

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 7 月 25 日現在

機関番号：82503

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03291

研究課題名(和文) 多地点・高頻度環境DNA観測に基づく魚類群集構造の変動様式と形成・維持機構の解明

研究課題名(英文) Unraveling variation patterns and the formation/maintenance mechanisms of fish community structures through multi-site, high-frequency environmental DNA sampling

研究代表者

宮 正樹 (Miya, Masaki)

千葉県立中央博物館・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：30250137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：環境DNAを用いて魚類群集構造の変動様式と形成・維持機構を解明するために、房総半島南部の岩礁海岸に設けた11測点で2年間にわたって計50回の採水を行った。計550サンプルを用い、MiFish法によるメタバーコーディング解析を行うと共に、得られた時系列データに基づき各種の多様性分析を行った。その結果、計856種の魚類が検出され、魚類群集構造は暖流/寒流や外洋/内湾の影響を受けた空間変動を示すとともに、季節的な時間変動を示すことが明らかになった。また、検出頻度が高かった優占種50種間の相互作用強度を最新の手法で分析したところ、種間強度にはさまざまな温度依存性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年発展が著しい環境DNA分析に最先端の時系列解析法を適用することによって、生物間の関係性に新たに焦点を当てることに成功した。すなわち、これまでの環境DNA研究で得られる情報は「何がどこにいるか」だけだったのが、本研究の手法を使えば「何と何がどれくらいの強さで関係しているか」まで推定できるようになったことを意味する。さらに、魚類群集における種間関係強度の温度依存性の存在を実証できたことは、全世界的に大きな問題となっている地球温暖化が、魚類群集のような複雑系に何らかの影響を与えることをも示唆している。環境DNAを用いた生物多様性モニタリングを継続していく意義を高めたと言ってもよい。

研究成果の概要(英文)：To explore spatio-temporal patterns and the mechanisms forming and maintaining fish communities, we collected 550 environmental DNA samples from 11 sites along the southern coast of the Boso Peninsula, central Japan, over a two-year period. MiFish metabarcoding was performed on all 550 samples, followed by a time-series analysis using a newly-developed method. In total, we identified 856 fish species across 33 orders, 167 families, and 466 genera. The observed occurrence patterns of these species exhibited spatio-temporal variations, likely influenced by ocean currents and the contrasting environments between the open ocean and inner bay areas. Furthermore, our analysis of the interspecific interaction strengths among the 50 most frequently detected species revealed diverse temperature-dependent patterns. These findings provide substantial implications for future research on fish community stability in the face of climate change.

研究分野：分子生態学・分子系統進化学

キーワード：環境DNA メタバーコーディング MiFish法 時系列解析 魚類群集 種間関係 モニタリング 生物多様性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

科学技術が発展した今日においても、「どこにどんな生きものがいるのか？」という問いに答えるのは容易でない。水生生物である魚類の場合には、潜水観察をしたり漁具を使って採捕したりなど、多大な労力と費用がかかるうえに長期間の調査が必要となる。さらに、日本産魚類だけでも 4,300 種以上いるため、種の同定を行うには高度に専門的な知識と経験が必要となる。

魚類群集モニタリングを「いつでも・どこでも・誰にでも」できるようにしたのが、代表者が開発した魚類環境 DNA メタバーコーディング法（以下、MiFish 法）と呼ばれる技術である。環境 DNA 研究が始まった 2012 年頃は、外来種や希少種など単一種の DNA が定量 PCR 法により検出されたにすぎなかったが、環境 DNA 中には多様な魚類の DNA が含まれており、それらをまとめて同時並行的に検出する手法の開発が望まれていた。

このような背景のもとに、代表者は種レベルの解像度をもつ環境 DNA 断片（ミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子の平均長 172bp）を全魚類から網羅的に増幅する PCR プライマー-MiFish を設計し、次世代シーケンサーを用いた実験系を開発した (Miya et al. 2015)。この技術により、一昼夜で数千万本もの環境 DNA 塩基配列が決定され、大量データを処理する解析パイプラインによって種同定が自動化された。

