

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03735

研究課題名(和文) 環境DNA/RNAを利用した生物調査の新展開：水を汲んで生物の行動や状態を知る

研究課題名(英文) Development of novel biological survey method using environmental DNA/RNA: estimating the behavior and states of underwater organisms

研究代表者

源 利文 (Minamoto, Toshifumi)

神戸大学・人間発達環境学研究科・准教授

研究者番号：50450656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では環境核酸(環境DNAおよび環境RNA)を用いて生物の行動や生理状態を把握する技術の開発を行った。その結果、環境DNAの増加が繁殖行動のマーカーとなりうること、環境RNAが検出可能であり、環境水中から細胞骨格関連遺伝子が多数検出されること、繁殖マーカー候補となりうるmRNAが環境中に存在することなどを明らかにした。環境核酸を用いて動物の生理状態や行動を検出可能であるとする報告はこれまでほとんどなく、特に野外で適用可能性を明らかにしたのは本研究が初めてである。これらの成果は今後の環境核酸分析の応用可能性を拡大するものであり、特筆すべきものであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境DNAなどの核酸を用いることで生物の状態を明らかにできる技術開発に成功したことは、希少種が再生産しているかなど生物多様性保全に関わる情報を非侵襲的に得ることなどを可能にする。また、環境中のmRNAなどは生物の生理状態を反映すると考えられ、水産養殖環境における感染症の早期発見など、応用的な利用も可能であると考えられる。このように本研究では基礎生物学的にも応用生物学的にも重要な手法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a technique to understand the behavior and physiological state of an organism using environmental nucleic acids (environmental DNA and RNA). The results showed that increased environmental DNA could be a marker of reproductive behavior, that environmental RNA was detectable, that a large number of cytoskeleton-related genes were detected in environmental water, and that mRNAs that could be candidate reproductive markers were present in the environment. This is the first study to demonstrate the applicability of environmental nucleic acids to the detection of animal physiological states and behaviors in the field. These results are particularly noteworthy because they expand the applicability of environmental nucleic acid analysis in the future.

研究分野：生態学

キーワード：環境DNA 環境RNA 繁殖 生理状態 RNA-seq

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

生物多様性の急速な喪失が問題視されて久しいが、特に水中の生物に関しては、何が、どこに、どれだけ、どのように生息しているのかなどを調べるのが容易ではなく、現状を正確に把握すること自体が困難である。近年環境中の DNA 情報を用いて目に見えるサイズのマクロ生物の存在や、数量を明らかにするための手法(環境 DNA 分析手法)が提唱され、急速に発展している。この手法は、対象水域の水から DNA を抽出し、対象生物の DNA の在/不在から当該水域における対象生物種の在/不在を推定しようとするものであり、その応用として DNA 量を用いたバイオマスや個体数の推定なども行われつつある。環境 DNA 分析は魚類や両生類だけでなく、昆虫や植物などでも報告例があり、あらゆるマクロ生物に適用可能であると考えられている。微生物では以前から環境 DNA 分析が行われていることをあわせると、一杯の水サンプルから、あらゆる生物の生息情報(在不在情報)を得ることが可能になりつつある。しかし、生物多様性の保全、希少種の保全を目指す時、ある種が生息するかどうかだけの情報では不完全であり、繁殖活動が行われているのか、その結果として生まれた未成熟個体がいるのかといった、再生産にかかわる情報も重要である。しかし、単に DNA の在不在を調べるような従来の環境 DNA 分析では、このような情報を得ることはできなかった。そこで、本研究では環境 DNA と環境 RNA の分析によって、生物の繁殖期や年齢構成といった再生産に関わる状態や行動の情報を得るための手法を開発することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、大きく分けて以下の(A)～(C)の3つの解析手法を用いて、環境 DNA または環境 RNA といった環境中の核酸サンプルから、繁殖行動の時期や場所の情報、年齢構成の情報を得るための手法開発を行い、槽実験や野外での実証実験を行うことでその概念を実証することを目的とした。ただし、(C)に関しては申請の時点からチャレンジングであり、まずは予備実験で実現可能性を判断することとしたが、予備的検討から環境 DNA のメチル化状態は適切なマーカーでない可能性が出てきたため、本研究期間では(A)および(B)の解析手法に注力することとした。

