

第1回

# 環境DNA学会東京大会

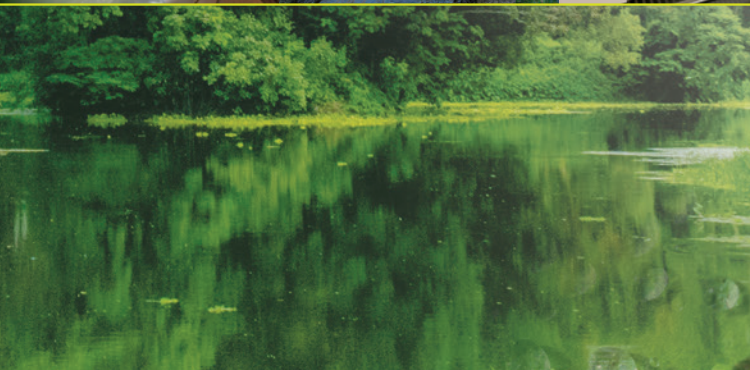
— The 1st Annual Meeting of The eDNA Society —

## プログラム集

2018年9月29日(土)・30日(日)

日本科学未来館

(東京都江東区青海2-3-6)



一般社団法人 環境DNA学会



## プログラム

### 9月29日(土)

10:00-17:30 企業展示(会場:A、B会場)  
展示企業:イルミナ(株)、(一社)九州環境管理協会、(株)建設環境研究所、(株)生物技研、  
(株)テクノスルガ・ラボ、パシフィックコンサルタンツ(株)、(株)日吉、(株)ファスマック、フナコシ(株)  
(50音順)

●ポスター発表(会場:A、B会場) 10:00-17:30

10:30-12:30 発表コアタイム:奇数ポスター番号

14:00-16:00 発表コアタイム:偶数ポスター番号

18:00-20:00 懇親会〈会員交流会〉(会場:日本科学未来館内 7階展望ラウンジ)

### 9月30日(日)

10:00-17:00 企業展示(会場:A、B会場)、ポスター展示(会場:A、B会場)

●技術指導セミナー(会場:未来館ホール)(\*今回は大会参加費のみでご参加いただけます)

午前の部・司会進行:荒木 仁志(北海道大 教授)

09:00-09:05 第一回東京大会 大会長挨拶  
笠井 亮秀(北海道大 教授)

09:05-09:40 環境DNA調査のプロトコル〜その基礎と失敗しないためのコツ〜  
源 利文(神戸大 准教授)

09:40-10:15 環境DNA解析に使用できる次世代シーケンサーの選び方  
〜解析原理から装置間比較まで〜  
小林 孝史(イルミナ株式会社 テクニカルセールススペシャリスト)

10:15-10:50 次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディング〜結果をどう解釈するか?〜  
山本 哲史(京都大 助教)

●公開シンポジウム(申込み不要、無料でどなたでもご参加いただけます)

**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**

後援:科学技術振興機構(JST)

11:10-12:05 基調講演  
**Understanding ecosystems using environmental DNA:  
what have we learned over the past decade,  
and where do we go from here?**  
Dr. Matthew Barnes (Texas Tech University Assistant Professor)

12:05-13:05 休憩

13:05-13:30 魚類環境DNAメタバーコーディング法が拓く新たな地平:  
いつ、どこに、どんな魚がいるのか「見える化」する  
宮 正樹(千葉県立中央博物館 生態・環境研究部長)

13:30-13:55 環境DNAを用いた沿岸魚類の定量的可能性  
源 利文(神戸大 准教授)

13:55-14:20 環境DNAを用いた陸水生態系種構成と遺伝的多様性の解明  
土居 秀幸(兵庫県立大 准教授)

14:20-14:45 休憩

午後の部・司会進行：清野 聡子（九州大 准教授）

14:45～15:15 **水産研究のための環境DNA—現状とこれから**

宮原 正典（水産研究・教育機構 理事長）

15:15～15:45 **環境省における環境DNA技術の活用と今後の期待**

鳥居 敏男（環境省 大臣官房審議官）

15:45～16:15 **河川水辺の国勢調査の経験と環境DNAへの期待**

光成 政和（国土交通省水管理・国土保全局 河川環境課 課長）

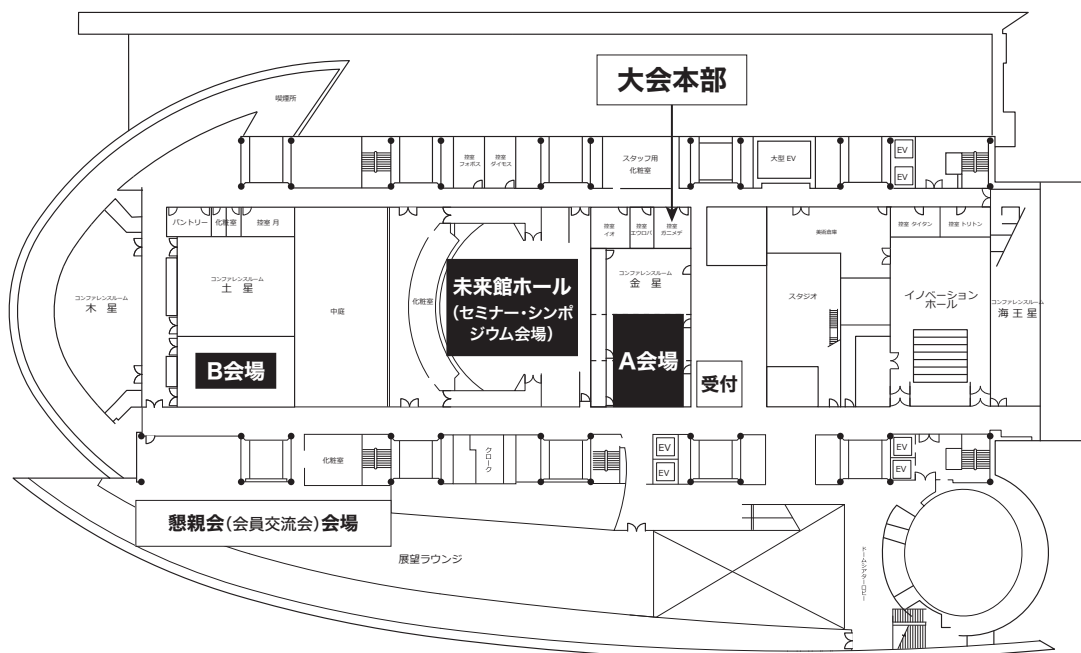
16:15～16:35 休 憩

16:35～17:00 **環境DNA観測に基づく大規模生態系データの獲得：高度生態情報社会の可能性**

近藤 倫生（環境DNA学会 会長／東北大 教授）

\* 本公開シンポジウムは、JST-CREST（JPMJCR13A2）「環境DNA 分析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」・独）環境再生保全機構 環境研究総合推進費 4-1602「環境DNAを用いた陸水生生態系種構成と遺伝的多様性の包括的解明手法の確立と実践」の成果の一般公開として行われます。

## 会 場 地 図



### 日本科学未来館 7階

（東京都江東区青海 2-3-6）

A、B会場：ポスター発表、企業展示（29～30日）

未来館ホール：技術指導セミナー（30日午前）・公開シンポジウム（30日11:10～17:00）

## 参加者へのご案内

### 一般注意事項

- ・会場内では基本的に飲食ができません。ご持参されたお水のみ飲んでいただけます。したがって、コーヒー、お茶などのサービスも提供できませんのでご了承ください。
- ・日本科学未来館では全ての場所で禁煙です。喫煙ルームをご利用ください。
- ・発表中の写真撮影、録画、録音、ポスターの撮影などは発表者の許可が必要です。
- ・発表内容は多くの未公表データを含んでおりますので、発表者の許可なく本大会以外での公表はお控えください。

### 受付

- ・9月29日(土) 9:30 - : 7階A会場前、30日(日) 8:30 - : 7階未来館ホール前。
- ・事前申し込み、当日受付ともに、受付で名札をお渡しいたしますので、会場内では名札をつけてください。

### クローク（荷物預かりについて）

- ・クロークは7階にはご用意しておりません。申し訳ございませんが、1階のコインロッカーをご利用ください。コインは、ご使用後に返金されます。

### インターネット接続（Wifi）

- ・Mirai Free Wifi、Docomo Wifi、Softbank Wifiなどの無線LAN接続サービスが一部エリアで使用できます（7階展望ラウンジ付近）。

詳しくはホームページをご参照ください：

<https://www.miraikan.jst.go.jp/m/guide/floormap/wifiarea.html>

### ポスター発表

- ・ポスターは90cm×210cm（縦長）の範囲内で作成してください。
- ・発表コアタイムを設けております（29日10:30-12:30〈奇数ポスター番号〉、29日14:00-16:00〈偶数ポスター番号〉）。発表者の方はポスター前にて説明をしてください。
- ・ポスターの撤去は、30日の17時まで完了してください。撤去されず残されたポスターは処分させていただきます。

### ポスター賞審査

- ・ポスター賞審査は、一般・賛助会員（ポスター審査対象者を除く）の投票により行います。受付でお渡しする投票用紙に記載していただき、A会場に設置されている投票箱に29日の15時までに投入してください。ご協力どうぞよろしくお願いします。
- ・ポスター賞審査結果の発表は29日の17時までに会場内、受付に掲示します。ポスター賞の表彰式は、懇親会（会員交流会）にて行います。
- ・ポスター賞受賞者は懇親会費が無料となります（入金済みの受賞者は返金いたします）。申し込みをされていない受賞者も参加できます。受賞者は受付にお申し出ください。

