

環境DNA技術: バケツー杯の水から生態系を把握する

近藤 倫生 東北大学生命科学研究科

宮 正樹 千葉県立中央博物館

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



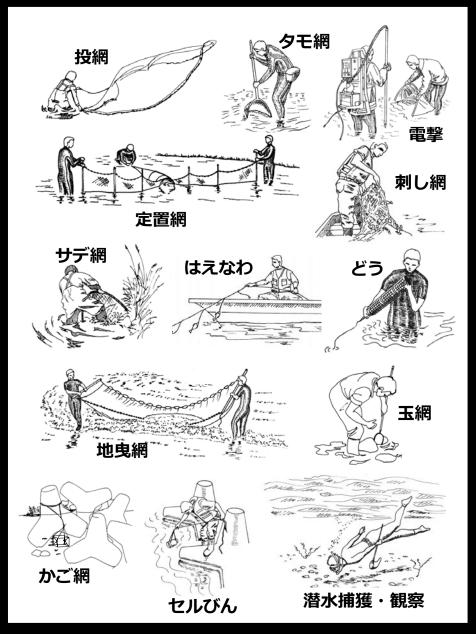
- ▶ 科学技術振興機構(JST)の公募 プロジェクト型研究CREST
- 研究領域「海洋生物多様性および 生態系の保全・再生に資する基盤 技術の創出」(研究総括 小池勲 夫, 16チーム)
- 期間:平成25~30年度(5年半)
- ▶ 共同研究者:

荒木 仁志(北海道大) 笠井 亮秀(北海道大) 清野 聡子(九州大) 益田 玲爾 (京都大) 源 利文(神戸大) 宮 正樹(千葉県立中央博) 生態系の「理解」が 人間の福利にとって 極めて重要な意味を持つ





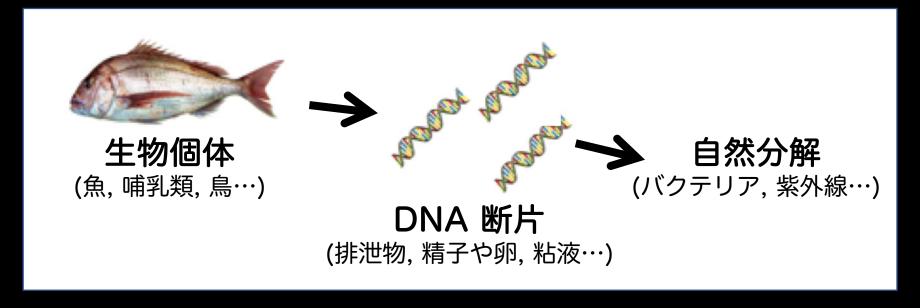




- ▶ 従来手法で生態系の大規模 データを得るのは容易では ない
- > 人的・時間的コストが高い/ 破壊的/非効率な手法も多い

国土交通省「河川水辺の国勢調査」マニュアルより

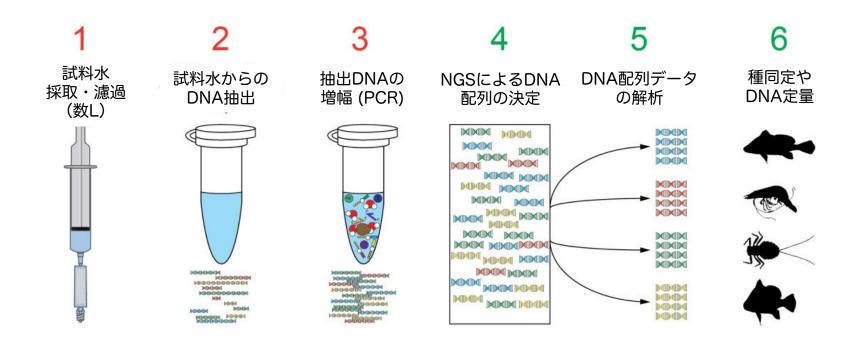
環境DNAとは何か



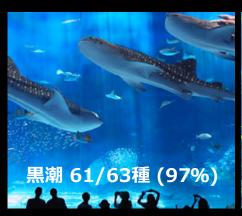
- > 環境DNA=環境試料 (水や土壌, 空気など) 中に存在するDNA
- > 環境DNAは生物由来(排泄物や粘液、精子・卵など様々な起源)
- ▶ DNAの塩基配列には種や系群等に関する情報が含まれる
- ▶ 環境DNAは水中では1週間以内に分解され検出不能になるため、生物の検 出や生物相調査に利用することができる
- > 環境DNAを利用すれば、環境への負荷を少なく、種解像度の生物多様性観 測が可能

