

R2-R4年度 4-2004 環境研究総合推進費 (JPMEERF20204004)

「環境DNAに基づく希少種・外来種の分布動態評価技術の開発と実践」

研究代表：荒木仁志（北海道大学）

サブテーマリーダー：

山中裕樹（龍谷大学）、内井喜美子（大阪大谷大学）、土居秀幸（京都大学）

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

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

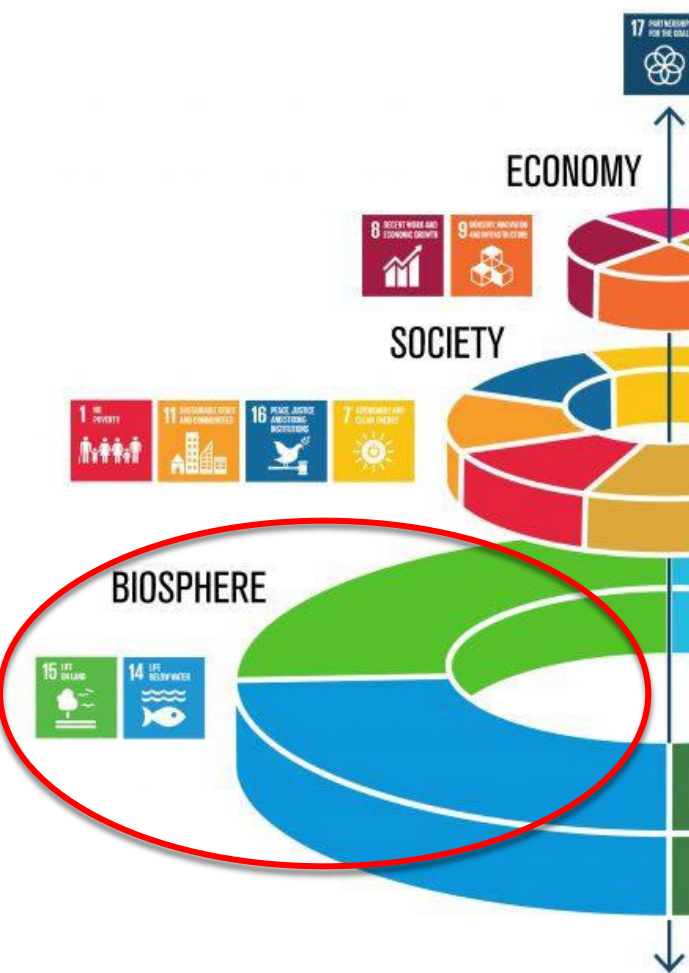
行政要請研究テーマ（行政ニーズ）

(4-2) 侵略的外来種の早期発見・早期防除技術等の開発

(4-4) 希少野生動植物の保全のための二次的自然の維持管理手法の検討

研究実施期間 令和2年度～令和4年度

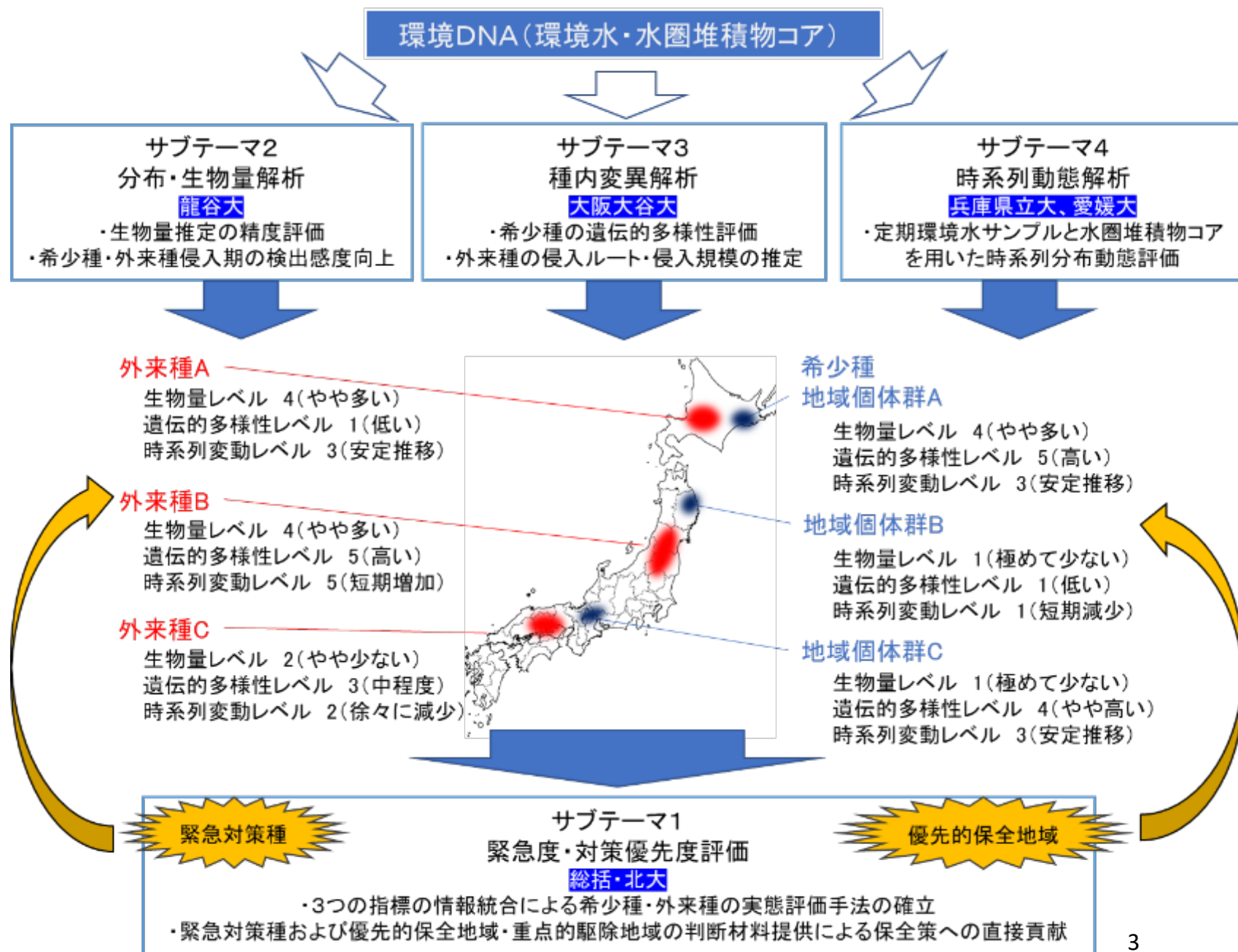
生物多様性とSDGs



15.1	2020年までに、国際協定の下での義務に則って、 森林、湿地、山地及び乾燥地をはじめとする陸域生態系と内陸淡水生態系及びそれらのサービスの保全、回復及び持続可能な利用を確保する。
15.2	2020年までに、あらゆる種類の森林の持続可能な経営の実施を促進し、森林減少を阻止し、劣化した森林を回復し、世界全体で新規植林及び再植林を大幅に増加させる。
15.3	2030年までに、砂漠化に対処し、砂漠化、干ばつ及び洪水の影響を受けた土地などの劣化した土地と土壌を回復し、 土地劣化に荷担しない世界の達成に尽力する。
15.4	2030年までに持続可能な開発に不可欠な便益をもたらす山地生態系の能力を強化するため、 生物多様性を含む山地生態系の保全を確実にする。
15.5	自然生息地の劣化を抑制し、生物多様性の損失を阻止し、2020年までに絶滅危惧種を保護し、また絶滅防止するための緊急かつ意味のある対策を講じる。
15.6	国際合意に基づき、遺伝資源の利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分を推進するとともに、遺伝資源への適切なアクセスを推進する。
15.7	保護の対象となっている動植物種の密猟及び違法取引を撲滅するための緊急対策を講じるとともに、違法な野生生物製品の需要と供給の両面に対処する。
15.8	2020年までに、外来種の侵入を防止するとともに、これらの種による陸域・海洋生態系への影響を大幅に減少させるための対策を導入し、さらに優先種の駆除または根絶を行う。
