

環境DNA技術を用いた生物 分布モニタリング手法の確立

研究代表者 土居 秀幸

（兵庫県立大学大学院 シミュレーション学研究科）

サブテーマ代表者 源 利文（神戸大 人間環境）

山中 裕樹（龍谷大 理工学部）

片野 泉（兵庫県大 環境人間学部）

高原 輝彦（推進費研究委託機関，島根大学）

松橋彩衣子（推進費ポスドク，兵庫県立大学）

内井喜美子（前推進費ポスドク，大阪大谷大学）

研究実施期間：平成25-27年度

累積予算額：3515.6万円

現在までの種組成・遺伝的多様性把握方法

これまでは、多大な労力や時間(コスト)をかけて捕獲調査を行なってきた。

水生生物の捕獲調査が難しい場合がある。

- ・ 複雑な地形や植生により網を打つのが困難
- ・ 水の濁りや流れによって姿が見えない
- ・ 微生物息場所に隠れてしまっても捕獲できない



環境DNA (eDNA)

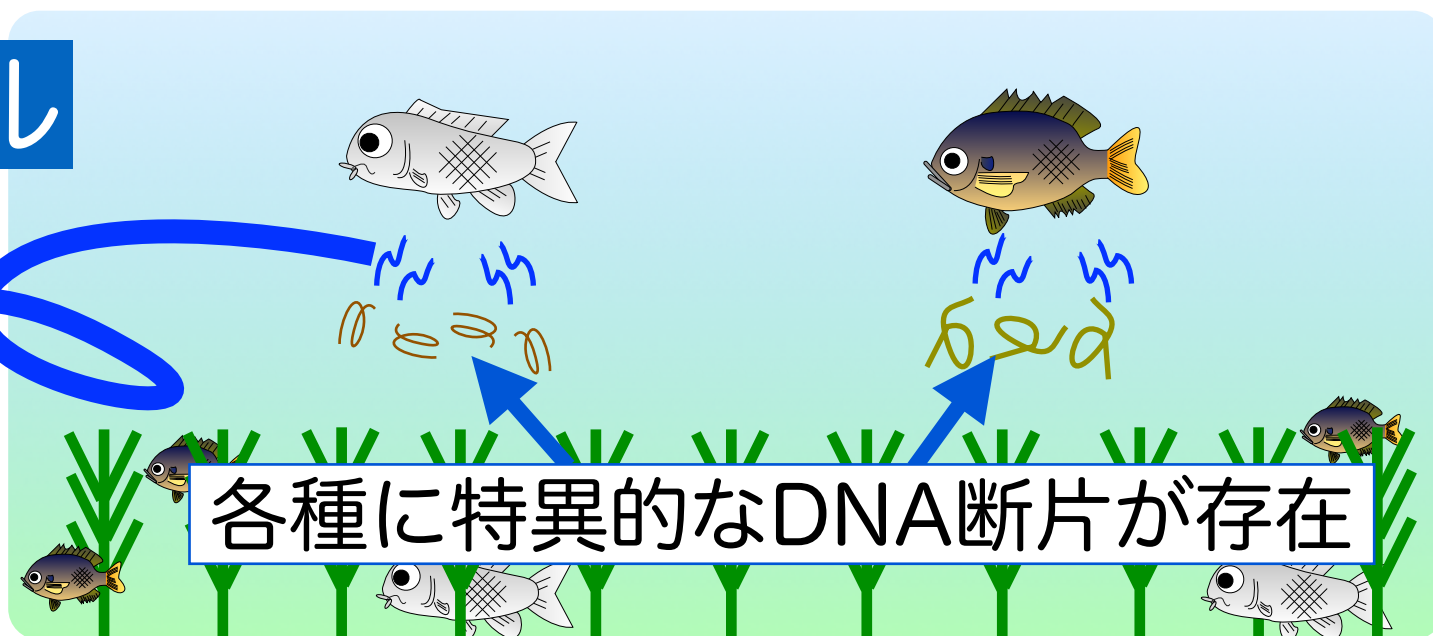
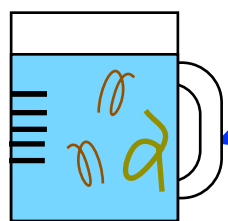
動植物の排泄物，組織片などに由来する水中に存在するDNA断片

1リットルの水から，環境DNAを調べることで

環境DNAの有無から生物の存在を推定

環境DNAの量から生物量を推定

1リットル



環境DNA (eDNA)

1リットルの水から、環境DNAを
取り出して分析する。

1リットル採水



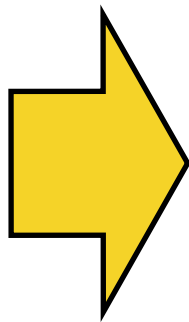
フィルターろ過



DNA抽出



定量PCR(リアルタイム,デジタル) で測定



環境DNA技術による生物分布モニタリング法の確立

環境DNA手法の開発

環境DNAの野外調査への適用

兵庫県立大学

神戸大

龍谷大

兵庫県立大

定量PCRによる環境DNA手法の開発

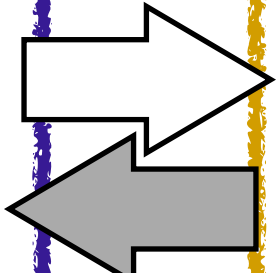
核DNA, シーケンスによる環境DNA手法の開発

生物の移動分散研究への環境DNAの適用

外来種・希少種調査への環境DNAの適用

- 定量PCR用の各種プライマーを開発
- 核DNAを用いたDNAシーケンスベースでの手法の開発
- 定量PCRによる在不在判別法, 統計モデルの開発
- 飼育実験による定量法の開発

