

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

SII-7-2 深海大型生物相の環境DNAによるモニタリング法の開発

(JPMEERF20S20720)

令和2年度～令和4年度

Development of Biodiversity Monitoring Methods for Deep-sea Macro-organisms using Environmental DNA
Metabarcoding

<研究代表機関>

千葉県立中央博物館

<研究分担機関>

神戸大学大学院

国立環境研究所生物・生態系環境研究センター

沖縄美ら島財団総合研究センター

京都大学

令和5年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5-1. 成果の概要	
5-2. 環境政策等への貢献	
5-3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6-1. 査読付き論文	
6-2. 知的財産権	
6-3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	15
II-1 脊椎動物における調査方法の開発と実践、ならびに基盤データの整備	17
（千葉県立中央博物館・沖縄美ら島財団総合研究センター・国立環境研究所琵琶湖分室）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II-2 無脊椎動物における調査方法の開発と実践、ならびに基盤データの整備	29

(神戸大学大学院・千葉県立中央博物館・京都大学)

要旨

1. 研究開発目的
2. 研究目標
3. 研究開発内容
4. 結果及び考察
5. 研究目標の達成状況
6. 引用文献

III. 研究成果の発表状況の詳細42

IV. 英文 Abstract47

I. 成果の概要

課題名 SII-7-2 深海大型生物相の環境DNAによるモニタリング法の開発

課題代表者名 宮 正樹（千葉県立中央博物館・資料管理研究科・主任上席研究員）

研究実施期間 令和2年度～令和4年度

研究経費

77,476千円（合計額）

（各年度の内訳：R2年度：25,854千円、R3年度：25,811千円、R4年度：25,811千円）

研究体制

（サブテーマ1）脊椎動物における調査方法の開発と実践、ならびに基盤データの整備（千葉県立中央博物館）（JPMEERF20S20703）

（サブテーマ2）無脊椎動物における調査方法の開発と実践、ならびに基盤データの整備（神戸大学大学院）（JPMEERF20S20704）

研究協力機関

海洋研究開発機構・沖縄県海洋深層水研究所・高知県海洋深層水研究所・みえ尾鷲海洋深層水アクアステーション・こしき海洋深層水株式会社・株式会社ディーエイチシー海洋深層水研究所・東京大学大学院・広島修道大学・鶴岡市立加茂水族館

本研究のキーワード

海洋保護区、環境DNA、メタバーコーディング、生物多様性、モニタリング、深海大型生物、魚類、無脊椎動物、西七島海嶺、沖合海底自然環境保全地域

1. はじめに（研究背景等）

海洋生態系の保全は地球規模の課題であり、生物多様性条約には2020年までに沿岸域及び海域の10%を海洋保護区に設定する目標が掲げられている。日本の海洋保護区は、管轄権内海域のうち沿岸域が中心に指定されてきたが、沖合域については十分に検討されてこなかった。環境省は、沖合域の海洋保護区設定（主に深海底）のため、2016年に「生物多様性の観点から重要度の高い海域」（重要海域）を抽出した。また、沖合域海洋保護区について改正自然環境保全法案が国会に提出され、この法案は2019年4月に成立した。その後、2020年10月に中央環境審議会から出た答申を受け、①日本海溝の最南部及び伊豆・小笠原海溝周辺の海域、②中マリアナ海嶺と西マリアナ海嶺を含む海域、③西七島海嶺を含む海域、及び④マリアナ海溝北部の4つの海域が沖合海底自然環境保全地域として指定された。

漁業や資源開発、テクトニクスなどによって深海生態系は変動するため、設定した海洋保護区での生物多様性の変動がどの程度あるのか、開発等により自然環境が劣化してしまっていないか、海洋保護区として保全効果が発揮できているか等を評価するためには継続的な生態系モニタリングが必要となる。しかし、深海調査は大がかりな調査機器と多大な経費が必要となるため、従来の調査法で継続的なモニタリングを実施するのは困難である。一方、近年の分子生物学における著しい技術的進歩により、多数のサンプルから得られた環境水中に存在するDNA（環境DNA）を分析可能な量に増幅し、次世代シーケンサを用いて同時並列的に分析できるようになった。

環境DNAにはさまざまな定義があるが、ここでは海や川の大型生物から体外に放出されたDNAのことを指す。2012年に相前後して魚類環境DNAに関する論文が出版されて以来、環境DNAを用いた調査は魚類をモニタリングする画期的な手法として大きな注目を集めてきた。本課題の研究代表者（宮正樹）が中心となって開発した、魚類環境DNAをターゲットとしたメタバーコーディング法（多種同時並列検出法；以下MiFish法）は、国内外で広く魚類群集調査に用いられるようになり、国内では水域

を管轄する関係各省庁が新たなモニタリング法として活用している。また、魚類以外の脊椎動物（哺乳類・鳥類・両生類）や無脊椎動物（十脚甲殻類・棘皮動物）などでも同様の手法が開発された。

2. 研究開発目的

こうした近年の著しい分子生態学における技術的進歩を受け、本課題では環境 DNA メタバーコーディング法を深海性脊椎動物と無脊椎動物で確立し、取得したデータから科学的な重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案することを大きな目的とした。この目的を達成するために、全国各地で汲み上げられている海洋深層水や研究船で実海域から得られる環境 DNA を分析し、本課題で提案する環境 DNA メタバーコーディング法の有効性を検証する。また、これと並行してリファレンス配列を各分類群で充実させることで、環境 DNA メタバーコーディング法における種判定の精度向上を図る。

3. 研究目標

全体目標	<p>環境 DNA を用いた深海性大型動物の同時並列多種検出法を脊椎動物と無脊椎動物の代表的分類群に対して開発し、沖合海底自然環境保全地域における継続的な種多様性モニタリングを可能にする。具体的には以下の通りになる。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・代表的分類群（魚類・刺胞動物・甲殻類・棘皮動物・軟体動物）を対象とした PCR プライマーを開発・既存のプライマーを最適化すると同時に、それぞれのプライマーについての実験条件を確立する。 ・上記の分類群について、同定された標本と紐づけた DNA のシークエンス情報を取得し、リファレンス配列を充実させる。関連して、次世代シークエンサーから出力されたデータを処理する解析パイプラインを構築し、種判別精度を高めるとともに、リファレンスの不足により種の同定が困難なデータについて、種に相当する遺伝子配列の分類単位をまとめる手法を確立する。 ・全国各地の海洋深層水で得られた環境 DNA を分析することにより、深海性魚類を中心とする生物群集の時空間動態を明らかにする。 ・実海域から得られた各分類群の環境 DNA を本研究で確立する手法により分析し、データから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。 ・以上で得られた各種技術を環境省へ移転し、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の継続的で効率的なモニタリングを可能にする。
------	--

サブテーマ 1	脊椎動物における調査方法の開発と実践、ならびに基盤データの整備
サブテーマリーダー/所属機関	宮 正樹/千葉県立中央博物館
目標	本サブテーマでは、深海性の脊椎動物を対象とした簡便・迅速な深海生態系モニタリング法構築を目標とする。そのため、魚類を中心とした深海性脊椎動物を対象に環境 DNA メタバーコーディング法（同時並列多種分析法）を確立する。その具体的な内容については以下の通りである。

	<p>① 既存の PCR プライマーを深海性分類群に対して最適化すると共に、海洋深層水を利用して採水・ろ過などのサンプル処理法やライブラリ調整等の実験法を確立する。</p> <p>② 標本と DNA 塩基配列を紐付けた深海性分類群のリファレンスデータを充実させ、超並列シーケンサーから出力される大量データを処理する解析パイプラインを構築し、種判定精度を高める。</p> <p>③ 全国各地の海洋深層水で得られた環境 DNA を分析することにより、深海性魚類群集の時空間動態を明らかにする。</p> <p>④ 海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される水深ならびに実海域から得られた環境 DNA を本研究で確立する手法により分析し、データから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。</p> <p>⑤ 以上で得られた各種技術を環境省へ移転し、海洋保護区(沖合海底自然環境保全地域)の継続的で効率的なモニタリングを可能にする。</p>
--	---

サブテーマ 2	無脊椎動物における調査方法の開発と実践、ならびに基盤データの整備
サブテーマリーダー/所属機関	源 利文/神戸大学大学院
目標	<p>本サブテーマでは、深海性の無脊椎動物を対象とした環境 DNA メタバーコーディング手法を開発し、深海の無脊椎動物相を把握する手法として確立する。具体的な内容は以下の通りである。</p> <p>① 刺胞動物（花虫綱・鉢虫綱）、甲殻類（十脚目・端脚目・等脚目）、棘皮動物（ヒトデ綱・ウニ綱・ナマコ綱・クモヒトデ綱・ウミユリ綱）、軟体動物（腹足綱・二枚貝綱・頭足綱）を対象としたプライマーを開発する。同時に、それぞれのプライマーを用いる際の実験条件を確立する。</p> <p>② 同定された標本と紐づいた DNA のシーケンス情報を取得し、リファレンス配列を充実させる。これに関連して、次世代シーケンサーから出力されたデータを処理する解析パイプラインを構築し、種判別精度を高めるとともに、リファレンスの不足により種の同定が困難なデータについて、種に相当する遺伝子配列の分類単位をまとめる手法を確立する。</p> <p>③ 実水域で採集された環境 DNA を本サブテーマで確立した手法を用いて解析し、サブテーマ 1 によって取得される脊椎動物のデータとあわせて、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。</p>

4. 研究開発内容

本課題では、環境 DNA を用いた深海性大型動物のメタバーコーディング法（同時並列多種検出法）を脊椎動物と無脊椎動物の代表的分類群に対して開発し、沖合海底自然環境保全地域における継続的な種多様性モニタリングを可能にした。

具体的には、代表的分類群（魚類・刺胞動物・甲殻類・棘皮動物・軟体動物）を対象とした既存の PCR プライマー(以下プライマー) を至適化するか、既存のプライマーがないものについては新たに設計・開

発し、それぞれのプライマーの至適実験条件を確立した。並行して、種判定精度向上のために上記分類群の標本と紐づけた DNA のシークエンス情報を取得し、リファレンス配列を充実させた。また、超並列シークエンサーから出力される大量データ処理を可能にする解析パイプラインを構築して種判定精度を高めた。このような実験手法開発に必要な深海の環境 DNA については、全国各地の施設で常時汲み上げられている海洋深層水を利用した。常時入手可能な海洋深層水の活用により、至適実験手法確立にあたって試行錯誤を繰り返すことが可能になり、多数の貴重な知見を得ることができた。こうした一連の予備的実験結果で得られた数多くの知見に基づき、実海域から得られた各分類群の環境 DNA を分析した。

最後に、以上で得られた各種実験手法をマニュアル化することで環境省に技術移転し、海洋保護区(沖合海底自然環境保全地域)の継続的で効率的なモニタリングを可能にした。環境 DNA から出現生物データを取得することにより、課題 1 の画像解析では検出できない種、たとえば採集しにくい種や、目視では検出できない種などについても情報を取得することができるようになった。

【サブテーマ 1】

本サブテーマでは、魚類を主体とする深海性脊椎動物に関して環境 DNA メタバーコーディング法を確立し、実海域から取得したデータから科学的な重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案することを目的とした。この目的を達成するため、既存の実験手法を深海性分類群に対して至適化した。また、標本と DNA 塩基配列を紐づけたリファレンスデータを充実させ、新たに開発した解析パイプラインを構築して種判定精度を高めた。さらに、全国各地の海洋深層水汲み上げ施設で得られた環境 DNA を分析することによって、沿岸の深海性魚類群集の時空間動態を明らかにした。これらの技術開発や実証的研究に基づき沖合海底自然環境保全地域の実海域から得られた環境 DNA を分析した。以上で得られた各種技術をマニュアル化することで環境省へ技術移転し、海洋保護区(沖合海底自然環境保全地域)の継続的で効率的なモニタリングを可能にした。

魚類を対象とした実験手法の効率化

本研究では、深海性分類群の DNA 塩基配列(既存のデータに加えて新たに決定したデータ)と MiFish プライマーの配列を比較することにより、さらなる至適化の必要がないことを確認した。一方、これまでの実験手法では環境 DNA 中に圧倒的に優占する微生物 DNA の非特異的増幅が顕著だったため、新たな DNA ポリメラーゼを用いた 1st PCR による魚類環境 DNA の増幅を試み、さらにこの DNA ポリメラーゼをつかった至適実験条件を探索した。

リファレンス配列の充実と解析パイプラインの構築

超並列シークエンサーから出力される大量データを用いて確度の高い種同定を行うためには、正しく種同定された標本に紐づくリファレンス配列が必要となる。本サブテーマでは、日本産深海魚を文献からリストアップし、それらの組織標本を収集した。組織標本から DNA を抽出し、MiFish 法で使われるミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子の断片の配列を決定した。これと並行して、超並列シークエンサーから出力されるデータの誤りを自動補正する解析パイプラインを新たに構築した。

海洋深層水を用いた深海性魚類の検出

本研究では、海洋保護区に比較的近い 5 つの汲み上げ施設(静岡県伊豆赤沢・三重県尾鷲・高知県室戸・鹿児島県甕島・沖縄県久米島)を選び、各施設で海洋深層水を現場ろ過することにより、深海から得られた環境 DNA を実験手法の開発に用いた。これら 5 つの施設は水深 320~800m から海水を汲み上げており、計 1,100 リットルの海水を 56 本のフィルターカートリッジでろ過した。ろ過したフィルターカートリッジから環境 DNA を抽出し、MiFish 法によるメタバーコーディングを行い、出力された分類群表を用いて時空間分析を行った。

実海域サンプルを用いた魚類群集解析

2020年から2022年にかけて海洋研究開発機構所属の海底広域研究船「かいめい」ならびに深海潜水調査船支援母船「よこすか」による計3回の研究航海が実施された。これらの航海で、計7つの海山山頂と斜面、ならびに駿河湾奥において、ロゼット採水装置を用いた近底層における採水と、フリーフォールランダーに装着したマスポンプによる海底直上の採水・現場ろ過を行った。前者については、船上で深層水を回収後にろ過を行い、後者については船上でフィルターカートリッジを回収し、いずれも陸上実験室で環境DNAを抽出した。抽出した環境DNAを用いてMiFish法によるメタバーコーディングを行い、出力された分類群表を用いて時空間分析を行った。

実験手法のマニュアル化と環境省への技術移転

以上で得られた各種実験技術をマニュアル化して、統一された手法の下で再現性の高い結果が得られるようにした。

【サブテーマ2】

本サブテーマでは、深海性無脊椎動物に関して環境DNAメタバーコーディング手法を確立し、実海域から取得したデータから科学的な重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案することを目的とした。この目的を達成するため、対象分類群（花虫綱、鉢虫綱、棘皮動物〔ヒトデ類、ウニ類、ナマコ類〕、クモヒトデ綱、ウミユリ綱、貝類（〔腹足綱、二枚貝綱〕、頭足綱）について、合計7種類のPCRプライマーを新規開発するとともに、甲殻類十脚目用のプライマーであるMiDecaが端脚目や等脚目などの軟甲甲殻類にも広く適用可能であることを確認した。また、環境DNAサンプルの保存法や抽出手法を改善して環境DNA収量を増加する手法を開発し、種査定の精度を上げるために必要なリファレンス配列を充実させた。

無脊椎動物を対象とした環境DNA分析用のプライマーの設計

本研究では1)花虫綱、2)鉢虫綱、3)棘皮動物、4)クモヒトデ綱、5)ウミユリ綱、6)貝類、7)頭足綱について、それぞれに新規のメタバーコーディング用プライマーを開発した。各動物群の検出系の開発にあたっては、DNAデータベースからミトコンドリア上のrRNA遺伝子のDNA塩基配列データを収集し、両端に分類群横断的にプライマーが結合する保存的領域（20bp前後）をもつ種間差の豊富な短い領域（100～200bp）を探索した。このように設計したプライマーの有効性および至適PCR条件について、水族館の水槽水や海洋深層水汲み上げ施設で得られた環境DNAサンプルを用いて検討を行った。

海水サンプルを対象とした環境DNA保存法の至適化

深海における大型生物の環境DNAの濃度は沿岸水と比較して低いことが想定され、さらに現行の採水法ではろ過可能な海水量も限定される。本サブテーマでは、環境DNAの保存や抽出法を改良することによってDNA収量の増加を試みた。従来法では、ろ過後のフィルターにRNAlaterを添加することによってDNAの分解を抑制してきたが、環境DNA抽出の際に用いるBufferATLをフィルターカートリッジに直接注入することでDNA収量が増すかどうか、沿岸水を用いた定量PCRとMiFish法によるメタバーコーディングで検討した。

海洋深層水を用いた深海性無脊椎動物の検出

本研究では、魚類と同様に5つの汲み上げ施設から得られた環境DNAサンプルを用い、深海性無脊椎動物が検出できるかどうか検討した。これら5つの施設は水深320～800mから海水を汲み上げており、計1,100リットルの海水を56本のフィルターカートリッジでろ過した。ろ過したフィルターカートリッジから環境DNAを抽出し、各分類群のプライマーを用いたメタバーコーディングを行い、出力された分類群表を用いて各種の多様性分析を行った。

実海域サンプルを用いた無脊椎動物解析

2020年から2022年にかけて海洋研究開発機構所属の海底広域研究船「かいめい」ならびに深海潜水調査船支援母船「よこすか」による計3回の研究航海が実施された。これらの航海で、計7つの海山山頂と斜面、ならびに駿河湾奥において、ロゼット採水装置を用いた近底層における採水と、フリーフォールランダーや調査潜水艇に装着したマスポンプによる海底直上の採水・現場ろ過を行った。前者については、船上で深層水を採取後にろ過を行い、後者については船上でフィルターカートリッジを回収し、いずれも陸上実験室で環境DNAを抽出した。これらのサンプルを用いて、本研究で開発した環境DNAメタバーコーディング法による無脊椎動物の検出を試み、各種の多様性解析を行った。

リファレンス配列の整備

日本周辺海域に出現する可能性のある無脊椎動物について、収集標本を整理し、リファレンス配列のない種について、それぞれのプライマー領域に相当するリファレンス配列を決定した。

実験手法のマニュアル化と環境省への技術移転

以上で得られた各種実験技術をマニュアル化して、統一された手法の下で再現性の高い結果が得られるようにした。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

【サブテーマ1】

魚類を対象とした実験手法の効率化

深海性分類群のDNA塩基配列（既存のデータに加えて新たに決定したデータ）とMiFishプライマーの配列を比較したところ、少なくとも目視レベルではさらなる至適化の必要がないことを確認した。一方、これまでの実験手法では環境DNA中に圧倒的に優占する微生物DNAの非特異的増幅が顕著だったため、新たなDNAポリメラーゼを用いた1st PCRによる魚類環境DNAの増幅を試みた。その結果、これまで1st PCRに用いていたKAPA HiFi HotStart DNA polymerase (Kapa Biosystems社)を用いるより、Platinum SuperFi II DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific社)を用いる方が、微生物DNAの非特異的増幅が抑制され、魚類環境DNAの特異的増幅が増すことが明らかになった。この新規DNAポリメラーゼの使用により、アガロースゲルを用いた魚類環境DNAの切り出しの手間がなくなり、実験効率が格段に向上した (Kawato et al. 2021)。

リファレンス配列の充実と解析パイプラインの構築

文献調査を行ったところ、計1,302種の日本産の深海性魚類がリストアップされた。これまでに収集してきた組織標本に加えて国内外の機関から組織標本を収集し、これらの組織標本からDNAを抽出してMiFish法で使われるミトコンドリア12SrRNA遺伝子の断片配列（平均長172bp）を決定した。その結果、日本産深海魚1,302種のうち854種のデータを取得することができた。これは魚類分類体系における階級の、目で100%、科で93.0%、属で80.5%、種で65.6%の網羅率となる。これと並行して、超並列シーケンサーから出力されるデータの誤りを自動補正する解析パイプライン (PMiFish) を新たに構築して一般利用を可能にするとともに (Miya et al. 2021)、さらに改良を進めた解析パイプラインをデータベースMitoFishにMiFish Pipelineとして搭載した (Zhu et al. 2023)。

海洋深層水を用いた深海性魚類の検出

5つの海洋深層水汲み上げ施設において、計1,100リットルの海水を56本のフィルターカートリッジ

を用いて現場ろ過した。ろ過したフィルターから環境 DNA を抽出し、MiFish 法によるメタバーコーディングを行った。その結果、すべてのサンプルから深海性魚類を検出することができ、各施設からは 31～140 種の深海性魚類を検出できた。これらの深海性魚類群集組成を分析したところ、それぞれの地域や深度の特性を反映したものであることが明らかになった。また、これとは別に久米島の海洋深層水研究所で年 4 回の調査を実施し、同様の分析を行ったところ、魚類群集組成の季節的な変化が検出された。

実海域サンプルを用いた魚類群集解析

計 7 つの海山山頂と斜面、ならびに駿河湾奥から得られた計 71 サンプルを MiFish 法で分析したところ、すべてのサンプルから深海性魚類が検出された。特筆すべきは、2020 年に駿河湾の 2,000m 以深で発見された大型高次捕食者のヨコヅナイワシが、西七島海嶺の正徳・元禄・安永・宝永海山の 2,000m 以深の海山斜面から検出されたことである (Fujiwara et al. 2022)。また、海山山頂からは計 115 種、海山斜面からは計 146 種の深海性魚類が検出された。得られた結果から、魚類群集組成を解析したところ、海山の深度（山頂・斜面）や地理的位置関係を反映した結果が得られた。

