに変更した。その結果多くの場所で結果が改善され、ウトナイ湖の一部などを除いてメタバーコーディングが可能となった。この結果から、多くの陸水環境では東洋紡のKOD FX NEO PCR mixを用いることを勧める。

さらに、魚類群集の種数を解析したところ10-30種程度の種数が得られた（図1-5）。魚類のこれま

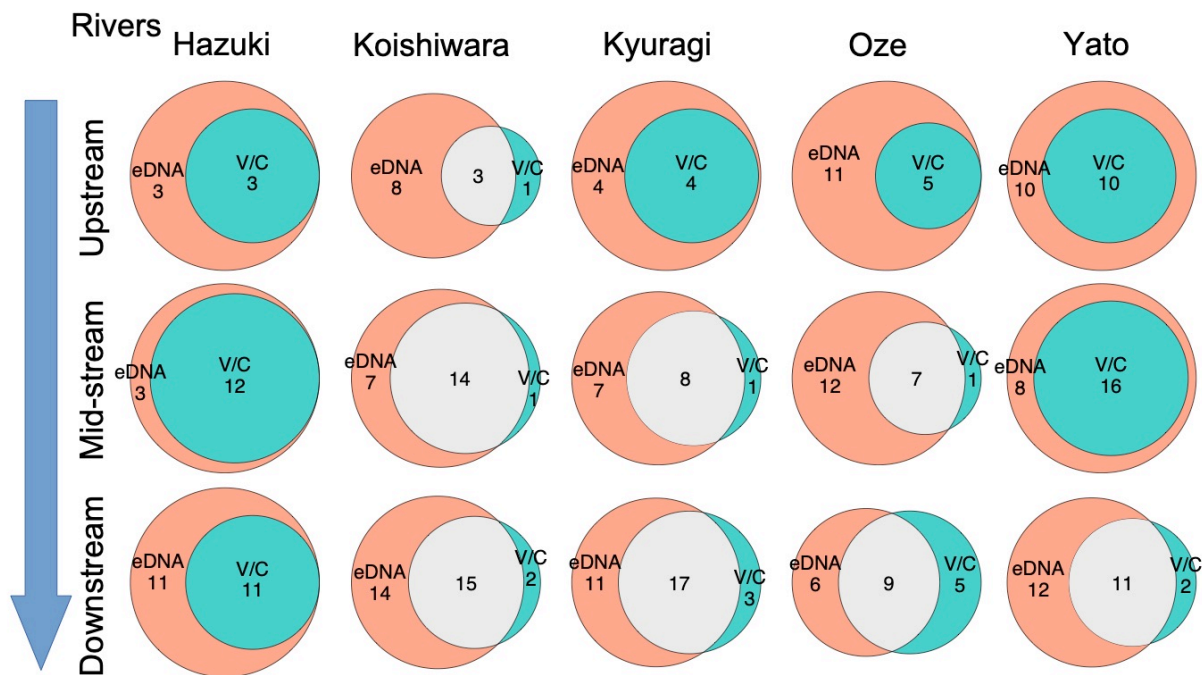
での採捕情報や図鑑の情報などと照らし合わせても妥当な種数であると考えられた。また地域性や湖沼の緯度などにより種数が影響を受けることが考えられたが、一般化線形混合モデルの結果、緯度や地域性と種数の関係は得られなかった。よって、MiFishの対象領域のデータベースについては、全国について網羅できていると考えられた。またさらに今後の全国での湖沼魚類群集の研究に、これらのメタバーコーディングからの種数や種組成の結果が貢献できると考えられる。



図（1）-5 全国湖沼の種数についてのボックスプロット。点は飛び離れ点を示す。

5つの河川での調査

5つの河川で調査した結果、合計で53種類が、環境DNAメタバーコーディングから検出された。一方で従来の潜水目視・採捕調査による検出（合計）は、38種類であった。調査結果を、環境DNAメタバーコーディングと従来の調査の両手法によって把握できる魚類群集の比較を行った（図1-6）。その結果、すべての河川においてすべての流程（上中下流）で環境DNAメタバーコーディングにより得られた種数は、従来の調査を上回っていた。この結果は、種数を目的変数とした一般化線形混合モデルにより、説明変数である調査手法の違いは有意であった（一般化線形混合モデル、 $t = -5.45$, $P = 0.000018$ ）。この結果より、多くの河川、また河川流程において、環境DNAメタバーコーディングにより得られた魚類種数は、従来の調査を上回ることがわかり、河川での魚類群集調査における環境DNAメタバーコーディングの有用性が確かめられた。また生物多様性を把握する上で、より多くの種類を検出できる環境DNA手法の優位性が明らかとなった。



図（1）-6 5つの河川における、環境DNAメタバーコーディングと従来の潜水目視・採捕調査での検出種数のベン図による比較。eDNAが環境DNAメタバーコーディング、V/Cが従来の潜水目視・採捕調査での検出種数を示す。灰色部分は共通して出た種数を示す。

真菌類

(結果1) 合計で696の菌類OTU(サンプル当たり平均126 OTU)が得られた。これらのOTUは子囊菌類(281 OTU)、担子菌類(37 OTU)、ツボカビ類(10 OTU)を中心として構成されていた(図1-7)。全696 OTUのうち、120 OTUの機能群が推定され、植物や微生物の寄生菌類(62 OTU)と有機物分解を行う腐生菌(42 OTU)を主として、植物の共生菌類や動物の寄生菌などが検出された。また、120 OTUのうち、24 OTUが主に水中で生活を営む水生菌(例えば*Tetracladium marchalianum*)で、残りの96 OTUは主に陸域で生活を営む陸生菌だと推定された。菌類相の空間構造を調査したところ、まず同一の支流内では異なる支流間よりも組成が似ていること、支流間で比べた場合、空間的に近い支流間ほど菌類相が似ており、そして調査地に渡って地理構造を持つことが明らかになった(図1-8)。この菌類相の空間的な類似性に影響する要因を解析したところ、場所間での環境(集水域の植生や土地利用)の類似性ではなく、空間的な距離の近さの影響のみが検出された(表1-1)。

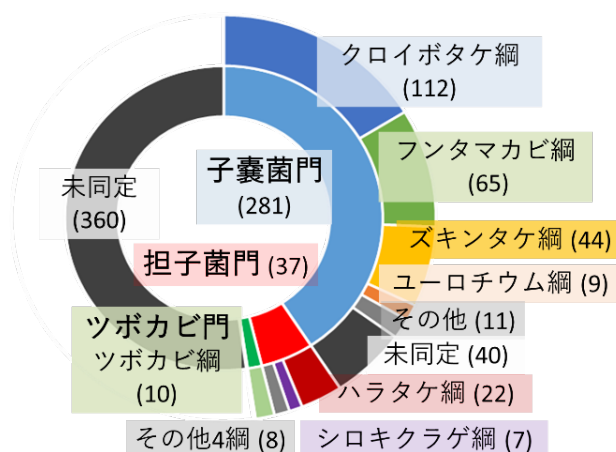


図 (1) - 7 河川水中の環境DNAから検出された菌類の分類学的多様性

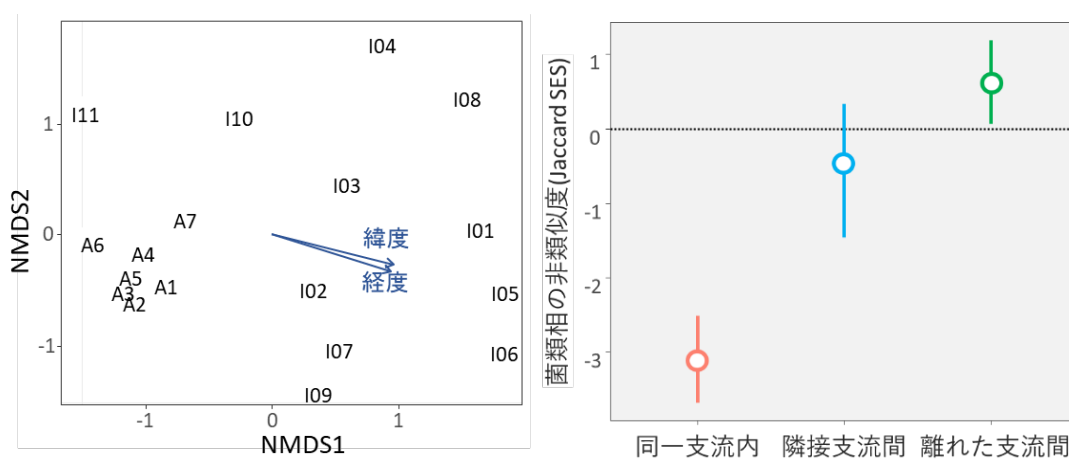


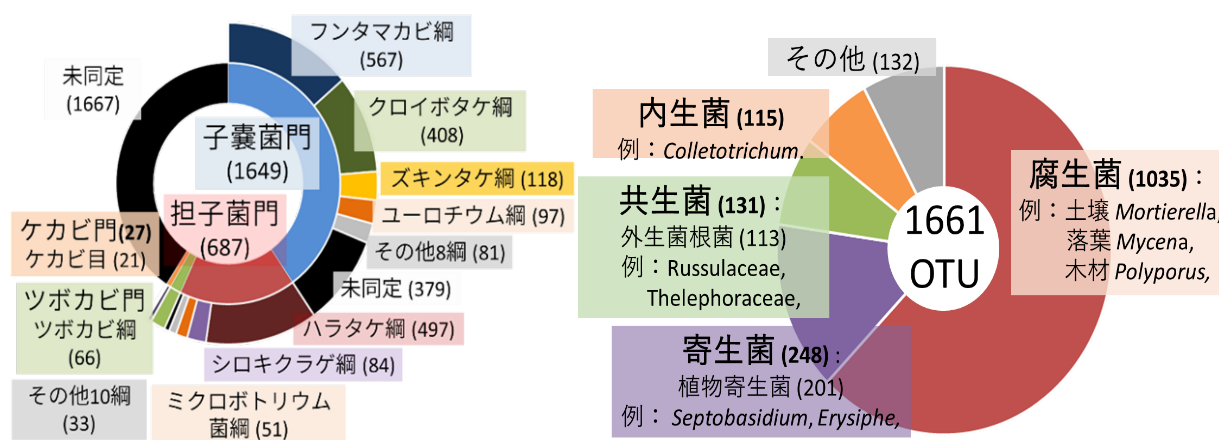
図 (1) - 8 河川水中の菌類相の空間構造。(左)非計量多次元尺度法によるサンプル間の菌類相の非類似度の可視化。近くにプロットされたサンプル間ほど菌類相が似ている(I12は組成が大きく違っていたため図には含めてない)。図中の文字列は採水地点を示し図1と対応している。菌類相は緯度・傾度に伴って変化していた。(右)サンプル間の菌類相の非類似度。値が低いほど菌類相が似ている。

	自由度	F値	R ² 値	P値
標高	1	2.763	0.235	0.147
植生(PC1軸)	1	0.894	0.090	0.498
植生(PC2軸)	1	-0.065	-0.007	0.847
空間距離(MEM1軸)	1	6.898	0.434	0.009
空間距離(MEM2軸)	1	-0.512	-0.060	0.923

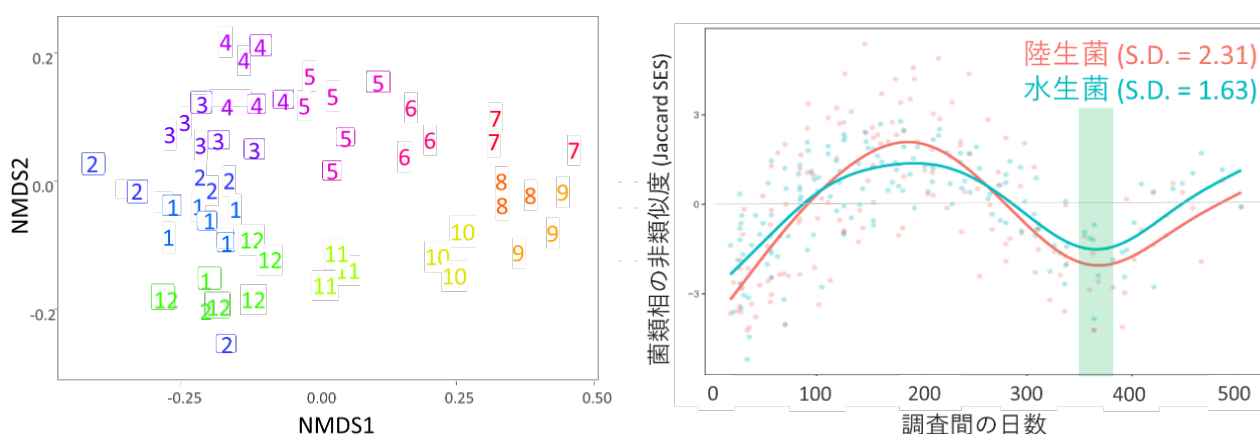
表(1)-1 サンプル間の菌類相の非類似度に対する各要因の説明力(PERMANOVA)。太字はP値<0.05。

(結果2) 2016年の12月から2018年の5月までの18か月で合計5820 の菌類OTU(サンプル当たり平均683 OTU)が

得られた。これらのOTUは子囊菌類(1694 OTU)、担子菌類(687 OTU)、ツボカビ類(66 OTU)を中心に構成されていた。全5820 OTUのうち、1661 OTUの機能群が推定され、有機物分解を行う腐生菌(1035 OTU)と植物や微生物の寄生菌類(248 OTU)とを主として、植物の共生菌類(131)などが検出された。また、機能が推定された1661 OTUのうち、116 OTUが主に水中で生活を営む水生菌で、残りの1545 OTUは主に陸域で生活を営む陸生菌だと推定された。また子実体調査では合計125 OTUが検出された。水中から検出された菌類DNAにはトリュフの一種である(*Tuber* sp.)やポルチーニの一種である(*Boletus* sp.)をはじめとして子実体調査で検出されたOTUと同一の塩基配列を持つ88 OTU(子実体が見つかった125 OTUの70%)が含まれた。環境DNA中の菌類相の時間変化を解析したところ、まず調査月によって菌類相は異なっており、同一の調査時期のサンプル間では、他の調査時期のサンプルよりも菌類相は似ていた(図1-9)。次に、菌類相は時間に伴い変化しており、その変化には一年単位の周期性があった(図1-10)。つまり非類似度は半年で最大となり、1年後にはまた低下しており、年が異なっても同じ月であれば菌類相は類似していた。また菌類相の時間変化量は陸生菌の方が水生菌よりも大きかった。



図(1)-9 河川水中の環境DNAから検出された菌類の分類学的多様性(左)と機能的多様性(右)



図(1)-10 河川水中の菌類DNA相の時間変化。(左)非計量多次元尺度法によるサンプル間の菌類DNA相の非類似度の可視化。近くにプロットされたサンプル間ほど菌類DNA相が似ている。図中の数字は採水月を示している。2016年12月から2017年11月(通常の数値)と2017年12月から2018年5月(四角で囲んだ数字)の結果を示している。(右)サンプル間の菌類DNA相の非類似度の時間変化。値が低いほど菌類DNA相が似ている。曲線は一般化加法モデルの回帰による。

(考察) 本研究によって、河川水中の環境DNAは分類学的にも機能的にも多様な菌類DNAを含んでおり、DNAメタバーコーディングによってこうした多様な菌類のDNAを検出可能であること、さらに環境DNAメタバーコーディングは、水中にとどまらず陸域を含む包括的な菌類多様性調査やモニタリングを行う上で有用であることが示された。

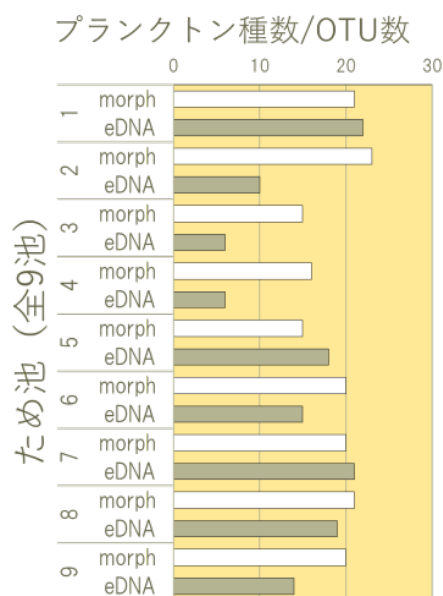
DNAメタバーコーディングによって環境DNA中から分類学的にも機能的にも多様な菌類が検出された。その中には、水生菌として知られるOTUのみならず、植物分解菌として知られる菌類や、植物の共生菌(例えば菌根菌)といった陸生と考えられるOTUも多数含まれていた。陸生菌類は一般に菌糸により土壌中や植物などの生物体の中で生活しており、子実体を形成し、周囲の環境中に胞子を放出することで分散している。放出された胞子や断片化した菌糸は空気中からの降下あるいは表層流を介して河川に加入している。環境DNAを解析することで、このような胞子や菌糸体由来の陸生の菌類DNAを検出していると考えられる。実験1の結果によると、河川水中の菌類DNA相は、異なる支流間と比べて同一の支流内では場所によらず似ていた。これは、上流で一定に加入している菌類DNAが下流まで流れる、あるいは集水域に広く分布している菌類のDNAが上流から下流にかけての様々な点で加入することで、上流から下流までどこでも共通したDNAが検出されているためだと考えられる。陸域(例えば土壌中)では、菌類相の空間的異質性が高く、集水域レベルの多様性を調査するためには数メートルおきに多地点の調査を行う必要がある。本研究結果は、河川環境DNAを調査対象としたDNAメタバーコーディングが、集水域全体をある程度均質化した菌類相の情報を得る上で、そして例えば「ある集水域に産業的に重要な種が生息しているのか」といった特定の種の探索を行う上で、従来の分離培養を用いた多様性探索手法に比べて有用な手法であることを示している。

動物プランクトン

①サンプリング手法間の比較

全ため池9池において形態分類によって検出されたプランクトンは、16属25種(ほか不明2分類群)で、内訳はミジンコ目が29.6%、ケンミジンコ目が11.1%、ワムシ類60%だった。

環境DNA手法によって得られたOTU数(リード数が12以上)は、Metazoa(いわゆる動物)は94.7%で、そのうち動物プランクトンのワムシ類(輪形動物門)は14.4%でOTU数79(リード数160,881)、節足動物門は10.9%でOTU数60(リード数52,516)、その他の動物(魚、ヒトなど)は0.3%でOTU数17(リード数2,079)、同定できなかった種は64.8%でOTU数390(リード数405,972)だった。サンプリング手法間で比較すると、環境DNAの種数(OTU数)は、形態で分類される種数より少ない場合があることがわかった(9ため池中6池、図1-11)。



図(1)-1 1 サンプリング手法間におけるたため池のプランクトン種数(OTU数)の比較

morphは、プランクトンネットで作られたプランクトンの形態による同定種数、eDNAは、環境DNA手法によって得られたOTU数。

たため池ごとに同定できたプランクトンを科レベルで比較した(図1-1 2)。環境DNA手法は、科レベルのような高次の同定レベルであれば、これまでの形態による同定方法と同程度のプランクトン相を把握できる可能性があることがわかった。ただし、環境DNA手法によって同定されたプランクトンは、形態分類と比較してCyclopida属やBranchionida属のようによく検出できている属と、Bosmina属やFilinida属のように検出できていない属があり、プランクトンの種類によって検出のされやすさが異なるのではないかと考えられた。

Zooplankton_Family	morph									eDNA									equivalency								
#Pond	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bosminidae	■	■			■		■		■	■									■		■	■	■		■		
Chydoridae	■						■		■						■	■	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■
Daphniidae	■						■		■		■							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Diaptomoidae							■		■										■	■	■	■	■	■	■	■	■
Cyclopidae	■								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Podocopida																	■		■	■	■	■	■	■	■	■	■
Philodinidae	■	■				■												■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Filinidae									■										■	■	■	■	■	■	■	■	■
Testudinellidae	■	■	■																■	■	■	■	■	■	■	■	■
Branchionidae	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Lecanidae	■			■	■	■	■	■	■										■	■	■	■	■	■	■	■	■
Trichocercidae	■	■	■	■	■	■	■	■	■										■	■	■	■	■	■	■	■	■
Gastropodidae									■										■	■	■	■	■	■	■	■	■
Synchaetidae	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

図(1)-1 2 同定できたプランクトンを科レベルで手法間で比較

morphは形態による同定、eDNAは環境DNAによる同定の結果を色付きで示している。また、equivalencyは2つの手法の結果が揃っている場合のみ色付きで示している。色がついていなければ2つの手法の結果が異なる。

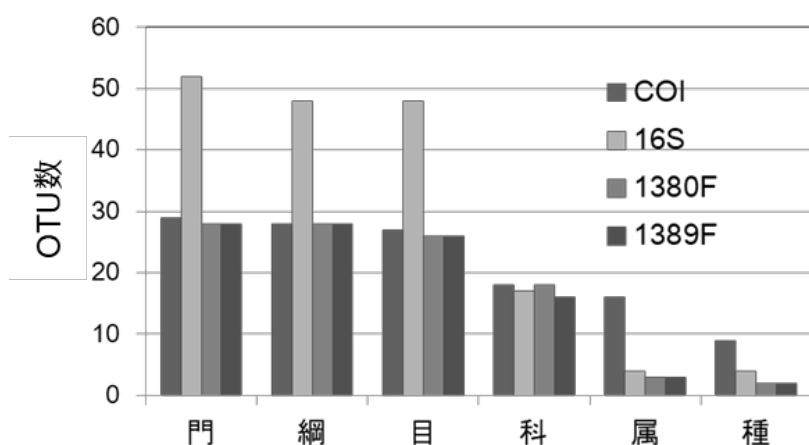
以上をまとめると、プランクトンネットによる形態的同定と、環境DNA手法で得られた同定では、種数にギャップがみられることから、その原因としてDNAが同定できていない可能性があることと、そもそもDNAが取れていない可能性があることの2つが挙げられる。DNAが同定できていない可能性には、プライマーのミス

ッチによって、DNAはあるのに同定できていない可能性がある。また、たとえば塩基配列がデータベースに記載されていないことで、種同定に至らなかったことも可能性として挙げられる。次にDNAが取れていない可能性については、プランクトンの種によって、体の構造、生息域や行動が異なるためにDNAの採集しやすさに違いが出るのではないかと考えられた。また、湖沼の水質によるDNA阻害や、湖盆の形態（深度、面積など）による環境DNA採集のしにくさ等が可能性としてある。これらの問題点を解決していくことが、プランクトン相を把握するための環境DNA手法の精度向上に重要だろうと考えられる。

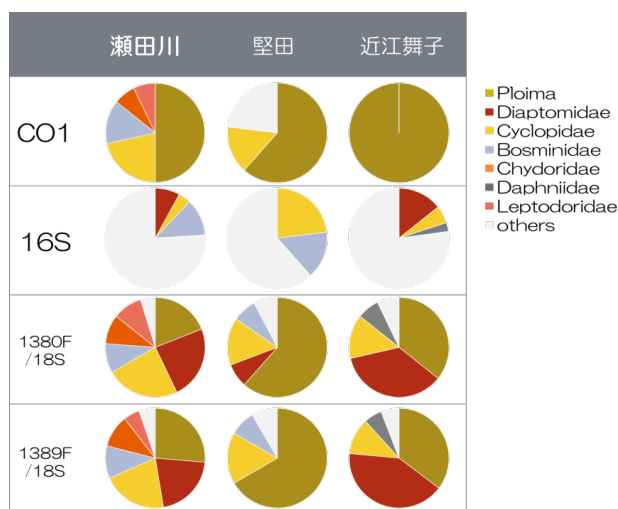
②環境DNA手法におけるサンプリング手法と解析手法

2-1 プライマー間の比較

得られたOTUのうち解析対象となるOTU数は、プライマー間で異なり、COI、16S、V4、V5-7、V9_1(1380F)、V9_2(1389F)の順に71、67、22、16、297、253 OTUだった。そのうち、プランクトンを検出したOTU数を比較すると、16Sを対象としたプライマーがもっとも多くプランクトンを検出することができた（図1-13）。門から目の分類レベルでは、16Sのプライマーが最もよく分類できたが、種まで分類できたのはCOIプライマーで9種同定できた。一方、プランクトンをいずれの分類レベルでも同定できなかったのは、V4とV5を対象としたプライマーだった。このことから、プランクトンの同定に有用なプライマー候補としては、COIプライマーが最もよく種まで同定できると考えられた。



図（1）-13 プライマー間のOTU数の比較

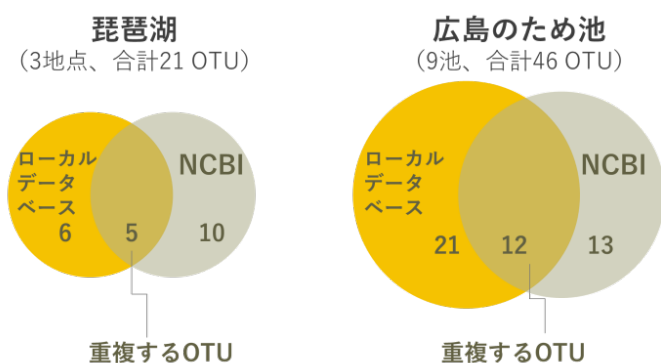


図（1）-14 科レベルからみた地点間のプランクトン属の構成の比較

地点間において、プランクトン属構成をプライマーごとと比較した（図1-14）。その結果、環境DNA分析によるプランクトン相の把握は、プライマー間で精度が異なることがわかった。同じサンプルでも、用いるプライマーによって、属構成は異なり、とくに16SはPloima（ワムシ類）を分類できないことがわかった。またCOIのプライマーは、他のプライマーと比較して、*Diaptomus*属の検出ができていない可能性があることがわかった。また本研究の同時期において、形態的同定による瀬田川の動物プランクトン相は、*Bosmina*属のゾウミジンコ（*Bosmina longirostris*）が、優占種であると報告されている（琵琶湖環境科学研究センターHPより）。環境DNAによる本研究の結果と比較すると、どのプライマーでも*Bosmina*属レベルまでの同定ができていた。プライマー間の属構成の違いは、DNAデータベースの充実度の違いを反映しているか、またはプライマーのもつ特性（どの領域を対象にしているか、またはシーケンスの長さ）によって生じているだろうと考えられた。

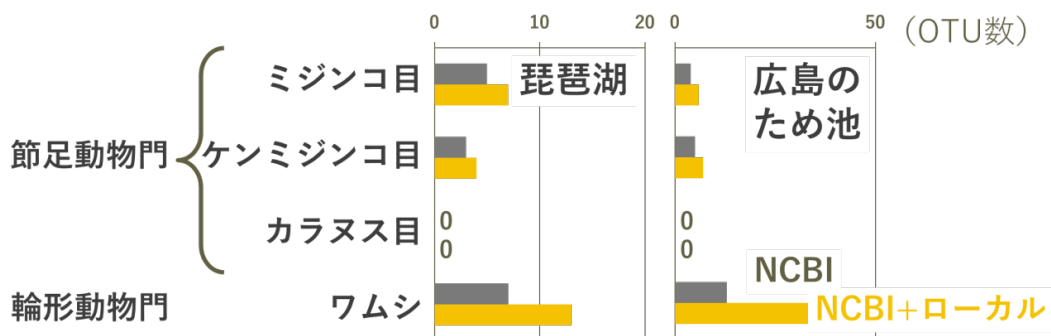
2-2 データベース間の比較

NCBIとローカルデータベースの2つのデータベースでプランクトンの配列と一致したOTU数の比較した（図1-15）。



図(1)-15 環境DNAによるプランクトンのメタバーコーディング結果のデータベース間の比較

2つのデータベースから得られたプランクトン数は、共通して得られる分類群があるが、合わせることで増加することがわかった。NCBIで得られた種数にローカルデータベースで得られた種数を加えると、全体のプランクトンのOTU数が1.4-1.8倍に増えることがわかった。また、ローカルデータベースを加えることで、特にワムシは極端に検出されるOTU数が増えることがわかった（図1-16）。このことから、NCBIはワムシ類のデータが不足しているのではないかと考えられた。



図(1)-16 データベースによるプランクトンの検出数の比較

一方、カラヌス目はどちらのデータベースにおいても検出されなかった。カラヌス目は、通常どの湖沼においても普遍的に生息することがわかっていることを考慮すると、生物特異的な環境DNAの挙動がある可能性

が示唆される。また、ローカルデータベースを加えることで、同定できるようになった種の内訳は、*Thermocyclops taihokuensis*, *Bosmina freyi*, *B. longirostris*, *Mesocyclops dissimillis*, *Brachionus angularis*, *Fillinia longiseta*などが挙げられる。*T. taihokuensis*は、そもそもNCBIに配列がない種のため、登録が必要である。それ以外で列挙した種は、NCBIに配列があるにもかかわらず検出できなかった種である。この原因として考えられることは、種内の配列に変異が大きい（地理的変異がある）か、または隠蔽種であることが挙げられる。以上のことから、環境DNAのメタバーコーディングによるプランクトン調査では、標本に基づくデータベースの充実（参照配列の取得）が急務であることがわかった。さらに、同種でも異なる生息地由来の配列の登録が必要であることがわかった。今後は日本産プランクトンの分類学的整理を行うと同時に、サブテーマ4の東北大学と協力しつつデータベースを拡充することで、プランクトンのメタバーコーディングはさらに精度の高いものになると考えられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

全国での湖沼での環境DNAメタバーコーディングの試行から、今後の保全に向けた魚類群集の把握に、環境DNAメタバーコーディングからの種数や種組成の結果が貢献できると考えられる。緯度や地域性と種数の関係は得られなかった。よって、MiFishの対象領域のデータベースについては、全国について網羅できていると考えられた。またさらに今後全国での湖沼魚類群集の研究に、これらのメタバーコーディングからの種数や種組成の結果が貢献できると考えられる。

5つの河川で調査した結果より、多くの河川、また河川流程において、環境DNAメタバーコーディングにより得られた魚類種数は、従来の調査を上回ることがわかり、河川での魚類群集調査における環境DNAメタバーコーディングの有用性が確かめられた。また生物多様性を把握する上で、より多くの種類を検出できる環境DNA手法の優位性が明らかとなった。

環境DNA中の菌類相調査を行うことで、菌類多様性の空間構造や時間変化を検出することが出来た。上述の通り、環境DNA中には水生菌と陸生菌の両者に由来する由来の多様な菌類DNAが含まれることから、検出された菌類相の空間構造や時間変化は、水生菌と陸生菌の空間・時間変化を反映していると考えられる。本研究結果から、環境DNAの広域的なサンプリングあるいは長期のサンプリングを行い、DNAメタバーコーディングによる解析を行うことで、菌類の分類群・生息域・機能群を問わず集水域レベルでの菌類多様性の地理パターンや長期的なモニタリングを行うことが出来ると考えられる。しかし、本研究により検出された菌類には分類群や機能群を特定できなかったOTUも多数含まれていた。そのため、菌類のリファレンスデータの拡充は、DNAメタバーコーディングによる多地点・長期的な菌類多様性調査と併せて、今後の重要な研究課題の1つといえる。

環境DNAによるプランクトン相の解明は、上記に挙げたCOIプライマーを用いることで科レベルの分類であれば把握できることがわかった。しかしながら実際にプランクトン調査で環境DNA手法が使えるようになるためには、精度の向上が求められるだろうと考えられる。解明すべき点としては、得られたプランクトンの環境DNAを同定できるようになることと、プランクトンの環境DNAを採集できるようになることが重要であることがわかった。より具体的には、環境DNAを同定できるようになるために、日本産プランクトンのデータベースの拡充が急務であり、これには日本各地の湖沼から得られたDNAが必要である。また種による環境DNAの挙動が異なる可能性があることから、室内において飼育実験をするなどして、プランクトンの種、または属特異的な環境DNAの挙動を知る必要がある。さらに、プランクトンによって異なるニッチや行動パターンが、環境DNAの分布に影響を与える可能性が示唆された。このことから、どのようなサンプリング方法が、プランクトン相を正確に反映した環境DNA手法となるかを、湖沼栄養型の違う湖沼を対象にした季節ごとの

野外調査などによって調べる必要がある。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

兵庫県東播磨県民局からの受託事業を受け、アカミミガメのため池での分布調査を行なった。環境省では「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」を開いている。この検討会の委員として、代表者（土居）と分担者（源）が参画している。環境省の事務局と実験マニュアルやリファレンスデータベースに関して情報交換を行っており、本サブテーマの成果が既に活用されている。水産庁のパイロットプロジェクトとして、瀬戸内海区水産研究所にて、瀬戸内内での環境DNA調査への本手法の利用が行われている。代表者（土居）が参画し、手法の指導を行なっている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

環境省では上記の絶滅危惧種を対象にした調査に加え、様々な場所での今後の生物モニタリングに環境DNAの活用を考えているため、本研究成果の活用が欠かせない。上記の検討会についてもあと3年間引き続き検討されるということで、本研究成果の活用が大いに期待される。

6. 国際共同研究等の状況

ヨーロッパでの環境DNA標準手法を策定するEU COST ACTION DNAqua-Net (<https://dnaqua.net>) の workshop 3に土居が招聘され（2018年3月25-26日）、日本での環境DNA手法などについて紹介し、環境DNA標準手法を議論した。

アメリカのUSGSやマイアミ大学と環境DNAによる個体数推定のモデルについて、共同で研究を進めて、論文を発表した。

7. 研究成果の発表状況

<論文（査読あり）>

- 1) A. FUJIWARA, S. MATSUHASHI, H. DOI, S. YAMAMOTO, T. MINAMOTO: Freshwater Science 35, 748-754 (2016)
“Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds”
- 2) S. MATSUHASHI, H. DOI, A. FUJIWARA, S. WATANABE, T. MINAMOTO: PLOS ONE 11, e0156217 (2016)
“Evaluation of the environmental DNA method for estimating distribution and biomass of submerged aquatic plants”
- 3) 高原輝彦、山中裕樹、源利文、土居秀幸、内井喜美子：日本生態学会誌, 66, 583-599 (2016)
「環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～」
- 4) 山中裕樹、源利文、高原輝彦、内井喜美子、土居秀幸：日本生態学会誌, 66, 601-611 (2016)
「環境DNA分析の野外調査への展開」
- 5) M. MIYA, T. MINAMOTO, H. YAMANAKA, S. OKA, K. SATO, S. YAMAMOTO, T. SADO, H. DOI: Journal

of Visualized Experiment 117, e54741 (2016)

“Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA”

- 6) H. DOI, R. INUI, Y. AKAMATSU, K. KUNO, H. YAMANAKA, T. TAKAHARA, T. MINAMOTO: *Freshwater Biology* 62, 30–39 (2017)
 “Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish”
- 7) H. DOI, K. UCHII, S. MATSUHASHI, T. TAKAHARA, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO: *Limnology and Oceanography Methods* 15, 212–218 (2017)
 “Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA”
- 8) T. MINAMOTO, K. UCHII, T. TAKAHARA, T. KITAYOSHI, S. TSUJI, H. YAMANAKA, H. DOI: *Molecular Ecology Resources* 17, 324–333 (2017)
 “Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*”
- 9) H. SATO, Y. SOGO, H. DOI and H. YAMANAKA: *Scientific Reports*, 7, 14860 (2017), Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities.
- 10) I. KATANO, K. HARADA, H. DOI, R. SOUMA, T. MINAMOTO: *PLOS ONE* 12(5): e0176541 (2017)
 Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods.
- 11) K. UCHII, H. DOI, H. YAMANAKA, H., T. MINAMOTO: *Ecology and Evolution* 7(20): 8515–8522 (2017) Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and non-native genotypes of common carp estimated by environmental DNA.
- 12) H. DOI, K. UCHII, S. MATSUHASHI, T. TAKAHARA, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO: *Limnology & Oceanography: Methods*, 15, 2, 212–218 (2017), Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA.
- 13) H. DOI, Y. AKAMATSU, Y. WATANABE, M. GOTO, R. INUI, I. KATANO, M. NAGANO, T. TAKAHARA, T. MINAMOTO: *Limnology and Oceanography: Methods* 15, 939–944 (2017) Water sampling for environmental DNA surveys by using an unmanned aerial vehicle.
- 14) T. CHAMBERT, D. S. PILLIOD, C. S. GOLDBERG, H. DOI and T. TAKAHARA: *Ecology and Evolution*, 8, 6, 3468–3477 (2018), An analytical framework for estimating aquatic species density from environmental DNA.
- 15) *T. TAKAHARA, *T. IKEBUCHI, H. DOI and T. MINAMOTO: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 221, 15–20 (2019), Using environmental DNA to estimate the seasonal distribution and habitat preferences of a Japanese basket clam in Lake Shinji, Japan. (*Both authors equally contributed.)
- 16) K. FUJII, H. DOI, S. MATSUOKA, M. NAGANO, H. SATO, and H. YAMANAKA *PLOS ONE* 14: e0210357 (2019) Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods.
- 17) H. DOI, K. FUKAYA, S. OKA, K. SATO, M. KONDOH, and M. MIYA *Scientific Reports* 9:3581(2019) Evaluation of detection probabilities at the water-filtering and initial PCR steps in environmental DNA metabarcoding using a multispecies site occupancy model.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 源利文、内井喜美子、高原輝彦、土居秀幸：環境技術 46 (12), 648-652 (2017)
「環境DNAモニタリング手法の課題と展望」
- 2) 土居秀幸：環境技術 46 (12), 624-629 (2017)
「環境DNAメタバーコーディングによる生物群集把握」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文：第64回日本生態学会大会（2017）
「核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による交雑個体群の遺伝構造解析」
- 2) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文：日本陸水学会第82回大会（2017）
「核DNAマーカーを用いた環境DNA分析」
- 3) H. DOI, R. INUI, K. UCHII, Y. AKAMATSU, K. KANNNO, S. MATSUHASHI, T. TAKAHARA, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO: 2016 ESA Annual Meeting, Fort Lauderdale, USA (2016)
"Environmental DNA method for estimating fish abundance and biomass"
- 4) 十河勇樹、土居秀幸、山中裕樹：日本陸水学会第81回大会、那覇（2016）
「環境DNA分析におけるデジタルPCRの定量精度とPCR阻害耐性について」
- 5) 内井喜美子、土居秀幸、源利文、山中裕樹：日本陸水学会第81回大会（2016）
「環境DNA研究におけるSNPマーカーの活用」
- 6) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文：第64回日本生態学会（2017）
「核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による交雑個体群の遺伝構造解析」
- 7) 松岡俊将、佐藤博俊、土居秀幸：第64回日本生態学会（2017）
「菌類メタバーコーディングによる河川水中の菌類相評価」
- 8) 土居秀幸、永野真理子、CHANG, KWANG-HYEON、高原輝彦、牧野渡、松岡俊将：第64回日本生態学会（2017）「環境DNA分析によるプランクトン群集の解析」
- 9) K. UCHII, H. DOI, T. MINAMOTO, H. YAMANAKA: 2018 ESA Annual Meeting (2018)
"The use of SNP markers in environmental DNA to detect intraspecific genetic variation"
- 10) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文：第66回日本生態学会大会（2019）
「SNPマーカーを用いた環境DNA分析による遺伝変異の検出」
- 11) 土居秀幸：第66回生態学会大会シンポジウム「環境DNA研究のフロンティア：生態学と分子生物学からのアプローチ」（2019）「環境DNAによる陸水生態系の生物種構成と遺伝的多様性の解析」

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 第1回環境DNA学会公開シンポジウムの開催：企画者
- 2) 第66回日本生態学会シンポジウムの開催：企画者

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) NHK サイエンスZERO「水の生態調査の大革命！環境DNA」(2016年7月17日)

- 2) 中国新聞 「川の水からアユの数を推定」(2016年10月6日)
- 3) 産経新聞 「アユの個体数計る調査法確立」(2016年10月9日)
- 4) 朝日新聞 「水生昆虫 バケツの水だけで生息判定」(2017年9月7日)
- 5) 神戸新聞 「ドローン使い生態系長」(2017年10月18日)
- 6) 朝日新聞 「水中生物調査にドローン活用」(2017年11月23日)
- 7) ラジオ関西 「三上公也の情報アサイチ！」出演 水を見れば生き物がわかる？(2017年12月10日)

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) D. DUDGEON et al. *Freshwater Biodiv.*, 81: 163-182 (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges.
- 2) 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. . *Soc. Open. Sci.*, 2015; 2: 150088. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. R
- 3) T. TAKAHARA, T. Minamoto, H. Yamanaka, H. Doi, Z. Kawabata: *Plos One*, 7, 4, e35868 (2012), Estimation of fish biomass using environmental DNA.
- 4) K. UCHII, H. DOI, H. YAMANAKA, H., T. MINAMOTO: *Ecology and Evolution* 7(20): 8515-8522 (2017) Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and non-native genotypes of common carp estimated by environmental DNA.
- 5) T. CHAMBERT, D. S. PILLIOD, C. S. GOLDBERG, H. DOI and T. TAKAHARA: *Ecology and Evolution*, 8, 6, 3468-3477 (2018), An analytical framework for estimating aquatic species density from environmental DNA.

Ⅱ-2 環境DNAによる生物多様性調査の高効率化を目指した調査・分析手法の検討

学校法人龍谷大学

理工学部環境ソリューション工学科

講師・山中裕樹

准教授・丸山 敦

平成 28～30年度累計予算額：25,926千円

(うち平成28年度：8,181千円、平成29年度：9,100千円、平成30年度：8,645千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

環境DNA分析は急速にその技術が発展し、生物多様性を保全するにあたってまず基盤となる、生物の分布についての情報をこれまでになく簡便かつ迅速に取得できる手法になりうるとして、大きな注目を集めている。ただし、調査および分析の方法についての細かなステップについてはブラックボックスが数多く残され、生物多様性保全に関わる多くのプレイヤーやマネージャーにとっては実質的に利用可能な技術として採用しがたい状況にあった。本サブテーマでは明らかにすべきブラックボックスの中から、特に「直接捕獲との検出率の違い」、そして「採水の方法」に注目して各種検討を行った。まず、基礎となる検出感度について、河川において直接捕獲と環境DNAメタバーコーディングとの比較を行い、直接捕獲によって確認された種のうち90%を環境DNA分析によって確認できた。次に、池沼で種の検出を行う際に、対象水域の周囲に配置した各地点のサンプルをすべて個別に分析する場合と、各地点の水サンプルを混合して1つのサンプルとして分析する場合とで、環境DNA分析による結果の差を比較した。結果として、サンプルを個別に扱ったほうがよりマイナーな種まで検出できる一方で、混合したサンプルは主要な種の構成を反映することが示された。最後に、プロジェクトの年限を通して3年間にわたって季節ごとの採取を行った、琵琶湖沿岸、周辺内湖、流入する一級河川、のサンプルを環境DNAメタバーコーディングに供して、滋賀県内の魚類相の分布とその特性について明らかにした。本サブテーマでは、こうした取り組みから、環境DNA分析によって得られるデータの特質の明確化、その効率的取得の方法の提案、そして広域かつ長期のデータ取得を実践し、環境DNA分析の学術分野、および社会の中での実装に向けて貢献できる成果を得た。

【キーワード】

環境DNA、生物多様性、検出感度、効率化、広域調査

1. はじめに

生物多様性の喪失は世界的な問題となっているが、保全に向けた活動に必要な各種の意思決定が拠り所とすべき生物の分布情報が十分にはそろっていないという現状がある。生物の分布はこれまで、直接の捕獲と目視による調査、漁業や狩猟にともなう記録等によって取得・蓄積されてきたが、対象生物が限定されていたり、手法にばらつきがあったり、もしくは広域での生物の分布情報を知ろうとする場合には調査年代が大きく異なるデータを蓄積して使わねばならなかったりなど、複数の課題をはらんでいる。保全対象地域が確定している場合に限っても、そこに生息する種をすべて詳らかにするのは容易ではない。生物相を明らかにするそうしたインベントリー調査に、新たな手法が求められている。

環境DNA分析は、環境中（特に研究例としては水中の例が圧倒的に多い）に存在しているDNAを捕集して抽出・精製したDNA試料を分析することで、その環境に生息している生物種を推定する技術である。日本国内

では10年ほど前から研究が行われており、技術的には近年急速に発展してきた。魚類等の水生生物を対象とする場合、現地での作業は「水を汲むだけ」であるという簡便さと、同定の段階ではDNA配列に基づいた作業が行われることから、分類学の専門家が必ずしも必要ではないという特性から、新たなインベントリー手法として注目を集めている。

ただ、環境DNA分析は比較的新しい技術であることから、分析の細かな条件や、調査時の採水の仕方など、について明確なルール化がなされておらず、水中での環境DNAの動態などについても多数のブラックボックスが残されている。本サブテーマでは明らかにすべきブラックボックスの中から、特に「直接捕獲との検出率の違い」、そして「採水の方法」に注目して各種検討を行った。

2. 研究開発目的

琵琶湖淀川水系を主な調査対象地として、環境DNA分析による調査・分析手法の高効率化を目指す。具体的には、より効率よくサンプルを高品質に採取すべく、(1)現場濾過が可能な装置の開発、環境DNA分析の感度を明らかにするために、(2) 直接捕獲と環境DNAメタバーコーディングとの比較、サンプル数を減らすことが推定される生物相の情報にどのように影響を与えるのかについての情報を得るべく、(3)複数地点試料の独立分析と混合分析の比較検討、そして、(1)の手法を用いて広域かつ長期の調査実施例を提示すべく、(4)琵琶湖水系での長期モニタリング、を実施した。

これらはすべて、環境DNA分析の信頼性の担保を担保すること、そしてその実施に効率化に関わっており、最終的な目的は、インベントリー技術として社会に認知・普及させることである。

3. 研究開発方法

(1) 環境DNA試料の現場濾過法の開発

環境DNAは水中で急速に減耗することが知られており、種や水質によって違いはあるものの、24時間で60%から90%ほどが消失してしまう。多くの分解はDNaseによるものと思われるが、数時間程度で半減してしまう場合もあり、これが環境DNAの現場での初期濃度を適切に知るうえで大きな問題となっている。そこで、採取したその時点でのサンプルの状態を保存するため、かつ、効率的に多地点での採取を可能とするために、採取直後に水試料を濾過できる車載濾過装置の開発を行った。

(2) 直接捕獲と環境DNAメタバーコーディングとの比較

実際の直接捕獲によって得られた魚類相データと魚類のミトコンドリア上にある12S領域をマーカーとしてメタバーコーディングが可能であるMiFish-Uプライマーで得られる魚類相データとの整合性を検証した。滋賀県内を流れる日野川支流・佐久良川から得た環境DNA試料を分析し、タモ網と投網による直接捕獲によって得られた魚類相データとの比較を行った。佐久良川中流域に約200メートルの調査区間を設定し、2015年8月1日に上流及び下流端で河川横断方向に3か所ずつ500ミリリットルの採水を行い、その後、区間内で実施された120人の一般市民による魚とりイベントで捕獲された魚類試料から魚類相情報を取得した。水試料(6サンプル)はそれぞれGF/Fフィルターでろ過し、ろ紙試料からDNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて環境DNAを抽出した。MiFish-Uプライマーを用いて各試料を繰り返し数3のPCRに供し、サンプルを識別するためのindexタグを付加してライブラリーを作成した。以降、Miya et al. (2015)のプロトコールに従って次世代シーケンサー (MiSeq、Illumina) によるシーケンシング、得られたシーケンスデータの処理、BLAST検索による種同定を行った。

(3) 複数地点試料の独立分析と混合分析の比較検討

水域内の魚類相を適切に検出するためにはどのような採水方法が適切なのかを検討するため、滋賀県内に点在する内湖のうち、曾根沼、野田沼、伊庭内湖、西ノ湖を対象として複数の採水・分析方法を試行した。採水は2015年6月12日に実施した。これらの内湖のうちで最大の西ノ湖は周囲16地点と沖の1地点、その他の内湖は周囲8地点と沖の1地点でそれぞれ500ミリリットルずつ採取し、個別にそれぞれ環境DNA試料を得た。また、それぞれの内湖において、各地点から250ミリリットルずつ採取してプールした水試料から500ミリリットルを更に採水してそれぞれの内湖を代表する集約サンプルとして環境DNA試料とした。これらの個別サンプルとそれぞれ地点のサンプルを混ぜ合わせた混合サンプルとをそれぞれ繰り返し3、15のPCRに供して、前述の河川サンプルと同様の方法で解析した。

(4) 琵琶湖水系での長期モニタリング

採水

環境DNA採集は琵琶湖本湖、内湖、一級河川で行った(図(2) - 1~3)。琵琶湖本湖と内湖では2015年11月から2018年5月まで3ヶ月毎に採集(計11回)しており、一級河川では2015年9月から2017年9月まで、毎年1回(計3回)の採集を行った。採集は500mLの水を汲み上げ、調査車内にてGF/Fフィルターで濾過を行い、車載冷凍庫にて冷凍してDNA抽出まで保管した。

DNA抽出、ライブラリ作成とシーケンス

DNA抽出はQIAGEN社DNeasy Blood & Tissue Kitを用いてMiya et al. (2015)のプロトコルにしたがって行った。鋳型DNA溶液にはPCR阻害物質が含まれており、PCRが阻害されなくなるまで希釈しないと増幅することができない。しかし、全サンプルで個別に希釈率を最適化するのは困難なため、全サンプルに適用する希釈率を決定した。決定には2015年の内湖環境DNAサンプルを用いた。鋳型DNA溶液を原液、5倍希釈、10倍希釈の3通りで45サイクルのPCRを行ってアガロースゲル電気泳動を行い、10倍希釈時に全てのサンプルでの増幅が確認できたことから、10倍の希釈率を採用した。PCRによる増幅には、MiFish-Uプライマー(Miya et al. 2015)を用い、当該論文に準拠したライブラリ調整を行った。シーケンスにはIllumina社製MiSeqとMiSeq v2 300 cyclesキットを使用し、150 bp x2のペアエンドシーケンスを行った。シーケンスカートリッジに投入したライブラリの終濃度は8~9pMで、PhiXを10%混合した。

シーケンスデータから魚類群集行列データの作成

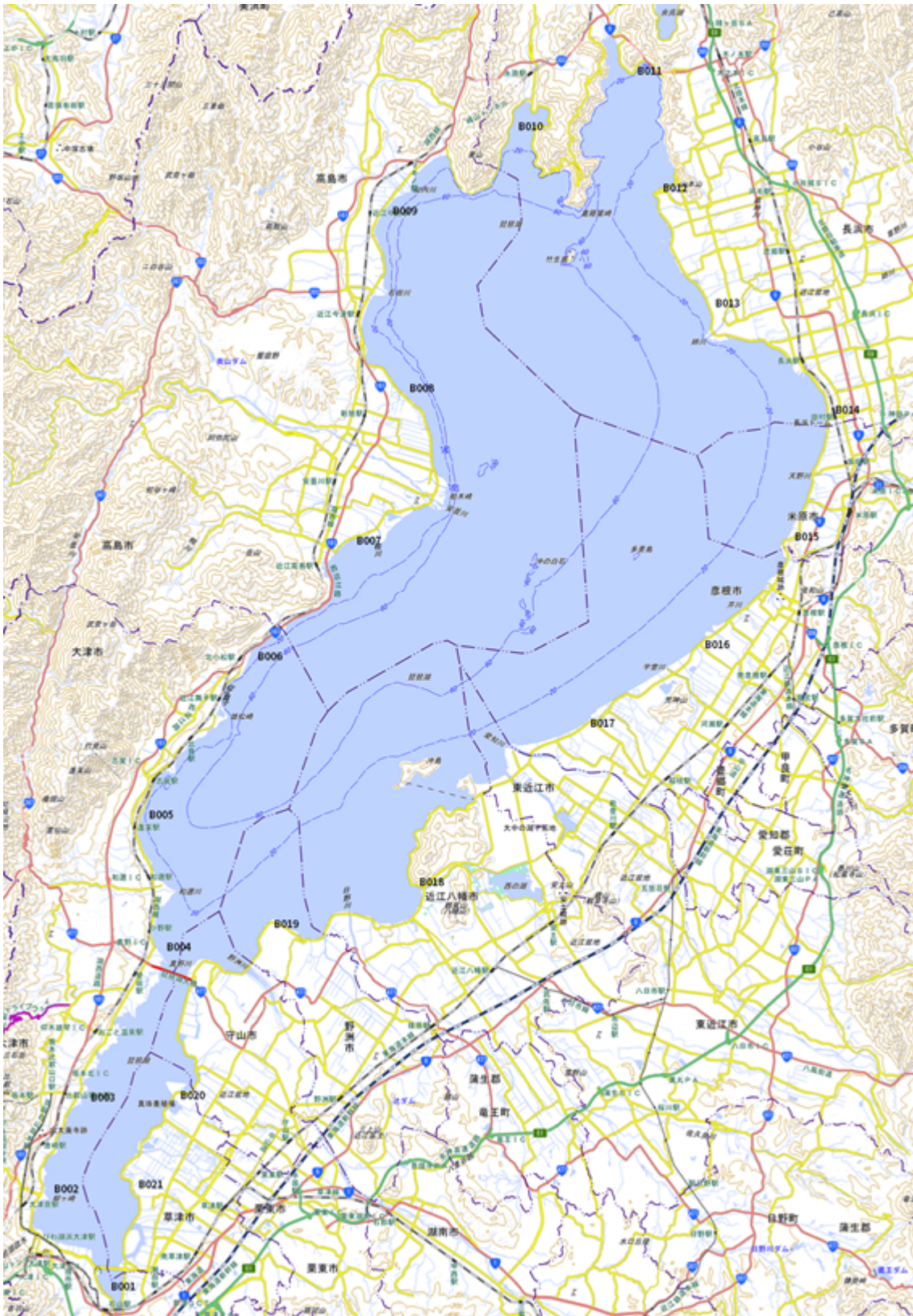
MiSeqのシーケンスデータは、Linux計算機に転送した後、Illumina社が提供するbcl2fastq2を用いてdemultiplexしていないFASTQ形式のファイルに出力した。これをClaidentのclsplitseqコマンドを用いてdemultiplexとプライマー部位の除去を行った。これは、MiSeq内蔵の機能ではインデックスの1塩基違いを許容する設定となっており、しかも変更できないこと、およびインデックス配列の品質値を無視することから、サンプル間の配列データの取り違えが発生する可能性が高く、これを抑制することを狙ったものである。

demultiplexしたデータは、Claidentのelconcatpairコマンドを介してVSEARCH (Rognes et al. 2016)によるペアの連結を行った。さらにVSEARCHを用いてNを1つでも含む配列の除去、100 bp未満あるいは250 bp超の配列の除去、品質値から推定される期待読み間違い数が1.0超の配列の除去を行った。

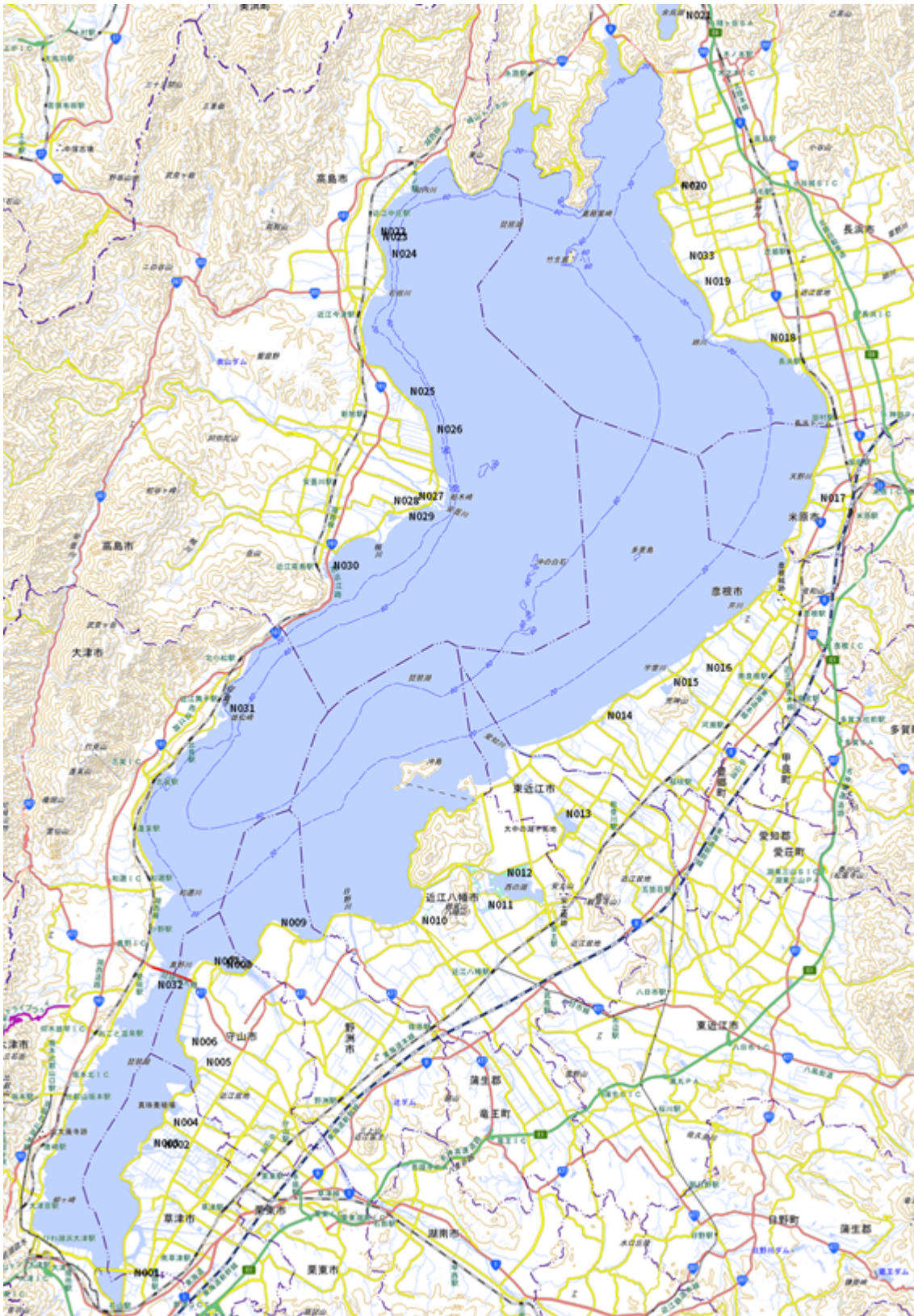
残ったシーケンスデータをRパッケージであるDADA2 (Callahan et al. 2016)に読み込ませ、シーケンスエラーの除去処理を適用した。DADA2からはエラー除去後のamplicon sequence variant (以下ASV)配列と、どのASVがどのサンプルから何配列観測されたかを表す群集行列データを出力した。DADA2のキメラ検出機能

は使用していないので、この時点ではまだキメラASVが残っていたと思われる。そこで、VSEARCHに実装されているuchime2_denovoアルゴリズム(Edgar 2016)を用いてデノボのキメラ検出・除去を適用し、さらに、MiFish DB v34 (MiFish pipeline (Sato et al. 2018)に含まれている)を参照配列としてuchime_refアルゴリズム(Edgar et al. 2011)によるキメラ検出・除去を重ねて適用した。除去されたASVは群集行列データから除外した。

非キメラASVの塩基配列をClaidentに実装されているQCauto法(Tanabe and Toju 2013)および97%-1NN法に基づいて分子同定し、QCauto法の結果を優先しつつ、97%-1NN法の結果がQCauto法の結果に矛盾せず、より低い分類階層まで同定できている場合は採用した。参照配列データベースはClaidentに同梱されているoverall_speciesデータベースの20180322版を使用した。群集行列データには魚類以外の生物も含まれているため、分子同定結果に基づいて、infraclassがTeleosteiではないASVは除外した。配列数の多い上位30のASVについてはMiFish DB v34の登録配列とも比較し、完全一致する配列を探索した。



図(2) - 1 琵琶湖本湖の採集地点図。南端をB001として、時計回りに21地点を配置している。



図(2) - 2 内湖の採集地点図。南端の殿田川内湖をN001として、反時計回りに33地点を配置している。ただし、北東部の早崎内湖はN033となっている。



図(2) - 3 一級河川の採集地点図。南端付近の長沢川をR001として、反時計回りに111地点を配置している。

魚類群集行列データの統計的分析

以後の統計的分析にはR v3.5.3 (R Core Team 2019)とRパッケージvegan (Oksanen et al. 2019)を使用した。

まず、大まかな全体の傾向を把握するため、出現配列数が多い上位30のASVおよびその他の配列の割合をサンプルごとに積み上げ棒グラフで可視化した。

また、この時点の群集行列データに含まれるASVは、除去しきれなかったエラー(PCRの合成ミスやカメラ、シーケンス時の読み間違い)のある配列が多数残っていると考えられる。そこで、「琵琶湖本湖、内湖、一級河川のそれぞれで、全サンプルを合わせれば検出可能な全ASVを網羅できているだろう」と仮定して出現配列数の少ないASVを除外した。手順としては、まず全ASVを含めた群集行列データを用いて横軸をサンプル数、縦軸をASV数とするASV累積曲線をveganのspecaccum関数で作成した。このときASV累積曲線は飽和していなかったため、次に100リード以上のASVのみの群集行列データで同様の試行を行い、次に200リード以上のASVのみ群集行列データで、と繰り返してASV累積曲線が飽和する閾値を求めた。以後の解析ではこの閾値に基づいて出現配列数の少ないASVを除去した群集行列データを用いている。

さらに、琵琶湖本湖、内湖、一級河川のASVの共有具合をベン図を用いて可視化した。ベン図の作成では、全ASVを使用した場合と出現配列数の少ないASVを除去した場合の2通りで行った。作成にはgplotsパッケージ(Warnes et al. 2019)のvenn関数を使用した。

次に、種の網羅度を把握するためにveganのrarecurve関数でレアファクションカーブを確認し、総配列数が5,000未満のサンプルを除外した上で、網羅度99.99%(レアファクションカーブの傾きが0.0001)を閾値としてカバレッジベースレアファクション(Chao and Jost 2012)を適用することでサンプル間のASV網羅度の均一化を行った。その上で、PCRバイアスや実験手技、シーケンスランの影響を受けやすい配列数の大小の効果を除くため、データを二値化した(1以上の値を全て1とした)。以降の解析は全てこのデータに基づいたものである。

琵琶湖本湖・内湖・一級河川のスペシャリスト探索

琵琶湖本湖と内湖での出現数をCLAMtest (Chazdon et al. 2011)を用いて比較することで、内湖よりも本湖を好むASV、本湖より内湖を好むASVを検出した。また、琵琶湖本湖と一級河川での出現数を同様に比較することで、一級河川よりも本湖を好むASV、本湖より一級河川を好むASVを検出した。

魚類群集のβ多様性に影響する要因の探索

二値化した魚類群集行列データに基づいて、β多様性の指標であるJaccard距離(Jaccard 1912)およびRaup-Crick距離(Raup and Crick 1979; Chase et al. 2011)を算出し、PERMANOVA (Anderson 2001)によって場所(本湖か内湖か一級河川か)・地点・年・月の効果を検定した。Jaccard距離とRaup-Crick距離を用いるのは、Jaccard距離がα多様性の影響を受ける指数で、Raup-Crick距離はα多様性の効果を除外したβ多様性指数だからである。この2つの指標の結果の違いは、α多様性の影響によって説明できる。

また、より詳細に効果を検討するため、琵琶湖本湖・内湖・一級河川のそれぞれのサンプルのみの群集行列データを作成し、前述のβ多様性指標とPERMANOVAを用いて地点・年・月の効果を検定した(ただし、一級河川は年に1回9月のサンプルしかないため月の効果はない)。

最後に、サンプルを琵琶湖南湖、北湖東岸、北湖西岸の3つのエリアに分けた上で、地点間の直線距離を算出し、β多様性への効果をMantel correlogram分析(Oden and Sokal 1986)を用いて検討した。琵琶湖南湖と北湖の境界は琵琶湖大橋、北湖東岸と西岸の境界は葛籠尾崎とした。また、Mantel correlogram分析には、Rパッケージvegan (Oksanen et al. 2019)のmantel.correlog関数を用いた。多重検定を行うことに伴うp値の補正には、Benjamini-Hochberg法(Benjamini and Hochberg 1995)を用いた。エリアを3つに分割す

るのは、北湖と南湖が水質や周辺の土地利用において大きく異なること、北湖東岸と北湖西岸では直線距離は近くても、岸辺しか利用できない魚類にとって移動の障害はずっと大きいと考えられるためである。また、今回は琵琶湖本湖・内湖・一級河川のそれぞれで別々にMantel correlogram分析を行っており、琵琶湖本湖と内湖、琵琶湖本湖と一級河川などの比較は行っていない。いずれも環境が全く異なっており、群集も異なるため、距離の効果を見るのに適切ではないためである。

4. 結果及び考察

(1) 環境DNA試料の現場濾過法の開発

異なる水サンプル間でのコンタミネーションの確率を低下させるため、使い捨てのプラスチックカップとプラスチックバッグを採水に利用し、それを直結する形で濾過が可能な現場濾過装置を開発した(Yamanaka et al. 2016)。濾過には直径47mmのGF/Fグラスファイバーフィルターを持ちており、濾過終了後、直ちに車載冷凍庫で氷点下保存する仕様となっている。これにより、ほとんどの場合、採水後15分以内には濾過と濾紙の保存が可能になった。これはつまり、ほぼ、分解を考慮しなくてもよい良質なサンプルが手に入る手法を完成できたということである。また、この装置の大きな利点として、密閉のプラスチックバッグを濾過装置に直結しているため、移動中の車内で濾過を進めることができる点がある。これにより、多地点での採水がより迅速に行えるようになった。本濾過装置を用いて、最大で日当たり50地点での採水を実施することができた。