新手法の適用



調査からの改善点のフィードバック
飼育実験の協力

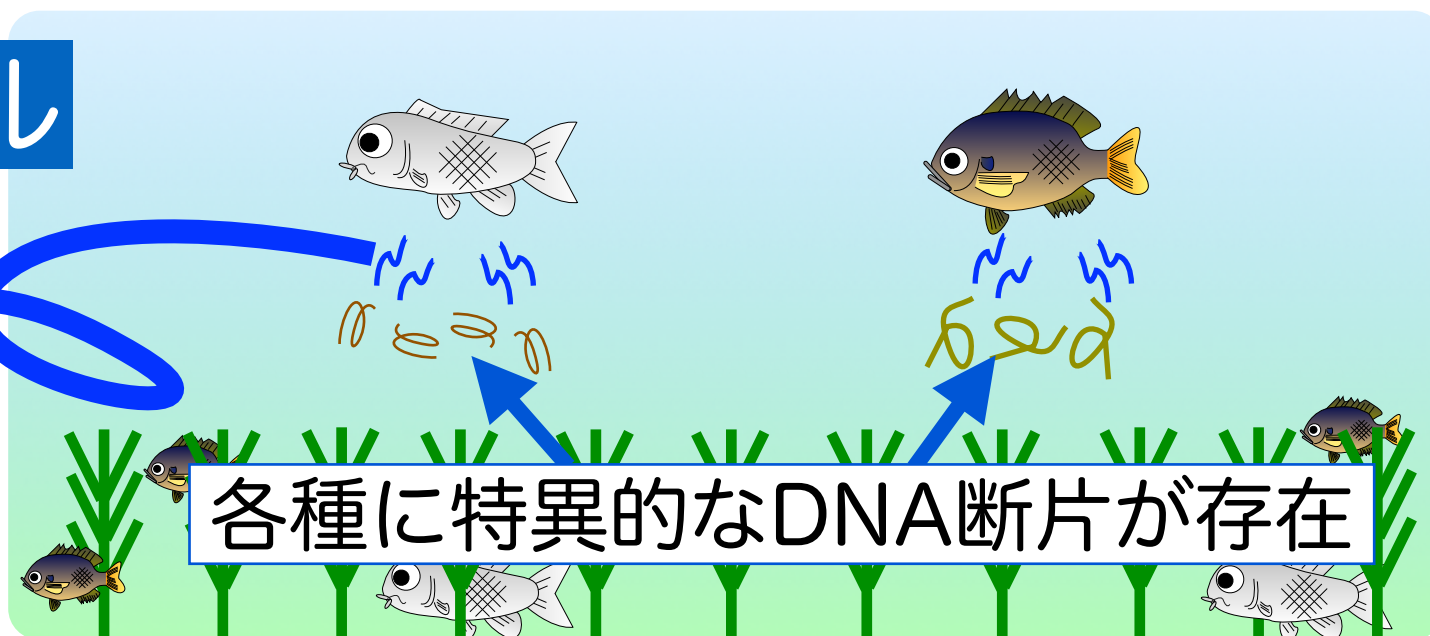
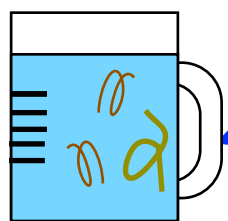
- 従来の採集法 (網, 干し上げ) と環境DNA法の比較
- 野外での環境DNAサンプルの採集と環境要因の分析
- 生物の移動分散の定量
- 環境DNAによる生物分布モデルの構築

環境DNA (eDNA)

動植物の排泄物，組織片などに由来する水中に存在するDNA断片

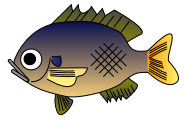
1リットルの水から，環境DNAを調べることで環境DNAの有無から生物の分布(在不在)を推定できる。

