

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

S II-7 新たな海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）管理のための深海を

対象とした生物多様性モニタリング技術開発

(JPMEERF20S20700)

令和2年度～令和4年度

Development of Biodiversity Monitoring Methods for the Management of Deep-sea Marine
Protected Areas

<戦略研究プロジェクト代表機関>
国立研究開発法人海洋研究開発機構

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
2. 研究開発目的	2
3. 研究目標	3
4. 研究開発内容	4
5. 研究成果	8
5-1. 成果の概要	8
5-2. 環境政策等への貢献	13
5-3. 研究目標の達成状況	14
6. 研究成果の発表状況	17
6-1. 査読付き論文	17
6-2. 知的財産権	18
6-3. その他発表件数	18
7. 国際共同研究等の状況	18
8. 研究者略歴	18
II. 英文 Abstract	20

I. 成果の概要

プロジェクト名 SII-7 新たな海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）管理のための深海を対象とした生物多様性モニタリング技術開発

プロジェクトリーダー 藤倉 克則（国立研究開発法人海洋研究開発機構 地球環境部門 海洋生物環境影響研究センター センター長）

研究実施期間 令和2～令和4年度

研究経費

(千円)

	契約額
令和2年度合計額	100,000
令和3年度合計額	99,957
令和4年度合計額	99,957
合計額	299,914

研究体制

- （テーマ1）深海生物相の画像解析によるモニタリング法及びサンプリング法の開発（国立研究開発法人海洋研究開発機構）（JPMEERF20S20710）
- （テーマ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（千葉県立中央博物館）（JPMEERF20S20720）
- （テーマ3）深海微小生物相のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発（東京大学）（JPMEERF20S20730）

本研究のキーワード 深海生態系モニタリング、生物多様性、ランダー、海洋保護区、メタゲノム、環境DNA、画像解析

1. はじめに（研究背景等）

海洋の生態系や生物多様性の変動は著しく、海洋生態系の保全は地球規模の課題となっている。国際的にも生物多様性条約の愛知目標や持続可能な開発目標（SDGs）に、2020年までに沿岸域及び海域の10%を保全する目標が掲げられた。日本でも環境省を中心に、この目標を達成するため日本周辺海域において海洋保護区の指定を加速させた。

日本の海洋保護区は、管轄権内海域のうち沿岸域を中心に8.3%が指定されていたが、沖合域に関しては具体的な施策は一部を除き講じられておらず海洋保護区の設定は十分とは言えなかった。環境省では、日本が環境保全し得る領海及びEEZ内で重要度が高い海域を抽出し、2016年に「生物多様性の観点から重要度の高い海域」（以下、重要海域）として公表した。このときに用いた抽出の基準は、生物多様性条約で推奨される基準も参照しつつ、1.唯一性又は希少性、2.種の生活史における重要性、3.絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地、4.脆弱性、感受性又は低回復性、5.生物学的生産性、6.生物学的多様性、7.自然性、8.典型性・代表性の8項目であった。

環境省は、沖合域（深海底）における海洋保護区の設定について中央環境審議会の答申を踏まえて改正法案を国会に提出し2019年に改正自然環境保全法が成立した。海洋保護区の設定は、「重要海域」を基礎とし、海山、化学合成生態系が形成される熱水噴出域や湧水域、海溝等を対象として、可能な限りどの生態系の種類もいずれかの海洋保護区に含めるという方針を踏まえ、2020年に①伊豆・小笠原海溝、②中マリアナ海嶺・西マリアナ海嶺北部、③西七島海嶺、④マリアナ海溝北部が「指定書および保全計画書」のもとに沖合海底自然環境保全地域（以下、沖合海底保全地域）に指定された。

深海生態系は漁業・資源開発、テクトニクス、ゴミなどによって変動するため、設定した海洋保護区での生物多様性の変動があるか、開発等により自然環境が劣化していないか、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の継続的なモニタリングが必要である。つまり、海洋保護区の設定後もその管理が重要となる。

深海域の調査観測は、沿岸域・表層に比べ大がかりな調査機器と経費が必要となる。深海域の調査には、大型調査船、無人探査機ROV、有人潜水調査船、大型ウインチなどが必要であり調査の機会も限られる。大がかりな調査機器と高額な経費は、深海域の海洋保護区の継続的なモニタリングに大きな制約となる。最近、分子生物学的手法や画像解析手法が生物多様性や生態系の調査観測に用いられようになってきた。これら新手法を応用することで、深海域のモニタリングを効率的な調査機器と経費で行うことが可能になると思われる。

沖合海底保全地域のモニタリングでは、「重要海域」抽出の指標や「指定書および保全計画書」で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ことが重要である。深海底にも多様な生物が生息しており、微小生物（原核生物やメイオセントス）は海底かく乱が生じた際の環境変動への応答が早いという特徴を有し、魚類や大型無脊椎動物は希少性・固有性・脆弱性を評価するのに適している。よって広範囲の生物群について「重要海域」抽出の基準や「指定書および保全計画書」の事項が維持されているかを評価することが肝要である。

深海のモニタリングを効率的な調査機器と経費で行えるかを評価するためには、実際のフィールドで調査する必要がある。沖合海底保全地域は、水深6000mを超える海溝も含むが、日本で計画されている鉱物資源開発は水深2000m以浅であること、底引きトロールの最大水深は約1500mであること、生物量や多様性が高く漁場になっている海山の重要性を踏まえ、少なくとも水深2000mまでのフィールド調査で評価する必要がある。

2. 研究開発目的

沖合海底保全地域において、継続的かつ多地点でのモニタリングを実現するために、生物多様性や生態系研究で技術発展がめざましい分子生物学的手法や画像解析手法を取り込んだ簡便な深海生態系モニタリング法の構築を目的とする。そして、本研究により開発される低コストかつ簡便なモニタリング技術を、海洋保護区の実効的管理の第一歩とし、今後の継続的な深海モニタリングへの土台にすることを

目標とする。フィールド調査海域としては、沖合海底保全地域のうち海山が多く、本土から近距離にある「西七島海嶺」とする。

3. 研究目標

プロジェクト 全体目標	深海の生物多様性や環境に関して、低コストで実施できる簡便なモニタリング法を構築し、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえて生物情報等を取得できることを目標とする。なお、本課題では沖合深海底を対象としていることに鑑み、重要海域の抽出基準のうち、主に唯一性・希少性、絶滅危惧種の生育・生息地、脆弱性・感受性又は低回復性、生物学的生産性、生物学的多様性に関する生物情報等をモニタリング項目とする。
----------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

テーマ 1	深海生物相の画像解析によるモニタリング法及びサンプリング法の開発
テーマリーダー/ 所属機関	藤倉 克則/国立研究開発法人海洋研究開発機構
目標	本推進費全体では、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえ、広範囲の生物群（原核生物から脊椎動物まで）を対象に生物情報等を取得するべく、これまでの深海生態系調査に比べ低コストで実施できる簡便な深海生態系モニタリング法を構築することを目標とする。このために、人工知能などを用いた画像解析、環境 DNA やメタゲノムの解析技術を用い、映像・水・堆積物から生物データが取得できるようにする。また、水/堆積物採取と環境計測が可能な小型化したフリーフォール式現場観測装置を開発し、上記解析のためのサンプル・データを提供できるようにする。