実験手法のマニュアル化と環境省への技術移転

以上で得られた各種実験技術 (DNA 抽出後の MiFish メタバーコーディング法) とデータ解析技術 (リードのアセンブルから種判定まで) を詳述し、合計 15 ページにわたる実験マニュアルにまとめた。このマニュアルに基づき実験を実施することにより、実験者に依存しない再現性の高い結果が得られると期待される。

【サブテーマ 2】

無脊椎動物を対象とした環境 DNA 分析用のプライマーの設計

1) 花虫綱、2) 鉢虫綱、3) 棘皮動物、4) クモヒトデ綱、5) ウミユリ綱、6) 貝類、7) 頭足綱について、それぞれに新規のプライマーを設計し、組織から抽出した DNA、水槽水、沿岸域表層水、海洋深層水、実海域から得られた沖合深層水から抽出した環境 DNA を用いてプライマーの性能を検証した。その結果、貝類を除くすべての分類群について、本研究で対象とする深海域から対象分類群の検出が可能であることを確認した。なお、十脚目用のプライマーである MiDeca については、十脚目以外の軟甲甲殻類でも有用であることが検証された。

深海サンプルを対象とした環境 DNA 保存法の最適化

RNAlater を用いる既存の保存法と Buffer ATL を用いる新たな保存法を単一種の定量 PCR で比較した結果、ATL 法で保存したサンプルの方が環境 DNA 濃度が有意に高く、約 2 倍濃度の環境 DNA を回収することができた。また、同一サンプルで MiFish 法により魚類群集組成を調べたところ、環境 DNA 保存法による差は認められなかった。以上の結果から、深海の採水においては ATL 法でより多くの DNA を回収することで、検出感度が向上することが期待される。

深層水を用いた無脊椎動物の環境 DNA メタバーコーディング

5 箇所の汲み上げ施設からろ過した海洋深層水より、頭足綱 23 種、花虫綱 55 種、鉢虫綱 12 種、クモヒトデ綱 24 種、ウミユリ綱 5 種、軟甲甲殻類 42 種の合計 161 種の無脊椎動物の環境 DNA を検出した (98% 以上の一致率の配列のみを記載)。採水地ごとの群集組成を調べたところ、それぞれの特徴を示しており、本研究で開発された無脊椎動物の環境 DNA メタバーコーディング法が、場所ごとの無脊椎動物組成を明らかにする手段として有効であることが明らかになった。このことは、本手法が重要海域の抽出基準としての生物多様性の情報を得るための手法として利用可能であることを示している。

実海域サンプルを用いた無脊椎動物解析

2020年から2022年の調査航海では、合計で17箇所の深海水から頭足綱57種、花虫綱55種、鉢虫綱14種、ナマコ綱14種、ヒトデ綱6種、ウニ綱18種、クモヒトデ綱4種、ウミユリ綱5種、十脚類18種の合計191種の無脊椎動物の環境DNAが検出された。特筆すべきは、生態がよく知られていないダイオウイカの環境DNAが広範囲から検出されたことであろう。また、種レベルで同定された191種のDNA配列の他に、種までの同定ができない約360分類群の塩基配列が検出された。後者の配列については、分子系統樹を参照することで属レベルや科レベルなどの帰属が可能であった。得られた結果から各種の多様性解析を行ったところ、採水法や分析法など今後実施する調査に有用な情報が数多く得られた。

リファレンス配列の整備

3年間にわたって十脚目910種、端脚目3種、等脚目4種、頭足綱17種、クモヒトデ綱24種、腹足綱133種、二枚貝綱12種、棘皮動物132種の合計1,235種の無脊椎動物のリファレンス配列を新たに取得した。この結果、既存のデータと合わせ、本研究で対象とする分類群の主要な目（甲殻類は亜目）48目（亜目）のうち46目（亜目）について、代表的な種のデータが1件以上利用可能となり、環境DNAで検出された種を少なくとも目レベル同定できる体制が整った。また、多くの主要分類群については科レベルでの同定が可能となった。

実験手法のマニュアル化と環境省への技術移転

以上で得られた各種実験技術（DNA抽出から種判定まで）を詳述し、合計9ページにわたる実験マニュアルにまとめた。このマニュアルに基づき実験を実施することにより、実験者に依存しない再現性の高い結果が得られると期待される。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

- ・本課題で深海性魚類に至適化されたMiFish法については、環境省が二次的自然環境における調査に既に幅広く利用している。また、環境省は「環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き」を作成して公開している（https://www.biodic.go.jp/edna/reports/fwfish_tebiki1.pdf）。この手引きは継続的に改訂されており、現在第2版が公開されている。
- ・同様に、国交省の河川水辺の国勢調査のテーマ調査にMiFish法が導入済みで、R8年度からは本調査に導入する予定となっている（辻ほか2021, 篠原ほか2021, 河川技術論文集27）。
- ・同様に、水産庁の各研究所でMiFish法の試行テストが行われ、人工魚礁の効果検証（Sato et al. 2021, Scientific Reports 11:19477）や東京湾における魚類群集調査（Hongo et al. 2021, Regional Studies in Marine Sciences 47:101950）に本手法が用いられ、直接的な手法（目視観察やネット採集）では不明だった魚類群集の時空間動態が明らかとなった。
- ・このような流れは民間にも波及しており、河川魚類群集の時空間変動をMiFish法により明らかにしたり（Suzuki et al. 2022, Limnologica 93:125955）、環境RNAを利用したMiFish法を開発することによって誤検出の確率を大幅に低下させたり（Miyata et al. 2021, Ecological Indicator 158:107796）など、大きな波及効果を上げている。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

- ・サブテーマ1と2では、SII-7-2の参画者以外でも再現性の高い実験結果が得られるように、魚類と無脊椎動物を対象とした環境DNAメタバーコーディングの実験手法マニュアルを作成した。本マニュアルはSII-7で発行される「沖合海底自然環境保全地域（海洋保護区）を対象とした深海生態

系のモニタリング方法」の 5.3（魚類）ならびに 5.4（無脊椎動物）に収録されており、本プロジェクト終了以降、沖合海底自然環境保全地域のモニタリングが実施されるにあたり、有効活用されることになる見込みである。

- ・上記マニュアルに記載された内容（とくに MiFish 法）については、環境 DNA 学会が発行する英文マニュアル”An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols” (<http://ednasociety.org/en/manual>) に準拠したもので、この英文マニュアルは世界各国で幅広く利用されている。たとえば米国大気海洋局（NOAA）のメンバーを中心とする研究グループは、”Observing life in the sea using environmental DNA” (<https://doi.org/10.5670/oceanogr.2021.218>) と題する論文を出版し、米国沿岸・沖合における MiFish 法による研究成果を出した。本論文では、環境 DNA 国際共同観測のネットワーク構築の重要性が指摘されており、本課題で構築された実験手法の重要性が高くなる見込みが高い。同様に、国連教育科学文化機関（UNESCO）が 2023 年秋から進める「海洋世界遺産 20 海域の魚類相調査プロジェクト(eDNA expeditions in marine World Heritage sites)」では、本課題で実施した研究成果に基づき魚類群集モニタリングにおける MiFish 法の優位性が示された結果、本手法が標準法として採用される見込みとなった。
- ・カナダのゲルフ大学教授 M. Hajibabaei 博士が主導して、International eDNA Standardization Task Force (iESTF) 立ち上げの準備が進められている。環境 DNA メタバーコーディングを生物多様性モニタリング手法として ISO 化を試みるのが主眼となっており、この会合にはサブテーマ 2 の研究代表者である源博士がメンバーとして加わっている。MiFish 法を含む各種環境 DNA 実験手法の国際標準化に取り組むことになっている。

5-3. 研究目標の達成状況

全体目標	目標の達成状況
<p>環境 DNA を用いた深海性大型動物の同時並列多種検出法を脊椎動物と無脊椎動物の代表的分類群に対して開発し、沖合海底自然環境保全地域における継続的な種多様性モニタリングを可能にする。具体的には以下の通りになる。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・代表的分類群（魚類・刺胞動物・甲殻類・棘皮動物・軟体動物）を対象としたプライマーを開発・既存のプライマーを最適化すると同時に、それぞれのプライマーについての実験条件を確立する。 ・上記の分類群について、同定された標本と紐づけた DNA のシーケンス情報を取得し、リファレンス配列を充実させる。関連して、次世代シーケンサーから出力されたデータを処理する解析パイプラインを構築し、種判別精度を高めるとともに、リファレンスの不足により種の同定が困難なデータについて、種に相当する遺伝子配列の分類単位をまとめる手法を確立する。 ・全国各地の海洋深層水で得られた環境 DNA を分析することにより、深海性魚類を中心とする生物群集の時空間動態を明らかにする。 ・実海域から得られた各分類群の環境 DNA を本研 	<p><u>目標どおりの成果をあげた。</u></p> <p>以下に示すとおり、当初掲げた 5 つの目標をいずれも達成できた。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・左記分類群の遺伝子断片を増幅する既存の PCR プライマーを至適化するとともに、既存のものが無い場合は新規 PCR プライマーを開発し、深海から得られた環境 DNA（海洋深層水汲み上げ施設ならびに実海域から得られたサンプル）から各種深海生物の検出に成功した。 ・いずれの分類群においても、標本と紐づけた DNA のシーケンス情報を取得し、リファレンス配列を充実させることができた。その結果、魚類では少なくとも科レベルの、無脊椎動物では少なくとも目レベルの帰属を明らかにできるようになった。また、次世代シーケンサーの大量データを解析するパイプラインを新たに開発し、データベース MitoFish に搭載して公開した。この解析パイプラインにより、リファレンス配列が完全でない場合でも、算出される系統樹を参照することで高次分類群への割り当てが可能となった。

<p>究で確立する手法により分析し、データから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。</p> <p>・以上で得られた各種技術を環境省へ移転し、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の継続的で効率的なモニタリングを可能にする。</p>	<p>・全国各地の施設から得られた大量の海洋深層水（計 1,100 リットル）を 56 本のフィルターカートリッジでろ過することで、試行錯誤しながら至適実験手法の探索が可能になり、各分類群で環境 DNA メタバーコーディング法を確立することができた。また、得られた群集データを時空間分析することで、日本沿岸の深海生物の時空間動態の一端が明らかになった。</p> <p>・計 3 回の研究航海で得られた 7 つの海山山頂と斜面、ならびに駿河湾奥から得られた 71 サンプルを用いて環境 DNA メタバーコーディングを行った。その結果、魚類では最近新種として記載されたトッププレデターのヨコヅナイワシの新たな分布域を発見し、無脊椎動物では世界最大の軟体動物でその生態が謎に包まれているダイオウイカを多くの地点で検出することができた。これら食物網の最上位に位置する希少な大型生物を検出できたことは、今後調査を継続することにより重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目の取得を可能にする。</p> <p>・環境 DNA メタバーコーディングの実験手法をマニュアル化することにより、各種技術を環境省へ移転することができた。これらのマニュアル化された技術を利用することで再現性の高い調査結果が誰でも得られることになる。</p>
--	---

サブテーマ 1 目標	目標の達成状況
<p>本サブテーマでは、深海性の脊椎動物を対象とした簡便・迅速な深海生態系モニタリング法構築を目標とする。そのため、魚類を中心とした深海性脊椎動物を対象に環境 DNA メタバーコーディング法（同時並列多種分析法）を確立する。その具体的な内容については以下の通りである。</p> <p>① 既存の PCR プライマーを深海性分類群に対して最適化すると共に、海洋深層水を利用して採水・ろ過などのサンプル処理法やライブラリ調整等の実験法を確立する。</p> <p>② 標本と DNA 塩基配列を紐付けた深海性分類群のリファレンスデータを充実させ、次世代シーケンサから出力される大量データを処理する解析パイプラインを構築し、種判定精度を高める。</p> <p>③ 全国各地の海洋深層水で得られた環境 DNA を分析することにより、深海性魚類群集の時空間動態を明らかにする。</p>	<p><u>目標どおりの成果をあげた。</u></p> <p>①に関して、既存のデータに基づき MiFish プライマーをそのまま深海性魚類に適用できることが確認された。また、海洋深層水のろ過に関しては、取水口からの水圧を利用した新たなろ過法を開発した。さらに、魚類環境 DNA の断片増幅に新たな DNA ポリメラーゼを用いることにより実験の効率が格段に向上した。</p> <p>②に関して、標本と紐づけた DNA のシークエンス情報を取得し、リファレンス配列を充実させることができた。その結果、魚類では深海性分類群の目の 100%、科の 93.0%、属の 80.5%、種の 65.6%を網羅することができた。また、次世代シーケンサーの大量データを解析するパイプラインを新たに開発し、データベース MitoFish に搭載して公開した。</p> <p>③に関して、全 56 サンプルから深海性魚類を検出</p>

<p>④ 海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される水深ならびに実海域から得られた環境 DNA を本研究で確立する手法により分析し、データから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。</p> <p>⑤ 以上で得られた各種技術を環境省へ移転し、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の継続的で効率的なモニタリングを可能にする。</p>	<p>し、種数や群集組成に関するデータを得ることができた。それらデータの時空間解析を行ったところ、深度や地域性などの空間的異質性や、季節性など時間的動態を検出することができた。</p> <p>④に関して、最近新種として記載された大型高次捕食者のヨコヅナイワシの新たな分布域を発見することができた。また、海山山頂やその斜面における魚類群集の異質性や地域性などが明らかになり、このような調査を続けていくことにより、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目に関する情報が得られることが明らかになった。</p> <p>⑤に関して、魚類環境 DNA メタバーコーディングの実験手法をマニュアル化することにより、各種技術を環境省へ移転することができた。これらのマニュアル化された技術を利用することで再現性の高い調査結果が誰でも得られることになる。</p>
--	---

サブテーマ2 目標	目標の達成状況
<p>本サブテーマでは、深海性の無脊椎動物を対象とした環境DNAメタバーコーディング手法を開発し、深海の無脊椎動物相を把握する手法として確立する。具体的な内容は以下の通りである。</p> <p>①刺胞動物（花虫綱、鉢虫綱）、甲殻類（十脚目、端脚目、等脚目）、棘皮動物（ヒトデ綱、ウニ綱、ナマコ綱、クモヒトデ綱、ウミユリ綱）、軟体動物（腹足綱、二枚貝綱、頭足綱）を対象としたプライマーを開発する。同時に、それぞれのプライマーを用いる際の実験条件を確立する。</p> <p>②同定された標本と紐づいたDNAのシーケンス情報を取得し、リファレンス配列を充実させる。これに関連して、次世代シーケンサーから出力されたデータを処理する解析パイプラインを構築し、種判別精度を高めるとともに、リファレンスの不足により種の同定が困難なデータについて、種に相当する遺伝子配列の分類単位をまとめる手法を確立する。</p> <p>③実水域で採集された環境DNAを本サブテーマで確立した手法を用いて解析し、サブテーマ1によって取得される脊椎動物のデータとあわせて、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。</p>	<p><u>目標どおりの成果をあげた。</u></p> <p>以下に示すとおり、当初掲げた 3 つの目標をいずれも達成できた。</p> <p>①に関して、当初掲げた無脊椎動物群のうち、軟体動物の腹足綱、二枚貝綱を除きすべての分類群でプライマーを開発し、実験条件を確立、深海サンプルへの適用に成功した。腹足綱、二枚貝綱についてはプライマーの開発までは完了したものの、深海サンプルからの検出がなく、実験条件の修正が必要である可能性がある。一方で、当初の予定になかった甲殻類のオキアミ目、アミ目、口脚目についても分析系が確立することができた。また、DNAの新たな保存・抽出方法の開発に成功し、DNAの収量を倍程度に高めることができた。これらの理由から、総合的には①の目標を達成できたものと判断する。</p> <p>②に関して、合計 1,235 種の新たなリファレンスシーケンスを取得し、代表的な分類群について目レベルでの同定が可能となった。また、リファレンスの不足により種の同定が困難なデータについて、種に相当する遺伝子配列の分類単位として ASV(Amplicon Sequence Variant) を用いることができることを示した。これらの理由から、②の目標を達成できたと判断する。</p>

	<p>③に関して、太平洋の深海のサンプルから合計 191 種の無脊椎動物種の DNA を検出することに成功し、この手法を用いることで、検出種のリストから生物学的多様性の情報を得ることができると示した。将来的にレッドリストなどの情報が充実すれば、唯一種、希少種、絶滅危惧種、指定書掲載種の情報も得ることができると思われる。実際にダイオウイカの DNA が 5 箇所検出されるなど、希少種の情報を得られることが実証できた。これらの理由から、③の目標を達成できたと判断する。</p>
--	--

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

13件

<主な査読付き論文>

- 1) Wu, Q., & Minamoto, T. (2023). Improvement of recovery yield of macro-organismal environmental DNA from seawater samples. *Analytical Sciences*. (In press.) (IF: 1.967)
- 2) Zhu, T., Sato, T., Sado, T., Miya, M. & Iwasaki, W. (2023). MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish pipeline: updates in 10 years. *Molecular Biology and Evolution* 40(3): msad035. (IF: 8.800)
- 3) Komai, T., Tsuchida, S., Fujiwara, Y. (2023) A new deep-sea palaemonid shrimp assigned to *Periclimenes* Costa, 1844 (Decapoda: Caridea) from the West Mariana Ridge, northwestern Pacific. *Zootaxa* 5231(4): 376–392. (IF: 1.091)
- 4) Okanishi, M., Kohtsuka, H., Wu, Q., Shinji, J., Shibata, N., Tamada, T., Nakano, T., Minamoto, T. (2023). Development of two new sets of PCR primers for eDNA metabarcoding of brittle stars (Echinodermata, Ophiuroidea). *Metabarcoding & Metagenomics* 7: e94298. (h-index: 14)
- 5) Fujiwara, Y., Tsuchida, S., Kawato, M., Masuda, K., Sakaguchi, O.S., Sado, T., Miya, M. & Yoshida T. (2022). Detection of the largest deep-sea-endemic teleost fish at depths of over 2,000 m through a combination of eDNA metabarcoding and baited camera observations. *Frontiers in Marine Science* 9: 945758. (IF: 5.247)
- 6) Oka, S. I., Miya, M., & Sado, T. (2022). Gravity filtration of environmental DNA: A simple, fast, and power-free method. *MethodsX* 9: 101838. (IF: 1.837)
- 7) Komai, T., Tsuchida, S., Fujiwara, Y. (2022). New record of a rarely collected caridean shrimp *Bathypalaemonella pandaloides* (Rathbun, 1906) (Decapoda: Bathypalaemonellidae) from the West Mariana Ridge, northwestern Pacific. *Zootaxa* 5129(2): 272–284. (IF: 1.091)
- 8) Miya, M. (2022). Environmental DNA metabarcoding: A novel method for biodiversity monitoring of marine fish communities. *Annual Review of Marine Science* 14: 161–185 (IF: 16.561)
- 9) Minamoto, T. (2022). Environmental DNA analysis for macro-organisms: Species distribution and more. *DNA Research* 29: dsac018. (IF: 4.477)
- 10) Kawato, M., Yoshida, T., Miya, M., Tsuchida, S., Nagano, Y., Nomura, M., Yabuki, A., Fujiwara, Y. & Fujikura, K. (2021). Optimization of environmental DNA extraction and amplification methods for metabarcoding of deep-sea fish. *MethodsX* 8: 101238. (IF: 1.837)

6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0件
その他誌上発表（査読なし）	0件
口頭発表（学会等）	11件
「国民との科学・技術対話」の実施	25件
マスコミ等への公表・報道等	22件以上
本研究費の研究成果による受賞	0件
その他の成果発表	1件

7. 国際共同研究等の状況

2020年9月に開催された国連国際海底機関（ISA: International Seabed Authority）(<https://www.isa.org.jm/>) が主催するワークショップ「深海生物分類の標準化：共同研究に基づく戦略的アプローチ(Workshop on Deep-Sea Taxonomic Standardization: Strategic Approaches for Collaboration)」で講演を行い、MiFish 法が深海性魚類のモニタリングに有用であることを本課題の成果に基づき発表した。その結果、各国の研究者から問合せが相次ぎ、国際共同研究のプロポーザルを出すなどした。

国連教育科学文化機関（UNESCO）が2023年から進める「海洋世界遺産 20 海域の魚類相調査プロジェクト（eDNA Expeditions in Marine World Heritage Sites）」で本課題の研究代表者（宮）がアドバイザーボードの1人となった。主催者ならびに世界各国のアドバイザーボードメンバーとのミーティングが何回かにわたって行われ、本課題で実施した研究成果に基づき魚類群集モニタリングにおける MiFish 法の優位性を示した。その結果、上記プロジェクトで MiFish 法が標準法として採用されることになった。

MiFish 法については、原典となる Miya et al. (2015) が2023年5月1日現在で832件引用されており、140以上の実証的研究が三大洋六大陸の海洋・汽水・陸水生態系で実施された。これらの研究には、カナダ東岸沖合の深海や太平洋外洋域において行われた研究も含まれており、調査海域やその深淺、さらには魚類分類群を問わずに MiFish 法が普遍的に適用できることを示している。なお、本論文は *Royal Society Open Science* 誌が2014年に創刊して以来出版された4,298編の論文のうち、過去12ヶ月ならびに通算の被引用数で第4位にランクされている。