1リットル



環境DNAの有無から生物の分布を推定できる。

ブルーギル



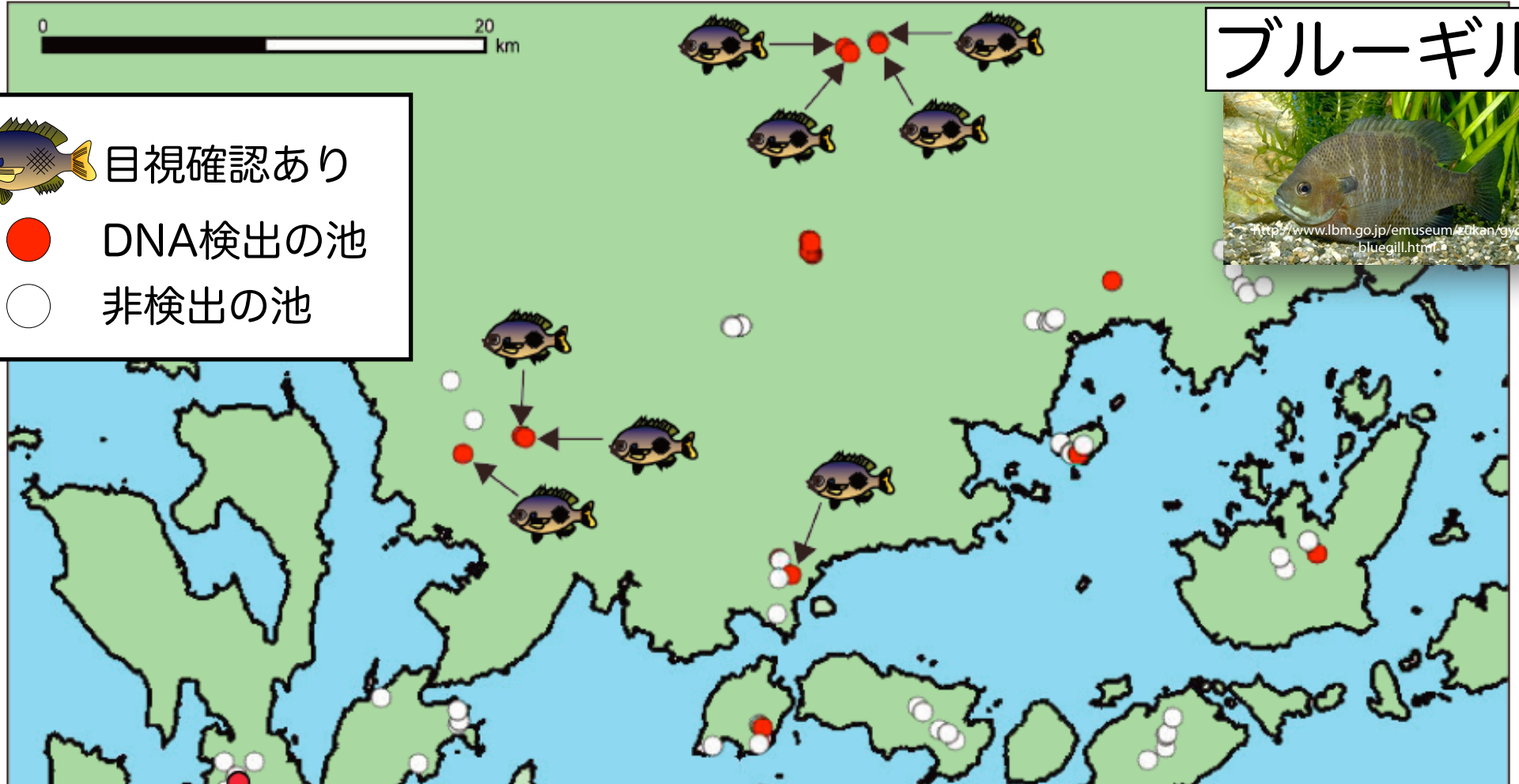
目視確認あり



DNA検出の池



非検出の池



		環境DNA	
		検出	非検出
目視	確認	8	0
	未確認	7	55

Takahara, Minamoto, Doi
(2013) *PLOS ONE*

環境DNAの有無から生物の分布を推定できる。

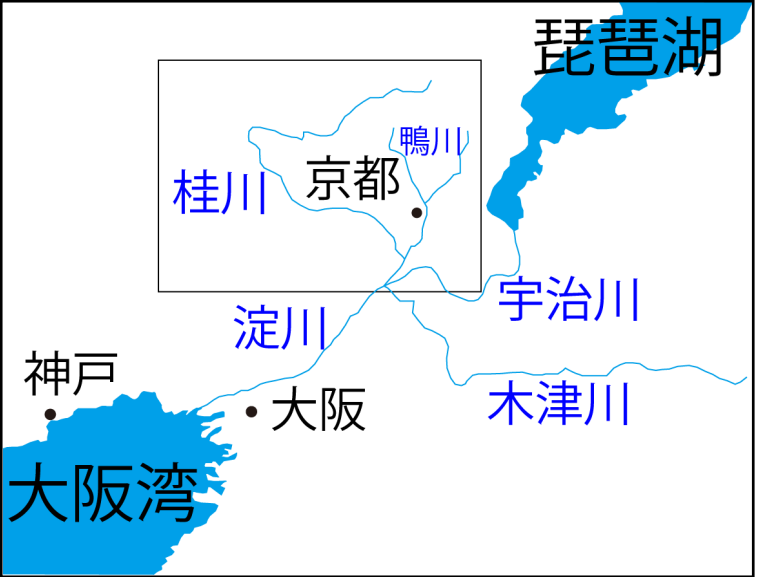
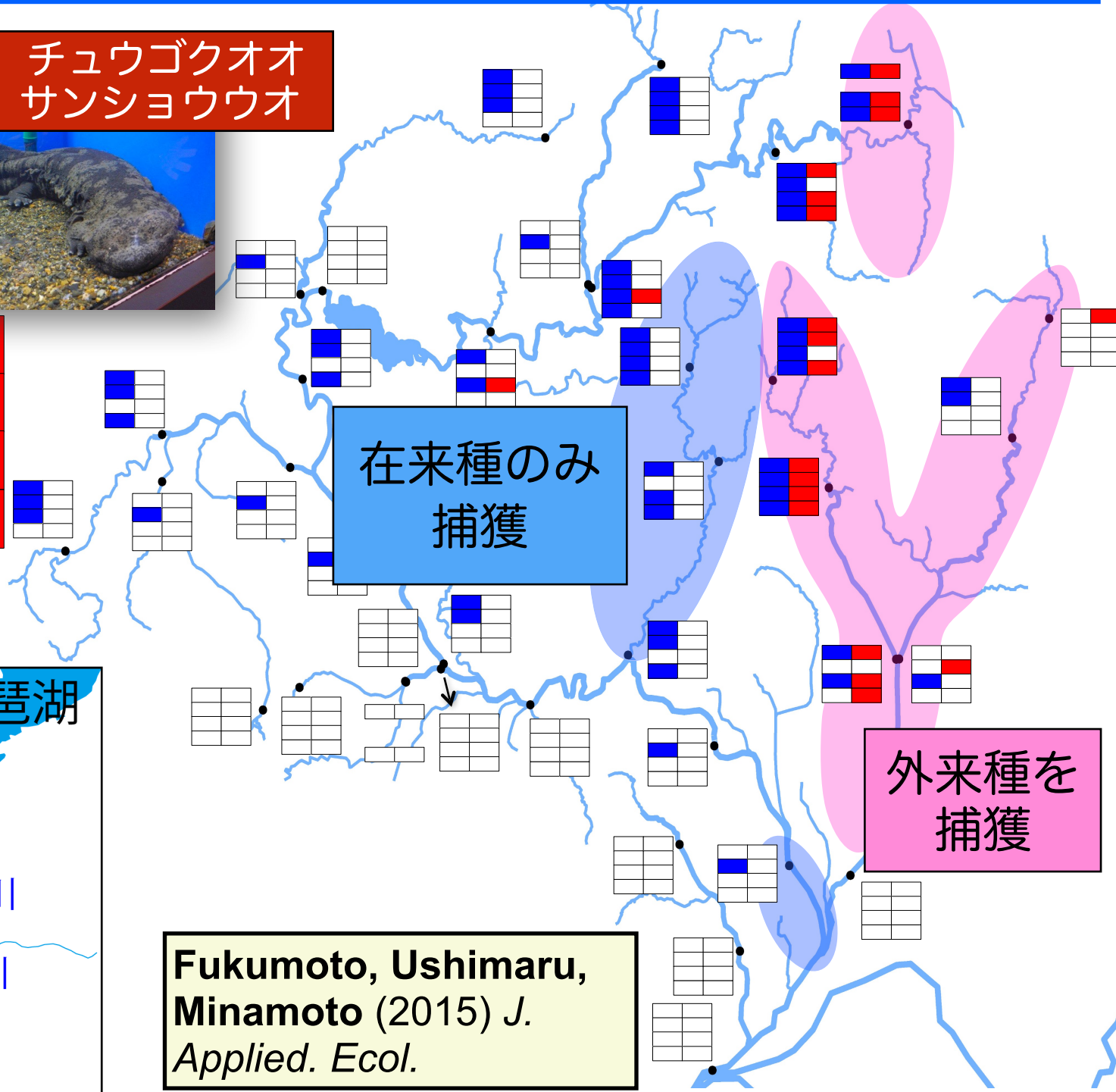
オオサンショウウオ