(A) 環境 DNA 濃度の時間変化を用いて繁殖行動の時期や場所を特定する手法

環境 DNA は主に生物の糞や粘液などに由来すると考えられているが、多くの魚類や両生類のような体外受精の生物の場合は、繁殖期に環境 DNA 濃度が増える可能性が指摘されている。これは主に精子の放出によるものと考えられている。ここでは、比較的技術が確立されている環境 DNA 分析による繁殖期や場所を特定する手法の確立を目的とした。(課題1～3)

(B) 環境 RNA を用いて繁殖行動の時期や場所を特定する手法

近年の申請者らの実験により、環境中には DNA だけでなく、RNA も検出可能な程度存在することがわかっている。例えばメッセンジャーRNA (mRNA) を DNA と同時に水中から検出できれば、生物の在/不在の情報に加えて、生物の状態の推定や環境核酸(環境 DNA および環境 RNA)の放出源となる由来組織の推定など、様々な情報を得られることが期待される。しかし、魚類等の大型脊椎動物の環境 RNA を分析対象とした研究例は学術論文レベルではいまだ報告されておらず、基礎的知見が不足している。そこで本研究では、環境核酸の由来組織の推定すること、環境 RNA による繁殖等のマーカーを特異的検出および網羅的検出により探索すること、環境 RNA の分解速度を実測することを目的として、脊椎動物由来の環境 RNA にかかわる未知の情報を拡充することを目指した。(課題3～6)

(C) 環境 DNA のメチル化状態を調べて群集の年齢構成を調べる手法

エピジェネティックな遺伝子の修飾の例としてよく知られる DNA のメチル化は哺乳類での研究が先行してきたが、魚類においてもモデル生物を中心にメチル化現象が調べられている。本研究では、年魚であるアユを対象として年齢(月齢)の変化と環境 DNA のメチル化状態の関係を野外で明らかにすることを目的としたが、予備的研究段階でマーカーとしての有用性に疑問がある結果を得たため、初年度に打ち切った。

3. 研究の方法

課題1 オオサンショウウオを対象とした環境 DNA による繁殖期の推定手法の開発

オオサンショウウオを対象とし、以下の(1)～(3)の3種類の調査および実験を行った。(1)産卵行動を綿密にモニタリングできる広島市安佐動物公園内の河川型繁殖水槽において環境 DNA 量を調べた。繁殖期前後の2018年7月31日から11月14日までの間に全9回の経時的な採水を行った。採水サンプルから環境 DNA を抽出し、ミトコンドリア NADH1 遺伝子および、核 rRNA 遺伝子をマーカーとしたリアルタイム PCR によって、それぞれの DNA マーカーのサンプル中の分子数を定量した。(2)産卵状況が観察できる自然河川として、広島県内の人工繁殖巣穴が設置

されている松歳川および大口川における野外調査を行った。2018年7月31日から10月31日までの間に全12回の経時的サンプリングを行った。それぞれのサンプル中におけるミトコンドリアおよび核DNAマーカーを上記と同様の手法で定量した。(3)産卵状況のわからない自然河川として兵庫県の羽束川において、2017年5月9日から2019年3月5日まで全42回のサンプリングを行った。それぞれのサンプル中におけるミトコンドリアおよび核DNAマーカーを上記と同様の手法で定量した。

課題2 ブルーギル及びオオクチバスを対象とした、環境DNAによる繁殖期推定手法の野外適用

福島県の三春ダムの蛇沢川前貯水池において、2019年3月26日から8月24日まで、毎週1回、全22回の採水を行った。採水された水サンプルから環境DNAを抽出し、オオクチバスおよびブルーギルを対象として、ミトコンドリアおよび核DNAマーカーのDNA分子量をリアルタイムPCRによって定量した。ミトコンドリアDNAのマーカーは先行研究で開発された既存のものを用い、核DNAのマーカーは本研究で新たに開発した。

