

### 要約

生物が水中などの体外に放出した DNA/RNA をフィルターで集めその遺伝子情報を読みとることで、その環境にいる生物群集の種組成を推定する手法は環境 DNA と呼ばれ、この 10 年で野外での生物群集の調査手法として盛んに研究されるようになった。その背景には、21 世紀に入る前後で急速に進展した分子生物学におけるゲノム解析の技術や機器開発があり、さらに膨大な遺伝子情報を処理する情報科学の技術の発展もその基盤を支えている。このような野外でのゲノム解析における技術の進展は従来の野外環境で採集した生物体の主に形態による生物種の分類手法に大きな影響を与え始めている。

本報告ではまず海洋環境を中心に水域における環境 DNA (eDNA) の測定法について紹介し、そこには保全生態学での必要性に答えて特定の種をターゲットに検出する手法と、ある環境に生育する多くの分類群の生物群集を網羅的に見て行くメタバーコーディング手法があることを示す。次に海洋生物、特に魚類がどのような核酸物質を体外に放出し、それがどのように水域環境で分解され輸送されて行くかについての知見をまとめる。これは“eDNA の生態学”とも言われ、得られた eDNA のデータと対象とする生物群集の時空間的な関係を知るうえで重要な情報である。eDNA の分解に関しては主に水槽実験により環境中に放出された様々なゲノム物質を対象に研究が進んでいるが、eDNA としての評価において特定のゲノムにおける優位性はまだはっきりしない。また、海洋環境も含めて eDNA は数日から 1 週間程度で検出出来なくなるという研究結果が多い。さらに、河川や沿岸域のように流動性の高い水域においても、少なくとも現場での研究では eDNA の輸送は限定的であると言う報告が多くなされている。一方で、eDNA が例えば嫌気的な堆積物等の異なる環境場に移動した場合、その分解は強く抑制されることは良く知られており、eDNA が古環境の指標として使われていることにも留意する必要がある

海洋における eDNA の実利用として提案されている対象としては大きくは 2 つの方向がある。その一つは eDNA を浮き魚や底魚などの水産資源の管理に使うものであり、その為にはその海域に存在しない魚種がポジティブに検出される擬陽性の問題から、この手法での対象魚種の生物量の推定までまだ多くの課題が指摘されている。もう一つはある海域での食物連鎖を構成する生態系を統合的に理解する手法としてこの eDNA を使うことである。ここでは複数のプライマーを使ったメタバーコード手法により、幅広い分類群の生物種を網羅的に把握することが出来る eDNA 手法の特徴が生かされており、研究的な色彩も強いのでその応用範囲は拡大すると思われる。この内水産資源の管理に関しては、従来の手法で得られていた水産資源の年齢構成、重さ、生活史段階、生産性（繁殖力）などは eDNA では教えてくれない。つまり、現状の eDNA の分析だけでは水産資源管理に必須の情報のすべては得ることが出来ない事は明らかである。その一方で、“eDNA の生態学”が解明され、さらに水産資源のアセスメントに係る統計的なモデリングの構築が進展することで、eDNA による水産資源生物の定量的な解析も将来的には可能になると言う期待もある。従って、将来的には eDNA の持つ利点を生かして従来の方法と組み合わせて水産資源を管理していく方向に進むのではないかと思われる。

種多様性などに関する基礎的な研究が従来の形態分類を中心とした手法からゲノムを中心とした手法へのある意味での転換期にある現在において、基礎研究の社会実装である保全生態学や水産資源の管理などがどのようにこの変化に対応していくかであろう。初めは従来法を補充するような形から次第に全体が置き換わって行く調査分野も考えられる。あるいは、調査目的によっては eDNA の持つ限界から従来法を維持する場合もあると思われる。いずれにしても基礎的な研究を持続させ、それを背景としてその手法の標準化や行政への取り込みが必要である。

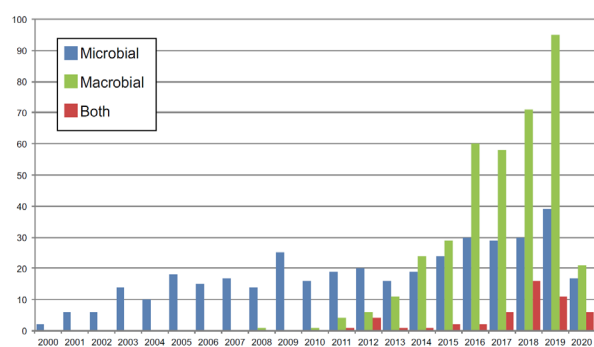
### 1. 始めに

生物はその代謝過程で多くの有機物を体外に排出するが、これらの有機物の中で DNA/RNA は排出した元の生物種を知ることが出来る手がかりを持っている。それは生物体を構成する有機化合物の中で DNA/RNA の配列は種やさらにその下の分類レベルまで多様化しており、元の生物体から離れても DNA/RNA の配列情報を既存のゲノム・データベースと照合することで、その DNA/RNA がどの生物に由来したかを知ることが出来るからである。ここではこのように環境 DNA(以降 eDNA と記述する)を、魚類などの多細胞生物から排出された生体外の DNA/RNA と定義する(坂田他, 2021)。eDNA と言った時には環境中の RNA も含み、生体内に含まれるゲノム情報の総称となっている。一方、eDNA を対象生物や DNA/RNA の存在状態(細胞や生物の内外)によらず環境の中から得られた核酸の総体を表すと言う定義もある(Pawlowski, *et al.*, 2020)。この場合はフィルター上で濃縮された細菌群集なども eDNA に含まれる。しかし、フィルター上の細菌群集のような生体内の DNA と生体外に出た DNA とはその動態が異なるため、本報告書で検討する eDNA は前者の定義に従う。なお、最近では eDNA と言う表現はその定義があいまいなので、extra-organism DNA(生物体外 DNA)と言う方がふさわしいと言う主張もある(Lacoursière-Roussel & Deiner, 2021)。

海洋などの水圏環境でのゲノム情報による生物種の同定は、環境中での特徴的な機能を持つ微生物の研究から始まっている。例えば、海洋での窒素循環でアンモニアの酸化を担っている硝化細菌については既に 1990 年代に報告がある(Voytek & Ward, 1995)。彼らは培養された硝化細菌の 16S rRNA 遺伝子情報を基に、フィルター上に集めた海洋中の微生物サンプルから核酸を抽出し、PCR で増幅することで海洋現場での硝化細菌の検出に成功している。自然界に存在する細菌群集はその培養が困難な場合が多いが、ある代謝活性を示す水圏環境での対象細菌をそのゲノムを特定することでその存在を示すことが出来る。さらに細菌群集の場合生物そのものがフィルター上に回収されていると判断出来るため、ゲノム量をその細菌の生物量の指標と見なせる大きな利点もある。

一方、最初に多細胞生物が体外に排出した eDNA を水中から集め、そのゲノム分析から特定の種がその水域に生育していることが示されたのは 2008 年である(Ficetola, *et al.*, 2008)。彼らはウシガエルのオタマジヤクシがあるため池に生育しているか、またどの程度の密度なのかを eDNA から推測して見せたのである。このように環境中に放出された eDNA からマクロな生物の存在を推定出来ることを、我々が知ってからまだ 15 年足らずである。しかし、この手法は河川、湖沼、海洋などの水圏だけでなく、土壌環境などの陸圏においても、希少生物の保全生態学などを含む様々な生態学分野で急速に研究手法として普及した。図 1 は 2019 年夏までのマクロ生物の生物体外の eDNA を扱った論文と、微生物群集を対象にした広義の意味での eDNA の論文とに分けてその論文数の推移を示したものである(Pawlowski, *et al.*, 2020)。

図 1 : この 20 年間における生物多様性において eDNA を扱った公表論文を、対象生物が微生物、マクロ生物、あるいはその両方に分けた時の論文数の推移(青:微生物、黄緑:マクロ生物、赤:両方)。なお、検索で抽出した内 192 論文では eDNA の目的が多様性の範疇以外で除外した。



既に述べたように、2010年頃までは殆どの論文が微生物群集を対象にしていたのに対し、最近ではマクロ生物を対象にした eDNA の論文が急速に増えており、対象生物がマクロ生物に移行していることが分かる。