海水中の魚類DNAを利用した生態系モニタリング手法の開発

調査海域の海水試料中の環境DNAから 生物量・分布と個体群・群集構造を知る



迅速性と省力性:沖縄美ら海水族館での実証試験







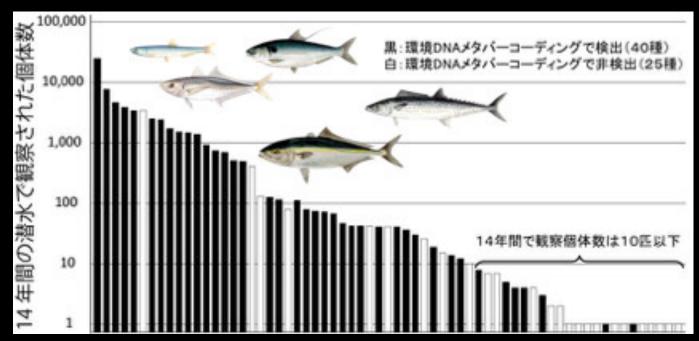


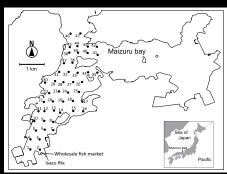
| 項目 | 黒潮 | 熱帯 | 深層 | 汽水 |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| MiSeq の2~5回のランで得られた総リード数 | 2,568,008 | 1,301,723 | 240,508 | 212,643 |
| 各水槽で飼育されている種数 (A) | 69 | 155 | 15 | 8 |
| 飼育種 (A) のうちリファレンスがある種 | 63 | 105 | 13 | 8 |
| MiSeq で検出された種数 (一致率97%以上) | 61 (97%) | 95 (91%) | 13 (100%) | 8 (100%) |
| 各水槽の容積 (m³) | 7,500 | 700 | 230 | 35.6 |

Miya et al. (2015)

- 4つの水槽 (36~7500 m³) に 249 魚種を飼育
- 各水槽から10Lの水採取、環境DNAメタバーコーディングによる分析
- 59科123属168種を検出(水族館で飼育された魚種の93.3%に相当)

迅速性と省力性:舞鶴湾での野外実証試験





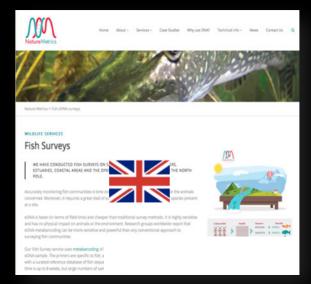


Yamamoto et al. (2017) より一部改変

魚種(観察数の多いものから順に並べた)

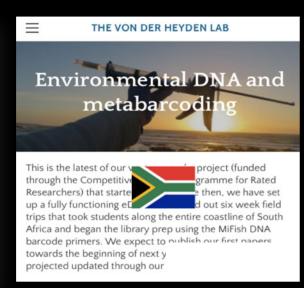
- 舞鶴湾西湾の47地点にて採水(表層・深層より1Lずつ;6時間調査), 環境DNAメタバーコーディング
- > 14年間140回の潜水調査で73,709個体・80種を観察、環境DNAでは ほとんどの優占種の検出に成功
- 過去14年間の観察では記録されていない20種以上を検出

