# 環境DNA学会 The eDNA Society NEWSLETTER





# Contents

# 2020年1月 発行 No.2

子云反矢授	1
近藤倫生 (学会長、東北大学大学院生命科学研究科 教授)	
第2回環境DNA学会神戸大会開催報告	
大会実行委員会からのお礼とご報告 源 利文 (大会長、神戸大学大学院人間発達環境学研究科 准教授)	2
大会概要報告	3
第2回公開シンポジウム「環境DNA技術の活用〜社会実装に向けて〜」	
◆ 開催報告	···· 4
◆参加者の声「社会実装への期待!」 池田幸資、真木伸隆、上月佐葉子 (パシフィックコンサルタンツ株式会社)	5
参加者の声「公開シンポジウムで感じたこと」 井戸基博 (龍谷大学理工学部 学部生)	6
自由集会開催報告 「オール北海道:北海道を舞台にした環境DNA研究」	
◆ 企画者報告	···· 7
◆参加者の声「環境 DNA で分かってくる北海道の自然」	8
「環境DNA技術における基礎研究の現状と展望」	
◆企画者報告 徐寿明(神戸大学大学院人間発達環境学研究科博士後期課程)	8
◆参加者の声「迷って決めた自由集会」	9
「NGSを用いた、環境DNA解析におけるメタバーコーディングの有用性」	
◆企画者報告 ····································	· 10
◆参加者の声「第2回環境 DNA 学会神戸大会:自由集会に参加して」 本澤大生 (一般財団法人 三重県環境保全事業団調査部 技師)	· 11
ポスター賞受賞者要旨集・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	· 12

#### その他学会活動報告

環境省「MiFishによる種の識別に注意を要する淡水魚類リスト」の公開	13
2019年全国技術セミナー	13
環境 DNA 研究最前線 (第 2 回) 公益財団法人かずさ DNA 研究所 紹介	15
山川 央 (かずさ DNA 研究所 ゲノム事業推進部臨床オミックス解析グループ 研究員)	
環境DNA学の今(第1回)	
MiFishプライマーを用いた魚類環境DNA研究の最新動向 - 1: 海外の研究グループによって明らかにされたMiFishプライマーの高い種検出能力	17
宮 正樹 (千葉県立中央博物館 生態・環境研究部長)	
編集あとがき・環境 DNA 学会 理事・監事/編集委員一覧	23
2018年度 環境 DNA 学会事業報告	24

# 学会長挨拶

近藤倫生(学会長、東北大学大学院生命科学研究科 教授)

環境 DNA 学会が2018年春に設立され、もう一年半が経ちました。学会設立当初は、文字通りゼロからのスタートでした。事務局の体制づくりや各種委員会の設置、年中行事や会員向けサービスの企画、各種行政機関との連携等、学会のあり方や立ち位置を模索したのが懐かしく思い出されます。それが今では、おかげさまで300名近い会員の皆様の参加を得るまでに成長し、その活動がニュースや新聞などでも報道されるなど、社会的な注目もますます高まっています。日頃より学会活動を支えてくださっている会員の皆様に、心より感謝申し上げます。

この一年半の間、環境DNA学会は学会内外で幅広い活動を積極的に推進して参りま した。東京(2018年9月)と神戸(2019年11月)で開催された2度の学会大会には、いず れも300名を超える皆様のご参加をいただきました。そこでは環境 DNA 科学における 最新の知見が共有されるとともに、環境DNA技術の社会実装をめぐる情報交換、今後 の発展方向をめぐる活発な議論がなされました。2019年4月には、環境 DNA 技術の普 及を目指し、標準版「環境 DNA 調査・実験マニュアル」を公開致しました。マニュアル 公開のフォローアップとして全国7会場で開催された環境DNA技術セミナーには150 名を超える会員の皆様のご参加をいただき、また、このマニュアル作成をきっかけとし て現在では、行政による環境DNA調査マニュアル作成や標準化業務にも学会として積 極的な協力を進めているところです。この他にも、船の科学館「海の学びミュージアム サポート」による支援のもと進められた、日本科学未来館との連携事業では、科学に興 味を持つ子供達への教育活動にも取り組みました。また国外に目を向けますと、国連 環境計画活動 NOWPAP(北西太平洋地域行動計画)を担う環日本海環境協力センター (NPEC) との協力のもと、環境 DNA 技術を国際的海洋観測に活かす計画を進めていま す。2021年度には環境 DNA に関する国際シンポジウムの日本開催が企画され、さらに 標準化委員会では、英語版「環境 DNA 調査・実験マニュアル」の作成が大詰めを迎え ています。これらの活動は、今後の新たな国際的連携やリーダーシップの発揮に展開し ていくことが期待されます。

環境DNA技術が改善され、実際に様々な場面で利用されるようになり、いよいよその社会実装が迫ってきたと感じています。各省庁や関連研究機関においては環境DNA研究・業務が熱心に進められ、また、科学の現場でも、国内外の研究機関や実験施設が連携して環境DNA観測網が構築されつつあります。このような動きから、向こう数年の間に環境DNA観測データが大量に蓄積されることが予想されます。かつてのヒトゲノム計画の例を引き合いに出すまでもなく、環境DNA観測に基づく大量の生データ蓄積は、これまでにない精度での生態系状態把握や将来予測といった、環境DNA観測データの新しい活用技術の誕生・発展を促すことになるでしょう。そしてこの技術発展が環境DNAデータの価値を高めることで、さらなる観測体制の充実、環境DNAに関する市場の拡大に繋がることが期待されます。

今後の加速が期待される環境 DNA 科学・技術の発展の中で、当学会への期待や果た すべき責任はこれまで以上に大きくなっていくでしょう。この環境 DNA をめぐる社会

第 2 回環境 DNA 学会神戸大会開催報告

的・学術的な動きを牽引し、「人類全体の幸福のための環境DNA技術の発展への貢献」 という学会のミッションを果たしていけるように尽力して参ります。会員の皆様のご協 力を是非ともよろしくお願い致します。

# 第2回環境 DNA 学会神戸大会開催報告

# 大会実行委員会からのお礼とご報告

源 利文 (大会長、神戸大学大学院人間発達環境学研究科 准教授)

このたび環境DNA学会の第2回大会を神戸大学鶴甲第2キャンパスを会場として開 催させていただきました。幸いなことに天候にも恵まれ、公開シンポジウムのみの参加 者をあわせ約300名の方がご参加くださいました。昨年の第1回大会と比べると立地の 面などから参加者が減ることも想定していたのですが、同程度の参加者を得ることがで き、環境DNA学の発展と分野としての定着を実感しています。

本大会で印象的だったのは参加者の熱気です。公開シンポジウムでは総合討論が大変 に盛り上がり、中身の濃い議論ができました。また、高校生がフロアから堂々と質問す るなど、この分野の今後のさらなる広がりを予感させてくれました。ポスターセッショ ンでは、ライトニングトークの効果もあってか、2時間という長いコアタイムの間、ポ スターの前から人が途切れることがなく白熱した議論が展開されていました。本大会か ら新しく始めた自由集会においても多くの参加者がメモをしながら熱心に聞き入る姿が 見られました。これが今まさに成長している学問分野の熱なのだろうと思います。なん とかその熱に答えられる大会を開くことができたのではないかと自己評価しています。

一方で、いくつかの点で参加者の方々に御迷惑をおかけしたことをお詫びいたします。 まず、申込みサイトがわかりにくいという声をいただきました。ポスター発表や懇親会 参加を申し込んだつもりだったが登録できていなかったというケースが複数あったよう です。この点については来年度の大会実行委員会に引き継ぎたいと思います。その他、 大学の普通の教室を使っての手作りの大会でしたので、それに起因するご不便もあった かと思いますがどうかご容赦いただきたく存じます。

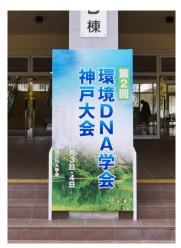
このように、いくつか反省点はありながらも概ね大会の運営はうまくいったと言って よいのではないかと思いますが、この成功は多くの方々のご支援があってこそ得られた ものです。公開シンポジウムで最新の状況や話題についてご講演くださった講演者の皆 様、日頃から学会運営にご協力いただいている賛助会員の皆様、展示を通して大会を盛 り上げてくださった企業・団体の皆様、ランチョンセミナーを開催してくださった企業 様、ボランティアとして様々な面で運営のサポートをしてくれた学生たち、なにより熱 心な討議を通じて素晴らしい大会としてくださった参加者の皆様に、大会実行委員会を 代表して感謝申し上げます。次回の仙台大会がさらに熱い大会になることを期待してお ります。

#### 大会概要報告

土居秀幸 (大会実行委員、兵庫県立大学シミュレーション学研究科 准教授)

第2回環境DNA学会神戸大会は、2019年11月3日 (日)から4日(月・休)の2日間にわたって神戸大学で開催された。一般会員123名、賛助会員65名、学生会員31名、招待者等47名、公開シンポジウムのみの一般参加者が60名となり、合計326名の参加があった。

