

水産海洋地域研究集会

第47回北洋研究シンポジウム
—環境DNAを用いた水産生物のモニタリング—

日 時：2017年6月17日（土）9:30-17:00
 場 所：札幌市北区北9条西9丁目北海道大学農学部総合研究棟
 共 催：一般社団法人水産海洋学会, CREST, 北海道大学農学部動物生態学セミナー
 コンビナー：笠井亮秀（北大院水産）・近藤倫生（龍谷大理工）・荒木仁志（北大院農）

1. 環境DNAとは何か ……………源 利文（神戸大人間発達環境）
2. 魚類環境DNA メタバーコーディング：次世代シーケンサを用いた超並列多種分析システムの紹介
……………宮 正樹（千葉博物館）
3. 環境DNA メタバーコーディングで観る魚類群集 ……………山本哲史（神戸大人間発達環境）
4. 種の保全・資源管理へ向けた種内多様性の評価 ……………山中裕樹（龍谷大理工）
5. 大量シーケンスと標準DNAを利用した魚類環境DNAの網羅的・定量的モニタリング：京都府舞鶴湾での解析事例
……………潮 雅之（京大生態研）
6. 環境DNAを通して観る北海道の水圏生物 ……………荒木仁志（北大院農）
7. 環境DNAから見る絶滅危惧種イトウの回遊行動 ……………水本寛基（北大院農）
8. 環境DNAによる資源量推定に向けての水槽実験とフィールドでの検証 ……………益田玲爾（京大フィールド研セ）
9. 流動モデルを用いた環境DNA濃度分布の再現 ……………笠井亮秀・尹 錫鎮（北大院水産）
10. 環境DNAによる魚類の個体数推定の可能性：統計モデルによる統合的アプローチ ……………深谷肇一（統数研）
11. 水産の立場から環境DNAへの期待 ……………中田 薫・小林敬典（水研機構）
12. 環境DNAを利用した水産生物観測にむけて ……………近藤倫生（龍谷大理工）

開催趣旨：水圏生物の資源変動は、水産業をはじめとする生態系サービスに直接的な影響を与える。また近年では、地球温暖化の影響により、水圏生物の分布や漁獲物組成が変化しているという報告も多い。今後も持続的に水産生物を利用していくためには、資源量調査や生物相のモニタリングが重要であるが、それらには多大な労力が必要である。さらに、希少種をモニタリングする際には、できる限りその個体や資源に影響を与えない手法が必要となる。近年、環境DNAと呼ばれる、水中に存在する生物由来のDNAを分析するモニタリング手法が開発され、その技術は急速に発展してきている。この手法は、現場では水を採集するだけで済むため簡便であるとともに、対象生物を傷つけることもない。本シンポジウムでは、その手法の原理や近年の研究成果を紹介するとともに、北海道周辺の沿岸域における水圏生物への適用について議論し、将来の水産生物のモニタリングに向けた布石としたい。

1. 環境DNAとは何か

源 利文（神戸大人間発達環境）

はじめに

海や川の水や堆積物の中にはさまざまな生物のDNAが存在している。それは細菌などの目には見えない微生物のDNAのほか、魚などの大きな生物に由来する生体外のDNAをも含む。このような、例えば水や堆積物などの中に存在するDNAを総称して環境DNA（environmental DNA; eDNA）と呼ぶ。近年、特に水の中の環境DNAを解析することでそ

の水域にどのような生物がどのくらい生息しているかを推定しようとする環境DNA分析と呼ばれる分析手法が急速に発展しており（Ficetola et al., 2008; Jerde et al., 2011; Minamoto et al., 2012）、本シンポジウムではそれがどのようなことに利用可能であるのか、最新の話題が紹介される。本講演では、シンポジウムのイントロダクションとして、環境DNAとは一体何なのか、それを用いることでどのようなこ

とが可能なのか等について概説する。

環境DNAの正体は？

魚などのマクロ生物の環境DNAはいったい何に由来し、どのような状態で環境中に存在するのであろうか。実は我々はこのような単純な質問にすら正確な答えを有していないのが現状である。一般的には、環境DNAは主にフンなどの排泄物や体表粘液などの分泌物に由来すると考えられている (Barnes and Turner, 2016)。しかし、どちらがより重要なソースなのかなど、詳しいことはまだわかっていない。

環境DNAはどのような状態で環境中に存在するのであろうか。組織片のような比較的大きな状態で水中を漂っているのか、ミトコンドリアのような細胞小器官の状態なのか、それとも裸のDNAか。これについてもまだはっきりとした答えはないが、いくつかの先行研究や、我々の研究室で行った研究の結果から、多くは1–10 μm 程度のサイズの粒子状のものであることがわかっている (Turner et al., 2014 他)。また、DNA抽出の際にタンパク質を分解する酵素を使うことでより効率的に回収できることから、タンパク質に囲まれたような状態で存在していると考えられる (Tsuji et al., 2017)。これらのことから、環境DNAは細胞片あるいは細胞内小器官などの状態で環境中を漂っている可能性が考えられる。

環境DNA分析の二つのアプローチ

環境DNA分析には大きく分けて、種特異的な検出と、メタバーコーディングの二つのアプローチがある (高原ほか, 2016; 山中ほか, 2016)。前者は、例えばある河川にオオサンショウウオが生息しているかどうかといった、特定の生物種のDNAを検出することでその生物の存在を推定しようとするものであり (Fukumoto et al., 2015; 福岡ほか, 2016 他)、後者は、例えば魚類なら魚類のDNAをまとめて検出しようとするものである (Miya et al., 2015 他)。前者はより簡便で低コストであるが、特異的な検出系を作成する手間が種ごとに必要になる。後者は解析コストがかかるものの、一度に大量のデータが得られるメリットがあるため、必要に応じて使い分けされる。どちらの方法でもDNA量を測ることで、生息数やバイオマスを相対的あるいは絶対的に定量する技術の開発が進んでいる (Takahara et al., 2012; Yamamoto et al., 2016; Doi et al., 2017; Ushio et al., 2017)。

環境DNA分析が適用可能な生物種はさまざまである。魚類や両生類などの脊椎動物のみならず、昆虫やエビ・カニなどの節足動物 (Ikeda et al., 2016)、いわゆるクラゲ類などの刺胞動物 (Minamoto et al., 2017)、あるいは水生植物 (Fujiwara et al., 2016; Matsushashi et al., 2016) での検出例も報告されており、おそらくはあらゆる生物種について適用可能だと思われる。

環境DNA分析の注意点

分析にあたって行う作業は、ろ過、フィルターからのDNA抽出、PCRなどの分子生物学的実験操作の3段階である。これらの分析作業は特殊なものではないが、微量なDNAを検出する実験であるため、通常の実験よりもコンタミネーションへの注意が必要である。実験のすべての段階において次亜塩素酸等を用いた器具のデコンタミネーションを行うことや、PCR前後で実験スペースを物理的に隔離するなどの注意が必要である。また、結果の解釈にあたっては、既知の知見との整合性を十分に確認することが望ましい。

研究開発段階から実装段階へ

マクロ生物の環境DNA分析は、初めての論文が世に出てからまだ10年と経っていない若い技術である。通常、新しい技術が研究開発の段階から実装段階へ至るまでに長い時間を要するが、環境DNA分析はかなり早いペースで実装段階に至りつつあるようである。そのために、本来行われるべき基礎的な調査や実験が不十分な部分があり、できることとできないことを十分に理解しないで見切り発車するとさまざまな問題が生じうる。今後は、環境DNA分析を実装段階に移行するための課題についても十分に議論し整理する必要があるだろう。

引用文献

- Barnes, M. A. and C. R. Turner (2016) The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Cons. Genet.*, **17**, 1–7.
- Doi, H., R. Inui, Y. Akamatsu, K. Kanno, H. Yamanaka, T. Takahara and T. Minamoto (2017) Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshw. Biol.*, **62**, 30–39.
- Ficetola, G. F., C. Miaud, F. Pompanon and P. Taberlet (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.*, **4**, 423–425.
- Fujiwara, A., S. Matsushashi, H. Doi, S. Yamamoto and T. Minamoto (2016) Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds. *Freshw. Sci.*, **35**, 748–754.
- Fukumoto, S., 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. *J. Appl. Ecol.*, **52**, 358–365.
- 福岡有紗・高原輝彦・松本宗弘・兵庫県立農業高校生物部・丑丸敦史・源利文 (2016) 在来希少種カワバタモロコシの環境DNAによる検出系の確立。日本生態学会誌, **66**, 613–620.
- Ikeda, K., H. Doi, K. Tanaka, T. Kawai and J. N. Negishi (2016) Using environmental DNA to detect an endangered crayfish *Cambaroides japonicus* in streams. *Cons. Genet. Resour.*, **8**, 231–234.
- Jerde, C. L., A. R. Mahon, W. L. Chadderton and D. M. Lodge (2011) “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Cons. Lett.*, **4**, 150–157.
- Matsushashi, S., H. Doi, A. Fujiwara, S. Watanabe and T. Minamoto (2016) Evaluation of the environmental DNA method for estimating distribution and biomass of submerged aquatic plants. *PLoS ONE*, **11**, e0156217.