この手法は水圏の希少生物の探査において従来法よりもはるかに検出感度の良い手法として、また、生物そのものを捕獲する必要が無いため、対象とする生物に害を与えない手法として高く評価された。また、eDNA の急速な発展には 21 世紀初頭における分子生物学での PCR や次世代シーケンサーなどの技術の発展や、バイオインフォマティクスなどの情報科学を含めた関連分野の急速な進展がその背景にある (Shokralla, *et al.*, 2012)。この eDNA を使った多細胞生物の多様性などの研究は河川や湖沼などの淡水環境で始まったが、海洋環境ではデンマーク沿岸での海水サンプルからメタバーコード手法を使って魚類の種組成を見たのが最初の論文である (Thomsen, *et al.*, 2012)。なお、同じ年に海産哺乳類のモニタリングに eDNA を使った論文も出ている (Foote, *et al.*, 2012)。

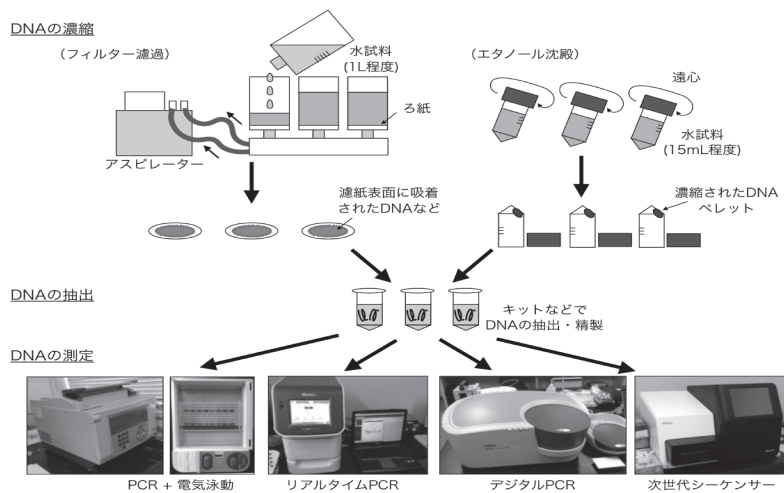
この報告書では始めに従来の生物多様性の調査方法とは大きく異なる eDNA を使った生物種の調査手法についてその概略を説明する。次に水圏でのマクロな生物が体外に放出する eDNA がどのような性状を持ち、その後の動態はどうなっているかについて海洋での知見も含めてまとめる。これは eDNA の生態学とも言われ、環境中から採取され解析された eDNA が何を意味するかを知る上で重要な知見である。この報告書で示されるように、この技術はある意味では発展途上であるが、既に行政的なモニタリングの手段としても検討され始めているので現時点における問題点などについても言及する。

## 2. 環境 DNA を用いた海産生物の調査手法

ここでは海洋などの水圏における eDNA の分析法に関してその概略を紹介する。従来の水圏での生物調査では、ネット採集など様々な手法で対象とする生物を捕獲し主に形態的に対象生物を分類していた。最近では得られた標本の形態分類の他にゲノム解析を行うことも多いが、形態的な特徴が分かっている生物体から得た試料である点が eDNA とは異なっている。一方、eDNA の場合は既に述べたように生物が水中などの体外に放出した DNA を水中などから抽出し解析することで、その環境場における対象生物の存在や密度を推定することになる。そのため、従来の生物の形態分類における様々な文献による表現形質の比較やタイプ標本との参照に代わって、対象生物グループのゲノムのデータベースがその分類の拠り所になる。また、水圏環境には多様な生物のゲノムが存在しており、その中から対象とする生物群の DNA を効率よく選り分ける必要がある。

図 2 に現在行われている eDNA 分析の手順を示した (坂田他, 2021)。まず水中に存在する eDNA を捕集・濃縮するのがステップ 1 であり、水中の DNA を適当な孔径のフィルターでろ過し分離・濃縮する手法が主に用いられている。分子生物学では DNA の分離・濃縮にアルコール沈殿などの方法が取られていたが、環境中の DNA は主に懸濁粒子として存在すること、また濃度が低いことや操作が簡便な事もあって、フィルター上に捕集する手法が標準となっている。次章で述べるように、どのようなサイズのフィルターを使えば効率的に対象とする生物群集の eDNA を集めることが出来るかは重要な課題であり、対象生物における eDNA のサイズ分布の知見が必要である。次のステップはフィルター上の DNA を抽出しさらに精製するプロセスであるが、これらは分子生物学分野での手法の発展に支えられている所が大きい。市販されている DNA の保存、抽出や精製のキットが環境 DNA の目的のために色々テストされて利用されているのが現状である。

図 2 : 水圏での環境 DNA による生物種の検出手法 (坂田他, 2021)



第三のステップは DNA の検出であるが、ここでも最近進展が目覚ましい分子生物学の手法、解析機器が用いられる。多くの場合 eDNA は濃度が低いため PCR 法によって増幅してから検出することになるが、その目的によって eDNA の検出手法は大きく二つに分けられる。その一つは希少種などある特定の生物群集を対象とする場合であり、この場合、なるべくこの生物の DNA だけを増幅することが出来る人工的な DNA 短鎖 (プライマー) を設計し、リアルタイム PCR、デジタル PCR といった DNA の増幅装置で特定のゲノムを増幅して検出する。なお、リアルタイム PCR やデジタル PCR では対象とする環境 DNA を定量的に増幅する事が出来るので、少なくとも時空間的なサンプリングでの各サンプル中の DNA 量を直接比較することが可能になる。もう一つの手法はある分類群に共通するゲノム部位をターゲットにしたユニバーサルプライマーを作成し、対象となる分類群全体の DNA を増幅しこれを網羅的に解析して分類する手法である。この手法をメタバーコーディング手法と呼び、大規模で網羅的な DNA 配列の解析を高速度で行うことが出来る超並列シーケンサーを使って解析が行われる。

多細胞生物の持つゲノム情報は細胞内の様々な部位に格納されている。核膜内の核 DNA をはじめとして、リボゾーム RNA、ミトコンドリア DNA、メッセンジャー RNA などである。また、ミトコンドリア内にもリボゾーム RNA などが存在する。これらのすべてのゲノムが eDNA の対象となり得るが、これまで種特異的な検出に用いられるプライマーとして用いられるゲノム配列には、ミトコンドリア DNA 中の cytochrome c oxidase subunit I (COI 領域) や、cytochrome b 領域が使われることが多かった (山中, 2021)。これはマクロな動物においてミトコンドリア DNA に関するデータベースの蓄積がこれまでに卓越していることによる。一方、ある分類群を網羅するようなメタバーコーディング手法においてはユニバーサルプライマーとしてミトコンドリアゲノムの 12SrRNA や 16SrRNA などのリボゾームでの配列も良く使われている。例えば、わが国で魚類の DNA メタバーコーディング手法として開発された MiFish は、880 種の魚類の 12SrRNA を使い、両端を保存領域に挟まれた平均長 172bp の超可変領域を利用してユニバーサルプライマーの設計が行われている (Miya, *et al.*, 2015, 2020)。

これまで発表されている海産や淡水の魚類を対象にした 12 種類のメタバーコーディング手法で、開発されたプライマーによる種の判別でのパフォーマンスを、計算機上で比較した研究を紹介する (Collins, *et al.*, 2019)。彼らはまず計算機上の比較で成績の良かった COI 領域を使ったプライマー 3 つと MiFish (12SrRNA) との 4 種類を選び、さらにこれらを用いて英国沿岸での実際の魚類サンプルについて検討した。判別された魚種の数やその再現性などにおいては、MiFish が他の COI 領域のプライマーと比較すると明らかに優れている結果となった。これは COI 領域のプライマーでは魚類に対する特異性が低いため、細菌などを含む魚類以外のゲノムの増幅が進行し結果の判別が難しくなる為であると考えられた。なお、この論文ではゲノムのデータベースの

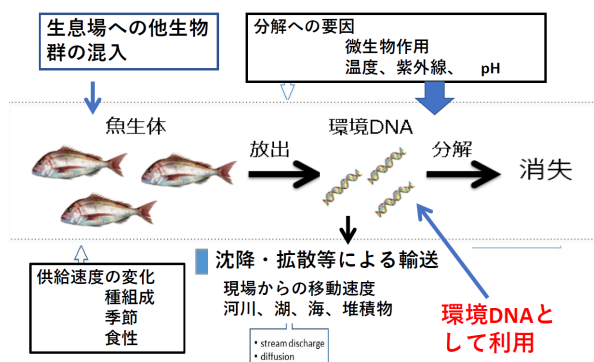
充実度においては依然として COI 領域が優れているとし、一方で 12sRNA のデータベースは未だ充分でないと述べ、今後、保存資料等からのデータ取得などによってデータベースの拡充を図る必要性を指摘している。