大会1日目(11月3日)は、ポスター発表61件と企業展示9件が2つの会場に分かれて実施された。今大会からの新たな取り組みとして、ポスター発表に先駆けて、ライトニングトークとして、各ポスター講演について90秒で紹介していただいた。ポスター発表では、各会場で白熱した議論が展開されていた。とくに若手研究者を奨励するために、前大会と同様に、ポスター発表における



会場入り口

最優秀賞・優秀賞が設けられ、21件の応募があり、切磋琢磨した発表が行われた。なお、神戸大会でのポスター賞審査は、一般会員の大会参加者数名に審査員を依頼し、各ポスター2名以上の審査により行われた。最終的に、最優秀賞1件、優秀賞1件が選出され、懇親会にて表彰式が執り行われた。また、ポスター発表では、高校生、中学生による発表も3件あり、研究者と活発な議論がなされていた。高校生ポスターについても同様に審査が行われ、最優秀賞1件、審査員特別賞2件が選出された。企業展示では、各企業の環境DNA事業の取り組みの紹介や環境DNA分析に関連する魅力的な展示が行われた。18時30分からは、三ノ宮の「ホテル北野プラザ六甲荘」にて懇親会(会員交流会)が催され、会員の交流が行われるとともに、次回第3回大会が近藤倫生大会委員長(東北大)のもと、個体群生態学会と共催として仙台で行われる予定であること、さらに、2021年には第1回の国際学会を主催することが発表され、参加者からは拍手で歓迎され、懇親会はお開きとなった。

大会2日目 (11月4日) は、10時から「オール北海道:北海道を舞台にした環境DNA研究」と「環境DNA技術における基礎研究の現状と展望」の2つの自由集会が開催された。11時45分からはイルミナ (株)提供のランチョン形式の自由集会として、「NGSを用いた、環境DNA解析におけるメタバーコーディングの有用性」が行われた。

午後からは、公開シンポジウム「環境DNA技術の活用~社会実装に向けて~」が行わ



会場受付



ポスター会場

れた。最初に近藤会長から、今後の環境DNA調査の社会実装と環境DNAによる広範囲で多地点の生物生息情報の獲得の意義について紹介があった。前半は、串田卓弥氏(環境省自然環境局生物多様性センター)、中村圭吾氏(土木研究所)、堀正和氏(水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所)から、環境DNA手法のマニュアル化、さらに、データベースの整備などについての話題提供があった。後半は、赤松良久氏(山口大学環境DNA



機器展示

研究センター)、長田 穣氏(東北大学大学院生命科学研究科)、清野聡子氏(九州大学大学院工学研究院)から最先端の環境 DNA 研究、全国や各地域での採水調査結果、さらに今後の地域連携などについて話題提供があった。公開シンポジウムの終盤では会場も交えて総合討論が行われ、今後の環境 DNA 手法をどのように社会実装していくことが必要かについて、とくに行政との連携やデータベースの整備などについて活発な意見が交換され、これらについて、今後、研究者や行政担当者、そして環境 DNA 学会が果たすべき役割が議論された。最後に源大会委員長から挨拶があり、本大会は閉幕した。



懇親会における集合写真

# 第2回公開シンポジウム 「環境DNA技術の活用~社会実装に向けて~」

#### ◆ 開催報告

笠井亮秀 (北海道大学水産科学研究院 教授)

第2回環境DNA学会神戸大会期間中の11月4日13時30分から17時15分にかけて、「環境DNA技術の活用~社会実装に向けて~」と題して公開シンポジウムを開催した。

冒頭の近藤学会長による挨拶の後、串田卓弥氏から環境省が行っている生物多様性保全施策へ環境DNAをどのように活用していくかについて講演があった。続いて土木研究所の中村圭吾氏より、環境DNAの活用を図るために民間企業と共同で実施している技術開発や河川流域管理に関する話題提供があった。水産研究・教育機構の堀正和氏からは、環境DNA技術を水産資源評価に用いるだけでなく、生態系ネットワークの解明やブルーカーボンの推定に適用した例が紹介された。これら各省庁からの話題提供後に、



会場の様子

休憩をはさんで、アカデミックな立場として、山口大学の赤松良久氏からは同大学の環境DNA研究センターが様々な分野と融合して取り組んでいるプロジェクトについて、東北大学の長田穣氏からはCRESTプロジェクトで得られたビッグデータの解析手法とその結果について、そして九州大学の清野聡子氏からは行政や市民と連携したモニタリング等についてお話しいただいた。

シンポジウムの最後には、提供いただいた話題をもとに総合討論を行い、環境DNA 技術の発展性や学会の進むべき方向についても議論した。環境DNAは、ほんのここ10 年ほどで発展した若い技術であるにもかかわらず、すでに得られた結果の一部が社会実 装されつつあることを実感させられた。今後は、これまでに得られた、そして現在得ら れつつあるビッグデータを正しく解析し、社会に有効に活用していく方策を考えていく ことが肝要と思われる。

会場の大教室には立ち見が出るほど多くの方に来場いただき、大盛況であった。ご講演頂いた先生方、会場準備に携わった方々、並びに活発な議論をしてくださった来場者の方々に、この場を借りてあらためて感謝申し上げる。熱気あふれる会場の様子については、ホームページに写真が掲載されているので、ぜひそちらもご覧いただきたい。

#### ◆参加者の声「社会実装への期待!」

**池田幸資**(パシフィックコンサルタンツ株式会社、 北海道支社 社会イノベーション事業部 環境・エネルギー室 室長)

真木伸降 (パシフィックコンサルタンツ株式会社、

社会イノベーション事業本部 環境・エネルギー部 環境プロジェクト室 室長)

上月佐葉子 (パシフィックコンサルタンツ株式会社、

北海道支社 社会イノベーション事業部 環境・エネルギー室 技術課長)

第2回環境DNA学会神戸大会で開催された公開シンポジウム「環境DNA技術の活用~社会実装に向けて~」に参加した。建設コンサルタント業の我々としては、環境DNA技術を業務でどのように活かせるのかに強い関心があり、本大会の中でも、公開シンポジウムへの期待が特に大きかった。

行政機関の講演では、環境省は、検討結果を まとめた手引きを今年度中に公表予定であること、



講演の様子

土木研究所でも民間企業との共同研究の中で現場作業や分析作業の各段階で把握すべき 情報を明示した様式を公表予定であること等が報告され、社会実装に向けた動きが具体 化している状況を知ることができた。水産分野では、大阪湾におけるマコガレイの調査 事例紹介やモニタリング関係の予算が縮小されていく中で、水産資源の状態を知るため

第 2 回環境 DNA 学会神戸大会開催報告

のツールとして環境 DNA 技術に期待していること等が報告された。

大学関係者では、赤松先生(山口大学)、長田先生(東北大学)、清野先生(九州大学) から、研究の成果と今後の展開について紹介いただいた。なかでも、山口大学の採水ド ローンの紹介や、ターゲットとする種の在・不在を簡易に調べる環境DNAチップの開 発状況について興味深く聞かせていただいた。環境DNA分析が普及するにつれ、社会 からは、ますます簡易に採水、分析することが求められるだろう。

今回のシンポジウムで多様な研究成果を拝聴し、環境DNA技術が秘めている大きな 可能性を改めて認識した次第である。環境DNA技術は急速に知見が増えており、社会 実装に向けて各所で驚くような取り組みが進められている。今後どのように技術が進展 するのか、仙台で開催予定の来年の環境DNA学会が益々楽しみである。

#### **◆参加者の声「公開シンポジウムで感じたこと」**

井戸基博(龍谷大学理工学部 学部生)

公開シンポジウムでは、研究者の方々による 成果発表や官公庁による社会実装に向けた取 り組みに関する講演が行われた。講演では、環 境DNA分析から得られた情報が何を示すのか、 環境DNAの実用性や求められていることなど が取り上げられており、このような場に参加で きたことは貴重な体験となった。公開シンポジ ウムに参加して、河川事業や水産庁事業におけ る環境DNAの活用が進んでおり、生態系の把



総合討論の様子

握をする手法として期待が高まっていることを改めて認識した。様々な興味深い報告が あったが、なかでも海草藻場を対象に、安定同位体分析と環境DNA分析を組み合わせ、 ブルーカーボンの堆積速度の詳細な算定に成功したという報告が印象深い。労力がかか り、種までの詳しい確認が困難なことがある目視の観察や衛星画像の代替手法となりう ると言えるのではないだろうか。2019年4月25日に「環境DNA調査・実験マニュアル」 が公表されたことで、環境DNAの一連の処理に関する統一的な手法が出来た。採水時 の服装やより詳細な採水方法など現段階では明確になっていない部分もあるので、今 後検討していく必要がある。環境DNA分析そのもの以外に、その技術を取り入れると なった際のコスト面についても焦点が当てられていた。環境水からその水域の生物相の 情報を簡易にかつ大量に得られる手法であるが、その実用性を示すためにも環境DNA 分析から得られた結果を誰もが理解しやすく報告することも重要視していく必要がある と考える。調査手法の確立や環境DNAと他の先端技術を組み合わせた応用研究がさら に進んでいくことに期待している。今回の公開シンポジウムで得られた知見を活かして、 この分野のさらなる発展に貢献できるように尽力していきたいと思う。