## 会場のご案内

### 宿泊案内

大会中の宿泊は各自での手配をお願いします。東京周辺には多くの宿泊施設がありますが、昨今の観光客増加によるホテル不足により予約がしにくい可能性もありますので、宿泊の予約は早めにされることをお勧めいたします。

### 交通案内

日本科学未来館（東京都江東区青海2-3-6 日本科学未来館 Tel: 03-3570-9151（代表））

詳しくは、日本科学未来館ホームページ（<https://www.miraikan.jst.go.jp/guide/route/>）をご参照ください。

#### 電 車

- ・ 新交通ゆりかもめ 「船の科学館駅」下車、徒歩約5分／「テレコムセンター駅」下車、徒歩約4分
- ・ 東京臨海高速鉄道りんかい線 「東京テレポート駅」下車、徒歩約15分

#### 車

地下駐車場が利用できます。

営業時間：7:00～23:00

料金：1時間400円、当日1日最大1,500円

台数：175台（車高2.1m以下）



### レストラン・カフェ

#### 7階レストラン「Miraikan Kitchen」

お台場から東京タワーまで見渡せる7階の展望ラウンジにある、セルフサービス形式のレストランです。工夫を凝らしたプレートランチ（720円～）やスイーツなどをご用意しています。

営業時間：10:00～17:00（ラストオーダー 16:45）※開館時間に準じる。

#### 5階 カフェ「Miraikan Café」

ユニークなインテリアの中で、ドリンクのほか、軽食やデザートも楽しめるカフェです。赤ちゃんと一緒にくつろげる授乳スペースもあります。

営業時間：10:00～17:00（ラストオーダー 16:45）※開館時間に準じる。

## ポスター発表

(#はポスター賞審査対象ポスター)

- P01 環境DNAによる沿岸域・河口域の生物多様性調査の行政・学術・民間調査の相補、統合化の提案**  
清野聡子・會津光博(九大院・工)
- P02 河川での外来沈水植物オオカナダモの環境DNA量の変化―太田川での例―**  
田中克幸・加藤康充・宮脇成生・木下長則((株)建設環境研究所)・土居秀幸(兵庫県立大・院・シミュレーション)
- P03 # トンボ目を対象とした環境DNAメタバーコーディング検出系の開発**  
坂田雅之(神戸大・院・発達)・内田 圭(横国大・環境情報)・佐藤博俊(京都大・院・人環)・山中裕樹(龍谷大・理工)・中尾遼平(神戸大・院・発達)・源 利文(神戸大・院・発達)
- P04 干潟底質の環境DNAによるカブトガニの空間利用調査の試み**  
大井和之((一財)九州環境管理協会)・高比良光治((一財)九州環境管理協会、(NPO法人)自然環境定量評価研究会)・小島治幸((NPO法人)自然環境定量評価研究会)
- P05 # 環境DNA解析による東丹沢地域におけるヌタ場利用哺乳類および鳥類のモニタリング**  
米地梨紗子(東京農大・野生動物)・石毛太一郎(東京農大NGRC、鯉渕学園)・大川智也(東京農大・院・野生動物)・佐野千尋(東京農大・院・野生動物)・宮 正樹(千葉中央博)・佐土哲也(千葉中央博)・潮 雅之(京大生態研センター)・松林尚志(東京農大・野生動物)
- P06 琵琶湖本湖と内湖の魚類環境DNAメタバーコーディング**  
田辺晶史(龍谷大)・佐藤博俊(京大)・宮正樹(千葉県博)・本郷真理・芝田直樹・渡邊和希(龍谷大)・土居秀幸(兵庫県立大)・山中裕樹(龍谷大)
- P07 # 環境DNAメタバーコーディングによって明らかになった六甲山周辺地域の淡水魚類相**  
中尾遼平(神戸大院・発達)・山本哲史(京大院・理)・宮 正樹(千葉県博)・源 利文(神戸大院・発達)
- P08 環境DNA分析を用いたイワナとコイの遺伝的多様性解析**  
半田佳宏・野口桂代子・阿部洋子・小野美奈子・中野江一郎(株式会社 生物技研)・亀甲武志・菅原和宏(滋賀県水産試験場)
- P09 # 環境DNA分析を利用した多摩川水系におけるウナギ分布調査**  
水田颯生・黒木真理・山川 卓(東大院・農)
- P10 環境DNAメタバーコーディングによる琵琶湖周辺河川の魚類相調査および文献資料との検出傾向比較**  
中川 光(京大)・源 利文(神戸大)・山本哲史(京大)・佐藤行人(琉球大)・佐土哲也(千葉中央博)・宮 正樹(千葉中央博)
- P11 # 環境DNAの放出と分解に対する水温とバイオマスの影響**  
徐 寿明(神戸大・院・発達)・村上弘章(京都大・フィー研・舞鶴)・山本哲史(京都大・院・理)・益田玲爾(京都大・フィー研・舞鶴)・源 利文(神戸大・院・発達)
- P12 環境DNAによる大阪湾のスナメリ検出の試み**  
工樂樹洋(理研BDR)・石川 恵(大阪海遊館)・杉山賢子(理研BDR)・辰見香織(理研BDR)・若林郁夫(鳥羽水族館)・土居秀幸(兵庫県立大)・西田清徳(大阪海遊館)
- P13 環境DNA分析を利用した宍道湖―中海に生息する魚介類の生態解明への試み**  
高原輝彦・山岸 聖・田口淳也・池淵貴志・立石 新・尾形茂紀・稲岡悠樹・服部真也・黒瀬裕斗・藤井正人(島根大・生資)・土居秀幸(兵庫県立大院・シミュ)・山中裕樹(龍谷大・理工)・源 利文(神戸大院・人間環境)
- P14 木曽川ワンド・たまりにおけるイタセンパラ稚魚の環境DNA検出精度の検証**  
永山滋也(岐阜大・流域研)・太田宗宏((株)建設環境研究所)・藤田朝彦((株)建設環境研究所)・源 利文(神戸大院・発達)・森 誠一(岐経大)
- P15 # 環境DNAを用いたため池における希少昆虫タガメと侵略的外来種の関係調査**  
尾形茂紀(島根大院・生物資源)・西脇淳浩(パシコン(株))・山添寛治((株)PCER)・土居秀幸(兵庫大院・シミュ)・源 利文(神戸大院・発達)・須貝杏子・高原輝彦(島根大・生物資源)

- P16 # 環境DNAを用いた北海道固有種シシャモ *Spirinchus lanceolatus* の河川遡上パターン検出  
八柳 哲\* (北大農)・神戸 崇 (北大農)・水本寛基 (北大農)・小林由美 (北大農)・  
鎌田頌子 (北大農)・南波聡子 (北大農)・新居久也 (北海道栽培公社)・源 利文 (神戸大)・  
坂田雅之 (神戸大)・荒木仁志 (北大農)
- P17 環境DNA技術を用いた北海道河川魚類相の解明  
荒木仁志 (北大農)・水本寛基 (北大農)・神戸 崇 (北大農)・鎌田頌子 (北大農)・南波聡子 (北大農)
- P18 DNAメタバーコーディングで探るアカネズミの食性の普遍性と多様性に与える時空間要因  
佐藤 淳 (福山大・生命工学)・島田卓哉 (森林総研)・京極大助 (東北大・生命科学)・  
小村健人 (京都大院・農学)・植村 滋 (北海道大・フィールド科学)・山口泰典 (福山大・生命工学)・  
齊藤 隆 (北海道大・フィールド科学)・井鷲裕司 (京都大院・農学)
- P19 # 環境DNA分析手法を用いたオオサンショウウオの繁殖期推定  
森本哲平 (神戸大院・人間発達環境学研究科)・中尾遼平 (神戸大院・人間発達環境学研究科)・  
源 利文 (神戸大院・人間発達環境学研究科)
- P20 最終処分場における埋立廃棄物組成と浸透水水質及び微生物群集構造の関係  
平川周作・古賀智子・藤川和浩・櫻井利彦・飛石和大・鳥羽峰樹 (福岡県保健環境研究所)
- P21 # 環境DNA技術を用いた絶滅危惧種イトウの分布域・生物量の全道推定  
水本寛基・荒木仁志 (北大・農・動物生態)
- P22 環境DNA分析によるイトウ (*Parahucho perryi*) 検出の試み  
鈴木祐太郎・高松慎吾・三沢勝也・山田芳樹 ((株)ドーコン)
- P23 # 菌類メタバーコーディングを用いた河川水中の菌類DNA相とその時間変動評価  
松岡俊将 (兵庫県大・院・シミュ)・下野義人 (三重大・院・生物資源)・杉山賢子 (兵庫県大・院・シミュ)・  
土居秀幸 (兵庫県大・院・シミュ)
- P24 モバイルPCR装置による環境DNAの現場迅速検出システムの開発  
渡部 健・林 麻里絵・門脇勇樹・真木伸隆・濱田敏宏・池田幸資 (パシフィックコンサルタンツ (株))・  
福澤 隆 (日本板硝子 (株))・大橋俊則 ((株)ゴーフォトン)・土居秀幸 (兵庫県立大院)
- P25 環境DNA解析パイプライン MiFish Pipeline と魚類ミトコンドリアゲノムデータベース MitoFish  
佐藤行人 (琉球大・研究推進機構)・宮 正樹 (千葉県立中央博・生態環境研)・  
福永津嵩 (東大・院情報理工)・佐土哲也 (千葉県立中央博・生態環境研)・岩崎 渉 (東大・院理)
- P26 # 環境DNA手法のコウモリ調査への応用  
岩澤大地 (北海道大学農学院)
- P27 # 環境DNAを用いた山口県内2級河川におけるヌートリアおよび  
オオカナダモの分布状況と生息適地の把握  
後藤益滋 (山口大院・工)・赤松良久 (山口大院・工)・乾 隆帝 (山口大院・工)・  
山中裕樹 (龍谷大・理工)・小室 隆 (山口大院・工)・河野誉仁 (山口大院・工)
- P28 環境DNA濃度の定量データと流動モデルの統合による個体数・生物量の推定  
深谷肇一 (国環研)・村上弘章 (京大院・農)・尹 錫鎮 (北大院・水)・  
南 憲吏 (島根大・エスチュアリー研究セ)・長田 穰 (東北大院・生命科学)・山本哲史 (京大院・理)・  
益田玲爾 (京大・フィールド研セ)・笠井亮秀 (北大院・水)・宮下和士 (北大・フィールド科セ)・  
源 利文 (神戸大院・発達)・近藤倫生 (東北大院・生命科学)
- P29 # 環境DNAメタバーコーディングと環境リモートセンシングを融合した花粉エアロゾルの解析  
田中啓介 (東京農大・生物資源ゲノム解析セ)・浜口 悠 (東京農大・生物資源ゲノム解析セ)・  
入江仁士 (千葉大・環境リモートセンシング研究セ)・  
矢嶋俊介 (東京農大・生命バイオ、東京農大・生物資源ゲノム解析セ)
- P30 小笠原諸島父島における環境DNAを用いた魚類多様性調査  
今藤夏子・上野隆平・佐竹 潔・吉田勝彦 (国立環境研)
- P31 # 野外環境に由来するDNAは糞サンプルにどのように混入するのか  
安藤温子 (国環研)・藤井智子・阿尾佳美・川鍋政孝 (多摩動物公園)・井上智美・竹中明夫 (国環研)

