

環境DNAを用いた才井戸流周辺の動物種の子察的分析

黒川 景⁽¹⁾ 野呂 達哉⁽²⁾ 熊澤 慶伯⁽³⁾

⁽¹⁾ 愛知県立大学看護学部病理学 〒463-8502 愛知県名古屋市守山区上志段味東谷

⁽²⁾ 四日市大学環境情報学部環境情報学科 〒512-8512 三重県四日市市萱生町1200

⁽³⁾ 名古屋市立大学大学院理学研究科附属生物多様性研究センター 〒467-8501 名古屋市瑞穂区瑞穂町字山の畑1

Preliminary analysis of animal species around Saido-nagare Stream using environmental DNA

Kei KUROKAWA⁽¹⁾ Tatsuya NORO⁽²⁾ Yoshinori KUMAZAWA⁽³⁾

⁽¹⁾ Division of Pathology, Graduate School of Nursing and Health, Aichi Prefectural University, Tougoku Kamishidami, Moriyama-ku, Nagoya, Aichi 463-8502, Japan

⁽²⁾ Faculty of Environmental and Information Sciences, Yokkaichi University, 1200, Kayou-cho, Yokkaichi, Mie 512-8512, Japan

⁽³⁾ Research Center for Biological Diversity, Graduate School of Science, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8501, Japan

Correspondence:

Kei KUROKAWA E-mail: keikuro@nrs.aichi-pu.ac.jp

要旨

名古屋市守山区中志段味地区にある才井戸流は、市内に残された貴重な湧水地の一つであり、大都市近郊にありながら多様な生物が観察されるスポットとして知られる。近年、次世代シーケンシングによる環境DNAメタバーコーディングの分析手法が開発され、環境中に生息する生物種の特定に有用であることが示されている。そこで、才井戸流の水から抽出した環境DNAを用いて、流域の動物種を分析することを試みた。魚類分析用のプライマーセットであるMiFish-Uを用いた分析では、ドジョウ属、ミナミメダカ、タモロコが常時検出され、過去の才井戸流の生態調査の報告と概ね合致する結果が得られた。過去の生態調査では、希少種であるスナヤツメの生息が報告されているため、円口類分析用のプライマーセットMiFish-Lを用いた分析も試みたが、ポリメラーゼ連鎖反応による十分な増幅産物が得られなかった。哺乳類用のプライマーセットMiMammal-Uを用いた分析では、ドジョウ属、ミナミメダカ、タモロコといった魚類とともに、ニホンイタチ、ハツカネズミ、キクガシラコウモリが検出された。ニホンイタチとキクガシラコウモリは、名古屋市版レッドリスト2020で絶滅危惧 I A類に掲載されているが、それらの生息を強く支持するデータが得られた。環境DNAメタバーコーディングは、目視での生息調査を補完する継続的モニタリング手法として、今後より広く活用されることが期待される。

Saido-nagare Stream at Naka-Shidanmi district in Moriyama Ward, Nagoya City, is one of the valuable springs in the city where rich biodiversity has been maintained despite its location in the peripheral of the large city. In recent years, environmental DNA (eDNA) metabarcoding using the

受付日：2022年10月12日

受理日：2023年1月18日

next-generation sequencing has emerged and proved to be useful for identifying animal species living in the environment. Here, we analyzed animal species around Saido-nagare using eDNA extracted from the water of the stream. *Misgurnus* sp., *Oryzias latipes*, *Gnathopogon elongatus* were always detected using the primer set for fish analyses, MiFish-U. These results are consistent with previous reports on ecological surveys of Saido-nagare. Since past field surveys recognized *Lethenteron reissneri* as a rare aquatic species at Saido-nagare, we also attempted to detect this species by the eDNA approach using the primer set specific for lampreys, MiFish-L. However, we did not detect any amplification products by polymerase chain reaction using this primer set. The eDNA metabarcoding using the primer set for mammals, MiMammal-U, detected *Mustela itatsi*, *Mus musculus*, and *Rhinolophus ferrumequinum*, along with *Misgurnus* sp., *Oryzias latipes*, and *Gnathopogon elongatus*. *M. itatsi* and *R. ferrumequinum* are listed as Critically Endangered IA species in the Red List Nagoya 2020. The eDNA metabarcoding that can complement visual surveillance in the field will be more widely used for continuous monitoring of biodiversity.

序文

才井戸流は、名古屋市北東部、守山区中志段味の庄内川河畔に位置し、市内で最大級の湧水地の一つとして知られる。一部人の手の入った環境であるにもかかわらず、多様な生物の生息が知られ、調査や保全活動が行われている（土山ほか、2011；西ほか、2012）。

地域に生息する生物の調査は、現地でその生物を目視しつつ、可能ならば採取を行い、主に形態的特徴によって同定することが基本である。しかし、絶滅危惧種など個体数が減少した生物、夜行性あるいは飛翔性の生物、例えば才井戸流周辺の洞窟など立ち入り困難な場所に生息する生物の調査などは、必ずしも容易ではない。また、形態的特徴のみからは、生物種の同定が困難な場合もある。

従来からの形態による分類や、代謝などによる生化学分類とは全く異なる手法として、近年遺伝子による生物の分類技術が進歩してきている。その先駆的な業績の一つとして、Carl Woeseら（Woese and Fox, 1977）は、リボソームRNA（ribosomal RNA：rRNA）の塩基配列に注目し、生物を真正細菌（Bacteria）、古細菌（Archaea）、真核生物（Eukaryota）の三つのドメインに大別したことが知られている。リボソームは、細胞内でDNAから転写されたメッセンジャーRNA（mRNA）の情報をアミノ酸配列に変換しタンパク質を合成する細胞内小器官

であり、生物の分類群を超えて生命を維持するための細胞の基本的な機能を担っている。rRNAの塩基配列は、生物の進化の過程で変異を生じつつも、幅広い生物で高度に保たれていることから、rRNA遺伝子の塩基配列（真核生物では、核DNAにコードされる18S rRNA遺伝子またはミトコンドリアDNAにコードされる12S rRNA遺伝子の塩基配列）に基づく生物の系統的分類は汎用性の高い方法と認められている。

