

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00581

研究課題名(和文) 魚類の大量死イベントの予測手法の開発：水中の環境mRNAとストレス物質を用いて

研究課題名(英文) Development of prediction method for mass death of fish by using eRNA and stress hormone

研究代表者

高原 輝彦 (Takahara, Teruhiko)

島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授

研究者番号：10536048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、島根県の宍道湖を主要な調査フィールドとして、環境中に放出するDNAやRNA、ストレスホルモン(コルチゾール)に着目して、水域における生物大量死のリスク評価、及び、予測モニタリング手法の開発を進めた。研究期間3年を通して、毎月14箇所の環境DNA・環境RNA・ストレスホルモン用のサンプルを集積すると共に、環境DNA用の水サンプルの最適な保存方法を明らかにした。加えて、環境RNAの回収・濃縮・精製の手法を確立した。また、ストレス実験条件下において、対象生物のコルチゾールの放出量変化の評価に成功した。以上より、生物大量死のリスク評価に必要な基礎的な技術を確立できたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでほとんど明らかにされていなかった湖沼などにおける魚介類の大量死イベントに関して、予測とモニタリングを可能にする技術開発に取り組んでおり、学術的意義は大きいと考えている。具体的には、水生動物を用いた詳細な飼育実験と継続的な野外調査を通して、大量死の予兆を把握するために環境RNAやストレスホルモンの測定を可能にした点があげられる。本研究で開発された技術は、様々な水生動物にも即座に応用可能であり、今後の発展として、水域生態系における大量死予測に関する汎用的な手法を提案し、重要水産資源等の持続可能な管理の実現が期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, by using environmental DNA (eDNA), environmental RNA (eRNA), and stress hormones (cortisol), we tried to develop the method for assessing the risk of biological mass death and the predictive monitoring in aquatic ecosystems. Lake Shinji as our main field is a shallow oligohaline lake on the coast of the Sea of Japan. The samples for eDNA, eRNA, and stress hormone were accumulated at 14 sites/month throughout 3 study years. In addition, the optimal storage method for water samples for eDNA was clarified. And, a method for collecting, concentrating, and purifying eRNA was established. We also established the method for assessing the amount of cortisol (stress hormone) released from the target organism under stress experimental conditions. Based on these results, we believe that we have established the basic technology necessary to perform the risk assessment of aquatic mass mortality.

研究分野：動物生態学

キーワード：環境DNA 環境RNA ストレスホルモン 水生動物

1. 研究開始当初の背景

生態系においては、生物種の発生・死亡を通じてその個体群が保たれ、生態系内の相互作用や機能を保っている。一方、生物の大量死は、現在多くの生態系で問題となっており、特に水産有用種などでは人間の生産活動においては甚大な被害を及ぼす。

大量死の原因には、水域生態系であれば貧酸素、ストレス、感染症などの様々な要因が関与するとされているが、その直接的な因果関係についてはほとんど明らかになっていない。また、大量死が大きな社会問題となっている一因には、その発生予測が非常に困難なことがあげられる。

申請者らはこれまでに、生物由来の環境中の DNA (環境 DNA) に着目した生物モニタリングの技術開発を精力的に進めており、水中に存在するわずかな DNA 断片を定量 PCR や DNA シークエンスに供することに成功していた。その結果、自然環境中に生息する水生動物の在・不在や生物量(数や重さ)を、採捕や目視などに頼ることなく、わずか数リットルの水に溶け込む DNA 情報を調べるだけで簡便に評価できる手法を開発してきた(Takahara et al. 2012, 2013)。加えて、モデル生物としてコイを用いて、ストレスを感じたときに分泌するストレスホルモンが、それらの飼育水からも測定できることも発見している(Takahara et al. 2014)。