テーマ 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
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	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。具体的には以下になる。 <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。

テーマ 3	深海微小生物相のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発
テーマリーダー/ 所属機関	浜崎 恒二/東京大学

目標	<p>深海の生物多様性や環境に関して、低コストで実施できる簡便なモニタリング法を構築し、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえた生物情報等の取得に資することを目標とする。特に本テーマでは、深海生物相の画像解析（テーマ1）によるモニタリングや深海大型生物相の環境DNAによるモニタリング（テーマ2）では検出できない原核生物や小型底生生物を対象とした技術開発を行うことにより、微生物から魚類までを含めた総合的な深海生態系モニタリングが可能となる技術の確立を目指す。</p>
----	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4. 研究開発内容

課題の目標は、大型調査船、大型深海用無人探査機、有人潜水調査船、大型ウインチなどを用いず、低コストかつ簡便に深海生態系をモニタリングし、「生物多様性の観点から重要度の高い海域」（重要海域）の選定基準（以下、重要海域選定基準）や沖合海底保全地域の「指定書および保全計画書」（以下、指定書）にある条件を評価する科学的なデータを取得できる手法を開発することである。そこで、フリーフォール式現場観測装置（ランダー）でサンプル採集や環境計測を行い、環境DNA、メタゲノム、画像解析を用い、重要海域選定基準や指定書の評価に資する深海生物の多様性や環境データを取得する手法の開発に取り組んだ（図1）。近年は民間企業等でも無人探査機を保有していることから、無人探査機の使用も想定し、映像から画像解析により、簡便に深海生物の多様性データを取得する手法の開発に取り組んだ（図1）。

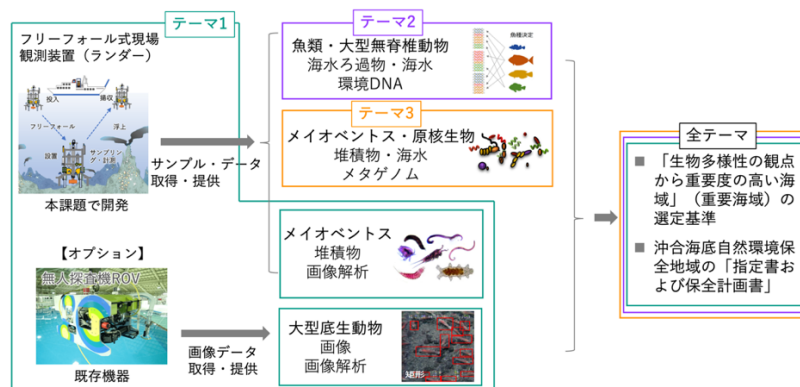


図1. 課題全体の研究開発の流れと分担テーマ

沖合海底保全地域の攪乱は、主に漁業や資源開発によるものが想定され、重要海域選定基準や指定書で対象としている魚類や大型無脊椎動物に加え、海底攪乱が生じた際の環境変動への応答が早い微小生物（原核生物やメイオベントス）もモニタリングの対象とした。分類群の多様性は、魚類と大型無脊椎動物は環境DNAで、メイオベントスと原核生物はメタゲノムで、さらに大型底生動物とメイオベントスについては画像解析で求める手法開発に取り組んだ。これらの攪乱は流向流速に応じて濁度、酸素濃度の変化をもたらすことが想定されるため、水温、塩分に加え、これらの環境因子もランダーで計測できるようにした。

これらの取り組みを効果的に推進するために研究開発テーマごとにグループを編成した。具体的にはランダー開発と画像解析を専門とするテーマ、環境DNA解析を専門とするテーマ、メタゲノム解析を専門とするテーマとした（表1、図1）。また、各テーマに異なる生物群を対象とするサブテーマを配置した。各テーマおよびサブテーマの研究開発内容を以下に示す。

【テーマ1】深海生物相の画像解析によるモニタリング法及びサンプリング法の開発

サブテーマ1：深海生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案

本サブテーマでは、大型調査船、大型無人探査機、有人潜水調査船、大型ウインチなど大型高額プラットフォームを用いなくても低コストで簡便に深海生態系をモニタリングできるフリーフォール式現場観測装置（以下、ランダー）を開発した。ランダーとは、金属フレームにサンプル採集機器や環境計測

機器を搭載し、フリーフォールで深海底に設置し自己浮上する観測装置である（図2）。このランダーを用いて、環境DNA、メタゲノム、画像解析に用いる海水、堆積物、海水ろ過物や環境データを取得できるようにして、他のサブテーマに提供した。民間環境会社等においても無人探査機により深海映像が取得可能となっていることを踏まえ、映像から大型底生動物の多様性データを取得するために、深層学習を用いて生物組成や分布量を算出する画像解析技術を開発した。本サブテーマは課題全体の推進や取りまとめを担った。

表 1. 課題を担うテーマとサブテーマ

新たな海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）管理のための深海を対象とした生物多様性モニタリング技術開発（課題代表：JAMSTEC）
テーマ1：深海生物相の画像解析によるモニタリング法及びサンプリング法の開発（リーダー：JAMSTEC）
サブテーマ1：深海生物相の画像解析をはじめとする深海生態系の多角的モニタリング法の提案（○JAMSTEC・東京大学）
サブテーマ2：深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発（○国立環境研究所・JAMSTEC）
テーマ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（リーダー：千葉県立中央博物館）
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・国立環境研究所・沖縄美ら島財団）
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・○千葉県立中央博物館・京都大学）
テーマ3：深海微小生物相のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発（リーダー：東京大学）
サブテーマ1：深海原核生物のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発（○東京大学）
サブテーマ2：深海小型底生生物のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発（○東京大学・熊本大学）

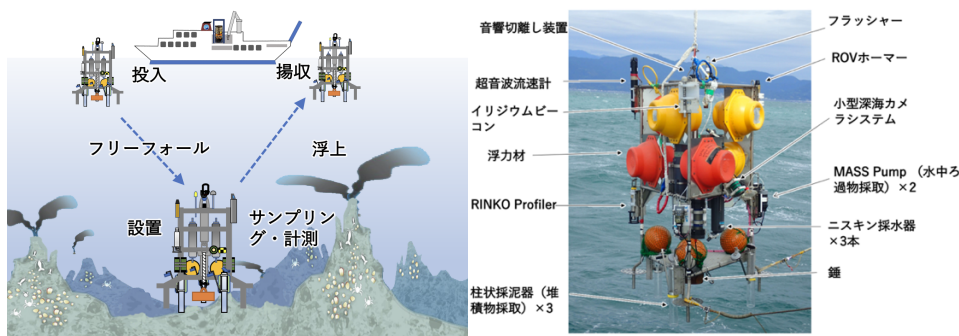


図 2. 左：フリーフォール式現場観測装置（ランダー）の投入から回収までのイメージ図。ランダーに錘を付け船上から投入し、観測終了後に音響信号により切り離し装置で錘を切り離し浮上させる。右：本課題で開発したフリーフォール式現場観測装置（ランダー）

