

環境DNAについて

1

-ある地域の生物多様性を守ろうと思ったら…-

- ✓ その地域に生息している生物は何かを知る必要がある。
- これが生物多様性保全の第1歩であるが、実はそれほど簡単ではない。

ある池での調査を想定すると…



胴長必要

溺れないか

投網必要

この魚は？

もれなく調査
できているのか

この昆虫は？

2

-ある地域の生物多様性を守ろうと思ったら…-

- ✓ その地域に生息している生物は何かを知る必要がある。
- これが生物多様性保全の第1歩であるが、実はそれほど簡単ではない。

ある川での調査を想定すると…



3

-ある地域の生物多様性を守ろうと思ったら…-

- ✓ その地域に生息している生物は何かを知る必要がある。
- これが生物多様性保全の第1歩であるが、実はそれほど簡単ではない。



- ✓ 現状の捕獲調査では、捕獲に関する技術や分類に関する知識が必要とされることから誰でも簡単にその地域における生物相を知ることができない。
- ✓ 一方で、生物多様性は地域性が高く、またその影響(恩恵又は被害)を受けるのはその地域に住む人たちであるので、地域の人たちがその地域の生物多様性保全を考えていくことが重要。



- ✓ 上記の目的を達成するには、捕獲調査のように一定の技量が必要な方法ではなく、だれでも簡単に生物調査が可能な手法が必要となる。
- 現状において「**環境DNA調査**」はその一つの解決策につながる可能性がある。

4

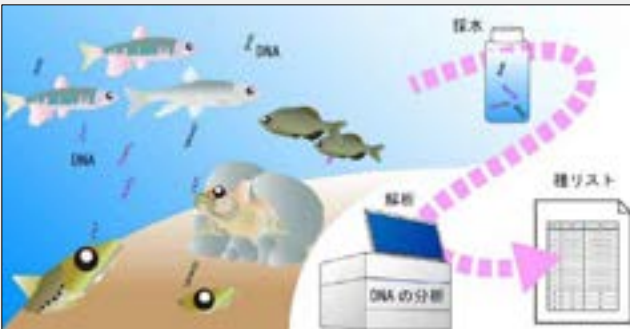
-環境DNAとは-

環境DNA (eDNA) 動植物の排泄物、組織片などに由来する水中に存在するDNA断片

1リットルの水から、環境DNAを調べることで
環境DNAの有無から生物の存在を推定

環境DNAの量から生物量を推定

→これを「環境DNA調査」といいます。



出典：「環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き(第2版)」(環境省生物多様性センター)