そこで、申請者らはこれらの手法を合わせることで、この予測困難な大量死について兆候を掴む有用な手段になるのではないかと考えた。なぜなら、どちらも簡便な手法で連続的に挙動をモニターすることが可能であり、さらに環境中の RNA (環境 RNA) を用いれば、大量死直前の個体情報(遺伝子の発現)を捉えることができると考えられるからである。同様に、対象種が生息する水サンプルからストレスホルモン(コルチゾール)を抽出することで、ストレス反応の定量化も可能になる。これらの背景から、上記の技術 2 つを併用したモニタリング手法の開発、および、そのデータを使った予測モデリングを実現できると着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、湖沼等の水を採取し、そこに含まれる水生動物の健康状態を反映する環境 RNA、及び、ストレスを感じて分泌されるストレスホルモン(コルチゾール)をモニターできるようになることを目的とした。そして、これらの成果を元にして、生物の大量死予測モデルを構築するための基礎技術の確立を目指した。そのために以下の 5 つのサブテーマに取り組んだ。(1) 大量死のモデル生物としてコノシロの環境 DNA 測定用のプライマー・プローブの作成、(2) 環境 DNA 用の水サンプルの最適な保存方法の確立、(3) 宍道湖を主要なモデルフィールドにした野外調査を継続的に 3 年間実施して、「環境 DNA」、「環境 RNA」、「ストレスホルモン」に関するサンプルの集積、および、「環境 DNA」を用いたユニバーサルプライマーによる生物相の網羅的解析、(4) 環境 DNA 断片長の差異から対象種の生死判別(=健康状態)を推定できる新たな環境 DNA 手法の開発、(5) ストレッサーに対するストレスホルモンの放出量変化によるストレス状態の評価手法の確立、のサブテーマ 5 つを実施した。

3. 研究の方法

(1) 大量死のモデル生物としてコノシロの環境 DNA 測定用のプライマー・プローブを完成するために、コノシロに加えて、コノシロの近縁種のニシン目ニシン科のウルメイワシ、サッパ、ニシン、キビナゴと、ニシン目カタクチイワシ科のカタクチイワシについて、データベースから遺伝子情報配列(チトクローム b)を抽出してマルチプルアライメントを作成し、コノシロに特異的な塩基配列を特定してプライマー・プローブをデザインした。つぎに、各魚種の組織から抽出した DNA サンプルを用意して、デザインしたプライマー・プローブがコノシロ DNA のみを増幅するかどうかを検証した。

(2) 環境 DNA 用の水サンプルの最適な保存方法を確立するため、他種で報告されていた DNA 分解抑制試薬が汽水の環境サンプルにも適用可能かどうかを検証した。その際、10 w/v% ベンザルコニウム塩化物液(日本製薬株式会社)(BAC)を用いた。実験では、BAC 添加の有無、水試料の保管温度と採水から濾過までの日数(保管期間)を設定した。野外採水調査は宍道湖において実施した。実験室に持ち帰った水サンプルは、「25 ℃」、「4 ℃」、「-30 ℃」の 3 種類の温度環境で保管した。つぎに、採水の直後(0 日目)、1 日後、3 日後、7 日後、14 日後、及び、21 日後に各水サンプルの濾過処理を実施した。水サンプルに含まれている DNA を測定する際に、ヤマトシジミ(*Corbicula japonica*)(Takahara et al. 2019)、スズキ(*Lateolabrax japonicus*)(Yamanaka & Minamoto 2016)、ニホンウナギ(*Anguilla japonica*)(Takahara et al. 印刷中)の環境 DNA 定量用プライマー・プローブのセットを用いた。

(3) 野外調査において、宍道湖を主要なフィールドとして、3 年間の調査期間を通して、14 箇所で月に 1 回、表層水を採水し、「環境 DNA」、「環境 RNA」、「ストレスホルモン」用のサンプルを