MiFish 法の基盤技術を確立する一方で、代表者はこの手法のもつ種多様性の「検出力」を飼育種が判明している水族館で検証した。その結果、沖縄美ら海水族館の 4 種類の水槽水計 28 リットルからリファレンス配列をもつ飼育種の 93.3% (168 種) を検出できた (Miya et al. 2015)。さらに、海（舞鶴湾）や河川（琵琶湖流入河川）等のフィールドで同様の調査を行ったところ、前者では過去の潜水調査で目視された 80 種を上回る 128 種もの魚類を半日の調査で検出した (Yamamoto et al. 2017)、後者ではわずか 1 人の調査者による 10 日間の調査で文献記録にある 9 割近い魚種を検出した (Nakagawa et al. 2018)。

一方、この手法のもつ空間的な検出範囲についても検討が進められた。京都府の舞鶴湾で潜水目視観察された魚種の個体数と、MiFish 法で得られた魚種のリード数との間には強い相関が認められた (Ushio et al. 2018)。また、一方向に水が流れる河川でも、上流と下流で棲み分ける近縁種の分布を明瞭に識別できた (Nakagawa et al. 2018)。最近、舞鶴湾でいけすを用いて行われた実験によると、海域で検出された環境 DNA は対象生物が 1 時間以内に採水地点から半径 30m 以内にいたことを反映するとされた (Murakami et al. 2019)。

こうした一連の基盤技術開発と実証的研究により、環境 DNA を MiFish 法で分析すれば「いつ・どこに・どんな魚種がいるのか」判ることが示され、これまで実現が困難であった多地点・高頻度の魚類群集調査が可能になった。

本研究がフィールドとする房総半島（全域が千葉県）は、本州中央部の太平洋側に位置する半島で、その南東部沖合を暖流の黒潮が北上し、北東部沿岸を親潮由来の冷水が南下する。そのため、両者の動向が半島沿岸の環境に与える影響は大きい。たとえば、2017 年夏に始まった東海沖の黒潮大蛇行は黒潮流路の半島への接岸をもたらし、この傾向は今後数年間続くと見られている。半島東岸の外房一帯はこのような外洋環境の影響を強く受ける一方で、半島西岸の内房一帯では北上するにつれて内湾環境（東京湾）の影響が強くなる。内房南部に位置する館山湾には、黒潮分枝流が直接当たって温暖なため、その一部でサンゴ群落や熱帯性魚類が恒常的に見られる。このような海洋環境の顕著な時空間変動は魚類群集構造に大きな影響を与えることが経験的に知られており、黒潮によって南方から運ばれる熱帯性魚類の移入と冬期の低水温による死滅は無効分散と呼ばれている（ただし温暖な冬の場合は越年することもある）。こうした時空間的な海洋環境の変動が顕著な房総半島南部一帯は、魚類群集と環境との応答関係を研究するうえで格好の野外実験場となる。

本研究課題では、海洋環境の時空間変動が著しい房総半島南部の岩礁海岸に 11 個の測点を設けて環境 DNA による長期モニタリングを行い、①魚類群集構造がどのような空間スケール（測点・海域）と時間スケール（時・日・季節・年）で変動するのか？；②魚類群集構造がどのようなメカニズムで形成・維持されるのか？ という二つの学術的問いを掲げた。

## 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、バケツ一杯の水を汲めば事足りる環境 DNA 調査の利点を生かして多地点・高頻度の長期モニタリングを行い、MiFish 法によって魚類群集構造の時空間変動様式を明らかにすることにある（上記の学術的問い①に対応）。本研究の第二の目的は、MiFish 法で得られたデータを分担者（潮）が開発した手法で定量化することにより、定量化+時空間データ解析に基づき群集形成・維持機構を解き明かすことにある（上記の②に対応）。

## 3. 研究の方法

房総半島南部の太平洋側に 6 地点、東京湾側に 5 地点の 11 調査地点を設定した（図 1）。これら 11 地点において、2017 年 8 月から 2019 年 8 月の 2 年間にわたって、計 50 回の隔週調査を