サブテーマ 2：深海堆積物中生物相の画像解析によるモニタリング法の開発

本サブテーマでは、深海堆積物中のメイオベントス（1 mm のメッシュを通過して 32 μ m のメッシュで捕捉される底生動物）を対象として、迅速かつ簡便に群集組成情報を取得するために、画像解析を用いた解析手法を開発した。メイオベントスは深海底において最も生息密度の高い動物群であり、代表グループとして線虫類、カイアシ類等が含まれ、メイオベントス群集組成が、人為的な攪乱や環境変動により変化することが知られている。メイオベントス群集の生物多様性を評価するためには、堆積物からメイオベントスを分離するためのサンプル前処理技術、迅速かつ簡便にメイオベントスの分類群同定と個体数測定を可能とする技術の開発が重要であった。本サブテーマでは、沖合海底自然環境保全地域等からの海底堆積物を採取して、堆積物からメイオベントスを効率的に分画する技術について検討した上で、イメージングフローサイトメトリ（FlowCAM）を用いてメイオベントスの画像の取得と深層学習による画像解析に基づく自動計数・分類システムを構築した（図3）。また沖合海底自然環境保全地域の調査航海において、他のサブテーマとともに構築した手法の性能評価や改良に取り組むとともに、モデルの改良、チューニングを行うことで分類精度の向上を図るとともに、作業の簡略化・プロトコル化を進めることで、沖合海底自然環境保全地域のための生物多様性モニタリング手法を提示した。

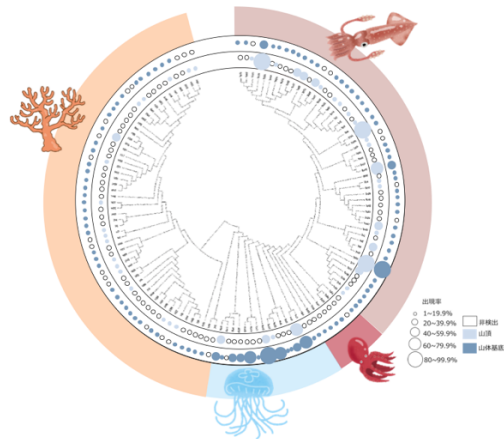


図 5. 沖合海底保全地域から環境 DNA メタバーコーディング法で検出した無脊椎動物分類群の出現率

【テーマ 3】深海微小生物相のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発

サブテーマ 1：深海原核生物のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発

本サブテーマでは、堆積物タイプ別の DNA 抽出と効果的な抽出方法の選定を行い、DNA 抽出方法等の違いによる 16S rRNA 遺伝子ベースの多様性推定への影響を調べた。堆積物の原核生物多様性について、沖合海底保全地域の海山堆積物を対象とした rRNA 遺伝子アンプリコン解析による種多様性評価、メタゲノム解析による多様性の評価を行った。海山堆積物のショットガンメタゲノムデータから個別種のゲノム (MAG: Metagenome Assembled Genome) を構築し、他の深海堆積物のデータと比較することにより特徴的な種を特定した。メタゲノム解析のための DNA 抽出プロトコルとして、海山堆積物の原核生物から断片化の少ない DNA を高効率で抽出するためのプロトコルを作成した。海山周辺堆積物から抽出したメタゲノム DNA を用いて、サンプルあたり 5~10 Gb の塩基配列を産出、そのうち 100 万配列から Genomape システムを使って原核生物遺伝子を解析し、生物機能(機能モジュール)情報を取得した (図 6)。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。

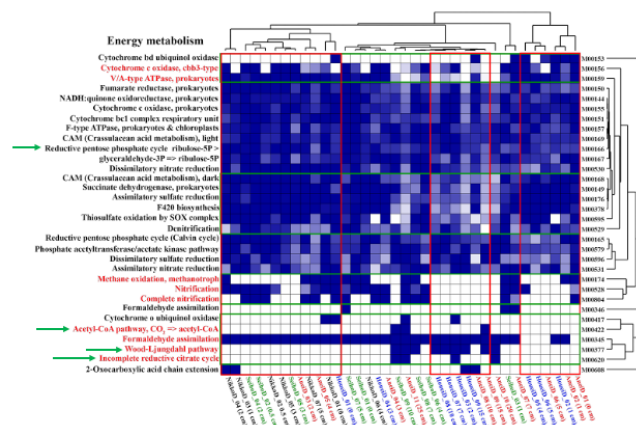


図 6. メタゲノム解析による沖合海底保全地域の原核生物群集のエネルギー合成機能の多様性

サブテーマ 2：深海小型底生生物のメタゲノム解析によるモニタリング法の開発

本サブテーマでは、八代海の海底堆積物を用いて堆積物からメイオベントスを選別し、その DNA を抽出する手法の実効性と条件を検討した。メイオベントスのモデル動物群を対象にミトコンドリア DNA データを用いた種多様性評価手法の検討を行った。十勝沖で深海底堆積物を採集して、環境 DNA およびメタゲノム解析手法を検討した。沖合海底保全地域の正保海山、日光海山、元禄海山、安永海山の海底堆積物からメイオベントスを選別し、メタゲノムデータを取得した。深海メイオベントス群集で線虫類に次ぐ優占動物群であるソコムジシコ目甲殻類をモデルとして、メタゲノムデータからそ

の種多様性を評価する手法を開発し（図7）、形態分類結果と照合することで有効性を検討した。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。

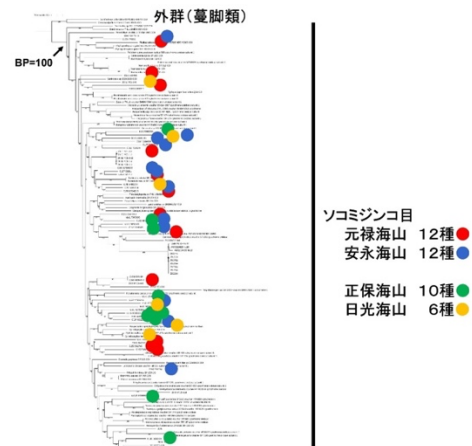


図7. DNA バーコードによる沖合海底自然環境保全地域の4海山のソコムジンコ類の系統解析結果

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

本課題では、フリーフォール式現場観測装置（ランダー）で海水、堆積物、海水ろ過物といったサンプルの採集や環境計測を行い、環境DNAやメタゲノム、画像解析で深海生物の多様性や環境に関するデータを取得し、重要海域の選定基準や沖合海底保全地域の指定書の評価に資する情報を取得する手法の開発に取り組んだ（図1）。民間企業等が無人探査機で調査を行うことも想定し、探査機の映像から画像解析により、簡便に深海生物の多様性を解析し情報を取得する手法の開発に取り組んだ（図1）。

(1) フリーフォール式現場観測装置（ランダー）の開発

(1-1) ランダーの構造とオペレーション

三角柱の金属フレーム（高さ2.35 m、一辺1.50 m）に、サンプル採集機器や環境計測機器を搭載したランダー（空中重量452 kg）を開発した。フレームには、海底での観測終了後に自己浮上させるための浮力材を取り付け、回収時（錘を切離した後）には約60 kgの浮力を確保した。船上からフリーフォールで水深2000 mまでの深海底に設置し、任意の時間で観測した後に、音響信号で錘を切離し自己浮上するようにした（図2）。