この 12SrRNA を使った魚類の参照データベースの充実に関しては、世界の魚類の種類が 32000 種以上と考えられている中で、わが国で作られた MiFishDB (12S r RNA) では、2020 年 6 月の段階で 8375 種 (479 科 1827 属) となっている。また、日本産魚類の 4554 種では、種レベルでは 71.5% の網羅率となっている (宮, 2021)。しかし、MiFishDB への登録は 2014 年 10 月の段階で約 4230 種であったので約 6 年で登録件数はほぼ倍になっており、今後のさらなる充実が期待される。

### 3. 海洋での eDNA の生態学

既に示したように魚類などの存在を eDNA で推定する時の条件としては、これらのマクロ生物が体外に放出した DNA がその調査対象になる。従って、(1) 対象とする生物群集が体外に放出する DNA の性状とその放出速度、(2) 放出された後の DNA の生物・非生物的な分解プロセス、さらに、(3) 海洋などの水圏での eDNA の拡散・輸送の理解が、eDNA とそれを排出した生物との関係を理解するには必要である (図 3)。これらは、いわば“eDNA の生態学”とでも言うべきものであるが、対象となる生物種が多様であること、また同じ水圏環境でも湖沼、河川、海洋など対象によって環境の異なりが大きいことから理解が進んでいないことも多い。ここでは、eDNA の生態学に関する Barnes & Turner (2016) の総説を初めとして、これまでの知見を中心に環境中の DNA の動態について紹介する。

図 3：魚から放出された環境 DNA の行方を示す模式図



#### 3-1 水圏環境での多細胞生物からの eDNA の放出プロセスについて

水圏環境でどのような生物がどのような形状の eDNA を体外に放出するかについての知見では魚類の研究例が他の生物群に比べて多い。これは水産資源との関係で eDNA に期待するところが大きいからでもあろう。魚の体表からの脱落組織である表皮、粘液、うろこや、消化管からは糞粒子に含まれる腸管細胞、また卵子・精子などが放出されるが、これらは多くのマクロ生物で共通する eDNA の起源有機物と考えられる (Barnes & Turner, 2016)。この中で主な起源の一つとして糞粒子が注目されるのは魚類などの消化管はその表面が外環境と繋がった最大の器官であり、その上皮細胞は脊椎動物のすべての組織の中で最も再生産が速いとされているからである (Helander & Fändriks, 2014)。一方、魚類や両生類などのように体表から粘液を出す生物群で、eDNA が検出しやすいという報告もある (Jerde *et al.*, 2011)。さらに、環境中で摂餌の対象となった魚からの組織に含まれる DNA なども eDNA を構成すると考えられる。

これらの eDNA の殆どは生物体から放出された時点では細胞内に含まれると考えられ、その意味



では細胞によって分解から保護されている状態である (Jo, *et al.*, 2019)。なお、不要になった表皮細胞などでは体外に放出される前にアポトーシス (プログラムされた細胞死) が生じていることも知られており、eDNAの初期の分解過程を複雑にしている (Harrison, *et al.*, 2019)。

海洋など水圏での懸濁有機物や植物プランクトンなどの特性を知るために、よく使われるフィルターによるサイズ分画に関してはeDNAで幾つかの報告がある。これは水圏でのeDNAの捕集方法として、簡便に試料を濃縮出来るフィルターによるろ過が主流となった結果でもあり、淡水のコイで初めてeDNAのサイズ分画が行われた (Turner *et al.*, 2014)。それによるとコイからのeDNAは180  $\mu\text{m}$ 以上から0.2  $\mu\text{m}$ 以下のサイズまで幅広く存在したが、その現存量のピークは1-10  $\mu\text{m}$ であった。この1-10  $\mu\text{m}$ サイズが多い実験結果は、淡水のサケ科のブルックトラウトでも示されている (Wilcox, *et al.*, 2015)。

表1に水産で重要な海産の浮き魚資源である、カリフォルニアマイワシ (Pacific Sardine) とマサバ (Pacific Chub Mackerel) の2種から放出されたeDNAのサイズ分布を示した (Sassoubre, *et al.*, 2016)。カリフォルニアマイワシの場合では、1-10  $\mu\text{m}$ と10  $\mu\text{m}$ 以上が最も量が多く、また、マサバでは10  $\mu\text{m}$ 以上が最も多かった。この結果は、既に指摘された多くのeDNAが放出時には細胞内に含まれていると言う見解と整合的である。しかし、一方で0.2ミクロン以下でも存在することは確かであるが、これが排出直後の形状なのかその後の分解を受けての形状なのかははっきりしない。また、表1の結果では分画を行わず試水全体からDNAを抽出した場合のDNA量は分画したものを積算した量よりもいずれの場合も多くなっており分析上の問題も残っている。

表1：マサバおよびカリフォルニアマイワシにおけるeDNAのサイズ分布

サイズ分画 (孔径 $\mu\text{m}$ )	マサバ	カリフォルニアマイワシ
分画なし	137.9 $\pm$ 66.0	152.8 $\pm$ 41.4
10 $\mu\text{m}$	12.5 $\pm$ 4.2	53.0 $\pm$ 21.5
1 $\mu\text{m}$	12.5 $\pm$ 3.1	15.4 $\pm$ 3.4
0.2 $\mu\text{m}$	2.5 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.6
<0.2 $\mu\text{m}$	9.2 $\pm$ 3.5	12.0 $\pm$ 2.1

なお、彼らは表2に示すように水槽内で3種の海産魚におけるeDNAの排出速度も比較しているが、個体バイオマス当たりの排出速度はカリフォルニアアンチョビーとカリフォルニアマイワシでは1桁近い違いがある。また、このような水圏環境下でのeDNAの排出速度を支配している要因として1) どのような種の生物か、2) 生物のサイズ、3) 生物の密度、4) 生活史の段階、5) 表皮、うろこ等の状態、6) 生物に与えているストレスや水温の六つを論文では挙げている。

表2：水槽実験における三種の海産魚におけるeDNAの排出速度

	eDNA 排出速度 (pg/h/fish)	eDNA 排出速度 (pg/h/g)
カリフォルニアアンチョビー	3.24x10 <sup>3</sup>	165
カリフォルニアマイワシ	1.13x10 <sup>5</sup>	1275
マサバ	2.12x10 <sup>5</sup>	500

水槽で飼育したマサバを使い、排出されたeDNAを核DNAとミトコンドリアDNAとに区別しそれらのサイズ分布を調べた実験も行われている (Jo *et al.*, 2019)。マサバを水槽から取り除いた直後のeDNA分画では、核DNAとミトコンドリアDNAのいずれもが10  $\mu$ m以上のサイズが最も大きかった。核DNAやミトコンドリアDNAのいずれものサイズが10  $\mu$ m以下であることを考えると、この結果もこの両方のeDNAの多くが放出された直後には細胞内にあることを示している。また、マジを水槽から除去すると水槽内のeDNAの濃度が高くなるが、これは物理的な刺激によって体表面の表皮細胞や粘液細胞がはがれて来たものと考えられる。彼らはマサバの飼育密度等を変えた実験からマサバにおけるeDNAの放出に関して次の結果をまとめている。

(1) 同じようなサイズの魚種においては、ある範囲では排出されるeDNAの量と魚の現存量には比例関係が成立する場合が多い。

(2) 水槽での飼育状態では、ある程度の密度になると密度の高い方が単位体重当たりの排出量が多い。これは魚同士の相互作用が高くなるのが原因と考えられる。

(3) 一方、重量単位では同じ魚種なら幼生期の方が排出は大きく、また、餌を十分に与えた時の方がそうでない時よりも排出量が多い。

以上のように多細胞生物からのeDNAの放出のプロセスやその速度などは、水槽実験でのeDNAのサイズ分布や排出されたeDNAの細胞内での存在状態などの研究は進んでいる。一方、どのような生物でどの組織から主にeDNAが排出されているかを知るために必要な、排出される特徴的な生物組織や細胞などに関する研究は殆ど進んでいない。このようなeDNAの実態を明らかにすることはeDNAの生態学の1つの大きな目的である。このためには体外DNAをもたらず組織や細胞の由来を同定し定量的に評価する手法の開発も今後必要であろう。

### 3-2 水圏環境でのeDNAの変質、分解について

放出されたeDNAは水圏環境の中で、他の有機物と同様に生物的/非生物的な分解を受けてその濃度を減少させていくと考えられる。生物分解に関しては、微生物等が持つ核酸分解酵素の働きが重要と考えられ、微生物そのものの代謝活性を支配する水の富栄養度、水温、pHなどが重要な因子である。一方、非生物的な分解要因としては紫外線などが挙げられるが、その直接の関係は海産魚の実験で見ると限りあまりはっきりしない (Andruszkiewicz, *et al.*, 2017)。また、後で紹介するように排出されるeDNAの持つ特性の違いも分解速度に影響する。いずれにしてもeDNAの分解速度とその残存に関する情報は、eDNAで検出された生物群の時空間的な分布範囲を推定する上で重要である。