- Minamoto, T., M. Fukuda, K. R. Katsuhara, A. Fujiwara, S. Hidaka, S. Yamamoto, K. Takahashi and R. Masuda (2017) Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLoS ONE*, **12**, e0173073.
- Minamoto T., H. Yamanaka, T. Takahara, M. N. Honjo and Z. Kawabata (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, **13**, 193–197.
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.*, **2**, 150088.
- Takahara T., T. Minamoto, H. Yamanaka, H. Doi and Z. Kawabata (2012) Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS ONE* **7**, e35868.
- 高原輝彦・山中裕樹・源 利文・土居秀幸・内井喜美子 (2016) 環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～. *日本生態学会誌*, **66**, 583–599.
- Tsuji, S., H. Yamanaka and T. Minamoto (2017) Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. *Limnol.*, **18**, 1–8.
- Turner, C. R., M. A. Barnes, C. C. Y. Xu, S. E. Jones, C. L. Jeered and D. M. Lodge (2014) Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods Ecol. Evol.*, **5**, 676–684.
- Ushio M., H. Murakami, R. Masuda, T. Sado, M. Miya, S. Sakurai, H. Yamanaka, T. Minamoto and M. Kondoh (2017) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *bioRxiv* 113472, doi:10.1101/113472.
- Yamamoto, S., K. Minami, K. Fukaya, K. Takahashi, H. Sawada, H. Murakami, S. Tsuji, H. Hashizume, S. Kubonaga, T. Horiuchi, M. Hongo, J. Nishida, Y. Okugawa, A. Fujiwara, M. Fukuda, S. Hidaka, K. W. Suzuki, M. Miya, H. Araki, H. Yamanaka, A. Maruyama, K. Miyashita, R. Masuda, T. Minamoto and M. Kondoh (2016) Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS ONE* **11**: e0149786.
- 山中裕樹・源 利文・高原輝彦・内井喜美子・土居秀幸 (2016) 環境DNA分析の野外調査への展開. *日本生態学会誌*, **66**, 601–611.

2. 魚類環境DNAメタバーコーディング：次世代シーケンサを用いた超並列多種分析システムの紹介

宮 正樹 (千葉博物館)

はじめに

ある水域の魚類群集の組成を明らかにするには、潜水観察をしたり漁具を使って魚を捕るなど、多大な労力と費用がかかるうえに長期間の調査が必要となる。さらに、日本産の魚類だけでも4,000種以上いるため、魚種の同定を行うためには高度に専門的な知識と経験が必要となる。「どこにどんな魚がいるのか?」というシンプルな問いに答えるのは容易なことではない。

魚類環境DNAメタバーコーディング法の登場

Miya et al. (2015) が開発した魚類メタバーコーディング (多種同時検出) の手法は、これまで魚類群集研究の足かせとなってきたこれらの障害を乗り越える画期的なものである。とくに、魚の体表の粘液や糞などとともに水中に放出されたDNA (環境DNA) を利用することで、バケツ一杯の水をくむだけで生息する魚種の概要を知ることができるようになったのは大きな成果である。

本手法の概要

環境DNAを用いたメタバーコーディングは、①採水；②フィルターを用いた水のろ過；③フィルター上からのDNA抽出；④ユニバーサルプライマーMiFishによる超可変領域 (ミトコンドリアの12S rRNA 遺伝子の断片約170 bp) の増幅とシーケンシングプライマーの付加 (1st

PCR)；⑤1st PCR産物に対するアダプターとインデックス配列の付加 (2nd PCR)；⑥次世代シーケンサMiSeqによる超並列シーケンシング；⑦出力されたデータの一次処理とその解析からなる。最近、フィルターがプラスチック製のカートリッジに封入されたステリボックスという製品を用いたろ過・抽出法がMiya et al. (2016) によって開発された。この手法を用いることにより、環境DNAで大きな問題となるコンタミネーションのリスクが大幅に軽減され、なおかつDNAの収量も多くなったことは特筆される。

次世代シーケンサの威力

次世代シーケンサMiSeqから出力されるデータの規模は想像を超えるもので、一昼夜のランで1500万リード (塩基配列) が得られる。しかも、上記の⑤で1st PCR産物に固有のインデックス (8塩基からなる配列) を付加することで、数百のサンプルを同時並行的に解析することができる。

この大量データに対して各種の一次処理を施した後に、リファレンス配列と比較することによって魚種の判別が行われる (リファレンス配列の充実度は世界の魚種3万数千種のうち7000種ほど)。また、サンプリングから実験までは数日間で行われ、コンピュータによるデータ処理や解析も数十分から数時間で終わる。

結論と展望

魚類環境DNAメタバーコーディングにより、これまで行われてきた魚類群集調査では得られない大規模なデータが、(実験設備さえ揃っていれば)誰でも簡便迅速に得られるようになった。環境DNAメタバーコーディングに基づく舞鶴湾の魚類群集解析に関する論文が今年になって出版されたが(Yamamoto et al., 2017), 調査はわずか1日で終わり、論文の筆頭著者は魚類の専門的知識を持ち合わせない昆虫の専門家である。

実際に得られたデータを魚類の専門家に見せると、「水の中を見てきたかのようなデータだ」と一様に驚きの声を上げる。この大規模で質の高いデータをどのように利用するかが今後の課題となる。データをとる時空間の規模を広げていけば、やがては魚類群集のダイナミクスの実態が明

らかになり、近未来の予報が可能になるのではないかと考える。

引用文献

- Miya, M., T. Minamoto, H. Yamanaka, S. Oka, K. Sato, S. Yamamoto, T. Sado and H. Doi (2016) Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *J. Visual. Exper.*, **117**, e54741.
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.*, **2**, 150088.
- Yamamoto, S., R. Masuda, Y. Sato, T. Sado, H. Araki, M. Kondoh, T. Minamoto and M. Miya (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Sci. Rep.*, **6**, 40368.

3. 環境DNAメタバーコーディングで観る魚類群集

山本哲史 (神戸大人間発達環境)

はじめに

海洋における魚類の調査には大変な労力が必要となる。例えば、漁網などの捕獲器具を用いる場合には、網の目合などによって捕獲される種にバイアスがかかりうるため、魚類相の網羅的な把握のためには網の種類を変えて何度も作業する必要があるだろう。また、そこで捕獲された魚の種同定には特別な知識が必要となる場合もある。

環境DNAメタバーコーディング法の検証

このような捕獲や目視による従来の魚類相調査における弱点を補完する手法として、場合によっては従来法の代替手法として魚類環境DNAメタバーコーディング法(魚類多種同時解析法)が注目されている。この方法は、DNAバーコーディングを環境DNAサンプルへ適用した手法で、バーコーディング領域と呼ばれるDNA領域の塩基配列をもとに生息魚類の種を明らかにする方法である。魚類環境DNAメタバーコーディング法で使われるユニバーサルプライマーの開発は国際的にも熾烈であり、その開発での競われる点は、「検出できる系統群の広さ」と「種レベルでの同定可能性」である。日本ではMiya et al. (2015) がMiFishプライマーを発表しており、現状では検出可能な系統群がもっとも広い。さらに、環境サンプルから得られた塩基配列と比較するためのリファレンスデータベースの整備も進んでおり、多くの魚種で種レベルでの同定が可能である。

しかし、このユニバーサルプライマーを用いたテストは野外の海域ではほとんどない。問題の1つは、テストの「正解」となる魚類リストが整備された野外の海域があまりな

い点である。そこで、本研究では、潜水目視による長期の魚類相観測データがある舞鶴湾に着目し、MiFishプライマーを用いた環境DNAメタバーコーディング法の調査効率を検証した(Yamamoto et al., 2017)。

方法

解析のための海水は、2014年6月18日に舞鶴湾西湾で得た。舞鶴湾西湾全体を網羅するため、採水地点は互いに約400 m離れた格子状に配置し、各地点で表層水をバケツで、海底付近の底層水をバンドン採水器で採取し、各1 Lを採水した。また得られた海水は、47 mmのGF/Fガラス繊維濾紙を用いて船上で直ちに濾過し、濾紙はDNA抽出まで