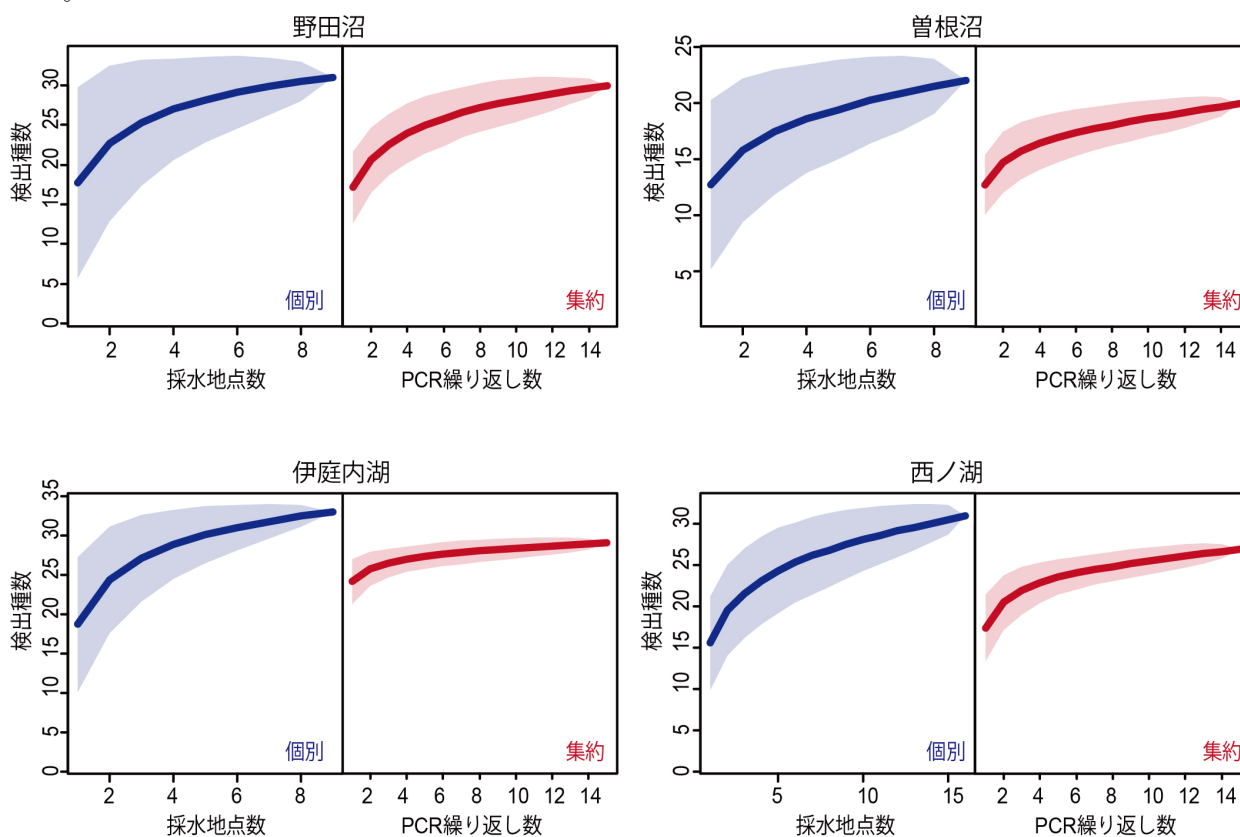
(2) 直接捕獲と環境DNAメタバーコーディングとの比較

佐久良川での調査の結果、環境DNA分析による検出数は28種、直接捕獲では20種であった。即ち、両手法での合計検出数は36種であった。直接捕獲で捕獲された種のうち、環境DNA分析でも検出された種の割合は90%であった。一般により高感度とされる環境DNA分析によってのみ検出された種が6種いた一方で、直接捕獲でしか検出されなかった種も2種いた。結果として、両手法で得られた魚類相データは高い割合で一致すること、そして、若干ながらやはり環境DNAメタバーコーディングによって得られる種数の方が多き事が確認された。

(3) 複数地点試料の独立分析と混合分析の比較検討

内湖での採水・分析手法の検討では、分析全体を通して4内湖から43種が検出された。個別サンプルの分析の結果、1内湖の中でもサンプルを増やす、つまり様々な地点から採取した水を持ちいた方がより多くの種が検出できることが示された(図(2) - 4)。これは、4内湖のうち最小の野田沼(8.4 ha)でも最大の西ノ湖(222 ha)でも同様の傾向がみられた。いずれの内湖でも、今回設定した採水地点数(沖を含めて9もしくは17地点)ではまだ種数が完全に飽和するには至らなかった。個別のサンプルを集約したサンプルではPCRの繰り返しを増やすほどに検出される種数が増加する傾向が見られたものの、各内湖の個別サンプルから検出された総種数よりも少ない種数しか検出できなかった(図(2) - 4)。ただし、最も小さい野田沼では、個別サンプルと集約サンプルの種数の差がもっとも小さかった。これらの結果は今回対象とした比較的小規模の水域であっても、対象水域内のすべての魚類を検出するためには個別サンプルを様々な地点で採取して分析したほうが良いことを示している。また、個別サンプルから得た結果について魚類相の空間的な違いについて解析したところ、近接する地点どうしでは組成が似通っていて離れるほど異なるというような空間的自己相関がみられたため、地点数を増やすならば互いに距離の離れた地点を選ぶことが検出種数を増やすためには効率がよいことを示唆している。一方で集約サンプルからは、個別サンプルの分析から得られた種の中でも比較的DNAが多く検出された種(サンプルの総リード数のなかで平均1%程度を超え

るリード数が検出された種)は安定して検出されており、簡単には個別サンプルが内包する地点間での違い(種組成やDNA量)を平均化したような結果が得られたと考えられる。これは各内湖の代表的魚類の情報をとらえていると言え、網羅的な種の検出が必ずしも必要ではない群集組成の水域間比較等を行う場合には労力の少ない採水・分析手法として利点があるかもしれない。これらの成果はSato et al. (2017)として報告した。



図(2) - 4 採水地点数(個別サンプル)またはPCR繰り返し数(集約サンプル)の増加に伴って累積する検出魚種数

(4) 琵琶湖水系での長期モニタリング

各ASVの検出量について

シーケンスデータを解析して分子同定した結果、最も多く観察されたASVは、多い順にヨシノボリ属、ブルーギル、チチブ属(おそらくヌマチチブ)、フナ(ギンプナ・キンブナ・ニゴロブナを含む)、ゲンゴロウブナ、オオクチバス、フナ、フナ、オオクチバス属(オオクチバスとフロリダバスの両方に完全一致)、ホンモロコ、ウキゴリ、コイ科(ヤマトゴイとモツゴに完全一致)、コイ属(ノゴイに完全一致)、オイカワ、カワムツ、アユ、ヨシノボリ属、ハス、カネヒラ、タイワンドジョウ属(カムルチーに完全一致)、ヤマトゴイ、ヨシノボリ属、カマツカ、ニジマス、ドンコ、ニゴイ属、ウツセミカジカ、フナ、ビワマス、イサザであった。

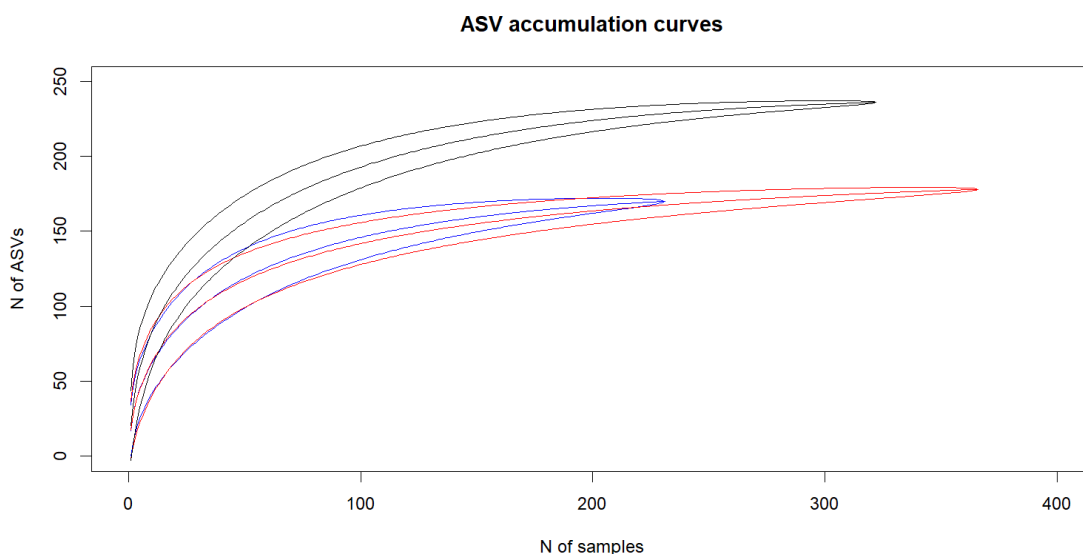
琵琶湖本湖では南湖～北湖南部ではブルーギルが優占しているが、それ以外の地点ではないわけではないがさほど多くない。5月はフナの検出量が増大するが、一部の地点ではオオクチバス、ヌマチチブ、イサザ、カマツカが優占する。8月になると、北湖ではヨシノボリ属とヌマチチブが優占する。内湖では5月のみブルーギルの割合が低下し、フナとゲンゴロウブナが増大する。一級河川では、9月しか採集していない

ため季節性はわからないが、全体的にヨシノボリ属が優占するが、南湖に注ぐ一部の河川ではブルーギルが優占することもあった。

近年新たに琵琶湖での拡大が心配されているスモールマウスバスは、既に報告されている野洲川周辺でしか検出されておらず、調査期間内の生息域拡大は見られなかった。チャンネルキャットフィッシュについては全く検出されていない。まだ数が少ないか、岸边にはあまりいないのかもしれない。

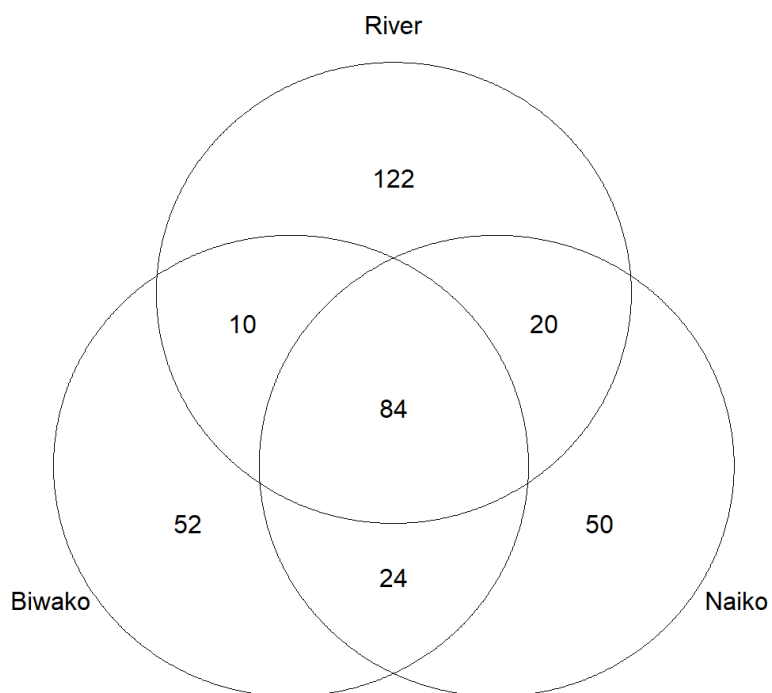
ASV累積曲線とレアファクションカーブに基づく群集行列データの加工について

全ASVから200リード未満のものを除いて描画したASV累積曲線は、末端の傾きが0に近い状態となった(図(2) - 5)。



図(2) - 5 琵琶湖本湖、内湖、一級河川の200リード以上のASVを使用したASV数累積曲線。青は琵琶湖本湖、赤が内湖、黒が一級河川を表す。曲線の上下の枠は推定値の標準誤差

琵琶湖本湖、内湖、一級河川のいずれについても200リード以上が検出されたASVに絞って解析すると、琵琶湖本湖、内湖、一級河川のいずれからも検出されたASVは84、本湖のみは52、内湖のみは50、河川のみは122となった(図(2) - 6)。なお、琵琶湖本湖ではその広さに対してASVが少ないが、沖合や深層のサンプルは採集していないので、あくまで岸边のASVに限られた比較となっていること、および地点数も少ないためであると考えられる。



図（2）－6 琵琶湖本湖、内湖、一級河川の200リード以上のASVを使用したベン図

サンプルごとのレアファクションカーブを描いたところ、ほとんどのサンプルで十分な数の配列が得られており、カーブの傾きは非常に小さいことがわかった。しかし、リード数の非常に少ないサンプルではレアファクションカーブの傾きの推定値の信頼性が低くなるため、カバレッジベースレアファクションの適用前に、総配列数が5,000リード未満の配列は除去した。

琵琶湖本湖、内湖、一級河川をそれぞれ好む魚種について

CLAMtestの結果、本湖より内湖を好むASVが6つ、内湖より本湖を好むASVが6つ、本湖より河川を好むASVが19、河川より本湖を好むASVが5つ検出された(表(2) - 1、2)。このうち、ブルーギルでは、種内で優占するASV2がジェネラリストであった一方で、一部の種内ASVが河川では検出されなかった(ASV48, ASV78(いずれも内湖からは検出されている(表1))。また、ヌマチチブもブルーギル同様優占するASV3は本湖、内湖、河川のいずれからも検出されているが、ASV74は内湖と河川からはあまり検出されず、本湖に多かった(表(2) - 1、2)。これらのASVが本当に本湖を好んでいるのか、単に本湖では個体群サイズが大きく遺伝的多様性が高いだけなのかは現時点では特定できない。

表(2) - 1 琵琶湖本湖と内湖のサンプルでのCLAMtestでスペシャリストと判定されたASV

ASV	琵琶湖サンプル数	内湖サンプル数	判定
ASV109(タイリクバラタナゴ)	1	17	内湖に多い
ASV20(タイワンドジョウ属)	24	127	内湖に多い
ASV37(モツゴ)	7	121	内湖に多い
ASV75(ゲンゴロウブナ)	4	39	内湖に多い
ASV76(モツゴ)	0	26	内湖に多い
ASV99(ツチフキ)	2	29	内湖に多い
ASV42(ニゴイ属)	67	16	琵琶湖に多い
ASV74(チチブ属)	33	7	琵琶湖に多い
ASV23(カマツカ)	66	22	琵琶湖に多い
ASV26(ニゴイ属)	112	48	琵琶湖に多い
ASV27(ウツセミカジカ)	69	18	琵琶湖に多い
ASV30(イサザ)	31	8	琵琶湖に多い

表(2) - 2 琵琶湖本湖と一級河川のサンプルでのCLAMtestでスペシャリストと判定されたASV

ASV	琵琶湖サンプル数	河川サンプル数	判定
ASV111(カワムツ)	0	21	河川に多い
ASV116(ヨシノボリ属)	1	38	河川に多い
ASV15(カワムツ)	10	131	河川に多い
ASV24(ニジマス)	1	25	河川に多い
ASV25(ドンコ)	16	131	河川に多い
ASV33(ヨシノボリ属)	13	102	河川に多い
ASV38(アブラハヤ)	9	78	河川に多い
ASV41(ヨシノボリ属)	8	74	河川に多い
ASV45(ヌマムツ)	5	80	河川に多い
ASV49(ヨシノボリ属)	8	64	河川に多い
ASV51(ヨシノボリ属)	8	66	河川に多い
ASV56(ヨシノボリ属)	4	58	河川に多い
ASV57(ヨシノボリ属)	4	57	河川に多い
ASV62(アブラハヤ)	4	51	河川に多い
ASV63(ヨシノボリ属)	3	80	河川に多い
ASV66(ヨシノボリ属)	0	57	河川に多い
ASV70(タカハヤ)	3	34	河川に多い
ASV71(ヨシノボリ属)	2	36	河川に多い
ASV93(ウキゴリ)	1	40	河川に多い
ASV34(ゼゼラ)	38	6	琵琶湖に多い
ASV44(ワカサギ属)	15	1	琵琶湖に多い
ASV48(ブルーギル)	32	10	琵琶湖に多い
ASV74(チチブ属)	33	7	琵琶湖に多い
ASV78(ブルーギル)	14	2	琵琶湖に多い

魚類群集の β 多様性に影響する要因

全サンプルを用いたPERMANOVAでは、Jaccard距離では場所(本湖か内湖か河川か)・地点・年・月の効果は全て有意だったが、Raup-Crick距離ではいずれの効果も検出されなかった。Jaccard距離は α 多様性の違いを反映するのに対してRaup-Crick距離は α 多様性の効果を除いたものであることから、この結果は場所・地点・年・月の効果が α 多様性に対するものであることを示唆している(表(2) - 3、4)。

表(2) - 3 全サンプル魚類群集でのJaccard距離に基づくPERMANOVA結果

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
場所	2	19.903	9.9517	53.132	0.11122	1e-04***
地点	155	73.505	0.4742	2.532	0.41075	1e-04***
年	3	2.631	0.8770	4.682	0.01470	1e-04***
月	3	3.498	1.1661	6.226	0.01955	1e-04***
Residuals	424	79.417	0.1873		0.44378	
Total	587	178.955			1.00000	

表(2) - 4 全サンプル魚類群集でのRaup-Crick距離に基づくPERMANOVA結果

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
場所	2	37.014	18.5069	-22422.4	0.51136	1
地点	155	31.548	0.2035	-246.6	0.43584	1
年	3	1.803	0.6012	-728.3	0.02492	1
月	3	2.368	0.7894	-956.5	0.03272	1
Residuals	424	-0.350	-0.0008		-0.00483	
Total	587	72.384			1.00000	

本湖、内湖のサンプルにおけるPERMANOVAでは、どちらの β 多様性指標を用いても地点・年・月の効果は全て有意であった(表(2) - 5~8)。それに対して、河川ではJaccard距離では地点・年が有意であるものの、Raup-Crick距離ではどちらも有意にはならなかった(表(2) - 9, 10)。このことから、河川サンプルにおける地点・年の多様性への効果は α 多様性に対するものであると考えられる。これは、河川では年に一度、9月だけの採集であるため、年による影響で特定の種が観測できたりできなかったりする影響ではないかと考えられる。例えば、9月はハスの産卵期末期であり、ビワマスの遡上には少し早い、いずれも年によって変動する。また、一級河川と言っても年によっては水が涸れているほどの小河川もあれば、野洲川、姉川、安曇川のような大きな河川もあり、当然検出種数、すなわち α 多様性は大きくばらつく。ただし、河川魚類群集の特殊性を示している可能性も否定はできない。

表(2) - 5 琵琶湖本湖魚類群集でのJaccard距離に基づくPERMANOVA結果

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
地点	20	11.856	0.59278	2.9941	0.27974	1e-04***
年	3	1.672	0.55738	2.8153	0.03945	1e-04***
月	3	2.719	0.90642	4.5782	0.06416	1e-04***
Residuals	132	26.134	0.19798		0.61664	
Total	158	42.381			1.00000	

表(2) - 6 琵琶湖本湖魚類群集でのRaup-Crick距離に基づくPERMANOVA結果

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
地点	20	9.1889	0.45944	71.045	0.65354	1e-04***
年	3	0.8056	0.26855	41.526	0.05730	1e-04***
月	3	3.2120	1.07066	165.560	0.22845	1e-04***
Residuals	132	0.8536	0.00647		0.06071	
Total	158	14.0601			1.00000	

表（2）－7 内湖魚類群集でのJaccard距離に基づくPERMANOVA結果

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
地点	36	18.951	0.52640	3.0875	0.36839	1e-04***
年	3	1.431	0.47685	2.7968	0.02781	1e-04***
月	3	2.077	0.69217	4.0597	0.04037	1e-04***
Residuals	170	28.984	0.17050		0.56344	
Total	212	51.442			1.00000	

表(2) - 8 内湖魚類群集でのRaup-Crick距離に基づくPERMANOVA結果

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
地点	36	8.1666	0.22685	57.183	0.72264	1e-04***
年	3	0.4537	0.15125	38.125	0.04015	1e-04***
月	3	2.0064	0.66879	168.585	0.17754	1e-04***
Residuals	170	0.6744	0.00397		0.05968	
Total	212	11.3011			1.00000	

表(2) - 9 一級河川魚類群集でのJaccard距離に基づくPERMANOVA結果

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
地点	99	42.699	0.43130	2.3466	0.65461	1e-04***
年	2	1.576	0.78786	4.2865	0.02416	1e-04***
Residuals	114	20.954	0.18380		0.32123	
Total	215	65.228			1.00000	

表(2) - 10 一級河川魚類群集でのRaup-Crick距離に基づくPERMANOVA結果

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
地点	99	20.9300	0.21141	-23.456	0.95976	1
年	2	1.9050	0.95252	-105.679	0.08736	1
Residuals	114	-1.0275	-0.00901		-0.04712	
Total	215	21.8075			1.00000	

最後に地理的距離による β 多様性への効果だが、いずれもごく近い距離でしか空間自己相関(近い地点間ほど群集が似ているという効果)は検出されず、10km以上離れるとほとんど空間自己相関は検出されなかった。なお、琵琶湖本湖の南湖エリアについては、地点が少なすぎて分析できなかったためである。空間自己相関が検出される距離の上限は、琵琶湖本湖では5km程度、内湖や河川ではこれよりも短かった。これは、内湖間や河川間の移動には本湖を経由する必要があるためではないかと考えられる。今回用いたMantel correlogram分析では、地点間の距離を0~5km、5~10km、10~15kmという風にいくつかのクラスに分割し(実際にはSturgesの公式(Sturges 1926)を用いて自動的に分割した)、各クラス内で地理的距離と β 多様性指標間の相関をMantel検定で検討する。一部、10km以上離れた地点で有意な正の空間自己相関が検出されたりもしたが、実際の群集の類似度は高くなく、当該距離クラス内で偶然に検出されたものと思われる。なお、今回のMantel correlogram分析では、十分なサンプル数を確保するため、異なる月、異なる年のサンプルも含めてしまっているため、同一地点の異なる日時のサンプルが多数ある。そのため、近距離で検出されている空間自己相関は、時間的自己相関をも含んでいるはずである。つまり、同一地点の群集であれば、3ヶ月以上異なる日(河川では1年以上異なる日)に調査しても似ているということになる。今回の結果は、岸辺の魚類群集にとっては、ごく僅かな距離であっても環境が変化したり地理的障壁があって移動が容易ではないことを示唆している。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

環境DNA分析が実用的に学术界や社会で利用される技術となるには、その効率的かつ信頼のおける試料採取方法や分析方法が必要とされる。新しい技術であるがゆえに数多くのブラックボックスが残されていたが、本サブテーマでは、実用にあたって重要な(1)簡便かつ効率的な試料採取を可能とする装置の開発を終えることができた。これにより、分解が進む前に環境DNA分析用水試料を迅速に処理することが可能になった。また、(2)直接捕獲による調査とかなり近い結果を環境DNAメタバーコーディングは提供できることを確認した。単純に直接捕獲された種の多くを検出できるということだけでなく、直接には捕獲されなかった種も検出することが示せた。これによって、まだまだその能力が明確にし切れていない環境DNA分析の検出力を示す一例を追加することができた。更に、(3)採水の方法が結果に与える影響について検討し、特定水域の魚類相を環境DNA分析で明らかにしようとする場合、非常にレアな種まで網羅するのではなく、主要な組成をとらえたいのであれば、複数地点から採取した水を混ぜ合わせたうえで一つの試料として処理・分析することが可能であることが示せた。これは、複数の水域にわたって、魚類相を長期的、広域的に調査しようとする際に有効な労力削減方法になると期待される。こうした成果をもとにして、(4)琵琶湖水系での長期間、かつ広域での調査を3年にわたって実施して、環境DNA分析によるインベントリーとモニタリングの実例を示した。「簡便で長期的かつ広域的な調査に適する」というコピーライトがいつも付けられる環境DNA分析であるが、データを伴った実例を示し、そこから得られる情報がどのようなものであるのかを提示できたことは、本手法を用いた調査研究を促進するための重要な参照例になると考えられる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

上述した「(1)科学的意義」にまとめた内容は、それぞれがすべて環境政策に貢献しうるものである。本サブテーマでは「環境DNA分析の信頼性を明らかにすること、技術利用にあたっての利便性を高めること」を主要な目的と設定しており、(1)で記述した(1)から(4)の成果はいずれも、その目的に適合している。行政が今後大型の調査プロジェクトを立案するにあたっては、どのような道具立てで、どの程度の作業時間を立てて、どのように採取した水試料を処理していくか、は主要な必要決定項目となるはずだが、本サブテーマで得られた成果は大きく貢献できる。また、そもそもプロジェクトがスタートされるにあたっては、「どのようなデータが得られるのか？」が最も重要であるが、本サブテーマで得た「琵琶湖水系における長期広域モニタリング」のデータはその有効な参照例であり、行政の中での環境DNA分析の活用にあたって、「その魅力の理解」から「実効的な計画の立案」まで一貫して貢献できる。

6. 国際共同研究等の状況

本課題に参加している研究者の多くが参加して設立された環境DNA学会で、昨年の大会で基調講演を行った米国Texas Tech UniversityのMatt Barnes博士とは、本サブテーマ代表の山中が数年前からコンタ

クトを取っており、環境DNAの環境中での減耗等に伴う検出結果の不確からしさの解消に向けた共同研究を進めている。2019年4月から数か月に渡り、山中がTexas Tech Universityに滞在して共同での実験を行う予定である。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Q. Wu, K. Kawano, Y. Uehara, N. Okuda, M. Hongo, S. Tsuji, H. Yamanaka and T. Minamoto: *Freshwater Science*, 37, 2, 307-314 (2018), Environmental DNA reveals non-migratory individuals of *Palaemon paucidens* overwintering in Lake Biwa shallow waters.
- 2) S. TSUJI, H. YAMANAKA and T. MINAMOTO: *Limnology*, 18, 1, 1-7 (2017), Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples.
- 3) S. Tsuji, M. Ushio, S. Sakurai, T. Minamoto and Hiroki Yamanaka: *PLOS ONE*, 12, e0176608 (2017), Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance.
- 4) H. Sato, Y. Sogo, H. Doi and H. Yamanaka: *Scientific Reports*, 7, 14860 (2017), Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities.
- 5) H. YAMANAKA, H. MOTOZAWA, S. TSUJI, R.C. MIYAZAWA, T. TAKAHARA and T. MINAMOTO: *Ecological Research*, 31, 6, 963-967 (2016), On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation.
- 6) 山中裕樹, 源利文, 高原輝彦, 内井喜美子, 土居秀幸: *日本生態学会誌*, 66, XX, 601-611 (2016), 「環境DNA分析の野外調査への展開」.

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 山中裕樹: 第65回日本生態学会、札幌 (2018)
「近年の環境DNA分析の進展と応用可能性」
- 2) H. Yamanaka: 6th Taiwan-japan Ecology Workshop, Tainan (2018)
“Environmental DNA analysis for ecology and conservation”
- 3) 芝田直樹、佐藤博俊、山本大輔、山本敏哉、櫻井翔、山中裕樹: 2018年度日本魚類学会、函館 (2018)
「環境DNAメタバーコーディング法を用いた1年間の調査から得た矢作川の魚類群集構造の季節変化」
- 4) H. Yamanaka, H. Sato, Ma. Miya, M. Hongo, N. Shibata, K. Watanabe and H. Doi: *Ecological Society of America Annual Meeting 2017, Portland* (2017)
“Environmental DNA metabarcoding unveils spatiotemporal dynamics of fish community in the littoral zone of Lake Biwa, central Japan”

- 5) 渡邊和希, 山内寛, 重吉実和, 芦野洸介, 辻冨月, 本澤大生, 池田静也, 佐藤博俊, 山中裕樹: 第65回日本生態学会、札幌 (2017)
「河川およびため池における魚類相調査: 環境DNAメタバーコーディングと直接捕獲の比較」
- 6) 佐藤博俊, 十河勇樹, 土居秀幸, 山中裕樹: 第65回日本生態学会、札幌 (2017)
「集約した環境DNAサンプルを利用した淡水魚類の環境DNAメタバーコーディング~その有用性と制約について~」
- 7) 本郷真理, 加納光樹, 苅部甚一, 平山拓弥, 山中裕樹: 日本陸水学会第81回大会、那覇 (2016)
「環境DNA分析を用いた小規模河川へのアメリカナマズの侵入モニタリング」
- 8) 辻冨月, 寺村伊織, 中井量暉, 本澤大生, 山中裕樹: 日本陸水学会第81回大会、那覇 (2016)
「近縁種を判別する: Multiplex PCRによる日本産メダカ属2種の同時検出」
- 9) 十河勇樹, 土居秀幸, 山中裕樹: 日本陸水学会第81回大会、那覇 (2016)
「環境DNA分析におけるデジタルPCRの定量精度とPCR阻害耐性について」
- 10) 本澤大生, 山中裕樹: 日本哺乳類学会2016年度大会、筑波 (2016)
「環境DNA分析を用いた特定外来生物ヌートリアの検出」
- 11) 山中裕樹, 佐藤博俊, 本郷真理, 芝田直樹, 渡邊和希, 與座梨里子, 十河勇樹, 櫻井翔, 垣見直希: 第64回日本生態学会、東京 (2017)
「環境DNAメタバーコーディングによる琵琶湖沿岸魚類相の分析」
- 12) 辻冨月, 宮正樹, 潮雅之, 佐藤行人, 山本哲史, 源利文, 山中裕樹: 第64回日本生態学会、東京 (2017)
「環境DNAを用いた種内変異の評価: NGS解析に由来する偽ハプロタイプを除去する新手法」
- 13) 垣見直希, 山中裕樹: 第64回日本生態学会、東京 (2017)
「環境水からの魚類由来RNAの回収抽出手法」

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) ジュニアびわ湖塾における授業「水中を科学捜査! 汲んだ水から魚の種類を調べる環境DNA分析」(主催: 認定特定非営利活動法人びわ湖トラスト、2018年1月27日、滋賀大学大津サテライトプラザ会議室、観客約20名)
- 2) 大分県立日田高等学校のSSHプログラム受講生に向けた特別授業「水中を科学捜査! 汲んだ水から魚の種類を調べる環境DNA分析」(2018年2月1日、聴講者約80名)
- 3) マリンチャレンジプログラムにおける講演「琵琶湖に育った中学生がアマゾン川に行くまで ~なぜ研究を始めて、どこへ向かっているのか~」(主催: 株式会社リバネス、2018年3月28日、品川フロントビル、観客約200名)
- 4) ジュニアドクター育成塾(主催: 認定特定非営利活動法人びわ湖トラスト、2018年10月28日、コラボしが21、観客約15名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 京都新聞 (2019年1月22日、滋賀版 (および京都版)、16頁、「広がれ! 「環境DNA」調査」)
- 2) 毎日新聞 (2018年8月30日、オンライン版、「「環境DNA」を研究 1リットルの水で生物把握 理工学部講師・山中裕樹さん」)
<https://mainichi.jp/univ/articles/20180823/org/00m/100/014000c>
- 3) 朝日新聞 (2018年5月12日、全国版、5頁、「水をくめば分かる生き物の種類」)

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) M. J. Anderson: *Austral Ecology*, 26, 1, 32-46 (2001), A new method for non-parametric multivariate analysis of variance.
- 2) Y. Benjamini and Y. Hochberg: *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57, 1, 289-300 (1995), Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.
- 3) 4) B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson, and S. P. Holmes: *Nature Methods*, 13, 7, 581-583 (2016), DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data.
- 4) A. Chao and L. Jost: *Ecology*, 93, 12, 2533-2547 (2012), Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size.
- 5) J. M. Chase, N. J. B. Kraft, K. G. Smith, M. Vellend, and B. D. Inouye: *Ecosphere*, 2, 2, art24 (2011), Using null models to disentangle variation in community dissimilarity from variation in α -diversity.
- 6) R. L. Chazdon, A. Chao, R. K. Colwell, S.-Y. Lin, N. Norden, S. G. Letcher, D. B. Clark, B. Finegan, and J. P. Arroyo: *Ecology*, 92, 6, 1332-1343 (2011), A novel statistical method for classifying habitat generalists and specialists.
- 7) R. C. Edgar, B. J. Haas, J. C. Clemente, C. Quince, and R. Knight: *Bioinformatics*, 27, 16, 2194-2200 (2011), UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection.
- 8) R. C. Edgar: *bioRxiv*, 074252 (2016), UCHIME2: improved chimera prediction for amplicon sequencing.
- 9) P. Jaccard: *New Phytologist*, 11, 2, 37-50 (1912), THE DISTRIBUTION OF THE FLORA IN THE ALPINE ZONE.
- 10) 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, 7, 150088 (2015), MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species.
- 11) N. L. Oden and R. R. Sokal: *Systematic Biology*, 35, 4, 608-617 (1986), Directional Autocorrelation: An Extension of Spatial Correlograms to Two Dimensions.
- 12) J. Oksanen, F. G. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. R. Minchin, R. B. O' Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens, E. Szoecs, and H. Wagner:

- vegan: Community Ecology Package. 2019.
- 13) R Core Team: R: A language and environment for statistical computing. 2019.
 - 14) D. M. Raup and R. E. Crick: *Journal of Paleontology*, 53, 5, 1213-1227 (1979), Measurement of Faunal Similarity in Paleontology.
 - 15) T. Rognes, T. Flouri, B. Nichols, C. Quince, and F. Mahé: *PeerJ*, 4, e2584 (2016), VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics.
 - 16) H. Sato, Y. Sogo, H. Doi and H. Yamanaka: *Scientific Reports*, 7, 14860 (2017), Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities.
 - 17) Y. Sato, M. Miya, T. Fukunaga, T. Sado, and W. Iwasaki: *Molecular Biology and Evolution*, 35, 6, 1553-1555 (2018), MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding.
 - 18) H. A. Sturges: *Journal of the American Statistical Association*, 21, 153, 65-66 (1926), The Choice of a Class Interval.
 - 19) A. S. Tanabe and H. Toju: *PLOS ONE*, 8, 10, e76910 (2013), Two New Computational Methods for Universal DNA Barcoding: A Benchmark Using Barcode Sequences of Bacteria, Archaea, Animals, Fungi, and Land Plants.
 - 20) G. R. Warnes, B. Bolker, L. Bonebakker, R. Gentleman, W. H. A. Liaw, T. Lumley, M. Maechler, A. Magnusson, S. Moeller, M. Schwartz, and B. Venables: *gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*. 2019.
 - 21) S. Yamamoto, R. Masuda, Y. Sato, T. Sado, H. Araki, M. Kondoh, T. Minamoto, and M. Miya: *Scientific Reports*, 7, 40368 (2017), Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea.
 - 22) H. YAMANAKA, H. MOTOZAWA, S. TSUJI, R.C. MIYAZAWA, T. TAKAHARA and T. MINAMOTO: *Ecological Research*, 31, 6, 963-967 (2016), On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation.

II-3 環境 DNA メタバーコーディングのためのユニバーサルプライマーとリファレンスデータの充実

千葉県立中央博物館

生態・環境研究部

生態・環境研究部長・宮 正樹

平成 28～30 年度累計予算額：20,626 千円（うち平成 28 年度：6,992 千円、平成 29 年度：6,992 千円、平成 30 年度：6,642 千円）

【要旨】

本サブテーマでは、魚類群集調査で大きな注目を集めている環境 DNA メタバーコーディング法（多種同時並列決定法：MiFish 法）を他の脊椎動物や無脊椎動物に適用することにより、湖沼・河川・汽水域などの陸水生生態系における生物群集の種組成をより広い動物群で推定することを目的に技術開発を行った。その結果、脊椎動物については哺乳類と鳥類で、無脊椎動物では十脚甲殻類（エビやカニのなかま）で環境 DNA メタバーコーディング法の開発に成功した。また、環境 DNA から増幅・検出された魚類由来の断片配列（ミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子の平均長 172 bp；MiFish 配列）の種判定に必要なリファレンス配列（証拠標本と MiFish 配列が紐付けされたもの）を充実させるために、日本全国各地の河川から魚類標本を収集した。これら魚類標本の種同定を行い千葉県立中央博物館に証拠標本として登録すると共に、全魚種の MiFish 配列をサンガー法により決定した。その結果、日本産淡水魚類（汽水域も含める）約 300 種のほぼ 80%に相当する 47 科 113 属 236 種のリファレンス配列を得ることができた。これらのリファレンス配列については、国際 DNA 塩基配列データベースである DDBJ/EMBL/GenBank に登録して即時公開した。

【キーワード】

メタバーコーディング、ユニバーサルプライマー、哺乳類、鳥類、甲殻類

1. はじめに

本サブテーマの代表者が中心となって開発した魚類環境 DNA メタバーコーディング法（以下 MiFish 法と略す）は、2015 年にその技術が論文¹⁾として公表されて以来、我が国のみならず世界各国で魚類群集調査に用いられてきた²⁻⁷⁾。この手法の基盤となるツールは、MiFish と名づけられた 1 組のプライマー（人工合成された短い一本鎖 DNA）である。このプライマーペアを用いることで、多種多様な魚類から放出された環境 DNA を、分析可能な量にまとめて増やすことが可能になった。

MiFish プライマーは、種間変異の大きな魚類のミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子の断片（以下 MiFish 配列；平均長 172bp）両端の保存的領域（約 880 種の魚類に共通する 22～28 塩基からなる配列）に結合する相補鎖として設計された。MiFish プライマーペアを使い、両者が挟み込む超可変領域（MiFish 配列）を分析可能な量に増やすには、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）と呼ばれる化学反応を用いる。

この、PCR と呼ばれる化学反応の概要を記すと次の通りとなる。最初に、反応液内に二本鎖で存在する環境 DNA を高温（94℃）で一本鎖に「変性」する。その直後に反応液を 65℃まで冷却すると、二つの MiFish プライマーがこの超可変領域の両端にある保存的領域に「アニーリング」（結合）する。このとき、フォワードと呼ばれるプライマー（MiFish-F）とリバースと呼ばれるプライマー（MiFish-R）は異なる一本鎖に結合する。DNA ポリメラーゼの活性を高めるために反応液の温度を 72℃に上げると、保存的領域に結合した 2 つの MiFish プライマーの 3' 末端を基点に一本鎖に沿って「伸長反応」（複製）が始まり二本鎖の DNA 断片を合成する。この一連の化学反応（二本鎖 DNA の変性～一本鎖 DNA へのプライマーのアニーリング～伸長反応）を 30～40 回ほど繰り返すと、ターゲットとなった MiFish 配列が倍々で増えることになり、微量な魚類環境 DNA が分析

可能な量になる。

分析可能な量に増えた MiFish 配列の両端にインデクス配列を含む各種のアダプターを付加すれば、イルミナ社の次世代シーケンサ MiSeq を用いた大量サンプルの同時並列分析が可能になる。アダプターには 3 種類の配列が含まれ、内側から順にシーケンスプライマー結合配列、インデクス配列、フローセル結合配列となる。インデクス配列の組み合わせをサンプル毎に変えることによりサンプル間の識別が可能となり、数千万本の DNA 塩基配列を同時並列的に分析できることになる。

種判別が可能な超可変領域 (200 bp 未満) を挟む二つの保存的領域 (特定分類群で共通する 20~30 bp 程度の塩基配列) が見つければ、そこにユニバーサルプライマーを設計できるので、上に記した MiFish 法は魚類以外の分類群にも容易に適用できる。環境水中に放出される DNA には魚類だけでなく、他のさまざまな水生生物由来の DNA が含まれるうえに、多くの陸上生物は水を飲んだり水面を泳いだりなど水との接触をもつものが多いため、水中に環境 DNA を放出する可能性をもつ。

2. 研究開発目的

上に詳述した MiFish 法の基盤技術を応用することにより、魚類以外の分類群で環境 DNA を用いたメタバーコーディング法 (多種同時並列検出法) を確立することを第一の目的とした。その対象は魚類以外の脊椎動物と、代表的な水生無脊椎動物である甲殻類とした。また、魚類標本を全国の河川から採集して博物館に証拠標本として登録し、証拠標本から DNA を抽出して MiFish 配列を決定し、魚類のリファレンス配列を充実させることを第二の目的とした。なお、以下に記す哺乳類用・鳥類用プライマーの開発については、「7. 研究成果の発表状況 (1) 誌上発表<論文(査読あり)>」の 5) ならびに 4) の論文において公表済みである。甲殻類用プライマーの開発については現在論文を投稿中である。

3. 研究開発方法

魚類を対象に設計した MiFish プライマーが、一部の哺乳類と鳥類を検出できることが判っていたため、これら二つの分類群に対しては MiFish プライマーを最適化することで対処した。甲殻類については、ミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子内部に上記の条件 (保存的領域を両端にもつ 200 bp 未満の超可変領域) を満たす領域が見当たらなかったため、16S rRNA 遺伝子にまで対象を広げて探索を行った。

3-(1) 哺乳類用プライマー MiMammal の開発

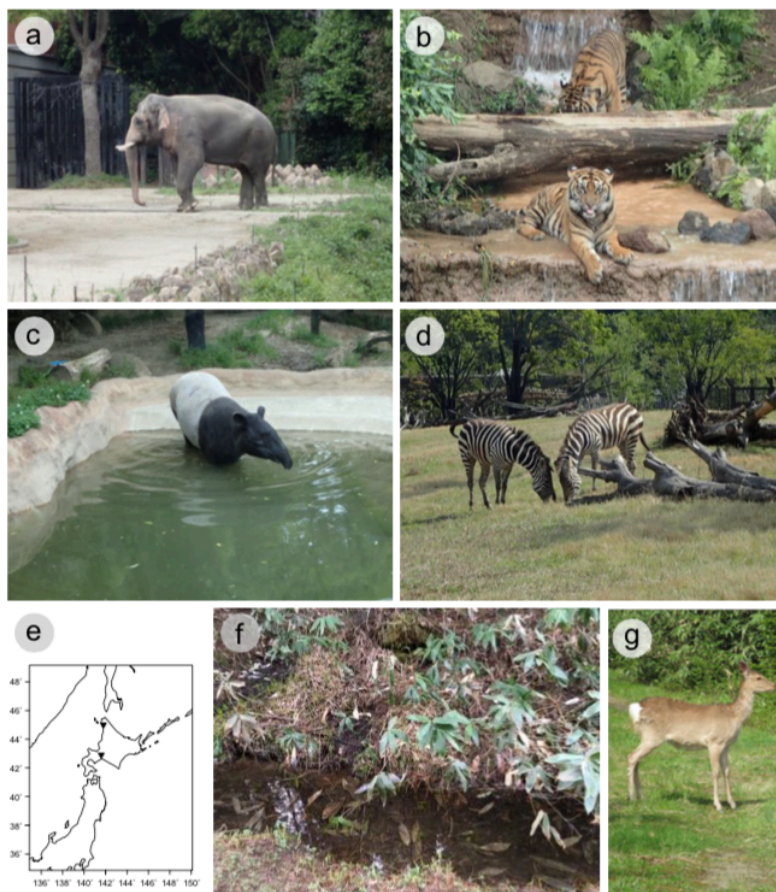
3-(1)-1. プライマーの設計: MiFish プライマーを哺乳類に最適化するため、2015 年 7 月 9 日現在で登録されていた哺乳類のミトコンドリアゲノム (ミトゲノム) 全長配列 741 件を FASTA 形式でダウンロードした。これら 741 件の配列に対して MAFFT[®] を用いた多重アラインメントを行い、Mesquite ver. 3.5 (<http://www.mesquiteproject.org>) で整列した塩基配列を可視化した。MiFish プライマー配列と MiFish 配列に相同な領域を Mesquite の検索機能により見だし、Show Selection Summary Strip 機能を用いて各座位の塩基組成をスプレッドシートに記録した。プライマーの設計にあたっては、① 3' 末端にテンプレートとの結合を強めるために C/G を入れるが、② 3' 末端に C/G が連続することは避け、③ A-G や C-T ペアより結合力が弱い T-G ペアをうまく利用することでプライマー設計の柔軟性を高め、④ 全体の G/C 含量が 40~60% に収まるようにした。

3-(1)-2. コンピュータを用いたプライマーの性能検証: 上記 741 件の配列から抜き出した MiFish 配列部分 (以下 MiMammal 配列) の種間変異を、ペアワイズの編集距離 (2 本の配列を比較して一方から他方に変化するのに必要な最小変化数) による総当たりで比較した。

3-(1)-3. 組織 DNA を用いたプライマーの性能検証：哺乳類の全多様性を網羅する 24 種（表(3)-1）の組織から抽出した DNA を用いて、新たに設計した MiMammal プライマーの性能を検証した。抽出 DNA はミリ Q 水を用いて 15 ng/ μ L に調整して PCR のテンプレートとした。PCR の反応溶液量は 15 μ L で、4.5 μ L のミリ Q 水、7.5 μ L の Gflex バッファー（Takara）、各プライマーを 0.7 μ L ずつ（5 μ M）、0.3 μ L の Taq ポリメラーゼを含む。PCR の温度設定とサイクル数は以下の通り：最初に 94°C で 1 分間の変性反応を挿入し、その後に 98°C で 10 秒間の変性反応、50°C で 10 秒間のアニーリング、68°C で 10 秒間の伸長反応を 30 回繰り返す、最後に 68°C の伸長反応を 7 分間挿入した。PCR 産物を ExoSAPIT（USB 社）で精製した後、BigDye Terminator v1.1（サーモフィッシャー社）を用いたサイクルシーケンス反応を付属のマニュアルに従って行った。サイクルシーケンス反応産物をエタノール精製した後 TE バッファーで融解し、ABI3130x1（ABI 社）で泳動して塩基配列を決定した。

表(3)-1 組織 DNA を抽出した哺乳類 24 種のリスト

番号	目名	科名	和名
1	オポッサム目	オポッサム科	オポッサム
2	イワダヌキ目	イワダヌキ科	ケープハイラックス
3	長鼻目	ゾウ科	アジアゾウ
4	長鼻目	ゾウ科	アフリカゾウ
5	カイギュウ目	ジュゴン科	ジュゴン
6	ツチブタ目	ツチブタ科	ツチブタ
7	アフリカトガリネズミ目	テンレック科	ヒメハリテンレック
8	被甲目	アルマジロ科	ミツオビアルマジロ
9	有毛目	アリクイ科	オオアリクイ
10	登木目	ツバイ科	コモンツバイ
11	食肉目	ネコ科	ネコ
12	有毛目	アリクイ科	ミナミコアリクイ
13	食肉目	イタチ科	ラッコ
14	食肉目	イタチ科	カワウソ
15	鯨偶蹄目	ナガスクジラ科	ミンククジラ
16	鯨偶蹄目	ナガスクジラ科	イワシクジラ
17	鯨偶蹄目	ナガスクジラ科	ニタリクジラ
18	鯨偶蹄目	ウシ科	ウシ
19	鯨偶蹄目	ウシ科	ヒツジ
20	鯨偶蹄目	マイルカ科	マダライルカ
21	鯨偶蹄目	マッコウクジラ科	マッコウクジラ
22	鯨偶蹄目	イノシシ科	イノシシ
23	翼手目	オオコウモリ科	クビワオオコウモリ
24	奇蹄目	ウマ科	ウマ



図(3)-1 MiMammal プライマーの検証にあたって対象とした哺乳類の一部 (a~d はゾウラシアで飼育されている哺乳類；g は北海道のニホンジカ) と採水現場。a) アジアゾウ；b) トラ；c) マレーバク；d) シマウマ；e) 北海道における採水地点；f) 採水を行った池；g) ニホンジカ。

3-(1)-4. 環境 DNA を用いたプライマーの性能検証：MiMammal プライマーが、環境 DNA メタバーコーディングに使えるかどうかを検証するため、動物園と野外フィールドでサンプリングを行った。動物園には、世界の哺乳類を 100 種以上飼育している「よこはま動物園ズーラシア」（神奈川県横浜市）を選び（図(3)-1），以下の哺乳類を飼育している 10 のケージで飲み水を採取した：ミナミアフリカオットセイ、クロサイ、アジアゾウ、ニホンザル、アカカンガルー、ライオン、トラ、マレーバク、ホッキョクグマ、シマウマ、キリン、チータ、エランド。また、野外フィールドには北海道大学が所有する天塩演習林ならびに苫小牧演習林にある池と川を選んだ（図(3)-1e）。なお、設計した MiMammal プライマーが、アジアゾウとホッキョクグマから得られた環境 DNA に対する増幅効率が劣ったため、新たに両者の配列に最適化したプライマー、MiMammal-E と MiMammal-B を作成した。

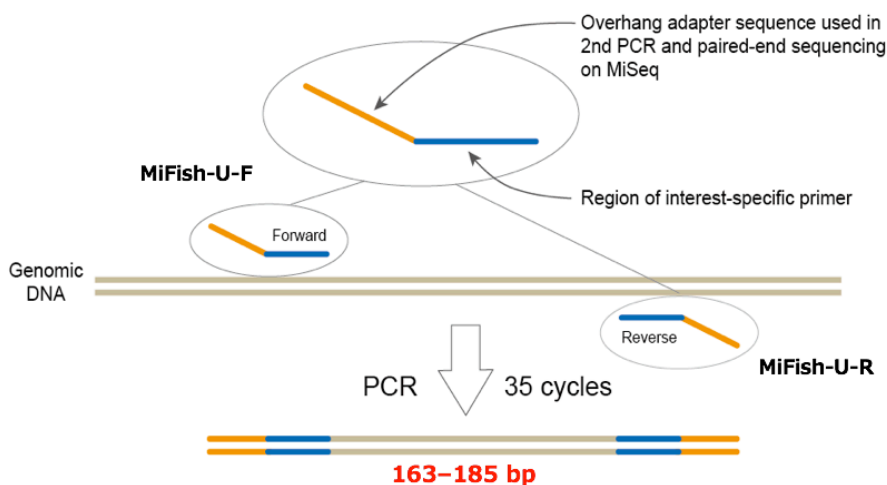
3-(1)-5. 環境 DNA の抽出：採取した環境水を実験室に持ち帰り、直径 47 mm のグラスファイバー製フィルター（孔径 0.7 μm ；Whatman 社）を用いてアスピレータによる吸引ろ過を行った。ろ過を終えたフィルターは直ちに -20°C で凍結した。フィルター上に集められた DNA は、DNeasy Blood and Tissue Kit（キアゲン社）を用いて Miya et al.¹⁾ に記された方法に従って抽出した。

3-(1)-6. ペアエンドライブラリの調整とシークエンス：以下に記す二段階 PCR を行うことにより、微量な環境 DNA から哺乳類特異的な断片を増幅すると共に、断片の両端に 3 種類のアダプターを付加した。第一段階の PCR（以下 1st PCR）の概要を以下の模式図に示す（図(3)-2）。

1st PCR では、MiMammal プライマーの 5' 末端に 6 個の N（A/C/G/T の何れかの塩基をランダムに割り当て

た配列) とシーケンスプライマー配列を付加した以下のプライマーを用いた。6 個の N を用いるのは、MiSeq でシーケンスを行う際にフローセル上に形成されるのクラスターの分離を良くして質の高いデータを得るためである。

1st PCR : 超可変領域の増幅とシーケンシングプライマー配列の付加



図(3)-2 ライブラリ調整の第一段階である 1st PCR の模式図。実際の PCR には用いないシーケンスプライマー配列 (2nd PCR の際のプライマー結合サイトとしても使われる) をプライマーの 5' 末端に付加して PCR を行う。テンプレートである環境 DNA に含まれる魚類 DNA の濃度が不明のため、サイクル数は通常の PCR より多い 35 サイクルを目安として行う。

MiMammal-U-F : ACACCTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTNNNNNNGGGTTGGTAAATTCGTGCCAGC

MiMammal-U-R : GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTNNNNNNCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG

MiMammal-E-F : ACACCTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTNNNNNNGGACTGGTCAATTCGTGCCAGC

MiMammal-E-R : GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTNNNNNNCATAGTGAGGTATCTAATCTCAGTTTG

MiMammal-B-F : ACACCTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTNNNNNNGGGTTGGTAAATTCGTGCCAGC

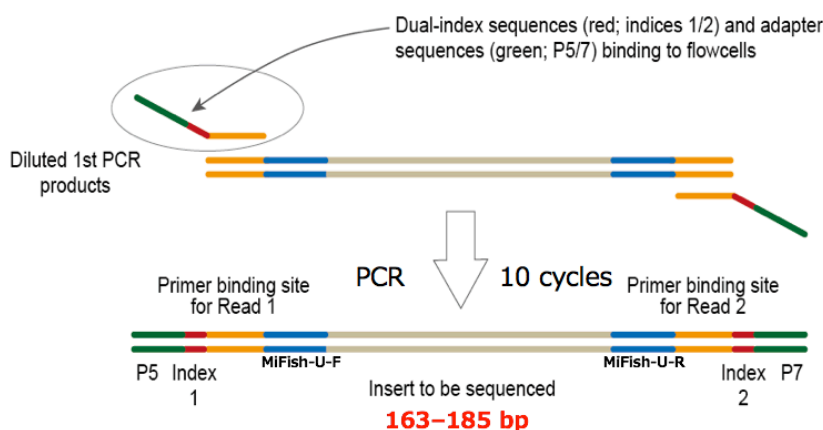
MiMammal-B-R : GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTNNNNNNCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG

1st PCR のチューブ 1 本当当たりの反応溶液量は 12 μ L で、6.0 μ L の 2 \times KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems 社) , 各プライマーを 0.7 μ L ずつ (5 μ M) , 2.6 μ L のミリ Q 水に 2.0 μ L のテンプレートを含み。マルチプレックス (複数のプライマーを混合) で 1st PCR を行う場合は、各プライマーの最終濃度を 0.1 μ M に調整して合計の最終濃度が 0.6 μ M になるようにした。

1st PCR の温度設定とサイクル数は以下の通り : 最初に 95 $^{\circ}$ C で 3 分間の変性反応を挿入し、その後に 98 $^{\circ}$ C で 20 秒間の変性反応、65 $^{\circ}$ C で 15 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 15 秒間の伸長反応を 35 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C の伸長反応を 5 分間挿入した。得られた 1st PCR 産物から余剰のアダプターダイマー・モノマーを取り除くために Exo-SAPIT を用い、精製を終えた 1st PCR 産物はミリ Q 水で 10 倍に希釈して第二段階の PCR (以下 2nd PCR) のテンプレートとして用いた。

2nd PCR の概要を以下の模式図に示す (図(3)-3) 。2nd PCR では、インデクス配列 (以下に示す 8 文字の X) とフローセル結合セル配列を付加することが大きな目的となる (したがってテンプレートを増幅しなくても良い) 。これら二つのアダプター付加にあたっては、1st PCR で付加したシーケンスプライマー配列をプライマー結合領域として利用する。

2nd PCR : インデクスとフローセル結合配列の付加 (増幅は不要)



図(3)-3 ライブラリ調整の第二段階である 2nd PCR の模式図。実際の PCR には用いないインデクス配列とフローセル結合配列をプライマーの 5' 末端に付加して PCR を行う。テンプレートにアダプターを付加することが目的なのでサイクル数は 10~15 と少なくする。

2nd PCR-F : AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXXXXACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT

2nd PCR-R : CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXXXXGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT

2nd PCR のチューブ 1 本当たりの反応溶液量は 24 μ L で、12 μ L の 2 \times KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems 社)、各プライマーを 1.4 μ L ずつ (5 μ M)、7.2 μ L のミリ Q 水に 2.0 μ L のテンプレートを含む。各サンプルごとに、異なるインデクス配列をもつプライマーを組み合わせることで 2nd PCR を行うことにより、同時並列分析を可能にした。

2nd PCR の温度設定とサイクル数は以下の通り：最初に 95 $^{\circ}$ C で 3 分間の変性反応を挿入し、その後に 98 $^{\circ}$ C で 20 秒間の変性反応、65 $^{\circ}$ C で 15 秒間のアニーリングと伸長反応を合わせたシャトル PCR を 12 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C の伸長反応を 5 分間挿入した。2nd PCR のサイクル数が 1st PCR と比べて少ないのは、2nd PCR の主な目的がアダプターの付加にあるためである。

インデクス配列が付加された 2nd PCR 産物をプールし、まとめて GeneRead Size Selection Kit (キアゲン社) を用いた精製を行った。精製済み 2nd PCR 産物を E-Gel SizeSelect (サーモフィッシャー社) を用いた電気泳動を行い、ターゲットとなる約 370 bp のサイズのバンドを切り出した。切り出した 2nd PCR 産物は、Qubit dsDNA HS assay kit と Qubit fluorometer (サーモフィッシャー社) を用いて定量し、ミリ Q 水で 2 nM に調整した。

ろ過、抽出、1st PCR、2nd PCR の各段階にネガティブコントロールを入れ、上記の実験プロセスでサンプルを処理することにより、外部由来の DNA が実験系に混入していないか判断した。

2 nM に調整したライブラリを、イルミナ社の試薬キット MiSeq Reagent Kit Nano v2 2 \times 150 bp PE に付属の HT1 バッファーで 12 pM に希釈し、MiSeq によるペアエンドシーケンスに用いた。なお、ペアエンドシーケンスでは、ライブラリ両端に付加されたシーケンスプライマーの 3' 末端から内部に向かって塩基配列を読み進めていく。実際には、フォワード側から 1 塩基ずつダイターミネート反応を行い塩基配列の解読を進め、それを 151 サイクル繰り返す。次にフォワード側のインデクスとリバース側のインデクスを同様の手法で読みとる (8 サイクルずつ)。最後にリバース側から同様の塩基配列の解読を進め、それを 151 サイクル繰り返す。こうすることによって、ライブラリの両端 (ペアエンド) から塩基配列を決定できることになり、今回のライブラリのサイズ (プライマー配列を加えると約 220 bp) だと、その中央部を両側から 50 bp

ほど重複して読めることになる。

3-(1)-7. データの一次処理と分類群の割り当て : Miya et al.¹⁾ で公表された解析パイプラインを用いてデータの一次処理と分類群の割り当てを行った。その概要は以下の通りである。① 信頼度が低いリード末端の配列を削除 ; ② 末端が削除されたペアエンドリードを連結 ; ③ 連結部にミスマッチを含むリードを除去 ; ④ 想定外の長さのものを除去 ; ⑤ プライマー配列の除去。

これらの一次処理を経た高品質のリードは、以下の分類群の割り当てに用いられることになる。分類群の割り当ての概要は以下のようになる。① 大量にある同一配列を「代表配列+リード数」の情報に集約して FASTA 形式のファイルにする ; ② 10 本以上の同一配列をもつリードのみを下流の解析に用いると共に、これらの配列に 99% 以上の一致率で類似する 10 本未満のリードは、その配列と同一のものとしてリード数を足し合わせて下流の解析に用いる ; ③ 以上の手順で処理されたデータを BLASTN 検索を用いて分類群の割り当てを行う。検索にあたっては、NCBI からダウンロードしたデータから作成したカスタムデータベース (1,881 種の哺乳類を含む) を用いた ; ④ 一致率 97% 以上のリードを該当する種とみなした ; ⑤ 一致率 97% 未満のリードについては、別途系統樹を作成するなどして分類群の割り当てを行った。

(2) 鳥類用プライマー MiBird の開発

3-(2)-1. プライマーの設計 : MiFish プライマーを鳥類に最適化するため、2015 年 7 月 9 日現在で登録されていた鳥類のミトコンドリアゲノム (ミトゲノム) 全長配列 410 件を FASTA 形式でダウンロードした。プライマー設計の方法については哺乳類のもの ((1)-1) に準じた。

(2)-2. コンピュータを用いたプライマーの性能検証 : 上記 410 件の配列から抜き出した MiFish 配列部分 (以下 MiBird 配列) の種間変異を、ペアワイズの編集距離 (2 本の配列を比較して一方から他方に変化するのに必要な最小変化数) による総当たりで比較した。

3-(2)-3. 組織 DNA を用いたプライマーの性能検証 : 鳥類全体の多様性を広く網羅する 22 種 (表(3)-2) の組織から抽出した DNA を用いて、新たに設計した MiBird プライマーの性能を検証した。実験方法については哺乳類のもの ((1)-3) に準じた。

3-(2)-4. 環境 DNA を用いたプライマーの性能検証 : MiBird プライマーが、環境 DNA メタバーコーディングに使えるかどうか検証するため、動物園と野外フィールドでサンプリングを行った。動物園には、世界の動物を 100 種以上飼育している「よこはま動物園ズーラシア」(神奈川県横浜市) を選び、以下の鳥類を飼育している 13 のケージの飲み水を採取した : オオワシ, ウミネコ, ヨーロッパオオライチョウ, ヒメウヅラ, アカツクシガモ, ベニジュケイ, オウギバト, オシドリ, フンボルトペンギン, シロフクロウ, コウノトリ, マナヅル, クロヅル, ナミコブジサイチョウ, モモアカノスリ, エミュー。また、野外フィールドには千葉県立中央博物館に隣接する生態園の舟田池を選んだ (図(3)-4)。

3-(2)-5. 環境 DNA の抽出 : 哺乳類で採用した方法 ((1)-5) に準じて環境 DNA を抽出した。

3-(2)-6. ペアエンドライブラリの調整とシーケンス : 哺乳類で採用した方法 ((1)-6) に準じてライブラリを調整すると共に、MiSeq による超並列シーケンスを行った。

3-(2)-7. データの一次処理と分類群の割り当て : 哺乳類で採用した方法 ((1)-7) に準じてデータの一次処理と分類群の割り当てを行った。なお、使用したデータベースは全脊椎動物のミトゲノム全長配列をダウンロードして該当領域を切り出したもので 1,881 種を含む。

表(3)-2 組織 DNA を抽出した鳥類 22 種のリスト

番号	目名	科名	和名
1	カモ目	カモ科	カルガモ
2	ヨタカ目	ヨタカ科	ヨタカ
3	チドリ目	ウミスズメ科	ウミスズメ
4	チドリ目	チドリ科	メダイチドリ
5	ハト目	ハト科	キジバト
6	カッコウ目	カッコウ科	ホトトギス
7	タカ目	タカ科	オオタカ
8	ハヤブサ目	ハヤブサ科	チョウゲンボウ
9	キジ目	キジ科	コジユケイ
10	アビ目	アビ科	アビ
11	ツル目	ツル科	タンチョウ
12	スズメ目	カラス科	ハシブトガラス
13	スズメ目	スズメ科	スズメ
14	ペリカン目	サギ科	ゴイサギ
15	ペリカン目	ペリカン科	モモイロペリカン
16	カツオドリ目	ウ科	カワウ
17	キツツキ目	キツツキ科	コゲラ
18	カイツブリ目	カイツブリ科	カイツブリ
19	ミズナギドリ目	ミズナギドリ科	ノドシロクロミズナギドリ
20	ミズナギドリ目	ミズナギドリ科	オナガミズナギドリ
21	ペンギン目	ペンギン科	オウサマペンギン
22	ペンギン目	ペンギン科	フンボルトペンギン



図(3)-3 サブテーマ代表者が所属する千葉県立中央博物館の舟田池。右側に見えるのは野鳥観察舎で、舟田池を訪れる野鳥を四季を通じて観察できるようになっている。

(3) 十脚甲殻類用プライマーMiDecaの開発

以下、研究成果の内容を含む論文が投稿中であるため概要のみを記す。

3-(3)-1. プライマーの設計: データベースに登録されていた甲殻類のミトコンドリアゲノム(ミトゲノム) 全長配列 267 件を FASTA 形式でダウンロードした(2017年10月17日現在)。プライマー設計の方法については哺乳類のもの((1)-1)に準じた。ミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子には、両脇に保存的領域をもつ 200 bp 未満の超可変領域が見当たらなかったため、同ゲノムの 16S rRNA 遺伝子を対象に探索を進めた。

3-(3)-2. コンピュータを用いたプライマーの性能検証: 設計したプライマーで増幅される配列部分(以下 MiDeca 配列)の種間変異を、ペアワイズの編集距離(2本の配列を比較して一方から他方に変化するための最小変化数)を用いて総当たりで比較した。

3-(3)-3. 組織 DNA を用いたプライマーの性能検証: 甲殻類全体の多様性を広く網羅する 250 種の組織から抽出した DNA を用いて、新たに設計した MiDeca プライマーの性能を検証した。実験方法については哺乳類のもの((1)-3)に準じた。

3-(3)-4. 環境 DNA を用いたプライマーの性能検証: MiDeca プライマーが環境 DNA メタバーコーディングに使えるかどうか検証するため、館山湾坂田の地先で天然環境水を採取しステリベクスフィルターカートリッジ(メルク・ミリポア社)と 50 mL のシリンジ(テルモ社)を用いた現場ろ過を行った。

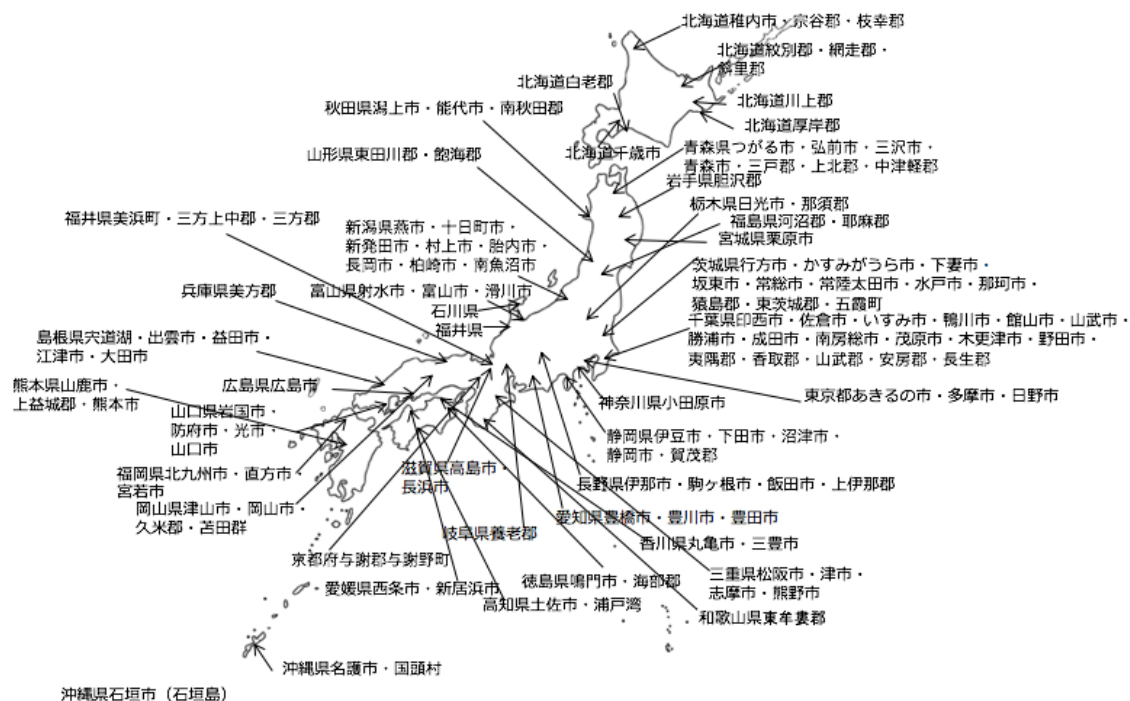
3-(3)-5. 環境 DNA の抽出 : Miya et al.⁹⁾が開発した手法を用いてステリベクスから DNA を抽出した。

