

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03326

研究課題名(和文) 環境DNA分析による繁殖レジームの多種同時分析系の開発

研究課題名(英文) Development of a simultaneous analysis system for multispecies breeding regimes with environmental DNA analysis

研究代表者

源 利文 (Minamoto, Toshifumi)

神戸大学・人間発達環境学研究科・教授

研究者番号：50450656

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：環境DNAなどの環境中の核酸の分析によって、水生生物の繁殖の情報を取得する技術の開発を目的として研究を実施した。その結果、核およびミトコンドリア環境DNAを用いることで特定種の繁殖レジームを把握することが可能であること、環境DNAの定量メタバーコーディングによって繁殖レジームを多種同時に把握することが可能であること、環境中のメッセンジャーRNA情報から繁殖レジームを把握することが潜在的に可能であることなどを明らかにすることができた。これらの成果は、環境DNA等の環境中の生体分子を用いることで、希少種や水産有用種の保全のための重要な情報である繁殖に関わる情報を得ることができることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野生生物の繁殖に関わる情報は、生物の保全上貴重である。このような情報を水をすくうだけで得ることができるようになれば、希少種や水産有用魚種の保全のための保護区域の設定などに役立つことが期待される。30 by 30における保護区域の設定においても有用な科学的知見を提供するためのツールとなりうるだろう

研究成果の概要(英文)：The study was conducted to obtain information other than distribution, such as reproduction of aquatic organisms, by analyzing nucleic acids in the environment including environmental DNA (eDNA) and environmental RNA (eRNA). We found that it is possible to understand the reproductive regimes of specific species by using nuclear and mitochondrial eDNA, that it is possible to understand the reproductive regimes of multiple species simultaneously using quantitative eDNA metabarcoding, and that it is potentially possible to understand the reproductive regimes from environmental messenger RNA (emRNA) information. These results indicate that we can obtain reproductive information, which is important for the conservation of rare and valuable fishery species, by using environmental biomolecules, eDNA and eRNA.

研究分野：分子生態学

キーワード：環境DNA 環境RNA 繁殖レジーム メタバーコーディング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、環境中の DNA 情報を用いてマクロ生物の分布を推定する「環境 DNA 分析」が大きく発展している。2008 年の初めての報告から約 15 年の間にこの技術は大きく進展し、モニタリングにおいては実務への応用段階にある。このように種分布の理解のための分析技術が普及しつつあるが、更なる応用可能性も秘めている。それは、調査対象とする生物が繁殖を行っているかどうか等、これまでの環境 DNA 分析では得られなかった情報を取り出すチャレンジである。環境媒質から繁殖行動を検知することができれば、保全や資源管理に革新をもたらすことだろう。本研究では、その核心をなす「問い」を、「環境中の核酸を利用して、魚類の繁殖レジームを理解することが可能であるか」に設定した。

この問いの探求にあたって、本研究ではふたつのアプローチをとった。ひとつは、環境 DNA の濃度変化を基軸としたものである。体外受精生物である魚類や両生類では繁殖期に環境 DNA 量が増加すると予想され、2017 年度から開始した申請者の科研費基盤 B (17H03735) の研究によって、オオサンショウウオやコイの環境 DNA 濃度が繁殖期に高まることが飼育下および野外条件下で確認された。しかし、環境 DNA は放出された時点・場所から時空間的に離れるほど希釈分解されることや、濃度に季節的な変動があるため、単に DNA 濃度の増減だけで繁殖期や繁殖地を知ることは限界がある。最近、精子では含まれる核 DNA の比率が高いことに着目して、環境 DNA の核/ミトコンドリア比(核/Mt 比)が繁殖活動のマーカーとなりうるということが、水槽実験によって示された (Bylemans et al. 2017, *Methods Ecol. Evol.*)。つまり、DNA 濃度といった量的な変化だけでなく、核/Mt 比といった質的变化を併用することで、精度良く繁殖地や繁殖期を知ることができる可能性がある。しかし、核/Mt 比の変化が他の種でも繁殖のマーカーとなりうるのかといった根本部分や野外検証が不十分であり、手法として確立するためには十分な検証が必要である。

