

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「海洋生物多様性および生態系の保全・
再生に資する基盤技術の創出」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 2013年10月～2019年3月

研究代表者：近藤倫生
(東北大学大学院生命科学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

[目標1] 生物分布・生物量の定量モニタリング技術

効率的かつ高精度な環境 DNA の回収・定量手法を確立した。マアジやカタクチイワシを対象とした舞鶴湾全域調査をおこない、水槽実験により把握した環境 DNA 動態(放出・分解速度)の環境・生物条件依存性、統計モデルを利用して、局所環境 DNA 濃度が周辺の生物量を反映することを明らかにした。また、丹後海・舞鶴湾での海洋環境を再現する物理モデルを開発・利用することで、多地点環境 DNA 調査データから舞鶴湾全体のマアジ量の推定が可能であることを実証した。シマアジ生簀を利用した実験により、舞鶴湾における環境 DNA の移流・拡散についての知見を得た。他にも、環境 DNA を利用した定量調査をスズキやウナギ、サケなどの多様な魚種を対象に実施し、本技術の汎用性を明らかにした。ユニバーサルプライマーと次世代シーケンサを用いた環境 DNA 定量手法を開発し、高頻度採水された試料を分析し、多種環境 DNA 時系列データ生成に成功した。

[目標2] 魚類群集構造の種解像度モニタリング技術

環境 DNA から多数の魚種を同時に検出する環境 DNA メタバーコーディング法を開発した。水族館において実施した実証実験では、リファレンス配列をもつ種の 93.3%に相当する 168 種の魚種の検出に成功した。また、舞鶴湾等の天然海水から得た環境 DNA 中からも、各海域を反映する魚種を検出することに成功したほか、全国沿岸の 500 以上の地点における環境 DNA 調査(全国一斉調査 2017)では日本産沿岸性魚類約 3,000 種の 45%に相当する 1300 種もの魚種を検出し、種多様性の南北勾配や個々の種の分布パターン把握(南方種の北上傾向等や地理的分化)に成功した。さらに最終年度には、環境 DNA メタバーコーディングによる多地点高頻度観測(全国一斉調査 2018)を実施し、生物分布の季節変動を明らかにするのに必要な試料を得た。他にもリファレンス配列の充実、検出精度をさらに高めるための実験条件(アニーリング温度や PCR の繰り返し数)の検討、天然海水でも適用できる大量ろ過法などの新しい関連技術の開発も行った。

[目標3] 非線形予測を応用した群集動態評価・予測技術

非線形動態理論に基づく Empirical Dynamic Modeling(EDM)を利用して、多種個体群密度時系列データから種間相互作用や生物群集安定性を評価する手法を完成させた。舞鶴湾における潜水調査による長期魚類相モニタリングデータにこの手法を適用し、魚種間の種間相互作用を検出したのみならず、生物群集の挙動の安定性の評価や、種多様性が種間相互作用強度を弱めることで群集安定性を高めることを明らかにし Nature 誌において報告した。また、種間相互作用の動態の詳細が既知である英国シルウッドパーク昆虫群集の時系列データを利用した研究では、EDM によって個体群密度変動データから種間相互作用を正しく推定できることを明らかにした。また、琵琶湖における植物プランクトン観測データの解析を通じて、シアノバクテリア等の動態予測が可能であることを明らかにした。舞鶴湾における高頻度環境 DNA 調査から得た多種環境 DNA 時系列データを解析することで、環境 DNA 時系列データに含まれる生態系情報を評価した。

[目標4] 海洋における環境 DNA を利用した種内多型解析手法の開発と応用

環境 DNA の定量性に加え種内多型を含めた実践的環境 DNA 解析手法を開発に取り組んだ。これまでに良好な予備実験結果が得られているサケ科魚類、および舞鶴湾の優先種であるマアジを対象として種内多型検出手法の開発に取り組んだ。サケ科魚類についてはこれまでも水産総合研究センター、千歳さけます事業所の協力の下、実施した予備実験に加え、サケマスふ化施設の種苗親魚、及び飼育稚魚個体サンプルから従来の集団遺伝学手法を用いて種内多型情報の集積に取り組んだ。同時に各飼育池、および北日本におけるサケマス生息域から環境 DNA を採取し、ミトコンドリア DNA および核 DNA を抽出、これら DNA の検出パターンを比