(3)-6. ペアエンドライブラリの調整とシーケンス : 哺乳類で採用した方法 ((1)-6) に概ね準じたが、同じサンプルに対して 1st PCR を 8 繰り返し行い、その産物をプールして GeneRead Size Selection Kit (サーモフィシャー社) を用いた精製・濃縮を行った。精製・濃縮した 1st PCR 産物は、TapeStation を用いてアダプターダイマー・モノマーが除去されていることを確認し、ターゲットとなる 320 bp のバンドの定量を行いミリ Q 水で 0.1 ng/μL に希釈した。2nd PCR のサイクル数は 10 回に設定した。

3-(3)-7. データの一次処理と分類群の割り当て : データの一次処理と分類群の割り当てには USEARCH ver. 10¹⁰⁾を用い、UNOISE2 によりエラー配列 (次世代シーケンサに固有の DNA ポリメラーゼの塩基取り込みエラーに由来するエラー配列) とキメラ配列 (伸長反応の阻害等により異種の配列が組み合わさってしまった配列) の除去を行った。分類群の割り当てに用いたカスタムデータベースには計 27,236 配列が含まれ、これらは 167 科・1,135 属に位置づけられる 4,005 種の甲殻類を含む。

(4) 魚類リファレンス標本の収集とリファレンス配列の決定

3-(4)-1. 魚類標本の収集 : MiFish 法で用いるリファレンス配列の充実を図るため、北は北海道から南は沖縄まで日本全国の河川 (148 水系 360 地点) で魚類標本の採集を行った (図(3)-4)。魚類標本の採集にあたっては各都道府県の内水面漁業調整規則を遵守し、魚類標本の採集には規制の適用外となる小型の手網を用いた。



図(3)-4 本サブテーマで魚類標本の収集を行った 148 水系 360 地点を含む都道府県と郡市町村。

3-(4)-2. DNA 分析用組織サンプルの採取と保存 : 全長が 40 mm 未満の小型個体の場合には、現場においてバイアルに入れた 99.5%エタノールで魚体全体を保存した。全長 40~300 mm の中型個体の場合には、体右側の胸鰭か腹鰭を切り出し、バイアルに入れた 99.5%エタノールに保存すると共に、魚体本体は 70%エタノールを入れた標本瓶で保存した。全長が 300 mm を超える大型個体の場合には、中型個体と同様の方法で鰭を切り出し保存すると共に、現場で魚体の写真を撮った。その後、撮影個体の回復を確認してから元の生息場所に放した。組織ならびに魚類標本は、採集者が千葉県立中央博物館に持ち帰った。

3-(4)-3. 標本の同定と登録 : 博物館に持ち帰った標本については、各種の資料に基づく種の同定を行った。

種の同定を終えた標本は、70%エタノール液に入れて博物館標本として登録した。

(4)-4. DNA の抽出：博物館に持ち帰った組織片（中型・大型個体）から、あるいは小型個体の場合は博物館で切り出した組織片から、DNeasy Blood and Tissue Kit（キアゲン社）を用いて付属のマニュアルに従い DNA を抽出した。抽出 DNA の濃度を分光光度計 NanoDrop Lite（サーモフィッシャー社）を用いて測定し、ミリ Q 水を用いて 15 ng/μL に希釈して MiFish 配列決定のためのテンプレートとした。

3-(4)-5. MiFish 配列の増幅：PCR のチューブ 1 本当たりの反応溶液量は 15 μL で、4.5 μL のミリ Q 水、7.5 μL の Gflex バッファー（Takara）、各プライマーを 0.7 μL ずつ（5 μM）、0.3 μL の Taq ポリメラーゼを含む。PCR の温度設定とサイクル数は以下の通り：最初に 94°C で 1 分間の変性反応を挿入し、その後 98°C で 10 秒間の変性反応、50°C で 10 秒間のアニーリング、68°C で 10 秒間の伸長反応を 30 回繰り返す、最後に 68°C の伸長反応を 7 分間挿入した。

3-(4)-6. サンガー法による MiFish 配列決定：PCR 産物を ExoSAPIT（USB 社）で余剰 dNTP とプライマーを除いた。精製した二本鎖 DNA をテンプレートに、BigDye Terminator v1.1（サーモフィッシャー社）を用いたサイクルシーケンシングを行った。サイクルシーケンシングには、フォワードとリバースプライマーの両方を用いた。サイクルシーケンシング産物をエタノール精製した後、ABI3130xI（ABI 社）で泳動してフォワードとリバースの双方向から塩基配列を決定した。

(5) 両生類汎用プライマー MiAmphi の開発

以下、研究成果に関する論文を準備中であるため、概要を示す。

3-(5)-1. プライマーの設計：データベースに登録されていた両生類のミトコンドリアゲノム（ミトゲノム）全長配列及び部分配列をダウンロードし、16s RNA 遺伝子領域について現生の 3 目（有尾目、無尾目、無足目）すべてを含む 969 種の配列からなるデータセットを作成した。次に MAFFT による多重整列を行い、目視で保存的な領域に挟まれた可変領域を探索した。保存的な領域にプライマーを設計し、それぞれについて二次構造の有無をプログラムで確認した。

3-(5)-2. 高濃度 DNA 溶液を用いた PCR によるプライマーの選択：有尾目 2 種、無尾目 13 種、無足類 1 種の組織から粗全 DNA を抽出し、設計したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物はゲル電気泳動し、バンドパターンを確認した。予想された長さの DNA 断片が増幅されており、増幅対象ではない領域の増幅やダイマー等が認められないか軽微であるプライマーセットを選択した。

3-(5)-3. 増幅領域の種識別能の予測：設計・選択したプライマーで増幅される配列部分（プライマー部分は含まない）について、上述の 969 種の種間、属間、科間のペアワイズ編集距離（2 本の配列を比較して一方から他方に変化するための最小変化数）を総当たりで計算し、既存のプライマーセットと比較した。

3-(5)-4. 低濃度 DNA 溶液を用いたプライマーの増幅能の検証：3-(5)-2 で用いた両生類 16 種の DNA 溶液をそれぞれ 1 pg/μl に希釈し、混合した。1 チューブあたり、超純水 1.2 μl、2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix（KAPA Biosystems 社）6.0 μl、5 μM フォワード/リバースプライマーをそれぞれ 1.4 μl、混合 DNA 溶液 2.0 μl を加え、first PCR を行った。なお、first PCR は同じサンプルについて 8 本の独立した系で行い、8 つの first PCR 産物をプールして GeneRead Size Selection Kit（サーモフィッシャー社）により精製・濃縮した。濃縮済み first PCR 産物は TapeStation を用いて増幅を確認するとともに、アダプターダイマー・モノマーが除去されていることを確認し、標的とする産物と同じ長さを持つバンドを定量した。定量したサンプルは同一の濃度になるように希釈し、second PCR を行った。以上により調整したライブラリは MiSeq（Illumina 社）で配列決定した。

3-(5)-5. 環境 DNA を用いたプライマーの性能検証：MiAmphi プライマーが環境 DNA メタバーコーディングに使えるかどうか検証するため、両生類飼育施設の排水及び自然環境水を採水・ろ過し、MiAmphi プライマーで増幅した。ろ過はステリバクスターフィルターカートリッジ（メルク・ミリポア社）と 50 mL のシリンジ（テ

ルモ社)、もしくは一般的なグラスファイバーフィルターを用いて現場で行った。環境 DNA は Miya et al.⁹⁾ が開発した手法を直接または一部変形して用いてフィルター類から抽出した。ライブラリ調整及び配列決定は 3-(5)-4 と同じ方法で行った。

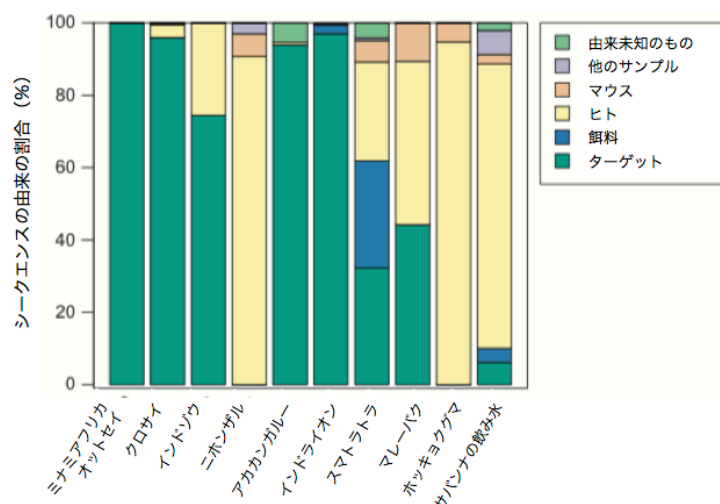
3-(5)-7. データの一次処理と分類群の割り当て: 哺乳類で採用した方法 ((1)-7) に準じてデータの一次処理と分類群の割り当てを行った。

4. 結果及び考察

(1) 哺乳類用プライマー MiMammal の開発

4-(1)-1. コンピュータと組織 DNA を用いたプライマー性能の検証: コンピュータ上コンピュータ上で MiMammal プライマーの性能を検証した結果, MiMammal-U-F の配列は 741 種の哺乳類の配列のうちの 516 種と完全一致し, MiMammal-U-R の配列は 676 種の配列と完全一致した。1 塩基違いのものを含めると, 両者はそれぞれ 92% と 99% に達するため, 哺乳類の 9 割以上の種を増幅できるのではないかと考えられた。幅広く哺乳類の多様性を網羅した 24 種 (表 (3)-1) の組織 DNA を用いた PCR では, すべての種について明瞭な増幅が認められ, MiMammal 配列を得ることができた。

4-(1)-2. 動物園から得られた環境 DNA を用いたプライマー性能の検証: ズーラシアから得られた 10 サンプルからライブラリを調整して次世代シーケンサ MiSeq による超並列分析を行った。その結果, 509, 497 リードが得られ, 各ケージに飼育されている 10 種の哺乳類を検出することができた (図 (3)-5)。一方, ヒトやマウスや餌など外部由来の DNA も数多く検出された。



図(3)-5 動物園サンプルから検出されたシークエンスの割合を色別に示した。横軸に記された哺乳類の名前は各ケージに飼育されていたもの。サバンナの飲み水は複数種が利用する (本文参照)。

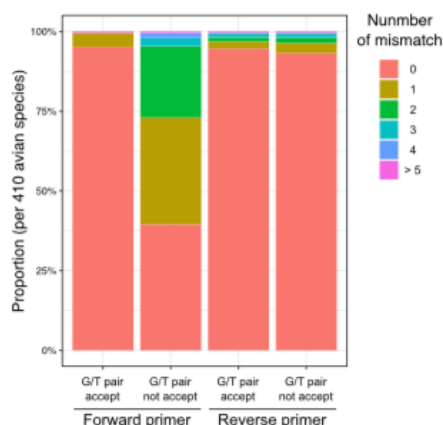
4-(1)-3. 天然環境水から得られた環境 DNA を用いたプライマー性能の検証: 手塩演習林ならびに苦小牧演習林内にある 2 箇所池の環境 DNA を用いてメタバーコーディングを行ったところ, ニホンジカ, ハツカネズミ, タイリクヤチネズミ, アライグマ, オオアシトガリネズミなど 5 種の哺乳類が検出された (表 (3)-3)。ニホンジカやアライグマのように目視が可能な哺乳類に加えて, ネズミ類など小型で目視が困難な哺乳類を検出できたことは, 今後の哺乳類環境 DNA の有効利用法の一つと考えられよう。

表(3)-3 北海道大学演習林の池で検出された哺乳類

種	天塩池1	天塩池2	苫小牧池1	苫小牧池2
ニホンジカ	0	0	19,452	1,306
ハツカネズミ	1,171	701	127	846
タイリクヤチネズミ	0	393	0	0
アライグマ	0	0	741	1,831
オオアシトガリネズミ	0	181	0	0
他のシークエンス	6,740	156	16,453	20,199

(2) 鳥類用プライマーMiBirdの開発

4-(1)-1. コンピュータと組織 DNA を用いたプライマー性能の検証：コンピュータ上コンピュータ上で MiBird プライマーの性能を検証した結果、MiBird-U-F の配列は 410 種の鳥類の配列のうちの 390 種(95.1%) と完全一致し、MiBird-U-R の配列は 388 種 (94.6%) の配列と完全一致した (図(3)-6)。1 塩基違いのものを含めると両者は 99% 近くに達するため、鳥類のほとんどの種を増幅できるのではないかと考えられた。幅広く鳥類の多様性を網羅した 22 種 (表(3)-2) の組織 DNA を用いた PCR では、すべての種について明瞭な増幅が認められ、MiBird 配列を得ることができた。また、MiBird 配列 410 種間の編集距離を総当たりで比較したところ、82,621 個のうち 82,177 個の距離が 5 以上となったため、十分な種間差があることが示された。



図(3)-6 MiBird プライマー配列と鳥類の配列との違い。G/T 結合を含めた場合、1 塩基違いを含めれば MiBird プライマー配列は 99% 以上の種と適合することがわかる。

4-(1)-2. 動物園から得られた環境 DNA を用いたプライマー性能の検証：ズーラシアから得られた 16 サンプルからライブラリを調整して次世代シーケンサ MiSeq による超並列分析を行った。その結果、656,472 リードが得られ、各ケージに飼育されている 16 種の鳥類すべてを検出することができた。一方、ヒトやマウスや餌など外部由来の DNA も数多く検出された。

4-(1)-3. 天然環境水から得られた環境 DNA を用いたプライマー性能の検証：千葉県立中央博物館の生態園内にある舟田池の環境 DNA を用いてメタバーコーディングを行ったところ、ハシビロガモ、ヨシガモ、バン、ツクシガモなどの一般的な水鳥に加えてヒヨドリの 5 種の鳥類が検出された。これらのことから、MiBird プライマーを用いて天然環境水からも鳥類を検出できると考えられた。

(3) 甲殻類用プライマーMiDecaの開発

甲殻類用プライマーMiDecaについては、研究結果を記した論文が投稿中のため、内容の詳細について記すことは差し控える。十脚甲殻類 250 種から抽出した組織 DNA からはすべて良好な PCR 産物が得られ、MiDeca 配列として国際データベースに登録した。また、館山湾坂田の地先礫で採取された環境水からは 40 種を超え

る十脚甲殻類が検出された。

(4) 魚類リファレンス標本の収集とリファレンス配列の決定

日本全国の 148 水系 360 地点で魚類の採集を行った結果、1,717 個体の標本を得ることができた。これら標本の同定を行った結果、47 科 113 属 236 種が含まれることがわかった。日本産淡水魚類（汽水種も含める）が約 300 種とすると、種数ではほぼ 80%を網羅できたことになる。これらの標本の中から重複種を除いて DNA を抽出し、サンガー法によって MiFish 配列を決定した。MiFish 配列を決定した種を 13 頁からの表(3)-4 に示す。

(5) 両生類汎用プライマーMiAmphi の開発

両生類汎用プライマーMiAmphi については、論文準備中につき、概要を示す。開発したプライマーは、脊椎動物全般を対象とした ecoPrimer やカエル類を対象とした batra と同程度もしくはより高い種識別能を持つと考えられた。組織から抽出した DNA の希釈混合物を用いたテストでは、得られた配列が使用した 16 種中 13 種（当該種もしくはその近縁種）に特定された。検出されなかった 3 種は無尾目だった。希釈混合物には含まれていない種も特定されたが、いずれもリード数がきわめて小さく、分析の過程で生じたアーティファクトもしくはコンタミネーションに由来する可能性が高いと考えられた。

飼育施設排水及び自然環境水を配列決定した結果、検出されたのはすべて無尾目であった。飼育施設排水からは 16 種が特定されたが、自然環境水からは 1-4 種のみが特定された。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 世界に先駆けて環境 DNA から哺乳類と鳥類を検出できる実験系を確立したこと。両者は水生生物ではないが、水辺や水上に暮らしたり餌を水中から獲るなどして陸水生態系への影響は極めて大きい一方、これまで効率的なモニタリング法が確立されてこなかった。とくに、森林のようなブラックボックス的な環境に生息する動物を水を介してモニタリングできるようになった科学的意義は大きい。

2) 世界に先駆けて環境 DNA から十脚甲殻類を検出できる実験系を確立したこと。エビやカニを含む十脚甲殻類は陸水生態系の主要構成要素であり、非侵襲的に彼らをモニタリングできる系を確立した科学的意義は大きい。

3) 日本産淡水魚のリファレンス配列を充実させたこと。本研究により 47 科 113 属 236 種にものぼる標本が収集され、既存の配列と合わせると日本産淡水魚の約 9 割以上を網羅したことになる。これは魚類環境 DNA メタバーコーディング（MiFish 法）における種判定の精度を著しく向上させるもので大きな科学的意義をもつ。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

1) 環境省では「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」を開いている。この検討会の開催にあたっては有識者として環境省の事務局と実験マニュアルやリファレンスデータベースに関して情報交換を行っており、本サブテーマの成果が既に活用されている。

2) 国土交通省では「環境 DNA の河川事業への適用を目指した共同研究に着手 -水をすくって川の生き物を特定-」とする報道発表を平成 30 年 4 月 24 日に行い、土木研究所と民間会社が共同研究（平成 30～32 年）を行うことを発表した。国交省ならびに民間会社とは、実験マニュアルやリファレンスデータベースに関して情報交換を行っており、本サブテーマの成果が既に活用されている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

1) 環境省では上記の絶滅危惧種を対象にした調査に加え、小笠原諸島・西之島や小笠原沖の深海生態系

のモニタリングに環境 DNA の活用を考えているため、本研究成果の活用が欠かせない。

2) 国土交通省では上記の技術開発を「河川水辺の国勢調査」に取り込むことを考えているので、本研究成果の活用は必須となる。

3) 水産庁では平成 31 年度水産予算概算要求の資料で「スマート水産業推進事業」を掲げており、その中で環境 DNA 解析の技術を取り入れ、資源変動要因や環境変化の解析を行うとともに、解析データを蓄積し、資源評価に活用するためのデータベースを構築すると明記している。したがって、本研究成果が鯨や水鳥に加えて十脚甲殻類の資源評価に使われる可能性が高い。

表(3)-4 全国 148 水系 360 地点から得られた魚類リスト。

科名	和名	採集日	都道府県	科名	和名	採集日	都道府県
ヤツメウナギ科	カワヤツメ	20161020	山形	コイ科	ウグイ	20170425	北海道
ヤツメウナギ科	シベリアヤツメ	20170423	北海道	コイ科	ウグイ	20170425	北海道
ヤツメウナギ科	シベリアヤツメ	20170502	北海道	コイ科	ウグイ	20170425	北海道
ヤツメウナギ科	スナヤツメ(南方集団)	20170720	新潟	コイ科	ウグイ	20170430	北海道
ヤツメウナギ科	スナヤツメ(北方集団)	20160916	千葉	コイ科	ウグイ	20170430	北海道
ヤツメウナギ科	スナヤツメ(北方集団)	20160916	千葉	コイ科	ウグイ	20170417	北海道
ヤツメウナギ科	スナヤツメ(北方集団)	20171100	富山	コイ科	ウグイ	20170417	北海道
ヤツメウナギ科	スナヤツメ(北方集団)	20180315	福島	コイ科	ウグイ	20170419	北海道
ウナギ科	オオウナギ	20180625	沖縄	コイ科	ウグイ	20170423	北海道
ウナギ科	ニホンウナギ	20160820	愛知	コイ科	ウグイ	20170502	北海道
サケ科	アマゴ	20160614	長野	コイ科	ウグイ	20180928	新潟
サケ科	アマゴ	20160827	鳥根	コイ科	エソウグイ	20161022	青森
サケ科	アメマス	20170417	北海道	コイ科	エソウグイ	20170423	北海道
サケ科	オショロコマ	20170501	北海道	コイ科	オイカフ	20160819	愛知県ほか
サケ科	ゴギ	20160827	鳥根	コイ科	オイカフ	20171019	福岡
サケ科	サクラマス	20170419	北海道	コイ科	オイカフ	20180928	新潟
サケ科	サクラマス	20170423	北海道	コイ科	オイカフ	20160819	静岡
サケ科	ニッコウイワナ	20160706	長野	コイ科	オオキンブナ	20180829	愛媛
サケ科	ニッコウイワナ	20180719	山形	コイ科	カゼトゲタナゴ	20171017	熊本
サケ科	ニッコウイワナ	20180719	山形	コイ科	カマツカ	20160614	長野
サケ科	ブラウントラウト	20170502	北海道	コイ科	カマツカ	20160824	岡山
サケ科	ヤマトイワナ	20160615	長野	コイ科	カマツカ	20160821	滋賀
サケ科	ヤマトイワナ	20160615	長野	コイ科	カマツカ	20160823	京都
サケ科	ヤマメ	20170201	神奈川県	コイ科	カマツカ	20171013	広島
サケ科	ヤマメ	20180719	山形	コイ科	カマツカ	20171013	山口
サケ科	ヤマメ	20180719	山形	コイ科	カマツカ	20171013	山口
キュウリウオ科	キュウリウオ	20170501	北海道	コイ科	カマツカ	20171015	福岡
キュウリウオ科	アユ	20160614	長野	コイ科	カマツカ	20171016	熊本
キュウリウオ科	アユ	20160822	福井	コイ科	カマツカ	20171017	熊本
キュウリウオ科	アユ	20160810	千葉	コイ科	カマツカ	20171110	福井
キュウリウオ科	アユ	20161019	新潟	コイ科	カマツカ	20160916	千葉
キュウリウオ科	アユ	20161020	山形	コイ科	カマツカ	20160930	東京
キュウリウオ科	アユ	20160821	滋賀	コイ科	カマツカ	20161018	新潟
キュウリウオ科	アユ	20181024	三重	コイ科	カマツカ	20161020	山形
コイ科	アカヒレタビラ	20161007	茨城	コイ科	カマツカ	20161022	青森
コイ科	アブラハヤ	20160614	長野	コイ科	カマツカ	20161107	茨城
コイ科	アブラハヤ	20160819	静岡	コイ科	カマツカ	20171012	岡山
コイ科	アブラハヤ	20160821	滋賀	コイ科	カマツカ	20180830	愛媛
コイ科	アブラハヤ	20160930	東京	コイ科	カマツカ	20181022	三重
コイ科	アブラハヤ	20161017	新潟	コイ科	カマツカ	20181023	三重
コイ科	アブラハヤ	20161019	新潟	コイ科	カフムツ	20160825	鳥根
コイ科	アブラハヤ	20161020	山形	コイ科	カフムツ	20170201	静岡
コイ科	アブラハヤ	20161019	新潟	コイ科	カフムツ	20180829	愛媛
コイ科	アブラハヤ	20170202	静岡	コイ科	ギンブナ	20160627	茨城
コイ科	アブラハヤ	20180719	山形	コイ科	ギンブナ	20180628	沖縄
コイ科	アブラハヤ	20181024	三重	コイ科	ギンブナ	20180828	高知
コイ科	アブラハヤ	20180928	新潟	コイ科	ギンブナ	20180829	愛媛
コイ科	アブラボテ	20160824	岡山	コイ科	ギンブナ	20180928	新潟
コイ科	アブラボテ	20171016	熊本	コイ科	ゲンゴロウブナ	20180828	高知
コイ科	イチモンジタナゴ	20171018	熊本	コイ科	コイ	20180826	高知
コイ科	イトモロコ	20171016	熊本	コイ科	コイ	20180825	徳島
コイ科	イトモロコ	20171014	山口	コイ科	コイ	20180928	新潟
コイ科	ウグイ	20161022	青森	コイ科	コウライモロコ	20160824	岡山
コイ科	ウグイ	20170423	北海道	コイ科	コウライモロコ	20160820	愛知
コイ科	ウグイ	20170425	北海道	コイ科	スゴモロコ	20171018	熊本
コイ科	ウグイ	20170425	北海道	コイ科	スゴモロコ	20180825	徳島

表(3)-4 つづき

科名	和名	採集日	都道府県	科名	和名	採集日	都道府県
コイ科	スゴモロコ	20180825	徳島	ドジョウ科	ドジョウ	20161020	山形
コイ科	スゴモロコ	20180928	新潟	ドジョウ科	ドジョウ	20161020	山形
コイ科	ゼブラダニオ	20180630	沖縄	ドジョウ科	ドジョウ	20161022	青森
コイ科	タイリクバラタナゴ	20160821	滋賀	ドジョウ科	ドジョウ	20161022	青森
コイ科	タイリクバラタナゴ	20170320	千葉	ドジョウ科	ドジョウ	20161022	青森
コイ科	タカハヤ	20160824	岡山	ドジョウ科	ドジョウ	20161023	青森
コイ科	タカハヤ	20160823	京都	ドジョウ科	ドジョウ	20170202	静岡
コイ科	タカハヤ	20170201	神奈川県	ドジョウ科	ドジョウ	20171108	富山
コイ科	タカハヤ	20171107	新潟	ドジョウ科	ドジョウ	20160916	千葉
コイ科	タカハヤ	20180829	愛媛	ドジョウ科	ドジョウ	20161021	秋田
コイ科	タモロコ	20160819	愛知	ドジョウ科	ドジョウ	20170502	北海道
コイ科	タモロコ	20160825	鳥取	ドジョウ科	ドジョウ	20171012	岡山
コイ科	タモロコ	20180829	愛媛	ドジョウ科	ドジョウ	20171016	熊本
コイ科	タモロコ	20180928	新潟	ドジョウ科	ドジョウ	20171107	富山
コイ科	ツチフキ	20170306	茨城	ドジョウ科	ドジョウ	20180315	福島
コイ科	ツチフキ	20160629	千葉	ドジョウ科	ドジョウ	20180316	福島
コイ科	ツチフキ	20170320	千葉	ドジョウ科	ドジョウ	20180317	栃木
コイ科	ツチフキ	20160916	千葉	ドジョウ科	ドジョウ	20180317	栃木
コイ科	ツチフキ	20171012	岡山	ドジョウ科	ドジョウ	20180825	徳島
コイ科	ニゴイ	20171110	福井	ドジョウ科	ドジョウ	20170502	北海道
コイ科	ニゴイ	20180825	徳島	ドジョウ科	ドジョウ	20170430	北海道
コイ科	ニゴイ	20180928	新潟	ドジョウ科	ドジョウ	20181023	三重
コイ科	ニッポンバラタナゴ	20171016	熊本	ドジョウ科	ナガレホトケドジョウ	20160824	岡山
コイ科	ニッポンバラタナゴ	20171016	熊本	ドジョウ科	ニシシマドジョウ	20160614	長野
コイ科	ヌマムツ	20160821	滋賀	ドジョウ科	ニシシマドジョウ	20161018	新潟
コイ科	ヒガイ	20160821	滋賀	ドジョウ科	ニシシマドジョウ	20171108	富山
コイ科	フナ属不明種	20180825	徳島	ドジョウ科	ニシシマドジョウ	20171110	福井
コイ科	ムギツク	20160824	岡山	ドジョウ科	ヒガシシマドジョウ	20160930	東京
コイ科	モツゴ	20160614	長野	ドジョウ科	ヒナイシドジョウ	20180829	愛媛
コイ科	モツゴ	20160819	愛知	ドジョウ科	フクドジョウ	20161020	山形
コイ科	モツゴ	20161021	秋田	ドジョウ科	ホトケドジョウ	20160916	千葉
コイ科	モツゴ	20180928	新潟	ドジョウ科	ホトケドジョウ	20161020	山形
コイ科	ヤチウグイ	20170423	北海道	ドジョウ科	ヤマトシマドジョウ	20171014	山口
コイ科	ヤリタナゴ	20160629	千葉	ドジョウ科	ヤマトシマドジョウ	20171014	山口
コイ科	ヤリタナゴ	20160821	滋賀	ドジョウ科	ヤマトシマドジョウ	20171014	山口
コイ科	ヤリタナゴ	20161216	岡山	タニノボリ科	ギギ	20180827	高知
コイ科	ヤリタナゴ	20171017	熊本	ナマズ科	ナマズ	20160614	長野
コイ科	ヤリタナゴ	20171109	石川	ナマズ科	ナマズ	20180831	香川
コイ科	ヤリタナゴ	20180825	徳島	アカザ科	アカザ	20160930	東京
コイ科	ヤリタナゴ	20180825	徳島	アカザ科	アカザ	20181022	三重
コイ科	ヤリタナゴ	20180828	高知	タツ科	コモチサヨリ	20180626	沖縄
ドジョウ科	アジメドジョウ	20181024	三重	メダカ科	キタノメダカ	20160822	福井
ドジョウ科	アリアケスジシマドジョウ	20171016	熊本	メダカ科	キタノメダカ	20171108	富山
ドジョウ科	エソホトケドジョウ	20170430	北海道	メダカ科	ミナミメダカ	20160824	岡山
ドジョウ科	オオシマドジョウ	20160824	岡山	メダカ科	ミナミメダカ	20160825	鳥取
ドジョウ科	オオシマドジョウ	20171013	山口	メダカ科	ミナミメダカ	20160819	愛知
ドジョウ科	カラドジョウ	20160614	長野	メダカ科	ミナミメダカ	20160819	静岡
ドジョウ科	キタドジョウ	20170430	北海道	メダカ科	ミナミメダカ	20160820	岐阜
ドジョウ科	シマドジョウ属不明種	20171016	熊本	メダカ科	ミナミメダカ	20160821	滋賀
ドジョウ科	チュウガタスジシマドジョウ	20160824	岡山	メダカ科	ミナミメダカ	20171017	熊本
ドジョウ科	トウカイコガタスジシマドジョウ	20160820	岐阜	メダカ科	ミナミメダカ	20181025	三重
ドジョウ科	トウカイナガレホトケドジョウ	20160820	愛知	カダヤシ科	カダヤシ	20160629	千葉
ドジョウ科	ドジョウ	20161017	新潟	カダヤシ科	グッピー	20180630	沖縄
ドジョウ科	ドジョウ	20161017	新潟	カダヤシ科	グリーンソードテール	20180630	沖縄
ドジョウ科	ドジョウ	20161019	新潟	カダヤシ科	コクチモーリー	20170502	北海道
ドジョウ科	ドジョウ	20161020	山形	カダヤシ科	コクチモーリー	20170502	北海道

表(3)-4 つづき

科名	和名	採集日	都道府県	科名	和名	採集日	都道府県
カダヤシ科	コクチモーリー	20170502	北海道	イソギンボ科	トサカギンボ	20180827	高知
トゲウオ科	エソトミヨ	20170423	北海道	カフアナゴ科	カフアナゴ属不明種	20180625	沖縄
トゲウオ科	トミヨ属淡水型	20170501	北海道	カフアナゴ科	カフアナゴ属不明種	20180629	沖縄
トゲウオ科	トミヨ属淡水型	20170501	北海道	カフアナゴ科	カフアナゴ属不明種	20180630	沖縄
トゲウオ科	トミヨ属淡水型	20170501	北海道	カフアナゴ科	タナゴモドキ	20180625	沖縄
トゲウオ科	トミヨ属淡水型	20170501	北海道	カフアナゴ科	タメトモハゼ	20180625	沖縄
トゲウオ科	トミヨ属淡水型	20170502	北海道	カフアナゴ科	テンジクカフアナゴ	20180625	沖縄
トゲウオ科	トミヨ属淡水型	20171108	富山	カフアナゴ科	ホシマダラハゼ	20180628	沖縄
トゲウオ科	ニホントヨ	20170502	北海道	ハゼ科	アカオビシマハゼ	20180827	高知
トゲウオ科	太平洋系陸海型イトヨ	20170502	北海道	ハゼ科	アシシロハゼ	20160825	鳥取
カジカ科	ウツセミカジカ	20180928	山形	ハゼ科	アシシロハゼ	20170430	北海道
カジカ科	エゾハナカジカ	20170425	北海道	ハゼ科	アシシロハゼ	20170228	千葉
カジカ科	カジカ小体型 (ウツセミカジカ)	20160821	滋賀	ハゼ科	アシシロハゼ	20170228	千葉
カジカ科	カジカ大体型	20160614	長野	ハゼ科	アシシロハゼ	20171109	石川
カジカ科	カジカ大体型	20160930	東京	ハゼ科	アシシロハゼ	20181024	三重
カジカ科	カジカ大体型	20180719	山形	ハゼ科	アベハゼ	20160820	愛知
カジカ科	カジカ中体型	20160823	兵庫	ハゼ科	アベハゼ	20181024	三重
カジカ科	カマキリ	20160819	静岡	ハゼ科	アヤヨシノボリ	20180625	沖縄
カジカ科	カマキリ	20160822	福井	ハゼ科	アヤヨシノボリ	20180630	沖縄
カジカ科	カマキリ	20180928	新潟	ハゼ科	アヤヨシノボリ	20180702	沖縄
カジカ科	カンキョウカジカ	20161023	青森	ハゼ科	アヤヨシノボリ	20180630	沖縄
カジカ科	ハナカジカ	20161024	青森	ハゼ科	インコハゼ	20180627	沖縄
カジカ科	ハナカジカ	20170502	北海道	ハゼ科	インコハゼ	20180702	沖縄
タカサゴイシモチ科	インディアングラスフィッシュ	20180703	沖縄	ハゼ科	ウキゴリ	20160614	長野
タカサゴイシモチ科	トグナカタカサゴイシモチ	20180629	沖縄	ハゼ科	ウキゴリ	20160627	茨城
アカメ科	アカメ	20180827	高知	ハゼ科	ウキゴリ	20160819	静岡
スズキ科	スズキ	20160822	福井	ハゼ科	ウキゴリ	20160821	滋賀
ユゴイ科	オオクチユゴイ	20180625	沖縄	ハゼ科	ウキゴリ	20161023	青森
ユゴイ科	オオクチユゴイ	20180701	沖縄	ハゼ科	ウキゴリ	20170502	北海道
ユゴイ科	ユゴイ	20180626	沖縄	ハゼ科	ウキゴリ	20170502	北海道
サンフィッシュ科	オオクチバス	20180831	愛媛	ハゼ科	ウキゴリ	20170430	北海道
サンフィッシュ科	コクチバス	20181023	三重	ハゼ科	ウキゴリ	20181023	三重
サンフィッシュ科	コクチバス	20180928	新潟	ハゼ科	ウキゴリ	20180928	山形
テンジクダイ科	アマミイシモチ	20180629	沖縄	ハゼ科	ウキゴリ	20180928	新潟
テンジクダイ科	シボリ属不明種	20180702	沖縄	ハゼ科	ウグイ	20170425	北海道
アジ科	カスミアジ	20180626	沖縄	ハゼ科	オウミヨシノボリ	20160821	滋賀
アジ科	ギンガメアジ属不明種	20180626	沖縄	ハゼ科	オオヨシノボリ	20161019	新潟
ヒイラギ科	ヒイラギ	20180828	高知	ハゼ科	オオヨシノボリ	20171013	山口
フエダイ科	オキフエダイ	20180627	沖縄	ハゼ科	オオヨシノボリ	20171013	山口
フエダイ科	クロホシフエダイ	20180627	沖縄	ハゼ科	オオヨシノボリ	20171109	石川
クロサギ科	クロサギ属不明種	20180629	沖縄	ハゼ科	オオヨシノボリ	20180719	山形
クロサギ科	セダカクロサギ属不明種	20180629	沖縄	ハゼ科	オオヨシノボリ	20180719	山形
クロサギ科	ダイミョウサギ	20180828	高知	ハゼ科	オオヨシノボリ	20180830	愛媛
タイ科	ナンヨウチヌ	20180626	沖縄	ハゼ科	オオヨシノボリ	20180830	愛媛
タイ科	ヘダイ	20170228	千葉	ハゼ科	オオヨシノボリ	20180830	愛媛
タイ科	ミナミクロダイ	20180626	沖縄	ハゼ科	オオヨシノボリ	20180830	愛媛
ヒメツバメウオ科	ヒメツバメウオ	20180625	沖縄	ハゼ科	カフヨシノボリ	20160820	愛知
クロホシマンジュウダイ科	クロホシマンジュウダイ	20180827	高知	ハゼ科	カフヨシノボリ	20160824	岡山
カフスズメ科	カフスズメ	20180703	沖縄	ハゼ科	キセルハゼ	20181024	三重
カフスズメ科	カフスズメ	20180703	沖縄	ハゼ科	クロコハゼ	20180701	沖縄
スズメダイ科	スミゾメスズメダイ	20180701	沖縄	ハゼ科	クロヨシノボリ	20160810	千葉
スズメダイ科	スミゾメスズメダイ	20180627	沖縄	ハゼ科	クロヨシノボリ	20160810	千葉
スズメダイ科	リボンスズメダイ	20180702	沖縄	ハゼ科	クロヨシノボリ	20180625	沖縄
ボラ科	カマヒレボラ	20180629	沖縄	ハゼ科	クロヨシノボリ	20180630	沖縄
ボラ科	コボラ	20180626	沖縄	ハゼ科	ゴクラクハゼ	20180626	沖縄
ボラ科	ボラ	20180826	徳島	ハゼ科	ゴクラクハゼ	20180628	沖縄

表(3)-4 つづき

科名	和名	採集日	都道府県	科名	和名	採集日	都道府県
ハゼ科	ゴクラクハゼ	20180826	徳島	ハゼ科	ビリンゴ	20181023	三重
ハゼ科	ゴクラクハゼ	20180630	沖縄	ハゼ科	ビリンゴ	20181024	三重
ハゼ科	ゴクラクハゼ	20181024	三重	ハゼ科	ビリンゴ	20181024	三重
ハゼ科	サラサハゼ	20180627	沖縄	ハゼ科	ビリンゴ	20180928	山形
ハゼ科	シマウキゴリ	20161019	新潟	ハゼ科	ボウズハゼ	20180826	徳島
ハゼ科	シマウキゴリ	20170425	北海道	ハゼ科	ボウズハゼ	20181025	和歌山
ハゼ科	シマウキゴリ	20170423	北海道	ハゼ科	ホクリクジュズカケハゼ	20171108	富山
ハゼ科	シマウキゴリ	20170425	北海道	ハゼ科	マサゴハゼ	20181023	三重
ハゼ科	シマウキゴリ	20170430	北海道	ハゼ科	マハゼ	20160820	愛知
ハゼ科	シマウキゴリ	20180928	山形	ハゼ科	マハゼ	20180928	新潟
ハゼ科	シマウキゴリ	20180928	新潟	ハゼ科	ミナミトビハゼ	20180625	沖縄
ハゼ科	シマヒレヨシノボリ	20160819	静岡	ハゼ科	ミミズハゼ	20170201	静岡
ハゼ科	シマヨシノボリ	20160819	静岡	ハゼ科	ミミズハゼ	20170202	静岡
ハゼ科	シマヨシノボリ	20160823	兵庫	ハゼ科	ミミズハゼ	20161206	千葉
ハゼ科	シマヨシノボリ	20160826	鳥取	ハゼ科	ミミズハゼ	20170215	千葉
ハゼ科	シマヨシノボリ	20161022	青森	ハゼ科	ミミズハゼ	20181023	三重
ハゼ科	シマヨシノボリ	20180826	徳島	ハゼ科	ミミズハゼ♀	20170201	静岡
ハゼ科	シマヨシノボリ	20180829	愛媛	ハゼ科	ミミズハゼ(不明種)	20161023	青森
ハゼ科	シマヨシノボリ	20180630	沖縄	ハゼ科	ムサシノジュズカケハゼ	20160930	東京
ハゼ科	シマヨシノボリ	20180829	愛媛	ハゼ科	ヨシノボリ	20160930	東京
ハゼ科	シマヨシノボリ	20170201	静岡	ハゼ科	ヨシノボリ(不明種)	20160614	長野
ハゼ科	シモフリシマハゼ	20171109	石川	ハゼ科	ヨシノボリ(不明種)	20160629	千葉
ハゼ科	シモフリシマハゼ	20170501	北海道	ハゼ科	ヨシノボリ(不明種)	20160916	千葉
ハゼ科	ジュズカケハゼ	20170419	北海道	ハゼ科	ヨシノボリ(不明種)	20171109	石川
ハゼ科	ジュズカケハゼ	20170501	北海道	ハゼ科	ヨシノボリ(不明種)	20180825	徳島
ハゼ科	ジュズカケハゼ	20170320	千葉	ハゼ科	ヨシノボリ(不明種)	20180825	徳島
ハゼ科	シンジコハゼ	20171108	富山	ハゼ科	ヨシノボリ(不明種)	20180928	新潟
ハゼ科	スズメハゼ	20180627	沖縄	ハゼ科	ヨロイボウズハゼ	20180630	沖縄
ハゼ科	スミウキゴリ	20160819	静岡	ハゼ科	ルリボウズハゼ	20180630	沖縄
ハゼ科	スミウキゴリ	20180826	徳島	ハゼ科	ルリヨシノボリ	20160819	静岡
ハゼ科	スミウキゴリ	20181024	三重	サツキハゼ科	サツキハゼ	20180702	沖縄
ハゼ科	スミウキゴリ	20181025	和歌山	ドンコ科	カラドンコ	20170306	茨城
ハゼ科	スミウキゴリ	20180928	新潟	ドンコ科	カラドンコ	20170306	茨城
ハゼ科	タネカフハゼ	20180625	沖縄	ドンコ科	カラドンコ	20170306	茨城
ハゼ科	タネカフハゼ	20180701	沖縄	ドンコ科	ドンコ	20160824	岡山
ハゼ科	タネハゼ	20180701	沖縄	ドンコ科	ドンコ	20160821	滋賀
ハゼ科	チヂブ	20180826	徳島	ドンコ科	ドンコ	20160823	京都
ハゼ科	ツムギハゼ	20180627	沖縄	ドンコ科	ドンコ	20160824	岡山
ハゼ科	トサカハゼ	20180627	沖縄	ドンコ科	ドンコ	20160825	鳥取
ハゼ科	ドロメ	20171109	石川	ドンコ科	ドンコ	20171012	岡山
ハゼ科	ドロメ	20181024	三重	ドンコ科	ドンコ	20171014	山口
ハゼ科	ナガノゴリ	20180701	沖縄	ドンコ科	ドンコ	20171016	熊本
ハゼ科	ナミハゼ	20180625	沖縄	ドンコ科	ドンコ	20180829	愛媛
ハゼ科	ナンヨウボウズハゼ	20180627	沖縄	ドンコ科	ドンコ	20180928	新潟
ハゼ科	ヌマチチブ	20160614	長野	アイゴ科	ゴマアイゴ	20180702	沖縄
ハゼ科	ヌマチチブ	20180826	徳島	タイワンドジョウ科	カムルチー	20180825	徳島
ハゼ科	ヌマチチブ	20170501	北海道	タイワンドジョウ科	カムルチー	20180928	新潟
ハゼ科	ヒナハゼ	20170228	千葉	カレイ科	ヌマガレイ	20170501	北海道
ハゼ科	ヒナハゼ	20180625	沖縄	フグ科	オキナフフグ	20180626	沖縄
ハゼ科	ヒナハゼ	20181024	三重	フグ科	クサフグ	20160822	福井
ハゼ科	ヒナハゼ	20181024	三重				
ハゼ科	ヒメハゼ	20170228	千葉				
ハゼ科	ヒモハゼ	20170228	千葉				
ハゼ科	ヒモハゼ	20181023	三重				
ハゼ科	ビリンゴ	20160810	千葉				
ハゼ科	ビリンゴ	20180826	徳島				

6. 国際共同研究等の状況

Global Genome Initiative 2017, Fishes of Amazon's Last Frontiers (GGI-Peer-2017-149), Dr. C David de Santana・Smithsonian Institution, National Museum of Natural History, USA, 研究代表者である Dr. Santana がブラジル国内のアマゾン流域の魚類相調査を行うのと並行して、環境 DNA メタバーコーディングに基づく調査を行った。現地において、代表者が採水ならびに現場ろ過を行い、ろ過済みフィルターカートリッジに核酸劣化防止剤を充填して千葉中央博に送付した。フィルターカートリッジから環境 DNA を抽出後、MiFish 法により魚類のミトコンドリア 12SrRNA 遺伝子断片（平均長 172bp）を増幅し、その両端にアダプターを付加して次世代シーケンサによる超並列塩基配列決定を行った。検出されたアマゾン側流域の魚類のリファレンスデータが不足していたものの、200 種近い魚類を検出することに成功、現在代表者が中心となって論文を作成している。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) K.Morita, G.Sahashi, M.Miya, S.Kamada, H.Kambe and H.Araki: *Hydrobiologia*, in press (2019) Ongoing localized extinctions of stream-dwelling white-spotted charr populations in small dammed-off habitats of Hokkaido Island, Japan (in press)
- 2) H.Nakagawa, S.Yamamoto, T.Minamoto, Y.Satoh, T.Sado and M.Miya: *Freshwater Biology*, 63, 6, 569–580 (2018) Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods
- 3) Y.Sato, M.Miya, T.Fukunaga, T.Sado and W.Iwasaki: *Molecular Biology and Evolution*, 35, 6, 1553–1555 (2018) MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding
- 4) M.Ushio, K.Murata, T.Sado, I.Nishiumi, M.Takeshita, W.Iwasaki and M.Miya: *Scientific Reports* 8 4493–4493 (2018) Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species
- 5) M.Ushio, H.Murakami, R.Masuda, T.Sado, M.Miya, S.Sakurai, H.Yamanaka, T.Minamoto, M.Kondoh: *Metabarcoding and Metagenomics* 2, 6, 1–15 (2018) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing
- 6) M.Ushio, H.Fukuda, T.Inoue, K.Makoto, O.Kishida, K.Sato, K.Murata, M.Nikaido, T.Sado, Y.Sato, M.Takeshita, W.Iwasaki, H.Yamanaka, M.Kondoh and M.Miya: *Molecular Ecology Resources* 17, 6, e63–e75 (2017) Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water
- 7) T.Ishige, M.Miya, M.Ushio, T.Sado, M.Ushioda, K.Maebashi, R.Yonechi, P.Lagan and H.Matsubayashi: *Biological Conservation* 210, 281–285 (2017) Tropical-forest mammals as detected by environmental DNA at natural saltlicks
- 8) M.Miya, T.Minamoto, H.Yamanaka, S.Oka, K.Sato, S.Yamamoto, T.Sado and H.Doi: *Journal of Visualized Experiments*, 117, e54741 (2016) Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 宮正樹, 魚類環境 DNA メタバーコーディング法による多様性評価：技術開発と応用：水環境学会誌, 41,

4, 132-136 (2018)

- 2) 益田玲爾・村上弘章・高橋宏司・源利文・宮正樹：環境 DNA の有効性：水槽実験とフィールドでの検証，*海洋と生物*, 40, 1, 17-22 (2018)
- 3) 宮正樹：魚類環境 DNA メタバーコーディング：新たな技術開発がもたらす革新的な魚類群集調査法，*海洋と生物*, 40, 1, 9-16 (2018)
- 4) 宮正樹：バケツ一杯の水で魚種を検出：環境 DNA メタバーコーディング，*バイオサイエンスとインダストリー*, 75, 4, 320-322 (2017)

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 宮正樹：第 66 回生態学会大会シンポジウム「環境 DNA 研究のフロンティア：生態学と分子生物学からのアプローチ」(2019)「多地点・高頻度環境 DNA 観測に基づく魚類多様性モニタリングでわかったこと」
- 2) K.Morita, G.Sahashi, M.Miya, Y.Sato, S.Kamada, S.Kambe and H.Araki: Charr Symposium, Duluth, Minnesota, USA, 2018 "Ongoing localized extinctions of stream-dwelling charr populations in small dammed-off habitats."
- 3) S.Tsuji, M.Miya, M.Ushio, H.Satoh, Y.Satoh, T.Minamoto and H.Yamanaka: British Ecological Society Annual Meeting 2017, Ghent, Belgium, 2017 "Detection of mitochondrial haplotypes of fish from environmental DNA using a new data-screening method for eliminating sequence artifacts generated in Next Generation Sequencing."
- 4) M.Masuda, H.Murakami, M.Ogata and M.Miya: 10th Indo-Pacific Fish Conference, Tahiti, French Polynesia 2017 "Environmental DNA metabarcoding of marine coastal fish reflects long term monitoring data with underwater visual census."
- 5) H.Yamanaka, H.Sato, M.Miya, M.Hongo, N.Shibata, K.Watanabe and H.Doi: 2017 ESA annual meeting, Portland, Oregon, USA, 2017 "Environmental DNA metabarcoding unveils spatiotemporal dynamics of fish community in the littoral zone of Lake Biwa, central Japan."
- 6) M.Ushio, H.Murakami, R.Masuda, T.Sado, M.Miya, S.Sakurai, H.Yamanaka, T.Minamoto and M.Kondoh: 2017 ESA annual meeting, Portland, Oregon, USA, 2017 " Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing."
- 7) 水本寛基, 荒木仁志, 宮正樹：第 65 回生態学会大会 (2018) 「環境 DNA 技術を用いたイトウの季節回遊行動の推定」
- 8) 山川央, 横山覚, 浅見結貴, 柴田大輔, 宮正樹：第 65 回生態学会大会 (2018) 「カメ由来環境 DNA を検出するユニバーサルプライマーの検討」
- 9) 中尾遼平, 山本哲史, 宮正樹, 源利文：第 65 回生態学会大会 (2018) 「環境 DNA メタバーコーディングによる六甲山周辺地域の魚類相の解明」
- 10) 會津光博・清野聡子・佐土哲也・宮正樹：第 65 回生態学会大会 (2018) 「環境 DNA メタバーコーディングに基づく福岡県今津干潟の魚類相の解明」
- 11) 米澤悟・潮雅之・高柳敦・齊藤浩明・宮正樹・井鷲裕司：第 65 回生態学会大会 (2018) 「環境 DNA メタバーコーディングによる森林の哺乳類相調査 -絶滅危惧種ニホンカワネズミの生息確認-」
- 12) 辻冨月・宮正樹・潮雅之・佐藤博俊・佐藤行人・源利文・山中裕樹：第 65 回生態学会大会 (2018) 「環境 DNA 分析を用いた遺伝的多様性検出：アユ野外個体群への適用と検出力の検討」
- 13) 石毛太郎・宮正樹・潮雅之・佐土哲也・P. Lagan・松林尚志：哺乳類学会 2017 年度大会 (2017) 「コップ 1 杯の水からオランウータンを検出」
- 14) 辻冨月・宮正樹・潮雅之・佐藤博俊・佐藤行人・源利文・山中裕樹：分析化学会 (2017) 「環境 DNA 手法に基づくアユ個体群におけるミトコンドリア DNA ハプロタイプ多様性の評価」

- 15) 宮正樹：昆虫 DNA 研究会（2017）「魚類の環境 DNA メタバーコーディング：データ駆動型・発見探索型アプローチがもたらす新たな展開」
- 16) M.Miya: 2016 Annual Meeting of the Asian Society of Ichthyologists, Taipei, Taiwan 2016 "Environmental DNA metabarcoding from fishes (and other vertebrates) using universal primers MiFish: A data-driven approach for fish community research."
- 17) M.Miya: 2016 The North Pacific Marine Science Organization (PICES) Annual Meeting, San Diego, California, USA 2016 "Environmental DNA metabarcoding from fishes (and other vertebrates) using universal primers MiFish: a data-driven approach for fish community research."
- 18) 辻冨月, 山本哲史, 潮雅之, 佐藤行人, 宮正樹, 源利文, 山中裕樹：第 64 回日本生態学会（2017）「環境 DNA 手法の新展開:アユのミトコンドリア DNA ハプロタイプを水試料から検出する」
- 19) 潮雅之, 村上弘章, 益田玲爾, 佐土哲也, 宮正樹, 櫻井翔, 山中裕樹, 源利文：第 64 回日本生態学会（2017）「大量シーケンスを用いた魚類環境 DNA の多種・定量的モニタリング」
- 20) 山本哲史, 宮正樹, 佐土哲也, 中川光, 源利文：第 64 回日本生態学会（2017）「環境 DNA メタバーコーディングは河川魚類群集の季節的变化を検出できる」
- 21) 中尾遼平, 山本哲史, 宮正樹, 源利文：第 64 回日本生態学会（2017）「環境 DNA メタバーコーディングによる魚類相の把握 —六甲山系の小河川群における事例—」
- 22) S.Tsuji, H.Yamanaka, M.Miya, Y.Sato, S.Yamamoto and T.Minamoto: 2016 Annual Meeting of the Ecological Society of America, Fort Lauderdale, Florida, USA (2016) "Application of environmental DNA to analysis of mitochondrial haplotypes of fish"
- 23) 坂田雅之, 山本哲史, 宮正樹, 源利文：2016 年度日本陸水学会第 81 回大会（2016）「堆積物中の環境 DNA を用いた魚類 DNA のメタバーコーディング」

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 第 158 回海洋フォーラム（主催：海洋政策研究所，2019 年 1 月 29 日，笹川平和財団，観客約 200 名）にて講演
- 2) 第 28 回東京大学環境安全センターシンポジウム「水環境モニタリングの最前線」（主催：東京大学環境安全センター，2018 年 12 月 20 日，東京大学山上会館，観客約 150 名）にて講演
- 3) 千葉県科学館「大人が楽しむ科学教室・千葉県科学フェスタ 2018」（主催：千葉県科学館，2018 年 10 月 21 日，千葉県科学館，観客約 50 名）
- 4) 第 1 回環境 DNA 学会東京大会公開シンポジウム「環境 DNA 技術の現在と社会実装に向けた展望」（主催：環境 DNA 学会，2018 年 9 月 30 日，日本科学未来館，観客約 300 名）にて講演
- 5) 鹿児島大学総合研究博物館第 35 回市民講座「バケツ一杯の水で棲んでいる魚が判る技術：環境 DNA メタバーコーディング法の概要と実際」（主催：鹿児島大学総合研究博物館・かごしま水族館，2018 年 5 月 27 日，かごしま水族館，観客約 70 名）にて講演
- 6) 第 8 回農業環境インベントリー研究会「農業～環境～多様性につながる統計データ解析」（主催：農研機構 農業環境変動研究センター，2018 年 2 月 23 日，エポカルつくば中ホール 200，観客約 150 名）にて講演

- 7) 千葉市科学館「大人が楽しむ科学教室」（主催：千葉市科学館，2017年11月12日，千葉市科学館，観客約50名）
- 8) 千葉県立中央博物館自然誌シンポジウム「自然史研究におけるDNA研究の役割」（主催：千葉県立中央博物館，2017年5月14日，千葉県立中央博物館講堂，観客約100名）にて講演

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 中日新聞（2018年3月1日，科学面，「環境調査に革命的な手法 DNAで動物探す」）
- 2) 朝日新聞（2018年3月1日，科学面，「バケツの水から魚40種の確認 「環境DNA」を使った調査」）
- 3) 京都新聞（2018年2月28日，社会面，「水中のDNAで魚推測 京滋の河川，簡単に分布調査」）
- 4) 東京新聞（2018年2月26日，科学面，「環境調査に革命的な手法 DNAで動物探す」）
- 5) 日本経済新聞（2018年11月12日，科学面，「水を見れば生物がわかる 「環境DNA」で種類を特定」）
- 6) 産経新聞（2017年9月7日，科学面，「水から魚の種類がわかる 簡単・高精度に生息調査」）
- 7) 読売新聞（2017年7月13日，夕刊科学面，「すむ魚を水で判別」）
- 8) 朝日小学生新聞（2017年7月12日，一面トップ，「コップ1杯の水が動物を救う」）
- 9) 千葉日報（2017年6月20日，一面トップ，「県立中央博 水1杯で生息種把握」）
- 10) NHK ラジオ第一放送ニュース（2017年6月14日，「森に住む野生動物 コップ1杯の水から特定」）
- 11) NHK ニュースおはよう日本（2017年6月14日，「森に住む野生動物 コップ1杯の水から特定」）
- 12) 読売新聞（2017年1月13日，朝刊社会面，「生息魚種 環境DNAで特定」）
- 13) ニュートン（2016年10月7日，Focus欄，「水をくむだけで生息している魚の種類がわかる！」）
- 14) 毎日新聞（2016年7月28日，朝刊科学面，「潜らなくても魚を特定」）
- 15) NHK Eテレ（2016年7月17日，サイエンスZERO，「水の調査の大革命！ 環境DNA」）

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 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) S.Yamamoto, R.Masuda, Y.Sato, T.Sado, H.Araki, M.Kondoh, T.Minamoto and M.Miya: Scientific Reports, 6, 403682017 (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea
- 3) E.A.Andruszkiewicz, H.A.Starks, F.P.Chavez, L.M.Sassoubre, B.A.Block, A.B.Boehm: PLoS ONE, 12, 4, e0176343 (2017) Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding
- 4) H.Nakagawa, S.Yamamoto, T.Minamoto, Y.Satoh, T.Sado and M.Miya: Freshwater Biology, 63, 6, 569–580 (2018) Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods
- 5) J.Bylemans, D.M.Gleeson, M.Lintermans, C.M.Hardy, M.Beitzel, D.M.Gilligan, E.M.Furlan: Metabarcoding and Metagenomics, 3, e30457 (2018) Monitoring riverine fish communities through eDNA metabarcoding: determining optimal sampling strategies along an altitudinal and biodiversity gradient

- 6) K.Fujii, H.Doi, S.Matsuoka, M.Nagano, H.Satoh and H.Yamanaka: PLoS ONE, 14, 1, e0210357 (2019) Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods
- 7) A.D.McDevitt, N.Guimaraes Sales, S.S.Browett, A.Sparnenn, S.Mariani, O.S.Wangenstein, I. Coscia and C.Benvenuto: bioRxiv doi:10.1101/498451 (2019) Environmental DNA metabarcoding as an effective and rapid tool for fish monitoring in canals
- 8) K.Katoh and D.M.Standley: Molecular Biology and Evolution, 30, 4, 772–780, (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability
- 9) M.Miya, T.Minamoto, H.Yamanaka, S.Oka, K.Sato, S.Yamamoto, T.Sado, and H.Doi: Journal of Visualized Experiments, 117, e54741 (2016) Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA
- 10) R.C.Edgar: Bioinformatics, 26, 19, 2460–2461 (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST

II-4 環境DNAメタバーコーディングデータからの多様性指標・群集解析パイプラインの開発

東北大学大学院生命科学研究科

助教・牧野渡

平成28～30年度累計予算額：1,736千円

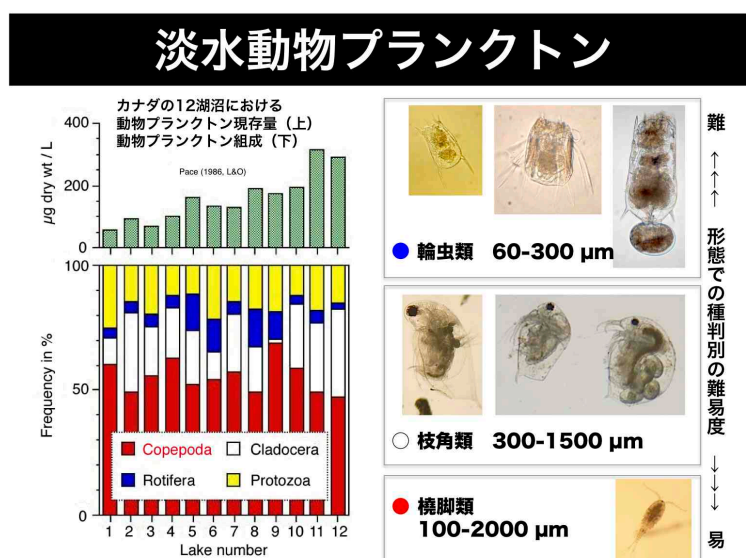
(うち平成28年度：558千円、平成29年度：604千円、平成30年度：574千円)

[要旨]

本サブテーマでは、環境DNAメタバーコーディングが、我が国の淡水動物プランクトンの多様性解析に使用可能となるよう、手法開発を行った。具体的には、霞ヶ浦や琵琶湖を含む、日本各地の湖沼やため池、水田から網羅的に採取した動物プランクトンについて、環境DNAメタバーコーディングに最適な遺伝子領域候補としてミトコンドリアDNAのCOI遺伝子領域（以後、mtCOIと表記）に着目し、その配列ライブラリーの充実に努めた。さらに、mtCOIバーコードを補完するものとして、核DNAの18SrDNA・V9領域（以後、nr18S-V9と表記）についても配列ライブラリーを作成するとともに、nr18S-V9バーコードに基づく種判別結果が、mtCOIバーコードでの種判別結果と一致するか否かを確認した。本研究により、種判別に使える形態形質を欠く卵や幼生においても、遺伝子情報による種判別が可能となった。また本研究で作成したライブラリー配列は、本邦湖沼での、将来の動物プランクトンモニタリングにて、担当機関により有効に活用されることが見込まれる。

[キーワード]

動物プランクトン、DNAバーコーディング、モニタリング調査、種判別



図(4)-1. 淡水動物プランクトンの代表的な3つのグループである「橈脚類」と「枝角類」と「輪虫類」は、どのような栄養状態の湖沼でも、動物プランクトン群集の大半を占めている。従って、これらの種判

1. はじめに

湖沼に出現する動物プランクトンは、魚類の餌生物として、また植物プランクトンおよび小型動物プランクトンの捕食者として、湖の生態系機能の重要な構成要素となっている。湖沼といっても栄養状態は様々で

あるが、貧栄養でも中栄養でも富栄養でも過栄養でも、「橈脚類 (copepoda) 」と「枝角類 (cladocera) 」と「輪虫類 (rotifera) 」の3つのグループで、動物プランクトン生物量の大半を占めることがわかっている (図 (4) -1)。

動物プランクトンは、種類が異なれば野外環境で担う役割も異なる。例えば橈脚類では大型種ほど肉食性が強くなることがわかっている。また枝角類では、ミジンコ (*Daphnia*属) のような大型種ほど摂餌速度が高く、かつ摂餌可能な餌のサイズも増加する。そのため、ミジンコ類が増加すると、水中から植物プランクトンが効率よく除去され、透明度が増加することがある。一方植物プランクトンが大量に増殖し透明度が低い湖沼では、大型の動物プランクトンが少なく、小型の枝角類と橈脚類、さらに小型の輪虫類が豊富に出現することが多い。つまり湖沼の水質の指標のひとつである透明度に、動物プランクトンは密接に関ることがあるため、その組成は「動物プランクトン類」と十把一絡げにするのではなく、橈脚類と枝角類と輪虫類それぞれについて、可能な限り細かく判別されるべきである。

一般に、形態に基づく動物プランクトンの種判別は、成体をつかって行われる。しかし野外環境では成体よりも幼生の方が数的に卓越するため、成体がサンプル中に出現せず、結果、種判別ができないため種組成が把握できない場合も珍しくない。従って、動物プランクトンの多様性評価に際しては、個体の発育段階に依存しない「DNAバーコード」が役立つ場面が多いだろう (図 (4) -2)。さらに、動物プランクトンにおいても、外部形態では区別できないが遺伝的には異なる隠蔽種 (cryptic species complex) が存在することが知られているが、「DNAバーコード」は (用いる遺伝子領域次第では) 隠蔽種をも区別できるだろう。

狭義のDNAバーコード・mtCOI

外部形態での種判別が非常に難しいため評判が悪い
オナガミジンコ類 (*Diaphanosoma* 属) での例

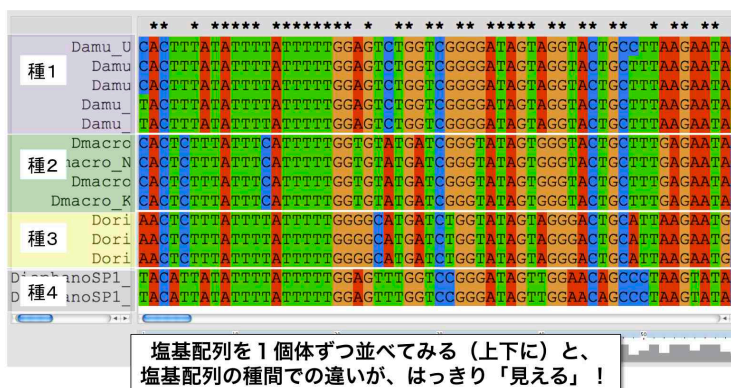


図 (4) -2. mtCOIバーコードによる、動物プランクトン種判別の実例。ここでは日本産オナガミジンコ4種について、異なる個体から得られたmtCOIのDNA塩基配列を上下方向に積み上げている。種1 (*Diaphanosoma* cf. *amurensis*) のように、塩基配列に種内多型が認められる場合もあるが、種内多型の程度は、種間多型の程度よりも著しく小さいことが、明瞭なビジュアルイメージとして理解できよう。こ

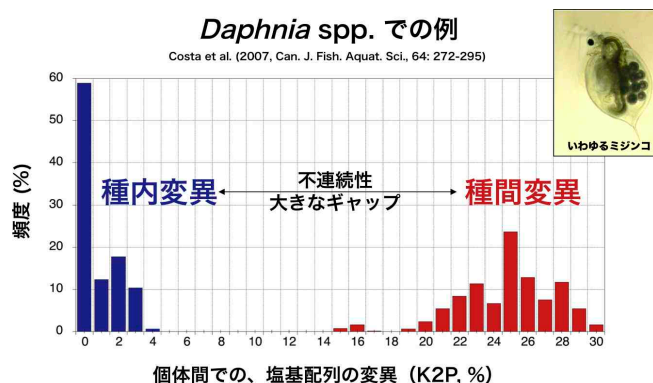
本サブテーマでは、環境DNAメタバーコーディングが、我が国の淡水動物プランクトンの多様性解析に使用可能となるよう、手法開発を行った。

2. 研究開発目的

前述の橈脚類、枝角類および輪虫類を含む後生生物では、mtCOIがいわゆる「狭義のDNAバーコード」とし

て頻繁に使用されている。その理由は、1) 広汎なタクサに適用できるPCRプライマーが存在すること、2) DNA塩基配列の種間差が、種内差よりも著しく大きく、結果明瞭な「バーコードギャップ」が異種間で得られるため、種判別が非常にやりやすい(図(4)-3)、という特徴に求めることができよう。実際に、DDBJ等の国際データベースには、淡水動物プランクトンのmtCOI領域のDNA塩基配列が、様々な地理範囲から登録されているため、それら既存の塩基配列をも使用できるというメリットも大きい。

狭義のDNAバーコード・mtCOI



図(4)-3. mtCOIバーコードによる「バーコードギャップ」の実例。ここではミジンコ属を例に説明しているが、塩基配列の種間変異の度合(赤色バー)が、種内変異の度合(青色バー)よりも著しく大きいため、種内変異と種間変異とを同一図内にプロットすると、両者の間に大きな空隙が発生する。この空隙が「バーコードギャップ」であり、その大きさは遺伝子領域により異なる。動物プランクトンの場合、mtCOIを用いると、大きな「バーコードギャップ」が得られるため、mtCOIは種判別に用いやすい領域であることが既にわかっている。