もうひとつのアプローチは、環境 DNA に替えて環境 RNA をマーカーとする手法である。各種の mRNA は生理状態に基づいて体内で発現するが、繁殖に関連する mRNA が環境 RNA として放出されているならば、繁殖活動のマーカーとなりうる。申請者はこれまでに、コイのカテプシン L や egg24 といった遺伝子の mRNA が繁殖期に環境中で検出されることや、ゼブラフィッシュの環境 RNA が環境 DNA と同様に、放出後数日間以上にわたって検出可能であることなどの結果を得ているが、これを実用化するためには基礎情報と技術の拡充が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、環境 DNA 分析技術を用いて、魚類の繁殖レジームを多種同時に把握する技術を開発し、琵琶湖(滋賀県)および三春ダム(福島県)といった野外に適用してその有効性を確認することおよび、その発展型として環境 RNA 分析の基礎技術の改良を通じて、野外への適用可能性を見極めることである。環境 DNA 分析による多種同時手法が完成すれば、希少種や外来種の繁殖レジームを知ることにもつながり、生物多様性の保全に貢献する。また、水産有用種の繁殖地や繁殖期を知ること、水産保護区や禁漁期の設定などを通じて水産資源の持続的利用に資することも期待される。

これらの研究の前提として、核 DNA や繁殖関連 mRNA の配列情報の拡充が必要である。現状ではこれらの情報が不足し、野外への技術展開を困難にしている。そこで、本研究では先進的な技術開発と並行して、それを支える基礎情報の拡充も、重要な目的のひとつとする。

3. 研究の方法

(1) 核およびミトコンドリア環境 DNA を用いた特定種の繁殖レジームの把握手法の開発及び野外における検証

野外実験池において、2021 年の 3 月から 5 月にかけて、コイを用いた人工産卵実験を実施し、各時空間ポイントにおいて、核 eDNA 濃度および Mt eDNA 濃度を測定し、核/Mt 比も算出した。

三春ダムの前貯水池において 2020 年 4 月から 8 月まで、研究協力者の協力を得て毎週採水調査を行った。また、6 月には現地でも 10 日連続の採水調査を行った。当初は、繁殖活動のモニタリングも計画していたが、COVID-19 のパンデミックの影響で活動が制限されたため、オオクチバスおよびブルーギルの産卵日は研究協力者によって行われた採捕個体の耳石分析の結果を利用した。これらのサンプルについて、オオクチバスとブルーギルを対象として核 eDNA 濃度および Mt eDNA 濃度を測定し、核/Mt 比も算出した。先行プロジェクト(科研費基盤 B:17H03735)で実施した 2019 年の 4 月から 8 月のサンプルの測定結果と合わせて、2 年度分の結果をまとめて解析した。

(2) 環境 DNA メタバーコーディングによる繁殖レジームの多種同時探索法の確立と野外適用

核 rRNA 遺伝子上に環境 DNA メタバーコーディング用のプライマーを設計した。2020 年 7 月から 2021 年 7 月にかけての 5 回にわたり琵琶湖及びその周辺の 5 地点で採水された水サンプルに適用し、その有効性を確認した。

(1) で採取した三春ダムの 2020 年のサンプルを利用して、MiFish プライマーによる定量メ

タバーコーディングを実施した。別プロジェクトで実施した 2019 年のサンプルの結果と合わせて以下の解析を行った。検出されたコピー数の変動が生息する魚種の生態を反映しているかどうかを確認するため、これまでに行われた採捕調査の結果および図鑑等に記載されている繁殖期との対応関係を調べた。当初、メタバコーディングによる核/Mt 比の測定も検討していたが、本研究で開発した核 rRNA 遺伝子上の環境 DNA メタバコーディング用プライマーによる増幅産物の長さが種によって大きく異なることが判明し、定量的な解析には有効でないと考えられたため、見送った。しかし、成果で述べる通り、MiFish プライマー単独による定量メタバコーディングで十分に必要な情報を得ることができた。

核ゲノム上の ITS 領域の配列決定のため、琵琶湖や福島県・三春ダムに生息する魚種のほとんどについて DNA 試料を準備した。サンガーシーケンシングにより予備的な配列決定を行い、対象領域を PCR により適切に増幅できていることを確認した。その後、ITS2 領域を増幅するプライマーセットの開発を行い、収集した各魚種の DNA 試料を用いて PCR とそれに続く次世代シーケンサーによる配列決定を実施した。