今日、米国（National Center for Biotechnology Information (NCBI)）、ヨーロッパ（European Bioinformatics Institute (EBI)）、日本（DNA Data Bank of Japan (DDBJ)）が連携して運営するInternational Nucleotide Sequence Database (INSD)をはじめとする公的な遺伝子データベースが公開され、遺伝子配列により生物種を同定する環境が整備されている。さらに近年、次世代シーケンシング（next generation sequencing：NGS）の技術により大量の塩基配列を高速に解読できるようになったことから、海洋や河川から採水してDNAを抽出し、12S rRNA遺伝子の部分塩基配列をNGSにより網羅的に解読することによって、周辺環境に生息する生物種や生物相を推定する環境DNAメタバーコーディングが開発されている（Miya et al., 2015; Ushio et al., 2017）。

本研究では、12S rRNA 遺伝子を用いた環境DNAメ

タバーコーディングが、才井戸流周辺に生息する魚類や哺乳類等を検出するのに適した方法であると考え、この方法を導入した調査を実施した。

材料および方法

1) 調査地点および調査日

才井戸流の下流には守山高等学校の敷地がある。流域の生物に由来するDNAが集まることを想定し、高等学校の手前で安全に採水できる地点を主要な調査地点に選んだ(図1, A地点)。

才井戸流の南側は、庄内川の河岸段丘となっており、段丘の上に神社がある。そこから才井戸流に向かって下降する斜面は雑木林および竹林になっているが、その中腹に、音声モニタリングによる調査でキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*) の音声を確認した洞窟がある(野呂, 2019, 2020a, 2020b)。洞窟は、由来がはっきりしないが人の手で掘られたものと考えられ、

音声モニタリングによる調査では、キクガシラコウモリの発するFM/CF/FM型の音声が検出されている。しかし、洞窟の入り口が土砂に埋まり人が入れるだけの十分なスペースはなく(図1, B地点)、今のところ洞窟から出巢するキクガシラコウモリを直接目視したり捕獲を行うには至っていない。そこで、この洞窟からしみ出し出口に貯留している水を調査の対象に加えた。洞窟からの水も、斜面を伝って才井戸流に流入するものと考えられる。

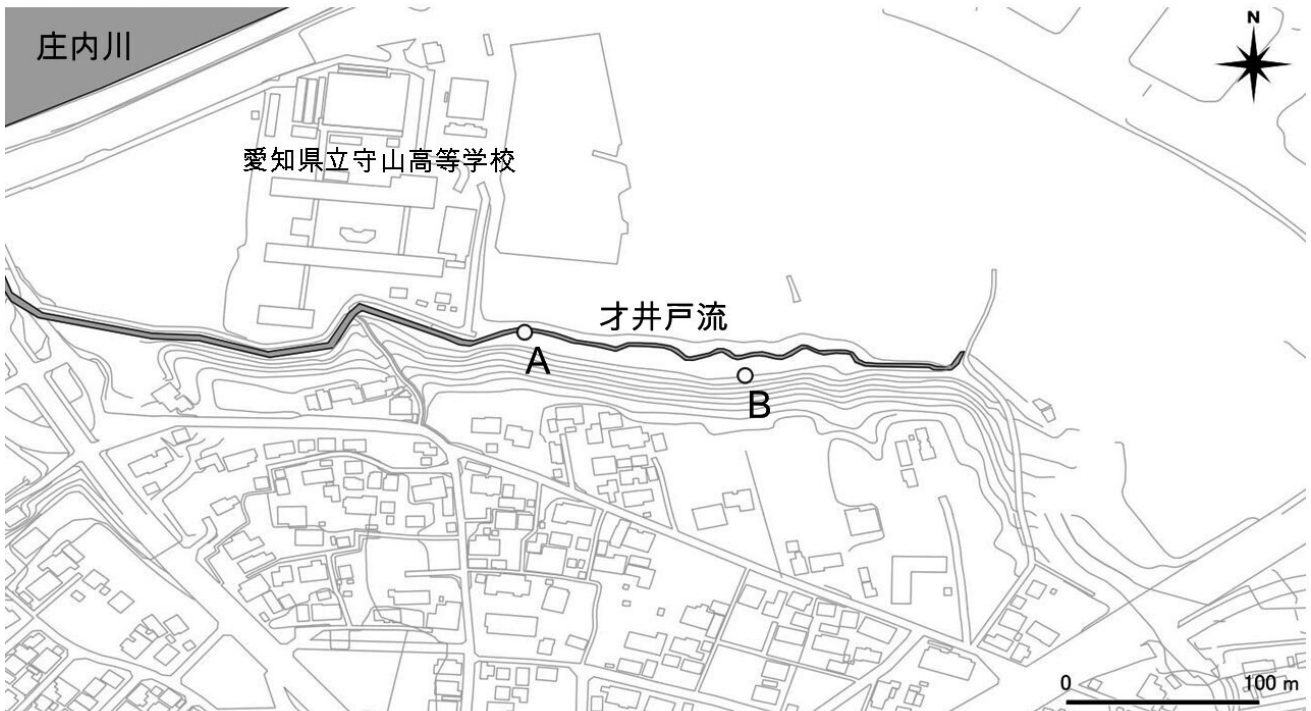
A, Bそれぞれの地点で、採水を3度ずつ実施した。A地点では、2021年7月21日(サンプル1), 11月26日(サンプル2), 2022年3月17日(サンプル3)に、B地点では、2020年10月12日(サンプル4), 2021年8月11日(サンプル5), 2022年3月17日(サンプル6: サンプル3と同日)に採水した。採水地点の写真を示す(図2: A地点, 図3: B地点, いずれも2022年3月17日撮影)。なお、野生での生息数が少ない希少種を確実に検出する

図1. 採水地点

A: 才井戸流の守山高等学校手前の地点, B: キクガシラコウモリが生息すると考えられる洞窟の前

Fig. 1. Localities for collected water samples

A: Saido-nagare Stream in front of Moriyama High School, B: In front of a cave presumably inhabited by *Rhinolophus ferrumequinum*.