- P32 遺伝的多様性から外来種と在来種を判別する手法の開発**  
鈴木紀之 (高知大)
- P33 # 環境DNAで探るニホンウナギ産卵生態の謎**  
竹内 綾 (日大院・生物資源)・渡邊 俊 (近大・農)・山本哲史 (京大)・山田祥朗・岡村明浩・堀江則行・三河直美 (いらご研)・樋口貴俊 (日大院・生物資源)・黒木真理 (東大院・農)・沖野龍文 (北大院)・三輪哲也 (海洋研究開発機構)・Michael J. Miller・小島隆人・塚本勝巳 (日大・生物資源)
- P34 環境DNA分析を用いた静岡県内におけるトウカイナガレホトケドジョウの生息調査**  
白子智康・中村匡聡・相馬理央 (いであ株式会社)
- P35 # 16SrRNAメタバーコーディングを用いた両生類の環境DNA検出**  
河田萌音 (神戸大・院・発達)・倉林 敦 (長浜バイオ大・バイオサイエンス)・Noerikanto Ramamonjisoa (京大・院・理)・夏原由博 (名古屋大・院・環境学)・山中裕樹 (龍谷大・理工)・源 利文 (神戸大・院・発達)
- P36 ため池の魚類相がカンムリカイツブリの生息地選択に及ぼす影響**  
曾我部篤・三上 賛・笠原里恵・工藤誠也・東 信行 (弘前大・農生)
- P37 # 琵琶湖産スズエビの時空間分布および移動タイミングの推定**  
鰐 倩倩・河野 健 (神戸大)・石川俊之 (滋賀大)・辻 冴月・山中裕樹 (龍谷大)・源 利文 (神戸大)
- P38 環境DNAによる多摩川流域におけるアユの動態の把握**  
内藤太輔 ((公財)リバーフロント研究所)・赤松良久 (山口大院・創成科学)・乾 隆帝 (山口大院・創成科学)・後藤益滋 (山口大院・創成科学)・小室 隆 (山口大院・創成科学)・今村史子 (日本工営・中央研究所)
- P39 # ダム湖における魚類環境DNAメタバーコーディング手法の最適化**  
速水花奈 (神戸大・院・発達)・坂田雅之 (神戸大・院・発達)・沖津二郎 (応用地質 (株))・片野 泉 (奈良女子大・理)・宮 正樹 (千葉県立中央博物館)・後藤 亮 (千葉県立中央博物館)・佐藤博俊 (京都大・院・人環)・山中裕樹 (龍谷大・理工)・源 利文 (神戸大・院・発達)
- P40 環境DNAを活用した関空島周辺海域におけるキジハタおよびカサゴの分布推定の可能性について**  
辻村浩隆・山本義彦・山中智之 (大阪環農水研)
- P41 # LAMP法を用いた淡水エビの在来種—外来種群判別法の確立**  
齊藤達也・石黒直哉 (城西大院・環境生命化学)
- P42 河川管理の現場への環境DNA導入に向けた取り組み**  
村岡敬子 (国研 土研)・鈴木宏幸 (国研 土研)・中村圭吾 (国研 土研)
- P43 # 生物の胃内容物から周辺の生物相を把握する手法の検討**  
清水拓海 (慶應大院・政メ)
- P44 Environmental DNA metabarcoding reveals fish species in Qingdao Underwater World**  
Zhi Chen・Na Song・Tianxiang Gao・Shengyong Xu (Zhejiang Ocean University)・Qianqian Wu (Kobe University)・Di Li (Qingdao Underwater World)・Jianwei Chen (BGI-Qingdao)・Linlin Zhao (The First Institute of Oceanography)・Toshifumi Minamoto (Kobe University)
- P45 長良川・揖斐川における環境DNA定量解析を用いた生物分布モニタリング  
～アユと冷水病菌の季節的相互関係を探る～**  
廣瀬雅恵 (岐阜高)・政井菜々美 (岐阜高)・常川光樹 (岐阜高)・土田康太 (岐阜高)・高木雅紀 (岐阜高)・矢追雄一 (岐阜高)・源 利文 (神戸大・院・発達)
- P46 Evaluation of the fish distribution and their environmental DNA in a semi-closed bay using a three-dimensional tracer model**  
Seokjin Yoon (NIFS)・笠井亮秀 (北大院・水)・村上弘章 (京大院・農)・南 憲吏 (島大・エスチュアリー研セ)・益田玲爾 (京大・フィールド研セ)・宮下和士 (北大・フィールド科セ)・源 利文 (神戸大院・発達)・近藤倫生 (東北大院・生命科学)
- P47 # 環境DNAから推測されるクロダイの分布様式：海洋および河川域での季節変化**  
笹野祥愛 (京都大院・農)・村上弘章 (京都大院・農)・鈴木啓太 (京都大・フィールド研)・源 利文 (神戸大院・人間発達環境)・山下 洋 (京都大・フィールド研)・益田玲爾 (京都大・フィールド研)

- P48 河川における環境DNA含有物質の動態に関する基礎的研究  
赤松良久(山口大院・創成科学)・山口皓平(山口大院・創成科学)・乾 隆帝(山口大院・創成科学)・  
後藤益滋(山口大院・創成科学)・河野誉仁(山口大院・創成科学)・栗田喜久(九大院・農学)
- P49 # 環境DNAを用いたアユの降下・産卵モニタリング  
乾 隆帝・赤松良久・河野誉仁・後藤益滋(山口大院・創成)
- P50 An optional cost-effective method of extracting environmental DNA  
from filter membranes in large scale eDNA surveys  
Zhi Chen・Na Song・Tianxiang Gao・Shengyong Xu (Zhejiang Ocean University)・  
Qianqian Wu (Kobe University)・Di Li (Qingdao Underwater World)・Jianwei Chen (BGI-Qingdao)・  
Linlin Zhao (The First Institute of Oceanography)・Toshifumi Minamoto (Kobe University)
- P51 # 環境DNAメタバーコーディングによる対馬沿岸域の魚類相の季節的変遷  
會津光博(九大院・工)・清野聡子(九大院・工)・佐土哲也(千葉県立中央博物館)・  
宮 正樹(千葉県立中央博物館)
- P52 環境DNAによる淀川水系河川の生物相(絶滅危惧種等)の調査と生物保全の実践活動  
○大久保 樹・○西田勇人・本田龍輝・谷脇鉄平(大阪高校・科学探究部)
- P53 # Microbial communities in public transport systems in Japan  
伊藤光平(慶應大・環境情報)・渡部 翔(慶應大・政策メディア)・  
水落有起(慶應大・環境情報)・安藤帆菜美(東京大・工)・金子紗由香(慶應大・環境情報)・  
佐藤紀胤(東京大・薬)・石田晴輝(東京大・薬)・小林 健(東京大・医)・  
富田 勝(慶應大・環境情報)・鈴木治夫(慶應大・環境情報)
- P54 土壌の法科学的異同識別のための植物DNAメタバーコーディング解析  
宮口 一・藤井宏治・杉田律子(科警研)
- P55 # 環境RNAと環境DNA間で検出できる種数の違い  
伊知地稔(東大・大海研)・吉澤 晋(東大院・新領域)・Shu-Kuan Wong(東大・大海研)・  
高野剛史(目黒寄生虫館、東大・大海研)・木暮一啓(東大・大海研)・岩崎 渉(東大・院理)
- P56 富栄養化湖沼における魚類メタバーコーディング解析の基礎的検討  
岡野邦宏(秋田県大・生物資源)・藤林 恵(秋田県大・生物資源)・松尾 歩(東北大学院・農学)・  
高田芳博(秋田県・水産振興センター)・宮田直幸(秋田県大・生物資源)
- P57 # 植食性昆虫の食痕からの環境DNA検出  
工藤 葵(京都市大・農)・源 利文(神戸大院・発達)・山本哲史(京都市大・理)
- P58 海底下深部堆積物中の真核生物環境DNAによる古代生態系の復元  
星野辰彦(JAMSTEC・高知コア)・伊達康博(理研・環境資源)・肖 楠(JAMSTEC・高知コア)・  
浦本豪一郎(高知大・海洋コア)・諸野祐樹(JAMSTEC・高知コア)・稲垣史生(JAMSTEC・高知コア)
- P59 # 環境DNAを用いた宮城県名取川流域における河川無脊椎生物の多様性解析  
内田典子・久保田健吾・会田俊介・風間 聡(東北大院・工学)
- P60 マングローブ根圏に形成される窒素固定細菌群集  
下野綾子(東邦大・生物)・井上智美(環境研・生物)
- P61 # アカミミガメを対象とした野外における環境DNA検出阻害要因の検討：  
野外での環境DNA検出確率の向上に向けて  
覺田青空(奈女大・院・人間文化)・東垣大祐(愛媛大・院・理工)・源 利文(神戸大・院・人間環境)・  
土居秀幸(兵庫県大・院・シミュレーション)・片野 泉(奈女大・院・人間文化)
- P62 有明海における二枚貝類と食害生物のDNA分析による定量の試み  
城内智行・大井和之((一財)九州環境管理協会)