# 自由集会開催報告

#### 「オール北海道:北海道を舞台にした環境 DNA 研究」

#### ◆企画者報告

荒木仁志 (北海道大学大学院農学研究院 教授)

本自由集会はここ数年、北海道をフィールドに行われてきた様々な環境DNA研究・調査について紹介し、同じフィールドで共通のツールを用いた研究を行うことの意義と可能性を議論するために企画された。企画者は筆者と北大の笠井亮秀、兵庫県立大の土居秀幸、神戸大で大会長でもある源利文の4名である。

北海道は広大な森林や大小様々な湖沼・河川、 長い沿岸域はもとより、寒冷で豪雪地帯を多数



会場の様子

有するなど本州以南とは一線を画したユニークな自然環境を形成している。今回の発表でも現状国内では北海道固有種であるイトウやシシャモのほか、北海道を分布南限とするオショロコマの分布推定や個体群動態推定に関する研究など、本州以南には生息しない生物に関する報告が幾つも為された。これに加え道東・阿寒湖周辺の河川における外来種ウチダザリガニの分布拡散メカニズムに関する研究や、全国河川、特に太平洋岸河川に広く見られるニホンウナギの分布が北海道においては殆ど見られない、といった地域特性に関する研究成果も紹介され、会場の半数以上を占めた「北海道での調査に関わりのないオーディエンス」にとっては、身近な自然とは一線を画すユニークな生態系の在り様に触れる良い機会になったのではないかと考えている。

本自由集会に向けて演者には予め、各自の研究成果報告に加えて「その研究を北海道で行うことの意義」についてコメントを求めてあった。これにより、単に北海道で研究している事例紹介を並べるのではなく、それぞれの研究成果を共有することから生まれるシナジー効果を期待していた。限られた時間の中ではそこから新しいアイデアを生み出す段階までには至らなかったが、今後の展開に期待したい。

北海道の地理的・生態学的独自性は環境 DNA 研究との相性も良く、今後益々発展が期待できる分野の一つである。本集会がその足掛かりとなったことを祈ってやまない。



#### プログラム

10:00-10:10	北海道を舞台にした環境DNA研究:特徴と展望
	荒木仁志(北大・院農)
10:10-10:25	野外定量への苦悩:「幻の魚」イトウの場合
	水本寛基(北大・院農)
10:25-10:40	"本シシャモ"の謎を追って:河川遡上と海域回遊
	八柳 哲(北大・院農)
10:40-10:55	絶滅危惧種ニホンザリガニと外来種ウチダザリガニ
	池田幸資(パシフィックコンサルタンツ、北大・院地環)

10:55-11:10 ニジマスと在来イワナ属は共存できるのか?

坂田雅之(神戸大・院・発達)

環境DNA分析によるウナギの分布推定 11:10-11:25

笠井亮秀(北大・院水)

コメント:北海道から考える環境 DNA の発展 11:25-11:30

土居秀幸 (兵庫県立大・院シミュレーション)

#### ◆参加者の声 「環境 DNA で分かってくる北海道の自然」

**久保貴大**(兵庫県立大学大学院シミュレーション学研究科 博士前期課程)

全国的に見ても、独特の生態系をもつ北海道では、広大な面積と寒さ厳しい冬の気候 が、調査の進行を阻む中、環境DNA技術がどのような形で、活用されているのかとい う疑問から集会に参加した。北海道で研究を行っておられる研究者の方々の、独自の取 り組みについても学ぶことができ、非常に有意義であった。

水本さんの、イトウに関する研究のお話では、捕獲調査における調査者間の探索技量 差を解消するため、ソナーカウントを用いたという点が画期的であると感じ、かなり興 味をそそられた。また、雪解け水による河川水位上昇で、河床堆積物が撹拌されること により、サンプリングする河川水中にPCR阻害物質が、多く含まれるようになるという 考察は、他の豪雪地域を流れる河川の調査でも、考慮されるべき点であると感じた。

北海道にのみ生息する本シシャモや、昨今では北海道にのみ生息するニホンザリガニ、 日本の在来イワナの河川横断構造物が生息に与える影響を絡めてのお話は、環境DNA 技術が確実に社会実装されていると感じ、感銘を受けた。また、ニホンザリガニと競合 するウチダザリガニに対する取り組みや、北海道での環境DNA検出が少ないニホンウ ナギの調査も、新しい見聞として興味深く感じた。集会で得た知見を活かして、現在取 り組んでいる研究の手法を改良し、今後の分野発展につなげていきたいと思う。

#### 「環境DNA技術における基礎研究の現状と展望」

# ◆企画者報告

徐 寿明 (神戸大学大学院人間発達環境学研究科 博士後期課程)

本集会で掲げたテーマは、「環境DNAそのものを研究する」ことの重要性を再認識す ることであった。環境 DNA「で」 何かを研究するためにも、そもそも環境 DNA とは何 なのか、つまり環境DNA「を」研究する、この点に私たちは徹底的にスポットライトを 当てることにした。

一人目かつ企画者の徐は、環境DNA分析において広く用いられているミトコンドリ アDNAと、近年その有用性が指摘される核DNAの両方に着目し、それらの環境中にお ける動態の比較について発表した。二人目の廣原氏からは、viability PCR を用いた生細 胞に由来する環境 DNA の特異的検出、そして三人目の釣氏からは、環境 RNA の検出を 介した環境 DNA の由来組織の推定について、それぞれ発表があった。「環境 DNA を知

る」ことが、既存の環境DNA分析では得られない種分布/組成以外の生物情報につながりうることが、これら三人の発表で共通して示された。四人目の深谷氏からは、環境DNAの基礎的な知見を生物量推定につなげるためのアイデアについて、非常に興味深い話題提供があった(内容は紙面の都合上省略、残念)。最後に再び徐から、環境中のDNA、RNA、そしてタンパク質情報の利用が、群集レベルでの生理生態



会場の様子

学を大きく飛躍させる可能性について話題提供があった。

いわば「非常に尖った」テーマを掲げた私たちの自由集会は、参加者にとても好意的に受け容れられたように思う。これを機に、環境DNAの性質および動態の解明への関心が、国内外を問わず高まっていくことを期待したい。

#### プログラム

10:00-10:05 1. 趣旨説明

徐 寿明(神戸大・院・発達)

10:05-10:25 2. 核およびミトコンドリアに由来する環境 DNA の動態

徐 寿明(神戸大・院・発達)、有本美於(神戸大・発達)、

村上弘章(京都大・フィー研・舞鶴)、

益田玲爾(京都大・フィー研・舞鶴)、源 利文(神戸大・院・発達)

10:25-10:40 3. 環境 DNA 分析における PMA 色素の有用性

廣原嵩也(龍谷大・院・理工)

10:40-10:55 4. 大型脊椎動物を対象とした環境RNAの検出と展望について

釣 健司(龍谷大・院・理工)

10:55-11:10 5. 環境 DNA の基礎的情報の必要性と展望: 定量的アプローチの視点から

深谷肇一(国立環境研究所)

11:10-11:20 6. 環境 DNA、環境 RNA、そして環境タンパク質へ

~環境生理生態学への展望~

徐 寿明 (神戸大・院・発達)

11:20-11:30 7. 質疑・総合議論

# ◆参加者の声「迷って決めた自由集会」

藤井和也 (株式会社福田水文センター 技師長/北海道大学大学院農学研究院 研究生)

「同じ時間帯に二つの魅力的な自由集会。どちらに行こうものか…」。今回の神戸大会の参加者の中にも、同じように悩まれた方も多いはず。やや思案して「環境DNA技術における基礎研究の現状と展望」を選択した。会場は超満員。急遽、増席される盛況ぶりで、立ち見の方もみられた。

「核DNA由来環境DNAの粒径区分はそうなっていたのか(徐氏の発表)」、「PMA色素を利用することで、そんなことがわかるんだ(廣原氏の発表)」、「環境RNAは、由来

もわかりそうかもという段まできているんだ(釣氏の発表)」。私にとって新たな知見が 盛沢山であった。

今回の自由集会のように、「現状において環境 DNA の何がどこまでわかっているのか?」、「どこまでわかりそうなのか?」という知りたいことを、直接第一線の研究者の方々から聞ける機会は非常に貴重である。このような基礎研究の重要性は、全ての方々が認めるところであろう。特に、産学官が熱く注目している環境 DNA 技術であればなおのこと。改めて日本各地で様々な基礎研究が鋭意進められていることを実感した。そして、環境 DNA 研究の分野では日本は先駆的とされているが、「では、世界ではどうなっているのだろう?」という思いも同時に湧いてきた。今後の大会においても、このような自由集会が継続的に実施されることを期待したい。深谷氏の「eDNA の基礎的理解が生態観測の技術開発・新しい応用を駆動する」という言葉が印象に残る自由集会であった。