また、カナダのゲルフ大学教授 Mehrdad Hajibabaei 博士が主導して、International eDNA Standardization Task Force (iESTF) を立ち上げ、環境 DNA メタバーコーディングを生物多様性モニタリング手法として ISO 化を試みている。この会合には、サブテーマ2の研究代表者である源博士がメンバーとして加わっており、MiFish 法を含む各種環境 DNA 実験手法の国際標準化に取り組むことになっている。サブテーマ1で至適化された MiFish 法に加えて、サブテーマ2で開発された無脊椎動物群のプライマーと実験法が国際標準法に採用される可能性も出てきた。

8. 研究者略歴

1) 宮 正樹

東京大学大学院農学研究科博士課程修了、農学博士を授与される。その後、千葉県博物館準備室・主任技師、千葉県立中央博物館・動物学研究科長、生態環境研究部長などを経て、現在、動物学研究科主任上席研究員（定年退職・再任用）。

2) 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）を授与される。その後、産業技術総合研究所特別研究員、総合地球環境学研究所上級研究員などを経て、現在、神戸大学大学院人間発達環境学研究科教授。

II. 成果の詳細

以下の2つのサブテーマでは、1) 5つの海洋深層水汲み上げ施設から得られた環境DNAと、2) 3回の研究航海で得られた実海域から得られた環境DNAを実験手法の開発ならびに実証試験にあたって共有した。これらの環境DNAを得た採水地点図(図II-1)と、採水深度・ろ過量等を示した一覧表(表II-1/2)を冒頭に示すことで、重複を避けることとした。



図II-1. 5つの海洋深層水汲み上げ施設(赤)と3回の研究航海で採水と現場ろ過を実施した測点(青)の位置図。

1) 海洋深層水汲み上げ施設からの採水とろ過：沖縄県海洋深層水研究所（沖縄県島尻郡久米島町）、高知県海洋深層水研究所（高知県室戸市）、みえ尾鷲海洋深層水アクアステーション（三重県尾鷲市）、こしき海洋深層水株式会社（鹿児島県薩摩川内市）、株式会社ディーエイチシー海洋深層水研究所（静岡県伊東市）の協力を得て、各汲み上げ施設において原水蛇口からの水圧を利用した深層水のろ過を行った。ろ過にあたっては、市販の塩ビ管に各種アダプターを接続したろ過装置(図II-2)を自作した。このろ過装置を原水蛇口とビニルホースを介して接続し、末端にルアーロックを介してステリベクスフィルターを取り付けた。フィルターの出水孔にはろ過水量を測定するために流量計を取り付け、1サンプル当たり約20リットルのろ過を行った（甌島のみ目詰まりを起こしたために約18リットル）。



図II-2. 深層水原水の取水口(原水蛇口)に自作のろ過装置を接続し、汲み上げ水圧によるろ過を行っているところ。フィルターの出水孔に流量計を取り付けることでろ過水量をモニターした。4連のろ過装置を縦列することにより同時に8本のフィルターによる並列ろ過が可能となる。

各施設で8個のステリベクスフィルターを同時に用いた並列ろ過（図II-2）を3回ずつ実施した（甌島のみフィルターが目詰まりを起こしたために2回）。得られた24本のフィルターからカートリッジ内の海水を除去した後に核酸劣化防止剤（RNAlater）を注入し、サブグループ1と2に12本ずつ分与した（甌島のみ8本ずつ分与）。サブグループ1は千葉県立中央博物館で、サブグループ2は神戸大学で、それぞれDNA抽出を行い実験に供した。これら海洋深層水汲み上げ施設で取得したサンプルに関するデータを表II-1に示す。

表II-1. 海洋深層水汲み上げ施設でろ過したサンプル一覧

施設	深度	年月日	ろ過量	サンプル数
伊豆赤沢	800 m	2021年11月24日	480 L	24本
尾鷲	415 m	2021年10月20日	480 L	24本
室戸	320 m	2021年12月15日	480 L	24本
甌島	375 m	2021年12月8日	280 L	8本
久米島	612 m	2021年12月17日	480 L	24本

2) 研究航海における実海域からの採水とろ過：海洋研究開発機構の研究船「かいめい」が2020年と2021年に実施した2回の研究航海、ならびに同機構所属の研究船「よこすか」が2022年に実施した1回の研究航海において深層水の採水が行われた（表II-2）。調査地点は西七島海嶺ならびにその隣接海域で、2020年と2021年にはロゼット採水装置に装着されたニスキン採水器を用いた採水が計7つの海山の山頂とその斜面において行われ、2022年にはランダーとベイトカメラおよび調査潜水艇（しんかい6500）に装着されたマスポンプによる現場ろ過が宝永海山と駿河湾において行われた。前者のニスキン採水器で採水された深層水については、船上でステリベクスフィルターを用いた吸引ろ過が行われ、ろ過終了後にフィルター内に核酸劣化防止剤（RNAlater）が注入され、陸上実験施設において環境DNAの抽出が行われた。後者の現場ろ過については、ステリベクスフィルター回収後に船上で核酸劣化防止剤が注入され、前者と同様に陸上実験施設において環境DNAの抽出が行われた。

表II-2. 実海域から得られたサンプル一覧

地点	場所	器具	深度	年月日	ろ過量	サンプル数
正保海山	山頂	ニスキン	356m	2020年11月28日	89L	3
	斜面	ニスキン	2000m	2020年11月25日	107L	3
正徳海山	山頂	ニスキン	350m	2020年12月1日	106L	3
	斜面	ニスキン	2000m	2020年11月26日	97L	3
立冬海山	山頂	ニスキン	530m	2020年12月5日	108L	3
	斜面	ニスキン	2000m	2020年12月6日	108L	3
日光海山	山頂	ニスキン	400m	2020年12月9日	108L	3
	斜面	ニスキン	2000m	2020年12月10日	108L	3
安永海山	山頂	ニスキン	800m	2021年10月18日	107L	3
	斜面	ニスキン	2000m	2021年10月19日	108L	3
元禄海山	斜面	ニスキン	2059m	2021年10月4日	108L	3
宝永海山	斜面	自動ろ過（6K-1）	2175m	2022年9月25日	79L	4
	斜面	自動ろ過（ランダー）	2178m	2022年9月26日	---	6
	斜面	自動ろ過（6K-2）	2132m	2022年9月26日	---	4
駿河湾	海底直上	自動ろ過（6K）	1368m	2022年9月23日	109L	3
	海底直上	自動ろ過（ベイトカメラ）	1224m	2022年9月23日	1784L	6
	海底直上	自動ろ過（ランダー）	1200m	2022年9月23日	1166L	12

II-1 脊椎動物における調査方法の開発と実践,ならびに基盤データの整備

千葉県立中央博物館 資料管理研究科	宮 正樹
一般財団法人 沖縄美ら島財団総合研究センター	岡 慎一郎
国立研究開発法人 国立環境研究所 琵琶湖分室	馬淵 浩司

[要旨]

本サブテーマでは、魚類を中心とする深海の脊椎動物相を把握する新たな手法として、魚類環境 DNA メタバーコーディング手法を確立し、実海域から取得したデータから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案することを目的とした。既存の実験手法が深海性魚類に適用可能かどうか検証して問題がないことを確認した上で、新たな DNA ポリメラーゼを用いることで実験効率の大幅な向上が図られることを明らかにした。また、超並列シーケンサから出力される大量データを分析する新たな解析パイプラインを構築し、リファレンス配列を充実させることで種判定の精度を高めた。上記の新たに開発された実験手法とデータ解析手法により、全国の5つの海洋深層水汲み上げ施設から得られた環境 DNA をメタバーコーディング法で分析したところ、深海性魚類群集の種数推定に関しては、累積種数曲線が飽和しておらず、今後のさらなる調査が必要であることが示唆された。一方、種組成に関しては非計量多次元尺度法により三次元的な異質性を検出できた。また、複数回の調査を行った施設に関しては、季節性を示すと思われる魚類群集の周期的変動が認められた。同様に、3回の研究航海において西七島海嶺ならびにその隣接海域の海山頂上や斜面等の実海域から得られた環境 DNA を分析したところ、3つの海山斜面の深度約 2,000m から近年駿河湾で発見された大型高次捕食者であるヨコヅナイワシが検出された。また、種数に関しては種数累積曲線が飽和しておらず、海洋深層水と同様に今後のさらなる調査が必要であることが示唆された。一方、種組成に関しては非計量多次元尺度法により三次元的な異質性を検出できた。全体を通じて、本研究で開発した手法によって、魚類に関して重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報取得が可能になり、当初設定した5つの研究目標についてはすべて達成できた。一方、ヨコヅナイワシのサイズや行動に関してベイトカメラで得られた貴重な生物学的情報については環境 DNA からは把握することができないことも浮き彫りとなった。今後は、直接採集や映像観察などの伝統的方法と環境 DNA を用いたモニタリングを併用することが、海洋保護区の生態系保全にとって望ましいと考えられた。最後に、本サブテーマで確立した実験手法をマニュアル化し、実験者に依存しない再現性の高い調査が実施できるようにした。

1. 研究開発目的

本サブテーマでは、環境 DNA メタバーコーディング法を魚類を中心とする深海性脊椎動物で確立し、取得したデータから科学的な重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案することを大きな目的とした。この目的を達成するために、全国各地の施設で汲み上げられている海洋深層水や、研究調査船で実海域から得られた深層水に含まれる環境 DNA を分析し、本課題で提案する環境 DNA メタバーコーディング法の有効性を検証した。また、これと並行してリファレンス配列を各分類群で充実させることで、本手法における種判定の精度向上を図る。さらに、本サブテーマで確立した実験手法をマニュアル化し、汎用性と再現性の高いものとした。

2. 研究目標

本サブテーマでは、深海性の脊椎動物を対象とした簡便・迅速な深海生態系モニタリング法構築を目標とする。そのため、魚類を中心とした深海性脊椎動物を対象に環境 DNA メタバーコーディング法(同時並列多種分析法)を確立する。その具体的な内容については以下の通りである。

- ① 既存の PCR プライマーを深海性分類群に対して最適化すると共に、海洋深層水を利用して採水・ろ過などのサンプル処理法やライブラリ調整等の実験法を確立する。
- ② 標本と DNA 塩基配列を紐付けた深海性分類群のリファレンスデータを充実させ、超並列シーケ

ンサーから出力される大量データを処理する解析パイプラインを構築し、種判定精度を高める。

③ 全国各地の海洋深層水で得られた環境 DNA を分析することにより、深海性魚類群集の時空間動態を明らかにする。

④ 海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される水深ならびに実海域から得られた環境 DNA を本研究で確立する手法により分析し、データから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。

⑤ 以上で得られた各種技術を環境省へ移転し、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の継続的で効率的なモニタリングを可能にする。

3. 研究開発内容

3-1) 魚類を対象とした実験手法の効率化

本研究では、日本周辺海域に出現すると想定される深海性魚類を既存の文献からリストアップした。これら分類群の DNA 塩基配列（既存のデータに加えて新たに決定したデータ）と、MiFish プライマー¹⁾の配列を比較することによって、深海性魚類に対する至適化が必要かどうか判断した。これまでの実験手法では、環境 DNA の抽出後に希薄な魚類環境 DNA（ミトコンドリアゲノムの 12S rRNA 遺伝子断片）を増幅する際（第一段階の PCR；以降 1st PCR と略）、環境水中で圧倒的に優占する微生物 DNA の非特異的増幅（核ゲノムの 16S rRNA 遺伝子断片）が顕著であった。このため、魚類由来の増幅産物を実験途中で切り出し、魚類解析用のライブラリーを調整する必要があった。微生物由来のテンプレート DNA 配列とプライマー DNA 配列の違いが大きいかかわらず、このような非特異的増幅が起こるのは DNA ポリメラーゼの特異性が低いことが原因だと想定し、より特異性が高い新たな DNA ポリメラーゼを用いることでこの問題を回避できると考えた。このような想定に基づき、新たな実験手法とその至適実験条件を探索した。

3-2) リファレンス配列の充実と解析パイプラインの構築

MiFish 法により、超並列シーケンサーから数百万本を超える大量の魚類環境 DNA データが出力される。この大量データを用いて確度の高い種同定を行うためには、正しく種同定された標本に紐づくリファレンス配列が必要となる。本サブテーマでは、日本産深海魚を文献からリストアップし、それらの組織標本を収集した。組織標本から DNA を抽出し、MiFish 法で使われるミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子の断片の配列をサンガーシーケンスにより決定した。また、世界各国から公表されるデータを逐次収集し、自身で決定したデータに加えてリファレンス配列を充実させた。

一方、上記の手法により出力される大量の DNA 塩基配列データには、誤った塩基の取り込みに由来する超並列シーケンサー固有のエラーが多数含まれる。誤った塩基が取り込まれる位置はランダムなので、これをモデル化することでエラーを自動補正（デノイズング）することができる。本サブテーマでは、このデノイズングのステップを含む新たな解析パイプラインをデータベース MitoFish 上に構築して公開した。さらに、このパイプラインに各種の生物多様性解析機能を搭載し、利用者の便宜を図った。

3-3) 海洋深層水を用いた深海性魚類の検出

本サブテーマでは、沖合海洋保護区に比較的近い 5 つの深層水汲み上げ施設（静岡県伊豆赤沢・三重県尾鷲・高知県室戸・鹿児島県甕島・沖縄県久米島）を選び、各施設で海洋深層水を現場ろ過した。現場ろ過にあたっては、冒頭に示した自作のろ過装置を原水蛇口に取り付け、その末端に各種アダプターを介してステリベクスフィルターを取り付けた（図 II-2）。ステリベクスフィルター下流の出水孔に流量計を取り付けることによってろ水量を推定した。4 本のフィルターカートリッジを用いた並列ろ過（最大 20 リットル）を 3 回実施し、各施設で計 12 本のフィルターを得た（甕島のみフィルターの目詰まりが起きたために 8 本）。ろ過終了後にフィルターカートリッジを装置から外し、シリンジでフィルター

出水孔から余剰水を抜き取り、入水孔から核酸劣化防止剤（RNAlater もしくは Buffer ATL）を注入し、冷蔵して実験室に持ち帰った。

いったんフィルターカートリッジを凍結した後、解凍してから Miya et al. (2016) の手法²⁾を用いて環境 DNA をフィルター残渣から回収した。回収した環境 DNA を用いて MiFish 法による魚類環境 DNA メタバーコーディングを行った。また、各種の生物多様性解析を行い、日本沿岸の深海性魚類群集の空間変動を明らかにした。また、久米島の海洋深層水については、2020 年 12 月から 2022 年 3 月まで計 6 回の調査を実施し、深海性魚類群集の時間変動について検証した。

3-4) 実海域サンプルを用いた魚類群集解析

2020 年から 2022 年にかけて海洋研究開発機構所属の海底広域研究船「かいめい」ならびに深海潜水調査船支援母船「よこすか」による計 3 回の研究航海が実施された。これらの航海で、計 7 つの海山山頂と斜面、ならびに駿河湾奥において、ロゼット採水装置を用いた近底層における採水と、フリーフォールランダーに装着した自動採水ろ過装置（マスポンプ）による海底直上の採水と現場ろ過を行った（表 II-2）。前者については、深層水を採取後に船上でろ過を行い、後者については船上でフィルターカートリッジを回収し、いずれも陸上実験室で Miya et al. (2016) の手法²⁾を用いて環境 DNA を抽出した。抽出した環境 DNA を用いて MiFish 法によるメタバーコーディングを行い、出力された分類群表を用いて生物多様性解析を行い空間変動を明らかにした。

3-5) 実験手法のマニュアル化と環境省への技術移転

以上で得られた各種実験技術をマニュアル化して、統一された手法の下で汎用性と再現性の高い結果が得られるようにした。

4. 結果及び考察

4-1) 魚類を対象とした実験手法の効率化

日本周辺海域に出現すると想定される深海性魚類を既存の文献から抽出した結果、34 目、201 科、608 属に含まれる 1,302 種がリストアップされた。これらの分類群から得られる MiFish プライマー領域の塩基配列、34 目、188 科、492 属に含まれる 856 種と MiFish プライマーの配列を整列させて目視で比較したところ、現状では深海性魚類に対する新たな至適化は必要ないと判断された。ただし、今後深海における魚類環境 DNA メタバーコーディング調査が進み、本来生息しているはずの魚種が検出されない事例が生じる可能性は十分にある³⁾。そのような場合は、該当種の塩基配列を参照して MiFish プライマーの塩基配列を至適化することにより、抽出した環境 DNA に含まれるにもかかわらず検出されない種が出てくる偽陰性を回避できる。

これまで、MiFish 法では環境 DNA 断片の増幅に KAPA HiFi DNA ポリメラーゼ（以下 KAPA と略）を用いてきた。本酵素は希薄な環境 DNA を効率的に増幅することで、環境 DNA 学会が発行するマニュアルでも用いられてきたが、環境 DNA で圧倒的に優占する微生物由来の DNA を増幅してしまう欠点ももっていた³⁾。そこで、プライマー配列とテンプレート DNA との特異性が高いとされている、Platinum SuperFi II DNA ポリメラーゼ（以下 SuperFi II と略）を、静岡県水産技術研究所駿河湾深層水水産利用施設（焼津市）の海洋深層水から得られた環境 DNA をテンプレートに魚類環境 DNA の増幅を試みた。その結果、KAPA では常に約 400bp に微生物由来の非特異的産物のピークが見られるのに対して、SuperFi II ではそのような産物が見られず魚類由来の産物が突出していた（図 1-1）。従来は、アガロースゲル上で 1st PCR 産物を泳動することでこの非特異的産物を除去していたが、SuperFi II を用いることでこのステップが不要になり、実験効率が格段に向上した⁴⁾。

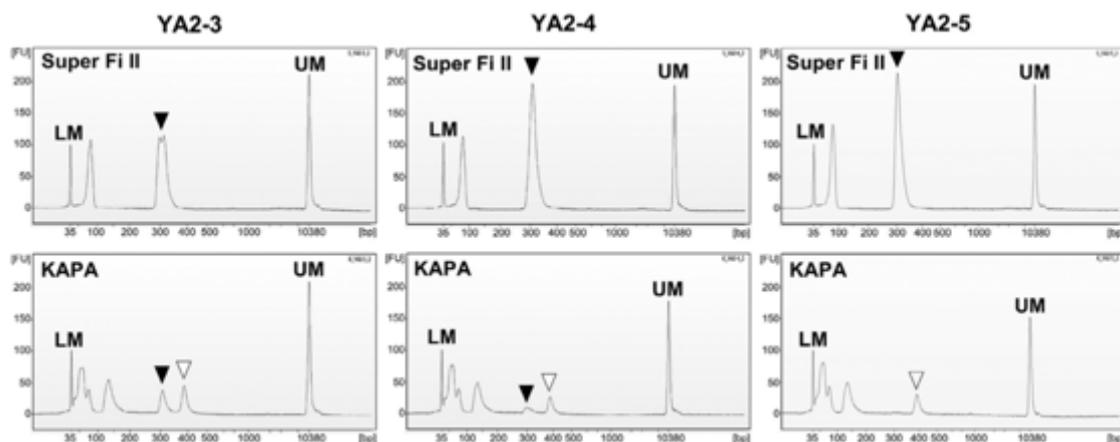


図 1-1. 海洋深層水を現場ろ過して得られた環境 DNA をテンプレートに、MiFish 法による 1st PCR を 2 種類の DNA ポリメラーゼ (SuperFi II と KAPA) を用いて行い、TapeStation で産物の電気泳動を行ったフェログラム。横軸は増幅産物長 (bp)、黒三角が魚類由来の特異的産物、白三角が微生物由来の非特異的産物のピーク。

4-2) リファレンス配列の充実と解析パイプラインの構築

文献からリストアップした日本産深海性魚類 1,302 種のうち、最終的に 34 目、188 科、492 属に含まれる 856 種からの MiFish 領域の配列を収集した。組織標本から DNA を抽出し、MiFish 法で使われるミトコンドリア 12SrRNA 遺伝子の断片の配列を決定した。また、世界各国から公表されるデータを逐次収集し、自身で決定したデータに加えてリファレンス配列を充実させた。その結果、日本産深海魚のリファレンス配列網羅率は目で 100%、科で 93.0%、属で 80.5%、種で 65.6% となり、少なくとも科レベルでは高い精度で分類群の帰属が判定できることになった。

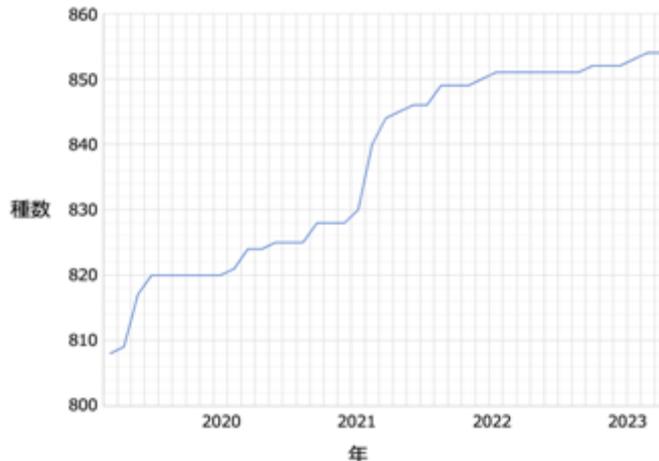


図 1-2. プロジェクト開始時 (2020 年 4 月) から終了時 (2023 年 3 月) までに収集・決定した日本産深海性魚類の MiFish 配列種数の経年変化。最終的に 34 目、188 科、492 属に含まれる 856 種からリファレンス配列を得ることができた。