開発した手法 (MiFish 法) は世界中の海や川で使われるようになった



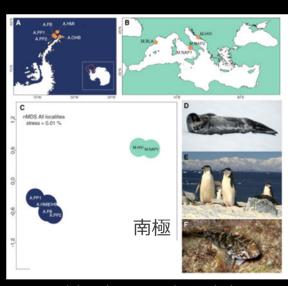
https://www.naturemetrics.co.uk/fish-edna-surveys/





https://www.vonderheydenlab.com/



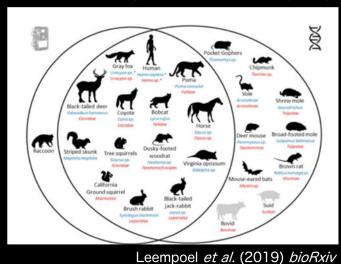


Mariani et al. (2019) Current Biology 29(11):R401-402



MiFish法の派生技術: MiMammal, MiBird, MiDeca

MiMammal で検出された北米の哺乳類



MiMammal

Key Words mitochondrial 16S rRNA gene, biodiversity monitoring, MiDeca, natural sea water

IMIMBMG

decapod crustaceans

Corresponding surbor: Tomoyaki Komai (komai@chiba-muse.or.p)

MiMammal で検出されたアマゾンの希少哺乳類

Sales et al. (2019) bioRxiv

Komai et al. (2019) Metabarcoding and Metagenomics 3: e33835

Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding

Academic editor: Fasco Ethycht | Received 13 February 2019 | Accepted 3 April 2019 | Published 24 April 2019

The Decapoda is one of the largest orders within the class Malacostraca, comprising approximately 14,000 extant species and in duding many commercially important species. For biodiversity monitoring in a non-invasive manner, a new set of PCR primers was

developed for metabarcoding environmental DNA (eDNA) from decaped crustaceans. The new primers (herein named "MiDeca") were designed for two conservative regions of the mitochondrial 16S rRNA gene, which amplify a short, hyper-variable region (153-184 bp, 164 bp on average) with sufficient interspecific variations. With the use of MiDeca primers and tissue-derived DNA extracts, we successfully determined those sequences (154–189 bp) from 250 species, placed in 186 genera and 65 families across the suborder Dendrobranchiata and 10 of the 11 infraorders of the suborder Pleocyemata. We also preliminarily attempted eDNA metabarcoding from natural seawater collected at Banda, Tateyama, the Pacific coast of central Japan and detected 42 decapod species including 34 and 8 species with sequence identities of > 98% and 80-98%, respectively. The results suggest the usefulness

of eDNA metabarcoding with MiDeca primers for biodiversity monitoring of the decapod species. It appears, however, that further optimisation of primer sequences would still be necessary to avoid possible PCR dropouts from eDNA extracts

Tomoyuki Komai¹, Ryo O. Gotoh², Tetsuya Sado², Masaki Miya² 1 Department of Zuology, Natural History Museum and Institute, Cleba, Cleba, 260-8682, Japan

2 Department of Ecology and Environmental Sciences, Natural History Museum and Institute, Chiha 260-8682, Japan







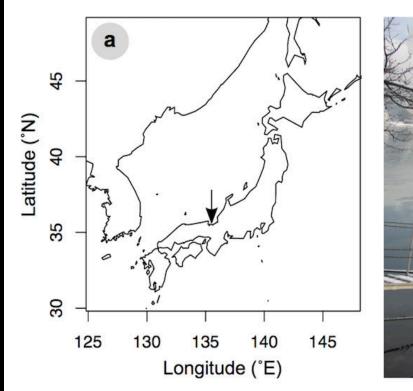
Metabarcoding and Metagenomics 3: 1-19 DOI 10.3897/mbmg.3.33835