ポスター発表要旨については、大会ホームページ (<http://ednasociety.org/meeting>) にてPDFを公開しております。

# 環境DNA調査のプロトコル ～その基礎と失敗しないためのコツ～

源 利文 (神戸大・院・発達)

著者連絡先: minamoto@people.kobe-u.ac.jp

## 1. はじめに

環境DNA分析は簡便で迅速な生物分布の調査法として確立しつつある。しかし、実際の分析にあたってはいくつかの注意点がある。本セミナーでは、環境水からの環境DNA分析のプロトコルを採水、DNA抽出、PCR以降の操作に分けて紹介しつつ、特に注意すべき点について解説する。

## 2. 全般的な注意点

環境DNA分析の最大の敵はDNAのコンタミネーションである。特に、PCRで増幅したPCR断片がサンプルに紛れ込むことが最も大きな問題を引き起こす。PCR産物でなくても、対象種の濃いDNAを取り扱った直後に環境DNAサンプルに触れるなどを避ける必要がある。DNAのコンタミネーションの除去には次亜塩素酸ナトリウムが有効であるので、複数回使う必要のある機器類は使用のたびに次亜塩素酸ナトリウムで除染する。また、濃いDNAを扱う場所と環境サンプルを扱う場所を物理的に分けることや、濃いDNAを扱った日にはその後環境サンプルには触れないなどの注意が必要である。また、コンタミネーションの有無を評価するため、採水からPCR解析までのそれぞれのステップにブランクコントロールを入れると良い。

## 3. 採 水

水域内のどこで水を汲めば対象生態系の生物分布を反映したデータを取得できるかについては知見が少ない。環境DNAの時空間的な挙

動がまだ明らかになっていないのがその原因である。したがって、どこで汲むかについては現時点では結論が出ないが、対象生態系における「代表的な水サンプル」を取ることを念頭におくのが良いだろう。必要に応じて、複数箇所から採水した水をプールして解析することもある。採水時の注意点としては、自らのDNAを混入させることのないよう、手袋を着用すること、堆積物を巻き上げないように慎重に採水すること、河川においてはボトルの口を上流側に向けることなどが求められる。また、採水サンプル中のDNAは常温下では急速に劣化するため、現場ですぐ行う、DNAの分解抑制試薬を用いる、サンプルを低温で輸送するなどの対策が必要である。

## 4. 環境水サンプルのろ過

環境水サンプルは現場で、あるいは実験室に持ち帰ってろ過を行い、DNAの濃縮をはかる。ろ過には一般的にガラスファイバーフィルターを用いる方法と、カートリッジ式フィルターを用いる方法がある。どちらの手法を選択するかは、予算規模や目的、採水者の経験などを勘案して決定すると良い。ろ過後のろ紙やフィルターカートリッジは冷凍で保存可能である。

## 5. DNAの抽出

ろ紙あるいはカートリッジ式ろ過からのDNA抽出には市販のDNA抽出キットを用いるのが一般的である。それぞれに確立されたプロトコル<sup>1,2)</sup>があるので確認されたい。これ以降の段階では、マイクロピペット等を介したコ

ンタミネーションを防止するため、フィルター付きピペットチップを使用することが望ましい。また、環境DNAサンプル中の対象DNAは一般に非常に希薄であるため、最終的に環境DNAサンプルを保存するマイクロチューブは低吸着タイプを使用することを推奨する。抽出後のDNAサンプルは一般的なDNAサンプルと同様に冷凍で保存可能である。

## 6. 種特異的検出に向けたプライマーの設計およびPCR

環境DNAの種特異的検出にはそれぞれの種に対応したプライマーなどが必要となる。環境中には様々な生物のDNAが混在しているので、対象生物のDNAだけをPCR増幅可能なプライマーを作成する必要がある。一般的なプライマー作成の手順としては、(1) 対象種および同所的に生息する近縁種の遺伝子配列をデータベースからダウンロードし、(2) 対象種と近縁種の間に変異のある領域にプライマーを設計し、(3) 設計したプライマーの得意性をPrimer-BLASTなどを用いてバイオインフォマティクス的に確認し、(4) 対象種および近縁種のDNAを用いたPCRによってプライマー特異性を実験的に確認する。といった段階を踏む必要がある。これだけの段階を踏んでも実際の野外サンプルにおける特異性が担保されるわけではないので、最終的には野外サンプルのPCR産物をサンガーシーケンスによって確認することが必要である。種特異的検出におけるPCRにはツーステップPCRによるリアルタイムPCRが使われることが多い。リアルタイムPCRには様々な試薬が市販されているが、環境DNAサンプルにはPCRを阻害する物質が混入していることがしばしばあるので、阻害に強い系を用いることが望ましい。また、PCR産物のキャ

リーオーバーコンタミネーションを防止するため、UNG-dUTP系を用いることが望ましい。

## 7. 環境DNAメタバーコーディングにおけるPCR

メタバーコーディングを行う場合には対象分類群のDNAを効率的に増幅するプライマーの利用が必須である。魚類を対象としたMiFish<sup>3)</sup>などいくつかのプライマーがすでに報告されており、今後も様々な分類群に適用可能なプライマーが設計されることが見込まれる。ここではMiFishを用いる場合を例にする。メタバーコーディングの際にはPCRのレプリケートを取ることが必須である。これはPCRドロップアウトと呼ばれる取りこぼしを防ぐためである。PCRは二段階に別れ、一回目のPCRでは主に対象DNAを増幅することを目的とし、二回目のPCRでは次世代シーケンスに必要なタグ配列やサンプルの識別に必要なインデックス配列を付加することを目的として行う。二回目のPCRを行う際にはPCR産物を取り扱う必要があるため、この段階でのコンタミネーションに最大限の気遣いが必要である。

## 8. 最後に

環境DNA分析は比較的新しい技術であるため、そのプロトコルも日進月歩である。ここでは現時点の最新情報をできる限り提供するが、最新の情報をキャッチアップし、より確実に比較可能なデータ取得を行うことができれば、これまでにない大量データを活かした新たな科学の発展にもつながることが期待される。

### 引用文献

- 1) Uchii et al. (2016) DOI: 10.1111/1755-0998.12460
- 2) Miya et al. (2016) DOI: 10.3791/54741
- 3) Miya et al. (2015) DOI: 10.1098/rsos.150088

# 環境DNA解析に使用できる次世代シーケンサーの選び方 ～解析原理から装置間比較まで～

小林 孝史（イルミナ株式会社・技術営業部）

著者連絡先：tkobayashi@illumina.com

## 1. はじめに

次世代シーケンサー（Next-Generation Sequencer; NGSとも呼ばれる）は、DNA断片をアプライすることにより最大で3Tb（3兆塩基）の大量の配列情報を取得することができる装置である。NGSは販売開始されてから10年間程度であるが、2003年にHuman Genome Projectで約30億ドルかかっていたヒトゲノム解析が2017年には技術の進歩もありイルミナNGSを使用することによって約1000ドル（1名分、人件費含まず）で可能になり、普及が急速に進んでいる<sup>1)</sup>。最近ではヒトゲノム解析によるがんなどの研究用途に限らず、穀物や家畜の育種などの農学用途やDNA鑑定などの法医学用途、微生物プロファイリングなどの環境調査用途などにもNGSが活用され始めている。

## 2. イルミナ次世代シーケンサーの特徴

2018年9月現在、イルミナでは図1に示す6種類のNGSを販売している。それぞれについて解析対象のDNAは同じものを流用することができ、装置によってリード長（配列の長さ）、クラスター数（配列の数）が異なる。装置の選定は、①装置価格を含む初期投資、②1回の解析で何サンプル解析が可能か、③解析時間、④設置環境、などによって制限されるため、検討が必要である。現在世界で最も導入台数が多いのはMiSeqであり、2017年末時点で6,000台程度である<sup>2)</sup>。また、2018年にリリースされたiSeq100は、希望販売価格300万円台とイルミナNGSの中でも最も手軽に導入でき環境DNA解析に対応できる仕様を持つ。現在のラインナップで環境DNA解析に最適なのは主にこの2機種である。



| システム            | iSeq 100     | MiniSeq      | MiSeq        | NextSeq 550  | HiSeq 4000   | NovaSeq 6000 |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| データ量<br>(最大値)   | 1.2 Gb       | 7.5 Gb       | 15 Gb        | 120 Gb       | 750 Gb       | 3 Tb         |
| リード長<br>(最大値)   | 2x<br>150 bp | 2x<br>150 bp | 2x<br>300 bp | 2x<br>150 bp | 2x<br>150 bp | 2x<br>150 bp |
| クラスター数<br>(最大値) | 400万         | 2500万        | 2500万        | 4億           | 25億          | 100億         |
| ラン時間<br>(時間)    | 17           | 24           | 55           | 29           | <84          | 44           |