(3) 環境中の RNA 情報から繁殖レジームを把握する手法の開発

環境 RNA 分析による mRNA タイピングの実証のため、ゼブラフィッシュの飼育水槽水から環境 RNA を回収し、核酸抽出、逆転写処理などの後、鰓と表皮で特異的に発現する遺伝子(それぞれ *clc2c* と *muc5.2*) の mRNA を PCR とその後の電気泳動によって検出した。同時に、鰓と表皮の組織試料をゼブラフィッシュ個体から採取して、同様に遺伝子が発現しているかの確認を行った。

魚類由来の環境 RNA の水中における分解速度について、モデル生物であるコイ科魚類のゼブラフィッシュを用いた水槽実験を実施し、異なる水温(10、20、30)ならびに pH 条件(4、7、10)間で環境 DNA と環境 RNA の分解速度を比較した。各環境条件の飼育水を経時的に採水し、飼育水中の環境 DNA および環境 RNA を回収した。核酸抽出、逆転写処理などの後、環境 DNA および環境 RNA 濃度をリアルタイム PCR によって測定し、それぞれの分解速度を推定した。

環境 RNA 分析の実効性を高める基礎的検討として、アユの飼育水から得た環境 RNA 分析用フィルターサンプルを使い、各種の保存試薬による保存効果の検証を行った。通常は RNA 試料の保存にウルトラフリーザー(-80)を使用するが、保存試薬を添加したうえで、より一般的な-20 のディープフリーザーでの保存を試行した。アユの飼育水槽から採水して GF/F フィルターでろ過し、RNAlater もしくは LBP buffer (RNA 抽出キット同梱の抽出用バッファ)をろ紙に染み込ませてから-20 で一週間保管した。核酸抽出、逆転写処理などの後、環境 RNA 濃度をリアルタイム PCR によって測定し、RNAlater、LBP buffer、コントロール、の 3 つの区での濃度を比較した。

トミヨ・イトヨといったトゲウオ類を対象として環境 RNA 分析による繁殖レジームの把握が可能か検証した。雄の腎臓で繁殖期に生産されるスピギンをコードする遺伝子を検出対象とした。トミヨ・イトヨ類の当該遺伝子領域の一部を特異的に PCR 増幅するプライマーを設計して繁殖期のトミヨの飼育水試料から抽出した RNA 試料を PCR に供した。

(4) 当初計画以外の研究

COVID-19 パンデミックの影響によって一部の計画(主に野外調査を伴う計画)が実施できなかったため、当初計画にはなかったが、本研究の主題と関連し、その成果が本研究の主題と相乗的に環境 DNA 分野の発展につながると考えられる研究(主に室内実験やこれまでに取得したデータの解析によって可能な研究)を実施した。

具体的には、環境 DNA 分析の野外生態系への適用および対象分類群の拡大、小型サンショウウオ類の環境 DNA 分析手法の確立、環境 DNA の基本情報の収集を実施した。

4. 研究成果

(1) 核およびミトコンドリア環境 DNA を用いた特定種の繁殖レジームの把握手法の開発及び野外における検証

野外の実験池を用いた人工産卵実験の結果、産卵活動によって増加したコイの各 DNA 濃度、MtDNA 濃度、核/Mt 比は、ピークに達した後 0.1 時間あたりそれぞれ 7.78 %、5.22 %、2.56 %の割合で減少した(図 1)。また、時間や距離間隔を変えて繰り返しサンプリングした場合に、コイの産卵活動のモニタリングが成功する確率を推定するデータシミュレーションを行った結果、環境 DNA 分析によって、過去 24 時間のコイの産卵活動をモニタリング可能であることが示された。さらに、コイの産卵がおきた場合、100m 毎、24 時間毎のサンプリング計画で、核 DNA 濃度や核/Mt 比を測定することによって、約 50~75%の確率で産卵活動をモニタリングすることができることが示された。この成果は国際査読誌に掲載された(Wu et al. [2022] *Ecological Indicators*)。