(1-2) サンプル採集

原核生物から魚類にわたる生物の多様性を分析するサンプル採集装置を、ランダーに装備した。

海水ろ過物を採集する現場大量ろ過システム MASS Pump：魚類と大型無脊椎動物の環境DNAを分析するためには約100 Lの海水を海底近傍から採水する必要がある。100 Lの海水をランダーでの採水は困難であることから、海水をろ過する現場大量ろ過システム（以下、MASS Pump）を開発した。これにより、1台のMASS Pumpで100 L以上の海底近傍でろ過した海水ろ過物が取得でき、ろ過物の環境DNA分析から魚類や大型無脊椎動物の出現データを取得できた。

堆積物サンリング装置：原核生物とマイオセントスのメタゲノム分析およびマイオセントスの画像解析には、層序をできるだけ乱さずに、少なくとも3本の柱状採泥器で堆積物を採取する必要がある。マルチプルコアラーなどで使用されている採泥器と、採泥器の蓋を閉めるトリガーに簡便で安価なガルバニックリリーサー（電触を利用した釣具のスイベルのような形状）を用いることで、層序をできるだけ乱さずに堆積物を採取できる柱状採泥器を開発した。得られた堆積物を用いてメタゲノム分析および画像解析を行い、原核生物とマイオセントスの多様性データを取得できた。

採水装置：原核生物のメタゲノムおよび大型無脊椎動物の環境DNAを分析するためには海底近傍から採水する必要がある。20 Lのニスキン採水ボトルを3本と採水ボトルの蓋を閉めるトリガーにガルバ

ニックリリーサーを用いることで、海底近傍で採水できるようにした。得られた海水を用いてメタゲノムおよび環境 DNA 分析を行い、原核生物と大型無脊椎動物の多様性データを取得できた。

(1-3) 深海の環境計測

漁業や資源開発、地質学的変動が生じた場合に変動する環境因子（水温、塩分、酸素濃度、水圧、濁度、流向流速）を想定し、それぞれの環境因子を計測する環境計測装置を装備した。

(2) 深海生物の多様性解析方法

(2-1) 環境 DNA による魚類の多様性解析

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（既存のデータと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。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：これまでに収集してきた標本に加えて国内外の機関から標本を収集し、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 172 bp）を決定した。日本産深海魚 1302 種のうち 854 種のデータを取得することができた。これは、目で 100%、科で 93.0%、属で 80.5%、種で 65.6%の網羅率となる。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を構築して一般利用を可能にするとともに (Miyata et al. 2021)、解析パイプラインをデータベースに搭載した (Zhu et al. 2023)。

海洋深層水を用いた深海性魚類の検出：5 箇所の海洋深層水汲み上げ施設において、計 1100 L の海水から環境 DNA を抽出し、MiFish 法によるメタバーコーディングを行った。すべてのサンプルから深海性魚類を検出でき、各施設からは 31~140 種の深海性魚類を検出できた。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。

沖合海底保全地域の魚類群集解析：沖合海底保全地域の海山ならびに駿河湾奥から得られた計 71 サンプルすべて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 2000 m 以深で発見されたトッププレデター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 2000 m 以深の海山斜面から検出されたことである (Fujiwara et al. 2022)。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。

(2-2) 環境 DNA による大型無脊椎動物の多様性解析

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：対象分類群を刺胞動物（花虫綱、鉢虫綱）、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）とし、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。

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。

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 箇所の海洋深層水汲み上げ施設の深層水より頭足綱 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）。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手法が、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。

沖合海底保全地域の無脊椎動物解析：沖合海底保全地域から頭足綱 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。ダイオウイカの環境 DNA も広範囲から検出された。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。

リファレンス配列の整備：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 1235 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。

(2-3) 画像解析による大型底生動物の多様性解析

民間環境会社等で用いる無人探査機や自律型無人潜水機の映像から、脆弱で低回復な海綿動物と冷水性サンゴ類といった大型底生動物を対象として生物組成や分布量などを算出する画像解析技術を開発した。深層学習における矩形検出を用いることで形態と色彩などの情報から、対象とする大型底生動物について、属から綱レベルで個体数や被度を算出できるようにした。

(2-4) 画像解析によるメイオベントスの多様性解析

沖合海底自然環境保全地域における深海底堆積物中のメイオベントスを対象として、迅速かつ簡便に群集組成をモニタリングするために、堆積物試料の処理法の検討を行い、メイオベントスの画像情報の取得と画像処理、深層学習による自動分類・計数システムを構築した。堆積物からメイオベントスを分画、回収する工程において、従来法と比較して本サブテーマで考案した方法 (Ludox による回収とセルストレーナーによるサイズ分画) は、より簡便、高い回収率でメイオベントスを分画することができた。FlowCAM 画像の深層学習による分類予測モデルの構築、画像処理と分類情報との紐付けやデータベース化、分類予測モデルを用いた予測性能評価、対象分類群の拡大により分類精度と正答率の向上を図ることができた。従来の検鏡による分類・計数では、1 試料につき 15-60 分の時間が必要であったが、それを 20-30 分に短縮でき、作業量や時間が効率的となった。これにより主要なメイオベントス (高次分類群) の自動分類・計測に必要な基盤技術を開発でき、重要海域海選定基準の生物学的多様性のデータを簡便に取得できるようになった。

(2-5) メタゲノムによるメイオベントスの多様性解析

柱状採泥で採集した深海底の堆積物サンプルから効率的にメタゲノム解析および環境 DNA 解析をする船上処理およびサンプルの保存方法を確立した。メタゲノム解析のために保存サンプルからメイオベントスの DNA を効率的に抽出する方法を確立した。深海メイオベントスのうち線形動物に次ぐ優占動物群であるソコミジンコ類を例として、既存および新規に決定したソコミジンコ類および外群のミトコンドリア DNA・COI 遺伝子および DNA バーコード領域の塩基配列の分子系統解析用データセットを整備した。次世代シーケンシングにより網羅的に決定したメタゲノムデータからソコミジンコ類の DNA バーコード領域の塩基配列を選別し、データセットを用いた分子系統解析によりサンプルに含まれていたソコミジンコ類の種数およびそれぞれの種の個体数を推定する手法を確立し、同時に採集したソコミジンコ類の形態分類結果と比較する事で手法の有効性を検証した。環境 DNA から DNA バーコード領域を PCR 法により増幅するための条件検討をおこない、効率的に PCR 産物を得る方法を確立した。

(2-6) メタゲノムによる原核生物の多様性解析

原核生物の俯瞰的な多様性および機能遺伝子情報の取得を可能とするため、DNA 抽出キット 5 種を比較し推奨キットを決定した。沖合海底保全地域の原核生物の多様性評価 (α 多様性、分類群組成) プロトコルを作成し、サンプルタイプ、地点、深度で多様性を比較した。保護区ではない堆積物 (釧路沖、拓洋第五海山) を含めた比較で、海山ごとに独自種の存在が示唆された。優占未培養原核生物系統群のゲノム情報取得技術を確立するため、沖合海底保全地域の海山堆積物のメタゲノムデータから 89 個の個別種のゲノムを構築し、これらの出現頻度をモニタリングするためのプロトコルを作成した。他の海域の堆積物のデータと比較することにより、他ではほとんど存在しない特徴的な最優占種