行った。各調査地点でバケツ採水ならびにシリンジとステリベクスフィルターを用いた現場ろ過を行った。最大1リットルの海水をろ過したフィルターを実験室に持ち帰り、フィルター上から環境DNAを抽出した。抽出DNAをテンプレートにMiFishプライマーを用いたメタバーコーディングを行った (Miya et al. 2015)。また、最優占種であるクロダイについては、全サンプルについてqPCRを行い内部標準として用い、超並列シークエンスで得られたリード数の定量化を行った<sup>6</sup>。超並列シークエンスで得られた大量のリードについては、PMiFish ver. 2.4を用いて分類群の割り当てを行った。また、情報理論に基づいた Unified Information-theoretic Causality (UIC)と力学系理論に基づく Multiview distance regularized S-map (MDR S-map) という手法を用いて魚種間の相互作用強度を定量化した。

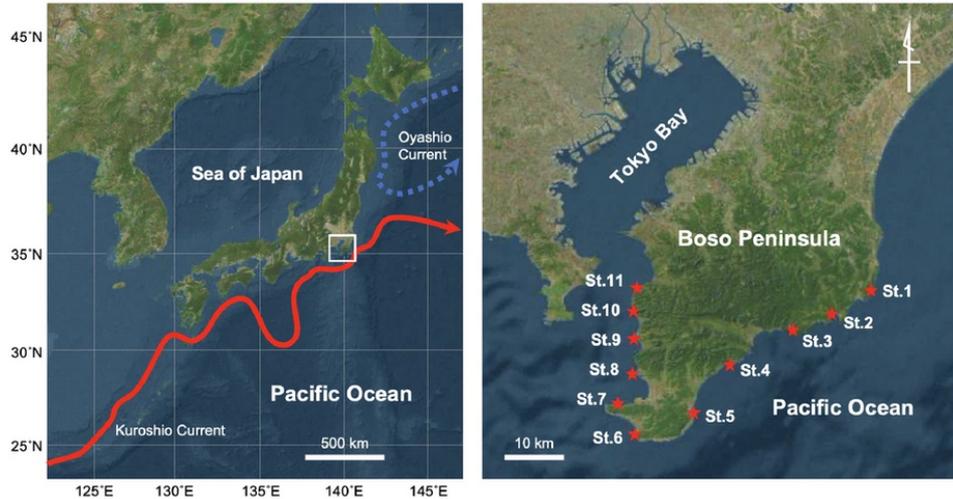


図 1. 房総半島南部に設置した 11 調査地点 (Ushio et al. 2023).

#### 4. 研究成果

全 550 のサンプルから 33 目, 158 科, 493 属に含まれる計 856 種の魚類を検出された。この種数は、房総半島から文献上で確認された 948 種に近い。

これらの魚種の環境 DNA の濃度を、リアルタイム PCR で測定したクロダイの環境 DNA 量を内部基準にして定量化し、検出頻度が高い 50 種 (以下「優占種」とする) の環境 DNA 濃度の時系列データに基づき、魚種間の相互作用強度を定量化した。これらのデータに基づき、優占種間の相互作用ネットワークを再構成した (図 2)。最も強い種間強度はアナハゼ科のアヤアナハゼとベラ科のアカササノハベラの間認められた。これら 2 種は生息場所が重複するため種間作用が実際に起こっていることが想定される。また、ウツボ科のウツボとアカササノハベラの間にも強い種間強度が観察された。これら 2 種は肉食性魚類で、両科は共同で狩りをする行動がしばしば観察されている (Bshary et al. 2006)。