●特徴

① 簡単・安全

- ✓現場作業は採水のみで非常に簡便かつ専門的な知識は不要
- ✓捕獲調査に比べて安全に作業可能

② 効率的

- ✓現場採水、ろ過・DNA抽出作業、分析・解析作業の工程を分担可能ため、高効率

③ 高精度

- ✓調査地周辺に生息する水生昆虫類を高精度に把握可能

④ 保存性

- ✓DNA抽出サンプルは低温で長期間保管可能

⑤ 解像度

- ✓形態から種を同定できない場合でも、DNA配列の違いから種同定可能

→端的に言えば「簡易・高精度な生物調査ツール」といえる。

5

-環境DNAの基本原理-

Polymerase

Chain

Reaction

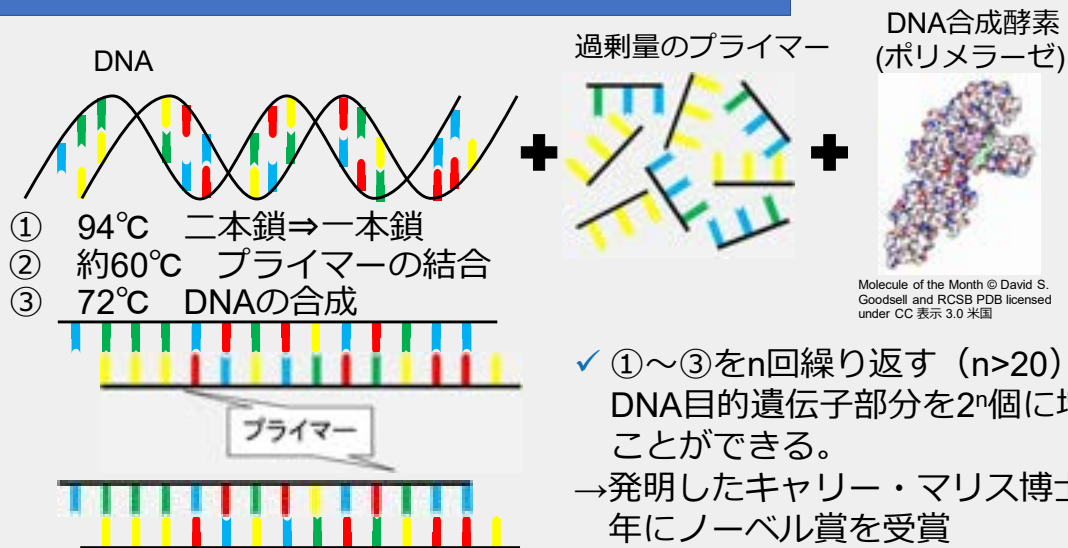
「ポリメラーゼ連鎖反応」

6

-環境DNA調査の原理-

PCR(polymerase chain reaction)法

PCR法：目的遺伝子の選択的増幅法

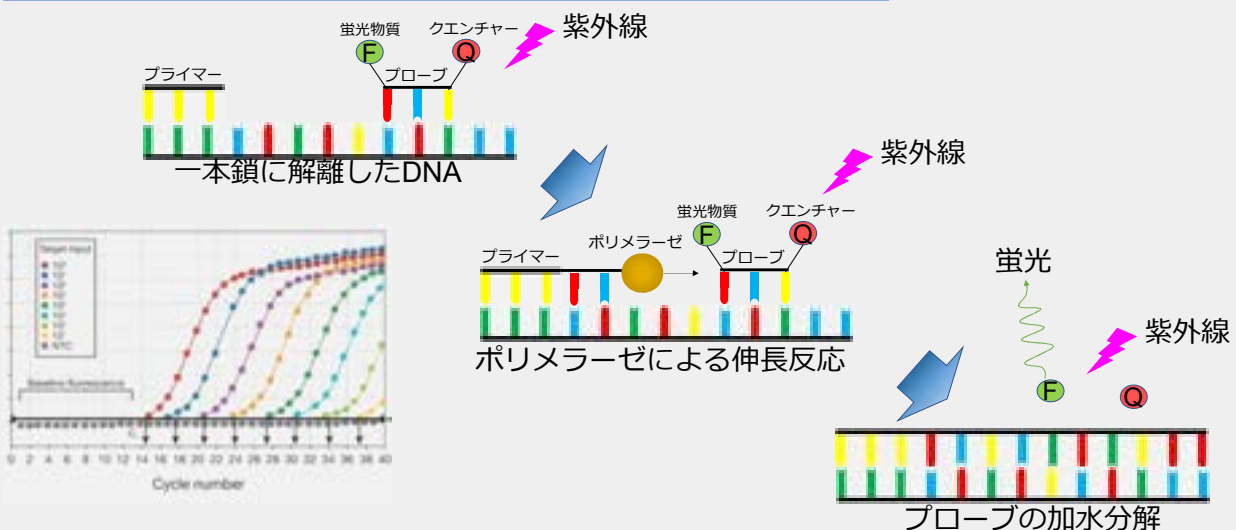


7

-種特異的調査手法の原理-

リアルタイムPCR(ハイブリダイゼーション法)