較することで、核 DNA からの環境 DNA 情報抽出手法の最適化を図った。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. 舞鶴湾の多地点において魚群探知機による魚類資源量推定と環境 DNA 定量調査を同時に行なった。これらのデータを詳細に解析した結果、マアジの環境 DNA 量が周辺の半径 150m 程度の海域の魚類バイオマスをよく反映することが明らかとなった。この結果から環境 DNA 解析法が魚類の資源量推定に適用できる可能性が強く示唆された。オープンな環境でも環境 DNA 量が生物量を反映することを示した初めての成果となった。(代表的な論文2)
2. 近藤チームで開発した魚類の環境 DNA メタバーコーディング用プライマーである MiFish を用いて、舞鶴湾に生息する魚種を推定可能か検証した。舞鶴湾の 47 箇所で採水した環境 DNA サンプルを解析した結果、128 種の魚類の DNA を検出することができた。この 128 種には 14 年間、計 140 回の潜水目視調査で観察された種の 6 割以上が含まれていた。また、これまでに目視では確認されることのなかった種も多数検出することができ、MiFish プライマーの有効性を確認することができた。(Yamamoto et al., Scientific Reports vol.7, pp.40368, (2017) DOI: 10.1038/srep40368)
3. 多種生物量を反映する時系列データから種間相互作用を検出するとともに、その変動の様子を捉え、群集動態安定性(局所リアプノフ指数)の評価を可能にするデータ解析手法を開発した。舞鶴湾で実施された過去 12 年の潜水魚類相調査データにこの手法を適用することで、夏季には種多様性が高まった結果、種間相互作用が弱まり、群集安定性が高まることなどを明らかにした。データにノイズを含みがちなる生物相調査をもとに、生物群集の構造と動態、さらにはそれらの間の関係性を評価できることを示すことに成功した。(代表的な論文3)

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 環境 DNA から多数の魚種を同時に検出する実験系(メタバーコーディング法)を確立した。種組成がわかっている水族館の水槽を用いてその性能試験を行ったところ、9 割以上の魚種の検出に成功した。また、野外で採取した水試料の分析から、現地の魚類相をよく反映する生物相が推定された。生物相モニタリングの革新的手法であり、「バケツ一杯で海や川にすんでいる魚種を特定する技術」としてサイエンス ZERO をはじめとする各種メディアに取り上げられた。また、本技術は欧米各国の研究者に広く使われ始め、さらに国内外の民間企業が本技術を利用した受託分析を開始した。(代表的な論文1)
2. 魚類環境 DNA メタバーコーディングの手法の開発により、水を汲むだけで「いつでも・どこでも・誰でも」魚類群集の概要を知ることができるようになった。この技術は、既に環境調査会社の分析メニューの一つに組み込まれており、海洋保護区の設定等についても基礎データを提供するなど大きな貢献が期待されている。この手法の一般への普及を促進するために、本手法で得られた大量塩基配列データを解析するパイプラインを、一般にも利用できるようにユーザーインターフェースを加え、データベース MitoFish (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp>) に搭載し、その概要を発表した。(Sato et al., Molecular Biology and Evolution, Vol. 35, Issue 6, p1553-1555 (2018) DOI:10.1093/molbev/msy074)
3. 生体からの放出後時間とともに環境 DNA の断片化が進むことを利用し、長鎖 DNA を解析することでより「新鮮な」情報を得ることを目的とした。まず、水槽実験によって長鎖 DNA の方が短鎖 DNA より分解が早いことを確認した。次に、舞鶴湾で採取したサンプルを長鎖 DNA 定量系で測定した結果、短鎖 DNA 分析では確認された漁港由来の系外 DNA の影響が全くなかった。また、長鎖 DNA 量のほうが短鎖 DNA 量よりも魚群探知機から推定されるマアジ個体の分布をよく反映していることが明らかになり、長鎖 DNA を用いることでより新しい情報を得ら

れることが示された。(Mol Ecol Resour. 2017 Nov;17(6):e25-e33, DOI: 10.1111/1755-0998.12685)

<代表的な論文>

1. Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, T., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M. & Iwasaki, W. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2: 150088.
2. Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K., Takahashi, K., Sawada, H., Tsuji, S., Hashizume, H., Kubonaga, S., Horiuchi, T., Hongo, M., Nishida, J., Okugawa, Y., Fujiwara, A., Fukuda, M., Hidaka, S., Suzuki, K. W., Miya, M., Araki, H., Yamanaka, H., Maruyama, A., Miyashita, K., Masuda, R., Minamoto, T., Kondoh, M. (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.
3. Masayuki Ushio, Chih-hao Hsieh, Reiji Masuda, Ethan R Deyle, Hao Ye, Chun-Wei Chang, George Sugihara, Michio Kondoh, "Fluctuating interaction network and time-varying stability of a natural fish community." *Nature* 554: 360-363, 2018.