リファレンス配列の充実に加えて、エラー配列を効果的に補正する UNOISE3 を適用することにより、デノイズングのステップを含む新たな解析パイプラインを構築した。この解析パイプラインは、超並列シーケンサから出力される塩基配列のクオリティーチェック、信頼度の低い末端部のトリミング、ペアエンドリードの結合、断片長に基づくフィルタリング、プライマー配列の除去を経て、UNOISE3 によるエラー配列の補正とユーザーが設定する閾値に基づくクラスタリングを行う (図 1-3)。さらに、クラスタリングを行った配列から代表配列 (リード数最多の配列) を抜きだし、リファレンス配列と比較して一致率が最も高いものにその分類群名を割り当てる。既存のデータを用いて新たな解析パイプラインで再解析を行ったところ、公表された論文では検出されなかった魚種が複数検出されたことから、

希少種の検出にもきわめて有効であると考える⁵⁾。

一連の基本的解析が終了すると、オプションで各サンプルのリード数に基づく相対量や多様度指数、種ごとの保全状況や水産資源としての重要性の一覧を作成し、さらに種判定精度を高めるための系統樹を算出する。また、MiFish プライマーだけでなく MiDeca プライマーを初めとする他のプライマーを用いた環境 DNA メタバーコーディングにも適用可能である。なお、この解析パイプラインは魚類ミトコンドリアゲノムに特化したデータベース MitoFish の機能の一つとして <http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp> で一般に公開されている⁵⁾。

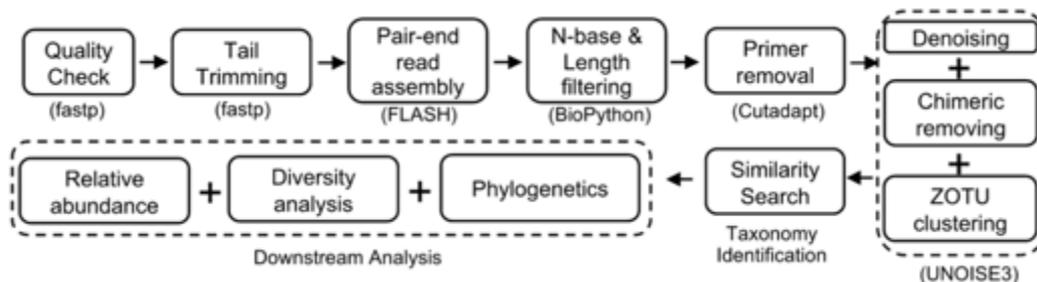


図 1-3. 新たな解析パイプラインのフローチャート。破線で囲んだ部分が従来の解析パイプラインをアップデートした箇所。UNOISE3 を用いることでエラー配列の補正が可能になり、種判定の精度が高まった。

4-3) 海洋深層水を用いた深海性魚類の検出

原水蛇口を利用して現場ろ過を行った 5 つの深層水汲み上げ施設では、静岡県伊豆赤沢で計 125 種、三重県尾鷲で計 104 種、高知県室戸で計 53 種、鹿児島県甕島で計 31 種、沖縄県久米島で計 136 種の深海性魚類が検出された。これらの検出された深海性魚類を合計すると 289 種になり、日本産深海性魚類の種数の 22.2% を検出できたことになる。総検出種数を比較してみると、取水口の深度が 400m 未満の 2 つの施設（甕島・室戸）で 31 種と 53 種と比較的少なく、それより深い 3 つの施設（伊豆赤沢・尾鷲・久米島）でいずれも 100 種を超えた。また、検出種数をサンプルごとにプロットしても同様の傾向が明瞭に見られた（図 1-4）。検出種数の違いが深度差によるものなのか、地域差によるものなのか不明であるが、調査が行われたのが 2021 年 10 月から 12 月と比較的短期間であることから、季節差によるものでないことは確かであろう。甕島の検出種数が少ないのは、フィルターの目詰まりが起り、サンプル当たりのろ過量が少なく、サンプル数も少なかったことが部分的に原因になっている可能性がある。

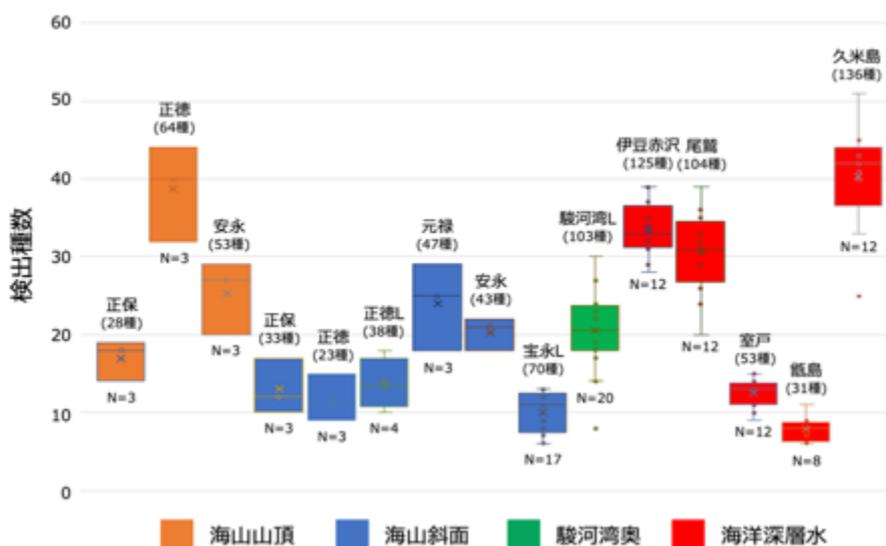


図 1-4. 実海域と海洋深層水から検出された 1 サンプル当たりの深海性魚類の種数のバラツキを箱ひげ図で示した。実海域については、海山山頂、海山斜面、駿河湾奥に色分けして示した。括弧内の数字は総検出数で、N は総サンプル数を示す。

総検出種数が現場の魚類相をどれだけ反映したものか、累積種数曲線をプロットすることで検討してみた（図 1-5）。海洋深層水については、5つの施設で検出された総種数は400近くに達し、外挿した曲線は飽和することなく上昇傾向が続いている。日本産深海性魚類の総種数が約1,300種であることを考えると、環境DNAによる調査でも依然として魚類相の一部を把握しているにすぎないことを示唆している。

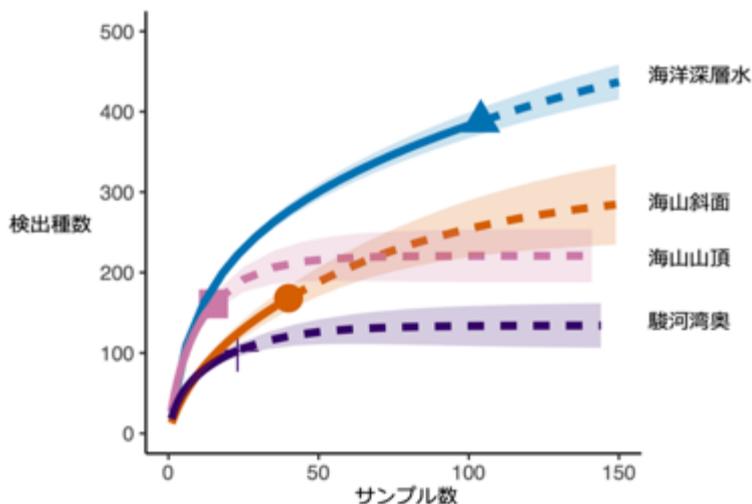


図 1-5. 実海域と海洋深層水から得られたサンプルをランダム化して累積種数曲線をプロットした。実海域については、海山山頂、海山斜面、駿河湾奥に色分けて示した。

海洋深層水の環境DNAから検出された魚類群集の非類似度に基づき、非計量多次元尺度法を用いてその違いを二次元に展開した（図 1-6）。400m以浅から取水している室戸と甕島の魚類群集は良く類似しており、両者間に統計的有意差は認められなかった。一方、それ以外の400m以深から取水している伊豆赤沢、尾鷲、久米島の沖合から検出された魚類群集は、それぞれ固有の95%信頼楕円を有していた。相模湾の沖合の深度800mから取水している伊豆赤沢から検出された魚類群集は、隣接する駿河湾の2000m以深から検出された魚類群集の95%信頼楕円内に位置し、地域性が反映された結果となった。短期間（2021年10月から12月）に行われた調査でこのような結果が得られたことは、環境DNAから検出された沿岸の深海性魚類群集に関するデータが、水平的（地理的）にも鉛直的にも有用な情報を提供したことを示唆している。

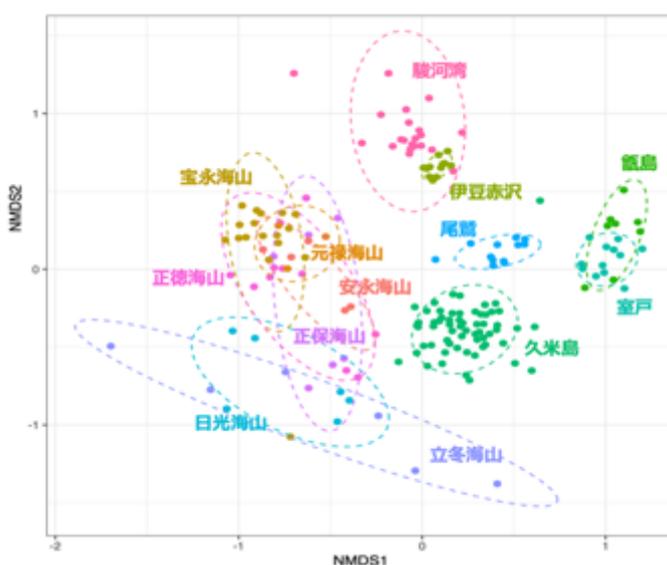


図 1-6. 非計量多次元尺度法により、実海域と海洋深層水の環境DNAから得られた魚類群集組成の違いを二次元に展開した。破線は各地点の95%信頼楕円。

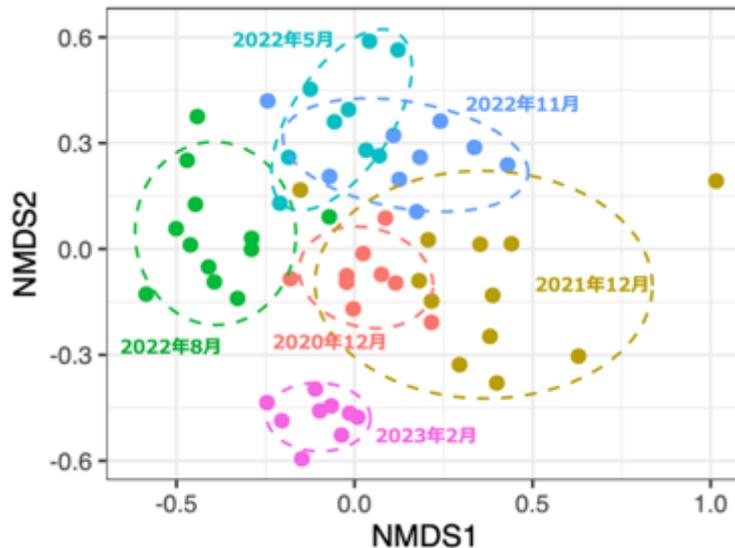


図 1-7. 非計量多次元尺度法により、久米島の海洋深層水の環境 DNA から得られた魚類群集組成の季節的違いを二次元に展開した。破線は各地点の 95%信頼楕円。

久米島の海洋深層水については、2020 年 12 月から 2023 年 2 月にかけて計 6 回の調査を行い、環境 DNA から検出される魚類群集に季節的な違いがあるかどうか検討した。魚類群集のサンプル間の非類似度を算出し、非計量多次元尺度法により二次元に展開したところ、最初に調査を行った 2020 年 12 月の魚類群集の 95%信頼楕円は同じ月（2021 年 12 月）の 95%信頼楕円にほぼ含まれていた。また、さらに 1 年後の 2022 年 11 月の魚類群集の信頼楕円は一部 2021 年 12 月に含まれているのに対し、2022 年 5 月、2022 年 8 月、2023 年 2 月の魚類群集の信頼楕円は、互いにほとんど接することなく、固有の信頼楕円内に位置づけられた。これらの結果は、取水口近辺の深海性魚類群集の出現に周期性があることを示唆しており、今後さらに調査や解析を進めることにより、深海性魚類群集の組成に時間的な動態があるかどうか明らかになっていくと思われる。

4-4) 実海域サンプルを用いた魚類群集解析

実海域でニスキン採水器により採取した海水からは、海山山頂と斜面の両方でサンプリングした測点については、正保海山でそれぞれ 28 種と 33 種、正徳海山で 64 種と 23 種、安永海山で 53 種と 43 種の深海性魚類が検出された（図 1-4）。ニスキン採水器を装着したロゼット採水装置は、機器損失の危険を避けるために海底直上での採水ができないが、深海性魚類の環境 DNA に関してはこのような方法でも検出可能であることが明らかになった。1 サンプル当たりの検出種数を比べると、全体的に海山山頂の方が斜面より種数が多い傾向が認められたが、サンプル数が 3 と小さいため、今後のさらなる調査が必要であろう。

2022 年の研究航海では、宝永海山斜面と駿河湾奥でニスキン採水器とフリーフォールランダーに装着したマスポンプ（自動採水・ろ過装置）の両方でサンプルを採取することができた（図 1-8）。ろ過装置がうまく動作しなかった宝永海山の外れ値 1 点と駿河湾奥の 2 点を除いて、両者のあいだには統計的有意差は認められなかったため、ランダーのように海底直上に設置することができる装置であれば、両者を併用することも可能であると思われる。

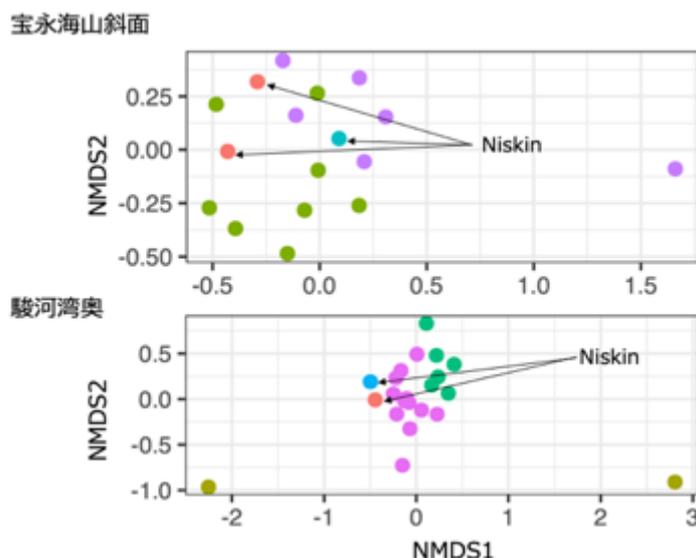


図 1-8. 非計量多次元尺度法により、宝永海山斜面と駿河湾奥の環境 DNA から得られた魚類群集組成の違いを二次元に展開したグラフ。Niskin と示した点はフリーフォールランダーかベイトトラップに装着されたニスキン採水器から得られた海水を分析したもの。それ以外は、ランダーもしくは潜水艇に装着されたマスポンプで採水・現場ろ過により得られた環境 DNA を分析したもの。

累積種数曲線を見てみると、海山山頂と駿河湾奥は両方とも飽和の傾向を見せているが、海山斜面については明瞭な飽和に達していない（図 1-5）。これについても、サンプル数が少ないため今後のさらなる調査が必要であろう。

今回の調査で最も特筆すべきことのひとつが、環境 DNA によるヨコヅナイワシの検出であろう。本種は、2020 年に駿河湾の水深約 2000m から発見された魚食性の大型高次捕食者で、これまで駿河湾以外の海域で発見されていない。今回、この模式産地から 400~600km 離れた正徳海山、元禄海山、ならびに安永海山の 3 つの海山斜面の環境 DNA から本種を検出することができた。これらの検出地点は、いずれも模式産地と同様に深度 2,000m 前後であることは駿河湾での採集水深と一致しており、本種が極めて深い深度に適応した大型捕食者であることが再確認された⁶⁾。

さらに、同時並行的に行われたベイトカメラを用いた映像観察では、元禄海山の水深 2,091m から本種を検出しているため（図 1-9）、環境 DNA と映像の両方が本種の検出に成功したことになる。なお、ベイトカメラと環境 DNA の努力量を比較する客観的な手法が確立されていないため、環境 DNA とベイトカメラのどちらの検出感度が高いか不明である。とはいえ、環境 DNA は 3 地点で本種を検出していることから、その検出能力はベイトカメラより広範囲である可能性がある。ベイトカメラは、行動やサイズなどの環境 DNA からは得られない情報を提供できることを考えると、両調査法が相補的であるのが妥当であり、今後も予算や時間が許す限り並行的に採用すべき調査法であると考えられる。

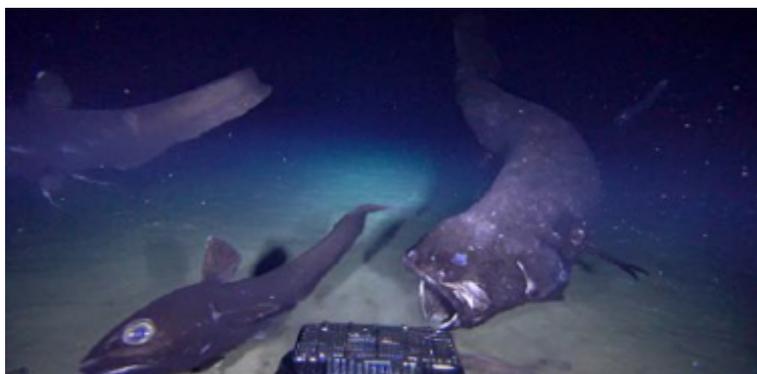


図 1-9. 元禄海山斜面の深度 2,091m に設置されたベイトカメラで撮影されたヨコヅナイワシ（右側の口を広げた個体）。同時に餌に集まったイバラヒゲ（左側の 2 個体）を、口を大きく開けて威嚇している様子がわかる（Fujiwara et al. 2022 の Figure 2 から引用）⁶⁾。

実海域の環境 DNA から検出された魚類群集の非類似度に基づき、非計量多次元尺度法を用いてその違いを二次元に展開した（図 1-6）。西七島海嶺海嶺に位置する正保、正徳、宝永、元禄、安永の 5 つの海山が近接し、その南に位置する日光と立冬の 2 つの海山とは離れていることから、環境 DNA メタバーコーディングで検出された魚類群集は地理的特徴を反映していると言って差し支えないであろう。同様に、日本列島の沿岸域に位置する駿河湾と 5 つの海洋深層水汲み上げ施設から検出された魚類群集とも大きく分離していることから、これらの海山で独自の魚類群集が形成されていると考えて良いと思われる。

最後に、海洋深層水汲み上げ施設ならびに実海域から検出された魚類環境 DNA には、表層性魚類のものが（わずかとはいえ）たびたび混入していた。多くの魚類が 200m を超える深海に出現することが報告されているため、検出された表層性魚類の環境 DNA がその場にいた個体のものか、あるいは表層から沈降してきたものなのか判断することは難しい。しかしながら、トビウオ類のように表層以外からの出現はまったく報告されていない種の環境 DNA が検出されることも多いため、明らかに一部のものは表層由来のものである。同様に、深海性魚類の中には海底からほとんど離れず生活している底生性のもの、海底付近を活発に泳ぎ回る近底層遊泳性のもの、さらには海底とはほとんど無関係に生活している中深層遊泳性のものなどさまざまな生活型をもつものがある。これらの環境 DNA が検出された場合、その場にいたものなのか、あるいは魚体から放出された環境 DNA が拡散したものなのか判断するのも困難である。いずれの場合も、このような偽陽性の問題は将来の研究課題となろう。

4-5) 実験手法のマニュアル化と環境省への技術移転

以上で得られた各種実験技術をマニュアル化して、統一された手法の下で再現性の高い結果が得られるようにした。本サブグループでは以下の「5.3.3. MiFish メタバーコーディング」から、「5.3.4. データ解析」までの計 24 ページの執筆を担当した（行末端の数字はマニュアル内での該当ページ）。

- 5.3.3. MiFish メタバーコーディング--- 67
 - 5.3.3.1. ライブラリーの調整① 1st PCR--- 67
 - 5.3.3.1.1. 1st PCR--- 68
 - 5.3.3.1.2. 1st PCR 産物の精製と濃縮--- 69
 - 5.3.3.1.3. 精製・濃縮済み 1st PCR 産物の定量と希釈--- 69
 - 5.3.3.2. ライブラリーの調整② 2nd PCR--- 70
 - 5.3.3.2.1. 2nd PCR--- 71
 - 5.3.3.2.2. 2nd PCR 産物の切り出し--- 73
 - 5.3.3.2.3. 切り出した 2nd PCR 産物の定量--- 73
 - 5.3.3.2.4. インデクス関連情報--- 74
 - 5.3.3.3. MiSeq を用いた超並列シーケンス--- 75
 - 5.3.3.3.1. MiSeq のメンテナンス--- 75
 - 5.3.3.3.2. シークエンスの下準備--- 76
 - 5.3.3.3.3. ライブラリー濃度の最終調整--- 76
 - 5.3.3.3.4. シークエンス開始前後の操作--- 77
- 5.3.4. データ解析 (usearch)--- 78
 - 5.3.4.1. 得られたリードのアセンブル--- 78
 - 5.3.4.2. プライマー配列の除去--- 78
 - 5.3.4.3. クオリティフィルタリング--- 78
 - 5.3.4.4. 合同配列をまとめる--- 78
 - 5.3.4.5. denoise して ASVs の作成--- 78
 - 5.3.4.6. リファレンス DB に参照した種の割り当て--- 78

