

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34316

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657020

研究課題名(和文) 実証的群集生態学革新をもたらす環境DNA分析手法の確立

研究課題名(英文) Innovative environmental DNA technique for community ecology

研究代表者

近藤 倫生 (Kondoh, Michio)

龍谷大学・理工学部・准教授

研究者番号：30388160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：環境DNAによる魚類群集モニタリング技術の開発、および関連する群集生態学的理論の構築をおこなった。主要な成果は以下のとおり：(1) 琵琶湖淀川水系に生息する7魚種についてDNAの検出・定量系を確立した。(2) 特定魚種の水槽実験より、環境DNA放出量や分解速度、それらの条件依存性に関する基本的知見を得た。(3) 野外において、環境DNAを利用してブルーギルやオオサンショウウオの存在を検出する実証実験に成功した。(4) 環境DNAの効率的な濃縮法や補足法を開発した。(5) マルチプレックスPCRによる多種同時検出系の検討を行った。(6) 群集ネットワークの構造と動態の関係に関する新たな理論的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We have developed the molecular and theoretical techniques to establish eDNA-based fish community monitoring. The major achievements are as follows: (i) A molecular biological methodology established to detect and quantify eDNA of seven fish species of the Lake Biwa-Yodo River System; (ii) DNA release and decomposition rates of fish individual, the basic parameters, and their condition dependence experimentally determined for particular species; (iii) Field and laboratory experiments conducted to test the methods developed for eDNA-based monitoring of bluegill and Japanese giant salamander; (iv) Novel methodologies established to capture and concentrate eDNA in water samples; (v) Multispecies detection technique based on multiplex PCR studied; (vi) Novel theoretical hypotheses obtained as to community network structure and its community dynamics consequences.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学，生態・環境

キーワード：環境DNA 魚類群集 DNAバーコーディング 環境モニタリング 琵琶湖水系

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 群集生態学は、生物群集の構造に関する時空間的パターンを理論予測・発見し、これを理解しようとしてきた。だが、その実証的研究には様々な制限が伴う。なかでも多種の個体密度を同時に、比較可能な方法で定量評価する困難さから、群集構造の決定・比較は容易でなく、実証的研究進展の大きな制約となっている。

(2) 申請者らは、環境中に存在する生物由来 DNA を利用して生物を検出する方法に着目した。申請者らの過去の研究から、湖水などの環境水には相当量の魚類由来 DNA が含まれていることが明らかになっている。また我々は、水槽実験により、環境水中 DNA を分析することで生息する魚種の特定が技術的に可能であること、標的魚種の量に応じて標的 DNA 量が増えることを確認していた。そこで、これまで単一種への適用に限られていた環境中 DNA 分析手法を、より体サイズの大きい生物の多種系に適用して群集構造を定量的に評価する着想を得た。

### 2. 研究の目的

(1) 種多様性・種構成等に関する群集パターンを、野外において検出・実証テストするのは容易ではない。生物群集は多種系であり、それら構成種の個体群密度、その空間分布、時間変動の推定に大きな労力や困難を伴うためである。

(2) 本研究では、環境媒体中（湖沼における水試料）に含まれる生物由来 DNA の分析に基づき、迅速かつ定量的に群集構造（種構成・個体群密度）を解析する簡便かつ標準化された新手法を開発し、群集生態学における実証研究の可能性を飛躍的に高める方法論的枠組みの構築を目指す。

(3) さらに、この環境 DNA を利用した生物群集モニタリング手法を野外等における魚類群集に実際に適用し、この新しく開発する群集解析手法の有効性と特徴、限界を検証することを目的とする。

(4) 環境 DNA データの蓄積が進むと、多種を対象とした生物群集研究や、多種時系列データの群集生態学における活用が求められるようになる。そこで、これらを可能にするような理論の構築を本研究課題の第四の目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究課題では、特異的プライマーを用いたマルチプレックス PCR により、特定の水域に生息する魚種の DNA を同時検出する系を開発する。具体的な対象は、申請者にとってアクセスしやすい琵琶湖における全魚種とする。これを実現するために、琵琶湖に生息する全魚種の DNA を入手し、ミトコンドリアチトクローム b 遺伝子のデータベースを補完する。このデータを元に各魚種の特異的プライマーを設計し、定量性のあるマルチ