図1 イルミナ次世代シーケンサーの種類（2018年9月現在）

全てのイルミナNGS装置の解析原理は図2に示すSequencing by Synthesis (SBS) 法、あるいはReversible Terminator Chemistry法と呼ばれる方法で行う<sup>3)</sup>。それぞれの装置には専用のフローセルと呼ばれるガラス基板が用いられ、ブリッジPCRと呼ばれる方法でフローセルの中でDNA断片を増幅しクラスターと呼ばれるモノクローナルなコロニーの作製を行う。それぞれのクラスターに1塩基ずつ蛍光標識された塩基をDNAポリメラーゼにより導入して蛍光シグナルをカメラにより取得し、そのシグナルをベースコールと呼ばれる解析により塩基に変換する。1連の反応を一般的には50～300回程度繰り返すことで50～300塩基を解析することができる。NGSが優れているのは並列解析できる点であり、サンプルを分子ごとに単離しなくても最大100億個のクラスターを並列で解析できる。

### 3. 環境DNA解析－メタバーコーディング

環境DNA解析は、環境サンプルにどのような生物が存在するか抽出したDNAを介して解析する方法である<sup>4)</sup>。一般的に、特定の数種類の生物を対象にする場合は定量PCR法を使用し、対象が決まっていない場合は網羅的に解析が可能なNGSを使用したメタバーコーディン

グ法を行う。メタバーコーディング法では土壌や環境水サンプルから抽出したDNAから一部の領域をPCR反応により増幅し、1サンプルについて3～10万配列（リード）を取得する。それらを、データベースに照合して1本1本の配列をデータベース上の生物種にあてはめて存在する生物の多様性を把握する。

基本的には、対象とする生物種によって定量PCR法で使用するプローブ配列、あるいはメタバーコーディングで使用するバーコード領域は変えなければならない。また、メタバーコーディング、定量PCR法のそれぞれについて確立されたユニバーサルプライマー、およびデータベースが必要である。歴史的には、International Barcode of Life (iBOL) 国際コンソーシアム<sup>5)</sup>などがバーコードの選定、ユニバーサルプライマーやデータベースの作成などを行ってきた。iBOLは植物、真菌、海洋生物など非常にさまざまな生物種について対象を広げていると同時に、生物の食性研究などの目的にも対応している。一方国内では魚種の同定を試みるアプローチが進んでいる。2015年に宮らが開発したユニバーサルプライマーMiFish<sup>6)</sup>、および岩崎らが開発したMitoFishデータベースはメタバーコーディングに有用なツールである<sup>7)</sup>。MitoFishは魚類のミトコ

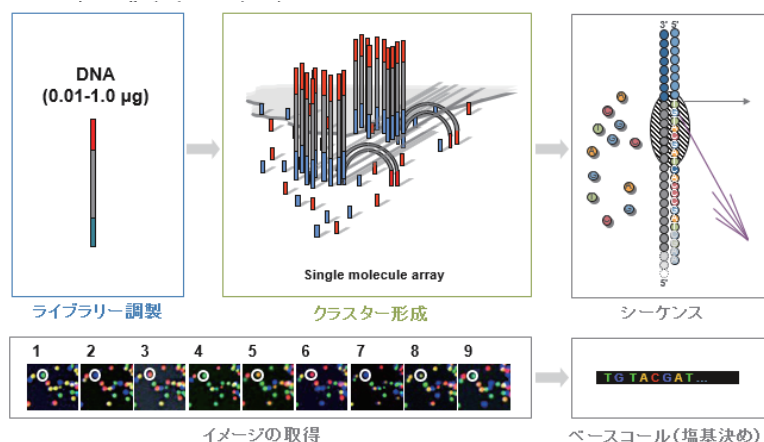


図2 Sequencing By Synthesis (SBS) ケミストリー



ンドリアのDNA配列のデータベースであり、MiFishで増幅したミトコンドリア12S rRNA領域をMitoFishデータベースにマッピングすることにより魚種を同定できる。これらの解析はMiSeqを中心にイルミナNGSのデータに最適化されたパッケージとして一般の研究者が使用できる環境にあり、2018年に佐藤らにより公表された<sup>8)</sup>。従って、現在では魚種の生態調査はMiFishを使用して比較的簡単に実施できる状態にある。一般的な解析として1サンプルにつき10万クラスター（配列）が魚種同定に必要とされ、iSeq100の1ランで40サンプル、MiSeqで最大96サンプルの解析が可能である。

#### 4. 最後に

NGSを使用した環境DNA解析は、特定の魚類を対象としない網羅的解析に有効な手法

である。定量PCRと異なり予想していなかった生物が見つかる可能性もある。解析システムとしてのNGS装置は現在300万円台から(iSeq100)購入でき、手軽に解析できるようになってきたので導入を検討されたい。

#### 参考文献

- 1) <https://www.genome.gov/27541954/dna-sequencing-costs-data/>
- 2) J.P. Morgan Illumina presentation; <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/company/investor-relations/ILMN-at-JPM-2018-8-January-2018.pdf>
- 3) Goodwin et al. (2016) DOI: 10.1038/nrg.2016.49
- 4) Thomson et al (2015) DOI: 10.1016/j.biocon.2014.11.019
- 5) <http://ibol.org/>
- 6) Miya et al. (2015) DOI: 10.1098/rsos.150088
- 7) Iwasaki et al (2013) DOI: 10.1093/molbev/mst141
- 8) Sato et al (2018) DOI: 10.1093/molbev/msy074

# 次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディング ～結果をどう解釈するか？～

山本 哲史 (京都大・院・理)

著者連絡先: s\_yamamoto@terra.zool.kyoto-u.ac.jp

## 1. はじめに

単一の生物種を検出することから始まった環境DNA解析技術は、現在では次世代シーケンサーの利用によって多種を同時に検出することも可能である。本セミナーでは、MiFish (マイフィッシュ) プライマー<sup>1)</sup>を用いた多種同時検出法 (MiFish メタバーコーディングと呼ぶこともある) について、そのデータの解釈について解説する。

## 2. 配列データの解析

次世代シーケンサーから得られる生データは単なる塩基配列データである。それらの配列から生物種名を推定することで始めて、生物群集として解釈可能なものとなる。そのために、得られた配列はMiFish-Pipeline<sup>2)</sup>で解析する。MiFish-Pipelineにはパソコン上で実行可能な端末版とウェブ上で実行可能なオンライン版がある。本セミナーではオンライン版による解説を行うが、オンライン版にはアップロード可能なデータ量など、いくつかの制限がある。端末版はコマンドラインによる実行が必要となるが、操作は比較的簡単なので、そちらの利用もお奨めする。

## 3. 結果の解釈

MiFish-Pipelineは得られた配列をBLAST検索し種のリストを表示するが、最初に表示される種のリストを鵜呑みにすることは危険である。本プログラムは、種判定の結果に対する信頼性についてもHigh/Moderate/Lowの3段階で評価してくれる。種判定の信頼性が低くなる

のは以下の場合である。①得られた配列 (問合わせ配列) がデータベース内の配列 (参照配列) に対して、データの一致率が低い。②問合わせ配列が、複数の参照配列に対して一致率が高い。①のケースでは、対象種のDNA配列がデータベースに登録されていない、もしくは、問合わせ配列がPCRエラーなどで生じた「現実には存在しない配列」である可能性がある。②のケースでは近縁種間でDNA配列に変異がない (種内の個体間変異が種間変異と同程度) 可能性がある。検出された各魚種に対して種判定の信頼性評価とその原因をチェックは必須である。さらにデータベースには稀に誤登録 (種名とDNA配列がちぐはぐになった状態で登録) が含まれることも承知しておいたほうがよい。端末版のMiFish-Pipelineでは、カスタムデータベースを利用することも可能であり、誤登録などのリスクを極力排除した自前データベースの利用も可能である。

## 4. 検出種リストに表示されない配列

BLAST検索の結果、問合わせ配列に対して、設定した一致率 (初期値は97%) 以上の参照配列が無かった場合、その問合わせ配列の種判定結果は別表 (BLASTN80-97%をクリック) に示される。この表では問合わせ配列にもっとも近縁な生物名を種名として掲載しているが、あくまで便宜的なものである。

このようにどの参照配列にも一致しない配列は、主にPCRエラーなどによって生じた「自然界に実在しない配列」だと考えられる。しかし、調査水域にはその配列をもつ生物が生息す

る可能性もある。そのため、このような配列もできるだけ無視しない方がよい。オンライン版 MiFish-Pipeline のデータベースに未登録な配列も、NCBI データベースには収録されている可能性もある。一度はそのような別のデータベースで BLAST 検索することをお奨めする。

また、その問合せ配列と、それに近縁だと考えられる種の配列を系統解析によって比較することも有効である。

## 5. ネガティブコントロールの種類

多種同時検出法では、頻繁にコンタミネーションの問題に直面する。コンタミネーションは採水現場や分子実験の過程、場合によっては MiSeq の流路内でも生じ得るもので、その程度の大小はあるものの、ほぼ必ず生じると言っても差し支えない。そのため、採水から実験過程のすべてにおいて、コンタミネーションを抑える工夫をたて、さらにコンタミネーションをチェックするためのネガティブコントロール（以下、ネガコン）を含める必要がある。MiFish による多種同時解析では、①採水～DNA抽出、②MiFish プライマーを用いた一次増幅、③MiSeq シーケンシング用のアダプター配列の結合、④MiSeq によるシーケンシングというステップで実験が進む。このうち最低でも、ろ過および一次増幅のステップにはネガコンを含める必要がある。また採水や MiSeq アダプター結合のチェックのためのネガコンを設ける余地もある。