DNA配列に特異的に結合するプライマーとプローブを用いて、DNAの増幅を蛍光強度変化として定量する方法



8

-種特異的調査手法について-

環境DNA (eDNA) 動植物の排泄物、組織片などに由来する水中に存在するDNA断片

1リットルの水から、環境DNAを調べることで

環境DNAの有無から生物の存在を推定

環境DNAの量から生物量を推定



●種特異的調査手法

- ✓ 特定の種に対応した試薬(プライマープロブセット)を用いてリアルタイムPCR等で測定
- ✓ 試薬については対象種毎に設計することが必要
- ✓ 一定の濃度に調整した試料を使って検量線を書くことにより、DNA濃度を測定可能
- ✓ 一度に測定できるのは最大3種程度
- ✓ 分析までの工程が比較的簡単(やろうと思えば1日で分析可能)

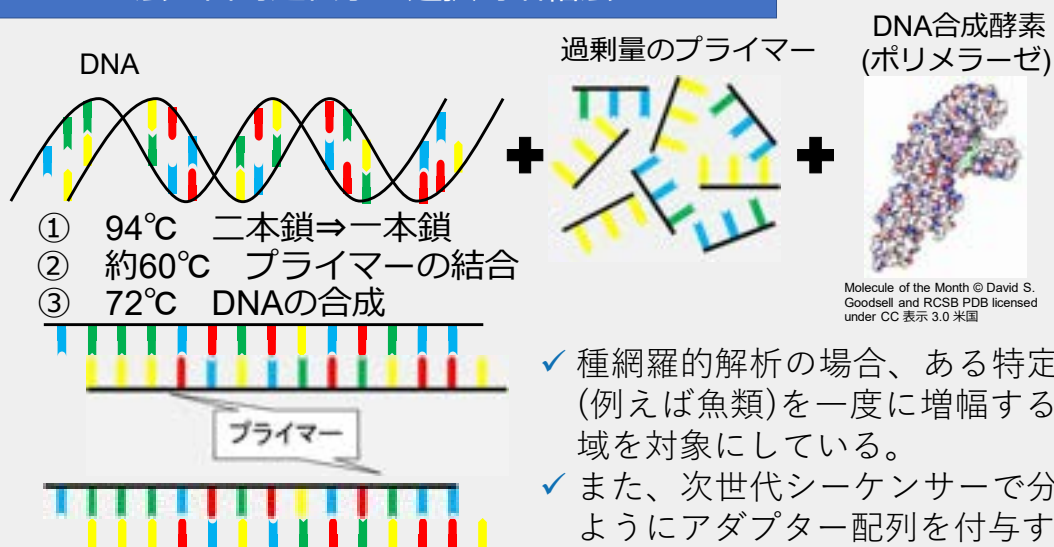


9

-種網羅的解析手法の原理-

PCR(polymerase chain reaction)法

PCR法：目的遺伝子の選択的増幅法



- ✓ 種網羅的解析の場合、ある特定の分類群(例えば魚類)を一度に増幅するような領域を対象にしている。
- ✓ また、次世代シーケンサーで分析できるようにアダプター配列を付与する。