目的には、一度の調査で反復採水を行い複数回のNGS解析を並行して行うことが推奨されているが（環境省自然環境局生物多様性センター, 2022）、本研究においては、労力や予算の制約もあり、予察的検討として反復採水は行わなかった。

図2. A地点の風景

画面の右上方に高等学校の建物の一部が見える。2022年3月17日撮影。

Fig. 2. View of locality A

Part of the high school building can be seen in the upper right of the image. Photographed on March 17, 2022.



図3. B地点の風景

岩盤に人の手で掘られたと思われる洞窟。入り口が土砂で埋もれつつあり、中の様子は見えない。2022年3月17日撮影。

Fig. 3. View of locality B

The cave seems to have been dug by human hands in the bedrock. The entrance is being filled with earth and sand, and the inside is not visible. Photographed on March 17, 2022.



2) 環境DNAの抽出

採取した水から、環境DNA学会の「環境DNA調査・実験マニュアルVer.2.2」（一般社団法人環境DNA学会, 2020）に従ってDNAの抽出を行った。採水した水500 ml に対し、DNAの分解を防止するために現地で10%塩化ベンザルコニウム500 μ lを添加し混和、クールボックスで保冷し実験室に運搬した。水をフィルター（STERIVEX HV 0.45 μ m FILTER UNIT, Millipore）に通した後、環境DNAを含むフィルター付着物からDNAを抽出キット（DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen）を用いて抽出した。まず、フィルターユニット内にproteinase K 20 μ l, AL溶液200 μ l, phosphate buffer saline (PBS) 240 μ lを添加し、ゆっくり攪拌しながら56°C 20分加温し、タンパク質成分を分解した。フィルターユニット内のDNAを含む液を回収し、DNA抽出キットのカラムで精製、抽出した。得られたDNA溶液は、次項のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施するまで、-20°Cで保管した。

3) 環境DNAからの塩基配列データの取得

次世代シーケンシングのためのアダプター配列の付加を、イルミナ社のプロトコールに従って行った。A地点のサンプルに対しては、魚類を検出するために設計されたプライマーセットMiFish-U (Miya et al., 2015) と、哺乳類を検出するために設計されたプライマーセットMiMammal-U (Ushio et al., 2017) を用いた。また、1997~1998年の調査で、才井戸流ではスナヤツメ (*Lethenteron reissneri*) の生息が報告されているが（土山ほか, 2010）、円口類は一般的な魚類用のプライマーセットであるMiFish-Uでは検出が困難と報告されているため、円口類用に設計されたプライマーセットMiFish-L（環境省自然環境局生物多様性センター, 2020）を用いた。B地点のサンプルに対しては、MiMammal-Uのみで分析を行った。

各地点の採取日毎のDNAサンプルを鋳型として、上記プライマーで第一段階のPCRを、KOD-Plus-Neo (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いた50 μ lの反応系で35サイクル行った（熱変性：98°Cで10秒、アニーリング：65°Cで30秒、伸長反応：68°Cで20秒）。得られた各サンプルのPCR産物に、サンプル識別のためのインデックス配列を付加するプライマーを用い、第二段階のPCRを、

KOD-Plus-Neoを用いた50 µlの反応系で12サイクル行った (熱変性: 98°Cで10秒, アニーリング: 60°Cで30秒, 伸長反応: 68°Cで30秒). PCR後の各DNAサンプルの濃度を, Qubit dsDNA HS Assay Kits (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) を用いたQubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) による蛍光測定で定量し, Illumina社 (San Diego, CA, USA) のプロトコールに従って, アンプリコン用DNAライブラリーを調製した. 続いてIllumina MiSeq次世代シーケンサーによるMiSeq Regent Micro Kit v2を用いた150塩基のpaired-endシーケンスにより, DNA塩基配列データを大量に取得した. 取得したリード数は, 各サンプルあたり552,708~1,568,264リードであった (表1). NGSにより決定した塩基配列データは, 表1に記したアクセッション番号で, DDBJ Sequence Read Archive (DRA) に登録されている.

4) 塩基配列データの解析

得られたNGSのDNA配列データは, MiFish pipeline (Sato et al., 2018) を参照し, バージョンアップした最新のデータベースや, 新たに報告された同等以上の機能を持つプログラムも導入して解析を行った. 解析のパイプラインは以下の通りである.

(1) クオリティーチェック

SolexaQA++ dynamictrim (Cox, Peterson and Biggs, 2010) を用い, Phred quality score 10以上を配列データとして選別した.

(2) ペアリング

MiSeqで5'側から読み取った配列のファイルと, 3'側から読み取った配列のファイルのデータを, FLASH2 (Magoč and Salzberg, 2011) を用いて結合した.

(3) DNA配列長の選別

SolexaQA++ length sort (Cox, et al., 2010) を用い,

表1. 環境DNA解析に用いられた水の採集地点と検出された動物種の概要

Table 1. Localities for collected water samples and major animal species detected by the eDNA metabarcoding