課題3 コイを対象とした環境DNAおよび環境RNAによる繁殖期マーカーの開発

コイを対象とした水槽実験により、産卵及び発生に関連して環境DNA量がどのように変化するかを調べると同時に、繁殖期に特有の環境RNAマーカーを探索した。水槽にコイの親魚を飼育し、ゴナドトロピンの接種によって産卵を誘発した。産卵前、産卵後に環境DNAおよび環境RNAサンプルを採取するとともに、卵を水槽に移し、発生段階に伴う変化をモニタリングした。環境DNAマーカーとしてはミトコンドリア、核の両方を用いた。環境RNAのマーカー候補として、繁殖期に特異的に発現することが期待されるZP2、ZP3、cathepsin L、Egg24などの13遺伝子を用いて環境RNAサンプル中からの検出を試みるとともに、常に一定量が発現することが期待されるいわゆるハウスキーピング遺伝子の4遺伝子の検出も同時に行った。

課題4：環境核酸（環境DNAおよび環境RNA）の放出源となる組織の推定

ゼブラフィッシュで組織特異性を持って発現する遺伝子5種（*FABP2*:腸、*muc5.2*:表皮、*pleca*:表皮、*krt5*:表皮、*clcn2c*:鰓）のmRNAを特異的に増幅させるプライマーセットを設計した。各プライマーセットは種特異性の担保とゲノムDNA(gDNA)の誤増幅の抑制を目指して設計した。次にこれら5種のプライマーセットを用いてゼブラフィッシュの飼育水から組織特異的に発現するmRNAの検出を行い、環境核酸の由来組織の推定を行った。RNAを抽出、精製し、gDNA除去反応、逆転写反応を行い、相補DNA(cDNA)テンプレートとした。これをPCRで増幅し、電気泳動で全ての遺伝子の増幅を確認した。PCR産物の配列を決定し、対象遺伝子であることを確認した。さらに、同様のプライマーセットを用いて、ゼブラフィッシュの組織試料（脳、鰓、肝臓、腸、表皮、筋肉）からmRNAの検出を行い、対象mRNAの各組織での発現と組織特異性を確認した。組織試料からRNAを抽出し、以降は上記と同様の分析を行った。以上のステップで、飼育水中からの遺伝子特異的なRNA検出と、各遺伝子の組織特異性の確認を行い、環境核酸の由来（放出源）となる組織の推定を試みた。

課題5：RNA-seqの適用による遺伝子リスト構築の試行

ゼブラフィッシュの飼育水槽から0.5Lの水試料を5繰り返しで採取し、すぐに濾過し、RNAの抽出、精製した。続いてTruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina社)のプロトコルに沿ってライブラリー調整を行い、MiSeq (Illumina社)でのAmpliconシーケンス(RNA-seq)に供した。出力されたリードは質のチェックを行った後、ゼブラフィッシュのゲノムデータにマッピングし、遺伝子を同定した。これにより、平常状態で魚類から水中に放出される遺伝子リストの取得を試みた。

課題6：環境RNAの分解速度の測定

ゼブラフィッシュの飼育水槽から0.6Lの水試料を18繰り返し採取し、各サンプルを入れたボトルを25°Cに設定した卓上人工気象器に収容してインキュベートを行った。インキュベート開始時点を0として、経時的に6、12、24、48、72、96、120、168時間目に2本ずつボトルを取り出してそれぞれ濾過し、RNAの抽出、精製とgDNA除去反応、逆転写反応を行ってcDNAテンプレートとした。過去に開発済みであったミトコンドリア上のcytochrome b (*cytb*)遺伝子を定量できるプライマープロブセットと、今回開発したハウスキーピング遺伝子 (*b2m*)のプライマーセットにさらにプロブを組み合わせたセットを用いて、定量PCRによってこれら2つの遺伝子の時間依存での量の変化を測定した。これにより、水中での魚類由来の環境RNAの分解速度と半減期を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

