

# 環境 DNA 分析による生物調査とその応用 – 環境 DNA 研究センター活動紹介 –

山口大学工学部に設置されている環境 DNA 研究センターでは、企業や行政とも連携し、環境 DNA 分析の技術開発や共同研究が行われています。魚類の環境 DNA 分析を起点に研究を進める同センターの中尾遼平先生に、現在の研究の内容や今後の環境 DNA 研究の進展について伺いました。



中尾 遼平 先生

山口大学大学院 創成科学研究科  
准教授（特命）  
山口大学 環境 DNA 研究センター  
メソット開発部門・応用生態（工学）部門  
山口大学工学部 流域環境学講座  
(日本工営株式会社共同講座)

Q. まず、山口大学の環境 DNA 研究センターについてご紹介ください。

A. 環境 DNA の分析技術の開発や活用システムの構築を行い、環境 DNA を多様な学問分野に応用することを目指しています。

山口大学環境 DNA 研究センター (<http://cedna.kenkyu.yamaguchi-u.ac.jp>) は 2018 年に設置されました。環境 DNA の基幹分析技術の開発、ビッグデータ解析やバイオインフォマティクスによる活用システムの構築を行い、多様な学問分野に環境 DNA を応用して横断的で先進的な研究を展開することを目的としています。本センターでは、山口大学の生態学、水産学、工学、獣医学、医学など様々な分野の研究者が研究に参加しています。私は 2019 年に同センターに所属し、同時にセンター長である赤松良久教授の研究室に所属しました。

赤松センター長は河川工学の専門家です。現在、河川管理の一環として、生物多様性が重視されており、生物モニタリングの点からも環境 DNA が注目されています。私たちは主に河川、海の干潟、浅瀬といった淡水域から汽水域の魚類、貝類、哺乳類、鳥類といったマクロ生物の環境 DNA を扱い、最近はウイルスや微生物も研究し始めています。

Q. 産官学連携による環境 DNA 分析にも携わっていらっしゃるそうですね。

A. 多くの企業や自治体、省庁と共同研究、分析委託などを行っています。

当センターのミッションとして環境 DNA の応用研究や人材育成を掲げており、企業からの分析の委託を受けたり、共同研究を行ったりしています。2021 年には環境 DNA に関する研究開発や情報共有を目的に環境 DNA コンソーシアムを設立し、環境コンサルタントや建設コンサルタントの企業に参画いただいております。

私の所属である山口大学工学部流域環境学講座は、建設コンサルタント企業の日本工営株式会社との共同講座です。そこで、日本工営さんとは環境 DNA 分析のノウハウを用いた環境モニタリング手法の開発やプラットフォームの整備などを、共同して行っています。

最近、国土交通省が行う「河川水辺の国勢調査」でも環境DNA分析が注目されています。そのなかで、河川で採集された魚類の種類や数（魚類相）と環境DNA分析の結果がどのくらい一致するのかを調べる研究を、国土交通省とともに始めました。また、水産試験場などからの分析依頼や共同研究も行っています。

Q. ご自身が環境DNA分析を始めた的には、どんなきっかけがあつたのでしょうか。

A. 博士研究員のときに魚類の環境DNA分析と出会ったのが始まりでした。

メダカが好きで、大学の卒業論文から大学院の博士論文までメダカの遺伝的多様性をテーマに遺伝子解析を行っていました。その後、神戸大学に博士研究員として在籍していたときに初めて環境DNA分析に出会い、これまで人力で行っていた調査が水を汲むだけで可能になるということで、衝撃を受けました。現在では、自身の研究であるメダカにも適用してみたり、魚類の多様性モニタリングに使ってみたりと、さまざまな用途で環境DNA分析を用いています。

Q. 魚類の環境DNA分析における、MiSeq™システムとiSeq™100システムの性能比較の論文について教えてください。

A. 同じサンプルを2つのNGSで分析したところ、機種間で結果にほとんど違いがないことを報告しました。

魚類の網羅的環境DNA分析（環境DNAメタバーコーディング）では、これまでイルミナ社の次世代シーケンサー（NGS）であるMiSeqシステムが主に使われてきました。後から発売された、より安価で小型のiSeq100システムは環境DNA分析にどのくらい有用なのかを調べた研究がなかったため、