15.9	2020年までに、生態系と生物多様性の価値を、国や地方の計画策定、開発プロセス及び貧困削減のための戦略及び会計に組み込む。
15.a	生物多様性と生態系の保全と持続的な利用のために、あらゆる資金源からの資金の動員及び大幅な増額を行う。
15.b	保全や再植林を含む持続可能な森林経営を推進するため、あらゆるレベルのあらゆる供給源から、持続可能な森林経営のための資金の調達と開発途上国への十分なインセンティブ付与のための相当量の資源を動員する。

→ 希少種・外来種モニタリングの切り札としての「環境DNA」

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



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

全体目標

本研究の最終目標は、環境 DNA 技術を用いて希少種・外来種の分布・動態や種内変異に関する情報を多次元的に収集し、それらを統合することで個々の希少種・外来種問題に対する対策優先度を科学的に評価する方法を提案することにある。

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

4つの目標

A) 希少種・外来種の分布・生物量推定精度の検証と改良

- 希少種・外来種DNAリファレンスデータの精査と拡充
- 環境DNAによる生物量推定精度の検証と感度向上技術開発

B) 希少種・外来種の種内変異解析手法の確立

- 環境DNAによる種内変異検出手法の開発
- 個体群の「質」に基づく対策優先順位の提示

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

- 堆積物コアからのDNA抽出技術の開発
- 得られたデータに基づく時系列解析技術の開発

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

- 環境DNAに基づく生物量・種内変異・時系列動態推定の実践
- 情報統合と対策優先度に関する科学的根拠の提示・提言

A) 希少種・外来種の分布・生物量推定精度の検証と改良

→ 希少種・外来種DNAリファレンスデータの精査と拡充

希少種169分類群、特定外来種26分類群（計195分類群）を対象

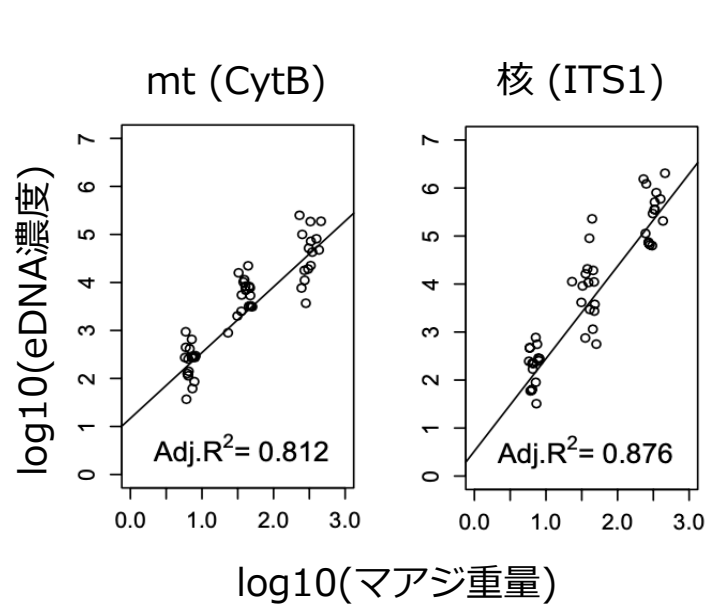
- ・うち77分類群は「データ未登録」もしくは「種判別能の再検討が必要」
 - 9分類群:新規にDNA配列を決定
 - 68分類群:識別可否の再検討（DNAデータベース更新の確認等を含む）