集積した。

また、宍道湖-地中海における魚類相(+鳥類相)マップを作成するため、上記サンプルのうち、2016年11月-2017年9月の奇数月に採取したサンプルを用いて、魚類用ユニバーサルプライマー(MiFish)(Miya et al. 2015)と鳥類用ユニバーサルプライマー(MiBird)(Ushio et al. 2018)を用いた網羅的な解析(環境DNAメタバーコーディング)を実施した。

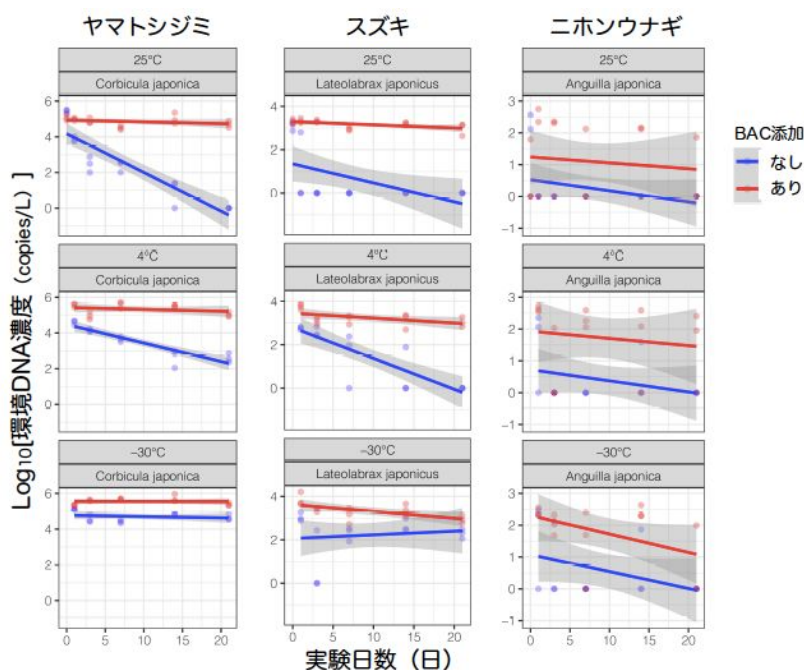
(4) 環境DNA断片長の差異から対象種の生死判別(=健康状態)を推定できる新たな環境DNA手法を開発するため、PCR増幅長の違いに着目した。環境DNA分析に必要な対象種特異的なPCR用プライマーは、増幅長が100-150bp程度になるように設計するのが一般的であるが、近年、長いDNA断片を標的としたプライマーを用いた研究が行われている。Jo et al. (2017)によると、短いDNA断片(127bp)を標的としたプライマー(プライマーS)は、生物から放出されてから時間が経過して分解が進んだDNAも検出するが、長いDNA断片(719bp)を標的としたプライマー(プライマーL)は、生物から放出されてから間もないDNAを検出することができると報告している。そこで、ヤマトシジミ(*Corbicula japonica*)をモデルケースにして、長いDNA断片を標的とするプライマー(プライマーL)を作成し、室内実験、および、野外調査の結果から、プライマーLの有用性を検証した。

(5) 申請者らが先行研究で確立した方法に基づいて(Takahara et al. 2014) 対象種の飼育水中に溶解するストレスホルモン(コルチゾール)を、固相抽出カートリッジ(InertSep Pharma: GL Sciences)によって濃縮・精製した後、YK241 Cortisol (Saliva) EIAキット(矢内原研究所)を用いた酵素結合免疫吸着法によって、ストレスホルモンの定量を試みた。