§ 2. 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 近藤グループ(東北大学)

- ・ 研究代表者:近藤 倫生 (東北大学生命科学研究科、教授)
- ・ 研究項目
 - －環境 DNA による特定対象種の検出系の開発
 - －環境 DNA の回収効率に関する水質条件の検討
 - －環境 DNA から種間相互作用を検出する技術、および生物定量をおこなう技術の開発

② 源グループ(神戸大学)

- ・ 主たる共同研究者:源 利文 (神戸大学人間発達環境学研究科、准教授)
- ・ 研究項目
 - －海水からの効率的 DNA 回収法の開発
 - －特定対象種の高精度 DNA 量評価手法の開発
 - －環境 DNA の由来に関する研究

③ 益田グループ(京都大学)

- ・ 主たる共同研究者:益田 玲爾 (京都大学フィールド科学教育研究センター、准教授)
- ・ 研究項目
 - －生物分布・生物量の定量モニタリング技術
フィールド実証実験:舞鶴湾における目視潜水調査と環境 DNA 量との対応の検証
水槽実験:水槽内における環境 DNA 量の偏在性の検証
発電所温排水実験:温排水による局所的温暖化海域における魚類群集の検討

④ 笠井グループ(北海道大学)

- ・ 主たる共同研究者:笠井 亮秀 (北海道大学水産科学研究院、教授)
- ・ 研究項目
 - －環境 DNA を利用したスズキの生物量・分布評価の実証実験
 - －環境 DNA 情報を魚類定量情報へと「翻訳」する技術の開発

⑤ 宮グループ(千葉県立中央博物館)

- ・ 主たる共同研究者:宮 正樹 (千葉県立中央博物館、動物学研究科長)
- ・ 研究項目
 - －次世代シーケンサを用いた環境 DNA 分析法の確立と魚類ミトゲノム配列の網羅的決定
 - －魚類ミトゲノムデータベース MitoFish の開発・運用

⑥ 荒木グループ(北海道大学)

- ・ 主たる共同研究者:荒木 仁志 (北海道大学農学研究院、教授)
- ・ 研究項目
 - －海洋における環境 DNA を利用した核 DNA 多型検出技術の開発
 - －環境 DNA 種内多型解析手法の開発と応用

⑦ 清野グループ(九州大学)

- ・ 主たる共同研究者:清野 聡子 (九州大学大学院工学研究院、准教授)
- ・ 研究項目
 - －対馬暖流域における環境 DNA メタバーコーディングに基づく海洋保護区の設定とその管理
 - －環境 DNA を用いた魚類相インベントリの地域社会での活用

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ① 研究チームメンバーは、謝志豪 博士(国立台湾大学海洋研究所)および George Sugihara 博士(SCRIPPS, UC San Diego)と、時系列データの非線形動態理論に基づく解析について共同研究を行っている。また、中国、台湾、タイなどの研究者と環境 DNA 分析にかかる共同研究も行っている。
- ② 2018 年 4 月、研究チームメンバーが中心となって一般社団法人環境 DNA 学会を設立し、行政や産業界との連携の仕組みを構築した。研究代表者の近藤が学会理事長に選出された。
- ③ 研究チームメンバーは、環境アセスメントを行う複数の企業から、奨学寄附金を得て受託研究を行っている。
- ④ 研究チームメンバーが、地方自治体の委託を受け、天然記念物に指定される生物や外来種の生息状況調査を行う受託研究を行っている。
- ⑤ 研究チームメンバーが、地方環境事務所の委託を受け、天然記念物に指定される生物や外来種の生息状況調査を行う受託研究を行っている。
- ⑥ 研究チームメンバーが、(国研)土木研究所より招へい研究員に委嘱され、環境 DNA の河川内動態などについて検討を行っている。
- ⑦ 複数の研究チームメンバーが、環境省委託業務にかかる検討会委員に委嘱され、環境 DNA 分析を用いた希少種の分布把握手法について指摘や助言を行っている。
- ⑧ かずさ DNA 研究所に魚類環境 DNA メタバーコーディング法を技術移転することにより、本研究所が受託分析を行うことを可能にした。
- ⑨ 研究チームメンバーが、国立環境研究所や北海道立総合研究機構と連携し、環境 DNA を用いて北海道内の河川を網羅的にモニタリングする共同研究を行っている。
- ⑩ 研究チームメンバーは、長崎県対馬市の海洋保護区設定、藻場管理政策へ環境 DNA 技術を導入した。環境 DNA メタバーコーディング法による魚類相を掲載した「対馬魚類図鑑」を対馬市役所と共著で同市ホームページにて公表した。
- ⑪ 福岡市博多湾での環境修復効果のモニタリングへの環境 DNA 手法の導入を国土交通省と開始した。