結果：154分類群（80%）が（一部条件付きながら）種判別可能と判明

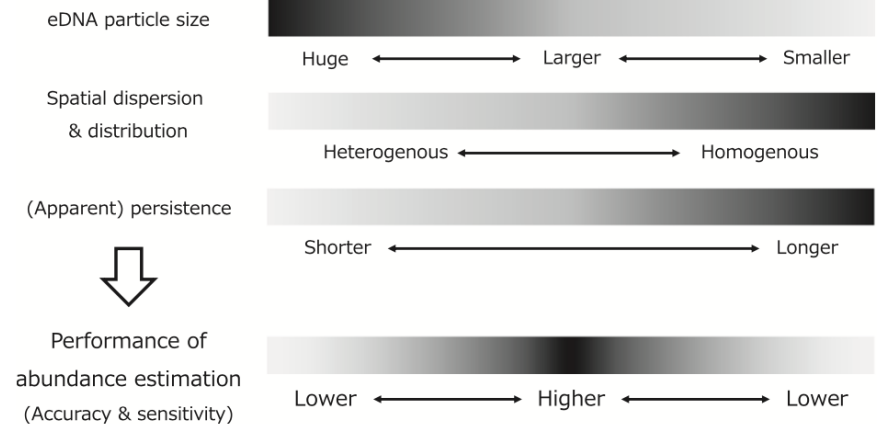
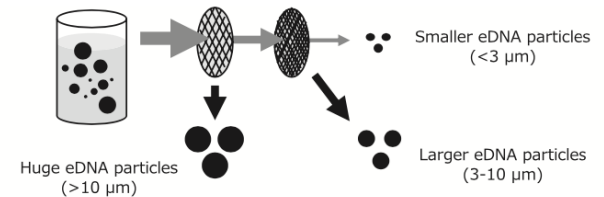
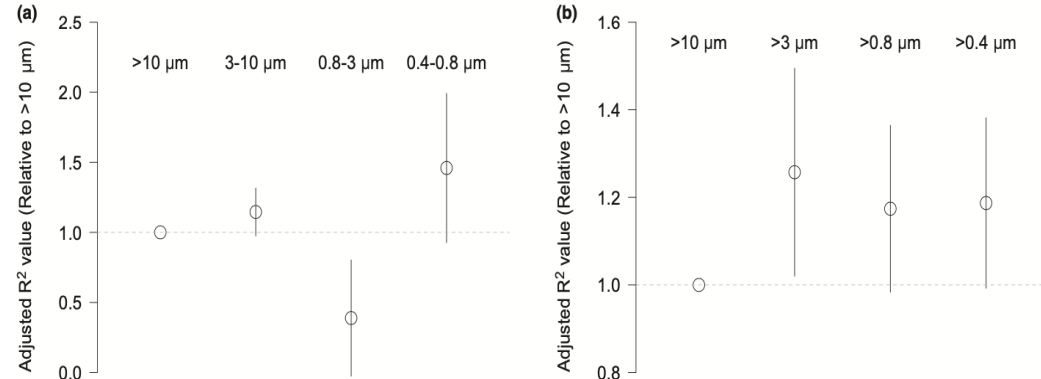
- ・うち134分類群で種レベルでの判別可、20分類群は条件付き
 - * 条件：他種とDNA配列が近似、もしくは近縁他種のDNA配列情報がない
- ・残り41分類群についてはMiFish領域のDNA配列が他種と同一、もしくは国内で組織標本の入手が困難と判明
（DNA配列が種間で酷似しているサケ類、偶来性の南方系ハゼ類など）
 - サケ亜科については独自に別のDNA領域を使って種判別を実現

A) 希少種・外来種の分布・生物量推定精度の検証と改良

→環境DNAによる生物量推定精度の検証と感度向上技術開発



相対R2値 (それぞれ最も左側に対する)

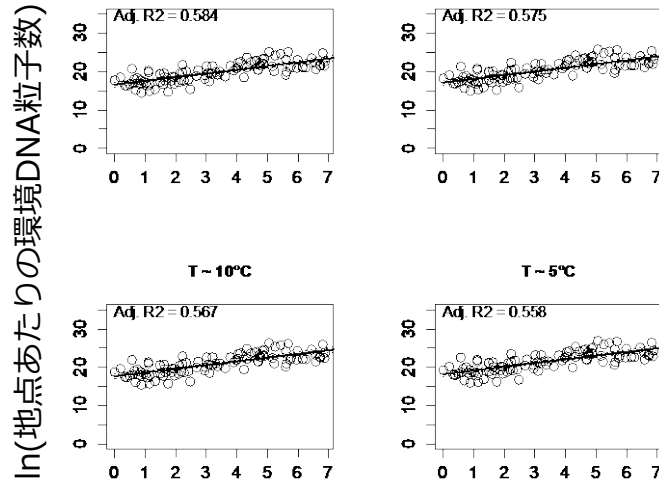


- ・ (左) mtよりも核の方が, マアジ重量に対する環境DNA濃度の回帰線の当てはまりが良い
- ・ (右) サイズ画分によって環境DNA濃度と生物量の関係性の強度は変動する

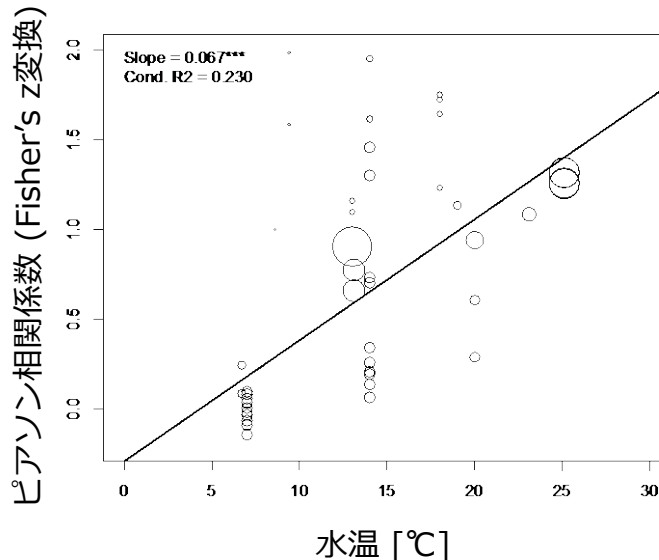
→ 生物量推定に適した環境DNAの存在を示唆

A) 希少種・外来種の分布・生物量推定精度の検証と改良

→環境DNAによる生物量推定精度の検証と感度向上技術開発



$\ln(\text{地点あたりの個体数})$



・(上) 高い水温下で促進される環境DNAの分解は、環境DNA濃度と生物量の関係性にどう影響するのか、数理モデルを用いたシミュレーション解析

$$\log(CV) = \log\left(\frac{S}{k}\right) = \log\left(\frac{S'N}{k}\right) = \log(S') + \log(N) - (\alpha + \beta T^{-1})$$

→ R2値は水温と弱い正の相関を示した
個体間での放出量のばらつきもR2値に影響を及ぼす
環境DNA放出の水温依存性を考慮することで
より厳密なモデリングが可能になる

・(下) 上の結果を検証するために、環境DNA濃度と生物量
の関係を調べた先行研究のメタ解析を実施

→ 調査環境における水温は、相関係数に有意な正の影響
低水温では環境DNA放出が抑えられるために非検出に
なる例が多く見られたことが一因か

B) 希少種・外来種の種内変異解析手法の確立

→ 環境DNAによる種内変異検出手法の開発

希少種

・ホンモロコ



これまで困難であった, 1~数塩基という少ない変異を正確かつ網羅的に検出する種内変異解析法の確立 (Wakimura et al. 2023)

→ あらゆる希少種の遺伝的多様性評価へ応用可能な環境DNA種内変異解析法の提示

外来種

・ブルーギル



・ブラックバス3種 (オオクチ, フロリダ, コクチ)



Duplex PCRを利用したハプロタイピング法の開発
(Wakimura et al. 準備中)