プレックス PCR 系を確立する。

(2) この手法の定性的・定量的妥当性を、水槽実験および野外実験により評価し、必要な場合には系の再設計を行う。

(3) 環境 DNA 技術の確立に伴って蓄積すると思われる群集データを利用して検証可能な群集生態学的理論を構築するとともに、多魚種環境 DNA 時系列データの利用方法を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 琵琶湖生息魚種のシーケンス情報取得琵琶湖生息魚類のうち、チトクローム b 領域についての配列情報が蓄積されていない種について、同領域のシーケンスを行い、環境 DNA 分析に用いるプライマーの設計に必要な情報を揃えた。種特異的な検出・定量系の確立環境 DNA を用いた生息種定量に向けて種特異的な検出・定量系を確立するため、琵琶湖淀川水系に生息する魚種のうち、オオクチバス、コクチバス、ブルーギル、アユ、アユモドキ、スズキ、ボラの検出・定量系を開発した。

(2) 環境 DNA を用いた魚類のバイオマス推定に向けて、環境 DNA 放出・分解速度、およびその条件依存性を調べた。体サイズと環境 DNA 放出量に関する知見を得た。また、水槽実験により、環境 DNA の分解速度に関する基本的な知見を得た。さらに、環境 DNA の放出速度と分解速度が給餌の有無や魚体の生死によってどのように影響されるかを示した。環境 DNA の主な放出源と考えられた粘液については、その置換速度を、安定同位体比の変化速度から推定した。(Maruyama et al 2014 Ecol Freshw Fish)

(3) 環境 DNA を利用した生物モニタリング手法の野外実証実験を行った。在来及び外来オオサンショウウオの分布域を迅速に推定する手法を開発し、京都府の桂川水系における外来種の分布拡大を示唆する結果を得た(Fukumoto et al. 投稿中)。また、ブルーギルについては、止水域において在/不在を検出する手法を確立し、環境 DNA 手法により高精度に在/不在を判定できることなどを明らかにした(Takahara et al., PLOS ONE, 2013)。

(4) 環境 DNA の効率的濃縮法の開発をおこなった。野外で採取した水から環境 DNA を、より高い回収率と再現性で回収するための手法を比較検討した。その結果、機器や電気供給が十分でない調査現場でも確度の高い環境 DNA 分析を行えるようになった(Minamoto et al. 投稿中)。また、どのような状態で水中に存在しているのか不明である環境 DNA について、試料水の pH の調整や酵素処理の有無などの条件検討を行い、より DNA 補足効率が高くなる濾過・抽出の条件を明らかにした。

(5)種特異的なプライマーセットを複数種同時に使用することで、1チューブで複数のターゲット種のDNAを同時に増幅するマルチプレックスPCRによる多種同時検出系の検討を行った。

(6) 多種の環境DNA量の時系列データから群集構造を推定するための数的手法 (Convergent Cross Mapping) の開発に取り組んだ。これにより種間のcausalityを予測する事が可能になる事が見込まれる。また、多種環境DNAデータの蓄積によって実証が可能になる事が期待される、群集ネットワークの構造と動態の関係に関する新たな理論的知見を得た (Mougi & Kondoh 2012, 2014a, b)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