# 「NGSを用いた、環境 DNA 解析におけるメタバーコーディングの有用性」 ◆企画者報告

小林孝史(イルミナ株式会社技術営業部 シニアアプライドゲノミクススペシャリスト) 李 爽(イルミナ株式会社技術営業部 アプライドゲノミクススペシャリスト)

イルミナ株式会社は、第2回環境DNA学会神戸大会2日目に自由集会を開きました。環境DNA解析では定量PCR法を用いた種特異的な検出方法と、次世代シーケンサーを用いた網羅的なメタバーコーディング法が用いられてきています。本自由集会ではメタバーコーディング法と新製品iSeq™ 100に着目し、企業講演を含めた3題が発表されました。

1人目の演者はイルミナ株式会社の小林で、環境 DNA解析におけるメタバーコーディング法の位置



講演の様子

づけ、論文数の伸びや、定量性に関する注意点についてお知らせしました。発表の後半は $MiSeq^{TM}$ とiSeq100について解析原理や使用方法の相違、また初期投資を含むコストについてもご案内しました。

2人目の演者は九州環境管理協会の大井和之先生で、前半ではこれまでのご研究の経験などをご紹介いただきました。九州環境管理協会は「イルミナジャパンアグリiSeq 100 グラント 2018」の受賞者で、2019年にiSeq 100 を導入され、初めて次世代シーケンサーをご使用された使用感を、使用したことのない聴講者にもわかりやすくご説明いただきました。

3人目の演者は山口大学大学院の中尾遼平先生で、MiSeq とiSeq 100の両方で同じサンプルを解析した結果の比較について発表いただきました。現在環境 DNA 解析で使用されている次世代シーケンサーのほとんどが MiSeq ですが、中尾先生のご発表では、新製品のiSeq 100でのメタバーコーディング解析の結果は MiSeq とおおよそ同等であり、今後iSeq 100も MiSeq に加えてメタバーコーディング法に使用されていく可能性が示唆されました。

当日は非常に盛況で多くの参加者の方に足を運んでいただきました。今後ともMiSeqやiSeq 100を用いたメタバーコーディング法が広がっていくことを心より願っております。

#### プログラム

演題1) 趣旨説明:環境DNA解析における次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディングの立ち位置、現状。およびメタバーコーディングに使用される次世代シーケンサーのご紹介

イルミナ株式会社・シニアアプライドゲノミクススペシャリスト 小林 孝史

演題2) NGS初心者がiSeq100を使ってみた メタバーコーディング分析ができるよう になるまで

(一財) 九州環境管理協会 環境部・生態工学室長 大井 和之 先生

- 演題3) iSeqを用いた環境DNAメタバーコーディング
  - ~ MiSeq との比較および実践事例の紹介~

山口大学大学院創成科学研究科 助教(特命) 中尾 遼平 先生

#### ◆参加者の声 「第2回環境 DNA 学会神戸大会:自由集会に参加して」

本澤大生(一般財団法人三重県環境保全事業団調査部 技師)

今回、第2回環境DNA学会神戸大会の中で行われた、自由集会「NGSを用いた、環境DNA解析におけるメタバーコーディングの有用性」について感想を述べさせていただきます。

弊団は、三重県における環境分析や廃棄物処理を主な事業とする組織であり、昨年度より分析事業の新規事業として環境DNA分析業務を開始しました。その中で環境DNA分析による生物相分析で使用する次世代シーケンサー、特に弊団で使用しているイルミナ社製のiSeq 100システムについては非常に扱い易いため、分析担当者として大変助けられていることが多いです。このような背景の中で、本自由集会は、メーカー・ユーザー・研究者のそれぞれの視点からMiSeqやiSeqをはじめとした次世代シーケンサーの話題が提供され大変興味深い内容でした。

メーカーであるイルミナ株式会社 小林様からは、次世代シーケンサーごとの測定システムの違いや、どのような使い方をするユーザーにどの機種が向いているかなどを非常に分かりやすくご講演いただきました。また、(一財) 九州環境管理協会 大井様からは「NGS初心者がiSeq 100を使ってみた」という非常に親しみを感じるタイトルでご講演をいただきました。ご講演の中で分析に苦労されていた点などは、私にも非常に身に覚えのあるところがあり大変参考になる内容でした。最後に研究者の立場より山口大学中尾先生から環境DNA分析における代表的なシーケンサーであるMiSeq とiSeq 100システムとの性能を比較したご講演をいただきました。現状、環境DNA学会から公開されている環境DNA調査・実験マニュアルにMiFishメタバーコーディングについてはMiSeqのみが分析手法として記載されています。しかしながら、iSeq100システムはその扱い易さと他の機種と比べ安価なことから、今後使用される場面は増加することが見込まれます。また、ご講演いただいたiSeq 100システムでもMiSeq と同程度の品質

第 2 回環境 DNA 学会神戸大会開催報告

が担保できるという知見は、今後の環境DNA分析が社会実装していく中、ハード面の 整備という点で必要不可欠な情報と言えます。最後に、技術革新が日進月歩のこの分野 において、このような集会に一人の技術者として参加することで大変有意義な時間を過 ごすことができました。

#### ポスター賞受賞者要旨集

#### 最優秀賞

#### P01 #「魚類集団における遺伝的多様性の量的評価と集団遺伝学的解析への適用」

辻 冴月(京大院・理)・芝田直樹((株)環境総合リサーチ)・沢田 隼(龍大院・ 理工)・潮 雅之(京大・白眉)

近年、環境DNA分析における新展開として、集団内におけるハプロタイプの網羅的 な検出が行われ、その有用性が示唆された。しかし、ハイスループットシーケンシン グ(HTS)で得られるリード数はDNAコピー数を必ずしも反映しないため、これまで 遺伝的多様性を量的に評価することは困難であった。 そこで本研究では、試料に内部 標準 DNA を加えることによりHTSを用いた網羅的な環境DNAの定量を可能にする qMiSeq 法を用い、アユの野外集団における遺伝的多様性の量的評価を試みた。結果、 得られた各ハプロタイプのコピー数は、捕獲調査におけるハプロタイプ頻度を非常によ く反映することが示された。さらに、各コピー数を個体数とみなし、ヌクレオチド多様 度や有効集団サイズを推定したところ、捕獲手法とほぼ同等の推定値が得られた。本研 究により集団遺伝学や系統地理学への環境DNA分析の適用が今後ますます加速するこ とが期待される。

#### 優秀賞

#### P25 #「ダム湖における魚類環境 DNA の鉛直分布」

速水花奈(神戸大・院・発達)・坂田雅之(神戸大・院・発達)・沖津二朗(応用地 質(株))・稲川崇史(応用地質(株))・源 利文(神戸大・院・発達)

環境 DNA (eDNA) メタバーコーディング手法を用いることで、一度に多種のeDNA を検出できる。しかし、メタバーコーディング手法による検出種数はサンプリングの季 節や場所によって変動することが明らかになっている。 これまでの eDNA に関する研究 では、多くの場合表層から水を汲んで分析が行われているため、水平方向のeDNA分布 に比べて鉛直方向のeDNA分布は十分に調べられていない。そこで本研究では、ダム湖 において季節ごとの鉛直方向における魚類eDNAの分布を調べた。福島県の三春ダムで 各季節6地点において採水を行い、各地点につき表層から底層まで約5mに1回採水を 行った。採水した水は、MiFishプライマーを用いてeDNAメタバーコーディング手法 により分析した。発表では、魚類の生態とeDNAメタバーコーディング手法での結果を 踏まえて、魚類eDNAの鉛直分布について議論したい。

# その他学会活動報告

# 環境省「MiFishによる種の識別に注意を要する 淡水魚類リスト」の公開

土居秀幸 (学会理事、兵庫県立大学シミュレーション学研究科 准教授)

環境省では、淡水魚類について、主にMiFishプライマーによるメタバーコーディング手法の標準化(マニュアルの作成やリファレンスの整備)及び一般への普及(調査体制構築)、データの効果的・効率的な共有を進めています。

環境DNA学会の理事4名(近藤倫生・源利文・宮正樹・土居秀幸)は、MiFish手法の標準化を議論するために、環境省が設置した「絶滅危惧種分布重要地域抽出のための環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の標準化・一般化に関する検討会」に委員として参画しました。そしてこの度、「MiFishによる種の識別に注意を要する淡水魚類リスト」が環境省のウェブサイトにて公開となりました。2019年6月末時点で公開されているMiFish領域の情報を整理し、MiFishによる識別に注意を要する淡水魚類リストを公表しています。詳細はウェブサイトをご参照ください。

http://www.biodic.go.jp/edna/edna\_top.html



# 2019全国技術セミナー

荒木仁志 (学会理事、北海道大学大学院農学研究院 教授)

本技術セミナーは先般公開された標準版「環境 DNA 調査・実験マニュアル」の解説に加え、環境 DNA の研究事例や使用例の紹介を目的として開催されました。全国7地区、延べ148名の学会員の皆様にご参加いただきました。ご参加・ご協力いただきました皆様、誠にありがとうございました。