10

-種網羅的解析手法の原理-

ライブラリー調整工程



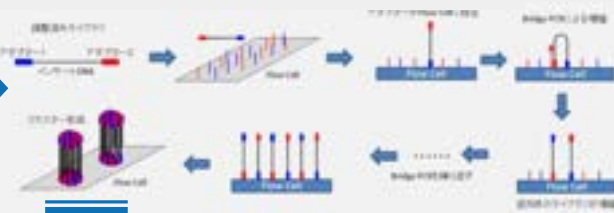
サーマルサイクラー 希釈・精製・調整

作るべき配列



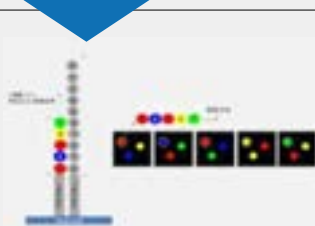
次世代シーケンサー内での工程

フローセル上にクラスターを形成



1塩基ずつ蛍光測定

- ✓ 測定方法については、色で判断する場合もあれば、発光パターンで判断する場合もある。



11

-種網羅的解析手法について-



●種網羅的調査手法

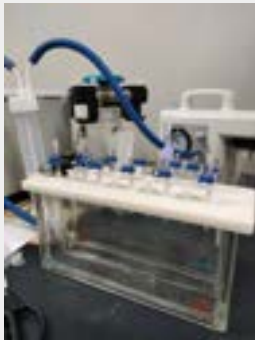
- ✓ 特定の分類群(例えば魚類)のDNAをまとめて増幅し、次世代シーケンサーで測定
- ✓ 多種を一度に測定可能
- ✓ DNA濃度の測定は種特異的調査手法より困難
- ✓ プライマーとのミスマッチにより増幅できない種が存在(例:MiFishプライマーにおけるスナヤツメ類等)
- ✓ 分析までの工程は比較的煩雑(急いでも丸4日くらいかかる)

<調査手順>



12

-DNA抽出①-



- ✓ ろ過を行ったステリベクスフィルターにはDNAの保存液が入っているので、この機械を使って、吸いだします。



- ✓ ステリベクスフィルターの中にDNAを溶かすための溶液を入れ、くるくる回してくれる機械を使って、フィルター面からまんべんなくDNAを溶出します。

13

-DNA抽出②-



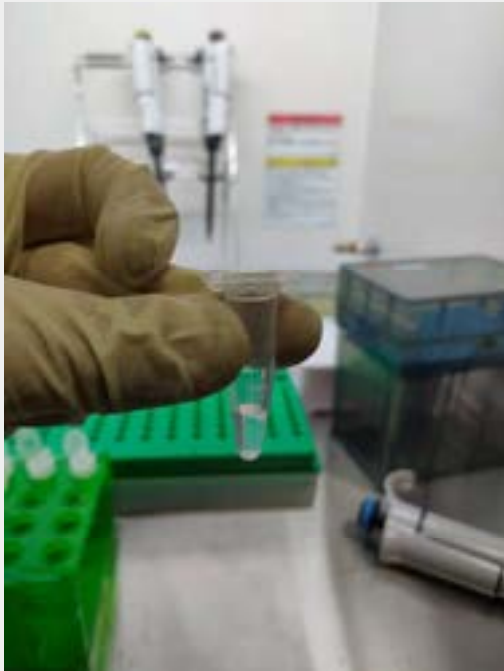
- ✓ DNA溶出液は遠心分離機を使ってステリベクスフィルターから取り出します。



- ✓ 取り出したDNA溶出液は左のようなフィルターがついたカラムを通すことでフィルターに吸着され、洗浄液などを使ってDNA以外の成分を洗い流します。
- ✓ 洗浄後、DNAを溶出できる液で溶出し、DNA抽出作業は終了します。

14

-DNA抽出③-



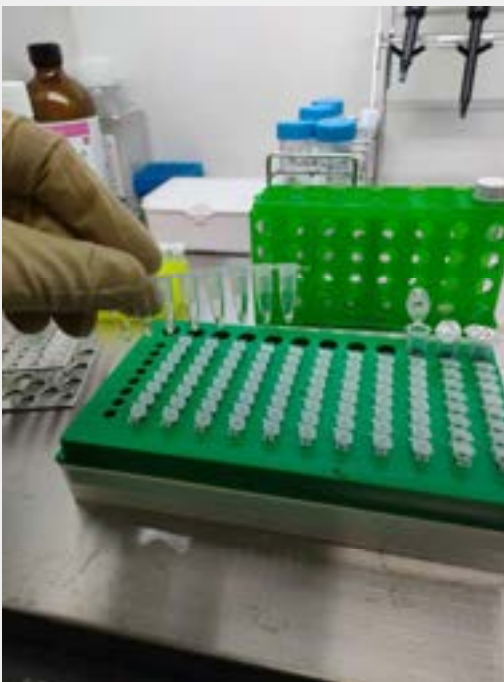
- ✓ 得られたDNA溶出液は右の図のとおり概ね200 μ L程度と非常に少量です。
- ✓ しかし、この中には今回分析する魚類のDNAだけでなく、昆虫類、両生類、場合によっては哺乳類、鳥類等様々な生物のDNAを含んでいます。
- ✓ このDNA溶出液は冷凍庫で長期間保存可能なので、現在の環境の生物情報を記憶した非常に貴重なサンプルとなります。