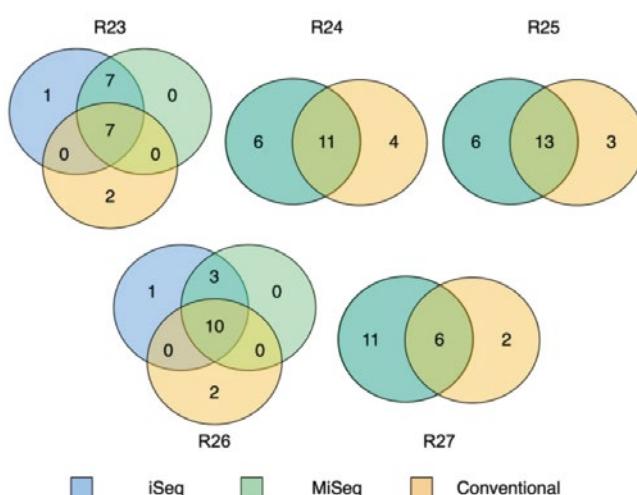
同じサンプルを使ってMiSeqシステムとiSeq100システムで比較してみました。

"Illumina iSeq 100 and MiSeq exhibit similar performance in freshwater fish environmental DNA metabarcoding" (<https://www.nature.com/articles/s41598-021-95360-5>)

日本各地の河川と湖沼から採取した水サンプルを用いて、検出された種数や種の組成の違いについて2つのNGS間で比較しました。その結果、iSeq100システムで検出された魚種の組成はMiSeqシステムのものとほぼ同じで、同品質のデータが出ることが示されました。また、網を用いた採集調査や水中の魚の種類や数をカウントする潜水面視調査などの従来の調査法（conventional method）のデータが存在する5つの河川のサンプルを使い、2つのNGSで検出できた魚種の数や組成を比較してみると、ほとんどのサンプルで青と緑の円が重なっており、2つのNGSはほぼ同等の分析ができることが明らかです（下図）。

MiSeqシステムでは解析の前後に洗浄を含むメンテナンスが必要です。一方で、iSeq100システムは、本体価格はMiSeqシステムの約5分の1で、カートリッジの入れ替えだけで使って、メンテナンスが楽なのが特徴です。そのため、iSeq100システムはNGSを用いたDNA分析これから始めてみたい人や研究機関でも使いやすい機種だと思います。私自身、MiSeqシステムを研究に使うときには外部に依頼していましたが、現在はiSeq100システムを使って自分でDNA分析を行っています。

iSeq100システムとMiSeqシステムの大きな違いは、スループットの違いに由来する1回で分析できるサンプル数と、解読できるDNA配列の長さです。たとえば微生物の多様性解析など、長いDNA配列を一度にかつ大量に解析したい場合にはMiSeqシステムが向きますが、少なくともマクロ生物（魚類や鳥類、哺乳類など）の環境DNA分析を行うのであれば、iSeq100システムで十分だと思います。



図：5つの河川サンプルにおける次世代シーケンサーと従来法の生物種数の比較のベン図。青はiSeqのeDNA、緑はMiSeqのeDNA、オレンジは従来法の生物種をそれぞれ示す。

**Q. 現在、研究で駆使されている定量的な網羅的環境 DNA 分析の手法について教えてください。**

**A. 定量メタバーコーディング法（qMiFish 法）によって、魚が“いる／いない”に加えて、“いるとすれば、どのくらいいるのか”をある程度推定できるようになりました。**

魚類の網羅的環境 DNA 分析の手法(以下、メタバーコーディング手法)は、千葉県立中央博物館の宮正樹先生(資料管理研究科主任上席研究員)が作成された、MiFish プライマーを使う方法が標準的です。この方法を用いる「環境 DNA 調査・実験マニュアル」(環境 DNA 学会)が 2019 年に作成され、現在、第 2 版が公開されています (<https://ednasociety.org/manual/>)。前述の論文でもこの MiFish プライマーを用いたメタバーコーディング手法 (MiFish 法) を用いて、iSeq 100 システムと MiSeq システムを比較しています。