本セミナーでは技術面での情報共有はもとより、マニュアルの作成に実際に携わった標準化委員会の委員や理事を含め、同じ課題や悩みを共有する学会員が直接議論できる貴重な交流・情報交換の場となりました。セミナー講師によるマニュアル解説後、質疑応答での議論が大いに盛り上がったことは嬉しい誤算でした(もっと質疑応答の時間



技術セミナー (関東地区) の様子1

をとってもよかったのかもしれません)。その 内容も各ステップにおける注意点・改善点など、 実際に環境DNA技術に携わっておられる皆様、 これから活用する具体的な計画をお持ちの皆様 ならではのものが多かったように思います。

本技術セミナーを通して、環境DNA技術の 普及と健全な発展がさらに促され、ひいては環 境DNA技術が世界的な問題となっている生物 多様性の保全や管理に大きく貢献することを 願っております。今後もマニュアルの更新や技術革新に伴い定期的に開催しますので、 皆様本技術セミナーへの積極参加をご検討いただければ幸いです。

セミナー講師(あいうえお順): 荒木仁志(北海道、東北地区)、岩崎渉(関東地区)、内井 喜美子(中部地区)、笠井亮秀(北海道地区)、近藤倫生(東北地区)、清野聡子(九州・沖縄 地区)、高原輝彦(中国・四国地区)、土居秀幸(関西地区)、益田玲爾(中国・四国地区)、水 本寛基(北海道、東北地区)、源利文(中部、関西、九州・沖縄地区)、山本哲史(関東地区)

#### 技術セミナー参加者内訳

北海道地区(2019.8.30、北海道大学札幌キャンパス)

企業関係者	10名
行政関係者	2名

大学関係者、その他 6名

東北地区(2019.8.28、東北大学片平キャンパス)

企業関係者 18名

大学関係者、その他 3名

関東地区 (2019.6.14、東京大学本郷キャンパス)

企業関係者 38名

行政関係者 6名

大学関係者、その他 6名

中部 (2019.6.6、名古屋市ABC貸会議室)

企業関係者 10名

行政関係者 1名

関西(2019.5.28、大阪大谷大学あべのハルカスキャンパス)

企業関係者 19名

行政関係者 3名

大学関係者、その他 6名

中国・四国地区 (2019.6.28、島根大学松江キャンパス)

企業関係者 4名

行政関係者 2名

大学関係者、その他 5名

九州・沖縄地区 (2019.6.7、九州大学西新プラザ)

企業関係者14名行政関係者1名

大学関係者、その他 2名



技術セミナー (関東地区) の様子2



技術セミナー (関東地区) の様子3

# 環境 DNA 研究最前線(第2回)

公益財団法人かずさ DNA 研究所 紹介

山川 央 (ゲノム事業推進部臨床オミックス解析グループ 研究員)

かずさDNA研究所は、生命科学とバイオテクノロジーの根幹である DNAの研究を行うことを目的とする公益財団法人で、千葉県のバックアップのもと、1994年10月に開所しました(図1)。国ではなく県が全面的に支援する基礎研究所というのは全国的にも珍しく、主に植物とヒトを対象として、ユニークな立ち位置から様々な研究を推し進めてきました。



図1 見学者の入り口となるかずさ DNA研究所の交流棟正面。見学者はこれまでにのべ13万人を超えています。

開所後間もない1996年に、ラン藻の全ゲノム

配列を解析完了しました。これは、生物としては4番目の全ゲノム解読であり、独立栄養型光合成生物としては初めての成果でした。以来、定期的に最新のシーケンサーを導入しつつ(図2)、モデル植物から主要な農作物、園芸作物のゲノム解読を次々と進めています。また、得られた遺伝情報をDNAマーカー開発へ活用し、選抜育種のサポートなどを通じて農業分野へ貢献しています。

ヒト遺伝子研究では、1990年代に主流であったゲノム解読やEST解析ではなく、技術的にも困難であったcDNAの全長解析に着手し、特に大きなサイズの









図2 かずさ DNA 研究所の次世代シーケンサー群(上段左:HiSeq2500、上段右: HiSeq1500、下段左手前:MiSeq、下段右:NextSeq500)。左下、MiSeqの隣(右奥)にあるのはパシフィック・バイオサイエンス社の第三世代シーケンサー Sequel です。かずさ DNA 研究所は Sequel を用いた解析で Pac Bio 認証サービスプロバイダーの認定を受けています。また、キャピラリーシーケンサーも 10 台ほど稼働しています。

cDNAに焦点を当てて解析収集しました。近年は医療分野への技術応用も進めており、 千葉県下の研究機関との連携の下、ゲノム医療の解析基盤としての役割を果たしていま す。また、県内外の医療機関とのネットワークを構築しつつ、希少難病等の遺伝学的検 査を公益的検査事業として実施しています。

加えて、代謝物を網羅的に解析するメタボローム技術を駆使した生体化合物の解析も 行っています。質量分析装置を活用して、植物が生産するさまざまな成分の分析やヒト 臨床検体の分析を進めています。

2007年にはバイオ産業技術支援センターを開設し、これまでの研究で蓄積してきた様々な技術やノウハウ、次世代シーケンサー(NGS)や高精度質量分析装置など最先端の分析機器を利用して、様々な受託解析を行っています。環境DNA分析は、当研究所のNGS関連機器群を用いた受託業務の一環として、昨年度より本格的な分析サービスを開始いたしました。主な使用機器はMiSeqですが、さらに大型のNextSeqなどを用いたサービスも検討する予定です。

さて、我々は、昨年度終了したCRESTの大型プロジェクトに協力し、全国で100名以上の協力の下採取した大量の試料からのDNA抽出と、NGSを用いたMiFish法による分析を行いました。2017年度にプロジェクト内で採取した千数百の残渣試料については、我々がすべてDNA抽出と配列解析を行い、現在プロジェクトの方でデータ解析を進めています。また、2018年度採取した二千あまりの残渣試料についても、同様にDNA抽出と配列解析を終了し、こちらも現在データ解析が進んでいます。

いずれの分析においても、微量試料の分析を行う際の注意点など、当研究所がこれまで培ってきたNGS分析技術を活かすことで、非常に質の高いデータが取得できました。また、一昨年度の抽出作業では、環境DNA作業専用のP2封じ込め実験室の中にさらに小部屋を組み立て、その中で調製を行っていましたが、昨年度からは、局所的にクリーンな環境を構築できるテーブルコーチを導入し、専用P2実験室内で運用しています(図3、4)。

今年度からは、我々も環境DNA観測プロジェクトに直接参画し、引き続き環境DNAによる観測を強化、推進していきます。環境DNA分析手法は、試料採取方法に加えて分析作業の効率化やデータの質の向上など、まだまだ改善の余地が多く残されています。今後、分子生物学の観点から新たな技術の導入や応用を進めつつ、環境DNAの基礎的研究でも貢献していければと考えています。

公益財団法人かずさ DNA 研究所ウェブページ:http://www.kazusa.or.jp









図3 P2封じ込め実験室を環境 DNA 抽出専用の部屋として用意し、外界から隔離した環境で作業を行っています。さらに、戸外から持ち込んだフィルター試料はクリーンベンチ内で処理し、汚染が広がらないようにします。



図4 (A)室内を舞う微粒子数、(B)テーブルコーチ前の作業場の微粒子数。テーブルコーチを使用すると、局所的に空気中の微粒子をゼロにできます。

# 環境DNA学の今(第1回)

MiFishプライマーを用いた魚類環境DNA研究の最新動向 – 1: 海外の研究グループによって明らかにされたMiFishプライマーの高い種検出能力

宮 正樹 (千葉県立中央博物館 生態・環境研究部)

#### はじめに

MiFishプライマーを用いた魚類環境DNAメタバーコーディング法 $^{1)}$ (以下MiFish法と略す)が公表されてから、2019年末でおよそ4年半が経過した。その間、MiFish法を用いた魚類群集モニタリングに関する実証的研究が海洋の沿岸や沖合域 $^{2\sim6}$ 、河川や湖沼などの陸水域 $^{7\sim11}$ 、さらには両者の境界にあたる汽水域 $^{12,13}$ )で行われ、本手法が多種多様な水界生態系に適用可能であることが明らかになってきた。これらの水域が属する大陸を見てみると、縁辺島嶼域を含むユーラシア $^{2,4,6\sim9,12,13}$ 、オセアニア $^{14}$ 、北米 $^{3}$ 、南米 $^{10}$ 、南極 $^{4}$  が含まれ、南アフリカで進行中のプロジェクト(https://www.vonderheydenlab.com/environmental-dna-and-metabarcoding.html)を含めれば、全6大陸でMiFish法を用いた研究が行われていることになる(図 $^{1}$ )。