(Methylomirabilaceae 科の新規細菌種) を特定した。機能遺伝子の選別と解析手法構築、モニタリング項目の情報取得を可能とするため、海山堆積物の原核生物から高品質の DNA を高効率で抽出するためのプロトコル、塩基配列から機能遺伝子を解析するためのプロトコルを作成した。沖合海底保全地域の堆積物サンプルから、宝永・安永海山の群集に対して、日光・正保海山の群集は機能的に区別されることが示された。また、化学合成原核生物の指標となる 4 種類の CO₂ 固定経路のアバンダンスから生産性を評価する方法を考案した。

(3) 重要海域の選定基準や沖合海底自然環境保全地域の指定書の評価

本課題で開発した手法で深海生態系をモニタリングして得られた情報は、沖合海底保全地域が、開発等により自然環境が劣化していないか、海洋保護区として保全効果が発揮できているかなどの評価に資することが肝要となる。沖合海底保全地域で生じる主な攪乱としては、漁業と資源開発が想定され攪乱が生じた場合に評価に用いる科学的指標が必要となる。そこで、海洋保護区設定に先立ち抽出された重要海域選定基準と指定書から、人為的な攪乱を想定し指標となる項目を選定した。

重要海域選定基準からは、深海生態系にも適用できる「唯一性又は希少性」、「絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地」、「脆弱性、感受性又は低回復性」、「生物学的生産性」、「生物学的多様性」をモニタリング指標とした。沖合海底保全地域の指定書は、4箇所の保全地域それぞれにあるが、主に「特定の分類群の分布」、「化学合成生態系（熱水噴出域・湧水域など）」、「微生物多様性」を基に沖合海底保全地域が指定されており、これらをモニタリング指標とした。

本課題の各サブテーマが創出する指標を表2に示した。全体的に、本課題で開発した手法で、想定した人為的な攪乱により変動し、重要海域選定基準と指定書のモニタリング指標を検出できるようになった。重要海域選定基準の「唯一性又は希少性」および「生物学的多様性」では、すべてのサブテーマで対象とする分類群データが取得できるようになり、分類群の唯一の分布域や固有な分類群、出現分類群数のデータが取得できるようになった。また、テーマ1サブテーマ1では、映像と環境データから独特な海洋学的特徴を持つ場所を評価するデータも得られるようになった。「絶滅危惧種又は減少しつつある種の生育・生息地」では、レッドリストは大型生物を対象に種で指定されていることから、環境DNAから魚類と大型無脊椎動物の種を同定するテーマ2の手法でレッドリスト掲載種を検出できるようになった。「脆弱性、感受性又は低回復性」では、冷水性サンゴ類やオンデンザメのような大型生物で長寿命種の存在が指標となるため、大型生物の画像解析や環境DNAから魚類と大型無脊椎動物を同定するテーマ1サブテーマ1およびテーマ2の手法でデータが得られるようになった。「生物学的生産性」では、深海で唯一基礎生産となるのは熱水噴出域や湧水域に形成される化学合成生態系の原核生物であるため、テーマ3サブテーマ1の原核生物のメタゲノムから機能を解析しデータが得られるようになった。

沖合海底保全地域の指定書の「特定の分類群の分布」は、大型生物を対象に指定されているため、テーマ1サブテーマ1およびテーマ2の手法でデータが取得できるようになった。「化学合成生態系（熱水噴出域・湧水域など）」については、テーマ3サブテーマ1の原核生物のメタゲノムから化学合成機能を有する原核生物を検出できデータが得られるようになった。「微生物多様性」については、テーマ1サブテーマ1およびテーマ3の手法でメイオベントスと原核生物のデータが取得できるようになった。

表2. 本課題の各サブテーマで取得できる「生物多様性の観点から重要度の高い海域」（重要海域）の抽出基準と沖合海底保全地域の「指定書および保全計画書」の指標

		重要海域の抽出基準				指定書及び保全計画書			
		唯一性、希少性	絶滅危惧種の生育・生息地	脆弱性、感受性、低回復性	生物学的生産性	生物学的多様性	分類群	熱水噴出域・湧水域	微生物多様性
テーマ1	サブテーマ1：大型生物画像解析	○独特な海洋学的特徴		○		○分類群組成・個体数	○		
	サブテーマ2：メイオベントス画像解析	○				○分類群組成・個体数			○
テーマ2	サブテーマ1：脊椎動物（魚類）環境DNA	○	○レッドリスト掲載種	○		○分類群組成	○	○	
	サブテーマ2：無脊椎動物環境DNA	○	○レッドリスト掲載種	○		○分類群組成	○	○	
テーマ3	サブテーマ1：原核生物メタゲノム	○			○化学合成原核生物	○分類群組成・個体数			○
	サブテーマ2：メイオベントスメタゲノム	○				○分類群組成・個体数			○

(4) 簡便化・低コスト化

(4-1) 簡便化

フリーフォール式現場観測装置（ランダー）は、深海生態系モニタリングに使われる深海用大型無人探査機や有人潜水調査船、大型ウインチと採水器に比べ小型軽量であり、数百トンクラスの調査船や作

業船でオペレーションができる。専門のオペレーターも不要となり簡便な深海生態系モニタリング手法となる。

(4-2) 低コスト化

ランダーの製作コストは約 3000 万となる。有人潜水調査船「しんかい 6500」の建造費は約 120 億円、深海用大型無人探査機は約 4 億円以上、大型ウインチと採水器は約 6 億円となり、本課題で開発したランダーは既存方法に比べ低コストとなる。ランダーを用いた調査を民間調査会社を実施する場合と JAMSTEC が実施する場合の海域調査費を比較した。経費は以下のように同一の条件のもと試算した。

- ・沖合海底自然環境保全地域（海洋保護区）においてフリーフォール式現場観測装置（ランダー）を用いて、データ・サンプルを取得する。
- ・対象とする沖合海底自然環境保全地域（海洋保護区）は図 3 の中マリアナ海嶺・西マリアナ海嶺北部沖合海底自然環境保全地域にある立冬海山（北緯 21 度 46 分 00 秒 東経 142 度 04 分 00 秒、水深 2000 m）とする。
- ・東京湾の港から出入港とする。
- ・ランダー観測は設置と回収で 2 日間、これを 3 地点で行う。

その結果、JAMSTEC に比べ民間調査会社では JAMSTEC の約半額で海域調査ができることがわかった（表 3）。民間調査会社は JAMSTEC の調査船に比べ小型船舶を用いることが大きな要因である。以上のことから、本課題で開発した手法は、既存方法に比べ低コスト化を図れたことになる。

表 3. 民間調査会社と JAMSTEC が沖合海底自然環境保全地域（海洋保護区）で海域調査を行った場合の経費比較

組織名	見積もり金額	備考
A 社	68,750,000円	調査船664 t 使用
B 社	78,639,000円	傭船1292 t使用
JAMSTEC	152,558,530円	自社調査船「かいめい」 5747 t 使用