採集地点/ Locality	採集時期/ Collected date	DRAアクセッション番号/ DRA accession numbers ¹	取得したリード数/ Number of raw reads	高品質のリード数/ Number of high quality reads	検出された動物種の概要/ Major animal species detected
地点A 守山高等学校手 前の才井戸流 GPS: 北緯35.2510, 東経137.0243	2021年7月21日	DRR413622 DRR413625	794548/1568264 ²	353196/357238 ²	魚類: ドジョウ属, タモロコ, ミナミメダカ, ブルーギル, ギンブナ 哺乳類: ヒト, ニホンイタチ, ハツカネズミ, キクガシラコウモリ
	2021年11月26日	DRR413623 DRR413626	746022/552708 ²	303017/125792 ²	魚類: ミナミメダカ, ドジョウ属, タモロコ 哺乳類: ヒト, ニホンイタチ, キクガシラコウモリ 鳥類: ウグイス属, ホオジロ属
	2022年3月17日	DRR413624 DRR413627	588734/1427754 ²	135627/107592 ²	魚類: ドジョウ属, タモロコ, ミナミメダカ 哺乳類: キクガシラコウモリ
地点B 才井戸流南側斜 面の洞窟前の貯 留水 GPS: 北緯35.2508, 東経137.0255	2020年10月12日	DRR413628	987244	370118	哺乳類: キクガシラコウモリ, ヒト
	2021年8月11日	DRR413629	699156	240052	哺乳類: キクガシラコウモリ
	2022年3月17日	DRR413630	681844	218386	哺乳類: キクガシラコウモリ, アライグマ, ハツカネズミ

¹ NGSで得られた生塩基配列データのDDBJ Sequence Read Archive登録情報

² 斜線の左側にMiFish-Uを用いた解析の値, 斜線の右側にMiMammal-Uを用いた解析の値を示す
地点Bの分析には, MiFish-Uを用いず, MiMammal-Uプライマーセットのみを用いていることに注意

¹ DDBJ Sequence Read Archive accession numbers for raw sequence data obtained

² Values to the left and right of a slash stand for read numbers obtained with MiFish-U and MiMammal-U primers, respectively
Note that only MiMammal-U primers (and not MiFish-U primers) were used for the analysis of locality B

ペアリング後のDNA配列長のうち、200塩基以上を選別した。

(4) アダプター配列の除去

アダプター配列を Cutadapt (Martin, 2011) を用い除去した。この操作により得られた配列が、クラスター化前の高品質リードに相当する。

(5) データのクラスター化

VSEARCH cluster (Rognes et al. 2016) を用い、99%以上の塩基配列類似度のある配列をクラスター化した。

(6) キメラ配列の除去

VSEARCH uchime (Rognes et al. 2016) を用い、キメラ配列の除去操作を行った。

(7) 生物種の同定とリード数のカウント

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) のインストール版 (BLAST+ 2.13.0) を用い、ミトコンドリア

遺伝子配列のデータセット mito (2022年7月13日版, <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>) を参照データベースとして、クラスター化を行った後のデータに対し12S rRNAの配列による生物種の検索を行った。DNAの配列長は、アダプター配列を除去した分を加味し、150塩基以上を選別した。クラスター化されたデータより同定した生物種について、クラスター化を行う前の高品質リードの数をカウントした。1つのリードに対して検索される生物種のうち、照合したデータベース配列とのアライメント長が長く、塩基配列の一致率の高い配列を優先して選択し、生物種の分析結果とした。少ないリード数の生物種でも、十分なアライメント長と塩基配列類似度があれば、検出された生物種として検討対象としたが、5リードに満たない生物種は対象外とした。

表2. A地点から2021年7月21日に得たサンプル1の環境DNA解析で検出された動物種とNCBI RefSeqデータベース上の登録配列とのマッチング

Table 2. Animal species detected by the eDNA analysis of Sample 1 collected from Locality A on July 21, 2021 and matching to the registered sequences at the NCBI RefSeq database

プライマー/ Primer	NCBI RefSeq アクセッション 番号/ NCBI RefSeq accession No.	学名/Scientific name	リード数/ Number of reads	リードの割合 (%) ¹ / Percentage of reads ¹	アライメント長 (bp)/ Alignment length (bp)	塩基配列類似度 (%)/ Nucleotide sequence similarity (%)
MiFish-U	NC_022854.1	<i>Misgurnus bipartitus</i>	100932	28.6	222	97.3
	NC_008649.1	<i>Gnathopogon elongatus</i>	95055	26.9	226	99.1
	NC_043847.1	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> と <i>Misgurnus bipartitus</i> の交雑種	38672	10.9	174	98.9
	NC_004387.1	<i>Oryzias latipes</i>	38219	10.8	189	97.4
	NC_015984.2	<i>Lepomis macrochirus</i>	11400	3.2	193	97.4
	NC_002079.1	<i>Carassius langsdorfii</i>	7195	2.0	173	99.4
MiMammal-U	NC_012920.1	<i>Homo sapiens</i>	90463	25.3	222	99.6
	NC_034330.1	<i>Mustela itatsi</i>	72630	20.3	214	100.0
	NC_022854.1	<i>Misgurnus bipartitus</i>	48019	13.4	172	97.1
	NC_008649.1	<i>Gnathopogon elongatus</i>	39339	11.0	222	99.1
	NC_043847.1	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> と <i>Misgurnus bipartitus</i> の交雑種	38885	10.9	219	97.7
	NC_004387.1	<i>Oryzias latipes</i>	7009	2.0	191	97.4
	NC_006914.1	<i>Mus musculus</i>	60	0.0	170	100.0
	NC_020326.1	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	10	0.0	168	100.0

¹ 該当するリード数の高品質リード数 (MiFish-Uの解析は353196リード, MiMammal-Uの解析は357238リード) に対する割合を示す

¹ Percentage of the corresponding read numbers among high-quality reads obtained (353196 reads by MiFish-U analysis and 357238 reads by MiMammal-U analysis)

表3. A地点から2021年11月26日に得たサンプル2の環境DNA解析で検出された動物種とNCBI RefSeqデータベース上の登録配列とのマッチング

Table 3. Animal species detected by the eDNA analysis of Sample 2 collected from Locality A on November 26, 2021 and matching to the registered sequences at the NCBI RefSeq database