4. 研究成果

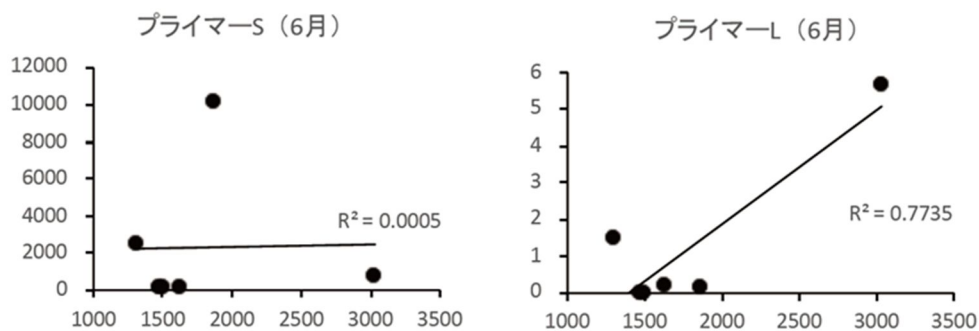
(1) コノシロのチトクローム*b*遺伝子を対象領域にして、PCR増幅長90bpのプライマー・プローブを作成した。このプライマー・プローブを用いて、各魚種の組織抽出DNAの増幅・非増幅を調べた結果、コノシロのDNAのみの増幅が確認されたため、コノシロ特異的なプライマー・プローブを開発できたと考えられた。

(2) 宍道湖で採取した水サンプルにBACを添加した場合、および、その水サンプルの保管期間は、ヤマトシジミ、スズキ、ニホンウナギの3種のDNA濃度に有意な影響を及ぼすことがわかった(下図参照)。一方で、BACの効果は初期のDNA濃度の異なるこれら3種の生物種間で違いはみられなかった。これらのことから、BACの添加は汽水の水サンプルに含まれるDNAの分解を劇的に抑制できることがわかった。以上のことから、環境DNA用の水サンプルの最適な保存方法を明らかにできたと考えている。なお、この成果は、国際誌において印刷中である(Takahara et al., *Limnology & Oceanography: Methods*)



(3) ヤマトシジミを対象にして、短いDNA断片を検出できるショートプライマー(プライマーS: 126bp, Takahara et al. 2019)に比べて長いDNA断片を検出可能なロングプライマー(プラ

イマー-L : 600bp 弱)を開発した。次に、室内飼育実験を行い、上記のプライマー-S と L を用いたヤマトシジミの環境 DNA 測定を実施したところ、生存個体の飼育水では長い DNA 断片が検出されるのに対して、死亡個体の飼育水からは長い DNA 断片がほとんど検出されないことがわかった。次に、宍道湖の野外サンプルを用いて、ヤマトシジミの生物量と、プライマー-S と L で測定した DNA 濃度との関係を調べた結果、プライマー-L で測定した DNA 濃度の方が生物量との相関が高くなることがわかった(下図参照)。しかし、プライマー-L の場合、検出される DNA 濃度が低下することも明らかになった。今後は、プライマー-S と L の中間程度の長さの DNA 断片を標的としたプライマー(プライマー-M)を開発して、有用性を比較・検討することが望ましいと考えている。



縦軸は環境 DNA 濃度(copies/mL)、横軸は生物量 (g/m²) を表す。

(4) 3年間の調査期間を通して、月に1度、計14箇所において表層水を採水し、「環境DNA」、「環境RNA」、「ストレスホルモン」用のサンプルを集積した。また、環境RNAによって生物の健康状態を把握する手法を確立するため、-80度で冷凍保存していた約1年半分のRNA用フィルターサンプルから環境RNAの回収・濃縮・精製することができた。

また、環境DNAメタバーコーディング法を用いて、宍道湖-中海を利用する魚類・鳥類の群集解析を実施した結果、絶滅危惧種を含む魚類150種以上、および、鳥類20種以上が検出された。魚類では、宍道湖西部は淡水魚が多く、大橋川付近で汽水魚が多くなり、中海東部は海水魚が多くなる傾向があった。鳥類では、夏季よりも冬季に多くの種数が検出された。宍道湖-中海における魚類の分布は、湖水の塩濃度勾配が影響しており、また、鳥類は、各湖内において越冬場所として選好する環境の存在が示唆された。以上のことから、環境DNAメタバーコーディング結果を精査・明瞭化した宍道湖-中海の生物相マップを作成することができた。