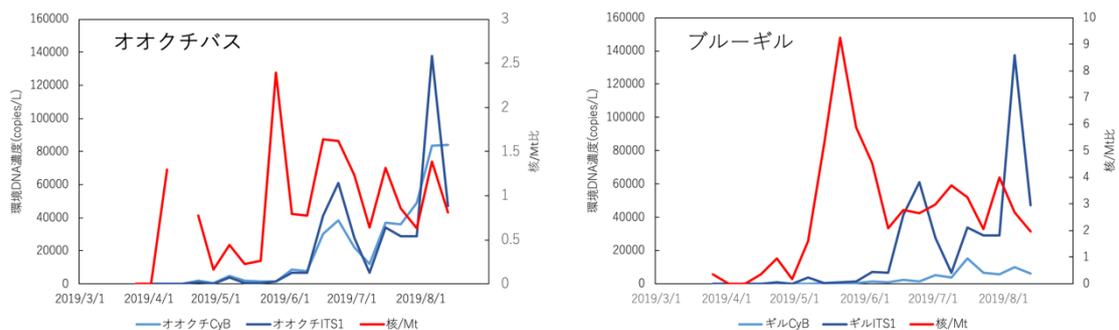
課題1 オオサンショウウオを対象とした環境DNAによる繁殖期の推定手法の開発

オオサンショウウオの繁殖施設におけるモニタリングの結果、産卵の観測された直後の採水サンプルにおいて、核DNAおよびミトコンドリアDNA量の大幅な増加が確認された。産卵は9月15日と17日に観測され、直後の採水は9月20日に行われたため、繁殖施設においては、少なくとも3日程度は産卵の影響が観測可能であると考えられた。これは、繁殖施設の水槽水が循環

していることが一因であると考えられる。人工巣穴の設置された河川においては、産卵から1日以内と推定されるタイミングで核 DNA およびミトコンドリア DNA 量の大幅な増加が確認され、その翌日には産卵前と同程度の DNA 量に戻った。このことから、野外環境において産卵の影響が観測できるのは1日程度だと推定された。また、人工巣穴直下の採水地点で DNA 量が大幅に増加した時に、約 200m 下流においては DNA 量の増加は観測されなかった。このことから、調査河川のような小規模河川においては、産卵の影響が観測できるのは約 200m 以内であると考えられた。羽束川におけるモニタリングの結果、繁殖期においては核 DNA 濃度が非繁殖期より有意に増加することが確認された。このことは、繁殖期のモニタリングには核 DNA をマーカーとすることが有用である可能性を示している。また、地点別の結果を詳細に確認すると、調査区間の上流部においてのみ核 DNA 量の顕著な増加が見られた。このことは、上流部がオオサンショウウオの主要な繁殖地であることを示唆する。本課題全体を通じて、核 DNA をマーカーとすることで、オオサンショウウオの繁殖地および繁殖期を高精度にモニタリングできる可能性が示された。

課題2 ブルーギル及びオオクチバスを対象とした、環境 DNA による繁殖期推定手法の野外適用

福島県の三春ダムの蛇沢川前貯水池における調査の結果、オオクチバスについては、ミトコンドリア (CyB)、核 (ITS1) とともに、6月以降8月にかけて次第に DNA 量が増加した (下図)。一方で、核/ミトコンドリア DNA 比は5月28日にピークを示したのち、何度かのピークと谷を繰り返した。ブルーギルについては、ミトコンドリアでは明瞭なピークが認められず、核は6月と8月に大きなピークがあった。また、核/ミトコンドリア DNA 比は5月後半に明瞭なピークを示した。これらのことを解釈するのは難しいが、先行研究で報告されているように核/ミトコンドリア比が繁殖のマーカーとして機能するのであれば、5月に産卵が行われたために両種において核/ミトコンドリア DNA 比が増加し、その後当歳魚の成長によるバイオマスの増加に伴って、それぞれのマーカー DNA 量が増加したのではないかと考えられる。ただし、課題2においては魚の産卵行動の確認は行っておらず、今後の研究の進展が必要である。