生物体から放出された後のeDNAの分解については、水槽実験で対象生物を除去した後、eDNAの減少を見ている研究が多い。図4は二種の実験魚でのこのような条件における水槽内のeDNAの濃度の推移を見たものである (Thomsen, *et al.*, 2012)。図4のように多くの場合、水中のeDNAの濃度は時間軸に対してほぼ直線あるいは指数関数的に減少する。しかし、魚の種類や実験環境さらには検出感度の問題もあり、検出出来なくなる時間には2-7日程度とかなりの幅がある (Thomsen, *et al.*, 2012; Collins, *et al.*, 2018)。

表3は3種の実験魚での一次式で近似した時の分解速度定数を示したものである。分解速度定数は0.0055から0.0101/hrであり、三つの種で大きな違いは無い (Sassoubre, *et al.*, 2016)。なお、eDNAの検出感度に関しては試水のろ過水量から始まって、検出するプライマーの選択、PCRでの増幅度など手法上の様々な選択が関係するので絶対的な値では無いことに注意が必要である。

図4：水槽実験における二種の海産魚（ヨーロッパヌマガレイ：●；イトヨ：▲）におけるeDNA濃度の減少の推移。時系列での赤シンボルは各魚種でeDNAの検出が出来なかった事を示し、点線はeDNAのこの実験での検出限界を示す。

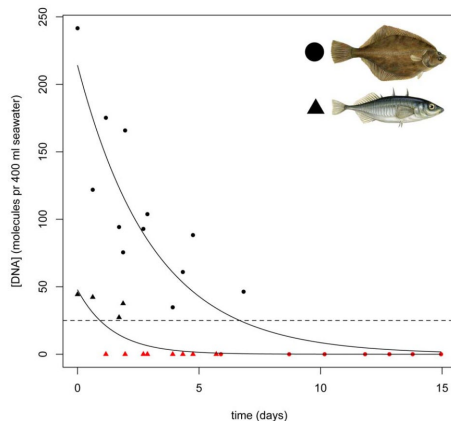


表3：三種の海産浮き魚類におけるeDNAの分解速度、

	eDNA 分解速度定数 (/hr)
カリフォルニアアンチョビ	0.101±0.011
カリフォルニアマイワシ	0.068±0.004
マサバ	0.070±0.004

既に述べたように生物から放出されるeDNAは、細胞内に含まれる様々なゲノム情報の混合物と考えられる。しかし研究の初期では既存のデータベースの充実度や細胞内での存在量などを考え、ミトコンドリアのDNA/RNAを対象にすることが多かった。しかし、それ以外のeDNAをターゲットにし、その分解を追跡する研究も行われている。例えば金魚からのeDNAの分解実験では、断片の長さが異なるミトコンドリアeDNAと核由来の短い断片のeDNAの分解速度を比較している

(Bylemans, *et al.*, 2018)。この実験でそれぞれのeDNAの断片の長さに注目したのは、長い断片のeDNAの方がプライマー設計の自由度が大きく、分類の精度が良くなる可能性があるからである。分解実験の結果では、核由来の短いeDNAおよび断片の長さが異なるミトコンドリアeDNAでの分解速度はあまり変わらず、断片の長さ違いは各DNAが放出された時の違いを反映していると結論している。

また、水産上重要な魚種であるマアジにおいて、ミトコンドリアDNAと同時に核DNAにも注目し、それらの分解過程の比較も行われている (Jo, *et al.*, 2019)。彼らは3-10  $\mu\text{m}$ の分画では核由来のDNAのほうがミトコンドリアDNAより当初の濃度が高かったこと、分解実験では3  $\mu\text{m}$ 以下のサイズ分画では両方の起源とも、より大きなサイズからの加入によってその減少は抑制される傾向にあったことを報告している。さらに自然界ではDNAよりもRNAのほうがより分解されやすいと言うデータが多いので、RNAをeDNAの対象とした方がより放出現場に近いものを見ていることになると考えた実験もある (Wood, *et al.*, 2020)。海産の環形動物のケヤリムシとホヤの種類2種を使ったこの水槽実験では、RNAとDNAとで分解速度には有意な違いはなかった。しかし、これらの核酸物質はバイオフィルムになって存在しており、これらの有機物との相互作用でこの両者の分解速度が変わらなかった可能性も指摘されている。以上のように水槽実験では細胞起源の様々なゲノム物質を対象にeDNAの分解に関する研究が行われているが、eDNAとしての特定のゲノムにおける優位性はまだまだはっきりしない。

一方、海洋現場でのeDNAの分解について英国海峡での異なる海洋環境、季節での海水を集め、そこにおけるeDNAの分解速度を約200時間まで追跡した研究がある (Collins, *et al.*, 2018)。



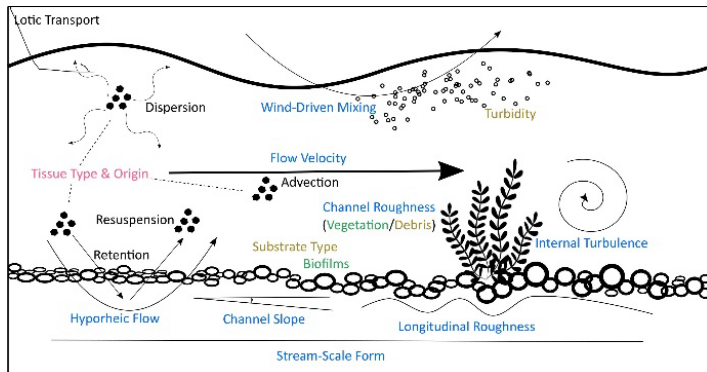
ここで用いたメタバーコーディング手法により海水中に含まれる多様な海産生物のeDNAの分解速度を同時に測定することが可能である。沖合環境に比べて沿岸環境では分解速度が1.6倍速いこと、しかし季節による分解速度の変動は見られなかったこと、分解に対する環境要因では塩分とpHの勾配が重要であることなどが報告されている。また、多くの魚種に関して排出後48時間まではeDNAを検出出来ることも示された。このように海洋現場も含めてeDNAは数日から1週間程度で検出出来なくなるという研究結果が多い。しかし、eDNAが例えば嫌氣的な堆積物等の異なる環境場に移動した場合、その分解は強く抑制されることは良く知られており、eDNAが古環境の指標として使われていることにも留意する必要がある (Pedersen, *et al.*, 2015)。

### 3-3 水圏環境におけるeDNAの輸送および保存

水圏でのeDNAの研究が始まったのは小さな池などの止水環境であった。このような環境ではeDNAは生物体外に放出された後、湖底に沈降する以外は現場の水中内で分解されて行くと考えられた。従って水塊の大規模な移動などは無いため、eDNAと対象生物との関係は付けやすい。しかし、eDNAの研究の対象が河川や海洋など大きな流水環境に広がると、eDNAと対象生物との分布の時空間的な関係を知る事が大きな課題となる。図5は、河川環境でのeDNAの輸送に関与する要因をまとめたものである (Harrison, *et al.*, 2019)。この図に示されたように河川環境でのeDNAの輸送で特徴的なことは、1) 下流方向への様々な強度の流れがあること、2) 河床とeDNAの相互作用で、滞留、沈着、再懸濁によるeDNAの動態が無視出来ないことである。

図5：河川流域におけるeDNAの輸送に関与する物理的な要因などの模式図

なお、ここで黒字がeDNAの輸送における様々な動態を示し、青字はそれらを駆動する外的営力や環境場を示す。(Harrison, *et al.*, 2019)