チュウゴクオオサンショウウオ



9月	Blue	Red
12月	Blue	Red
3月	Blue	Red
6月	Blue	Red



Fukumoto, Ushimaru, Minamoto (2015) *J. Applied. Ecol.*

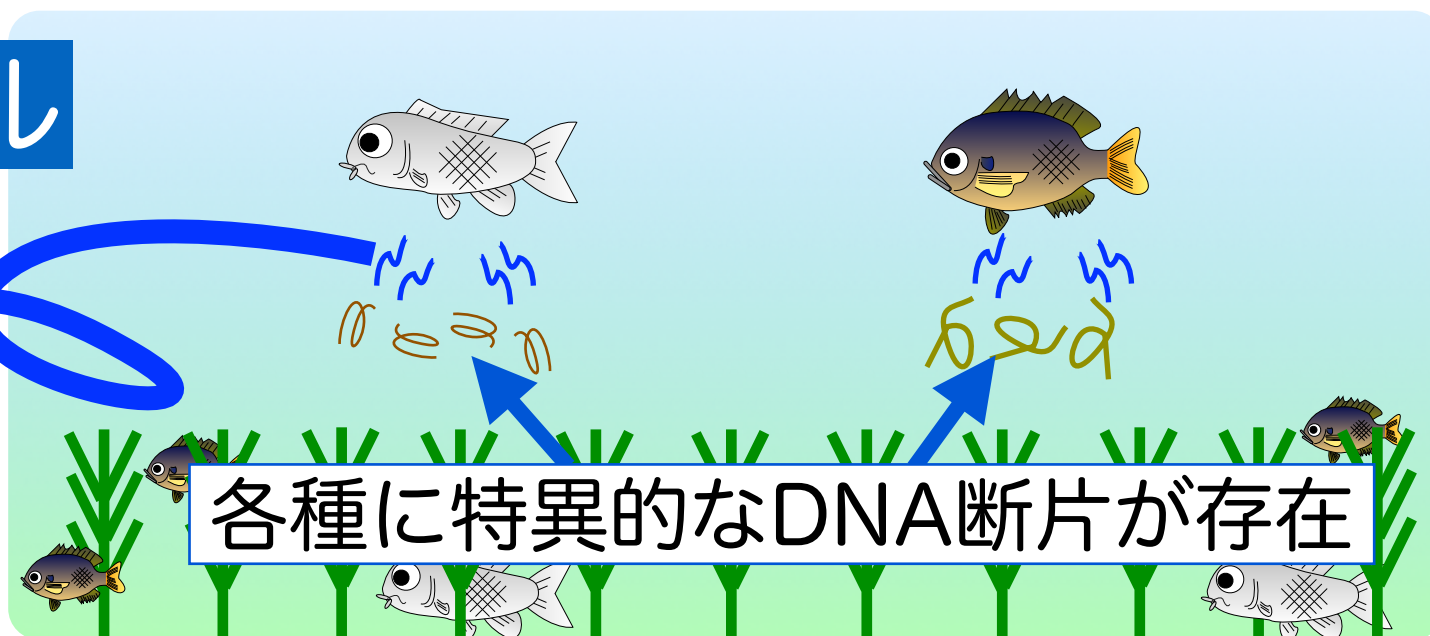
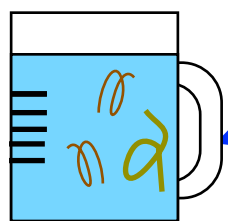
環境DNA (eDNA)