1. Mougi, A., Kondoh, M. (2014a) Instability of a hybrid module of antagonistic and mutualistic interactions. *Population Ecology* 56, 257-263. 査読有. DOI: 10.1007/s10144-014-0430-9.
2. Mougi, A., Kondoh, M. (2014b) Adaptation in a hybrid world with multiple interaction types: a new mechanism for species coexistence. *Ecological Research* 29, 113-119. 査読有. DOI: 10.1007/s11284-013-1111-4.
3. Uchii, K., Minamoto, T., Honjo, M. N., Kawabata, Z. (2014) Seasonal reactivation enables Cyprinid herpesvirus 3 to persist in a wild host population. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 536-542. 査読有. DOI:10.1111/1574-6941.12242.
4. Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H., Ito, T., Kawabata, Z. (2014) Differences between domesticated Eurasian and Japanese indigenous strains of the common carp (*Cyprinus carpio*) in cortisol release following acute stressor. *Ichthyological Research* 61, 165-168. 査読有. DOI:10.1007/s10228-013-0385-4
5. Noda, H., Maruyama, A. (2014) The relationship between an introduced predator-prey pair, largemouth bass and bluegill, and the chlorophyll concentration in farm ponds. *Ichthyological Research* 61, 159-164. 査読有. DOI:10.1007/s10228-013-0380-9.
6. Shinohara, K., Maruyama, A., Rusuwa, B., Ohtsuka, T. (2014) Taxonomic revision of three diatoms found in Lake Malawi: *Afrocybella brunii* (Fricke) comb. nov., *Afrocybella rossii* (Kocielek & Stoermer) comb. nov., and *Aulacoseira euareolata* (O.Müller) comb. nov. et nom. nov. *Phycological Research* 62, 9-15. 査読有. DOI: 10.1111/pre.12036.
7. Maruyama, A., Shimonaka, H., Ito, T. (2014) Quick change in  $^{15}\text{N}$  values of fish mucus confirmed in the field using a migratory goby. *Ecology of Freshwater Fish. online first.* 査読有. DOI: 10.1111/eff.12124.
8. Koehncke, A., Telschow, A., Kondoh, M. (2013) Invasibility as an emergent property of native metapopulation structure. *Oikos* 122, 332-340. 査読有. DOI: 10.1111/j.1600-0706.2012.20677.x.
9. Yamanaka, H., Takahara, T., Kohmatsu, Y., Yuma, M. (2013) Body size and temperature dependence of routine metabolic rate and critical oxygen concentration in larvae and juveniles of the round crucian carp *Carassius auratus grandoculis* Temminck & Schlegel 1846. *Journal of Applied Ichthyology* 29, 891-895. 査読有. DOI: 10.1111/jai.12126.
10. Yamanaka, H. (2013) Hypoxic conditions enhance refuge effect of macrophyte zone for small prey fish from piscivorous predators. *Fisheries Management and Ecology* 20, 465-472. 査読有. DOI: 10.1111/fme.12033.
11. Uchii K., Okuda N., Minamoto T., Kawabata Z. (2013) An emerging infectious pathogen endangers an ancient lineage of common carp by acting synergistically with conspecific exotic strains. *Animal Conservation* 16, 324-330. 査読有. DOI: 10.1111/j.1469-1795.2012.00604.x.
12. Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H. (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLOS ONE* 8, e56584. 査読有.
13. Takahara, T., Kohmatsu, Y., Maruyama, A., Yamaoka, R. (2012) Predator-specific inducible morphological changes in two Japanese anurans tadpoles. *Herpetology Notes* 4, 43-47. 査読有. DOI: 10.1371/journal.pone.0056584.
14. Takahara, T., Kohmatsu, Y., Maruyama, A., Doi, H., Yamanaka, H., Yamaoka, R. (2012) Inducible defense behavior of an anuran tadpole: cue-detection range and cue types against predator. *Behavioral Ecology* 23, 863-868. 査読有. DOI: 10.1093/beheco/ars044.
15. Mougi A., Kondoh, M. (2012) Diversity of interaction types and ecological

community stability. *Science* 337, 349-351. 査読有. DOI: 10.1126/science.1220529.

〔学会発表〕(計 42 件)