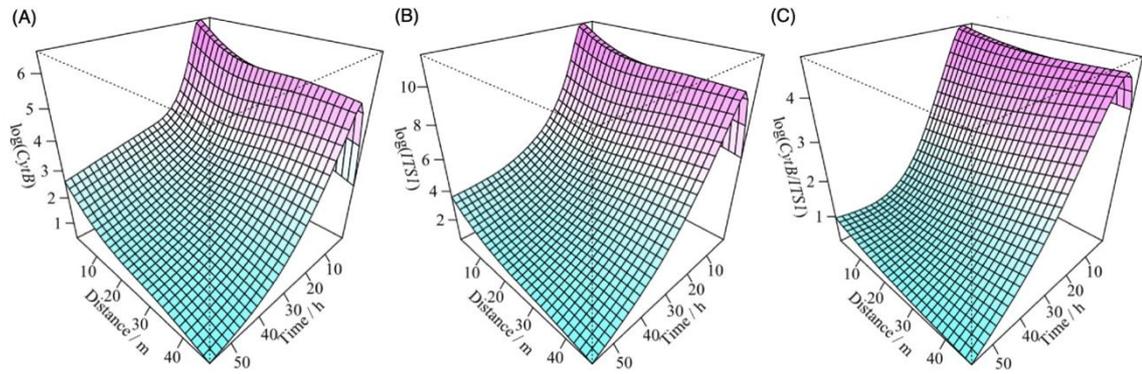


図1 コイの人工産卵前後における環境 DNA 濃度 (A: MtDNA、B:核 DNA) および核/Mt 比 (C) の時空間的变化。Wu et al. (2022) *Ecological Indicators* (<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109213>) の Fig. 1 を改変して引用した。

三春ダムにおけるオオクチバスとブルーギルの環境 DNA 分析結果を利用し、一般化加法混合モデルを用いて産卵活動期間を推定した結果、オオクチバス、ブルーギルの推定産卵活動期間は、それぞれ5月から7月、5月から8月であった(図2)。この推定された産卵時期は、別プロジェクトで解析した両魚種の耳石分析の結果とある程度一致した。また、10日間の連続サンプリングのデータを解析したところ、時間的解像度の高い産卵期の推定が可能であることが示された。これらの結果から、環境 DNA 分析による特定種の繁殖レジームの把握は、ある程度可能であることが明らかになった。この成果は国際査読誌に掲載された(Wu et al. [2023] *Freshwater Biology*)。環境 DNA と耳石分析の結果が完全に一致しなかった理由のひとつは、耳石分析に利用した個体群が三春ダム全域で採取したものであった一方で、環境 DNA 分析は三春ダムの前貯水池で行ったためかもしれない。これは COVID-19 の影響で前貯水池での繁殖状況調査ができなかった事による。

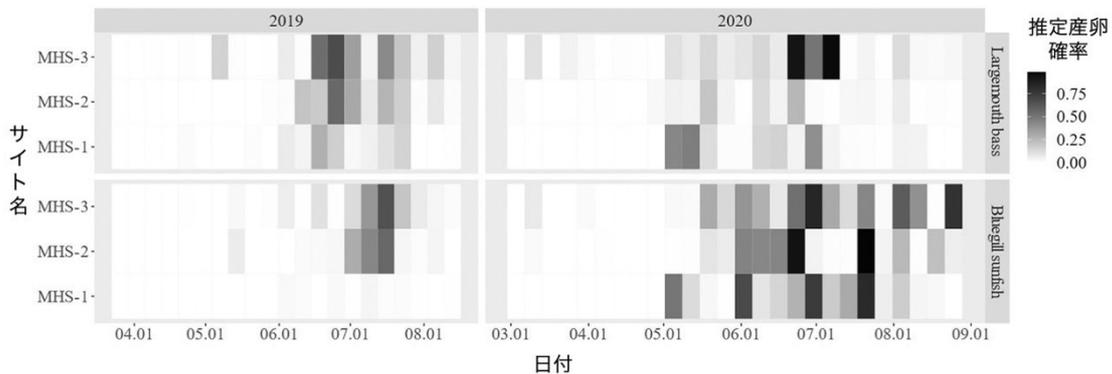


図2 三春ダムの前貯水池におけるオオクチバス(上段)とブルーギル(下段)の週ごとの推定産卵確率。Wu et al. (2023) *Freshwater Biology* (<https://doi.org/10.1111/fwb.14012>) の Fig. 5 を改変して引用した。