## 6. ネガティブコントロールの解釈

ネガコンにおいて何らかの配列が検出された場合、何らかのコンタミネーションがあったと考え、それを考慮して結果を解釈する必要がある。例えば、ネガコンで種 A が検出された場合、サンプル間でも種 A の DNA がコンタミネーションしている可能性がある。この場合、本来は種 A が生息しない場所のサンプルからも、種 A が検出されている可能性を念頭において結果を解釈する必要がある。

ろ過時にとったネガコンから何らかの配列が得られた場合、それは、「ろ過の際に」コンタミネーションがあったことを示唆するというよりは、「ろ過以降のどこかの過程」でコンタミネーションがあったことを示唆するものである。

## 7. まとめ

次世代シーケンサーを用いた環境 DNA の多種同時検出法は効率的に生物群集データを得ることに適している。しかし、その結果を適切に解釈するには、データ解析過程でどのような処理が行われているかを理解する必要がある。また、現地採水を始める前にネガコンの本数や種類を考えておき、実験がどれほどコントロールされたものだったかを、評価できるデザインにする必要がある。

### 引用文献

- 1) Miya et al. (2015) DOI: 10.1098/rsos.150088
- 2) Sato et al. (2018) DOI: 10.1093/molbev/msy074

# Understanding ecosystems using environmental DNA: what have we learned over the past decade, and where do we go from here?

Dr. Matthew A Barnes, Texas Tech University

## Abstract:

Over the past decade, the emergence and rapid expansion of eDNA methodologies have generated unprecedented ability to detect species and conduct genetic analyses for conservation, management, and research, particularly in scenarios where collection of whole organisms is impractical or impossible. While the number of studies demonstrating successful eDNA detection has increased rapidly in recent years, less research has explored the “ecology” of eDNA—myriad interactions between extraorganismal genetic material and its environment—and its influence on eDNA detection, quantification, analysis, and application to conservation and research. This talk will outline a framework for understanding the ecology of eDNA, including the origin, state, transport, and fate of extraorganismal genetic material. In the context of this framework, this talk will then present and interpret results from recent survey efforts for invasive fish in Texas and threatened and endangered species in New Mexico. Recent advances in methodologies, such as airborne eDNA work at Texas Tech University and additional frontiers of eDNA application by US researchers and management officials will also be reviewed. Finally, the talk will conclude with a discussion of frontiers of conservation-focused eDNA application where the greatest potential for growth exists, and a prognosis of research questions and activities that will contribute to a more complete understanding of the ecology of eDNA and maximize the potential of future eDNA applications will be offered.

**Keywords:** ecology, environmental DNA, metabarcoding, metagenomics, monitoring, surveillance

## Brief Bio:

As a child, Dr. Barnes enjoyed summer vacations to the shores of Lake Erie as well as flipping over rocks to discover bugs in the creeks of his hometown in Plano, Texas. Dr. Barnes discovered a more scholarly approach to aquatic ecology and studying human interactions with their environment as an undergraduate at Southwestern University, earning a BA in biology with a minor in sociology. He honed his passion for aquatic invasions pursuing his PhD and serving as a postdoctoral researcher at The University of Notre Dame and The Environmental Change Initiative. Dr. Barnes joined the Department of Natural Resources Management at Texas Tech University in 2014 as an Assistant Professor. At Texas Tech, Dr. Barnes continues to enjoy studying aquatic communities and biological invasions, sharing these topics with students in the classroom, and mentoring undergraduate and graduate student researchers.

# 環境DNAによる生態系の理解：この10年間で 何が明らかとなり、どこへ向かおうとしているのか？

マット・バーンズ博士（テキサス工科大学）

## 講演要旨：

遺伝子の解析によって種を検出し、保全や管理、そして研究のための情報を得ることができる環境DNA法は、ここ10年ほどの間に急激に発展してきた。特に生物個体そのものの収集が現実的に不可能なケースでは、他に類を見ない能力を発揮している。ただ、近年は環境DNAによる生物の検出に成功したとする研究例は急速に増加しているものの、環境DNAの「生態」について明らかにしようとする研究例は多くない。即ち、生物体外に放出された遺伝物質とそれを取り巻く環境との無数の相互作用について、である。この環境DNAの生態というものが、環境DNA法による検出や、定量、解析、そして保全や研究への利用に対して与える影響についても、あまり多くの研究はなされていない。本講演では、生体外遺伝物質の起源、状態、輸送、運命を含めた環境DNAの生態を理解するための枠組みを概説する。この枠組みを解説する文脈の中で、テキサス州の侵略的外来魚やニューメキシコ州の絶滅のおそれのある種についての最近の調査結果を紹介する。テキサス工科大学での大気環境DNA研究における進展や、米国の研究者や環境管理にかかわる公的機関による環境DNA法の利用に関する最新の知見についても概観する。講演の締めくくりとして、今後大きく成長する可能性を秘めている、保全に主眼を置いた環境DNA法の利用の最前線と、環境DNAの生態の更なる理解を促進し、将来の環境DNA法の潜在性を最大化するような今後の研究課題について、話題を提供する。

**キーワード：**生態学、環境DNA、メタバーコーディング、メタゲノミクス、モニタリング、調査

## 略 歴：

子供の頃、バーンズ博士はエリー湖畔で夏休みを楽しく過ごし、また、故郷であるテキサス州プラノでは小川の川底にある石をめくっては虫を探した。バーンズ博士は、こうした興味から水生生態学を志し、サウスウェスタン大学では環境と人間の相互作用を研究して生物学の学士号、そして副専攻として社会学の学士号を取得した。彼は水生生物の侵略問題に情熱をもって取り組み、ノートルダム大学で博士号を取得し、環境変化イニシアチブのポストドクターとして研究を続けた。バーンズ博士はテキサス工科大学の天然資源管理学部に2014年に助教として着任した。テキサス工科大学では水生生物群集や外来生物の侵略の問題についての研究を続け、講義を通してこれらの知見を学生たちに伝えつつ、学部生や大学院生の研究指導を行っている。

# 魚類環境DNAメタバーコーディング法が拓く新たな地平： いつ、どこに、どんな魚がいるのか「見える化」する

宮 正樹（千葉中央博）

キーワード：多様性・魚類群集・空間分析・時系列分析

著者連絡先：miya@chiba-muse.or.jp

## 1. はじめに

陸上動物であるヒトにとって、水中は半ばブラックボックスである。したがって、目の前の海や川にどんな魚がいるのか、すぐにはわからない。この素朴な問いに答えるためには、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であった。さらに、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。

このブラックボックスを「見える化」したのが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（以下MiFish法）である。2015年7月にこの技術を発表して以来、本手法による環境DNA分析は世界各国の海や川で利用されるようになり、「バケツ一杯の水で棲んでいる魚が判る技術」として知られるようになった。

今回の発表では、現在使われている最新のMiFish法について概説すると共に、その機動性・迅速性・簡便性を生かして何がわかるか展望してみる。

## 2. MiFish法の概要

他の環境DNA解析と重複する採水からDNA抽出までを除くと、MiFish法は①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170bp）の増幅とシークエンスプライマーの付加（1st PCR）；②1st 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）；③次世代シークエンサMiSeqによる超並列シークエンシング；④出力されたデータの一次処理とその

解析の四つのステップからなる。MiFish法で質の高い解釈可能なデータをとるためにはどこに注意すべきか、その要点についていくつか述べる。

## 3. MiFish法でわかること

水を汲んでろ過すれば、ろ紙がサンプルとなるのが環境DNA分析の手軽さである。このろ過のプロセスどこでもできるようにしたのがステリベクス（カートリッジに封入されたろ紙）を50 mLシリンジに接続したシステムである。これさえあれば、どんな奥地でも現場ろ過が可能になる。

この現場ろ過システムを使うことにより、2017年夏には日本沿岸の全国528地点で一斉魚類相調査を行うことができた。現場ろ過を行った後のステリベクスに核酸劣化防止剤であるRNAlaterを充填すれば、鮮度の良いDNAを長期間保存できることがわかり、大変良質のデータを得ることができた。このデータを解析することで、「どんな魚がいるのか」に加えて、彼らが広大な空間の「どこにいるのか」モニタリングできたことになる。

さらに、2017年8月末から房総半島南端に設けた11測点で隔週サンプリングを開始した。この隔週サンプルを予備的に解析したところ、11地点の魚類群集はそれぞれ地域的な独自性を保ちつつ、季節的に変化する様子がモニタリングできた。「どこに」「どんな魚がいるのか」に加えて「いつ」に関してもモニタリングできたことになる。

# 環境DNAを用いた沿岸魚類の定量の可能性

源 利文 (神戸大・院・発達)

キーワード：環境DNA・リアルタイムPCR・舞鶴湾・バイオマス・定量

著者連絡先：minamoto@people.kobe-u.ac.jp

## 1. はじめに

環境DNAを用いた生物分布の推定手法はこの10年の間に急速に発展しており、生物の存在を知る手法としての有用性はすでに確実なものとなっている。一方で、DNA量を定量することで生物の個体数やバイオマスを推定しようとする試みも早くから行われてきた。

本講演では、これまで行われてきた環境DNAによる個体数やバイオマスの推定の研究の流れを概観するとともに、演者を含む研究チームがこれまでに行ってきた、舞鶴湾における魚類バイオマスの定量推定に関する試みについて紹介する。そのうえで、環境DNAによる魚類資源量定量の可能性について議論したい。