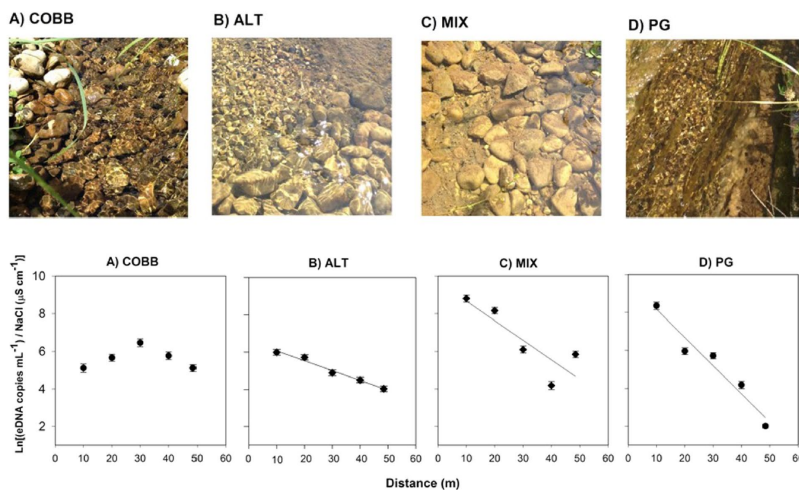


河川に関して当初には上流から下流への流れに関して、どの位下流まで輸送されたeDNAが検出されるかの調査が行なわれた。例えば、スイスの富栄養の湖沼から流出する小河川系（流れは3-4立方m/sec）を使い、湖沼にしか生育しない動物プランクトンと二枚貝のeDNAがどの程度の下流まで検出されるかを見た調査がある (Deiner & Altermatt, 2014)。この場合、eDNAは両方ともほぼ10km下流まで検出されたが、7月と10月の2回の季節で両種の検出頻度は異なることを見出している。なお、このような小型の無脊椎動物の場合、著者らがeDNAの起源と考えているのは、動物プランクトンでは脱皮物、二枚貝の場合は、ミューカス、死骸あるいは摂餌された残がい、幼生時における流出などであり、既に示した魚類の場合とはかなり異なっている。

図5で示したように河川では河床間隙水域 (Hyporheic zone) を含む河床でのeDNAの滞留・沈着や河床からのeDNAの再懸濁のプロセスが重要である。ここで河床間隙水域とは、河床表面から深さ数十cm-1mまでの河川水が間隙水として浸入する領域を指す。この領域では河床を構成する鉱物粒子の性状によって、水中の懸濁粒子がその間を通過する時に粒子との複雑な相互作用

用が生じる。これらの影響を解明するために、図6で示したようにアメリカ東部のインディアナ州にある河床の形状を変えた4つの人工河川（小河川の上流から中流を想定）で、コイなどに由来する eDNA を放出しその下流への分布を時系列で観測した報告がある（Shogren, *et al.*, 2017）。なお、懸濁粒子としての eDNA との違いを見るために同時に NaCl を添加し、実験時間内において溶解態成分としては下流までの分布は均一になることを確認している。図6に示すように、COBBを除いてはいずれも下流方向に eDNA は減少し、河床でトラップされていることを示し、また礫の粒度が細かい方がより多く eDNA がトラップされていることも分かる。

図6：実験河川での4種類の河床の性状（COBB, ALT, MIX, PG）（上段）と各河床条件における eDNA 供給停止時における各河床における上流から下流に向けての NaCl 濃度で補正した eDNA の濃度変化（下段）COBB:平均粒径が5 cmの礫床、PG:平均粒径が0.5cmの礫、ALT: 2 m間隔でCOBBとPGで構成、MIX: COBBとPGを50:50で混合。また礫はバイオフィルムが形成されている。（Shogren, *et al.*, 2017）

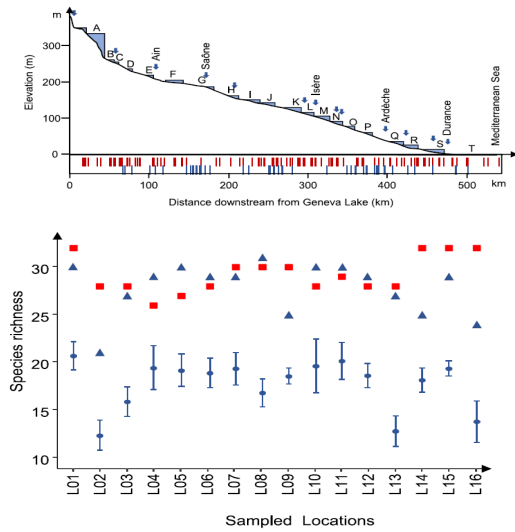


これらの結果は河川の場合、流れによって異なる組成の河床中に eDNA が異なる割合でトラップされることを示している。また eDNA の供給を停止してからどれだけの eDNA がこの河床から流出するかも検討しているが、4 時間が経過しても河床から流出していた。しかし河床の性状との関係もはっきりしなかった。以上の結果は河床を構成する基質と eDNA の複雑な相互作用を示しており、河川の場合、河床に留まった eDNA がどのような分解・輸送過程を経るかの検討が、eDNA による対象生物の分布域の推定には必要な事を示している。

一方、源頭をスイスに持ちフランス国内を南に流れて地中海に至る540kmの長さのローヌ川では、10年以上にわたり電気漁獲法による40測点での魚類組成のデータがある。これまで蓄積されたセーヌ川での魚種多様性データと春における1回のeDNAサンプリングのデータとの比較を図7に示した（Pont, *et al.*, 2018）。図7の下段には両方のデータがある16測点での結果を示しているが、全ての比較した測点において10年間にわたる毎年の電気漁獲法による魚種数はeDNA法に比べると明らかに少ない。一方で電気魚獲法で10年間の間に得られた魚種数の総計は、多くの測点でeDNAの一回での魚種数と類似した結果を得ていることは興味深い。なお、73-93%の種類が2つの方法で共通に検出されており、eDNAでの検出コピー数と電気捕獲法での数は16測点のうち13測点で有意の相関があった。セーヌ川は図7上段に示されたように上流から下流まで数多くの発電等のダムで分断化されているが、ここでの結果はeDNAによる魚類の多様性データは、ある広がりを持った水域での時間平均的な生物群集の値を良く再現しているとも考えられる。

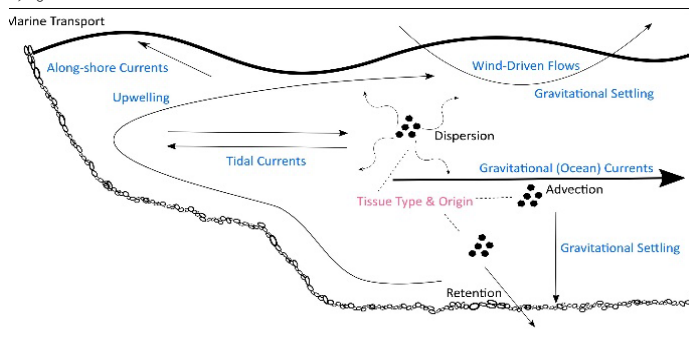
図7：セーヌ川の源頭から河口までの勾配とダムの配置、および電気魚獲法（青線）とeDNA（赤

線)との調査地点(上段)、調査地点L1(上流)からL16(下流)における10年間の各年ごとの電気魚獲法による魚種数の平均と幅(青○)、eDNAでの魚種数(赤□)、従来法による10年間の魚種の積算値(青△)



河川や湖沼に比べて、海洋におけるeDNAの輸送に関する研究はあまり進んでいない。その理由として海洋では潮汐や海流等で流れが時空間的に複雑であること、また、湖沼等に比べて調査が容易ではない事が挙げられる。図8は沿岸海域でのeDNAの分散・輸送に關与する物理的な要因をまとめたものである(Harrison, *et al.*, 2019)。

図8 沿岸域でのeDNAの分散・輸送に働く物理的な要因をまとめた模式図(Harrison, *et al.*, 2019)ここで黒字がeDNAの輸送における様々な動態を示し、青字はそれらを駆動する外的営力や環境場を示す。



この図に示されるように、沿岸域では潮汐による周期的な流れが卓越する所が多いが、風による風送流や岸に沿った沿岸流、さらに、広域での海流など海域による異なりが大きい。また、鉛直混合にも関係する湧昇流があるが、魚の糞粒子などのeDNAは沈降による鉛直輸送も考慮する必要がある(Hansen, *et al.*, 2018)。最近、魚類による有機炭素の海洋中層以深への輸送(生物ポンプ)への寄与が定量的に評価されたが、糞粒子の寄与が大きい事が示されこれは魚の糞粒子は速やかに沈降することを反映している(Saba, *et al.*, 2021)。

海洋でのeDNAの輸送に関する実験的な研究として、内湾である舞鶴湾に生簀を設置しそこに飼育されたシマアジのeDNAの拡散・輸送を調べた研究がある(Murakami, *et al.*, 2019)。シマアジはこの海域ではこの時期分布しないことが分かっている魚種である。表面水を探り最大距離1kmまでの時空間的に得た全部で351サンプルの中で57サンプルにおいてシマアジのeDNAが検出されたが、その約80%が30m以内の測点であった。さらに、生簀を除去してから1時間経過の後では

測線でeDNAは検出されたが2時間では出なかった。以上の結果から湾内に放出されたシマアジのeDNAの拡散はかなり限定的と推定している。なお、この実験では流速計も設置していたが、その結果とeDNAの分散にははっきりした関係が見いだせない。これは日本海の潮汐流が弱い事、また、流速計の設置位置が適当でなかった可能性もある。さらに、表層水しかサンプリングしていない調査におけるバイアスも考えられる。