(2) 環境 DNA メタバーコーディングによる繁殖レジームの多種同時探索法の確立と野外適用

魚類の核 rRNA の ITS2 領域を増幅するメタバーコーディングプライマー(以下、ITS2 プライマー)の開発に成功した。増幅領域の長さは、魚種によって大きく異なり、約 300~600bp である。このプライマーを用いて琵琶湖で採水したサンプルの環境 DNA メタバーコーディングを行い、その結果を MiFish プライマーによるメタバーコーディングの結果と比較した。両マーカーについてリファレンス配列が存在する魚種に限ると、ITS2 プライマーで 10 種、MiFish で 16 種が検出され、検出感度は MiFish のほうが優れていた。ITS2 プライマーにはコイ科の魚類の一部魚種においてプライマー領域に変異があることがわかり、これが検出感度を低減させた可能性がある。今後、ミックス塩基の利用などで感度が改善する可能性がある。一方、MiFish では検出されなかったワカサギの DNA が ITS2 プライマーでは検出され、ITS2 プライマーが MiFish の弱点を補完しうる可能性が示された。

三春ダムの前貯水池の定量メタバーコーディングの結果、このアプローチによる検出魚種は、従来の採捕による魚類モニタリングの結果とよく一致した。また、環境 DNA 濃度と捕獲された事个体数の間には、有意な正の関係が認められ、環境 DNA 濃度の変化から推定される魚類集団構造の季節変化は、それぞれの魚の活動シーズンを明らかにする手段として有効である可能性が示された。このデータから各魚種の環境 DNA 濃度の外れ値を検出したところ、解析を行った 13 種中 12 種について、繁殖期に相当するサンプルにから外れ値が観測されることが明らかになり、

環境 DNA メタバーコーディングによる繁殖レジームの多種同時探索が可能であることが示された。この成果については、国際査読誌に投稿中（2023年5月現在、改訂原稿の査読中）である。

ITS2領域の全長配列の決定は、65魚種(101個体)において成功した。配列決定に失敗した2魚種については、抽出DNAの劣化の可能性が考えられたため、新たな組織サンプルの入手を行った。更に追加で17種48個体と、重複する種44種82個体についての情報を追加し、当該領域をメタバーコーディング領域として活用するためのリファレンスデータ整備を進めた。このデータ整備によって、種の検出感度や同定精度の向上が期待できる。

(3) 環境中のRNA情報から繁殖レジームを把握する手法の開発

環境RNA分析によるmRNAタイピングの実証について、検出対象とした*clc2c*と*muc5.2*のmRNAを検出した。これによって、脊椎動物のmRNAを環境水中から回収して検出が可能であることを示し、また、長らく議論の対象となっている「環境DNAは魚類のどこから放出されているのか」という問いに部分的に答えることができた。*clc2c*と*muc5.2*の検出成功は鰓や体表組織から剥がれ落ちた細胞が環境DNA(および環境RNA)の由来の一つとなっていることを強く示しており、同時に分析した他の複数のmRNAの検出結果から、腸管なども放出起源となっていることが示唆された。脊椎動物由来の環境RNAに対して、特定のmRNAを狙って検出(タイピング)できることを実証した例は本研究が初めてであり、極めて分解が早く検出は困難と思われていた分析が可能であると示されたことで、環境RNA分析の実行性を確認できた。この成果は国際査読誌に掲載された(Tsuri et al. [2020] Environmental DNA)。

環境RNAの分解速度については、より高温の条件下でRNAもDNAも分解が促進された一方で、RNAとDNAの比較では従前から想像されていたほどに明瞭な分解速度の差はないことが明らかとなった。これまでの一般的な想定よりも長い期間水中に残存していたことから、野外試料を用いた分析が実際に行えているという事実の背景の一端が明らかになったといえる。また、環境RNAは環境DNAと同様に高水温下で分解されやすくなった一方、pHの影響は核酸タイプ間でやや異なっており、これは核酸間の物理化学的性質やそれらを取り囲む膜構造などによるものだと考えられた。さらに、環境DNAに対する環境RNAの相対濃度(環境核酸比)は、時間経過に伴い減少する傾向にあった。このことは、環境DNAならびにRNAの放出後時間や新鮮さを表す指標として、環境核酸比が有効である可能性を示唆している。こうした環境RNAの水中での動態に関わる基礎的知見は、分析の実効性を確認するという視点から重要な成果である。この成果は国際査読誌に掲載された(Jo et al. [2022] Environmental DNA)。