プライマー/ Primer	NCBI RefSeq アクセッション 番号/NCBI RefSeq accession No.	学名/Scientific name	リード数/ Number of reads	リードの割合 (%) ¹ / Percentage of reads ¹	アラインメント長 (bp)/ Alignment length (bp)	塩基配列類似度 (%)/ Nucleotide sequence similarity (%)
MiFish-U	NC_004387.1	<i>Oryzias latipes</i>	149233	49.2	215	98.6
	NC_022854.1	<i>Misgurnus bipartitus</i>	62122	20.5	172	97.1
	NC_008649.1	<i>Gnathopogon elongatus</i>	54758	18.1	226	99.6
	NC_043847.1	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> と <i>Misgurnus bipartitus</i> の交雑種	7939	2.6	174	98.3
	NC_053103.1	<i>Horornis sp.</i>	2095	0.7	181	97.2
	NC_012920.1	<i>Homo sapiens</i>	1911	0.6	194	98.5
	NC_034330.1	<i>Mustela itatsi</i>	10	0.0	193	99.0
MiMammal-U	NC_004387.1	<i>Oryzias latipes</i>	60255	47.9	208	98.1
	NC_022854.1	<i>Misgurnus bipartitus</i>	22195	17.6	172	97.1
	NC_008649.1	<i>Gnathopogon elongatus</i>	2032	1.6	177	100.0
	NC_021445.1	<i>Emberiza sp.</i>	137	0.1	182	100.0
	NC_043847.1	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> と <i>Misgurnus bipartitus</i> の交雑種	8	0.0	193	98.4
	NC_020326.1	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	5	0.0	168	100.0

¹ 該当するリード数の高品質リード数 (MiFish-Uの解析は303017リード, MiMammal-Uの解析は125792リード) に対する割合を示す

¹ Percentage of the corresponding read numbers among high-quality reads obtained (303017 reads by MiFish-U analysis and 125792 reads by MiMammal-U analysis)

表4. A地点から2022年3月17日に得たサンプル3の環境DNA解析で検出された動物種とNCBI RegSeqデータベース上の登録配列とのマッチング

Table 4. Animal species detected by the eDNA analysis of Sample 3 collected from Locality A on March 17, 2022 and matching to the registered sequences at the NCBI RegSeq database

プライマー/ Primer	NCBI RefSeq アクセッション 番号/NCBI RefSeq accession No.	学名/Scientific name	リード数/ Number of reads	リードの割合 (%) ¹ / Percentage of reads ¹	アラインメント長 (bp)/ Alignment length (bp)	塩基配列類似度 (%)/ Nucleotide sequence similarity (%)
MiFish-U	NC_022854.1	<i>Misgurnus bipartitus</i>	56348	41.5	218	97.7
	NC_008649.1	<i>Gnathopogon elongatus</i>	41149	30.3	224	100.0
	NC_004387.1	<i>Oryzias latipes</i>	25798	19.0	214	98.6
MiMammal-U	NC_022854.1	<i>Misgurnus bipartitus</i>	40582	37.7	172	97.7
	NC_004387.1	<i>Oryzias latipes</i>	4549	4.2	168	98.8
	NC_043847.1	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> と <i>Misgurnus bipartitus</i> の交雑種	1423	1.3	174	98.3
	NC_016191.1	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	43	0.0	168	100.0

¹ 該当するリード数の高品質リード数 (MiFish-Uの解析は135627リード, MiMammal-Uの解析は107592リード) に対する割合を示す

¹ Percentage of the corresponding read numbers among high-quality reads obtained (135627 reads by MiFish-U analysis and 107592 reads by MiMammal-U analysis)

結果

水の各採集地点、各採集日にて検出された動物種の概要を表1に示す。また、各サンプルから得られた環境DNAの解析結果を、表2～5に示す。Blast+による解析で用いたミトコンドリア遺伝子配列のデータセットmitoには、動物種に対応してNCBIのReference Sequence (RefSeq) アクセッション番号が登録されているため、表2～5にはサンプルの解析結果として得られた動物種の学名とRefSeq アクセッション番号を表示し、それぞれのリード数およびサンプル毎の高品質リード数に対する割合、アライメント長の最大値および塩基配列類似度を含む詳細な解析結果を記載した。円口類用のMiFish-Lのプライマーセットに関しては、いずれのサンプルにおいても十分量のPCR産物が得られず、データを取得できなかった。

A地点で、夏にサンプル1、秋にサンプル2、初春にサンプル3を採取した。MiFish-Uプライマーによる魚類の検出については、リード数の順位の変動はあるものの、ドジョウ属 (*Misgurnus*)、タモロコ (*Gnathopogon elongatus*)、ミナミメダカ (*Oryzias latipes*) がいずれのサンプルにも検出された。水温のまだ低い初春には、

これら3種(属)のみが検出されたが、夏にはさらにブルーギル (*Lepomis macrochirus*)、ギンブナ (*Carassius langsdorfii*) が検出された。MiMammal-Uのプライマーは、MiFish-Uで検出される魚類とともに、概ね哺乳類を効率よく検出している。サンプル1で、ヒト (*Homo sapiens*)、ニホンイタチ (*Mustela itatsi*) が多数リード、ハツカネズミ (*Mus musculus*) が少数リード検出された。一方、サンプル2、3では、これらはいずれも少数のリードのみの検出にとどまるか、検出されなかった。キクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*) は、3回とも少数のリードが検出された。

今回の環境DNAの分析では、サンプル2から鳥類も検出された。MiFish-Uのプライマーによりウグイス属 (*Horornis* sp.) が、同じくサンプル2からMiMammal-Uのプライマーによりホオジロ属 (*Emberiza* sp.) が、それぞれ少数リード検出された。

一方、B地点では一貫してキクガシラコウモリが多数リード検出された。サンプル4ではヒト、サンプル6ではアライグマ (*Procyon lotor*)、ハツカネズミも検出された。

表5. B地点から得たサンプル4-6のMiMammal-Uプライマーを用いた環境DNA解析で検出された動物種とNCBI RefSeqデータベース上の登録配列とのマッチング

Table 5. Animal species detected by the eDNA analysis using the MiMammal-U primer of Samples 4-6 collected from Locality B and matching to the registered sequences at the NCBI RefSeq database

