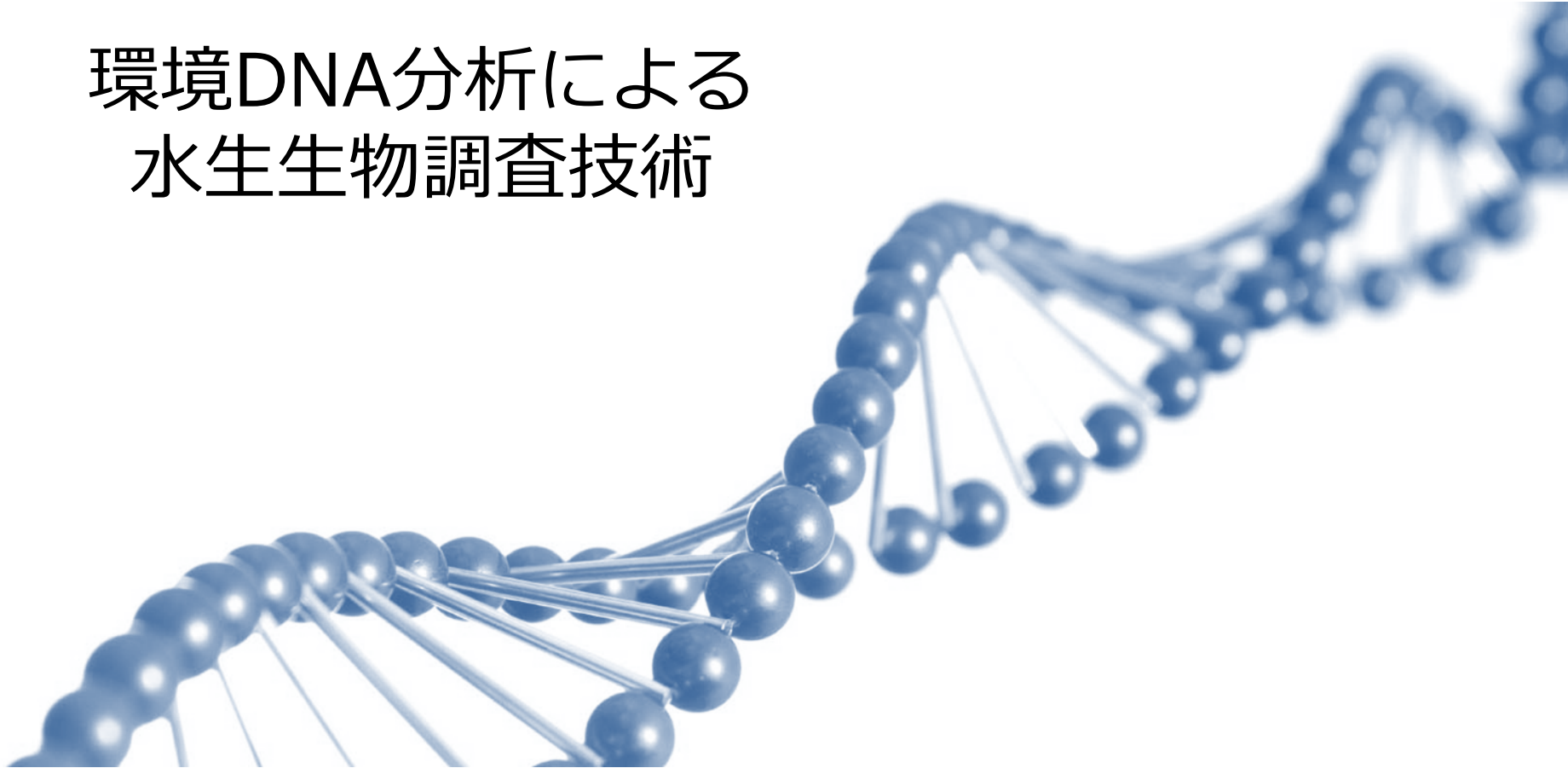




環境DNA分析による 水生生物調査技術



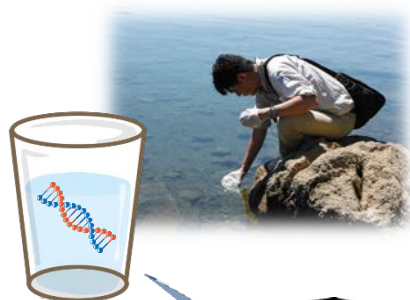
P R O D U C I N G
T H E F U T U R E

1. 環境DNA分析とは？

環境DNA：生物の体の外に放出されたDNA
(糞、粘膜、死骸、脱落した体表組織等に由来)