外来種の分布と個体群遺伝構造の同時推定を
可能とする環境DNA種内変異解析法の確立



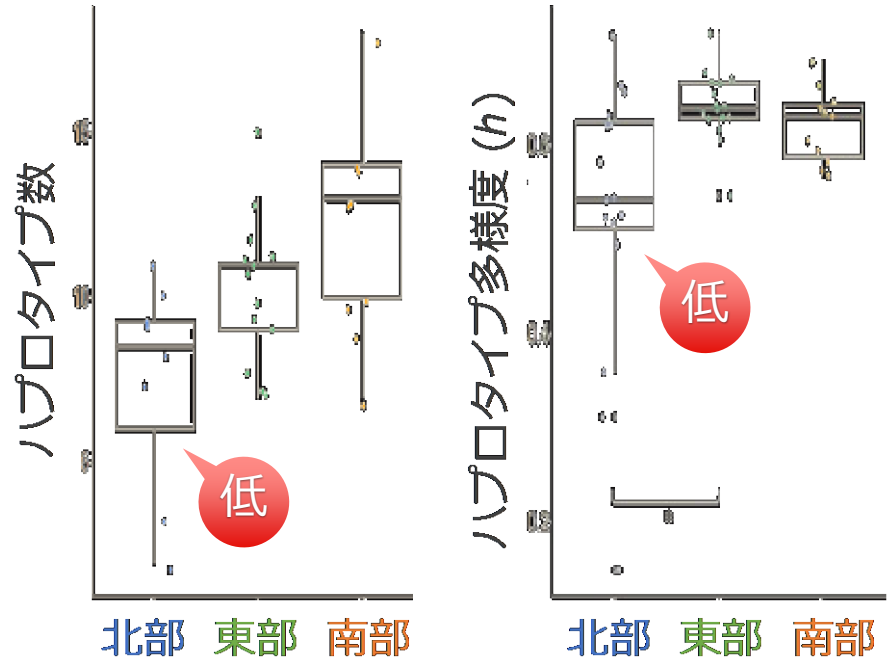
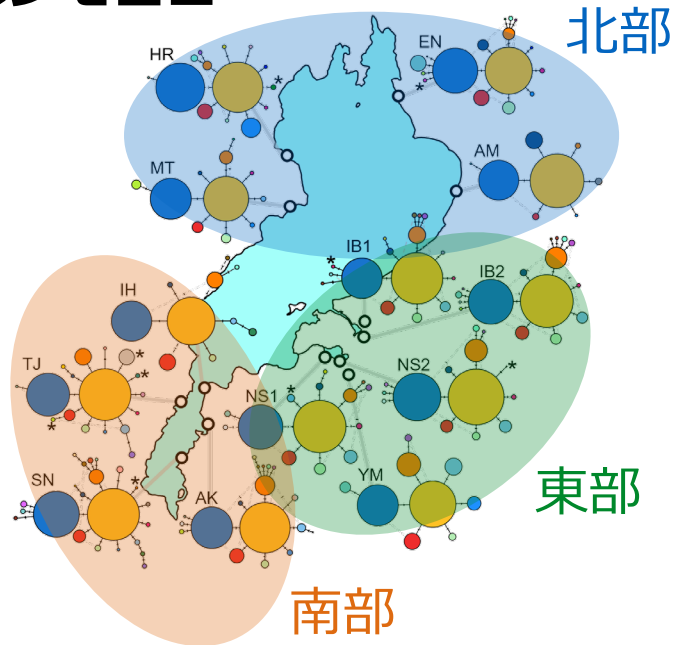
全3種全ハプロタイプの同時検出法の開発
(Wakimura et al. 準備中)

B) 希少種・外来種の種内変異解析手法の確立

→ 個体群の「質」に基づく対策優先順位の提示

希少種

・ホンモロコ



希少種生息地における包括的な遺伝的多様性評価 (Wakimura et al. 2023)



それに基づく遺伝的多様性低下の検出 (Wakimura et al. 2023)