環境DNA観測の未来

1. 高頻度生態系観測

環境DNA技術を利用した大規模データ獲得:舞鶴湾での高頻度観測

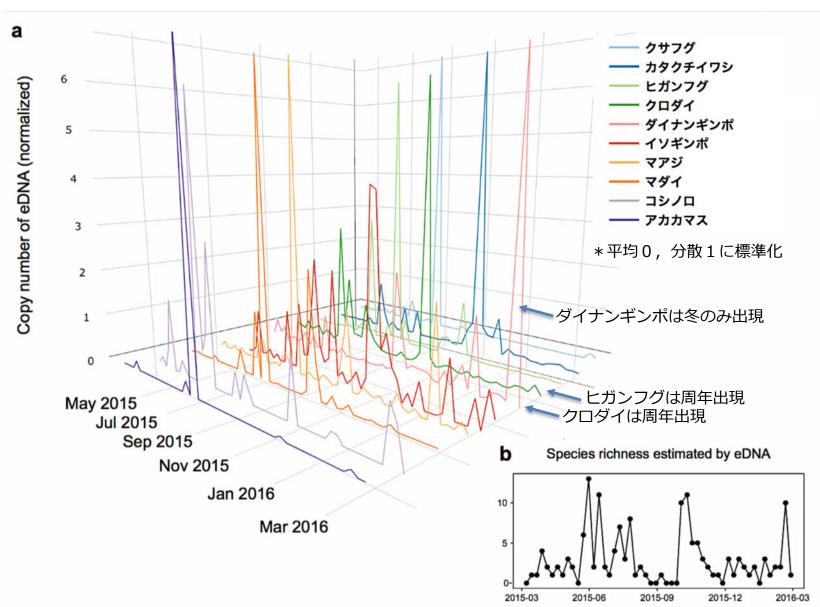




Ushio et al. (2017)

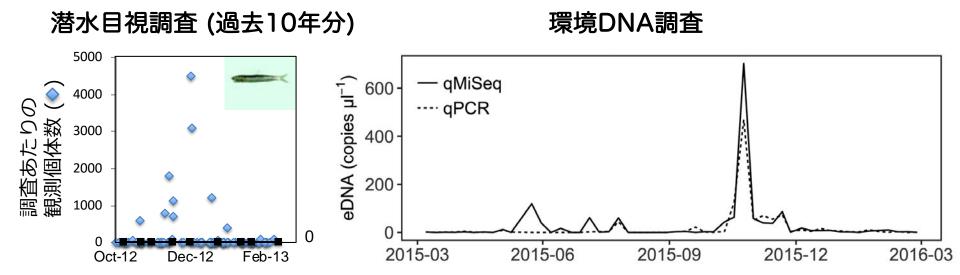
- 添加した「標準DNA」を利用することで次世代シーケンスのリード数データから多種のDNA量を定量評価するための手法を開発
- ▶ 定期的採水試料(2015年3月~2016年3月;毎週)を分析、一度のNGS分析 から多種環境DNA時系列データ取得

舞鶴湾における主要10魚種の高頻度観測データ



環境DNA技術を利用した大規模データ獲得:舞鶴湾での高頻度観測





環境DNA観測の未来

2. 多地点生態系観測

全国一斉調査2017:528地点の全魚種調査を3ヶ月で



調査開始日:2017年6月5日

調査終了日:2017年8月30日

調査地点数:528地点

最北:宗谷岬(北緯45.52度)

最南:南硫黄島(北緯24.22度)

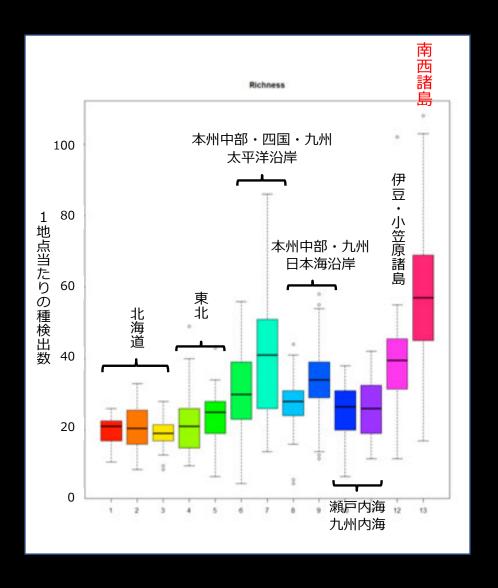
最東:納沙布岬(東経145.82度)

最西:与那国島(東経122.68度)

参加延人数:114名



CRESTによる調査(未発表)