水中には、水域に生息（生育）する生物に由来するDNAが浮遊している。

【環境DNA分析による水生生物調査】



1. 採水

- ・環境水に含まれるDNAを捕捉



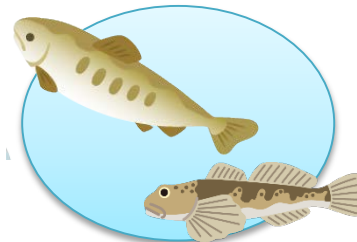
2. DNA分析

- ・定量PCR装置/シーケンサーによるDNA解析



3. 生息種の判定

- ・得られたDNA情報から生息種を推定



(背景：designed by Brgfx - Freepik.com)

2. 環境DNA分析の2つの方法

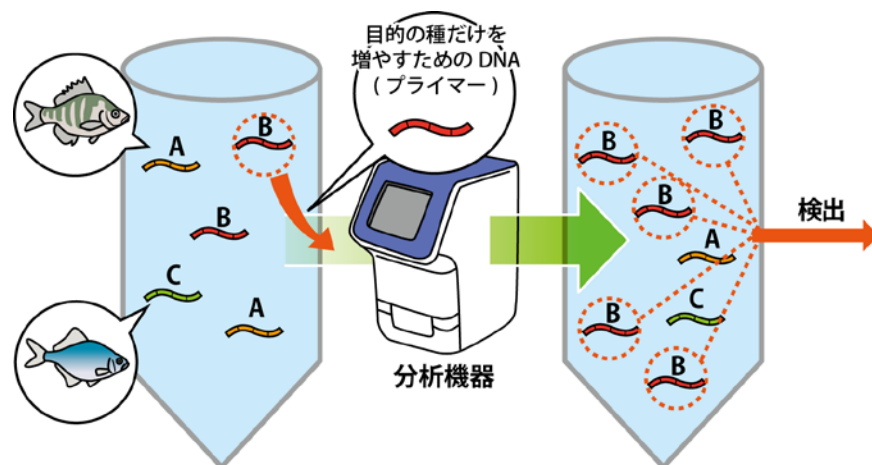
(1) 定量PCR法

特定の種の生息状況を知りたい場合は定量PCR法 (qPCR) が優れている

(1) 検出力が高い。

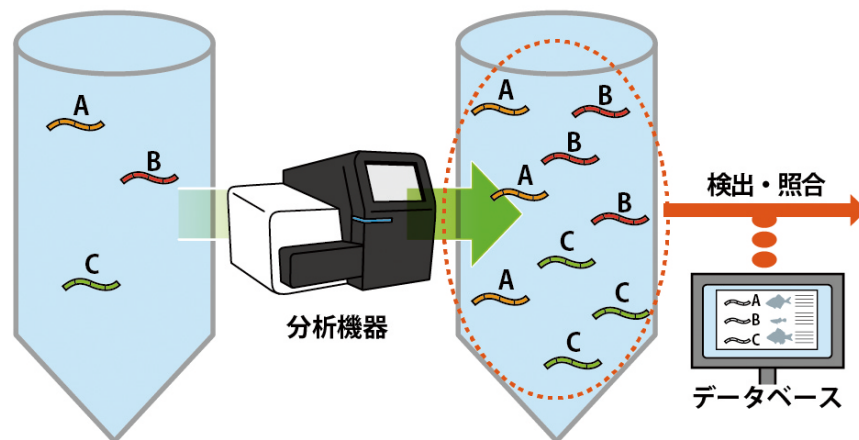
(2) eDNA濃度の定量評価が可能。

⇒対象生物の個体数・生物量を評価できるか？



(2) メタバーコーディング法

その場所にどんな種が生息するか、**全種を網羅的に確認したい場合**には次世代型シーケンサーを用いたメタバーコーディング法が有効



3. プライマー