動植物の排泄物，組織片などに由来する水中に存在するDNA断片

1リットルの水から，環境DNAを調べることで

環境DNAの量から生物量（場合によっては個体数）を推定できる。

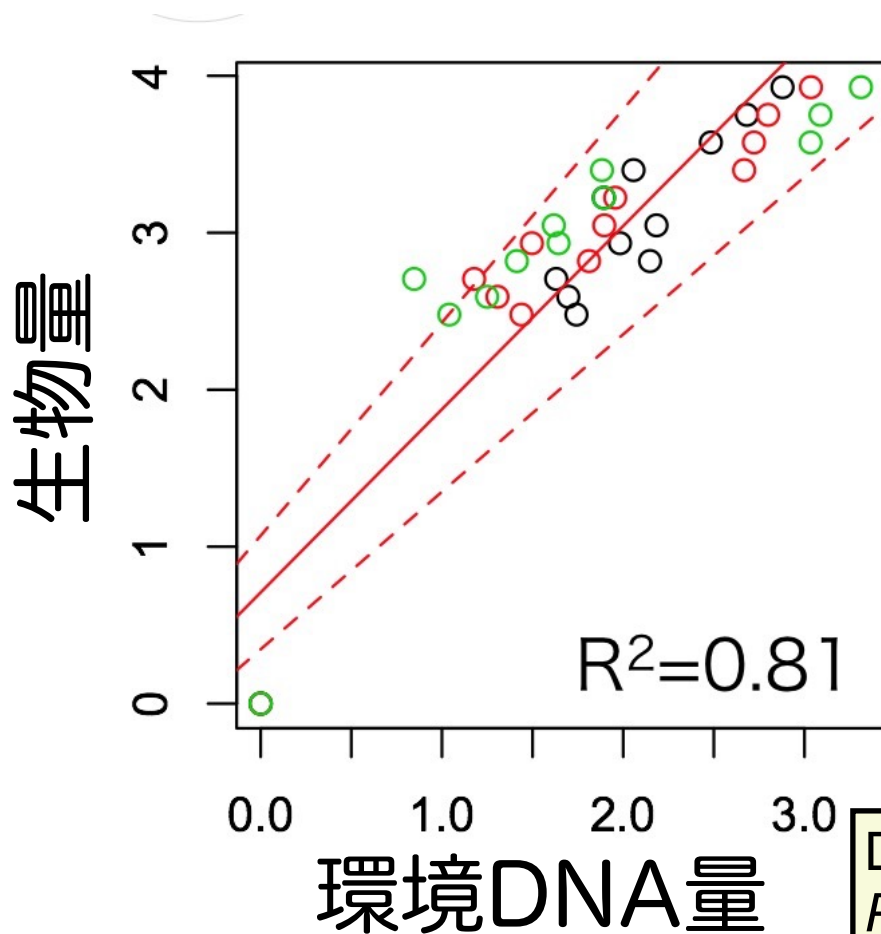
1リットル



環境DNAの量から生物量を推定：止水



タンク実験により，コイの生物量(3-85 匹/450L)と環境DNA量を比較した。



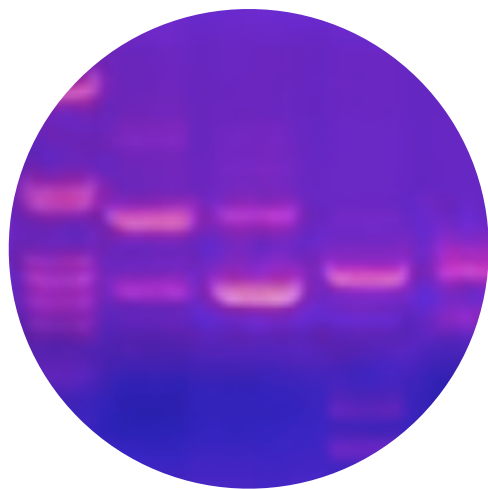
デジタルPCRはリアルタイムPCRに比べて，特に低濃度で定量性が高かった。



Doi et al. (2015)
PLOS ONE

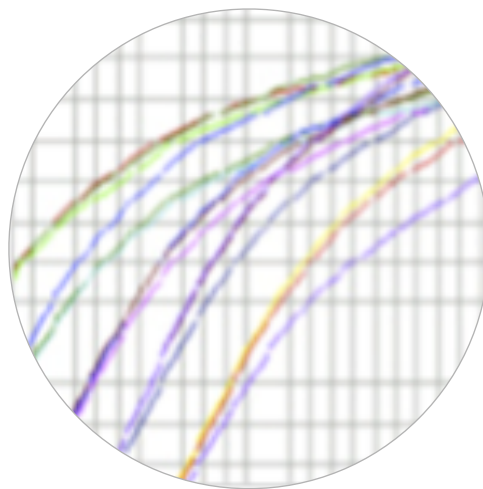