課題3 コイを対象とした環境 DNA および環境 RNA による繁殖期マーカーの開発

コイを対象とした水槽実験の結果、産卵のタイミングでミトコンドリア DNA、核 DNA とともに顕著な増加を示した。核/ミトコンドリア比は水槽によってばらつきがあり、実験に用いた3つのうち1つの水槽では産卵のタイミングで増加したものの、残る2つの水槽では大きな変動は見られなかった。環境 RNA マーカーの探索においては、いわゆるハウスキーピング遺伝子のうち、チトクローム b および核の rRNA 遺伝子については全てのサンプルから検出が確認された。残る2つのハウスキーピング遺伝子は検出されない場合もあった。この原因は不明である。繁殖期のマーカーとして期待される 13 遺伝子のうち、Egg24 産卵時と卵の環境 RNA サンプルから、cathepsin L は産卵前の親魚、産卵時、卵の環境 RNA サンプルからそれぞれ検出された。Egg24 は胚発生時に発現するミオシン、cathepsin L は卵成熟に関与する酵素であり、それぞれの体組織における既知の発現パターンと一致していた。産卵のタイミングで環境 DNA 放出量が顕著に増大することは先行研究や本研究の他の課題の結果とも一致していた。また、環境 RNA を用いた繁殖マーカー候補として Egg24 と cathepsin L を抽出することができた。これらはコイなどの魚類の繁殖マーカーとして有用である可能性がある。

課題4: 環境核酸 (環境 DNA および環境 RNA) の放出源となる組織の推定

Primer-BLAST の結果から設計した全てのプライマーセットがゼブラフィッシュの対象遺伝子の mRNA を特異的に増幅することを確認できた。電気泳動の結果3サンプル中2サンプルで対象とした全ての mRNA を検出した。また、配列決定された PCR 産物はゼブラフィッシュの対象遺伝子であることが確認された。さらに、*c1en2c*、*muc5.2* は、それぞれ鰓、表皮での組織特異的な発現を確認できた。*FABP2* は腸での発現を確認できたが、特異性は確認できなかった。本結果より、鰓、表皮は環境核酸の由来組織の一つであることが強く示唆された。また、*FABP2* の組織特異性は確認されなかったものの、過去の研究では当該遺伝子は腸で非常に高い発現をしていることが明らかになっているため、由来組織の一つであると考えられる。水試料は3繰り返しで採取されたが、そのうち2つの反復では検出されている2つの遺伝子が、残りの1反復では検出されなかった。これは分析過程における RNA の分解などに起因する偽陰性、もしくはそれ以前の

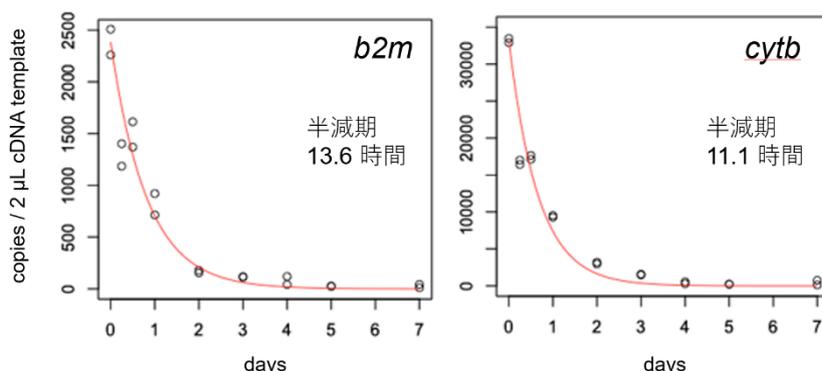
ろ過の段階における、確率論的な回収の失敗、だと考えられる。今後、環境 RNA 分析における偽陰性を減少させ、より実用的な調査手法として確立させるためには、水中での存在状態についての基礎的知見の蓄積と高効率な回収手法の検討、分解を避けるための迅速な実験ステップへの改良が求められる。