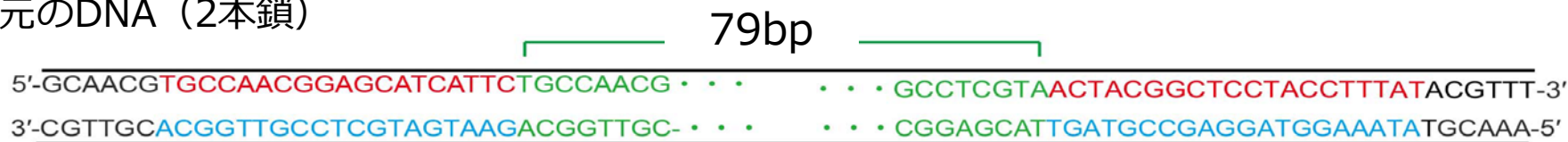
ウシガエル (*Rana catesbeiana*) を検出するプライマー

ターゲット : mtDNA cyt- b 領域 (79塩基対)

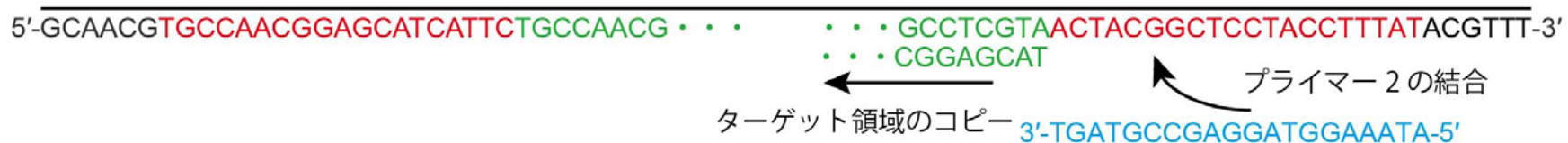
プライマー1 : 5'-TGCCAACGGAGCATCATTC-3'

プライマー2 : 5'-ATAAAGGTAGGAGCCGTAGT-3'

●元のDNA (2本鎖)



●1本鎖に開裂し、それぞれを鋳型にして、プライマー結合位置からターゲット領域をコピー



4-1. 希少・外来甲殻類の調査への利用

ニホンザリガニ（環境省RL:絶滅危惧II類）



川の上流域の沢に生息し、石の下に隠れているため調査が難しい。

※生息確認には時間やコストがかかる。

※石おこし等の方法は生息地を攪乱することになる。

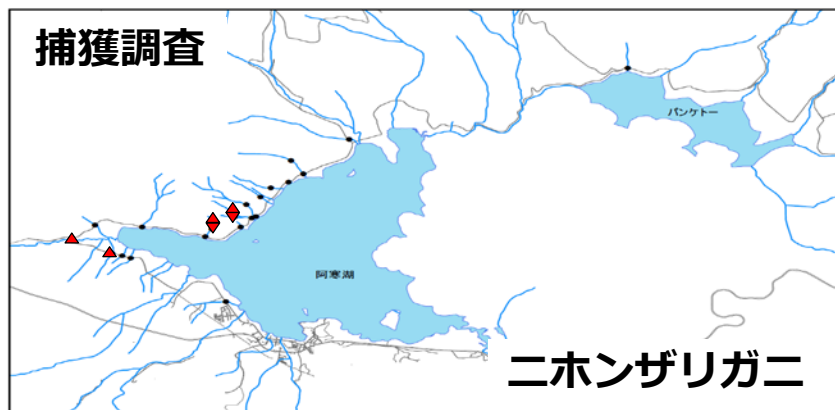


- 従来の調査方法と、環境DNA分析（定量PCR法）による結果を比較
⇒ 環境DNA分析の調査能力を評価
- ニホンザリガニの脅威（捕食・病原菌の媒介）となっている**外来種ウチダザリガニ**も合わせて調査