=生態系タイムカプセル



15

-PCR工程-



- ✓ PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)とは、DNA配列のうちある特定の領域を大量に増やす技術です。
- ✓ 左の図のとおり、DNA溶出液とDNAを合成してくれる酵素や合成をスタートさせる起点となるプライマーという試薬を混合し、熱をかけたり、冷やしたりすることで反応が進みます。
- ✓ この時の実験では魚類のある特定の配列のみを増やすプライマーを使用しています。

16

-精製・定量・希釈工程-



- ✓ PCR工程でちゃんと対象のDNA領域が増えているかどうか、また濃度はどの程度かというのを左の図の機械(Tapestation)で調べます。
- ✓ その結果、下の図のとおりある特定の長さのDNA(黒く帯になっているところ)がしっかりと増えているのが確認され、魚類のDNAが増えていることがわかります。
- ✓ なお、D2の欄は真っ白ですが、どうやらエラーを起こしたようで、再分析して問題ないことを確認しています。



17

-分析-

- ✓ 対象のDNA領域が増えていることが確認された後はサンプルの濃度を調整し、次世代シーケンサーで分析を行います。
- ✓ 分析はおおむね1日程度かかります。
- ✓ その後得られた配列と魚類のDNA配列とを比較して、調査地点にどのような生物が生息していたのかを判断します。



カラム

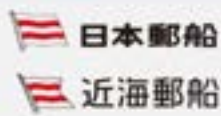
次世代シーケンサー

18

ここからは環境DNA技術の活用事例を紹介

19

-全国的な環境DNA調査網構築の動き-



2022 年 6 月 2 日

報道発表資料

東北大学大学院生命科学研究科／日本郵船株式会社／近海郵船株式会社
南三陸町／特定非営利活動法人アースウォッチ・ジャパン

バケツ一杯の水 から存在する生物の種類や分布が分かる！日本で生まれた調査手法

“世界初” 環境 DNA ビッグデータが生物多様性を見える化！

アネモネデータベース

生き物の天気図 を示すオープンデータ「ANEMONE DB」の運用開始

海運会社や市民による継続的な調査体制も確立し、生物多様性回復や漁業等の産業貢献へ

環境 DNA^{®1} を利用した生物多様性観測ネットワーク「ANEMONE^{®2}（アネモネ）」を主催する、東北大学大学院生命科学研究科 教授の近藤倫生と観測活動に参画してきた日本郵船株式会社と同社グループ会社の近海郵船株式会社、南三陸町、特定非営利活動法人アースウォッチ・ジャパンの4者は、環境 DNA を用いた魚類調査によるビッグデータ「ANEMONE DB」をオープンデータとして 2022 年 6 月 2 日から運用を開始することを発表します。

20

-ANEMONE DB(神奈川県データ)について-

Browse all MiFish metabarcoding samples of worldmesh 205339



- ✓神奈川県は内水面において最も環境DNA調査の実施件数が多い地域の一つ。
- ✓ぜひ東京都も頑張ってください。

23

-環境DNA技術はどんな活用方法ができるのか-

④ 活用例 (調査が簡単であるという特徴を生かした多地点調査)

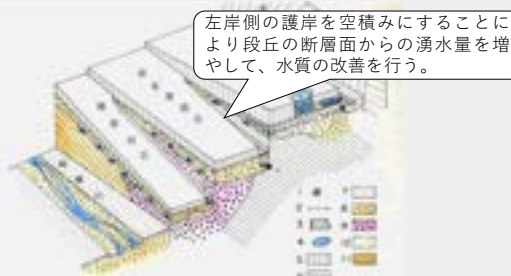
東北大学との共同研究「河川における自然浄化対策実施効果の生物学的な評価手法の開発(R4~R5)」