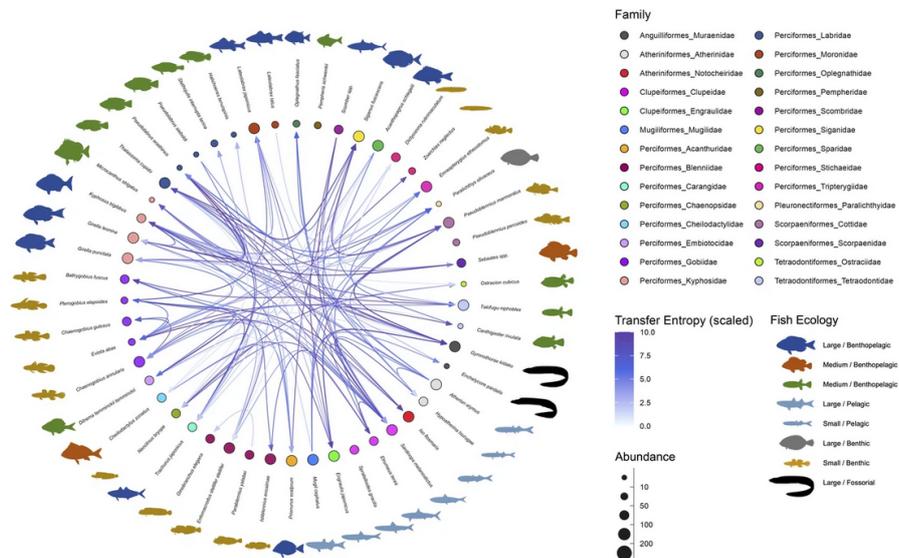


図 2. 優占種間の相互作用強度ネットワーク (Ushio et al. 2023).

種の相互作用強度と海水温との関係を見るために、相互作用を受ける側 (in-strength) と与える側 (out-strength) に分けて解析した。その結果、多くの種において海水温との有意な関係が認められたが、その変異のパターンは様々であった。

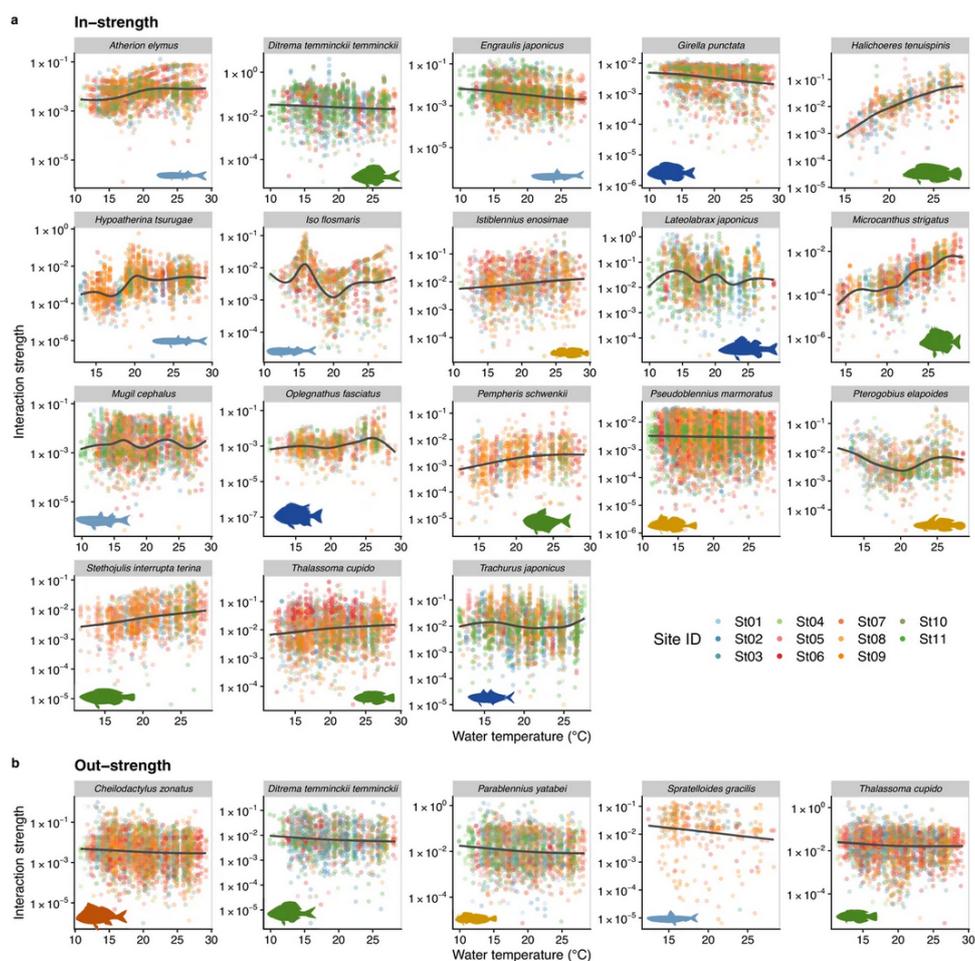


図 3. 優占種における種間の相互作用強度と海水温の関係 (Ushio et al. 2023).