沿岸域で海岸から4km沖合までの距離が、eDNAによる生物群集の組成や多様性にどのように影響するかを見るために、アメリカ西海岸 (Puget Sound, Washington) で海岸からの調査ライン (8点 x 3測線) で調査が行われている (O' Donnell, *et al.*, 2017)。彼らはメタバーコード法により底生生物を含む広い分類群を推定しているが、生物群集の類似度と言う指数を取ると距離で50m離れると1から0.4まで急激に低下している事、一方、50mから4kmまではこの指数の減少が0.4から0.2までゆっくりしている事を見出した。この結果は、浅海域と言う物理的な営力が大きな海域にも拘らず長距離のeDNAの移動は少なく、ある場における生物群集をeDNAで再現するには少なくとも100m以内の間隔でのサンプリングが必要になると述べている。例えば内湾・沿岸性のウミタナゴの仲間は岸から100mより浅い海域でしか検出されない。

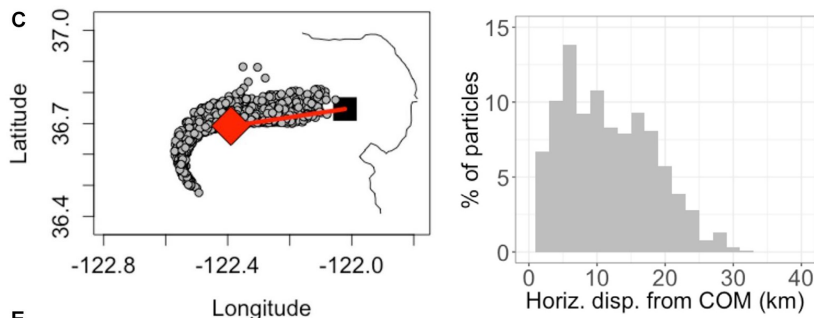
また、海域での eDNA の時空間的な分布においてその広範な拡散はあまり無く、物理的な営力が大きな浅海域でも >100m と考えられるという幾つかの報告に対し、アメリカ西海岸で潮汐に注目して潮間帯での eDNA がどの程度変動するかを検討している報告がある (Kelly, *et al.*, 2018)。彼らは 3 か所において時系列で eDNA 群集組成を見ているが、プライマーとして COI を使う事で極めて多様なプランクトン、ベントス群集を検出している。結果的に eDNA の時空間分布を見ると潮汐はこの生物群集の組成に強くは影響しておらず、何周期も通じてそれぞれの地域における水圏環境に合致した群集組成を保っていた。しかし、一方で各地域を特徴づけている物理的・化学的な環境が重要でこれが変わること、eDNA による群集組成も変化すると考えている。

さらに、ニュージーランドの沿岸で潮汐や沿岸流などが卓越する海域の 5km 以内にあるサンドビーチ、岩礁帯、泥質帯、沖合域など 12 か所で満潮直後に採水を行って生物組成を見た研究がある (Jeunen, *et al.*, 2018)。メタゲノム手法により魚、甲殻類など 3 つの異なるプライマーを使って 11 門にわたる 77 科の生物群集を調べた結果として、ベントスや海藻などを中心としてそれぞれの海域で分布する生物群はそこでしか検出されず、一方、広域性があることが分かっている生物群は幅広い分布が検出されたと報告している。

これまで紹介した海域におけるeDNAの拡散の研究は、底生生物からの放出を含めた岸近くでの沿岸環境での調査が主であった。より広い沿岸海域を対象にした研究では、卵稚仔の輸送などで良く使われる海洋循環モデルと表層でのラグランジアン粒子追跡法を組み合わせ、ある海域の点から放出されたeDNAの拡散・輸送を調べた報告がある (Andruszkiewicz, *et al.*, 2019)。数値実験が行われたのはアメリカ西海岸のモンレー湾で湾内の1測点から2015年の毎日10,000個の粒子を1年間表面で放出する。また、カリフォルニア海流が流れるこの沿岸域での循環モデルには1kmメッシュの解像度を持つRegional Ocean Modeling System (ROMS)を使っている。図9に示したように、放出された粒子(疑似eDNA)は4日間で分布の中心は西方に数10km移動し(左図)、また、その分布の中心からの広がりも約30kmにも及ぶことが分かった(右図)。数日後の粒子の分布に関して大きく寄与する要因として、この海域では水平移流、分解、沈降の3つが寄与していることが、分解、沈降のパラメータを輸送モデルに入れる事で明らかになった。なお、粒子の沈降を入れた計算では7日後の粒子の分布の中心は9m水深になっている。また、このシュミレーションモデルを使えばこの海域での任意の測点で観測されたeDNAの起源海域について時間を遡って推定することも可能となる。

図9 放流点(黒四角)から4日後の粒子の分布と集積の中心(赤菱形)(左図)、および4日後の集積の中心からの粒子の分散の距離のヒストグラム(右図)





以上のようにeDNAの拡散・輸送に関しては様々な水圏環境で、ある地点のある時間に得られたeDNAがその環境での生物群集をどこまで反映しているかの検討が色々行われている。その結果、潮汐の影響を受ける浅海域では、様々な流れ場が存在するにも関わらず、底生生物も含めてeDNAの拡散・輸送は比較的限定されていると言う報告が多い。沿岸域においては高分解能を持つ循環モデルの作製が可能であり、これにeDNAの粒子としての性状を反映させることで、実際の観測データとシュミレーション実験からeDNAの輸送についての時空間的情報を得ることが期待される。

#### 4. 海洋でのその応用例と今後の課題

海洋環境での eDNA の実利用として提案されている対象としては大きくは2つの方向がある。その一つは eDNA を浮き魚や底魚などの水産資源の管理に使うものであり、その為にはその海域に存在しない魚種がポジティブに検出される擬陽性の問題から、対象魚種の資源量の推定まで多くの課題が指摘されている (Hansen, *et al.*, 2018)。もう一つはある海域での食物連鎖を構成する生態系を統合的に理解する手法としてこの eDNA を使うことで、“Tree of Life” と言う言い方もされる (Stat *et al.*, 2017; Djurhuus *et al.*, 2020)。後者の場合、複数のプライマーを使ったメタバーコード手法で幅広い分類群の生物種を網羅的に把握することが出来る eDNA 研究の特徴が生かされており、現在では沿岸域のサンゴ礁や海藻藻場生態系などがその対象になっている。この方向へのアプローチは基礎科学への貢献と同時に、これらの生態系の適切な管理への貢献も念頭に置いている。ここでは eDNA を使ったこの二つの海洋での研究分野に関してその現状と課題をまとめる。

##### 4-1 海洋での水産資源の管理と eDNA の利用

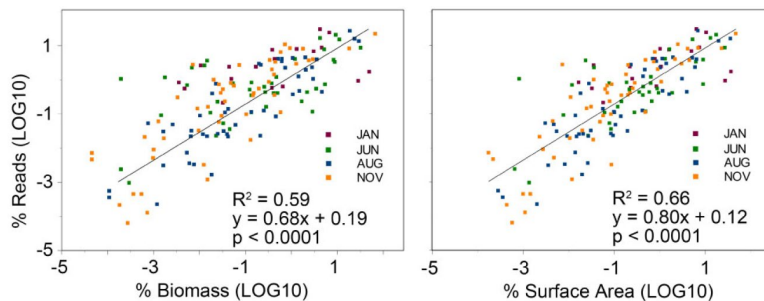
水産資源の管理のためには、対象とする魚種だけでなく各魚種の個体数やその魚齢構成などを知る必要がある。しかし、従来行われていた漁業調査船によるトロールや魚探などの調査によるこれらのデータの十分な取得は容易ではない。また、現状では魚種の分類に詳しい専門家の減少も課題であり、特に卵稚仔や稚魚などの段階での魚種の判別が難しい。このような状況の下で eDNAによって沿岸域の魚類群集が初めて調べられたのは既に述べたように2012年であった

(Thomsen, *et al.*, 2012)。なお、淡水域での水産資源の管理に関しては、それ以前にもアメリカの五大湖でのアジアカブなどの侵入種の事例がある。ここでは2009年に既にこれら侵入種のeDNA調査が行われ、居ないはずの水域でeDNAによりこれらの存在が推定されたため、漁業管理者の間で大きな問題が生じた。それは漁業管理者には対象魚種を物理的に確認するまではその存在を信じない者が多かったからである (Jerde, 2021)。この実際に存在するかどうかの問題は、その後コストのかかる捕獲法が数年かかって実施されその魚種が実際に捕獲されたことで決着したが、結果的にeDNAはその早期発見に寄与することになった。一方、この侵入種からのeDNAの排出、輸送等のプロセスが理解出来ていれば、課題はもっと早期に解決したように思われるとのコメントもある (Lacoursière-Roussel & Deiner, 2021)。