従って本サブテーマでは、我が国の淡水動物プランクトンの多様性解析に、環境DNAメタバーコーディングが使用可能となることを目指し、まずはmtCOIの塩基配列を網羅的に得ることを目的とした。具体的には、霞ヶ浦や琵琶湖を含む、日本各地の湖沼やため池、水田から網羅的に採取した動物プランクトンについて、形態に基づき種判別を行った(判別単位を今後はタクサと称す)後に、各タクサ複数個体からmtCOIの塩基配列を取得することを試みた。

さらに、mtCOIバーコードの補完のため、nr18S-V9についても、配列ライブラリーを作成することを、第二の目的とした。

3. 研究開発方法

(1) 試料採集

本邦各地の湖沼やため池では、おもにプランクトンネット(目合0.1mm)の斜行曳により動物プランクトンを採集した。霞ヶ浦の動物プランクトンについては、国立環境研究所による定期観測時に、別途採集されたサンプルを提供していただいた。これらとは別に、水田のように水深が浅い水域では、柄杓で水をすくい、そこに含まれる動物プランクトンをプランクトンネット(目合0.1mm)で捕集した。

いずれの場合も、得られた動物プランクトンは、現地にてエタノール(最終濃度99%)で固定し、実験室に持ち帰った。採集から24時間以内を目処に、サンプルびん中のエタノール(99%)を全置換し、以後は冷蔵庫にて解析まで保存した。

(2) DNA抽出

サンプルびん中の動物プランクトンは、まずは外部形態を顕微鏡下で確認し、タクサを同定した。次いで、タクサが判明した個体ごとにDNA抽出を行った。本サブテーマでは、QuickExtractとよばれるDNA抽出キットを採用し、1個体あたり50マイクロリットルを使用した。

(3) DNAバーコードの作成 (mtCOI)

PCRには、Prosser et al.¹⁾に従い、いわゆる狭義のDNAバーコード取得に常用される「Folmerプライマー」の改良版である「mtCOIZPLANK」プライマーセットを使用した。PCR条件はProsser et al.¹⁾に従い、PCR産物はExoSAP-ITキットで精製した後、BigDye Terminator (v3.1) キットのサイクルシーケンスに供した。サイクルシーケンス産物はBigDye Xterminator精製キットで処理し、いわゆるサンガーシーケンサー (ABI3100-Avant) にてDNA塩基配列を決定した。本サブテーマでは、フォワード、リバースの両側からシーケンスを行っている。

ところで、いわゆる次世代型シーケンサー (以後NGSと表記する) では、ある程度「長い」DNA (例えば、600 bp) の場合には、その塩基配列を全部読み取ることは、現状では、不可能である。本サブテーマのシーケンスで得られるmtCOIバーコードは、橈脚類と枝角類では658 bp、輪虫類では661 bpである。従って、本サブテーマで得られるmtCOIバーコードは、取得部位の全てが、NGSでのメタバーコーディングにて使用されるのではない。

実際のNGS使用時には、Leray et al.²⁾が整理した、メタバーコーディング用に設計されたプライマーセット (例えば、jgLC01490とjgHC02198) を適用することになると予想されるが、その場合には、ここで得られたmtCOIバーコードの、3' 末端側の約310 bpがPCR増幅される。この約310 bpの領域は、本サブテーマで得られるmtCOIバーコードの「うしろ半分」に過ぎないが、この程度の塩基長に短縮すれば、例えばMiSeqに対応したシーケンス試薬キット・MiSeq Reagent Kit v2 (500 Cycles)、MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500 Cycles)、あるいはMiSeq Reagent Kit v3 (500 Cycles) のいずれかを使用し、250 bp ペアエンド (MiSeq Reagent Kit v3の場合には、300 bp ペアエンド) にて、MiSeqでメタバーコーディングを行うことが、十分現実的となる。

(4) DNAバーコードの作成 (nr18S-V9)

PCRには、Tanabe et al.³⁾のプライマーSSU-F1289と同SSU-R1772を用いた。PCR条件はTanabe et al.³⁾に従った。PCR以降の解析手順は、上記のmtCOIバーコードの場合と基本的に同一であるが、サイクルシーケンスに用いたフォワード側のプライマーは、SSU-F1289ではなく、Amaral-Zettler et al.⁴⁾の1389Fである。そのため、最終的なシーケンス塩基長は、タクサ間で多少の違いは認められたが、およそ150bpとなった。従って、本サブテーマで得られたnr18S-V9バーコードは、全ての範囲が、NGSのメタバーコーディング領域として利用できる、と考えてよい。

なお、核DNAの塩基置換率は、一般にmtCOIのそれよりも低いとされている。さらに、nr18S-V9バーコードの塩基長は、前述のmtCOIバーコードの塩基長のおよそ1/4である。従って、基本的な情報量 (つまり、塩基対数) が少ない上に、塩基置換率が小さいならば、nr18S-V9バーコードは、塩基配列の種間変異が、あまり大きくないかも知れず、その結果、種判別精度が、mtCOIの種判別精度よりも、著しく低下するかもしれない。この問題点を検証するために、本サブテーマで得られた両方のDNAバーコードの種判別性能を、タクサ間で比較することも行った。

4. 結果及び考察

(1) mtCOIバーコード

本サブテーマでは、橈脚類37タクサから355種類、枝角類82タクサから266種類、輪虫類61種から180種類、合計180タクサの本邦淡水動物プランクトンから、801種類のmtCOIバーコードを取得することができた。そのうちの代表的な結果を順次記してゆく。

1) 霞ヶ浦での事例

本サブテーマでは、まず霞ヶ浦の動物プランクトンについて、網羅的なmtCOIバーコードライブラリーを作成することを試みた。霞ヶ浦は、本邦第二の大型湖沼であり、ワカサギ等を対象にした内水面漁業が盛んに行われている。同湖での漁獲対象魚種の多くが動物プランクトンを捕食することは古くから知られており、そのため、同湖のプランクトン組成を把握するためのモニタリング調査も、すでに過去40年間にわたって実施され、得られた結果は、誰でも利用可能な「霞ヶ浦データベース」の一部として一般に公開されている。

a) 輪虫類

図(4)-1にも示したとおり、輪虫類は最も小型の動物プランクトンであり、外部形態による分類最が最も難しい動物プランクトンである。そのため、霞ヶ浦に限らず、いずれの湖沼においても、輪虫類の種判別結果は「あいまいな」記述にとどめざるを得ないことが多い。霞ヶ浦の長期モニタリングにおいても、例えばハネウデワムシの類い (*Polyarthra*属) は、複数種混在状況を示す *Polyarthra* spp. という形で記述されている。

本サブテーマで得られるmtCOIバーコードは、そのような「あいまいな」記述を、次のように「具体的な」記述にまで、解像度を引き上げることができた(図(4)-4)。

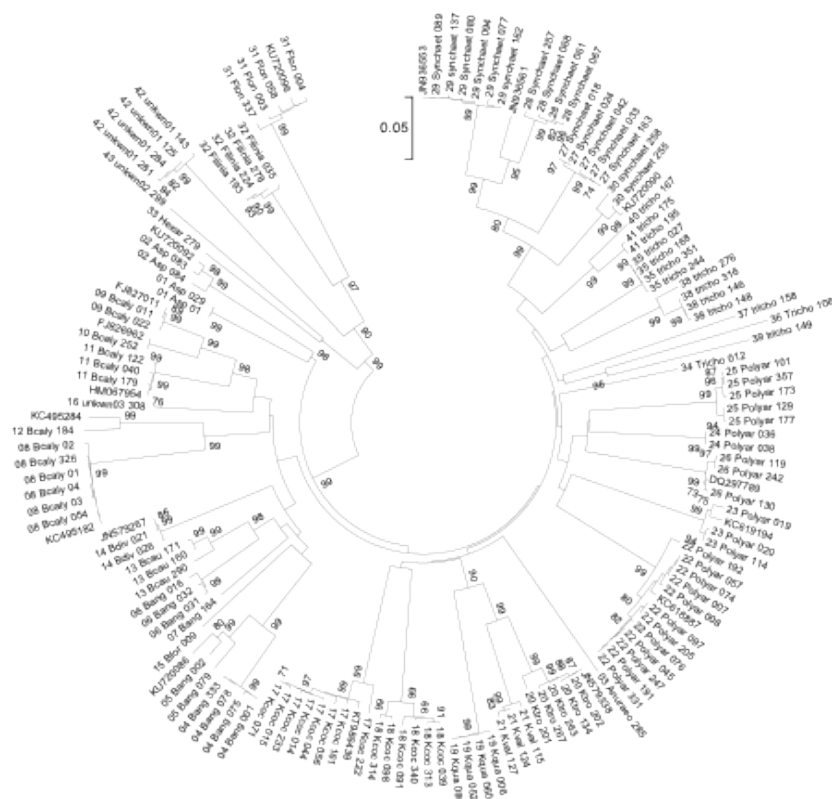


図(4)-4. 霞ヶ浦のハネウデワムシにおける、mtCOIバーコードに基づくタクサ判別結果。「誌上发表」欄のMakino et al. (2017)を改変して作成。

すなわち、塩基配列の変異の度合いが「種間変異」に相当することになる、異なる5つの「タクサ」が、霞ヶ浦には出現していることがわかった。そして、季節が変わると出現タクサも変わっていたことから、5つの「タクサ」は至適水温範囲が異なることが類推された。これら5つの「タクサ」は、外部形態が互いに酷

似しているため、形態での判別は不可能であった。つまりここで得られたmtCOIバーコードにより、霞ヶ浦のハネウデワムシ類に関する情報量は、形態に基づく情報よりも、5倍増加したとも表現できるだろう。

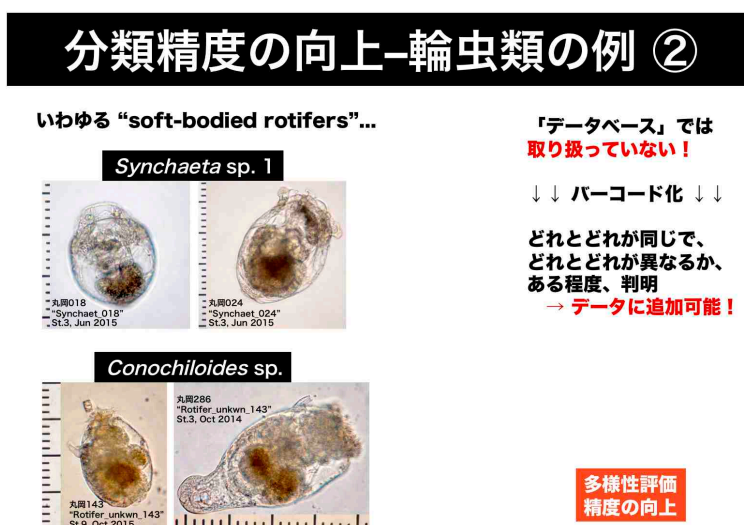
実際には、ハネウデワムシ属だけにとどまらず、調査期間中に出現した全ての輪虫類についてmtCOIバーコードの取得を試みており、合計で43タクサについて取得することができた(図(4)-5)。その結果、



図(4)-5. 霞ヶ浦の輪虫類における、mtCOIバーコードに基づくタクサ判別結果(NJアルゴリズム、K2P塩基置換モデル)。「誌上発表」欄のMakino et al. (2017)を改変して作成。ハプロタイプ名称の頭書番号はタクサ番号である。同一のハプロタイプが複数個体から得られた場合でも、図中には1度しか表記し

従来の形態に基づく種判別では単一のタクサとして取り扱われていた、ツボワムシの類いである*Brachionus calyciflorus*では、実際には遺伝的には異なる5タクサ(図(4)-5では、タクサ番号8から11に該当)として扱われるべきであることがわかった。同様の結果は、従来*Filinia longiseta*とされていたタクサでも認められた。このような、従来の外部形態に基づく評価では区別できないが、遺伝的には区別できる「隠蔽種」の存在を明示できることも、DNAバーコードを用いることで得られる利点の一つである。

また、固い被甲をもたない輪虫類は、ホルマリン等の防腐剤を入れて固定する際に収縮してしまい、その結果、属レベルの種判別さえもできなくなることが多い。その代表例が図(4)-6に示した、収縮して単なる「球状」となってしまうタクサである。ここで得られたDNAバーコードにより、このような外部形態では判別できないタクサも、判別できるようになった。



図(4)-6. 霞ヶ浦の輪虫類における、「球状」となってしまうタクサの具体例。このような外部形態では識別できないタクサも、mtCOIバーコード化により識別可能となった。

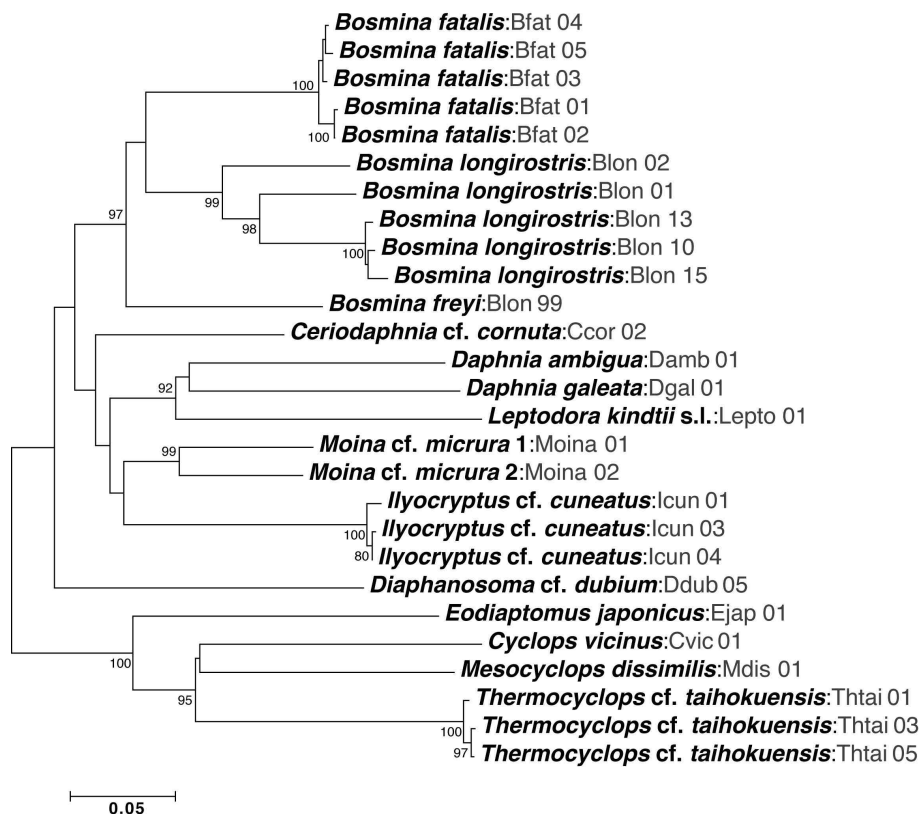
b) 橈脚類および枝角類

橈脚類と枝角類のmtCOIバーコードは、輪虫類のバーコードよりも2 bp 短いため、別途整理し図(4)-7に示した。すなわち、橈脚類の4タクサ、枝角類が12タクサからmtCOIバーコードを取得することができた。

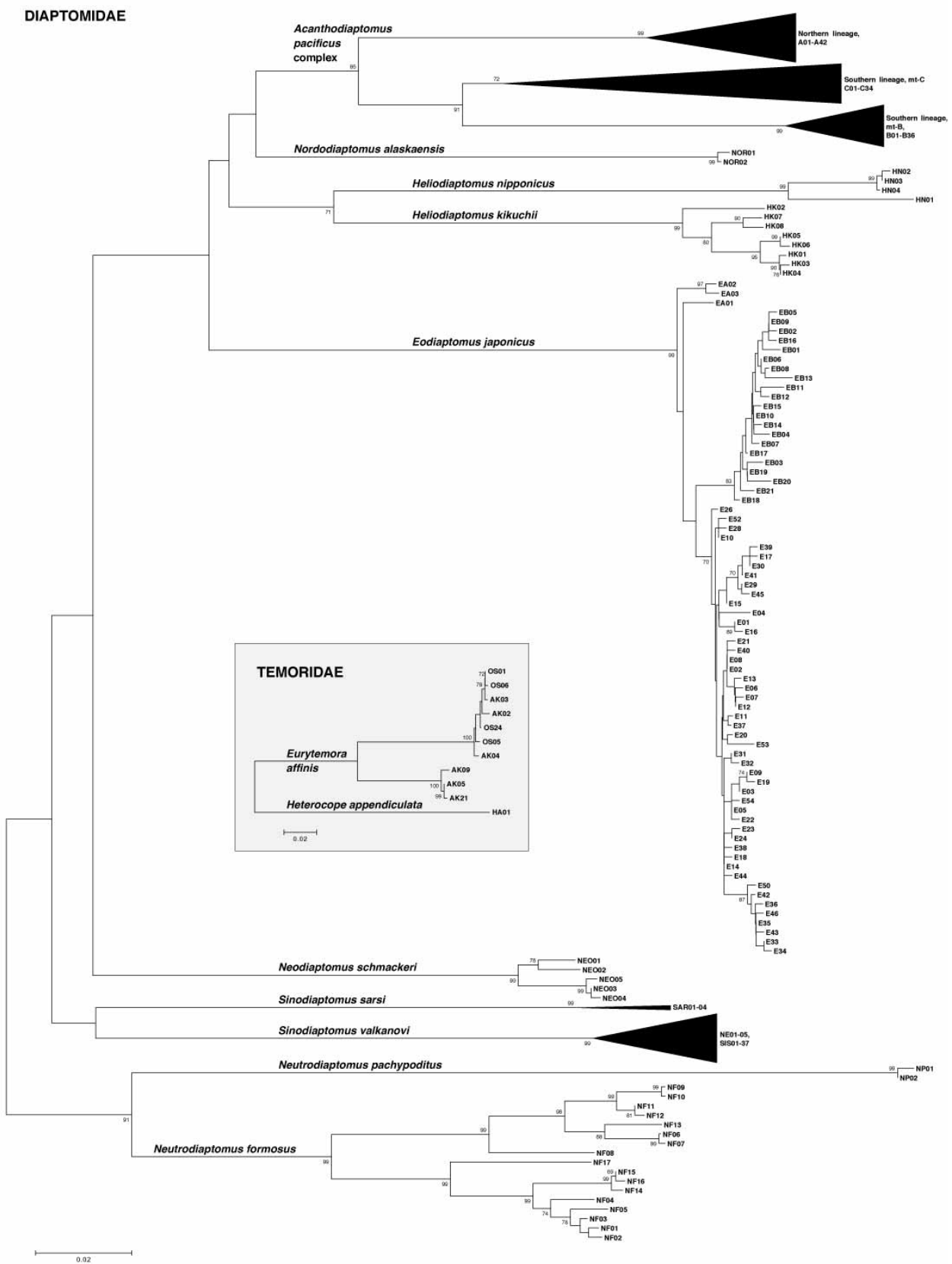
ゾウミジンコ類(いわゆる*Bosmina*属)は、貧栄養湖から富栄養湖まで、様々な栄養段階の湖沼で、しばしば数的に卓越する動物プランクトンタクサのひとつである。ところが、外部形態による種判別を会得するには少々時間が必要であるため、モニタリング調査においては、種レベルまで同定されることは少ない。そのようなタクサが、図(4)-7で整理したとおり、霞ヶ浦には3タクサも出現していることがわかった。また、形態が酷似し、かつ出現時期が重なることも多い*Daphnia galeata*と*Daphnia ambigua*についても、mtCOIバーコードにより、明瞭に区別し得た。

また今回バーコード化できた橈脚類の4タクサについては、サンプル中に雌成体があれば、該当するタクサを判断することは、比較的容易である。ところが実際のサンプル中には、成体よりもノープリウス幼生やコペポダイト幼生の方が多く出現し、それら幼生の種判別は、外部形態だけでは、ほぼ不可能である。一方、ここで得られたmtCOIバーコードは、同一のタクサであれば、発育段階にかかわらず変化しない(ただし、個体群内で、塩基配列に種内多型が存在する場合には、異なる個体から異なる塩基配列が得られる可能性は否定できない)。

つまり、ここで得られたmtCOIバーコードは、橈脚類幼生に対しても適用可能であり、結果的に、モニタリング調査の精度を著しく増加させるポテンシャルを秘めていると言えよう。



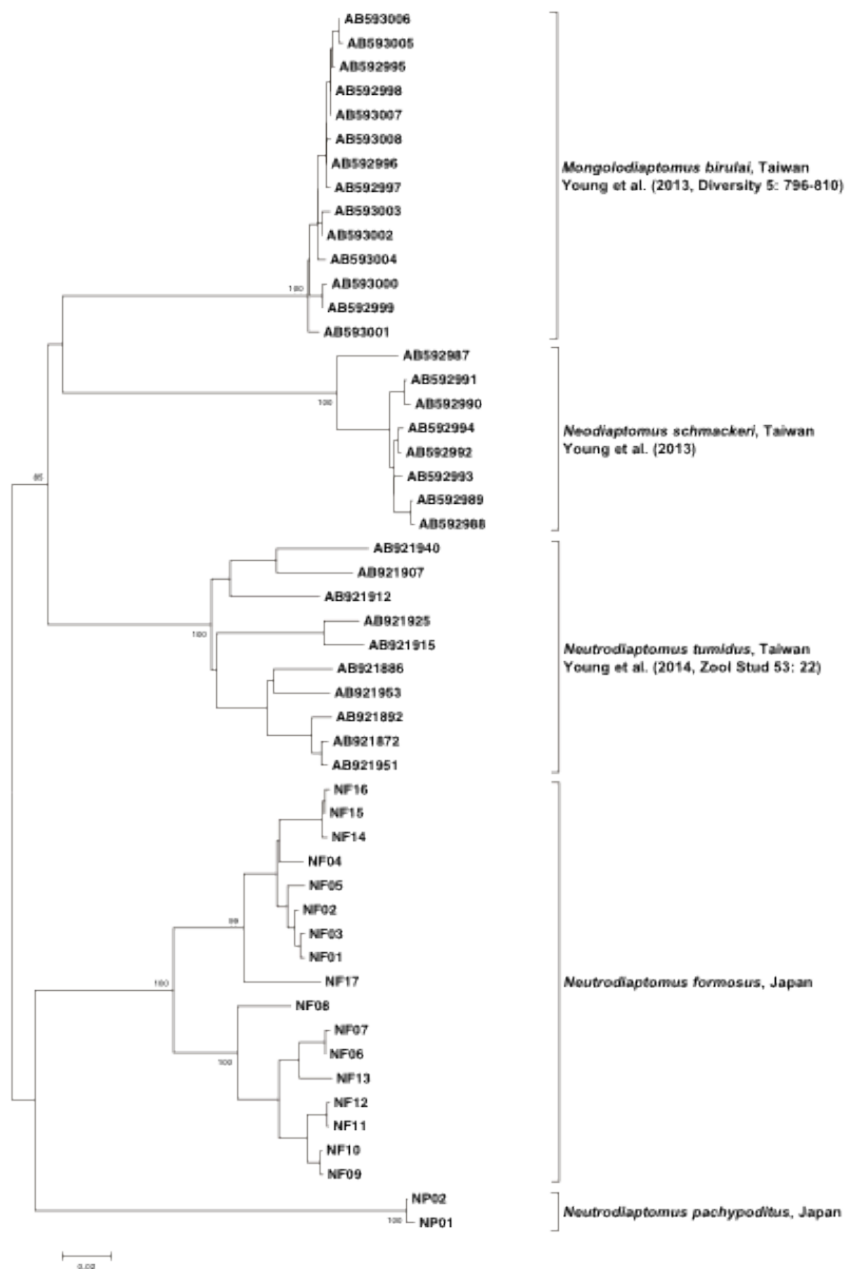
図(4)-7. 霞ヶ浦の橈脚類および枝角類動物プランクトンにおける, mtCOIバーコードに基づくタクサ判別結果 (NJアルゴリズム, K2P塩基置換モデル). 「誌上発表」欄のMakino et al. (2017)を改変して作成. ハプロタイプ名称冒頭は、現時点で最適と判断された学名であり、同末尾はハプロタイプコードである (同一のハプロタイプが複数個体から得られた場合でも、図中には1度しか表記していない).



図(4)-8. 日本淡水産カラノイダ(橈脚類)における, mtCOIバーコードに基づくタクサ判別結果 (NJアルゴリズム, K2P塩基置換モデル). 「誌上発表」欄のMakino et al. (2018)をもとに再作成.

2) 日本淡水産橈脚類での事例

前述のとおり、外部形態からは種判別できない幼生が多く出現する橈脚類については、DNAバーコード化が特に有効であった。そこで本邦に出現する橈脚類のなかでも、湖沼で特に卓越することが多いカラノイダ橈脚類（以後カラノイダと略称する）について、本邦各地から得られたサンプルを使用して、網羅的な



図(4)-9. 日本淡水産*Neutrodiaptomus*属と、台湾淡水産カラノイダのmtCOIバーコードの比較(NJアルゴリズム、K2P塩基置換モデル)。「誌上発表」欄のMakino et al. (2018)をもとに再作成。台湾から報告されているカラノイダからは、本邦の*N. formosus*と相同あるいは極めて相同なmtCOIバーコードは報告されていない。この結果は、*N. formosus*が台湾には分布していないことを示唆する。

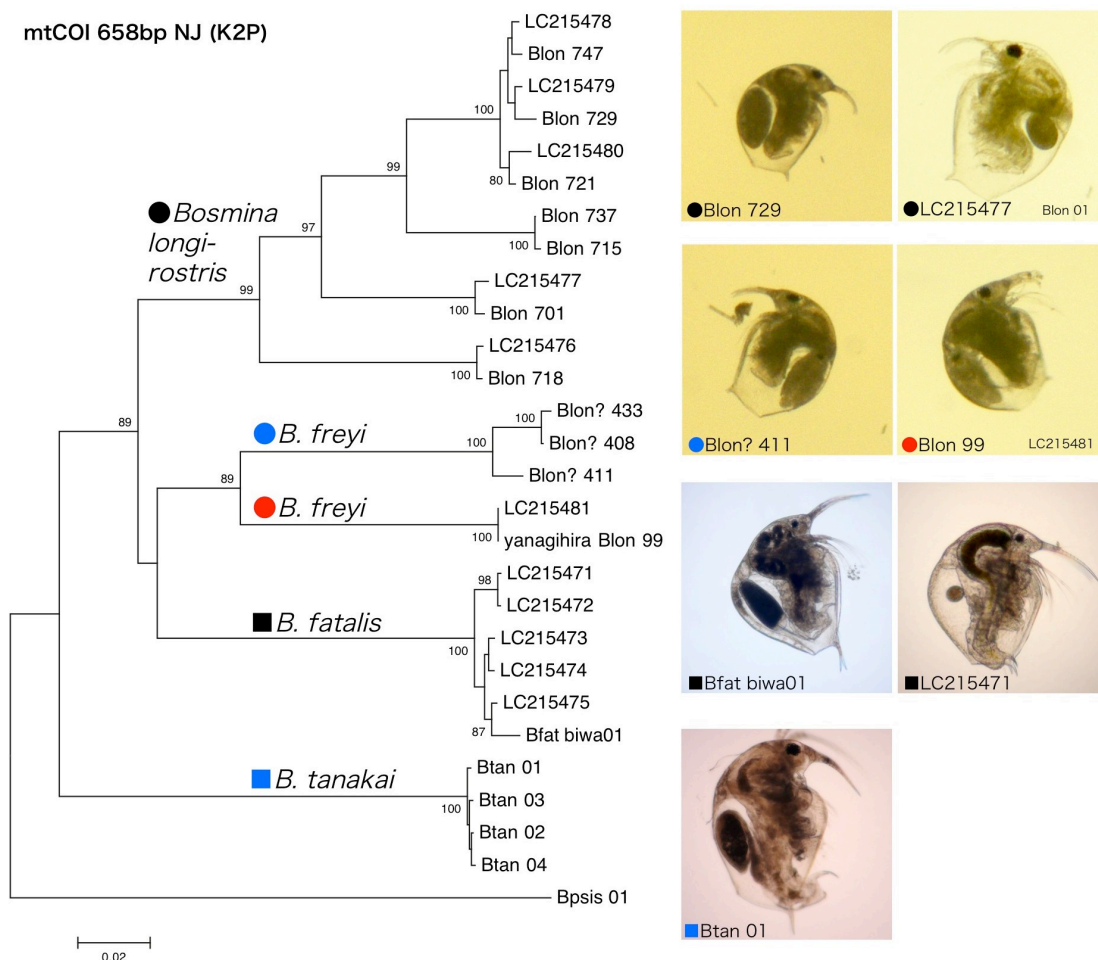
mtCOIバーコードの取得を行った(前ページ、図(4)-8)。本邦からはテモラ科に属する2タクサと、ディプトムス科に属する11タクサ(*Acanthodiaptomus pacificus*は、隠蔽種2種の複合体であるため、2タクサとして扱った)が得られ、それぞれから合計で282にのぼるmtCOIバーコードが取得された。*A.*

*pacificus*以外にも、本邦産*Eurytemora affinis*と*Neutrodiaptomus formosus*は、mtCOIバーコードの種内変異が種間変異に相当するほど大きかったため、いずれも隠蔽種の複合体である可能性が高いと考えられた。

なお、*N. formosus*には「タイワンチュウヒゲナガケンミジンコ」なる和名が付与される場合があるが、実際には*N. formosus*は台湾には出現しない（前ページ、図（4）-9を参照）。おそらく、種小名である*formosus*が、ポルトガル語などでは台湾を意味すること、などの理由により、*N. formosus*が台湾由来のタクサであると誤解されてきたのであろうが、*N. formosus*は日本固有種である。従って、*N. formosus*に「タイワンチュウヒゲナガケンミジンコ」をあてることは、結果として無用の混乱を招く可能性があるため、今後は厳に慎むべきである。

3) 日本産ゾウミジンコ類での事例

貧栄養湖から富栄養湖まで、様々な栄養段階の湖沼で、しばしば数的に卓越する動物プランクトンタクサのひとつである*Bosmina*属については、外部形態による種判別がしばしば困難であるため、モニタリング調査にて種レベルまで同定されることは少ないことは、前述したとおりである。そこで本サブテーマでは、本邦各地から得られたゾウミジンコ類から網羅的にmtCOIバーコードを取得することで、本邦淡水産ゾウミジンコ類の種判別を、より簡便にかつ正確にできるよう改善した（図（4）-10）。従来の知見に従えば、



図（4）-10. 日本産ゾウミジンコにおける、mtCOIバーコードに基づくタクサ判別結果（NJアルゴリズム、K2P塩基置換モデル）。「誌上発表」欄のMakino et al. (2017)のデータを一部使用して再作成。

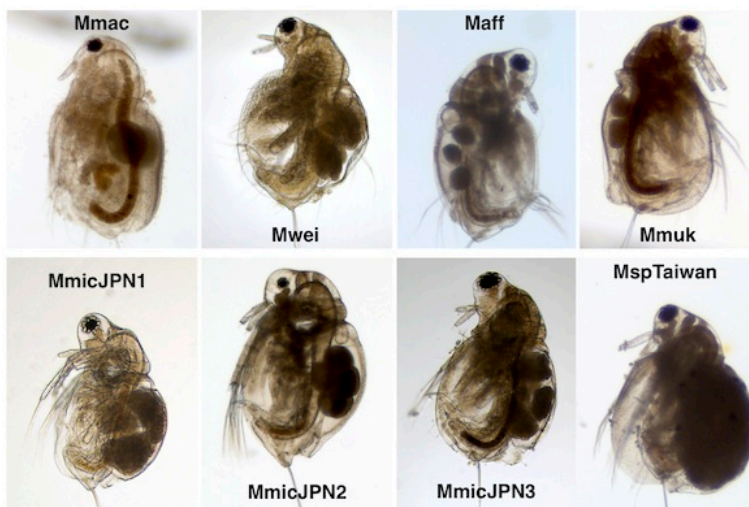
本邦には*Bosmina longirostris*、*Bosmina fatalis*、および*Bosmina tanakai*の3タクサが分布するとされ

る。今回の解析では、*B. longirostris*からは12、*B. fatalis*からは6、*B. tanakai*からは4通りのmtCOIバーコードが得られ、これらに従えば明瞭なタクサ判別が可能となった。琵琶湖や諏訪湖に出現する、第一触角が後方に湾曲しないタイプの*B. fatalis* (図(4)-10では、写真・Bfat_biwa01)からは、第一触角が湾曲する、通常タイプの*B. fatalis* (図(4)-10では、写真・LC215471)とは異なったmtCOIバーコードが得られたが、両形態タイプを別種と認めるほどに大きな塩基配列の差は、認められなかった。

さらに今回の解析では、既知の3タクサに加えて、新たに*Bosmina freyi*の出現が確認された。この*B. freyi*の形態は*B. longirostris*の形態と酷似しており、わずかに後腹部尾爪の棘が太い(*B. freyi*)あるいは細い(*B. longirostris*)で判別可能な程度であるが、野外採集サンプルでは、後腹部尾爪の棘には珪藻やツリガネムシなどの生物が高頻度で付着しているため、棘の太さを観察できないことも多い。また、付着生物がなくても、後腹部尾爪の棘の太い細いの判定は、慣れないうちは主観的にならざるを得ないため、長期に及ぶ修練が必要であると思われた。従って、このような主観的な不確定要素を排除できるという観点からも、本サブテーマで得られたmtCOIバーコードに基づく種判別は、非常に有益であると判断される。

4) 日本産タマミジンコ (*Moina*属) での事例

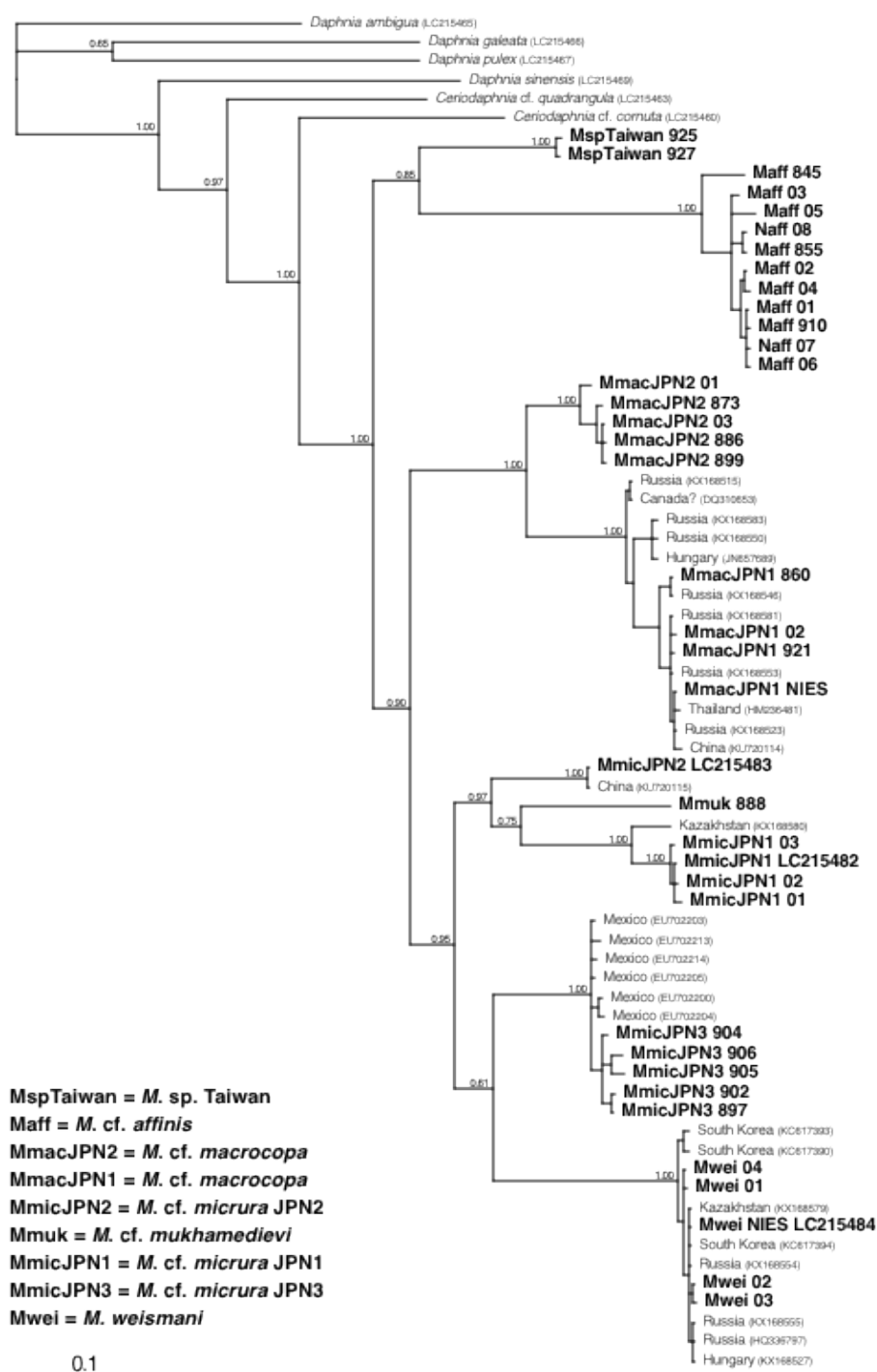
本邦の水田においては、湛水直後からタマミジンコ類(図(4)-11)が大発生することが古くから知られている。本邦の図鑑類に掲載されている、タマミジンコ類の種判別にかかる形態学的形質は(種間変異が大きい形質に依存している、等の理由で)現在の観点からは、もはや意味をなさない場合が多い。従って、外部形態に基づく本邦タマミジンコ類の種判別は、現状では、きわめて不十分であると言わざるを得ない。そこで本サブテーマでは、本邦各地からタマミジンコ類を網羅的に採集し、mtCOIバーコードを網羅的に収集し、種判別を簡便にかつ正確にできるよう改善した。



図(4)-11. 本サブテーマで採集できたタマミジンコ類(すべて雌成体). 写真上の名称コードの詳細は、次ページの図(4)-12を参照のこと。

解析にあたっては、水田だけでなく、自然湖沼やため池から得られたタマミジンコ類も使用した。その結果、今回は図(4)-11と(4)-12に示した、合計8タクサ(本邦に限れば7タクサ)が出現していたことがわかった。興味深いことに、これらのタクサは生息場所に偏りが認められた。具体的には、日本全国各地の水田からは*Moina cf. macrocopa*と*Moina cf. affinis*が出現したが、これらは湖沼やため池からはほとんど出現しなかった。中国、四国、および九州地方の水田からは、*M. cf. macrocopa*と*M. cf. affinis*に加えて、*Moina cf. mukhamedievi*と*Moina cf. micrura* JPN3も出現した。一方、*Moina weismanni*と*Moina cf. micrura* JPN1は主にため池から採集されており、水田にはほとんど出現しなかった。*Moina cf.*

micrura JPN2は霞ヶ浦および北浦からのみ採集された。



図(4)-12. 本サブテーマで収集したタマミジンコ類のmtCOIバーコード(フォント黒色)の、ベイズ推定系統樹. 図中には、国際塩基配列データベース上にデポジットされていた、同種と判断されるmtCOIハプロタイプ(相同性95%以上、フォント灰色)とあわせて表示した. なお*M. sp. taiwan*は、現時点では、本邦からは採集されていない.

なお、従来の知見に従えば、本邦からは*Moina macrocopa*、*Moina micrura*、および*Moina weismanni*の3タクサが出現するとされていたが、今回の解析では、日本から7タクサを得ることができた。本邦初記録の

タクサ (*M. cf. affinis*, および *M. cf. mukhamedievi*) の存在と、本邦で従来 *M. micrura* とされていたタクサが、実際には異なる3タクサ (現時点では、*M. cf. micrura* JPN1, *M. cf. micrura* JPN2, および *M. cf. micrura* JPN3) に分かれること、が出現タクサ数が増加した理由である。

(2) nr18S-V9バーコード

本サブテーマでは、橈脚類18タクサから15種類、枝角類61タクサから60種類、輪虫類60種から36種類、合計89タクサから、111種類のnr18S-V9バーコードを取得することができた。

表(4)-1. 複数のタクサ (mtCOIバーコードで判定) を包含したnr18S-V9バーコードのリスト.

分類群	nr18S-V9バーコード名称	包含されるタクサ (mtCOIバーコードで判定)
橈脚類	18S_Sinodiaptomus_multispp	<i>Sinodiaptomus valkanovi</i> <i>S. sarsi</i>
	18S_Heliodiaptomus_multispp	<i>Heliodiaptomus nipponicus</i> <i>H. kikuchii</i>
	18S_Acanthodiaptomus_pacificus_complex	<i>Acanthodiaptomus pacificus</i> 北方系統 <i>A. pacificus</i> 南方系統 (mt-C)
枝角類	18S_Bosmina_multispp	<i>Bosmina fatalis</i> <i>B. longirostris</i>
	18S_Daphnia_multispp1	<i>Daphnia pulex</i> <i>D. pulicaria</i> <i>D. mitsukuri complex</i>
	18S_Daphnia_multispp2	<i>Daphnia cristata</i> <i>D. longiremis</i>
	18S_Daphnia_multispp3	<i>Daphnia dentifera</i> <i>D. galeata</i>
輪虫類	18S_Brachionus_mutispp1	<i>Brachionus cf. angularis</i> type 1-1 <i>B. angularis cf. type 1-2</i> <i>B. angularis cf. type 2</i> <i>B. angularis cf. type 3</i> <i>B. cf. caudatus</i> <i>B. cf. diversicornis</i>
	18S_Brachionus_mutispp2	<i>Brachionus cf. forficula</i> type 2 <i>B. cf. falcatus</i> <i>B. cf. quadridentatus</i> type 1
	18S_Bcaly_multispp	<i>Brachionus cf. calyciflorus</i> type 1 <i>B. cf. calyciflorus</i> type 2a <i>B. cf. calyciflorus</i> type 3 <i>B. cf. calyciflorus</i> type 4
	18S_Polyarthra_multispp	<i>Polyarthra</i> sp. 4 <i>P. sp. 6</i> <i>P. sp. 7</i>
	18S_Keratella_multispp	<i>Keratella cf. tropica/valga</i> type 1 <i>K. cf. tropica/valga</i> type 2
	18S_Synchaeta_spp2and3	<i>Synchaeta</i> sp. 2 <i>S. sp. 3</i>
	18S_Flon_multispp	<i>Filinia cf. longiseta</i> type 1 <i>F. cf. longiseta</i> type 2
	18S_Trichocerca_spp2and5	<i>Trichocerca</i> sp. 2 <i>T. sp. 5</i>
	18S_Trichocerca_spp3and6	<i>Trichocerca</i> sp. 3 <i>T. sp. 6</i>
	18S_Trichocerca_spp7-9	<i>Trichocerca</i> sp. 7 <i>T. sp. 8</i> <i>T. sp. 9</i>

核DNAの塩基置換率がmtCOIよりも低いことと、このnr18S-V9バーコードの塩基長がmtCOIバーコードの23%程度に過ぎないこと、の2点から、nr18S-V9バーコードの種判別精度は、mtCOIの種判別精度よりも若干低下すると予想していたが、実際に表(4)-1に示したとおり、いくつかの異なるタクサ (mtCOIで決定されたタクサ) から完全に相同なnr18S-V9バーコードが得られる事例が、しばしば認められた。なかでも輪虫類では、そのような事例が橈脚類や枝角類群よりも多く認められ、特に *Brachionus* 属ではその傾向が強まった。ただし結果全体を俯瞰すると、異なるタクサ間でnr18S-V9バーコードがシェアされるケースはむしろ例外的であった。従って、塩基長の短いnr18S-V9バーコードを用いても「意外なほど」あるいは「予想以上に」高い精度で種判別が可能である、と結論できた。

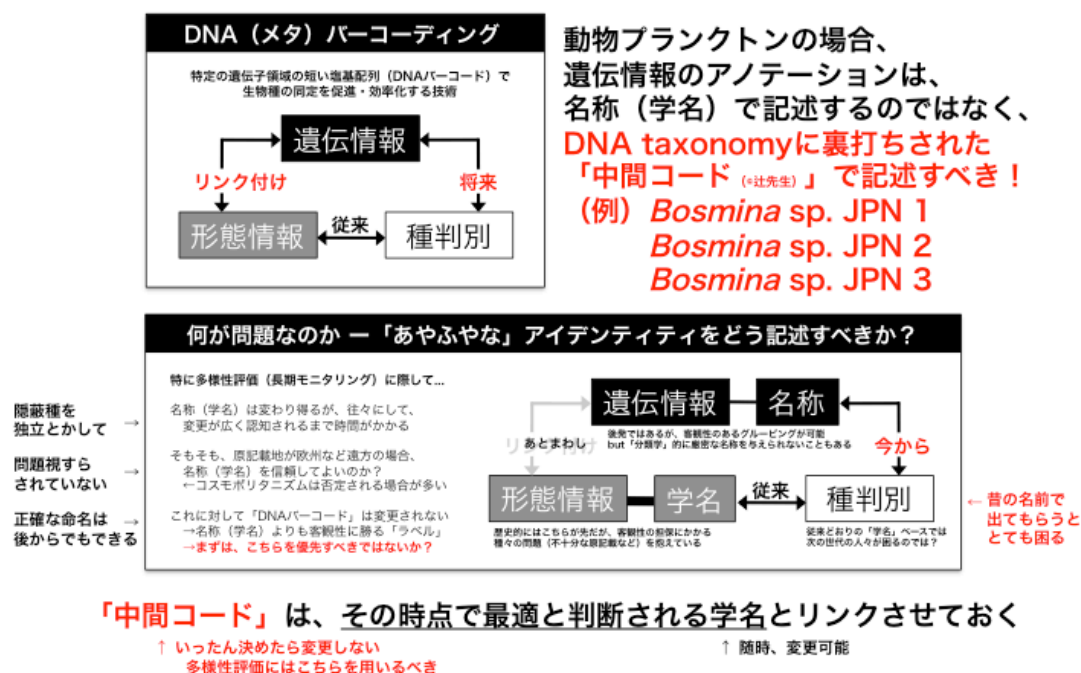
(3) 淡水動物プランクトンの多様性指標・群集解析への応用

本サブテーマでは、タクサ判別性能が高いことが知られていた、mtCOIバーコードを本邦淡水動物プランクトンから網羅的に採集し得た。これに加えて、mtCOIバーコードを補完する目的にて、nr18S-V9バーコードの種判別能力を評価したところ、補完目的は十分に達せられると判断された。

これらの結果を総合すると、メタバーコーディングによる動物プランクトンの多様性指標の取得、および群集解析に際しては、1) 今回得られたmtCOIバーコードライブラリー（より正確には、その3'末端側の約310 bp）の適用を主とし、PCRに際しては前述のLerayがまとめたプライマーセットを用いること、ただし、2) メタバーコーディングでは、どの遺伝子領域を用いても、種間でのPCRバイアスを完全には消し去ることができないため、mtCOIバーコードとともにnr18S-V9バーコードを同時に解析してmtCOIバーコードを補完させること、が強く推奨される。

表（4）-2. 本邦淡水域に出現する動物プランクトンのうち、従来の名称が無効であるタクサの例。

分類群	従来の理解(名称)	最新の理解(名称)	典拠
輪脚類	<i>Pseudodiaptomus inopinus</i>	<i>Pseudodiaptomus japonicus</i>	Sakaguchi & Ueda (2018, Plankton Benthos Res, 13, 173-179)
	<i>Pseudodiaptomus inopinus</i>	<i>Pseudodiaptomus yamato</i>	Ueda & Sakaguchi (2019, Plankton Benthos Res, 14, 29-38)
枝角類	<i>Chydorus sphaericus</i>	<i>Chydorus cf. sphaericus</i>	Belyaeva & Taylor (2009, Mol Phylogenet Evol 50, 534-546)
	<i>Polyphemus pediculus</i>	<i>Polyphemus cf. pediculus</i>	Xu et al. (2009, Mol Ecol 18, 5161-5179)
	<i>Moina micrura</i>	<i>Moina cf. micrura</i> JPN1, JPN2, JPN3	本サブテーマ
	<i>Sida crystallina</i>	<i>Sida cf. crystallina</i>	本サブテーマ



図（4）-13. 現状では非常に未完成である淡水動物プランクトンの分類を勘案すれば、DNAバーコードに付与する名称は、図中の「中間コード」のように、意図的にある程度「あいまい」とどめておく方がよい。

なお淡水動物プランクトンの分類は、いまだ未完のままである。特に近年になって、分子生態学的手法を用いた種判別が、形態に基づく種判別と併用され始めて以来、隠蔽種の存在が頻繁に報告されるようになって

た。さらには、異なる隠蔽系統の形態を詳細に比較して、判別可能な形態形質を新たに見つけ出す研究も、頻繁になされるようになった。その結果、従来使用されていた名称（学名）が、現在では使用できないケースが、意外と多く存在するのである。本邦淡水域に出現する動物プランクトンでは、例えば全国各地の湖沼や水田、さらには池塘にいたるまで様々な水域に分布することが知られているマルミジンコ (*Chydorus sphaericus* であるとされていたタクサ、表(4)-2を参照)は、全球的に分布するコスモポリタン種であると思われていたが実はそうではなく、分布範囲の限られた、遺伝的に異なる系統を多数含むことがわかった。そして異なる遺伝系統は、従来は用いられなかった形態形質にて識別可能であることもわかった。さらに狭義の*C. sphaericus*は欧州周辺にのみ分布することも指摘されてしまった。従って、従来から本邦で*C. sphaericus*とされてきたタクサは、狭義の*C. sphaericus*とは異なるタクサであるため、別の名称が付与される必要がある(ここでは*C. cf. sphaericus*としておく)。同様の例を表(4)-2に示すが、ここに記した例が全てではなく、今後も類例が次々と報告され続けるであろうことに留意すべきである。

このように完成にはほど遠い淡水動物プランクトンの分類学の現状を勘案すれば、ひとつひとつのDNAバーコードに付与する「名称」に関しても、あまり限定的な意味合いの名称を使用することは、少なくとも現時点では、避けた方がよい(前ページ、図(4)-13を参照)。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

淡水域は、地球上の表面積のわずか0.8%を占めているに過ぎないが、その狭い範囲に、既知種の6-12%に相当する生物が棲息する、いわば生物多様性のホットスポットである。その一方で、地球上で最も人間活動が活発な地域が、淡水域の周辺に偏在している。そのため、淡水域の生物多様性は強い人為影響をうけて急速に減少しており、その減少度合は海洋生態系や陸上生態系での減少度合よりも高いことがわかっている。人間活動が今後急速に弱まることは期待できないため、人為影響が淡水生物多様性に与える影響については、今後も継続的に調査する必要があるが、実はここに大きな問題点がある。すなわち、脊椎動物以外の淡水生物相は、分類が整理できていないタクサが多いため、正確に把握されてすらいないのである。現状が正確に把握できていなければ、将来との比較もできないため、非常に問題である。かかる状況において、本邦淡水動物プランクトンの多様性に関して、今回整備したmtCOIバーコードを使用することで正確に、且つ形態情報からアプローチする場合よりも高い解像度にて、記述できるようになった点こそが、本サブテーマの最も大きな科学的意義である。ここで得られたDNAバーコード類は、本邦で重要であることは当然であるが、近隣諸国の淡水動物プランクトン相調査に際しても、リファレンス配列として有効利用されるであろう。さらに欧州等の遠隔地における、淡水動物プランクトンの外来種スクリーニングに際しても、リファレンス配列として有効利用されるであろう。

(2) 環境政策への貢献

本研究により、種判別に使える形態形質を欠く個体においても、DNAバーコードを使って種判別が可能となっただけでなく、湖水などのいわゆる環境サンプルを使って、動物プランクトン相を調べることも可能となった。つまり、従来の手法よりも簡便に、動物プランクトン相を把握するための素地が整ったことになり、この点をもって本サブテーマは将来の環境政策へ貢献できるだろう。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究で得られた、日本淡水産動物プランクトンのDNAバーコードは、本邦湖沼での、将来の動物プランクトンモニタリングにて、担当機関により活用されることが見込まれる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) W. MAKINO, N. MARUOKA, M. NAKAGAWA and N. TAKAMURA: Ecological Research, 32, 481-493 (2017)
“DNA barcoding of freshwater zooplankton in Lake Kasumigaura, Japan”
- 2) W. MAKINO, A. S. TANABE and J. URABE: Limnology and Oceanography, 63, 758-772. “The fauna of freshwater calanoid copepods in Japan in the early decades of the 21st Century: implications for the assessment and conservation of biodiversity”

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

特に記載すべき事項はない。

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) S. PROSSER, A. MARTINEZ-ARCE and M. ELIAS-GUTIERREZ: Molecular Ecology Resources, 13, 1151-1155 (2013), A new set of primers for COI amplification from freshwater microcrustaceans.

- 2) M. LERAY, J. Y. YANG, C. P. MEYER, S. C. MILLS, N. AGUDELO, V. RANWEZ, J. T. BOEHM and R. J. MACHIDA: *Frontiers in Zoology*, 10, 34 (2013), A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents.
- 3) A. S. TANABE, S. NAGAI, K. HIDA, M. YASUIKE, A. FUJIWARA, Y. NAKAMURA, ... S. KATAKURA: *Molecular Ecology Resources*, 16, 402–414 (2016), Comparative study of the validity of three regions of the 18S-rRNA gene for massively parallel sequencing-based monitoring of the planktonic eukaryote community.
- 4) L. A. AMARAL-ZETTLER, E. A. McCLIMENT, H. W. DUCKLOW and S. M. HUSE: *PLoS One*, 4, e6372 (2009), A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA Genes.

II-5 六甲山周辺地域をモデルとした環境DNAによる水域生物相モニタリング手法の確立

神戸大学大学院人間発達環境学研究科	准教授・源 利文
	教授・丑丸敦史
	准教授・高見泰興
理学研究科	准教授・佐藤拓哉

平成28年度～30年度累計予算額：20,700千円

(うち平成28年度：7,017千円、平成29年度：7,017千円、平成30年度：6,666千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

淡水生態系はその限られた生息域のなかに多様な生息環境を有しており、非常に生物多様性の高い生態系である一方で、もっとも危機に瀕している生態系の一つでもある。水田、湿地、ワンドなどを含む我が国の淡水生態系の生物多様性を保全していくためには、このような水域及びその周辺の環境における正確な生物モニタリングが必要である。しかしながら、特に水域における直接採集などの従来の生物相モニタリングは時間的、人的コストが大きいために大規模な調査が困難であり、生物多様性を迅速かつ高精度に特定できるツールの開発が求められてきた。そこでサブテーマ5では、六甲山周辺地域をモデルとして、近年注目されている環境DNA手法を用いた水生生物相のモニタリング手法の確立およびそれらの手法を野外環境に適用したモニタリングの実践を行った。新規モニタリング手法の開発では、トンボ目、水生コウチュウ目、両生類、水生植物についてメタバーコーディング手法による網羅的な種の検出手法を検討した。これらの手法では、実験条件の検討から配列情報の集積など、メタバーコーディング手法の確立にかかる情報の蓄積についても同時に行った。また、新規手法の開発として、土壌堆積物からの環境DNAの抽出および分析手法の確立を行った。本手法では、過去に報告されていた堆積物サンプルからの環境DNA抽出手法の改善に取り組み、従来法と比較しておよそ3倍量の環境サンプルをDNA抽出に用いることが可能となり、各サンプルから得られるDNA量も増加した。野外環境における環境DNAモニタリング手法の実践においては、主に六甲山周辺地域の河川、ため池、水田地帯で魚類、水生昆虫類、両生類、水生植物の環境DNAメタバーコーディング手法を適用した。魚類では、六甲山周辺地域の225地点の河川、100地点のため池、8地域90地点の水田地帯にてメタバーコーディングを行い、在来種、外来種を含む58種の淡水魚類を検出した。さらに、河川では魚類の分布情報と周辺の環境要因から淡水魚類の分布に周辺の土地利用が関係することを明らかにし、淡水魚類の生息環境の保全における水田環境の重要性を示した。水生昆虫のうち、水生コウチュウ目については水田の水サンプルから水生コウチュウの検出ができた。しかし、生息が確認されたにもかかわらずDNAの検出されない種もいるなど改善の余地がある。トンボ目では、兵庫県内のため池約100地点を対象として行った調査で、620TUと多くのトンボ目を検出できた。ため池の環境要因や魚類の出現情報から、ため池におけるトンボ目の多様性には、植物構造の有無や人工護岸の割合、魚類の種数が影響を与えていることが明らかとなった。両生類では六甲山周辺の2地域の水田地帯において、5種の無尾目と1種の有尾目の検出し、目視で判別の困難な種や目視できていない種まで検出できた。水生植物では、六甲山周辺のため池を中心とした約150地点で環境DNAメタバーコーディングを適用し、絶滅危惧種を多く含むイバラモ属の生息するため池群を明らかにした。また、イバラモ属の分布にはため池周辺の森林環境の有無が重要であることが示唆された。以上のように、サブテーマ5では環境DNA手法を用いて多くの分類群のモニタリングを実践し、手法の確立を行った。また、一部の分類群については、多地点・高頻度な調査が可能な環境DNA手法の利点を活かし、周辺環境と種の多様性の関係を明らかにするなど、水生生物相のモニタリングにおける環境DNA手法の有用性を示

した。

[キーワード]

水生昆虫、水生植物、両生類、河川、水田

1. はじめに

近年、人間活動の影響などにより、世界各地で生物多様性の減少が生じている。特に淡水生態系はその限られた生息域のなかに多様な生息環境を有しており、特に生物多様性の高い生態系である一方で、環境の劣化や人間活動の影響などを受けやすく、もともと危機に瀕している生態系の一つでもある (Gleick et al. 1996; Dudgeon et al. 2006)。我が国における淡水生態系の主要な構成要素として、河川、ため池を中心とした恒常的な水域、そして水田、湿地、ワンドなどの一時的な水域があげられる。淡水生態系の生物多様性を保全していくためには、これらの環境を内包する水田およびその周辺の環境を保全が重要となり、現在そこにどのような生物種が生息しておくことが非常に重要な課題となる。また、淡水環境では指標として魚類が特に注目される傾向にあるが、水生昆虫類や水草などの水生植物も淡水生態系における重要な多様性の指標である (Foster et al. 1990; Clark and Samways 1996)。しかしながら、水田環境を利用する生物種には多くの分類群が含まれており、それらを網羅的に把握することは直接採集などの従来法では時間的、人的コストがかかってしまうことから困難であり、生物多様性を迅速かつ高精度に特定できるツールの開発が求められてきた。近年注目されている環境DNA手法では、対象の分類群を網羅的に検出する環境DNAメタバーコーディングが、魚類ですでに確立されており、水サンプルからそこに生息する魚類を網羅的に検出することができるようになってきている (Miya et al. 2015、サブテーマ3)。サブテーマ5では、環境DNA手法を用いた淡水生態系におけるそれぞれの分類群のなかから、水生コウチュウ目、トンボ目、両生類、水生植物について環境DNAメタバーコーディングによる分類群網羅的なモニタリング手法を新たに確立し、六甲山周辺の水域をモデルとして、すでに手法の確立している魚類を含め、それぞれの手法の実践を行った。

2. 研究開発目的

環境DNAメタバーコーディング手法は調査地における分類群網羅的な検出手法として有効なツールである。一方で、有効性の確認されている環境DNAメタバーコーディングの対象は魚類 (Miya et al. 2015) や哺乳類 (Ushio et al. 2017) など一部の分類群にとどまっており、環境DNAメタバーコーディング手法を適用できる分類群の拡大が求められる。特に淡水生態系の主要な構成分類群である水生昆虫類、両生類、水生植物については、淡水生態系の生物多様性の保全にむけたモニタリングを行ううえで、手法の確立の重要度が高い。さらに、淡水生態系では、生息地の喪失や改変、二次的自然の荒廃による生態系の劣化が進行しており、近年多くの分類群で絶滅危惧種の種数が増加している。そこでサブテーマ5では、水生昆虫類のなかでも環境の指標種となることが多い1)水生コウチュウ目および2)トンボ目、淡水生態系でも特に水田生態系の主要な分類群である3)両生類、4)水生植物のメタバーコーディング手法の確立と野外環境での実践を目的とした。さらに、これらの手法に加えてすでに確立されている魚類のメタバーコーディング手法を用いて、六甲山周辺の河川、ため池、水田を対象としたモニタリング手法の実践を行った。魚類、トンボ目、水生植物では、得られた結果から環境要因と対象分類群の種の出現関係について考察を行い、周辺環境や土地利用の変化が分類群の出現関係や種数に与える影響について統計モデルの構築による検証を行った。

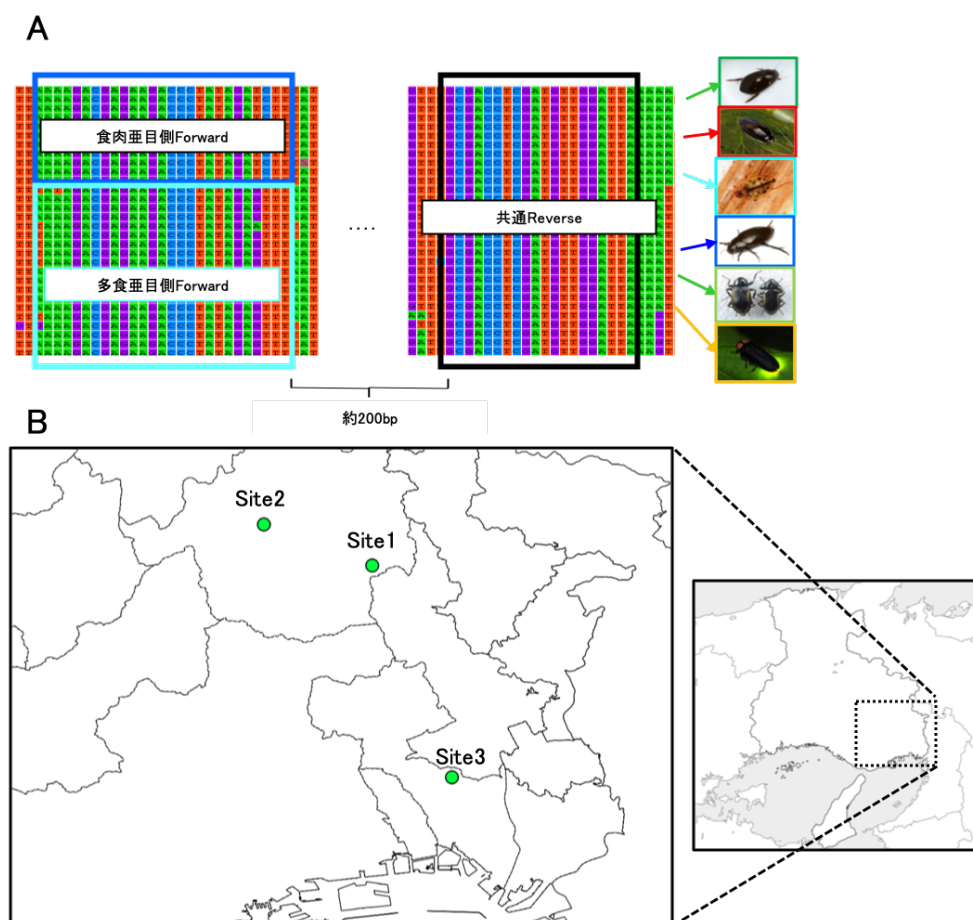
さらに、淡水生態系における生物種は、水田のような一時的な水域を利用する種や生活史の中の一時期のみ水域を利用する種も多く含まれる。そのため、たとえ環境DNA手法であったとしても、季節性の大きな分類

群の検出は困難となる可能性がある。そこで、水よりも長期に渡ってDNA情報が保存されていると環境媒体を得ることができれば、季節を問わないサンプリングが可能となり、調査努力の削減に繋がると考えられる。サブテーマ5では新たな環境媒体の候補として堆積物に着目し、土壌堆積物からの環境DNAの抽出手法の確立と水サンプルと比較した際の特性の違いについての解明を行った。

3. 研究開発手法

1) 水生コウチュウ目の環境DNAメタバーコーディング手法の確立および野外環境での実践

ミトコンドリアDNA16SrRNA領域を用いて、9科38属65種・亜種の塩基配列情報から環境DNAメタバーコーディング手法に適した増幅長約200bpを増幅できるようなユニバーサルプライマーを設計し、その特異性をPrimer BLASTで確認した。コウチュウ目については、ゲンゴロウ上科などを含む食肉亜目とガムシ上科やホタル上科を含む多食亜目をそれぞれ増幅できるように、2種類のフォワードプライマーと1種類のリバースプライマーを設計した(図(5)-1)。その後、組織DNAサンプルを用いてPCR酵素、アニーリング温度、サイクル数など最適なPCR実験条件を検討した。種の配列情報を登録したリファレンスデータベースの構築には、プライマー設計に使用したデータベース上の配列情報に加えて、サンガーシーケンスによって新たに取得した種の塩基配列を加えたローカルデータベースを用いた。このデータベースを組み込んだローカルの解析パイプラインを用いて、各地点における種の出現情報を出力した。ユニバーサルプライマーを用いて、水槽から採水した水サンプルおよび複数種の対象生物の組織DNAを混合して作成したモックサンプルを用いて、対象生物が実際に増幅・検出されることを確認したのち、野外サンプルへとメタバーコーディング手法を適用した。プライマー設計から野外サンプルへの適用までの過程については、以降のトンボ目、両生類、水生植物のメタバーコーディング手法の確立についても、同様の手順で行っている。