課題 5 : RNA-seq の適用による遺伝子リスト構築の試行

RNA-seq では同一の水槽から採取したにもかかわらず、マップされたリード数が繰り返し間で大きくばらついた (1%から 13%) が、全体としては 2700 ほどの遺伝子が検出された。このうち、5 つの繰り返しすべてで検出され、かつ、Transcripts per million (TPM) が 10 以上であった遺伝子が 70 確認された。この中にはミトコンドリア上の遺伝子では NADH dehydrogenase subunit 1 (*nd1*)、cytochrome c oxidase subunit I (*co1*) がみられた。核遺伝子ではアクチンやチューブリン関連の細胞骨格に関わる遺伝子が多く検出された。課題 4 と同様に、水中からの RNA 回収の段階でのばらつきが多いと考えられる結果で、さらに安定した分析が行えるよう、実験プロトコルの改良が必要である。ただし、魚類の環境 RNA を対象とした RNA-seq に成功した初の事例であり環境核酸の研究分野における大きな前進である。また、細胞骨格関連遺伝子が多く検出されたという結果は環境核酸の存在状態をさらに明らかにしていくうえで非常に示唆に富んだものである。

課題 6 : 環境 RNA の分解速度の測定

7 日間 (168 時間) にわたる環境 RNA の分解実験では、当初予想していなかった結果が得られ、*cytb*、*b2m* とともに、7 日後でも水中から検出可能であった。また、半減期は既存の研究で報告されている環境 DNA における事例と大きく変わらないことが確認された (下図)。多くの研究者が環境 RNA は DNA に比べて格段に早く分解して消失するだろうと予想している中、まったく異なる知見が得られた。本結果は、比較的長く水中に残存することから環境 RNA が想像よりも検出しやすいものである可能性を示唆するものである一方で、種の検出という観点からは、環境 DNA よりも「より新しいもの/より採水地点に近い個体」を検出するマーカーとしての潜在性は無いであろうことも示唆している。今後の環境 RNA 分析の展開の方向を見定めるにあたって貴重な情報が得られた。



上記の 6 課題と平行して、陸水域での環境 DNA 分析に関する基礎的な知見の収集も行い、DNA の分解速度の測定、サンプルの保管手法の改善、希少種や外来種の検出手法の確立、哺乳類や甲殻類といった魚類以外の分類群への適用などにも取り組んだ。