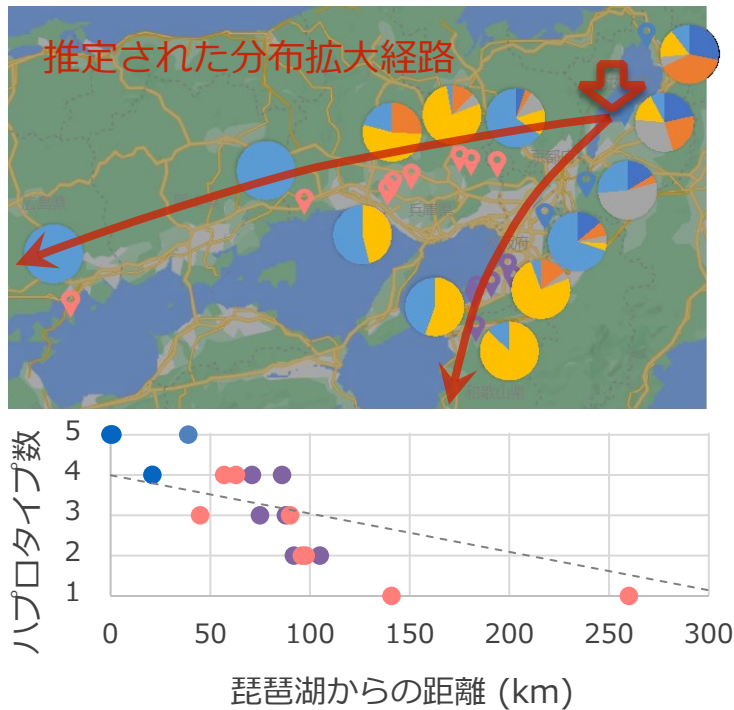
遺伝的多様性に基づく希少種個体群の健全性評価と対策優先度の推定を実践

B) 希少種・外来種の種内変異解析手法の確立

→ 個体群の「質」に基づく対策優先順位の提示

外来種

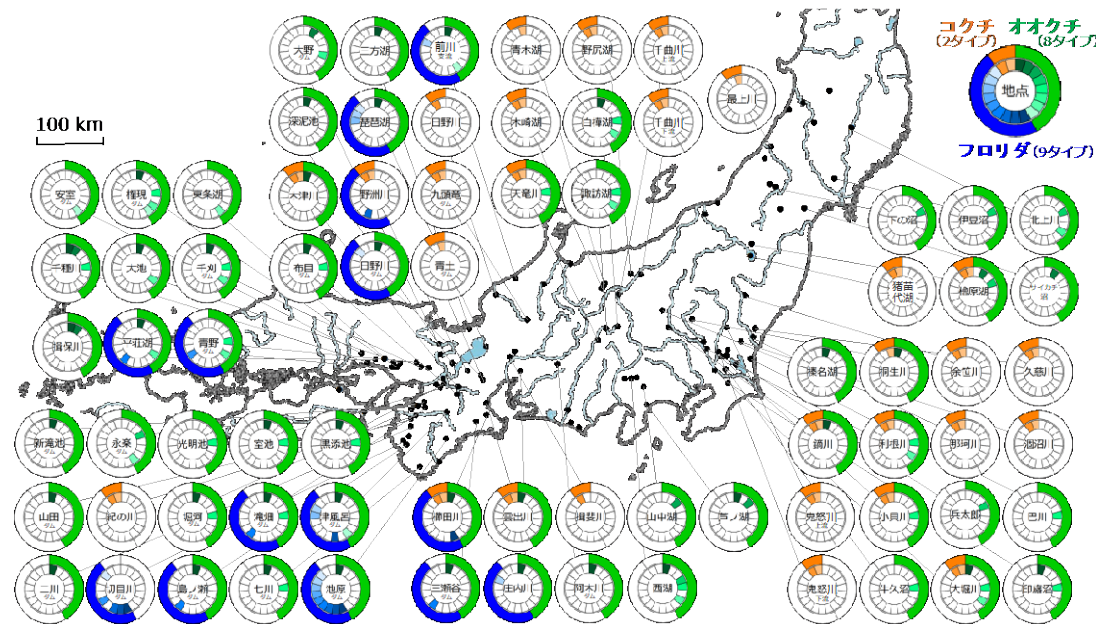
・ブルーギル



近畿・中国地方での野外実践

→ 環境DNAハプロタイピングによる外来種布拡大経路推定の有用性を実証

・ブラックバス3種 (オオクチ, フロリダ, コクチ)



日本広域での野外実践

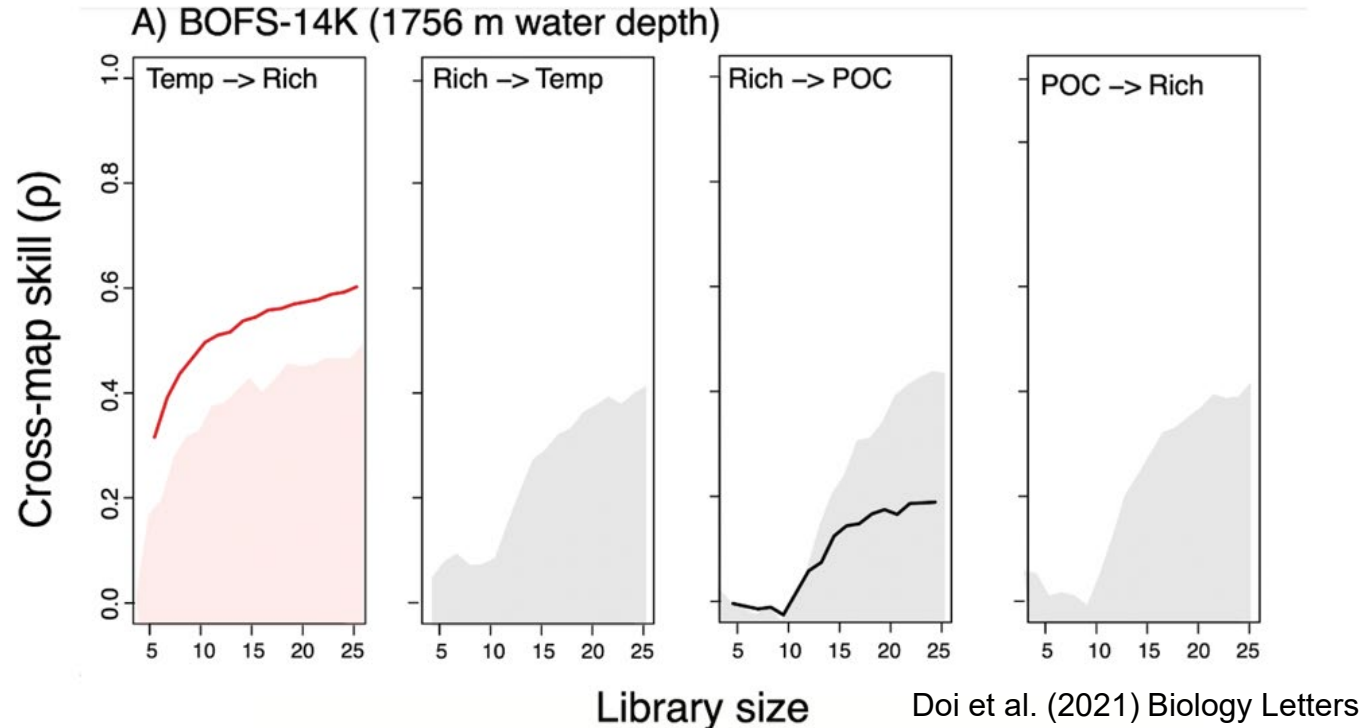
→ 環境DNAハプロタイピングを、分布状況把握と拡散経路推定が同時に可能な効率的モニタリング法として提示

C) 環境水・水圏堆積物コアの解析を組み合わせた希少種・外来種の

時系列解析手法の確立

→ 得られたデータに基づく時系列解析技術の開発

Empirical dynamic model (EDM)による時系列解析手法、特にCCM (Convergence cross -mapping)による因果推論を開発し、異なった時系列を持つ堆積物コア間においても解析可能な手法を見出した。



1つのコアにおけるLibrary size とCross-map skill の関係。Temp->Richは水温から種数へ与える因果的影響を示す。実線がコアデータから得られた解析で、シャドー部分の帰無仮説から出ていると、堆積物データ間に因果があることを示す。

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

→ 環境DNAに基づく生物量・種内変異・時系列動態推定の実践

希少種・外来種の生物量・時系列動態

・イトウ

7/120河川でeDNA検出 (Mizumoto et al. 2020)

→ 17/278河川にアップデート (Kanbe et al. 2nd rev.)

→ 既存個体群への**外来種ニジマスの影響評価**



・シシャモ

稚魚の沿岸域利用と温度依存性 (Yatsuyanagi et al. 2020)

→ Lp個体群の資源量激減とその要因解明



・アズマヒキガエル

eDNA検出系の確立 (Mizumoto et al. 2022)