最も多くの地点から検出された魚種



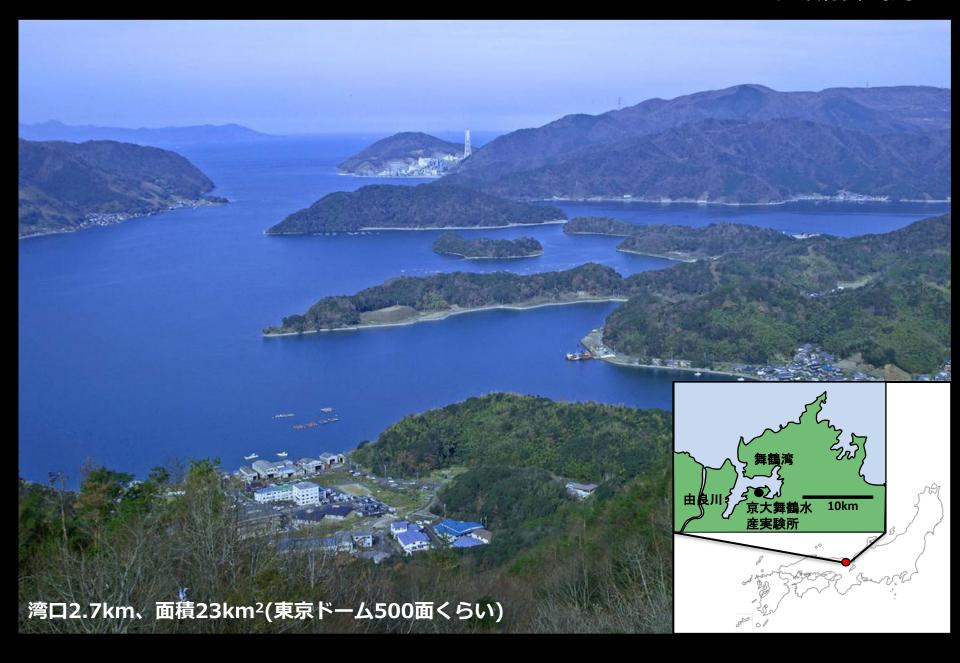
276 sites

- > 136科 521属 1,220 種の多様な魚が検出された
- > 日本の沿岸魚 (2,800種) の 43.5% に当たる

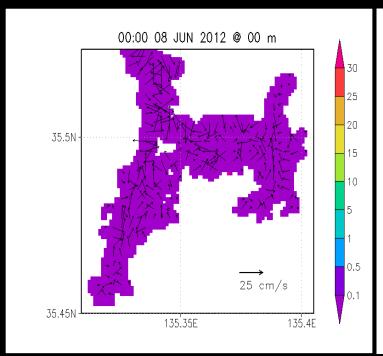
環境DNA観測の未来

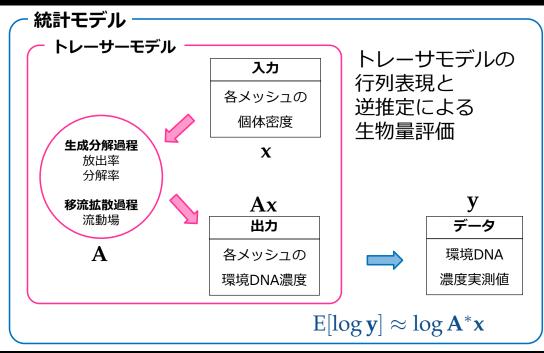
3. 生物量定量の可能性

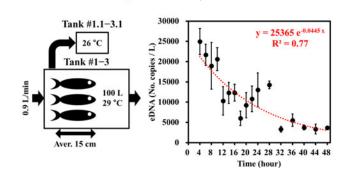
京都府舞鶴湾



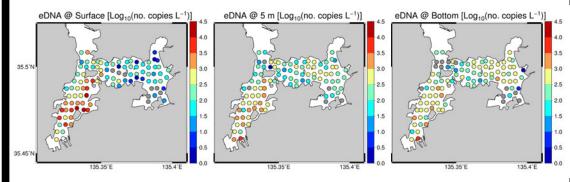
環境DNA技術を利用した生物量評価:舞鶴湾のマアジ





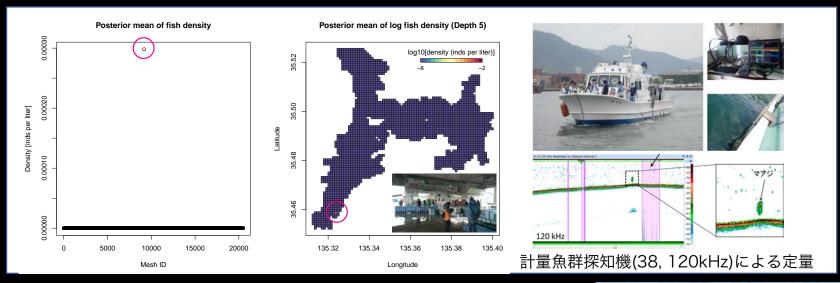


放出・分解速度評価(水槽実験)



y: 環境DNA調査 2016.6.21-22, 100測点

環境DNA技術を利用した生物量評価:舞鶴湾のマアジ



| データ | 推定個体数 | 推定生物量 |
|------------------|-----------------|-------------|
| 計量魚探 | 3600 万 | 36 トン |
| 環境 DNA | 7013 万 | 70 トン |
| | [5120万,9815万] | [51トン,98トン] |
| 環境 DNA(市場メッシュ除く) | 5672 万 | 57 トン |
| | [2615 万,9060 万] | [26トン,91トン] |
| | | |



