

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08010

研究課題名(和文) 農業水路系における水生生物の環境DNAメタバーコーディング手法の開発

研究課題名(英文) Development of environmental DNA metabarcoding method for aquatic organisms in agricultural canal systems

研究代表者

小出水 規行 (Koizumi, Noriyuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究部門・調整監・技術支援センター長等

研究者番号：60301222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：水や土壌等の環境サンプルに含まれているDNAの存否をつうじて、対象生物種の生息の有無や分布を推定する環境DNA分析が注目されている。本課題では、環境DNAの塩基配列を決定し、その塩基配列をDNAデータベースに照合することにより、農業水路系に生息する魚類を網羅的に検出可能な環境DNAメタバーコーディング手法を開発した。さらに現地調査を5府県で実施し、開発した手法の有効性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、これまで負担となっていた生物調査における個体採捕や種同定作業等を必要とせず、現行の調査手法に代替する簡便かつ効率的な手法として、今後、広い普及が期待される。このような非侵襲的方法是生物多様性の保全やSDGs 15.陸の豊かさを守ろうに大きく貢献し、さらに本成果におけるコンピューターサイエンスやデジタル化要素は、Society 5.0を目指した社会へと大きく結びつくこととなる。

研究成果の概要(英文)：Environmental DNA (eDNA) analysis is currently attracting worldwide attention. eDNA is extracted from environmental samples such as water and soil. The presence or absence and distribution of the target species can be estimated by examining whether the eDNA contains the target species DNA. In this study, we developed an eDNA metabarcoding method that can comprehensively detect fish inhabiting agricultural canal systems. In this method, environmental DNA sequences were determined using a next-generation sequencer, and fish inhabiting were estimated by collating sequences with the DNA database. This method was applied to agricultural canals, rivers and ponds in 5 prefectures, and the effectiveness of the method was confirmed.

研究分野：農村生態工学

キーワード：環境DNA メタバーコーディング 水生生物 農業水路系

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 水や土壌等の環境サンプルに含まれている DNA の存否をつうじて、対象生物種の生息の有無や分布を推定する環境 DNA 分析が注目されている(図 1)。本課題代表者は先の科研費課題「水から抽出した DNA を用いて水路に生息する魚類を検出する手法の開発(基盤 C、2014~16 年度、課題番号 26450348)」において、環境 DNA 手法が魚類の生息の有無だけでなく、対象種の DNA 量と採捕個体数との関係から、生息量推定にも利用できる可能性を明らかにした。さらに本手法の応用として、カメ類の糞から環境 DNA を抽出し、カメ類がハス田に及ぼす食害の影響についても取り組んだ。

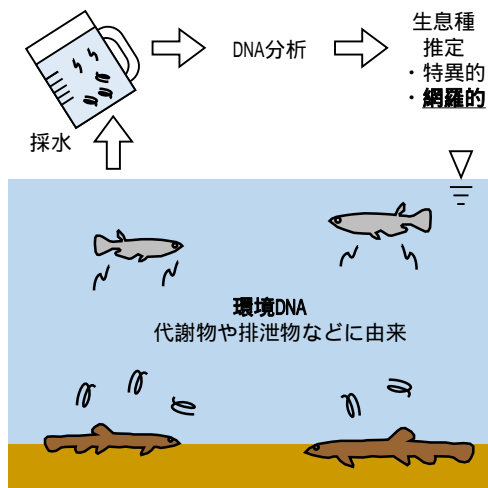


図 1 環境 DNA 分析のイメージ

(2) 実際、環境 DNA は対象種以外の DNA も含んでいる。どのような種なのか、その実態を網羅的に分析すれば、環境 DNA 手法はより汎用的な生物調査法へと拡張できる。このような環境 DNA の網羅的分析は、環境 DNA メタバーコーディングと呼ばれ、数年前に提案されたばかりである。環境 DNA メタバーコーディングでは次世代シーケンサーを利用して、環境 DNA の塩基配列を決定し、それぞれの配列を DNA データベースと照合して種を特定する。

(3) これまで日本国内における環境 DNA メタバーコーディングは、沿岸域や水族館等での海産魚類を対象に実施されている。一方、農村環境における事例は少なく、本課題代表者が農業水路の水を予備的に解析し、原生生物、菌類、植物と共に魚類や甲殻類等の水生生物の DNA を確認したに過ぎない。