デジタルPCRを生物量分析に応用

第1世代



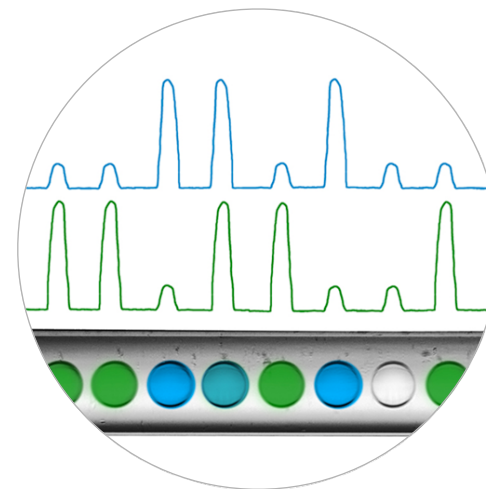
PCR
定性的

第2世代



リアルタイムPCR
相対定量

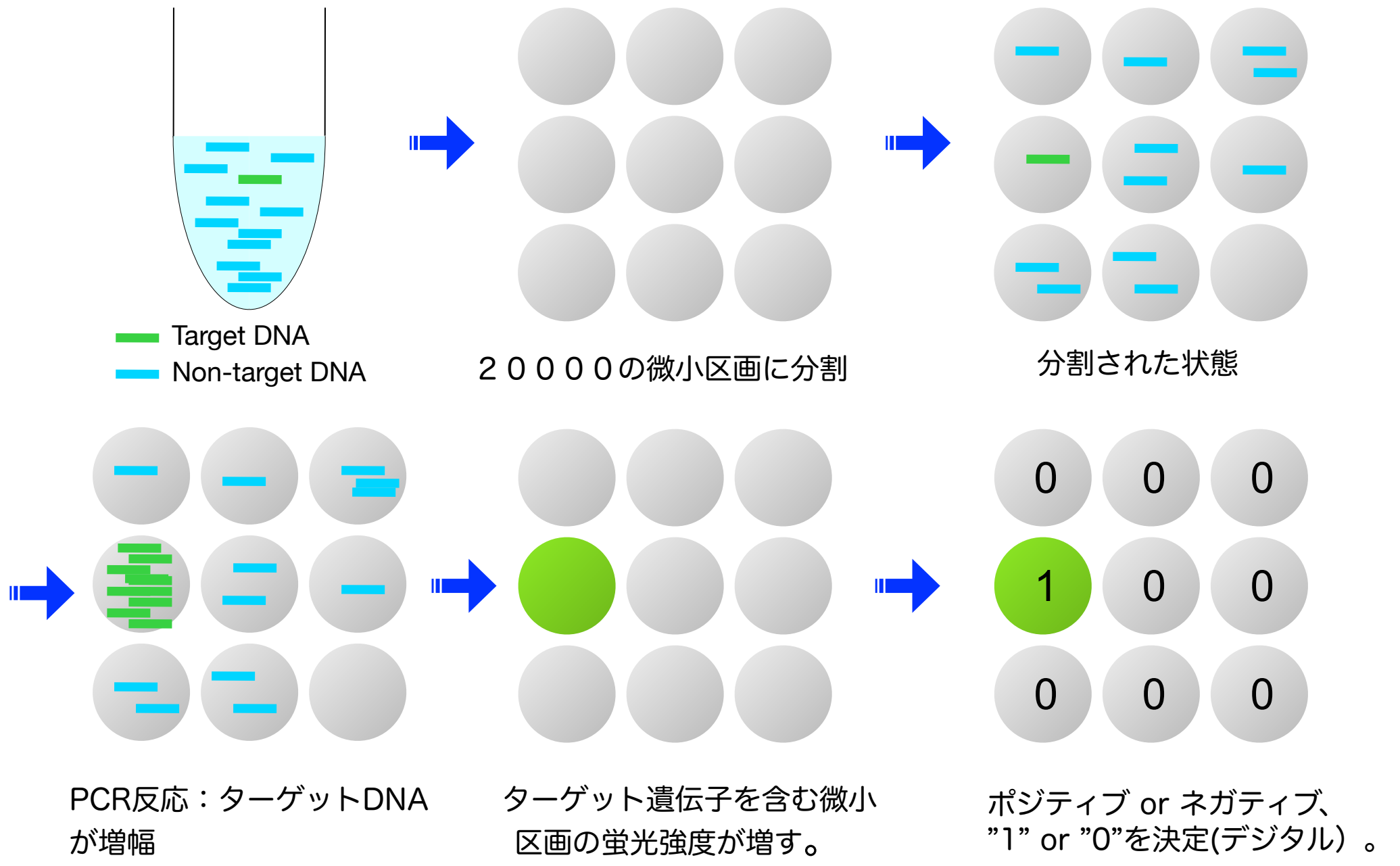
第3世代



デジタルPCR
絶対定量

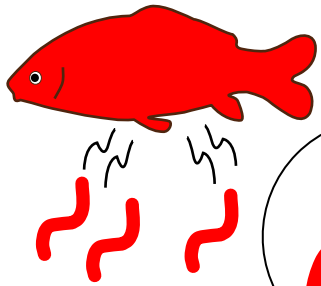
環境DNAの量から生物量を推定：止水

デジタルPCRの原理

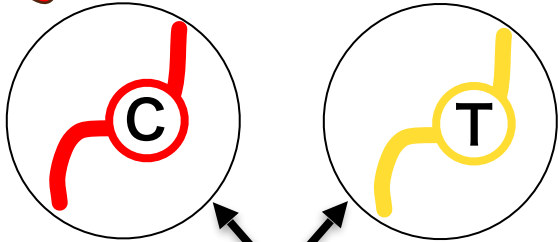
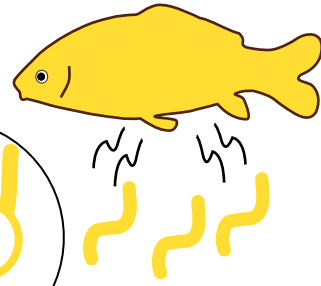