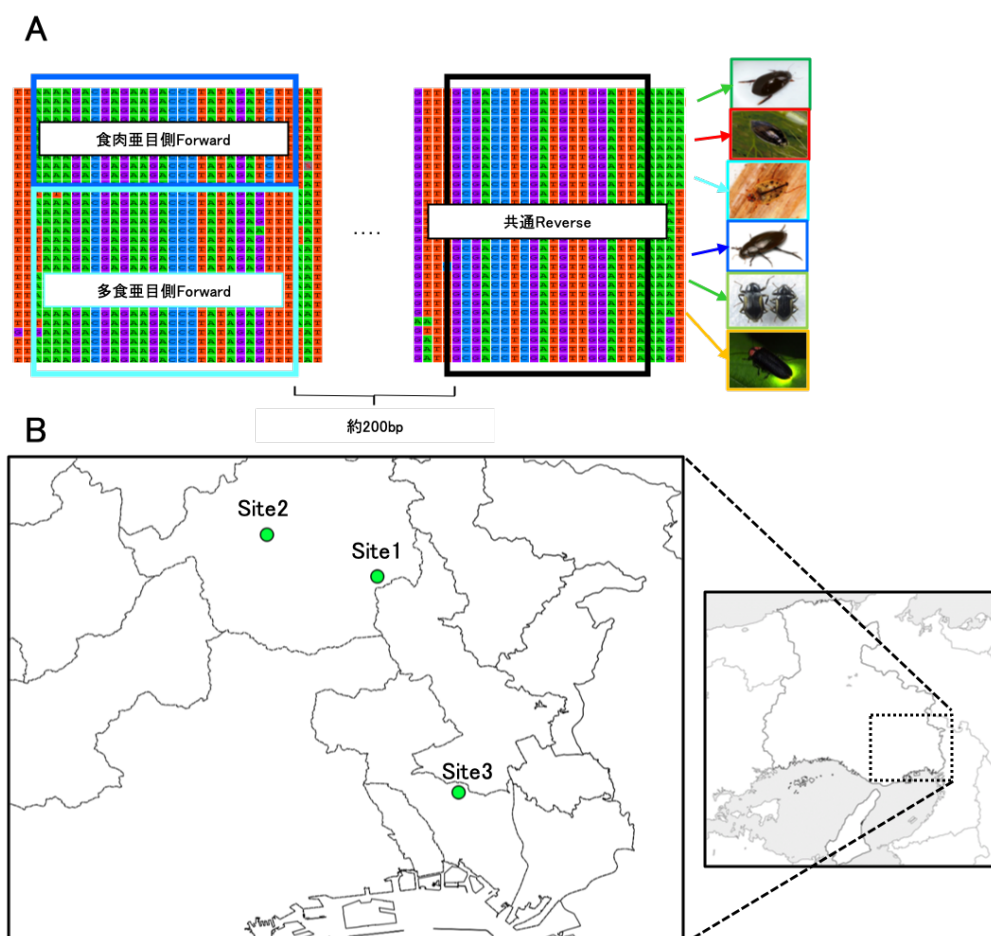
図(5)-1 コウチュウ目メタバーコーディングのプライマー設計図 (A) と野外の採水地点 (B)

野外サンプルへの適用では、2018年8月に六甲山周辺地域の水田3地点で水サンプルの採水と採集調査を同時に行い、採集された種については種レベルまで同定し、記録した。次世代シーケンサーを用いてコウチュウ目の環境DNAメタバーコーディングを行い、野外サンプルから検出されたコウチュウ目のDNA情報と採集された種を比較することで、環境DNA手法がどの程度種を網羅できているかを確認した。

2) トンボ目の環境DNAメタバーコーディング手法の確立および野外環境での実践

トンボ目では、ミトコンドリアDNA12SrRNA領域において、10科24属36種のDNA情報を各種の組織DNAからサンガーシーケンスによって取得し、得られた塩基配列情報をもとに増幅長約130bpとなるユニバーサルプライマーを設計した。トンボ目では、イトトンボ亜目のみ共通配列部分が若干異なるため、1種類のフォワードプライマーとトンボ亜目とイトトンボ亜目を増幅できるような3種類のリバースプライマーを設計した(図(5)-2)。

野外環境への適用では兵庫県内のため池100地点を選定し、2016年の夏(6-7月)と冬(11-12月)の2回それぞれの地点で水質測定(水温、pH、溶存酸素量、電気伝導度、濁度)と採水(計200地点)を行った。すべての地点にトンボ目の環境DNAメタバーコーディング手法を適用し、得られた結果からそれぞれの季節および地点におけるトンボ目の出現種数を算出した。これらの地点で採水したサンプルにはMiFish法(Miya et al. 2015)も同時に適用し、得られた結果を以下の統計モデル解析に用いた。最後に、各地点のトンボ目種数、魚種数、周辺の土地利用、ため池構造を含めた環境要因を用いて構造方程式モデルを構築し、ベストモデルの選択を行った。

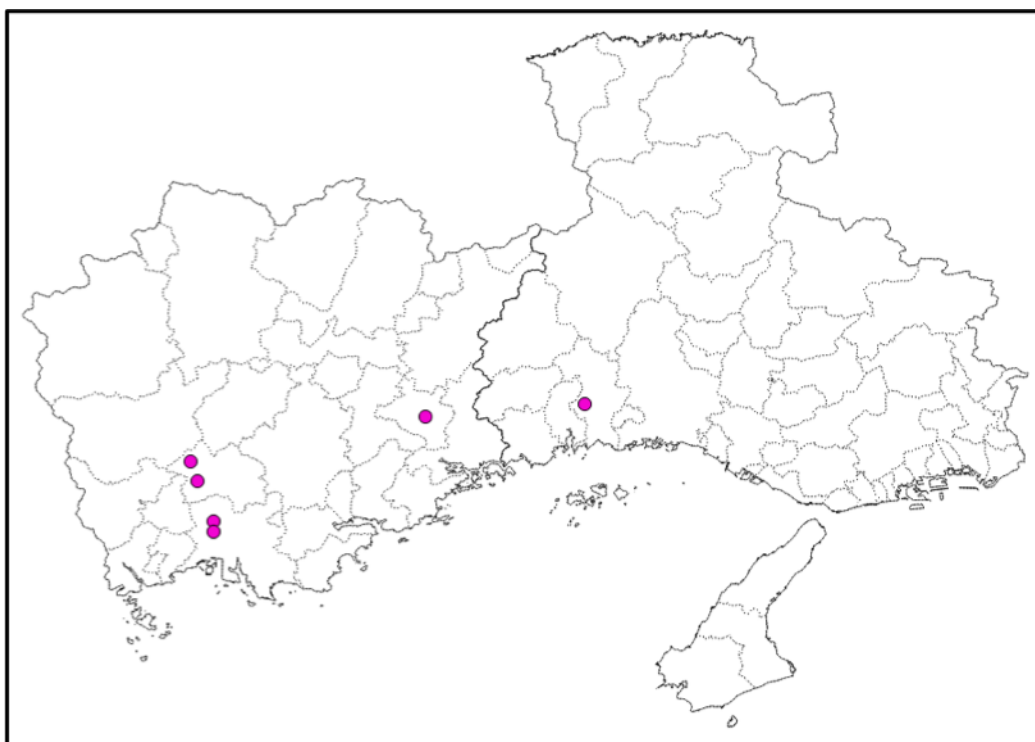


図(5)-2 トンボ目メタバーコーディングのプライマー設計図 (A) と野外の採水地点 (B)

3) 両生類の環境DNAメタバーコーディング手法の確立および野外環境での実践

両生類では、別プロジェクトにおいて下記の方法で設計されたプライマーを用いて、その有効性を検証した。ミトコンドリアDNA16SrRNA領域において、3目227種の塩基配列をもとに増幅長約290bpとなるユニバーサルプライマーを設計した。

野外環境への適用では、岡山県のため池6地点（2016年10月）、六甲山周辺の水田地帯2地域20地点（2018年6月）で採水したサンプルを使用した。また、採水と同時に目視および鳴き声による観察調査を行い、観察された種を記録した。コウチュウ目と同様に、環境DNAメタバーコーディングの結果と観察調査の結果を比較することで、環境DNA手法による検出種数の確認を行った。



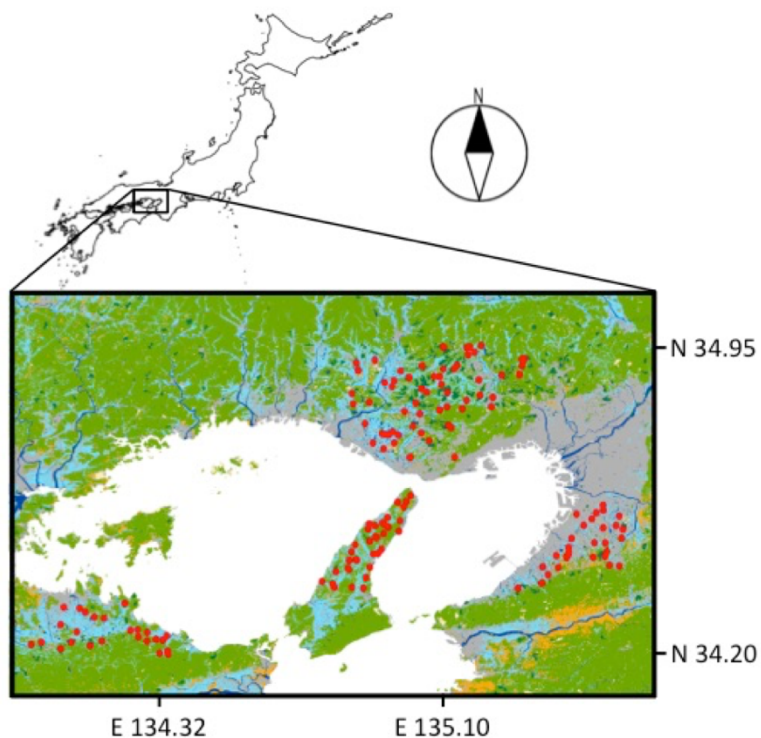
図(5)-3 両生類メタバーコーディングの調査地である岡山県のため池。

兵庫県調査地については、図(5)-5BのSite3およびSite4を参照。

4) 水生植物の環境DNAメタバーコーディング手法の確立および野外環境での実践

水生植物では、水生植物全般を対象とできるような核DNAのITS領域に増幅長約300bpのユニバーサルプライマーを設計した。特に本研究では、止水域の水生植物の中でも絶滅危惧種を多く含むイバラモ属を検出することを目的として、イバラモ属9種のDNA配列に基づいて設計した。コウチュウ目と同様に手法として確立したのち、野外環境へと適用した。ユニバーサルプライマーの検証として、トンボ目と同様神戸大学鶴甲第2キャンパスのビオトープの水サンプルおよびイバラモ属を飼育していた水槽水サンプルを用いた。

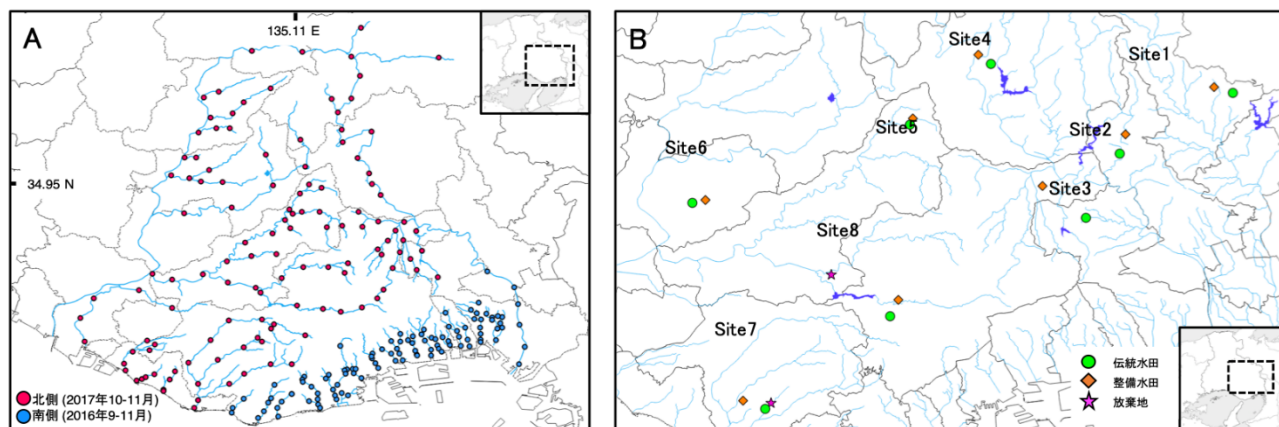
野外環境では、2016年7-9月に兵庫県、大阪府、香川県のため池158地点において採水調査を行い、それぞれのサンプルにイバラモ属をターゲットとした環境DNAメタバーコーディング手法を適用した。ため池の種類を護岸の形状と周辺環境の組み合わせから決定し、それぞれの環境要因をため池の環境として当てはめた。また、採水地点ではトンボ目と同様にため池の水質測定を行った。すべての環境要因を説明変数に、イバラモ属の分布情報を応答変数に用いて、一般化線形モデル（GLM）によるモデル構築を行い、AICによるベストモデルの選択とイバラモ属の分布に影響を与えている環境要因を考察した。



図(5)-4 水生植物メタバーコーディングの調査地概略図
赤色の地点は、採水地点であるため池を示す。

5) 六甲山周辺地域における魚類環境DNAメタバーコーディング

魚類においては、2016年10-11月に六甲山系の南側、2017年9-11月に六甲山系の北側をそれぞれ対象として、4水系37河川225地点で採水調査と水質測定を行った(図(5)-5A)。MiFish法を適用し、各地点に出現する淡水魚類の種組成を特定した。また、各地点で行った水質測定で計測したpH、電気伝導度、水温を環境要因として記録した。さらに、QGISを用いて採水地点周辺の土地利用情報(標高、傾斜、水田面積割合、人工地割合、森林面積割合)と河川情報(河川次数、河川合流点、河口からの距離)を求めた。魚類の種組成を非計量多次元尺度構成法(NMDS)で6種のグループに要約し、それぞれのグループを応答変数、環境要因を説明変数、河川IDをランダム項として、一般化線形混合モデルによるモデル構築を行った。それぞれのグループで出力されたベストモデルから、それぞれの魚類グループの分布と土地利用や環境要因との関係について考察した。



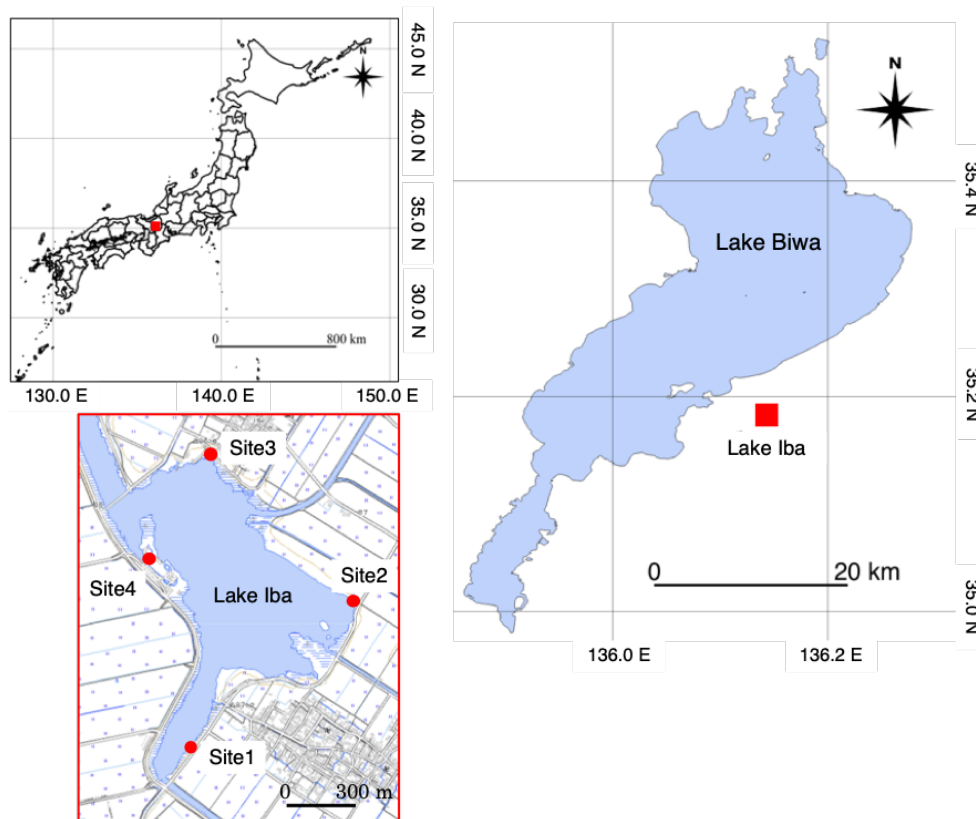
図(5)-5 河川(A)と水田(B)における魚類メタバーコーディングの採水地点

水田では、河川同様に魚類環境DNAメタバーコーディングを行った。8地域18ヶ所の水田地帯において、1ヶ所につきため池2地点、水田2地点、用水路1地点の計5地点で、各地点につき湛水期の夏と渇水期の秋の二季節で採水および堆積物の採取を行った（180サンプル；図(5)-5B）。各地域および各管理区の淡水魚類相の違いおよび種組成の変化から、それぞれの管理手法や地域間の比較を行った。

6) 堆積物からの環境DNA抽出手法の開発と実践

手法の検討に使用する堆積物および水サンプルを、神戸大学鶴甲第2キャンパスに造成されているビオトープからそれぞれ81サンプル（9バルクサンプル×9分割）採取した堆積物は1サンプルにつき3グラム、水サンプルは1サンプルにつき250mLとした。9分割されたサンプルをそれぞれ9個のタイムポイント（0、12、24、48、72、168、336、504、672時間）ごとにろ過およびDNA抽出の処理を施した。堆積物サンプルにはKouduka et al. (2012)に従ってアルカリ抽出法をDNA抽出の行程に加え、処理後に残ったペレットを用いてDNA抽出を行った。堆積物および水サンプルを用いて、ビオトープに生息しているカワバタモロコ *Hemigrammococypris rasborella*の環境DNAをリアルタイム定量PCRで検出を行い、水と堆積物においてそれぞれのタイムポイントで残存している環境DNA量を比較した。また、野外サンプルでは琵琶湖の内湖の一つである伊庭内湖（図(5)-6）で4地点採水および堆積物の採取を行い、コイ、ブルーギル、オオクチバスの環境DNAをリアルタイム定量PCRで比較した。環境DNAメタバーコーディング手法でも同様に、伊庭内湖のサンプルを用いてサンプル間の検出種数および種組成の違いについて検証した。

また、水サンプルに比べて利用できる容量が少なく、PCR阻害が生じやすい堆積物サンプルの全DNA収量を増加させるために、アルカリ抽出に用いる堆積物量の増加およびG2DNA/RNAエンハンサー（AMPLICON社製 <https://www.funakoshi.co.jp/contents/68547>）の添加によるDNA収量増加の検討を行い、カワバタモロコのリアルタイム定量PCRで水サンプル1Lから抽出された環境DNAサンプルとの比較を行った。

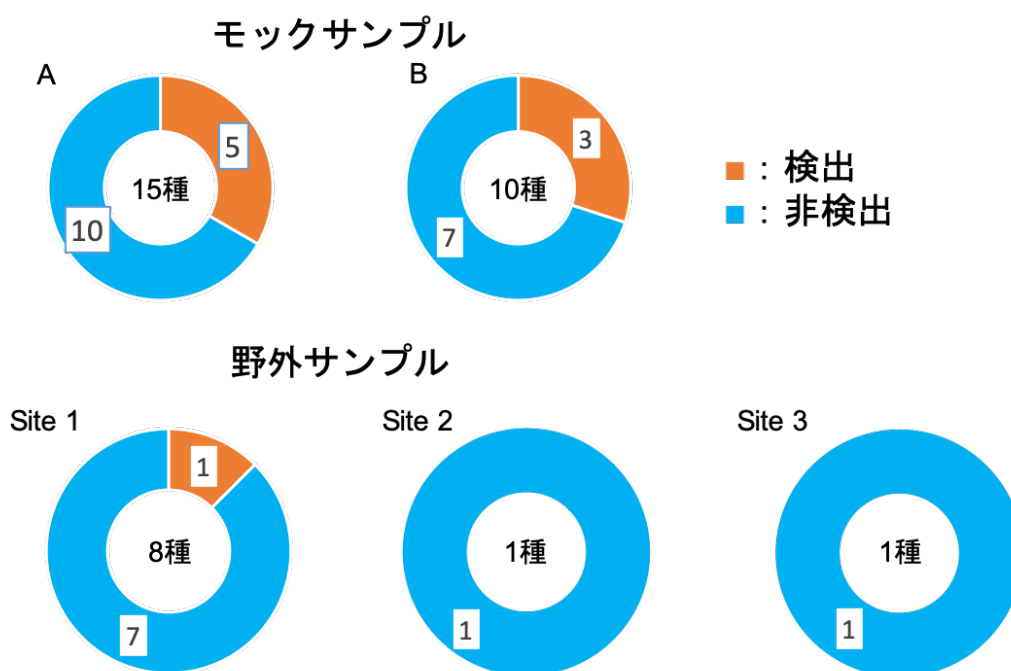


図(5)-6 堆積物環境DNAにおける野外サンプルの採取地点（赤色）

4. 結果および考察

1) 水生コウチュウ目の環境DNAメタバーコーディング手法の確立および野外環境での実践

実験環境下では、単一種のDNAでは対象としたすべての分類群でPCR増幅が確認されたため、複数種のDNAを複合したモックサンプルおよび野外環境への適用を行った。モックサンプルでは、3科15種(図(5)-7A)と3科10種(図(5)-7B)のDNAを混ぜた2種類のサンプルを作成し、メタバーコーディング手法を適用したところ、それぞれ検出できた種数は5/15種と3/10種であった。また、野外環境ではそれぞれ1/8、0/1、0/1種であった。したがって、本研究で開発したユニバーサルプライマーはコウチュウ目のDNAを増幅できる一方で、野外環境へ適用した場合はコウチュウ目を十分に増幅できていないことになる。この要因として、2種類のフォワードプライマーを使用したこと、サンプルごとのPCRの繰り返し数が不足していたことが考えられる。フォワードプライマーについては、各サンプルでゲンゴロウ科の種がほとんど検出されていなかったことから、プライマー間の増幅バイアスが生じている可能性が考えられる。この影響については、2種類のフォワードプライマーを分割してそれぞれのプライマーでPCRを行うことで、検証できると考えられる。また、PCRの繰り返し数不足について、本研究ではそれぞれのサンプルについて4繰り返しでPCRを行っていたが、種数が飽和するPCR繰り返し数を検討していく必要がある。水生コウチュウ目のメタバーコーディング手法を確立するためには、これらの課題を解決する必要がある。一方で、本研究で作成したユニバーサルプライマーは環境DNAと同等の濃度にあわせたコウチュウ目の組織DNAサンプルでも十分にPCR増幅が確認できていることから、コウチュウ目のDNAを増幅できることは検証済みである。今後、課題を解決していくことで、水生コウチュウ目の環境DNAメタバーコーディング手法としての確立と実践が可能になるだろう。

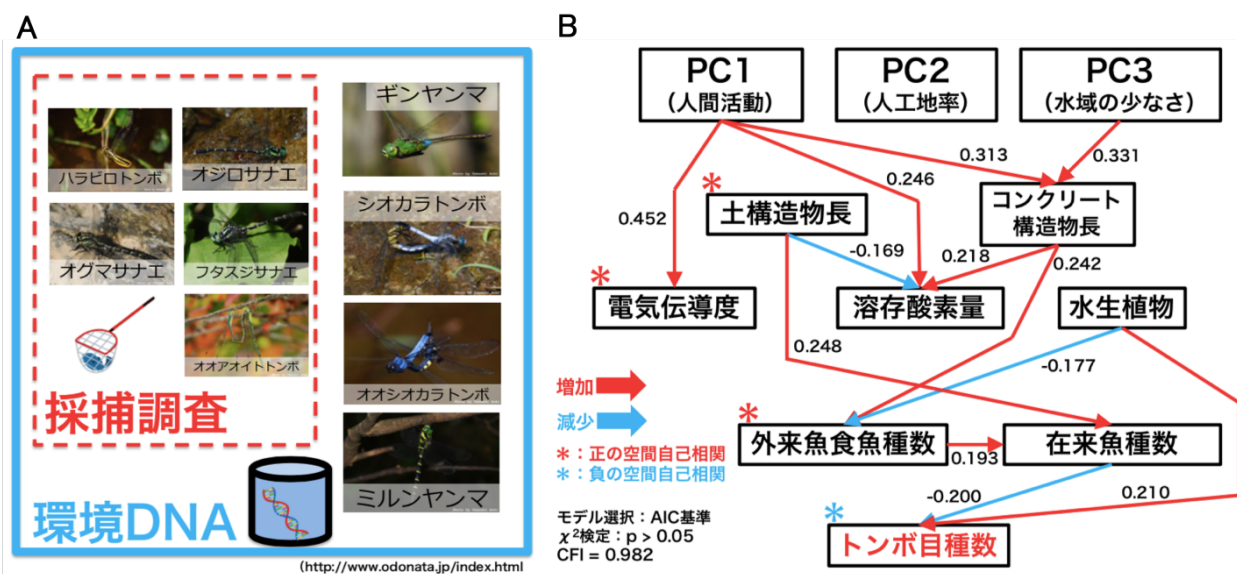


図(5)-7 水生コウチュウ目メタバーコーディング手法によるモックサンプルと野外サンプルの検出種数

2) トンボ目の環境DNAメタバーコーディング手法の確立および野外環境での実践

実験環境下、および野外のため池でトンボ目のDNAを検出できた。さらに、野外サンプルでは採捕では捕獲できなかった種を環境DNAから検出することができた(図(5)-8A)。これにより、本研究で開発したユニバーサルプライマーがトンボ目の網羅的な検出に有効なツールであることが証明できた。

ユニバーサルプライマーを用いた野外環境での実践では、野外のため池100地点で、夏と冬の二季節で採水した計200サンプルの解析を行ったところ、62のトンボ目と考えられるOTUが検出され、うち260TUは種レベルまで同定可能であった。残りのOTUについては、属レベルまでの同定にとどまるもの等であり、これらは今後リファレンスデータベースが充実することで種レベルまで同定できる可能性が高いと考えられる。種レベルまで同定されたOTUのなかでは、コシアキトンボ*Pseudothemis zonata*、シオカラトンボ*Orthetrum albistylum*などが検出されていた。さらに、地点数は少ないものの、絶滅危惧種に指定されているオオキトンボ*Sympetrum uniforme*や準絶滅危惧種のベニイトトンボ*Ceriagrion nipponicum*が検出されるなど、絶滅危惧種も検出されていた。冬季のサンプルではほとんどのサンプルでトンボ目のOTUが検出されなかったことから、トンボ目を検出するためには少なくとも夏季に調査を行う方が良いと考えられる。同時に行った魚類のメタバーコーディングでは29種類の魚類が検出されており、ヨシノボリ類*Rhinogobius* spp.、コイ*Cyprinus carpio*、ブルーギル*Lepomis macrochirus*などが検出されていた。これらは止水域に普遍的にみられる種であるため、多くのため池からDNAが検出されたのだと考えられる。一方で、魚類でも絶滅危惧種であるカワバタモロコやミナミメダカ*Oryzias latipes*が検出されていたことから、兵庫県内のため池には絶滅危惧種のトンボ類や魚類の生息地となっている重要なため池が数は少ないもの残っていることが明らかとなった。



図(5)-8 トンボ目におけるメタバーコーディング手法の野外適用 (A) と構造方程式モデル結果 (B)
 左図の赤枠内の種は採捕調査で、青枠で囲まれている種は環境DNAで検出された種を示す。また、構造方程式における矢印の方向と色はそれぞれの要因が影響をあたえる方向と影響の正負を示す。

構造方程式モデルの構築の結果、ベストモデルは図(5)-8Bのようになった。このモデル結果において、適合度指標CFIは0.982、データとモデルとの乖離指標であるRMSEAは0.040という、非常に当てはまりのよいモデルとなった。モデルにおいて、トンボ目の種数は植物構造の有無に有意な正の影響を受け、在来魚の種数に有意な負の影響を受け、負の空間自己相関を示すことがわかった。これは、成虫の産卵行動が植物に依存している種もいることや幼虫が植物構造に影響を受けるためであると考えられる。ため池に在来魚は雑食性の種が多く、幼生に対して捕食圧が働いた結果であると考えられること、コイ科の底生魚のなかにはベントスを捕食する際に底質を掘り返すようにすることから、植生などが掘り返されたことが影響している可能性があることなどが考えられる。また、空間自己相関が負に効くということは、同数程度の種数が生息するため池は距離的に離れる傾向があることを示すと解釈できる。このことは、どのような環境でも生息できる種は一律に分布できる一方で、好適な環境に限られる種は特定の地点に集中しているということが考えられ

る。以上のことから、本研究では初めて環境DNAからトンボ目を複数種同時検出する系の開発に成功し、環境DNA分析を用いることで、広域・多地点にわたる水中の生物相をまとめて調査することができた。そのため、今まであまり研究のされてこなかったトンボ目多様性に対する魚類の多様性と環境要因の影響を構造的に把握することができた。また、本研究は環境DNA手法を生態学に応用させた先進的な事例としてその有用性を示すことができた。これらの知見は、絶滅の危機に瀕したトンボ目の生息地の発見やその保全施策に向けた有益な知見を提供できると考えられる。

3) 両生類の環境DNAメタバーコーディング手法の確立および野外環境での実践

実験環境下では、3目12種の組織DNAを混合したモックサンプルに対してメタバーコーディングを行った結果、全種を検出することができた。これにより、本研究で開発したユニバーサルプライマーが両生類の網羅的な検出に有効なツールであることが証明できた。

ユニバーサルプライマーを用いて、岡山県のため池群、六甲山周辺の水田地帯で両生類の環境DNAメタバーコーディングを行った。岡山県のため池サンプルでは、従来法で5種の両生類が発見されていたが、環境DNAではウシガエル *Lithobates catesbeiana* 1種しか検出されなかった。これはサンプルが冬季に採取した採水サンプルだったため、環境DNAが検出された種数が少なかったと考えられ、両生類が活動し始める春から夏にかけて採水を行うことで、他種の環境DNAを検出することができるかもしれない。また、一部の種はリファレンスデータベースに登録されていなかったことから、データベースの配列情報を充実させていくことで、解決できる可能性が非常に高い。

六甲山の水田地帯では、2地域20地点から5種類の無尾目と1種類の有尾目を検出した。調査地の20地点のうち無尾目が確認された地点数は従来手法で10地点、環境DNA解析で存在が推定された地点数は19地点だった。また、有尾目が確認された地点数は1地点で、環境DNA解析で存在が推定された地点数は6地点だった。従来法で確認された無尾目の幼生のうち種まで同定されていないものも存在したが、環境DNA解析によってどの種の幼生であったかある程度推定された。

本研究で開発したユニバーサルプライマーは、両生類の環境DNAを十分に増幅し、種の出現情報を検出するうえで有効なツールであることが示された。両生類の分布調査では目視調査や鳴き声の聞き取り調査などが行われてきたが、季節や時間帯の制約などが大きく、また幼生の同定は困難であることから、多大なコストがかかってきた。両生類における環境DNAメタバーコーディング手法が確立できたことで、分布情報など保全の基礎となる情報の収集をより効率的に行うことができるようになり、両生類の保護・保全に大きく寄与できると考えられる。

4) 水生植物の環境DNAメタバーコーディング手法の確立および野外環境での実践

観察の結果、水面上の植物も含めてピオトープでは15種が確認された。メタバーコーディングでは、27種類の植物の環境DNAが検出され、観察された種のうち7種が検出された。観察されなかった種で環境DNAが検出されたものは22種類あった。これらの種の中には、ダイコン属のような人間の生活と関連する種やケヤキ属のような陸上植物までもが検出されていた。以上のことから、本研究で開発したユニバーサルプライマーは水生植物以外の環境DNAも検出できる可能性が示唆されており、今後さまざまな植物の環境DNA調査に利用できる可能性を有している。

野外適用では、調査地域とした全158地点のため池のうち、14地点でイバラモ属のいずれかの種の環境DNAが検出された。内訳は、兵庫県本州側65地点からは6地点、兵庫県淡路島37地点のうち4地点、香川県25地点のうち2地点、大阪府31地点のうち2地点である。イバラモ属9種のうち、種間の判別ができないOTUが4種類あり、それらは複合種と判定している。158地点のイバラモ属の結果と環境要因を組み合わせたGLMの結果、池周辺における森林の距離が有意に効いていることが明らかとなった ($p < 0.05$)。このことから、ため池が

森林に囲まれている距離が長いほどイバラモ属が生育している可能性が高いことが示された。多くの沈水植物は生育するために根を張れる土壌が必要であり、周囲の森林はイバラモ属の定着や生育に必要な土壌の供給源になっている可能性がある。また、林縁のため池という条件は、今後イバラモ属の保全に活かすことのできる知見となると考えられる。

	イバラモ ヒメイバラモ	トリゲモ オオトリゲモ	イトトリゲモ イトイバラモ	ホッソモ	ムサシモ	ヒロハ トリゲモ		イバラモ ヒメイバラモ	トリゲモ オオトリゲモ	イトトリゲモ イトイバラモ	ホッソモ	ムサシモ	ヒロハ トリゲモ
H001	0	0	0	0	0	0	H035	0	0	0	0	0	0
H002	0	0	0	0	0	0	H036	0	0	0	0	0	0
H003	0	0	0	0	0	0	H037	0	0	0	0	0	0
H004	0	0	0	0	0	0	H038	0	0	0	0	0	0
H005	0	1	0	0	0	0	H039	0	0	0	0	0	0
H006	0	0	0	0	0	0	H040	0	0	0	0	0	0
H007	0	0	0	0	0	0	H041	0	0	0	0	0	0
H008	0	0	0	0	0	0	H042	0	0	0	0	0	0
H009	0	0	0	0	0	0	H043	0	0	0	0	0	0
H010	0	0	0	0	0	0	H044	0	0	0	0	0	0
H011	0	0	0	0	0	0	H045	0	0	0	0	0	0
H012	0	0	0	0	0	0	H046	0	0	0	0	0	0
H014	0	0	0	0	0	0	H047	0	0	0	0	0	0
H015	0	0	0	0	0	0	H048	0	0	0	0	0	0
H016	0	0	0	0	0	0	H049	0	0	0	0	0	0
H017	1	0	0	0	0	0	H050	0	0	0	0	0	0
H018	0	0	0	0	0	0	H051	0	0	0	0	0	0
H019	0	1	0	0	0	0	H052	0	0	0	0	0	0
H021	0	0	0	0	0	0	H053	0	0	0	0	0	0
H022	0	0	0	0	0	0	H054	0	0	0	0	0	0
H023	0	0	0	0	0	0	H055	0	0	0	0	0	0
H024	0	0	0	0	0	0	H056	0	1	1	1	0	0
H025	0	1	0	0	0	0	H057	0	0	0	0	0	0
H026	0	0	0	0	0	0	H058	0	0	0	0	0	0
H027	0	0	0	0	0	0	H059	0	0	0	0	0	0
H028	0	0	0	0	0	0	H060	0	0	0	0	0	0
H029	0	0	0	0	0	0	H062	0	0	0	0	0	0
H030	0	0	0	0	0	0	H063	0	1	0	0	0	0
H031	0	0	0	0	0	0	H064	0	0	0	0	0	0
H032	0	0	0	0	0	0	H065	0	0	0	0	0	0
H033	0	0	0	0	0	0							
H034	0	0	0	0	0	0							

図(5)-9 水生植物環境DNAメタバーコーディングにおける野外適用の結果

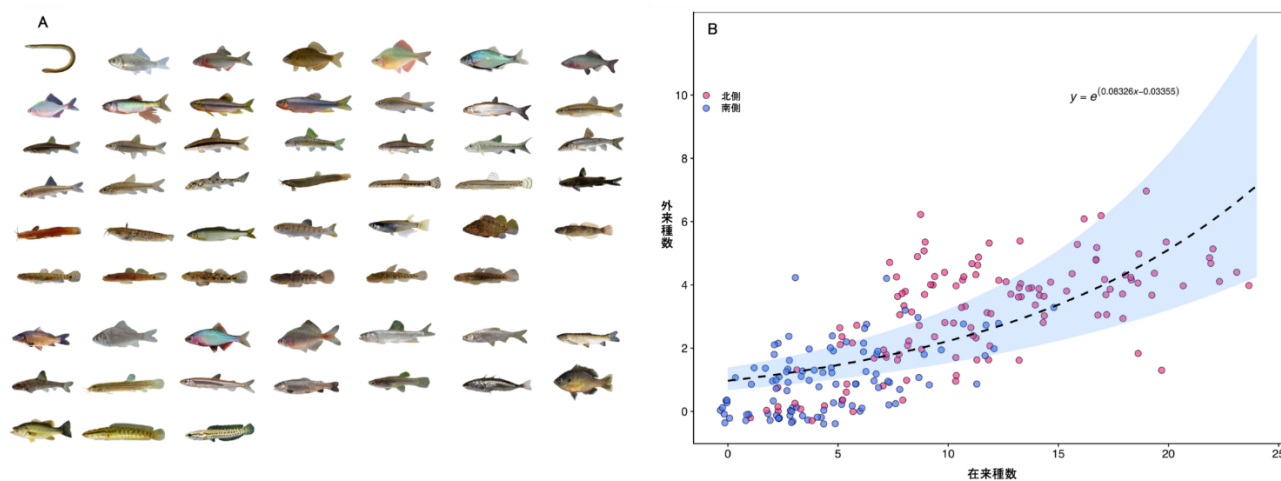
赤色で示されている地点は、イバラモ属が検出された地点を示している。ここでは、調査地の一部である兵庫県本州側の調査地の結果を示している。塩基配列上で種判別できなかったものを複合種として2種の和名を記載している。

本研究では、水生植物のなかでも特にイバラモ属に焦点を当て、ユニバーサルプライマーの開発と手法の確立を行った。本研究で対象としたイバラモ属は、沈水植物であることから種の同定および分布の特定が困難である。本研究では種レベルの解像度まで落とせなかった種群はあるものの、イバラモ属を検出することはできたことから、本研究で確立したメタバーコーディング手法は絶滅危惧種を多く含むイバラモ属の保全を行ううえで有効なツールとなることが期待される。さらに、このユニバーサルプライマーは他の植物種を検出できる可能性があり、さまざまな植物種への環境DNA研究の応用についても期待できると考えられる。

5) 六甲山周辺地域における魚類環境DNAメタバーコーディング

六甲山周辺地域の河川では、225地点から在来種と外来種を含む58種の淡水魚類が検出された(図(5)-10)。これらのうち、もっとも多く出現した種はカワヨシノボリ *Rhinogobius flumineus* で181地点であり、次点でカワムツ *Zacco temminckii* であった。これらの種は、流速の早く都市化の進んだ南側の河川でも頻繁に見つかり、検出された魚類の中でもっとも広い分布をもつ種であった。また、オオクチバスやブルーギルなどの外来種も頻繁に出現していたことから、外来魚が大規模に侵入・定着していることも示唆された。一方で、ニホンウナギ *Anguilla japonica* やミナミメダカ、タナゴ類など絶滅危惧種も多数の地点から検出されたことから、六甲山周辺の河川群では淡水魚類の多様性の高いエリアが残されていると考えられる。ま

た、淡水魚類において、在来種数の多い河川では外来種数も多くなる傾向がみられた(図(5)-10)。これは、在来魚にとって良好な河川環境が外来魚にとっても良好な環境であることを示しており、一方で在来魚も外来魚も定着できないような魚類の生息できない河川があることも示している。



図(5)-10 六甲山周辺河川における出現魚類(A)と種の出現関係(B)

各点は、それぞれの地域の調査地点を表す。

破線の曲線は回帰曲線を、青色の範囲は95%信頼区間をそれぞれ示す。

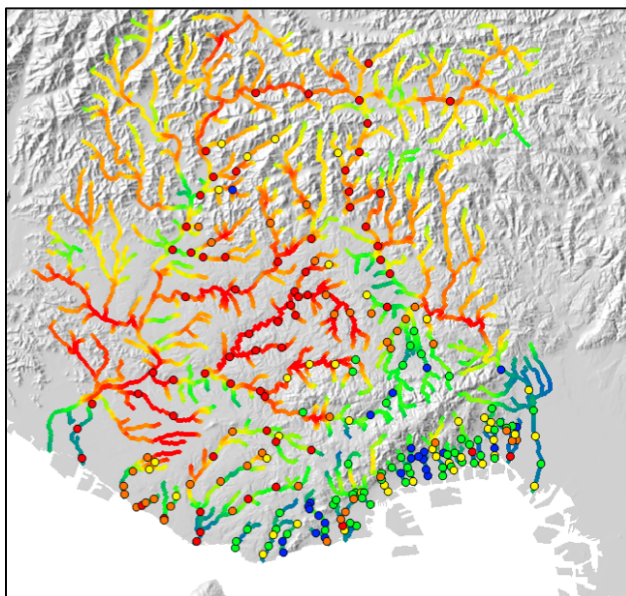
出現する魚類の分布情報を魚類の生態情報を用いてNMDSで要約すると、生息環境、産卵生態、生活史の分類に基づく58種の魚類は6グループに大別された。これは、淡水魚類の分布パターンを決定するうえで、この3種類の情報が重要であることを示している。また、六甲山における淡水魚類の分布や種の多様性を決定する要因を検証するためにGLMMによるモデル構築を行ったところ、表(5)-1のようになり、ベストモデルに基づく分布予測図は図(5)-11のようになった。

モデル構築の結果、湿地率、合流点、河川次数が正の効果、すなわち水田環境が河川の周辺に多いほど、河川の規模が大きくなり、中下流域ほど種数が増加することが明らかとなった。また、人工地率、標高、海からの距離が負、つまり都市化が進むほど、また上流部へ登っていくほど種数は減少することが示された。以上のことを総合すると、六甲山周辺地域の河川において下流域は都市化が進んでいることから、最も種数が多くなる地域は水田環境の多く残されている河川の中流部であることが考えられる。これは、分布予測図の結果からみても、非常に当てはまりの良いモデルであると考えられる(図(5)-13)。また、6グループの分布予測をそれぞれ個別に見ていくと、ニホンウナギやハゼ科魚類など回遊する生態を有するグループは、人工地率が正の効果となっており、人工地率が増すほど種数が増える結果となった。これは、河川次数や海からの距離などが正の効果を示していることとあわせて、このグループの好適環境である下流域から汽水域に分布が集中することを間接的に示している。

表(5)-1 GLMMによって選択された淡水魚類の分布予測のベストモデル

橙色が正の効果、青色が負の効果を示す変数となっている。

グループ	人工地率	湿地率	合流点	標高	(標高) ²	海からの距離(log)	河川次数	傾斜	AIC	種数
全種	-3.031	1.120	0.0183	-0.0023	-	-0.123	0.0875	-	1328.558	58



図(5)-11 GLMMによって選択された淡水魚類58種の河川の分布予測図
河川の着色は、青色から赤色へ向かうほど予測される種数が増加する。
それぞれの点は調査地とそこで検出された魚類の種数を示している。

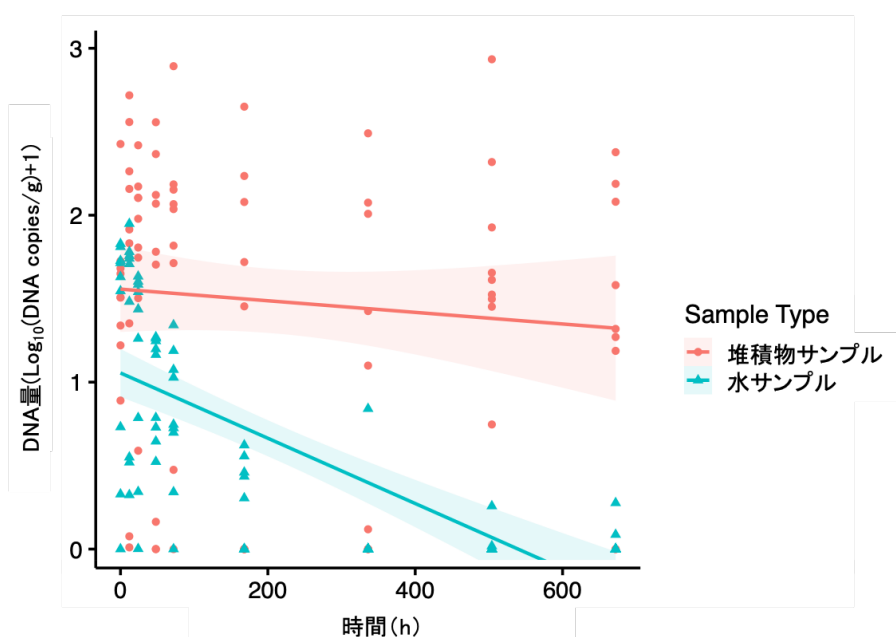
水田地帯におけるメタバーコーディングでは、4地域40地点のメタバーコーディング結果から、淡水魚類19種の出現情報を得た。ため池など水田生態系を利用する止水域の魚類で主に構成されており、フナ類などのコイ科魚類が多くなっていた。また、カワバタモロコやミナミメダカなど絶滅危惧種が多く見つかったことに加えて、一部の地域ではこれまで分布の確認されていなかったイチモンジタナゴが出現していた。イチモンジタナゴは危急度の高い絶滅危惧IA類に指定されており、兵庫県では分布が非常に限られている種である。兵庫県では東西に広がって良好な里山環境が維持されており、管理の継続されている地域も多い。希少種の多くは二次的自然に適応した種が多いことから、良好な環境が残されていることで絶滅を免れている可能性が高いと考えられる。一方で、オオクチバスやブルーギルのような外来魚も出現していることから、希少種の保全に向けた早急な対策が必要になってくるだろう。

本研究では、淡水生態系における魚類メタバーコーディングでは、広大な六甲山周辺の河川および水田地帯を調査地として広大な魚類の分布情報を提供し、その多様性を明らかにした。加えて、河川では魚類の種多様性に影響を与えている環境要因や土地利用との関係を統計モデルによって解明した。これらの成果は魚類の分布を把握するだけでなく、好適な環境や潜在的な生息地を予測や生息環境の整備など、淡水魚類の多様性保全においてさまざまな貢献ができると考えられる。一方で、環境DNA調査だけにとどまるのではなく、今後絶滅危惧種などが出現していた地域、および分布予測で出現の予測される地域では、実際に採捕調査を行うことで、より正確な情報を得る必要がある。また、水田地帯では追加でサンプルの解析を行うことで、現在見えていない水田の管理手法の違いや地域の違いと魚類の種多様性との関係などが明らかになると考えられる。

6) 堆積物からの環境DNA抽出手法の開発と実践

カワバタモロコの環境DNAを用いたサンプルの比較解析では、堆積物由来の環境DNAのほうが環境サンプル中に長時間保持されることが明らかとなった(図(5)-12)。これは、堆積物サンプルのほうが水サンプルに比べて日光や水環境、水温の影響を受けにくいことから、DNAの分解率が低くなるためであると考えられる。したがって、堆積物サンプルのほうが水サンプルよりも古い環境情報や生物情報を保持している可能性が高く、水サンプルにくらべて季節や時間の影響を問わない、努力量をより抑えたサンプリングが可能にな

るかもしれない。



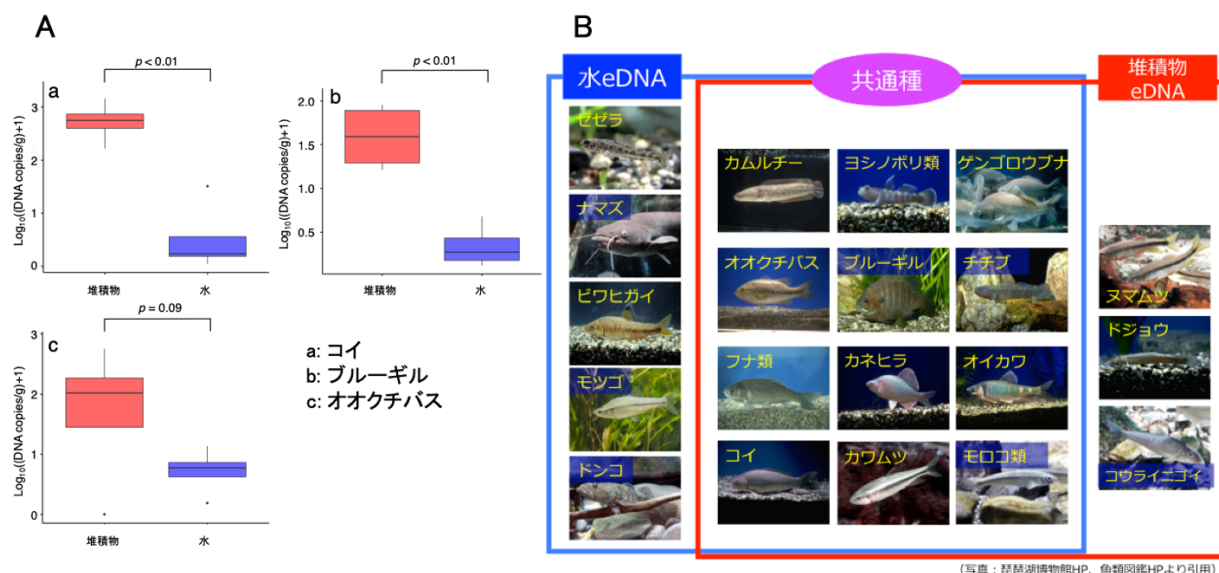
図(5)-12 堆積物環境DNAと水環境DNAとの減少量の比較図

赤色と青色はそれぞれ堆積物環境DNAと水環境DNAの回帰直線と95%信頼区間をそれぞれ表す。

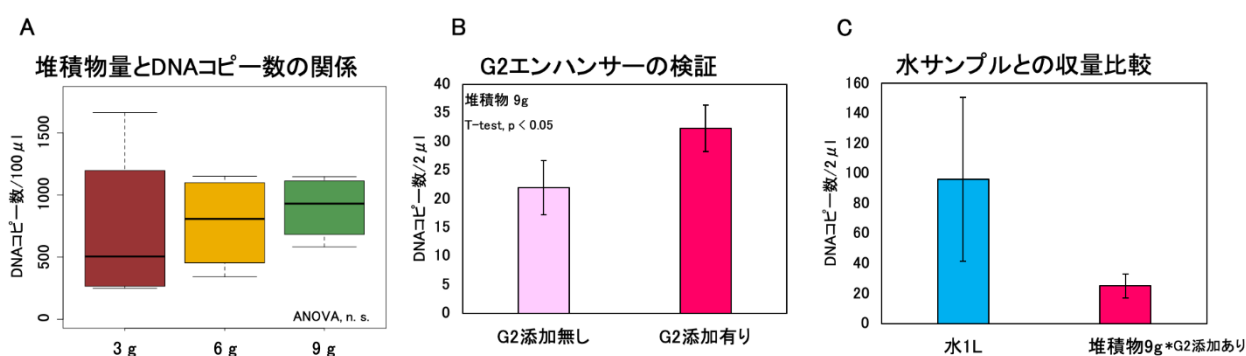
3種の魚類を用いた野外環境への適用の結果、同一重量あたりの環境DNA濃度は、堆積物環境DNAのほうが水環境DNAにくらべて高くなる傾向が見られた(図(5)-13A)。さらに、環境DNAメタバーコーディングの結果、出現する魚種の種組成は、堆積物環境DNAと水環境DNAで異なっていた(図(5)-13B)。これは、水サンプルと堆積物サンプルがそれぞれ反映する時空間スケールの違いが影響を与えていると考えられる。つまり、水のほうが拡散しやすいことから水サンプルのほうが広い空間スケールの情報をもっているのに対し、DNAが長期間保持される堆積物サンプルはその場所のより古い生物情報をもっており、この違いがメタバーコーディングの結果の違いに反映されたと考えられる。したがって、メタバーコーディングを行ううえで、水サンプルに加えて堆積物サンプルを同時に解析することで、水だけでは得ることのできなかった生物情報を得ることができ、より信頼性の高いデータを提供できることが示唆される。

堆積物環境DNAの収量増加の検討では、使用する堆積物サンプル量の増加、G2DNA/RNAエンハンサーの検証、水サンプルとの比較を、カワバタモロコシの環境DNA解析を用いてリアルタイム定量PCRで行った(図(5)-13)。堆積物量の増加では、3g、6g、9gでそれぞれ試したところ、収量自体の増加はみられなかったが、サンプル量を増加させるほどDNA量のばらつきは減少した(図(5)-14A)。G2DNA/RNAエンハンサーの検証では、添加を行うとDNAの収量が有意に増加することが明らかとなった(図(5)-14B)。しかしながら、従来用いられている水1L中の環境DNA量と比較すると、水サンプルのほうが多くなっていた。しかし、水と比較するとばらつきは少なかったことから、定量性は堆積物サンプルのほうが高いかもしれない。

本研究では、抽出キット(QIAGEN社製 DNeasy Powersoil kit)の使用前にアルカリ抽出法を組み合わせることで、従来最大0.25gまでしか使用できなかったサンプル量を12倍の3gまで使用できるように改善した。また、さらに抽出するサンプル量の改善やエンハンサーの使用により、堆積物環境DNAの収量をさらに増加させることができた。また、堆積物環境DNAの特性を解明することで、環境DNAを用いたモニタリングを行う際の堆積物環境DNAの有用性を示した。



図(5)-13 同一重量あたりの環境DNA量の比較(A)とメタバーコーディング結果の比較(B)
箱ひげ中の線は中央値、ひげの先は上が最大値、下が最小値をそれぞれ示す。



図(5)-14 堆積物環境DNAの収量増加の手法の検討結果
箱ひげおよび棒グラフでは、それぞれひげの上部が最大値、下部が最小値を示す。
また、箱ひげ図中の線は中央値を示す。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究では、淡水生態系において新規の環境DNAメタバーコーディング手法を確立した。本研究で用いた分類群(コウチュウ目、トンボ目、両生類、水生植物)は、陸水生態系において環境および生態系の健全度を測る指標種とされることが多く、陸水生態系の生物多様性をモニタリングするうえで欠かせない分類群である。そのため、本研究で確立した数々のメタバーコーディング手法は、淡水生態系における生物多様性のモニタリングまたは生物多様性の保全において、非常に有効なツールになることが期待される。また、環境DNAメタバーコーディング手法が確立できたことで、これらの分類群に対して、従来よりも多地点かつ高頻度な調査が可能になると考えられる。これにより、いままで見過ごしてきた、または見落とされてきた希少種の生息地や分布をより詳細に明らかにできるようになると考えられる。

また、手法の実践では、環境DNAメタバーコーディング手法を野外環境へ適用し、大規模な水生生物相の

モニタリングを行うと同時に、得られたデータを土地利用や環境要因と組み合わせることで、魚類では大規模な分布予測図を作成し、トンボ目や水生植物では種の多様性を決定する要因の解明につなげることができた。これらの成果は、環境DNAメタバーコーディング手法が、生物相モニタリングの手法として実用的かつ有効なツールであることを示し、多地点から得られるデータを利用した統計モデリングなどの大規模な解析に利用出来ることを示した。

(2) 環境政策への貢献

〈行政が既に活用した成果〉

2018年度神戸市生物多様性の保全に関する条例にかかる希少種生息調査（ヒダサンショウウオ）に環境DNA分析が用いられた。

〈行政が活用することが見込まれる成果〉

本研究で開発した様々な分類群の環境DNA分析用プライマーは、現在すでに利用されている魚類用のプライマーであるMiFishプライマーと合わせて、環境省の実施する希少種分布調査、国土交通省の実施する河川水辺の国勢調査などに組み込まれ、活用されることが期待される。

6. 国際共同研究等の状況

・中国沿岸部における環境DNA分析による魚類生息状況調査を、中国・浙江海洋大学の高天翔教授と共同で行っている。2018年度に中国の国家自然科学基金に共同研究として採択され、研究を開始した。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

〈論文（査読あり）〉

- 1) H. DOI, R. INUI, Y. AKAMATSU, K. KANNO, H. YAMANAKA, T. TAKAHARA, T. MINAMOTO: *Freshwater Biology* 62 (1), 30-39 (2017) Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish.
- 2) H. DOI, K. UCHII, S. MATSUHASHI, T. TAKAHARA, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO: *Limnology and Oceanography: Methods*, 15 (2), 212-218 (2017) Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA.
- 3) S. TSUJI, M. USHIO, S. SAKURAI, T. MINAMOTO, H. YAMANAKA: *PLOS ONE* 12(4): e0176608 (2017) Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance.
- 4) I. KATANO, K. HARADA, H. DOI, R. SOUMA, T. MINAMOTO: *PLOS ONE* 12(5): e0176541 (2017) Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods.
- 5) K. UCHII, H. DOI, H. YAMANAKA, H., T. MINAMOTO: *Ecology and Evolution* 7(20): 8515-8522 (2017) Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and non-native genotypes of common carp estimated by environmental DNA.
- 6) H. DOI, Y. AKAMATSU, Y. WATANABE, M. GOTO, R. INUI, I. KATANO, M. NAGANO, T. TAKAHARA, T. MINAMOTO: *Limnology and Oceanography: Methods* 15, 939-944 (2017) Water sampling for

environmental DNA surveys by using an unmanned aerial vehicle.

- 7) Q. WU, K. KAWANO, Y. UEHARA, N. OKUDA, M. HONGO, S. TSUJI, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO: Freshwater Science 37 (2), 307-314 (2018) Environmental DNA reveals non-migratory individuals of *Palaemon paucidens* overwintering in Lake Biwa shallow waters.

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 源利文: BIOINDUSTRY, 33 (6), 60-65 (2016)
「環境DNAを用いて水中の生物相を知る」
- 2) 源利文、内井喜美子、山中裕樹、高原輝彦、片野泉、土居秀幸: 日本生態学会誌 66(3), 621-623 (2016)
「環境DNA分析のさらなる進展にむけて」
- 3) 内井喜美子、源利文、土居秀幸、高原輝彦、山中裕樹、片野泉: 日本生態学会誌 66 (3), 581-582 (2016)
「環境DNA分析: 新しい水棲生物分布調査法」
- 4) 源利文、内井喜美子、高原輝彦、土居秀幸: 環境技術 46 (12), 648-652 (2017)
「環境DNAモニタリング手法の課題と展望」
- 5) 源利文: 環境技術 46 (12), 624-629 (2017)
「水域生態系における環境DNAモニタリング手法開発の現在。」
- 6) 源利文: 環境技術 水環境学会誌 41A (4), 123-127 (2018)
「種特異的な環境DNA検出によるマクロ生物の生態調査」
- 7) 源利文: 化学と生物 57 (3), 181-186 (2019)
「環境DNA分析の概要と希少種の検出〜水をくむだけで絶滅危惧種の分布がわかる」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 富田勢、神松幸弘、山中裕樹、永野昌博、佐藤拓哉、高原輝彦、沢田隼、源利文: 第81回日本陸水学会大会 (2016)
「ユニバーサルプライマーを用いたサンショウウオ類の環境DNA検出」
- 2) A. FUJIWARA, K. UCHID, H. SATO, N. HAYASHI, T. MINAMOTO: 第64回日本生態学会大会 (2017)
"A large scale study of aquatic plants according to eDNA analysis"
- 3) 中尾遼平、山本哲史、宮正樹、源利文: 第64回日本生態学会大会 (2017)
「環境DNAメタバーコーディングによる魚類相の把握-六甲山系の小河川群における事例-」
- 4) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文: 第64回日本生態学会大会 (2017)
「核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による交雑個体群の遺伝構造解析」
- 5) 富田勢、神松幸弘、山中裕樹、永野昌博、佐藤拓哉、高原輝彦、沢田隼、勝原光希、源利文: 第64回日本生態学会大会 (2017)
「ユニバーサルプライマーを用いたサンショウウオ属(Hynobius)の環境DNA検出」
- 6) 邬倩倩、石川俊之、辻冴月、山中裕樹、高見泰興、源利文: 第64回日本生態学会大会 (2017)
「eDNA分析で明らかになった琵琶湖産スジエビの時空間的分布」
- 7) 邬倩倩、河野健、上原佳敏、奥田昇、辻冴月、山中裕樹、源利文: 日本陸水学会第82回大会 (2017)
「琵琶湖及び周辺内湖における環境DNA分析手法の適用例」
- 8) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文: 日本陸水学会第82回大会 (2017)
「核DNAマーカーを用いた環境DNA分析」

- 9) 中尾遼平、山本哲史、宮正樹、源利文：第65回日本生態学会大会（2018）
「環境DNAメタバーコーディングによる六甲山周辺地域の魚類相の解明」
- 10) 坂田雅之、内田圭、佐藤博俊、山中裕樹、中尾遼平、源利文：第65回日本生態学会大会（2018）
「環境DNA分析を用いたため池の生物多様性を規定する要因の解明 —トンボ類および魚類を用いた事例—」
- 11) K. UCHII, H. DOI, T. MINAMOTO, H. YAMANAKA: 2018 ESA Annual Meeting (2018)
"The use of SNP markers in environmental DNA to detect intraspecific genetic variation"
- 12) 中尾遼平、山本哲史、宮正樹、源利文：第1回環境DNA学会東京大会（2018）
「環境DNAメタバーコーディングによって明らかになった六甲山周辺地域の淡水魚類相」
- 13) 坂田雅之、内田圭、佐藤博俊、山中裕樹、中尾遼平、源利文：第1回環境DNA学会東京大会（2018）
「トンボ目を対象とした環境DNAメタバーコーディング検出系の開発」
- 14) 河田萌音、倉林敦、N. Ramamonjisoa、夏原由博、山中裕樹、源利文：第1回環境DNA学会東京大会（2018）
「16SrRNAメタバーコーディングを用いた両生類の環境DNA検出」
- 15) 坂田雅之、源利文：日本陸水学会第83回大会（2018）
「堆積物由来環境DNA抽出法の改善と過去復元への展望」
- 16) T. Q. HUYNH, M. K. SAKATA, R. NAKAO, T. MINAMOTO, M. LAILATI, N. USIO: 第66回日本生態学会大会（2019）
"Application of bamboo biomass resources in agrochemical-free rice farming: effects on odonate diversity"
- 17) 井上碧、中尾遼平、源利文、篠原忠：第66回日本生態学会大会（2019）
「水生コウチュウ目の環境DNAメタバーコーディング手法の確立」
- 18) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文：第66回日本生態学会大会（2019）
「SNPマーカーを用いた環境DNA分析による遺伝変異の検出」
- 19) 坂田雅之、源利文：第66回日本生態学会大会（2019）
「堆積物からの環境DNA抽出法の効率化」
- 20) 河田萌音、倉林淳、N. RAMAMONJISOA、夏原由博、山中裕樹、佐藤博俊、坂田雅之、源利文：第66回日本生態学会大会（2019）
「メタバーコーディング解析を用いた両生類の環境DNA検出」
- 21) 中尾遼平、平岩将良、山本哲史、宮正樹、源利文：第66回日本生態学会大会（2019）
「環境DNAから読み解く六甲山周辺の土地利用と淡水魚類相の関係性」

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 兵庫県内高校生向けの科学交流合宿研修会「環境DNA」（2016年7月26日、神戸大学大学院人間発達環境学研究科にて、受講者6名）
- 2) 兵庫県立西宮東高等学校向けの模擬授業「環境DNAとはなにか」（2016年8月24日、神戸大学大学院人間発達環境学研究科にて、受講者約25名）
- 3) 女子中高生のための関西科学塾「水中のDNAを使って魚の生息数を推定する」（2016年10月16日、神戸大学大学院人間発達環境学研究科にて、受講者9名）

- 4) 沖縄県進学力グレードアップ推進事業における模擬授業「環境DNAを用いた生物相診断：水中の生物多様性保全に向けて」（2016年11月10日、神戸大学大学院人間発達環境学研究科にて、受講者39名）
- 5) とよなか市民環境会議アジェンダ21における講演「新しい生物調査法「環境DNA分析」～一杯の水から生息種がわかる～」（2016年12月10日、豊中市立中央公民館にて、参加者約20名）
- 6) 岐阜県立岐阜高等学校グローバルリーダー養成事業における特別授業「水を調べれば生物がわかる？環境DNA研究の発展」（2017年6月23日、岐阜県立岐阜高等学校にて、受講者約40名）
- 7) ひょうご環境体験館特別講演会「DNAを使って水の中の生き物をしらべる」（2017年7月23日、ひょうご環境体験館にて、参加者約50名）
- 8) 兵庫県内高校生向けの科学交流合宿研修会「環境DNA」（2017年7月24日、神戸大学大学院人間発達環境学研究科にて、受講者12名）
- 9) 一般向け講演会「近未来への招待状 ～ナイスステップな研究者2016からのメッセージ～」における講演「水を汲むだけの生物調査：環境DNAを用いて水中生物の種類や量を把握する技術の開発」（2017年7月28日、文部科学省科学技術・学術政策研究所にて、参加者約40名）
- 10) 海を学ぼう！「海のサイエンス」体験ツアーにおける講演及び実習体験「「環境DNA」で神戸港の魚を調べよう！」（2017年7月29日、神戸市産業振興センターにて、参加者約60名[小中学生]）
- 11) 兵庫県立西宮東高等学校向けの模擬授業「環境DNAとはなにか」（2017年7月31日、神戸大学大学院人間発達環境学研究科にて、受講者約40名）
- 12) 女子中高生のための関西科学塾「水中のDNAを使って魚の生息数を推定する」（2017年11月19日、神戸大学大学院人間発達環境学研究科にて、受講者9名）
- 13) 清心女子高等学校における授業「グリーンサイエンス」における特別授業「環境中のDNAを利用して水中の生物を知る」（2018年1月26日、清心女子高等学校にて、受講者約25名）
- 14) 一般向け武庫川流域環境講演会「環境DNAで水中生物を知る」（2018年6月26日、神戸市役所にて、参加者約60名）
- 15) 兵庫県内高校生向けの科学交流合宿研修会「環境DNA」（2018年7月23日、神戸大学大学院人間発達環境学研究科にて、受講者4名）
- 16) 青翔高等学校サイエンスギャラリーにおける特別授業「水中生物の世界を覗く未来のメガネ？～環境DNA」（2018年7月28日、大阪国際交流センターにて、受講者約100名）
- 17) 兵庫県立西宮東高等学校向けの模擬授業「環境DNAとはなにか」（2018年8月21日、神戸大学大学院人間発達環境学研究科にて、受講者約40名）
- 18) 清心女子高等学校における授業「グリーンサイエンス」における特別授業「環境中のDNAを利用して水中の生物を知る」（2018年1月26日、清心女子高等学校にて、受講者約25名）
- 19) 一般向け神戸市生物多様性シンポジウム「環境DNA：水をくんで生物分布を知る新たな手法」（2018年11月10日、神戸市立王子動物園動物園ホールにて、参加者200名）
- 20) 女子中高生のための関西科学塾「水中のDNAを使って魚の生息数を推定する」（2018年11月18日、神戸大学大学院人間発達環境学研究科にて、受講者6名）
- 21) 平成30年度第2回大阪府高等学校生物教育研究会における講演「水中生物の世界を覗く科学のメガネ～環境DNA」（2018年12月7日、ピアレ大阪にて、参加者約30名）
- 22) 大阪府立岸和田高等学校における出前講義「環境DNA：コップ一杯の水で生物分布を知る」（2019年1月8日、岸和田高等学校にて、受講者約50名）
- 23) 一般向け 第64回日本水環境学会セミナー「水環境における環境DNAを用いた生物モニタリング」における講演「種特異的な環境DNA検出による希少種や外来種の分布状況調査」（2019年1月25日、日本自動車会館にて、参加者約80名）

