

課題名 4RF-1302 環境DNA技術を用いた生物分布モニタリング手法の確立

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

研究実施期間 平成25～27年度

累計予算額 33,498千円（うち平成27年度：12,103千円）

予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 環境DNA、リアルタイムPCR、生物分布調査、採捕調査、ため池、河川、魚類、両生類、水草

研究体制

- (1) 定量PCRによる環境DNA手法の開発（広島大学）
- (2) 核DNA、シーケンスによる環境DNA手法の確立（神戸大学）
- (3) 生物移動分散研究への環境DNAの適用（龍谷大学）
- (4) 外来種・希少種調査への環境DNAの適用（兵庫県立大学）

研究協力機関

島根大学

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

ある生態系に生息する生物の種類や、様々な種から成り立つ生物群集の状況を知るためには、まずはそこにどんな生物種が生息しているか？どれくらい生息しているか？という基本的な情報が必要となる。これらの情報は、生物多様性や希少種の保全、外来種の駆除などを検討するための基礎的情報になる。しかし、実際にこれらのデータを取ることは、生物の捕獲調査などを行う必要があるため、大変な労力を伴うことが多く、大規模な生息調査を展開することは難しかった。

近年、環境中（水や土壌など）に存在する大型生物（魚類など）に由来するDNAを解析することにより、生物の生息状況を知ることができるという画期的な手法が提案されつつある。この手法は環境DNA手法と呼ばれている。実際に採取した水や土壌のサンプルにその生物自体が存在していなくとも、その生物由来のDNAが含まれていれば、そのDNAを分析することで生物の生息状況を分けることが明らかになってきた。そこで、生物分布を知るための新たな手法として、環境DNAによる生物分布モニタリング手法が用いられ始めている。大型生物の環境DNA分析はその手法が初めて報告されてからまだ10年も経っていない新しい技術であるが、めざましい進歩を遂げている。しかし、その現象の詳細やメカニズム、実際の利用方法などはほとんど明らかになっておらず、まだ行政で利用するにはさらなる手法開発が必要な状態である。本研究プロジェクトでは日本で世界的にも先駆的に環境DNA研究を始めた研究者によって構成され、環境DNAによる迅速かつ簡便な生物分布モニタリング手法を開発すべく研究に取り組んだ。

2. 研究開発目的

生物種の保護・管理をする上で最も基本的かつ重要な情報は、生物の生息分布や個体数、生物量である。分布や個体数推定には、様々な手法や分布予測モデルが提案されてきており、近年になってもその議論が終息することはない。これらの従来の研究では、生物の生息場所や生息量を知るためには、採集を行う、網を仕掛けるなど、多大な労力と時間をかけて調査を行う必要があった。これらの調査方法は、信頼性が低いことや調査対象を広げられないなどの問題点が挙げられていた。よって、生物の分布や生物量などを迅速かつ広域で推定できる新たな手法を開発する必要がある。その問題を解決する手法として本研究では、環境DNAによる生物分布モニタリング手法を提案する。開発チームとそれぞれの目的は図1の通りである。本研究では、ミトコンドリアDNAおよび核DNAによる定量PCRとDNAシーケンスにより環境DNAによる生物分布や生物量の推定方法を開発する。開発した環境DNA技術について、河川、湖沼、ため池などの淡水域において適用し、希少種、外来種などの生物分布範囲、移動分散の範囲の抽出、さらに野外での生物量の定量を目指す。また、野外での調査を通じて、どのような環境要因が環境DNAの定量に影響するかについても明らかにする。本研究の最終的な目的は、生態系の管理

者や技術者が、簡便に生物分布のモニタリングに利用できる、環境DNA技術を確立することである。

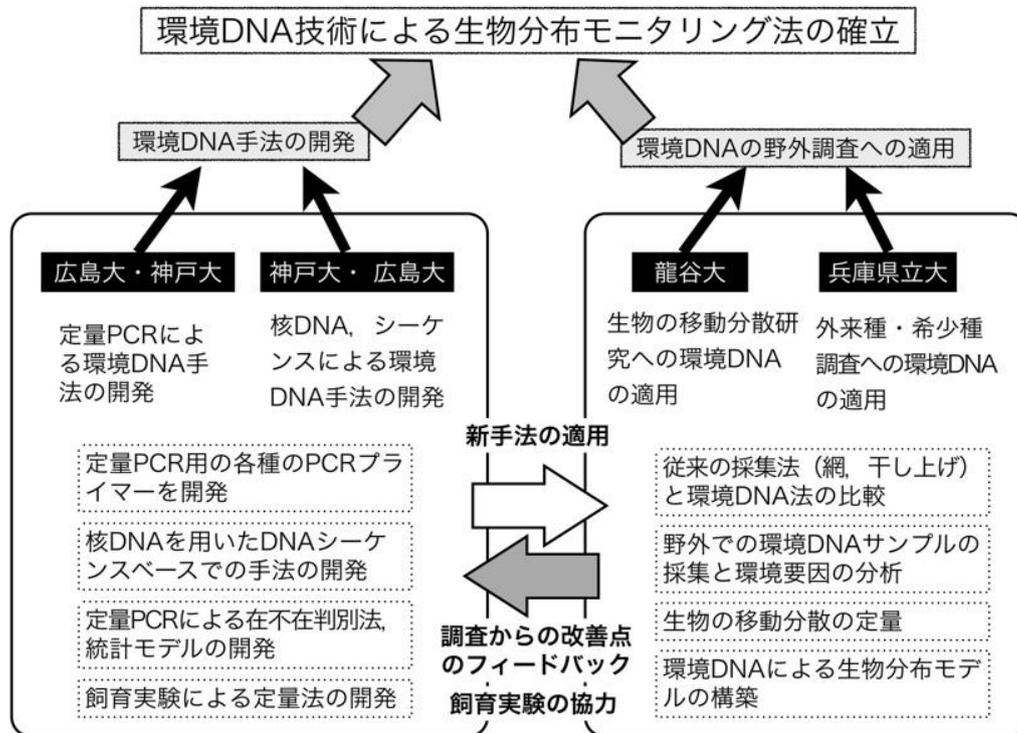


図1 本研究プロジェクトの組織図

3. 研究開発の方法

(1) 定量PCRによる環境DNA手法の開発（広島大学）

1-1 デジタルPCRとリアルタイムPCRを用いた環境DNA量からのコイの個体数推定

野外実験水槽を12基用いて、コイの個体数（0-85匹）を変えてコイの飼育実験を行った。水槽水から環境DNAを抽出し、環境DNA量については、リアルタイムPCR法とデジタルPCRの両手法を用いて解析を行い、これら2手法にて定量された環境DNA量と飼育実験の個体数と比較した。

1-2 生物量のモニタリングにおける環境DNA技術の有用性の検証

オオクチバス (*Micropterus salmoides*) とブルーギル (*Lepomis macrochirus*) の外来魚2種を対象にして、2012年7-8月にかけて兵庫県明石市周辺のため池50面において調査を行った。環境DNA手法では、各池の沖と岸の表層から採取した水サンプル各1Lに含まれる各魚種に特異的なDNAの濃度を定量PCR法によって測定し、外来魚2種の生息状況（採捕調査結果）との比較を試みた。

1-3 Cycleave PCR法による在来種とその同種内外来遺伝子型の検出

コイについて、日本在来型および外来型の遺伝子それぞれについて、SNP部分をRNAとするDNA-RNA-DNAプローブを設計し、これら2種のプローブを異なる蛍光物質で標識した。この Cycleave PCR法によって、2種のDNA比が正しく定量できるかどうかを確認するため、在来および外来遺伝子型由来のDNAを異なる比率で混合したDNA溶液（DNA比スタンダード）を鋳型としてリアルタイムPCRを行ない、DNA比（外来DNAコピー数/在来DNAコピー数）と ΔC_T 値（ $C_{T\text{在来}} - C_{T\text{外来}}$ ）の検量線を作成した。次に、在来遺伝子型と外来遺伝子型を異なるバイオマス比で飼育する水槽実験を行なった。飼育水から抽出した環境DNAをCycleave PCR法に供し、定量されたDNA比からバイオマス比を正しく推定できるかを確認した。

(2) 核DNA、シーケンスによる環境DNA手法の確立 (神戸大学)

2-1. コイを対象とした核DNAの検出および定量

コイを対象として、核DNAを環境DNA手法のマーカーとした検出および定量手法の開発を行った。水槽、野外メソコズム、野外実験池、自然湖沼で採取した環境DNAサンプルを用いて核DNAのコピー数をリアルタイムPCR法によって測定し、ミトコンドリアDNAのコピー数と比較した。

2-2. 核DNAのシーケンス情報の収集

項目2-1の結果から、核rDNAをマーカーとした場合に検出感度が高まることが明らかになったため、その適用対象種を拡大するためにシーケンスデータの整備を行った。琵琶湖淀川水系に生息する在来及び外来の魚種について、ITS1領域およびITS2領域のシーケンス解析を試みた。また、次世代シーケンサーによるオオサンショウウオのITS1領域のマスシーケンス解析も行った。

2-3. 環境DNA手法を利用した希少魚種カワバタモロコの検出法の開発および新規生息地の探索

既にカワバタモロコの在・不在が明らかな兵庫県のため池で、採水調査を行った。ため池の表層水を約2L採水し、ガラスフィルターを用いて吸引濾過をした。ろ過フィルターからDNAを抽出し、設計したリアルタイムPCRによる検出系を用いてカワバタモロコのDNAの有無を確認した。

2-4. 環境DNA手法を利用したオオサンショウウオ属在来種および外来種の同時検出法の開発および野外適用

オオサンショウウオおよびチュウゴクオオサンショウウオのミトコンドリアNADH1遺伝子をそれぞれ特異的に検出するプライマー/プローブセットを開発した。京都府の桂川水系全域から、2012年9月、12月、2013年3月、6月の4回にわたり4Lのサンプル水を採取した。採水は、在来種と外来種の交雑が報告されている鴨川流域を含む、京都府の桂川水系37地点で行った。水サンプルからろ過、DNA抽出を行い、リアルタイムPCRによってそれぞれの種の遺伝子の検出実験を行った。

2-5. マルチプレックスPCRを用いた野外のため池における在来種と外来種の分布域マッピング

兵庫県のため池における在来種の代表的なものとして、カワバタモロコ、ミナミメダカ (*Oryzias latipes*)、ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) の3種について、マルチプレックスPCRによる同時検出系を作成した。また、国内で在来魚の生息を脅かすサンフィッシュ科の外来魚3種 (ブルーギル [*Lepomis macrochirus*]、オオクチバス [*Micropterus salmoides*]、コクチバス [*Micropterus dolomieu*]) について、同様にマルチプレックス検出系を作成した。兵庫県下のため池合計101地点で177の水サンプルを得た。うち82地点の82サンプルは2-3で述べたサンプルと同一である。これらの水サンプルから環境DNAを抽出し、在来魚および外来魚を対象としたマルチプレックスPCRによって6種の在/不在を明らかにした。

(3) 生物移動分散研究への環境DNAの適用 (龍谷大学)

3-1 環境DNAの分解と環境要因の効果について

アユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) を用いて、放出後のDNAがどのような速度で分解するのかについて飼育条件下での基礎的研究を行った。また、環境DNAの野外環境水中での分解については滋賀県の野洲川で採取した水を用いて実験を行った。4Lタンク12本分の採水を行い、実験室に氷冷状態で持ち帰ったのち、10℃、20℃、30℃の各温度で48時間インキュベートした。0、1、3、6、12、24、48時間経過ごとに各温度の水を採取して500mLずつ濾過を行い、上述の野外調査と同じ手法でアユの環境DNAの検出・定量を行った。

3-2 環境DNAの測定精度向上に向けた試料の前処理について

環境DNAは極薄い濃度で環境水中に含まれており、同じ試料水であっても採水の繰り返しの間で大きくDNA濃度推定値にばらつきが生じることが経験的に知られている。これはしばしばDNA定量精度に看過しがたい大きさの変動を生じさせるため、このバラつきを抑制するための水試料の前処理方法を検

討した。まず、実験Ⅰとして、ばらつきの原因と考えられる細胞の大きな塊等の DNA を多く含む断片を除去することで定量精度を向上させる為、採水したサンプルを一旦メッシュサイズが粗いフィルターで濾過し体積が大きい断片を除去するプレ濾過手法を検討した。次に、実験Ⅱとして、ばらつきの原因と考えられる細胞の大きな塊等の DNA を多く含む断片を除去することで定量精度を向上させる為、採水したサンプルを遠心分離し、比重の大きい DNA を含む断片を遠心分離による除去する手法を検討した。

3-3 流水環境における移動分散研究の実例の提示

大阪湾から琵琶湖に至る淀川本流およびその代表的支流である桂川水系で高密度なサンプリングを行い、外来哺乳類、ヌートリア (*Myocastor coypus*) の分布推定を実施した。さらに、愛知県の矢作川でアユを対象として調査を実施した。当該河川に3-4 km ほどの採水地点を29地点設定して毎月1回、11年間アユの環境DNAの検出・定量を行った。

(4) 外来種・希少種調査への環境DNAの適用 (兵庫県立大学)

4-1 ため池における生物量定量：池干し調査と環境DNAの比較

池干しが行われるため池において、コイと特定外来種であるブルーギルを対象に、環境DNA分析と生物の採捕調査を行い、両データの関係について検証を行った。さらに、池の体積なども分析時に考慮した。池干し調査は、姫路市・明石市・加古川市のため池8面にて、2014年9月から12月にかけて行った。対象生物はコイとブルーギルの2種とし、池干し前に環境DNA採集を、池干し直後に生物の採捕調査を行った。環境DNAの採集は、池干しの約1週間前に実施した。ため池の沖帯3地点と岸帯3地点の計6地点からそれぞれ1L採水し、環境DNAを抽出し、リアルタイムPCRにてDNA量を定量した。

4-2 環境DNAを用いた流水環境における生物量推定法の開発

水槽3基 (6,000 L) にアユ (*Plecoglossus altivelis*) 1尾、3尾、9尾を投入し、各尾数に応じて水中に放出されたアユのDNA量を調べた。実験中、各水槽から水1Lずつを採取した。次に、採取した水をろ過してフィルターにトラップされたDNAの抽出・精製を行い、アユ特異的なDNAを増幅・定量するプライマー・プローブを用いて、リアルタイムPCRによりDNA量を測定した。これによって、アユのバイオマス (mg/L) と環境中のDNA量 (コピー数/L) との関係を解析した。

4-3 環境DNA手法を用いた水生植物の分布推定法の開発

野外調査において、従来の目視による分布調査か環境DNA手法のどちらがクロモの検出力が高いかを比較した。調査は、東広島市内のため池21か所 (クロモ分布情報あり：5か所、なし：16か所) にて行った。各ため池から1Lを採水し、フィルター濾過によってDNAを抽出した。それらからクロモDNAが検出されるかをリアルタイムPCRにより確認した。

水中の環境DNA量によって、そこに生育する水草の生物量を推定することができるかを明らかにするために、室内の制御環境下において水槽実験を行った。実験対象生物はクロモとオオカナダモの2種を扱った。それぞれの種について、生物量を3条件 (1cm、4cm、4cmx2本) にわけて水2L中で10日間生育した。各条件につき6反復行った。各種投入後数日にわたり15mlずつ採水した。それらをエタノール沈殿し、環境DNAを抽出し定量した。

4. 結果及び考察

(1) 定量PCRによる環境DNA手法の開発 (広島大学)

1-1 デジタルPCR、リアルタイムPCRを用いたコイの個体数・バイオマス推定

採水したサンプルにおいて、リアルタイムPCRとデジタルPCRを用いてコイの環境DNA量を定量した。その結果、まずはデジタルPCRとリアルタイムPCRではほぼ同じような値が測定されることがわかった。しかし、測定誤差についてCV値を用いて比較すると、リアルタイムPCRでは、デジタルPCRに比較して、DNAのコピー数が少ない時に、デジタルPCRよりもばらつきが大きくなることが明らかとなり、デジタルPCRの測定制度が高いことがわかったリアルタイムPCRとデジタルPCRを用いて定量したコイの環境DNA量と、コイの個体数を比較したところ、有意な強い関係性が見られることが明らかとなった。また、

デジタルPCRではDNAコピー数が少ない時にも、回帰の直線上に値が分布しており、リアルタイムPCRよりも高精度で個体数・生物量推定が可能であることが示唆された。

1-2 生物量のモニタリングにおける環境DNA技術の有用性の検証

オオクチバスでは、目視調査によって池50面のうち2面で生息が確認され、環境DNA手法では11面でオオクチバスのDNAが検出された（DNA検出率100%）。ブルーギルでは、目視調査によって50面のうち5面で生息が確認され、環境DNA手法では23面でブルーギルのDNAが検出された。さらに、目視調査によって生息確認した5面すべてでDNAも検出された（100%）。両魚種の環境中のDNA濃度は、採捕調査による努力当たりの漁獲量（catch-per-unit effort、CPUE）と、正の相関関係をもつ傾向がみられた。

1-3 Cycleave PCR法による在来種とその同種内外来遺伝子型の検出

在来遺伝子型と外来遺伝子型を持つコイを異なるバイオマス比で飼育した6つの水槽水から得られた環境DNA試料中のDNA比をCycleave PCRによって定量した。6水槽について、環境DNA試料より定量された外来DNAの割合と、実際に測定した外来遺伝子型のバイオマスの割合には傾きがほぼ1の強い正の相関が検出された。したがって、本研究で開発したCycleave PCRを用いた環境DNA手法を用いれば、外来遺伝子型のバイオマス割合、つまり外来遺伝子型の侵入レベルを推定できることが示唆された。そこで、西日本の23地点の水域に本手法を適用し、コイ地域個体群における外来遺伝子型の侵入レベルの推定を行った。17水域において外来／在来DNA比の定量値が得られ、その結果、西日本において大きく外来遺伝子型の侵入が進んでいることが明らかとなった。

（2）核DNA、シーケンスによる環境DNA手法の確立（神戸大学）

2-1. コイを対象とした核DNAの検出および定量

環境DNA手法における核DNAマーカー使用の可能性を検討した結果、野外メソコズム実験では核DNAの分子数がミトコンドリアDNAの分子数に対して160倍程度多く検出された。野外実験池と自然湖沼においては核DNAの分子数がミトコンドリアDNAに比べてそれぞれ300倍、150倍程度多く検出された。この結果から、核DNAを環境DNAマーカーとして利用することが可能であることが示され、その感度はミトコンドリアDNAをマーカーとした場合に比べて10倍から100倍程度高いことが示唆された。

2-2. 核DNAのシーケンス情報の収集

オオサンショウウオをモデルとして、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いたマスシーケンシングによって、ITS1領域の個体内多型の情報を得た。1個体に由来するDNAからITS1領域について約2500本のシーケンスを得、類似度の高い（97%以上）シーケンスをクラスタリングした結果、120種類の代表配列を得た。これらの配列の解析の結果、1個体に由来する配列であるにもかかわらず多数の塩基置換や挿入／欠失が存在していた。このことから、生物種によってはrDNAに多型が存在するため、環境DNAのマーカーとして用いるには特に挿入／欠失のある部位を避けたプライマー／プローブ設計が重要であることが明らかになった。

2-3. 環境DNA手法を利用した希少魚種カワバタモロコの検出法の開発および新規生息地の探索

兵庫県下のため池82地点で採水を行い、カワバタモロコのDNAを検出する調査を行った結果、7地点のサンプルからカワバタモロコのDNAを検出した。この7地点について、もんどりを用いた採捕調査を行ったところ、6地点でカワバタモロコが捕獲された。兵庫県下のカワバタモロコ生息地は約30地点といわれており、本調査の結果は環境DNA手法を用いて希少種の生息地を新たに発見することが可能であることを示している。

2-4. 環境DNA手法を利用したオオサンショウウオ属在来種および外来種の同時検出法の開発および野外適用

京都府の桂川水系における在来及び外来オオサンショウウオDNAの検出調査の結果、合計25箇所では在来オオサンショウウオの、9箇所では外来オオサンショウウオ（チュウゴクオオサンショウウオ）のDNAの検出に成功した。両種の検出されたエリアは過去に京都市が行った採捕調査の結果と良く整合しており、本手法が在来／外来オオサンショウウオに適用可能である事が示された。

2-5. マルチプレックスPCRを用いた野外のため池における在来種と外来種の分布域マッピング

兵庫県下のため池合計101地点で得た177サンプルについて、外来魚3種（オオクチバス、コクチバス、ブルーギル）と在来魚3種（カワバタモロコ、ミナミメダカ、ドジョウ）の同時検出系でDNA検出を行った。その結果、101地点中23地点でブルーギルのDNAが、33地点でオオクチバスのDNAが、1地点でコクチバスのDNAが、13地点でカワバタモロコのDNAが、24地点でミナミメダカのDNAが、40地点でドジョウのDNAが検出され、環境DNAによる外来魚及び在来希少種の生息地検出が有効であることが示された。

（3）生物移動分散研究への環境DNAの適用（龍谷大学）

3-1 環境DNAの分解と環境要因の効果について

DNAの濃度は指数関数的に減少し、24時間で $90 \pm 4.6\%$ 程度が分解すると推定された。既存の研究において、ヨーロッパヌマガレイ (*Platichthys flesus*) とイトヨ (*Gasterosteus aculeatus*) では、それぞれ約68%と30%のDNAが24時間で分解すると報告されており、これらの値と比較すると、アユから放出されるDNAの分解は格段に速いと考えられる。

3-2 環境DNAの測定精度向上に向けた試料の前処理について

実験Ⅰのプレ濾過による方法については、測定されたDNA濃度を多重比較した結果、メッシュサイズ $30 \mu\text{m}$ でプレろ過を行ったサンプルのDNA濃度 (860 ± 660 コピー数/ μL) と $3.0 \mu\text{m}$ でプレろ過を行ったサンプルのDNA濃度 (360 ± 37.0 コピー数/ μL) の間に有意な差が認められ、細かな目合いのフィルターでプレ濾過した試料ほど、測定されたDNA濃度が低くなる傾向がみられた。

遠心分離による前処理を検討した実験Ⅱでは、測定されたDNA濃度を多重比較した結果、遠心分離を行わなかったサンプルのDNA濃度 ($700. \pm 41.0$ コピー数/ $2 \mu\text{L}$) と $8000 \times g$ で遠心分離を行ったサンプルのDNA濃度 (250 ± 27.0 コピー数/ $2 \mu\text{L}$) との間に有意な差が示され、遠心力が大きくなるほど測定されたDNA濃度は低下した。

3-3 流水環境における移動分散研究の実例の提示

淀川および桂川の水系における多地点調査の結果、51地点中27地点でヌートリアのDNAが検出された。平成23年度の河川水辺の国勢調査による同地域でのヌートリア確認状況と比較すると、確認されている地点ではほぼすべて環境DNAで検出できていることが明らかとなった。

矢作川におけるアユの移動分散について、環境DNAの検出によりこれまでよく知られているアユの生活史、即ち、春に河川に遡上し、夏の間河川で藻を食んで成長し、秋以降に産卵して生涯を終えるという生活史を適切にとらえていると考えられる。これにより、流水環境下であっても、季節的な採水調査を広域的に繰り返すことによって生物種の生活史（移動分散、再生産から減耗）を推定するために環境DNA分析が利用できること示された。

（4）外来種・希少種調査への環境DNAの適用（兵庫県立大学）

4-1 ため池における生物量定量：池干し調査

ため池から採取した水サンプルのDNA量と、池干しによる採捕調査から得られたコイ、ブルーギルの生物量を比較した結果、コイでは、環境DNA量が生物量を比較的反映する結果となった。一方ブルーギルでは、生物量が異なっても環境DNA量はほぼ一定の値を示し、環境DNA量と生物量の間に関係性はみられなかった。

4-2 環境DNAを用いた流水環境における生物量推定法の開発

水槽実験の結果、環境中のアユのDNA量から生物量を推定するモデル式の開発に成功した。次に、このモデル式を用いて、野外調査時に採取した水サンプル中のDNA濃度からアユの生物量を推定したその結果、野外で採取した水サンプルから推定されたアユの推定生物量は2980kgになり、放流時よりも約13.5倍に増加していることが示唆された。