環境RNAの保存法については、*RNAlater*を添加して-20℃で1週間保存した場合、添加していない試料に比べて数十倍から数百倍の濃度のRNAを回収することができた。野外での調査時には一般的な保存方法である超低温(-80℃など)での試料保管と輸送は困難であるため、この簡易的な保存方法は環境RNA分析の実行性を高めることが期待される。

トゲウオを用いた実験では、PCR産物の電気泳動で、想定された長さのバンドが確認された。これにより、スピギン遺伝子のmRNAを環境RNA分析によって検出できることが示された。ただし、飼育水での第1次検証は済んだものの、組織別での遺伝子発現の特性やその季節的变化(繁殖期・非繁殖期)などの検討がさらに必要である。

(4) 当初計画以外の研究

環境DNA分析の野外生態系への適用および対象分類群の拡大に関しては、すでにDNA分析手法が確立したMiFish分析手法の最適化のためのサンプリング戦略の検討(Sakata et al. [2021] Limnology)、富栄養化や亜寒帯域などの極端な環境への適用(Imamura et al. [2020] Biodiversity data Journal)、人工夜間光による生態系影響の解明、河川横断構造物による生態系影響の解明、両生類や昆虫類への環境DNA分析の拡大などを行い(Sakata et al. [2022] Metabarcoding & Metagenomics; Yasashimoto et al. [2021] Scientific Reports)、それぞれに成果を得た。特に、両生類を対象としたMiAmphプライマーを用いた分析は今後両生類のメタバーコーディング分析の標準手法となることが期待される。

小型サンショウウオ類の環境DNA分析手法の確立に関しては、キタサンショウウオ(Takeshita et al. 2020, PeerJ)、ヒダサンショウウオ(Jo et al. [2020] Endangered Species Research)、オオダイガハラサンショウウオ(Sakata et al. [2023] Analytical Sciences)など、生息環境の異なる小型サンショウウオ類の環境DNA検出手法の最適化を行った。これらの成果は、ほとんどが希少種である小型サンショウウオ類の保全上重要な情報の収集を容易にすることにつながるが期待される。

環境DNAの基本情報の収集に関しては、環境DNA分析に影響を与えうる生物学的特性に関する検討(Takahashi et al. [2021] PLOS ONE)、マーカーの種類や長さなどの分析結果への影響の検討(Jo et al. [2021] Environmental DNA)、一般に環境DNAと呼ばれるものの正体の解明(Hirohara et al. [2021] Frontiers in Ecology and Evolution)などを行った。また、これまでの知見をまとめた総説や書籍の執筆も行った(Minamoto [2022] DNA Research; 源 [2022] 岩波書店)。これらの情報は、今後の環境DNA分析技術のさらなる発展のための基礎となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Jo Toshiaki, Takao Kenta, Minamoto Toshifumi	4. 巻 4
2. 論文標題 Linking the state of environmental DNA to its application for biomonitoring and stock assessment: Targeting mitochondrial/nuclear genes, and different DNA fragment lengths and particle sizes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 271 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.253	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 Sakata Masayuki K., Kawata Mone U., Kurabayashi Atsushi, Kurita Takaki, Nakamura Masatoshi, Shirako Tomoyasu, Kakehashi Ryosuke, Nishikawa Kanto, Hossman Mohamad Yazid, Nishijima Takashi, Kabamoto Junichi, Miya Masaki, Minamoto Toshifumi	4. 巻 6
2. 論文標題 Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabarcoding and Metagenomics	6. 最初と最後の頁 15 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3897/mbmg.6.76534	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 該当する
1. 著者名 Yasashimoto Tetsu, Sakata Masayuki K., Sakita Tomoya, Nakajima Satoko, Ozaki Mamiko, Minamoto Toshifumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Environmental DNA detection of an invasive ant species (<i>Linepithema humile</i>) from soil samples	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89993-9	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 Sakata Masayuki K., Watanabe Takeshi, Maki Nobutaka, Ikeda Kousuke, Kosuge Toshihiro, Okada Hiroaki, Yamanaka Hiroki, Sado Tetsuya, Miya Masaki, Minamoto Toshifumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Determining an effective sampling method for eDNA metabarcoding: a case study for fish biodiversity monitoring in a small, natural river	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Limnology	6. 最初と最後の頁 221 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10201-020-00645-9	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 Takahashi Sayaka, Takada Shingo, Yamanaka Hiroki, Masuda Reiji, Kasai Akihide	4. 巻 16
2. 論文標題 Intraspecific genetic variability and diurnal activity affect environmental DNA detection in Japanese eel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0255576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0255576	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 Hirohara Takaya, Tsuru Kenji, Miyagawa Koichi, Paine Robert T. R., Yamanaka Hiroki	4. 巻 9
2. 論文標題 The Application of PMA (Propidium Monoazide) to Different Target Sequence Lengths of Zebrafish eDNA: A New Approach Aimed Toward Improving Environmental DNA Ecology and Biological Surveillance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 632973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fevo.2021.632973	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 該当する