4-6) 重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報取得

本サブテーマでは、魚類環境 DNA メタバーコーディング法を深海性魚類に対して至適化するとともに、データ解析法など各種技術を開発したりリファレンス配列を充実させたりすることにより、種判定

の精度を高めた。これは、本研究で開発した一連の手法を用いることで、重要海域の抽出基準・指定書及び保全計画書の指標としてあげられている以下の諸項目に関する情報が海水を採取するだけで得られることを意味している：1) 唯一性、又は希少性を示す唯一種および希少種；2) 絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地であることを示すレッドリスト掲載種；3) 脆弱性、感受性又は低回復性の指標となる指定書掲載種の DNA の検出；ならびに 4) 生物学的多様性の指標としての生息する分類群の種数と群集組成の把握。当然のことながら、これらの項目は単一の調査で得られるものでなく、今後の継続的な調査が不可欠である。

また、本研究で対象とした深海性魚類は希少性などの上記の情報が十分に存在するわけではない点には注意する必要がある。たとえば、環境省版の海洋生物レッドリストにおいて魚類は 219 種が評価対象となっているが、そのうち深海性魚類は 38 種を占めるにすぎない（表 1-1）。そして、その中で絶滅危惧種として掲載されているのは魚類全体で 105 種で、そのうち深海性魚類は 12 種にすぎない。しかも、その内訳は特定分類群に偏っており、板鰓類（サメ・エイ類）やメバル類が大半を占めている。前者は高次捕食者であり絶対数が少ないと推定されるもので、後者は漁獲圧が高い水産重要種である。一方、情報不足として掲載されているものは全体では 112 種で、そのうち深海性魚類は 26 種しかリストアップされていない。日本に生息する約 1,300 種の深海性魚類には生態や資源量が不明なものが多いことを考えると、評価が十分なされているとはいえないのが現状である。

表1-1. 環境省が発行するレッドリストにリストアップされている日本産深海性魚類と MiFish リファレンスデータの有無

目	科	学名	和名	MiFish	カテゴリー
スタウナギ	スタウナギ	<i>Eptatretus atami</i>	クロスタウナギ	○	準絶滅危惧 (NT)
スタウナギ	スタウナギ	<i>Myxine garmani</i>	ホソスタウナギ	○	情報不足 (DD)
スタウナギ	スタウナギ	<i>Myxine paucidens</i>	オキナホソスタウナギ	○	情報不足 (DD)
ギンザメ	テングギンザメ	<i>Harriota raleighana</i>	アズマギンザメ	○	情報不足 (DD)
ギンザメ	テングギンザメ	<i>Rhinochimaera africana</i>	クロテングギンザメ	○	情報不足 (DD)
ギンザメ	テングギンザメ	<i>Rhinochimaera pacifica</i>	テングギンザメ	○	情報不足 (DD)
ギンザメ	ギンザメ	<i>Chimaera phantasma</i>	ギンザメ	○	情報不足 (DD)
ギンザメ	ギンザメ	<i>Hydrolagus barbouri</i>	ココノホシギンザメ	○	情報不足 (DD)
ネズミザメ	オオワニザメ	<i>Carcharias taurus</i>	シロワニ	○	絶滅危惧B 類 (EN)
ネズミザメ	オオワニザメ	<i>Odontaspis ferox</i>	オオワニザメ	○	情報不足 (DD)
ネズミザメ	ミツクリザメ	<i>Mitsukurina owstoni</i>	ミツクリザメ	○	情報不足 (DD)
メジロザメ	トラザメ	<i>Cephaloscyllium umbratile</i>	ナヌカザメ	○	情報不足 (DD)
メジロザメ	ドチザメ	<i>Hemitriakis japonica</i>	エイラクブカ	○	準絶滅危惧 (NT)
メジロザメ	ドチザメ	<i>Mustelus manazo</i>	ホシザメ	○	準絶滅危惧 (NT)
メジロザメ	メジロザメ	<i>Carcharhinus obscurus</i>	ドタブカ	○	情報不足 (DD)
ラブカ	ラブカ	<i>Chlamydoselachus anguineus</i>	ラブカ	○	情報不足 (DD)
カグラザメ	カグラザメ	<i>Heptanchias perlo</i>	エドアブラザメ	○	情報不足 (DD)
カグラザメ	カグラザメ	<i>Hexanchus griseus</i>	カグラザメ	○	情報不足 (DD)
ツノザメ	ツノザメ	<i>Squalus mitsukurii</i>	フトツノザメ	○	準絶滅危惧 (NT)
ツノザメ	アイザメ	<i>Centrophorus acus</i>	タロウザメ	○	情報不足 (DD)
ツノザメ	アイザメ	<i>Centrophorus squamosus</i>	モミシザメ	○	情報不足 (DD)
ツノザメ	アイザメ	<i>Centrophorus tessellatus</i>	ゲンロクザメ	○	情報不足 (DD)
ツノザメ	オンデンザメ	<i>Somniosus pacificus</i>	オンデンザメ	○	情報不足 (DD)
ツノザメ	オロシザメ	<i>Orymotus japonicus</i>	オロシザメ	○	情報不足 (DD)
カスザメ	カスザメ	<i>Squatina formosa</i>	タイワンコロザメ	○	情報不足 (DD)
ノコギリザメ	ノコギリザメ	<i>Pristiophorus japonicus</i>	ノコギリザメ	○	情報不足 (DD)
ガンギエイ	ガンギエイ	<i>Bathyraja sminovi</i>	ドブカスベ	○	準絶滅危惧 (NT)
スズキ	メバル	<i>Hozukius guyotensis</i>	ベニメヌケ	○	準絶滅危惧 (NT)
スズキ	メバル	<i>Hozukius emblemarius</i>	ホウズキ	○	情報不足 (DD)
スズキ	メバル	<i>Sebastes alutus</i>	アラスカメヌケ	○	情報不足 (DD)
スズキ	メバル	<i>Sebastes baramenueke</i>	バラメヌケ	○	準絶滅危惧 (NT)
スズキ	メバル	<i>Sebastes borealis</i>	ヒレグロメヌケ	○	準絶滅危惧 (NT)
スズキ	メバル	<i>Sebastes flammeus</i>	サンコウメヌケ	○	準絶滅危惧 (NT)
スズキ	メバル	<i>Sebastes iracundus</i>	オオサガ	○	準絶滅危惧 (NT)
スズキ	メバル	<i>Sebastes matsubarae</i>	アコウタイ	○	情報不足 (DD)
スズキ	メバル	<i>Sebastes melanostictus</i>	アラメヌケ	○	準絶滅危惧 (NT)
スズキ	ダンゴウオ	<i>Aptocyclus ventricosus</i>	ホテイウオ	○	情報不足 (DD)
カレイ	カレイ	<i>Verasper moseri</i>	マツカフ	○	情報不足 (DD)

本研究においてはレッドリストに掲載されている種のうち、元禄海山からオンデンザメが、海洋深層水汲み上げ施設や駿河湾などからクロテングギンザメ、オオワニザメ、ラブカなど合計で 9 種が検出されているが、そのうち絶滅危惧種に指定されているものはオオワニザメとフトツノザメ（環境 DNA ではツノザメ属複合種群）のみである。この数値は、希少であるから検出率が低いという可能性も否定はできないが、深海性魚類がそもそもレッドリストに反映されていないことが原因であろう。したがって、本研究で開発した手法が重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報取得に直接役立つためには、その前提として環境 DNA を用いて外洋性や深海性の多くの種についての情報を得ることが重要で、その増減を知るためには継続的なモニタリングが必要となる。

レッドリストには掲載されていないものの、本サブテーマで4つの海山（論文で発表された3つの海山に加えて2022年度の航海で宝永海山）から検出されたヨコヅナイワシは注目に値する。本種が属するセキトリーワシ科は、もっぱらゼラチン質の無脊椎動物を摂餌するものが多いことが知られているが、本種は体長2mを超す大型種で魚食性であることが各種分析から判明している⁶⁾。このような大型でトッププレデターの種は、陸上でいうライオン等など大型肉食動物と同様に漁獲や環境変動に対する脆弱性が高く、生態系保全の象徴種（flagship species）として有用な存在となる可能性が高い。生態系の頂点に立つ大型生物をシンボル生物として指定することによる、生態系全体の保全効果の高さは各種研究で明らかになっており⁷⁾、今後本種を海洋保護区の生態系保全に有効活用することも検討すべきであろう。

5. 研究目標の達成状況

本サブテーマでは、深海性の脊椎動物を対象とした簡便・迅速な深海生態系モニタリング法構築を目標とした。そのため、魚類を中心とした深海性脊椎動物を対象に環境DNAメタバーコーディング法（同時並列多種分析法）を確立した。その具体的な内容については以下の通りである。

① 既存のPCRプライマーを深海性分類群に対して最適化すると共に、海洋深層水を利用して採水・ろ過などのサンプル処理法やライブラリ調整等の実験法を確立する：既存のデータに基づき MiFish プライマーをそのまま深海性魚類に適用できることが確認された。また、海洋深層水のろ過に関しては、原水蛇口からの水圧を利用した新たなろ過法を開発した。さらに、魚類環境DNAの断片増幅（1st PCR）に新たなDNAポリメラーゼを用いることにより微生物DNA由来の非特異的増幅が抑制され、実験の効率が格段に向上した。以上のことから、研究目標は達成できたと判断する。

② 標本とDNA塩基配列を紐付けた深海性分類群のリファレンスデータを充実させ、次世代シーケンサーから出力される大量データを処理する解析パイプラインを構築して種判定精度を高めた：標本と紐付けたDNA配列情報を新たに取得し、リファレンス配列を充実させることができた。その結果、魚類では深海性分類群の目の100%、科の93.0%、属の80.5%、種の65.6%を網羅することができた。その結果、少なくとも科レベルでは精度の高い種判定が可能になった。また、超並列シーケンサーから出力される大量データを解析するパイプラインを新たに開発し、データベース MitoFish の一機能として公開した。この解析パイプラインにより、環境DNAメタバーコーディングで大きな問題となっていたエラー配列の補正が可能になり、種判定の精度が高まった。以上のことから、研究目標は達成できたと判断する。

③ 全国各地の海洋深層水汲み上げ施設で得られた環境DNAを分析することにより、深海性魚類群集の時空間動態を明らかにした：全56サンプルから深海性魚類を検出し、各地点の種数や群集組成に関するデータを取得することができた。これら生物多様性データの時空間解析を行ったところ、これまで深海性魚類ではほとんど実態が不明であった深度や地域性などの空間的異質性や、季節性など時間的動態を検出することができた。以上のことから、研究目標は達成できたと判断する。

④ 海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の設定が想定される水深ならびに実海域から得られた環境DNAを本研究で確立する手法により分析し、データから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得した：最近、駿河湾から新種として記載された大型高次捕食者のヨコヅナイワシ⁶⁾の新たな分布域を発見することができた。また、海山山頂やその斜面における魚類群集の異質性や地域性などが明らかになり、このような調査を続けていくことにより、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目に関する情報が得られることが明らかになった。以上のことから、研究目標は達成できたと判断する。

⑤ 以上で得られた各種技術を環境省へ移転し、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の継続的で効率的なモニタリングを可能にした：魚類環境DNAメタバーコーディングの実験手法をマニュアル化することにより、各種技術を環境省へ移転することが可能になった。これらのマニュアル化された技術を利用することで、汎用性と再現性の高い調査結果が得られることになる。以上のことから、研究目標は達成できたと判断する。

6. 引用文献

- 1) Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., & Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2(7): 150088.
- 2) Miya, M., Minamoto, T., Yamanaka, H., Oka, S. I., Sato, K., Yamamoto, S., Sado, T., & Doi, H. (2016). Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *Journal of visualized experiments (JoVE)* (117): e54541.
- 3) Miya, M., Gotoh, R.O., & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fisheries Science* 86(6): 939–970.
- 4) Kawato, M., Yoshida, T., Miya, M., Tsuchida, S., Nagano, Y., Nomura, M., Yabuki, A., Fujiwara, Y., & Fujikura, K. (2021). Optimization of environmental DNA extraction and amplification methods for metabarcoding of deep-sea fish. *MethodsX* 8: 101238.
- 5) Zhu, T., Sato, Y., Sado, T., Miya, M., & Iwasaki, W. (2023). MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish Pipeline: Updates in 10 Years. *Molecular Biology and Evolution* 40(3): msad035.
- 6) Fujiwara, Y., Tsuchida, S., Kawato, M., Masuda, K., Sakaguchi, S. O., Sado, T., Miya, M., & Yoshida, T. (2022). Detection of the largest deep-sea-endemic teleost fish at depths of over 2,000 m through a combination of eDNA metabarcoding and baited camera observations. *Frontiers in Marine Science* 9: 945758.
- 7) Lundberg, P., & Arponen, A. (2022). An overview of reviews of conservation flagships: evaluating fundraising ability and surrogate power. *Nature Conservation* 49: 153–188.

II-2 無脊椎動物における調査方法の開発と実践,ならびに基盤データの整備

国立大学法人神戸大学大学院人間発達環境学研究所	源 利文
千葉県立中央博物館・動物学研究所	駒井 智幸
国立大学法人京都大学フィールド科学教育研究センター	中野 智之

[要旨]

本サブテーマでは、深海の無脊椎動物相を把握する新たな手法として、深海性無脊椎動物の環境 DNA メタバーコーディング手法を確立し、実海域から取得したデータから重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案することを目的とした。まず、環境 DNA 分析手法を DNA の希薄な深海に適用するために環境 DNA の保存および抽出法の再検討を行い、従来法よりも収量が 2 倍程度増加する手法の開発に成功した。また、各分類群に対してメタバーコーディング用の PCR プライマーを設計し、1) 花虫綱、2) 鉢虫綱、3) 棘皮動物 (ヒトデ類・ウニ類・ナマコ類)、4) クモヒトデ綱、5) ウミユリ綱、6) 貝類 (腹足綱・二枚貝綱)、7) 頭足綱のプライマーをそれぞれ作成した。これら新規のプライマーと既存の甲殻類のプライマーを用いて深層水の汲み上げ施設 5 箇所および太平洋の実海域 17 地点から得たサンプルを解析した結果、深層水の汲み上げ施設の海水から花虫綱 55 種、鉢虫綱 12 種、クモヒトデ綱 24 種、ウミユリ綱 5 種、頭足綱 23 種、軟甲甲殻類 42 種の計 161 種の無脊椎動物の環境 DNA を検出した。また、実海域からは花虫綱 55 種、鉢虫綱 14 種、ヒトデ綱 6 種、ウニ綱 18 種、ナマコ綱 14 種、クモヒトデ綱 4 種、ウミユリ綱 5 種、頭足綱 57 種、十脚類 18 種の計 191 種の無脊椎動物の環境 DNA (種レベルの同定ができたもの) を検出した。この他に、種レベルの同定には至らなかった約 360 分類群の DNA を検出した。貝類のみ深海サンプルからの検出がなかったものの、それ以外はすべての対象分類群の DNA が検出された。一方で、甲殻類を対象とするプライマーが想定以上に幅広い分類群を検出できることが示された。これらの結果は、本研究で開発した手法が、採水地点近傍の無脊椎動物相を把握する手法として有効であることを示唆している。リファレンス配列の整備においては、十脚目 910 種、端脚目 3 種、等脚目 4 種、頭足綱 17 種、クモヒトデ綱 24 種、腹足綱 133 種、二枚貝綱 12 種、棘皮動物 132 種などの合計 1,235 種のリファレンス配列を新たに取得した。この結果、既存のデータと合わせ、本研究で対象とする分類群の主要な目 (甲殻類は亜目) 48 目 (亜目) のうち 46 目 (亜目) について、代表的な種のデータが 1 件以上利用可能となり、環境 DNA で検出された種を少なくとも目レベルで同定できる体制が整った。全体を通じて、本研究で開発した手法によって、無脊椎動物に関して重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報取得が可能になり、当初設定した 3 つの研究目標はすべて達成できた。また、本サブテーマで確立した実験手法をマニュアル化し、実験者に依存しない再現性の高い調査が実施できるようにした。

1. 研究開発目的

本サブテーマでは、深海性無脊椎動物に関して環境 DNA メタバーコーディング手法を確立し、実海域から取得したデータから科学的な重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング法を提案することを目的とした。そのため、環境 DNA が希薄な深海からのサンプルの保存法や抽出手法を改善して環境 DNA 収量を増加する手法を開発するとともに、各分類群 (花虫綱、鉢虫綱、棘皮動物 [ヒトデ類、ウニ類、ナマコ類]、クモヒトデ綱、ウミユリ綱、貝類 [腹足綱、二枚貝綱]、頭足綱) のメタバーコーディングプライマーを新規開発した。また、甲殻類十脚目用のプライマーである MiDeca が端脚目や等脚目に適用可能であることを確認した。さらに、種査定の精度を上げるために必要なリファレンス配列を充実させることも目的とした。

2. 研究目標

本サブテーマでは、深海性の無脊椎動物を対象とした環境 DNA メタバーコーディング手法を開発し、深海の無脊椎動物相を把握する手法として確立する。具体的な内容は以下の通りである。

- ① 刺胞動物 (花虫綱、鉢虫綱)、甲殻類 (十脚目、端脚目、等脚目)、棘皮動物 (ヒトデ綱、ウニ綱、

ナマコ綱、クモヒトデ綱、ウミユリ綱)、軟体動物(腹足綱、二枚貝綱、頭足綱)を対象としたプライマーを開発する。同時に、それぞれのプライマーを用いる際の実験条件を確立する。

② 同定された標本と紐づいた DNA のシーケンス情報を取得し、リファレンス配列を充実させる。これに関連して、次世代シーケンサーから出力されたデータを処理する解析パイプラインを構築し、種判別精度を高めるとともに、リファレンスの不足により種の同定が困難なデータについて、種に相当する遺伝子配列の分類単位をまとめる手法を確立する。

③ 実水域で採集された環境 DNA を本サブテーマで確立した手法を用いて解析し、サブテーマ 1 によって取得される脊椎動物のデータとあわせて、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得する。

3. 研究開発内容

3-1) 無脊椎動物を対象とした環境 DNA 分析用のプライマーの設計

無脊椎動物の環境 DNA メタバーコーディング手法は十脚目を対象とした MiDeca 法¹⁾以外に、分類群ごとの検出系がほとんど存在しない。真核生物一般を対象にしたプライマーは報告されているが、このようなプライマーには分類群による増幅バイアスがあることが知られており、分類群に対してそれぞれにプライマーを設計することが必要である。そこで、本研究では 1) 花虫綱、2) 鉢虫綱、3) 棘皮動物(ヒトデ類、ウニ類、ナマコ類)、4) クモヒトデ綱、5) ウミユリ綱、6) 貝類(腹足綱、二枚貝綱)、7) 頭足綱について、それぞれに新規のメタバーコーディング用プライマーを開発した。それぞれの分類群について、データベース上のミトコンドリア DNA の配列情報を利用したプライマー設計、組織 DNA を用いた増幅確認、至適 PCR 条件の検討、野外や水槽水に由来する環境 DNA サンプルを用いたライブラリ調整、および次世代シーケンサーを用いた超並列シーケンスを実施した。

各種動物群の検出系の開発にあたっては、データベース上から主にミトコンドリア上の 12S rRNA 領域または 16S rRNA 領域を対象として、各分類群の DNA 塩基配列データを収集し、両端に分類群横断的にプライマーが結合する保存的領域(20bp 前後)をもつ種間差の豊富な短い領域(100~200bp)を探索した。これらの対象領域は、分類群内で共通する配列と、種特異的な配列がタンデムに並んでいるため、メタバーコーディング用のマーカーとして有効であることが知られている^{1),2)}。設計したプライマーの有効性および至適 PCR 条件を検討するために、PCR による組織 DNA の増幅確認と用いる酵素及びアニーリング温度の検討を行った。対象分類群の各目からそれぞれ 1 種の組織 DNA サンプルを用い、抽出後の DNA を 5 pg/μL に調整して PCR に使用した。次に、酵素やアニーリング温度の検討を行った。ここでは主に 2 種類の試薬 2 × KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems、Wilmington、MA、USA: 以下 KAPA と略す) または KOD-Plus-Neo (東洋紡ライフサイエンス事業部: 以下 KOD と略す) を用い、アニーリング温度を 54/56/58/60/62/64°C とする 6 つの温度条件で至適実験条件の検討を行った。最後に、実際の環境サンプルでの環境 DNA の増幅を確認するため、京都大学白浜水族館などの水族館の水槽水や、5 箇所の深層水組み上げ施設(久米島、甕島、室戸、尾鷲、赤沢)で得られた環境 DNA サンプルを用いて上記の至適条件で PCR を行った。それぞれの深層水(図 2-1) はステリベクスフィルター(孔径 0.45μm)によってろ過を実施し、平均約 38 リットルをステリベクスフィルターでろ過したものを用いた。