4-3 環境DNA手法を用いた水生植物の分布推定法の開発

野外調査の結果、目視によってクロモの分布が確認できたのは2か所（分布情報あり）のみであった。一方で、環境DNA手法では、目視で確認できた2か所に加え、3か所（分布情報あり：2か所、なし：1か所）からクロモDNAが検出された。このことから、環境DNA手法は水生植物においても検出力が高く有力な

分布推定法となりうることが示唆された。

オオカナダモにおいては、生物量が多くなるほど環境DNA量も増加する傾向が検出された一方で、クロモにおいては生物量が少ない条件下でも個体によっては環境DNA量が増加した。今回の実験ではクロモはオオカナダモよりも生物量自体が小さいため、生物量が小さい条件下では環境DNA量との関係性が見えにくくなったことが考えられる

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究開発により得られた成果の重要な科学的意義として、以下の4点が挙げられる。

1) 生物分布調査への環境DNA手法の適用：本研究で示された、外来種の生物分布や希少種の新規分布域について環境DNAを用いて探索する手法は、概念としては提唱されていたものの、実際にそれに成功した事例はこれまでほとんど報告されておらず、科学的に重要な成果である。さらに、環境DNAサンプルから、同属の近縁種のDNAを区別して検出する手法や、マルチプレックスPCRを用いた多種DNAの同時検出系もこれまでに報告がなく、環境DNA分析を実用化する上で重要な成果である。特に矢作川でのアユの移動分散調査では、毎月一回の調査と付随する分析をほぼ2名の調査者で実施でき、非常に省力化できることが示唆された。生物の移動分散調査は多くの研究で非常に基礎的かつ労力のかかるパートである。対象種のDNAを現場から採取するという環境DNA分析は、労力が小さく、かつ、明確な科学的根拠をもった結果が得られる手法である。実際の野外調査での実行性を示した本研究は実務的調査研究への橋渡しとして意義が大きい。

2) 環境DNAからの生物量推定：これまでに実験生態系を用いた高原らや他の研究で明らかになった、環境DNAと魚のバイオマスや個体数の関係について、比較的面積が大きく、自然環境に近いため池全体でもある程度定量できること、さらには河川などの流水系でも推計できる可能性が示された。

3) 環境DNAによる遺伝型の判別：同種内外来種などの種内の遺伝子型間の違いを環境DNAから判別し、その割合を定量できる可能性が示された。

4) 核DNAによる環境DNA手法の開発：本研究で見出された魚類の核DNAを環境サンプルから検出することが可能であることや、核rDNAのITS1領域のコピー数がミトコンドリアのCytB領域のコピー数よりも100倍以上多いことはこれまでに知られていなかった事実である。この結果は、環境DNA分析の感度向上やバイオマス推定精度の向上に役立つと考えられる。

(2) 環境政策への貢献

これら本研究開発により得られた環境DNA技術については、すでに様々な省庁や自治体、環境コンサルタント会社から問い合わせを受けており、すでにいくつかとは共同で研究や実地での応用を開始している。また、本研究開発のゴールであった日本語によるマニュアル化については日本生態学会雑誌の特集号にて環境DNA手法に関する詳細な総説が出版される（受理済）。

<行政が既に活用した成果>

本研究によるため池や河川での環境DNA検出技術を応用した調査が、環境省中国四国地方環境事務所の「平成27年度希少淡水魚生息域における外来魚等防除のための環境DNA分析技術開発業務」に用いられ、外来魚および希少淡水魚種の環境DNA検出結果が報告された。さらに、河川やダム湖の生物群集の把握のために、すでに国土交通省の外郭団体であるダム水源地整備センターにおいて、同環境DNA技術を利用した評価方法の検討のために、同センター設置の氾濫原研究会において検討のための調査・実験を依頼されている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

環境DNA分析は現場での作業が水をくむだけであるというその省力化された特性があり、今後は水産資源の管理（放流効果の検証等）や外来種の侵入検知、希少種の探索等に有効活用が期待できる。DNAという物証を持って結果を出せるため、これらの課題にかかわる行政判断が求められる場面で活用されることが期待できる。さらに、環境省レッドリストで絶滅危惧Ⅱ類（VU）に指定されているオオサンショウウオや、特定外来生物であるブルーギル、オオクチバス、コクチバスなどのDNA検出技

術は、対象種の検出やバイオマス推定等に利用可能であり、希少種の保護事業や、外来種の駆除活動などに直接利用可能である。また、技術の応用によって他の生物種にも利用可能であるので、環境調査等の事業に応用されることが見込まれる。さらに判別が難しい同種内外来種などの遺伝型が異なる種や集団についても適用可能であり、新たな生物分布調査方法として非常に有効であると見込まれる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) T. TAKAHARA, T. MINAMOTO and H. DOI (2015) “Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*).” *Biological Conservation* 183, 64–69
- 2) H. DOI, K. UCHII, T. TAKAHARA, S. MATSUHASHI, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO (2015) “Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys” *PLOS ONE* 10:e0122763
- 3) S. FUKUMOTO, A. USHIMARU and T. MINAMOTO (2015)
“A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan.” *Journal of Applied Ecology* 52 (2) 358–365.
- 4) H. DOI, T. TAKAHARA, T. MINAMOTO, S. MATSUHASHI, K. UCHII, and H. YAMANAKA (2015)
“Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species.” *Environmental Science & Technology* 49:5601–5608.
- 5) H. YAMANAKA, and T. MINAMOTO (2016) “The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity.” *Ecological Indicators* 62, 147–153.
- 6) K. Uchii, H. Doi, and T. Minamoto (2016) A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources* 16:415–422.

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 高原輝彦、源利文、土居秀幸 (2014)：身近な水の環境科学（測定編）－調査・実習から環境教育まで－、朝倉書店 「水を調べるだけで生き物がわかる！～環境中のDNAを利用した生物分布モニタリング法～」

(2) 主な口頭発表（学会等）

- 1) T. Takahara, T. Minamoto, H. Doi : 26th International Congress for Conservation Biology, Baltimore, USA, 2013 “Using environmental DNA to estimate the distributions and biomass of fish”
- 2) 源利文：第29回個体群生態学会大会（2013）
「環境DNAを用いた水中生物モニタリングの現状」
- 3) 山中裕樹、源利文、櫻井翔、大垣寿々香：第61回日本生態学会（2014）
「水生生物の移動分散モニタリングへの環境DNA技術の適用：流水環境における研究例と展望」
- 4) 土居秀幸、高原輝彦、源利文：第61回日本生態学会（2014）
「環境DNAとフェノロジー：現状と未来」
- 5) H. Doi, T. Takahara, T. Minamoto : Evolutionary Community Ecology symposium, Kyoto, Japan, (2014) “Community ecology using environmental DNA “
- 6) T. Minamoto, S. Fukumoto and A. Ushimaru: Joint 2014 Annual Meeting British Ecological Society and Société Française d’ Ecologie, Lille, France, (2014) “A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic and exotic giant salamander species in Japan.”
- 7) H. Yamanaka, T. Minamoto : Joint 2014 Annual Meeting – British Ecological Society and Societe Francaise d’ Ecologie, Lille, (2014) “Assessment of the effect of artificial obstructions

on fish migration in a river using environmental DNA.”

7. 研究者略歴

課題代表者：土居 秀幸

東北大学大学院生命科学研究科博士後期課程修了博士（生命科学）、愛媛大学農学部 日本学術振興会特別研究員（PD）、University of Washington 客員研究員、Carl-von-Ossietzky University Oldenburg 日本学術振興会海外特別研究員、広島大学サステナブル・ディベロップメント実践研究センターテニユアトラック講師、兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科准教授

研究分担者

1) 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）、京都大学生態学研究センター講師（研究機関研究員）、産業技術総合研究所特別研究員、総合地球環境学研究所プロジェクト上級研究員、現在、神戸大学大学院人間発達環境学研究科特命助教

2) 山中裕樹

京都大学大学院理学研究科修了、博士（理学）、総合地球環境学研究所研究員、龍谷大学理工学部助手、現在、龍谷大学理工学部 講師

3) 片野泉

奈良女子大学大学院人間文化研究科修了、博士（理学）、奈良女子大学共生科学研究センター研究員、土木研究所自然共生研究センター専門研究員、Carl-von-Ossietzky University Oldenburg Post-doc、兵庫県立大学環境人間学部准教授、現在、奈良女子大学理学部准教授

4RF-1302 環境DNA技術を用いた生物分布モニタリング手法の確立

(1) 定量PCRによる環境DNA手法の開発

広島大学 土居秀幸

平成25～27年度累計予算額：12,815千円（うち平成27年度：0千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本研究では、平成25、26年度において、環境DNAによる生物分布モニタリング手法を開発すべく、特に環境DNAの濃度から生物量を推定する手法の開発、外来種の分布や生物量の推定、さらには、新しい手法であるCycleave PCR法による在来種とその同種内外来遺伝子型の検出を行った。1-1として、デジタルPCRとリアルタイムPCRを用いた環境DNA量からのコイの個体数推定をおこなった。12基のメソコズムを用いて、水中の環境DNA量とコイの個体数・生物量の関係について検討し、両者には明瞭な正の関係があり、環境DNA量から生物量や個体数を予測できること、さらに新しい分析手法であるデジタルPCRでは、特に低濃度でさらに精度よく推定できることがわかった。1-2として、環境DNA手法と古典的な採捕調査とを50個のため池で比較し、特にオオクチバス

(*Micropterus salmoides*) については、採捕調査で明らかとなった生物量明瞭な関係があることがわかった。1-3として遺伝的に非常に近縁である同種内外来遺伝子型の侵入を迅速に把握するための環境DNA手法の開発を行った。まず、DNA上の一塩基多型に基づいて在来遺伝子型と外来遺伝子型を判別し、さらに両者のDNAの存在比を決定する定量PCR手法を確立した。次に、水槽実験において、環境DNAより定量した外来／在来DNA比から外来／在来遺伝子型のバイオマス比を高精度に推定できることを確認した。さらに、本手法を野外へ適用し、自然水域における外来遺伝子型の侵入レベルを短期間のうちに広範に推定することに成功した。

[キーワード]

環境DNA、生物モニタリング、魚類、生物量、ため池、河川

1. はじめに

生物種の保護・管理をする上で最も基本的かつ重要な情報は、生物の生息分布や個体数、生物量である。分布や個体数推定には、様々な手法や分布予測モデルが提案されてきており、近年になってもその議論が終息することはない。従来の研究では、生物の生息場所や生息量を知るためには、目視で数える、採集を行う、網を仕掛けるなど、多大な労力と時間をかけて調査を行う必要があった。これらの調査方法は、信頼性が低いことや調査対象を広げられないなどの多くの問題点が挙げられていた。よって、生物の分布や生物量などを迅速かつ広域で推定できる新たな手法を開発する必要がある。その問題を解決する手法として本研究では、環境DNAによる生物分布モニタリング手法を提案する。環境DNAによるモニタリング手法では、水に含まれる生物由来のミト

コンドリアDNAから生物の種を判別し、さらにその量を定量PCRにより定量することによって、生物分布や生物量を推定する。その際、より高精度での推定を実現するためには、どのような環境要因が環境DNAの定量に影響するかについても明らかにする必要がある。そのために以下の3つの研究を進めた。

- 1-1 デジタルPCRとリアルタイムPCRを用いた環境DNA量からのコイの個体数推定
- 1-2 生物量のモニタリングにおける環境DNA技術の有用性の検証
- 1-3 Cycleave PCR法による在来種とその同種内外来遺伝子型の定量的検出法の開発

2. 研究開発目的

1-1 デジタルPCRとリアルタイムPCRを用いた環境DNA量からのコイの個体数推定

デジタルPCRとリアルタイムPCRを用いた環境DNA量から魚の個体数を推定する手法を開発するために、メソコズムによる操作実験を行った。3-8 5個体のコイを飼育して（表(1)-1）、その水から環境DNAを取り出して解析することで、水中の環境DNA量とコイの個体数の関係について検討した。本実験ではコイを対象にして飼育実験を行った。

1-2 生物量のモニタリングにおける環境DNA技術の有用性の検証

環境DNA手法と古典的な調査法（目視や採捕調査）における生物モニタリング法としての有用性を比較・検証するため、オオクチバス (*Micropterus salmoides*) とブルーギル (*Lepomis macrochirus*) の外来魚2種を対象にして、2012年7-8月にかけて兵庫県明石市周辺のため池50面において調査を行った。

1-3 Cycleave PCR法による在来種とその同種内外来遺伝子型の検出

同種内の遺伝的に異なる外来集団（同種内外来遺伝子型）は、見た目では在来種と区別がつかないため、その検出に大きな困難を要するだけでなく、在来種との交雑によって遺伝子浸透を引き起こす可能性が高く、生物多様性保全における重大リスクとなっている。在来種と遺伝的に非常に近い同種内外来遺伝子型の特異的検出には、種内の小さな変異を判別できる高感度な手法が必要となる。そこで本研究では、最も豊富に存在する遺伝変異であり、変異の最小単位である一塩基多型（SNP）に基づいて、在来遺伝子型と外来遺伝子型のDNAの存在比を決定する定量PCR法を確立するとともに、その定量PCR法を利用し、外来遺伝子型の侵入規模を迅速に推定する環境DNA手法を開発することを目的とした。

3. 研究開発方法

1-1 デジタルPCRとリアルタイムPCRを用いた環境DNA量からのコイの個体数推定

コイを用いた飼育実験は、広島大学理学部に設置されている野外実験水槽を12基用いて行った。各水槽（約450L）に実験7日前に水道水を入れ、実験開始まで汲み置きした。また1基の水槽はコイを入れず（0匹）、コントロール区とした。採水は、コイを入れる前（コントロール、0日）、1日目、2日目、3日目に採水した。また、途中で死亡した個体については体重を測定して、実験水

槽から取り除いた。

エタノール沈殿による抽出：水槽中央部において、1.5ml の 3M sodium acetateを入れておいた50ml 遠沈管に15ml の水をピペットで採水した。採水後すぐに33 ml absolute ethanolを入れたあと、-20℃にて冷凍保存した。その後、高速冷却遠心機（条件：10,000 g、1時間、4℃）で遠心した後、その上澄みをQiagen DNeasy Blood and Tissue Kitを用いて、抽出・精製した。

環境DNA量については、リアルタイムPCR (StepOne、Life technologies)とデジタルPCR (QX-100、Bio-Rad、広島大学霞キャンパスに設置)の両手法を用いて解析を行った。コイのプライマープロープについては、リアルタイムPCR、デジタルPCR共に同じものを用いて分析を行った (F、5'-GGTGGTTCTCAGTAGACAATGC-3'; R、5'-GGCGGCAATAACAAATGGTAGT-3'、TaqMan probe (5'-FAM-CACTAACACGATTCTTCGCATTCCACTTCC-TAMRA-3')。これら2手法にて定量された環境DNA量と飼育実験の個体数と比較した。

表(1)-1 コイ飼育実験に用いた個体数

Tank	Individuals per pond
1	0
2	3
3	4
4	5
5	7
6	9
7	11
8	17
9	25
10	38
11	56
12	85

1-2 生物量のモニタリングにおける環境DNA技術の有用性の検証

オオクチバス (*Micropterus salmoides*) とブルーギル (*Lepomis macrochirus*) の外来魚2種を対象にして、2012年7-8月にかけて兵庫県明石市周辺のため池50面において調査を行った。環境DNA手法では、各池の沖と岸の表層から採取した水サンプル各1Lに含まれる各魚種に特異的なDNA (ミトコンドリアDNAのシトクロム**b**遺伝子の一部) の濃度を定量PCR法によって測定し、外来魚2種の生息状況 (在・不在および生物量) の評価を試みた。目視調査は、水サンプル採集の際に、対象魚種が確認できるかどうかによって在・不在を判定した。採捕調査は、熟練の研究者2名が投網とタモ網を用いて、すべての池において面積辺りの努力量が等しくなるように行い、生息状況を評価した。

1-3 Cycleave PCR法による在来種とその同種内外来遺伝子型の検出

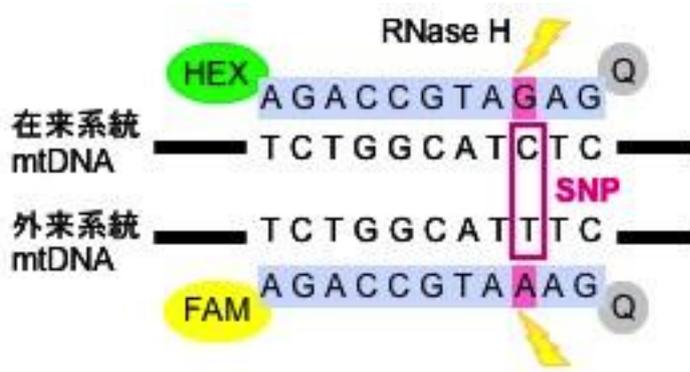
在来種とその同種内外来遺伝子型のモデルとして、日本列島在来のコイ (*Cyprinus carpio*) と、それとは数百万年前に分岐し、現在は人為導入により日本全国の湖沼・河川に広く分布するユー

ロシア大陸系統のコイを用いた。まず、既知のコイのミトコンドリアDNAのD-loop領域の全ハプロタイプの塩基配列情報から、在来遺伝子型と外来遺伝子型間の一塩基多型（SNP）を探索した。在来および外来遺伝子型それぞれについて、SNP部分をRNAとするDNA-RNA-DNAプローブを設計し、これら2種のプローブを異なる蛍光物質で標識した（表(1)-2参照）。プローブ配列を含む領域を増幅する在来および外来遺伝子型に共通のプライマーセットとプローブ2種を同時に使い、RNA分解酵素Hを含んだリアルタイムPCRを行なった（Cleave PCR法）。図(1)-1に示すように、プローブ配列とターゲット配列が完全にマッチすれば、RNA分解酵素によりDNA-RNAハイブリッドのRNA部分が切断され、プローブの蛍光が発せられる。

Cleave PCR法によって、2種のDNA比が正しく定量できるかどうかを確認するため、在来および外来遺伝子型由来のDNAを異なる比率で混合したDNA溶液（DNA比スタンダード）を鋳型としてリアルタイムPCRを行ない、DNA比（外来DNAコピー数／在来DNAコピー数）と ΔC_T 値（ $C_{T\text{在来プローブ}} - C_{T\text{外来プローブ}}$ ）の検量線を作成した。次に、在来遺伝子型と外来遺伝子型を異なるバイオマス比（在来／外来 = 0.1、0.2、0.7、1.7、4.0、9.8）で飼育する水槽実験を行なった。飼育水から抽出した環境DNAをCleave PCR法に供し、定量されたDNA比からバイオマス比を正しく推定できるかを確認した。

表(1)-2

	塩基配列 (5' → 3')	
F-プライマー	TCCACCCTCGGATAAT	
R-プライマー	ACTATGTAAGGATAAGTTGAACTA	
在来遺伝子型プローブ	GAG <u>AT</u> GCCAGA-(HEX標識)	※下線部はSNPかつRNA
外来遺伝子型プローブ	GAA <u>AT</u> GCCAGA-(FAM標識)	※下線部はSNPかつRNA



図(1)-1 Cleave PCR法の原理

4. 結果及び考察

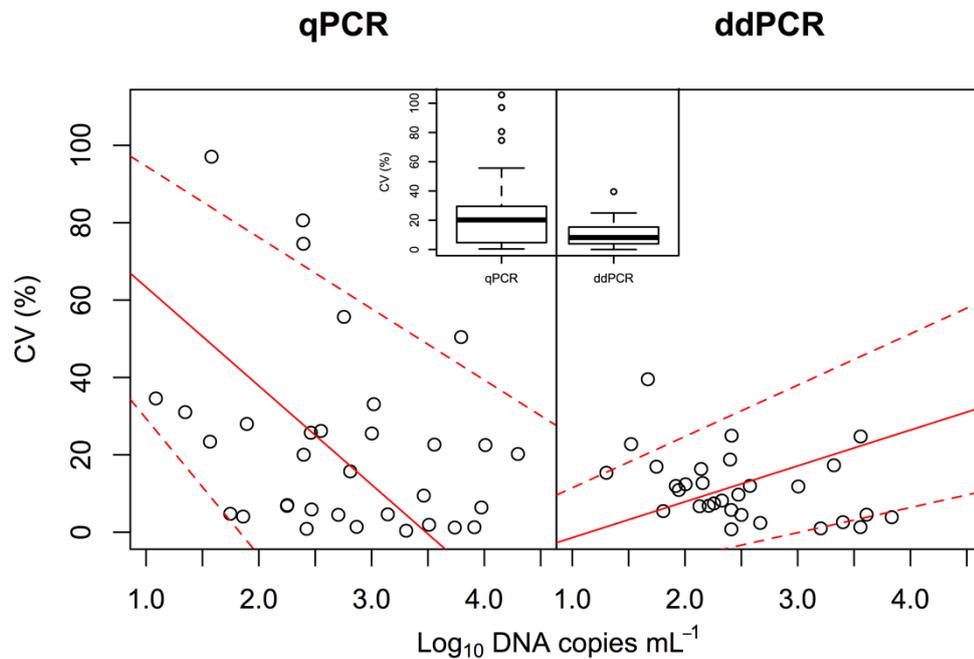
1-1 デジタルPCR、リアルタイムPCRを用いたコイの個体数・バイオマス推定

実験1、2、3日目に採水したサンプルにおいて、リアルタイムPCRとデジタルPCRを用いてコイの環境DNA量を定量した。その結果、まずはデジタルPCRとリアルタイムPCRではほぼ同じような値が測定されることがわかった（ $R^2 = 0.961$ 、 $p < 0.0001$ ）。しかし、測定誤差についてCV値を用い

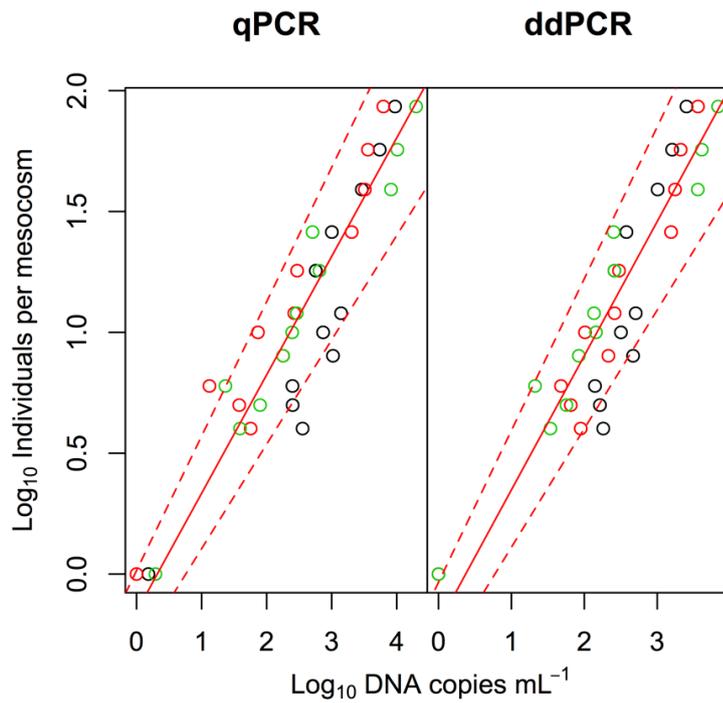
て比較すると、リアルタイムPCR (qPCR)では、デジタルPCR (ddPCR、 digital droplet PCR)に比較して、DNAのコピー数が少ない時に、デジタルPCRよりもばらつきが大きくなることが明らかとなり、デジタルPCRの測定精度が高いことがわかった (図(1)-2)。

リアルタイムPCRとデジタルPCRを用いて定量したコイの環境DNA量と、コイの個体数を比較したところ、有意な強い関係性が見られることが明らかとなった (図(1)-3)。また、その関係性の強さを示す R^2 値はリアルタイム、デジタルPCRそれぞれ0.868と 0.874であり、有意な差異は見られなかった。