同種内の在来／外来遺伝子型頻度を推定

在来遺伝子型

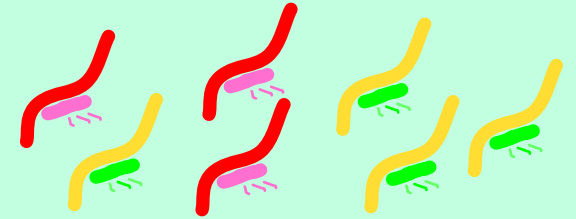


外来遺伝子型



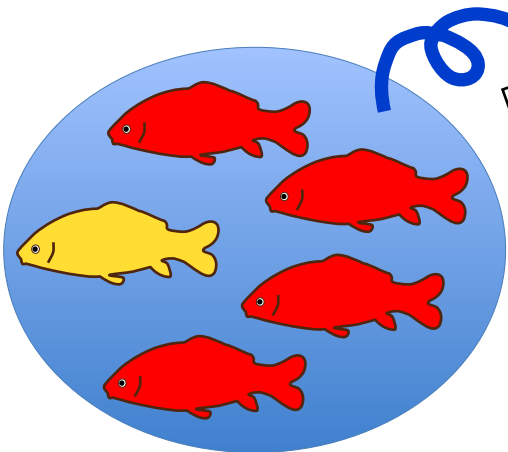
遺伝型を区別する一塩基多型(SNP)座位

Cycleave PCR

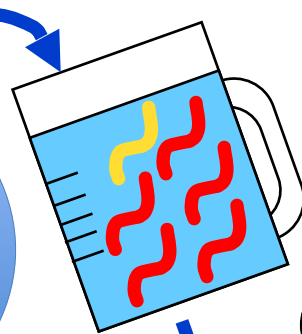


在来・外来に共通のプライマーで増幅したSNP座位を、SNPプローブにより在来・外来を区別して検出・定量する

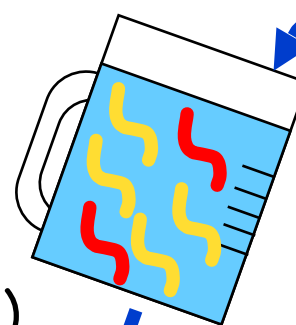
個体群単位で外来遺伝子型侵入レベルの迅速推定が可能に！



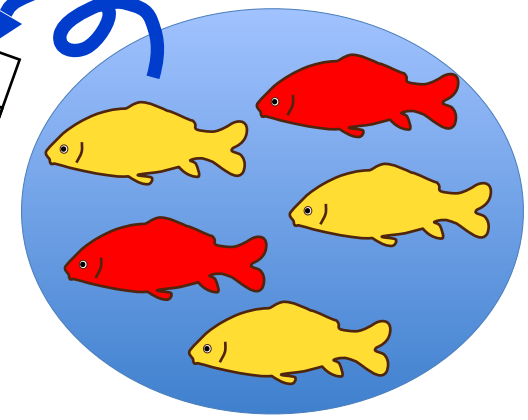
侵入レベル低



アレル頻度の
定量的解析
(Cycleave PCR)



侵入レベル高

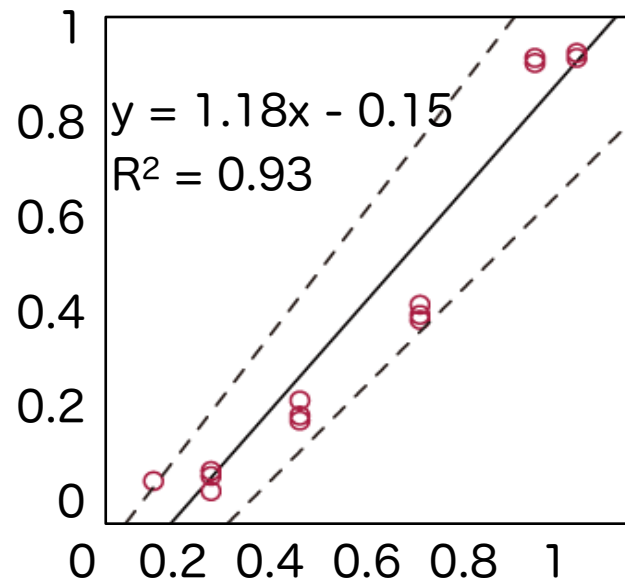


同種内の在来／外来遺伝子型頻度を推定

SNPプローブを使って，同種内の在来／外来遺伝子型頻度
や在来／外来系統のバイオマス比を推定

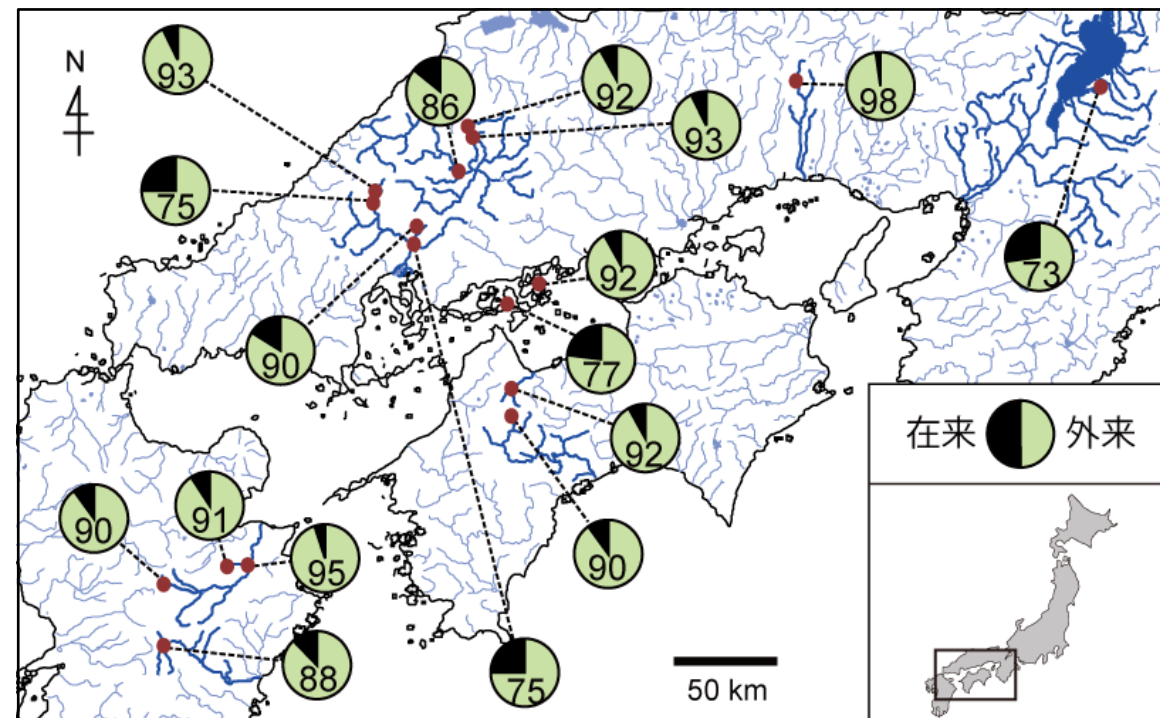
水槽実験における
DNA比 vs バイオマス比

外来型DNAの割合



外来コイの割合 (バイオマス)