3-2) 海水サンプルを対象とした環境 DNA 保存法の最適化

深海におけるマクロ生物の環境 DNA の濃度は、これまで多くの研究で検討されてきた淡水域や沿岸域の水と比較して低いことが想定される。そのため、採水およびろ過の量を増やす必要があるが、現行のステリベクスやグラスファイバーフィルターを用いたろ過方法ではろ紙の目詰まりのためにろ過可能な量に限界がある。また、特にニスキン採水器などの採水器を用いた採水にあたっては、深海から組み上げられるサンプル水の量にも限りがあり、多種類の調査を同時に行う深海調査において十分な水量を環境 DNA 用に確保することは容易ではない。そこで、ろ過量を増やすことと並行して、保存や抽出手法の最適化によって DNA 収量を増加させる必要があり、本研究ではサンプルの保存法および抽出法に

ついでに再検討を行った。

これまでステリベクスフィルターによるろ過を実施する場合、ろ過後に RNeasy 添加剤を添加することによる DNA の分解を抑制できることが知られており、多くの研究で用いられているが²⁾⁻⁴⁾、RNeasy は本来 RNA の保存用に開発された試薬であり、より適切な保存法として期待される Buffer ATL の添加法をテストした。神戸港の表層の水をステリベクスフィルターでろ過し、ろ過後に RNeasy または Buffer ATL でサンプルを保存し、DNA を抽出した。その後脊椎動物のモデルとしてクロダイ⁵⁾、無脊椎動物のモデルとしてアカクラゲ⁶⁾の種特異環境 DNA 検出系を用いた環境 DNA 定量を用い、それぞれの保存法で得られた環境 DNA 濃度を比較した。さらに、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行い、それぞれの保存法で検出された種数と種組成を比較した。

3-3) 深層水を用いた無脊椎動物の環境DNAメタバーコーディング

2020 年 12 月から 2021 年 12 月にわたって、5 箇所の深層水研究所（図 II-1）において、沖合に設けられた取水口から常時汲み上げられている深層水のろ過を行い、深海性無脊椎動物の検出が環境 DNA から可能であるかどうかを検証した。1 回の調査で、3 本のステリベクスフィルター（カートリッジ内に孔径 0.45 μ m のろ紙が封入されたろ過システム）を用いた吸引式の並列ろ過を行い、各フィルターで 50 リットルの深層水をろ過した（3 本の合計 150 リットル）。この操作を 2 日間に分けて 3 回行った結果、1 回の調査で計 450 リットルの深層水をろ過することができた。深層水と並行して、リーフエッジから取水している表層水についても、深層水のろ過終了後に 1 回 10 リットルをろ過した。ろ過を終えたカートリッジに 1.6mL の核酸劣化防止剤（RNeasy または Buffer ATL）を加え氷温に冷却して実験室に持ち帰った。カートリッジ内のフィルターから 3-2) に記載した ATL 法または既存の RNeasy 法を用いて環境 DNA サンプルを保存、抽出、精製し、本プロジェクトで開発した環境 DNA メタバーコーディングを行い、深海性無脊椎動物群の検出を試みるとともに、サンプル間の比較のために各種の多様性分析を行った。

3-4) 実海域サンプルを用いた無脊椎動物解析

2020 年 11 月から 12 月（KM20-10 航海）、2021 年 10 月（KM21-E04 航海）、2022 年 9 月（KM22-17C 航海）の 3 回にわたり、海底広域調査船「かいめい」と「しんかい 6500」などを利用した航海調査を実施した。各航海において、西七島海嶺に並ぶ正保海山（深度 356m/2,000m）、正徳海山（350m/2,000m）、日光海山（400m/2,000m）、立冬海山（530m/2,000m）、安永海山（800m/2,000m）、元禄海山（2,059m/2,177m）の計 12 地点において、CTD 測器に取り付けたニスキン採水器を用いて、それぞれの深度における近底層の採水を行った（図 2-1；表 2-1）。また、宝永海山（1,360 m/2,119 m/2,171 m）、駿河湾（1,200 m/1,224 m）の 5 地点において、しんかい 6500（6K）、ランダーもしくは、ベイトカメラにセッティングした自動ろ過器（マスポンプ）による現場ろ過を行った（図 2-1）。2020 年度および 2022 年度は既存の RNeasy 法による保存及び抽出を行い、2021 年度は、3-2) に記載の ATL 法によって深海サンプルを保存及び抽出を行い、本プロジェクトで開発した無脊椎動物の検出を試みた。なお、2022 年度のサンプルは【テーマ 1 のサブテーマ 4】によって採取、DNA 抽出されたものである。

3-5) リファレンス配列の整備

日本周辺海域（沿岸及び深海）に出現する可能性のある無脊椎動物について、収集標本を整理し、リファレンス配列のないものについて、それぞれのプライマー領域（詳しくは表 2-2 を参照）に相当するリファレンス配列をサンガーシーケンシングによって決定した。

4. 結果及び考察

4-1) 無脊椎動物を対象とした環境 DNA 分析用のプライマーの設計

1) 花虫綱、2) 鉢虫綱、3) 棘皮動物（ヒトデ類、ウニ類、ナマコ類）、4) クモヒトデ綱、5) ウミユリ綱、6) 貝類（腹足綱、二枚貝綱）、7) 頭足綱について、それぞれに新規のプライマーを設計し、組織、水槽水等を用いたテストを完了した。ここでは頭足綱のプライマー開発を例としてその検討の過程と実

験結果を示す。

頭足綱については、ミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子領域を対象としてプライマーを設計した (図 2-1)。頭足綱を代表する 5 つの目の組織 DNA を PCR 増幅したところ、想定通りの長さの増幅バンドが確認できた (図 2-2)。増幅に使用する DNA ポリメラーゼを比較した結果、KOD の方が KAPA より多くの種の DNA 増幅に成功し、増幅バンドもより明瞭であった (図 2-3)。また KOD ではアニーリング温度が 58、60、62、64°C の場合にすべての種の増幅を確認できた。以上のような実験結果から、DNA ポリメラーゼとしては KOD を用いてアニーリング温度を 62°C とすることが、頭足綱には至適な実験条件であると判断した。

さらに、野外で得られたサンプルを用いて環境 DNA メタバーコーディングを行った結果、深層水サンプルから頭足綱が検出されると同時に、頭足綱以外の分類群も一部同時に検出されることが明らかになった。

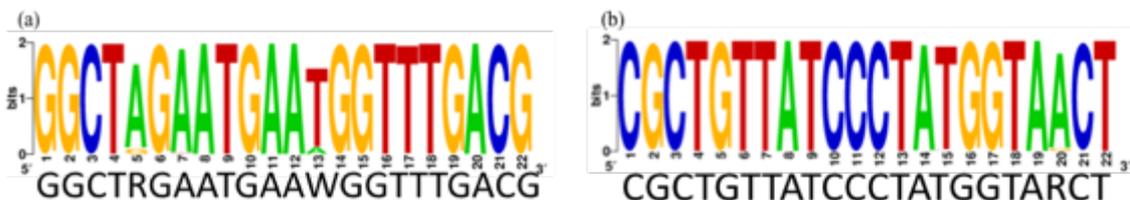


図 2-1. 頭足綱を対象とした PCR プライマーの塩基配列と塩基組成。増幅対象領域をミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子 (増幅長約 280bp) に決定した。(a)フォワードプライマー、(b)リバースプライマーの配列に相当する部分の塩基組成をシークエンスロゴで示した。それぞれのシークエンスロゴの下に書かれた配列がプライマーの配列となる。R は A/G の、W は A/T の混合塩基をそれぞれ示す。

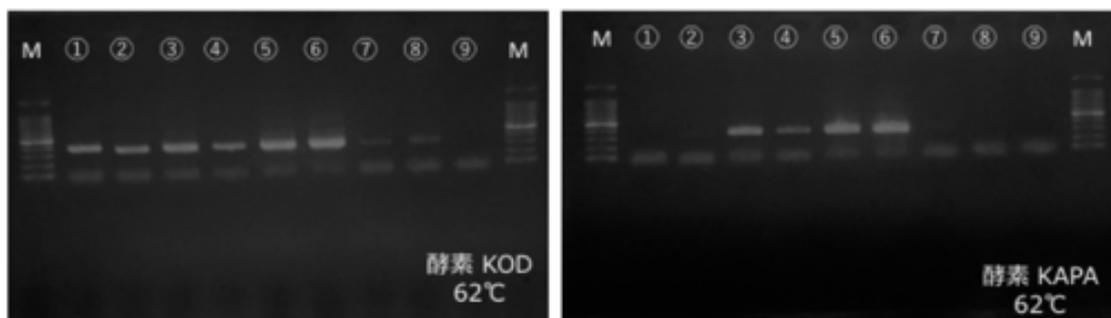


図 2-2. 組織 DNA サンプルと野外環境 DNA サンプルを用いて、DNA ポリメラーゼ KOD と KAPA による増幅をアガロースゲル上で確認した結果。①閉眼亜目 (ケンサキイカ) ; ②開眼亜目 (スルメイカ) ; ③コウイカ目 (ヒメイカ) ; ④⑤ツツイカ目 (トビイカ) ; ⑥タコ目 (マダコ) ; ⑦Mock サンプル (複数の組織 DNA サンプルを混合したもの) ; ⑧野外サンプル; ⑨ネガティブコントロール (サンプルの代わりに水を入れたもの)。

頭足綱以外の 6 つの対象分類群についても、頭足綱と同様の実験プロセスを経ることで検出系の構築とテストを完了した。さらに、水族館などの水槽水サンプル、沿岸域のサンプル、深層水汲み上げ施設のサンプル、実海域サンプルなどの環境 DNA サンプルを利用したテストを行い、本研究で対象とする深海域で利用可能であることを確認した。ただし、貝類 (腹足綱と二枚貝綱) のプライマーについてのみ、深海のサンプルから貝類の DNA が検出されず、さらなる検討が必要であると考えられた。なお、十脚目用のプライマーである MiDeca¹ が端脚目と等脚目および当初の計画には入っていなかった、オキアミ目、アミ目、口脚目についても援用できることがわかったため、これらの分類群については新たなプライマーを設計することはなく、MiDeca を利用することとした。それぞれの分類群に利用可能な設計したプライマーに関する遺伝子領域、実験条件、PCR 産物の増幅長などの詳細を表 2-1 に示す。

表 2-1. 各分類群で設計した PCR プライマーの遺伝子領域、増幅の際のアニーリング温度、使用した DNA ポリメラーゼ、ならびに PCR 産物のサイズ

分類群	遺伝子領域	アニーリング温度	DNA ポリメラーゼ	増幅長 (bp)
花虫綱	16S	60°C	KOD Plus NEO	約290
鉢虫綱	16S	62°C	KOD Plus NEO	約310
甲殻類 (十脚目、端脚目、等脚目、アミ目、口脚目)	12S	60°C/62°C	KAPA HiFi HS ReadyMix	約140~160
棘皮動物 (ヒトデ類、ウニ類、ナマコ類)	16S	62°C	KOD Plus NEO	約220~300
クモヒトデ綱	16S	56°C	KOD Plus NEO	約290
ウミユリ綱	16S	60°C	KOD Plus NEO	約270
貝類 (腹足綱、二枚貝綱)	16S	50°C	KOD Plus NEO	約250~400
頭足綱	16S	62°C	KOD Plus NEO	約350

4-2) 深海サンプルを対象とした環境 DNA 保存法の至適化

保存法を比較した結果、脊椎動物であるクロダイでも無脊椎動物であるアカクラゲでも、ATL 法で保存したサンプルの方が環境 DNA 濃度が有意に高く、約 2 倍多く回収できた (GLMM, $p=0.020$ [クロダイ]; $p=0.015$ [アカクラゲ]; 図 2-4)。このような結果は淡水域のステリベクスフィルターを用いたサンプルにおいても同様であり、また、環境 DNA 学会発行のマニュアルに記載されているような⁴⁾、環境 DNA 分析においてステリベクスフィルターと並んで一般的に利用されているグラスファイバーフィルターを用いた解析においても同様であったため、本研究で開発された手法が環境 DNA 分析一般に適用可能であることが期待される (データ非掲載)。

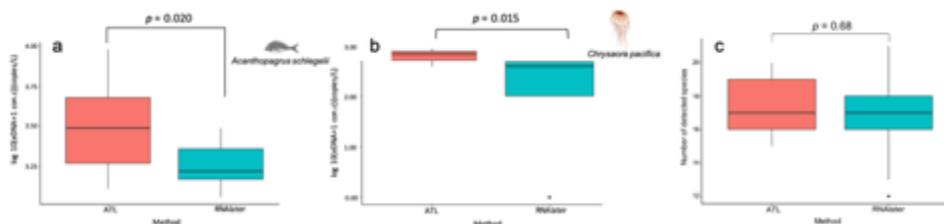


図 2-4. 異なる保存法で得られたクロダイ(a)とアカクラゲ(b)の環境 DNA 濃度と、MiFish 法で得られた魚類の検出種数(c)の比較。

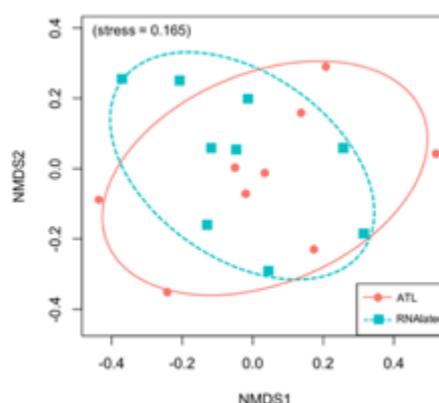


図 2-5. 異なる保存法で得られた魚類群集組成のサンプル間の非類似度に基づき、非計量多次元尺度法で二次元に展開したグラフ。

また、MiFish 法で魚類の環境 DNA メタバーコーディングを実施したところ、ATL 法と RNAlater 法を用いた場合に、それぞれ 32 種と 31 種が検出され、手法間で有意差はなかった (GLMM, $p=0.68$; 図 2-4c)。種の多様性分析の結果、保存法の違いで検出された魚種の組成には大きな差が見られなかった (PERMANOVA, $p=0.48$; PERMDISP, $p=0.95$; 図 2-5)。比較的 DNA 濃度の濃い神戸港の表層水で実験をしたために種数や種組成に差が出なかった可能性があるが、より DNA 濃度の希薄な深海の採水

においては、ATL法でより多くのDNAを回収することで検出感度が向上する可能性があり、深海の調査においてはATL法を用いることが推奨される。

本研究で確立したBuffer ATLを保存に用いる方法のプロトコルを以下に示す。ステリベクスで環境水をろ過した後、1mLのBuffer ATLをステリベクスに注入する。ATLを注入したサンプルは冷凍庫で保管可能である。サンプルを抽出する際には、冷凍庫から取り出したステリベクスを解凍し、100 μ LのProteinase Kを添加し、56 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートする。この際、5分おきに上下を入れ替えてしっかりと混ざるようにする。インキュベートの後、ステリベクス内の液をすべて2mLのチューブに回収する。液を15mLの遠沈管に移し、1mLのBuffer ALを加えてよく混ぜる。さらに、1mLのエタノールを加えてよく混ぜる。この液を650 μ Lずつ、DNeasy Blood & Tissue Kit付属のスピンカラムに通し、DNAをカラムに吸着させる。以降はDNeasy Blood & Tissue Kitのプロトコルどおりに抽出を行い、100~200 μ Lの環境DNA抽出液を得る。

4-3) 深層水を用いた無脊椎動物の環境DNAメタバーコーディング

5箇所の汲み上げ施設からろ過した深層水より頭足綱23種、花虫綱55種、鉢虫綱12種、クモヒトデ綱24種、ウミユリ綱5種、十脚類42種の合計161種の無脊椎動物の環境DNAを検出した(98%以上の一致率の配列のみを記載)。各汲み上げ施設によって検出種数が異なり、久米島での種数が最も多かった(図2-7)。甌島のサンプルについては甲殻類のみの解析を行ったため検出種数が少なくなったが、甲殻類に限定すると必ずしも少なくはなかった(図2-6)。甌島を除くサンプルについて採水地ごとの群集組成を調べたところ、それぞれの採水地ごとの特徴を示しており、本研究で開発された無脊椎動物の環境DNAメタバーコーディング手法が、場所ごとの分類群組成を明らかにする手段として有効であることが明らかになった(図2-7)。このことは、本手法が重要海域の抽出基準としての生物多様性の情報を得るための手法として利用可能であることを示している。

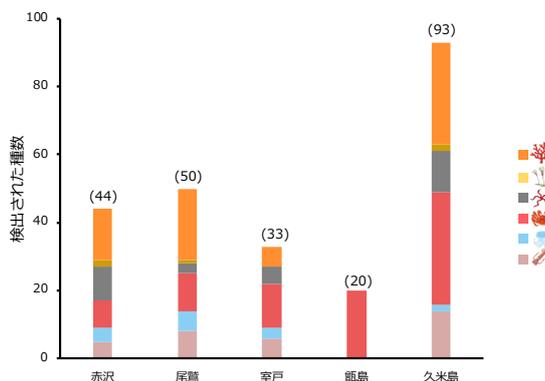


図 2-6. 5 箇所の深層水汲み上げ施設から検出された各無脊椎動物分類群の種数。甌島については甲殻類のみを分析した。

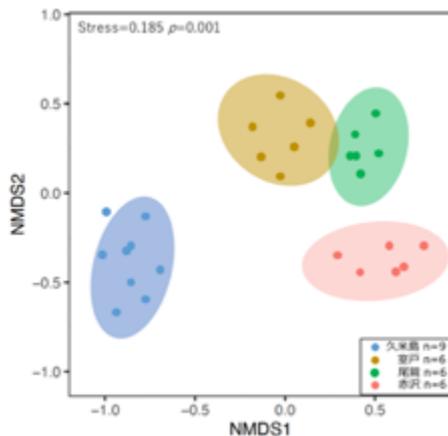


図 2-7. 5 箇所の深層水汲み上げ施設で得られた無脊椎動物群集組成のサンプル間における非類似度に基づき非計量多次元尺度法で二次元に展開したグラフ。甲殻類のみ分析した甌島のデータは除外した。

4-4) 実海域サンプルを用いた無脊椎動物解析

2021年から2023年までの広域航海調査では合計で17箇所の深海水から、頭足綱57種、花虫綱55種、鉢虫綱14種、ナマコ綱14種、ヒトデ綱6種、ウニ綱18種、クモヒトデ綱4種、ウミユリ綱5種、十脚類18種の合計191種の無脊椎動物の環境DNAを検出した(98%以上の一致率の配列のみを種同定できたもとして示す)。全体のデータが膨大であるため、ここでは例として頭足類の結果のみを示す(表2-3)。これらのうち、ダイオウイカ(*Architeuthis dux*)のDNAが正保海山山頂、正徳海山山頂、安永海山斜面、元禄海山斜面、宝永海山斜面と、水平報告にも鉛直方向にも広範囲から検出されたことは特筆すべき成果である。なお、これらの種レベルで同定されたDNA配列の他に、種までの同定ができない約360分類群の塩基配列が検出された。これらの配列は、それぞれの配列をASV(Amplicon Sequence Variants)として種同様に扱うことができ、ASVの配列とデータベース上の配列を用いて分子系統樹を作成するなどの方法で、属レベル、科レベルなどの帰属が可能である(例を図2-8に示す)。したがって、全体としては551分類群の検出ができたといえる。なお、種レベルの同定ができない原因は主にリファレンスとなるデータの不足によるものであり、以下にも述べる通り、日本周辺海域に出現する可能性のある無脊椎動物リファレンス配列データベースの充実度を向上させる必要がある。

各海山で検出された種数は異なっており、宝永海山斜面で54種の深海無脊椎動物の環境DNAを検出したのに対して、熱水噴出域である日光海山の山頂からはわずか6種のみが検出されたにすぎなかった(図2-9)。ただし、後者からは熱水噴出域に固有のユノハナガニが検出された。熱水噴出域においては本研究で対象とする無脊椎動物群の種数は限られると思われ、固有の種が検出されたことと合わせてこの結果は妥当であると考えられる。また、検出した無脊椎動物の出現率は、対象種の移動能力や生息範囲によって異なると考えられた。例えば中深層の広域を泳ぐことができるイカ類については、海山山頂と基底部付近の両方で検出される種が多かった一方で、基本的に底生であるタコ類や固着性である花虫綱については、海山斜面で検出された種が多かった(表2-3;図2-10)。これらの結果は本研究で開発した手法が、採水地点近傍の生物相を把握する手法として有効である可能性を示唆している。

しかし、海山ごとに検出した種組成の非類似度には統計的な違いは見られなかった(PERMANOVA, $p=0.613$; PERMDISP, $p=0.969$; 図2-11)。これはろ過反復間のバラツキが大きいことが原因の一つであると考えられ、今後の調査に際してはろ過の反復数の増加やろ過量の増加が必要であると考えられる。2022年の調査では駿河湾と宝永海山の2箇所においてしんかい6500、ランダー、及びベイトカメラにセッティングした自動ろ過器(マスポンプ)による採水・ろ過を行った。それぞれの手法間で検出された種数や種組成には統計的な有意差は見られなかった(GLMM[種数], $p=0.073$; PERMANOVA, $p=0.575$; PERMDISP, $p=0.84$; 図2-12,13)。