(5) 飼育が容易だったサンショウウオ類の幼生をモデルケースとして、ストレス(塩分)に対するストレス反応を評価できるかどうか検証したところ、サンショウウオ類が水中に放出するストレスホルモン濃度には、個体差が大きかったため有意な差異はみられなかったが、高い塩分に曝露された処理区においてのみ、ストレスホルモン濃度が高くなる傾向があることがわかった。このことは、塩分ストレスに対してサンショウウオがストレスなどを感じており、その指標として、コルチゾールをモニターできることが示唆された。以上ことから、対象生物の飼育水から、環境条件に応じたストレスホルモン(コルチゾール)の放出量の変化について評価する手法を確立することができたと考えている。今後は、本手法を様々な生物種に適用させた汎用的な技術として活用していくことを検討している。

(参考文献)

- Takahara et al. (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE* 7: e35868.
- Takahara et al. (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE* 8: e56584.
- Takahara et al. (2014) Effects of daily temperature fluctuation on the survival of carp infected with *Cyprinid herpesvirus 3*. *Aquaculture* 433: 208-213.
- Takahara et al. (in press) Suppression of eDNA degradation in water samples associated with different storage temperature and period using benzalkonium chloride. *Limnology and Oceanography: Methods*
- Takahara et al. (2019) Using environmental DNA to estimate the seasonal distribution and habitat preferences of a Japanese basket clam in Lake Shinji, Japan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 221: 15-20.
- Yamanaka and Minamoto (2016) The use of environmental DNA of fishes as an efficient

method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicator* 62: 147-153.

- Miya et al. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2: 150088.
- Ushio et al. (2018) Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports* 8: 4493.
- Jo et al. (2017) Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources* 17: e25-e33.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Takahara Teruhiko, Iwai Noriko, Yasumiba Kiyomi, Igawa Takeshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Comparison of the detection of 3 endangered frog species by eDNA and acoustic surveys across 3 seasons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Freshwater Science	6. 最初と最後の頁 18 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1086/707365	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 Igawa Takeshi, Takahara Teruhiko, Lau Quintin, Komaki Shohei	4. 巻 7
2. 論文標題 An application of PCR-RFLP species identification assay for environmental DNA detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e7597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.7717/peerj.7597	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, Takahara Teruhiko, Doi Hideyuki, Shibata Naoki, Yamanaka Hiroki	4. 巻 1
2. 論文標題 The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis?A review of methods for collection, extraction, and detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 99 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.21	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 Teruhiko Takahara, Junya Taguchi, Satoshi Yamagishi, Hideyuki Doi, Shigeki Ogata, Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Suppression of eDNA degradation in water samples associated with different storage temperature and period using benzalkonium chloride	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Limnology and Oceanography: Methods	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) -	査読の有無 有
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 Iwai Noriko, Yasumiba Kiyomi, Takahara Teruhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Efficacy of environmental DNA to detect and quantify stream tadpoles of <i>Odorrana splendida</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 181798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://dx.doi.org/10.1098/rsos.181798	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 Takahara Teruhiko, Ikebuchi Takashi, Doi Hideyuki, Minamoto Toshifumi	4. 巻 221
2. 論文標題 Using environmental DNA to estimate the seasonal distribution and habitat preferences of a Japanese basket clam in Lake Shinji, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Estuarine, Coastal and Shelf Science	6. 最初と最後の頁 15 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.02.022	査読の有無 有
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 高原輝彦	4. 巻 61
2. 論文標題 環境DNAを用いた水域生態系の解明に向けた取り組み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 用水と排水	6. 最初と最後の頁 64 ~ 70
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 Doi Hideyuki, Fukaya Keiichi, Oka Shin-ichiro, Sato Keiichi, Kondoh Michio, Miya Masaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Evaluation of detection probabilities at the water-filtering and initial PCR steps in environmental DNA metabarcoding using a multispecies site occupancy model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40233-1	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 Fujii Kazuya, Doi Hideyuki, Matsuoka Shunsuke, Nagano Mariko, Sato Hirotohi, Yamanaka Hiroki	4. 巻 14
2. 論文標題 Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: A comparison of capture methods	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0210357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0210357	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 高原輝彦	4. 巻 46
2. 論文標題 水生動物の生物量、季節分布と移動における環境DNAを用いた推定	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 環境技術	6. 最初と最後の頁 636 ~ 641
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、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 乾隆帝、赤松良久、高原輝彦、後藤益滋、一松晃弘	4. 巻 23
2. 論文標題 流水中におけるカワムツの生物量と環境DNA量の関係性 - 水路実験と野外への適用 -	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 河川技術論文集	6. 最初と最後の頁 651 ~ 656
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 有
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 Doi Hideyuki, Uchii Kimiko, Matsuhashi Saeko, Takahara Teruhiko, Yamanaka Hiroki, Minamoto Toshifumi	4. 巻 15
2. 論文標題 Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Limnology and Oceanography: Methods	6. 最初と最後の頁 212 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lom3.10161	査読の有無 有
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 Chambert Thierry, Pilliod David S., Goldberg Caren S., Doi Hideyuki, Takahara Teruhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 An analytical framework for estimating aquatic species density from environmental DNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 3468 ~ 3477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ece3.3764	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 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 -