これらの全ての研究課題の結果を総合して、本研究では主として (1) 繁殖期における環境 DNA の急激な増加が繁殖行動のマーカーとなりうること、(2) 環境 DNA サンプル中の核/ミトコンドリア比が繁殖行動のタイミングで増加する場合としない場合があること、(3) 環境 RNA サンプル中に細胞骨格関連遺伝子が多数検出されること、(4) 繁殖マーカー候補となりうる mRNA が存在すること、(5) 鰓および表皮が環境核酸の由来組織 (の一部) であること、(6) 環境 RNA の分解速度は環境 DNA と近いものであることを明らかにした。環境 DNA で動物の生理状態や行動を検出可能であるとする報告はこれまでほとんどなく、特に野外での適用可能性を明らかにしたのは本研究が初めてである。また、マクロ生物の環境 RNA 研究もほとんど報告されておらず、環境 RNA に関する報告はいずれも新規性の高い重要な発見である。これらの技術を用いることで、生物の分布だけでなくその生理状態や行動を明らかにできる可能性を実証したことは、今後の環境核酸分析の応用可能性を拡大するものであり、特筆すべき成果であると考えられる。一方で、当初予定した環境 DNA のメチル化状態の測定による年齢推定などは本研究では実施できず、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Toshifumi Minamoto, Kana Hayami, Masayuki K. Sakata, Akio Imamura	4. 巻 24
2. 論文標題 Real time polymerase chain reaction assays for environmental DNA detection of three salmonid fish in Hokkaido, Japan: Application to winter surveys	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ecological Resaerch	6. 最初と最後の頁 237-242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1440-1703.1018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Qianqian Wu, Ken Kawano, Yoshitoshi Uehara, Noboru Okuda, Masamichi Hongo, Satsuki Tsuji, Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto	4. 巻 37
2. 論文標題 Environmental DNA reveals nonmigratory individuals of Palaemon paucidens overwintering in Lake Biwa shallow waters	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Freshwater Science	6. 最初と最後の頁 307-314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1086/697542	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuji Satsuki, Ushio Masayuki, Sakurai Sho, Minamoto Toshifumi, Yamanaka Hiroki	4. 巻 12
2. 論文標題 Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0176608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0176608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamanaka Hiroki, Minamoto Toshifumi, Matsuura Junichi, Sakurai Sho, Tsuji Satsuki, Motozawa Hiromu, Hongo Masamichi, Sogo Yuki, Kakimi Naoki, Teramura Iori, Sugita Masaki, Baba Miki, Kondo Akihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Limnology	6. 最初と最後の頁 233 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10201-016-0508-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 源利文	4. 巻 41
2. 論文標題 環境DNA分析を用いた高校生による生物調査	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 兵庫県高等学校教育研究会生物部会	6. 最初と最後の頁 2~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 源利文	4. 巻 46
2. 論文標題 水域生態系における環境DNAモニタリング手法開発の現在	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 環境技術	6. 最初と最後の頁 624 ~ 629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 源利文、内井喜美子、高原輝彦、土居秀幸	4. 巻 46
2. 論文標題 環境DNAモニタリング手法の課題と展望	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 環境技術	6. 最初と最後の頁 648 ~ 652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakata Masayuki K., Maki Nobutaka, Sugiyama Hideki, Minamoto Toshifumi	4. 巻 104
2. 論文標題 Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, <i>Acheilognathus typus</i> , in a natural river in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Science of Nature	6. 最初と最後の頁 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00114-017-1521-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 源利文	4. 巻 40
2. 論文標題 環境DNAとは何か	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 海洋と生物	6. 最初と最後の頁 3~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 深谷肇一、長田穰、源利文	4. 巻 40
2. 論文標題 環境DNAによる個体数・生物量推定の可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 海洋と生物	6. 最初と最後の頁 47~53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 益田玲爾、村上弘章、高橋宏司、源利文、宮正樹	4. 巻 40
2. 論文標題 環境DNAの有効性：水槽実験とフィールドでの検証	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 海洋と生物	6. 最初と最後の頁 17~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山中裕樹	4. 巻 40
2. 論文標題 海と川との接続性を環境DNA分析で診る：河川横断構造物の影響評価	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 海洋と生物	6. 最初と最後の頁 54~59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ushio Masayuki, Fukuda Hisato, Inoue Toshiki, Makoto Kobayashi, Kishida Osamu, Sato Keiichi, Murata Koichi, Nikaido Masato, Sado Tetsuya, Sato Yukuto, Takeshita Masamichi, Iwasaki Wataru, Yamanaka Hiroki, Kondoh Michio, Miya Masaki	4. 巻 17