サンプル (採集日)	NCBI RefSeq アクセッション 番号/NCBI RefSeq accession No.	学名/ Scientific name	リード数/ Number of reads	リードの割合 (%) ¹ / Percentage of reads	アライメント長 (bp)/ Alignment length (bp)	塩基配列類似度 (%)/ Nucleotide sequence similarity (%)
サンプル4 (2021年 7月21日)	NC_020326.1	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	290320	78.4	221	100.0
	NC_012920.1	<i>Homo sapiens</i>	73164	19.8	221	99.1
サンプル5 (2021年 11月26日)	NC_020326.1	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	235254	98.0	218	100.0
サンプル6 (2022年 3月17日)	NC_020326.1	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	138107	63.2	220	100.0
	NC_009126.1	<i>Procyon lotor</i>	42702	19.6	167	98.2
	NC_006914.1/ NC_010339.1	<i>Mus musculus</i>	28087	12.9	198	97.5

¹ 該当するリード数の高品質リード数 (サンプル4-6について、それぞれ370118リード、240052リード、218386リード) に対する割合を示す

¹ Percentage of the corresponding read numbers among high-quality reads obtained (370118 reads, 240052 reads, and 218386 reads for Samples 4-6, respectively)

考察

調査方法について

本研究では、名古屋市最大の湧水地であり、希少な動物種の生息が期待できる守山区才井戸流流域の2地点から環境水を採取し、環境DNAによる生息動物種の検出を試みた。当地域の動物調査は、これまで目視による個体確認やセンサーカメラ撮影、トラップによる捕獲、足跡・糞等による痕跡、コウモリ類が発する音声などの分析によって行われてきた(野呂, 2019, 2020a, 2020b)。しかし、コウモリ類やイタチ類などは夜行性のため目視確認が難しく、また、同所的に近縁種が分布するために区別が困難な動物の場合、これらの手法だけではなかなか確実な生息データを得づらいう問題点があった。また、才井戸流の水圏内に生息する魚類については、魚類自体の数が少なく、採集だけでは詳細な魚類相を把握できないという課題があった。

本研究では、筆者らが知る限りおそらく初めて、才井戸流周辺の動物相調査を環境DNAの手法で行い、名古屋市版レッドリスト2020(名古屋市, 2020)において絶滅危惧I A類に掲載されているキクガシラコウモリやニホンイタチなどの生息に関して確度の高い生息情報を提供することができた。このように、コウモリ類については、今後、音声モニタリングと環境DNAの手法を併用することによって、より信頼性の高い結果を得ることができると考えられる。また、今回の洞窟のように、入口が狭く、調査者が容易に進入できないような場合や調査者の侵入がコウモリ類に極度のストレスを与えてしまうといった状況においても、水から採取でき、非侵襲的な環境DNAの手法は非常に有効であると考えられる。ただし、本研究では、分析した地点の数が2地点と少なく、また反復採水などの手法も用いていないため、才井戸流周辺の動物相を網羅的に調べたわけではない。現時点では、あくまで予察的な定性種分析を行った段階だと考えている。今後は、今回の成果を踏まえて、より計画的に定期的かつ定量的な環境DNAによる動物相のモニタリング調査を実施し、レッドリスト作成の基となる絶滅危惧種の生存情報に繋げていくことが期待される。

ミトコンドリアDNAにコードされる12S rRNAの配列による生物種の同定は、真核生物全般にわたって広く用いられる方法であるが、データベースに登録されてい

ない種、亜種については、近縁種についての示唆は得られるものの、完全な同定には至らないという限界がある。特に、地域固有の種、亜種については、登録が進んでいないことが指摘されている(Alam et al., 2020)。従って、環境DNAの12S rRNAによる分析結果を、地域の生態系に生息する動物種に即して確認、検証することが必要である。公的遺伝子データベースに登録されていない地域固有の種、亜種については、生息数の少ない種や捕獲が困難な種については不可能な場合もあるが、DNA分析が可能な個体や博物館標本などが得られれば12S rRNA領域の配列の解読、データベースへの登録が望まれる。

才井戸流に生息する魚類について

3回の調査を通して、ドジョウ属、タモロコ、ミナミメダカが検出されることが確認され、常時安定して生息していることが示唆される。また、夏には検出される種が増え、ブルーギル、ギンブナも検出された。これらは、水温の低い3月には検出されなかったが、季節による個体数の変化を反映している可能性もある。

才井戸流に生息するドジョウ属の詳細については、本研究のように短い指標配列を用いたBlast+解析の精度には限界があり、実際の才井戸流における捕獲調査により遺伝子を含めた種の検討が望まれる。コイやフナの仲間についても、アライメント長が最も長く、かつ塩基配列類似度が最も高いギンブナを結果として示したが、塩基配列類似度がやや低くなるものの、同じ配列からコイ属やフナ属の交雑種を含めた種が検索されており、実際に捕獲調査を行って結果を照合する必要があるものと考えられる。

今回、1990年代後半に才井戸流で生息が確認されていたスナヤツメの検出も試みた。円口類は一般的な魚類用のプライマーであるMiFish-Uでは検出が困難と報告されており、円口類用に設計されたプライマーを用いたが(環境省自然環境局生物多様性センター, 2020)、NGSで分析可能な量のアンプリコンDNAを得ることができなかった。スナヤツメは環境省レッドリスト2020絶滅危惧II類(環境省, 2020)、名古屋市版レッドリスト2020絶滅危惧IA類(名古屋市, 2020)であり、才井戸流での現時点での絶滅が危惧され、追加的な調査が望まれる。