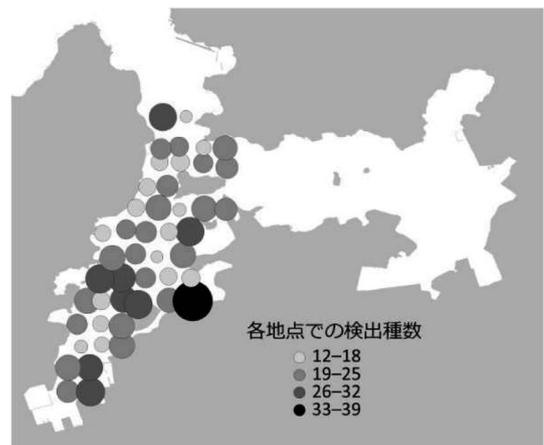


図1. 各地点での環境DNAによる検出種数。

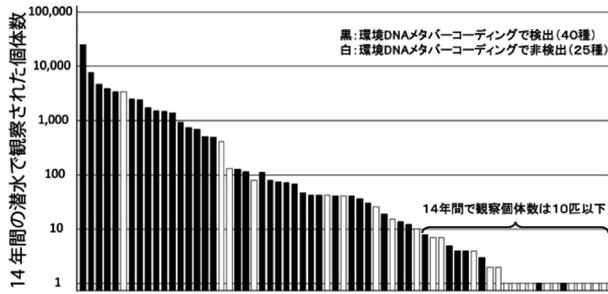


図2. 目視観察された種のなかでDNAでも検出した種。

冷凍保存した。実験室では濾紙からDNAを抽出し、MiFishプライマーを用いてメタバーコーディング用のライブラリを作成、MiSeqによる塩基配列の解析を行った。

結果

西湾全体で128種の魚類を検出した。河口に近い採水点で

は淡水魚を多く検出し、藻場付近では藻場に生息する魚種を検出するなど、各採水地点付近の環境に応じた魚類相が明らかとなった(図1)。これら128種の魚類は、益田玲爾氏(京都大学)による14年間の目視観測で観察した魚類の6割を含んでおり(図2)、さらに目視観測よりも種数が多い。また、本研究では西湾全体の採水を約6時間で終えたが、この6時間の調査は、目視調査14回分の検出効率となると見積もられた。

引用文献

- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwaksaki (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.*, 2, 150088.
- Yamamoto, S., R. Masuda, Y. Sato, T. Sado, H. Araki, M. Kondoh, T. Minamoto and M. Miya (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Sci. Rep.* 7, 40368.

4. 種の保全・資源管理へ向けた種内多様性の評価

山中裕樹(龍谷大理工)

はじめに

生物は同じ種であっても個体ごとにわずかに遺伝的に異なっており、これは種内の遺伝的多様性と呼ばれている。この種内多様性が高いほど、生息場所の物理化学的な環境の変化や感染症といったリスクへの個体群の耐久力があると考えられている。例えば特定の遺伝子型に偏った、つまり種内多様性が低い個体群では、ある感染症が蔓延した場合には多くの個体が死亡してしまうリスクが高くなったり、同じような環境選好性や行動をとる個体ばかりになって環境変化の影響を大きく受けるといったことが考えられる。こうした観点から、種の保全を考えるときには個体数だけではなく種内多様性もしっかりと把握しておくべき基礎情報であると言える。しかしながら、一般的な遺伝的多様性の調査手法では、対象生物を直接捕獲して組織を採取してDNA試料を得ねばならない。対象を捕獲したり、傷つけたりといったことが避けられない現行の手法は、希少な種に対してや、捕獲自体が困難な生物に対しては適用しにくい。

研究の目的

本研究は、環境水中に含まれる生物由来のDNA(環境DNA)を対象とする環境DNA分析を種内多様性の評価に利用するための技術開発を目的とした。これまで種の検出に利用されてきた環境DNA分析を、種よりもさらに細かな単位である個体群内の遺伝的多様性の解析へ拡張するこ

とが狙いである。DNA配列情報の読み取りには次世代シーケンサー(NGS)を使用した。出力されるデータの中にはPCRでの塩基取り込みエラーや塩基読み取り時の誤読に由来する多数の偽の塩基配列データが含まれていることが明らかとなった。これらの偽のデータ(実験過程で生成された、実際には元試料に含まれていない塩基配列データ)を実在する真のデータと区別するための解析技術の開発も同時に進めた。

方法

対象種はアユ(*Plecoglossus altivelis altivelis*)とし、ミトコンドリア上のD-loop領域の塩基配列の差異に基づいた遺伝型(ハプロタイプ)の分析が可能な検出系の開発を行った。まず、対象領域を環境DNA試料中から特異的に増幅するプライマーを新規に設計した。実験1では20尾のアユ仔魚を個別飼育し、各水槽から仔魚の組織試料と飼育水を採取し、個別にDNA抽出を行った。それぞれのDNAを前述のプライマーを用いてPCRに供し、塩基配列のサンガーシーケンスによってハプロタイプを決定した。実験2では、実験1で用いたアユの仔魚20尾分の飼育水を混合した水から環境DNAを抽出し、PCRのうち、NGSを用いた塩基配列の網羅的な読み取りを行った。PCR時には15回の反復を設け、それぞれの反復ごとに結果を独立に解析した。検出された各ハプロタイプの15反復における出現頻度、および既知の実

在するハプロタイプとの塩基配列の違い（類似度）を指標として、データの真偽の判別を試みた。

結果

実験1では、各個体から直接採取したDNAを分析したハプロタイプの情報とまったく同じ情報が飼育水に含まれていた環境DNAの分析から得られることを確認した。実験2では飼育個体のハプロタイプすべてが出現頻度15回で検出された一方で、多数の偽ハプロタイプがさまざまな頻度で検出された。また、各ハプロタイプの塩基配列を既知のハプロタイプと比較し、その類似度から各ハプロタイプの

データが真である予測値を求め、設定した閾値を超えたものを真データとした。結果、出現頻度と既知のハプロタイプとの塩基配列の違いに基づいたデータクリーニングによって偽ハプロタイプ全体の99%を除外できた。

本技術の利用と展望

環境DNA分析による種内多様性評価技術は資金的、そして時間的な制約を受けにくく、広域かつ長期的なモニタリングを実現する可能性が高い。希少種の保全や水産有用種の資源管理で活用すれば、より効果の高い施策の立案に貢献できると考えられる。

5. 大量シーケンスと標準DNAを利用した魚類環境DNAの網羅的・定量的モニタリング：京都府舞鶴湾での解析事例

潮 雅之 (JST さきがけ, 京大生態研)・村上弘章・益田玲爾 (京大フィールド研)・佐土哲也・宮 正樹 (千葉博物館)・櫻井 翔・山中裕樹 (龍谷大理工)・源 利文 (神戸大人間発達環境)・近藤倫生 (龍谷大理工)

はじめに

海洋生態系の保管理にはその海に生息する生物の種や数の記載といった「定量的な生物多様性モニタリング」が欠かせない。したがって、長期・高頻度・多種生物の定量的な時系列データは海洋保全において非常に価値の高いものである。しかしながら、そのような時系列データの取得には時間的・労力的・金銭的なコストが必要となる。

近年、魚の体表から剥がれ落ちるなどして水中に漂う魚由来のDNA（魚類環境DNA）を水サンプルから濾過し、それらからDNAを抽出して解析を行うことで、対象となる水域にいる魚を目視観察などに頼らず検出できる「環境DNA分析技術」が急速に発展してきた (Minamoto et al., 2012; Takahara et al., 2012; Miya et al., 2015)。環境DNA分析ではこれまでに定量PCRを用いた単一種・定量的な分析、もしくはIllumina MiSeqといった大量シーケンサーを用いた網羅的（多種）・定性的な分析のどちらかが行われてきた。しかしながら、効率的・より正確な海洋生態系のモニタリングのためには網羅的かつ定量的な分析方法の確立が欠かせない。

本研究では京都府舞鶴湾の魚類群集を対象に内部標準DNAと大量シーケンスを利用することで定量的かつ網羅的な環境DNAモニタリングを可能とする手法の開発を試みた (Ushio et al., 2017)。

材料と方法

まず、京都府舞鶴湾から週1回、1年分の海水濾過サンプル ($N=52$) を取得し、それらから環境DNAを抽出した。抽出

した環境DNAそれぞれにサンプル中には存在しない魚のDNA（本研究では東南アジア／アフリカ産の淡水魚の組織抽出DNA）を内部標準DNAとして濃度既知の状態です種類添加した (*Saurogobio immaculatus*, 500 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; *Elapichthys bambusa*, 250 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; *Carassioides acuminatus*, 100 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; *Labeo coubie*, 50 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$; *Acanthopsoidea gracilentus*, 25 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)。これにより、内部標準DNAのコピー数と検出される配列数の間の関係をサンプルごとに表現できる。その後、内部標準DNAを加えた環境DNAサンプルに魚類のユニバーサルプライマー (MiFish; Miya et al., 2015) を適用し12Sミトコンドリア領域を増幅し、さらにIllumina MiSeqによる配列解析のためのアダプター配列を付加した。構築したライブラリはMiSeq V2 Reagent Nano Kit for 2 \times 150 PEを使用し、網羅的に配列を読んだ。

結果と考察

MiSeqによる解析の結果、52サンプル中80%以上のサンプルで内部標準DNAのコピー数と検出配列数の間に決定係数0.9以上という良好な検量線（線形な関係）を描くことができた (図1)。本解析では52サンプルから合計70種以上の魚のDNAが検出されたが、それらの検出配列数を検量線を用いてDNAコピー数に変換した。その後、MiSeqによる定量結果を定量PCR法による定量結果と比較を行った。定量PCRはTaqManプローブ法を用い、舞鶴湾で特に優占するカタクチイワシを対象に解析した。その結果、MiSeqを用いて定量したコピー数は定量PCRを用いて定量したコピー数と有意な正の相関を示し、さらに多くの

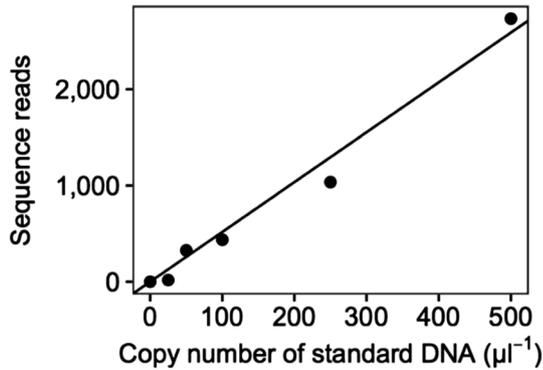


図1. 内部標準DNAのコピー数とMiSeqによる検出配列数の関係の例. このような検量線を52サンプルすべてについて描いたところ, 80%以上のサンプルで決定係数0.9以上であった.