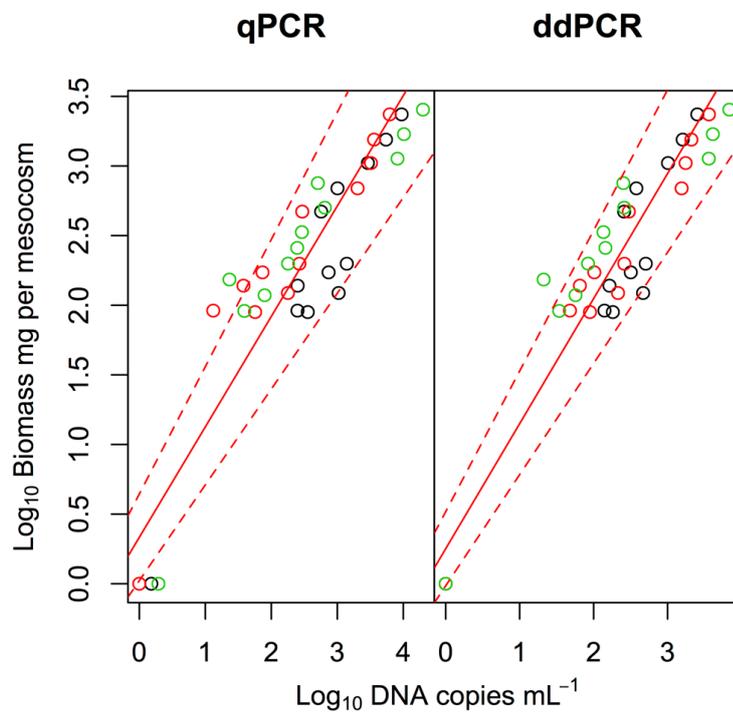
コイの環境DNA量とコイの生物量を比較したところ、有意な強い関係性が見られることが明らかとなった (図(1)-4)。また、その関係性の強さを示す R^2 値はリアルタイム、デジタルPCRそれぞれ0.783と 0.886であり、有意にデジタルPCRにおいて関係性が強いことがわかった。さらに、個体数・生物量との比較において、デジタルPCRではDNAコピー数が少ない時にも、Type II回帰の直線上に値が分布しており、リアルタイムPCRよりも高精度で個体数・生物量推定が可能であることが示唆された。



図(1)-2. リアルタイムPCR (qPCR)、デジタルPCR (ddPCR、 digital droplet PCR)におけるコイの環境DNA(eDNA)量とそのデータのばらつきの関係。赤線は一般線形モデル (GLM) から得られた線形回帰を示し、点線は±95%信頼区間を示す。上部四角中のグラフは、中央値とばらつきを示す。中央値が黒線、四角枠が±25%四分位、バーが±1.5 x 四分位、白丸がはずれ点をそれぞれ示す。



図(1)-3. コイの環境DNA (eDNA) 量と各水槽でのコイ個体数の関係。赤線はType II回帰から得られた線形回帰を示し、点線は±95%信頼区間を示す。黒、赤、緑丸はそれぞれ測定1、2、3日目のデータを示す。



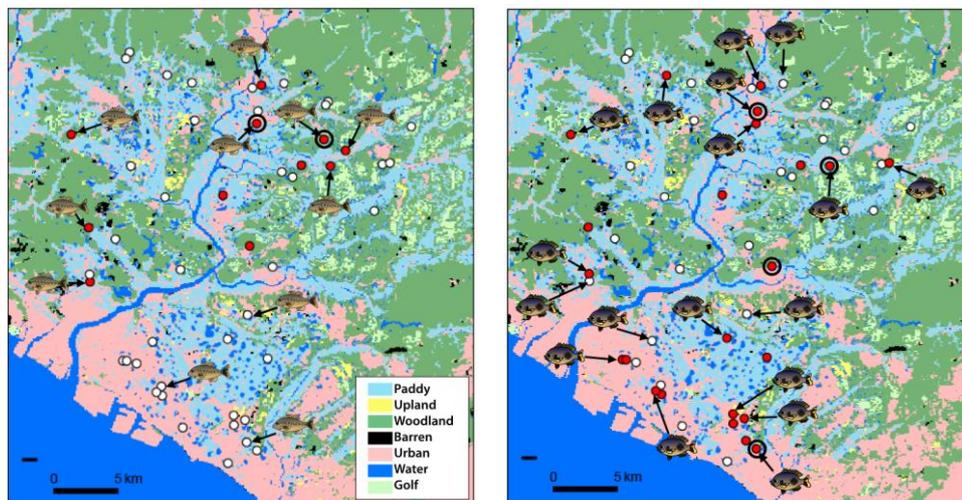
図(1)-4. コイの環境DNA (eDNA) 量と各水槽でコイ生物量の関係。赤線はType II回帰から得られた線形回帰を示し、点線は±95%信頼区間を示す。黒、赤、緑丸はそれぞれ測定1、2、3日目のデータを示す。

1-2 生物量のモニタリングにおける環境DNA技術の有用性の検証

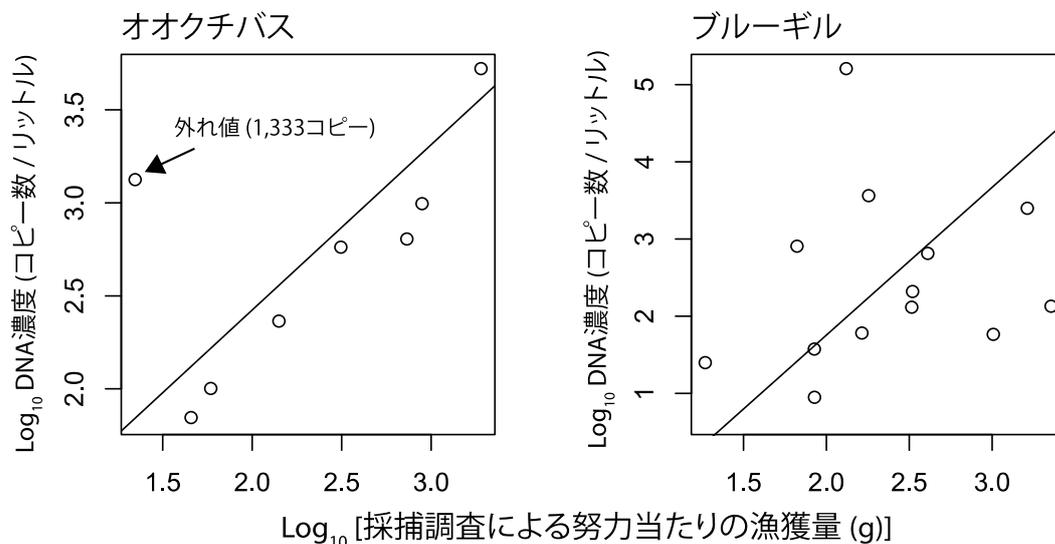
オオクチバスでは、目視調査によって池50面のうち2面で生息が確認され、環境DNA手法では11面でオオクチバスのDNAが検出された（図(1)-5）。さらに、目視調査によって生息確認した2面でDNAも検出された（DNA検出率100%）。ブルーギルでは、目視調査によって50面のうち5面で生息が確認され、環境DNA手法では23面でブルーギルのDNAが検出された。さらに、目視調査によって生息確認した5面すべてでDNAも検出された（100%）。一方、オオクチバスのDNAは、採捕調査による生息確認済みの11面のうち8面でのみDNAが検出され（DNA検出率73%）、ブルーギルのDNAは、採捕調査による生息確認済み18面のうち14面でのみDNAが検出された（78%）。

両魚種の環境中のDNA濃度は、採捕調査による努力当たりの漁獲量（catch-per-unit effort、CPUE）と、正の相関関係をもつ傾向がみられたが、統計的に有意ではなかった（オオクチバス、 $R^2 = 0.37$ 、 $p = 0.11$ ；ブルーギル、 $R^2 = 0.03$ 、 $p = 0.59$ ）（図(1)-6）。しかしながら、オオクチバスの場合、環境中のDNA濃度の外れ値を除外したとき（1,333コピー、図(1)-6 左）、統計的に有意な正の相関関係を示すことがわかった（ $R^2 = 0.93$ 、 $p < 0.001$ ）。

これらの結果から、環境DNA手法は、魚種の違いに関係なく、それらの在・不在をある程度正確に予測できることがわかった。さらに、環境DNA濃度は、とくにオオクチバスの場合、採捕調査よりも正確にバイオマスを推定できることが示唆された。今後は、各魚種の生息密度や池の大きさ、水質（PCR阻害物質の有無等）などとDNA濃度との関係を明らかにすることで、環境DNAを用いた生物量のモニタリング手法の更なる精度向上が期待できる。



図(1)-5. 左図はオオクチバス、右図はブルーギルのため池50面における調査結果を示す。赤丸は対象種のDNAが検出された池、白丸は検出されなかった池を示す。黒い太線で囲まれた池は各魚種が目視確認された池、ポンチ絵は各魚種が採捕調査によって捕獲された池を示す。

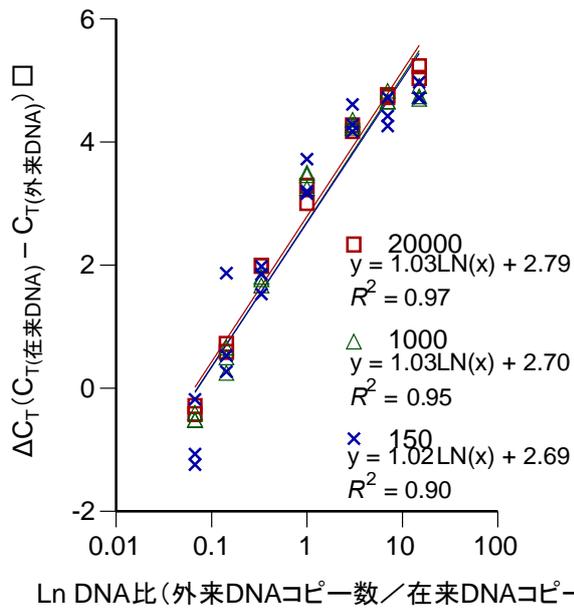


図(1)-6. 各魚種の環境中のDNA濃度 (eDNA) と採捕調査による努力当たりの漁獲量

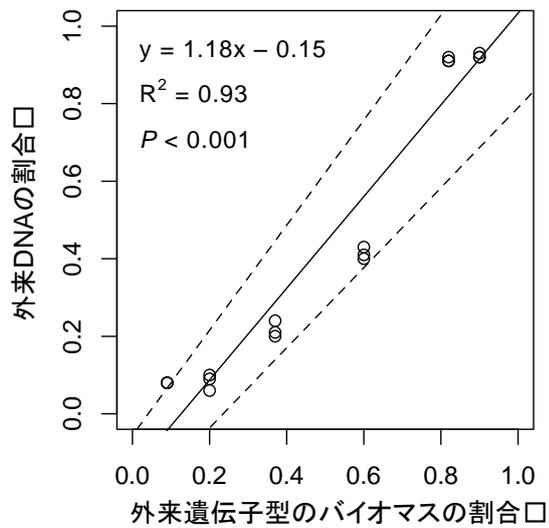
(catch-per-unit effort、CPUE) との関係を示す (オオクチバス、 $R^2 = 0.37$ 、 $p = 0.11$; ブルーギル、 $R^2 = 0.03$ 、 $p = 0.59$)。

1-3 Cycleave PCR法による在来種とその同種内外来遺伝子型の検出

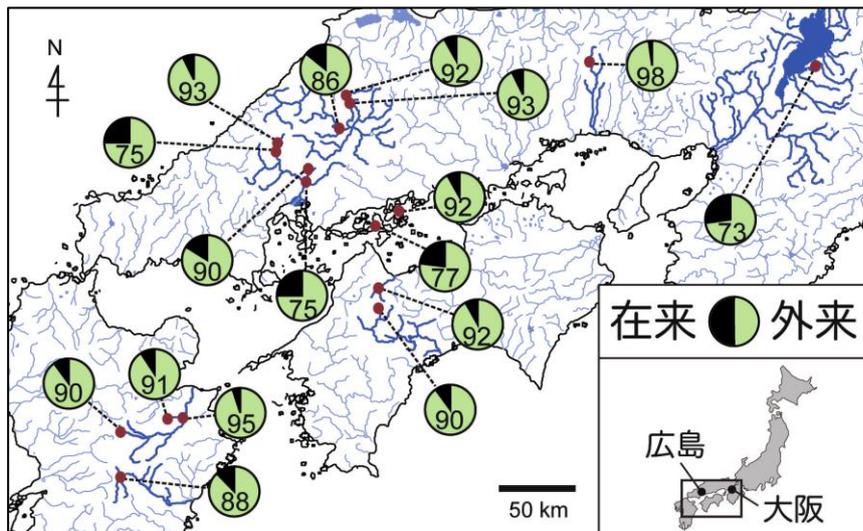
鋳型DNA量が150、1000、20000 (コピー/反応) のどの場合も、Cycleave PCR法により得られたDNA比と ΔC_T の検量線は、外来/在来DNA比が0.07から15の範囲で直線性を示すと同時に、異なる鋳型DNA量の間でも検量線はほぼ同一であった (図(1)-7)¹⁾。つまり、Cycleave PCR法は、鋳型DNA量に関わらず、在来または外来遺伝子型どちらかのDNAが約6%以上存在すれば、DNA比を正確に定量できることが分かった。次に、在来遺伝子型と外来遺伝子型を持つコイを異なるバイオマス比で飼育した6つの水槽水から得られた環境DNA試料中のDNA比をCycleave PCRによって定量した。6水槽について、環境DNA試料より定量された外来DNAの割合と、実際に測定した外来遺伝子型のバイオマスの割合の関係を図(1)-8に示す。両者の間には傾きがほぼ1の強い正の相関が検出された。つまり、外来DNAの割合は外来遺伝子型バイオマスの割合と1:1の関係を持っていた。したがって、本研究で開発したCycleave PCRを用いた環境DNA手法を用いれば、外来遺伝子型のバイオマス割合、つまり外来遺伝子型の侵入レベルを推定できることが示唆された。そこで、西日本の23地点の水域に本手法を適用し、コイ地域個体群における外来遺伝子型の侵入レベルの推定を行った。17水域において外来/在来DNA比の定量値が得られ、その結果、西日本において大きく外来遺伝子型の侵入が進んでいることが明らかとなった (図(1)-9)。



図(1)-7. Cycleave PCRより得られたDNA比と ΔC_T の検量線



図(1)-8. バイオマスの割合とDNAの割合の関係



図(1)-9. 西日本の河川および貯水池において推定された在来および外来遺伝子型の割合。円グラフ中の数字は外来遺伝子型の割合（％）。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究開発により得られた成果の重要な科学的意義として、以下の2点が挙げられる。まず、1) これまでに実験生態系を用いた高原ら¹⁾や他の研究で明らかになった、環境DNAと魚のバイオマスや個体数の関係について、比較的面積が大きく、自然環境に近い池全体でもある程度定量できること、さらには河川などの流水系でも推計できる可能性が示された。2) 同種内外来種などの種内の遺伝子型間の違いを環境DNAから判別し、その割合を定量できる可能性が示された。

(2) 環境政策への貢献

これら本研究開発により得られた環境DNA技術については、すでに様々な省庁や自治体、環境コンサルタント会社から問い合わせを受けており、すでにいくつかとは共同で研究や実地での応用を開始している。また、本研究開発のゴールであったマニュアル化については日本生態学会雑誌の特集号にて環境DNA手法に関する詳細な総説が出版される予定である（受理決定）。さらに、アドバイザーボード会合において、PO、アドバイザーと意見交換を行い、今後環境政策に活かすためにどのように研究に取り組んでいけばよいか、アドバイスを頂いた。今後、環境省においても環境DNAを使った外来種モニタリングなどを検討したく、今後の本委託業務の成果を期待しているとの感想を得た。

<行政が既に活用した成果>

河川やダム湖の生物群集の把握のために、すでに国土交通省の外郭団体であるダム水源地整備センターにおいて、同環境DNA技術を利用した評価方法の検討のために、同センター設置の氾濫原研究会において検討のための調査・実験を依頼されている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

水域生態系に生息する、魚類をはじめとした様々な種類について、環境DNAによりその生息場所や生息量を評価できることから、迅速かつ簡便な生息分布調査やモニタリングのために利用されることが見込まれる。さらに判別が難しい同種内外来種などの遺伝型が異なる種や集団についても適用可能であり、新たな生物分布調査方法として非常に有効であると見込まれる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) T. TAKAHARA, T. MINAMOTO and H. DOI (2015) “Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*).” *Biological Conservations* 183, 64-69
- 2) H. DOI, K. UCHII, T. TAKAHARA, S. MATSUHASHI, H. YAMANAKA, T. MINAMOTO (2015) “Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys” *PLOS ONE* 10:e0122763
- 3) H. DOI, T. TAKAHARA, T. MINAMOTO, S. MATSUHASHI, K. UCHII, and H. YAMANAKA (2015) “Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species.” *Environmental Science & Technology* 49:5601-5608.

<査読付論文に準ずる成果発表>

- 1) 高原輝彦、源利文、土居秀幸 (2014)：身近な水の環境科学（測定編）－調査・実習から環境教育まで－、朝倉書店 「水を調べるだけで生き物がわかる！～環境中のDNAを利用した生物分布モニタリング法～」

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 高原輝彦、源利文、土居秀幸、満尾世志人、角田裕志、木塚俊和、高村典子：「ため池の生物多様性の保全」にかかる研究成果報告会～兵庫県東・北播磨のため池に棲む生きものと人の関わり～（2013）「水を調べるだけで魚がわかる!？」
- 2) T. Takahara, T. Minamoto, H. Doi : 26th International Congress for Conservation Biology, Baltimore, USA, 2013 “Using environmental DNA to estimate the distributions and

biomass of fish”

- 3) 内井喜美子、土居秀幸、源利文、山中裕樹：日本陸水学会第78回大会（2013）「環境DNAを利用した同種内外来種の迅速把握」
- 4) 高原輝彦、源利文、土居秀幸、木塚俊和、満尾世志人、角田裕志、高村典子：第61回日本生態学会（2014）「オオクチバス等の外来魚モニタリングにおける環境DNA技術の有用性の検証－調査手法の違いによる結果の比較を通して－」
- 5) 内井喜美子、土居秀幸、源利文、山中裕樹：第61回日本生態学会（2014）「同種内外来種の侵入規模の迅速把握」
- 6) 土居秀幸、高原輝彦、源利文：第61回日本生態学会（2014）「環境DNAとフェノロジー：現状と未来」
- 7) H. Doi, T. Takahara, T. Minamoto：Evolutionary Community Ecology symposium, Kyoto, Japan, (2014) “Community ecology using environmental DNA “

（3）出願特許

特に記載すべき事項はない。

（4）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 高原輝彦：サイエンス・カフェひょうご in 加古川（2014）
「水を調べて生きものを調査する～環境中のDNAを利用した生物のモニタリング法～」

（5）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞（2015年4月30日、大阪版、科学面）

（6）その他

- 1) 第16回日本陸水学会吉村賞（土居秀幸 受賞 2014年9月13日）

8. 引用文献

- 1) K. Uchii, H. Doi, and T. Minamoto (2016) A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources* 16:415-422.

(2) 核DNA、シーケンスによる環境DNA手法の確立

神戸大学

源利文

平成25～27年度累計予算額：5,014千円（うち平成27年度：1,014千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

大型生物の環境DNA分析はその手法が初めて報告されてからまだ10年も経ていない新しい技術であるが、めざましい進歩を遂げている。本研究では、これまでミトコンドリアDNAに限定されていた遺伝子マーカーを核DNAに広げることが試みた。モデルとしてコイを用い、組織等に由来する細胞あたりコピー数の比較を行ったところ、脳、エラ、腸内容物に由来するコイのDNAサンプルいずれにおいても、核rDNAのITS1領域のコピー数がミトコンドリアチトクロームb (CytB) 領域のコピー数よりも約20-100倍多いことが明らかになった。その結果と対応するように、環境DNAサンプルにおいてもITS1領域がCytB領域よりも100倍以上多く、環境DNA分析の検出感度の向上に利用可能であることが示された。同時に行ったITS領域のシーケンス情報の取得においては、13魚種についてITS1領域の塩基配列の全部または一部を、12魚種についてITS2領域の塩基配列の全部または一部の配列を得ることができた。また、野外での実践例の少ない環境DNA分析手法の応用可能性を確認するため、野外での環境DNA検出調査も行った。その結果、兵庫県下において30箇所の生息地が知られるのみであったカワバタモロコの生息地を新たに6箇所発見することに成功し、環境DNA分析によって希少種の新規生息地を探索することが可能であることが示された。環境省レッドリストで絶滅危惧Ⅱ類 (VU) に指定されているオオサンショウウオを対象とした河川における調査では、桂川水系全域 (約1,000km²) におけるオオサンショウウオの分布域を、合計8日間の野外調査で推定することに成功し、調査が困難な希少種の分布域を迅速に把握することができることが明らかになった。また、マルチプレックスPCR法による多種の同時検出にも成功し、調査の一層のコストダウンが可能であることが示された。これらの成果は広域における希少種や外来種の分布を、これまでの捕獲をとまなう調査より低コストで明らかにする手法として有用であり、種々の対象に対して応用が可能である。

[キーワード]

環境DNA、生物モニタリング、魚類、生物量、ため池、河川

1. はじめに

生物種の保護・管理をする上で最も基本的な情報として、生物の生息分布や個体数、生物量を知るための新たな手法として、環境DNAによる生物分布モニタリング手法が用いられ始めている。大型生物を対象とした環境DNA手法は近年急速に発展してきたが、いずれの研究もミトコンドリアDNAをターゲットとしている。ミトコンドリアDNAはコピー数が多いために検出上の利点があるが、一方で母系遺伝であることや、種内変異レベルの解像度を有していないことなどの欠点がある。

このため、交雑種の判定や種内の集団遺伝学的な解析には用いることができず、ミトコンドリアDNAを対象としなければならないということが、環境DNA手法を発展させる上でのひとつの束縛となっている。そのため、核DNAを対象とした検出法の開発が必要である。また、環境DNA手法は未だ発展途上であり、野外への適用例が十分ではなく、河川、ため池などの野外水域において希少種の保全に資することを示すための実践的研究も求められている。さらに、これまでの環境DNA手法は一度の解析で一種のデータを得られるにとどまっており、複数種を対象にするためには種の数だけ実験を繰り返す必要があった。生物分布の調査をより簡便にするためには、複数種の同時検出系が必要である。そこで、本研究においては以下の5項目を実施した。

2-1. コイを対象とした核DNAの検出および定量

2-2. 核DNAのシーケンス情報の収集

2-3. 環境DNA手法を利用した希少魚種カワバタモロコの検出法の開発および新規生息地の探索

2-4. 環境DNA手法を利用したオオサンショウウオ属在来種および外来種の同時検出法の開発および野外適用

2-5. マルチプレックスPCRを用いた野外のため池における在来種と外来種の分布域マッピング

2. 研究開発目的

2-1. コイを対象とした核DNAの検出および定量

これまでの大型生物の環境DNA分析ではミトコンドリアDNAが用いられ、核DNAをマーカーとした研究例はほとんどない。ミトコンドリアDNAはコピー数が多いために検出上有利だが、一方で母系遺伝であることや、種内変異レベルの解像度を有していないことなどの欠点がある。また、ミトコンドリアは生物の生理状態などによってその細胞あたりの数が変化することが知られており、環境DNAの量からバイオマスを推定する場合に推定精度に影響する可能性がある。そこで、これまでに環境DNA検出の研究が進んでいるコイ (*Cyprinus carpio*) をモデルとし、環境DNAサンプルから核DNAを検出・定量する系を開発し、ミトコンドリアをマーカーとした場合と比較することを目的とした。