調査地の水を汲んで MiFish 法で環境 DNA 分析を行うだけで、そこにどんな魚がすんでいるのか簡単に知ることができるようになりました。一方で、この方法では、どの魚が“いるかないないか”はわかりますが、どの魚が“どのくらいいるのか”については知ることはできませんでした。もしそれを知りたいのであれば、調べたい種を絞ってリアルタイム定量 PCR で見る必要があります。

しかし近年、京都大学の潮雅之先生(白眉センター 特定准教授)が定量メタバーコーディング法 (qMiFish 法)を開発されたことで、サンプルに含まれる魚類の環境 DNA を網羅的に検出しつつ、DNA の定量性をある程度担保できるようになりました (<https://mbmg.pensoft.net/articles.php?id=23297>)。qMiFish 法では、PCR による DNA 増幅の際に自然界に存在しない DNA 配列を内部標準 DNA として PCR 反応液に何種類か加えています。それぞれの内部標準 DNA の濃度はあらかじめわかっているため、それを基準としてすることで、NGS から出力された魚類の DNA を質的な情報から量的な情報へと変換することができるようになります。

qMiFish 法ができたことで、水さえ汲めれば、魚類の分布や組成を河川の上流から下流まで網羅的かつ量的に知ることができるようになりました。現在、赤松研究室および共同講座では、中国地方における一級河川を中心にして、河川流域の網羅的な環境 DNA 調査を実施しています。qMiFish 法を使ってこれらのサンプルを分析することで、それぞれの河川における魚類の組成や分布を推定しています。また、魚類の組成は上流から下流にかけて質的にも量的にも変化するので、どのような環境要因がその変化に影響をしているのかについても調査しています。たとえば、qMiFish 法を用いてアユやカジカのような回遊魚の分布をまとめて調べることで、どこの堰堤や砂防ダムが下流から上流に遡上するどの魚の障壁となっているかを一度に推定することも可能でしょう。

現在メタバーコーディング手法では、魚類だけでなく両生類や鳥類、哺乳類などさまざまな動物を対象とした分析手法が開発されています。いまのところ、定量メタバーコーディング法を適用できるのは魚類だけですが、ほかの動物についても

今後適用できるようになるかもしれません。そうなれば、ひとつの地点で採取されたサンプルを使ってさまざまな分類群の定量メタバーコーディング手法を行うことで、河川生態系における生物多様性や生物種間の関係などの生態学的な知見が得られるようになり、河川生態系の健全度を評価するための有用なツールとしても使えるのではないかと思います。

MiFish 法では、上記のように環境 DNA 学会によってマニュアルの作製や技術セミナーの実施が行われていることから、魚類のモニタリング手法として普及はじめています。一方で、qMiFish 法には定量用の内部標準 DNA を準備する必要があるため、MiFish 法のように普及するにはある程度時間がかかるかもしれません。もしくは、qMiFish 法用の内部標準 DNA ミックスなどが販売されれば、より普及しやすくなるのではないかでしょうか。

**Q. 環境 DNA 分析にはどのような可能性があると考えていますか。**

**A. 従来の生物調査と組み合わせることで、より正確な生物多様性データの収集が可能になると思われます。**

採取した水から魚類の種類や量がわかるのは環境 DNA 分析のすごいところです。また、環境 DNA 分析をつかうことで、捕獲などの従来の生物調査手法で取り逃していた生物種をみつけることもできます。一方で、前述の図の黄色部分のように、環境 DNA 分析では検出できず、従来の生物調査手法でのみ確認された種も見られます。そのため、どちらか一方のみを使うのではなく、これまでの生物調査手法に加えて、環境 DNA 分析を組み込むことで、より正確な生物多様性のデータの収集につながると思われます。また、こういった情報を 10 年 20 年のような長期的なデータとして積み重ねていくことで、研究の幅も広がるでしょう。

将来的には、環境 DNA 分析の結果が資源量の推定に使うことができるような精度まで向上すれば、魚類の資源量を考慮した漁獲量の調整などの政策的な提案に利用できるかもしれません。今のところはまだそこまで正確なデータは出せませんが、水中の環境 DNA がどのような動きをするのか、どれくらいで分解されるのかをより詳細に理解し、魚の種類や量、水流、天候などを考慮したシミュレーションや物理モデルなどを組み合わせて研究していくけば、より正確な予測につながると考えています。