2010年位以降、本報告書の3-2で示したように主に生簀を使った水産重要魚種によるeDNAの排出速度の推定や、その形態、分解速度等に関する多くの研究が行われ、eDNAの実態に関する理解は進展している。さらに、水槽実験などではeDNAとそこでの魚種の生物量とに一定の正の相関が見られることを報告した研究も多い(Rourke, *et al.*, 2021)。なお、eDNAと水産資源あるいは魚類に関しては最近にもいくつかの総説が出ている(Hansen, *et al.*, 2018; Rourke, *et al.*, 2021; Wang, *et al.*, 2021)。

一方、海洋現場でも従来のトロール網や魚探などでの生物資源量とeDNAを比較する研究も行われた。例えば、Stoeckle, *et al.*, (2021)はアメリカ東部の沿岸域で従来行われてきた各季節におけるボトムトロールによる魚種の生物量と表層と下層2層からのeDNAの解析値を比較し、少なくとも40種以上の魚種で各季節における現存量の変化に対し検出されたeDNA濃度は相対的には対応していると結論している(図10)。

図10：アメリカ東部沿岸域でのボトムトロールで捕獲された季節ごとの魚種の生物量(左図)および表面積(右図)と各魚種のeDNA量とのLog-Logプロット。



この時、著者は魚の場合その表面積がeDNAの排出速度を決めていると仮定し、生物量の2/3乗をeDNAとの関係に使っている。なお、eDNAをその場の漁業資源と関連させるには、eDNAでは魚当たりの排出速度、分解速度、流れなどの物理的な要因があること、一方トロールによる漁獲には、網目の大きさ、回避、パッチ上の分布などの生物的な要因もその誤差には含まれると述べられている。調査結果としてeDNAのほうが、ボトムトロールによる分布よりもその分布状態がよりパッチ的であったとしており、eDNAにおける分散や、魚の行動その他のまだ不明の現象が寄与していると考えている。

魚類のeDNAに関しては、従来の魚網や魚群探知機によるデータとの比較のほか、最近では、浅海底に設置されたケーブルステーションでのビデオ撮影による魚種の出現推定とeDNAを合わせた研究も報告されている(Mirimin, *et al.*, 2021)。この論文ではこれらの2つの手法を合わせることで、重要魚種を含むより多くの種が判別出来たと述べている。

ではeDNAはどこまで従来手法の代わりをしてくれるであろうか。現状では各国の水産資源の管理者は水産資源管理にこのeDNA手法を取り込むかどうかの分岐路に立たされているようである。しかし、表面的なその魅力にも関わらず、管理者の目から見るとこの分野の実践的な経験者以外には、そのアプローチや限界から見た壁が高いと感じるものも多い(Hansen, 2018)。例えばeDNAを水産資源の推定に使う場合、従来の直接捕獲と比べて資源の年齢構成、重さ、生活史段階、生産性(繁殖力)は教えてくれない。つまり、幾つかの論文が示しているように魚年齢による単位重量当たりのeDNAが大きく異なっては困るし、その違いが判る必要があるのである。従って、eDNAの分析だけからは水産資源管理に必須の情報のすべては得ることが出来ない事は明らかである。一方で、eDNAの排出に関する様々な点が解明され、さらに水産資源のアセスメントに係る統計的なモデリングの構築が進展することで、eDNAによる定量的な解析も将来的には可能



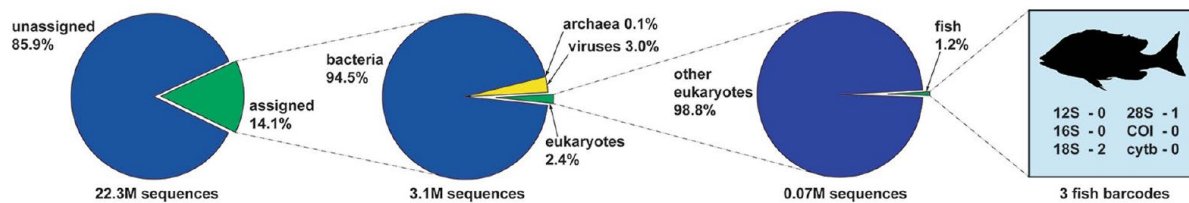
になるかも知れないと言う期待もある。従って、将来的には eDNA の持つ利点を生かして従来の方法と組み合わせて水産資源を管理していく方向に進むのではないかとと思われる。

#### 4-2 生態系の網羅的な把握

ある海域における広範な分類群を網羅的に捉え、その季節変化などの外部環境との応答や生物群集同士の相互作用を解析する手法として、複数のプライマーを使ったメタバーコード eDNA 法は多くの利点を持っている。例えば、アメリカのモンレー湾において 18 か月にわたる海水の時系列サンプリングを行い、同じ海水サンプルからの eDNA を、16rRNA, 18rRNA, cytochrome c oxidase I (COI), 12rRNA の 4 つのゲノムソースに分けてシークエンスして微生物から海産哺乳類まで科以上で 663 の分類群を持つデータセットが作られた (Djurhuus, *et al.*, 2020)。これらのデータから、期待される捕食-被捕食の関係や栄養段階での繋がり、さらにはすべての栄養段階における季節変化との群集組成の関係などを見ることが出来た。これ等の情報は沿岸域における生態系変化に対する感度の高い生物指標の特定や生態系保全の方針への助言などに大きく役立つものと考えられている。

同様に、オーストラリアのサンゴ礁海域においても、生物群集を網羅的に捉えることでその特徴を明らかにし、この生態系の保全管理に使うことを目的として、バクテリアから魚類までの生態系全体を含むメタバーコード法による調査が行われている (Stat, *et al.*, 2017)。彼らは最終的には 6 つの異なるプライマーを組み合わせることで真核生物の多くの分類にまたがる 287 科の生物を検出しているが、フィルター上に回収された DNA の内、由来が分かったものの約 98% が細菌等の原核生物であったと述べている。従って、真核生物のゲノムは 2.4% に過ぎなかったこと、さらに真核生物の内魚類は 1.2% の割合でしかゲノムが検出されないため、プライマー等に工夫が必要なことを指摘している (図 11)。

図 11：西オーストラリアのコーラル湾で採取された海水サンプルからの eDNA のショットガンライブラリーで得られた DNA 配列の生物群への割り当てのまとめ。説明は本文参照。



このように、サンゴ礁や沿岸海域の生態系を統合的に理解する一つ的手段として eDNA は多くの利点を持っており、今後も生態系の管理と言った観点でも研究の進展が期待される分野である。しかし生物多様性と保全生物学の立場から Cristescu & Hebert (2018) は、2018 年の段階における総説で、eDNA での調査・研究における現状での限界を次のように列挙している。1 つは、各生物群における eDNA の起源、分解や輸送などのその後の運命がはっきりしない事、メタバーコード手法での eDNA の量と生物量との関係の曖昧さ、さらには、eDNA では、対象と成る生物群の生育段階や性別など生活史の段階がわからない事、メタバーコード手法における参照ゲノムデータの不完全さなどを挙げている。その結果、ある種の存在の評価に関しての間違いが少なくない事、手法全体に対して標準化がなされていないことなども加えている。特に、保全生態学において、eDNA におけるその生物の存在の有無の間違いは致命的であると述べている。eDNA の研究の進展を見ながら、その利点と限界をしっかりと判断することが望まれる。

5 最後に：

Pawlowski, *et al.*, (2021)は専門誌 *Molecular Ecology* で出版された eDNA の特集号で次のように述べている。すなわち、この 10 年間で eDNA に関する研究は急速に進展したが、その一方で eDNA 技法の通常の生物モニタリングへ適用はあまり進んでいない。その理由はいくつか考えられるが、大きな課題は eDNA における研究の中心が eDNA に関するデータの精度をあげ最適化することであり、この手法の標準化やそれを通常モニタリングのルートに落としこむための研究は進展していないことであると述べている。さらに、従来の生物モニタリングの手法と eDNA の手法との間の関係性もまだはっきりしない。つまり、従来のモニタリングの手法での結果と合致していれば受け入れられるのが現状である。ここで認識しなくてはならないのが、eDNA の生態学と生物の生態学は大きく異なることを認識して eDNA を考える必要がある事である。