2-2. 核DNAのシーケンス情報の収集

魚類に関して、核DNAのシーケンス情報はこれまで積極的に収集されてこなかった。特に、本研究で対象とした核rDNAのITS領域の情報はシーケンスデータベース上にもほとんど収録されていない。そこで、琵琶湖淀川水系の魚類を中心に、核rDNAのITS領域のデータを収集することを目的とした。

2-3. 環境DNA手法を利用した希少魚種カワバタモロコの検出法の開発および新規生息地の探索

環境DNA手法は希少種などの探索に有用であると考えられてきたが、実際に野外で希少種の探索に用いられた例はなく、実践例が必要であった。本項目では、環境省レッドリストの絶滅危惧IB類に指定されるコイ科のカワバタモロコ (*Hemigrammocyppris rasborella*) を対象として、野外での分布調査および新規生息地の探索を目的とした。

2-4. 環境DNA手法を利用したオオサンショウウオ属在来種および外来種の同時検出法の開発および野外適用

上述の2-3と同様に、河川における希少種探索の実践例を示すことを目的として、環境省レッドリストで絶滅危惧Ⅱ類（VU）に指定されているオオサンショウウオ（*Andrias japonicus*）およびそれに近縁な外来種であるチュウゴクオオサンショウウオ（*Andrias davidianus*）の分布域を明らかにすることを目的とした。

2-5. マルチプレックスPCRを用いた野外のため池における在来種と外来種の分布域マッピング

これまでの環境DNA手法では、主に一回の実験で一種の検出にとどまっていた。複数種を探索する場合には複数回のPCR実験を繰り返す必要があり、手間とコストが必要となる。そこで、複数種の検出をより簡便に低コストで行う手法として、マルチプレックスPCRを用いた複数種の同時検出系の開発を行い、野外のため池における在来種および外来種の分布域調査を実践することを目的とした。

3. 研究開発方法

2-1. コイを対象とした核DNAの検出および定量

本項目では、コイを対象として、核DNAを環境DNA手法のマーカースとした検出および定量手法の開発を行った。核DNAのマーカースとしては、核rDNAのITS領域を検出対象の遺伝子とした。rDNAは核内の遺伝子としては例外的に多コピーあるため、検出上の利点があると考えたからである。水槽、野外メソコズム、野外実験池、自然湖沼で採取した環境DNAサンプルを用いて核DNAのコピー数をリアルタイムPCR法によって測定し、ミトコンドリアDNAのコピー数と比較した。また、コイの組織サンプルに由来するDNA（脳組織およびエラの抽出DNAと、環境DNAの供給源として重要と目される腸内容物から抽出したDNA）を対象として、核DNAとミトコンドリアDNAのコピー数を比較した。検出にはコイのITS1領域を特異的に検出するプライマー及びプローブを用い、リアルタイムPCR法によって、それぞれのマーカースのDNAコピー数を測定した。また、核DNAを用いた場合とミトコンドリアDNAを用いた場合のバイオマス推定精度を比較した。

2-2. 核DNAのシーケンス情報の収集

項目2-1の結果から、核rDNAをマーカースとした場合に検出感度が高まることが明らかになったため、その適用対象種を拡大するためにシーケンスデータの整備を行った。琵琶湖淀川水系に生息する在来及び外来の魚種の中から、コイ科の6種とナマズ科の3種に加え、アメリカナマズ科、ドジョウ科、ギギ科、タイワンドジョウ科、カダヤシ科、トゲウオ科、サンフィッシュ科、サケ科、アカザ科からそれぞれ1種を選び、ITS1領域およびITS2領域のシーケンス解析を試みた。また、オオサンショウウオのITS1領域のマスシーケンス解析も行った。

2-3. 環境DNA手法を利用した希少魚種カワバタモロコの検出法の開発および新規生息地の探索

カワバタモロコの在・不在を調査するためには、種特異的な検出系を作成する必要がある。本

研究ではTaqManプローブ法を用いたリアルタイムPCRによる検出系の確立を行った。カワバタモロコと近縁な種と塩基配列を比べるため、コイ目コイ科に属する近縁種5種のミトコンドリアのチトクローム*b* (CytB) 遺伝子の情報を遺伝子データベースから得た。プライマーおよびプローブはPrimer Express 3.0 (Life Technologies社) を用いて、プライマーの3'末端側の5塩基以内の種特異的な塩基数が多くなるようにプライマーを設計した。

設計したカワバタモロコの検出系が正確に機能するかどうかを確認するため、既にカワバタモロコの在・不在が明らかな兵庫県神戸市北区および西区のため池11箇所で、2014年1月に採水調査を行った。ため池の表層水を約2L採水し、ガラスフィルターを用いて吸引濾過をした。ろ過フィルターからDNAを抽出し、設計したリアルタイムPCRによる検出系を用いてカワバタモロコのDNAの有無を確認した。

最後に、2013年10月から2014年1月にかけて、兵庫県下の82箇所のため池で採水調査を行った。採水方法とその後の濾過法、DNA抽出法、リアルタイムPCRによるカワバタモロコの検出法は上述の通りである。

2-4. 環境DNA手法を利用したオオサンショウウオ属在来種および外来種の同時検出法の開発および野外適用

オオサンショウウオおよびチュウゴクオオサンショウウオのミトコンドリアNADH1遺伝子をそれぞれ特異的に検出するプライマー／プローブセットを開発した。それぞれの検出系の特異性を、脱皮殻に由来するDNAおよび京都水族館の飼育水に由来するDNAを用いて確認した。

京都府の桂川水系全域から、2012年9月、12月、2013年3月、6月の4回にわたり4リットルのサンプル水を採取した。採水は、在来種と外来種の交雑が報告されている鴨川流域を含む、京都府の桂川水系37地点で行った。水サンプルからろ過、DNA抽出を行い、リアルタイムPCRによってそれぞれの種の遺伝子の検出実験を行った。

2-5. マルチプレックスPCRを用いた野外のため池における在来種と外来種の分布域マッピング

兵庫県のため池における在来種の代表的なものとして、カワバタモロコ、ミナミメダカ (*Oryzias latipes*)、ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) の3種について、マルチプレックスPCRによる同時検出系を作成した。また、国内で在来魚の生息を脅かすサンフィッシュ科の外来魚3種 (ブルーギル [*Lepomis macrochirus*]、オオクチバス [*Micropterus salmoides*]、コクチバス [*Micropterus dolomieu*]) について、同様にマルチプレックス検出系を作成した。

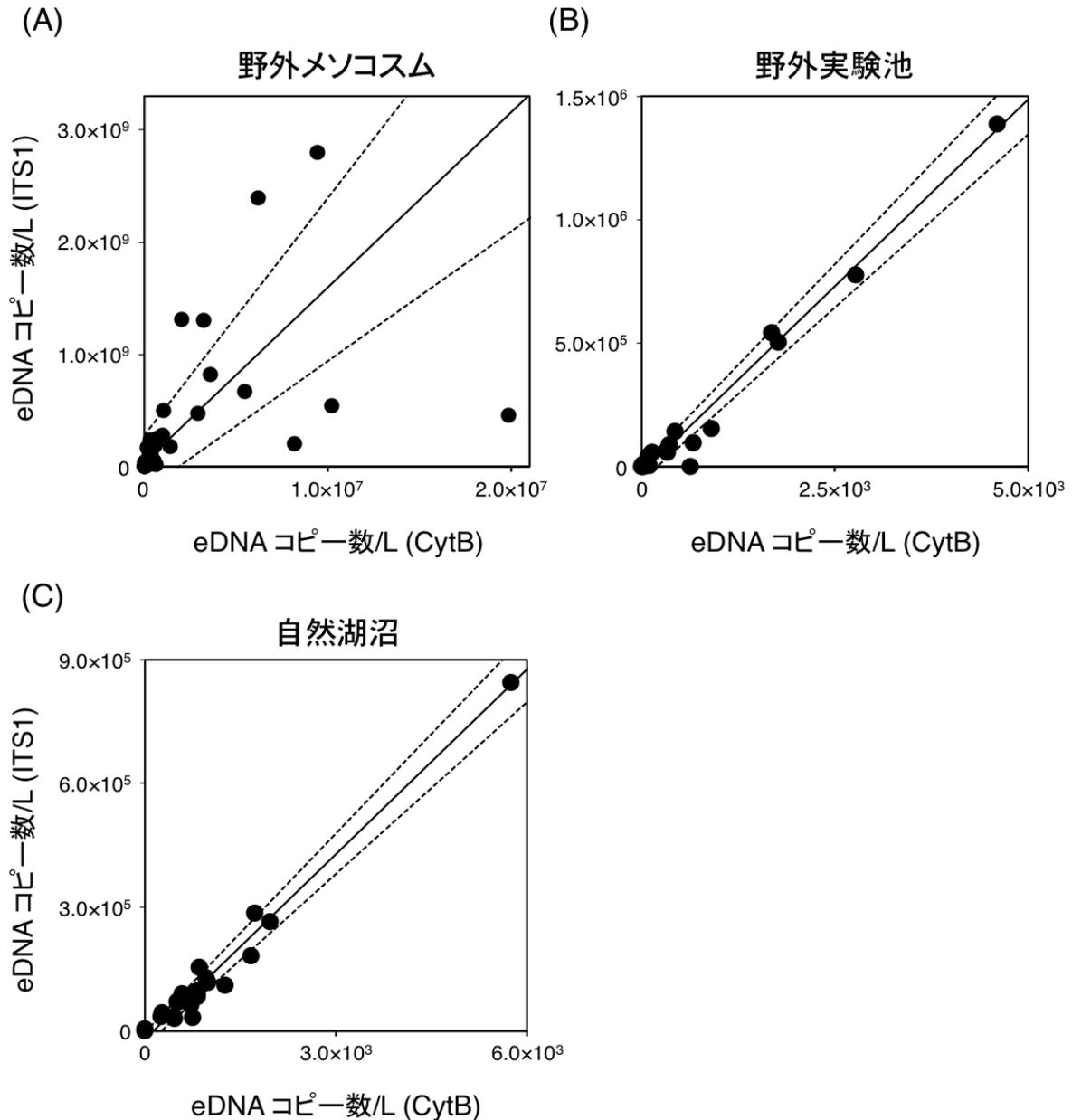
兵庫県下のため池合計101地点で177の水サンプルを得た。うち82地点の82サンプルは2-3で述べたサンプルと同一である。これらの水サンプルから環境DNAを抽出し、在来魚および外来魚を対象としたマルチプレックスPCRによって6種の在／不在を明らかにした。

4. 結果及び考察

2-1. コイを対象とした核DNAの検出および定量

環境DNA手法における核DNAマーカー使用の可能性を検討した結果、野外メソコズム実験では核

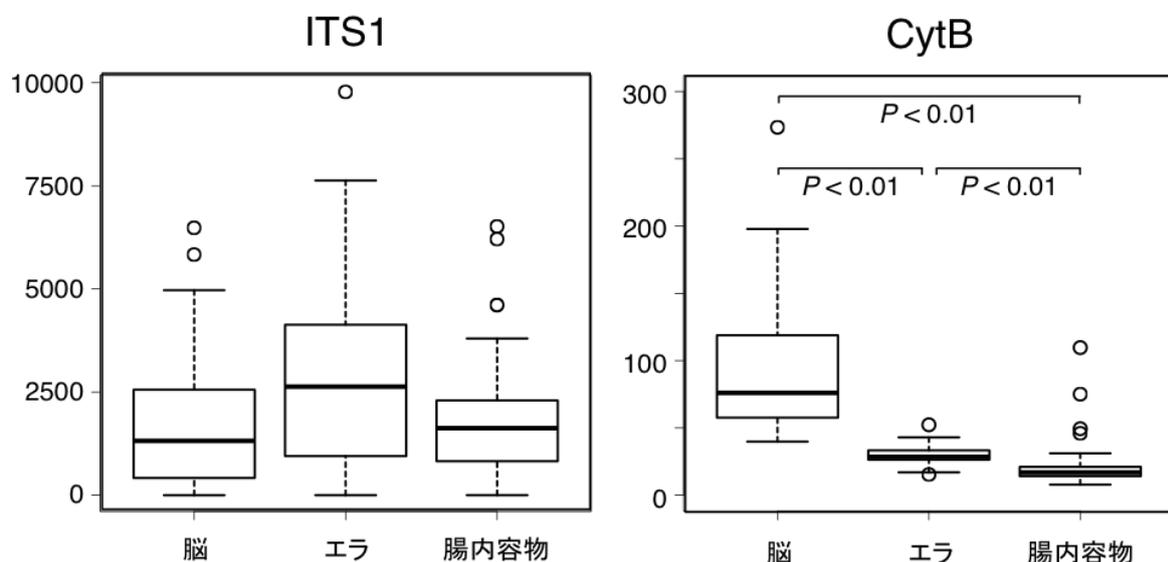
DNAの分子数がミトコンドリアDNAの分子数に対して160倍程度多く検出された。野外実験池と自然湖沼においては核DNAの分子数がミトコンドリアDNAに比べてそれぞれ300倍、150倍程度多く検出された（図(2)-1）。この結果から、核DNAを環境DNAマーカーとして利用することが可能であることが示され、その感度はミトコンドリアDNAをマーカーとした場合に比べて10倍から100倍程度高いことが示唆された。



図(2)-1. ミトコンドリアアトクロームB遺伝子 (CytB) をマーカーとした場合と、核rDNA ITS1領域 (ITS1) をマーカーとした場合の各サンプル中における環境DNAコピー数の関係。それぞれ、(A) 野外メソコスム、(B) 野外実験池、(C) 自然湖沼における結果を示す。どのサンプルにおいてもCytBのコピー数とITS1のコピー数は性の相関を示した（実線：タイプII回帰分析、 $y = 156x + 3.16 \times 10^7$ 、 $R^2 = 0.229$ 、 $P < 0.01$ [野外メソコスム]； $y = 303x - 2.77 \times 10^4$ 、 $R^2 = 0.977$ 、 $P < 0.001$ [野外実験池]； $y = 149x - 2.02 \times 10^4$ 、 $R^2 = 0.972$ 、 $P < 0.001$ [自然湖沼]）。点線は

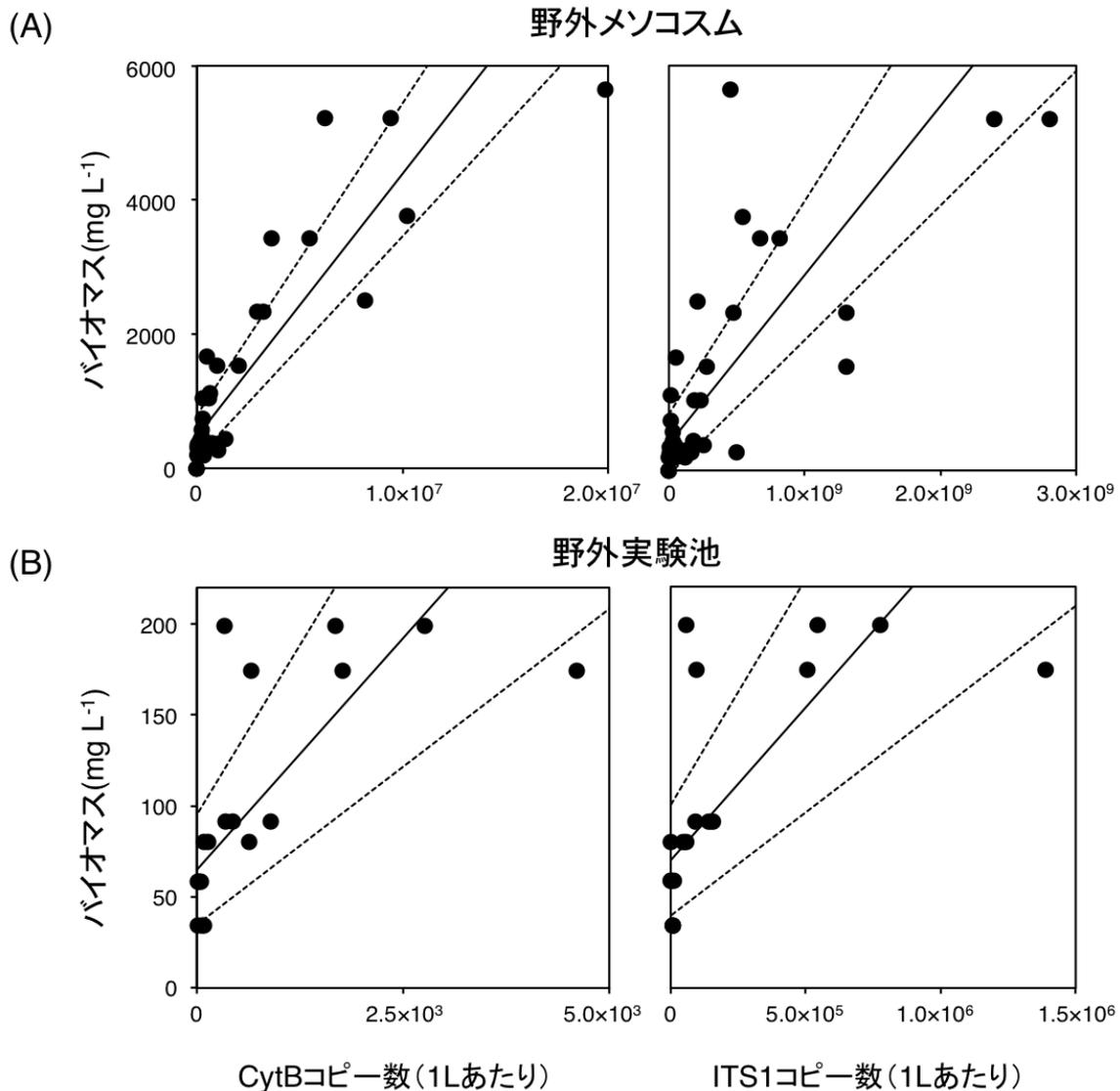
95%信頼区間を示す。

環境DNA手法における核DNAの有用性を確認するためには、核DNAがなぜミトコンドリアDNAより多く検出されるのか、その原因を知る必要がある。そこで、生体内の組織や腸内容物における、チトクロームb遺伝子 (CytB) とリボソームRNA遺伝子ITS1領域 (ITS1) の細胞あたりコピー数を比較した (図(2)-2)。その結果、ITS1のコピー数は組織間で有意差がない一方で、CytBのコピー数は脳>エラ>腸内容物の順であり、組織間で核DNAのコピー数は変動しないが、ミトコンドリアのコピー数は異なるという知見と整合的であった。また、いずれの組織においてもCytBよりコピー数が多く、脳では約18倍、エラでは約96倍、腸内容物では約76倍であった。環境DNAの放出源として有力な表皮細胞や腸内容物においてITS1が環境水中で観察される150倍程度の量比と近いことから、環境DNAサンプル中にITS1が多く検出される原因は、環境DNAの由来となる体細胞内においてITS1のコピー数が多いことにありと結論できた。



図(2)-2. 各組織におけるITS1とCytBの細胞あたりコピー数。いずれの組織においてもITS1がCytBより多かった。また、ITS1は組織間でコピー数に有意な差がなかったが、CytBでは各組織間で有意にコピー数が異なっていた。

最後に、ITS1とCytBのどちらがバイオマス推定精度で優れているのかを比較するために、野外メソコズムおよび野外実験池において行った操作実験で得られたサンプルについて、それぞれのマーカーで推定精度を調べた (図(2)-3)。その結果、どちらの場合も、バイオマスの推定精度はほぼ互角であり、ITS1が有利であるという結果は得られなかった。しかし、上で報告したとおり、検出感度ではITS1が高いため、環境DNAの検出においてもバイオマス推定においてもITS1がマーカーとして有利であると結論できる。



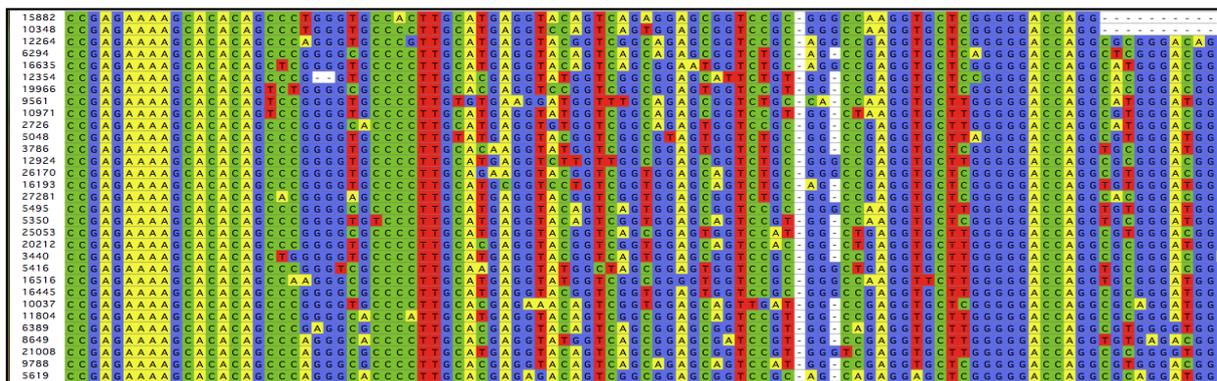
図(2)-3. (A) 野外メソコスムと(B) 野外実験池における、CytBとバイオマス、ITS1とバイオマスの関係。どちらの場合も、バイオマスの推定精度はITS1とCytBで同程度であった。

2-2. 核DNAのシーケンス情報の収集

環境DNA手法における新たなマーカーとして期待される核DNAのrDNA領域において、合計18魚種および両生類のオオサンショウウオについてITS1領域とITS2領域のシーケンス解析を試みた。その結果、13魚種についてITS1領域の塩基配列の全部または一部を、12魚種についてITS2領域の塩基配列の全部または一部を得ることができた。これらのシーケンス情報は核DNAを環境DNA解析のマーカーとして用いるための基礎データとなる。それぞれの領域に関して一部の種についてシーケンス解析が不調に終わったが、これは個体内のITS領域におけるシーケンス多型、とくに挿入/欠失を含む多型の存在が原因であると推定された。特に、オオサンショウウオに関しては波形の重なり等によって、通常のサンガー法によるシーケンスではITS領域のシーケンスはまったく読めなかった。

そこで、オオサンショウウオをモデルとして、次世代シーケンサー (MiSeq) を用いたマスシー

ケンシングによって、ITS1領域の個体内多型の情報を得た。1個体に由来するDNAからITS1領域について約2500本のシーケンスを得、類似度の高い（97%以上）シーケンスをクラスタリングした結果、120種類の代表配列を得た。これらの配列の解析の結果、1個体に由来する配列であるにもかかわらず多数の塩基置換や挿入／欠失が存在していた（図(2)-4）。このことから、生物種によってはrDNAに多型が存在するため、環境DNAのマーカールとして用いるには特に挿入／欠失のある部位を避けたプライマー／プローブ設計が重要であることが明らかになった。この解析で得られたシーケンスを元にオオサンショウウオの核DNAの検出系を作成し、野外サンプルに適用する実験を行った結果、既存のミトコンドリアDNAをマーカールとした手法に比べ、野外での検出感度が高かった。