1. Fukumoto, S., Ushimaru, A., Minamoto, T. (2014) Large scale environmental DNA assessment for Japanese and Chinese giant salamanders in Katsura River, Japan. *Frontiers in Amphibian Biology: Endangered Species Conservation and Genome Editing*. 広島大学東広島キャンパス. 2014年3月27日-28日
2. 内井喜美子、土居秀幸、源利文、山中裕樹 (2014) 同種内外来種の侵入規模の迅速把握. 日本生態学会広島大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
3. 山中裕樹、源利文、櫻井翔、大垣寿々香 (2014) 水生生物の移動分散モニタリングへの環境 DNA 技術の適用: 流水環境における研究例と展望. 日本生態学会広島大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
4. 辻咲恵、小山奈々、大塚泰介、池田町農業公社、ネイチャースケープ、岩井紀子、丸山敦 (2014) 生物がいると水田の群集組成はどう変化するか ~ドジョウ、タニシ、オタマジャクシが果たす役割~. 日本生態学会広島大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
5. Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., Minamoto, T. (2014) Environmental DNA release velocity from different sized fish. 日本生態学会広島大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
6. 小山奈々、辻咲恵、池田町農業公社、ネイチャースケープ、丸山敦、岩井紀子 (2014) 水田に生物がいると水質とイネはどう変化するか ~ドジョウ、タニシ、オタマジャクシが果たす役割~. 日本生態学会広島大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
7. 小林千草、近藤倫生 (2014) ワクチン接種率が感染動態に及ぼす影響. 日本生態学会第 61 回全国大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
8. 吉川萌美、近藤倫生 (2014) 協力行動はグループからの離脱によって維持される. 日本生態学会第 61 回全国大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
9. 中井信吾、近藤倫生 (2014) Bioaccumulation as an interactive consequence of ecological and physiological processes: a theoretical model. 日本生態学会第 61 回全国大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
10. Kondoh, M., Miki, T., Kato, S. (2014) Stable isotope analysis and food-web unfolding. 日本生態学会第 61 回全国大会 シンポジウム「Use of various isotope tools in watershed ecology」. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
11. 土居秀幸、高原輝彦、源利文 (2014) 環境 DNA とフェノロジー研究: 現状と未来. 日本生態学会第 61 回全国大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
12. 高原輝彦、源利文、土居秀幸、木塚俊和、満尾世志人、角田裕志、高村典子 (2014) オオクチバス等の外来魚モニタリングにおける環境 DNA 技術の有効性の検証 - 調査手法の違いによる結果の比較を通して -. 日本生態学会第 61 回全国大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
13. 源利文 (2014) 核DNAをマーカーとした環境 DNA 解析. 日本生態学会第 61 回全国大会. 広島国際会議場. 2014年3月14日-18日
14. 篠原耕平、丸山敦、Bosco Rusuwa、大塚泰介 (2013) Taxonomic revision of three diatoms found in Lake Malawi; *Afrocymbella brunii* (Fricke) comb. nov., *Afrocymbella rossii* (Kociolek & Stoermer) comb. nov., and *Aulacoseira euareolata* (O.Müller) comb. nov. et nom. nov. 日本珪藻学会研究集会. 琉球大学. 2013年11月16日
15. Kondoh, M. (2013) Interaction-type diversity and complexity-stability relationship of community network. *Food Webs: Science with Impact*, Schloss Rauischholzhausen. Giessen, Germany. 2013年10月13日-15日
16. 源利文 (2013) 環境DNAを用いた水中生物モニタリングの現状. 第 29 回個体群生態学会大会. 大阪府立大学. 2013年10月12日-13日
17. Mougi, A. and Kondoh, M. (2013) What generates the stabilising effect of interaction-type diversity in ecological communities? 第 29 回個体群生態学会基調シンポジウム A「Network Structure and Dynamics of Ecological Communities」(招待講演)大阪府立大学中百舌鳥キャンパス. 2013年10月12日
18. 内井喜美子、土居秀幸、源利文、山中裕樹 (2014) 同種内外来種の侵入規模の迅速把握. 日本陸水学会第 78 回大会. 龍谷大学. 2013年9月11日-13日
19. Mougi, A. and Kondoh, M. (2013) Stability of ecological community with three interaction types. 第 23 回日本数理生物学会大会. 静岡大学. 2013年9月11日-13日
20. 福本想、丸山敦、源利文 (2013) 環境DNAを用いた在来および外来オオサンショウウオの検出. 日本陸水学会第 78 回大会. 龍谷大学. 2013年9月10日-13日