図1 世界各地で使われるようになった MiFish プライマー

また、上記の実証的研究と並行して、MiFish法の使用をベースにした新たな実験法の開発や、実験条件の至適化を目的とした研究が行われてきた。たとえば、カートリッジ式フィルターを用いたろ過法・DNA抽出法の開発 $^{15)}$ や、MiFish法で得られた結果を相互比較可能にする半定量化 $^{16)}$ は前者に相当する。また、採水法や実験法がMiFish法で得られた検出種の組成や数にどのような影響を与えるか比較した研究 $^{10,17,18)}$ は後者に相当する。これら以外にも、MiFishプライマーが幅広い魚類分類群のターゲット領域を効率的に増幅する性質を利用して、PCR産物から単一種を検出する簡易法も新たに開発された。GoFishと名づけられた手法 $^{19)}$ は、MiFishプライマーを用いて環境DNAから増幅したPCR産物をテンプレートに、種特異的プライマーを用いてターゲット種の在不在を判定する。同様に得られたPCR産物をテンプレートに、最新の携帯型一分子シークエンサー(Oxford Nanopore社のMinIon)をホホジロザメの現場検出に応用した例も最近になって発表された $^{20)}$ 。

このように、MiFish法は魚類群集モニタリングの分野で幅広く使われるようになっただけでなく、その周辺技術や応用技術が開発されると共に、実験条件の至適化に関する知見が蓄積されてきた。一方、本手法の根幹となるMiFishプライマーの性能や汎用性については、原典 $^{1)}$ で競合プライマー $^{1}$ 種 (ecoPrimer) $^{21)}$ との簡単な比較が行われて以来、十分な検討がなされてこなかった。そのような中、イギリスのサルフォード大学の Stefano Mariani 教授を中心とする研究グループが、これまで魚類環境 DNA メタバーコーディング用に使われてきた計 $^{12}$ 組の PCR プライマーの性能や汎用性について詳細な比較検討を行った $^{22)}$ 。この研究により、MiFishプライマーが他の $^{11}$ 組のプライマーを圧倒する性能と汎用性をもつことが示されたので、その概要を紹介する。

#### 研究の背景

まず始めに、このようなプライマーの比較研究が行われた(論文には書かれていない) 背景について簡単に説明しよう。以下の内容は、上記論文の責任著者であるサルフォー ド大学のマリアーニ教授から、2019年7月に英国のキングストン・アポン・ハルで開催 された環境 DNA に関するシンポジウム (FSBI2019;https://www.fsbi.org.uk/annualsymposia/symposium-2019/) の席上で直接伺ったことである。

マリアーニ教授は、2015年に環境DNAを用いて海洋生態系の構造を解き明かそうというプロジェクト(https://www.marianilab.org/seadna)を英国政府の支援を受けて立ち上げた。その初期の研究で、サメ類の多様性を環境DNAを用いてモニタリングしたのだが、あまり思わしい結果が得られなかった<sup>21)</sup>。生物バーコードのターゲットであるミトコンドリアのCOI遺伝子上にサメ用のプライマーを設計したのだが、サメ以外の分類群(ほとんどが微生物由来のもの)が大量に増幅してしまい、結果として得られるサメのリード数は全体のリード数のごく一部という結果となってしまったのだ。海産魚類に対してどのようなプライマーが有効なのか、彼の研究グループは詳細な比較検討を行うことにした。なお、この実験にはポスドク2人が参画し、丸二年にわたって慎重に実験を進めたとのことである。

#### 論文の概要

本論文で比較の対象になったのは、これまでの研究で使われてきた10組のプライマーに加えて、新たに設計された2組のプライマーである ( $\frac{\mathbf{5}\mathbf{1}}{\mathbf{1}}$ )。いずれもミトコンドリアゲノム上にコードされている遺伝子で、生物バーコードで使われている $\mathbf{COI}$ から $\mathbf{4}$ 

組、 $cyt\ b$ から1組、 $12S\ rRNA$ から6組、 $16S\ rRNA$ から1組のプライマーがその性能と汎用性を評価された。断片長は最も短いものでCOIの $55\ bp、最も長いもので生物バーコードに用いられる<math>655\ bp$ であり、平均長は $206\ bp$ であった。なお、Taberlet-tele/elasとあるプライマーは、それぞれMiFish-U/Eにみられるテンプレートとのミスマッチを少なくしたとされているプライマーだが、MiFishプライマー設計時に使われているテクニカルチップ  $(T/G\ omega)$ を考慮していないことをここに記しておく。

これら12組のプライマーのすべてについて、環境DNAを用いた実験を行うには膨大な手間と予算がかかるため、まずは(1)リファレンス配列の充実度、(2)分類群の識別能力、(3)プライマーの汎用性について、コンピュータ上での比較テストが実施された。詳細については論文を読んでいただくとして、彼らはコンピュータ上で行われた上記3点に基づく「予選」で高得点を得たものの中から、COIに設計された3組(Leray-XT、SeaDNA-mid、SeaDNA-short)のプライマーと、12Sに設計されたMiFishプライマーを、環境DNAを用いた「決勝戦」に進めることにした。

この決勝戦は、イギリス海峡と北海に位置する計5つの汽水域と沿岸域から得られた環境DNAを用いて行われた。それぞれの環境DNAに対して、上記4組のプライマーを用いたライブラリーが調整され、イルミナ社のMiSeqを用いた超並列シークエンスが実施された。シークエンスから得られた生データの解析結果を表2に示した。表2には、わかりやすいように一次処理(生データを解析可能な形式の質の高いものにする一連のプロセス)を終えたもののリード数から、それがどのような分類群に割り当てられたか

表1 Collins et al. (2019) で評価の対象になった12組のプライマー

	, , ,		
プライマー	遺伝子	断片長	文献
Leray-XT	COI	313	Wangensteen et al. (2018) $^{24)}$
SeaDNA-short	COI	55	本研究 <sup>22)</sup>
SeaDNA-mid	COI	130	本研究 <sup>22)</sup>
Ward-barcode	COI	655	Ward et al. (2005) <sup>25)</sup>
Minamoto-fish	cyt b	235	Minamoto et al. (2012) <sup>26)</sup>
MiFish-U	12S	171	Miya et al. (2015) 1)
MiFish-E	12S	171	Miya et al. (2015) 1)
Taberlet-tele02	12S	167	Taberlet et al. (2018) $^{27)}$
Taberlet-elas02	12S	181	Taberlet et al. (2018) $^{27)}$
Valentini-tele01	12S	63	Valentini et al. (2016) <sup>28)</sup>
Riaz-V5	12S	106	Riaz et al. (2011) <sup>21)</sup>
Berry-fish	16S	219	Berry et al. (2017) <sup>29)</sup>

表2 MiSegシークエンスデータの一次処理後に割り当てられた各分類群のリード数

リード数	COI Leray-XT (	%)	COI SeaDNA-mid	d(%)	COI SeaDNA-sho	rt(%)	12S MiFish-U	(%)
一時処理後	3,223,743	100	8,703,109	100	4,074,123	100	2,157,365	100
バクテリア	1,476,994	45.8	1,388,681	16.0	2,242,220	50.8	4	0.0
真核生物	1,745,295	54.1	7,294,762	83.8	1,815,928	41.1	2,157,361	100.0
後生動物	321,590	10.0	1,161,769	13.3	412,871	9.3	2,157,361	100.0
脊椎動物	6,351	0.2	337,901	3.9	250,650	5.7	2,157,361	100.0
魚類	2,371	0.1	234,219	2.7	193,593	4.4	1,637,728	75.9

を示している。一見してわかる通り、COIのプライマーはMiSegから出力された全体 のリード数が多いのにもかかわらず、魚類のリード数が0.1~4.4%と著しく低い。一方、 MiFishプライマーは全体のリード数は若干少ないが、バクテリアのリードはほぼゼロ で、魚のリードが75.9%を占めている。 魚類以外の脊椎動物のリードが4分の1ほどを占 めているのは、汽水域や沿岸域など人間活動の影響が大きい水域であるためと思われる。 さらに、各プライマーで検出された魚類の種数を比べてみると、MiFishプライマー がCOIの3種のプライマーと比べて顕著に高い検出力をもつことがわかる(図2)。この 図は、水域ごとに各プライマーの検出種数を比較したものだが、MiFishプライマーが

 $COI の 3 種のプライマーより、2.2 \sim 2.9 倍の種の検出力をもつことがわかる。ここでは$ 詳しく触れる余裕はないが、解析結果の再現性という点でもMiFishプライマーはCOI プライマーを大きく上回る結果が得られている。

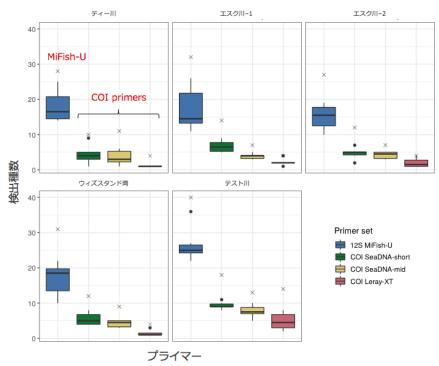


図2 5つの汽水・沿岸域で4種類のプライマーを用いて検出された種数の比較。一番左の青いボック スがMiFishプライマーの検出数で、右の3つのボックスがCOIのプライマー。MiFishプライマーが他 のプライマーより2.2~2.9倍の検出力をもつことがわかる。