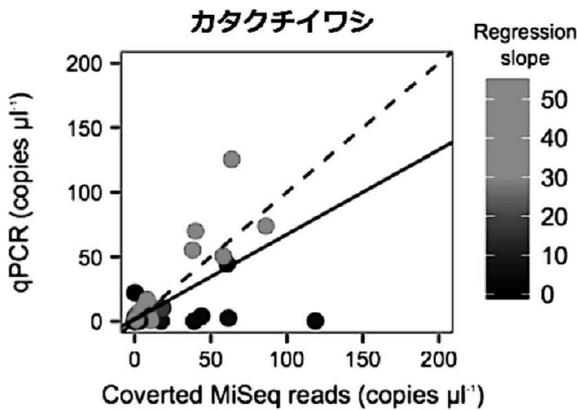


図2. 内部標準DNAのコピー数とMiSeqによる検出配列数の関係の例. x軸はMiSeqを用いて解析した「配列数」を検量線を用いて「コピー数」に変換した値 (Covered MiSeq reads). y軸は定量PCRでの測定値. 点線は1:1の関係を示し, 実線は線形回帰の結果を示す. 点の色は検量線の線形回帰の傾きを示す.

サンプルは1:1のラインに近い場所にプロットされた (図2). 一方, 一部のサンプルではMiSeqで定量した値に比べて定量PCRで定量した値が極端に低くなる場合が見られた (図2中の暗い点). これらは標準DNAを用いて描いた検量線の傾きが小さい点である場合が多く, これらのサンプルでPCR増幅阻害が起こっている可能性が示唆された. PCR増幅阻害が起こった場合, 定量PCRではDNAコピー数を過小評価してしまう可能性が高いが, MiSeqと標準DNAを用いた解析の場合は, 検量線の傾きとしてPCR増幅阻害の程度を考慮したうえでの定量が可能となっていると考えられた.

さらに, MiSeqと標準DNAを用いて測定したコピー数を時系列データとしてみても, 定量PCRで捉えられるものとはほぼ同じ時間的動態を再現することができた (図3). これらの結果から, MiSeqと標準DNAを用いた解析では, 従来の定量PCRと遜色ない定量性を示しつつ, かつPCR

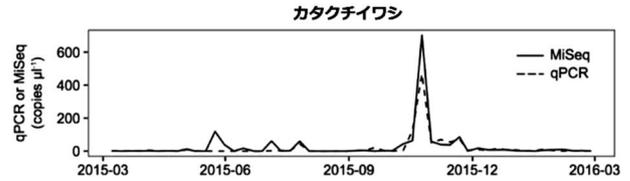


図3. 内部標準DNAとMiSeqにより定量したカタクチイワシ環境DNAコピー数の季節動態 (実線) と定量PCRによるカタクチイワシ環境DNAコピー数の季節動態 (点線). 両者は非常によく一致していた.

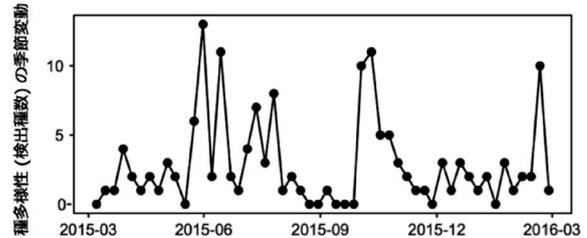


図4. 舞鶴湾で環境DNA解析によって検出される種数の季節変動. 同じ場所で長期的に行われている潜水目視観察による結果と一致する傾向を示している.

増幅阻害が起こるようなサンプルにおいてはより正確な定量が行えている可能性が示唆された.

また, MiSeqと標準DNAを用いた解析では, 多種の環境DNAを一度に解析できるため適切なDNAコピー数の閾値を設けることによって多様性の季節変動の解析も可能である. 例えば5 copies $\cdot\mu\text{l}^{-1}$ 以上の濃度でDNAが検出される魚種のみをカウントすることで舞鶴湾での出現魚種数の季節変動を描くことができる (図4). 多少の変動はあるが, 6–10月頃に高く冬場に低い傾向があり, この傾向は潜水目視観察による結果と一致している.

本研究により, 内部標準DNAを利用した大量シーケンス解析によって一度に多種の魚類環境DNA量を定量PCRと遜色ない精度で定量できることが示された. すなわち, 環境DNAサンプルを今回用いた手法を利用して解析することで多種・高頻度・長期かつ定量的な時系列データをこれまでと比べて低い労力で得ることができるだろう. 本手法は将来的には効果的・効率的な海洋保全・管理を達成するための基盤である海洋生態系モニタリングに利用できると考えられる.

引用文献

- Minamoto, T., H. Yamanaka, T. Takahara, M. N. Honjo and Z. Kawabata (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, **13**, 193–197.
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230

subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.*, **2**, 150088.
Takahara, T., T. Minamoto, H. Yamanaka, H. Doi and Z. Kawabata
(2012) Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA.
PLoS ONE **7**, e35868.

Ushio, M., H. Murakami, R. Masuda, T. Sado, M. Miya, S. Sakurai, H.
Yamanaka, T. Minamoto and M. Kondoh (2017) Quantitative moni-
toring of multispecies fish environmental DNA using high-through-
put sequencing. *bioRxiv* 113472, doi:10.1101/113472.

6. 環境DNAを通して観る北海道の水圏生物

荒木仁志・神戸 崇・水本寛基・鎌田祥子・南波聡子（北大院農）・宮 正樹（千葉博物館）

はじめに

北方圏は熱帯などと比べ、一般に生物相が希薄と考えられている。しかし、北方圏の生物は冬季に代表される厳しい環境と闘いながら、独自のユニークな進化を遂げてきた。その生活史や分布、行動や形態、適応様式は多岐にわたるが、通年にわたる野外調査は困難な場合が多く、これら生物の生態には未解明な点が多い。

近年演者らを含む日本人研究者グループを筆頭にさまざまな環境DNA研究技術の開発が進んでいる。環境DNAとは野生生物の環境媒体から得られるDNAのことで、水圏生物の場合は環境水由来のDNAを指す。通常、環境水中にはわずかな量のDNAしか含まれていないが、これらを効率よく回収・増幅し解析する最新の技術が環境DNA技術と言える。この技術を使えば、少ない労力で多くの地点において画一的な調査ができるばかりか、捕獲や目視に頼らず非侵襲的に客観的な生物相の情報が得られることが期待されている（Takahara et al., 2012; Miya et al., 2015 など）。

材料と手法

本研究では、演者の研究室で過去4年にわたり収集・保存した北海道の河川・沿岸水由来の環境DNAサンプルの一部について解析を行い、魚類をはじめ野生水圏生物のDNA検出を基に各調査対象種の分布や生物相を明らかにするとともに、その問題点や改良点の洗い出しを行った。

道内のサンプルの殆どはワットマン社製のGF/Fフィルターの形で同研究室に冷凍保存されている。これらのサンプルの多くは演者らにより収集されたものであるが、一部サンプルについては北海道水研や道総研・内水面水産試験場、栽培公社や複数のアセスメント系企業などの協力の下に収集されており、その数は数千に上る。

このフィルターよりDNAeasyキットを用いてDNA抽出を行った。抽出DNAを次世代シーケンサーで解析する場合は魚類ユニバーサルプライマー（Miya et al., 2015）を、定量PCRを用いてサケなどの特定種を対象とする場合は種特異的プライマーと専用プローブを用いて増幅を行い、可視化した。

定量PCR解析の場合は同研究室の所有するアジレント・テクノロジー社のMx3000Pを用いて、次世代シーケ

ンサー解析の場合は千葉中央博の所有するイルミナ社のMiSeqを用いて環境DNA解析を行った。

結果と考察

道内の環境水サンプルのほとんどすべてから何らかの生物由来のDNA検出が認められた。例えば千歳川では季節ごとに遡上・降河するサケマスDNA消長が季節性を見事に反映する形で認められるほか、河川のどこにいつでもどの種類の魚類が共存・生息しているかを反映する結果となった。また、海洋沿岸域においても環境DNAの検出が見られ、日本海側、オホーツク海、知床周辺、太平洋側といった北海道を取り巻く海洋の魚類相をうまく説明できる結果が得られている（荒木, 2017）。さらに、海洋深層水を解析したところ表層には普段見られない魚類の検出も見られ、水平方向のみならず垂直方向の魚類相解析にも本技術が応用可能である可能性を示した。

北海道内には多種多様なサケマス類が生息するほか、世界遺産である知床も抱え、陸圏・水圏を問わずユニークな生態系を形成している。上記の結果は、環境DNA技術がこれらの生態系モニタリングはもちろん、生態系維持メカニズムや希少種・外来種の分布解明に関して、大きな武器の一つとなる可能性を示唆している。

環境DNA技術はまだ新しく、未解明の点も多い。技術的にも日進月歩の状況にあるが、検出範囲や検出条件の検討、検出感度の向上といった課題が解決すれば、これまでとはまったく違う規模の野生生物管理が可能となることが期待される。

引用文献

荒木仁志 (2017) アクアネット。「環境DNA ～水から垣間見る魚類相と生物多様性～」湊文社、東村山、46-50。
Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.*, **2**: 150088.
Takahara, T., T. Miyamoto, H. Yamanaka, H. Doi and Z. Kawabata (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE* **7**: e35868.