全体を通して、環境DNA分析によって深海の無脊椎動物相を明らかにする手法の開発に成功したと言って良いと考えられるが、一方で以下の4点が課題として挙げられる。

1つ目は、ろ過反復間のバラツキが大きいことである。多くの無脊椎動物は、単一で行動する特徴が見られ、単一個体から放出されるeDNA量は多くないと予想される。今回の調査では多くの調査地点で3反復しかろ過を行ってないため、今後の対策として、反復数またはろ過量を増やすことによって改善できると期待される。

2つ目は、より海の浅部から落ちてくる環境DNAを深部で拾ってしまう可能性があることである。近年の研究で環境RNAは分解速度が早いために、遠くから落ちてくる、あるいは流れてくる情報を検出しないことなどが報告されており7)、環境RNAの導入によって、偽陽性による検出をある程度防ぐことができるのか、今後検討する必要がある。

3つ目は、海洋深層水をろ過したサンプルからは中深層、近底層遊泳性、底生、内在性種が網羅的に検出された一方で、CTD測器に取り付けたニスキン採水器による採水サンプルでは底生性種の検出は乏しかった。ただし、海底での水温の高い熱水噴出域上では海水プルームの上昇が生じるので、海底のDNA断片も共に上昇し、それが検出されたもの(日光海山のユノハナガニ)と推測される。運動性の乏しい底生性種の検出には海底付近での採水が必要であることが示唆される。それを実現するには、ランダーとろ過用のマスポンプを組み合わせた機材による海底直上での現場ろ過の手法を開発・発展させるのが現実的と考える。

表2-3. 各サンプルから検出された無脊椎動物種一覧（頭足類）

分類群	学名	正保	正保	正徳	正徳	立冬	立冬	日光	日光	安永	安永	元禄	宝永	宝永	宝永	駿河湾	駿河湾	駿河湾
		山頂	斜面	斜面	斜面 ランダー	斜面 OK-1	斜面 OK-2	OK	ペイト	ランダー								
頭足類	<i>Abrailia</i> sp.											○						
(イカ類)	<i>Abrailopsis atlantica</i>										○	○						
	<i>Ancistirocheirus tsusurii</i>		○						○	○								
	<i>Architeuthis duk</i>	○		○						○	○	○	○					
	<i>Bathtauma tyronna</i>												○					
	<i>Bathtyphus abyssicola</i>	○	○			○												
	<i>Chiroteuthis megi</i>												○					
	<i>Chiroteuthis picteti</i>					○									○			
	<i>Chiroteuthis</i> sp.																○	
	<i>Chiroteuthis sicula</i>									○								
	<i>Cirroteuthis</i> sp.																○	
	<i>Cranchia scabra</i>												○					
	<i>Cychotheutis sirventi</i>												○					
	<i>Diplommatina suratorensis</i>																	
	<i>Discoteuthis discus</i>									○	○	○		○				
	<i>Echiroteuthis atlantica</i>																	
	<i>Engeloteuthis reticulata</i>	○	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	<i>Euctoteuthis luminosa</i>									○								
	<i>Galliteuthis armata</i>								○	○								
	<i>Goniatum kamtschatkense</i>												○					
	<i>Grimalditeuthis borplandi</i>																○	
	<i>Halicoranchia pfefferi</i>											○						
	<i>Heteroteuthis abgarensis</i>													○				
	<i>Histiotiteuthis corona</i>	○				○			○	○		○					○	
	<i>Histiotiteuthis hoylei</i>	○	○		○	○	○		○	○								
	<i>Histiotiteuthis miranda</i>					○							○					
	<i>Histiotiteuthis</i> sp.									○								
	<i>Hyaliteuthis pelagica</i>									○								
	<i>Joubiniteuthis portieri</i>	○	○	○		○				○	○	○	○	○	○			
	<i>Ligurilla podipterina</i>																	
	<i>Ligurilla podipterina</i>																	
	<i>Mastigoteuthis agassizii</i>		○		○			○	○	○	○	○	○	○	○		○	
	<i>Mastigoteuthis psychrophila</i>									○								
	<i>Mastigoteuthis pyrosoma</i>		○								○	○	○					
	<i>Natoteuthis hawaiiensis</i>																	
	<i>Octopoteuthis</i> sp.													○				
	<i>Octopoteuthis noberti</i>										○							
	<i>Octopoteuthis sicula</i>																○	
	<i>Ommastrephes bartramii</i>				○				○		○	○						
	<i>Ommastrephes brevipinna</i>												○					
	<i>Onychoteuthis aff. Compacta</i>												○					
	<i>Onychoteuthis lacrima</i>	○																
	<i>Onychoteuthis</i> sp.		○		○			○										
	<i>Onykia aff. ingens</i>												○	○				
	<i>Onykia loenbergii</i>												○			○	○	
	<i>Oroteuthis volatilis</i>				○									○	○		○	
	<i>Panoteuthis cf. danae</i>	○	○			○			○									
	<i>Sthenoteuthis oualensis</i>	○	○	○	○		○	○	○	○		○	○	○				
	<i>Stigmatoteuthis arcturi</i>					○				○								
	<i>Taringia danae</i>									○	○		○					
	<i>Taurofowenia megalops</i>										○							
	<i>Thysanoteuthis rhombus</i>									○	○	○	○		○		○	
	<i>Walvisteuthis jeremiahi</i>																	
	<i>Walvisteuthis scintillans</i>									○	○	○						
頭足類	<i>Amydoteuthis pelagica</i>																	
(タコ類)	<i>Benthoteuthis elcomar</i>																	
	<i>Benthoteuthis</i> sp.																○	
	<i>Cirroteuthis murrayi</i>										○	○	○	○				
	<i>Cryptoteuthis brevibrachiatia</i>											○						
	<i>Stauroteuthis gilchristi</i>																○	
	<i>Stauroteuthis syrtensis</i>										○	○						
	<i>Tremoctopus violaceus</i>	○			○						○							

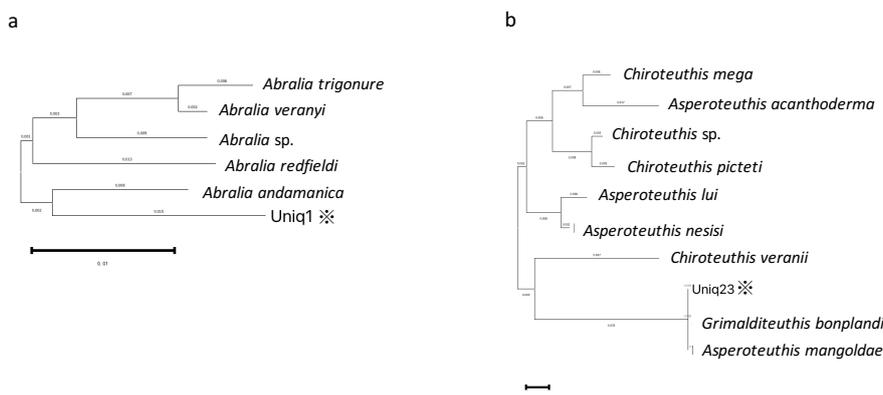


図 2-8. 環境 DNA から検出された配列を用いた系統樹に基づく帰属分類群の推定。a) 属レベルの帰属の代表例 (*Abralia* sp.)と、b) 科レベルの帰属代表例 (*Chiroteuthidae* spp.)。※で表記した Uniq は超並列シーケンサから得られた配列で、他の配列はデータベースに含まれていた種の配列。

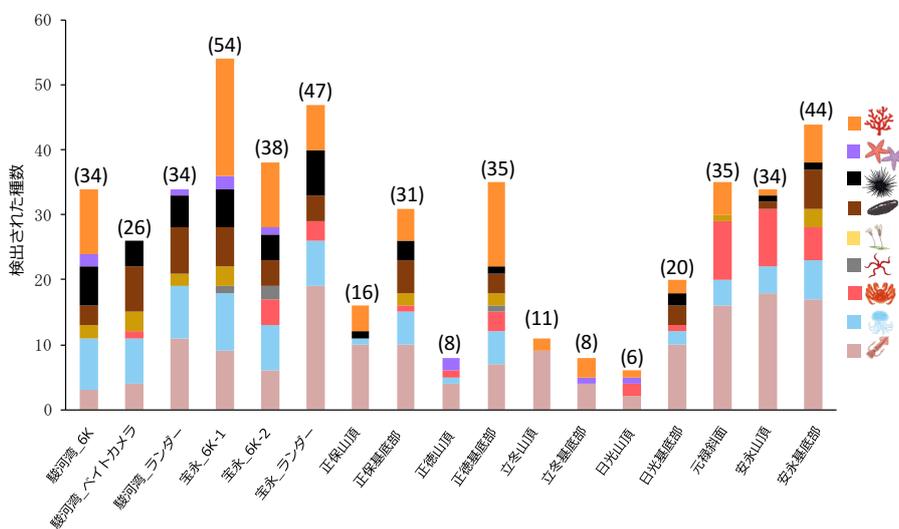


図 2-9. 西七島海嶺ならびに隣接海域の海山山頂と斜面、ならびに駿河湾から環境 DNA メタバーコーディング法により検出された各無脊椎動物分類群の種数。

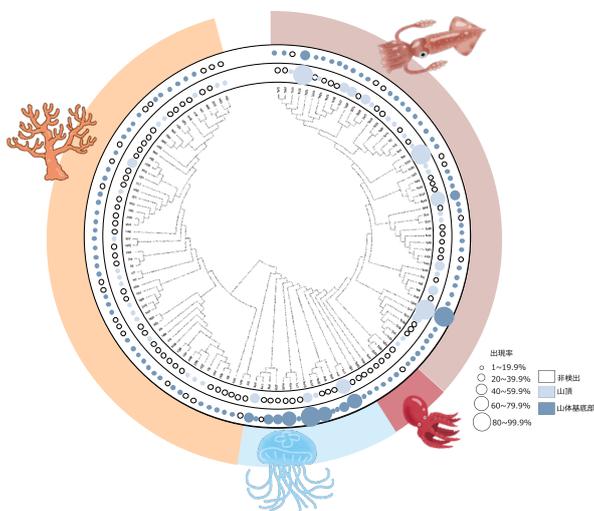


図2-10.各海山から環境DNAメタバーコーディング法で検出された無脊椎動物分類群の出現率。円の内側は海山の山頂を示し、外側は海山の斜面を示す。

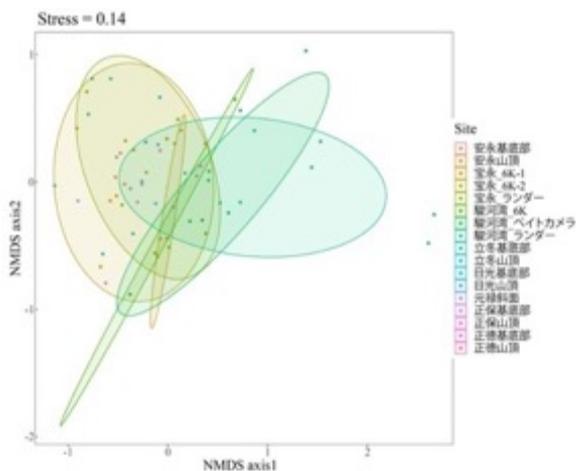


図 2-11. 各海山から環境 DNA メタバーコーディング法で検出された無脊椎動物群集組成の非類似度に基づき非計量多次元尺度法で二次元に展開したグラフ。

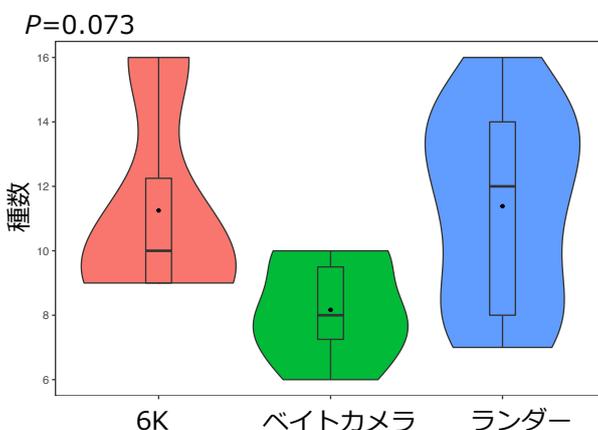


図 2-12. 3 種類の採水法で得られた環境 DNA から検出された無脊椎動物分類群の種数。3 者間で統計的な有意差は見られなかった。

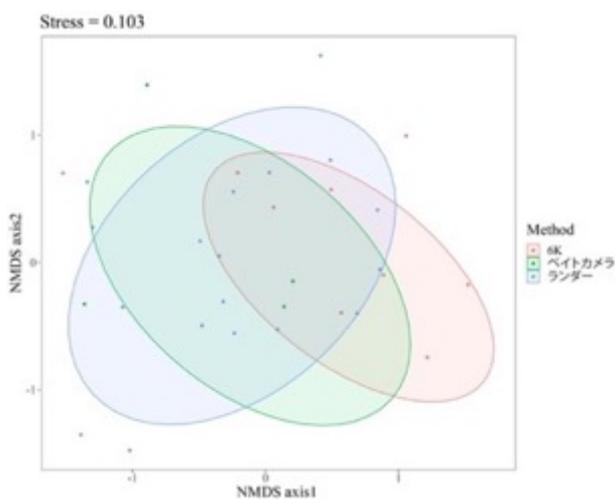


図 2-13. 3 種類の採水法で得られた環境 DNA から検出された無脊椎動物群集の非類似度に基づき非計量多次元尺度法で二次元に展開したグラフ。

4 つ目は、リファレンス配列の不足が大きな課題である。今回の研究では、どの分類群でも半分以上の配列は種までの同定ができず、リファレンス配列との一致率の低いものが多く見られた。今後リファレンス整備を加速することで、より精度の高い結果を期待できる。今回、KM20-10C、KM21-E4C 航海に

において、ROVによって採集された標本と撮影された映像・画像を照合することができた。その結果、実際に撮影されたユノハナガニのDNAが環境DNA分析でも検出されており、分析の妥当性が確認された。環境DNA分析と映像を組み合わせることによって、生息種を推測することは可能であると考えられるので、それらの情報の蓄積は今後も重要である。また、環境DNAメタバーコーディングによる分析は未知の種の存在の予測にも大きな効果があることは間違いない。

4-5) リファレンス配列の整備

3年間にわたって十脚目910種、端脚目3種、等脚目4種、頭足綱17種、クモヒトデ綱24種、腹足綱133種、二枚貝綱12種、棘皮動物132種などの合計1,235種のリファレンス配列を新たに取得した。この結果、既存のデータと合わせ、本研究で対象とする分類群の主要な目(甲殻類は亜目)48目(亜目)のうち46目(亜目)について、代表的な種のデータが1件以上利用可能となり、環境DNAで検出された種を少なくとも目レベル同定できる体制が整った。また、多くの主要分類群については科レベルでの同定が可能となった。しかし、データベースに登録された無脊椎動物のリファレンス配列はそれでも十分ではない。未決定種を含む新たな標本を国内の研究機関、博物館や水族館と連携をとりつつ日本周辺海域に出現する可能性のある無脊椎動物リファレンス配列を向上させることが期待される。

4-6) 実験手法のマニュアル化と環境省への技術移転

以上で得られた各種実験技術をマニュアル化して、統一された手法の下で再現性の高い結果が得られるようにした。本サブグループでは以下の「5.4. 無脊椎動物の環境DNAメタバーコーディング法(DNA抽出から種決定まで)」の計9ページの執筆を担当した。

- 5.4. 無脊椎動物の環境DNAメタバーコーディング法(DNA抽出から種決定まで) --- 79
 - 5.4.1. サンプルの保存法(RNAlater法とATL法) --- 79
 - 5.4.2. 実験室への輸送 --- 79
 - 5.4.3. ステリベクスからのDNA抽出 --- 79
 - 5.4.3.1. 実験の準備 --- 79
 - 5.4.3.2. DNeasy Blood & Tissue kit を用いたDNAの抽出 (RNAlater法とATL法) --- 79
 - 5.4.4. 無脊椎動物の環境DNAメタバーコーディング --- 81
 - 5.4.4.1. ライブラリー調整①:1st PCR --- 81
 - 5.4.4.1.1. 1st PCR --- 81
 - 5.4.4.1.2. 1st PCR産物のビーズ精製(サイズセレクション) --- 83
 - 5.4.4.1.3. 精製済みの1st PCR産物の濃度測定と希釈 --- 84
 - 5.4.4.2. ライブラリーの調整②:2nd PCR --- 84
 - 5.4.4.2.1. 2nd PCR --- 84
 - 5.4.4.2.2. 2nd PCR産物の精製(サイズセレクション) --- 84
 - 5.4.4.2.3. 切り出した2nd PCR産物の質の確認と濃度測定 --- 85
 - 5.4.5. MiSeqまたはiSeq100を用いた超並列シークエンス --- 85
 - 5.4.5.1. 下準備(キットの解凍) --- 85
 - 5.4.5.2. ライブラリー濃度の最終調整及び濃縮 --- 85
 - 5.4.5.3. シークエンス開始前後の操作 --- 85
 - 5.4.6. データ解析(ussearch) --- 86
 - 5.4.6.1. 得られたリードのアッセンブル(ペアエンドの場合) --- 86
 - 5.4.6.2. プライマー配列の除去 --- 86
 - 5.4.6.3. クオリティフィルタリング --- 86
 - 5.4.6.4. 合同配列をまとめる --- 86
 - 5.4.6.5. denoiseしてASVsの作成 --- 86
 - 5.4.6.6. リファレンスDBに参照した種の割り当て --- 86
 - 5.4.6.7. 得られたリードのアッセンブル(片側の場合) --- 87

4-7) 重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報取得

本サブテーマの主たる目標である、深海における無脊椎動物の環境 DNA メタバーコーディング手法の開発には成功した。最後に、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報取得に関して述べる。本研究で開発した手法を用いることで、重要海域の抽出基準・指定書及び保全計画書の指標として、1) 唯一性、又は希少性を示す唯一種および希少種、2) 絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地であることを示すレッドリスト掲載種、3) 脆弱性、感受性又は低回復性の指標となる指定書掲載種の DNA を検出することができる。また、4) 生物学的多様性の指標として、生息する分類群の組成を明らかにすることができる。これらのことから、本研究で開発した手法によって、無脊椎動物に関して重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報取得が技術的に可能になったと結論する。

ただし、本研究で対象とした多くの分類群について、希少性などの情報が十分に存在するわけではない点には注意が必要である。例えば、環境省版の海洋生物レッドリストにおいては、サンゴ類約 690 種、甲殻類約 3,000 種、軟体動物（頭足類）約 230 種、その他の無脊椎動物約 2,300 種が評価対象となっているが、絶滅危惧種として掲載されているのは、サンゴ類 6 種、甲殻類約 30 種、軟体動物（頭足類）0 種、その他の無脊椎動物 4 種に過ぎない。一方で情報不足として掲載されているのは上記の分類群の合計で 112 種である。これは調査が十分でないことなどが原因と考えられる。また、深海性の種はほとんど評価対象とされていない。実際に、本研究においてはレッドリストに掲載されている種の検出はなかった。これは、希少であるから検出確率が低いという可能性も否定はできないが、それ以上に深海性の種がそもそもレッドリストに掲載されていないことが原因であろう。したがって、本研究で開発した手法が重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報取得に直接役立つためには、その前提として、この手法を深海性の生物の分布状況調査に用いて、外洋性、深海性の多くの生物群についての情報を得ることが重要である。

また、重要海域の抽出に際して、どの生物群を重点的に調査するべきかについても今後検討が必要であろう。本研究では、実海域のサンプルから頭足綱 57 種と花虫綱 55 種を検出、同定することに成功した。これはこれらの分類群のリファレンスデータが充実していることの現れでもあるが、現時点で、あるいは近い将来に、本研究で開発した手法の一部を用いて生物学的多様性の指標データを得ることを目的にする場合は、第一に頭足綱および花虫綱を対象とすることで、比較的多くの情報を得ることができることを示している。一方で、甲殻類などの検出系では種まで同定できない DNA 配列が多数検出されており、リファレンスの充実によって、甲殻類も対象とすることが有効になるだろう。

5. 研究目標の達成状況

本サブテーマでは、深海性の無脊椎動物を対象とした環境 DNA メタバーコーディング手法を開発し、深海の無脊椎動物相を把握する手法として確立するため具体的には 3 つの目標を提示した。それぞれの目標に関する達成状況は以下の通りである。

① 刺胞動物（花虫綱、鉢虫綱）、甲殻類（十脚目、端脚目、等脚目）、棘皮動物（ヒトデ綱、ウニ綱、ナマコ綱、クモヒトデ綱、ウミユリ綱）、軟体動物（腹足綱、二枚貝綱、頭足綱）を対象としたプライマーを開発し、実験条件を確立するという目標に関して、当初の予定通り達成することができた。当初掲げた無脊椎動物群のうち、軟体動物の腹足綱、二枚貝綱を除きすべての分類群でプライマーを開発し、実験条件を確立、深海サンプルへの適用に成功した。腹足綱、二枚貝綱についてはプライマーの開発までは完了したものの、野外サンプルからの検出がなく、実験条件の修正が必要である可能性がある。一方で、当初の予定になかった甲殻類のアミ目、口脚目についても分析系が確立することができた。また、DNA の新たな保存・抽出方法の開発に成功し、DNA の収量を倍程度に高めることができた。これらの理由から、総合的には目標を達成できたものと判断する。

② 同定された標本と紐づいた DNA のシーケンス情報を取得し、リファレンス配列を充実させる点に関しては、合計 1,235 種の新たなリファレンスシーケンスを取得し、代表的な分類群について目レベル（主要分類群については多くが科レベル）での同定が可能となったため目標を達成できたと判断する。また、リファレンスの不足により種の同定が困難なデータについて、種に相当する遺伝子配列の分

類単位として ASV (Amplicon Sequence Variant) を用いることができることを示し、この点についても目標を達成できたと判断する。

③ 実水域で採集された環境 DNA を本サブテーマで確立した手法を用いて解析し、重要海域の抽出基準を踏まえたモニタリング項目についての情報を取得するという目標については、太平洋の深海のサンプルから合計 191 種の無脊椎動物種の DNA を検出することに成功した。この手法を用いることで、検出種のリストから生物学的多様性の情報を得ることができることは上記に示したとおりであり、その情報に含まれる唯一種、希少種、絶滅危惧種、指定書掲載種等の情報についても、継続的な調査を続けることで将来的に得ることができると考える。実際に、ダイオウイカの DNA が 5 箇所検出されるなど、希少種の情報を得られることが実証できたため、この点についても目標を達成できたと判断する。

6. 引用文献

- 1) Komai, T., Gotoh, R.O., Sado, T., & Miya, M. (2019). Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding & Metagenomics* **3**: e33835.
- 2) Miya, M., Sato, Y. Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., & Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* **2**: 150088.
- 3) Wong, M.K.S., Nakao, M., & Hyodo, S. (2020). Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Scientific Reports* **10**: 21531.
- 4) Minamoto, T., Miya, M., Sado, T., Seino, S., Doi, H., Kondoh, M., Nakamura, K., Takahara, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Iwasaki, W., Kasai, A., Masuda, R., & Uchii, K. (2021). An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA* **3**: 8–13.
- 5) Sasano, S., Murakami, H., Suzuki, K. W., Minamoto, T., Yamashita, Y., & Masuda R. (2022). Seasonal changes in the distribution of black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* estimated by environmental DNA. *Fisheries Science* **88**: 91–107.
- 6) Minamoto, T., Fukuda, M., Katsuhara, K.R., Fujiwara, A., Hidaka, S., Yamamoto, S., & Takahashi, K., Masuda, R. (2017). Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLOS ONE* **12**(2): e0173073.
- 7) Miyata, K., Inoue, Y., Amano, Y., Nishioka, T., Yamane, M., Kawaguchi, T., Morita, O., & Honda, H. (2021). Fish environmental RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity. *Ecological Indicators* **128**: 107796.