本論文の結論は、タイトルにもあるように(そして表2を見れば明らかなように)、 魚類以外の非特異的増幅がCOIプライマーの有用性を損ねているということになる。 MiFish以外のプライマーが、あまりにも他の生物の相同領域を増幅してしまい、その 結果として魚類のリード数の割合が低くなり、さらには検出種数の低下をもたらすので ある。同様の結果はオーストラリアの河川でも得られており<sup>23)</sup>、この論文の筆頭著者で あるDr. Bylemans は以降の研究で(自分で設計した汎用プライマーでなく) MiFish プ ライマーをもっぱら使っている<sup>30,31)</sup>。

#### おわりに

水中の環境DNAに含まれる魚類由来のDNAは、原核生物本体に由来するものと比 べたらごくわずかなものだろう。MiFishプライマーは、その微量な魚類由来の環境 DNA を (一部の他の脊椎動物と共に) 特異的に増幅してくれることがおわかりいただけ ただろうか。今回紹介した論文の責任著者であるサルフォード大学のマリアーニ教授か らは「MiFishプライマーは(他のプライマーを使って環境DNAメタバーコーディングがうまくいかなかった)多くの人々を助けてきたんだよ」と教えてもらった。この言葉が決して大げさなものでなかったことは、シンポジウムの会期中に多くの人(民間企業の人も含む)から感謝の言葉を聞いたことからも伺える。

もちろん、MiFishプライマーは万能ではない。つい最近、MiFishプライマーは房総半島沿岸の普通種であるアナハゼ類を十分に検出できないことがわかった。そのこともあり、環境DNA学会が発行する実験マニュアルにはアナハゼ類を検出できるように設計したMiFish-U2を掲出したのだが、今後そのようなことはいくらでも起こりうるし、起こって然るべきである。本年、とある国際シンポジウムでメタバーコーディングの大御所であるフランスのPierre Taberlet博士と二日間にわたってご一緒したのだが、彼も「万能のプライマーなどありえない」と言っていた。

この問題 (PCR dropouts) については、河川を調査している人から「スナヤツメがいるはずなのに検出されない」、「アユやワカサギのリード数が現存量と比べて少ない」などのコメントをいただく。ひょっとしたらプライマーとのミスマッチが多いメダカも十分に検出されていない可能性がある。こうした分類群に対しては、至適化したプライマーを少量 (たとえばプライマー全量の8~16分の1) 加えることで検出率が大幅に向上するし、スナヤツメでは実際にそのことを確認した。ただ、注意してほしいのは、環境DNAをテンプレートにすると、どういうわけか縮重プライマーが効かないことである。複数のターゲットを効率よく増幅したいのであれば、縮重サイトを使わないプライマーを別個に注文して混ぜた方が良い。まだまだ乗り越えるべき壁は大きいというのが正直なところである。

最後に、今回紹介した論文の責任著者であるステファーノ・マリアーニ教授と、筆頭著者であるルペール・コリンズ博士には論文原図 (図2) を快く提供して頂いたことに感謝の意を表する。

#### 引用文献

- 1) Miya, M. et al. 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 (2015).
- 2) Yamamoto, S. et al. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Sci Rep* **6**, 40368 (2017).
- 3) Andruszkiewicz, E. A. et al. Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding. *PLoS ONE* **12**, e0176343–20 (2017).
- 4) Mariani, S., Baillie, C., Colosimo, G. & Riesgo, A. Sponges as natural environmental DNA samplers. *Curr Biol* **29**, R401–R402 (2019).
- 5)上村, 了美. et al. 大阪湾奥における魚類多様性検出のための環境 DNA 調査. 土 木学会論文集B2 (海岸工学) 75, I 1171-I 1176 (2019).
- 6) Andriyono, S., Alam, M. J. & Kim, H.-W. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding: Diversity study around the Pondok Dadap fish landing station, Malang, Indonesia. *Biodiversitas* **20**, 3772–3781 (2019).
- 7) Nakagawa, H. et al. Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshw Biol* **63**, 569–580 (2018).
- 8) McDevitt, A. D. et al. Environmental DNA metabarcoding as an effective and rapid tool for fish monitoring in canals. *J Fish Biology* **6**, 25–5 (2019).
- 9) Morita, K. et al. Ongoing localized extinctions of stream-dwelling white- spotted charr populations in small dammed-off habitats of Hokkaido Island, Japan. *Hydrobiologia* 1–7 (2019). doi:10.1007/s10750-019-3891-1
- 10) Sales, N. G., Wangensteen, O. S., Carvalho, D. C. & Mariani, S. Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river.

- Environmental DNA 2, 1-12 (2019).
- 11) Fujii, K. et al. Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods. *PLoS ONE* 14, e0210357–17 (2019).
- 12) Zhang, H., Yoshizawa, S., Iwasaki, W. & Xian, W. Seasonal fish assemblage structure using environmental DNA in the Yangtze Estuary and its adjacent waters. *Front. Mar. Sci.* 6, 671–10 (2019).
- 13) Zou, K. et al. eDNA metabarcoding as a promising conservation tool for monitoring fish diversity in a coastal wetland of the Pearl River Estuary compared to bottom trawling. *Science of The Total Environment* **702**, 134704–11 (2020).
- 14) Lintermans, M. et al. Monitoring riverine fish communities through eDNA metabarcoding: determining optimal sampling strategies along an altitudinal and biodiversity gradient. *Metabarcoding and Metagenomics* 2, 1361–12 (2018).
- 15) Miya, M. et al. Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *J. Visual. Exper.* 1–8 (2016). doi:10.3791/54741
- 16) Ushio, M. et al. Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics* **2**, e23297 (2018).
- 17) Sato, H., Sogo, Y., Doi, H. & Yamanaka, H. Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities. *Sci Rep* 7, 14860 (2017).
- 18) Doi, H. et al. Evaluation of detection probabilities at the water-filtering and initial PCR steps in environmental DNA metabarcoding using a multispecies site occupancy model. *Sci Rep* 9, 1–8 (2019).
- 19) Stoeckle, M. Y., Mishu, Das, M. & Charlop-Powers, Z. GoFish: A versatile nested PCR strategy for environmental DNA assays for marine vertebrates. *PLoS ONE* **13**, e0198717–17 (2018).
- 20) Truelove, N. K., Andruszkiewicz, E. A. & Block, B. A. A rapid environmental DNA method for detecting white sharks in the open ocean. *Methods in Ecology and Evolution* **10**, 1128–1135 (2019).
- 21) Riaz, T. et al. ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research* **39**, e145–e145 (2011).
- 22) Collins, R. A. et al. Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI. *Methods in Ecology and Evolution* **10,** 1985–2001 (2019).
- 23) Bylemans, J., Gleeson, D. M., Hardy, C. M. & Furlan, E. Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray-Darling Basin (Australia). *Ecol Evol* 8, 8697–8712 (2018).
- 24) Wangensteen, O. S., Palacín, C., Guardiola, M. & Turon, X. DNA metabarcoding of littoral hard-bottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ* 6, e4705–30 (2018).
- 25) Ward, R., Zemlak, T., Innes, B., Last, P. & Hebert, P. DNA barcoding Australia's fish species. Phil Trans Roy Soc B: *Biol Sci* **360**, 1847 (2005).
- 26) Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Honjo, M. N. & Kawabata, Z. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13, 193–197 (2012).
- 27) Taberlet, P., Bonin, A., Coissac, E. & Zinger, L. *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring.* (Oxford University Press, 2018).
- 28) Valentini, A. et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol* **25**, 929–942 (2016).
- 29) Berry, T. E. et al. DNAmetabarcoding for diet analysis and biodiversity: A case study using the endangered Australian sea lion (Neophoca cinerea). *Ecol Evol* 7, 5435–5453 (2017).
- 30) Bylemans, J. et al. Monitoring riverine fish communities through eDNA metabarcoding: determining optimal sampling strategies along an altitudinal and biodiversity gradient. *Metabarcoding and Metagenomics* **2**, 1361–12 (2018).
- 31) Bylemans, J., Gleeson, D. M., Duncan, R. P., Hardy, C. M. & Furlan, E. M. A performance evaluation of targeted eDNA and eDNA metabarcoding analyses for freshwater fishes. *Environmental DNA* 1, 402–414 (2019).