- ・場所：44箇所（北海道東部）
- ・方法①（従来の手法）：石おこし等の目視・捕獲調査（30分）
- ・方法②（環境DNA分析）：調査地で1 L 採水し、両種の環境DNAを分析

4-2. 希少・外来甲殻類の調査への利用

結果：捕獲調査と環境DNA分析で得られた分布情報



4-3. 希少・外来甲殻類の調査への利用

調査結果

ニホンザリガニ		環境DNA調査		計
		検出	非検出	
捕獲調査	確認	6	0	6
	未確認	14	24	38
計		20	24	44

- ・ニホンザリガニは6地点で捕獲。
- ・6地点全てでニホンザリガニのDNAを検出。

- ・捕獲確認できなかった38地点のうち、14地点でニホンザリガニのDNAを検出。
- ・捕獲調査では確認できなかった地点にも生息している可能性を示唆。

ウチダザリガニ		環境DNA調査		計
		検出	非検出	
捕獲調査	確認	17	0	17
	未確認	22	5	27
計		39	5	44

- ・ウチダザリガニは17地点で捕獲。
- ・17地点全てでウチダザリガニのDNAを検出。

- ・捕獲確認できなかった27地点のうち、22地点でウチダザリガニのDNAを検出。
- ・捕獲調査では確認できなかった地点にも広範に生息している可能性を示唆。

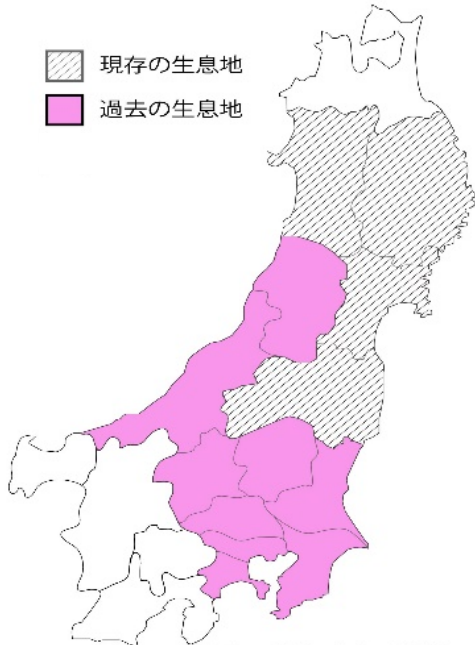
⇒環境DNA分析により、より精密な分布情報が得られる可能性が示された。

5-1. 希少淡水魚類調査への利用

ゼニタナゴ（環境省RL, 秋田県：絶滅危惧IA類）



■ 現存の生息地
■ 過去の生息地



出典：レッドデータブック2014
-日本の絶滅のおそれのある野生生物-

※東北地方、関東地方、新潟県など1都11県に分布していたが、生息環境の消失、オオクチバス等の外来魚の侵入により生息地が大幅に減少。現在では、東北地方の4県のごく一部でのみ確認。