→ 石狩川流域32/73地点からeDNA検出

→ 階層的占有モデルを用いて**eDNA検出確率を推定**

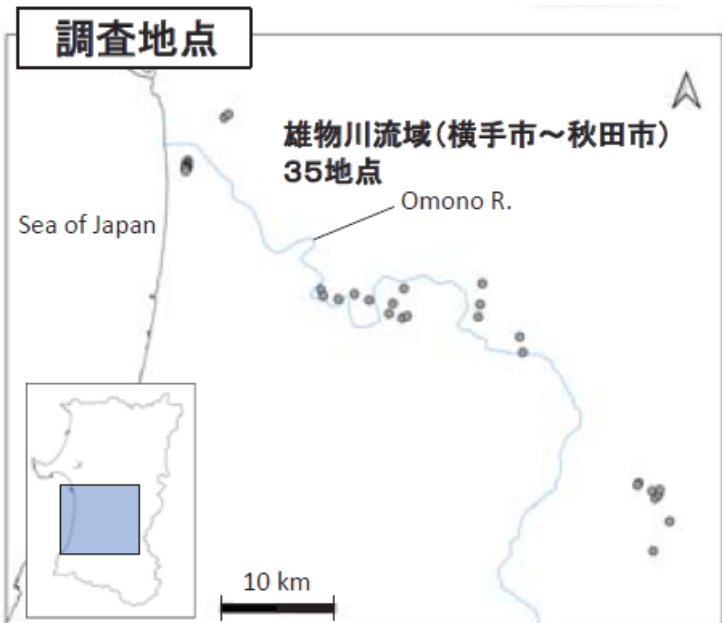


D) 生物量・種内変異・時系列動態の情報統合とそれに基づく対策優先度

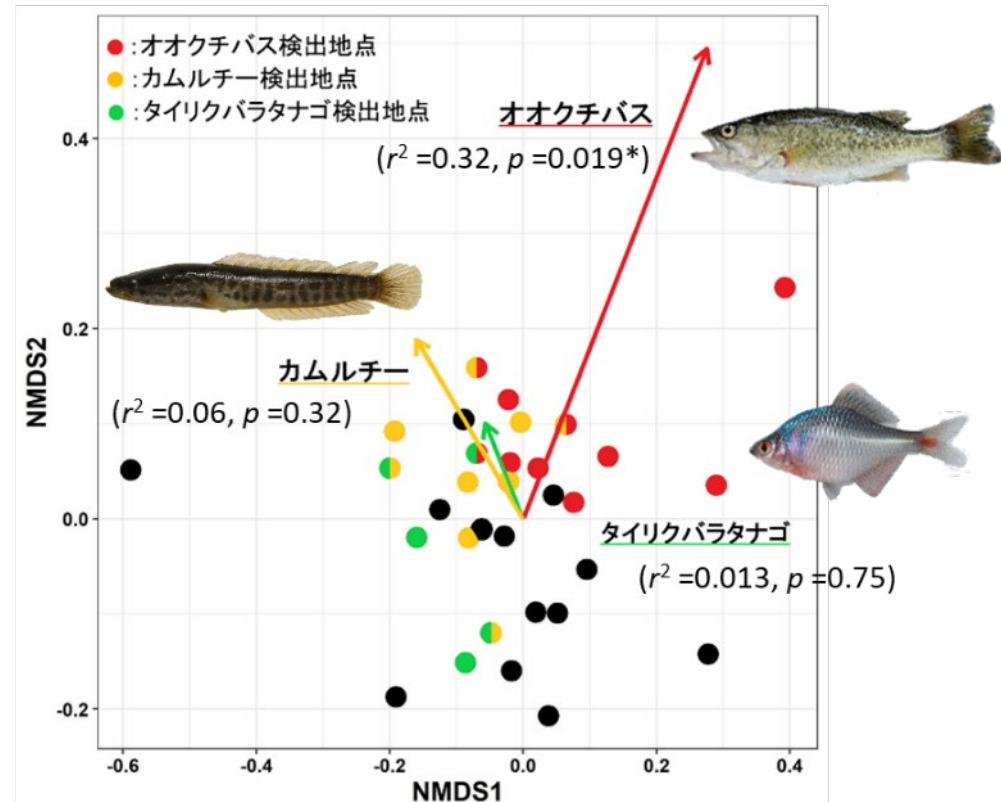
評価手法の確立

→ 情報統合と対策優先度に関する科学的根拠の提示・提言

・ 北日本の溜池における外来種対策優先度評価 (小粥ら *in press*)



魚類群集と外来種の関係におけるNMDS解析

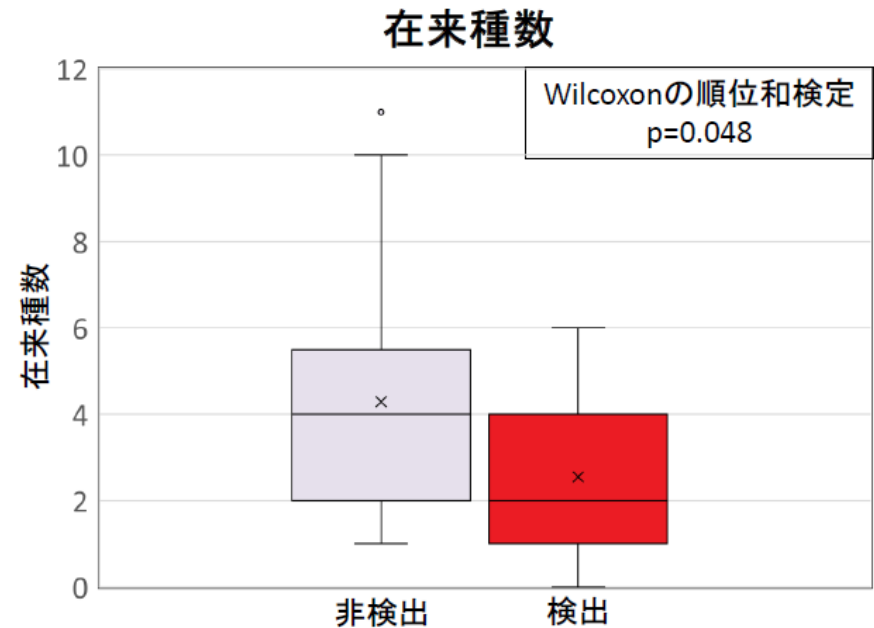
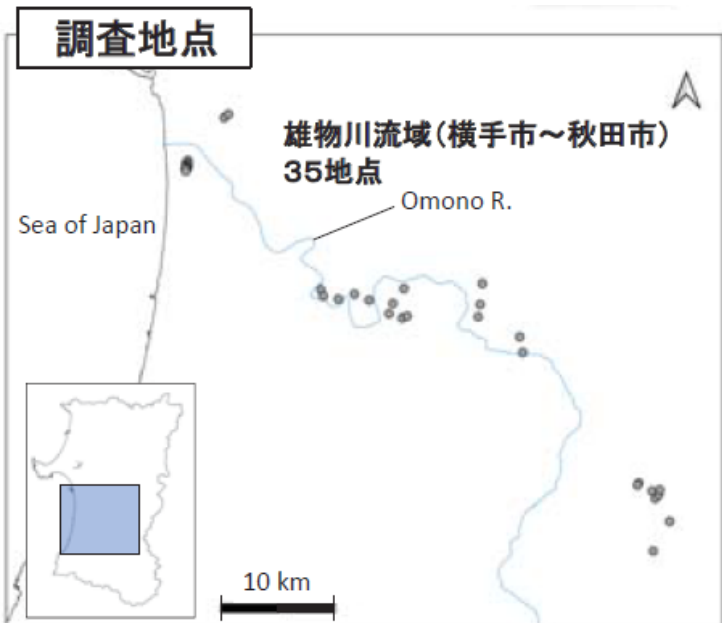


D) 生物量・種内変異・時系列動態の情報統合とそれに基づく対策優先度

評価手法の確立

→ 情報統合と対策優先度に関する科学的根拠の提示・提言

・ 北日本の溜池における外来種対策優先度評価 (小粥ら *in press*)



→ バス侵入で、在来種数が約4割減?