才井戸流流域の哺乳類、鳥類について

才井戸流に生息する魚類に比し、周辺流域に生息、あるいは出現する哺乳類、鳥類については、サンプル毎に検出される種やリード数の変動がみられた。飲水や水浴び等、流域の水系との接触がより濃厚になった場合に、検出リード数が増加するものと考えられる。一方、才井戸流の流域の洞窟に生息するキクガシラコウモリについては、洞窟出口の水から多数のリードが検出されるとともに、才井戸流の下流地点からも、3回の調査で一貫して少数のリードが確認された。以上より、哺乳類については、流域をめぐらして生息するコウモリ類の場合には、安定して検出されるものの、流域に近づいたり遠ざかったりして移動する動物種については、採水時期により検出リード数が大きく変動することが考えられる。今回の環境DNAによる調査では、後述するように、才井戸流流域で過去に生息が確認されている哺乳類で情報の得られなかった種がある。また、一部サンプルで鳥類が検出されたが、渡りなど季節による移動を含め網羅的な調査を実施するためには、調査地点を増やすとともに、反復採水を行うことの必要性を示している。調査には、労力や予算の制約が生じるが、生態学的に重要な意味を持つ生物種が生息する、あるいは観察される地点については、重点的に繰り返し調査に取り組むことによって、貴重なデータが得られることが期待される。

才井戸流流域では、1990年代にニホンイタチの生息が確認されたという記録があるが(高田, 2002)、近年、名古屋市内では外来種のシベリアイタチ (*M. sibirica*) が圧倒的に多く生息しているのが確認されている(野呂, 2015)。今回の環境DNAの12S rRNAによるメタバーコーディングでは、アライメント長214塩基、塩基配列類似度100%で *M. itatsi* として検出されている。一方、NGSの同じリードから *M. sibirica* も検索されているが、アライメント長214塩基で塩基配列類似度が97.20%と *M. itatsi* よりも低値であった。DNA塩基配列の類似度に基づけば、才井戸流流域は名古屋市内で現在もニホンイタチが生息している貴重な環境であることが示唆された。今後、才井戸流周辺域にニホンイタチが生息しているかどうか確認するための捕獲調査が望まれる。その他の哺乳類については、今回の環境DNAの調査でアライグマ、ハツカネズミが検出された。アライグマが検出されたこ

とは外来種のモニタリングに関して環境DNAの手法が有効であることを示している。また、アライグマやニホンイタチの検出は、頻繁に水辺で活動する動物が検出されやすいことを示唆している。一方、才井戸流においては、過去にアカギツネ (*Vulpes vulpes*)、タヌキ (*Nyctereutes procyonoides*)、イエネコ (*Felis catus*)、ヌートリア (*Myocastor coypus*)、アカネズミ (*Apodemus speciosus*)、カヤネズミ (*Micromys minutus*)、ニホンジネズミ (*Crocidura dsinezumi*)、コウベモグラ (*Mogera wogura*) といった多種の哺乳類が確認されているが(野呂, 未発表)、これらの哺乳類が環境DNAによる調査を重ねることによって検出されるかどうか、今後この地域の生息調査を継続していく上で検討する価値のある課題である。

MiFish-UおよびMiMammal-Uのプライマーは、もとも魚類および哺乳類を対象として設計されているが、今回の調査では、少数のリードながら鳥類も検出された。このうち、ウグイス属については、データベース上はスダウグイス (*H. vulcanius*) として検出された(アライメント長181塩基、塩基配列類似度97.24%)。スダウグイスは、インドネシア、マレーシア、フィリピンに生息するウグイスの仲間で、日本には生息しない種であるが、才井戸流周辺域に生息するウグイスを検出したものと判断するのが妥当と考えられた。GenBankにおける日本のウグイス (*H. diphone*) のDNA配列の登録状況を検討したところ、ミトコンドリアDNAにコードされる遺伝子のうち、cytochrome *b* 遺伝子は登録されているが、12S rRNA 遺伝子の塩基配列は登録されていない。したがって、現状の遺伝子データベースで日本のウグイスを確認するためには、cytochrome *b* 遺伝子による分析を行う必要がある。ホオジロ属については、データベースによる分析ではアオジ (*E. spodocephala*)、シマアオジ (*E. aureola*)、シマノジコ (*E. rutila*) の3種がアライメント配列長182塩基、塩基配列類似度100%の同配列として検出された。このうち、本州中部で見つかる可能性の高い種はアオジと考えられるが、才井戸流で実際に飛来が観察できるかどうかの情報が望まれる。

鳥類の12S rRNAメタバーコーディングのために設計されたプライマーとしては、MiBird (Ushio et al., 2018) が報告されている。今回は鳥類についての調査を計画し

ていなかったため、MiBirdによるメタバーコーディングは実施しなかった。MiFish-U、MiMammal-U、MiBird-Uの3'側のプライマー配列は共通であり、5'側のプライマー配列が異なる。また、スダウグイス (*H. vulcanius*, アクセション番号NC_053103.1) とアオジ (*E. spodocephala*, アクセション番号NC_021445.1) の5'側のプライマー配列に対応する配列の違いは1塩基のみである。今回、ウグイス属がスダウグイスとしてMiFish-Uで、ホオジロ属がアオジとしてMiMammal-Uで検出されたが、スダウグイスについては、MiFish-Uのプライマー配列との類似度がMiMammal-Uとの類似度を上回り (85.7% 対 82.6%)、アオジについては、MiFish-Uとの類似度がMiMammal-Uとの類似度を下回る (81.0% 対 87.0%) ことが影響しているものと考えられた。鳥類の検出用に設計されていないMiFish-UおよびMiMammal-Uのプライマー配列との類似度は、いずれも90%未満であるが、今回のように鳥類が偶然検出される場合には、わずかな塩基配列の違いによりMiFishで検出されやすい種とMiMammalで検出されやすい種があることが示唆された。