### 2. 研究の目的

(1) 農村環境には水路、河川、ため池をはじめとする様々な水域があり、これらは農業水路系または水路網として日本各地に存在する。それぞれの水路系には多くの生物が生息し、特に魚類は水域生態系の上位者として位置づけられている。農業水路系の生物調査では、水路系の代表種として魚類の個体採捕等が主体となるため、本課題では水生生物の環境 DNA メタバーコーディング手法の開発として、魚類を対象に現地調査に基づく手法の有効性を確認した。

### 3. 研究の方法

(1) 環境 DNA メタバーコーディングの分析手順は既報を参考に次のように決定(開発)し、すべての現地調査で統一して用いた。分析手順はステップ ~ となり、ステップ 調査現場で水 1 リットルを採水し、ステップ できるだけ早く実験室にてフィルターを過し、ステップ フィルターの残渣から環境 DNA を抽出した。ステップ 魚類の種特定に有効なユニバーサルプライマー MiFish を用いて、環境 DNA に含まれているすべての魚類の DNA を増幅し、ステップ 次世代シーケンサーで分析するための DNA ライブラリを作成した。ステップ 作成したライブラリの塩基配列を次世代シーケンサーで読み取り、ステップ MiFish 解析パイプラインを用いて、得られた塩基配列を DNA データベースに照合(相同性検索)し、該当する魚種を特定した。

(2) 現地調査は広島県の 1 農業水路と 3 河川で予備調査を行い、岡山県の 1 農業水路で季節変化を調査し、岩手県の 1 ため池、千葉県、京都府の各 1 農業水路で地域性を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 広島県の 1 農業水路と 3 河川において、各水域 3~5 地点で 2017 年 2 月に採水した環境 DNA サンプルを分析した。結果として、コイ類、ドジョウ類、ハゼ類を中心に計 31 魚種の生息が環境 DNA によって推定され(河川 B の 14 種が最小、河川 C の 29 種が最大)、水域間の種数の違いは空間サイズや

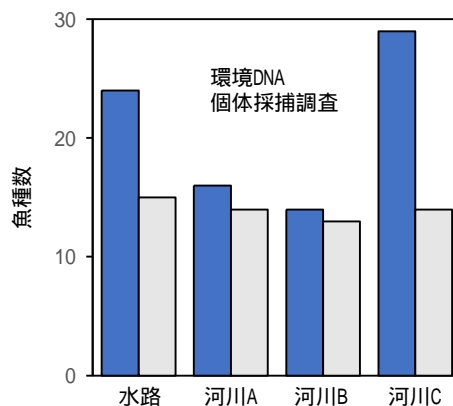


図 2 環境 DNA 分析と個体採捕調査による種数比較

流れ等の環境の違いに関連すると推察した。過去5年以内にタモ網、投網、定置網などにより実施された既存の採捕調査結果と比較した結果、各水域で採捕できたのは13~15種に留まり、全ての魚種が環境DNAによる推定魚種に含まれていた(図2)。採捕できる魚類には限りがあり、環境DNA分析による生息魚類推定の有効性を確認した。

(2) 岡山県の1農業水路、8地点において2016年4月~12月に約1ヶ月間隔で10回採水した環境DNAサンプルを分析した。また、8地点のうち5地点では、8月と11月に採水後に個体採捕を実施した。結果として、全サンプルで41魚種149,0578DNAリード(DNA量の単位)からなるデータが得られた。個体採捕を実施した5地点について環境DNAにより検出された魚種数と比較すると、38魚種中19種が環境DNAと採捕で確認され、15種が環境DNAのみ、4種が採捕のみとなった。本調査でも環境DNAによる魚種検出の高さを確認できた。また、全41魚種のうち、ヨシノボリ類は全DNAリード数の39%、次いでムギツクは12%、オイカワが11%を占めた。これら代表種のリード数について季節変化をみた結果、リード数は5月と8月で高くなり、9月以降は低い傾向がみられた(図3)。この傾向は各魚種の繁殖、成長、移動等に関連すると考えられ、環境DNA分析によって個体の在・不在だけでなく、生態的・生活史的イベントについてもモニターできる可能が推察された。