1. 著者名 Uchii Kimiko, Doi Hideyuki, Yamanaka Hiroki, Minamoto Toshifumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and non-native genotypes of common carp estimated by environmental DNA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 8515 ~ 8522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ece3.3346	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 Doi Hideyuki, Katano Izumi, Sakata Yusuke, Souma Rio, Kosuge Toshihiro, Nagano Mariko, Ikeda Kousuke, Yano Koki, Tojo Koji	4. 巻 4
2. 論文標題 Detection of an endangered aquatic heteropteran using environmental DNA in a wetland ecosystem	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 170568 ~ 170568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.170568	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 Katano Izumi, Harada Ken, Doi Hideyuki, Souma Rio, Minamoto Toshifumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0176541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0176541	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中島広樹、土居秀幸、高原輝彦、松岡俊将、永野真理子
2. 発表標題 環境DNAメタバーコーディング解析を用いた微生物群集の空間構造解析：群集生態学の高次プロセスを微生物群集から考える
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高原輝彦、山中裕樹、折戸みゆき、中道友規、立石新、土居秀幸、後藤亮、佐土哲也、宮正樹
2. 発表標題 環境DNAメタバーコーディングを用いた宍道湖-中海の魚類・鳥類群集の季節変遷解析
3. 学会等名 第2回環境DNA学会神戸大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高原輝彦、山岸聖、田口淳也、池淵貴志、立石新、尾形茂紀、稲岡悠樹、服部真也、黒瀬裕斗、藤井正人、土居秀幸、山中裕樹、源利文
2. 発表標題 環境DNA分析を利用した宍道湖-中海に生息する魚介類の生態解明への試み
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 尾形茂紀、西脇淳浩、山添寛治、土居秀幸、源利文、須貝杏子、高原輝彦
2. 発表標題 環境DNAを用いたため池における希少昆虫タガメと侵略的外来種の関係調査
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 高原輝彦、田口淳也、池淵貴志、内田浩、石田健次、山岸聖、尾形茂紀、土居秀幸、源利文
2. 発表標題 環境DNAを用いた宍道湖ヤマトシジミ資源量推定への試み
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 尾形茂紀、西脇淳浩、山添寛治、須貝杏子、高原輝彦
2. 発表標題 環境DNAを用いたため池におけるタガメの分布状況推定
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	土居 秀幸 (Doi Hideyuki) (80608505)	兵庫県立大学・シミュレーション学研究科・准教授 (24506)	