7. 環境DNAから見る絶滅危惧種イトウの回遊行動

水本寛基・荒木仁志(北大農)・宮 正樹(千葉博物館)

研究背景

イトウ (*Parahucho perryi*) は河川生態系における高次捕食者で、日本最大の淡水魚である。本種はかつて北海道全域に分布していたが、河川開発などの影響を受け生息域が大幅に減少し、現在IUCNのRed ListにおいてCRに分類される絶滅危惧種となっている (Rand, 2013)。

別寒辺牛川水系は北海道東部に位置するイトウに残された数少ない安定生息地の一つである (Fukushima et al., 2011)。本水系においては、バイオテレメトリー等を用いたイトウの回遊行動における研究が行われてきた (Honda et al., 2012)。しかしこれらの先行研究は研究手法の特性上、イトウの捕獲が必須条件であるだけでなくサンプル数も限られてしまうため、本水系におけるイトウの普遍的な行動様式の解明には至っていない。またその行動様式の決定要因についても、これまでの知見と同様に水温変動の影響に言及するにとどまり、餌資源をめぐる生活史戦略については未解明のままである。

研究目的

本研究では、環境水中に含まれる水圏生物由来のDNAから標的生物の在・不在を検出する「環境DNA技術」を用いて、捕獲調査に頼らずにイトウの河川内分布の把握を試みた。また複数の魚種を同時かつ網羅的に検出する次世代シーケンサーによる解析と組み合わせ、「イトウの回遊行動は特定の餌資源の在・不在に連動して引き起こされている」という仮説の検証も行った。

研究方法

調査対象水域は別寒辺牛川水系および厚岸湖とし、四季を通じた調査を行うため、6, 8, 11, 2月に別寒辺牛川上流から河口部までの5地点、厚岸湖右岸・左岸の計7定点でサンプリングを行った。本水域は冬になると結氷するため、2月の調査においてはワカサギ釣り用のドリルで氷に穴をあけサンプリングを行った。

各定点で採集した環境水は北海道大学厚岸臨海実験所に持ち帰りその日の内に濾過を行った後、濾紙サンプルとして冷凍保存した。濾紙サンプルは北海道大学動物生態学研究室に持ち帰った後、DNA抽出キット (DNeasy, Qiagen社) でDNA抽出を行い、魚類用ユニバーサルプライマーであるMiFishプライマー (Miya et al., 2015) を用いてDNA解析領域のPCR増幅を行った。最後にIllumina社のMiSeqを

用いて魚種判別を行った。

結果と考察

イトウのDNAは厚岸湖左岸を除くすべての地点において検出されたが、1年を通してイトウのDNAが検出された地点は存在しなかった。また、先行研究においてイトウは夏季に高水温を避けるため上流で過ごすと言われていたが、各季節・地点における水温と検出されたイトウのDNAの量の間に関係性は認められなかった。

本調査において淡水域で23種、汽水・海水域で21種、合計44種の魚類が検出された。このうち淡水域で確認された15種についてはイトウの在・不在にかかわらず検出されたが、残りの8種についてはイトウのDNAが検出されたときのみDNAが検出された。また汽水・海水域では、6月の厚岸湖右岸においてのみイトウのDNAが検出された。

以上2つの結果から、イトウの回遊行動は従来の定説のように「水温変化に連動して起こる」というわけではなく「特定の餌資源の在・不在に連動して引き起こされている」可能性が示唆された。このことから「回遊性魚類の生態学的知見を非侵襲的に調査・追跡する道具」としての環境DNA技術の新たな可能性が示された。

また同様の調査を道内でイトウの分布が確認されている河川でも行うことで、イトウの在・不在が河川生態系に与える影響を評価できるようになることが期待される。

引用文献

- Fukushima, M., H. Shimazaki, P. S. Rand and M. Kaeriyama (2011) Reconstructing Sakhalin taimen *Parahucho perryi* historical distribution and identifying causes for local extinctions. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **140**, 1–13.
- Honda, K., H. Kagiwada, N. Takahashi and K. Miyashita (2012) Seasonal stream habitat of adult Sakhalin taimen, *Parahucho perryi*, in the Bekanbeushi River system, eastern Hokkaido, Jpn. *Ecol. Freshw. Fish.*, **21**, 640–657.
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J.Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwaksaki (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.*, **2**, 150088.
- Rand, P. S. (2013) Current global status of taimen and the need to implement aggressive conservation measures to avoid population and species-level extinction. *Arch. Polish, Fish.*, **21**, 119–128.

8. 環境DNAによる資源量推定に向けての水槽実験とフィールドでの検証

益田玲爾・村上弘章・高橋宏司（京大舞鶴水産実験所）・源 利文（神戸大人間発達環境）・宮 正樹（千葉博物館）

はじめに

環境DNA分析は、その感度の高さや効率性から、資源量推定に関わる従来の手法の欠点を大きく補うことが期待される。本技術を現場で応用するうえで必要となる基礎情報を集積するため、京大舞鶴水産実験所では水槽実験とフィールド調査を行ってきた。本稿ではこれらを概観する。

水槽実験

マアジに特異的なプライマーを用いて、環境DNAの定量性に関わる基礎的な実験を行った。500 Lの水槽に3尾のマアジを収容し、海水を表層・中層または底層から採取し、DNA量を測定したところ、中層の採水試料においてDNAの検出量は安定する傾向があった。そこで以下の実験では、水槽の中央付近の中層からの排水をDNAの定量に用いることにした。

水槽に1, 3, 10または30尾のマアジを収容し、DNA量を測定した（堀内, 2016）。検出されるDNA量は、水槽内の個体密度に応じてほぼ直線的に増えた。

続いてDNA放出量の日周性について調べた（福本, 2015）。200 l水槽に5尾のマアジを収容し、無給餌下で0, 6, 12および18時に4日連続で採水した。同様の採水を舞鶴水産実験所の棧橋でも行った。水槽内では採水時刻間で検出量に違いが認められなかった。しかし棧橋では、18時の採水において12時よりもDNAの検出量が有意に多かった。このことから、マアジの移動や摂餌等の日周性を反映してDNAの検出量が増えるものと考えられた。

さらに、異なる魚種を収容した際のDNA放出量について調べた（村上ほか, 未発表）。マアジとシマアジを単独または混合で収容した場合、両魚種間で環境DNA放出量に差は認められなかった。また両魚種を混合した条件下でDNA量が減ずることもなかった。

生簀実験

生簀にシマアジを収容し、ここから1, 10, 30, 100, 300, 600および1000 mの地点で採水することにより、DNAの分散範囲を推定した（村上ほか, 2016）。生簀の除去後にも採水を行った。シマアジのDNAは生簀に近い採水地点ほど検出量が多く、全体の90%程度は30 m以内から検出された。生簀の除去から1時間後にもDNAは検出されたが、2時間後以降は検出されなかった。

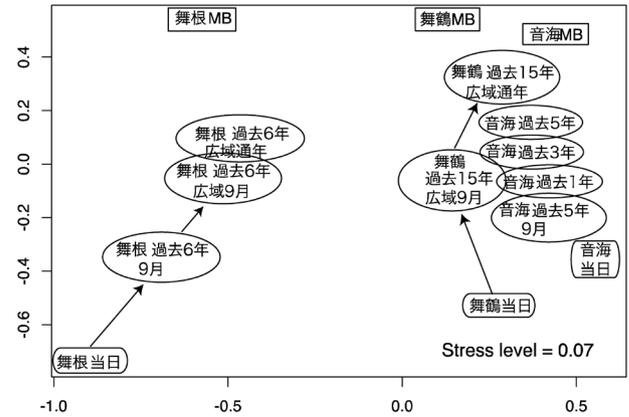


図1. 環境DNAメタバーコーディングと潜水目視調査結果とをBray-Curtis指数により比較し非計量多次元尺度（nMDS）で配置した。メタバーコーディングの結果を四角で、当日に目視記録された魚類群集を角丸四角で、周辺海域を含めた長期の目視データを楕円で囲った。