1. 著者名 Takeshita Daiki, Terui Shigeharu, Ikeda Kousuke, Mitsuzuka Takashi, Osathanunkul Maslin, Minamoto Toshifumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Projection range of eDNA analysis in marshes: a suggestion from the Siberian salamander (<i>Salamandrella keyserlingii</i>) inhabiting the Kushiro marsh, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e9764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.9764	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 該当する

1. 著者名 Imamura Akio, Hayami Kana, Sakata Masayuki, Minamoto Toshifumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Environmental DNA revealed the fish community of Hokkaido Island, Japan, after invasion by rainbow trout	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biodiversity Data Journal	6. 最初と最後の頁 e56876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3897/BDJ.8.e56876	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 Jo T, Tomita S, Kohmatsu Y, Osathanukul M, Ushimaru A, Minamoto T	4. 巻 43
2. 論文標題 Seasonal monitoring of Hida salamander <i>Hynobius kimurae</i> using environmental DNA with a genus-specific primer set	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endangered Species Research	6. 最初と最後の頁 341 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3354/esr01073	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 該当する

1. 著者名 Tsuru Kenji, Ikeda Shizuya, Hirohara Takaya, Shimada Yasuhito, Minamoto Toshifumi, Yamanaka Hiroki	4. 巻 3
2. 論文標題 Messenger RNA typing of environmental RNA (eRNA): A case study on zebrafish tank water with perspectives for the future development of eRNA analysis on aquatic vertebrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 14 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.169	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 Jo Toshiaki, Tsuru Kenji, Hirohara Takaya, Yamanaka Hiroki	4. 巻 (in press)
2. 論文標題 Warm temperature and alkaline conditions accelerate environmental degradation <scp>RNA</scp>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/EDN3.334	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 Minamoto Toshifumi	4. 巻 29
2. 論文標題 Environmental DNA analysis for macro-organisms: species distribution and more	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 dsac018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/dnares/dsac018	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 Wu Luhan, Yamamoto Yoshihiko, Yamaguchi Shogo, Minamoto Toshifumi	4. 巻 142
2. 論文標題 Spatiotemporal changes in environmental DNA concentrations caused by fish spawning activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ecological Indicators	6. 最初と最後の頁 109213 ~ 109213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ecolind.2022.109213	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 Sakata Masayuki K., Takeshita Daiki, Nishizawa Ryohei, Sato Takuya, Minamoto Toshifumi	4. 巻 39
2. 論文標題 An efficient environmental DNA detection method for rare species: a case study of a small salamander (<i>Hynobius boulengeri</i>)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 721 ~ 728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-023-00289-6	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 -