Fukaya et al. (2018)

- ▶ 統計的推定はベイズ推定により行った
- マルコフ連鎖モンテカルロ法を用いて得た事後分布標本から個体数推定
- ▶ 魚探推定値とほぼ同程度の妥当な推定値を得ることに成功した

一般社団法人 環境DNA学会設立







- ▶ 2018年4月、環境 DNA 技術の発展と、環境 DNA 技術を活用した自然調和型社会の実現を目指す有志の交流の場として環境DNA学会を設立(一般197名・学生59名・賛助29団体)
- ▶ 環境DNA学会第一回東京大会(2018年9月29-30日;日本科学未来館;参加者309名)、第二回神戸大会(2019年11月3-4日:神戸大;288名 概数)

学会設立発起人

荒木 仁志(北海道大学農学研究院教授) 岩崎 渉(東京大学大学院理学系研究科准教授) 内井 喜美子(大阪大谷大学薬学部助教) 笠井 亮秀(北海道大学水産科学研究院教授) 近藤 倫生(東北大学大学院生命科学研究科教授)

清野 聡子(九州大学工学部准教授)

高原 輝彦 (島根大学生物資源科学部助教)

土居 秀幸 (兵庫県立大学シミュレーション学研究科准教授)

西田 睦(琉球大学副学長)

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)

源 利文(神戸大学大学院人間発達環境学研究科准教授)

宮 正樹(千葉県立中央博物館生態・環境研究部長)

山中 裕樹(龍谷大学理工学部講師)

山本 哲史(京都大学理学部助教)

環境DNA調査・実験マニュアルの公開

環境 DNA 調査・実験マニュアル

Ver. 1.2 (2018年10月31日)