21. Takahara, T., Doi, H., Minamoto, T. (2013) Using environmental DNA to estimate the distributions and biomass of fish. 26th International Congress for Conservation Biology (ICCB 2013). Baltimore Convention Center (USA). 2013年7月20日-25日
22. 奥田武弘、酒井陽一郎、近藤倫生 (2013) 漁獲量を観測データとして用いた状態空間モデルによる琵琶湖の魚類個体群動態の推定. 第60回日本生態学会大会. グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター). 2013年3月5日-9日
23. 中井信吾、近藤倫生 (2013) 生態系・代謝過程を考慮した生物濃縮モデル. 第60回日本生態学会大会. グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター). 2013年3月5日-9日
24. 源利文、中貴文、船津耕平、神松幸弘、川端善一郎、丸山敦、Tiengkham Pongvongsa、門司和彦(2013) 環境DNAを用いてタイ肝吸虫の生態を探る. 日本生態学会第60回大会. グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター). 2013年3月5日-9日
25. 船津耕平、丸山敦、神松幸弘、源利文、門司和彦 (2013) メコン中流域の魚類の移動と寄生虫感染率の変化. 日本生態学会第60回大会. グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター). 2013年3月5日-9日
26. 近藤倫生 (2013) リズムを主題に生理学と生態学をつなぐ. 第60回日本生態学会大会. グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター). 2013年3月5日-9日
27. 土居秀幸、高原輝彦、源利文 (2013) 先端技術(環境DNA,次世代シーケンス)を使って生態学を変えていくには? 日本生態学会第60回大会. グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター). 2013年3月5日-9日
28. 山中裕樹、源利文 (2013) 環境DNAを用いた魚類の不在判定による遡河行動のモニタリング. 日本生態学会第60回大会. グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター). 2013年3月5日-9日
29. 丸山敦、重田雅 (2013) 粘液の安定同位体比分析:早い応答と反復測定の利点. 日本生態学会第60回大会. グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター). 2013年3月5日-9日
30. 高原輝彦、土居秀幸、源利文 (2013) 環境DNA技術を用いた外来種モニタリング手法の開発. 日本生態学会第60回大会. グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター). 2013年3月5日-9日
31. 中貴文、源利文、門司和彦、丸山敦 (2013) 環境DNA分析の実用化:野外で使える前処理法の検討. 日本生態学会第60回大会. グランシップ(静岡県コンベンションアーツセンター). 2013年3月5日-9日
32. Koehncke, A., Telchow, A., Kondoh, M. (2012) Species invasion and native meta-population structure. 第28回個体群生態学会. 東邦大学. 2012年10月20日-21日
33. 中井信吾、近藤倫生 (2012) 生物濃縮における生態系過程と代謝過程. 第28回個体群生態学会. 東邦大学. 2012年10月20日-21日
34. 高原輝彦、山中裕樹、本庄三恵、川端善一郎 (2012) ため池の水生動物モニタリングに環境DNAを応用する. 日本陸水学会第77回大会. 名古屋大学. 2012年9月14日-17日
35. 源利文 (2012) 環境DNAを用いた魚類相の定性的把握法. 日本陸水学会第77回大会. 名古屋大学. 2012年9月14日-17日
36. 舞木昭彦、近藤倫生 (2012) 新しい多種共存メカニズム:種間相互作用の多様性. 第22回数理生物学会. 岡山大学. 2012年9月10日-12日
37. Koehncke, A., Telchow, A., Kondoh, M. (2012) Species invasion and native meta-population structure. 第22回数理生物学会. 岡山大学. 2012年9月10日-12日
38. Kondoh, M. (2012) Ecological complexity and biodiversity maintenance: a community network approach. 2012 Annual Meeting of the Society for Mathematical Biology(招待講演). Knoxville, TN, USA. 2012年7月25日-28日
39. Tayasu, I., Okuda, N., Tokuchi, N., Ohte, N., Kondoh, M. (2012) Multiple isotope approach for studying material flow and food web structures of stream ecosystems in Lake Biwa watershed. ASLO Aquatic Sciences Meeting 2012. Lake Biwa, Shiga, Japan. 2012年7月8日-13日
40. Nakazawa, T., Ushio, M., Kondoh, M. (2012) Scale dependence of predator-prey mass ratio: determinants and applications. ASLO Aquatic Sciences Meeting 2012. Lake Biwa, Shiga, Japan. 2012年7月8日-13日
41. Kondoh, M., Kato, S. (2012) Nested food webs; implications for structure-dynamics relationships. ASLO Aquatic Sciences Meeting 2012. Lake Biwa, Shiga, Japan. 2012年7月8日-13日
42. Takahara, T., Doi, H., Minamoto, T., Yamanaka, H., Zen'ichiro Kawabata. (2012) Detection and quantification of fish presence/biomass in ponds using environmental DNA. 2012 ASLO

Aquatic Sciences Meeting. Lake Biwa,  
Shiga, Japan. 2012年7月8日-13日

〔図書〕(計1件)

1. M. Kondoh (2012) Resilience and Stability.  
(eds. A. Hasting et al.) In: Encyclopedia of  
Theoretical Ecology. University of  
California Press. 848

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 倫生 (KONDOH, Michio)  
龍谷大学・理工学部・准教授  
研究者番号：30388160

### (2) 研究分担者

源 利文 (MINAMOTO, Toshihumi)  
総合地球環境学研究所・研究部・プロジェ  
クト上級研究員  
研究者番号：50450656

丸山 敦 (MARUYAMA, Atsushi)  
龍谷大学・理工学部・講師  
研究者番号：70368033

山中 裕樹 (YAMANAKA, Hiroki)  
龍谷大学・理工学部・講師  
研究者番号：60455227