※本来の生息環境である大河川で生息が確認されているのは、現在、雄物川のみ。

ただし、近年における雄物川における本種の確認記録は以下の2例に留まる

- ①平成17年10月 成魚1個体を確認
- ②平成26年11月 産着卵を確認

●ゼニタナゴの生息地調査

延長約120kmと調査範囲が広大、生息情報がほとんどない状況で、効率的に生息地を絞込む手法として環境DNA調査を提案。

5-2. 希少淡水魚類調査への利用

- 雄物川の河口部～上流部にかけて
合計99地点で採水
- 8/8～10（3日間）で実施

調査結果

- ・2ヶ所でゼニタナゴのDNAを検出
⇒DNAを検出した2ヶ所で採捕調査を実施
- ・DNAが検出された2ヶ所中1ヶ所で、
ゼニタナゴの成魚雌雄を採捕

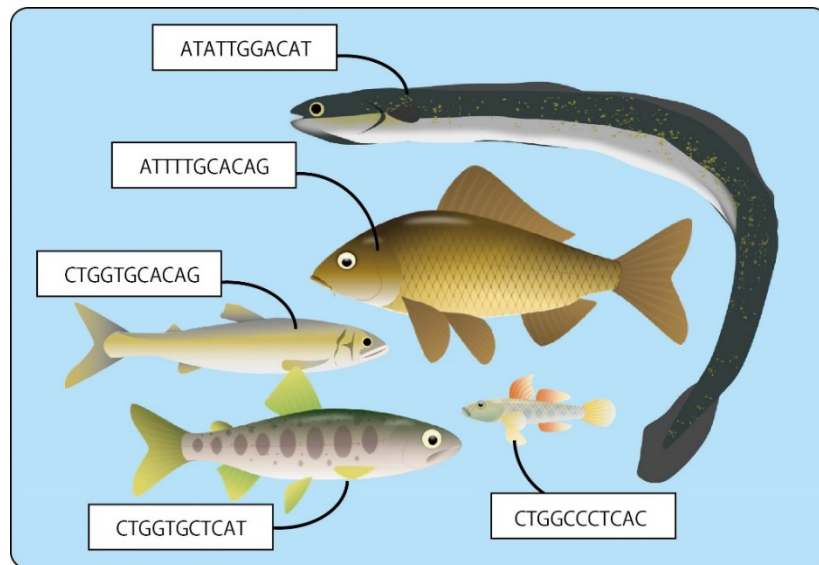


雄物川における自然繁殖を直接確認した初めての記録となった

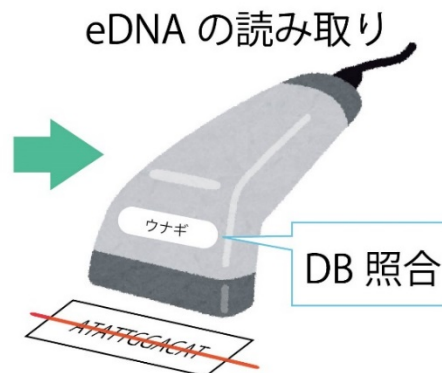
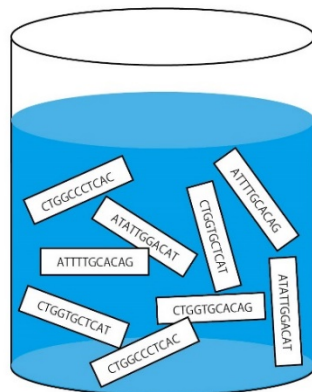