(5) マニュアル公開

本課題で開発した手法を、課題参画者以外が用いて深海生態系のモニタリングを実施するためには、マニュアルが必要である。そこで、フィールド調査からラボ実験、データ解析などを詳細に記述したマニュアル「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（海底設置型フリーフォール式ランダーおよび画像を用いて）」をインターネットで公開した（https://www.jamstec.go.jp/bioenv/j/mpa-monitoring-method/pdf/monitoring_manual.pdf）。これにより、海洋調査や分子生物研究の経験者が、深海生態系をモニタリングできるようになると期待する。

(6) 特筆する成果

特筆すべき成果としては、西七島海嶺沖合海底保全地域からのヨコヅナイワシの発見が挙げられる（図 8）。ヨコヅナイワシは 2016 年に採集され、2021 年に新種として記載されたセクトリイワシ科最大の魚類で、食物連鎖における栄養段階が非常に高く、駿河湾最深部の生態系の頂点に立つトップ・プレデターであることが判明していた。これまでに採集されたヨコヅナイワシはわずか 7 個体のみで、駿河湾以外の海域からは報告がなかったが、駿河湾より 400 キロメートル以上離れた沖合海底保全地域から、ヨコヅナイワシの遺伝子配列を検出した。ベイトカメラ（海底設置型餌付きカメラ）を投入したところ、全長 2.5 メートルを超す巨大なヨコヅナイワシの撮影に成功し、本種の新たな生息域を示すことができた。トップ・プレデターは生態系の生物多様性や機能の維持に重要な役割を果たしており、トップ・プレデターが失われると、生態系が大きく崩壊してしまうことが報告されている。沖合海底保全地域でヨコヅナイワシのようなトップ・プレデターの存在が確認できたことで、沖合海底保全地域の健全性が明らかとなり、今後の生態系モニタリングの絶好の対象種とできる。

また 2020 年からの一連の調査により、沖合海底保全地域から 8 種を新種記載したほか、数多くの日本初記録種や希少種の発見が相次いだ。

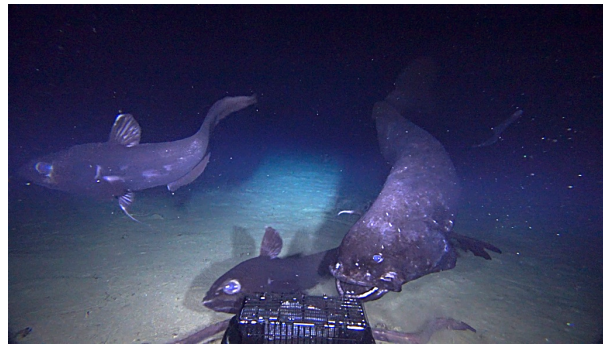


図 8. 西七島海嶺沖合海底自然環境保全地域で生息が確認されたヨコヅナイワシ。

5-2. 環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

- ・本課題で実施した西七島海嶺沖合海底保全地域のフィールド調査は、沖合海底保全地域を管理するために環境省の受託調査航海「沖合海底自然環境保全地域モニタリング」と連携して実施した。よって本課題で得られた情報の一部は、環境省に提示し、西七島海嶺の沖合海底保全地域の管理に用いられた。
- ・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。
- ・国交省の河川水辺の国勢調査のテーマ調査に本課題で至適化された 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。
- ・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や東京湾における魚類群集調査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。
- ・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、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>

A. 沖合海底保全地域（深海底の海洋保護区）の管理

【深海における生態系モニタリングの効率化】深海域で生物多様性や生態系に関する科学的データを取得するには、専用の深海調査用大型プラットフォームや、高額な経費、高度なノウハウが必要なため調査の機会は限定的である。本課題で開発したランダーを主体とした簡便で低コストな深海生態系のモニタリング手法は、高頻度な深海調査の機会を増加させ、深海域の生物多様性や生態系に関する科学的データの取得を促進に活用されることが期待できる。

【沖合海底保全地域指定条件や生物多様性の観点から重要度の高い海域（重要海域）選定条件の点検】深海生態系は自然のみならず漁業や資源開発などにより変動するため、沖合海底保全地域指定後も指定した条件が満たされているか確認する必要がある。環境 DNA、メタゲノム、画像から得られる生物多様性データと、ランダーで計測する環境データは沖合海底保全地域の指定書にある条件の評価に活用されることが期待できる。

【沖合海底保全地域保全計画の推進】沖合海底保全地域の「計画書」には、「調査研究等の推進」と「おおむね 10 年ごとの点検」が提示されている。簡便で低コストな深海生態系のモニタリング手法を用い、高頻度で深海域の生物多様性や生態系に関する科学的データを取得することで、保全計画の効率的な実行に貢献することが期待できる。

B. 30by30 に向けた科学情報の集積（新たな保全海域設定のための科学情報の集積）

昆明・モンリオール生物多様性枠組における 2030 年までに海域の 30%を保全する（30by30）目標を日本周辺の海域で達成するには、主に深海底を含む沖合海域で海洋保護区もしくは OECM が設定される可能性が高い。これらの保全海域を設定するためには、深海底を含む沖合海域で生物多様性や生態系に関する科学的データの集積が必要となる。効率的な深海生態系のモニタリング手法は、新たな保全海域設定のための科学的データの集積に活用できる。

C. 環境 DNA 解析手法の国際展開

マニュアルに記載された内容（特に 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）を中心とする論文では、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。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

プロジェクト全体目標	目標の達成状況
<p>深海の生物多様性や環境に関して、低コストで実施できる簡便なモニタリング法を構築し、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえて生物情報等を取得できることを目標とする。なお、本課題では沖合深海底を対象としていることに鑑み、重要海域の抽出基準のうち、主に唯一性・希少性、絶滅危惧種の生育・生息地、脆弱性・感受性又は低回復性、生物学的生産性、生物学的多様性に関する生物情報等をモニタリング項目とする。</p>	<p><u>目標を上回る成果をあげた。</u></p> <p>深海の生物多様性や環境に関して、現場でサンプル採集や環境計測ができるフリーフォール式現場観測装置（ランダー）を開発し実海域で使用できるようにした。ランダーでは、海水、海水ろ過物、堆積物が採集でき、これらのサンプルから環境 DNA で魚類と大型無脊椎動物、メタゲノムでメイオセントスと原核生物はメタゲノム、画像解析でメイオセントスについて分類群の多様性、原核生物の機能に関するデータを得ることができた。また、無人探査機による深海映像から画像解析により大型底生動物の多様性データを取得手法を開発した。ランダーを用いた調査方法は、従来の深海調査に比べ、小型・軽量化、製作費を一桁以上低コスト化、オペレーションの簡便化、調査航海経費の低コスト化となった。そして、沖合海底保全地域において環境 DNA、メタゲノム、画像解析で、重要海域選定基準（唯一性・希少性、絶滅危惧種の生育・生息地、脆弱性・感受性又は低回復性、生物学的生産性、生物学的多様性など）および指定書を踏まえた基準や条件を評価する情報を取得できるようになった。ここまでは目標どおりの成果となる。</p> <p>本課題で開発した技術を広く展開するために、詳細なマニュアルを整備し公表した。深海生態系の最上位捕食者で、かつ希少種である巨大深海魚「ヨコヅナイワシ」を沖合海底保全地域で確認し、今後、当該海域の重要なモニタリング指標種となることを見出した。限られた予算のなかで沖合海底保全地域のフィールド調査を実施したが、他の研究プロジェクト航海と連携した航海の実施などにより、フィールド調査の機会を予算規模以上に増加させ、他のテーマも含め調査手法の開発機会を増加できた。これらは目標を上回る成果と思われる。</p>