#### 編集あとがき

荒木仁志 (ニュースレター編集長)

昨年は5月にNPAFC (North Pacific Anadromous Fish Commission) のミーティングでアメリカ・オレゴン州のポートランド、10月にはPICES (North Pacific Marine Science Organization) のワークショップでカナダ・ブリティッシュコロンビア州のビクトリアとアメリカ大陸西海岸でのミーティングに参加させていただく機会があった。どちらも北太平洋の生物相・資源量変動をいかに正確に把握し、適切な管理に繋げていくかが大きなテーマ



PICES ワークショップの開かれた カナダ・ビクトリアの街並み

だったが、私自身の講演に限らず環境DNA関連の発表には多数のオーディエンスが参加してくださり、本技術への期待の大きさを実感することができた。特にPICESのワークショップでは多数の環境DNA研究者による発表があり、丸一日を通して活発な議論や情報交換が行われていた。11月の神戸大会でも至る所で興味深く熱い議論が展開し、国内研究者の熱量や研究内容の新規性は決して世界に劣らないことを確認する一方、欧米での国を挙げての大規模な研究計画や社会実装に向けた取り組みを目の当たりにするにつけ、日本の技術がその萌芽期を支え世界をリードした環境DNA研究が今後、今以上に激しい国際的な競争の中に置かれることを感じずにはいられなかった。学術・行政両面での世界的な展開を含め、環境DNA学会の担う役割は益々大きくなることだろう。

#### 環境 DNA 学会 理事・監事

近藤 倫生(会長、東北大学大学院生命科学研究科 教授)

源 利文(副会長、神戸大学大学院人間発達環境学研究科 准教授)

宮 正樹(副会長、千葉県立中央博物館 生態・環境研究部長)

土居 秀幸 (専務理事、兵庫県立大学シミュレーション学研究科 准教授)

内井 喜美子(会計担当理事、大阪大谷大学薬学部 助教)

益田 玲爾 (庶務担当理事、京都大学フィールド科学教育研究センター 准教授)

荒木 仁志 (広報担当理事、北海道大学大学院農学研究院 教授)

清野 聡子(涉外担当理事、九州大学大学院工学研究院 准教授)

岩崎 涉(理事、東京大学大学院理学系研究科准教授)

高原 輝彦 (理事、島根大学生物資源科学部 助教)

山中 裕樹 (理事、龍谷大学理工学部 講師)

笠井 亮秀(監事、北海道大学大学院水産科学研究院 教授)

山本 哲史(監事、京都大学大学院理学研究科 助教)

# 環境DNA学会事業報告

#### 環境DNA学会ニュースレター編集委員

#### 編集長:

荒木 仁志(北海道大学大学院農学研究院 教授)

#### 編集委員:

山中 裕樹 (龍谷大学理工学部 講師)

高原 輝彦 (島根大学生物資源科学部 助教)

水本 寬基(北海道大学大学院農学研究院 博士研究員)

#### 2018年度 環境 DNA 学会事業報告

(2018年9月1日~2019年8月31日) 一般社団法人環境DNA学会

#### 1. 学術大会の開催

第1回環境 DNA 学会東京大会を開催した。

1) 期 日:2018年9月29日、30日

2) 場 所:日本科学未来館

3) 参加者:正会員(一般) 171名、正会員(学生) 53名、賛助会員51名、非会員14名

4) 講演数:技術指導セミナー3件、ポスター発表62件

5) 公開シンポジウム:環境DNA技術の現在と社会実装に向けた展望 Environmental DNA - Current Status and its Future Implementations

6) 企業展示:10件

#### 2. ニュースレターの発行

環境DNA学会の活動報告と情報共有を目的とし、2019年1月15日付けで学会公式 ニュースレターを学会ウェブサイトにて発行した。第一号となる今回は学会長挨拶、東 京大会報告、環境DNA研究最前線、ニュースレター編集委員紹介および編集あとがき という内容で、全15頁とした。また、学会で使用する公式ロゴの選定に関してはデザイ ナー案3件について学会員に諮り、学会ウェブサイトからのオンライン投票を実施した。 2019年1月15日より1月31日にかけて行われた投票の結果、約6割の票を集めた第一案 (現行の公式ロゴ)を公式ロゴとすることが決定し、公表された。

#### 3. 技術セミナーの開催

環境DNA技術の普及と発展を目的とし、全国7地区において、環境DNA調査・実験 マニュアルの紹介・解説と、最新の環境DNA研究の紹介を行う技術セミナーを開催し た。なお、プロトコル冊子は、セミナー用に400部発注し、178部配布した。

- 1) 関西地区(大阪市) 2019年5月28日、参加者22名
- 2) 中部地区(名古屋市) 2019年6月6日、参加者11名
- 3) 九州・沖縄地区(福岡市) 2019年6月7日、参加者16名
- 4) 関東地区(東京都) 2019年6月14日、参加者49名
- 5) 中国・四国地区(松江市) 2019年6月28日、参加者11名

- 6) 東北地区(仙台市) 2019年8月28日、参加者21名
- 7) 北海道地区(札幌市) 2019年8月30日、参加者18名

#### 4. 環境 DNA 調査・実験マニュアルの発行

環境DNA技術標準化委員会の主導のもと、105ページからなる「環境DNA調査・実験 マニュアル ver.2.1.3 | を2019年4月25日に学会ウェブサイト上で公表した。執筆者は源 利文(環境DNA技術標準化委員会委員長)、近藤倫生、清野聡子、高原輝彦、土居秀幸、 中村圭吾、宮正樹、山中裕樹(以上、環境DNA技術標準化委員会委員、五十音)、佐土 哲也、山本哲史(委員外、五十音順)である。

#### 5. 関連機関との連携・協力並びに社会貢献・社会教育の推進事業

- 1) 海の学びミュージアムサポートによる社会教育活動 2019年度「海の学びミュージアムサポート」プログラム2「海の博物館活動サポー トIAコース博物館活動に係る支援を受け、日本科学未来館において「環境DNAで 丸わかり?大都会の海に生きる魚たち」と題したイベントを開催する準備を進めた。
- 2) 国立研究開発法人水産研究・教育機構に対する技術指導 国立研究開発法人水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所と、2018年9月4日付 で技術指導に関わる契約を締結した。これに基づき、魚類の環境DNA分析技術に 関して採水・現場ろ過技術についての説明・講習会を実施するとともに、DNA測 定および解析技術の説明・実地指導を実施した。技術指導は、環境DNA技術標準 化委員会から土居秀幸・山本哲史が担当した。

#### 6. 代議員会、理事会、その他

- 1) 理事会
- (1) 2018年9月29日定時理事会(日本科学未来館)理事11名、監事2名
- (2) 2018年12月11日臨時理事会(龍谷大学)理事6名、監事2名
- (3) 2019年4月8日臨時理事会 (ニュー末広ビル) 理事6名、監事2名
- 2) 代議員会

2018年9月29日定時代議員(日本科学未来館)代議員13名

#### 7. 事業計画および収支予算書

2018年9月29日開催の理事会において、2019年度事業計画および収支予算書を承認した。

#### 8. 会員動向

	2017年度末現在	2018年度末現在	増減
正会員 (一般)	98人	234人	+ 136
正会員 (学生)	21人	72人	+ 51
賛助会員	25団体	36団体	+11

事業報告の内容を補足する重要な事項 特になし

以上

#### 2018年度 (2018年9月1日~2019年8月31日) 収支報告

収入の部単位:円

科 目	予算	決 算
会費収入	1,148,000	2,063,000
年会費 (一般)	890,000	1,360,000
年会費 (学生)	108,000	153,000
年会費 (賛助会員)	150,000	550,000
事業収入	6,100,000	5,437,000
大会収入	4,200,000	4,084,000
技術指導セミナー受講料 (資料代)	900,000	433,000
技術指導契約料 (瀬戸内水研)	1,000,000	920,000
寄付金収入	700,000	350,000
事業外収入	-	1,110,034
2019年度海の学びミュージアムサポート支援金	-	1,110,000
利息	-	34
前年度繰越金	3,029,888	3,029,888
収入合計	10,977,888	11,989,922

#### 支出の部

科 目	予算	決 算
管理費	4,124,500	4,075,381
ウェブシステム費	2,080,900	2,138,160
事務費	1,643,600	1,937,221
法人税	400,000	_
事業費	4,197,000	4,831,173
学会大会開催費	3,000,000	
第1回東京大会開催費		2,852,902
第2回神戸大会宣伝費		86,400
出版費		
ニュースレター発行費	200,000	141,480
マニュアル印刷費	-	235,092
技術指導契約 (瀬戸内水研) 事業費		
講演謝金および講師旅費	240,000	178,280
マニュアル執筆謝金	527,000	250,000
技術指導セミナー開催費		
技術指導セミナー講演謝金	80,000	330,000
技術指導セミナー諸経費(会場費、旅費、雑給等)	50,000	629,069
ロゴ作製費	100,000	97,200
2019年度海の学びミュージアムサポート事業費	_	30,750
予備費	2,656,388	-
支出合計	10,977,888	8,906,554
次年度繰越金		3,083,368

#### 監査報告

2018年度の事業ならびに会計に関する報告を受けた後、重要な決裁書類等を閲覧し会計帳簿及び関係資料の調査を行った結果、事業報告及び会計処理が適正になされたものと認めます。

2019年10月11日 環境DNA学会監事 笠井亮秀、山本哲史

#### 環境DNA学会 ニュースレター No.2

The eDNA Society NEWSLETTER No. 2

2020年1月27日発行

編集·発行:一般社団法人環境 DNA 学会

編集長:荒木仁志

〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷1-5 龍谷大学内

一般社団法人環境DNA学会 事務局 email: office@ednasociety.org

ホームページ:http://ednasociety.org/