採水地点

6-1. メタバーコーディング法



採水



メタ・バーコーディング法
=環境DNA多種同時検出法

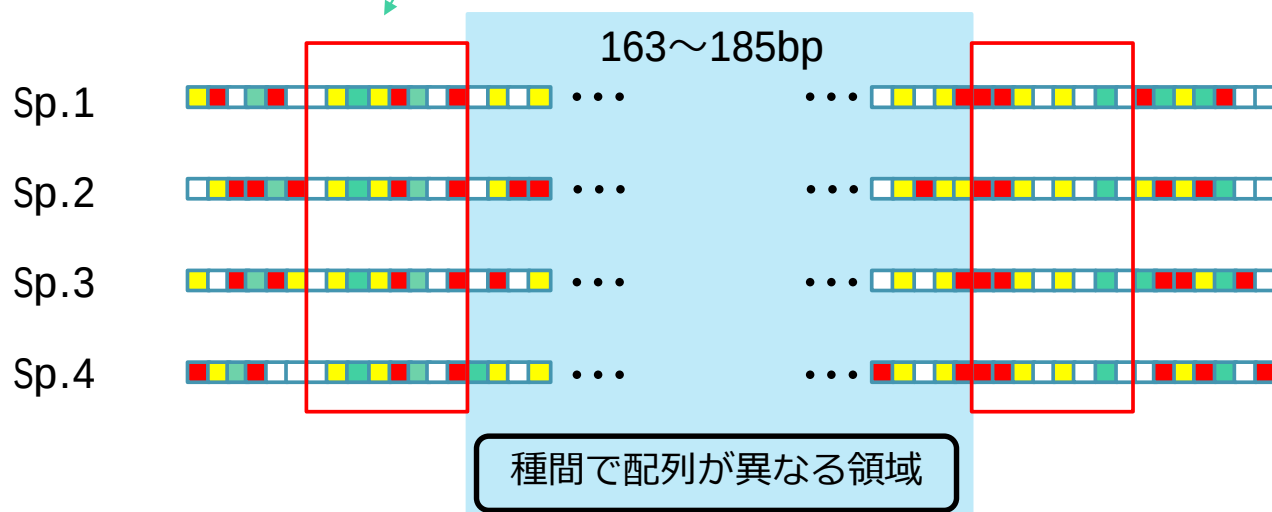
環境水には多様な生物のDNAが含まれている。



サンプル中の複数種のDNAを同時に分析して、含まれる全種のDNAを判定

6-2. メタバーコーディング法

ユニバーサル・プライマー結合領域
(種間で共通の配列領域)



○メタバーコーディング法の場合は、対象分類群（例えば魚類）全種の共通配列領域を増幅し、その後、それぞれのDNA断片の塩基配列をシーケンサーで読み取る。

○プライマーで挟まれた領域の塩基配列は種間で異なることから、この領域の塩基配列を読みとり、DBで照合することで種を特定する。

採水サンプルの濾過
eDNA抽出

ライブラリー作成

シーケンス
※塩基配列の読み取り

データ解析
※得られた塩基配列
情報をDBで照合し種
を特定

6-3. メタバーコーディング法

種名	ユニバーサル領域に挟まれる領域の塩基配列
ニゴロブナ	CACCGCGGTTAGACGAGAGGCCCTAGTTGATATTACAACGGCGTA AAGGGTGGTTAAGGATAACAAAAATAAAGTCAAATGGCCCCTT GGCCGTCATACGCTTCTAGGCGTCCGAAGCCCTAATACGAAAGTA ACTTTAATAAACCCGCCTGACCCACGAAAGCTGAGAAA
ゲンゴロウブナ	CACCGCGGTTAGACGAGAGGCCCTAGTTGATATTACAACGGCGTA AAGGGTGGTTAAGGATAACAAAAATAAAGTCAAATGGCCCCTT GGCCGTCATACGCTTCTAGGCGTCCGAAGCCCTAATACGAAAGTA ACTTTAATAAGCCCACTGACCCACGAAAGCTGAGAAA
コイ	CACCGCGGTTAGACGAGAGGCCCTAGTTGATATTACAACGGCGTA AAGGGTGGTTAAGGATAGACAAAAATAAAGTCAAATGGCCCCTT GGCCGTCATACGCTTCTAGGAGCCCGAAGCCCTAATACGAAAGTA ACTTTAATAAACCCACCTGACCCACGAAAGCTGAGAAA