西日本の河川・ダム湖における
コイの在来・外来遺伝子型頻度



数字は外来遺伝子型の頻度 (%)

本プロジェクトの ゴール

環境DNA技術による生物分布 モニタリング法の確立

環境DNA（ミトコンドリア・核DNA）の**有無**から
→ 水域（河川・湖沼・ため池）における**生物**の
分布を推定する手法を提案。

達成 ↓
すでに多方面に技術提供中。プレスリリースな
どで公開，生態学会誌（和文）にて詳細な方法
などについて紹介する（査読後改訂済み）。

環境DNAの**量**から
→ 特定種の**生物量**を推定する方法を提案。

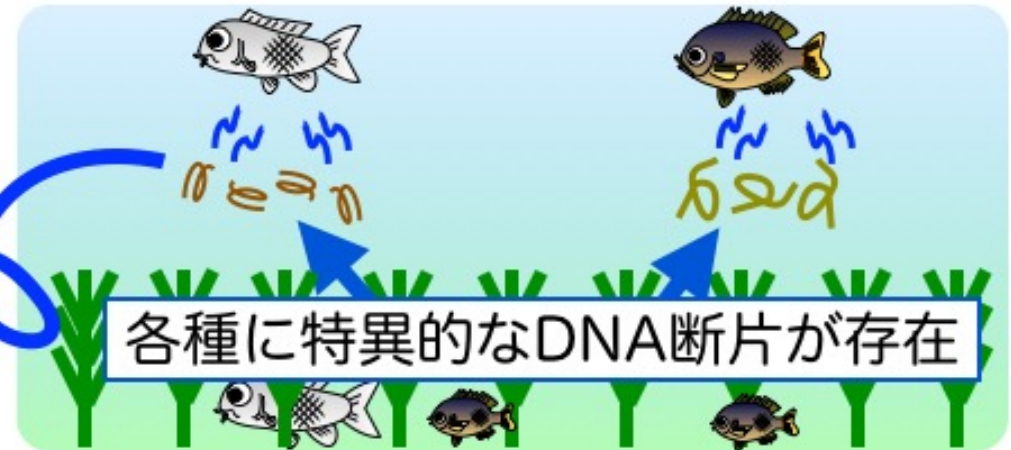
達成 ↓
デジタルPCRなど新たな手法を提案。アユな
どで野外の流水系でも使えることを確認。

本プロジェクトの ゴール

環境DNA技術による生物分布 モニタリング法の確立

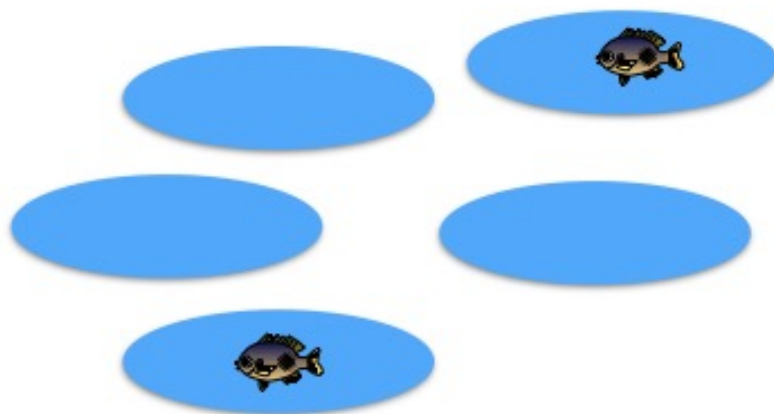
環境DNA (eDNA)

動物の排泄物などに由来して水中に溶け出したDNA

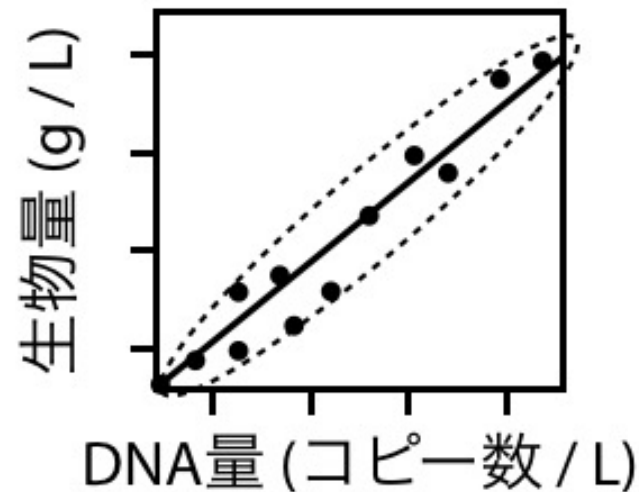


少量の水を採取してDNA情報を調べることで

環境DNAの**有無**から
生物分布を推定できる



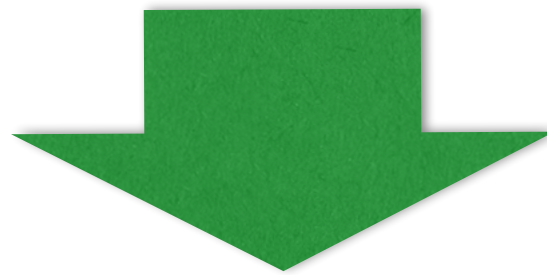
環境DNAの**量**から
生物量を推定できる



本手法は、
種特異的なPCR用プライマーの設計によって
環境アセスメントに即座に応用可能な技術

すでに、環境コンサルタント企業や、地方自治体、中央省庁などから問い合わせ多数。

いくつかの地方自治体、コンサルタント会社との受託研究、共同研究や技術提供を開始。



すでに環境アセスメントなど生物調査
に使える技術として認識されつつある。