一般社団法人環境 DNA 学会編

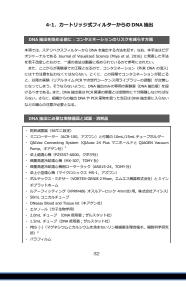


図 5-1-2-5
バクラーを分子実験用ベーバータオルで
されたばた物色。 むれたばたからない
と、日本の間に近が広で唱声を予測して
しまうので注意すること。

図 5-1-2-6
ロープの末端を懸にくくりつける。

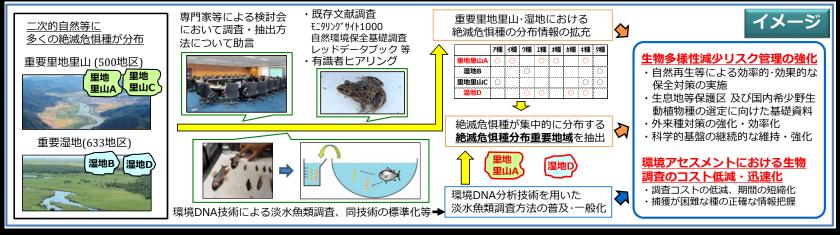
図 5-1-2-6
ロープを予修り寄せて磁珠木の入ったパ
ケッを回収する。

- ▶ 環境DNA学会作成、100ページ 以上に渡る標準マニュアル
- ➤ 環境DNA調査・実験に必要な、 調査地の選定・採水および濾 過・ DNAの抽出・分析の手順 について、写真や参考文献等を 交え解説
- ▶ 調査者の違いによる分析結果の 違いなどを根本的に解消するこ とが可能
- 環境アセスメントや水産資源管理の現場で有益に利用できる質の高い分析の普及を目標に学会ウェブサイトにて無償公開(https://ednasociety.org)

行政による環境DNA調査マニュアル作成と学会の貢献

環境省「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・一般化検討業務 」

環境省「里地里山及び湿地における絶滅危惧種分布重要地域抽出調査費」資料より抜粋



専門家委員として学会理事多数が参加、環境DNA学会と連携しつつマニュアルを作成

水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所



環境DNAに関する技術指導とマニュアルの提供

- l. 魚類相調査のための採水・現場ろ過マニュアルの提供
- 2. 前処理サンプルのDNA測定および解析マニュアルの提供
- 3.環境DNA学会専門家による第1項に関する講習会の開催
- 4. 環境DNA学会専門家による第2項に関する実地指導

http://feis.fra.affrc.go.jp

環境DNAを活用した市民科学の推進



- 日本科学未来館と環境DNA学会の連携事業
- 船の科学館「海の学びミュージアムサポート」(日本財団・海と日本プロジェクト) による支援
- 日本各地の科学館・博物館等へプログラム を提供
- ▶ 市民による環境DNA観測は生態系保全の主軸のひとつを形成する可能性



ログイン

会員向けイベント

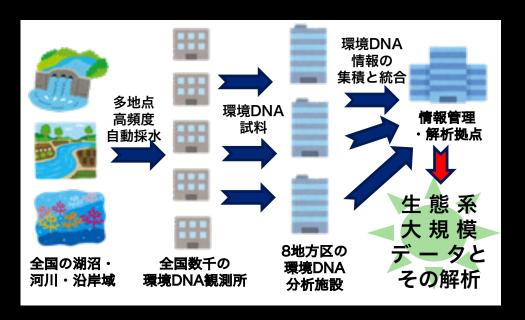
【試行会】『海の中には何がいる!? 環境DNAであばく、水の生き物とそのつながり』 9/23 10:00-

魚の粘膜やフンなど、生物の体からまわりへと出ていくものの中には、その生物のDNAが含まれています。このように海や川などの自然環境に含まれる生物のDNAのことを、「環境DNA」と呼びます。最近、この環境DNAを調べることで、その環境にどんな生物がいるかを把握する研究が進んでいます。このイベントでは、「環境DNA解析」という新しい技術を使って、皆さんが採取した水から、そこに生息している魚の種類を探りだす調査を実施していただきます。研究者と協力して、水の中の世界をあばいてみましょう!



海の中にはどんな魚がいる?

大規模環境DNA観測に基づく高度生態情報社会の実現:SDGsへの貢献



【水産】水産資源分布と変動予測を可能にする 「水産資源天気図」、水産物の飛躍的増産・持 続的利用

【生物多様性保全】高解像度生物多様性情報に 基づくきめ細やかな保全(いつどこを保護?)

【疫学】空港・家庭排水の環境DNA観測による 病原性生物の検出・感染症リスク管理

- 生態系・生物多様性観測を気象 観測の水準に高度化
- ▶ 多様な時空間スケールの生態系 データを多地点(数百~数千地 点)・高頻度(数分~数日間 隔)で収集
- 大規模データを高精度に解析することで迅速な状態把握、自然環境の変動予測、防災や異常検知、生態系保全に活用
- ➤ SDGsへの貢献 ⑦ 農林水産業の完全自動化;テラ・フォーミング技術の確立;23 海洋・地下を網羅的・高精度に測定し可視化・監視