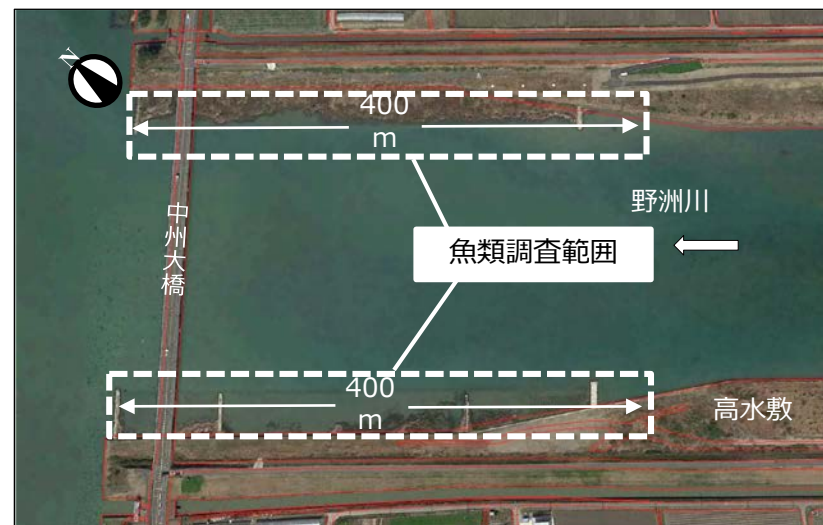
7-1. メタバーコーディング分析の利用事例

自然再生事業（ヨシ帯の再生事業）での事例

●滋賀県野洲川河口で、**多様な魚類の生息・繁殖の場**として利用されるヨシ帯の再生事業が行われた。

●事業の効果を検証するためのモニタリング調査が継続している。

●環境モニタリング（魚類の生息・生息の場）の手法として、**環境DNA分析（メタバーコーディング法）**が従来の捕獲調査に代替できる調査手法となるかを検討



調査地点

【方法】

従来の捕獲手法（河川水辺の国勢調査準拠）で確認される魚種と、環境DNA分析で確認される魚種を、夏季・秋季の2期調査を実施して比較。

7-4. メタバーコーディング分析の利用事例

(1) 確認種の比較（種数）

水国No.	種名	夏季		秋季		2季	
		環境DNA	捕獲	環境DNA	捕獲	環境DNA	捕獲
1	コイ	○	●	○	●	○	●
2	ゲンゴロウブナ	○		○		○	
3	ニゴロブナ	○		○		○	
4	キンギョ	○		○		○	
	フナ属		●		●		●
5	ヤリタナゴ				●		●
6	カネヒラ	○	●	○	●	○	●
7	ハス	○		○	●	○	●
8	オイカワ	○	●	○	●	○	●
9	カワムツ			○		○	
10	モツゴ	○	●	○	●	○	●
11	ビワヒガイ			○		○	
12	タモロコ			○		○	
13	ゼゼラ	○				○	
14	カマツカ	○		○	●	○	●
	カマツカ属			○		○	
15	ズナガニゴイ			○		○	
16	コウライニゴイ	○	●	○	●	○	●
	ニゴイ属		●		●		●
17	コウライモロコ	○		○		○	
	スゴモロコ類	○	●	○	●	○	●
18	ドジョウ	○				○	
	ドジョウ属	○		○		○	
19	アジメドジョウ			○		○	
20	シマドジョウ属			○		○	
21	ナマズ	○		○	●	○	●
22	アユ		●	○	●	○	●
23	ビワマス			○		○	
24	オヤニラミ	○		○		○	
25	ブルーギル		●	○	●	○	●
26	オオクチバス		●	○	●	○	●
27	コクチバス	○		○		○	
28	ウキゴリ			○		○	
29	イサザ	○				○	
	ウキゴリ属		●				●
30	ヨシノボリ属	○	●	○	●	○	●
31	ヌマチチブ	○	●	○	●	○	●
	ハゼ科		●				●
32	ドンコ			○		○	
33	カムルチー	○	●		●		●
計	34種	24種	14種	30種	17種	32種	18種

調査手法	夏季	秋季	2季 合計
捕獲調査	14種	17種	18種
環境DNA分析	24種	30種	32種



●環境DNA分析は、捕獲調査に比べて、
より多くの種を検出した
※環境DNA分析で検出できなかった種
はヤリタナゴのみであった

⇒環境DNA分析は、琵琶湖沿岸、流入
河川の中～下流域に生息する魚種を網
羅的に検出できた。

7-3. メタバーコーディング分析の利用事例

(2) 検出種群の比較

環境DNA分析によって、いずれの分類群でも捕獲調査と同程度もしくはそれ以上の種数を検出 ⇒ 検出が苦手な種群はみられなかった

分類群(科)	夏季		秋季		合計		内容
	環境DNA	捕獲	環境DNA	捕獲	環境DNA	捕獲	
コイ科	12	7	15	10	16	10	
コイ科 (ドジョウ類)	1	0	3	0	3	0	
ナマズ科	1	0	1	1	1 ^b	1 ^b	b. ナマズ
アユ科	1	1	1	1	1 ^d	1 ^d	d. アユ
サケ科	0	0	1	0	1 ^e	0	e. ビワマス
ケツギョ科	1	0	1	0	1 ^f	0	f. オヤニラミ
サンフィッシュ科	3	2	3	2	3 ^g	2 ^h	g. オオクチバス、コクチバス、ブルーギル h. オオクチバス、ブルーギル
ハゼ科	4	3	3	2	4	3	
ドンコ科	0	0	1	0	1 ⁱ	0	i. ドンコ
タイワンドジョウ科	1	1	1	1	1 ^j	1 ^j	j. カムルチー
合計	24種	14種	30種	17種	32種	18種	-