24) 一般向け CREST「海洋生物多様性」研究領域シンポジウム「環境DNA技術の現在：生態系観測の未来を展望する」における講演「環境DNA分析の発展と基礎的分析技術について」（2019年1月29日：笹川平和財団ビル国際会議場にて、参加者約150名）

25) 大分県立大分舞鶴高校SSH発表会における特別講演「環境DNAが拓く未来」（2019年2月1日、ホルトホール大分にて、参加者約600名）」

(5) マスコミ等への公表・報道等

1) NHK サイエンスZERO「水の生態調査の大革命！環境DNA」(2016年7月17日)

2) 岐阜新聞 (2017年6月26日朝刊, 14面「環境DNA分析紹介 岐阜高で源さん(神戸大学大学院特命助教)講演 カスミサンショウウオ 生徒が研究発表も」)

3) 中日新聞 (2017年6月27日朝刊(岐阜版), 14面「「環境DNA」で生息生物を判断 岐阜高で講演会」)

4) 神戸新聞 (2017年7月26日朝刊(西播版), 24面「水生生物の調査方法学ぶ 佐用で講演会 児童ら50人聞き入る」)

(6) その他

1) 源利文：科学技術への顕著な貢献2016（ナイスステップな研究者）受賞（2016年12月、科学技術・学術政策研究所より）

2) 源利文：第36回村尾育英会学術賞受賞（2019年3月、村尾育英会より）

8. 引用文献

- 1) Gleick, P. H. Global Freshwater Resources: Soft-Path Solutions for the 21st Century. *Science*, 302: 1524-1528 (1996)
- 2) Dudgeon, D., A. H. Arthington, M. O. Gessner, Z. Kawabata and D. J. Knowler. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Freshwater Biodiv.*, 81: 163-182 (2006)
- 3) Foster G.N., Foster A.P., Eyre M.D. and Bilton D.T. Classification of water beetle assemblages in arable fenland and ranking of sites in relation to conservation value. *Freshwater Biol.* 22: 343-354. (1990)
- 4) Clark, E. T. and M. J. Samways. Dragonflies (Odonata) as Indicators of Biotope Quality in the Kruger National Park, South Africa. *J. Appl. Biol.*, 33: 1001-1012. (1996)
- 5) Miya M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J.Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open. Sci.*, 2015; 2: 150088. (2015)
- 6) Ushio M., H. Fukuda, T. Inoue, K. Makoto, O. Kishida, K. Sato, K. Murata, M. Nikaido, T. Sado, Y. Sato, M. Takeshita, W. Iwasaki, H. Yamanaka, M. Kondoh, M. Miya. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Mol. Ecol. Res.* 17: e63-e75. (2017)

II-6 汽水流域における環境DNAによる底生動物相モニタリング手法の確立

島根大学 生物資源科学部

助教・高原 輝彦
准教授・舞木 昭彦

平成28～30年度累計予算額：5,078千円

(うち平成28年度：2,348千円、平成29年度：1,400千円、平成30年度：1,330千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

環境DNA分析手法においては、様々な野外調査でその実用可能性について検討が始まっている。とくに湖沼や河川、海洋分野で幅広く利用されているが、淡水と海水が混じり合う汽水環境における本手法の有用性については十分な研究例がない。そこで本サブテーマではまず、汽水域における環境DNA分析手法の確立を目指し、島根県の宍道湖に高密度で分布する二枚貝ヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) などの環境DNA定量用のプライマー・プローブを作成した。次に、ヤマトシジミを汽水に生息する底生動物のモデル生物の1つとして、宍道湖から採取した水試料と泥試料におけるDNA回収率などを比較し、汽水域における最適な環境DNAサンプリング手法について検討した。その結果、泥試料よりも、水試料に含まれるDNA濃度の方が島根県の目視資源量調査結果と相関する傾向があることがわかった。このことから、汽水における環境DNA測定用のサンプルは水試料を採取する方が適切であることが示唆された。さらに、いくつかの淡水魚で既報のDNA分解抑制試薬が、汽水性の水生動物3種(ヤマトシジミ、スズキ、ニホンウナギ)に由来する環境DNAの保存においても効果的であることが確認された。加えて、宍道湖全域122箇所の一斉採水調査を行った結果、ヤマトシジミの環境DNA濃度の分布と島根県の目視資源量調査結果と傾向が一致していることが示唆された。また、宍道湖-中海を利用する魚類・鳥類を含む生物群集を対象にした環境DNAメタバーコーディング法の有用性を検証した。その結果、絶滅危惧種など希少種11種を含む魚類168種、および、鳥類23種が検出された。さらに、宍道湖から中海に分布する魚類相は、湖水の塩分濃度勾配が関係しており、また、鳥類が越冬地として利用する場合に、各湖内においても選好する場所が存在することが示唆された。以上のことから、本サブテーマによって、汽水域における環境DNA分析手法(種特異的検出系、及び、メタバーコーディング法)の有用性の一端を明らかにできたと考えている。

[キーワード]

環境DNA、汽水、底生動物、回遊魚、種特異的検出系、メタバーコーディング

1. はじめに

環境DNA分析手法においては、様々な研究分野やフィールドでその実用可能性について検討が始まっている。本手法は、その中でも湖沼や河川、海洋分野で幅広く利用されているが、淡水と海水が混じり合う汽水の環境における有用性については十分な研究例がない。汽水湖として有名な宍道湖(島根県)では現在、とくに底生二枚貝のヤマトシジミの資源量の動態を把握するために採泥器を用いた調査が行われている。この

手法は、目視で採集個体の状態確認や個体数を正確に計測できる一方で大型機材や人手が必要となる。そこで本サブチームでは、近年、様々な生物分類群におけるモニタリング方法として注目されている環境DNA分析手法を汽水環境に生息するヤマトシジミをはじめとした底生動物に適用することを検討した。また、環境DNAを使ったモニタリング手法が確立されつつあると同時に、水サンプルの保存方法についての研究も盛んに取り組まれている。保存方法の1つとしてBAC (Benzalkonium chloride: ベンザルコニウム塩化物) の添加がある。BACとは、陽イオン性の界面活性剤であり、主に滅菌・消毒に用いられる溶液であり、陽イオン性界面活性剤は、細菌の表面に吸着し、細菌細胞の正常な機能を妨げる効果を示す物質である (Ziani et al. 2011)。Yamanaka et al. (2016) は、アユ (*Plecoglossus altivelis*) の環境DNAを含む水試料の中にBACを入れて実験したところ、BACを添加しなかった水試料では時間経過とともにDNAが検出されなくなったのに対し、BACを添加した水試料では50%程度の減少で抑えられていた。このことから水試料にBACを添加することは、環境DNAの分解を抑制し、調査時における正確な生物生息情報の収集を可能にすると考えられる。しかしながら、BACの効果は、汽水の環境サンプルに含まれるDNAの保存にも適用可能かどうかは明らかになっていない。また、汽水湖に限らず湖沼全域における採水調査によって生物生息状況を推定する試みもなされていない。さらに、汽水湖は塩分濃度勾配などが生じることにより、多種多様な生物種が利用しており、季節に応じてその種組成が変化する。このような汽水湖の生物多様性を評価するためには、環境DNAメタバーコーディング手法が最適であると考えられるが未だ検討されていなかった。

以上のことから、本サブテーマによって、汽水域における最適な環境DNA分析手法の確立を目指して、主に底生動物を対象にして、効果的なサンプルの採集と保管方法の検討、宍道湖全域における環境DNA分析手法による生物生息状況の推定について検討、そして、汽水湖における環境DNAメタバーコーディングを用いた魚類相・鳥類相の網羅的解析を実施することとした。

2. 研究開発目的

本サブチームでは、汽水域における最適な環境DNA分析手法の確立を目的として、島根県の宍道湖、及び、中海を主要な調査フィールドとして3年間の研究計画を立案した。そのために主に以下の研究テーマ4つを設けた。まず、(1) 汽水を利用する水生動物の種特異的プライマーの開発を行った。ここでは、ヤマトシジミ (*Corbicula japonica*)、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*)、シラウオ (*Salangichthys microdon*)、ワカサギ (*Hypomesus nipponensis*)、及び、モクズガニ (*Eriocheir japonica*)などの汽水を生息場所として利用する代表的な生物種を対象にして種特異的検出系の開発を進めた。次に、(2) 汽水域における最適な環境DNAサンプリング手法の開発を試みた。そのために、宍道湖における環境水(水試料)と湖底堆積物(泥試料)におけるDNA回収率を比較・検討した。また、水試料に含まれる環境DNAは時間経過に応じて減少することがわかっている。そこで、汽水の水試料に対するDNA分解抑制試薬(BAC)の効果の検証を行った。さらに、(3) 汽水湖全域における環境DNAを用いた生物生息状況の推定を試みた。そのために、宍道湖内122箇所の一斉採水調査を2回実施した。最後に、(4) 汽水域におけるユニバーサルプライマーの効果を検証するため、サブテーマ3で開発済みの魚類用ユニバーサルプライマーMiFish (Miya et al. 2015)と鳥類用ユニバーサルプライマーMiBird (Ushio et al. 2018)を用いて、宍道湖-中海における魚類相・鳥類相の網羅的な解析をサブテーマ2・3と協同で実施した。

3. 研究開発方法

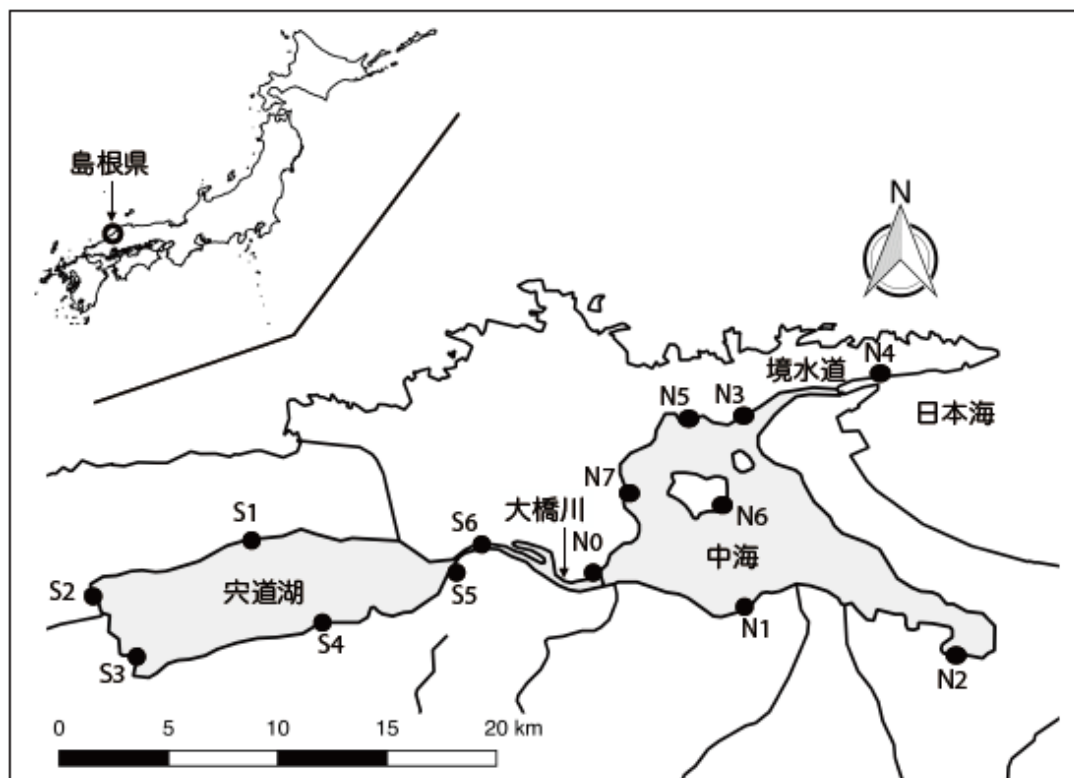
- (1) 汽水に生息する水生動物の種特異的プライマーの開発

新規な種特異的プライマーの開発

宍道湖の重要水産資源である二枚貝ヤマトシジミ (*Corbicula japonica*)、宍道湖や中海を利用する回遊魚の代表種として、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*)、シラウオ (*Salangichthys microdon*)、ワカサギ (*Hypomesus nipponensis*) の種特異的プライマーの開発を試みた。また、回遊性の底生動物として、すでに陸水用としてはサブテーマ2で開発済みであったモクズガニ (*Eriocheir japonica*) の種特異的プライマーが汽水域をフィールドにした場合でも利用可能かどうかを検証した。

野外調査

汽水の生物を対象に開発したプライマー・プローブの有用性を検証するため、ヤマトシジミをモデルケースにして、宍道湖における環境DNA調査を実施した。調査は毎月1回行い、2015年12月18日、2016年1月29日、2月25日、3月29日、4月24日、5月19日、6月23日、7月27日、8月29日、9月24日、10月27日、11月27日に実施した。水試料は、図1の調査地点S1からS6において、岸から1Lポリ瓶に汲み取った。採水後、環境データとして、気温、水温、pH、溶存酸素濃度、 NO_3^- 、塩濃度、電気伝導率を記録した。低温状態で持ち帰った水試料はその日のうちに実験室で濾過処理を行った。採水した地点によって1L濾過することができないものがあり、その場合は濾紙2枚で濾過できる限界まで実施した。濾過し終わった濾紙はアルミホイルに包み、DNA抽出処理まで -30°C で保存した。



図(6) - 1 主要フィールドである宍道湖-中海の調査サイト(サイト“S1”～“S6”、“N0”～“N7”)。

DNA抽出と精製処理

濾紙表面に吸着させたDNAの抽出・精製のため、DNeasy Blood & Tissueキット（キアゲン社）を用いた。濾過済みの濾紙をサリベットに入れ、Buffer AL 400 μ L/filterとProteinase K 40 μ L/filterを加えた。56°Cの定温乾燥機で30分間インキュベートした後、サリベットを5,000gで5分間遠心処理をした。TE (pH8.0) 220 μ L/filterを添加し、室温で1分間放置し、5,000gで5分間遠心した。サリベットの上部を捨て、濾液にBuffer AL 200 μ L/filterと100%エタノール600 μ L/filterを添加し、十分にピペッティングした後、DNeasy Mini Spin Columnにアプライした。6,000gで1分間遠心をし、コレクションチューブの濾液を捨て、濾液がなくなるまで繰り返した。次に、カラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW1を500 μ L添加し、6,000gで1分間遠心した。カラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW2 500 μ Lを添加し、15,000gで3分間遠心した。カラムを新しいマイクロチューブに移し、Buffer AEを100 μ L添加し、室温で1分間放置し、6,000gで3分間遠心した。回収されたDNA溶液は-30°Cで保存した。

リアルタイム定量PCR (qPCR) 実験

1ウェル辺り、DW（蒸留水）8 μ L、Master Mix (TaqMan Environmental Master Mix : Life Technologies) 10 μ L、1 μ Lの20 \times プライマー・プローブ（フォワードプライマー終濃度900nM、リバースプライマー終濃度900nM、プローブ終濃度125nM）の順にチューブに入れてqPCR用プレミックスを作成した。PCR用プレートの各ウェルにプレミックスを19 μ Lずつ分注した。DNAサンプルを1 μ Lずつ添加した。qPCR実験ごとに、既知量のスタンダードと、ネガティブ・コントロールとしてDWをDNAサンプルと同量（この場合、1 μ L）用意した。プレートにフィルムを張ってプレート用遠心機で溶液を落とし、qPCRで測定した。qPCR測定は、1サンプルにつき3~4回の繰り返しで行った。qPCRの温度条件は50°Cで2分、95°Cで10分の後、95°Cで15秒、60°Cで1分のサイクルを55回繰り返し、DNAの測定を行った。

(2) 汽水における最適な環境DNAサンプリング手法の確立

汽水湖における環境水と湖底堆積物におけるDNA回収率を比較・検討

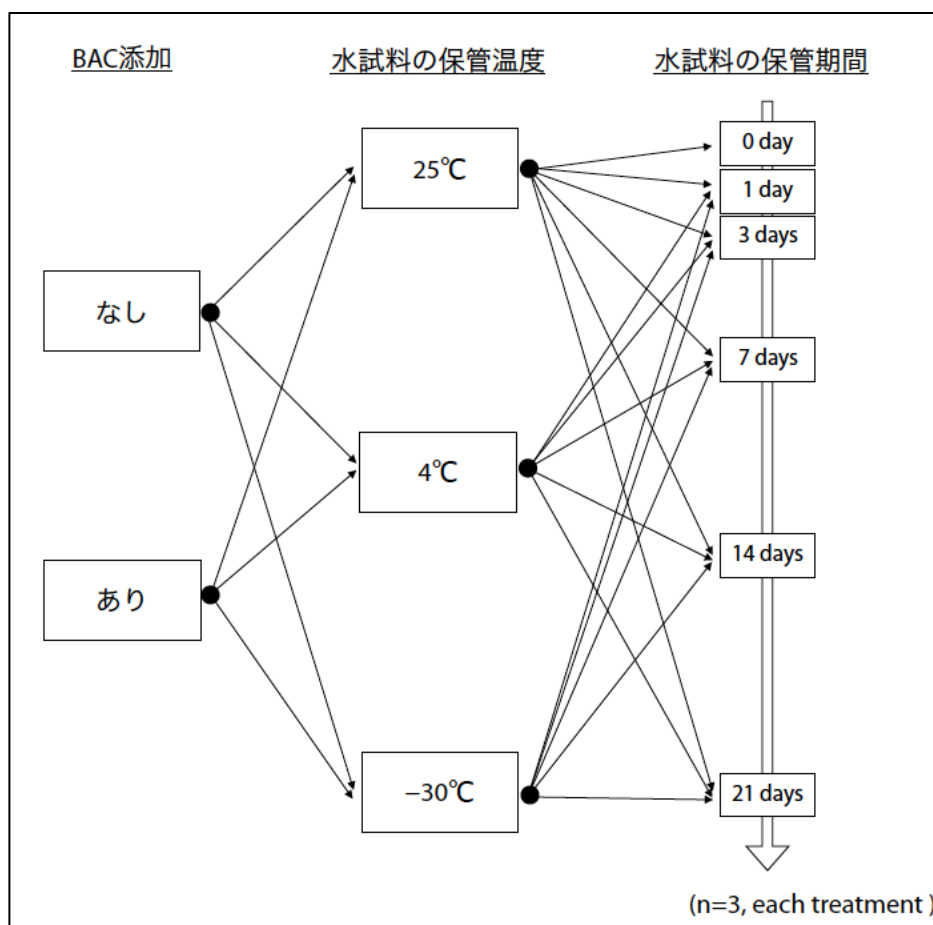
本調査は、島根県水産技術センターが保有する試験船「ごず」（8.5t）に乗船して、宍道湖の西岸・南岸・北岸・東岸・大橋川1・大橋川2の計6カ所で毎月実施した。調査は毎月1回行い、2016年7月19日-20日、8月10日、9月14日、10月3日、11月16日、12月5日、2017年1月18日、2月15日、3月16日、4月12日、5月18日、6月5日に実施した。なお、試験船の不調のため、7月は2日間に分けて実施することになった。水試料は、船上からひも付きのバケツを投げて水を汲み取り、1Lポリ瓶に採取した。採泥は「ごず」に設置されているスミス・マッキンタイヤ採泥器を使用して行い、各地点で水底の泥を引き上げ、60mLサンプル管に泥が3g以上になるように泥試料を採取した。各試料は運搬時に、高温にならないよう低温を維持した。水試料は上述した濾過方法で調査日に濾過を実施した後、濾過済み濾紙はアルミホイルに包んで-30°Cで保存して、後日、上述のDNA抽出処理・測定を実施した。泥試料は実験室に持ち帰った後、DNA抽出まで-30°Cで保存した。

冷凍保存しておいた泥試料から約3gを15mLチューブに入れ、NaOH (0.33M) 6.0mLとBuffer TE 3.0mLを添加した。その後、94°Cに設定した定温乾燥機でインキュベートした。50分後、定温乾燥機から取り出し、5,000gで30秒間遠心した。そして、上澄み7.5mLを50mL遠心チューブに採取して、同量の7.5mLのTris-HCl (1M)を添加して中和した。その後、3M NaOAc (3M 酢酸ナトリウム) 1.5mLとエタノール30mLを加えてか

らよく混ぜ、 -30°C で1時間保存した。保冷後、溶液を室温にさらして常温に戻した。その後、5, 350gで20分間遠心した。遠心後、上澄みを捨て、チューブの口を下にして数分間放置した。100 μL のDWを添加して沈殿物を溶かし、PowerSoil® DNA Isolation KitのPower Beads Tubeへ移した。これ以降は、キットのマニュアルに従って処理を実施した。抽出されたDNA溶液は -30°C で保存して、適宜、DNA測定を実施した。

汽水サンプルに対するDNA分解抑制試薬効果の検証

他種で報告されているDNA分解抑制試薬が汽水の環境サンプルにも適用可能かどうかを検証するため、10 w/v% ベンザルコニウム塩化物液（日本製薬株式会社）（BAC）を用いた実験を実施した。実験では、BAC添加の有無、水試料の保管温度と採水から濾過までの日数（保管期間）を図6—（2）のように設定した。その際、条件ごと3回の繰り返しで実施した。



図（6）— 2 BAC添加の有無と水試料の保管温度、及び、保管期間に関する実験条件のフローチャート。

宍道湖における採水は2017年9月30日に行った。プラスチック製のビーカーを用いて、約60 Lの水を90 Lポリバケツにくみ上げた。水試料に含まれるDNA濃度をできるだけ均一にするため、90 Lポリバケツに入っている水全体をプラスチック製のビーカーを使って下から上にかきまぜながら、102本の500 mLポリ瓶にそれぞれ移した。102本のうち54本には終濃度が0.1%となるようにBACを添加した。90 Lポリバケツから500 mLボトルへ水を移す順番は無作為とし、また、BACを添加する順番も無作為に行った。

実験室に持ち帰ったポリ瓶は、3種類の温度で保管した。「常温」で保管するポリ瓶は、 25°C に設定されたインキュベーターで、「冷蔵」で保管するポリ瓶は、 4°C に設定された部屋の中で、「冷凍」で保管する

ポリ瓶は、-30℃の冷凍庫でそれぞれ保管した。「冷凍」で保管した水試料は、濾過を行う約2時間前に実験室内に運び、バットの中に入れ、ボトルの表面に水をかけ流して解凍した。解凍した水試料は、ポリ瓶の表面を拭き、すぐに濾過を行った。採水の直後（0日目）、1日後、3日後、7日後、14日後、及び、21日後に各水試料の濾過処理を実施した。

水試料に含まれているDNAを測定する際に、ヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) (Takahara et al. 2019)、スズキ (*Lateolabrax japonicus*) (Yamanaka & Minamoto 2016)、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) (Takahara et al. 未発表) の環境DNA定量用プライマー・プローブを用いて測定を行った。

(3) 宍道湖全域における環境DNA分析手法の有用性についての調査

汽水湖全域における生物生息状況の推定調査を行うため、宍道湖内122地点での船の上から湖水1Lずつを採集した。調査は産卵期初期である6月と成長期である10月の計2回行った。その際、島根県水産技術センターが保有する調査船「ごず」に同乗して実施した。宍道湖を取り囲む、平田地区、秋鹿・大野地区、浜佐陀地区、松江地区、玉湯地区、来待地区、宍道地区、斐川地区の計8地区において、各地区3～5本、水深の沿岸から深場に向かってラインを設定し、0.0～2.0m、2.1m～3.0m、3.1m～3.5m、3.6m～4.0mの4つの段階ごとに1つずつ調査地点を設定した。6月の調査は、2017年6月14日と19日に、10月の調査は、2017年10月20日と26日に実施した。調査は、船の上から採水を迅速にできるように、図(6)－3のようなポリ瓶（直径9.5 cm、高さ20 cm）にビニール紐（約3.5 m）と重り（20 g）をくくり付けたものを調査地点の数だけ作成して使用した。これを船の上から投げ、調査船体に付着するDNAのコンタミネーションのリスクをできるだけ軽減できるように、船から離れた場所の表層水を採取した。その後、水試料の中に最終濃度0.1%となるようにBACを添加して、冷蔵状態で持ち帰り、適宜、濾過処理、DNA抽出・精製を実施した。なお、水試料に含まれているDNAを測定は、ヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) (Takahara et al. 2019) の環境DNA定量用プライマー・プローブを用いて測定を行った。



図(6)－3 122箇所の採水調査を迅速に実施するために考案したビニール紐付きの採水ボトル。

(4) 魚類用 (MiFish) と鳥類用 (MiBird) ユニバーサルプライマーを用いた網羅的解析

汽水域におけるユニバーサルプライマーの効果を検証するため、サブテーマ3で開発済みの魚類用ユニバーサルプライマー (MiFish) (Miya et al. 2015) と鳥類用ユニバーサルプライマー (MiBird) (Ushio et al. 2018) を用いて、宍道湖-中海における魚類相・鳥類相の網羅的な解析をサブテーマ2と3と協同で実施した。使用したDNAサンプルは、宍道湖では、2016年11月27日、2017年1月28日、3月30日、5月25日、7月24日、9月29日、中海では、2016年11月29日、2017年1月29日、3月31日、5月26日、7月31日、9月27日に採取したものを用了。調査は図(6)-1の“S1~S6”と“N0 (=S7) ~N7”の計14地点で実施した。

1st PCR

1ウェル当たり、2×PCR bufferを10μL、dNTPを4.0μL、KOD FX Neoを0.4μL、それぞれ10mMに希釈したMiFish (U-F, U-R) とMiBird (E-F, E-R) を0.6μLずつ、MiFish (E-F, E-R, U2-F, U2-R) を0.3μLずつ順に1.5mLチューブに入れてPCR用プレミックスを作成した。PCR用プレートの各ウェルにプレミックスを18μLずつ分注した。DNAサンプルを2μLずつ添加し、総量で溶液量が1サンプル当たり20μLになるようにした。PCR測定は1サンプルにつき8回の繰り返しで実施した。PCR条件は94°Cで2分、98°Cで10秒の後、65°Cで30秒、68°Cで30秒のサイクルを35回繰り返し、その後、68°Cで5分間最終伸長反応をさせてDNAを増幅した。PCR後にプレートに漏れがないか確認し、DNAサンプルごとに8回の繰り返し分を全て1つにまとめてボルテックスし、遠心してライブラリを作成した。

2nd PCR

1st PCRの増幅産物をサンプルごとに1つのチューブに集約しておいたライブラリから50μLをサンプルごとに96穴プレートに移し、あらかじめExoSAP-IT (ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents ; Thermo Fisher Scientific) をDWで10倍に希釈したExoSAP溶液を5μL加えた。次に、酵素処理は、37°Cで15分間インキュベートして1st PCR時の残プライマーとdNTPsを分解し、80°Cで15分間インキュベートして酵素を非活性化させ、10°Cで保存を行った。1ウェル当たり、MiliQを1μL、2×PCR bufferを6μL、dNTPsを2.4μL、KOD FX Neoを0.24μLずつ順に1.5mLチューブに入れてPCR用プレミックスを作成した。手動でチューブを上下にして混ぜ、PCR用プレートの各ウェルにプレミックスを9.64μLずつ分注した。サンプル判別のため、2種類のtag primerをサンプルごとに掛け合わせて、それぞれ0.7μLずつプレートの壁を分けて分注した後、酵素処理後のDNAサンプルを1μLずつ添加し、総量で溶液量が1サンプル当たり12μLになるようにした。プレートのアルミシールを貼って溶液が漏れないように十分に粘着させた。PCR条件は94°Cで3分間、98°Cで10秒の後、68°Cで30秒のサイクルを12回繰り返し、その後、68°Cで7分間最終伸長反応をさせてDNAを増幅させた。

2nd PCR後の電気泳動でバンドを確認後、2nd PCR産物を各サンプル4.5μLずつ1つのチューブに集約し、ライブラリを作成した。Bioanalyzerで目的領域のピークが確認できたサンプルを、MiSeqを用いたシーケンス解析、及び、MiFishとMiBirdのパイプラインに通した。

4. 結果及び考察

(1) 汽水に生息する水生動物の種特異的プライマーの開発

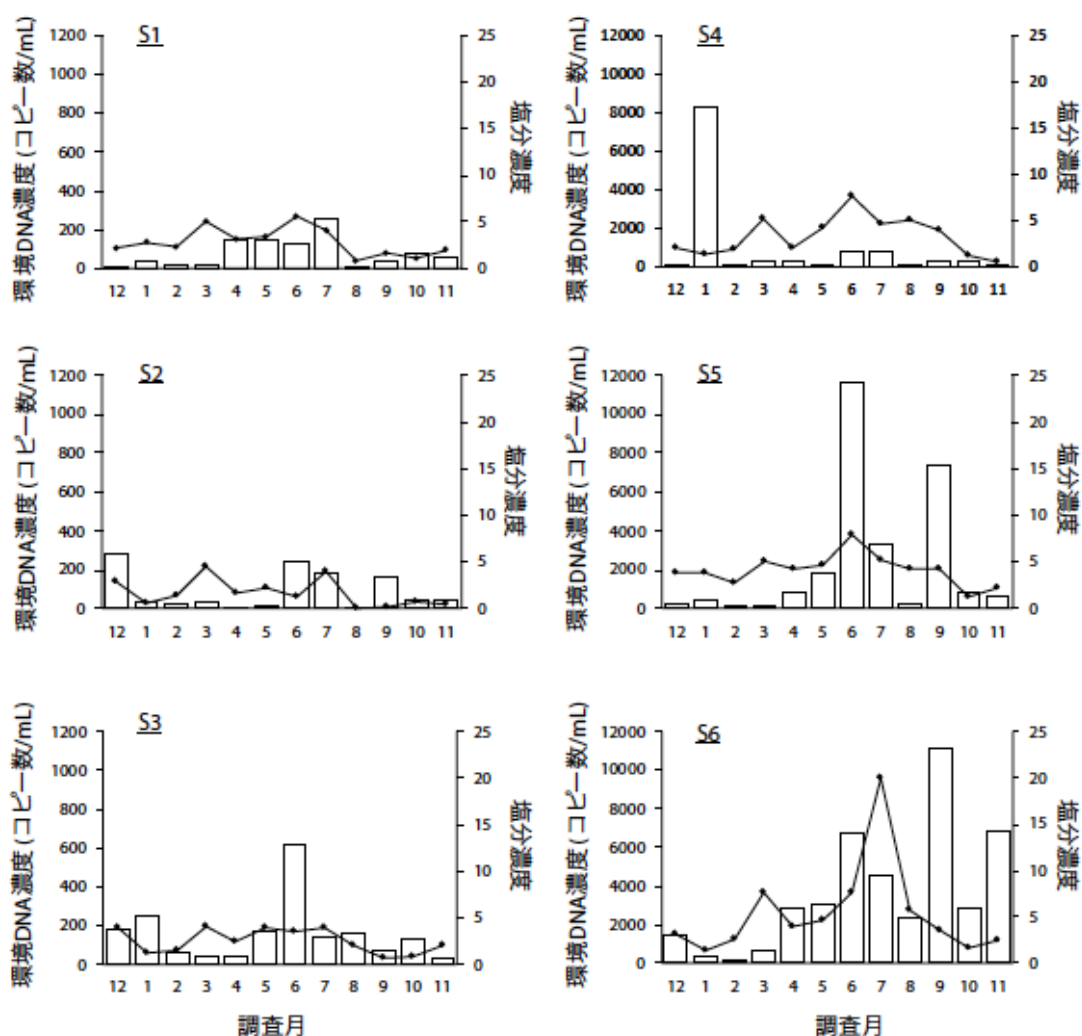
種特異的プライマーの開発

本研究期間において、汽水湖に生息するヤマトシジミ (*Corbicula japonica*)、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*)、シラウオ (*Salangichthys microdon*)、ワカサギ (*Hypomesus nipponensis*)、モクズガニ (*Eriocheir japonica*) の種特異的プライマーの開発に成功した。

種特異的プライマーの有用性の検証

2015年12月から2016年11月の間、宍道湖6定点で毎月1回の採水調査を実施して、採取した水試料に含まれているヤマトシジミのDNA濃度を測定した結果、一年間を通したヤマトシジミの環境DNA濃度の変動から本種の野外分布を推定した。その結果、とくに宍道湖東岸の“S5”と“S6”の調査地点で高いDNA濃度を示した。環境DNA濃度の高さはヤマトシジミの生物量と相関があり、このことから島根県の資源量調査結果と環境DNA調査結果との傾向が一致していることがわかった。さらに、統計的な解析によって、ヤマトシジミは宍道湖内の塩分濃度が高い場所を選好していることも示唆された（図（6）－4）。

これらのことから、環境DNA分析手法は汽水に生息する底生動物の分布推定とともに、選好場所を推定することも可能であることを明らかにできたと考えている。



図（6）－4 環境DNAを用いたヤマトシジミの野外分布推定結果。統計解析により、ヤマトシジミのDNA濃度と塩濃度に正の相関がみられた。

(2) 汽水における最適な環境DNAサンプリング手法の確立

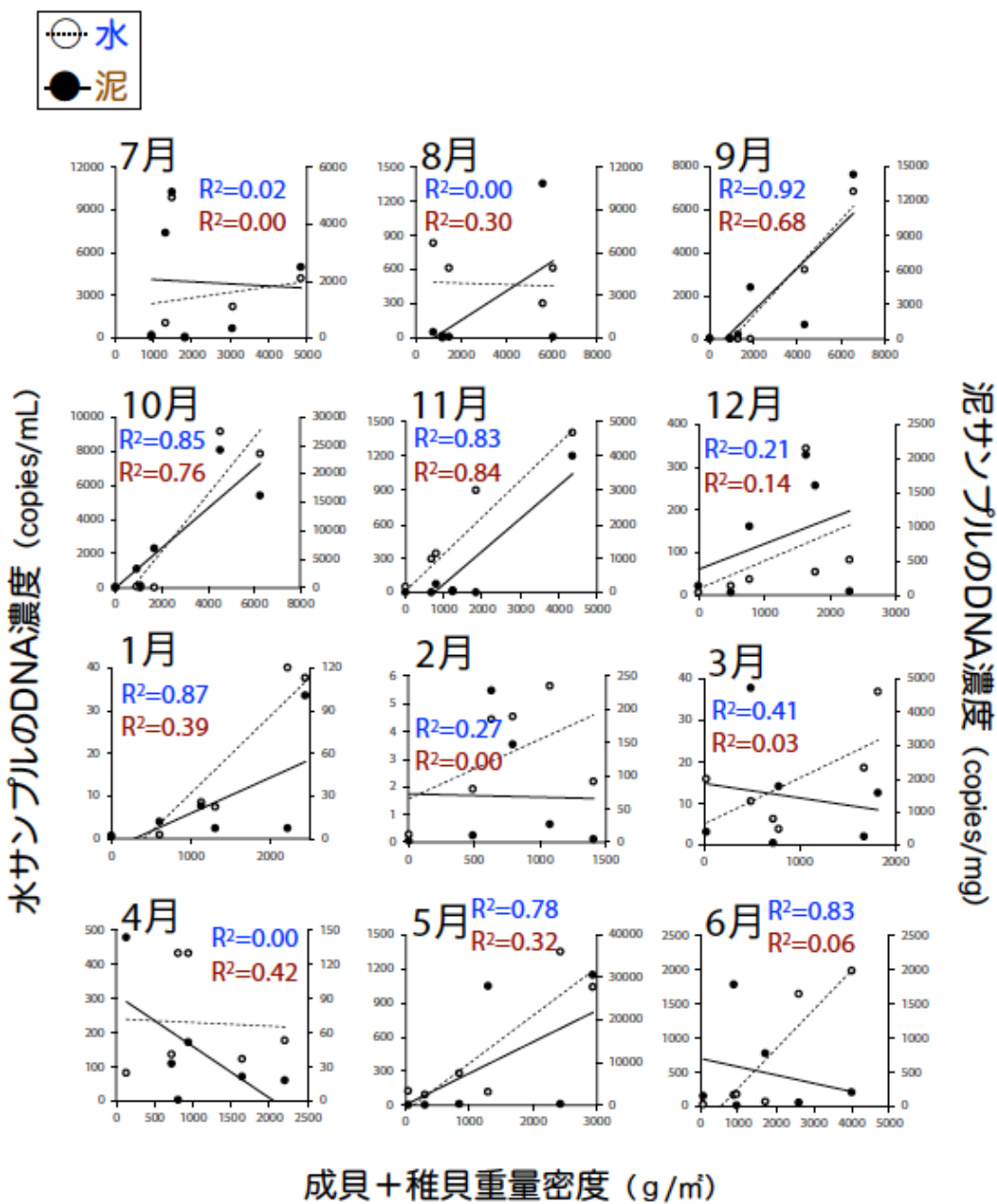
汽水湖における環境水と湖底堆積物におけるDNA回収率を比較・検討

汽水で採取した水試料と泥試料のどちらのDNAを捕集する方がヤマトシジミをモデルケースにした底生動物の環境DNA分析手法として適しているのかを調べたところ、水試料に含まれるDNA濃度の方が島根県の目視による資源量調査結果（成貝と稚貝の重量密度）と相関する傾向がみられた（図（6）－5）。水試料では9月（ $R^2=0.92$ ）、10月（ $R^2=0.85$ ）、11月（ $R^2=0.83$ ）、1月（ $R^2=0.87$ ）、5月（ $R^2=0.78$ ）、6月（ $R^2=0.83$ ）で高い相関関係がみられた。泥試料では、9月（ $R^2=0.68$ ）、10月（ $R^2=0.76$ ）、11月（ $R^2=0.84$ ）でのみ高い相関関係がみられた。水試料では、12月と2月から4月、7月から8月で R^2 値が低かった。泥試料では、12月から8月までの R^2 値が低かった。

冬場に R^2 が低かった要因として、ヤマトシジミは12月から4月の期間に砂礫中で越冬する個体が多く、DNAが水中に放出されにくかったため、相関が良くなかったのかもしれない。一方、水温が上昇する5月、6月の時期となると、ヤマトシジミが湖底表面付近に移動したことから、目視での資源量調査との間に相関がみられたと考えられた。

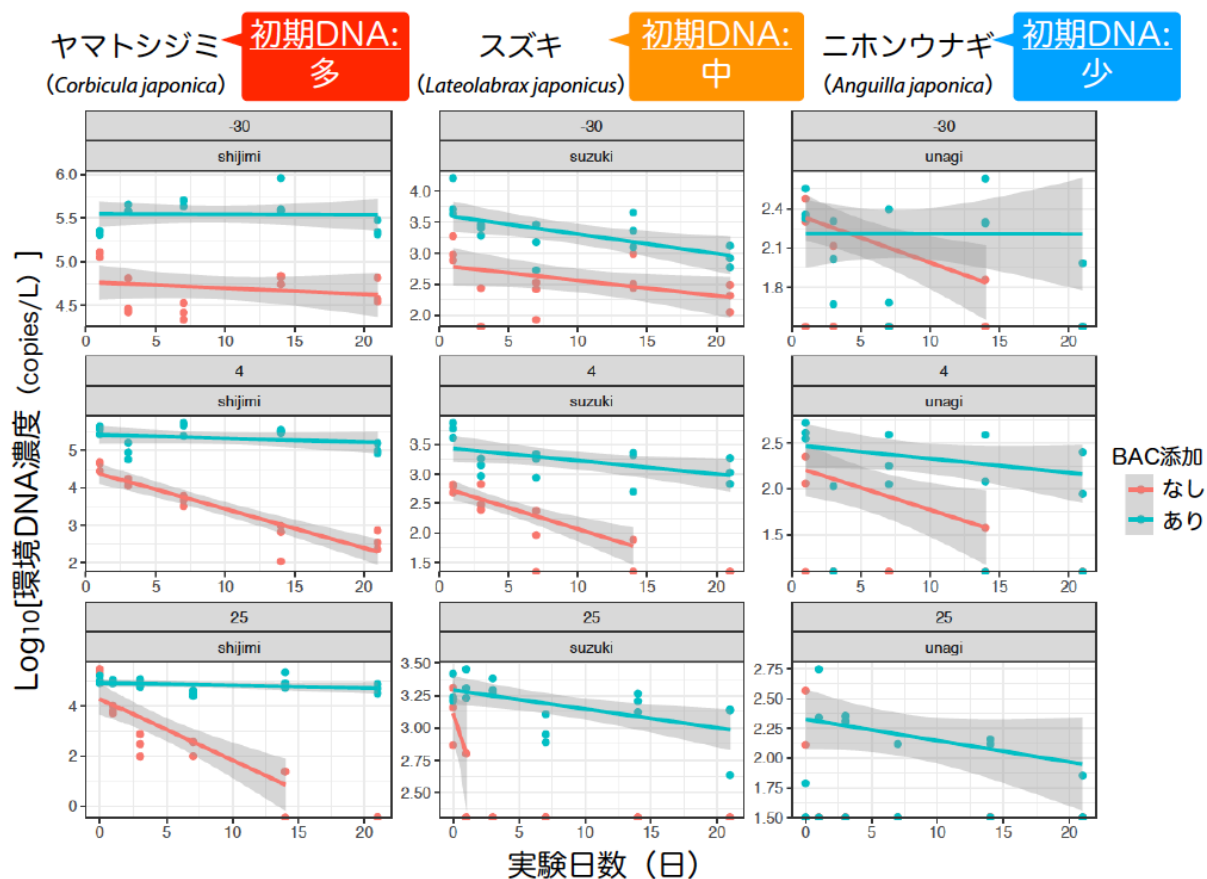
一方で、泥試料に含まれるヤマトシジミのDNA濃度と目視での資源量調査との相関は低い傾向がみられた。泥に含まれる生物のDNAの分解速度に関して、Turner et al. (2015) の報告によると、水に含まれるDNAと比較して、堆積物中では水の流れと微生物による影響が低いため、DNA分解速度が遅く、コクレン（*Hypophthalmichthys* spp.）を対象にした実験を行ったところ、堆積物中に含まれるコクレンeDNAが132日間検出されたと報告している。このことから、ヤマトシジミの泥中に含まれたDNA濃度は以前から蓄積されたものも反映しているため、資源量調査との相関がよくなかったのかもしれない。一方、水中のDNAは時間経過とともに分解が進むのが早いため、より最近の資源量（ヤマトシジミの生息密度）を反映しており、相関がよくなったと思われる。

以上のことから、宍道湖におけるヤマトシジミの環境DNAモニタリング調査には水試料を用いた方が適切であると考えられた。



図（6）－5 水試料と泥試料に含まれる環境DNA濃度と目視資源量調査結果との関係。

汽水サンプルにおけるDNA分解抑制試薬の効果検証



図（6）－6 BAC添加の有無と水試料の保管条件の違いがDNA分解速度に及ぼす影響評価。

宍道湖で採取した水試料にBACを添加した場合、及び、その水試料の保管期間は、ヤマトシジミ、スズキ、ニホンウナギの3種のDNA濃度に有意な影響を及ぼすことがわかった（図（6）－6）。一方で、BACの効果は初期のDNA濃度の異なるこれら3種の生物種間で違いはみられなかった。

これらのことから、BACの添加は汽水の水試料に含まれるDNAの分解を劇的に抑制できることがわかった。今後は汽水の水試料を採取後、できるだけ速やかにBACを添加することが効果的であることが明らかになった。

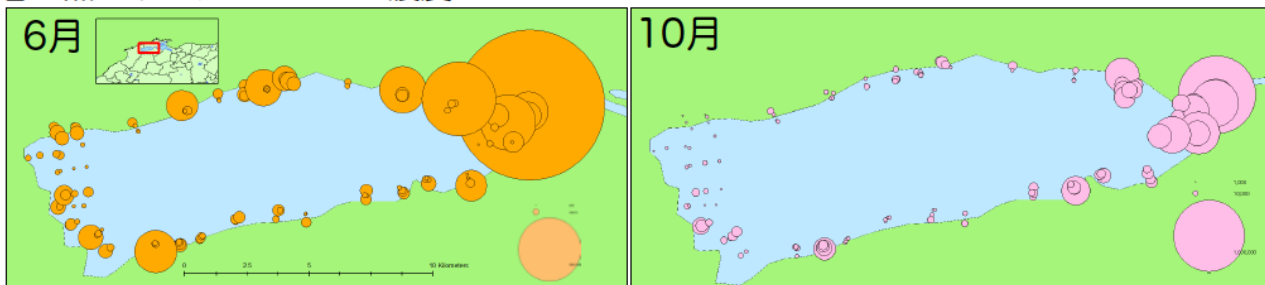
(3) 宍道湖全域における環境DNA分析手法の有用性についての調査

2017年6月と10月にそれぞれ宍道湖内122箇所の一斉採水調査を行った。その結果、ヤマトシジミの産卵期初期である6月ではヤマトシジミのDNAが宍道湖岸全域で分布している傾向がみられた（図（6）－7）。一方、成長期である10月では、とくに南東部にかけてDNA濃度が高い傾向を示した。これらの環境DNAの結果は、宍道湖に生息するヤマトシジミの資源量調査結果と傾向が一致していると考えられた。6月と10月の調査のどちらも、すべての調査地点でヤマトシジミのDNAが検出され、全体の66%の地点で、6月から10月にかけて、検出されるDNA量が減少した。

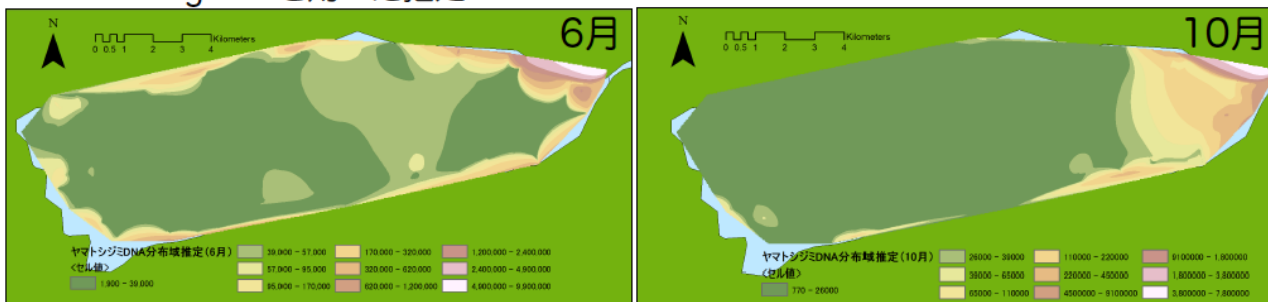
また、ArcGIS10.3に搭載されている分析ツール（Natural Neighbor）を用いてヤマトシジミDNAの分布を色別に表したところ、6月では宍道湖全域の岸沿いにヤマトシジミのDNAが分布しており、また、西岸に比べ大橋川に近い東岸にかけて高濃度に分布していると推測された。10月では、ヤマトシジミのDNAが南東側の岸に偏って分布していると推測された。

各地点のヤマトシジミDNA濃度

(arcGIS 10.3で作成)

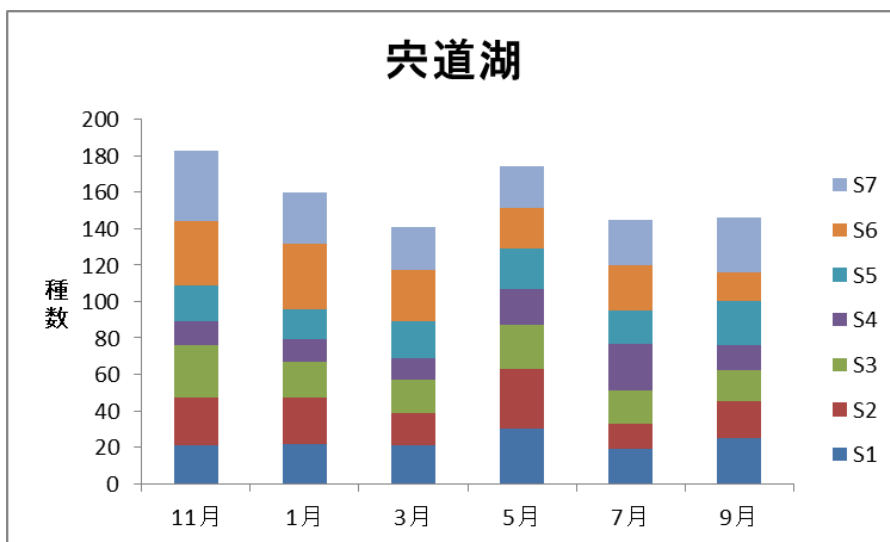


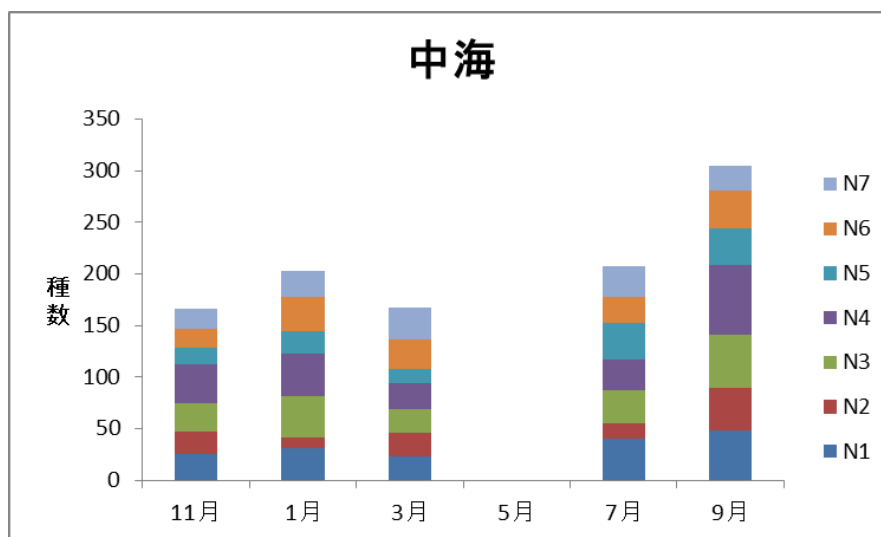
Natural Neighborを用いた推定



図(6) - 7 (上) 各地点におけるヤマトシジミDNA濃度(6月・10月)。各地点の円の大きさはヤマトシジミのDNA濃度を表しており、円が大きいほどDNA濃度が高いことを示している。(下) 宍道湖全域における推定されたヤマトシジミDNA分布(6月・10月)(ArcGIS 10.3を用いて作成)。赤色に近い場所ほどヤマトシジミのDNA濃度が高いと推定された場所を示している。

(4) 魚類用(MiFish)と鳥類用(MiBird)ユニバーサルプライマーを用いた網羅的解析





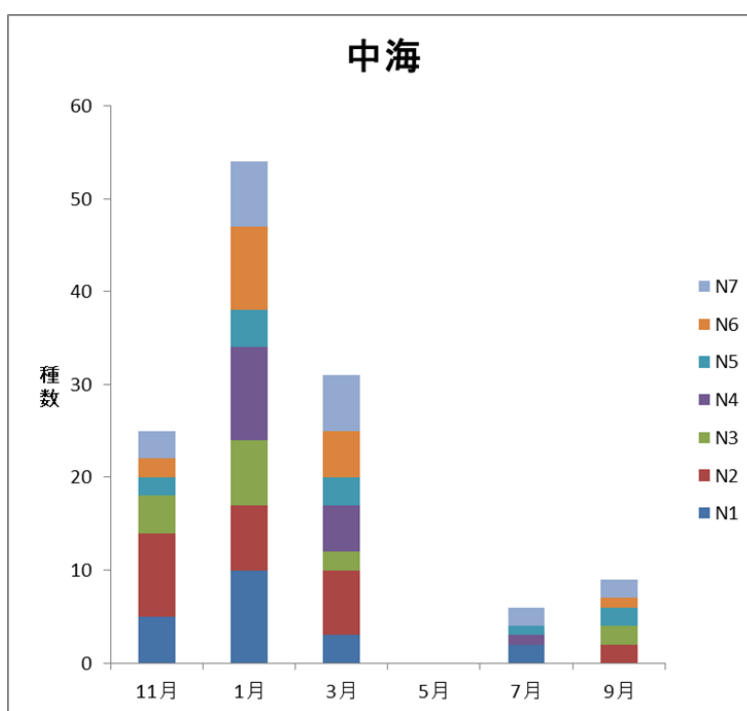
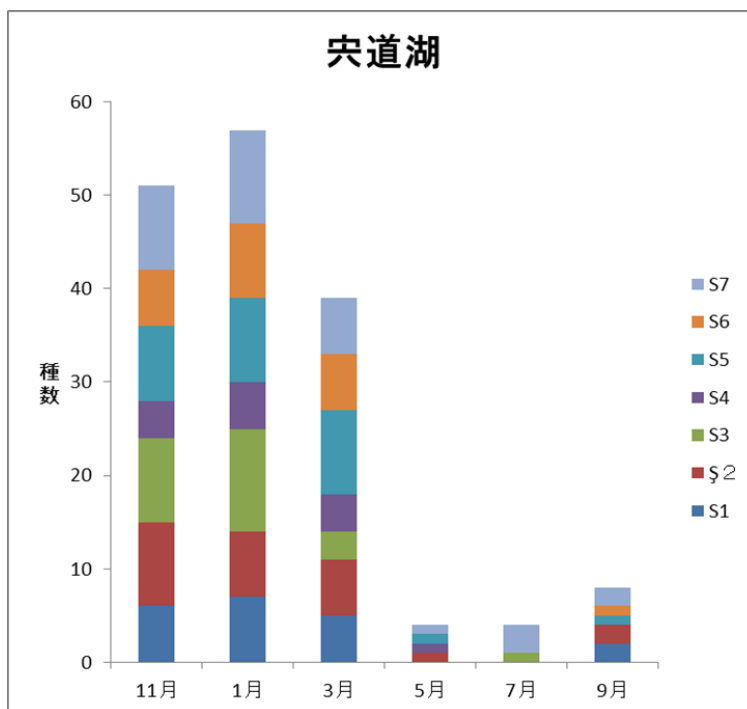
図(6)－8 宍道湖と中海における奇数月ごとに検出された魚類の種数(2016年11月～2017年9月)。なお、中海の5月はサンプル調製等がうまくいかず欠損データとなった。

調査期間中に、宍道湖-中海において計168種の魚種が検出された(図(6)－8)。168種のうち11種が環境省の絶滅危惧種に指定された魚種であった。それらを海水魚、淡水魚、汽水魚、回遊魚の4つに分類したところ、海水魚ではドロメ(*Chaenogobius gulosus*)やカタクチイワシ(*Engraulis japonicus*)、ハゼ科の一種(*Gobiidae* spp.)、淡水魚ではギンブナ(*Carassius auratus langsdorfii*)やウグイ(*Tribolodon hakonensis*)、汽水魚ではコノシロ(*Konosirus punctatus*)やチチブ(*Tridentiger obscurus*)、回遊魚ではスズキ(*Lateolabrax japonicus*)やボラ(*Mugil cephalus*)が主要魚種として認められた。とくに中海では、日本海に連結する境水道の“N3”と“N4”で年間を通じて海水魚の割合が高く、宍道湖に近い“N1”では他の中海の調査地点よりも淡水魚が高い割合で検出された。また、中海の境水道付近である“N3”、“N4”、“N6”では、7月から9月にかけて海水魚の種数の割合が増加した。宍道湖では、湖北に位置する“S1”と斐伊川河口の“S2”で淡水魚の割合がその他の調査地点よりも高かった。中海では、境水道に近いほど検出種数が多く、遠くなるほど検出種数が少ない傾向がみられた。宍道湖では、中海に近い大橋川付近の“S5”、“S6”、“S7”で検出された種数が年間を通じて他の地点より多かった。またこれらの調査地点では汽水魚も他の地点よりも多く検出されていた。

中海の5月のデータが得られなかった理由は、2nd PCR後の電気泳動でバンドが確認できていたことから、ライブラリを集約する過程でいくつかのサンプルで96穴プレートからの蒸発が認められ、集約後の各サンプルの濃度に差異が生じ、MiSeqでシークエンスする際の障害となり、読み取ることができなかったのではないかと考えられた。現在、再実験を行い、データを補完中である。

中海の境水道付近で海水魚が多く、中海西岸に近づくにつれて汽水魚の割合が増加した。さらに、大橋川で汽水魚の割合が最も高くなり、宍道湖の斐伊川付近で淡水魚の割合が最大になった。調査地点での中海全地点の2016年10月～2017年9月までの年間平均塩分濃度は1.88%、宍道湖全地点の2016年10月～2017年9月までの年間平均塩分濃度は0.50%であった。地点別にみると、斐伊川河口付近の“S2”(0.18%)が最も低い塩分濃度で、大橋川の“S7”(1.24%)が宍道湖で最も高く、中海の境水道から最も離れた“N2”(1.10%)が中海で最も低く、美保湾に面している“N4”(3.00%)が最も高い塩分濃度を示したことから、斐伊川側から境水道側に向かうにつれて低濃度から高濃度に塩分濃度勾配を示している。過去の研究で塩分濃度勾配が河口の魚の群集を決定する要因である可能性を示しており、本研究でも過去の知見と一致し

ていることが示唆された。このことから、汽水域における魚類の環境DNAメタバーコーディング手法の有用性を実証できたと考えられる。



図（6）－9 宍道湖と中海における奇数月ごとに検出された鳥類の種数（2016年11月～2017年9月）。なお、中海の5月はサンプル調製等がうまくいかず欠損データとなった。

調査期間中、宍道湖-中海において計23種の鳥類が検出された（図（6）－9）。そのうち、冬季である11月、1月、3月に検出された種数が夏季である5月から9月より多く、国の天然記念物マガンや準絶滅危惧種

ツクシガモが含まれていた。23種の鳥類を冬季に越冬しに飛来する“冬鳥”と年中留まる“留鳥”に分類すると、冬季に月ごとの鳥類の過半数を冬鳥が占めていた。また、冬季のサイト別に冬鳥の検出数の割合は、中海では“N1”と“N2”において冬季を通じて比較的多く、宍道湖では11月に“S2”“S3”“S7”、1月に“S3”と“S7”、3月に“S2”と“S5”で多いことがわかった。

今回の実験で検出された魚類および鳥類が過去の知見とほぼ一致していたことから、汽水域での生物群集を把握するための手法の1つとして、環境DNAメタバーコーディング法の有用性が高いことが示唆された。以上のことから、本研究では過去の知見と一致する魚類と鳥類の生物群集把握ができ、汽水域での生物群集を把握するための手法の1つとして環境DNAメタバーコーディング法の有用性が高いことが示唆された。しかし、湖沿岸部のみの採水調査では、湖央や水底を利用する種までカバーできず、検出に至らなかったと考えられる。したがって、より詳細な生物群集を把握するためには沿岸部のみでなく、湖央や水底も調査地点として検討する必要があると考えられた。また、湖と湖外を利用する種も把握するためには周辺の水田や河川なども調査する必要があるだろう。また、今回調査したのは奇数月のみであったが、調査していない偶数月を含め、定期的な調査により高精度の生物情報を入手することが可能となるだろう。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本サブテーマの実施によって、これまで湖沼や河川、海洋分野などの様々な研究分野やフィールドで幅広く利用されてきた環境DNA分析手法が、汽水の環境においても有用であることを実証できたことの科学的意義は大きいと考えている。なぜなら、淡水と海水が混じり合う汽水是、塩分濃度勾配などが生じる複雑な環境であり、他の環境に比べても多種多様な生物種が生息していることが多いからである。このような環境における生物多様性を評価する手法として魚類相・鳥類相を評価する環境DNAメタバーコーディング手法が有用であることを実証できたことも重要である。また、底生動物の二枚貝ヤマトシジミをモデルケースにした場合、環境DNAサンプリング手法としては、泥試料よりも水試料を利用した方が生物量をより反映していることも明らかにできた。さらに、水試料の保存に淡水魚で既知であったDNA分解抑制試薬（BAC）が汽水環境でも有用であることも実証した。加えて、汽水湖全体の一斉採水調査の結果は、従来の資源量調査の結果と同様の傾向を示すことができたことは、簡便で安価な環境DNA分析手法が既存の調査手法を補完する形で生物量の推定まで実施できる可能性を示すことができたと考えている。これらのことから、本サブテーマは、今後の環境DNA研究分野における汽水環境をフィールドにした発展性を示すことができたものと考えており、本サブテーマの研究成果における科学的な意義は大きいと思われる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本サブテーマの研究成果による環境政策への貢献が見込まれる点に関して、今後、行政主導の生物調査等を実施する際に、以下の点を考慮することを推奨できるようになった。まず、汽水も含めた湖沼等の生物調査には、泥試料よりも水試料を利用する方がより正確な生物量の推定が可能になると思われる。また、そ

の際にはDNA分解抑制試薬（BAC）を添加しておくことで、より正確な生物情報を得ることができるだろう。さらに、環境DNAメタバーコーディング手法は、汽水環境も含めた生物多様性調査に有用であることが実証できたことから、今後は、積極的に環境政策の立案の際に活用していくべきであることを強く推奨したい。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) *T. TAKAHARA, *T. IKEBUCHI, H. DOI and T. MINAMOTO: Estuarine, Coastal and Shelf Science, 221, 15-20 (2019), Using environmental DNA to estimate the seasonal distribution and habitat preferences of a Japanese basket clam in Lake Shinji, Japan. (*Both authors equally contributed.)
- 2) *N. IWAI, *K. YASUMIBA and *T. TAKAHARA: Royal Society Open Science, 6, 181798 (2019), Efficacy of environmental DNA to detect and quantify stream tadpoles of *Odorrana splendida*. (*All authors equally contributed.)
- 3) T. CHAMBERT, D. S. PILLIOD, C. S. GOLDBERG, H. DOI and T. TAKAHARA: Ecology and Evolution, 8, 6, 3468-3477 (2018), An analytical framework for estimating aquatic species density from environmental DNA.
- 4) 乾隆帝、赤松良久、高原輝彦、後藤益滋、一松晃弘：河川技術論文集、23、651-656（2017）, 流水中におけるカワムツの生物量と環境DNA量の関係性－水路実験と野外への適用－.
- 5) C. S. GOLDBERG, C. R. TURNER, K. DEINER, K. E. KLYMUS, P. F. THOMSEN, M. A. MURPHY, S. F. SPEAR, A. McKEE, S. OYLER-MCCANCE, R. S. CORNMAN, M. LARAMIE, A. R. MAHON, R. LANCE, D. S. PILLIOD, K. M. STRICKLER, L. P. WAITS, A. K. FREMIER, T. TAKAHARA, J. E. HERDER, and P. TABERLET: Methods in Ecology and Evolution, 7, 11, 1299-1307 (2016), Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. (Web of Science Hot paper)
- 6) 高原輝彦、山中裕樹、源利文、土居秀幸、内井喜美子：日本生態学会誌, 66, 3, 583-599 (2016), 「環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 高原輝彦：用水と排水、61、4、64-70（2019）
「環境DNAを用いた水域生態系の解明に向けた取り組み」
- 2) 高原輝彦：環境技術、46、12、636-641（2017）
「水生動物の生物量、季節分布と移動における環境DNAを用いた推定」

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 高原輝彦、田口淳也、池淵貴志、内田浩、石田健次、山岸聖、尾形茂紀、土居秀幸、源利文：第65回日本生態学会札幌大会 (2018)
「環境DNAを用いた宍道湖ヤマトシジミ資源量推定への試み」
- 2) 岩井紀子、休場聖美、井川武、高原輝彦：日本爬虫両棲類学会第56回大会 (2017)
「アマミイシカワガエルの幼生密度および発育段階と環境DNA濃度の季節変化」

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) まつえ市民大学ふるさと環境コースにおける特別授業「環境DNA！宍道湖七珍の復活に向けて」
(2018年10月31日、聴講者40名)
- 2) 島根大学研究・学術情報機構エスチュアリー研究センター第25回新春恒例汽水域研究発表会 (2018年1月6日) にて成果紹介

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 山陰中央新報 (平成31年4月17日、朝刊23面、「宍道湖のシジミ 水中DNAで個体数を推定」)
- 2) 山陰中央新報 (平成30年1月7日、朝刊23面、「宍道湖などの汽水域 最新研究成果発表会 島大」)
- 3) 山陰中央新報 (平成29年8月6日、朝刊23面「ウナギ繁殖へ生態調査-最新手法で生息環境解析」)

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) H. YAMANAKA, T. MINAMOTO, J. MATSUURA, S. SAKURAI, S. TSUJI, H. MOTOZAWA, M. HONGO, Y. SOGO, N. KAKIMI, I. TERAMURA, M. SUGITA, M. BABA and A. KONDO: *Limnology*, 18, 233-241 (2016), A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant.