図(2)-4. オオサンショウウオのITS1領域のマスシーケンス解析の結果（一部抜粋）。1個体に由来するシーケンスの中に多数の塩基置換や挿入／欠失が観察された。

2-3. 環境DNA手法を利用した希少魚種カワバタモロコの検出法の開発および新規生息地の探索

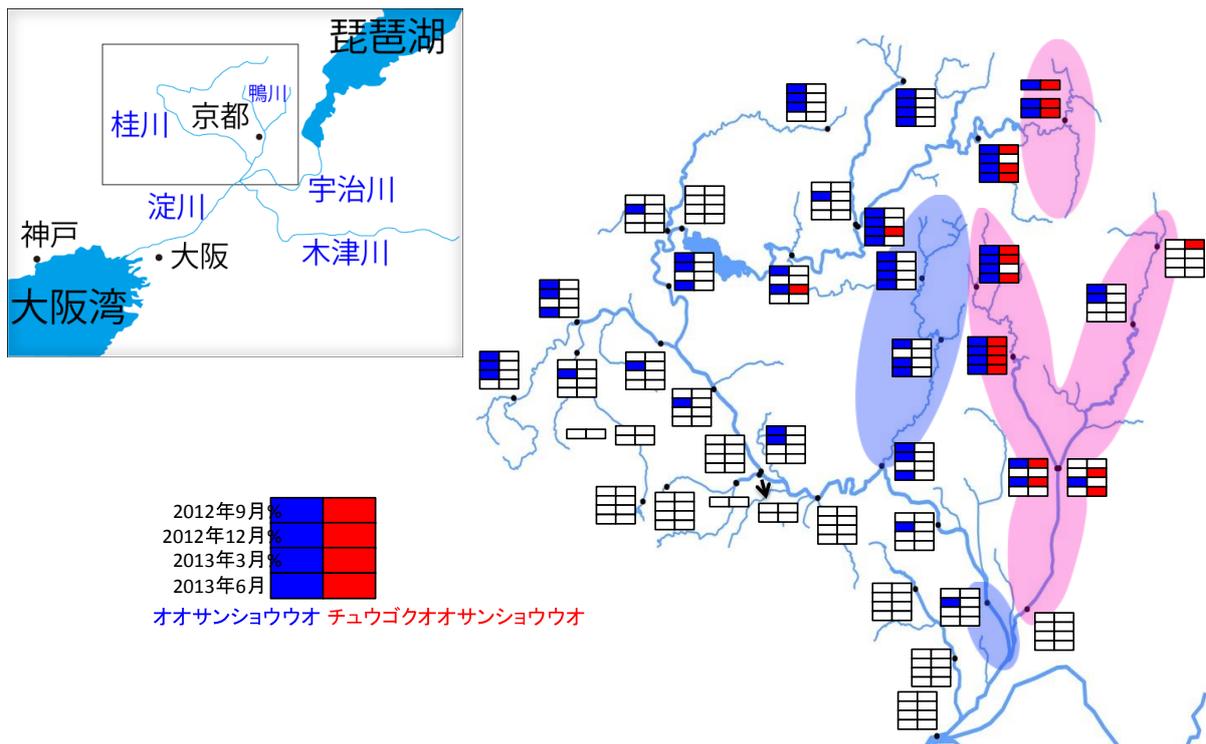
カワバタモロコの筋肉に由来するDNAサンプル、およびビオトープの水サンプルに由来する環境DNAサンプルについて、カワバタモロコのDNAの増幅が確認された。

カワバタモロコの在・不在が既知のため池11箇所の水サンプルを解析した結果、分布が確認されている7箇所からカワバタモロコのDNAを検出し、分布しないと考えられているため池4箇所の水サンプルからはカワバタモロコのDNAは検出されなかった。この結果から、我々の作成した検出系はカワバタモロコの在／不在を正確に判定できるものであることが示唆された。

最後に、兵庫県下のため池82地点で採水を行い、カワバタモロコのDNAを検出する調査を行った結果、7地点のサンプルからカワバタモロコのDNAを検出した。この7地点について、もんどりを用いた捕獲調査を行ったところ、6地点でカワバタモロコが捕獲された。兵庫県下のカワバタモロコ生息地は約30地点といわれており、本調査の結果は環境DNA手法を用いて希少種の生息地を新たに発見することが可能であることを示している。

2-4. 環境DNA手法を利用したオオサンショウウオ属在来種および外来種の同時検出法の開発および野外適用

京都府の桂川水系における在来及び外来オオサンショウウオDNAの検出調査の結果、合計25箇所では在来オオサンショウウオの、9箇所では外来オオサンショウウオ（チュウゴクオオサンショウウオ）のDNAの検出に成功した。両種の検出されたエリアは過去に京都市が行った捕獲調査の結果と良く整合しており、本手法が在来／外来オオサンショウウオに適用可能である事が示された（図(2)-5）。



図(2)-5. 桂川水系における在来／外来オオサンショウウオの環境DNA分布と捕獲調査の比較。37地点で調査を行い、25箇所で在来種の、9箇所で外来種のDNAが検出された。河川のバックグラウンドがピンク色で塗られたエリアは京都市の行った捕獲調査によって在来種、外来種および交雑種が生息することが知られているエリアを、青色で塗られたエリアは捕獲調査で在来種のみが生息することが知られているエリアを示す。環境DNA手法による結果は捕獲調査の結果とよく一致した。Fukumoto et al. (2015)のFigure 3を改変¹⁾。

2-5. マルチプレックスPCRを用いた野外のため池における在来種と外来種の分布域マッピング

兵庫県下のため池合計101地点で得た177サンプルについて、外来魚3種（オオクチバス、コクチバス、ブルーギル）と在来魚3種（カワバタモロコ、ミナミメダカ、ドジョウ）の同時検出系でDNA検出を行った。その結果、101地点中23地点でブルーギルのDNAが、33地点でオオクチバスのDNAが、1地点でコクチバスのDNAが、13地点でカワバタモロコのDNAが、24地点でミナミメダカのDNAが、40地点でドジョウのDNAが検出され、それらの結果をもとに分布地図を作成した（図(2)-6）。これらの検出地点から各種についてそれぞれ8-14地点を選択して、実際に生息しているかを捕獲または目視によって確認したところ、75-95%の地点で実際に生息していることが確認され、環境DNAによる外来魚及び在来希少種の生息地検出が有効であることが示された。



図(2)-6. 兵庫県下のため池における外来魚及び在来魚の分布地図。コクチバスは1地点のみで検出されたため、ここにはプロットしていない。野外のため池であっても環境DNA検出によって複数魚種の分布を描くことが可能であることが示された。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究で見出された魚類の核DNAを環境サンプルから検出することが可能であることや、核rDNAのITS1領域のコピー数がミトコンドリアのCytB領域のコピー数よりも100倍以上多いことはこれまでに知られていなかった事実である。この結果は、環境DNA分析の感度向上やバイオマス推定精度の向上に役立つと考えられる。

本研究で示された希少種の新規分布域を環境DNAを用いて探索する手法は、概念としては提唱されていたものの、実際にそれに成功した事例はこれまで報告されておらず、科学的に重要な成果である。

環境DNAサンプルから、同属の近縁種のDNAを区別して検出する手法や、マルチプレックスPCRを用いた多種DNAの同時検出系もこれまでに報告がなく、環境DNA分析を実用化する上で重要な成果である。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

本研究によるため池や河川での環境DNA検出技術を応用した調査が、環境省中国四国地方環境事務所の「平成27年度希少淡水魚生息域における外来魚等防除のための環境DNA分析技術開発業務」に用いられ、外来魚および希少淡水魚種の環境DNA検出結果が報告された。

<行政が活用することが見込まれる成果>

環境省レッドリストで絶滅危惧Ⅱ類(VU)に指定されているオオサンショウウオや、特定外来生物であるブルーギル、オオクチバス、コクチバスなどのDNA検出技術は、対象種の検出やバ

イオマス推定等に利用可能であり、希少種の保護事業や、外来種の駆除活動などに直接利用可能である。また、技術の応用によって他の生物種にも利用可能であるので、環境調査等の事業に応用されることが見込まれる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) S. FUKUMOTO, A. USHIMARU and T. MINAMOTO (2015) "A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan." *Journal of Applied Ecology* 52 (2) 358-365.
- 2) A. FUJIWARA, S. MATSUHASHI, H. DOI, S. YAMAMOTO, and T. MINAMOTO (2016)
"Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds." *Freshwater Science* in press

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 源利文：医学のあゆみ、医歯薬出版，249、12、1264-1269 (2014)
「環境DNA：エコヘルス研究の新しいツール」
- 2) 岩崎渉・佐藤行人・源利文・山中裕樹・荒木仁志・宮正樹
：実験医学34 (1)、103-107 (2016)
「環境DNA研究のインパクト」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 福本想、丑丸敦史、源利文：日本陸水学会第78回大会 (2013)
「環境DNAを用いた在来および外来オオサンショウウオの検出」
- 2) 源利文：第29回個体群生態学会大会 (2013)
「環境DNAを用いた水中生物モニタリングの現状」
- 3) 源利文：第61回日本生態学会 (2014)
「核DNAをマーカーとした環境DNA解析」
- 4) S. Fukumoto, A. Ushimaru, T. Minamoto: *Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing*, Higashi-Hiroshima, Japan, 2014
"Large-scale environmental DNA assessment for Japanese and Chinese giant salamanders in Katsura River, Japan. "

- 5) 源利文、福岡有紗、高原輝彦、兵庫県立農業高校生物部：日本陸水学会第79回大会（2014）
「環境 DNA 手法の希少生物種調査への応用：兵庫県下のため池におけるカワバタモロコの分布調査」
- 6) T. Minamoto, S. Fukumoto and A. Ushimaru: Joint 2014 Annual Meeting British Ecological Society and Société Française d' Ecologie, Lille, France, (2014)
“A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic and exotic giant salamander species in Japan.”
- 7) 福本想、丑丸敦史、源利文：第62回日本生態学会大会（2015）
「環境DNA分析を用いた希少在来種と近縁外来種の流域スケール調査：京都府桂川のオオサンショウウオを例に」
- 8) 福岡有紗、丑丸敦史、源利文：第62回日本生態学会大会（2015）
「環境DNAとマルチプレックスPCRを用いた複数魚種の同時検出」
- 9) 藤原綾香、松橋彩衣子、土居秀幸、源利文：第62回日本生態学会大会（2015）
「環境DNA手法の新たな展開～沈水植物の検出法の開発～」
- 10) T. Minamoto, S. Fukumoto and A. Ushimaru: 2015 Society of Wetland Scientist Annual Meeting (2015)
“Environmental DNA assessment of rare endemic species and closely related exotic species: a case study of giant salamanders in Japan”
- 11) 源利文、高原輝彦、北吉匠文、辻冨月、山中裕樹、内井喜美子、土居秀幸
：日本陸水学会第80回大会（2015）
「新たな環境DNAマーカーとしての核DNAの利用」

（3）出願特許

特に記載すべき事項はない。

（4）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 源利文：夢・化学21 高校生のための化学講座（浜松）（2013）
「見えない生き物を見つけ出す環境DNA技術」

（5）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 成果の記者発表（2015年2月5日、於兵庫県教育委員会記者クラブ）
- 2) サンテレビジョンニュースポート（2015年2月13日、オオサンショウウオの環境DNA解析の成果について5分ほどインタビューを交えて紹介）
- 3) 朝日新聞（2015年2月14日、全国版、社会面）
- 4) 読売新聞（2015年2月14日、全国版、社会面）
- 5) 産経新聞（2015年2月14日、全国版、社会面）
- 6) 神戸新聞（2015年2月14日、社会面）
- 7) 日本経済新聞ほか共同通信及び時事通信の配信記事を利用している各紙（2015年2月14日）
- 8) 朝日新聞（2015年4月23日、大阪版、科学面）

- 9) NHKニュース7
(2015年5月9日、環境DNA 水を調べて生物を特定する新技術について5分程度の特集)
- 10) 週間エコノミスト (2015年7月21日、サイエンス最前線、p86-87)

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) S. FUKUMOTO, A. USHIMARU and T. MINAMOTO (2015)
“A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan.” *Journal of Applied Ecology* 52 (2) 358-365.

(3) 生物移動分散研究への環境DNAの適用

龍谷大学 山中裕樹

平成25～27年度累計予算額：6,553千円（うち平成27年度：1,814千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本研究では環境DNA分析を河川という流水環境での水棲生物の移動分散研究に応用すべく、その研究実施例を提示するとともに、環境DNA分析の分析精度向上に資する関連の基礎研究も含め、研究項目を3つの区分で設定して調査・実験を行った。3-1では水棲生物から環境水中に放出された環境DNAが時間とともに分解していく過程について、アユの飼育水とアユが生息する河川の水を試料として検討した。飼育水と河川水のどちらにおいても20℃の水温では24時間のうちに90-97%が分解してしまうという結果が得られ、環境中での環境DNA分解は相当に早い速度で進行することが示された。また、河川水を用いた実験では分解速度の温度依存性も検討し、同じく24時間で10℃では58%が分解し、30℃ではほぼ100%が分解してしまうことが明らかとなった。3-2では環境DNAの分析精度（特に定量精度）を向上させる目的で水試料の前処理方法の検討を行った。環境DNAは相当に希薄な濃度で存在しているため効率的に回収することが分析をするうえで重要であるが、同時に、分析試料水の繰り返し間でのばらつきを小さくすることも分析精度を向上させるうえで必要である。通常は0.7 μ mの孔径のグラスファイバーフィルターをもちいて試料水をろ過するが、3 μ mのメンブレンフィルターでプレ濾過することにより、直接グラスファイバーフィルターでろ過する場合よりも変動係数で12%程度ばらつきを抑えられることが明らかになった。また、試料水を1000Gで遠心分離してから上澄みのみを分析することにより、直接分析した場合に比べて48%程度ばらつきが抑えられることも示された。3-3では2つの大規模な河川（淀川および矢作川）で水棲生物の分布調査を実施した。淀川においてはヌートリアを、矢作川ではアユを調査対象として、流程分布とその時間変化を追うことで移動分散を明らかにすることとした。ヌートリアもアユも河川水中から環境DNAを検出することができ、1年間の調査を実施したアユの例では、春先の海からの遡上、産卵期前の中上流から中下流への産卵親魚の降下、産卵後の減耗といった様子を、環境DNA分析でとらえることが出来た。また、ヌートリアにおいてもアユにおいても、流程分布は調査地点ごとで大きく変動しており、上流から流れてきたDNAがずっと下流まで検出され続けるという結果にはならなかった。このことは、環境DNAが流れにともなって拡散する流水環境では、対象生物の実際の分布と環境DNAの分布が対応付けしにくいのではないかと懸念が大きい事を示唆している。本研究では、ブラックボックスが多かった環境DNAの動態について新たな基礎情報を提供すると同時に、流水環境での環境DNA分析による水棲生物の移動分散研究の重要な実施例を提供することができた。河川における生態学的・水産学的な調査研究に環境DNA分析を適用する際の貴重な先行研究例となる。

[キーワード]

環境DNA、生物モニタリング、アユ、ヌートリア、河川、移動分散、分解

1. はじめに

本研究では、流水環境において環境DNA分析による水棲生物の移動分散の追跡を行うという研究事例の提出を主目的とした。また、これに付随する基礎的研究にも取り組んだ。環境DNA分析による水棲生物の分布調査はこれまでも多く実施されてきた。これは対象生物から環境中に放出されたDNAを手掛かりとして対象生物の在不在を推定するというものであるが、多くの先行研究例は実験池やため池などの止水域で実施されてきた。一方で、水の大きな動きによるDNAの移流拡散が想定される流水環境、すなわち河川においては環境DNA分析が生物の分布とその時間変化をとらえることが出来るかは明らかでない。流水環境においては時間経過とともに起こるDNAの分解を考慮すること、そしてそのわずかな差異をとらえるためにはDNAの分析精度自体の向上も必要となる。本研究ではこれらの課題とその関連課題として次の3つの研究項目を実施した。

- 3-1 環境DNAの分解と環境要因の効果について
- 3-2 環境DNAの測定精度向上に向けた試料の前処理について
- 3-3 流水環境における移動分散研究の実例の提示

2. 研究開発目的

本研究では上記1に掲げた研究項目を実施した。環境DNAは様々な環境要因の効果を受けて時間的に分解することが知られているが、まだまだ未解明な部分が多い。3-1では最も単純な、水槽水中での経時的分解を追い、また、先行研究例が非常に少ない河川水中での分解速度を明らかにすることを主目的とした。また、補足的に紫外線による分解の効果も明らかにした。3-2では環境DNAの測定精度（定量精度）を向上させることを目的として、環境DNAを含む水試料の前処理方法を検討した。環境DNAは裸の分子の状態では環境中に存在しているのではなく、多くが細胞や細胞小器官に含まれた状態で浮遊していると考えられている。これは、採水時に誤って大きな断片を拾ってしまうことによるデータの大きなばらつきを生じさせる原因になる。本研究項目では試料水を目合いの大きいフィルターでプレ濾過をすることでより大きなばらつきを生みうる断片を除外する手法、そして、遠心分離によって大きな断片を除去するという手法を試した。3-3では長野から愛知まで流れる矢作川と、琵琶湖から大阪湾に至る淀川で水棲生物の検出を実際に行い、環境DNA分析による流水環境での研究事例を示すとともに、流水ならではの問題である、「採取した環境DNAは採水地点ではなく他から流れてきたものではないのか？」という疑問に答えるようなデータの解釈方法を検討することを目的とした。

3. 研究開発方法

3-1 環境DNAの分解と環境要因の効果について

これまでに実施されてきた研究においても、環境DNA技術を生物の分布の推定に利用しようという試みがなされてきた。しかし、それらの多くは個々の地点で対象種のDNAが有るか無いかを単純に検討したもの、もしくは直接採集等、他の手法によって確認した「種の在不在」との比較から

「環境DNAの有無による種の分布推定」が確からしいかどうかを検討するなど、対象種からの環境水中へのDNA放出に始まる、検出までの一連のプロセスについては完全なブラックボックスのままとなっている。つまり、環境DNAによる種の存在判定の時空間的な解像度等については全く明らかにされていない。本研究項目では、流水環境である河川において種の移動分散を追跡可能な手法を検討することを目標としている。移動分散という動的な現象を追跡するためにはやはり、手付かずとなっている「環境DNA」の放出から消失までのプロセスを明らかにし、時間的な解像度を詳細に捉えた上でそれを考慮した推定手法を開発せねばならない。本研究では、日本の河川において主要な水産対象種となっているアユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) を用いて、放出後のDNAがどのような速度で分解するのかについて飼育条件下での基礎的研究を行った。また、環境DNAの野外環境水中での分解については滋賀県の野洲川で採取した水を用いて実験を行った。4Lタンク12本分の採水を行い、実験室に氷冷状態で持ち帰ったのち、10℃、20℃、30℃の各温度で48時間インキュベートした。0、1、3、6、12、24、48時間経過ごとに各温度の水を採取して500mLずつ濾過を行い、上述の野外調査と同じ手法でアユの環境DNAの検出・定量を行った。さらに、野外においては大きく効果を持つであろうと推測される紫外線が環境DNAの分解に与える効果を予備的に検討した。

3-2 環境DNAの測定精度向上に向けた試料の前処理について

水中での環境DNAの動態解明のために重要なDNA定量精度の向上に向けた水試料の処理方法についての検討を行った。環境DNAは極薄い濃度で環境水中に含まれており、同じ試料水であっても採水の繰り返しの間で大きくDNA濃度推定値にばらつきが生じることが経験的に知られている。これはしばしばDNA定量精度に看過しがたい大きさの変動を生じさせるため、このバラつきを抑制するための水試料の前処理方法を検討した。まず、実験Ⅰとして、ばらつきの原因と考えられる細胞の大きな塊等のDNAを多く含む断片を除去することで定量精度を向上させる為、採水したサンプルを一旦メッシュサイズが粗いフィルターで濾過し体積が大きい断片を除去するプレ濾過手法を検討した。実験試料は、ガラス水槽(60×30×36(水量 57 L))、水温 26℃、明暗周期 12 時間の条件下で、絶食させた 100 匹のゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)を飼育した水槽水を用いた。水槽水をボトルに 12 L 採水した。採水した試料を 1 サンプルにつき 300 mLを 攪拌しながらメッシュサイズ 3.0 μm (TSTP04700) , 10 μm (NY1004700) , 30 μm (NY3004700) , 60 μm (NY1004700) のナイロンフィルター (MILLIPORE Nylon Net Filters) でそれぞれ濾過し、濾液を GF/F フィルター (1825-047, GE, Healthcare, Buckinghamshire, UK) で濾過した。各設定、繰り返し数 6 とした。その後 GF/F フィルターから DNA 抽出を行ってリアルタイムPCRでDNA濃度の定量を行った。次に、実験Ⅱとして、ばらつきの原因と考えられる細胞の大きな塊等のDNAを多く含む断片を除去することで定量精度を向上させる為、採水したサンプルを遠心分離し、比重の大きいDNAを含む断片を除去する手法を検討した。実験試料は、ガラス水槽(60×30×36 cm(水量 57 L))、水温 20℃、明暗周期 12 時間の条件下で、絶食させた 6 匹のコイ(*Cyprinus carpio*)を飼育した水槽水を用いた。水槽水をボトルに 800 mL 採水した。採水したボトルを攪拌し、30 mL ずつ 50 mL 遠沈管に分注した。遠沈管を 4 種類の異なる遠心力 (1000 × g, 2000 × g, 4000 × g, 8000 × g) でそれぞれ 1 分間遠心分離した。その後、静かに上清 15mL を回収し、エタノール沈殿法による DNA 抽出を行った。各設定、繰り返し数 4 とした。抽出したDNA試料をリアルタイ

ムPCRによりDNA濃度の定量を行った。

3-3 流水環境における移動分散研究の実例の提示

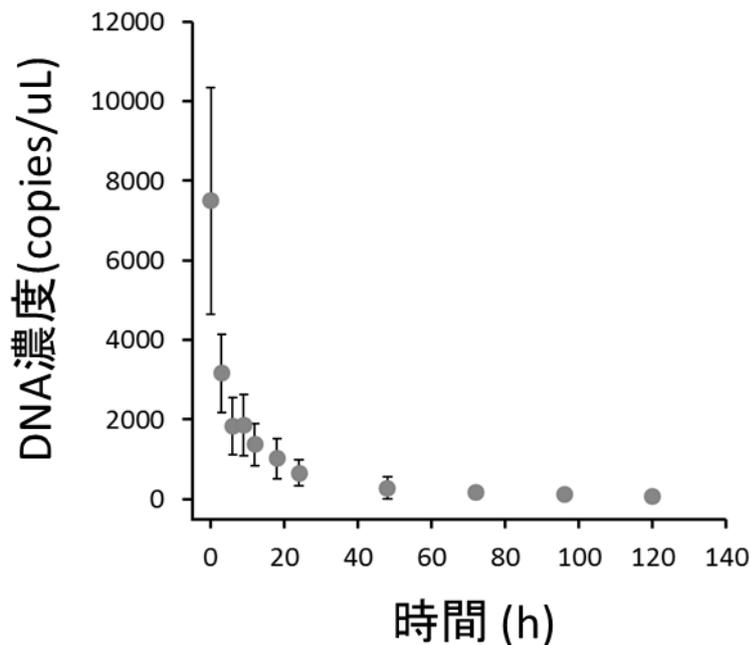
空間的な解像度についての知見を得るべく、大阪湾から琵琶湖に至る淀川本流およびその代表的支流である桂川水系で高密度なサンプリングを行い、現在同水系で分布の拡大が懸念されている水辺に済む特定外来生物のヌートリア (*Myocastor coypus*) の分布推定を実施した。また、このデータを用いて、DNAの有無だけでなく、その量を考慮に入れてより妥当な「在不在」を検討するためのデータ解析方法を提案した。これら2つの方向性(時間、空間)から環境DNA分析による「種の移動分散」把握手法の「感度」について検討し、野外適用への基盤確立を図った。

さらに広範囲、かつ、長期的な調査例を提示すべく、愛知県の矢作川でアユを対象として調査を実施した。長野県に水源を持ち、三河湾に流れ込む当該河川に3-4 kmごとの採水地点を29地点設定して毎月1回、1年間アユの環境DNAの検出・定量を行った。矢作川のアユは豊田市に位置する豊田市矢作川研究所によってアユの遡上量および放流量の把握がなされており、環境DNAで魚の移動を追う本研究にとっては最適な対象地である。毎月の調査では1Lの河川水を採取するとともに水温(°C)、pH、電気伝導度(mS/cm)を測定した。水試料は現場で濾過作業をし、実験室でDNA抽出、そして種特異的プライマーを用いたリアルタイムPCRによる検出・定量を行った。また、陽性反応が得られたPCR産物について、これらのうち濃度が極端に低いと考えられるものは産物のダイレクトシーケンスを実施し、アユ以外の生物種のDNAを誤って増幅した疑陽性ではないことの確認を行った。