Q. 水中の環境 DNA 分析以外にも、環境 DNA 分析は広がっているのでしょうか。

A. 大気や土壌など、さまざまな環境媒体を用いた環境 DNA 分析の研究がすすんでいます。

これまで、環境 DNA 分析の主な対象は水でしたが、近年では大気や土壌といった水以外の環境媒体も利用され始めています。当センターでも、最近、大気中の環境 DNA を対象とした哺乳類や鳥類の検出に取り組み始めました。ここでは、動物園でエアーサンプラーを使って園内の空気を捕集し、空気中に浮遊している哺乳類や鳥類の環境 DNA を検出する試みを行っています。ただ、大気中の環境 DNA 調査に関する基礎的な知見や情報が不足しているのが現状なので、まずは大気の捕集方法や捕集時間、フィルターのかけ方、解析方法など環境 DNA 分析の方法そのものの基礎的な検討を始めている段階です。今後より検討を重ねていき、同じ調査地点の水と大気の両方で環境 DNA 分析ができれば、水域と陸域のデータを組み合わせて、より詳細な生物多様性モニタリングが可能になるはずです。

Q. 今後の研究の方向性と、研究の推進に重要と考えるポイントを教えてください。

A. 流域生態系における生物多様性の保全や持続的な河川管理のためのツールとして環境 DNA 分析を活用していくければと考えています。

環境 DNA 分析は、河川流域における魚類などを含む生物多様性を省力的かつ広域にモニタリングし、そのデータを収集できるツールだと思います。特に、qMiFish 法は魚類の網羅的かつ量的な多様性を推定することができるため、今後の活用にとても期待できると思います。主な利用はこれまで述べたような広域の魚類の分布や組成を把握することですが、その他にも、たとえば時間帯や季節による魚類相の経時的な変化が見られれば、どのような魚がどのような時間帯に多く活動しているのか、どのような季節にどのくらい調査地を利用しているのか、などがわかるようになるかもしれません。このような時間経過を追う調査は潜水調査や水中カメラによる録画などを用いて行われますが、時間的にも労力的にも限界があるので、環境 DNA 分析でこういった情報が手に入るのであれば、とても有用だと思います。

また、河川の調査では、ドローン空撮や衛星画像を用いて岸辺の植生や河道の状況の高解像度の画像を広範囲で入手し、その解析を行うことができます。魚類に限らず、さまざまな生物、もしくは生物群集の環境 DNA データとこれらのデータを統合し、その関係を明らかにしていくことで河川の健全度の総合的な調査に使えればと考えます。これにより、最終的には流域生態系における生物多様性の保全や継続的な河川管理に貢献できるような研究につながればと思っています。

また、環境 DNA 分析のうち、特にメタバーコーディング手法では、レファレンスとなるデータベースの充実度が重要です。データベースに配列が登録されていない、またはその充実度が足りないがためにその場にいるはずの生物を検出できなかつたり、種の誤同定が起こったりすることが懸念されます。現在、個人の研究者のみなさんのご尽力によって、魚類においては DNA 配列の登録データの更新やメタバーコーディング用のデータ解析サイトの管理などが行われていますが、全国レベルで考えるとまだまだ不足している地域が残っているのが現状かもしれません。今後、メタバーコーディング手法を用いてより詳細な生物多様性情報を蓄積していくためにも、地域レベルでの DNA 情報の蓄積が必要になってくるのかもしれません。当センターでも、中国・四国地方を中心としてそのような取り組みができるとよいと考えています。

## イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝5-36-7 三田ベルジュビル22階  
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810  
[jp.illumina.com](http://jp.illumina.com)

 [www.facebook.com/illuminakk](http://www.facebook.com/illuminakk)

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件：[jp.illumina.com/tc](http://jp.illumina.com/tc)

© 2022 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。  
商標および登録商標の詳細は [jp.illumina.com/company/legal.html](http://jp.illumina.com/company/legal.html) をご覧ください。  
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

販売店

APJ-5015-221201-02-JP