2. 論文標題 Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Ecology Resources	6. 最初と最後の頁 e63 ~ e75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1755-0998.12690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Hirotooshi, Sogo Yuki, Doi Hideyuki, Yamanaka Hiroki	4. 巻 7
2. 論文標題 Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-14978-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 森本哲平, 中尾遼平, 源利文
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第1回環境DNA学会東京大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hi roki Yamanaka
2. 発表標題 Environmental DNA analysis for ecology and conservation
3. 学会等名 6th Taiwan - Japan Ecology Workshop, Tainan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ウ倩倩, 河野健, 石川俊之, 辻冴月, 山中裕樹, 源利文
2. 発表標題 琵琶湖産スジエビの時空間分布および移動タイミングの推定
3. 学会等名 第1回環境DNA学会東京大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 姜明揚, 前川和也, 中尾遼平, 源利文
2. 発表標題 野外におけるコイの環境RNAの検出
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本哲平, 田口勇輝, 源利文
2. 発表標題 オオサンショウウオの繁殖行動は水で検出可能か? ~人工巣穴での環境DNA調査より~
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ウ倩倩, 河野健, 石川俊之, 坂田雅之, 中尾遼平, 平岩将良, 辻冴月, 山中裕樹, 源利文
2. 発表標題 環境DNA分析法を用いた琵琶湖におけるスジエビの動態の解明
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 釣健司, 池田静也, 廣原嵩也, 島田康人, 源利文, 山中裕樹
2. 発表標題 環境RNA分析を用いた環境核酸の由来組織の推定
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中道友規, 釣健司, 寺園裕一郎, 加茂耕太郎, 石原孝, 山中裕樹
2. 発表標題 環境RNAと環境DNAによる魚類の検出感度の比較とその時間変化
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣原嵩也, 釣健司, 宮川光一, 山中裕樹
2. 発表標題 環境DNA分析におけるPMA色素の有用性
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 源利文
2. 発表標題 水を調べれば生物がわかる～驚異の＜環境DNA＞
3. 学会等名 読売テクノ・フォーラム第202回研究交流会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 源利文
2. 発表標題 水を汲むだけの生物調査：環境DNAを用いて水中生物の種類や量を把握する技術の開発
3. 学会等名 近未来への招待状 ~ ナイスステップな研究者2016からのメッセージ ~ (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroki Yamanaka, Hiroto Sato, Masaki Miya, Masamichi Hongo, Naoki Shibata, Kazuki Watanabe, Hideyuki Doi
2. 発表標題 Environmental DNA metabarcoding unveils spatiotemporal dynamics of fish community in the littoral zone of Lake Biwa, central Japan
3. 学会等名 Ecological Society of America Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 MINAMOTO Toshifumi, SAKATA K. Masayuki, MAKI Nobutaka, SUGIYAMA Hideki
2. 発表標題 Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, <i>Acheilognathus typus</i> , by combining eDNA and conventional surveys
3. 学会等名 Ecology Across Borders: Joint Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 YAMANAKA Hiroki, YONEKURA Ryuji, KOMATSU Fumiya, KAKAMU Hiroto, TAKINO Fumiya, TADA Satoru, YAMAMOTO Yoshihiko, MINAMOTO Toshifumi
2. 発表標題 Fish larvae inside? Indirect assessment of fish larvae presence in host mussels using environmental DNA analysis
3. 学会等名 Ecology Across Borders: Joint Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前川和也、源利文、山本義彦
2. 発表標題 環境RNAを用いたコイの繁殖行動の検出
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田静也、平尾陽平、多田眞証、佐藤博俊、源利文、山中裕樹
2. 発表標題 環境RNA分析による遺伝子発現解析にむけた基礎技術の検討
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 源利文
2. 発表標題 環境DNAで繁殖期や繁殖場所を特定する
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤博俊、十河勇樹、土居秀幸、山中裕樹
2. 発表標題 集約した環境DNAサンプルを利用した淡水魚類の環境DNAメタバーコーディング～その有用性と制約について～
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊和希、山内寛、重吉実和、芦野洸介、辻冨月、本澤大生、池田静也、佐藤博俊、山中裕樹
2. 発表標題 河川およびため池における魚類相調査：環境DNAメタバーコーディングと直接捕獲の比較
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山敦、高田恭輔、麻田弥希、渡邊和希、佐藤博俊、米倉竜次、山中裕樹
2. 発表標題 農業水路網での魚類相調査における環境DNA分析の有用性
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中道友規、櫻井翔、山中裕樹
2. 発表標題 河川流量の変化が生物量と環境DNA濃度との関係に及ぼす影響：いつ水を汲むのが適切か？
3. 学会等名 第65回日本生態学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山中 裕樹 (Yamanaka Hiroki) (60455227)	龍谷大学・理工学部・講師 (34316)	