4. 結果及び考察

3-1 環境DNAの分解と環境要因の効果について

アユ(湿重量 82.9 ± 7.2 g)を1個体ずつ水槽(25 L)で飼育し、5日間の馴致後アユを取り出した。その後の飼育水中DNAの濃度(コピー数:環境水からの注出DNA溶液1 μ Lあたり)をリアルタイムPCRによる定量測定(分析対象遺伝子領域:チトクロームb)でモニタリングした。結果、DNAの濃度は指数関数的に減少し(図(3)-1)、24時間で $90 \pm 4.6\%$ 程度が分解すると推定された。既存の研究において、ヨーロッパヌマガレイ (*Platichthys flesus*) とイトヨ (*Gasterosteus aculeatus*) では、それぞれ約68%と30%のDNAが24時間で分解すると報告されており、これらの値と比較すると、アユから放出されるDNAの分解は格段に速いと考えられる。



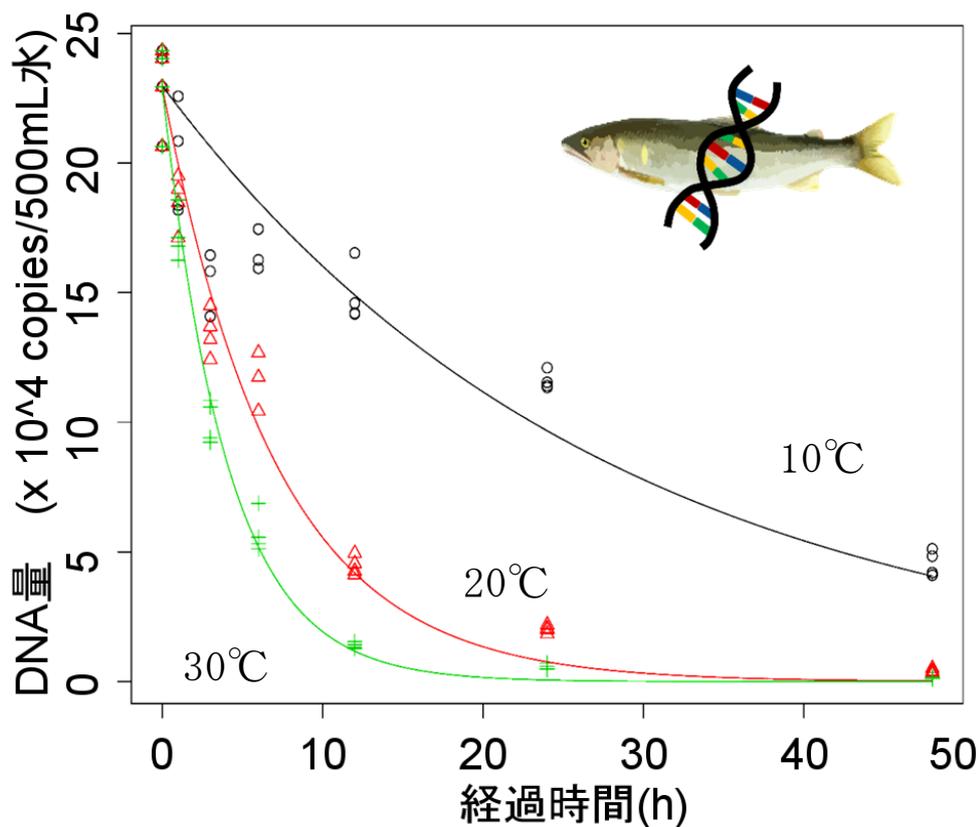
図(3)-1. アユを水槽から取り出した後の時間経過に伴う、DNA濃度の減少を示す。取り出し直後から急激に減少し、1日当たり90%程度が分解すると考えられた。

次に、滋賀県野洲川の河川水を用いたアユ環境DNAの分解実験について述べる。10℃、20℃、30℃でそれぞれアユDNAの分解について時間依存性を調べたところ、いずれの温度でも指数関数的な減少を示した(図(3)-2)。経過時間と水温を説明変数として次のモデル式で回帰することができた。

アユDNAコピー数/500mL水 =

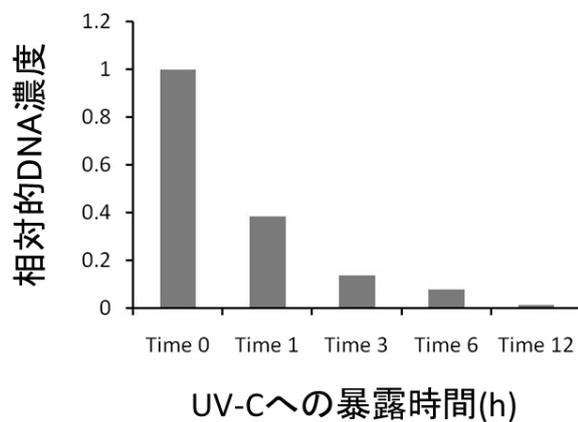
$$229901.2329 * \exp \left(- \left(-0.069755 + 0.010582 * \text{水温}(\text{℃}) \right) * \text{時間}(\text{h}) \right)$$

同じくアユを用いた水槽実験では水温を20℃でのみ実施し、結果として24時間で90%の減少率であった。今回の結果では同様の条件で約97%の減少率となり、ほぼ同様の結果が得られた。ただし、今回の実験では水温の効果も明らかになり、それによると水温間で結果に大きな差があった。特に10℃とその他の温度での結果の差が顕著であり、同じく24時間後の減少率をみると10℃では約58%であったのに対し、20℃で約97%、30℃ではほぼ100%であった。この結果に基づいて考えると、特に暖かい季節には地点間でのDNAの流下に伴う解析結果の空間解像度の低下は起こりにくいであろうと言える。過去の研究では流量が早い河川では下流にも上流のDNAと変わらない量のDNAが流れ、流れが遅い河川では急速に沈着、分解が進んで下流へは流達しにくいとの報告がなされている。こうした流量依存性と共に、今回明らかになった水温依存性も考慮してさらなる検討を進める必要がある。ただし、矢作川においては数キロスケールで地点間隔が設定されており、野外調査におけるDNA濃度の流程変化(図(3)-9)をみてもほとんど上流側の影響は考慮しなくても良いだろう。



図(3)-2. 河川水中でのアユDNA量の時間経過に伴う変化を示す。3つの温度の間で減少速度に違いがみられ、高温になるほどその速度が速いことが明らかとなった。ただし、いずれの温度においても指数関数的な減少傾向であることに違いはなく、水温と時間を変数とする指数関数式で回帰することができた。数式の詳細は本文を参照のこと。

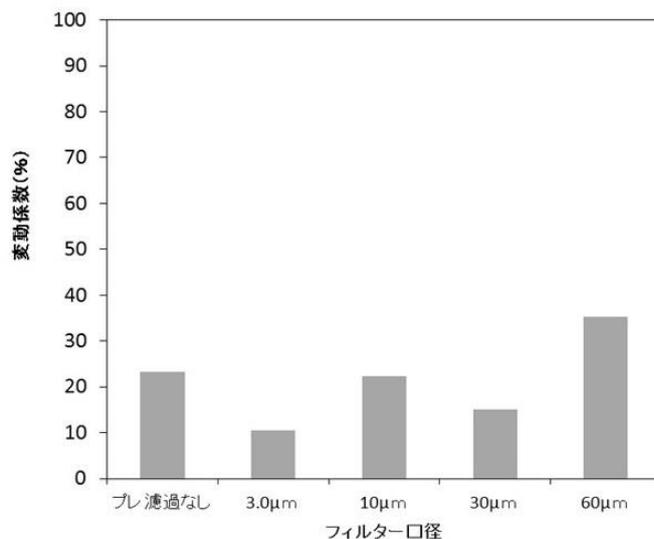
基礎的知見としてDNAの減少に与える紫外線の効果を確認するため、最もDNAへのダメージが大きいとされるUV-Cの光源（6W×2灯）をコイ（*Cyprinus carpio*）の肉片から抽出したDNAに照射し、0、1、3、6、12、24時間後のDNAの減少量をリアルタイムPCRによる定量測定（分析対象遺伝子領域：チトクロームb）でモニタリングした。結果として、指数関数的なDNA量の減少が確認され、24時間後には初期量の1%未満に減少した（図(3)-3）。これはもちろん、殺菌目的で使用されるUV-Cを用いたことが原因であり、野外で観察されるUV-AやUV-Bの効果はこれよりも格段に小さいことが推測される。しかしながら、本予備実験によってかなり簡単な指数関数式で紫外線の効果を定式化できる見込みが得られたことで、今後の研究で野外でのUV-AやUV-Bの効果が無視できなくなった場合は、DNAの減少に与えるこれら紫外線のパラメータを比較的簡単な実験で推定できると考えられる。



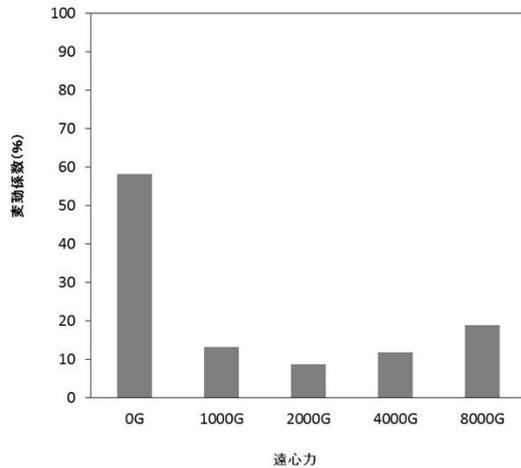
図(3)-3. UV-CへのDNA暴露時間と相対的なDNA濃度の関係をしめす。時間経過とともに指数関数的なDNA濃度の低下がみられた。

3-2 環境DNAの測定精度向上に向けた試料の前処理について

実験Ⅰのプレ濾過による方法については、測定されたDNA濃度を多重比較した結果、メッシュサイズ $30\mu\text{m}$ でプレろ過を行ったサンプルのDNA濃度(860 ± 660 コピー数/ μL)と $3.0\mu\text{m}$ でプレろ過を行ったサンプルのDNA濃度(360 ± 37.0 コピー数/ μL)の間に有意な差が認められ(TukeyHSD : $p<0.05$)、細かな目合いのフィルターでプレ濾過した試料ほど、測定されたDNA濃度が低くなる傾向がみられた。DNA濃度のばらつきを変動係数として比較した結果、メッシュサイズ $3.0\mu\text{m}$ でプレろ過を行うことで変動係数はプレろ過を行わなかったものより12.7%低減された(図(3)-4)。遠心分離による前処理を検討した実験Ⅱでは、測定されたDNA濃度を多重比較した結果、遠心分離を行わなかったサンプルのDNA濃度($700. \pm 41.0$ コピー数/ $2\mu\text{L}$)と $8000\times g$ で遠心分離を行ったサンプルのDNA濃度(250 ± 27.0 コピー数/ $2\mu\text{L}$)との間に有意な差が示され(TukeyHSD : $p<0.05$)、遠心力が大きくなるほど測定されたDNA濃度は低下した。DNA濃度のばらつきを変動係数として比較した結果、遠心分離することで変動係数は低減される傾向が見られ、 $1000\times g$ の遠心分離を行うことで変動係数は遠心分離を行わなかったものより48.0%低減された(図(3)-5)。



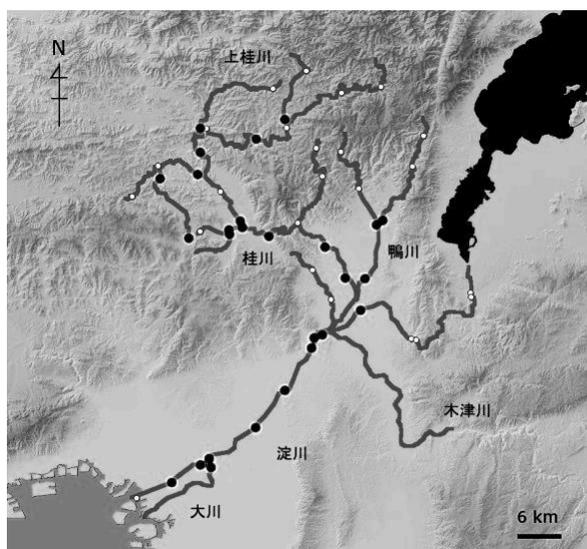
図(3)-4. 各条件のサンプル数(N = 6)、ネガティブコントロールは未検出、変動係数はプレろ過後のGF/F フィルターでろ過した濾液中の DNA 濃度の変動係数を示す。メッシュサイズ 3.0 μm のナイロンフィルターでプレろ過を行うことで、変動係数はプレろ過を行わなかったものより 12.7%低下した。



図(3)-5. 各条件のサンプル数(N = 4)、ネガティブコントロールは未検出、変動係数は遠心分離後の上清中の DNA 濃度の変動係数を示す。変動係数は1000 \times g の遠心分離を行うことで遠心分離を行わなかったものより 48.0%低減された。

3-3 流水環境における移動分散研究の実例の提示

淀川および桂川の水系における多地点調査の結果、51地点中27地点でヌートリアのDNAが検出された(図(3)-6)。平成23年度の河川水辺の国勢調査による同地域でのヌートリア確認状況と比較すると、確認されている地点ではほぼすべて環境DNAで検出できていることが明らかとなった。また、桂川水系では河川水辺の国勢調査で調査されているよりもかなり広範囲に調査を実施したが、その結果として、同水域ではほぼ全域にわたってヌートリアが生息していることが推定された。

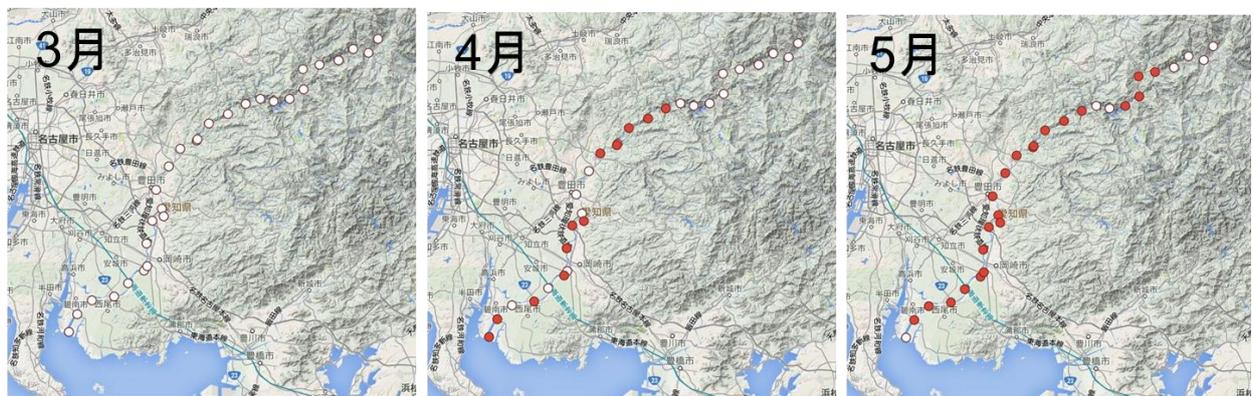


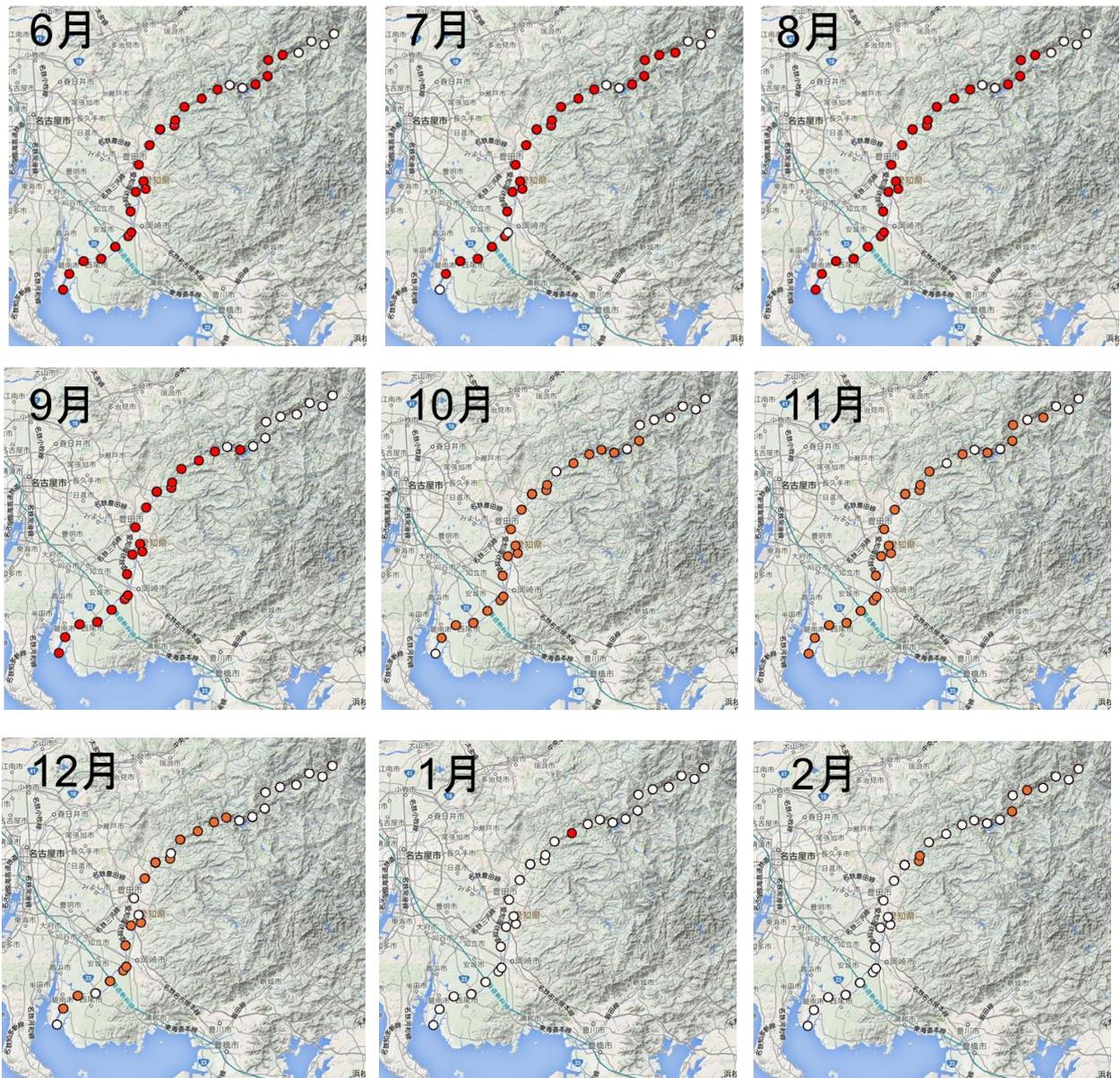
図(3)-6. 桂川及び淀川水系におけるヌートリアDNAの分析結果。51地点中27地点でDNAが検出され、

かなり広域的に分布が拡大していることが明らかになった。黒丸の地点が陽性反応のあった地点を示す。

次に、矢作川におけるアユの移動分散についての調査結果について述べる。2014年3月から2015年3月の1年分の試料の分析が終了し、また、PCRで陽性反応が出たものの、格段に濃度が薄いと考えられた試料についてはPCR産物のダイレクトシーケンスによって対象種を適切に検出しているかを確認した。シーケンスの結果はすべてアユのDNAを適切に検出していたことを示していた。以降、周年での河川内のDNA検出結果の季節変化について述べる(図(3)-7参照)。

2014年の3月にはいずれの調査地点からもアユのDNAは検出されなかった。4月に入ると、海からの天然遡上個体と放流種苗に由来すると思われるアユのDNAがそれぞれ下流部と中流部から検出され、季節的な遡上を捉えることができた。5月には上流部でも多く検出されるようになったが、これらの地点には天然遡上アユは到達できないため、上流側の漁協による放流種苗に由来すると考えられた。もっとも上流で陽性反応が見られた地点付近では、およそ300kgの種苗が放流されており、少なくともこの程度の生物量が存在していれば、希釈効果が大きい河川でも検出可能であることが示唆された。6月から8月はアユの成長期であり、河川全域にわたって陽性反応が得られる地点がほとんどを占めた。9月に入ると上流部で陰性となる地点が増加し、アユの産卵に向けた、季節的な降下に起因することが考えられた。10月から12月にかけては陽性反応のある地点はそれほど減少していないものの、繰り返し数4で実施しているPCRの結果を精査する(29地点について繰り返し数4のため、総数で116反応)と、この3ヶ月のうちに陽性反応総数が51、62、21と変化し、12月に急減していた。これは、産卵期の終盤に向かって、アユ親魚の斃死によって生物量が急減していることを示していると考えられる。2015年の1月及び2月には陽性反応が見られる地点の数自体も大きく減った。以上の様な検出結果の季節変化は、よく知られているアユの生活史、即ち、春に河川に遡上し、夏の間河川で藻を食んで成長し、秋以降に産卵して生涯を終えるという生活史を適切にとらえていると考えられる。これにより、流水環境下であっても、季節的な採水調査を広域的に繰り返すことによって生物種の生活史(移動分散、再生産から減耗)を推定するために環境DNA分析が利用できることを実例をもって示すことができた。

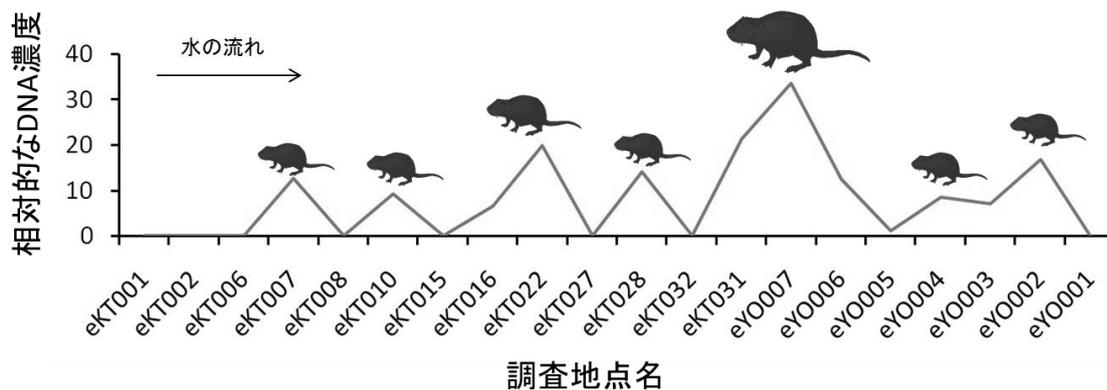




図(3)-7. アユの環境DNAの検出・非検出をそれぞれ白丸と赤丸で示す。2014年3月から2015年2月の結果をそれぞれ示している。

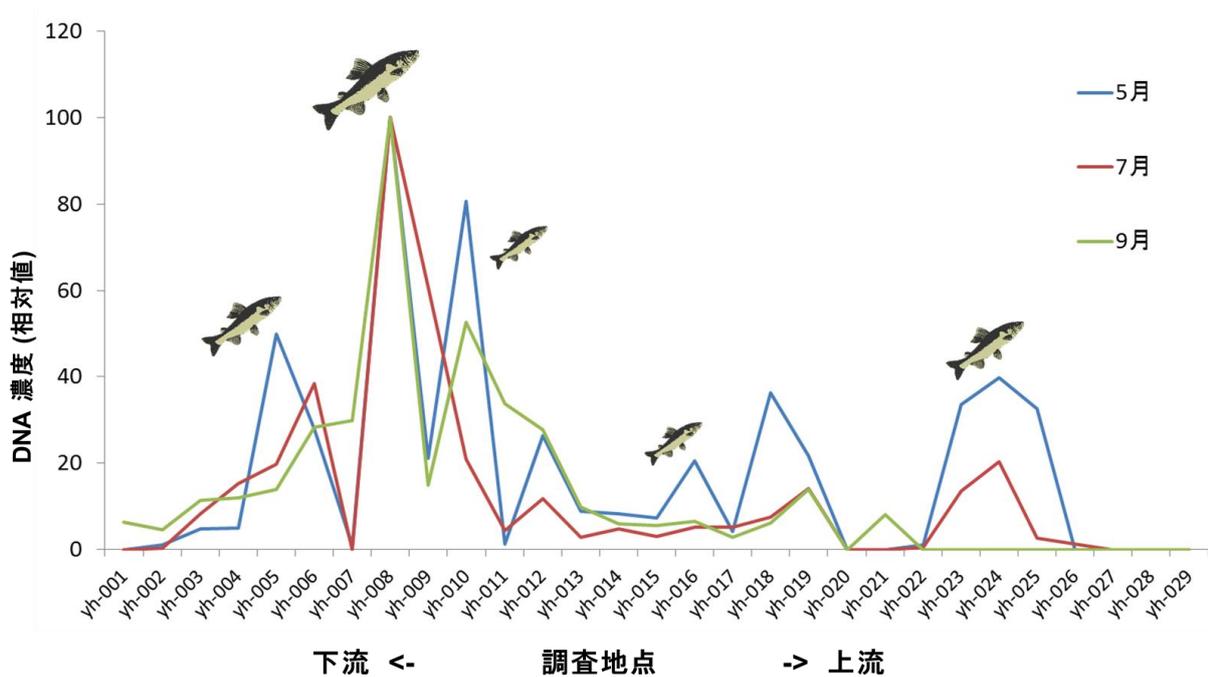
流水環境における「DNAの検出・非検出」の空間的解像度を検討するために、新たなデータ解析手法を検討した。上述のヌートリアの検出は定性的な分析であり、PCRで「DNAが増幅したかいなかったか」のみを利用して在不在の判定をしている。しかし、流水環境では上流から下流へのDNAの輸送があるために、上流のある生息域から流下してきたDNAを複数の下流側調査地点で検出してしまう危険性がある。図(3)-8には桂川本流から淀川本流を経て大阪湾にいたる調査地点を左から右へ上流から下流側地点となるよう列挙している。縦軸は相対的なDNA濃度を示しており、調査地点間で大きく値が異なることがわかった。図にヌートリアの絵が示してある地点は、その地点よりも上流側でヌートリアのDNA濃度が増加傾向となっている地点であり、このようなDNA濃度の高まりは、近傍にヌートリアが生息している、もしくは生息している小さな支流から河川水が流れ