テーマ1 目標	目標の達成状況
<p>本推進費全体では、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえ、広範囲の生物群（原核生物から脊椎動物まで）を対象に生物情報等を取得するべく、これまでの深海生態系調査に比べ低コストで実施できる簡便な深海生態系モニタリング法を構築することを目標とする。このために、人工知能などを用いた画像解析、環境 DNA やメタゲノムの解析技術を用い、映像・水・堆積物から生物データが取得できるようにする。また、水／堆積物採取と環境計測が可能な小型化したフリーフォール式現場観測装置を開発し、上記解析のためのサンプル・データを提供できるようにする。</p>	<p><u>目標を上回る成果をあげた。</u></p> <p>無人探査機を用いた深海調査を想定し、機械学習やモデルを用いた画像解析から重要海域海選定基準の「脆弱性・低回復性」と「多様性」にあたる海綿動物と冷水性サンゴ類といった大型底生動物の分類群判別と個体数、被度を効率的に取得できるようにした。画像解析の深層学習のモデルについて、サブテーマ2とそれぞれを分担して検討し効果的なモデルを採用することができた。深海堆積物からメイオベントスを簡便かつ高い回収率で分画、回収するための新たなサンプル処理技術を開発できた。メイオベントスの効率的な分画手法を確認し、FlowCAM で画像情報を取得したメイオベントスについても、DNA バーコーディングやメタゲノム解析を行う見込みを立てることができた。重要海域海選定基準の生物学的多様性（分類群組成と各分類群の個体数）のデータを簡便に取得できるようになった。</p> <p>ランダーを開発し、沖合海底保全地域において環境 DNA、メタゲノム、画像解析の分析に用いるサンプルと、環境データを取得できるようにし、他のテーマやサブテーマに提供した。ランダーは従来より深海調査に用いられている調査機器に比べ、小型・軽量化、製作費を一桁以上低コスト化、オペレーションの簡便化、調査航海経費の低コスト化ができた。調査航海の実施、アドバイザーの助言取り込み、全体会合などを行い、各テーマ・サブテーマが連携・協同して効率的に計画が進められるようにしにした。ここまでは目標どおりの成果となる。</p> <p>さらに、本課題で開発した技術を広く展開するために、詳細なマニュアルを整備し公表した。テーマ2と共同で深海生態系の最上位捕食者で、かつ希少種である巨大深海魚「ヨコヅナイワシ」を沖合海底自然環境保全地域で確認し、今後、当該海域の重要なモニタリング指標種となることを見出した。ほかにも8新種の発見があり沖合海底保全地域には未知種が生息するポテンシャルを示し海洋保護区としての重要性をした。限られた予算のなかで海洋調査船による沖合海底保全地域のフィールド調査を実施したが、他の研究プロジェクト航海と連携した航海の実施などにより、フィールド調査の機会を予算規模以上に増加させ、他のテーマも含め調査手法の開発機会を増加できた。これらは目標を上回る成果と思われる。</p>

テーマ2 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。具体的には以下になる。</p>	<p><u>目標どおりの成果をあげた。</u></p> <p>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、既存のものがない場合は新規PCRプライマーを開発し、深海から得られた環境DNAから各種深海生物の検出に成功した。

<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。 	<ul style="list-style-type: none"> ・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。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。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。 ・全国各地の施設の海洋深層水（計 1,100 L）をろ過することで、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。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。 ・沖合海底保全地域の海山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。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、無脊椎動物ではダイオウイカを多くの地点で検出することができた。また、多様性（種組成）の検出により重要海域選定基準を踏まえた多様性評価指標（多様性、唯一性、絶滅危惧種）を取得する技術を確立した。 ・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、再現性の高い調査結果が誰でも得られることになる。
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

テーマ3目標	目標の達成状況
<p>深海の生物多様性や環境に関して、低コストで実施できる簡便なモニタリング法を構築し、海洋保護区（沖合海底自然環境保全地域）の指定の基礎となる重要海域の抽出基準を踏まえた生物情報等の取得に資することを目標とする。特に本テーマでは、深海生物相の画像解析（テーマ1）によるモニタリングや深海大型生物相の環境 DNA によるモニタリング（テーマ2）では検出できない原核生物や小型底生生物を対象とした技術開発を行うことにより、微生物から魚類までを含めた総合的な深海生態系モニタリングが可能となる技術の確立を目指す。</p>	<p>目標どおりの成果をあげた。</p> <p>原核生物や小型底生生物を対象として、沖合海底保全地域の堆積物サンプルのメタゲノム解析を可能とし、重要海域選定基準を踏まえた多様性評価指標（多様性、唯一性、希少性、生産性）を取得する技術を確立した。堆積物の原核生物から高品質の DNA を高効率で抽出するためのプロトコル、得られた塩基配列から機能遺伝子を解析するためのプロトコルを作成し、実サンプルを用いた機能的な比較ができた。また、機能遺伝子の解析から生産性を評価する方法を考案することができた。深海メイオベントス群集で優占するソコムジンコ類を例にして、整備したデータベースを用いて、従来の形態分類と同等の多様性データ（種組成と各種の個体数）を得ることができることが示された。同じ方法で他の分類群についても解析することが可能であることから、沖合海底域のメイオベントス群集の多様性を評価し、重要海域選定基準を踏まえてモニタリングすることが可能となった。</p>