潜水目視調査との対応

京都府舞鶴湾、福井県高浜町音海、および宮城県気仙沼市舞根湾において、潜水目視調査を継続して行っている（Masuda et al., 2016など）。これらの地点で採水した試料について環境DNAを抽出し、MiFishを用いたDNAメタバーコーディングを試みた（益田ほか, 未発表）。各地点で検出された魚類群集は、当日の目視調査記録よりもむしろ、それぞれの地点および近隣で過去に長期にわたり記録された魚類群集と類似した（図1）。また、気仙沼舞根では顕著に冷水系の魚種が多いなど、調査地点の水温に対応した魚類が検出された。

考察

種特異的プライマーを用いた実験では、環境DNAを用いた海産魚の生物量推定が十分に可能であることが示された。一方、受精卵から成魚にいたるまでのバイオマスあたりの環境DNA放出量についても、資源量推定の現場で本技術を用いるうえでは不可欠な情報である。また、繁殖や被食といった生活史イベントにおいて多量のDNAが放出される可能性も検討する必要がある。

ユニバーサルプライマーを用いた環境DNAメタバーコーディングでは、広域かつ長期にわたる潜水目視調査の結果と類似した情報が得られた。このことは、本手法が持つ検出力の高さを示すものである。今後、参照配列のデータベースを充実させることにより、本手法は水産学や海洋学の現場で急速に普及するものと期待できる。

引用文献

- 堀内智矢 (2016) 環境DNAを用いた海産魚類の生物量推定に関する基礎的研究. 京都大学修士論文.
- 福本 想 (2015) マアジ (*Trachurus japonicus*) が排出する環境DNA量の日周変化と季節変化. 京都大学修士論文.
- Masuda, R., M. Hatakeyama, K. Yokoyama and M. Tanaka (2016) Recovery of coastal fauna after the 2011 tsunami in Japan as determined

- by bimonthly underwater visual censuses conducted over five years. PLoS ONE 11: e0668261.
- 村上弘章・尹 錫鎮・笠井亮秀・源 利文・山本哲史・坂田雅之・堀内智矢・澤田英樹・益田玲爾 (2016) 沿岸海域における環境DNAの分散過程に関する生簀を用いた検証実験. 平成28年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 35.

9. 流動モデルを用いた環境DNA濃度分布の再現

笠井亮秀・尹 錫鎮 (北大院水産)

はじめに

近年の環境DNA技術の発展はめざましく、ある水域に生息する魚類のメタバーコーディングが行われたり (Miya et al., 2015)、生物量の推定が行われたりするようになった。しかし、開放系である海域で環境DNAから生物量を正確に推定するためには、生物から海水中に放出されたDNAが、どのように輸送・拡散されるかを把握しておかなくてはならない。本研究では、内湾域の詳細な物理環境を再現できるモデルを開発し、それによって得られた流動場を用いて、観測された環境DNA分布・濃度の再現を試みた。

方法

2014年6月18日に、舞鶴湾において魚探を用いたマアジの分布と環境DNA濃度の調査が行われた (Yamamoto et al., 2016)。そこでマアジの分布密度 (と魚市場からの流出)

をもとにDNAを放出させ、その後のDNAの輸送・拡散をシミュレーションした。

物理モデルはPOMを基にした σ -coordinateモデルであり、外洋側の境界条件は若狭湾モデルのネスティングによって決定している。気象条件として舞鶴特別地域気象観測所で観測された値を用い、伊佐津川ほか8河川から淡水を流入させている。モデルによって得られた水温、塩分の値を湾口部と湾中央部南側で観測された値と比較したところ、両者がよく一致したことから、このモデルは舞鶴湾の物理環境をよく再現できるものと判断した。

室内実験の結果を基に、マアジからのDNA放出量は 1.2×10^6 copies day⁻¹ ind⁻¹とし、海中に放出された後は0.66 day⁻¹の割合で分解されるものとした。

結果と考察

実験を行った6月18日は、上層では湾外に流出し、下層では湾内に向かって流入するという、エスチュアリー循環が形成されていた。表層では西湾で環境DNA濃度が高く東湾で低かった (図1)。これは西湾奥に存在する魚市場から多量のマアジDNAが流出しているためである。一方下層では、表層よりは東西間の濃度差が小さく、湾口部で低く湾奥部で高いという結果が得られた。これは湾外から環境DNA濃度の低い外洋水がエスチュアリー循環によって湾内下層に流入するためである。そして、シミュレーションによって得られた結果と観測結果を比較したところ、両者はよく一致した。

結論

池や湖のような閉じた水域では、環境DNA濃度が生物量を反映しやすく、これまでにフィールド調査に基づく数多くの成果が得られている。それに対し海洋は基本的には開放系であり、放出されたDNAは流れに乗って輸送・拡散される。そのような場合でも、流動場を正確に再現できれば、魚の分布密度から環境DNAの分布を再現できることが、本研究により示された。これにより、環境DNAの分

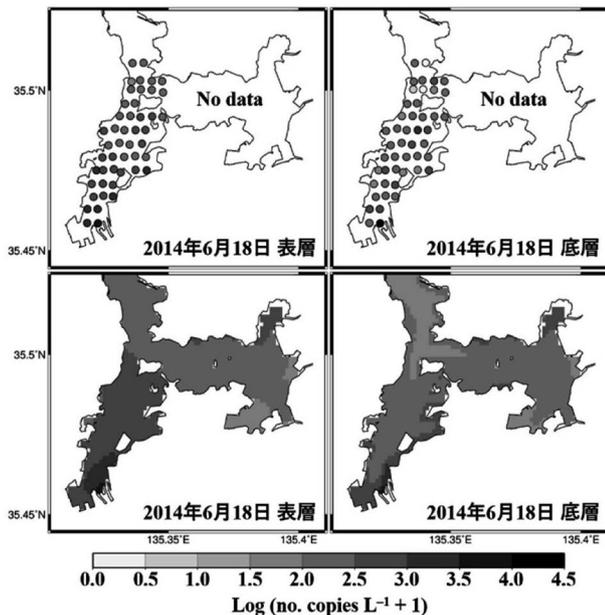


図1. 観測 (上) とシミュレーション (下) によるマアジ環境DNAの分布.

布から魚の量を知る道筋が得られた。

引用文献

Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.*, **2**, 150088.

Yamamoto, S., K. Minami, K. Fukaya, K. Takahashi, H. Sawada, H., Murakami, S. Tsuji, H. Hashizume, S. Kubonaga, T. Horiuchi, M., Hongo, J. Nishida, Y. Okugawa, A. Fujiwara, M. Fukuda, S. Hidaka, K. W. Suzuki, M. Miya, H. Araki, H. Yamanaka, A. Maruyama, K., Miyashita, R. Masuda, T. Minamoto and M. Kondoh (2016) Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS ONE*, **11**: e0149786.

10. 環境DNAによる魚類の個体数推定の可能性 統計モデルによる統合的アプローチ

深谷肇一 (統計数理研究所)

はじめに

個体数は最も基本的な生態学的変数の1つであり、その推定は水産学や生態学、野生生物管理学などにおいて根本的な問題である。野外に生息する生物の数を見積もることは多くの難しさがあるものの、個体数を推定するための標準的な調査法として捕獲再捕獲法、除去法、ライントランセクト法、区画法などが知られており、これらの方法に基づく推定の手続きと調査計画には多くの研究がなされている。しかしながら、こうした古典的な方法による個体数推定ではいずれも個体の目視や捕獲が必要であり、要求される調査努力量は大きくなりがちである。

環境DNAの分布はどう決まるか？

これまでの研究により、水中の環境DNA濃度が生物量と関連する場合があることが示唆されている。しかしながら、開放系である野外生態系においては一般的に両者の関連は条件依存적であると予想される。環境DNA濃度を手がかりに背景にある個体数を推定するためには、少なくとも環境DNAの時空間分布の成り立ちを考慮することが必要になるだろう。環境DNAの時空間分布を決定する要因としては、DNAの放出源となる生物の密度分布に加えて、DNAの生成、移流・拡散、分解の各過程が考えられる。

環境DNAによる個体数推定のアプローチ

本研究では環境DNAを用いた個体数推定法として、対象海域を離散的なメッシュに分割して環境DNAの濃度をシミュレートする「トレーサーモデル」を用いて、その入力値に相当するメッシュごとの個体数を逆問題として解くアプローチを提案する。環境DNAの単位時間あたり・個体あたりの放出率や分解率、シミュレーションを行う期間の物理条件が定まれば、トレーサーモデルは個々のメッシュにおける個体数の関数として環境DNAの濃度分布を予測できる。そこで、対象海域をカバーする複数の地点で環境DNA濃度を測定し、トレーサーモデルによって環境DNA