込んできていることを示すと考えられる。一方で、ヌートリアDNAの濃度が最も高かったeY0007地点（桂川と淀川の合流点）の下流側2地点（eY0006およびeY0005）ではDNA濃度が検出されたものの、上流地点から流れてきたDNAを検出している可能性が否定できない。このような新たな「在不在」の検討方法によって、誤った「生息」判定をしてしまう危険性を減らすことができると考えられる。また、これは対象生物の分布特性や密度および行動範囲にもよると考えられるが、本調査での調査地点間距離を考えると、本水域では環境DNAによる在不在判定が数kmから10数km程度の空間解像度を持つであろうことが推察される。今後は新たな水域においても同様の解析をすすめることにより、対象水域ごとの空間解像度の検討が可能になると思われる。



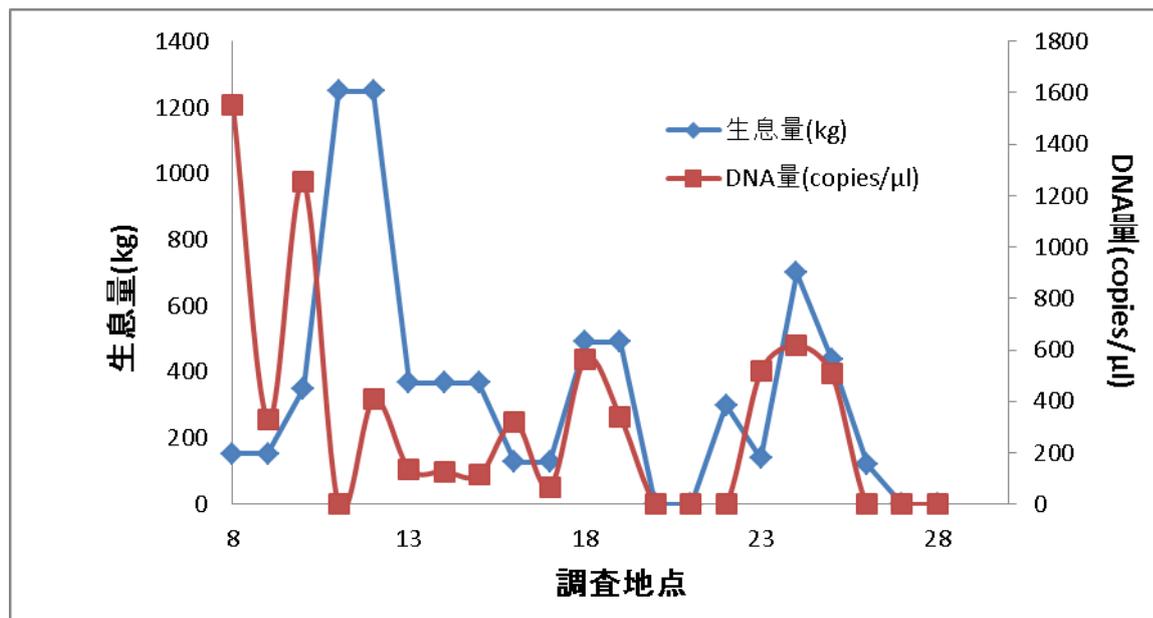
図(3)-8. 桂川本流最上流地点から、淀川合流後大阪湾に至る調査地点での相対的なDNA濃度を示す。

続いて、上述のヌートリアの例と同様にアユについて、上流から下流へ向かっての環境DNAの流下に伴う、下流での誤った検出について検討した。矢作川での調査地点は3-4 kmごとに設定されているが、図(3)-9に示すように、アユのDNA濃度は地点間で大きく変動している。例として5月、7月、9月のDNA濃度（相対値）の下流から上流へ向かっての分布を示しているが、濃度が比較的高い地点であっても、その下流側地点へ向かって長く尾を引くように高いDNA濃度が続くことはあまりないことが分かった。ある地点における高いDNA濃度は、わずかにあると考えられる上流からのDNAの流下のみならず、その地点近傍にDNA放出源であるアユの個体が存在していることで生じていると考えられる。よって、流程に沿って本研究の様に多地点を設定してDNA濃度を比較することで、対象種が実際にいる場所を絞り込むことができると考えられる。矢作川は中流域であれば1秒当たり20トンほどの水量がある大規模な河川であるが、このような水量によって引き起こされるDNAの希釈は、DNAを検出しにくくすることが考えられる。しかしその一方で、空間解像度を高める意味においては個体近傍から離れば急速にDNA濃度が低下するため、上流から流下してくるDNAを誤って検出するという誤検出の可能性を低下させる効果があると考えられる。以上から、この規模の河川であれば、流水環境であっても少なくとも3-4 kmの空間解像度が見込めることが示された。



図(3)-9. 流程方向の環境DNA濃度（最も濃度の高かった地点yh-008を100%とする）を示す。例として5月、7月、9月の結果を記載している。調査地点の間は3-4km離れている。

図(3)-10にはアユの放流量と遡上量調査から推定された生息量と、各地点でのDNA量を示している。いくつかの地点で見られるように、上流側の隣り合う地点で高いDNA量が観測されていても、下流側では急に濃度が減っている。図(3)-9では単純に環境DNAの濃度の流程分布のみから環境DNAの広がり方を考察してそれほど下流方向へ広範囲に流れ下ってはいないであろうとの見解を示した。図(3)-10を見ると、特に上流よりの地点では生息量の多いところで環境DNA濃度も高くなる傾向がみられ、いないところで極端に高くなるという誤検出は起こりにくいであろうと考えられる。この結果は、流水環境中でもある程度の空間解像度は確保された形で環境DNA分析による水棲生物の移動分散調査が実行可能であることを支持するものであると捉えることができる。



図(3)-10. アユの生息量データがある8から28地点までのアユ生息量データと環境DNA量を示す。横軸右手に行くほど上流側の地点となっている。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究ではかなり大規模な河川においても、環境DNA分析による水棲生物のモニタリングが実施可能であることを実例を持って示すことが出来た。特に矢作川でのアユの移動分散調査では、毎月一回の調査と付随する分析をほぼ2名の調査者で実施した。流程が100kmほどの大規模河川で29の調査地点を設定しての調査であることを考えると、環境DNA分析以外の分布調査手法では実施不可能であったであろうと思われる。生物の移動分散調査は多くの研究で非常に基礎的かつ労力のかかるパートである。対象種のDNAを現場から採取するという環境DNA分析は、労力が小さく、かつ、明確な科学的根拠をもった結果が得られる手法である。実際の野外調査での実行性を示した本研究は実務的調査研究への橋渡しとして意義が大きい。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究では特定外来生物であるヌートリアと、水産上重要なアユについて環境DNA分析による検出と大規模な広域調査が実施可能であることを示した。環境DNA分析は現場での作業が水をくむだけであるというその省力化された特性があり、今後は水産資源の管理（放流効果の検証等）や外来種の侵入検知、希少種の探索等に有効活用が期待できる。DNAという物証を持って結果を出せる

ため、これらの課題にかかわる行政判断が求められる場面で活用されることが期待できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) H. YAMANAKA, and T. MINAMOTO (2016) "The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity." *Ecological Indicators* 62, 147-153.

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 山中裕樹：Rio（豊田市矢作川研究所月報）188, pp.1-2（2014）
「魚のDNAを追う！～汲んだ水からアユの生息場所を推定する～」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 山中裕樹、源利文、櫻井翔、大垣寿々香：第61回日本生態学会（2014）
「水生生物の移動分散モニタリングへの環境DNA技術の適用：流水環境における研究例と展望」
- 2) S. Tsuji, H. Yamanaka: Japanese Society of Limnology 79th Annual Meeting, Tsukuba (2014)
“On the effect of pH of water sample on the recovery rate of environmental DNA.”
- 3) H. Yamanaka, T. Minamoto: Ecological Society of America Annual Meeting 2014, Sacramento (2014)
“Monitoring upstream migration of fish using environmental DNA: Towards a more efficient method for assessing habitat connectivity.”
- 4) H. Yamanaka, T. Minamoto: Joint 2014 Annual Meeting - British Ecological Society and Societe Francaise d'Ecologie, Lille, (2014)
“Assessment of the effect of artificial obstructions on fish migration in a river using environmental DNA.”
- 5) 山中裕樹、櫻井翔、山本大輔、山本敏哉：日本陸水学会第80回大会（2015.9）
「環境DNA分析によるアユの河川内移動モニタリング」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 矢作新報（2014年7月4日、6面）

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

(4) 外来種・希少種調査への環境DNAの適用

兵庫県立大学 土居秀幸

片野泉

平成25～27年度累計予算額：10,774千円（うち平成27年度：9,275千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

本サブグループでは、外来種・希少種調査への環境DNAの適用をすべく研究を推進した。特にため池や河川において、環境DNAの濃度から生物量を推定する手法の開発、外来種の分布や生物量の推定、さらには外来種・希少種の水草への環境DNA手法の適用を行った。4-1として、ため池における池干し時に採捕調査を行いたため池全体の生物量を測定し、環境DNA量との比較をおこなった。その結果、コイでは環境DNA量と生物量に明瞭な関係が見られ、その傾向は岸や沖などの環境DNAの採集場所にはあまり関係ないことがわかった。4-2として、アユを対象として、流水環境において魚類の生息量を簡便に評価できる環境DNA分析手法を開発する他、野外の大型水槽（6,000L）を用いて、流水環境における飼育実験により水中の環境DNA量とアユの個体数・生物量の関係について検討し、両者には明瞭な正の関係があることがわかった。4-3として環境DNA手法の水生植物分布推定への有用性を確かめるために、トチカガミ科の沈水植物クロモ（希少種）やオオカナダモ（外来種）を対象として、リアルタイムPCRのプライマー・プローブの開発及び野外調査を実施した。その結果、生物量と環境DNA量に関係性があること、動物と異なる粒子画分に環境DNAがより多く存在することが明らかとなった。これら本研究にて開発した環境DNA手法は、様々な生物種における生物量の推定、生物分布調査、さらには外来遺伝子型の侵入規模を迅速に把握するための有効な手段となると考えられる。

[キーワード]

環境DNA、生物モニタリング、魚類、生物量、ため池、河川

1. はじめに

ため池をはじめとする水域での生物分布調査は、これまでは網や罟を用いて生物を捕獲する、目視で生息を確認するなどの方法で行われてきた。しかしこれらの調査方法は、多大な時間と労力、捕獲した生物を同定する専門知識などが必要となるため、膨大な数のため池全てでこのような調査を行うことは、人員や時間の確保、コスト面からも困難といえる。近年、これらの従来法を補完する新たな手法として我々は環境DNAを用いた生物分布、生物量調査法を開発している。本サブテーマでは、その技術を野外生態系に適用すべく研究を進めた。特に外来種と在来希少種に着目して以下の3つについて研究を行った。

- 4-1 ため池における生物量定量：池干し調査と環境DNAの比較
- 4-2 環境DNAを用いた流水環境における生物量推定法の開発
- 4-3 環境DNA手法を用いた水生植物の分布推定法の開発

2. 研究開発目的

4-1 ため池における生物量定量：池干し調査と環境DNAの比較

池干し時のため池では、通常時のため池では困難な生物の存在及び生物量の把握を、これまでの調査よりも正確に行うことができる。これにより、実際の生物量データと合わせて環境DNAデータを考察できると考えた。そこで本研究では、環境DNAデータが実際の生物量をどの程度反映するか、明らかにすることを目的とした。

4-2 環境DNAを用いた流水環境における生物量推定法の開発

河川の重要な水産資源のアユ (*Plecoglossus altivelis*) を対象にして、流水環境において魚類の生息量を簡便に評価できる環境DNA分析手法を開発することを試みた。そのためにまず、アユが放出するDNA量から生息量（バイオマス）を推定するモデル式（回帰式）を開発するため、野外大型水槽3基（6,000 L）を用いて、飼育実験を行った。

4-3 環境DNA手法を用いた水生植物の分布推定法の開発

沈水植物における環境DNA技術を用いた分布推定法を開発するために、沈水植物調査における本手法の有用性評価、分析精度を向上させるための基礎情報の収集、本手法の環境管理への活用可能性の検討を行うことを目的とした。環境DNA手法を水生植物に適用した研究例は乏しく、自然集団への適用した例は未だ発表されていない。そこで、環境DNA手法の水生植物分布推定への有用性を確かめるために、トチカガミ科の沈水植物クロモ (*Hydrilla verticillata*) を対象として、リアルタイムPCRのプライマー・プローブの開発及び野外調査を実施した。クロモは、日本においては地域的に絶滅危惧種とされている在来種であるが、海外においては外来種として分布拡大に成功している。クロモにおける手法の開発は日本国内では希少種の保全に、海外では外来種の管理に活用されることが期待できる。また、近縁種のオオカナダモ、コカナダモは侵略性の高い外来種として知られている。そのため、得られた知見を両種に適用することも期待できる。さらに、本種はアクアリウムショップ等で購入可能であり、室内実験を容易に実施することが可能である。

3. 研究開発方法

4-1 ため池における生物量定量：池干し調査と環境DNAの比較

池干しが行われるため池において、コイと特定外来種であるブルーギルを対象に、環境DNA分析と生物の採捕調査を行い、両データの関係について検証を行った。さらに、池の体積なども分析時に考慮した。池干し調査は、姫路市・明石市・加古川市のため池8面にて、2014年9月から12月にかけて行った。対象生物はコイとブルーギルの2種とし、池干し前に環境DNA採集を、池干し直

後に生物の採捕調査を行った。環境DNAの採集は、池干しの約1週間前に実施した。ため池の沖帯3地点と岸帯3地点の計6地点からそれぞれ1L採水し、冷蔵して持ち帰った。水は実験室にてろ過(GF/F)、DNA抽出(サリベット-DNeasy blood and tissue kit法)を行い、抽出DNAを冷凍保存した。抽出DNAのサンプルは、コイ、ブルーギルのミトコンドリアDNAチトクロームb領域にそれぞれ特異的なPCRプライマーとTaqMan蛍光プローブを用いて、リアルタイムPCR(StepOnePlus)にてDNA量を定量した。

4-2 環境DNAを用いた流水環境における生物量推定法の開発

水槽3基(6,000 L)にアユ(*Plecoglossus altivelis*)1尾、3尾、9尾を投入し、各尾数に応じて水中に放出されたアユのDNA量を調べた。実験中、各水槽から水1Lずつを採取した。次に、採取した水をろ過してフィルターにトラップされたDNAの抽出・精製を行い、アユ特異的なDNAを増幅・定量するプライマー・プローブを用いて、リアルタイムPCRによりDNA量を測定した。これによって、アユのバイオマス(mg/L)と環境中のDNA量(コピー数/L)との関係を解析した。なお、実験中の流量は、5~7 L/sであった。次に、上流にダム、下流に大規模な滝があることによって、海から遡上してきた天然アユが侵入できない半閉鎖的な河川環境(約2km)において、アユの稚魚を放流して(約18 g/尾、11,000尾)、数ヶ月後の生物量を環境DNAから推定することを試みた。なお、放流アユは、この調査区域内に留まっていることを前提とした。調査は、調査区域2km範囲内の12カ所において、岸から表層水1Lずつを採取した。DNAの抽出や測定方法は、上記の水槽実験と同様の手順で行った。なお、調査中の平均流速と水温は、約0.5m/sおよび17~20℃であった。

4-3 環境DNA手法を用いた水生植物の分布推定法の開発

クロモに特異的なPCRプライマー・TaqManプローブ領域を開発するために、クロモ及び国内の近縁7種(スプタ、ヤナギスプタ、オオカナダモ、コカナダモ、トチカガミ、ミズオオバコ、コウガイモ)で塩基配列が既知である*matK*(葉緑体ゲノムに含まれる)を参照した。その結果をもとに、クロモに特異的なプライマー・プローブをソフトウェアPrimer Expressを用いて設計した。

野外調査では、従来の目視による分布調査か環境DNA手法のどちらがクロモの検出力が高いかを比較した。調査は、東広島市内のため池21か所(クロモ分布情報あり:5か所、なし:16か所)にて行った。クロモの分布情報は広島大学の渡邊園子氏らが過去に行った調査結果より提供いただいた。各ため池から1Lを採水し、フィルター濾過によってDNAを抽出した。それらからクロモDNAが検出されるかをリアルタイムPCRにより確認した。

水中の環境DNA量によって、そこに生育する水草の生物量を推定することができるかを明らかにするために、室内の制御環境下において水槽実験を行った。実験対象生物はクロモとオオカナダモの2種を扱った。それぞれの種について、生物量を3条件(1cm、4cm、4cmx2本)にわけて水2L中で10日間生育した。各条件につき6反復行った。各種投入後1日後、2日後、3日後、5日後、7日後、10日後に15mlずつ採水した。それらをエタノール沈殿し、環境DNAを抽出した。それらをTEで溶解した後、Proteinase K処理したものをテンプレートとしてリアルタイムPCRで定量した。

さらに、水生植物の分布調査における本手法の有用性を検討するために、3つの実験を行った。まず、本手法を分布調査に活用するにあたり重要な基礎情報となる次の2点の解明に取り組んだ。
1) 植物では環境DNAとして検出されるのはどのくらいの大きさの組織片か。それは動物と比較し

てどのような違いがあるか。 2) 自然集団において環境DNA量は季節変化するか。そして、実際に本手法の環境管理への活用可能性を検討するため、 3) 河川流量が増加した場合、流される植物環境DNA量も変化するか について検証した。これらはトチカガミ科沈水植物種を用いて検証した。

1) の検証のため、オオカナダモ (*Egeria densa*) とコイが同所的に生息する兵庫県姫路市の河川及び広島県東広島市のため池から1L採水し、7種類のフィルター(100 μ m、60 μ m、30 μ m、10 μ m、3 μ m、0.8 μ m、0.2 μ m)で濾過しサイズ分画を行った。各フィルター及び濾液からDNAを抽出し、定量PCRにより各分画のDNA量を調べた。

次に2) の検証のため、クロモ (*Hydrilla verticillata*) が分布している広島県東広島市のため池5ヶ所を対象に環境DNA量の季節変化を調べた。各ため池において春から冬にかけて5回採水し、フィルターで濾過しDNAを抽出し、定量PCRによりDNA量を測定した。

3) では、広島県三次市の灰塚ダムのフラッシュ放流に着目した。このダムでは一時的に放流量を増加させることで、河川に繁茂した水草や固着藻類を一掃している。この河川流量の増加に伴い、流されるオオカナダモが増加することが先行研究により報告されている(水口ら、2013、土木学会論文集B1(水工学))。そこで、河川流量の増加に伴い、オオカナダモの環境DNA量も増加するかを検証した。フラッシュ放流中に下流河川において1時間おきに計7回1L採水した。採水には広島大学工学部の椿涼太助教にご協力いただいた。各水サンプルをフィルターで濾過し、DNAを抽出した。定量PCRによりDNA量を調べ、オオカナダモDNA量の変化を検出した。

4. 結果及び考察

4-1 ため池における生物量定量：池干し調査

コイは8面中7面の池で、ブルーギルは8面中3面の池で生息が確認された(表(4)-1)。対象生物以外には、フナ類、オオクチバス、ウシガエル、ヌマムツ、ドンコ、アカミミガメなどが捕獲された。また、T4-大谷下池はウシガエルが圧倒的に優占しており、他の生物はほとんど見られなかった。採捕調査による生物量と、環境DNAの関係を図(4)-8に示す。

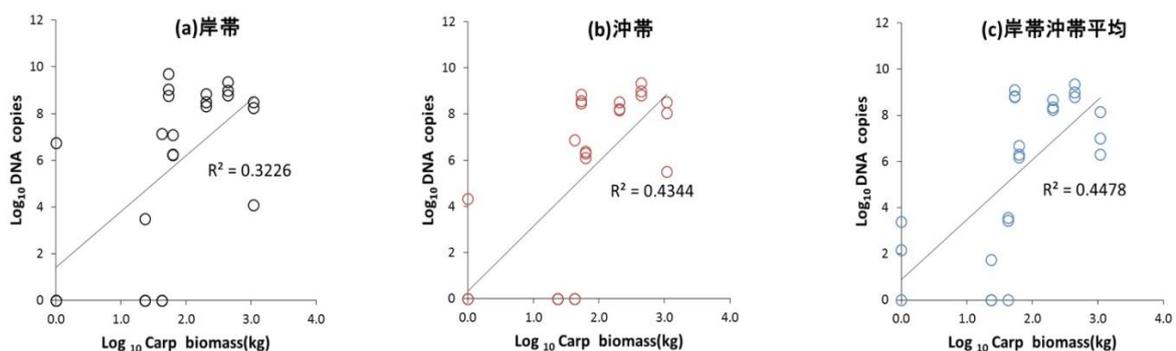
ため池から採取した水サンプルのDNA量と、採捕調査から得られた生物量を比較した結果を図(4)-1、図(4)-2に示す。共にx軸は捕獲された重量(kg)、y軸はため池中の環境DNA量(1Lあたりのコピー数 \times 各ため池の体積(m^3))を対数変換した値を用いた。また、(a)は岸帯、(b)は沖帯、(c)は岸帯と沖帯を平均したDNA量を表す。