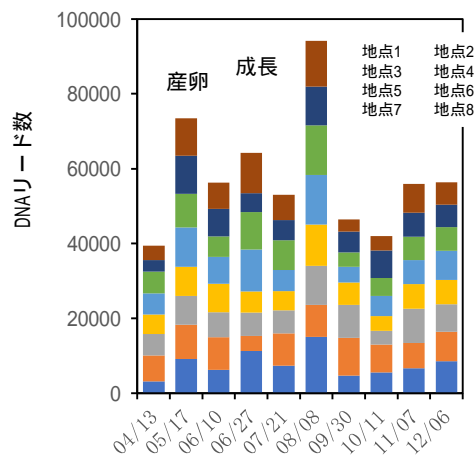


図3 ヨシノボリ類の環境DNAの季節変化

(3) 岩手県の1ため池、千葉県、京都府の各1農業水路の11~24地点において2019年12月~2020年10月にかけて採水した環境DNAサンプルを分析した。分析結果はこれまでと同様に岩手県では17魚種、千葉県では26魚種、京都府では29魚種が検出され、既存の魚類調査結果との比較により、各水路の検出魚類は概ね妥当と推察された。地区間における魚種数の差は、岩手県はため池、千葉県と京都府は水路といった農業水域環境の違いや地域性に基づくものと考えられた。以上の研究成果により、環境DNAメタバーコーディング手法は魚類生息調査の有効なツールの1つとして利用可能なことが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小出水 規行	4. 巻 95
2. 論文標題 すくった水を見るだけで、棲んでいる生きものが分かる	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 農業および園芸	6. 最初と最後の頁 23-26
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 森 晃、小出水 規行、森 淳、守山 拓弥	4. 巻 86
2. 論文標題 農業農村整備のための生態配慮の基礎知識（11） - 農村生態系配慮にむけた新しい調査・分析手法 -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 農業農村工学会誌	6. 最初と最後の頁 59-64
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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 小出水 規行、竹村 武士、渡部 恵司
2. 発表標題 環境DNAを利用した富士川下流のアユ稚魚の遡上モニタリング
3. 学会等名 2020年度農業農村工学会大会講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小出水 規行、渡部 恵司
2. 発表標題 富士川下流におけるアユ稚魚の環境DNAモニタリング
3. 学会等名 第70回農業農村工学会関東支部大会講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小出水 規行、渡部 恵司
2. 発表標題 環境DNAを利用したアユ稚魚の遡上モニタリング：2017年と2018年の比較
3. 学会等名 2019年度農業農村工学会大会講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小出水 規行、渡部 恵司
2. 発表標題 環境DNAを利用したアユ稚魚の遡上モニタリング
3. 学会等名 2018年度農業農村工学会大会講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小出水 規行、渡部 恵司、嶺田 拓也
2. 発表標題 環境DNAを利用した遡上アユの分布推定
3. 学会等名 第8回琵琶湖地域の水田生物研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小出水 規行
2. 発表標題 環境DNA研究の動向について
3. 学会等名 用生態工学会第21回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小出水 規行、成 成南、中田 和義、宮 正樹、佐土 哲也、渡部 恵司、森 淳、竹村 武士、嶺田 拓也、吉永 育生、山岡 賢
2. 発表標題 環境DNAメタバーコーディング法 ' MiFish ' を用いた農業水路に生息する魚類の予備推定
3. 学会等名 2017年度農業農村工学会大会講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小出水 規行、森 淳、渡部 恵司、竹村 武士、嶺田 拓也、山岡 賢
2. 発表標題 環境DNAメタバーコーディングによる生息魚類の網羅的推定の試み
3. 学会等名 NGS現場の会第五回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小出水 規行
2. 発表標題 環境DNA分析による生息魚類の推定
3. 学会等名 第6回日本分析化学会受託分析研究懇談会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小出水 規行
2. 発表標題 月1回の定期採水からみえたもの：環境DNA分析の農業水路への適用
3. 学会等名 平成30年度日本水環境学会関東支部総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小出水 規行
2. 発表標題 環境DNA解析による魚類の生息状況調査について
3. 学会等名 埼玉県水環境分野の行政課題研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Noriyuki Koizumi and Keiji Watabe
2. 発表標題 Upstream migration surveillance of juvenile Ayu using environmental DNA
3. 学会等名 PAWEES-INWEPF 2018 International Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriyuki Koizumi and Keiji Watabe
2. 発表標題 Fish community structure in agricultural canal inferred from environmental DNA metabarcoding
3. 学会等名 12th International Symposium Ecohydraulics（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriyuki Koizumi, S. Ham, Kazuyoshi Nakata, Muneaki Oota and Keiji Watabe
2. 発表標題 Environmental DNA metabarcoding reveals better, the freshwater fish communities inhabiting Japanese rural areas
3. 学会等名 PAWEES-INWEPF 2018 International Conference（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小出水 規行、渡部 恵司（執筆分担）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文永堂出版	5. 総ページ数 236-249（総ページ数321のうち14）
3. 書名 生態系解析（飯田・加藤編、農業水利学）	

〔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	渡部 恵司  (Watabe Keiji)  (50527017)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・本部・主任研究員    (82111)	

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
---------	---------