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

21 件

<主な査読付き論文>

【テーマ1】

- 1) Kawato, M., T. Yoshida, M. Miya, S. Tsuchida, Y. Nagano, M. Nomura, A. Yabuki, Y. Fujiwara, K. Fujikura (2021) Optimization of environmental DNA extraction and amplification methods for metabarcoding of deep-sea fish. *Method X*, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101238> (IF: 1.837) テーマ2 と共同
- 2) Koeda, K., S. Takashima, T. Yamakita, S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2021) Deep-sea fish fauna on the seamounts of southern Japan with taxonomic notes on the observed species. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(11), 1294, <https://doi.org/10.3390/jmse9111294> (IF:2.744)
- 3) Aoki, K., Fujiwara Y, Tsuchida S (2022) Estimating deep-sea fish population density from the odour extension area: A theoretical basis and comparison with the conventional methods. *Frontiers in Marine Science*, doi.org/10.3389/fmars.2022.854958 (IF:5.247)
- 4) Fujiwara., Y., Tsuchida S., Kawato M., Masuda K., Sakaguchi S.O., Sado T., Miya M. and 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. doi: 10.3389/fmars.2022.945758 (IF:5.247) テーマ2 と共同
- 5) Hookabe N, Koeda K, Fujiwara Y, Tsuchida S, Ueshima R. (2022) First eumonostiliferous nemertean from the Nishi-Shichito Ridge, *Genrokunemertes obesa* gen. et sp. nov. (Eumonostilifera, Nemertea). *PeerJ*, 10:e13857 <https://doi.org/10.7717/peerj.13857> (IF:3.061)
- 6) Hookabe, N, N. Jimi, H. Yokooka, S. Tsuchida, Fujiwara, Y. (2022) *Lacydonia shohoensis* (Annelida, Lacydoniidae) sp. nov. a new lacydonid species from deep-sea sunken wood discovered at the Nishi-Shichito Ridge, Northwestern Pacific Ocean. *Journal of the Marine Biological Association UK*, 101(6) 1-7, DOI:10.1017/S0025315421000862 (IF:1.559)
- 7) Jimi, N., C. Chen, Y. Fujiwara (2022) Two new species of *Branchinotogluma* (Polynoidae: Annelida) from chemosynthesis-based ecosystems in Japan. *Zootaxa* 5138 (1): 017–030. doi 10.11646/zootaxa.5138.1.2 (IF:1.028)
- 8) Hookabe, N., H. Kohtsuka, Y. Fujiwara, S. Tsuchida, R. Ueshima (2023) Three new species in *Tetrastemma* Ehrenberg, 1828 (Nemertea, Monostilifera) from sublittoral to upper bathyal zones of the northwestern Pacific. *ZooKeys* 1146: 135-146. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1146.95004> (IF:1.496)
- 9) Jimi, N., I. Kobayashi, T. Moritaki, S. P. Woo, S. Tsuchida, Y. Fujiwara (2023) Insights into the diversification of deep-sea endoparasites: phylogenetic relationships within *Dendrogaster* (Crustacea: Ascothoracida) and a new species description from a western Pacific seamount. *Deep-Sea Research I*, <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2023.104025> (IF:3.101)
- 10) Kobayashi I, Yamamoto M, Fujiwara Y, Tsuchida S, Fujita T (2022) First Record of the Family Myxasteridae (Asteroidea: Velatida) from Western North Pacific with Description of a New Species of *Asthenactis*. *Species Diversity* 27: 251-258, doi 10.12782/specdiv.27.251 (IF:0.336)

【テーマ2】

- 1) 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) テーマ1 と共同
- 2) Komai, T., Tsuchida, S., Fujiwara, Y. (In review) 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. テーマ1と共同

- 3) Minamoto, T. (2022) Environmental DNA analysis for macro-organisms: Species distribution and more. DNA Research, 29: dsac018. (IF: 4.477)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 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)
- 8) Wu, Q., & Minamoto, T. (accepted). Improvement of recovery yield of macro-organismal environmental DNA from seawater samples. Analytical Sciences. (IF: 1.967)
- 9) 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)
- 10) 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・小島不二夫 (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)

【テーマ3】

特に記載すべき事項はない。

6-2. 知的財産権

【テーマ1】

- 1) 藤原義弘、土田真二、河戸勝、吉田尊雄、増田殊大；「自律型大量濾過システム」、特許願 22P007、令和5年3月20日

【テーマ2】

特に記載すべき事項はない。

【テーマ3】

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）	3件
口頭発表（学会等）	21件
「国民との科学・技術対話」の実施	52件
マスコミ等への公表・報道等	40件
本研究費の研究成果による受賞	0件
その他の成果発表	6件

7. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

8. 研究者略歴

プロジェクトリーダー

藤倉 克則

東京水産大学大学院修了、学術博士（水産学）。現在、国立研究開発法人海洋研究開発機構 地球環境部門 海洋生物環境影響研究センター長

テーマリーダー

テーマ 1) 藤倉 克則

東京水産大学大学院修了、学術博士（水産学）。現在、国立研究開発法人海洋研究開発機構 地球環境部門 海洋生物環境影響研究センター長

テーマ 2) 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。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）

テーマ 3) 浜崎 恒二

東京大学農学部卒業、博士（農学）。現在、東京大学大気海洋研究所教授

II. 英文 Abstract

Development of Biodiversity Monitoring Methods for the Management of Deep-sea Marine Protected Areas

Principal Investigator: Katsunori FUJIKURA

Institution: 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka City, Kanagawa, JAPAN

Tel: 046-867-9555 / Fax: 046-867-9525

E-mail: fujikura@jamstec.go.jp

Cooperated by: National Institute for Environmental Studies, Japan, The University of Tokyo, Natural History Museum and Institute, Chiba, Okinawa Churashima Foundation, Kobe University, Kyoto University, Kumamoto University

[Abstract]

Key Words: Deep-sea ecosystem monitoring, Biodiversity, In-situ Free-Fall Deep-Sea Ecosystem Observatory (Lander), Marine protected areas, Metagenome, Environmental DNA, Image analysis

Based on the Aichi Targets of the Convention on Biological Diversity, marine protected areas were established on the deep-sea floor in Japanese waters in 2020. However, the conditions for marine protected area designation should be inspected for conformity, as deep-sea ecosystems fluctuate due to geological phenomena, deep-sea fishing, and resource exploitation. Opportunities for deep-sea research are limited, as they typically require large oceanographic research vessels, manned submersible research vessels, human-occupied vehicles, large deep-sea remotely operated vehicles (ROV), or large winches, which are expensive and specialized operators.

Fortunately, molecular biological methods, deep learning, and machine learning have made remarkable progress and make it possible to obtain data on biodiversity, functions, and abundance from seawater, sediments, and video images. Additionally, underwater environmental measurement sensors are also becoming smaller and more precise. Leveraging these advanced technologies, we aim to develop simple and inexpensive methods for deep-sea ecosystem monitoring.

Considering the depths targeted for deep-sea fisheries and resource exploitation, the monitoring methods to be developed for this project can be used at depths of up to 2000 m. Deep-sea marine protected areas are designated based on the distribution and biodiversity of microorganisms and animals, as well as the environmental characteristics of the marine ecosystem. Therefore, we aimed to use this monitoring method to obtain taxonomic data on prokaryotes, meiobenthos, mega invertebrates, and fish, along with information on their abundance, prokaryotic function, and environmental characteristics of the marine ecosystem.

We have developed an instrument called the In-situ Free-Fall Deep-Sea Ecosystem Observatory (Lander), which is deployed from a ship, lands on the deep-sea floor, and surfaces to conduct the observation. The lander is equipped to collect seawater, seawater filtrate, and sediments on the deep-sea floor. It can also acquire data on video, water temperature, salinity, water pressure, turbidity, current direction and velocity, and dissolved oxygen.

Data on prokaryotic biodiversity, abundance, and function were obtained from metagenomic analyses of seawater and sediment samples. We determined the biodiversity and abundance of meiobenthos by metagenomic and image analysis from sediment samples. Data on the biodiversity of fish and mega invertebrates were obtained by environmental DNA analysis using samples of seawater filtrate. In cases

where remotely operated vehicles (ROV) acquired images, data on biodiversity and abundance of mega invertebrates were obtained through image analysis . A detailed manual on how to this deep-sea ecosystem monitoring method is available on the web page (see https://www.jamstec.go.jp/bioenv/j/mpa-monitoring-method/pdf/monitoring_manual.pdf).

The free-fall deep-sea ecosystem observation lander will be smaller, lighter, and less expensive than previous deep-sea survey tools, and will also require no specialized operators. Deep-sea surveys with landers will be less expensive because they can be done with smaller vessels. Such a simple and inexpensive method of monitoring deep-sea ecosystems would increase opportunities for deep-sea research and allow management of deep-sea marine protected areas based on scientific data.