コイでは、環境DNA量が生物量を比較的反映する結果となった(図(4)-1)。また(a)岸帯、(b)沖帯、(c)岸帯沖帯平均の3つのグラフの間に大きな差異は見られなかったが、 R^2 値は、(a) $R^2=0.3226$ 、(b) $R^2=0.4344$ 、(c) $R^2=0.4478$ と、岸帯より沖帯、沖帯より岸帯沖帯の平均がわずかに強い相関を示した。一方ブルーギルでは、生物量が異なっても環境DNA量はほぼ一定の値を示し、環境DNA量と生物量の間に関係性は見られなかった(図(4)-2)。また(a)、(b)、(c)3つのグラフの間に大きな差異は見られず、ほぼ同一の結果を示した。さらにブルーギルは、岸帯を好んで生息する習性があるが、今回は岸帯でDNA量が多いという結果は得られなかった。本研究では、生物の行動範囲の違いによる環境DNAの変化についても考察するため、対象種をコイとブルーギルの2

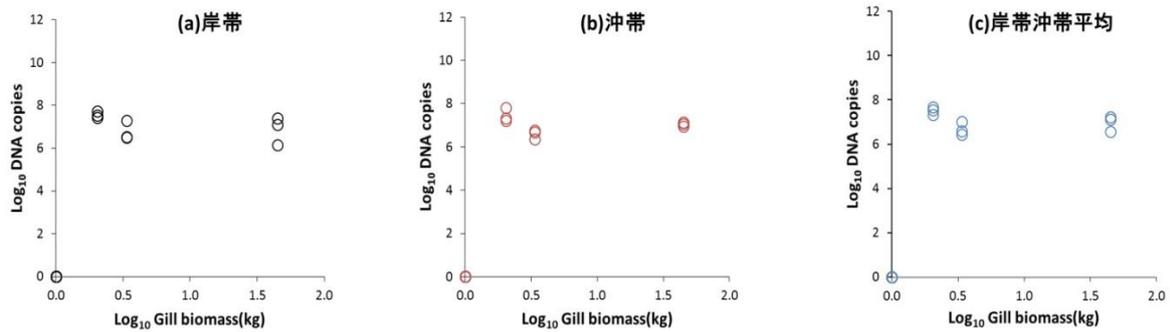
種においたが、明瞭な変化は見られなかった。環境DNAによる種の検出および定量と、池干しによる従来型の捕獲調査のデータを比較した結果、コイでは、環境DNA量が生物量を比較的反映する結果となった（最大 $R^2=0.4478$ ）。しかし先行研究において、実験下ではコイのDNA濃度と生物量の間に強い正の相関（最大 $R^2=0.93$ ）が見られており¹⁾、本研究の結果は、先行研究よりも弱い相関となった。考えられる要因としては、本研究は自然環境中で実施したため、泥によるDNAの吸着や水中の化学物質などによる阻害の影響が挙げられる。また、ため池は周囲の用水路と繋がっているため、採水から採捕調査までの期間に移動した可能性、池により、水中の微生物などによる分解の影響が異なった可能性も考えられた。自然環境中において環境DNAの抽出を阻害する要因については、今後環境DNA手法を広く適用する上での重要な課題であり、今後検討が必要である。

表(4)-1. 各地点での対象生物の採捕量

調査地点	Carp (kg)	Gill (kg)
T1 アブタ池	22.5	0.0
T2 谷々池	41.5	44.0
T3 奥三谷池	61.9	0.0
T4 大谷下池	0.0	0.0
T5 中笠池	51.5	1.0
T6 辻堂池	439.1	0.0
T7 盆ノ池	196.4	2.4
T8 17号池	391.5	0.0



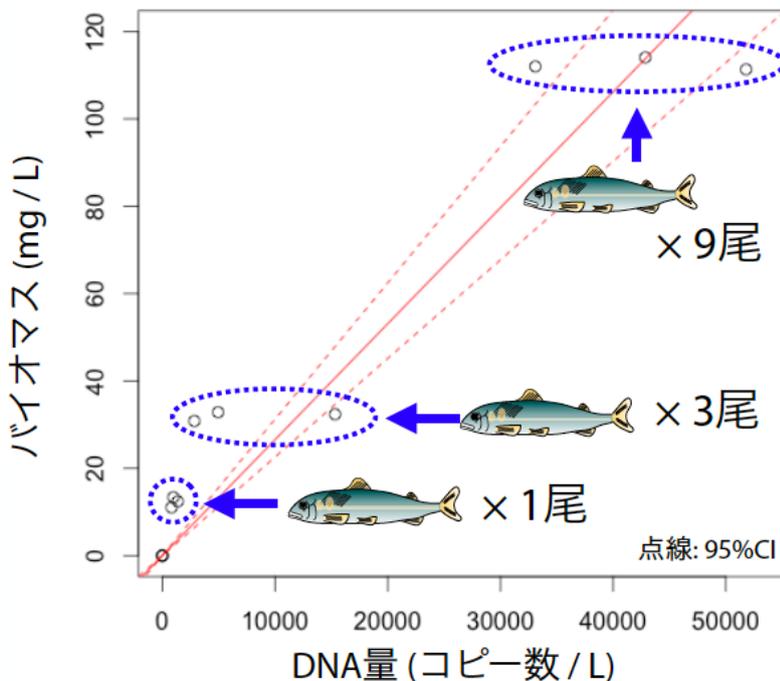
図(4)-1. コイにおける生物量と環境DNA量の関係 赤と黒の直線はそれぞれ、沖・岸帯での線形回帰モデルの結果を示す。



図(4)-2. ブルーギルにおける生物量と環境DNA量の関係

4-2 環境DNAを用いた流水環境における生物量推定法の開発

水槽実験の結果、環境中のアユのDNA量 (x) からバイオマス (y) を推定するモデル式の開発に成功した ($y = 0.00265x$, $R^2 = 0.94$, $P < 0.001$, 図(4)-3)。次に、このモデル式を用いて、野外調査時に採取した水サンプル中のDNA濃度からアユのバイオマスを推定した。その際、調査地の流量 (1872 L/s) や容積 (5400 t) などの環境データも考慮した。その結果、野外で採取した水サンプルから推定されたアユの推定バイオマスは2980kgになり、放流時よりも約13.5倍に増加していることが示唆された。一方、投網などで捕獲されたアユ個体の重量は約5.2倍に成長していた。今後、環境DNAによる推定バイオマスと捕獲個体から推定されたバイオマスとの値の差異について精査しなければならない。



図(4)-3. 水槽実験結果による環境中のアユのDNA量とバイオマスの関係 ($y = 0.00265x$, $R^2 = 0.94$, $P < 0.001$)

4-3 環境DNA手法を用いた水生植物の分布推定法の開発

開発されたプライマー・プローブをクロモ及び、誤同定されやすい近縁種オオカナダモのDNAで増幅を確認したところ、クロモのみで増幅が認められ特異性が確認された。

野外調査の結果、目視によってクロモの分布が確認できたのは2か所(分布情報あり)のみであった。一方で、環境DNA手法では、目視で確認できた2か所に加え、3か所(分布情報あり:2か所、なし:1か所)からクロモDNAが検出された(図(4)-4)。従って今回の結果では、環境DNA手法を用いた分布調査が、従来の目視による調査よりも高い検出力を持つことが示された。このことから、環境DNA手法は水生植物においても検出力が高く有力な分布推定法となりうることを示唆された。

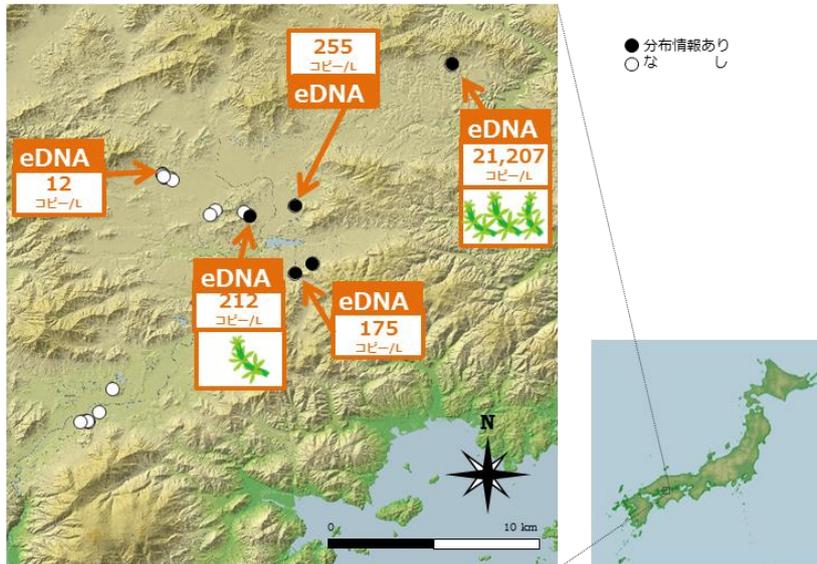
オオカナダモにおいては、生物量が多くなるほど環境DNA量も増加する傾向が検出された(図(4)-5 (A)-(C))。一方で、クロモにおいては生物量が少ない条件下でも個体によっては環境DNA量が増加した(図(4)-5 (D)-(F))。今回の実験ではクロモはオオカナダモよりも生物量自体が小さいため、生物量が小さい条件下では環境DNA量との関係性が見えにくくなったことが考えられる。両種とも、最も環境DNA量が多くなるのは、植物体投入後2~3日後となった。その後環境DNA量は減少していく傾向がみられたが、個体によっては増加するものも認められた。全ての個体において環境DNA量が0となる日が確認されたため、環境DNAは常に放出され続けてはいないことが示唆された。これらのことから、環境DNA量が生物量の推定に利用できる可能性が示唆された一方で、放出されるDNA量は継時的に変動することが明らかとなった。環境DNA手法を生物量推定に適用するためには、DNA量の継時的な変動がどのように起こっているのかについて、より詳細を調べていく必要がある。また、自然集団においては季節的にも環境DNA量が変化しうるため、生物量を推定するにあたり注意が必要であることが示唆された。そのため次年度では、自然集団における環境DNA量の季節的変化を調査する予定である。

実験1)の結果、オオカナダモの環境DNAは特に0.2 µm未満の分画由来から高濃度で検出されることが明らかになった(図(4)-6)。この傾向は河川サンプル、ため池サンプルの両方で確認された。一方で、コイの環境DNAは0.2µm未満から100µm以上の様々なサイズの組織片から検出された。これにより植物では動物よりもサイズの小さい組織片からDNAが放出されていることが示唆された。そのため、植物環境DNAの検出力を増加させるためには、サイズの小さい組織片を収集できるようなDNA抽出方法を確立させていくことが重要だと考えられる。

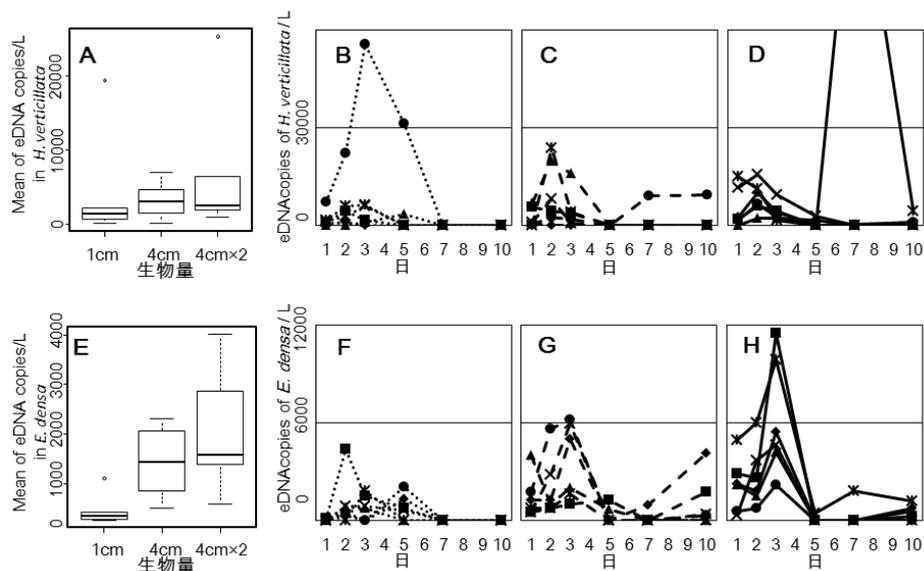
また、実験1)の結果、クロモの環境DNA量は時間的に変化することが明らかになった。DNA量は夏あるいは秋に最大となり、冬に減少する傾向が検出された(図(4)-7)。クロモは夏に成長量が増加し、冬には地上部が消失することが知られている。こうした植物のフェノロジーにより環境DNA量は変化することが示唆された。このことから、環境DNA法を植物分布調査に適用する場合、対象種のフェノロジーを考慮していくことが必要であると言える。

実験3)では、フラッシュ放流によってダム下流河川の流量が増加した場合、流されるオオカナダモの環境DNA量も増加する傾向が検出された(図(4)-8)。放流開始によって水位が上昇しはじめてからやや遅れてDNA量は増加した。放流終了後、水位が低くなるとDNA量も減少した。これら

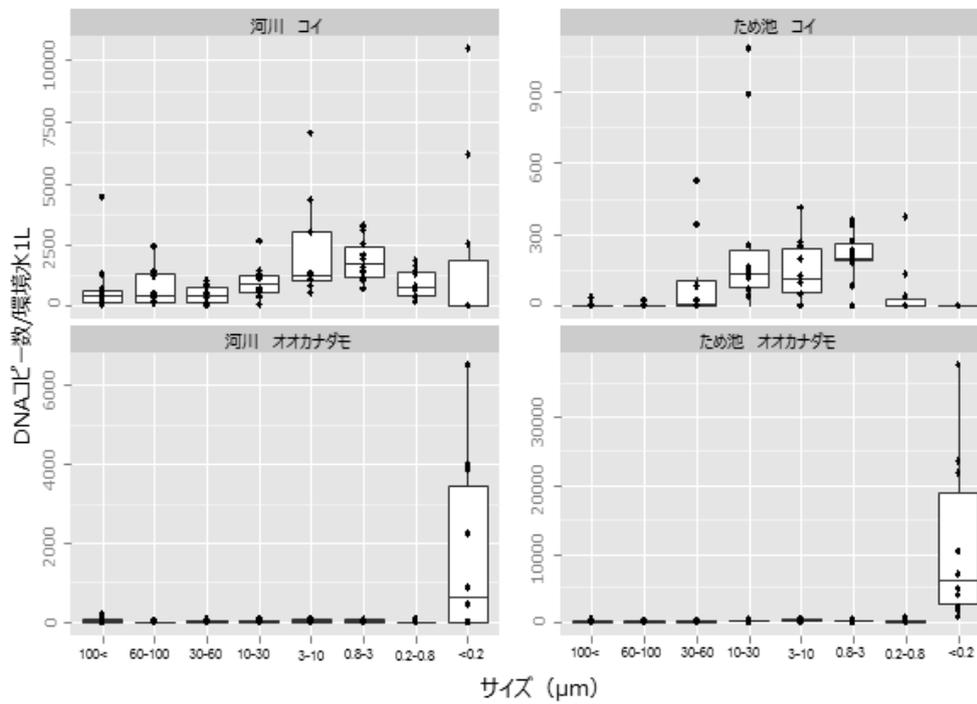
は、放流によって流される対象種の生物量の増加によって環境DNA量も増加したことを示唆している。それを検証するためには実際に生物量の測定など更なる調査が必要であるが、今回の結果は環境DNA手法の環境管理への活用可能性を示唆するものとなった。



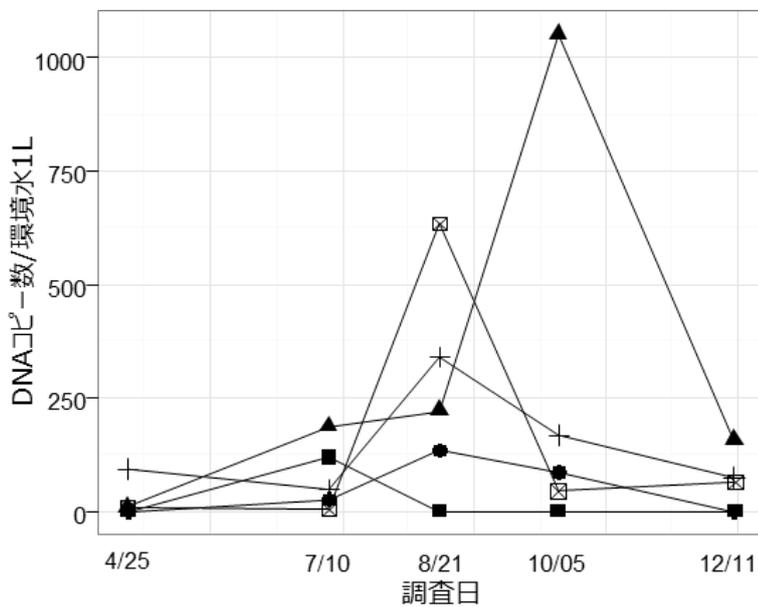
図(4)-4 分布推定を行ったため池の位置と、目視調査及び環境DNA分析の結果
水草の絵は目視でクロモが確認できたことを示す。環境DNAが検出されたため池については水1Lあたりに含まれるDNAコピー数を示す。



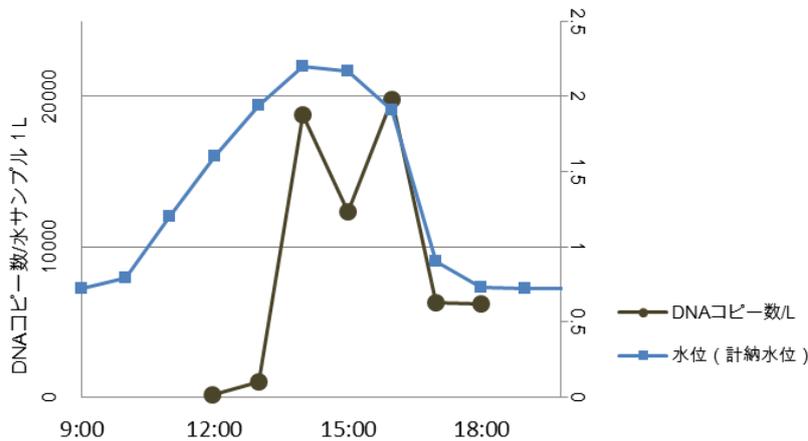
図(4)-5 クロモ (A-D) 及びオオカナダモ (E-H) について、生物量条件ごとの環境DNA量の平均値 (A、E) と各生物量条件1cm(B、F)、4cm(C、G)、4cmx2(D、H)における環境DNA量の推移を示す。



図(4)-6 コイ、オオカナダモの河川・ため池における各サイズ分画由来の環境DNA量



図(4)-7. 5つのため池におけるクロモDNA濃度の時間的变化



図(4)-8. フラッシュ放流による河川の水位とオオカナダモ環境DNA量の時間的変化

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究開発により得られた成果の重要な科学的意義として、以下の3点が挙げられる。まず、1) これまでに実験生態系を用いた高原らや他の研究で明らかになった、環境DNAと魚のバイオマスや個体数の関係について、比較的面積が大きく、自然環境に近い池全体でもある程度定量できること、さらには河川などの流水系でも推計できる可能性が示された。2) 同種内外来種などの種内の遺伝子型間の違いを環境DNAから判別し、その割合を定量できる可能性が示された。3) 水草(トチカガミ科)について、環境DNAにより生息分布が明らかにできること、さらにそのDNA捕集に適した採集方法やフィルター サイズ、季節的な環境DNAの消長が明らかとなった。

(2) 環境政策への貢献

これら本研究開発により得られた環境DNA技術については、すでに兵庫県東播磨県民局から問い合わせを受けるなど、兵庫地域の環境政策立案への貢献が期待されている。

<行政が既に活用した成果>

すでに兵庫県東播磨県民局から問い合わせを受けて、兵庫県のため池における外来種、在来種についての環境DNA調査を委託されている。

<行政が活用することが見込まれる成果>

環境DNAにより、脊椎動物から水草まで様々な生物種その生息場所や生息量を評価できることから、迅速かつ簡便な生息分布調査やモニタリングのために利用されることが見込まれる。さらに流水系である河川での魚類や水草の生物定量にも適用可能であり、新たな生物量調査方法として非常に有効であると見込まれる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) N. Koizumi, T. Takahara, T. Minamoto, H. Doi, A. Mori, K. Watanabe, and T. Takemura (2015) "Preliminary experiment for detection method of fish inhabiting agricultural drainage canals using environmental DNA." *IDRE Journal* 297: IV_7-IV_8.
- 2) K. Uchii, H. Doi, and T. Minamoto (2016) A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources* 16:415-422.

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 片野泉、名倉明日子、濱野紗耶加、土居秀幸、高原輝彦、源利文：日本陸水学会第79回大会（2014）「ため池の動物プランクトン群集の規定要因：生産性、生態系サイズ、捕食者に着目した解析」
- 2) 相馬理央、片野泉、源利文、高原輝彦、土居秀幸：日本陸水学会近畿支部会第26回研究発表会（2015）「環境DNA技術を用いた、ため池の生物分布調査：池干しによる採捕調査との比較」
- 3) 相馬理央、片野泉、源利文、高原輝彦、土居秀幸：日本陸水学会第80回大会（2015）「ため池の環境DNA量と生物量の比較：池干し時の採捕調査による検証」
- 4) 土居秀幸、内井喜美子、高原輝彦、松橋彩衣子、山中裕樹、源利文：第63回日本生態学会仙台大会（2016）「デジタルPCRを用いた環境DNAによる生物量・生物分布推定」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) T. TAKAHARA, T. MINAMOTO, H. YAMANAKA, H. DOI and Z. KAWABATA (2012) "Estimation of fish biomass using environmental DNA." PLoS ONE 7:e35868

Environmental DNA Methods for Monitoring the Distribution of Aquatic Organisms

Principal Investigator: Hideyuki DOI

Institution: Graduate School of Simulation Studies, University of
Hyogo7-1-28 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe,
650-0047, Japan
TEL:078-303-1986 FAX:078-303-1986
E-mail: hideyuki.doi@icloud.com

Cooperated by: Kobe University, Ryukoku University

[Abstract]

Key Words: Environmental DNA, Distribution, Biomass, Monitoring, Fish, River, Pond

The first report regarding environmental DNA (eDNA) was published in 2008; eDNA analysis is now considered a useful tool to investigate the distributions of aquatic and terrestrial organisms and their biodiversity.

In this project, we developed two types of assessments for aquatic macroorganisms using eDNA in the water: 1) species distribution based on the presence or absence of eDNA in the habitat, and 2) species abundance/biomass based on eDNA concentration. We first focused on developing eDNA methods to detect species distributions for fish, amphibians, mammals, and macrophytes, including common, alien, and endangered species, in various aquatic habitats (ponds and rivers). We also found detection rates of the species using eDNA to be generally higher than those using traditional methods, such as visual observations and analysis of old distribution records. Additionally, we developed multiplex PCR methods to enable eDNA detection of multiple species and successfully employed these methods in ponds. These eDNA methods use mitochondrial DNA (mtDNA) as a genetic marker. However, mtDNA markers have certain drawbacks, such as variable copy number and maternal inheritance. Thus, we also conducted tests using nuclear DNA (ncDNA) as a more reliable genetic marker for eDNA analysis. Experimental and field investigations suggested that a genetic marker (ITS1) in ncDNA is more sensitive for eDNA detection than that in mtDNA.

Next, we developed eDNA methods to estimate species abundance/biomass. Using mesocosms, we determined that a positive relationship exists between eDNA concentration and fish biomass/abundance. We then conducted field surveys in ponds and

rivers along with biomass estimation by traditional methods—visual observation, net sampling, and sampling at draining the ponds, and compared the fish abundance/biomass data obtained with eDNA concentration. These field investigations also revealed positive relationships between eDNA concentration and abundance/biomass. We also developed a method to estimate genotype ratio in natural populations between invasive and native haplotypes using eDNA.

These results strongly suggest that eDNA can detect species with greater sensitivity than traditional methods, and that eDNA methods can be applied to estimate macroorganism abundance/biomass in aquatic habitats. Thus, our newly developed eDNA methods will contribute to reducing the cost and efforts of field surveys in aquatic habitats and facilitate policy decisions.