→ 生物多様性保全にはバス駆除が最優先



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

・環境政策等への貢献

環境省生物多様性センター「環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き」改訂第2版・「MiFish法に係る誤同定チェックシート」の作成・発行

知床世界自然遺産地域科学委員会・第二期長期モニタリング計画
(環境DNAを用いたオショロコマ生物量モニタリング、R4-R14)

環境DNA調査・実験標準化マニュアルの一般公開 (Minamoto et al. 2020)

和文入門書「環境DNA - 生態系の真の姿を読み解く」発行 (近藤、土居編 2021)

・行政活用 (見込み)

外来種侵入ルート of 逆算的推定や希少種分布を含む「本来の生物多様性復元」に向けた学術的根拠の提供

・研究目標の達成状況

全体・サブテーマ1 - 4 共、「目標を大きく上回る成果」

・ 研究成果の発表状況（査読付き論文、計21本）

2020

- 1) T. YATSUYANAGI and H. ARAKI. PLOS ONE 15: e0239912 (2020) (IF : 3.752) Understanding seasonal migration of Shishamo smelt in coastal regions using environmental DNA.
- 2) H. MIZUMOTO, T. MITSUZUKA and H. ARAKI. Frontiers in Ecology and Evolution 8: 569425 (2020) (IF : 4.496) An environmental DNA survey on distribution of an endangered salmonid species, *Parahucho perryi*, in Hokkaido, Japan.

2021

- 3) T. MINAMOTO, M. MIYA, T. SADO, S. SEINO, H. DOI, M. KONDOH, K. NAKAMURA, T. TAKAHARA, S. YAMAMOTO, H. YAMANAKA, H. ARAKI, W. IWASAKI, A. KASAI, R. MASUDA and K. UCHII. Environmental DNA, 3, 8-13 (2021) (IF : 6.9) An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols.
- 4) H. DOI, T. MIMAMOTO, T. TAKAHARA, S. TSUJI, K. UCHII, S. YAMAMOTO, I. KATANO, and H. YAMANAKA. Ecological Research, 36, 379-388 (2021) (IF : 2.056) Compilation of real-time PCR conditions toward the standardization of eDNA methods.
- 5) H. DOI, R. INUI, S. MATSUOKA, Y. AKAMATSU, M. GOTO and T. KONO. Freshwater Biology online (2021) (IF : 3.835) Estimation of biodiversity metrics by environmental DNA metabarcoding compared with visual and capture surveys of river fish communities. available DOI:10.1111/fwb.13714
- 6) T. SAITO and H. DOI. Frontiers in Ecology and Evolution 9:623831 (2021) (IF : 2.416) A model and simulation of the influence of temperature and amplicon length on environmental DNA degradation rates: A meta-analysis approach.
- 7) H. DOI, T. WATANABE N. NISHIZAWA, T. SAITO, H. NAGATA, Y. KAMEDA, N. MAKI, K. IKEDA, and T. FUKUZAWA. Molecular Ecology Resources 21:2364-2368 (2021)(IF: 8.678) On-site environmental DNA detection of species using ultra-rapid mobile PCR.
- 8) H. DOI, M. YASUHARA, and M. USHIO. Biology Letters 17: 20200666 (2021) (IF : 3.904) Causal analysis of the temperature impact on deep-sea biodiversity.

2022

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

・研究成果の発表状況（査読付き論文、続き）

2022（続き）

- 10) H. ARAKI, T. KANBE, H. YAMANAKA, Y. MINEGISHI and N. KOIZUMI. Environmental DNA, 4, 487-491 (2022) (IF : 6.9) edna2021: The fourth annual meeting of The eDNA Society “Species distributions, and beyond”.
- 11) G. ITO, H. YAMAUCHI, M. SHIGEYOSHI, K. ASHINO, C. YONASHIRO, M. ASAMI, Y. GOTO, J. J. DUDA, and H. YAMANAKA. Global Ecology and Conservation, 43: e02448 (2022) (IF : 3.97) Using eDNA metabarcoding to establish targets for freshwater fish composition following river restoration.
- 12) T. JO, and H. YAMANAKA. Freshwater Biology, 67: 1333-1343 (2022) (IF : 3.835) Meta-analyses of eDNA downstream transport and deposition in relation to hydrogeography in riverine environments.
- 13) T. S. JO, K. TSURI, and H. YAMANAKA. The Science of Nature, 109: 38 (2022) (IF : 2.645) Can nuclear aquatic environmental DNA be a genetic marker for the accurate estimation of species abundance?
- 14) T. JO, and H. YAMANAKA. Ecology and Evolution, 12: e9234 (2022) (IF : 3.167) Fine-tuning the performance of abundance estimation based on environmental DNA (eDNA) focusing on eDNA particle size and marker length.
- 15) K. UCHII, K. WAKIMURA, T. KIKKO, R. YONEKURA, R. KAWAGUCHI, H. KOMADA, H. YAMANAKA, T. KENZAKA, and K. TANI. Limnology, 23, 49-56 (2022) (IF : 2.156) Environmental DNA monitoring method of the commercially important and endangered fish *Gnathopogon caerulescens*.
- 16) T. FUKUZAWA, Y. KAMEDA, H. NAGATA, N. NISHIZAWA, and H. DOI. Molecular Ecology Resources 22: 2651-2661 (2022) (IF: 8.678) Filtration extraction method using microfluidic channel for measuring environmental DNA.
- 17) S. OGATA, H. DOI, T. IGAWA, S. KOMAKI and T. TAKAHARA. Ecological Research 37: 701-710 (2022) (IF:2.056) Environmental DNA methods for detecting two invasive alien species (American bullfrog and red swamp crayfish) in Japanese ponds.