ここでの課題は、種多様性などに関する基礎的な研究が従来の形態分類を中心とした手法からゲノムを中心とした手法へのある意味での転換期にある現在において、そのいわば社会実装である保全生態学や水産資源の管理などが、どのようにこの変化に応答していくかであろう。初めは従来法を補充するような形から次第に全体が置き換わって行く調査分野も考えられる。あるいは、調査目的によっては eDNA の持つ限界から従来法を維持する場合もあると思われる。いずれにしても基礎的な研究を持続させ、それを背景としてその手法の標準化や行政への取り込みが必要である。

なお、この eDNA の研究に関してはわが国の研究者が、その進展の様々な局面で大きな貢献をしている。例えば世界に先駆けて 2018 年には環境 DNA 学会を設立させ基礎的な研究の進展のみならず、その環境保全などの応用分野への応用を図っている。その活動の一環として、本報告書でもいくつかその内容を参照しているこの分野の最新の進展をまとめた「環境 DNA-生態系の真の姿を読み解く-」の出版や、eDNA の応用のための「環境 DNA 調査・実験マニュアル」を公開と活発な活動を行っている。

引用文献：

- Andruszkiewicz EA, Sassoubre LM, Boehm AB. (2017) Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *PLoS ONE* 12(9): e0185043.
- Andruszkiewicz EA, Koseff JR, Fringer OB, Ouellette NT, Lowe AB, Edwards CA, Boehm AB. (2019) Modeling Environmental DNA Transport in the Coastal Ocean Using Lagrangian Particle Tracking. *Front. Mar. Sci.* 6:477.
- Barnes MA & Turner CR. (2016) The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conserv Genet.* 17:1–17 13.
- Bylemans J., Furlan EM., Gleeson DM, Hardy CM, Duncan RP. (2018) Does Size Matter? An Experimental Evaluation of the Relative Abundance and Decay Rates of Aquatic Environmental DNA. *Environ. Sci. Technol.* 52, issue 11, pp. 6408-6416.
- Collins RA, Wangensteen OS, O’Gorman EJ, Mariani S, Sims DW. & Genner, MJ. (2018) Persistence of environmental DNA in marine systems. *Commun. Biol.* 1, 185.
- Collins RA, Bakker J, Wangensteen OS, Soto AZ, Corrigan L, Sims DW, Genner MJ, & Mariani S. (2019) Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI. *Methods Ecol. Evol.* 10, 1985–2001.
- Cristescu ME & Hebert PDN. (2018) Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 49, 209–230.
- Deiner K & Altermatt F. (2014) Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS ONE* 9:e88786.
- Djurhuus A, Closek CJ, Kelly RP, Pitz KJ, Michisaki RP, *et al* (2020) Environmental DNA reveals seasonal shifts and potential interactions in a marine community. *Nature Commun.* 11(1), 254.

- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon FO, Taberlet P. (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423–425.
- Footo AD, Thomsen PF, Sveegaard S, Wahlberg M, Kielgast J, *et al.* (2012) Investigating the Potential Use of Environmental DNA (eDNA) for Genetic Monitoring of Marine Mammals. *PLoS ONE* 7(8): e41781.
- Hansen BK, Bekkevold D, Clausen LW, Nielsen EE. (2018) The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish Fish.* 19:751–768.
- Harrison JB, Sunday JM, Rogers SM. (2019) Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proc. R. Soc. B* 286: 20191409.
- Helander HF & Fandriks L. (2014) Surface area of the digestive tract—revisited. *Scand J Gastroenterol.* 49:681–89.
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM. (2011). “Sight unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv Lett* 4:150–157.
- Jerde CL. (2021) Can we manage fisheries with the inherent uncertainty from eDNA? *J Fish Biol.* 98:341–353.
- Jeunen G-J, Knapp M, Spencer HG, *et al.* (2019) Environmental DNA (eDNA) metabarcoding reveals strong discrimination among diverse marine habitats connected by water movement. *Mol Ecol Resour.* 19:426–438.
- Jo T, Arimoto, M, Murakami H, Masuda R, Minamoto T. (2019) Particle size distribution of environmental DNA from the nuclei of marine fish. *Environ. Sci. & Technol.* 53, 9947–9956.
- Kelly RP, Gallego R, Jacobs-Palmer E. (2018) The effect of tides on nearshore environmental DNA. *PeerJ* 6:e4521
- Lacoursière-Roussel A & Deiner K. (2021) Environmental DNA is not the tool by itself. *J Fish Biol.* 98:383–386.
- Mirimin L, Desmet S, López-Romero D, Fernandez-Fernandez S, *et al.* (2021) Don't catch me if you can – Using cabled observatories as multidisciplinary platforms for marine fish community monitoring: An *in situ* case study combining Underwater Video and environmental DNA data. *Sci. Total Environ.* 773 (2021) 145351
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sadoet T, *et al.* (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fish detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.* 2, 150088
- Miya M, Gotoh RO, Sado T. (2020) MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fish Sci.*, 86:939–970.
- Murakami H, Yoon S, Kasai A, Minamoto T, *et al.* (2019) Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fish Sci.* 85(2) 1–11.
- O'Donnell JL, Kelly RP, Shelton AO, Samhuri JF, *et al.* (2017) Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat. *PeerJ* 5: e3044.
- Pawlowski J, Apothéloz-Perret-Gentil L, Altermatt F. (2020) Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Mol Ecol.* 29:4258–4264.
- Pawlowski J, Bonin A, Boyer F, Cordier T, Taberlet P. (2021) Environmental DNA for biomonitoring. *Mol Ecol.* 30, 2931–2936.
- Pedersen MW, Overballe-Petersen S, Ermini L, Der Sarkissian C, *et al.* (2015) Ancient and modern environmental DNA. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370, 20130383.
- Pont D, Rocle M, Valentini A, Civade R, *et al.* (2018) Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Sci. Rep.* 8, 10361.
- Rourke ML, Fowler AM, Hughes JM, *et al.* (2021) Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental*

- Saba GK, Burd AB, Dunne JP, *et al.* (2021) Toward a better understanding of fish-based contribution to ocean carbon flux. *Limnol. Oceanogr.* 66, 1639–1664
- Sassoubre LM, Yamahara KM, Gardner LD, Block BA, Boehm AB. (2016) Quantification of Environmental eNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. *Environ. Sci. Technol.* 50, 10456–10464.
- Shogren AJ, Tank JL, Andruszkiewicz E, Olds B, Andrew R, *et al.* (2017) Controls on eDNA movement in streams: Transport, retention, and resuspension. *Sci Rep* 7:5065.
- Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M. (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol. Ecol.* 21:1794–805
- Stat M, Huggett MJ, Bernasconi R, DiBattista, JD, *et al.* (2017). Ecosystem biomonitoring with eDNA: Metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Sci Rep* 7, 12240.
- Stoeckle MY, Adolf J, Charlop-Powers Z, Dunton KJ, *et al.* (2021) Trawl and eDNA assessment of marine fish diversity, seasonality, and relative abundance in coastal New Jersey, USA. *ICES J Mar Sci* 78: 293–304
- Thomsen P, Kielgast J, Iversen L, Moller P, Rasmussen M, Willerslev E. (2012) Detection of a diverse marine fauna using eDNA from seawater samples. *PLoS ONE*, 7(8), e41732.
- Turner CR, Barnes MA, Xu CC. Y., Jones SE., Jerde, CL, Lodge DM. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial environmental DNA. *Methods Ecol. Evol.* 5, 676–684.
- Voytek MA & Ward BB (1995) Detection of Ammonium-Oxidizing Bacteria of the Beta-Subclass of the Class *Proteobacteria* in Aquatic Samples with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1444–1450.
- Wang S, Yan Z, Hänfling B, Zheng X, *et al.* (2021). Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Sci. Total Environ.* 755: 1–17.
- Wilcox TM, McKelvey KS, Young, MK, Lowe, WH, Schwartz MK. (2015) Environmental DNA particle size distribution from Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*). *Conserv. Genet. Resour.* 7, 639–641.
- Wood SA, Biessy L, Latchford JL, Zaiko A, von Ammon U, *et al.* (2020) Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system. *Sci. Total Environ.* 704: 135314.
- 坂田雅之・徐寿明・源利文、2021、環境 DNA 分析の概要、環境 DNA-生態系の真の姿を読み解く-、土居秀幸、近藤倫生 (編)、共立出版、1–35。
- 宮正樹、2021、環境 DNA メタバーコーディング法、環境 DNA-生態系の真の姿を読み解く-、土居秀幸、近藤倫生 (編)、共立出版、124–156。
- 山中裕樹、2021、種特異的環境 DNA 手法、環境 DNA-生態系の真の姿を読み解く-、土居秀幸、近藤倫生 (編)、共立出版、36–55。