データを最もよく説明できる個体数分布を統計的に推定することを考える。

舞鶴湾のマアジ個体群への適用

舞鶴湾のマアジを対象として、上記のアプローチによる個体数推定を試みた。2016年6月21日から22日にかけて、舞鶴湾内の100測点において採水調査を行った。採水は各測点で表層、中層、底層の3つの深度で行い、マアジに特異的なプライマーを用いた定量PCRにより、各サンプルに含まれるマアジ由来の環境DNAの濃度を測定した。こうして得られた環境DNAのデータに対して、同時期の舞鶴湾における環境DNAの移流・拡散をシミュレートするトレーサーモデルを当てはめて舞鶴湾内のマアジの個体数を推定した。環境DNAの放出率および分解率は水槽実験から得られた値を用いた (Jo et al., *in press*)。

また、環境DNAから推定された個体数を検証するためのデータとして、同時期に計量魚群探知機による個体数推定を行った。採水調査と同じ日に、採水地点を結ぶ測線で38 kHzおよび120 kHzの音響反射強度データを取得した。周波数差を用いた判別法によりマアジの反応を特定し、舞鶴湾内のマアジの個体数を求めた。

調査時期のマアジの大きさを3 cm、重量を1 gと仮定すると、環境DNAから推定された湾内のマアジ個体数は7013万 (95%信用区間: 5120万–9815万) と推定された。ただし、舞鶴漁港の近傍で見つかった極めて密度が高く推定されたメッシュは魚市場からのDNAの流入を反映したものと考えられる (Yamamoto et al., 2016)。そこで、このメッシュを除いて湾内の個体数を推定したところ、5672万 (95%信用区間: 2615万–9060万) と推定された。一方、計量魚群探知機によるマアジの推定個体数は3600万であった。市場の影響を考慮した場合の環境DNAから推定された個体数は計量魚群探知機による推定の1.6倍程度であり、またその95%信用区間は魚群探知機による推定値を含んでいることから、環境DNAによる推定値は計量魚

群探知機の推定値に極めて近いと結論できる。

結論と展望

本研究では、環境DNAの生成、移流・拡散、分解に関する情報と環境DNAの時空間分布データを統合して、対象海域における魚類の個体数を推定するアプローチを提示した。個体数分布を入力として環境DNAの分布を予測するモデルが得られていれば、個体数の推定値は環境DNA濃度データを所与とした逆問題の解として得ることができる。こうした個体数推定の手続きがあれば、環境DNAを水産資源評価のための新しいツールとして利用することができるかもしれない。トレーサーモデルは、あるメッシュに存在する環境DNAがどのメッシュに由来するものであ

るかを明らかにすることができるため、環境DNAのサンプリング計画を事前に検討するうえでも有用である。

引用文献

- Jo, T., H. Murakami, R. Masuda, M. Sakata, S. Yamamoto and T. Minamoto (in press) Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Mol. Ecol. Res.*
- Yamamoto, S., K. Minami, K. Fukaya, K. Takahashi, H. Sawada, H. Murakami, S. Tsuji, H. Hashizume, S. Kubonaga, T. Horiuchi, M. Hongo, J. Nishida, Y. Okugawa, A. Fujiwara, M. Fukuda, S. Hidaka, K. W. Suzuki, M. Miya, H. Araki, H. Yamanaka, A. Maruyama, K. Miyashita, R. Masuda, T. Minamoto and M. Kondoh (2016) Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS ONE* 11: e0149786.

11. 水産の立場から環境DNAへの期待

中田 薫・小林敬典 (水研機構)

はじめに

2011年より開始されたJSTのCREST「海洋生物多様性の保全・再生に資する基盤技術の創出 (生物多様性領域)」では、海洋の生物多様性と生態系を把握するためにさまざまな先進的計測技術が開発されてきた。本研究集会でも報告されているように、生物多様性領域の「環境DNAに基づく魚類群集の定量モニタリングと生態系評価手法の開発」においても多くの成果が得られてきた。一方、本年4月に策定された新たな水産基本計画では、資源管理の高度化・拡充とそのため資源評価の精度向上が強く打ち出された。このため、「新たな解析手法」の導入等により資源評価の精度向上を図ることが、戦略的に推進すべき調査・研究・技術開発課題に位置づけられたところである。ここでは、資源評価の高精度化に焦点をあて、「新たな解析手法」としての環境DNAの可能性とその活用の際して解決すべき課題について述べる。

資源評価・資源研究への環境DNA適用への期待

通常、資源評価や資源研究で必要となる魚類試料は、ターゲットとなる種類やその発育段階、分布特性や行動特性等に応じてさまざまな漁具や手法を使い分けて採集される。これに対し、環境DNAを用いた解析では基本的には海水を採取すればよく、漁船やボランティアシップによる採水や自動観測機による時系列採集なども活用して時空間的に広い範囲から多数の試料を容易に得ることが可能である。また、NGSの速い進化により、分析時間やコストの大幅削減が可能となった。さらに、コンピューター能力の増大やMitoFishなどのデータベースの構築、digital DNAチップ

などの周辺技術の開発・整備により、環境DNAを水産資源の調査・研究に適用することのハードルは大きく下がりがつつある。

環境DNA解析では生態系を構成するさまざまな生物に関わる情報を取得することが可能である。新たな水産基本計画では、沿岸種で漁獲の落ち込みが激しい資源評価未実施種を資源評価の対象に加えることを検討するとしている。環境DNA解析は、これまでのデータ蓄積が少ないことが想定されるこうした種類の分布や出現情報の蓄積に役立つと考える。また、気候変動の影響が顕在化する中で、資源変動メカニズムの解明は古くて新しい課題となっている。気候変動の影響は生態系全体に及び、資源変動には魚どうしの種間関係が重要との解析結果もある。しかし、これらについての研究の多くが個々の資源と環境要因の関係の把握や、個々の種と環境要因との関係の比較にとどまっている。環境DNA解析の導入により、気候変動に伴う生態系全体の変動を把握して変動メカニズムに迫る情報を効率的に得ることができると期待する。

環境DNA活用の課題

資源評価等で環境DNAを活用する場合には、主要な魚種の定量性の確保は避けては通れない課題である。また、環境DNAデータ解析結果そのものを主要な資源評価のツールとするのか、既存手法の精度を上げるための補完的なデータとするのか、さらには相対的な変動を捉えてメカニズム研究に用いるのか、ほかの計測手法との比較を行い、その状況を踏まえて判断し活用することになるだろう。

また、資源評価や資源研究に必要な試水を採取し、それ

ぞれの試水から多種多様な生物のDNAデータを取得すると、それはまさにビッグデータの世界である。個々の研究者レベルで対応できる課題ではなく、組織あるいは省庁レベルで対応すべきこととなるが、大量のデータを蓄積し、インフォマティクでなくとも必要な生物情報を抽出・活用でき、さらにそれらと海洋環境データや、数値モデルによる再解析値等と合わせて解析できるようなデータベースの構築・維持と解析ツールなど必要なシステムを開発・整備することが重要となる。

12. 環境DNAを利用した水産生物観測にむけて

近藤倫生（龍谷大理工）

はじめに

生物資源管理には、資源となる生物の量や分布、齢・サイズ構成といった資源情報の把握が欠かせない（クラーク, 1989; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997）。水産資源の管理のため、日本では漁獲統計や捕獲等に基づく様々な方法で生物資源情報の収集・資源評価が行われ、資源管理に活用されてきた（水産庁・水産総合研究センター, 2017; <http://abchan.fra.go.jp/index.html>, 2017年7月31日）。漁獲や観測から得られた資源情報は、資源評価報告書として取りまとめられ、漁獲可能量（TAC）設定など資源の適切な管理に活用されている（水産庁増殖推進部, 2017）。

環境DNA技術とは、環境水中に含まれる生物由来のDNAを分析することで生態系情報を得ようとする技術をさす（源ほか, 2016; 高原ほか, 2016; 山中ほか, 2016）。ここ数年の間に、環境DNA技術は大きく発展しており、魚類をはじめとする生物の存在判定はもとより、生物量の推定、生物相の把握等への活用が進んできた。

観測とスケール：気象観測に学ぶ

魚のような大型の生物を対象とした環境DNA技術はまだ歴史が浅い。したがって、この技術が、生物資源管理において、今後どのような役割を担うようになるかはまだ不透明である。それはきっと、技術の発展や改善とともに提案・テストされ、今後、次第に明らかになっていくと想像される。それでも、環境DNA技術の開発やその活用をこれから進めようとする者にとって、今後の見通しを持っておくことは有益であろう。そこで本稿では、生物資源観測とは異なる、他分野の環境観測において、どのような観測手法がいかんして活用されているかを概観することで、生物観測における今後の環境DNA技術の展開を占ってみたい。

着目するのは気象観測である。気象観測の分野では、国

おわりに

水産分野における環境DNAの活用は資源評価や資源研究に限ったものではなく、赤潮予測や魚病予測、漁場環境保全等の機能探索への活用等に関する研究が進められてきた。ここ数年のゲノム関係の技術の進歩を考えれば、水産分野における環境DNAの解析技術や解析で得られた情報の活用範囲は、今後大きく広がるものと期待される。

際的な基準に基づいて気象観測データが継続的に収集されており、情報通信網を通じてリアルタイムで国内及び世界の国々に配信され、また気象予報等の社会活動と密接に関わりながら活用されている（石原・津田, 2012）。気象観測は、将来の生態系観測システムを構築する上で、ひとつの優良な「お手本」と言えるかもしれない。