本研究は、環境 DNA に基づき海水温が魚類群集における相互作用強度に影響を与えることを示した初の研究例となる。この結果は、地球温暖化が全世界の深刻な問題となっている現在、魚類群集という複雑系に水温上昇が何らかの影響を与えることを示唆している点で貴重なものとなっている (Ushio et al. 2023)。今後、さまざまな生物群集で同様の研究が行われることで、生物多様性モニタリングの意義が、より一層高まることが期待される。

#### 引用文献

- Bshary R, Hohner A, Ait-el-Djoudi K, Fricke H (2006) Interspecific Communicative and Coordinated Hunting between Groupers and Giant Moray Eels in the Red Sea. *PLoS Biology* 4: e431. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040431>
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W (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. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- Murakami H, Yoon S, Kasai A, Minamoto T, Yamamoto S, Sakata MK, Horiuchi T, Sawada H, Kondoh M, Yamashita Y, Masuda R (2019) Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fisheries Science* 85: 327–337. <https://doi.org/10.1007/s12562-018-1282-6>
- Nakagawa H, Yamamoto S, Sato Y, Sado T, Minamoto T, Miya M (2018) Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshwater Biology* 63: 569–580. <https://doi.org/10.1111/fwb.13094>

- Ushio M, Sado T, Fukuchi T, Sasano S, Masuda R, Osada Y, Miya M (2023) Temperature sensitivity of the interspecific interaction strength of coastal marine fish communities. *eLife* 12: RP85795. <https://doi.org/10.7554/elife.85795>
- Ushio M, Hiroaki M, Masuda R, Sado T, Miya M, Sakurai S, Yamanaka H, Minamoto T, Kondoh M (2018) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics* 2: e23297. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.23297>
- Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, Sado T, Araki H, Kondoh M, Minamoto T, Miya M (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports* 7: 40368. <https://doi.org/10.1038/srep40368>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Masaki Miya	4. 巻 14
2. 論文標題 Environmental DNA Metabarcoding: A Novel Method for Biodiversity Monitoring of Marine Fish Communities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annual Review of Marine Science	6. 最初と最後の頁 161-185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-marine-041421-082251	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 Masaru Kawato, Takao Yoshida, Masaki Miya, Shinji Tsuchida, Yuriko Nagano, Michiyasu Nomura, Akinori Yabuki, Yoshihiro Fujiwara, Katsunori Fujikura	4. 巻 8
2. 論文標題 Optimization of environmental DNA extraction and amplification methods for metabarcoding of deep-sea fish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 101238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mex.2021.101238	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 Shinichiro Oka, Hideyuki Doi, Kei Miyamoto, Nozomi Hanahara, Tetsuya Sado, Masaki Miya	4. 巻 3
2. 論文標題 Environmental DNA metabarcoding for biodiversity monitoring of a highly diverse tropical fish community in a coral reef lagoon: Estimation of species richness and detection of habitat segregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 55-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.132	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 Toshifumi Minamoto, Masaki Miya, Tetsuya Sado, Satoquo Seino, Hideyuki Doi, Michio Kondoh, Keigo Nakamura, Teruhiko Takahara, Satoshi Yamamoto, Hiroki Yamanaka, Hitoshi Araki, Wataru Iwasaki, Akihide Kasai, Reiji Masuda, Kimiko Uchii	4. 巻 3
2. 論文標題 An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 3-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.121	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 Hyojin Ahn, Manabu Kume, Yuki Terashima, Feng Ye, Satoshi Kaneyama, Masaki Miya, Yoh Yamashita, Akihide Kasai	4. 巻 15
2. 論文標題 Evaluation of fish biodiversity in estuaries using environmental DNA metabarcoding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0231127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231127	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 Masaki Miya, Ryo O. Gotoh, Tetsuya Sado	4. 巻 86
2. 論文標題 MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 939-970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12562-020-01461-x	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 Masayuki K. Sakata, Satoshi Yamamoto, Ryo O. Gotoh, Masaki Miya, Hiroki Yamanaka, Toshifumi Minamoto	4. 巻 2