- 2) K. ZIANI, Y. CHANG, L. MCLANDBOROUGH, and D. J. MCCLEMENTS: *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 59, 6247–6255 (2011), Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions.
 - 3) H. YAMANAKA, and T. MINAMOTO: *Ecological Indicator*, 62, 147-153 (2016), The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity.
 - 4) C. R. TURNER, L. KAREN, U. ROBERT, and C. EVERHART: *Biological Conservation*, 183, 93-102 (2014), Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water.
 - 5) 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.
- M. USHIO, K. MURATA, T. SADO, I. NISHIUMI, M. TAKESHITA, W. IWASAKI, and M. MIYA: *Scientific Reports*, 8, 4493 (2018), Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species

II-7 環境DNAを用いた北海道陸水域における固有種・外来種の包括的分布評価と有効集団サイズ推定手法の確立

国立大学法人北海道大学

大学院農学研究院 基盤研究部門

教授・荒木仁志

平成28(開始年度)～30年度累計予算額：20,700千円

(うち平成28年度：7,017千円、平成29年度：7,017千円、平成30年度：6,666千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本サブテーマでは環境DNA技術を改良し、北海道の陸水域を対象とした魚類相の解明と固有種・外来種の包括的分布評価を第一の目的とした研究を行った。その結果、北海道の河川においてはイトウやエゾホトケなどの希少種の分布が明らかになると共に、ニジマスやブラウントラウトといった外来サケマスの分布域も明らかとなった。一方、石狩川流域に数多く残された河跡湖においては、コイ科魚類に代表される国内外来種・カムルチーに代表される国外外来種など、道内の河川とは著しく異なる魚類相が検出され、過去の河川改修が外来種の温床となっていることが示唆された。

本サブテーマの第二の目的には環境DNA技術の種内多型推定およびそれに基づく有効集団サイズ推定が挙げられる。これには既存の環境DNA技術の主流となっているミトコンドリアゲノム由来の遺伝情報解析から核ゲノム由来の遺伝情報解析への技術革新が求められる。核ゲノムはミトコンドリアゲノムに比べ細胞当たりのコピー数が少ないため、より感度の高い環境DNA検出技術を目指した技術改良を行った。その結果、河川内においても生物密度の高い場所においては核ゲノム由来の遺伝情報を安定的に抽出することが可能となり、同種個体群間の集団遺伝特性についても解析が可能となる事が示唆された。

[キーワード]

北方生態系、外来種、希少種、核ゲノム、種内多型

1. はじめに

生物多様性の維持・保全が世界的な関心事となる一方、地域ごとの生物相の把握やモニタリングが環境変動やそれに伴う生物群集動態の変化に追いついておらず、日本国内においても外来種の拡散や地域固有種の絶滅には歯止めがかかっていないのが現状である。また北方域においては、地球温暖化の影響による南方種の北限移動など、全球レベルでの環境変動とそれに伴う生態系の変化が懸念されており、生物相の網羅的かつ高精度なモニタリングの必要性が叫ばれている。なかでも北海道は陸域・水域を問わず本州以南とは大きく異なる生態系を有する一方、その地理学的特性から四季を通した網羅的な調査が難しく、体系的かつ継続的なモニタリングを実現するための技術革新を必要としている。

河川・湖沼の水に含まれる周辺生物由来のDNA(環境DNA)を分析する技術は、サンプルの収集が容易でフィールド調査時の作業時間を大幅に短縮できるだけでなく、生物捕獲に依らないため捕獲が困難で希少な野生生物の検出に高い技術的優位性を有している。また、データベース上のDNAリファレンス配列との比較で種同定が可能となるため分類学的な専門知識がなくとも幅広い分類群の種同定が出来る。そこで、本サブテーマでは発展目覚ましい環境DNA技術を用い、北海道の陸水域を対象とした生物相の解明と固有種・外来種

の包括的分布評価を実現することを第一目的に、この技術の発展的応用として種内多型の検出に基づく集団遺伝学解析技術の開発を第二目的にした研究を行った。

2. 研究開発目的

北海道における陸水域の魚類相を効率的にモニタリングするため、次世代シーケンサーを用いた超並列アンプリコン解析に基づく環境DNAメタバーコーディングを駆使した魚類相解析と、外来種・希少種対策を念頭に北海道における魚類・両生類の環境DNA解析モデル生物としてシロザケ (*Oncorhynchus keta*)、サクラマス (*Oncorhynchus masou*)、イトウ (*Parahucho perryi*)、アズマヒキガエル (*Bufo japonicus formosus*) に特異的な定量検出系の確立を目指す。また環境DNAに基づく種内多型解析技術を開発するため、シロザケ核ゲノム中に存在する可変反復領域 (マイクロサテライト) 由来のマーカールを作製、その解析手法の確立を目指す。以下、手法と結果・考察について各項目ごとに記述する。

(1) 環境 DNA 技術を用いた北海道陸水域を対象とした生物相の解明と固有種・外来種の包括的分布評価

- (1) - 1. 環境DNAメタバーコーディングを用いた北海道陸水域の魚類相推定
- (1) - 2. 水産有用種シロザケの環境DNA定量系開発と検証
- (1) - 3. 水産有用種サクラマスの環境DNA定量系開発と検証
- (1) - 4. 絶滅危惧種イトウの環境DNA定量系開発と検証
- (1) - 5. 国内外来種アズマヒキガエルの環境DNA定量系開発と検証

(2) 環境DNA技術を用いた種内多型の検出と集団遺伝学解析への応用

- (2) - 1. 環境DNAに基づく種内多型検出手法の開発
- (2) - 2. 環境DNAを基に得られた種内多型の解析手法の確立

3. 研究開発方法

(1) 環境 DNA 技術を用いた北海道陸水域を対象とした生物相の解明と固有種・外来種の包括的分布評価

- (1) - 1. 環境DNAメタバーコーディングを用いた北海道陸水域の魚類相推定

プライマー開発

魚類相推定のための魚類ユニバーサルプライマーとして、Miya et al. (2015) のMiFish-Uプライマーを用いた。本プライマーはミトコンドリアの12S rRNA遺伝子配列内の200bp前後を増幅し、その塩基配列を既存のDNAデータベースと照らし合せて分類群を推定した。多くの分類群では種レベルまで推定できるが、一部の分類群では近縁種の区別が困難な場合があった。水産有用種や外来種が含まれるサケ科魚類もMiFish-Uプライマーでは種の判別が困難であったため、サケ科魚類種判別用のユニバーサルプライマーSalmo-U (仮称) を独自開発した (Araki et al. *in prep.*)。サケ科魚類のミトコンドリアのNADH dehydrogenase subunit-2領域のDNA配列情報をGenBankから収集し、種間で変異が多い領域とそれを挟む安定した領域を探索した。以下の種の配列情報を使用した。イトウ *Parahucho perryi*、ドナウイトウ *Hucho hucho*、チョウコウイトウ *H. bleekeri*、アムールイトウ *H. taimen*、ブラウントラウト

Salmo trutta、タイセイヨウサケ *Salmo salar*、シロザケ *Oncorhynchus keta*、ベニザケ *O. nerka*、カラフトマス *O. gorbuscha*、サクラマス *O. masou*、ギンザケ *O. kisutch*、カットスロート *O. clarkii*、マスノスケ *O. tshawytscha*、ニジマス *O. mykiss*、アメマス *Salverinus leucomaenis*、カワマス *Salv. fontinalis*、ホッキョクイワナ *Salv. alpinus*、クリルイワナ *Salv. curilus*、オシロコマ *Salv. malma*。以下の解析ではこれら2種のユニバーサルプライマーを併用し、サケ科魚類についてはSalmo-U、それ以外についてはMiFish-Uを用いた超並列アンプリコン解析を行い、偽陽性を排除するため各サンプル目標リード数の0.5%を超えたDNA配列について種判別を行った。

採水・ろ過

北海道内河川における環境DNAメタバーコーディングによる魚類相推定のため、本研究プロジェクトのため収集した内別川、千歳川、知床河川など約100地点の環境DNAサンプルのほか、当研究室所属の研究者・学生らが統一した方法（以下参照）で2015年から2019年にかけて収集した北海道内河川・湖沼由来の環境DNAサンプルの一部も環境DNAメタバーコーディング分析を実施し、本魚類相解析に供した。採水現場でのコンタミネーションを確認するため、各地点での採水後には日ごとに精製水をろ過したネガティブコントロールを作成し、サンプル同様の解析を行うことでコンタミネーションの程度を確認した。（上記リード数の閾値を超えるコンタミネーションが確認されたサンプルは以降の解析から排除した。）

プラスチックバケツまたは1Lのプラスチックボトルを用いて河川水を採水した。これらの容器は再利用したが、使用前に洗浄、次亜塩素酸溶液による漂白を行ってDNAの持越しがないようにした。採水した水は現地または研究室でろ過を行った。現地でのろ過には基本的に50mLシリンジ（テルモ株式会社）を使ってフィルターカートリッジSterivex-HV（ポアサイズ0.45 μ m、メルクミリポア）でろ過を行った（Miya et al. 2016）。ろ過後のフィルターカートリッジにはDNA保存剤として2mLのRNlater（Thermo Fisher Scientific）を充填し、冷暗条件で研究室へ輸送した。研究室でろ過を行う場合は、1Lずつの水をプラスチックボトルに入れてオスバン液1mLを加えてから、冷暗条件で研究室へ輸送した。その後、47mm径のWhatmanガラス繊維ろ紙GF/F（0.7 μ m、GEヘルスケア・ジャパン）で吸引ろ過を行った。ろ過後、ろ紙は70%エタノールで固定した。ろ過水量は水の濁度等により250または500、1000mLとした。DNA抽出を行うまでは-80 $^{\circ}$ Cの冷凍庫で保存した。

DNA抽出

ろ紙サンプルについてはろ紙の種類ごとに以下の方法で抽出を行った。

1) SterivexからのDNA抽出

カートリッジのOutlet側からRNlaterを吸引した後、1000 μ LのMilliQ水でリンス・吸引を2回行った。次にInletから220 μ LのPBS、200 μ LのBuffer AL（キアゲン）、20 μ LのProteinase K（キアゲン）の混合液を充填してプラグで封をし、56 $^{\circ}$ Cで30分培養した。培養中はローテーターで攪拌した。培養後、遠心機を使ってInlet側から培養液を2mLのチューブに移した（5350 \times g、3分）。残留しているDNAを回収するため、Inletから200 μ LのTEを添加し、56 $^{\circ}$ Cで1分間攪拌した後、同様にして同じ2mLのチューブに回収した。回収した培養液に200 μ LのBuffer ALと400 μ Lの99.5%エタノールを加えて良く混合してからDNeasy Blood & Tissue Kit（キアゲン）のスピンカラムに移した。以降はDNeasy Blood & Tissue Kitの手順に従ってDNAを精製・抽出した。DNAは100 μ LのBuffer AEで溶出し、低吸着タイプのエッペンドルフチューブに入れて-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

2) ガラス繊維ろ紙からのDNA抽出

ガラス繊維ろ紙を円柱形に折り畳み、スピнкаラムEZ-10 (Bio Basic) に入れた。5000×gで3分遠心して残留している水やエタノールを除去した。ろ紙の入ったスピнкаラムを新しい2mLのエッペンドルフチューブに載せ替え、150μLのBuffer ALと150μLの滅菌水、20μLのProteinase K (キアゲン) をろ紙に添加し、56°Cで30分培養した。5000×gで3分遠心した後、ろ紙に残留しているDNAをさらに回収するために180μLのTEをろ紙に添加し、1分培養した。5000×gで3分遠心して同じ2mLのエッペンドルフチューブに回収した。この培養液に180μLのBuffer ALと340μLの99.5%エタノールを加えて良く攪拌し、DNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン) のスピнкаラムに移した。以降はDNeasy Blood & Tissue Kit の手順に従ってDNAを精製・抽出した。DNAは110μLのBuffer AEで溶出し、低吸着タイプのエッペンドルフチューブに入れて-20°Cで保存した。また一部のサンプルについてはスピнкаラムの代用としてサリベットチューブ (ザルスタット社) を用いた遠心分離を行い、その後DNeasy Blood & Tissue Kit を用いたDNA精製・抽出に供した。

シーケンシングライブラリーの作製

ライブラリーは標的のDNA配列を増幅するための1stPCRと、多サンプルを区別するためのインデックス配列を付加する2ndPCRを行って作製した。1stPCRではユニバーサルプライマーの5'側にイルミナ社のシーケンサーで使用されるアダプター配列を付加したものを使用した (Miya et al. 2015参照)。このPCRは10μLの反応系で以下の組成で行った。すなわち、5μLのKAPA HiFi Hot Start Ready Mix (KAPA BIOSYSTEMS) と0.3μLずつの10μMプライマー溶液、2.4μLの滅菌水の混合液に2μLのDNA溶液を添加した。PCR条件は以下の通りである。95°C、3分の熱変性の後、35サイクルの98°C、20秒の熱変性、67°C

(MiFish-U) あるいは60°C (Salmon-U)、20秒のアニーリング、72°C、30秒の伸長反応を行い、その後72°C、5分の最終伸長反応を行った。相対的に少ないDNA断片はPCR反応に供するDNA溶液に含まれない確率が高く、非検出となりうる。そのため、それぞれのプライマーセットについてサンプルあたり4回の独立したPCRを行った。4回分のPCR産物は1つにまとめてからGene Read size selection kit (キアゲン) を使って150bp以下のプライマーダイマー等の増幅産物を除去し、これを次の2ndPCRの鋳型として用いた。

2ndPCRでは8塩基からなるインデックス配列とイルミナ社のアダプター配列を含むプライマーを使用した。インデックス配列はイルミナ社が提供している配列のほか、8塩基中最低4塩基が互いに異なるように独自に設計した配列セットを用いた。PCRは20μLの反応系で以下の組成で行った。10μLのKAPA HiFi Hot Start Ready Mixと0.6μLずつのプライマー、6.85μLの滅菌水の混合液に1.35μLの精製した1stPCR産物を添加した。PCR条件は以下の通りである。95°C、3分の熱変性の後、18サイクルの98°C、20秒の熱変性、72°C、30秒の伸長反応を行い、その後72°C、5分の最終伸長反応を行った。

2ndPCR産物は2%アガロースゲル電気泳動で増幅状況を確認した後、実験系ごとに各サンプルを等量プールした。QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン) で精製した後、E-Gel電気泳動システム

(Thermo Fisher Scientific) の2% E-Gel EX Gelで電気泳動を行い、標的のサイズのDNAバンドを切り出した。切り出したゲルよりGel/PCR Extraction Kit (FastGene) を使ってDNAを抽出した。各実験系のライブラリーはQubit 3.0でDNA濃度を測定し、それぞれの平均DNA断片長に基づいてモル濃度に換算して4nMに調整した。その後、各実験系のサンプル数と必要リード数に応じてすべてのライブラリーを混合した。サンプルあたりの割り当てリード数は5万リードとした。

シーケンスには共同研究者が所属する千葉県立中央博物館または国立環境研究所、龍谷大学のMiSeqまたは当研究室のiSeq100 (いずれもイルミナ社) を使用し、150bpペアエンドで行い、MiFish pipeline (Sato et al. 2018) を使用してシーケンスされた環境DNAの種を判定した。

(1) - 2. 水産有用種シロザケの環境DNA定量系開発と検証

シロザケに由来する環境DNAのみを検出・定量するために、ミトコンドリアの中でも進化速度が速い(変異が起こりやすい)調節領域(Control regionまたはD-loop)でシロザケ固有の配列を探索した。シロザケのほか同所的に分布する可能性のあるサケ科魚類のイトウ *Parahucho perryi*、アムールイトウ *H. taimen*、ブラウントラウト *Salmo trutta*、タイセイヨウサケ *Salmo salar*、ベニザケ *O. nerka*、カラフトマス *O. gorbuscha*、サクラマス *O. masou*、ギンザケ *O. kisutch*、カッツスロート *O. clarkii*、マスノスケ *O. tshawytscha*、ニジマス *O. mykiss*、アメマス *Salv. leucomaenis*、オシロコマ *Salv. malma*、レイクトラウト *Salv. namaycush*の配列情報をGenBankより収集し、比較した。より定量精度の高いTaqman probe法で定量PCRを行うため、以下のプライマーとプローブを開発した。これらのプライマーの特異性試験にはポジティブコントロールとしてのシロザケのほか、イトウ *P. perryi*、ドナウイトウ *H. hucho*、ブラウントラウト *Salmo trutta*、ベニザケ *O. nerka*、カラフトマス *O. gorbuscha*、サクラマス *O. masou*、ニジマス *O. mykiss*、アメマス *Salv. leucomaenis*、オシロコマ *Salv. malma*、レイクトラウト *Salv. namaycush*の組織DNAを用いて行った。

表(7)-1 シロザケ検出・定量用のプライマーとプローブ

プライマー/プローブ名	Primer (F/R) /Probe	DNA配列
OnKeta-F5	Primer (F)	5' -TCTGGCGGCTACATCCC-3'
OnKeta-R5	Primer (R)	5' -GCTGATGTATGAGGGGTTAAAATAAGT-3'
OkDL-Probe1	Probe	[FAM]CCCATATATAATACTGCACGTGAGTAGTAC[TAMRA]

定量PCRは20 μ Lの反応系で以下の組成と反応条件でサンプルあたり3回の反復を用意して行った。反応液調整過程のコンタミをチェックするためにDNAサンプルの代わりに滅菌水を添加したネガティブコントロールを毎回用意した。

10 μ LのBrilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix (Agilent Technologies)、それぞれ1.0 μ Lの10 μ Mのプライマー、0.3 μ Lの10 μ Mのプローブ、0.05 μ LのBSA (20mg/mL、New England BioLabs)、0.3 μ LのリファレンスDye (ROX)、5.35 μ Lの滅菌水、2 μ LのDNAサンプル。95 $^{\circ}$ C、3分の熱変性の後、50サイクルの95 $^{\circ}$ C、10秒の熱変性、57 $^{\circ}$ C、10秒のアニーリング、60 $^{\circ}$ C、30秒の伸長反応を行った。蛍光測定は伸長反応の後に行った。

絶対定量を行うために、シロザケの増幅領域の配列からなる2本鎖DNA断片を合成し、濃度を調整したスタンダードの希釈系列を作製した。プライマーF3/R3の場合は10⁷コピー/ μ Lのストックを調整し、10⁰コピー/ μ Lまでの10倍希釈系列を作製した。プライマーF5/R5の場合は10⁵コピー/ μ Lと10²コピー/ μ Lのストックを調整し、それぞれから10³コピー/ μ Lまでと10⁰コピー/ μ Lまでの10倍希釈系列を作製した。ストック溶液は10 μ Lずつに分注して冷凍保存し、1回の実験で使い切るようにした。このようにすることで、プライマーF5/R5の場合はいつでも10⁵コピー/ μ Lと10²コピー/ μ Lの2点については濃度が一定になり、希釈による誤差で検量線がばらつくのを抑えた。

(1) - 3. 水産有用種サクラマスの環境DNA定量系開発と検証

サクラマスの特異検出系開発のため、標的配列にミトコンドリアDNAのND2領域を選択し、NCBIから599本の塩基配列情報を収集し、サクラマス特異プライマーとプローブを設計した(表(7)-2, -3)。アンプリコンサイズは148bpである。

表(7)-2 サクラマスプライマー作成に用いた属ごとの種数リスト

Genus	Species (n)
Oncorhynchus	8
Salvelinus	8
Parahucho	1
Hucho	3
Salmo	5
Thymallus	10
Brachymystax	3
Stenodus	1
Prosopium	2
Coregonus	11

表(7)-3 サクラマス検出・定量用のプライマーとプローブ

プライマー／プローブ名	Primer (F/R) /Probe	DNA配列
OnMasu-F	Primer (F)	5' -AGTAGCCCCATCCATCG-3'
OnMasu-R	Primer (R)	5' -GATTAATACTATTCAACCAAGATGT-3'
OM-Probel	Probe	[FAM] TAGTGGGAGGTTGAGGTGGACTCA [TAMRA]

次にサクラマスを含む日本国内に生息するサケ科魚類計9種（シロザケ *O. keta*, ニジマス *O. mykiss*, ベニザケ *O. nerka*, カラフトマス *O. gorbuscha*, イトウ *P. perryi*、ブラウントラウト *Salmo trutta*, オショロコマ *Salv. malma*, アメマス *Salv. leucomaenis*) の組織由来のDNAサンプルを用いて本検出系の種特異性を検証した。反応液はBrilliantIII Ultra-Fast qPCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc.)、200nMのプライマー及びプローブ、濾紙サンプルから抽出したテンプレートDNA2μLを全量20μLになるよう作成し、定量PCRはStratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Inc.)を用いて1サンプルにつき3反復行った。

(1) - 4. 絶滅危惧種イトウの環境DNA定量系開発と検証

本研究では絶滅危惧種イトウの種特異検出系を開発した(Mizumoto et al. 2018)。標的配列にはミトコンドリアDNAのND2領域を選択し、NCBIデータベースから599本の塩基配列情報（*Parahucho*属1種、*Hucho*属3種、*Oncorhynchus*属11種、*Salmo*属4種、*Salvelinus*属8種、*Brachymystax*属3種、*Thymallus*属12種、*Stenodus*属1種、*Prosopium*属2種、*Coregonus*属11種）を収集した。これに加え、本種はサケ科魚類の中でも極めて高い母川回帰性を示すことから、北海道内の計10水系由来のイトウの組織サンプルを採集し、北海道内の地域個体群を代表するサンプルとして配列情報を解読し、以上の配列情報をもとにイトウ種特異プライマーとプローブを設計した。アンプリコンサイズは124bpとなった。

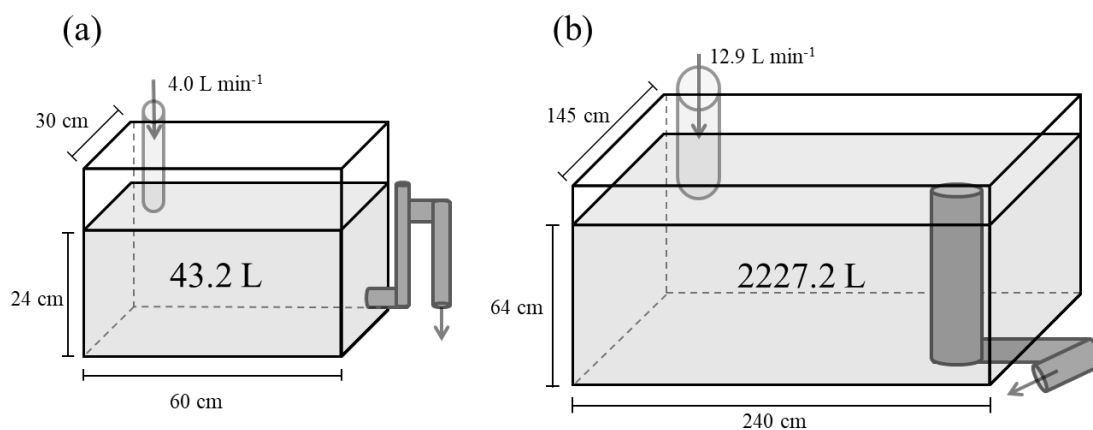
表(7)-4 イトウ検出・定量用のプライマーとプローブ

プライマー／プローブ名	Primer (F/R) /Probe	DNA配列
PaHuch-F	Primer (F)	5' - GCAATAGGCCTCCTATCAACAA - 3'
PaHuch-R	Primer (R)	5' - CGAATTGTAAAATTAGTACTATCCATCCA -3'
PH-Probel	Probe	[FAM] AGCATACTCTCAATCGCCACCT [TAMRA]

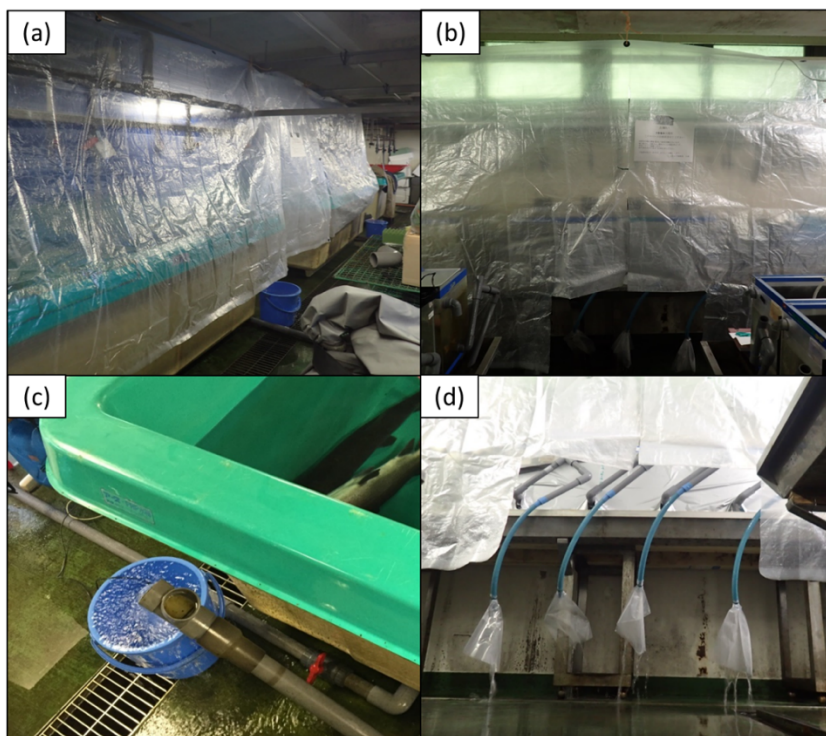
次にイトウを含む日本国内に生息するサケ科魚類計9種（シロザケ *O. keta*, サクラマス *O. masou*, ニジマス *O. mykiss*, ベニザケ *O. nerka*, カラフトマス *O. gorbusha*, ブラウントラウト *Salmo trutta*, オシヨロコマ *Salv. malma*, アメマス *Salv. leucomaenis*) の組織由来のDNAサンプルを用いて本検出系の種特異性を検証した。反応液はBrilliantIII Ultra-Fast qPCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc.)、400nMのプライマー及びプローブ、濾紙サンプルから抽出したテンプレートDNA2 μ Lを全量20 μ Lになるよう作成し、定量PCRはStratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Inc.)を用いて1サンプルにつき3反復行った。

本検出系を用いた検証項目は「飼育環境下において環境DNAの量はイトウ個体数及び体サイズに相関するか」「イトウは現在、北海道のどこにどれほど生息しているのか」の2点とした。検証項目1では国内最大の淡水魚であるイトウを対象とすることで、体サイズおよび個体数の増加が環境DNAの量に与える影響について普遍的な知見を得る目的で行われた。実験は地方独立行政法人北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場恵庭本場の協力の下、2種類の大きさの異なる水槽（40L水槽と2000L水槽）を用いて行った（図(7)-1, 2）。実験に使用したのは0歳、1歳、2歳の稚魚と20歳以上の親魚で、40L水槽には0歳、1歳、2歳魚を、2000L水槽には0歳、2歳、親魚を収容し、それぞれ収容尾数を変化させた状態で採水を行った。採水に際し、魚が採水者を認識して動き回ることを防ぐため水槽にカーテンをかけたうえで魚からこちらが見えないような低い位置から採水を行うよう工夫した（図(7)-2）。採集した飼育水はWhatman GF/Fフィルターを用いて濾紙1枚あたり1L濾過した。

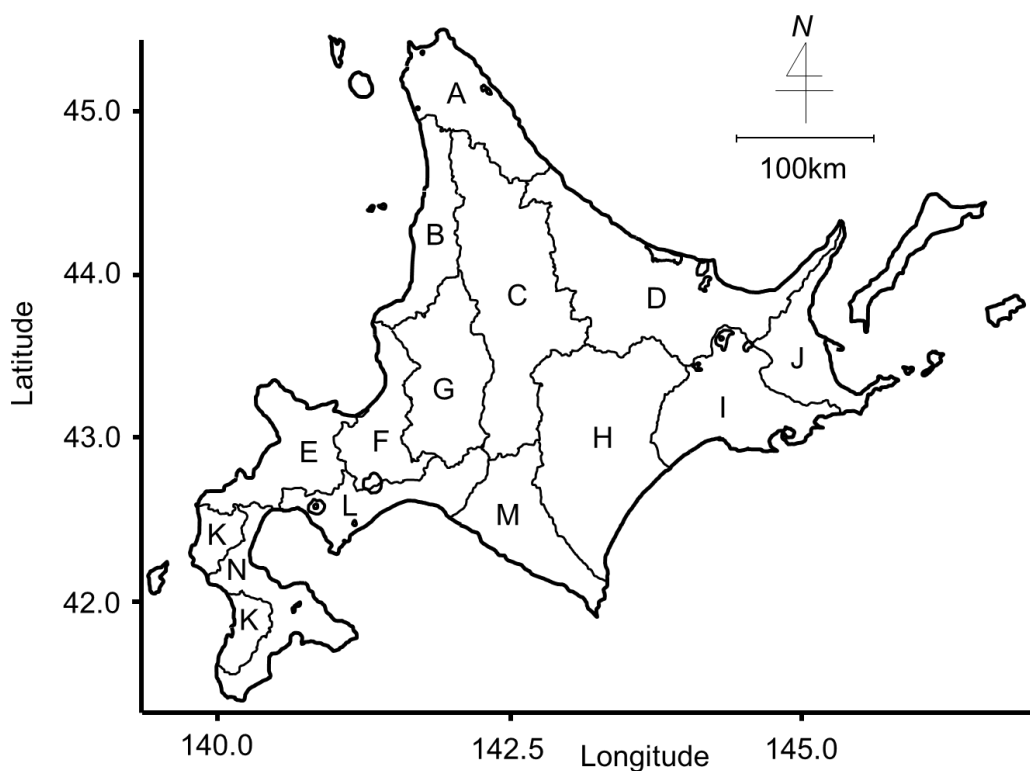
検証項目2では北海道全域の125河川においてイトウの在・不在およびバイオマスを推定するため採水を行った（図(7)-3）。採水は河川の河口で行い、Whatman GF/Fフィルターを用いて濾紙1枚あたり1L濾過した。バイオマス推定にはRand and Fukushima (2014) において1000-1250匹のイトウ親魚が生息すると推定された河川において検出されたイトウDNAのコピー数をもとに行った。



図(7)-1 イトウ飼育実験に用いた水槽概略図。(a)が40L水槽で(b)が2000L水槽を示しており、飼育水は図中に示されている灰色のパイプから採集した。なお飼育水は水槽上部からかけ流しになっており、採水に伴って飼育水が減少することはない。



図(7)-2 イトウ飼育実験に用いた水槽の写真。(a)が40L水槽で(b)が2000L水槽を示しており、飼育水は図中に示されている灰色のパイプから採集した。なお飼育水は水槽上部からかけ流しになっており、採水に伴って飼育水が減少することはない。



図(7)-3 北海道全域規模で行ったサンプリングマップ(振興局ごとにA-N)。イトウ個体群保全の観点から詳細な地点情報は掲載していないが、A区域では16河川、B区域では9河川、D区域では11河川、E区域では11河川、F区域では3河川、H区域では8河川、I区域では15河川、J区域では20河川、L区域では8河川、M区域では9河川、N区域では17河川からそれぞれ採水を行った(保全対象種のため河川名・緯度経

度は非公表)。

(1) - 5. 国内外来種アズマヒキガエルの環境DNA定量系開発と検証

北海道における国内外来種であるアズマヒキガエル *Bufo japonicus formosus* 特異検出系を開発するため、標的配列にはミトコンドリアDNAの12sRNA領域を選択し、NCBIから得られた92本の塩基配列情報をもとに、*in silico*で定量PCR用のプライマー及びプローブを設計した(表(7)-5, -6)。アンプリコンサイズは123bpとなった。

表(7)-5 ヒキガエルプライマー作成に用いた属ごとの種数リスト

Genus	Species (n)
Bufo	5
Rana	9
Pelophylax	1
Rhacophorus	2
Hyla	1
Buergeri	1

表(7)-6 アズマヒキガエル検出・定量用のプライマーとプローブ

プライマー/プローブ名	Primer (F/R) /Probe	DNA配列
BuJapo-F	Primer (F)	5' - CCTTGTGGTCAGTTACTACTACTA - 3'
BuJapo-R	Primer (R)	5' - TAGGTGTCTTGGGCGGAT -3'
BJ-Probel	Probe	[FAM] TTAGGACAAGGAGCCGGTATCAGG [TAMRA]

最後に、設計したプライマー及びプローブのヒキガエル特異性の検証のため、北海道に生息するヒキガエルを含む8種の両生類(アマガエル *Hyla japonica*、エゾアカガエル *Rana pirica*、エゾサンショウウオ *Hynobius retardatus*、ツチガエル *R. rugosa*、トウキョウダルマガエル *R. porosa*、トノサマガエル *Pelophylax nigromaculatus*、ウシガエル *Lithobates catesbeiana*)の組織サンプルから抽出したDNAについて定量PCRを行った。反応液はBrilliantIII Ultra-Fast qPCR Master Mix (Agilent Technologies, Inc.)、200nMのプライマー及びプローブ、濾紙サンプルから抽出したテンプレートDNA2 μ Lを全量20 μ Lになるよう作成し、定量PCRはStratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Inc.)を用いて1サンプルにつき3反復行った。

本検証の調査水域は北海道上川管内において、ヒキガエルのオタマジヤクシがいる池や、ヒキガエルの繁殖池が集水域に含まれる河川を対象とした。採水は2018年6月に行い、環境水はステリベクスフィルターを用いて濾紙1枚あたり500mL濾過した。最終的にネガティブコントロールサンプルを含む計81サンプルを採集し、定量PCRに供した。このとき標的配列の合成DNAで5段階の希釈系列(2 \times 10¹、

2×10^2 、 2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 copies/2 μ L) を作成し、スタンダードとしてテンプレートDNAに含まれるDNAコピー数を推定した。

(2) 環境DNA技術を用いた種内多型の検出と集団遺伝学解析への応用

(2) - 1. 環境DNAに基づく種内多型検出手法の開発

環境DNA中の核DNAはミトコンドリアDNAよりもコピー数がかなり少なく、たとえ少数コピーのDNAが検出できたとしても集団の遺伝的特性を反映しないと予想される。そのため高濃度の環境DNAを供する必要がある。シロザケは秋から冬にかけて産卵のために多数の個体が遡上して産卵場所に集まる。また、各地のサケマス孵化場では孵化放流事業のために大規模にシロザケを飼養している。遡上ピーク期の河川や孵化場の飼育池なら高濃度かつ多数個体に由来する環境DNAを得ることができる。

アンプリコン解析ライブラリーの作製には、Tsukagoshi et al. (2015)で記載された13遺伝子座と塚越氏との共同研究で得られた6遺伝子座の合計19遺伝子座のシロザケのマイクロサテライトプライマーにイルミナ社のNGSシステムでシーケンスするためのアダプター配列を付加し、環境DNAに含まれるマイクロサテライトをPCR増幅した。以降のNGS用ライブラリーの作成手順はMiFish-U等と同じであり、1stPCRの条件のみ、最適な条件に調整した。MiSeqまたはiSeq100を使用し、150bpペアエンドまたは300bpペアエンドでの塩基配列決定を行った。サンプルあたりの割り当てリード数は5万リードとした。

(2) - 2. 環境DNAを基に得られた種内多型の解析手法の確立

環境DNAには標的とするシロザケ以外にも他のサケ科魚類のDNAも含まれており、マイクロサテライトは近縁な種でも同じ領域が増幅することが多い。そのため、環境DNAから増幅されたDNA断片には他種に由来するものも含まれる可能性がある。そこで、シロザケのみの種内多型を見たい場合はシーケンスされた個々の配列に基づいて判別することにした。北海道に分布するサケ科魚類10種（シロザケ *O. keta*、イトウ *P. perryi*、ブラウントラウト *Salmo trutta*、ベニザケ *O. nerka*、カラフトマス *O. gorbuscha*、サクラマス *O. masou*、ニジマス *O. mykiss*、アメマス *Salv. leucomaenis*、レイクトラウト *Salv. namaycush*、オシヨロコマ *Salv. malma*) の組織DNAを鋳型にして、シロザケと同じPCR条件でそれぞれのマイクロサテライトの増幅を行った。これらを次世代シーケンサーを用いて塩基配列決定し、シロザケ由来の配列と区別できるか比較した。安定した種間変異サイトがあれば、シロザケ固有な配列を持つシーケンスリードだけをデータ処理によって抽出することが可能となる。

次に次世代シーケンサーから出力されたシーケンスデータ (Fastq形式) からシロザケのマイクロサテライトの配列のみを抽出するために、BashとPerl、R (R Core Team, 2018) を使ってスクリプトを開発した。以下の順で処理を行った。

- 1) FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) を使ってシーケンスデータの品質を評価。
- 2) 各リードの信頼性の低い部分を取り除くためにSolexaQA (Cox et al., 2010) を使ってトリミング。
- 3) tagcleaner.pl (Schmieder et al. 2010) を使ってマイクロサテライトのプライマー配列が含まれるリードだけを抽出。この際、シーケンスエラーを考慮して3塩基までのミスマッチを許容した。
- 4) シーケンスの読み始めにプライマー配列、その次にそのプライマーで増幅されるマイクロサテライトの反復配列が含まれるリードだけを抽出。

- 5) 残った配列のうちリード1 (Forwardプライマー側からシーケンスしたリード) とリード2 (Reverseプライマー側からシーケンスしたリード) の両方が残っているものだけを抽出。ただし、両方とも反復配列の途中でシーケンスが終わっているものは除いた。
- 6) FLASH (Magoč and Salzberg 2011) でリード1とリード2をアセンブル。
- 7) シロザケ固有な配列を含むリードのみを抽出。
- 8) 各リードの長さ (ForwardプライマーからReverseプライマーまでの塩基数) を数え、長さ (対立遺伝子) ごとにその数をカウント。

シロザケの北海道内の河川集団間の類縁関係を明らかにするために、秋のシロザケ産卵遡上期に千歳川 (日本海側)、遠音別川 (オホーツク海側)、十勝川、豊畑川 (共に太平洋側)、遊楽部川、鳥崎川 (共に噴火湾沿い) での採水調査を行った。外群として岩手県釜石市の甲子川で採水したサンプルも解析に加えた。安定した結果が得られるかを検証するために、それぞれ2つのレプリケートを用意した。

シロザケと他種の配列を区別可能であった遺伝子座 (結果と考察参照) のうち4つの遺伝子座を用いて解析を行った。以降の方法は前述の通りである。サンプルあたりの割り当てリード数は5万リードとした。

データ処理と解析には、上記スクリプトを使用してシロザケの対立遺伝子の頻度データを出力した。サンプル間の遺伝距離と系統関係を明らかにするため、得られた対立遺伝子の頻度から相対頻度を計算し、POPTREE2 (Takezaki et al., 2010) を用いて近隣結合法 (NJ法) を用いた系統樹を構築した。遺伝距離はDa distance (Nei et al., 1983) を使用し、遺伝子座について1000回のブートストラップを試行した。

4. 結果及び考察

(1) 環境DNA技術を用いた北海道陸水域を対象とした生物相の解明と固有種・外来種の包括的分布評価

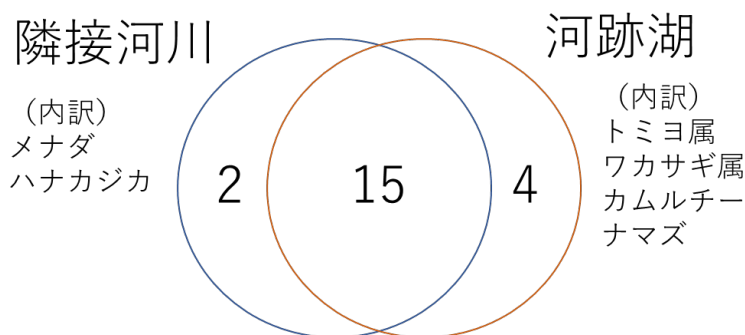
(1) - 1. 環境DNAメタバーコーディングを用いた北海道陸水域の魚類相推定

道内最大河川である石狩川水系の千歳川、内別川、豊平川からは計24の淡水魚由来の環境DNAが検出された。うちサケ科魚類は以下の7種である。シロザケ *O. keta*、サクラマス *O. masou*、カラフトマス *O. gorbusha*、ニジマス *O. mykiss*、ブラウントラウト *Salmo trutta*、オショロコマ *Salv. malma*、イトウ *P. perryi*。このうちニジマス、ブラウントラウトは国外外来種、イトウは絶滅危惧種に該当する。上記3河川で非サケ科魚類として検出された魚種のうち、DNAリード数において高頻度に上位を占めていたのはエゾウグイ *Tribolodon sachalinensis*、ハナカジカ *Cottus nozawae*、フクドジョウ *Barbatula toni* であった。一方、イトヨ *Gasterosteus aculeatus* に代表されるトゲウオ科魚類は各環境DNAサンプル中で上位を占めることはなかったものの、千歳川 (水源にあたる支笏湖を含む) においては環境DNAメタバーコーディングに供した6地点全てのサンプルから検出されるなど、河川内に一様に分布していることを示唆する結果が得られた。なお、豊平川からは希少種エゾホトケ *Lefua nikkonis* の環境DNA検出も見られた。

同じ石狩川水系でも石狩川本川周辺に点在する河跡湖においては検出魚類相が大きく異なっていた。2017年に研究室所属の学生 (池山昭太) を中心に実施した13の河跡湖調査では、計19の淡水魚由来環境DNA検出が見られたものの、そのうちサケ科魚類は2種 (シロザケ *O. keta*、サクラマス *O. masou*) に留まり、最も頻繁に検出されたのは北海道においてはその殆どが外来となるコイ科魚類であった (フナ属 *Carassius* spp.、コイ *Cyprinus carpio*、バラタナゴ *Rhodeus ocellatus*、モツゴ *Pseudorasbora*

parva、タモロコ *Gnathopodon caerulescens*、エゾウグイ *T. sachalinensis*、ウグイ *T. hakonensis*、マルタ *T. brandtii*)。また肉食性外来魚としてナマズ *Silurus asotus* やカムルチー *Channa argus* が検出されるなど、特徴的な解析結果が得られた。これらの河跡湖はいずれも石狩川本川の直線化に伴い生じた湖だが、現在でも水門や水路を通じた本川との水の往来は維持されており、隣接する本川においても8割近い魚種の環境DNAが検出されたことから(図(7)-4)、河跡湖が外来種の温床となるばかりか隣接する石狩川を通じた分布拡大の原因となりうる可能性を強く示唆する結果となった(Ikeyama et al. *in prep.*)。

一方、道東に位置し世界自然遺産に登録されている知床半島の河川においては調査対象とした37河川全てのサンプルからオショロコマ *Salv. malma* 由来の環境DNA検出が見られたほか、一部河川からはサクラマス *O. masou*、ニジマス *O. mykiss* の環境DNA検出も見られた(Araki et al. *in prep.*)。ただし非サケ科魚類で環境DNA検出が見られたのはカンキョウカジカ *Cottus hangiongensis*、シマウキゴリ *Gymnogobius opperiens*、フクドジョウ *Barbatula toni*の3種のみであった。この結果は知床半島に位置する河川がオショロコマを中心とする独自性の高い河川生態系を形成していることを示唆すると同時に、この手法が同じ道内においても地域性を反映した魚類相を網羅的に比較・評価する上で効率的かつ合理的であることを示唆している。

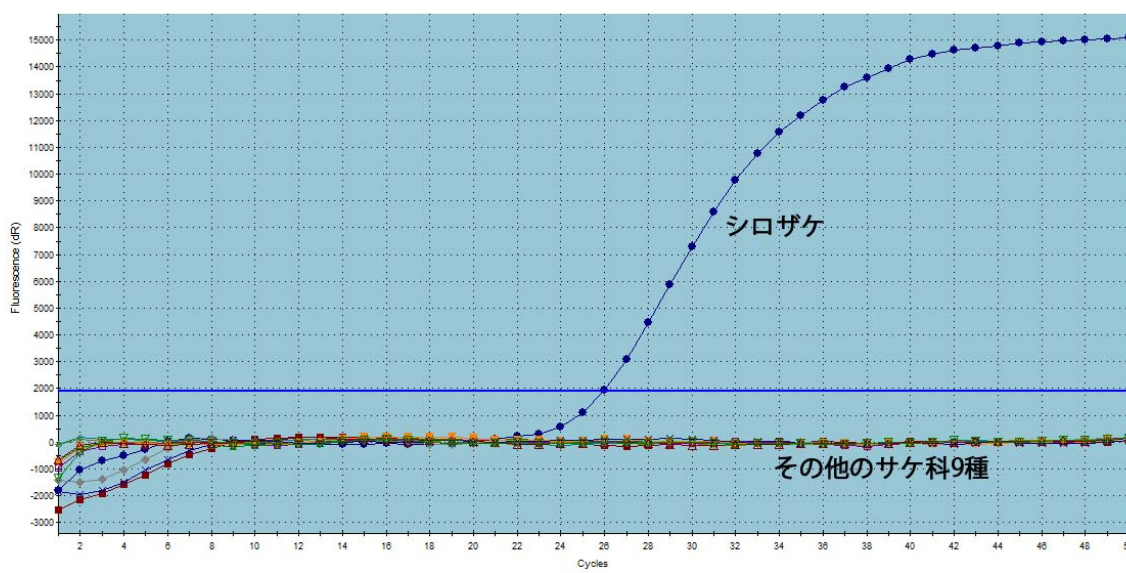


図(7)-4 環境DNAメタバーコーディングによる石狩川流域の河跡湖と隣接河川の魚類相比較 (Ikeyama et al. *in prep.*)

(1) - 2. 水産有用種シロザケの環境DNA定量系開発と検証

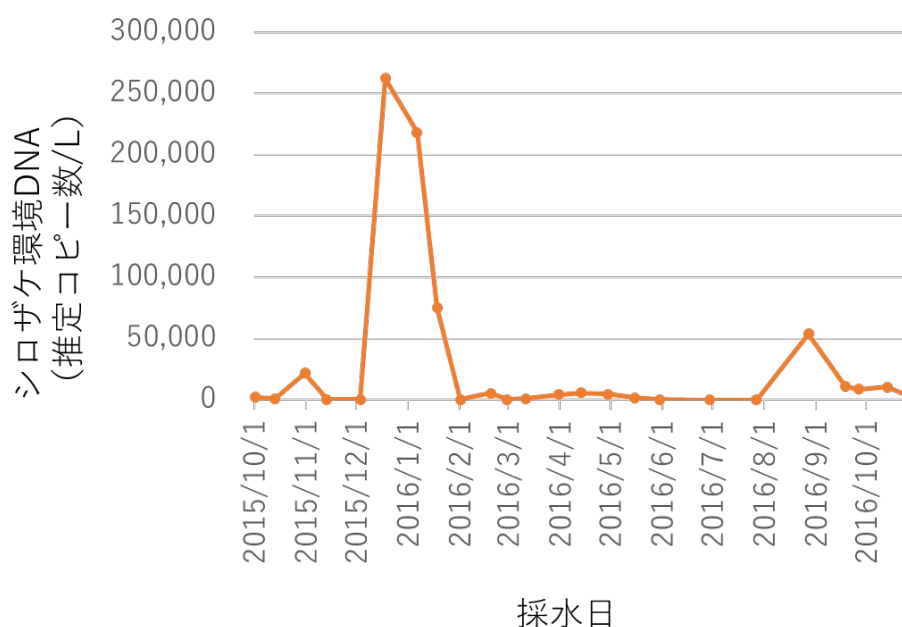
シロザケ (サケ、*O. keta*) は日本を代表する水産有用種であるばかりでなく、大型の遡河性回遊魚として海の栄養素を河川生態系にもたらす重要な生態学的役割を担っている。シロザケの資源量には海域における成長環境の変化のほか、稚魚降河時の減耗の影響も示唆されているが、その生態についての知見は十分とは言えない。そこで本研究においてはシロザケに特異的な検出系を開発し、上記環境DNAメタバーコーディングに供したサンプルとは別にシロザケの河川内動態を意図した河川水サンプリングを行い、野外検証を行った。

シロザケについては環境DNAの定量検出系が存在しなかったため、既存のDNAデータベースを基にシロザケのミトコンドリアゲノムに特異的なプライマーおよびプローブを開発し、上記サケ科10種の組織標本を用いて特異性の検証を行った。その結果、図(7)-5に示したとおり、組織標本由来の高濃度DNAをテンプレートとした場合、シロザケの検出を確認した。



図(7)-5 定量PCRを用いたシロザケ特異的検出系の組織DNA検証結果。横軸は定量PCRのサイクル数、縦軸は蛍光強度を表す。この実験の結果、本検出系は同水系に共存する可能性を有するサケ科魚類のうち、シロザケ *O. keta* 由来DNAのみで増幅し蛍光強度を増加させることが確認された。

次にこのシロザケ検出系の有効性を野外検証するため、道央に位置する内別川における定期採水サンプルを用いた定量PCR解析を行った。その結果、本河川で目視観察されているシロザケ冬期遡上群（12-1月）と夏期遡上群（8-9月）の検出が確認されたほか、春には微量ながら河川内で自然再生産した稚魚由来と思われるシロザケ環境DNAの検出も見られた（図(7)-6）。

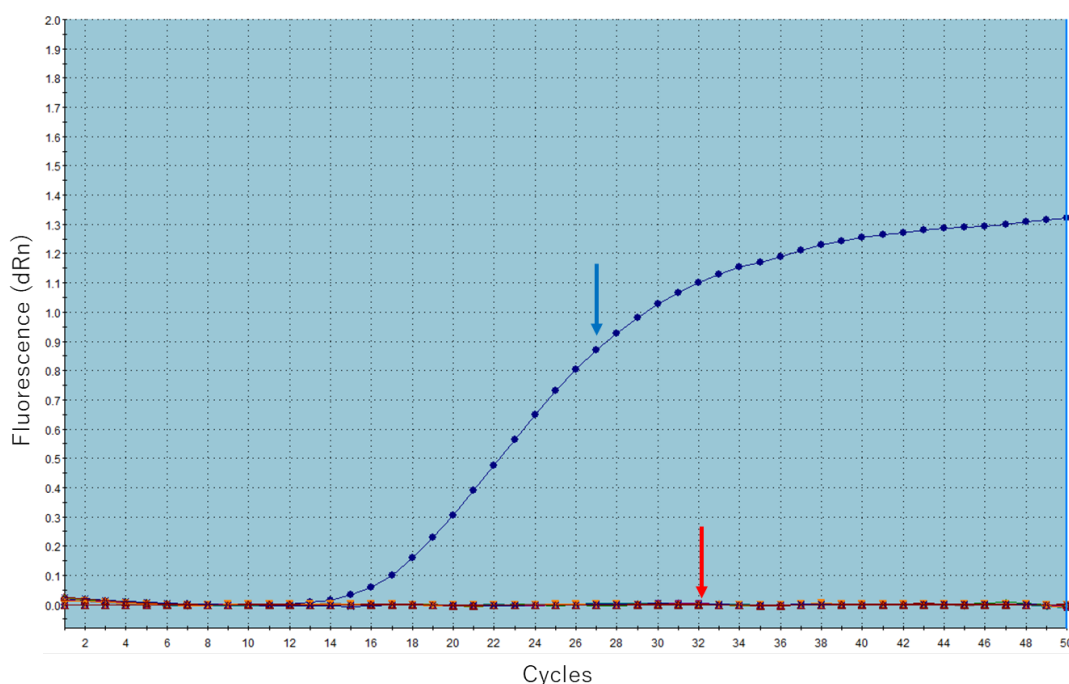


図(7)-6 シロザケ特異的検出系を用いた内別川のシロザケ環境DNA濃度推定。12-1月に最大のピーク、8-9月に二つ目のピークがあるほか、3-5月には低濃度ながらコンスタントなシロザケ環境DNA検出が見られている。

(1) - 3. 水産有用種サクラマス環境DNA定量系開発と検証

シロザケと同じサケ科・太平洋サケ属に属するサクラマスはシロザケ、カラフトマスと並び日本の水産有用種の一つだが、降河せずに淡水で一生を過ごす陸封・定着型の生活史多型（通称ヤマメ）が存在するなどシロザケやカラフトマスに比べ淡水依存性が高く、淡水域での資源管理がより重要視されている。そこで本研究においてはサクラマスに特異的な検出系を開発し、その野外検証を行った。その結果、上記シロザケ特異的検出系同様、サクラマス以外の組織由来DNAの検出は認められなかったことから、本検出系のサクラマス特異性が確認された（図(7)-7）。以降のサクラマス環境DNA解析にはすべてこの検出系を使用した。

本検出系を用いた野外検証については道央・北広島市に位置する仁井別川において、北海道立総合研究機構 さけます・内水面水産試験場と共同で河川内個体数の操作実験を行った。4-16個体のサクラマスを河川内の一地点にケージ設置して下流部における環境DNA検出を試みた本実験においては、4個体では最大300メートル、8-16個体では最大500メートル下流でのサクラマス環境DNA検出が認められた一方、その平均検出濃度は供試魚からの距離と必ずしも反比例せず、より詳細な解析の必要性が示唆された（Urabe et al. *in prep.*）。



図(7)-7 定量PCRを用いたサクラマス特異的検出系の組織DNA検証結果。横軸は定量PCRのサイクル数、縦軸は蛍光強度を表す。サクラマス（青線）のみからの検出が見られる。赤線はサクラマスを除く近縁8種の検出結果（非検出）を示す。

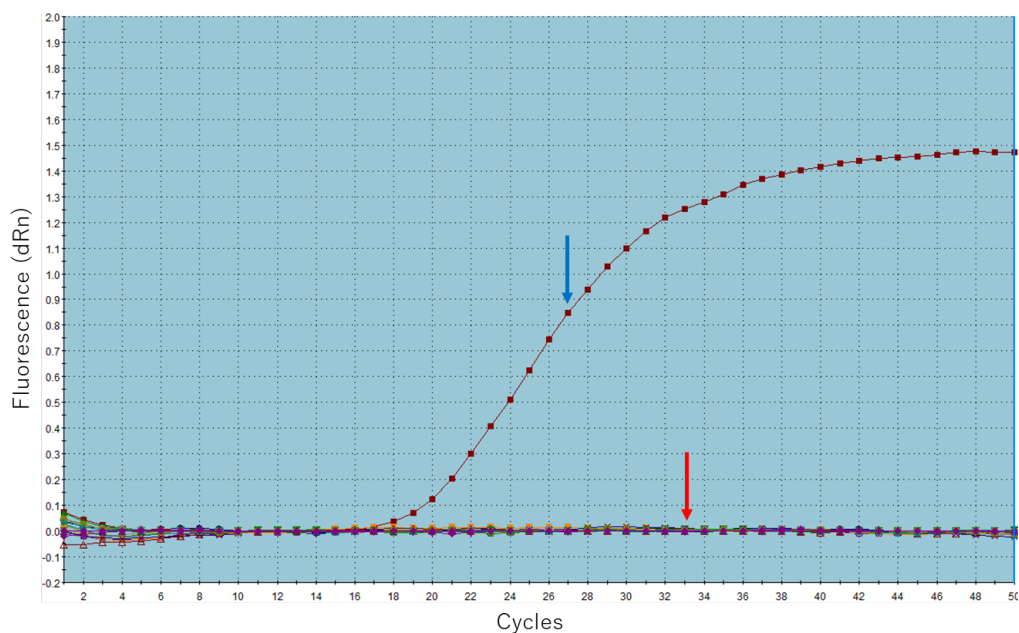
(1) - 4. 絶滅危惧種イトウの環境DNA定量系開発と検証

当研究室学生（水本寛基、現・研究員）を中心に開発したイトウ環境DNA検出系は、シロザケ、サクラマス同様、組織由来のDNAを用いた種特異性検証実験によってその有効性が確認された（図(7)-8）。以降、イトウ環境DNA解析にはすべてこの検出系を適用した。

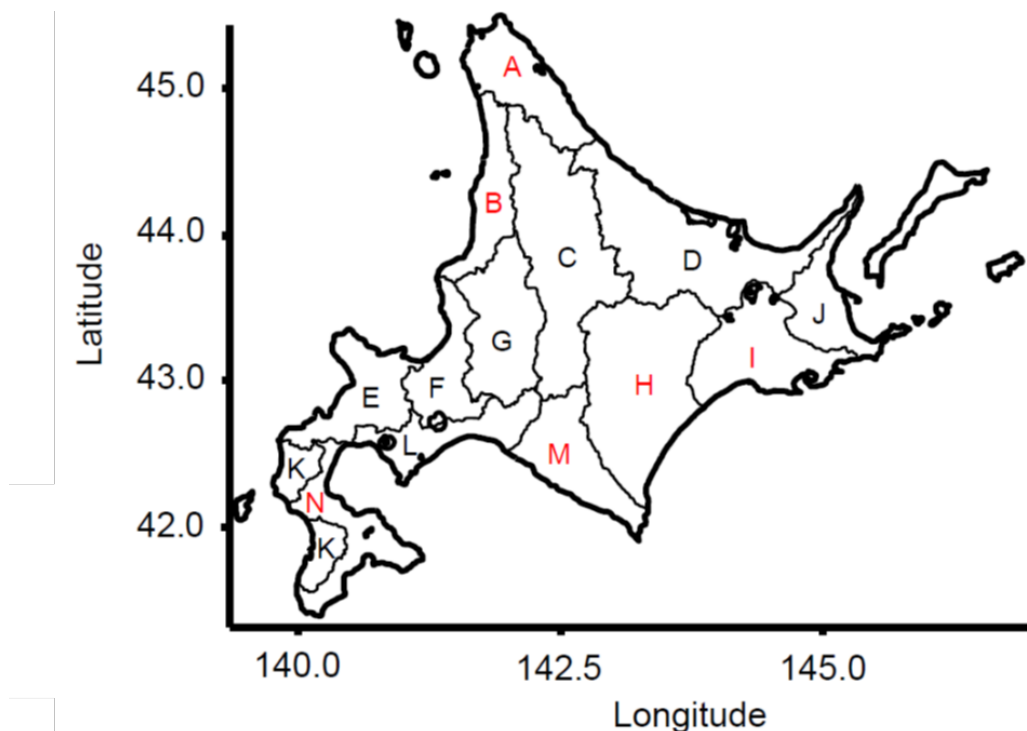
北海道立総合研究機構 さけます・内水面水産試験場協力の下で実施したかけ流し式の水槽実験の結果、イトウが生息する流水域においても、一定の環境下であれば生物量、特に重量換算での生物量と環境DNA濃度には強い相関が見られることが確認された（Mizumoto et al. 2018）。この結果は、少な

くとも安定した環境下であれば、野外でも検出された環境DNA濃度が周囲に生息するイトウの重量換算生物量を反映している可能性を示唆している。

全道125河川で実施した本検出系を用いたイトウ分布推定の結果、6.4%にあたる6区域8河川からのイトウ環境DNA検出が確認された（図(7)-9）。このうち特に高濃度のイトウ環境DNAが検出されたA、I両区域にはイトウの安定生息河川である猿払川水系、別寒辺牛川水系がそれぞれ含まれており、この2区域での検出濃度は道内全域での検出濃度総計の95%超となるなど、本絶滅危惧種の道内分布が少数の河川に局所化していることを強く示唆する結果が得られた（Mizumoto et al. *in prep.*）。



図(7)-8 定量PCRを用いたイトウ特異的検出系の組織DNA検証結果。横軸は定量PCRのサイクル数、縦軸は蛍光強度を表す。イトウ（青線）のみからの検出が見られる。赤線はイトウを除く近縁8種の検出結果（非検出）を示す。



図(7)-9 全道14区域（振興局）およびイトウ環境DNA検出区域のマップ。赤で示した6区域内の8河川からイトウ環境DNA検出が見られた（Mizumoto et al. *in prep.*）。

(1) - 5. 国内外来種アズマヒキガエルの環境DNA定量系開発と検証

上記サケ科魚類検出系同様、アズマヒキガエルにおいても組織DNAを用いた特異性検証ではヒキガエル以外のDNA検出は認められなかったことから、以降のヒキガエル環境DNA解析にはこの検出系を適用した。

国内外来種であるアズマヒキガエルは近年、旭川地域を中心とする石狩川水系で分布拡大が懸念されており、本研究では両生類の専門家である北大・フィールド科学センターの岸田治准教授と合同でアズマヒキガエルの繁殖期にあたる2018年の5-6月にかけて、石狩川支流となる愛別川、忠別川、伊野川での採水調査を行った。その結果、愛別川では4地点中1地点で1/6レプリケートからのヒキガエル環境DNA検出が見られ、忠別川では非検出だったがアズマヒキガエルの繁殖が目視されている伊野川では周辺の溜池のみならず、河川本流からも6/6レプリケート（100%）で高濃度のヒキガエル環境DNA検出が見られた。忠別川でも下流域ではアズマヒキガエルの繁殖が確認されており、この地点での非検出については今後の課題となるものの、全体としては予想された分布に近い結果が得られており、野外での本外来種検出法の技術的障害は限定的であることが推測される。

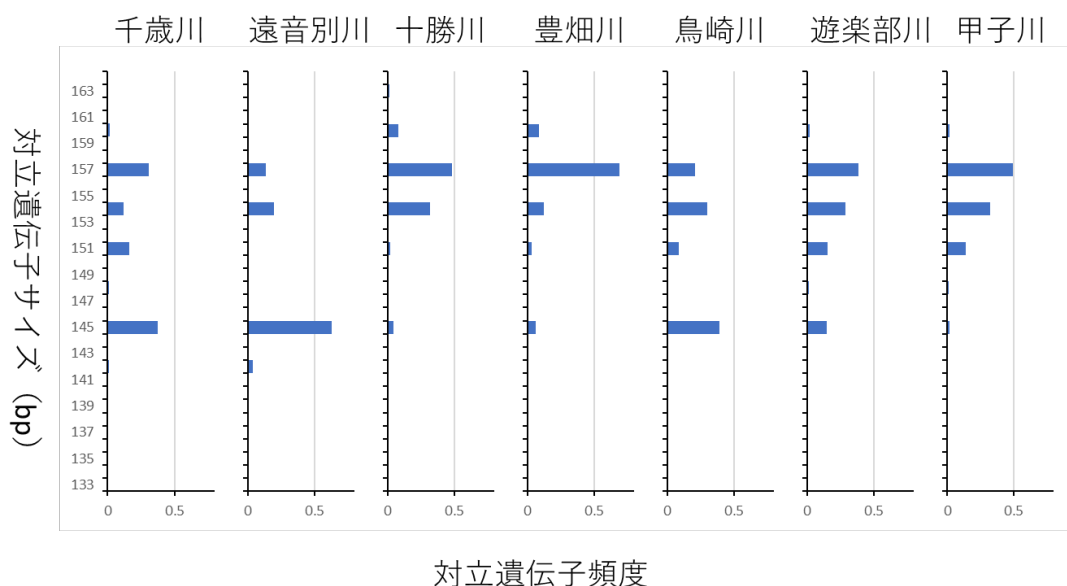
(2) 環境DNA技術を用いた種内多型の検出と集団遺伝学解析への応用

(2) - 1. 環境DNAに基づく種内多型検出手法の開発

核ゲノムに位置し、突然変異率の高いマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝構造解析は今や分子生態学、生物地理学をはじめとする各分野において主流となっている。しかし、これまでの解析には比較対象となる各集団から50～100個体分もの遺伝情報を収集する必要があるため、サンプリングに大きなハードルを有する。一方、環境DNA技術は現場においては採水・ろ過のみと効率的であるものの、これまで主なマーカーとして使われてきたのは細胞当たりのコピー数の多いミトコンドリアゲノ

ム由来の遺伝子だった。そこで、本研究ではまず、自然界でも多数の個体が局在するシロザケの産卵遡上期をターゲットに、核DNA由来のマイクロサテライトマーカーを増幅し、安定的に可視化出来るかどうか、水産研究・教育機構 北海道区水産研究所の協力の下、サケ飼育池で採集した環境DNAの解析を行ったところ、複数のマイクロサテライトマーカーで明確な増幅が見られた。

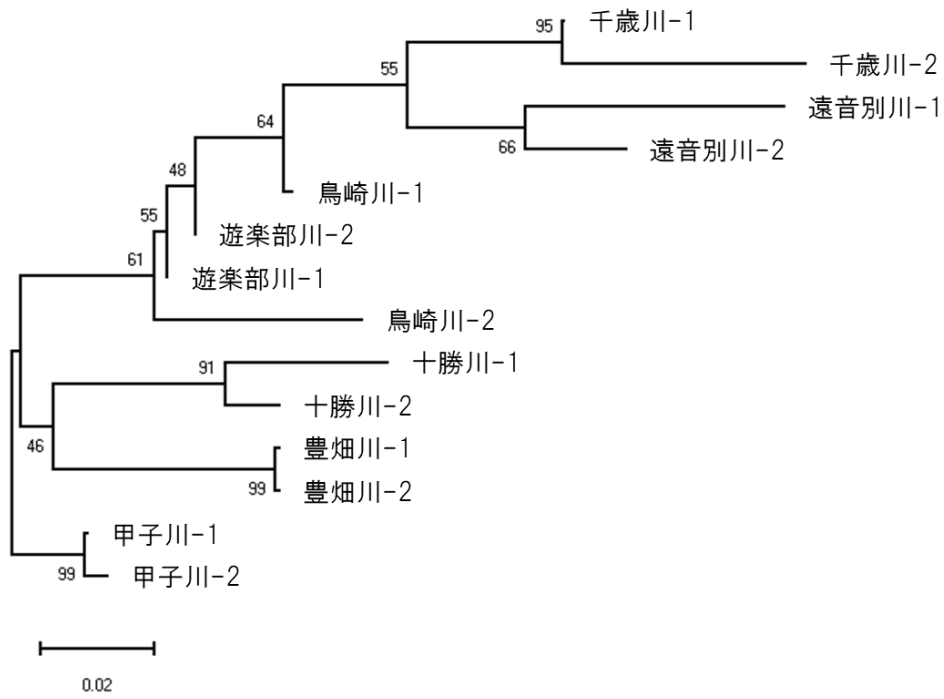
また、道内自然河川においてもシロザケ遡上期に採水を行い、同様の解析を行ったところ、図(7)-10に示す通り河川集団ごとに分布に差のある対立遺伝子頻度が確認された。



図(7)-10 シロザケ核ゲノムに位置するマイクロサテライト遺伝子座Chums2の対立遺伝子頻度分布。縦軸は対立遺伝子の長さ (bp) で、増幅効率の下がる165bp以上は除外して表示した。

(2) - 2. 環境DNAを基に得られた種内多型の解析手法の確立

環境DNAに基づく種内多型解析のもう一つの課題は、個体ごとの情報が得られないことによる連鎖情報の欠落である。同一サンプルに複数の個体由来の対立遺伝子が検出されるため、これはサンプリングを簡略化する上で不可避な問題であるが、遺伝的多様性の指数化には複数の方法があり、指数ごとにその適性を見極める必要がある。本研究ではまず本技術を系群判定に使用可能か確かめるため、図(7)-11で示した各河川個体群に対して近隣結合法を用いた解析を行った。それに先立ち核ゲノム由来の19マイクロサテライト遺伝子座に対してシロザケと他種との区別が可能かを検討した結果、開発したスクリプト「ScriptsForMicrosatelliteVer5」によって10遺伝子座でシロザケの配列のみを抽出可能であることが分かった。このうち最も多型的であった4遺伝子座に基づき各河川個体群からそれぞれ2サンプル（レプリケート）を用いて系統樹を作成したところ、地理的に最も近い鳥崎川、遊楽部川（共に噴火湾沿い）を除きレプリケート間で安定的に河川個体群のクラスターが指示されたほか、太平洋群（十勝川、豊畑川）、日本海・オホーツク海群（千歳川、遠音別川）といった北海道内の遺伝的構造を反映した系統関係が確認された。



図(7)-11 環境DNAに基づくシロザケマイクロサテライトの対立遺伝子頻度から推定されたNJ系統樹。枝にある数値はブートストラップ値。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

北海道陸水域の環境DNAに焦点を当てた本研究では、これまで困難であった河川内における回遊魚（シロザケ、サクラマス、イトウなど）や国内外来種であるアズマヒキガエルの環境DNA定量検出系を開発し、これら生物の非侵襲的生物分布推定法を確立した。これによりイトウに代表される絶滅危惧種やアズマヒキガエルに代表される外来種の分布変化をモニタリングすることが各段に容易となり、またシロザケ、サクラマスといった水産有用種の資源管理に向けて、陸水域においては既存の方法では得られなかった高密度かつ広範囲な情報収集が可能となることが示された。

また、環境DNAメタバーコーディングを用いた道内河川・湖沼における魚類相推定の結果は、この手法が各水域の生物多様性特性を記述するのに有用であるばかりか、人為的な河川改修のもたらす多様な生物への影響を解明する上で大変有効な手法であることを示している。今後河川の直線化のみならず、河川工作物の影響や魚道の効果、水質改善等々の水辺の環境整備に関する様々な場面でこの手法が活用されることが期待される。

更に環境DNAを用いたシロザケの種内多型解析手法の開発は、本技術の集団遺伝学的解析への応用可能性を強く示唆する結果をもたらした。これは、これまで何十、何百もの野生生物を捕獲しなければ出来なかった集団遺伝解析が、河川水や湖沼の水の解析によって部分的にせよ代用可能となることを意味している。現時点では一定の生物密度を要する技術だが、今後この技術をさらに改良するなどして遺伝的多様性の減少が危惧される絶滅危惧種の保全といった問題への特効薬となる可能性が考えられる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省、林野庁、北海道および学識経験者などの構成員からな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、オシヨロコマ長期モニタリング調査結果の一部として本研究成果の一つである知床半島内の河川環境DNA調査の結果が示され、今後知床半島のオシヨロコマモニタリングにこの技術を活用していくことが承認された。（オシヨロコマ長期モニタリング調査結果資料にこの解析結果の一部が採用されている）。

<行政が活用することが見込まれる成果>

2019年5月にアメリカ合衆国・オレゴン州ポートランドで開かれる北太平洋溯河性魚類委員会（NPAFC）のワークショップに招聘されており、本研究成果の一部を発表する予定となっている。これによりサケ科魚類に代表される河川・海洋を行き来する水圏生物の網羅的なモニタリングが世界規模で実現し、自然環境や資源管理の国家戦略に大きく貢献することが期待される。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) H. Mizumoto, H. Urabe, T. Kanbe, M. Fukushima, and H. Araki: *Limnology*, 19(2), 219–227. (2018), Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid.