## 2. これまでの研究の流れ

環境DNA分析の黎明期である2012年に出版された2本の論文<sup>1,2)</sup>が環境DNA定量のさきがけであった。どちらの論文も水槽や実験池を用いた実験によって、個体数やバイオマスと環境DNA量の間に正の相関があることを明らかにし、DNA量から個体数／生物量を推定することが可能であることを示した。その後も、水槽やメソコスムなどの比較的小規模な止水環境においては生物の数量と環境DNA量の間に正の相関があることが次々と示された。一方で、環境研究総合推進費の研究プロジェクト<sup>3,4)</sup>などで、河川などの水の動きのある環境における定量も進められてきたが、環境中における環境DNAがどのように振る舞うのかは明らかでなく、単純な相関を得ることが困難であることが予想され、実際に関連する場合もしない場合もあるこ

とが報告されてきた。

## 3. 舞鶴湾における研究の成果

JST-CRESTの海洋生物多様性領域における環境DNAプロジェクト<sup>5)</sup>では、京都府の舞鶴湾を主たる研究フィールドとして、環境DNAによる魚類の定量の可能性を探ってきた。舞鶴湾におけるいわゆる「グラウンドトゥールース」として魚群探知機によるマアジの推定分布とマアジ環境DNA分布を比較したところ、水揚げ漁港からの環境DNA流入の影響が顕著であること、そのような流入の影響を考慮することで魚群探知機による推定分布と環境DNAの分布の間に偏相関を見出すことができることなどが示された。さらに、単純な分布の比較ではなく、環境DNAの移動、環境DNAの放出と分解の過程などを考慮したモデルを作成したところ、計量魚群探知機によって推定された舞鶴湾の総個体数とほぼ同等の推定値を得ることに成功した。この手法は環境DNA量から魚類の資源量を推定する手法として一般化できる可能性がある。一方で、一種の定量のために様々な実験やモデリングが必要な点など、未だ課題も多く、一般的な推定手法として確立するためにはさらなる研究の進展が必要である。

1) Takahara et al. (2012) PLOS ONE, 7(4), e35868.

2) Thomsen et al. (2012) Mol Ecol Res, 21(11), 2565-2573.

3) 「環境DNA技術を用いた生物分布モニタリング手法の確立」(代表：土居秀幸)

4) 「環境DNAを用いた陸水生系種構成と遺伝的多様性の包括的解明手法の確立と実践」(代表：土居秀幸)

5) 「環境DNA分析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」(代表：近藤倫生)

# 環境DNAを用いた陸水生態系種構成と 遺伝的多様性の解明

土居 秀幸 (兵庫県立大学・院・シミュレーション)

キーワード：陸水域・生物多様性・遺伝的多様性

著者連絡先：hideyuki.doi@icloud.com

## 1. はじめに

本プロジェクトでは、環境DNAを用いて、湖沼、河川、汽水域などの陸水生態系における生物の種組成を推定するとともに、外来種や希少種を早期発見するメタバーコーディングの手法を確立することを目指している。さらに、環境DNAから遺伝的多様性を推定し、有効集団サイズを含む集団遺伝学的解析を可能にする。それにより、湖沼、河川、汽水域などの陸水域生態系に生息する魚類、昆虫、水草といった多様な生物種の分布や動態を、1リットルの水を汲むだけで把握する革新的技術を開発する。この環境DNA技術により、外来種・希少種を含めた生物群集の簡便かつ迅速な生物分布モニタリングが可能となる。

本講演では、独) 環境再生保全機構 環境研究総合推進費4-1602として行われた一連の研究について解説し、陸水域生態系に生息する生物群集のモニタリング、さらには、その集団遺伝学的解析を目指して取り組んでいる研究を紹介する。

## 2. 各グループでの主な研究成果

- (1) 全国での湖沼や河川での野外調査、採水を行った。得られたサンプルについて、MiFishプライマーを用いて解析を行い、淡水域における有効性を検討した。
- (2) 既知の魚類相情報とMiFishを利用したメタバーコーディング結果の整合性の検討を行い、採水地点の配置やろ過手法について効率化を検討した。
- (3) 魚類以外の脊椎動物と無脊椎動物のユニバーサルプライマーを開発してその性能について検証試験を行った。並行して魚類のリファレ

ンスデータの充実に努めた。

- (4) メタバーコーディングに適用可能なデータが少ないプランクトンについて、リファレンスを構築し、解析領域の候補を比較検討した。

- (5) 水田の水などの濁水および堆積物からの環境DNA解析手法を開発した。並行して、トンボ目のユニバーサルプライマーおよび、希少種の種特異的検出法を確立した。

- (6) 環境水と湖底堆積物におけるDNA回収率などを比較し、汽水域における最適な環境DNAサンプリング手法を確立した。また、回遊性魚種の種特異的検出系を開発した。

- (7) 北海道地方の河川を中心に網羅的な採水を行い環境DNAを収集、一部捕獲調査も行い、調査結果と検出魚類相を比較検討した。

- (8) 核DNA上の多型マーカーにおけるアレル頻度を定量的に解析する環境DNA分析手法を開発した。

## 3. 今後の環境調査への活用に向けて

本プロジェクトでは、環境モニタリングとして環境DNA技術、特にメタバーコーディングによる生物多様性調査と遺伝的多様性調査を進める場合の基準や標準的な方法の開発を進めている。これらの情報を還元することで、環境DNAによるモニタリング手法の策定に大きく貢献できると考えられる。

本研究は、独) 環境再生保全機構 環境研究総合推進費4-1602「環境DNAを用いた陸水生態系種構成と遺伝的多様性の包括的解明手法の確立と実践」の成果の一部である。

# 水産研究のための環境DNA—現状とこれから

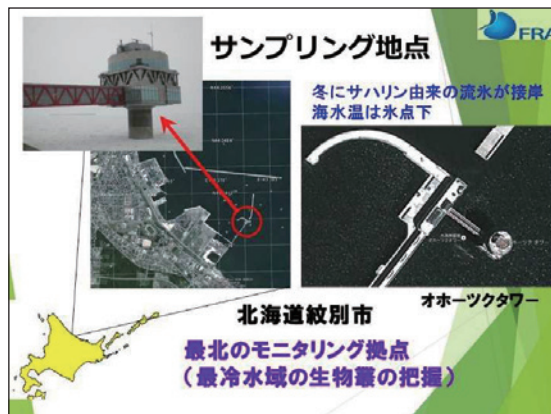
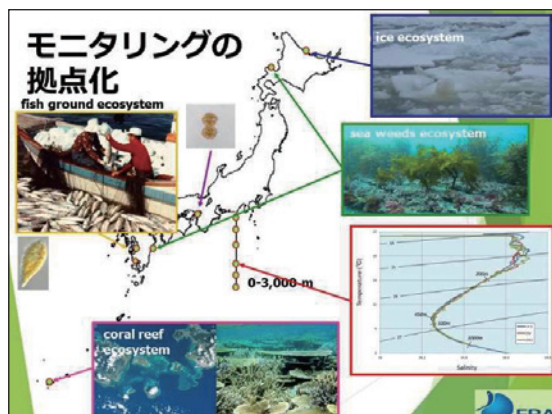
宮原 正典（水産研究・教育機構）

キーワード：eDNA・漁業・資源管理・成長産業化

著者連絡先：masamiya@fra.affrc.go.jp

多種多様な漁業資源に恵まれた北西太平洋水域は、世界の漁業生産量の約1/4を占める世界で最も豊かな海域の一つである。しかしながら、我が国水産業の生産は減少し、近年水産資源の回復を求める声は高まりを見せている。こうした中、2017年秋から内閣総理大臣の諮問機関である「規制改革推進会議」において、水産業の成長産業化を目指して政策の見直し作業が開始された。これを受け、去る6月15日に規制改革推進に関する第3次答申が発表されたが、その中では水産資源の管理の充実が一つの柱として提言され、そのための法改正や必要な予算拡充が急ピッチで進められている。資源管理の基礎となる資源評価の対象は、現在50魚

種に留まるが、これを5年後には200魚種程度にまで増やすとともに数量管理の対象を拡大し、我が国全漁獲量の8割以上をカバーすることが求められている。これら状況から資源調査の強化が急務であり、機構は資源解析の精度向上のため、従来の調査研究活動の増強に加え、新たな手法を開発するためにも、都道府県や大学、さらには外国機関との連携を深めようとしている。このような動きの中で環境DNAは有望な新手法の一つと考えられるが、資源評価への貢献については未知数であり、当面は調和のとれたデータ収集を関係機関と連携して慎重に進め、徒に脚光をあてて誤った過大な期待感を生まないよう努めていきたいと考えている。



## 環境省における環境DNA技術の活用と今後の期待

鳥居 敏男（環境省）

キーワード：自然環境保全基礎調査・モニタリングサイト1000・

絶滅危惧種・外来生物・環境アセスメント

著者連絡先：TOSHIO\_TORII@env.go.jp

環境省における環境DNA技術の活用はまだ緒に就いたばかりであるが、その可能性と今後の期待について考えたい。

環境省では自然環境保全法に基づき、1973年から「自然環境保全基礎調査」を実施している。これまでに陸域、陸水域、海域の各々の領域にわたり、動物、植物、地形、河川、湖沼、湿地、藻場・干潟、サンゴ礁等について国土全体の状況を調査している。これらのデータは、生物多様性国家戦略などの国土レベルの各種計画や指針の見直しに役立っているほか、地域的には、各自治体が土地利用計画を作成する際や、一定規模以上の開発に義務付けられている環境影響評価を行う際の基礎資料として活用されている。また2004年度からは、気候変動などによる生物・生態系への影響を把握するため「モニタリングサイト1000」事業に着手し、国土に約1,000箇所の定点サイトを設け、例えば湖沼のサイトでは淡水魚類の生息調査を実施している。さらに2013年度からは、インターネットを活用して全国の生物情報を統合的に共有化して提供するシステム「いきものログ」を構築、運用している。行政機関、研究機関、専門家、市民等が管理する生物情報を登録し、蓄積された情報は誰でも活用できる。これらの事業は生物多様性センター<sup>1)</sup>が実施しているが、このような調査に今後環境DNA技術を活用していくことが考えられる。