7-4. メタバーコーディング分析の利用事例

(3) 希少種・特定外来種の 確認状況

No.	種名	捕獲調査	環境DNA	選定基準		
				環境省 RL	滋賀県 RDB	外来 生物法
1	コイ	○	○	LP ^{注2}	希少 ^{注2}	
2	ゲンゴロウブナ		○	EN	希少	
3	ニゴロブナ		○	EN	希少	
	フナ属	○※		注3	注3	
4	ヤリタナゴ	○		NT	危増	
5	カネヒラ	○	○		危増	
6	ハス	○	○	VU	希少	
7	ヌマムツ				分布	
8	モツゴ	○	○		希少	
9	ビワヒガイ		○		希少	
10	ゼゼラ		○	VU	希少	
11	ズナガニゴイ		○		危増	
12	コウライニゴイ	○	○		要注	
13	ドジョウ		○	DD	要注	
14	アジメドジョウ		○	VU	希少	
15	ナマズ	○	○		要注	
16	アユ	○	○		分布	
17	ビワマス		○	NT	要注	
18	ブルーギル	●	●			特定
19	オオクチバス	●	●			特定
20	コクチバス		●			特定
21	イサザ		○	CR	危惧	
22	ドンコ		○		その他	
計	重要種	8種	17種	—	—	—
	特定外来生物	2種	3種			

【希少種】

調査手法	夏季	秋季	2季 合計
捕獲調査	5種	8種	8種
環境DNA分析	12種	14種	17種

⇒環境DNA分析は、捕獲調査と比べて、
希少種の検出能力に優れている

【特定外来生物】

調査手法	夏季	秋季	2季 合計
捕獲調査	2種	2種	2種
環境DNA分析	3種	3種	3種

⇒環境DNA分析は、捕獲調査と比べて、
特定外来種の検出能力に優れている

8-1. 舞鶴湾（内湾）における環境DNA分析の事例

京都府北部の舞鶴湾において、1日で合計47地点で採水を実施（図1）。

調査結果

- ・ 合計128種の魚類のDNAが検出された。
- ・ 環境DNA分析で検出した種には、過去14年間に140回行われた潜水調査で観察されていた80種の魚類の、6割余りが含まれていた。
- ・ 14年間で合計10個体未満しか確認されていない稀な魚種を除くと、環境DNA分析により、1日の採水試料から、過去14年の目視調査で観察された種の8割を検出できた（図2）。

8-2. 侵略的外来種オニヒトデ類の検出

オーストラリアの沿岸で、周期的に大発生するオニヒトデ類の潜水目視センサスと環境DNA分析を実施。

⇒環境DNA濃度とオニヒトデ類の密度には相関がみられることから、大発生の早期把握モニタリングツールとして有用であると考えられる。

8-3. ベニザケの産卵期における環境DNAの変動

アラスカの河川で、ベニザケの産卵期に個体数の目視観察と環境DNA分析を実施。
⇒環境DNAの増減パターンは目視観察による個体数の増減パターンと良い相関を示した。

8-4. 深海のトロール調査

グリーンランド沖の深海でトロール調査による捕獲結果と環境DNA分析（メタバーコーディング分析）による検出種を比較
⇒26科の種が共通に確認された。（トロール調査で確認されたがeDNAで確認されなかった種群は2科のみ。）

8-5. ロボットによる定点リアルタイム分析

デンマーク工科大学は、Environmental Sample Processor (ESP) を魚類の環境DNA分析装置に特化させ、連続モニタリング調査を開始した。
⇒採水・分析の自動化の試みも始まっている！

9. 解決すべき課題

現状では環境DNAの水理動態について基礎的な知見が不足している

- A) 環境DNAの起源（どのような状態の個体から放出されている？）
- B) 環境DNAの状態（どのような大きさの粒子？）
- C) 環境DNAの輸送（どのように運ばれてくる？）
- D) 環境DNAの分解・減耗（環境中で、どのくらい維持される？）

基礎的な性質を明らかにすることで、環境DNA分析のデータが示す情報の意味を、より明確にしていく必要がある。