<査読付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）>

- 1) 荒木仁志、宮正樹、池田実、矢部衛：「生物学者、地球を行く」日本生態学会北海道地区会（編集）、24–30（2018）
「北の海に未知なる生命を求めて 環境DNAの挑戦」（執筆担当：荒木仁志、宮正樹、池田実、矢部衛）
- 2) 荒木仁志、水本寛基：「Salmon情報 No. 12」北海道区水産研究所、27–28（2018）
「環境DNAを用いた水圏生物研究」（執筆担当：荒木仁志、水本寛基）
- 3) 荒木仁志、水本寛基：「海洋と生物 vol. 40」、生物研究社、35–39（2018）

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) H. Araki, H. Mizumoto, T. Kanbe and S. Sato: The 2nd NPAFC-IYS Workshop on Salmon Ocean Ecology in a Changing Climate, Portland OR, USA (2019)
“Evaluation of an environmental DNA method as a potential tool for monitoring salmonid fishes in the wild”
- 2) H. Araki, H. Mizumoto and T. Kanbe: The 66th Annual meeting of the Ecological Society of Japan, Kobe (2019)
“Environmental DNA for studying intra-specific variations”
- 3) H. Mizumoto, K. Ikeda, and H. Araki: The 66th Annual meeting of the Ecological Society of Japan, Kobe (2019)
“Understanding the distribution and biomass of Sakhalin taimen using environmental DNA”
- 4) 荒木仁志：北海道大学部局横断シンポジウム，札幌（2019）
「メタゲノムからメタバーコーディングへ：環境DNAの挑戦」
- 5) 水本寛基：北海道大学部局横断シンポジウム，札幌（2019）
「絶滅危惧種を追い！～1Lの水から始まる生態学～」
- 6) 水本寛基，荒木仁志：第1回環境DNA学会大会，東京（2018）
「環境DNA技術を用いた絶滅危惧種イトウの分布域・生物量の全道推定」
- 7) 荒木仁志，水本寛基，神戸崇，鎌田頌子，南波聡子：第1回環境DNA学会大会，東京（2018）
「環境DNAを用いた北海道河川魚類相の解明と展望」
- 8) 水本寛基：応用生態工学会金沢，金沢（2018）
- 9) 荒木仁志：環境アセスメント協会技術セミナー，札幌（2018）
「環境DNAを用いた魚類分布・資源量推定の実例紹介」
- 10) H. Mizumoto and H. Araki: The 43rd Annual meeting of the Western Division American Fisheries Society, Anchorage AK, USA (2018)

“Estimating the seasonal migration of Sakhalin taimen using environmental DNA”

- 11) 荒木仁志：魚道研究会，札幌（2018）
「環境 DNA 技術を用いた水圏生物相推定および河川横断工作物影響評価の可能性」
- 12) 荒木仁志，神戸崇，水本寛基，南波聡子：第 40 回魚類系統学研究会，札幌（2018）
「環境 DNA 2018」
- 13) 荒木仁志，宮下和士：サケ学研究会，函館（2018）
「サケの価値とは何か」
- 14) 荒木仁志，神戸崇，水本寛基，鎌田頌子，佐藤俊平：水産学会特別シンポジウム，東京（2018）
「環境 DNA によるサケの資源・生態研究」
- 15) 水本寛基，荒木仁志，宮正樹：第 65 回日本生態学会大会，札幌（2018）
「環境DNA技術を用いたイトウの季節回遊行動の推定」
- 16) H. Araki: International symposium “Promotion of global network studies on seagrass ecosystem based on innovative new technology”, Tokyo (2018)
“Environmental DNA as a monitoring tool for aquatic biodiversity”
- 17) 荒木仁志：海洋生物科学研究会、札幌（2017）
「見えない生物多様性を見る—環境DNA技術の可能性」
- 18) 荒木仁志：第 39 回魚類系統研究会，赤平（2017）
「環境DNA 2017」
- 19) 水本寛基，荒木仁志：第 39 回魚類系統研究会，赤平（2017）
「環境DNAを用いたイトウの分布調査速報」
- 20) 荒木仁志，宮正樹，池田実，矢部衛：魚類学会シンポジウム，函館（2017）
「環境DNAを通して観る、北の海の生物と多様性」
- 21) 水本寛基，荒木仁志，福島路生，卜部浩一：第 11 回サケ学研究会，札幌（2017）
「環境DNAを用いた自然河川におけるイトウの生物量推定への試み」
- 22) 水本寛基：第 1 回道東森里海連環シンポジウム，厚岸（2017）
「絶滅危惧種イトウをモデルに環境DNAの応用可能性に迫る」
- 23) 荒木仁志：海洋生物科学研究会、札幌（2017）
「見えない生物多様性を見る—環境DNA技術の可能性」
- 24) 荒木仁志，神戸崇，本多託也，水本寛基，鎌田頌子，南波聡子，宮正樹：水産海洋学会地域研究集会北洋研究シンポジウム，札幌（2017）
「環境DNAを通して観る北海道の水圏生物」
- 25) 水本寛基，荒木仁志，宮正樹：水産海洋学会地域研究集会北洋研究シンポジウム，札幌（2017）
「環境DNAから見る絶滅危惧種イトウの回遊行動」
- 26) H. Araki: The 64th Annual meeting of the Ecological Society of Japan, Tokyo (2017)
“Environmental DNA as an ecological tool for salmonid fish distribution”
- 27) H. Mizumoto, H. Araki, H. Urabe, and M. Fukushima: The 64th Annual meeting of the Ecological Society of Japan, Tokyo (2017)
“Can we detect distribution and quantify biomass of Itou (*Parahucho perryi*) by using eDNA?”
- 28) 池山昭太，成瀬未帆，Theodore Squires, Jocelyn Chui，水本寛基，牛山克巳，長谷川理，荒木仁志：石狩川流域 湿地・水辺・海岸ネットワーク設立記念フォーラム，札幌（2017）
「環境 DNA を用いた石狩川流域の生物多様性評価」
- 29) 荒木仁志：第五回流域環境研究会，札幌（2017）

「環境 DNA を用いた水圏生物研究」

- 30) H. Araki: Japan-Taiwan Ecology Workshop, Kyoto (2016)
“Environmental DNA analysis for identifying multiple species: A scoop of water for biodiversity?”
- 31) 荒木仁志: 第 17 回日本進化学会, 東京 (2016)
「環境 DNA を用いた生物フロンティアの開拓」
- 32) 荒木仁志: ゲノム多様性ワークショップ, 札幌 (2016)
「環境 DNA を用いた水圏動物研究: 現状と課題」
- 33) 荒木仁志: 第 38 回魚類系統研究会, 苫小牧 (2016)
「フィールドリサーチツールとしての環境DNA研究」
- 34) H. Mizumoto: 32nd Annual meeting of the Society of Population Ecology, Sapporo (2016)
- 35) “A challenge for developing the system that aimed to detect distribution and quantify biomass of endangered species Itou (*Parahucho perryi*) simultaneously by using eDNA technique”

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) イトウシンポジウム (主催: 猿払イトウ保全協議会、2018年5月6日、猿払村役場、観客約80名) にて講演
- 2) 市民フォーラム2018 (主催: 札幌ワイルドサーモンプロジェクト、2018年1月27日、エルプラザ、観客約120名) にて講演
- 3) エコカフェ (主催: たきかわ環境フォーラム、2017年10月1日、滝川地区地域防災施設、聴講者約30名) にて講演
- 4) 市民講座「あぐり大学」 (主催: 北海道大学農学部、北海道新聞、2017年9月30日、水産研究・教育機構、聴講者約50名) にて講演、特別授業
- 5) サイエンスカフェ「環境DNAって、何？」 (主催: 海と日本PROJECT、2017年7月22日、函館市国際水産海洋研究センター、聴講者約50名) にて講演、特別授業
- 6) 一般市民講座・第36回時計台サロン (主催: 北海道大学農学部、北海道新聞、2017年2月14日、札幌時計台 2F、聴講者約80名) にて講演
- 7) 北海道区水産研究所千歳事業所 業務打合せ会議 (主催: 水産研究・教育機構、2016年9月8日、千歳さけます事業所、聴講者約40名) にて講演
- 8) 札幌市立札幌開成中等教育学校における特別授業「サケ学入門」 (2016年11月18日、聴講者約20名)
- 9) さーもん・かふえ2016 (主催: 「さーもん・かふえ実行委員会」、2016年7月1日、エスポワールいわて、聴講者約80名) にて講演

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 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, 7, 150088 (2015), MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species.
- 2) M. Miya, T. Minamoto, H. Yamanaka, S. I. Oka, K. Sato, S. Yamamoto, T. Sado, and H. Doi: Journal of Visualized Experiments, (117), e54741. (2016), Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA.
- 3) Y. Sato, M. Miya, T. Fukunaga, T. Sado, and W. Iwasaki: Molecular Biology and Evolution, 35, 6, 1553–1555 (2018), MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding.
- 4) H. Mizumoto, H. Urabe, T. Kanbe, M. Fukushima, and H. Araki: Limnology, 19(2), 219–227. (2018), Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid.
- 5) P. S. Rand, and M. Fukushima: Global Ecological Conservation, 2: 214–225. (2014), Estimating the size of the spawning population and evaluating environmental controls on migration for a critically endangered Asian salmonid, Sakhalin taimen.
- 6) H. Tsukagoshi, S. Terui, and S. Abe: Conservation Genetics Resources, 7(1), 173–175. (2015), Characterization of sixteen polymorphic microsatellite DNA loci in the chum salmon (*Oncorhynchus keta*) isolated by next-generation sequencing.
- 7) R Core Team: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available via: <http://www.R-project.org>. (2018), R: A language and environment for statistical computing.
- 8) M. P. Cox, D. A. Peterson, and P. J. Biggs: BMC bioinformatics, 11(1), 485. (2010), SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data.
- 9) R. Schmieder, Y. W. Lim, F. Rohwer, and R. Edwards: BMC Bioinformatics, 11, 341. (2010), TagCleaner: Identification and removal of tag sequences from genomic and metagenomic datasets.
- 10) T. Magoč, and S. L. Salzberg: Bioinformatics, 27(21), 2957–2963. (2011), FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies.
- 11) N. Takezaki, M. Nei, and K. Tamura: Molecular Biological Evolution, 27:747–752. (2010), POPTREE2: software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface.
- 12) M. Nei, F. Tajima, and Y. Tatenno: Journal of molecular evolution, 19(2), 153–170. (1983), Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data.

II-8 核DNAマーカーを用いた個体群の遺伝的構造の解析

大阪大谷大学 薬学部

助教・内井 喜美子

平成28～30年度累計予算額：4,388千円

(うち平成28年度：2,106千円、平成29年度：1,170千円、平成30年度：1,112千円)

累計予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

環境DNA分析は特定の種や分類群の分布を迅速に推定する手法として急速な発展を遂げている。しかし、個体群の遺伝的構造や遺伝的多様性を推定するために、種内変異の定量的な検出に環境DNA分析を適用した事例は未だ極めて限定的である。本研究ではコイをモデル生物とし、在来コイと外来コイを区別する一塩基の変異（一塩基多型）を指標として用いることにより、個体群遺伝構造を迅速に推定する環境DNA手法の開発を行った。環境DNA分析において従来より標的とされてきたミトコンドリアDNAマーカーは母由来の遺伝情報しか反映しないという欠点があるため、本研究では、標的をミトコンドリアDNAから核DNAへと拡張することにより、両親の遺伝情報を反映する個体群遺伝構造の推定を試みた。本目的を達成するために、まず、核における有用多型マーカーの多くがシングルコピーDNAである点に着目し、検出が極めて困難と予測される核シングルコピーDNAを環境DNAから検出する方策を検討したところ、繁殖期に繁殖地において水試料を得ることにより、定量分析が可能な濃度の環境DNAサンプルを得られることが明らかとなった。さらに、希薄なDNAを用いた定量的解析において、結果の信頼性を大きく損なわせるPCR阻害の問題を解決するために、環境DNAサンプルに混入するPCR阻害物質への抵抗性に優れたPCR検出系について検討を行ったところ、特定のPCR反応試薬を用いることによりPCR阻害作用が大幅に軽減されることを見出した。これら2点の検討結果を踏まえ、核遺伝子座における一塩基多型のアレル頻度を定量的に解析するリアルタイムPCR法を開発し、さらに開発したアレル頻度定量法を用いた環境DNA分析を野外において実践した。その結果、環境DNA分析により推定された在来遺伝子と外来遺伝子のアレル頻度は、捕獲したコイ個体における分析結果とよく一致し、核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による個体群遺伝構造解析が野外において十分実施可能であることが実証

された。本成果は、生物多様性保全における難題である、同種の外来遺伝子型の侵入や個体群縮小による遺伝的多様性の低下といった問題について、迅速かつ広汎な調査を可能とする有用な手段として活用されることが期待される。

[キーワード]

一塩基多型、遺伝子型、核DNAマーカー、シングルコピーDNA、種内変異

1. はじめに

環境DNA分析は、特定の種や分類群の分布を迅速に推定する手法として急速な発展を遂げる一方¹⁾²⁾³⁾、その種内変異の検出への適用は、本サブテーマ代表者による2例を含む3例が報告されるのみである⁴⁾⁵⁾⁶⁾。したがって現状では、個体群遺伝構造の評価手法としての環境DNA分析法の開発は極めて限定的であるといえる。しかし遺伝情報に基づいた種判別を基礎とする環境DNA分析は、種内変異の検出においてこそ大きな力を発揮すると考えられる。なぜなら、種内において遺伝的に異なる集団、すなわち遺伝子型を異にする集団は、形態に基づく正確な識別が困難であることが多いため、従来の個体毎の分析においても遺伝分析により遺伝子型の判別が行われてきたからである。つまり、捕獲に加え個体毎の遺伝分析を必要とする点で大きな労力が費やされてきた個体群遺伝構造解析が、環境DNA分析の適用により飛躍的に簡便化されることが見込まれる。環境DNA分析による個体群遺伝構造解析が実現すれば、生物多様性保全における難題である、同種の外来遺伝子型の侵入や個体群縮小による遺伝的多様性の低下といった現象を、低コストで迅速かつ広汎に観測することのできる有用ツールとして広く活用されることが期待される。

環境DNA分析を種内変異の検出に適用した研究3例では、ミトコンドリアDNAにおける変異が標的とされてきた⁴⁾⁵⁾⁶⁾。その主たる理由は、一つの体細胞内に複数コピー（～数千コピー）存在するミトコンドリアDNAを標的とすることにより、DNA濃度の希薄な環境水からの検出確率を向上させるためであった。しかし、種内変異を検出する上で、ミトコンドリアDNAには母性遺伝をするという大きな欠点がある。すなわち、有性生殖をする個体群の遺伝的構造を評価する上で、母親由来の遺伝情報しか得られないという問題が発生する。したがって、個体群の遺伝的構造や遺伝的多様性を評価するためには、両親の遺伝情報を反映する核DNAにおける変異を標的とすることが望まれる。

核DNAを標的とした環境DNA分析を実用化するためには、まず2つの大きな課題を克服しなければならない。一つ目の課題は、種内変異の検出に用いられる核DNAマーカーのほとんどが、ゲノムに1セットしか存在しないシングルコピーDNAであることだ。シングルコピーDNAは、ミトコンドリアDNAのような一細胞に複数コピー存在するDNAに比べ、環境DNAからの検出が極めて困難になると予測される。したがって、まず、環境DNA分析においてシングルコピーDNAを検出する方策を確立する必要がある。二つ目の課題は、PCRにおける増幅阻害作用である。従来のミトコンドリアDNAマーカーに比べ、その濃度が極めて希薄と考えられる核DNAマーカーを検出するには、環境水から環境DNAを回収する際に濃縮率を高くすべきであるが、それに伴い混入するPCR阻害物質の濃度も増加することが予測される。PCR阻害が引き起こされると、標的DNAが存在しても非検出となったり、標的DNAの量が実際よりも過小評価されることにより、分析の信頼性が損なわれてしまう。そこで、PCR阻害作用を受けにくい検出システムを確立することが肝要となる。

本サブテーマでは、まず前段の二つの課題（希薄な核シングルコピーDNAの検出、PCR阻害作用の緩和）を解決した上で、個体群遺伝構造の迅速評価法として、核DNA上の種内変異を特異的に検出・定量する環境DNA分析手法の開発を行うことを目的とした。種内変異を区別する目印としては、ゲノム上に最も豊富に存在するため、遺伝的に近縁な生物を判別するマーカーとして有用性が高い、一塩基多型（一塩基の変異）マーカーを採用した。一塩基多型マーカーを用いれば、標的とするDNA配列長を短く設計できるため、劣化により

断片化した状態で存在する環境DNA⁷⁾において、標的DNAの検出率が向上する効果も期待される。また手法開発の材料としては、コイ (*Cyprinus carpio*) を用いた。日本のコイ個体群には、古来より日本に自生する日本在来コイと、遅くとも100年ほど前よりユーラシア大陸から人為導入された外来コイが存在し⁸⁾⁹⁾、在来コイと外来コイの間では交雑が起こっている¹⁰⁾。このような交雑集団において、外来遺伝子型の侵入レベルを評価するためには、母由来の情報しか反映しないミトコンドリアDNAマーカーではなく、両親の遺伝情報を反映する核DNAマーカーにより個体群遺伝構造を明らかとすることが重要である。在来コイと外来コイの間には、核DNAの複数の遺伝子座において一塩基多型が存在することが知られるため¹¹⁾、この既存情報を利用し、複数の核遺伝子座における在来遺伝子型と外来遺伝子型の頻度を指標とした個体群遺伝構造の解析を可能とする環境DNA手法の開発を進めた。

2. 研究開発目的

本サブテーマでは、日本における在来コイと外来コイの交雑個体群を材料とし、個体群遺伝構造を評価するための核DNAマーカーを用いた環境DNA分析手法を開発することを目的とした。そのために、以下の4つの研究目的を設定した。まず、(1) 環境からの核シングルコピーDNAの効率的な検出方策の確立と、(2) 環境DNAサンプルに混入するPCR阻害物質によるPCR阻害の影響を受けにくいリアルタイムPCR検出系の確立を目指し、研究開発を行なった。その上で、在来コイと外来コイの交雑個体群における遺伝構造解析を行うために、(3) 複数の核遺伝子座における在来遺伝子と外来遺伝子のアレル頻度を定量的に解析する分析手法の開発を行い、さらに、(4) 核DNAマーカーを用いた環境DNA手法の実用化を見据え、開発した分析手法の野外適用により交雑個体群における在来遺伝子と外来遺伝子のアレル頻度推定を試みた。

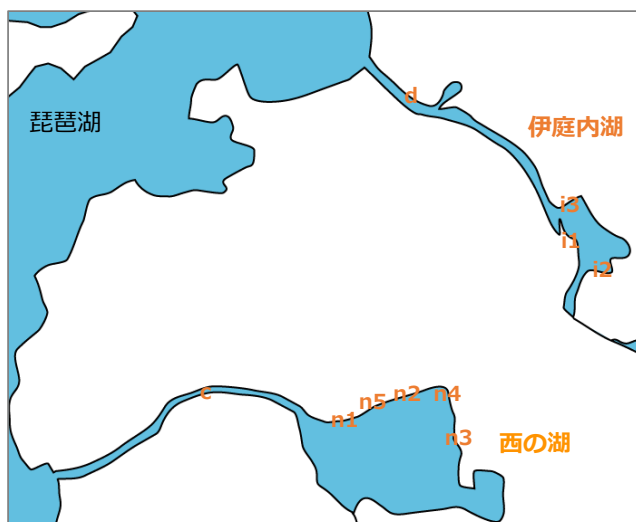
3. 研究開発方法

(1) 開発手法の野外適用に向けた検討1：野外における核シングルコピーDNAの検出方策

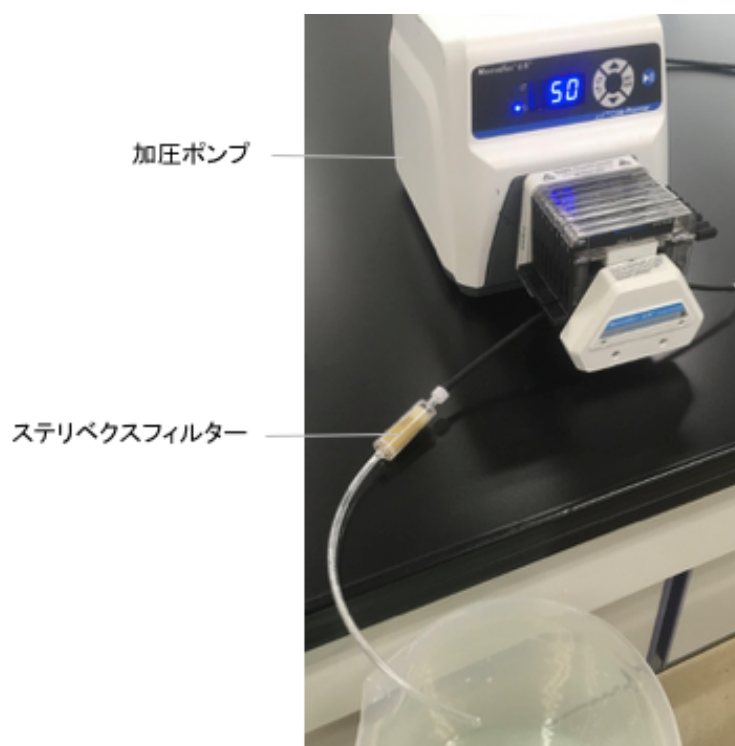
従来のミトコンドリアDNAマーカーと比べ、環境水中における核シングルコピーDNAの濃度は希薄であると予測される。そこで、野外における核シングルコピーDNA濃度とミトコンドリアDNA濃度を2017年3月から2018年4月までの1年を通してモニタリングすることにより、環境DNA分析における核DNAマーカーの実用可能性について検討した。調査地は、図(8)-1に示す通り、琵琶湖水系に属する2つの水域、伊庭内湖および西の湖とした。各サンプリング地点(ただしn4、n5を除く)において、3度の採水により集めた環境水1Lを、現場で加圧ポンプを用いてステリベクスフィルター(0.45 μm, cat no. SVHV010RS)上にろ過した(図(8)-2)。サンプリング中のコンタミネーションの有無を確認するために、各サンプリング日の最後に必ず水1Lを同様の方法でステリベクスフィルターにろ過した。ステリベクスフィルターは、ろ過終了後すぐにドライアイス中で冷凍保存し、実験室に持ち帰った後は-25℃にて保存した。ステリベクスフィルターからのDNA抽出は、Miya et al. (2016)¹²⁾の方法に従い、DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN)を用いて行った。ただし、抽出の最終段階のDNA溶出のステップにおいて溶出液の量を50 μLに減らすことにより、より濃縮率の高い環境DNAサンプルを得た。

モデル材料として用いたコイのミトコンドリアDNAと核シングルコピーDNAの濃度をTaqManリアルタイムPCRにより定量した。ミトコンドリアDNAとしてシトクロム*b*遺伝子を、核シングルコピーDNAとしてグルコキナーゼ遺伝子をターゲットとした。反応に用いたコイに特異的なプライマーとTaqManプローブのDNA塩基配列は表(8)-1に示す通りである。シトクロム*b*遺伝子を標的としたTaqManリアルタイムPCRの反応組成は、1x TaqPath qPCR Master Mix, GC (ThermoFisher Scientific)、各プライマー濃度200 nM、プローブ濃度125 nM、テンプレートDNA量1 μL、トータル反応量20 μLとし、50℃ 2分、95℃ 10分のステップの後、

95℃ 15秒 - 60℃ 1分の温度サイクルを40回繰り返した。グルコキナーゼ遺伝子を標的としたTaqManリアルタイムPCRの反応組成は、1x TaqPath qPCR Master Mix, GC、各プライマー濃度 900 nM、プローブ濃度 125 nM、テンプレートDNA量 2 μ L、トータル反応量 20 μ L とし、50℃ 2分、95℃ 20秒のステップの後、95℃ 1秒 - 60℃ 20秒の温度サイクルを45回繰り返した。リアルタイムPCR分析はStepOne PlusリアルタイムPCRシステム (ThermoFisher Scientific)を用いて行い、検量線作成のための標準DNAとPCR反応液調整時のコンタミネーション確認のためのPCRブランクを必ずサンプルと同時に分析した。サンプル、標準DNA、ブランクの全ての反応は3繰り返しで行った。



図(8)-1 伊庭内湖および西の湖における水試料のサンプリング地点



図(8)-2 加圧ポンプを用いたステリベクスフィルターへの環境水のろ過

表(8)-1 シトクロム*b*遺伝子とグルコキナーゼ遺伝子の検出に用いたプライマー・プローブの塩基配列

標的遺伝子	プライマー、プローブ	DNA 塩基配列 (5'-3')	引用
シトクロム <i>b</i>	CpCyB_496F	GGTGGTTCTCAGTAGACAATGC	Takahara et al. (2012) ¹³⁾
	CpCyB_573R	GGCGGCAATAACAAATGGTAGT	
	CpCyB_550P	FAM-CACTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTCC-TAMRA	
グルコキナーゼ	Gluc-F	AGGAGCTTTTGAAACTCGCTTTGT	本研究
	Gluc-R	TCTTGTGTCATTTTGCTTCTCAAGCT	
	Gluc-P	FAM-CTCCCAGATTGAGAGGTATGGCTGATGA-TAMRA	

(2) 開発手法の野外適用に向けた検討2：PCR阻害耐性の強いリアルタイムPCR検出系の確立

環境DNAサンプルに含まれるDNAは低濃度であることが多い。特に、本サブテーマで標的とする核シングルコピーDNAは、従来のミトコンドリアDNAマーカーに比べその濃度が極めて低いと予測される。このような低濃度のDNAサンプルにおけるDNA量をリアルタイムPCRにより定量的に解析する時、PCR阻害が起こると定量結果の信頼性が著しく損なわれるため、PCR阻害耐性に優れたリアルタイムPCR系の確立が重要となる。従来は、DNA抽出液を精製したり、PCR反応に用いるDNAテンプレート量を減らすことにより、PCR阻害作用の緩和が行われてきたが、近年は、PCR阻害耐性を向上させた様々なPCR試薬が入手可能となっており、これらを利用することにより、簡便にPCR阻害作用を緩和できる可能性がある。そこで、環境DNA分析に最適なPCR試薬を決定するために、PCR阻害物質に対する耐性を複数のPCR試薬間で比較した。

リアルタイムPCRにおける阻害作用は、阻害物質を含む反応と含まない反応の間でのThreshold Cycle数の差 ($\Delta Ct = Ct_{[阻害物質あり]} - Ct_{[阻害物質なし]}$) により判定した。 ΔCt 値が大きいほど、PCR阻害の影響が強いことを示す。各反応におけるCtは、自然界に存在しないルシフェラーゼ遺伝子由来cDNAを標的としたリアルタイムPCR (フォワードプライマー：5'-GGAAGTTCACCGCGTCAT-3'、リバースプライマー：5'-GGAAGTTCACCGCGTCAT-3'、TaqManプローブ：5'-HEX-CGGGCGTGGCAGGTCTCCC-TAMRA-3') により測定した。まず、主要なPCR阻害物質として知られるフミン酸、フルボ酸、タンニン酸に対する耐性を検証するため、TaqMan Gene Expression Master Mix (略記：GMM、Thermo Fisher Scientific)、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (略記：EMM、Thermo Fisher Scientific)、TaqPath qPCR Master Mix, CG (略記：TMM、Thermo Fisher Scientific)、KAPA3G Plant PCR Kit (略記：K3G、KAPA Biosystems)の4種類の試薬間で ΔCt 値を比較した。次に、環境由来の様々な阻害物質により複合的に引き起こされるPCR阻害作用に対する耐性を検証するため、前述の比較実験によりPCR阻害耐性が認められた3つの試薬 (EMM、TMM、K3G) を用い、先行実験によりPCR阻害作用を有することが確認された環境DNAサンプルを用いたスパイク実験を行なった。多様なPCR阻害物質に対する耐性に優れた試薬を選定するため、河川、湖、ため池、水田、水中堆積物、陸上土壌という様々な環境より採取された環境DNAサンプルをスパイク実験に供した。

(3) 核DNAの一塩基多型マーカーに基づくアレル頻度定量法の開発

本サブテーマ代表者の先行研究⁵⁾により、RNA分解酵素HとDNA-RNA-DNAプローブを用いたリアルタイムPCR (Cleave PCR) を用いることにより、ミトコンドリアDNA上の一塩基多型に基づいてコイの在来遺伝子型と外来遺伝子型を高感度に判別した上で、2者の頻度を定量的に解析できることが実証されている。Cleave PCRとは、一塩基多型を示す塩基またはその近傍の塩基をRNAに置き換えたDNA-RNA-DNAプローブが標的DNAとハイブリッドを形成すると、RNA分解酵素HがハイブリッドのRNA部分を切断するというメカニズムを利用し、一塩基の変異を高感度に識別することを可能としたリアルタイムPCRである。本研究では、既報の核DNA上の一塩基多型情報に基づき¹¹⁾、在来遺伝子型と外来遺伝子型それぞれに特異的なDNA-RNA-DNAプロ

ープと、プローブ配列を含むDNA断片を増幅するコイ特異的なプライマーセットを設計し、CycleavePCR Reaction Mix (TaKaRa Bio) を反応試薬とするリアルタイムPCRによるアレル頻度定量法を開発した。Cycleave PCRを用いたアレル頻度定量法の正確性の検討は、在来および外来遺伝子型由来のDNAを異なる比率で混合したDNA溶液を鋳型としてリアルタイムPCRを行ない、DNA比（在来DNAコピー数/外来DNAコピー数）と ΔCt 値（ $Ct_{\text{外来プローブ}} - Ct_{\text{在来プローブ}}$ ）の相関関係を確認することにより行なった。また、在来コイと外来コイを異なるバイオマス比（在来/外来 = 0.1、0.2、0.7、1.7、4.0、9.8）で飼育した水槽の水から抽出した環境DNAサンプルを分析に供し、定量されたDNA比からバイオマス比を正しく推定できるかを確認した。

さらに、リアルタイムPCRを用いた一塩基多型に基づくアレル頻度定量法を、よりPCR阻害物質への耐性の高い分析法へと改良するために、(2)の研究により優れたPCR阻害物質耐性を示すことが分かったTaqPath qPCR Master Mix, GC (TMM) を用いる手法の開発を行った。TMMをリアルタイムPCRの反応試薬として用いるため、一塩基多型に基づく標的遺伝子の検出にはTaqMan MGBプローブを採用した。TaqMan MGBプローブとは、MGB (Minor Groove Binder) 構造によりプローブ配列長を短くすることにより、プローブ中の一塩基の違いによる T_m 値（二本鎖DNAの50%が解離して一本鎖になる温度）の差が顕著に現れるようにしたプローブである。したがって、Cycleave PCRと同様に一塩基の違いを高感度に判別することができると考えられる。既報の核DNA上の一塩基多型情報に基づき¹¹⁾、在来遺伝子型と外来遺伝子型それぞれに特異的なTaqMan MGBプローブと、プローブ配列を含むDNA断片を増幅するコイ特異的なプライマーセットを設計した上で、TMMを反応試薬とするリアルタイムPCR法を開発した。

(4) 野外交雑個体群におけるアレル頻度の推定

図(8)-1に示す伊庭内湖および西の湖を調査地とし、(3)で開発した核DNAマーカのアレル頻度定量法を用いた環境DNA分析を実施した。下記の結果及び考察(1)で述べる通り、環境水中における核シングルコピーDNA濃度は、コイの繁殖期である春季に急激に上昇することが明らかとなった。そこで繁殖期に合わせて採水を行うことにより、核DNAマーカを用いたアレル頻度の定量的解析が実施可能な濃度の環境DNAサンプルを得た。これらの環境DNAサンプルを用い、(3)において開発したCycleave PCR法およびTaqMan MGBプローブリアルタイムPCR法により、核遺伝子座における在来遺伝子および外来遺伝子のアレル頻度を定量した。また、一部のサンプルについて、従来のミトコンドリアDNAマーカを用いたアレル頻度解析を実施し、核DNAマーカとの比較を行なった。分析は1サンプル毎に3繰り返しにて行った。

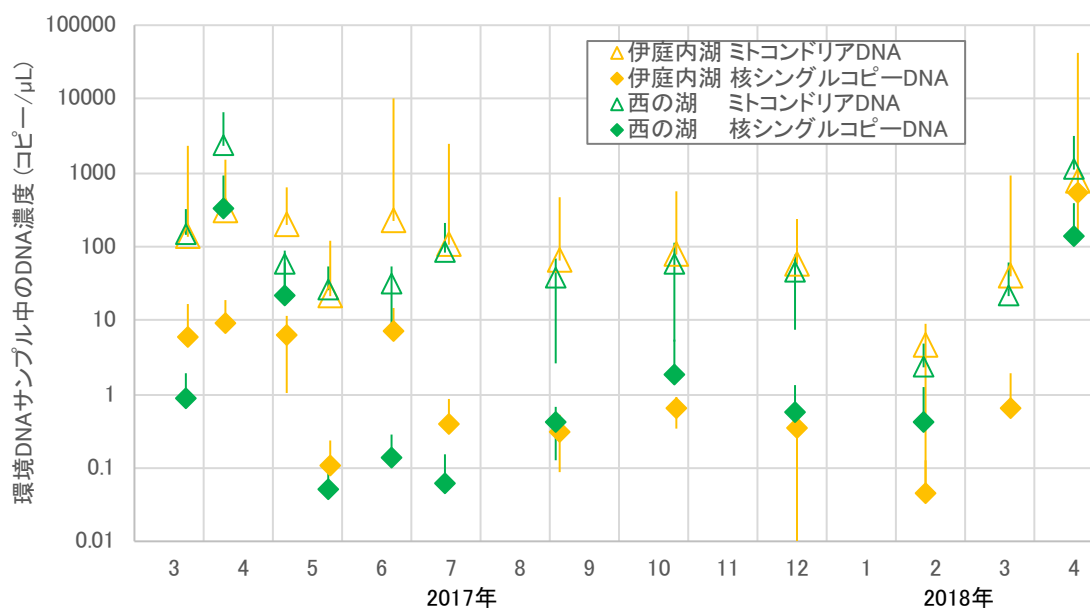
4. 結果及び考察

(1) 開発手法の野外適用に向けた検討1：野外における核シングルコピーDNAの検出方策

図(8)-3に、ミトコンドリアDNA濃度および核シングルコピーDNA濃度の一年を通じた季節変動を示す。核シングルコピーDNA濃度は、ミトコンドリアDNA濃度の1/100倍ほどと非常に希薄であることが明らかとなった。とくに、6月から翌3月にかけては、環境DNAサンプルにおける核シングルコピーDNA濃度が1（コピー/ μL ）を下回るが多く、定量的な解析を実施するレベルに達しなかった。一方、2017年4月と2018年4月には、核シングルコピーDNA濃度が100（コピー/ μL ）を上回る環境DNAサンプルが得られた。伊庭内湖および西の湖は、コイを始めとした多くの魚種の産卵場として重要な生息地である。コイの繁殖期は、例年3月下旬より5月上旬であり、とくに4月には繁殖のため多数のコイが浅い岸边に集まる（図(8)-4）。つまり、繁殖のために集団化したコイから放出された粘液、細胞片、精子などにより、濃度の高い環境DNAサンプルが得られたと考えられる。そこで、本サブテーマの目的(4)である、環境DNA分析による野外交雑個体群におけるアレル頻度の推定は、繁殖地において繁殖期の環境DNAサンプルを得るという方策に則り行うこととした。

本検討により、核シングルコピーDNAを環境DNAより検出することは非常に困難であるが、繁殖地において

繁殖期にタイミングを合わせて水試料を採取することにより、核シングルコピーDNAを標的とした定量的解析を実施可能な高濃度の環境DNAサンプルを得られることが明らかとなった。本研究の材料としたコイに限らず、体外受精を行う多くの水生生物は繁殖のために集団化することが知られる。したがって、繁殖期に繁殖地において環境DNAを捕集するという核シングルコピーDNAの検出策は、多くの水生生物種に普遍的に適用できると考えられる。これは、これまで困難と考えられてきた核DNAマーカーを用いた環境DNA分析の実用化への道を拓く重要な成果である。



図(8)-3 伊庭内湖および西の湖におけるミトコンドリアDNA濃度と核シングルコピーDNA濃度の季節変動。縦軸は、水1 Lから環境DNAサンプル50 μ Lを得た場合のDNA濃度である。各水域内のサンプリング地点の平均 \pm 1標準偏差で示す。

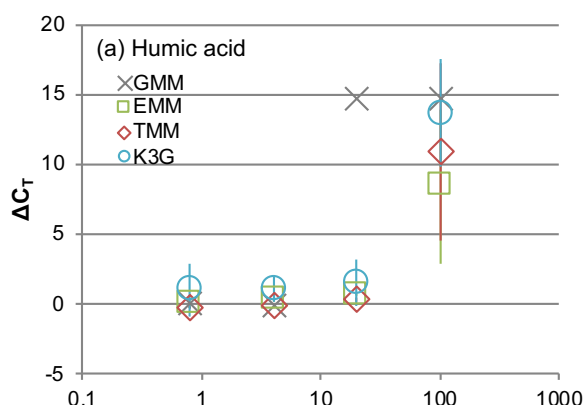


図(8)-4 西の湖において観察されたコイの繁殖行動。ヨシやマコモの茂る岸边に多数のコイが集まり、産卵・放精を行っていた。

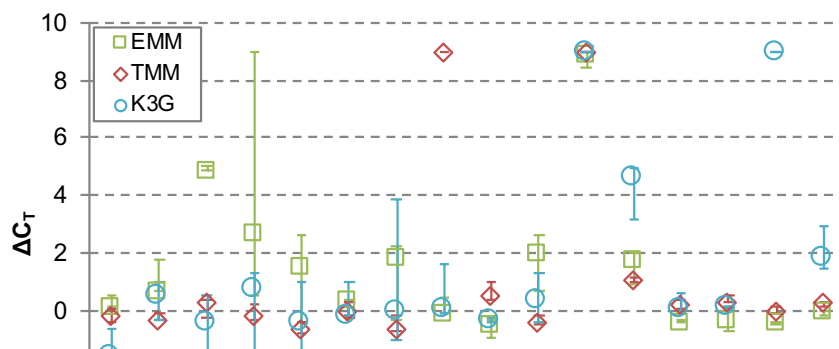
(2) 開発手法の野外適用に向けた検討2：PCR阻害耐性の強いリアルタイムPCR検出系の確立

主要なPCR阻害物質であるフミン酸、フルボ酸、タンニン酸に対する耐性を4種類のPCR試薬間で比較したところ、従来の環境DNA研究において頻繁に使用されてきたTaqMan Gene Expression Master Mix (GMM) はフミン酸とタンニン酸への耐性に劣る一方、TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (EMM) はフミン酸とタンニン酸に対し、TaqPath qPCR Master Mix, CG (TMM) はフミン酸とフルボ酸に対し、KAPA3G Plant PCR Kit (K3G) はフルボ酸とタンニン酸に対し、高い耐性を持つことが明らかとなった(図(8)-5)。次に、GMMに比べて高いPCR阻害耐性を持つことが確認されたEMM、TMM、K3Gを用い、環境DNAサンプルを用いたスパイク実験を行なったところ、TMMをリアルタイムPCR反応試薬として用いた場合、2サンプル(Pond 3-1、Sediment 1)を除くすべての環境DNAサンプルにおいて ΔCt はゼロに近い値を示し(図(8)-6)、PCR阻害が起こっていないことが確認された。一方、EMMおよびK3Gを反応試薬として用いた場合は、半数以上の環境DNAサンプルにおいて阻害作用が緩和されていたものの、 ΔCt 値が2以上を示す環境DNAサンプルの数がTMMに比べて多いことが明らかとなった(図(8)-6)。以上の結果より、TMMをリアルタイムPCR反応試薬として用いることにより、環境DNAサンプルに混入するPCR阻害物質によるPCR増幅阻害の影響を大幅に軽減できることが明らかとなった。リアルタイムPCRを用いる定量的な環境DNA分析において、PCR阻害作用の緩和は、精度の高い分析結果を得るために非常に重要である。そこで、本サブテーマの目的とする核DNAの一塩基多型マーカーに基づくアレル頻度定量法の開発においても、TMMを用いた定量的リアルタイムPCR系の確立を目指すこととした。

リアルタイムPCRは、環境DNA分析において最も頻繁に用いられる分析手法である。したがって、本検討により確立されたPCR阻害物質への抵抗性の高いリアルタイムPCR検出系は、より精度の高い環境DNA分析の実現に向けた重要な知見となると考えられる。



図(8)-5 4種類の試薬間での、フミン酸(a)、フルボ酸(b)、タンニン酸(c)によるPCR阻害への耐性の比較。横軸は各阻害物質の濃度、縦軸は ΔC_t 値である。 ΔC_t 値は、3繰り返し平均をシンボルで、1標準偏差を縦棒で示す。本図は Uchii et al. (under review) より引用した。

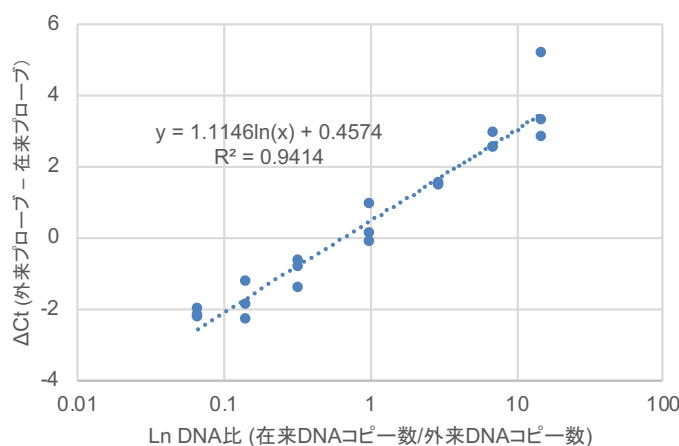


図(8)-6 様々な環境より得た環境DNAサンプルが引き起こすPCR阻害効果の試薬間比較。3繰り返しの中央値をシンボルで、最小値と最大値を縦棒で示す。本図は Uchii et al. (under review) より引用した。

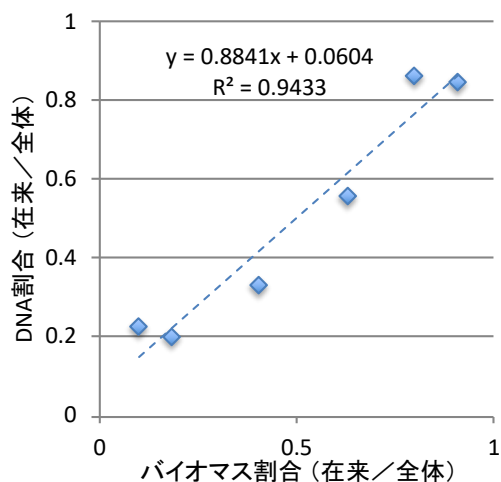
(3) 核DNAの一塩基多型マーカーに基づくアレル頻度定量法の開発

Cycleave PCR法

先行研究¹¹⁾により報告された、コイの核DNAにおいて在来遺伝子型と外来遺伝子型が一塩基多型を示す遺伝子座のうち、c25遺伝子座についてCycleave PCRによるアレル頻度定量法を開発した。図(8)-7にc25遺伝子座を標的としたCycleave PCRの定量性を示す。既知の在来DNA/外来DNA比と、在来DNAおよび外来DNAそれぞれに特異的なプローブより得られた増幅シグナルの差 (ΔCt) の間には高い相関が得られた。これは、在来DNA (または外来DNA) が7%以上存在すれば、在来DNA/外来DNA比を正確に定量できることを示す。また、在来コイと外来コイを異なるバイオマス割合で飼育した水槽の水より抽出した環境DNAサンプルにおける在来DNA/外来DNA比をCycleave PCRにより定量したところ、Cycleave PCRにより推定された在来DNAの割合と、水槽に実際に投入した在来コイのバイオマスの割合は、ほぼ1 : 1の関係を示した (図(8)-8)。



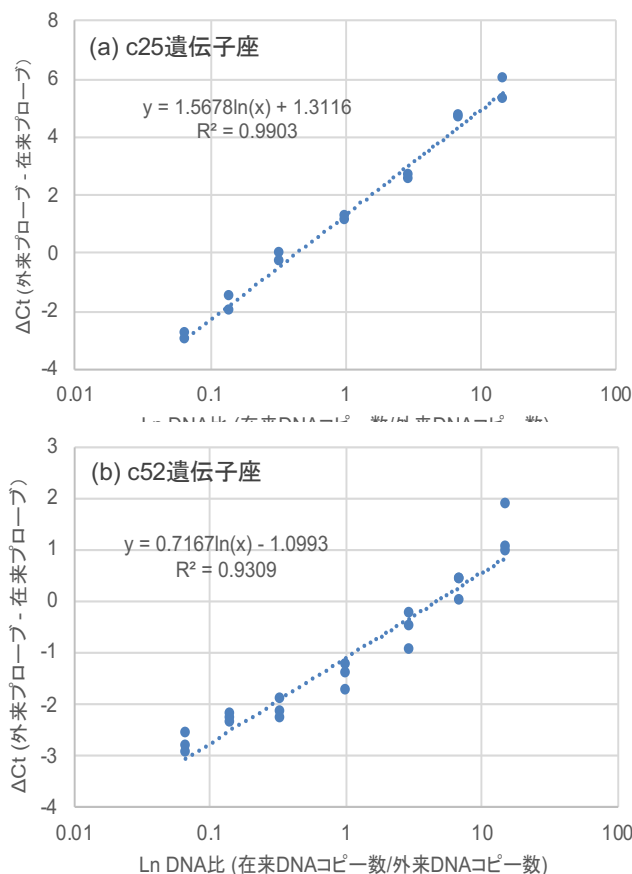
図(8)-7 核DNAマーカー (c25遺伝子座) を標的としたCycleave PCRにより得られた ΔCt ($Ct_{\text{外来プローブ}} - Ct_{\text{在来プローブ}}$) と実際のDNA比の関係



図(8)-8 核DNAマーカー (c25遺伝子座) を用いた環境DNA分析により定量された在来遺伝子型の割合と在来コイの実際のバイオマスの割合の関係

TaqMan MGBプローブリアルタイムPCR法

c25遺伝子座とc52遺伝子座¹¹⁾について、一塩基多型検出プローブとしてTaqMan MGBプローブを、PCR反応試薬としてPCR阻害耐性に優れたTaqPath qPCR Master Mix, GCを用いたアレル頻度定量法を開発した。図(8)-9にc25遺伝子座およびc52遺伝子座を標的としたTaqMan MGBプローブリアルタイムPCRの定量性を示す。既知の在来DNA/外来DNA比と、在来DNAおよび外来DNAそれぞれに特異的なプローブより得られた増幅シグナルの差 (ΔCt) の間には高い相関が得られ、在来DNAと外来DNAのどちらかが全体の7%以上存在すれば、DNA比を正確に定量できることが分かった。

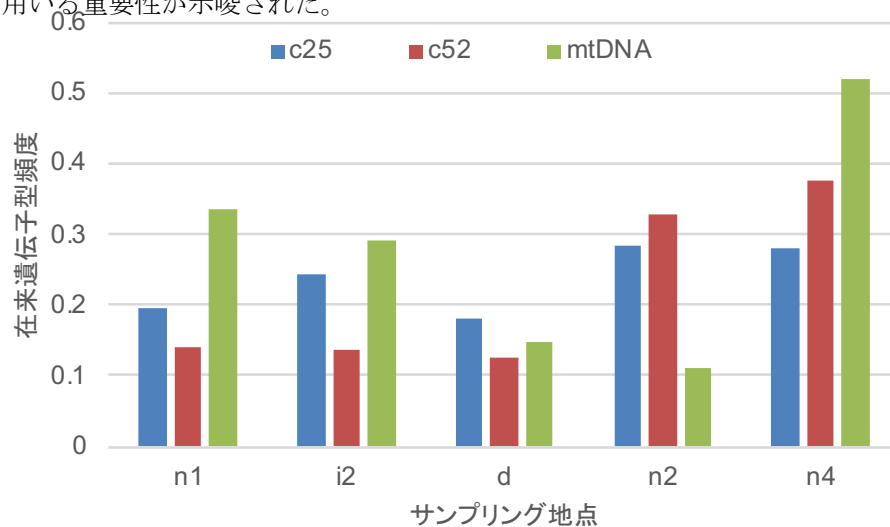


図(8)-9 核DNAマーカーを標的としたTaqMan MGBプローブリアルタイムPCRにより得られた ΔCt と実際のDNA比の関係。c25遺伝子座 (a) およびc52遺伝子座 (b) について示す。

(4) 野外交雑個体群におけるアレル頻度の推定

伊庭内湖および西の湖においてコイの繁殖期である4月に採取した環境DNAサンプルを、(3)で開発したCycleave PCR法およびTaqMan MGBプローブリアルタイムPCRにより分析した。すると、同一サンプルの3繰り返し ΔCt 値は、TaqMan MGBプローブリアルタイムPCR法に比べ、Cycleave PCR法を用いた場合において顕著に大きなばらつきを示し、またCycleave PCR法では増幅が見られないサンプルも存在した。これは、Cycleave PCR法が環境DNAサンプルに混入するPCR阻害物質による影響を受けやすいためと推測された。したがって、開発手法の野外適用に際しては、より信頼性の高い推定値をもたらすと考えられるTaqMan MGBプローブリアルタイムPCRを採用することに決定した。

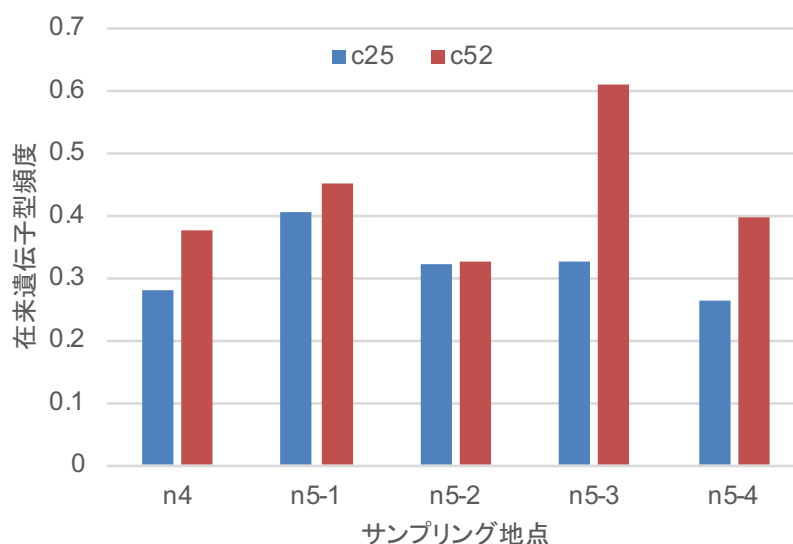
図(8)-10に、繁殖地において繁殖期に採取した環境DNAサンプルを用い、TaqMan MGBプローブリアルタイムPCRにより推定された核遺伝子座 (c25、c52) における在来遺伝子型頻度、および先行研究⁵⁾により開発された手法を用いたミトコンドリアDNAマーカーにおける在来遺伝子型頻度を示す。核DNAのc25マーカーとc52マーカーは、どの地点においても比較的似た在来遺伝子型頻度を示したのに対し、ミトコンドリアDNAマーカーにおける在来遺伝子型頻度は、いくつかの地点 (n1、n2) において核DNAマーカーとは大きく異なる推定値を示した。これは、母性遺伝をするミトコンドリアDNAと両性遺伝をする核DNAとの間の遺伝様式の違いを反映したからと考えられた。したがって、個体群遺伝構造解析には、両親の遺伝情報を評価できる核DNAをマーカーとして用いる重要性が示唆された。



図(8)-10 核DNAマーカーおよびミトコンドリアDNAマーカーを標的とした環境DNA分析により推定された在来遺伝子型頻度。サンプリング地点は図(8)-1に示す。n1は4月上旬に、i2~n4は4月下旬に採取されたサンプルである。

図(8)-11に、西の湖においてコイが繁殖行動を行なっている際に採取した環境DNAサンプルを用いたTaqMan MGBプローブリアルタイムPCRにより推定された核遺伝子座における在来遺伝子型の頻度を示す。地点n5において30~40メートル間隔で採取した4つのサブサンプルn5-1~n5-4における在来遺伝子型頻度は、c52遺伝子座において比較的大きなばらつき (変動係数27%) を示した。これは、繁殖のために対象生物が密集しているような状況においては、水媒体による拡散効果が十分に働かず、局所的に特定の個体由来のDNAが集積する可能性を示唆するものである。一方、4つのサブサンプルから推定された在来遺伝子型頻度を平

均すると、c25遺伝子座については33%、c52遺伝子座については45%という推定値が得られた。これらの平均推定値は、西の湖において捕獲したコイ個体の遺伝分析より得られた在来遺伝子型頻度（c25遺伝子座において33%、c52遺伝子座において41%¹⁴⁾）と非常によく一致した。したがって、核DNAマーカーを用いた環境DNA分析を野外において実践する際には、地点毎に複数のサブサンプルを採取することにより、より正確な推定結果を得られることが示唆された。



図(8)-11 核DNAマーカーを標的とした環境DNA分析により推定された在来遺伝子型頻度。サンプリング地点は図(8)-1に示す。全てのサンプルはコイの繁殖行動が行われている最中に採取された。n5-1～n5-4は、地点n5において30～40メートル間隔で採取したサブサンプルである。

以上の結果より、核DNAにおける一塩基多型マーカーを標的としたTaqMan MGBリアルタイムPCRを用い、繁殖地において繁殖期に捕集した環境DNAを分析することにより、個体群におけるアレル頻度の推定が実行可能であることが実証された。核シングルコピーDNAは、希薄な環境DNAからの検出が非常に困難と考えられてきた。しかし、繁殖期に合わせて水試料を得る、そしてPCR阻害作用の影響を受けにくいPCR反応試薬を用いる、という比較的単純な方策を取るだけで、核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による種内変異の検出と定量が野外において実践可能であることを示した本成果は、将来、環境DNA分析を遺伝的構造や遺伝的多様性の推定へと発展させていく上で基礎となる重要な知見を提供することとなった。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

現在までに、核シングルコピーDNAを標的とした環境DNA分析は、本プロジェクトにおける試みを除いて全くなされてこなかった。本研究は、環境DNA研究において未踏の領域であった核DNAマーカーに基づく個体群遺伝構造解析の野外適用を実践し、その実行可能性と有効性を実証することにより、種内変異の検出・定量という環境DNA分析における新たな領域を切り拓く重要な成果となった。特に重要な科学的意義として、以下の3点が挙げられる。まず、1) 繁殖時の集団化という水生生物に広く共通する繁殖生態を

利用することにより、従来のミトコンドリアDNAマーカーに比べて極めて希薄な核DNAマーカーを環境DNAより検出することが出来るという、多くの水生生物に適用可能な方策を提示した点である。さらに本研究では、2) 一塩基多型を標的とすることにより種内変異の判別と定量が可能であることを示した。一塩基多型は遺伝変異の最小単位であり、ゲノムに最も豊富に存在すると言われている。したがって理論的には、同様のアプローチ法があらゆる生物に適用可能である点は大きな意義を持つ。また、3) リアルタイムPCRにおいて、環境DNA捕集の際に混入するPCR阻害物質の影響を受けにくい信頼性の高い検出系を提案した点は、本研究テーマである種内変異の検出・定量においてだけでなく、標的種のDNAの検出・定量を目的とした環境DNA分析においても広く役立つ成果となった。

本研究成果を土台とし、将来、さまざまな生物種において、個体群の遺伝的構造や遺伝的多様性を推定する環境DNA研究が発展することが期待される。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究で開発した核DNAマーカーを用いた環境DNA分析手法は、一塩基多型を標的としている点で、あらゆる遺伝的に近縁な集団の判別と存在比の定量に応用できる可能性が高い。近年、世界的に、様々な同種内外来集団の侵入と拡散が問題となっている。在来集団と同種であるが遺伝的に異なる集団は形態での判別が難しく、それゆえに我々人間がその侵入に気付くのが遅れることが多い。認識されにくい同種内外来集団であるが、一旦侵入すると、交雑や競争排除により在来個体群に大きな影響を与えるため、生物多様性の保全において解決すべき重要な課題となっている。同種内外来集団の分布調査には、捕獲と個体毎のDNA分析という大きな労力を要する点が、保全策における難題として挙げられるが、本研究で開発した環境DNA分析手法は、外来集団の侵入を受けた個体群において、外来遺伝子の侵入レベルを迅速かつ簡便に推定できる画期的なツールとなりうる。手法の迅速性によって広範な調査が可能となるため、スクリーニングによる同種内外来集団の早期発見や、侵入を受けていない生息地の発見を通し、有効な保全策の実施が可能となることも期待される。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) K. Uchii, H. Doi, H. Yamanaka, T. Minamoto: Ecology and Evolution, 7, 20, 8515-8522 (2017), Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and non-native genotypes of common carp estimated by environmental DNA.
- 2) T. Minamoto, K. Uchii, T. Takahara, T. Kitayoshi, S. Tsuji, H. Yamanaka, H. Doi: Molecular Ecology Resources, 17, 2, 324-333 (2017), Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*.
- 3) H. Doi, K. Uchii, S. Matsuhashi, T. Takahara, H. Yamanaka, T. Minamoto: Limnology &

Oceanography: Methods, 15, 2, 212-218 (2017), Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA.

- 4) K. Uchii, H. Doi, T. Okahashi, I. Katano, H. Yamanaka, M. K. Sakata, T. Minamoto: Comparison of tolerance to PCR inhibitors among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA. (under review)

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 内井喜美子：環境技術、46、630-635（2017）
「環境DNAによる外来種および希少種の迅速な検出」
- 2) 源利文、内井喜美子、高原輝彦、土居秀幸：環境技術、46、648-652（2017）
「環境DNAモニタリング手法の課題と展望」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文：日本生態学会第65回大会（2019）
「SNPマーカーを用いた環境DNA分析による遺伝変異の検出」
- 2) K. Uchii, H. Doi, H. Yamanaka, T. Minamoto: 103th ESA Annual Meeting (2018)
“The use of SNP markers in environmental DNA to detect intraspecific genetic variation.”
- 3) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文：日本陸水学会第82回大会（2017）
「核DNAマーカーを用いた環境DNA分析」
- 4) 内井喜美子、土居秀幸、山中裕樹、源利文：日本生態学会第64回大会（2017）
「核DNAマーカーを用いた環境DNA分析による交雑個体群の遺伝構造解析」
- 5) 内井喜美子、土居秀幸、源利文、山中裕樹：日本陸水学会第81回大会（2016）
「環境DNA研究におけるSNPマーカーの活用」
- 6) H. Doi, R. Inui, K. Uchii, Y. Akamatsu, K. Kanno, S. Matsushashi, T. Takahara, H. Yamanaka, T. Minamoto: 101th ESA Annual Meeting (2016)
“Environmental DNA method for estimating fish abundance and biomass.”

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) M. A. Barnes, C. R. Turner: Conserv. Genet., 17, 1, 1-17 (2016), The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics.

- 2) P.F. Thomsen, E. Willerslev: *Biol. Conserv.*, 183, 4-18 (2015), Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity.
- 3) 山中裕樹, 源利文, 高原輝彦, 内井喜美子, 土居秀幸: 日本生態学会誌, 66, 3, 601-611 (2016), 環境DNA 分析の野外調査への展開.
- 4) E.E. Sigsgaard, I.B. Nielsen, S.S. Bach, E.D. Lorenzen, D.P. Robinson, S.W. Knudsen, M.W. Pedersen, M.A. Jaidah, L. Orlando, E. Willerslev, P.R. Møller, P.F. Thomsen: *Nature Ecol. Evol.*, 1, 0004 (2016), Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA.
- 5) K. Uchii, H. Doi, T. Minamoto: *Mol. Ecol. Resour.*, 16, 415-422 (2016), A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes.
- 6) K. Uchii, H. Doi, H. Yamanaka, T. Minamoto: *Ecol. Evol.*, 7, 20, 8515-8522 (2017), Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and non-native genotypes of common carp estimated by environmental DNA.
- 7) T. Jo, H. Murakami, R. Masuda, M.K. Sakata, S. Yamamoto, T. Minamoto: *Mol. Ecol. Resour.*, 17, 6, e25-e33 (2017), Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA.
- 8) K. Mabuchi, H. Senou, M. Nishida: *Mol. Ecol.*, 17, 3, 796-809 (2008), Mitochondrial DNA analysis reveals cryptic large-scale invasion of non-native genotypes of common carp (*Cyprinus carpio*) in Japan.
- 9) K. Mabuchi, H. Senou, T. Suzuki, M. Nishida: *J. Fish Biol.*, 66, 6, 1516-1528 (2005), Discovery of an ancient lineage of *Cyprinus carpio* from Lake Biwa, central Japan, based on mtDNA sequence data, with reference to possible multiple origins of koi.
- 10) S.S. Matsuzaki, K. Mabuchi, N. Takamura, B.J. Hicks, M. Nishida, I. Washitani: *Oikos*, 119, 6, 964-971 (2010), Stable isotope and molecular analyses indicate that hybridization with non-native domesticated common carp influence habitat use of native carp.
- 11) K. Mabuchi, H. Song, H. Takeshima, M. Nishida: *Conserv. Genet. Resour.*, 4, 3, 649-652 (2012), A set of SNPs near or within STR regions useful for discriminating native Lake Biwa and introduced "Eurasian" strains of common carp.
- 12) M. Miya, T. Minamoto, H. Yamanaka, S.-i. Oka, K. Sato, S. Yamamoto, T. Sado, H. Doi: *JoVE*, 117, e54741 (2016), Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA.
- 13) T. Takahara, T. Minamoto, H. Yamanaka, H. Doi, Z. Kawabata: *Plos One*, 7, 4, e35868 (2012), Estimation of fish biomass using environmental DNA.
- 14) 内井喜美子, 奥田昇, 小北智之, 馬淵浩司, 西田睦, 川端善一郎: 第60回日本生態学会 (2013), 琵琶湖のコイの遺伝子型に応じた生息地利用の違い.

III. 英文Abstract

Development and Application of Environmental DNA Methods for the Estimation of Community Composition and Genetic Diversity in Aquatic Systems

Principal Investigator: Hideyuki Doi

Institution: Graduate School of Simulation Studies, University of Hyogo

7-1-28 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, 650-0047, Japan

Tel: +81-79-303-1986 / Fax: +81-79-303-1986

E-mail: hideyuki.doi@icloud.com

Cooperated by: Ryukoku University, Natural History Museum and Institute, Chiba, Tohoku University, Kobe University, Shimane University, Hokkaido University, Osaka Ohtani University

[Abstract]

Key Words: Environmental DNA, Biodiversity survey, Species distribution, Genetic diversity, Community, Metabarcoding

The environmental DNA (eDNA) technique has been increasingly considered a useful tool for investigating the distribution and biodiversity of aquatic and terrestrial organisms. Recently, high-throughput sequencing (HTS) has been applied in eDNA studies for the simultaneous detection of multiple species from eDNA. This technique is called eDNA metabarcoding and is a rapid method of biodiversity assessment with DNA-based identification and HTS. eDNA technology enables the simple and rapid monitoring of the distribution of organisms, including exotic and rare species. In addition, mitochondrial DNA markers and nuclear DNA markers can be used to develop methods to identify “health conditions” based on genetic diversity, such as the risk of extinction for various species and populations. The following three large themes were proposed in order to achieve our purposes: 1) the establishment and testing of methods to elucidate the composition of aquatic species using eDNA metabarcoding; 2) the development of eDNA metabarcoding techniques, including new universal primers for other taxa and sampling and analytic methods; and 3) the development of methods to elucidate genetic diversity using eDNA.

1) We tested the eDNA metabarcoding methods on a fish community using MiFish universal primers (Miya et al. 2015) in various lakes, rivers, and brackish waters across Japan to evaluate their performances compared to those of traditional capturing methods. We found that eDNA metabarcoding could detect the species in the fish community better than could traditional methods.

2) We developed eDNA metabarcoding techniques for multiple communities, including fishes, mammals, water birds, decapods, and aquatic insects, and tested them in the natural habitats. These methods used universal primers to amplify a hypervariable region of the mitochondrial 12S rRNA gene. We also developed the DNA-sequence database for the 12S primer regions of fishes, mammals, water birds, decapods, and aquatic insects, as well as the COI and 18S regions of the zooplankton community. In addition, we evaluated the sampling strategy, especially for mixed and independent water sampling, for eDNA metabarcoding.

3) We developed an effective population size estimation method for salmon populations using the microsatellite methods detected by eDNA. We also developed methods to evaluate the population genetic structure using nuclear DNA markers for eDNA. Here, we developed eDNA metabarcoding techniques and population genetic parameter estimations for various species and inland water habitats. Our developed eDNA methods have great potential as useful tools for biodiversity assessment in aquatic habitats.