環境省は「種の保存法」を所管している。特に淡水域では、絶滅が危惧される淡水魚類の調

査手法が捕獲に限られるため、生息状況の把握に多大な労力と経費が必要となっていたが、環境DNA技術の活用により、法に基づく「国内希少野生動植物種」の指定促進と生息・生育地の保全が進むことが期待される。また「外来生物対策法」を所管する立場からも、環境DNA技術を用いた調査により、特定外来生物に該当する魚類の効率的・効果的な駆除手法や、精度の高いモニタリング手法の開発が期待される。

このほか環境省では、2014年度から、風力発電等の再生可能エネルギーの導入拡大と、質が高く効率的な環境アセスメントの実施を促進することを目的として、「環境アセスメント環境基礎情報データベースシステム」<sup>2)</sup>を運用している。このような基礎情報にも環境DNA技術を使った調査結果を盛り込んでいくことで、情報量の充実が期待される。

以上のように環境DNA技術は、生物・生態系の調査とそれを基にした対策や計画の作成に大きな効果をもたらすものとして期待される。今後は淡水域のみならず海域における調査でも活用できるよう、また対象生物の分布だけでなく生物量や季節変動なども推察できるよう、さらなる精度の向上や技術の確立に向けた検証を進めていきたい。

1) 環境省生物多様性センター HP：  
<http://www.biodic.go.jp/>

2) 環境アセスメント環境基礎情報DBS：  
<https://www2.env.go.jp/eiadb/ebidbs/>

# 河川水辺の国勢調査の経験と環境DNAへの期待

光成 政和（国土交通省）

キーワード：河川水辺の国勢調査・河川環境調査

著者連絡先：mitsunari-m752@mlit.go.jp

## 1. 概 要

「河川水辺の国勢調査」は、河川を環境という観点からとらえ、定期的、継続的、統一的に、河川に関して基礎情報の収集整備のために行っている調査である。平成2年度から、主に全国109の一級水系の国土交通省管理区間の河川及び、国土交通省・水資源機構の管理ダムを対象として行われ、調査項目対象生物は魚類、植物、鳥類等多岐にわたり、項目によって異なるものの概ね5～10で一巡するよう調査を行っている。

河川水辺の国勢調査における生物の生息・生育環境等に関するデータは雨量や水位などと同様に、河川の整備・管理に必要な基礎的情報であり、河川整備計画の策定、工事による貴重種等の影響可能性の評価、保全対策の立案、建設後のモニタリング等に活用している。

## 2. 精度管理

適切な調査精度の確保にあたっては、調査計画の策定時に、河川生態等に精通したアドバイザー等の学識経験者の助言を得て実施することとしており、調査結果は、分類学等に精通した学識経験者によるスクリーニング委員会を組織して、魚類、植物、鳥類等の調査結果の検証を行っている。

## 3. 効率的な調査に向けて

従来の調査結果の精度を維持しつつ、効率的



Fig.1 水辺の国勢調査の概要

な調査が求められていることから、長年にわたる調査結果等の成果も踏まえ、調査サイクルや年調査回数等の見直し、指標性の高い種等を対象として同定する種のレベルの絞り込み等を行い、作業の効率化と精度の維持を図っている。

## 4. まとめ

予算が厳しい中、河川水辺の国勢調査についても一層のコスト縮減と必要な精度の維持が求められるところであり、環境DNA等、革新的技術の発展を期待したい。

# 環境DNA観測に基づく大規模生態系データの獲得： 高度生態情報社会の可能性

近藤 倫生（東北大・院・生命）

キーワード：多地点高頻度観測・大規模生態系データ・高度生態情報

著者連絡先：michio.kondo.b8@tohoku.ac.jp

## 1. はじめに

環境DNA技術を利用した生態系調査の最大の武器は、その省力性と迅速性にある。これまで実施されてきた調査と比較して、環境DNA調査で求められる現地での作業はごく少量の採水のみと極めて簡便であり、その後の試料分析も短い時間で行うことが可能である。これにより、生態系調査の大規模化、すなわち観測地点を増やす「多地点化」と観測頻度を増やす「高頻度化」、が可能になる。

## 2. 大規模生態系データがもたらすもの

生態系観測の大規模化という量的変化が生じると、近年になって大きく発展したデータ解析技術と結びつき、生態系管理の手法や自然科学のあり方に様々な質的変革がもたらされる可能性がある。例えば、生態系調査の「多地点化」が進めば、生物の分布に関する情報が入手できるようになるだけでなく、調査対象となっている生物の存在を定めるルールを特定できるようになる。また、高頻度の観測によって生態系変動を表す時系列データに基づいて、その背後に隠された規則が明らかにできれば、これまででは容易ではなかった生態系変動の短期予測技術の確立も現実味を帯びてくる。

## 3. 環境DNA観測に基づく高度生態情報社会

大規模な環境DNA観測から生態系に関する高解像度の情報（高度生態情報）が得られるようになると、その影響は、生態系の状態把握・

評価に関わる様々な分野、例えば水産分野や環境関連分野に波及するだろう。多地点高頻度の生態系情報獲得を可能にする環境DNA技術は、気象観測におけるアメダスの多地点観測になぞらえられる。ちょうど気象データに基づいて気象予報が行われるように、大規模な環境DNA観測データから作成した「生態系天気図」を使って、生態系の状態変化や異常を検知したり、将来の予報を行ったりできるようになるかもしれない。また、大規模生態データは生態学などの基礎科学を、従来の仮説検証型研究の分野から、データ駆動型・発見型の研究分野へと大きく転換させるだろう。

## 4. 環境DNA技術の社会実装に向けて

環境DNA観測を利用した高度生態情報社会を実現するには、今後も引き続き環境DNA研究が推進されなくてはならない。環境DNA技術は未だ誕生して間もない「若い」技術であり、本格的な社会実装までに解決しておくべき課題が数多く残されているためである。また、環境DNA観測の社会実装には採水施設や分析施設などのインフラ整備だけではなく、環境DNA観測データあるいは試料水の管理方針の策定も必要となるだろう。いずれの課題も、研究機関と民間企業、行政が互いに連携しつつ解決していくことが求められる。環境DNA学会が、環境DNA技術のさらなる発展・普及、そして生態系保全・持続的利用を目指す様々な立場のメンバーの連携する場となることを願っている。

# 第1回環境DNA学会東京大会 実行委員会

## 東京大会 大会長

笠井 亮秀 (環境DNA学会 監事・北海道大学)

## 環境DNA学会大会企画委員会

笠井 亮秀 (環境DNA学会 監事・北海道大学)

土居 秀幸 (環境DNA学会 専務理事・兵庫県立大学)

高原 輝彦 (環境DNA学会 理事・島根大学)

宮 正樹 (環境DNA学会 副会長・千葉県立中央博物館)

## 司会進行担当

荒木 仁志 (環境DNA学会 広報担当理事・北海道大学)

清野 聡子 (環境DNA学会 渉外担当理事・九州大学)

## 会場担当

清野 聡子 (環境DNA学会 渉外担当理事・九州大学)

## 企業展示担当

益田 玲爾 (環境DNA学会 庶務担当理事・京都大学)

## ポスターセッション担当

益田 玲爾 (環境DNA学会 庶務担当理事・京都大学)

## 懇親会担当

源 利文 (環境DNA学会 副会長・神戸大学)

## 受付担当

山中 裕樹 (環境DNA学会 理事・龍谷大学)

生駒 優佳 (環境DNA学会事務局)

乗地 真里 (龍谷大学)

内井 喜美子 (環境DNA学会 会計担当理事・大阪大谷大学)

## アルバイト担当

山中 裕樹 (環境DNA学会 理事・龍谷大学)

荒木 仁志 (環境DNA学会 広報担当理事・北海道大学)

## 会計担当

内井 喜美子 (環境DNA学会 会計担当理事・大阪大谷大学)

生駒 優佳 (環境DNA学会事務局)

## プログラム集 要旨集担当

土居 秀幸 (環境DNA学会 専務理事・兵庫県立大学)

## ホームページ担当

荒木 仁志 (環境DNA学会 広報担当理事・北海道大学)

高原 輝彦 (環境DNA学会 理事・島根大学)

山中 裕樹 (環境DNA学会 理事・龍谷大学)

## 庶務担当

生駒 優佳 (環境DNA学会事務局)

土居 秀幸 (環境DNA学会 専務理事・兵庫県立大学)

内井 喜美子 (環境DNA学会 会計担当理事・大阪大谷大学)

高原 輝彦 (環境DNA学会 理事・島根大学)

## 第1回環境DNA学会東京大会 プログラム集

2018年9月29日～30日

The 1<sup>st</sup> annual meeting of The eDNA Society Programs

29-30 September, 2018

出版：2018年9月18日

発行：一般社団法人環境DNA学会

〒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

e-mail：office@ednasociety.org

ホームページ：http://ednasociety.org/

Copyright © 2018 The eDNA Society, Japan All rights reserved (無断転載不可)



**The eDNA Society**