気象観測の手法は多様である（http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/kansoku/weather_obs.html, 2017年7月31日）。日本では、全国1300地点に設置された地域気象観測システム観測（アメダス）網において、降水量以外にも、観測点によって風向・風速・気温・日照時間などの基礎的情報を自動的に得る仕組みが構築されている。また60地点の気象台・測候所では、観測者の目視により、視程・現在天気・大気現象などのより詳細なデータも併せて収集されている。さらに、全国20地点に設置された気象ドップラーレーダー観測網は全国をカバーする雨・雪の分布や強度、風向や風速の観測を可能にしているし、さらに広域の大気現象をカバーするため、観測気象衛星によって、可視光から目に見えない赤外線までのさまざまな波長帯の電磁波を利用した観測も行われている。

この気象観測における観測手法の多様性は、大気現象の時空間スケールの多様性をカバーするのに役立っている（<http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/whitep/1-1-2.html>, 2017年7月31日）。ひと口に大気現象といっても、そのスケールは一定ではない。例えば、水平スケールが数千kmにもおよぶ高気圧・低気圧といった現象から、水平スケールが一回り小さい台風や前線、さらに小さい数十～数百kmスケールの現象である積乱雲や積雲、数kmのスケールで生じる竜巻やダウンバーストまで、スケールには大きな幅がある。これらの大気現象を把握するには、特有の異なる水平分解能や観測高度に対応した観測手法が必要とされる。

生物観測における環境DNA観測の位置づけ

では、水産生物観測で利用される諸手法はどのようなスケールで特徴付けられるだろうか。ここでは、潜水目視・トロール網・音響計測の3つの主要観測手法に着目し、時空間スケールと解像度、生物情報の細かさに注目してその特徴を概観してみたい（国土交通省水管理・国土保全局河川環境課, 2016; <http://abchan.fra.go.jp>, 2017年7月31日）。

3つの生物観測手法の中でも最も空間解像度が高いのは潜水目視であろう。これは潜水者による直接観察なので、非常に高い空間解像度での生物個体の位置特定、種の判別や詳細な行動の観察を可能にする。しかし、観測できる場所に制限が生じるし、潜水時間の制限を受けるため長期・多地点の観測には向かないだろう。潜水目視は、限られた時空間範囲で種特定をしたり、詳細な行動情報を得たりする手段に位置づけられると思われる。より広域（数百m～数km）での種組成調査には、トロール網等を利用した捕獲調査がある（藤原ほか, 2008）。しかし、この手法では、トロール網の曳網距離（数百～数千m）以下の解像度では捕獲位置を特定できないし、大規模な調査に伴う大きな人的・時間的・経済的コストが必要になるという制限がある。音響を利用した計測には、それに比べるとずっと高い空間解像度の情報を取得できる利点がある（海洋音響学会, 2004）。しかし、この手法では、生物を直接に観察するわけではないので、種判別や体長といった生物情報の取得に難しさがある。

既存の生物調査手法と比較したとき、環境DNA調査には現場での「省労力・省時間性」という、非常に大きな優位性がある。しばしば「バケツ一杯の水」を用いた調査と呼ばれるように、調査海域での作業は採水のみなので、環境DNA調査は容易に多数回の実施が可能で、その結果として多地点・高頻度での調査が可能となるのである（Yamamoto et al., 2016）。さらに、DNA配列情報の種特異性に基づく、高い分類解像能、多種網羅性も環境DNA調査の重要な特徴である（Miya et al., 2015）。メタバーコーディングの手法を利用すれば、一度の採水から多数回の潜水調査に匹敵する多数の種検出が可能となる（Yamamoto et al., 2017）。そして、これらの優位性の帰結として、環境DNA調査は、これまでの調査にはない「ビッグデータ性」を生物調査にもたらすことになる。

環境DNA調査の省労力・省時間性、あるいは多種網羅性といった有利性は、DNAを用いた間接的観測であることから生じているが、その弱点もまた観測が間接的であることから生じる。第一に、生物由来のDNAは、水の動きに連れて移流・拡散するので一回の採水調査がカバーする空間範囲が不明確になりがちである（Yamamoto et al., 2016）。海のような水が複雑に動く水域では、「バケツ一杯の水」が反映する空間範囲も一定ではなく、時とともに大きく変動してしまう可能性がある。第二に、時間解像度に

も不明確さがある。水槽実験による分解速度推定実験から、環境DNAは過去数日くらいの情報を持っていると考えられるものの、これも環境条件によって変動するものと想像される（Tsuiji et al., 2017）。だが、環境DNA調査の間接性に由来するこれらの不確実性も、同一地点における調査の回数を増やすことである程度解決できるかもしれない。コンタミネーションに伴う偽陽性の問題も、調査地点や回数を増やすことで異常値として検出できるようになることが期待される。

これからの展開

環境DNA観測網が構築されれば、数百～数千種にも及ぶ生物種を網羅した、広域の多地点時系列データが得られるようになるだろう。このような、我々が今まで手にしたことのないデータによって、生物資源管理のあり方は大きく変わるだろう。第一に、広域多地点調査によって、これまでにない精度での生物分布情報、もしくは生物の移動・回遊情報が得られるようになるだろう。その結果、資源量・分布把握が容易になり、資源管理の精度も大きく上昇するだろう。第二に、連続採水による時系列データが得られることで、生物資源動態の背後にあるプロセスに関する情報が得られる可能性がある。なぜなら、時系列データには、要素間の相互作用や因果関係に関する情報が含まれるためである。

環境DNA観測に基づく生物資源管理システムの構築のためには、乗り越えるべき課題は多い。第一に、広域多地点での観測を連続的に行うためには、その精度を維持する観測システムの構築が不可欠である。生物情報のシステムティックな取得を可能にする全国への採水調査地点の設置、試料水分析の効率化と同時に、取得データの質を保証する認証システムの構築が必要となる。第二に、高精度の生物情報は、漁獲効率の上昇を通じて、生物資源の適切な利用を今よりもさらに困難にってしまうかもしれない。高精度の生物資源情報の公開範囲や取り扱いに関するルールづくりが必要になるだろう。第三に、環境DNAデータに基づく研究のためには、生態系大規模データを解析するための新たな理論的ツールの開発が進展する必要がある。持続的な環境DNA観測の体制づくり、それを支える科学技術開発への支援、観測データの適切な活用法の設定の三者が一体となって進むことが期待される。

引用文献

- クラーク, C. W. (田中昌一監訳) (1989) 「水産資源管理論：生物経済モデルと漁業管理」, 恒社厚生閣, 東京, 300 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (1997) FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries No. 4.: Fishery Management. FAO, Rome, 82 pp.
- 藤原邦浩・宮嶋俊明・山崎 淳・藪本 隆 (2008) 底魚類の資源量推定のための桁曳網調査の操業実態と曳網距離. 京都府立海

- 洋センター研究報告, **30**, 13–20.
- 石原正仁・津田敏隆 (2012) 「シリーズ新しい気象技術と気象学：最先端の気象観測」. 東京堂出版, 東京, 176 pp.
- 海洋音響学会 (2004) 「海洋音響の基礎と応用」. 成山堂書店, 東京, 314 pp.
- 国土交通省水管理・国土保全局河川環境課 (2016) 平成28年度版河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル【ダム湖版】. 国土交通省水管理・国土保全局河川環境課.
- 源 利文・山本哲史・笠井亮秀・近藤倫生 (2016) 環境DNAを用いた沿岸域における魚類モニタリング. 沿岸海洋研究, **53**, 173–178.
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.*, **2**, 150088.
- 水産庁増殖推進部 (2017) 我が国周辺水域の漁業資源評価 平成28年度. 水産庁増殖推進部.
- 水産庁・水産総合研究センター (2017) 平成28年度国際漁業資源の現況. 水産庁・水産総合研究センター.
- 高原輝彦・山中裕樹・源 利文・土居秀幸・内井喜美子 (2016) 環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心に～. *日本生態学会誌*, **66**, 583–599.
- Tsuji, S., M. Ushio, S. Sakurai, T. Minamoto and H. Yamanaka (2017) Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS ONE*, **12**, e0176608.
- Yamamoto, S., K. Minami, K. Fukaya, K. Takahashi, H. Sawada, H. Murakami, S. Tsuji, H. Hashizume, S. Kubonaga, T. Horiuchi, M. Hongo, J. Nishida, Y. Okugawa, A. Fujiwara, M. Fukuda, S. Hidaka, K. W. Suzuki, M. Miya, H. Araki, H. Yamanaka, A. Maruyama, K. Miyashita, R. Masuda, T. Minamoto and M. Kondoh (2016) Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS ONE*, **11**, e1249786.
- Yamamoto, S., R. Masuda, Y. Sato, T. Sado, H. Araki, M. Kondoh, T. Minamoto and M. Miya (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Rep.*, **7**, 40368.
- 山中裕樹・源 利文・高原輝彦・内井喜美子・土居秀幸 (2016) 環境DNA分析の野外調査への展開. *日本生態学会誌*, **66**, 601–611.