- 生態系による自然浄化機能を高める整備事業の例
＜厚木市恩曾川＞



川の流れに変化をつけることにより、水生生物が生息できる環境を創出し、自然浄化機能を高める。

- 水循環機能を高める整備事業の例
＜相模原市姥川＞



左岸側の護岸を空積みにより段丘の断面面からの湧水量を増やして、水質の改善を行う。

果たして事業実施場所において生物相・生態系はどのような変化を起こしたのか？



従来の捕獲による生物調査では大量のお金と時間をつぎ込めば、その変化を検出できるかもしれないが非現実的



簡単で安価な生物調査手法が必要→**環境DNA!!**



24

-環境DNA技術はどんな活用方法ができるのか-

④ 活用例(調査が簡単であるという特徴を生かした多地点調査)

東北大学との共同研究「河川における自然浄化対策実施効果の生物学的な評価手法の開発(R4~R5)」



- ✓ 事業実施地点と未実施地点計100地点の調査を実施し、事業の実施が生物多様性にどのような影響を及ぼしているのかを定量化するという試みを実施。
- ✓ 通常の捕獲調査でこれらを実施しようとすれば相当の労力がかかるが、環境DNA調査であれば、1ヶ月程度で現場調査が可能。



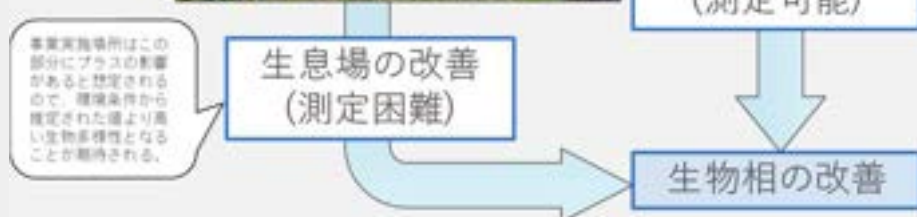
現場ろ過の様子

25

-環境DNA技術はどんな活用方法ができるのか-

④ 活用例(調査が簡単であるという特徴を生かした多地点調査)

東北大学との共同研究「河川における自然浄化対策実施効果の生物学的な評価手法の開発(R4~R5)」



- ✓ 水源事業が水質の改善と生息場の改善の両方に影響するのであれば、事業実施場所は水質から予測される生物指標よりも高い生物多様性を示すことが期待される。

26

-環境DNA技術はどんな活用方法ができるのか-

④ 活用例(調査が簡単であるという特徴を生かした多地点調査)

東北大学との共同研究「河川における自然浄化対策実施効果の生物学的な評価手法の開発(R4~R5)」

- ✓ 善明川のビオトープといった事業規模が大きいところでは、多様度指標が水質から予測される数値よりも高くなった。
- ✓ 生物量以外の多様度指標の差がマイナスとなった地点(赤枠)も存在したが、それらの地点の共通点として下流に堰が設置され、連続性が阻害されていた。
- ✓ 水源事業では対象地域の生物生息環境の改善を行うため生物量としては増加するものの、種数や多様度指数の改善のためには流域全体としての遡上阻害の要因を取り除く必要があることを示していると考えられた。

表 水質指標を用いて予測した多様度指標と実際の多様度指標の差

事業名	種数	シマンの多様度指標	シマンの多様度指標	生物量
善名川・ビオトープ前	13.4	0.423	0.180	63.0
善名川・善名町橋	5.59	0.372	-0.010	-0.41
善名川(遠流田)	-0.28	-0.207	-1.33	7.95
善名川(神田)	-0.17	-0.033	-2.38	35.2
相模川合流地点付近(八瀬田)	4.95	0.412	1.28	8.74
小瀬川合流地点(牛瀬田)	0.235	0.324	-0.156	-11.0
善名川	-0.002	-0.507	-1.35	9.29
下吉沢(善名川上流)	-2.60	-0.428	-2.12	15.3
善名川合流前	-0.603	-0.038	-0.180	67.4



27



KANAGAWA

ご清聴ありがとうございました



私たち一人ひとりの行動が、
未来につながる。

SDGs 未来都市 神奈川県



28