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1】

- 1) Zhu, T., Sato, T., Sado, T. Miya, M. & Iwasaki, W. (2023). MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish pipeline: updates in 10 years. *Molecular Biology and Evolution* 40(3): msad035. (IF: 8.800)
- 2) Fujiwara, Y., Tsuchida, S., Kawato, M., Masuda, K., Sakaguchi, O.S., Sado, T., Miya, M. & Yoshida T. (2022). Detection of the largest deep-sea-endemic teleost fish at depths of over 2,000 m through a combination of eDNA metabarcoding and baited camera observations. *Frontiers in Marine Science* 9: 945758. (IF: 5.247)
- 3) Miya, M. (2022). Environmental DNA metabarcoding: A novel method for biodiversity monitoring of marine fish communities. *Annual Review of Marine Science* 14: 161–185 (IF: 16.561)
- 4) Oka, S. I., Miya, M., & Sado, T. (2022). Gravity filtration of environmental DNA: A simple, fast, and power-free method. *MethodsX*, 9: 101838. (IF: 1.837)
- 5) Kawato, M., Yoshida, T., Miya, M., Tsuchida, S., Nagano, Y., Nomura, M., Yabuki, A., Fujiwara, Y. & Fujikura, K. (2021). Optimization of environmental DNA extraction and amplification methods for metabarcoding of deep-sea fish. *MethodsX* 8: 101238. (IF: 1.837)
- 6) 平井惇也・宮正樹・藤木徹一・吉田聡・乙坂重嘉・帰山秀樹・加古真一郎・片岡智哉・松岡大祐・日高弥子・杉山大祐・小嶋不二夫 (2021). 海洋学の10年展望2021：新たな手法と問題. 海の研究, 30(5): 227–253 (IF/h-index: データ無し)

【サブテーマ2】

- 1) Komai, T., Tsuchida, S., & Fujiwara, Y. (2023). Squat lobsters of the superfamily Chirostyloidea (Decapoda: Anomura) from seamounts on the Nishi-Shichito and Mariana ridges, North-West Pacific off Japan, with descriptions of two new species. *Zootaxa* (In press.)
- 2) Wu, Q., & Minamoto, T. (2023). Improvement of recovery yield of macro-organismal environmental DNA from seawater samples. *Analytical Sciences*. (In press.) (IF: 1.967)
- 3) Komai, T., Tsuchida, S., & Fujiwara, Y. (2023). A new deep-sea palaemonid shrimp assigned to *Periclimenes* Costa, 1844 (Decapoda: Caridea) from the West Mariana Ridge, northwestern Pacific. *Zootaxa* 5231(4): 376–392. (IF: 1.091)
- 4) Okanishi, M., Kohtsuka, H., Wu, Q., Shinji, J., Shibata, N., Tamada, T., Nakano, & T., Minamoto, T. (2023). Development of two new sets of PCR primers for eDNA metabarcoding of brittle stars (Echinodermata, Ophiuroidea). *Metabarcoding & Metagenomics* 7: e94298. (h-index: 14)
- 5) Komai, T., Tsuchida, S., & Fujiwara, Y. (2022). New record of a rarely collected caridean shrimp *Bathypalaemonella pandaloides* (Rathbun, 1906) (Decapoda: Bathypalaemonellidae) from the West Mariana Ridge, northwestern Pacific. *Zootaxa* 5129(2): 272–284. (IF: 1.091)
- 6) Minamoto, T. (2022). Environmental DNA analysis for macro-organisms: Species distribution and more. *DNA Research* 29: dsac018. (IF: 4.477)
- 7) Wu, Q., Sakata, M. K., Wu, D., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2021). Application of environmental DNA metabarcoding in a lake with extensive algal blooms. *Limnology* 22: 363–370. (IF: 2.156)

<査読付き論文に準ずる成果発表>

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

【サブテーマ1】

- 1) Miya, M. “The mitogenomic contributions to molecular evolution and ecology of fishes: Revealing the patterns of diversity through space and time.” Commemorative Symposium for the 38th International Prize for Biology. “Biology of Fishes: Ecology, Evolution and Development.” Okazaki Conference Center, Aichi, Japan. December 17, 2022.
- 2) Miya, M. “Environmental DNA metabarcoding: A novel method for biodiversity monitoring of marine fish communities.” UK eDNA Webinar Week, UK, January 17, 2022.
- 3) Miya, M. “MiFish eDNA metabarcoding: A new biodiversity monitoring method enables simultaneous detection of multiple fish species from a bottle of seawater.” Workshop on Deep-sea Taxonomic Standardization: Strategic Approach for Collaboration, International Seabed Authority, September 15, 2020.

【サブテーマ2】

- 1) 岡西政典・幸塚久典・鄔倩倩・進士淳平・芝田直樹・玉田貴・中野智之・源利文. 「クモヒトデ綱（棘皮動物門）の環境DNAメタバーコーディングプライマーの開発」. 第18回棘皮動物研究集会. 2022年12月.
- 2) 小泉佳祐・中野智之・鄔倩倩・幸塚久典・小川晟人・岡西政典・源利文. 「棘皮動物の多様性把握における環境DNAメタバーコーディング分析の適用」. ベントスプランクトン学会、2022年9月.
- 3) 岡西政典・幸塚久典・鄔倩倩・進士淳平・芝田直樹・玉田貴・源利文. 「クモヒトデ綱の環境DNAメタバーコーディングプライマーの開発」. 環境DNA学会 あなたが主役のワークショップ、2022年11月.
- 4) 鄔倩倩・西澤峻平・藤原義弘・土田真二・吉田尊雄・河戸勝・駒井智幸・源利文. 「環境DNAメタバーコーディングによる深海無脊椎動物の検出」. 環境DNA学会 あなたが主役のワークショップ、2022年11月.（優秀発表賞）
- 5) 小泉佳祐・中野智之・鄔倩倩・幸塚久典・小川晟人・岡西政典・源利文. 「棘皮動物における環境DNAメタバーコーディングプライマーの開発」. 環境DNA学会 あなたが主役のワークショップ、2022年11月.

- 6) 鄔倩倩・中野智之・駒井智幸・宮正樹・呉盧漢・源利文. 「頭足綱を対象とした環境DNAメタバーコーディング検出系の開発」. 環境DNA学会第4回大会、2021年11月.
- 7) 西澤 峻平・鄔倩倩・中野智之・駒井智幸・源利文「花虫綱を対象とした環境DNAメタバーコーディング系の開発」. 環境DNA学会第4回大会、2021年11月.
- 8) 西澤峻平・鄔倩倩・中野智之・駒井智幸・源利文「鉢虫綱クラゲ類の環境DNAメタバーコーディング系の設計」日本生態学会第68回大会、3月、2021年.

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ1】

- 1) 九州大学大学院工学研究院附属工学研究教育センター公開講座・海洋の生物多様性保全の最先端「— 環境DNA・里海と海洋保護区「バケツ一杯の水からわかる世界の海や川の魚たち — MiFish法の概要と最新情報—」(一般向けオンライン講座、2021年3月14日、九州大学、受講者約50名)
- 2) 日本生態学会第24回公開講演会・環境DNAの衝撃「バケツ一杯の水からわかる世界の海や川の魚たち —MiFish法の概要と最新情報—」(一般向け講演会、2021年3月21日、島根大学、受講者約200名)
- 3) OceanDNAテック2021・環境DNA技術はどこまで進むか? 「魚類環境DNAメタバーコーディン: MiFish法の概要と最新情報」(一般向け講演会、2021年6月30日、SHIBUYA QWS [渋谷キューズ]、受講者約100名)
- 4) 千葉県立中央博物館令和3年度講座「バケツ一杯の水から海の魚を探る」(全2回連続一般向け講座、2021年7月4日・9月19日、千葉県立中央博物館、受講者親子6組16名)
- 5) 沖縄美ら海水族館オンラインイベント「深海魚研究最前線! 世界初! 神秘的な深海魚リュウグウノツカイ誕生秘話」(一般向けオンライン講演会、2022年2月23日、沖縄美ら海水族館、受講者約90名)
- 6) 千葉県立中央博物館令和4年度講座「バケツ一杯の水から海の魚を探る」(全2回連続一般向け講座、2022年7月17日・9月18日、千葉県立中央博物館、受講者親子7組18名)
- 7) 千葉県立中央博物館公開イベント講演会「図鑑GET! 魚ができるまで」(一般向け講演会、2022年8月27日、千葉県立中央博物館、受講者約70名)
- 8) 令和4年度国公立大学病院医療技術関係職員研修オンライン講演会「環境DNAメタバーコーディング —バケツ一杯の水から棲んでいる魚がわかる技術—」(医療技術関係者向けオンライン講演会、2022年10月26日、受講者約80名)
- 9) OceanDNAテック2022・環境DNA技術はどこまで進むか? 「環境DNAメタバーコーディング MiFish法の最新情報 —魚類群集の時空間変動を捉える—」(一般向け講演会、2022年11月22日、東京大学柏図書館メディアホール、受講者約100名)
- 10) 沖縄美ら海水族館オンラインイベント「あの潜水艇で深海に行ってきました!」(一般向けオンライン講演会、2022年12月17日、沖縄美ら海水族館、受講者約70名)
- 11) 令和4年度全国環境研協議会・環境生物部会研修「バケツ一杯の水からわかる世界の海や川の魚たち —MiFish法の概要と最新情報—」(全国の環境研究者・技術者向け研修、2022年12月23日、オンラインミーティング、受講者約90名)
- 12) 2022年度千葉県生物学会公開講演会「環境DNAメタバーコーディング:バケツ一杯の水から棲んでいる魚がわかる技術」(一般向け講演会、2023年2月23日、千葉県立中央博物館、受講者約70名)

- 13) 令和5年度水産学会春季大会関連公開講演会・第2回核酸研究会ミーティング「環境DNAメタバーコーディングーバケツ一杯の水から棲んでいる魚がわかる技術」(一般向け講演会、2023年3月31日、東京海洋大学、受講者約100名)

【サブテーマ2】

- 1) 第23回ダヴィンチマスターズ「DNAを検出して博士になろう！」(小学生向け実験講座、2020年11月3日、神戸国際会議場、受講者約30名)
- 2) 根源を問い革新を生む国際的科学技术人材育成挑戦プログラム (ROOTプログラム) における実習講義「水中のDNAを使って魚の生息数を推定する」(中高生向け実験講座、2020年11月21日、神戸大学、受講者約10名)
- 3) 令和2年度西宮市生涯学習大学「宮水学園」ラジオ版教養講座「環境DNAで探る世界」(ラジオ講座、2020年11月14日放送)
- 4) 令和2年度水産資源保護啓発研究事業 環境DNA研究開発に関する講習会「環境DNAを用いた水中生物調査手法の開発と実践」(講演、2020年12月9日、まちなかキャンパス長岡、受講者約40名)
- 5) 箕面生物多様性会議 生物多様性復活活動報告会における講演「環境DNAで水中の生態系を覗く」(講演、2021年2月6日、みのお市民活動センター、受講者約30名)
- 6) 根源を問い革新を生む国際的科学技术人材育成挑戦プログラム (ROOTプログラム) における実習講義「水中のDNAを使って魚の生息数を推定する」(中高生向け実験講座、2021年11月14日、神戸大学、受講者16名)
- 7) 根源を問い革新を生む国際的科学技术人材育成挑戦プログラム (ROOTプログラム) における講義「環境DNAは何を語るか」(中高生向け講義、2022年11月3日、神戸大学、受講者約50名)
- 8) 根源を問い革新を生む国際的科学技术人材育成挑戦プログラム (ROOTプログラム) における実習講義「環境DNA実習」(中高生向け実験講座、2022年11月13日、神戸大学、受講者約20名)
- 9) 公開シンポジウム え、ニジマスって外来種なの？における講演「水中の生き物調査の新技术：環境DNA」(シンポジウムにおける講演、2022年12月10日、TKP札幌カンファレンスセンター、受講者約200名)
- 10) East Asia-Pacific Youth Environmental Forum 2023 in Osakaにおける英語模擬授業「Observing underwater biodiversity with environmental DNA」(2023年1月7日、高津高校、受講生約30名)
- 11) 令和4年度西宮市生涯学習大学「宮水学園」サイエンス講座「環境DNA分析は生物多様性の危機を救えるか？」(2023年1月13日、鳴尾公民館、受講者約50名)
- 12) 2023年水生昆虫談話会・日本陸水学会共催公開シンポジウム 水生昆虫における環境DNAのいまにおける講演「マクロ生物の環境DNA分析：生物分布から繁殖期推定まで」(基調講演、2023年1月21日、信州大学、受講者約150名)

(4) マスコミ等への公表・報道等

【サブテーマ1】(以下、オンライン版を除く20件に限定した)

- 1) 毎日新聞 (2022年7月1日「全長2.5mのヨコヅナイワシ撮影成功 深海の硬骨魚で世界最大」)
- 2) 日テレNEWS (2022年7月1日「去年新種として報告「ヨコヅナイワシ」、硬い骨を持つ深海魚としては世界最大と判明」)
- 3) テレ朝news (2022年7月1日、「世界最大 深海魚ヨコヅナイワシ撮影成功ノーカット映像で」)
- 4) NHK WORLD-JAPAN (2022年7月1日「Deep-sea camera captures giant 'yokozuna iwashi' in Pacific」)
- 5) The Mainichi (2022年7月1日「Japanese researchers take video of largest deep-sea bony fish in

the world」)

- 6) 静岡新聞 (2022年7月1日「駿河湾のヨコヅナイワシ まさに”横綱” 全長2.5メートル 海洋研究開発機構が発表」)
- 7) 日刊工業新聞 (2022年7月1日「海洋研究開発機構 「ヨコヅナイワシ」生態研究“深海の覇者”の姿暴く」)
- 8) 科学新聞 (2022年7月1日「世界最大の深海硬骨魚類 ヨコヅナイワシ 全長2.5メートル超 JAMSTECが撮影成功」)
- 9) 日本経済新聞 (2022年7月1日「深海魚ヨコヅナイワシ撮影 海洋機構 世界最大の2.5メートル」)
- 10) 朝日新聞 (2022年7月1日「2.5メートルのヨコヅナイワシ ただならぬ圧 水深2千メートルで撮影成功 餌カゴがぶり」)
- 11) The Times (2022年7月1日「Giant sumo fish lurking in deep off Japan is biggest ever found」)
- 12) Daily Star (2022年7月1日「Rare footage of world’s largest deep sea fish that lives in darkness 6,000 ft underwater」)
- 13) The Science Times (2022年7月1日「Largest deep sea fish captured in rare footage at 6,000-foot deep off the coast of Japan」)
- 14) 河北新聞 (2022年7月1日「深海の「横綱」は250センチ超 海洋機構「世界最大」と発表」)
- 15) 中国新聞 (2022年7月1日「トピックス ヨコヅナイワシ 世界最大 深海の硬骨魚類」)
- 16) 神戸新聞 (2022年7月1日「<ずーむあっぷ>横綱級イワシは深海最大」)
- 17) 長崎新聞 (2022年7月1日「科学トピックス/横綱級イワシは世界最大」)
- 18) 福井新聞 (2022年7月1日「ズームアップ 新種深海魚「ヨコヅナイワシ」硬骨魚類で世界最大」)
- 19) 愛媛新聞 (2022年7月1日「ヨコヅナイワシ深海最大」)
- 20) 朝日小学生新聞 (2022年8月4日、「新種の深海魚 ヨコヅナイワシ 全長2.5メートルをこす大物もいた」)

【サブテーマ2】

- 1) 読売新聞 (2021年6月13日、神戸版、「希少種生息域水から特定」)
- 2) 日経産業新聞 (2021年10月4日、全国版、「水をくむだけの環境DNA分析」)

(5) 本研究費の研究成果による受賞

【サブテーマ1】

特に記載すべき事項はない。

【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

(6) その他の成果発表

【サブテーマ1】

- 1) 宮 正樹 (総監修)「角川の集める図鑑GET! 魚」KADOKAWA、2022年6月8日の出版 (本書でヨコヅナイワシの生態や威嚇行動を紹介するとともに、環境DNAメタバーコーディング法について見開き2ページで紹介した)

【サブテーマ2】

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文 Abstract

Development of Biodiversity Monitoring Methods for Deep-sea Macro-organisms using Environmental DNA Metabarcoding

Principal Investigators: Masaki MIYA and Toshifumi MINAMOTO

Institution: Natural History Museum and Institute, Chiba / Kobe University

Tel: +81-43-265-3111 Fax: +81-43-266-2481 / Tel & Fax :+81-78-803-7743

E-mail: miya@chiba-muse.or.jp / minamoto@people.kobe-u.ac.jp

Cooperated by: National Institute for Environmental Studies, Okinawa Churashima Research Center, Kyoto University

[Abstract]

Key Words: Marine Protected Area (MPA), environmental DNA, metabarcoding, biodiversity monitoring, deep-sea macro-organisms, fish, invertebrates, offshore seabed nature conservation area

The conservation of marine ecosystems is a matter of global concern, and the Convention on Biological Diversity has set a target of designating 10% of coastal and marine areas as marine protected areas (MPAs) by 2020. While the Japanese government has recently designated MPAs in deep offshore waters, there are still many challenges regarding monitoring biodiversity that need to be addressed. The primary objective of this project is to develop a method for detecting deep-sea macro-organisms using environmental DNA (eDNA) metabarcoding, which allows for the simultaneous detection of multiple species from seawater samples. To achieve this objective, we have identified four criteria: 1) uniqueness or rarity, 2) endangered or declining species and/or their habitats, 3) vulnerability, and 4) biological diversity. The project is divided into two subgroups — fish and invertebrates — and both have 1) established experimental methods, 2) collected reference sequences associated with specimens for accurate species identification, and 3) tested the detectability of deep-sea macro-organisms using deep-sea water pumped from coastal areas and seawater taken from MPAs. For fishes, we optimized the MiFish metabarcoding methods and various experimental protocols to detect deep-sea fish. As a result, we detected a deep-sea-endemic teleost fish (Yokozunaiwashi), the largest of its kind, at depths of over 2,000 meters in an MPA. This species had previously been described from Suruga Bay, 400–600 kilometers away from the area, and has been unknown from the other areas. Additionally, we captured the biodiversity patterns and spatio-temporal dynamics of deep-sea fish communities using pumped deep-sea water and actual seawater from MPAs. For invertebrates, we designed new PCR primers for almost all major taxa in various mitochondrial gene regions and optimized experimental protocols accordingly. As a result, we detected the “giant squid,” with an unknown life history, at multiple MPA sites. Also, we captured biodiversity patterns and spatial dynamics of deep-sea invertebrate communities using pumped deep-sea water and actual seawater from MPAs. We conclude that the newly developed eDNA metabarcoding methods for fish and invertebrates provide relevant information that meets the above four criteria through future continuous monitoring. However, collecting more reference sequences for both groups is necessary to improve species identification accuracy. We also argue that biodiversity monitoring using eDNA metabarcoding and conventional methods, such as nettings and visual observations, is desirable to provide complementary biological information on the target organisms. Finally, we have created a manual of experimental protocols to ensure the reproducibility of experiments.