2. 論文標題 Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 505-518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.75	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 Toshifumi Minamoto, Masaki Miya, Tetsuya Sado, Satoquo Seino, Hideyuki Doi, Michio Kondoh, Keigo Nakamura, Teruhiko Takahara, Satoshi Yamamoto, Hiroki Yamanaka, Hitoshi Araki, Wataru Iwasaki, Akihide Kasai, Reiji Masuda, Kimiko Uchii	4. 巻 3
2. 論文標題 An illustrated manual for environmental DNA research: Water sampling guidelines and experimental protocols	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 8-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.121	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 Shin ichiro Oka, Hideyuki Doi, Kei Miyamoto, Nozomi Hanahara, Tetsuya Sado, Masaki Miya	4. 巻 3
2. 論文標題 Environmental DNA metabarcoding for biodiversity monitoring of a highly diverse tropical fish community in a coral reef lagoon: Estimation of species richness and detection of habitat segregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental DNA	6. 最初と最後の頁 55-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/edn3.132	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 Kawato Masaru, Yoshida Takao, Miya Masaki, Tsuchida Shinji, Nagano Yuriko, Nomura Michiyasu, Yabuki Akinori, Fujiwara Yoshihiro, Fujikura Katsunori	4. 巻 8
2. 論文標題 Optimization of environmental DNA extraction and amplification methods for metabarcoding of deep-sea fish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 101238 ~ 101238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mex.2021.101238	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 Morita K , Sahashi G , Miya M , Kamada S , Kanbe H , Araki H	4. 巻 840
2. 論文標題 Ongoing localized extinctions of stream-dwelling white-spotted charr populations in small dammed-off habitats of Hokkaido Island, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hydrobiologia	6. 最初と最後の頁 207-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10750-019-3891-1	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 Ushio Masayuki, Sado Testuya, Fukuchi Takehiko, Sasano Sachia, Masuda Reiji, Osada Yutaka, Miya Masaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Temperature sensitivity of the interspecific interaction strength of coastal marine fish communities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP85795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.85795	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5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Miya, M
2. 発表標題 Environmental DNA metabarcoding enables a data-driven approach for fish community research in large spatiotemporal scales
3. 学会等名 Gordon Research Conference in Marine Molecular Ecology: Novel Insights into Marine Patterns and Processes (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miya, M
2. 発表標題 Environmental DNA metabarcoding enables a data-driven approach for fish community research in large spatiotemporal scales
3. 学会等名 FSBI symposium 2019: Advances in eDNA-based Approaches to Fish Ecology and Management (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miya, M
2. 発表標題 Environmental DNA metabarcoding: a new biodiversity monitoring method that enables a data-driven approach for fish community research
3. 学会等名 Marine Biotechnology Conference 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miya, M
2. 発表標題 Environmental DNA metabarcoding: a new biodiversity monitoring method that enables a data-driven approach for fish community research
3. 学会等名 The International Symposium of Hydrological Sciences and High-efficiency Water Resources Utilization under the Changing Environment (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miya, M
2. 発表標題 Environmental DNA metabarcoding: A novel method for biodiversity monitoring of marine fish communities
3. 学会等名 UK eDNA Webinar Week (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮 正樹	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	

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap 宮 正樹 <a href="https://researchmap.jp/mum-usagi">https://researchmap.jp/mum-usagi</a>
---

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	潮 雅之  (Ushio Masayuki)  (40722814)	京都大学・白眉センター・特定准教授   (14301)	

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