1. 著者名 Wu Luhan, Wu Qianqian, Inagawa Takashi, Okitsu Jiro, Sakamoto Shogo, Minamoto Toshifumi	4. 巻 68
2. 論文標題 Estimating the spawning activity of fish species using nuclear and mitochondrial environmental DNA concentrations and their ratios	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Freshwater Biology	6. 最初と最後の頁 103 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/fwb.14012	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20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Toshiaki Jo
2. 発表標題 Understanding eDNA characteristics and dynamics for fisheries management and conservation
3. 学会等名 American Fisheries Society 151st Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Yamanaka
2. 発表標題 Basic knowledge accumulation in eDNA/eRNA analysis for mining more biological information from the environmental medium with more reliability
3. 学会等名 American Fisheries Society 151st Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東坂波也翔, 松本岳大, 坂田雅之, 源利文
2. 発表標題 琵琶湖における廃川の魚類ハピタットとしての活用可能性
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木大介, 伊藤玄, 山中裕樹, 坂田雅之, 源利文
2. 発表標題 核DNAをマーカーとする魚類環境DNAメタバーコーディング法の野外適用
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 呉盧漢, 稲川崇史, 沖津二郎, 坂本正吾, 源利文
2. 発表標題 定量的環境DNAメタバーコーディングを用いた魚類の繁殖期の同時モニタリング
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ウ倩倩, 坂田雅之, 吳德意, 山中裕樹, 源利文
2. 発表標題 アオコの発生した湖における環境DNAメタバーコーディングの試み
3. 学会等名 環境DNA学会第4回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田雅之, 河田萌音, 倉林敦, 栗田隆気, 中村匡聡, 白子智康, 掛橋竜祐, 西川完途, モハメド ヤジット ホスマン, 西島太加志, 樺元淳一, 宮正樹, 源利文
2. 発表標題 両生類を対象とした環境DNAメタバーコーディング検出系の開発と評価
3. 学会等名 環境DNA学会第4回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木大介, 山中裕樹, 坂田雅之, 源利文
2. 発表標題 魚類の核環境DNAメタバーコーディング手法の開発
3. 学会等名 環境DNA学会第4回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吳盧漢, 山本義彦, 山口翔吾, 源利文
2. 発表標題 魚類繁殖活動による環境DNA濃度の時間と距離に伴う変化
3. 学会等名 環境DNA学会第4回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 呉廬漢, 稲川崇史, 沖津二郎, 源利文
2. 発表標題 環境DNAによる魚類の繁殖期推定
3. 学会等名 環境DNA学会第3回大会・第36回個体群生態学会大会合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木大介, 渡部健, 源利文
2. 発表標題 環境DNA分析手法を用いたコイ科魚類の産卵行動の検出
3. 学会等名 環境DNA学会第3回大会・第36回個体群生態学会大会合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高尾健太, 徐寿明, 源利文
2. 発表標題 魚類環境RNAの検出最適化のためのプロトコル検証および野外適用
3. 学会等名 日本生態学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 姜明揚, 山本義彦, 源利文
2. 発表標題 環境核酸分析によるコイの栄養状態の評価
3. 学会等名 日本生態学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木大介, 山中裕樹, 源利文
2. 発表標題 核DNAをマーカーとした魚類環境DNAメタバーコーディングの新規手法の開発
3. 学会等名 日本生態学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 呉廬漢, 稲川崇史, 沖津二郎, 源利文
2. 発表標題 環境DNAを用いたダム湖における魚類繁殖期の推定
3. 学会等名 日本生態学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 釣健司, 廣原嵩也, 島田康人, 源利文, 山中裕樹
2. 発表標題 環境DNAとRNAの分解に及ぼす温度とpHの影響
3. 学会等名 日本生態学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大藪愛紗, 源利文
2. 発表標題 夜間の光は魚の生態に影響を及ぼすのか? -環境DNA技術を用いた種組成調査より-
3. 学会等名 日本陸水学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 呉廬漢、稲川崇史、沖津二郎、坂本正吾、源利文
2. 発表標題 定量メタバーコーディングを用いた魚類生態調査
3. 学会等名 環境DNA学会「あなたが主役のワークショップ」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國政祐太、木原菜摘、源利文
2. 発表標題 河川横断構造物がニホンウナギの河川遡上に与える影響の解明
3. 学会等名 環境DNA学会「あなたが主役のワークショップ」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 源利文、木原菜摘
2. 発表標題 絶滅危惧種の保全と外来種対策における環境DNA分析の有効性
3. 学会等名 スイゲンゼニタナゴの保全を考えるワークショップ
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 一般社団法人 環境DNA学会、土居 秀幸、近藤 倫生	4. 発行年 2021年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 300
3. 書名 環境DNA	

1. 著者名 源 利文	4. 発行年 2022年
2. 出版社 岩波書店	5. 総ページ数 120
3. 書名 環境DNA入門	

〔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・先端理工学部・准教授 (34316)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------