2023

- 18) T. S. JO. Hydrobiologia, 850: 39-50 (2023) Correlation between the number of eDNA particles and species abundance is strengthened by warm temperature: Simulation and meta-analysis.
- 19) K. WAKIMURA, K. UCHII, and T. KIKKO. Environmental DNA, 00, 1-14 (2023) (IF : 6.9) Evaluation of genetic diversity in an endangered fish *Gnathopogon caerulescens* using environmental DNA and its potential use in fish conservation. DOI: 10.1002/edn3.408
- 20) K. NAKANE, X. LIU, H. DOI, et al. Freshwater Biology, (2023) (IF: 3.538)
Sedimentary DNA can reveal the past population dynamics of a pelagic copepod. *online available*
- 21) 【予定】小粥淳史, 八柳哲, 神戸崇, 井上頌子, 荒木仁志 保全生態学研究 (2023) 環境DNAメタバーコーディングを用いた北日本の溜池における外来魚の影響評価 *in press*

・国民との対話

- 1) 公開集会「環境DNA・環境RNA研究の新たな挑戦」（主催：京都大学生態学研究センター、2020年12月15日、オンライン、観客約180名）にて講演
- 2) 一般公開シンポジウム「環境DNA市民科学－参加型調査で地域の生態系を見つめる」（主催：環境DNA学会、2021年11月21日、オンライン/北海道大学/南三陸ネイチャーセンター/九州大学、観客約300名）にて講演
- 3) 一般公開シンポジウム「野生生物モニタリングの現在・未来～研究者たちの挑戦」（主催：本推進費プロジェクト、2022年11月20日、オンライン/札幌エルプラザ、観客約250名）にて講演
- 4) 公開シンポジウム「科学者が見てきた知床の今と昔」（主催：知床世界自然遺産地域科学委員会、2023年3月15日、オンライン/北海道立道民活動センター かでる 2・7、観客約220名）にて講演
- 5) 公開講座「びわ湖の日滋賀県提携 龍谷講座」（共催：滋賀県、龍谷大学、2022年10月17日、オンライン、観客約80名）にて講演
- 6) 日本学術会議公開シンポジウム「縮退時代において、20年後のまち・社会を考える～宇宙×都市×遺伝子×生態～」（主催：日本学術会議若手アカデミー越境する若手科学者分科会、2022年3月1日、オンライン、観客約300名）にて「環境DNAから考える20年後のまち・社会：環境DNAによる生物多様性観測と自然共生社会実現への道」と題する講演

・マスコミ等の公表・報道

- 1) 日本経済新聞（2020年11月16日、全国版「イトウの生息場所 水中DNAで推定」）
- 2) 読売新聞（2020年11月16日、全国版「イトウ生息「痕跡」確認」）
- 3) 北海道新聞（2020年11月16日、地方版「イトウ7河川に生息」）
- 4) 共同通信（2020年11月16日、オンライン版「幻の魚イトウ、7河川に生息か 北大、水からDNA検出」）
- 5) 日本経済新聞 かがくアゴラ（2020年12月18日、全国版「幻の魚イトウ 生息域を探る」）
- 6) 子供の科学（2021年1月9日、全国版「幻の魚イトウはどこにいる？」）
- 7) 日経サイエンス2021年3月号（2021年1月25日、「“幻の魚”イトウ、道内7河川に～」）
- 8) 北海道新聞（2021年12月27日、地方版「外来種アズマヒキガエル繁殖地 環境DNAで推定」）
- 9) 科学新聞（2021年1月14日、全国版「国内外来種ヒキガエル 繁殖地推定手法を開発」）
- 10) 学士会会報（2021年7月、全国版「環境DNAに基づく新・生態学の夜明け」）
- 11) 日刊工業新聞（2023年4月12日、23頁）「大阪大谷大・近大、ホンモロコの遺伝的多様性評価に新手法」
- 12) 産経新聞（2020年11月5日、全国版）「海底の泥から魚のDNA300年分採取、個体数変遷追う」
- 13) 子供の科学（2021年1月号） 「堆積物DNA」
- 14) 環境展望台, 国立環境研究所（2020年10月16日）「愛媛大など、環境DNA分析により魚の長期個体数変動を解明」

・ 本研究費の研究成果による受賞

- 1)兵庫県立大学第1回研究活動特別賞 兵庫県立大学、2021年10月28日、土居秀幸
- 2)兵庫県立大学最優秀研究活動賞 兵庫県立大学 2021年7月28日 土居秀幸
- 3)北海道大学総長表彰（研究） 北海道大学、2022年2月16日、荒木仁志
- 4)第39回村尾育英会学術賞 村尾育英会 2022年3月4日 土居秀幸
- 5)2022年度第70回日本生態学会大会 Best English Award「Phylogeography of Siberian stone loach revealed by environmental DNA」、北海道大学、2023年3月17日(金)～21日(火) T. Yatsuyanagi, T. Kanbe, K. Fujii, S. Inoue, H. Araki
- 6)2022年度第70回日本生態学会大会・ポスター賞最優秀賞「シカのヌタ場が両生類の繁殖に与える影響」、北海道大学他、2023年3月17日(金)～21日(火) 松浦なる、岡宮久規、八柳哲、坂田雅之、岸田治、荒木仁志
- 7)2022年度環境DNA学会ワークショップ・発表賞最優秀賞「環境DNAに基づく純淡水魚フクドジョウの系統地理推定」、北海道大学、2022年11月19日(土) 八柳哲、神戸崇、藤井和也、井上頌子、荒木仁志
- 8)2022年度環境DNA学会ワークショップ・発表賞最優秀賞「キタノスジエビの河川下流域への産卵回遊とその適応的意義」、北海道大学、2022年11月19日(土) 加藤優樹、神戸崇、荒木仁志
- 9)2022年度環境DNA学会ワークショップ・発表賞最優秀賞「環境DNAハプロタイピングにもとづくオショロコマの遺伝子浸透率推定」、北海道大学、2022年11月19日(土) 小澤徹也、神戸崇、荒木仁志
- 10)2022年度サケ学研究会大会・サケ科学奨励賞「知床におけるオショロコマの遺伝子浸透と第3イワナの生息可能性」、北海道大学、2022年12月17日(土) 小澤徹也、神戸崇、荒木仁志
- 11)2021年度環境DNA学会大会12回ポスター発表優秀賞「北海道におけるワカサギ2種の季節性異所的分布」、北海道大学、2021年11月20日（土）～21日(日)、池田崇人、神戸崇、荒木仁志
- 12)日本陸水学会第86回兵庫大会最優秀ポスター賞「堆積物DNAに基づくカイアシ類の長期変動に関する研究」、愛媛大学他、2022年9月16日(金)～19日(月)、中根 快, 刘 鑫, 土居 秀幸, 伴 修平, デュア・ガエル, 加 三千宣, 槻木 玲美
- 13)2021年度環境DNA学会大会12回ポスター発表最優秀賞「堆積物DNAにより復元された動物プランクトンの過去100年にわたる産卵量の変動」、愛媛大学他、2021年11月20日（土）～21日(日)、中根 快・土居秀幸・越智梨月・加 三千宣・槻木 玲美