結語

才井戸流に生息する生物種を、環境DNAの12S rRNAメタバーコーディングにより検討した。才井戸流に生息する魚類、流域の洞窟に生息するキクガシラコウモリの他、ニホンイタチ、アライグマ、ハツカネズミといった哺乳類が検出された。特に、ニホンイタチは、過去の調査で才井戸河流域での生息が観察されていた。この地域は、ニホンイタチの生息が現在も維持されている名古屋市内でも貴重な環境であることが示唆された。一方、かつて生息が観察されたスナヤツメについては、円口類用のプライマーを用いて検出を試みたが、今回の分析では検出できず、その生息が危ぶまれる。水中に生息する魚類と比較し、周囲の水域をめぐらとせず移動する陸生生物については、検出リード数の変動が大きく、調査地点を増やし繰り返し調査を行う必要性が示された。環境DNAの12S rRNAメタバーコーディングを用いた生物種の分析は、参照するデータベースに依存するため、地域の固有種の同定や、生息数の少ない絶滅危惧種の検出には限界がある。これまで蓄積された地域の生息調査によ

る知見や、博物館標本などから取得する新たなDNA情報と照合してデータを解釈する必要がある。一方、直接確認が困難な生物種を、遺伝子配列に基づいてスクリーニングできる場合もある。従来からの生息調査に加えて、環境DNAによる生物種の分析手法を導入した継続的サーベイランスが、地域の生態系保全のために今後広く活用されることが期待される。

謝辞

本研究は、名古屋市立大学共用機器センターの次世代シーケンサー (イルミナMiSeq) を用いて行われた。著者の黒川は、2017年度から2020年度の愛知県立大学学長特別教員研究費および2022年度の愛知県立大学学長特別研究費を受け、本研究を実施した。また、黒川が次世代シーケンサーを用いた環境DNAの研究を開始するにあたり、名古屋大学大学院医学系研究科神経疾患・腫瘍分子医学研究センターシステム生物学分野 紅朋浩先生、同研究科附属医学教育研究支援センター分析機器部門伊藤康友様に懇切丁寧なご指導をいただいた。深田仁氏をはじめとした中志段味の自然を次世代に伝える会の皆様には現地調査に関して多大なご配慮をいただいた。Xiakena Xiaokaitiさん (名古屋市立大学大学院生) にも技術的なサポートを頂いた。ここに謝意を申し上げる。

引用文献

- Alam, M. J., N-K. Kim, S. Andriyono, H-K. Choi, J-H. Lee and H-W. Kim. 2020. Assessment of fish biodiversity in four Korean rivers using environmental DNA metabarcoding. PeerJ, 8: e9508.
- Cox, M. P., D. A. Peterson and P. J. Biggs. 2010. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. BMC Bioinformatics, 11: 485.
- 一般社団法人環境DNA学会. 2020. 環境DNA調査・実験マニュアル Ver. 2.2. https://ednasociety.org/wp-content/uploads/2022/06/eDNA_manual_ver2_2.pdf, 2022年8月30日確認
- 環境省. 2020. 環境省レッドリスト2020. <https://www.env.go.jp/content/900515981.pdf>, 2022

- 年8月30日確認
- 環境省自然環境局生物多様性センター. 2020. 環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き 第1版. 環境省自然環境局生物多様性センター, 富士吉田. 42pp.
- 環境省自然環境局生物多様性センター. 2022. 環境DNA分析技術を用いた淡水魚類調査手法の手引き. 改訂第2版. 環境省自然環境局生物多様性センター, 富士吉田. 97pp.
- Magoč, T. and S. L. Salzberg. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21): 2957-2963.
- Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, 17(1): 10-12.
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J. Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki. 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(7): 150088.
- 名古屋市. 2020. 名古屋市版レッドリスト2020. <https://www.city.nagoya.jp/kankyo/cmsfiles/contents/0000125/125632/redlist2020.pdf>, 2022年9月21日確認
- 西史江, 岡村祐里子, 榊原 靖. 2012. 2011年の才井戸流れ(守山区志段味)の水質. 名古屋市環境科学調査センター年報, 1: 90-95.
- 野呂達哉. 2015. ニホンイタチ *Mustela itatsi Temminck*. 名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課(編). 名古屋市の絶滅のおそれのある野生生物 レッドデータブックなごや2015-動物編-, p. 42. 名古屋市環境局環境企画部環境活動推進課, 名古屋.
- 野呂達哉. 2019. 動物調査と保全対策部会. なごや生物多様性保全活動協議会(編). 平成30年度なごや生物多様性保全活動協議会活動報告書, pp. 7-11. なごや生物多様性保全活動協議会, 名古屋.
- 野呂達哉. 2020a. 動物調査と保全対策部会. なごや生物多様性保全活動協議会(編). 令和元年度なごや生物多様性保全活動協議会活動報告書, pp. 8-13. なごや生物多様性保全活動協議会, 名古屋.
- 野呂達哉. 2020b. 都市域名古屋には何種類のコウモリが生息しているのか? -音声による種同定の試み-. 環境省自然局第23回自然系調査研究機関連絡会議調査研究・活動事例集, pp. 14-18. <https://www.biodic.go.jp/relatedinst/23rd/P14.pdf>, 2022年8月30日確認
- Rognes, T., T. Flouri, B. Nichols, C. Quince and F. Mahé. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4: e2584.
- Sato, Y., M. Miya, T. Fukunaga, T. Sado and W. Iwasaki. 2018. MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1553-1555.
- 高田靖司. 2002. 守山と春日井の哺乳類. 私たちの博物館 -志段味の自然と歴史を訪ねて-. 62: 1-5.
- 土山ふみ, 鎌田敏幸, 榊原 靖, 西史江. 2011. 1990年代後半の才井戸流れ(守山区志段味)の水質と水生生物. 名古屋市環境科学研究所報, 40: 50-59.
- Ushio, M., H. Fukuda, T. Inoue, M. Kobayashi, O. Kishida, K. Sato, K. Murata, M. Nikaido, T. Sado, Y. Sato, K. Murata, M. Nikaido, T. Sado, Y. Sato M. Takeshita, W. Iwasaki, H. Yamanaka, M. Kondoh, and M. Miya. 2017. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources*, 17(6): e63-e75.
- Ushio, M., K. Murata, T. Sado, I. Nishiumi, M. Takeshita, W. Iwasaki and M. Miya. 2018. Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports*, 8: 4493.
- Woese, C. R. and G. E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 74(11): 5088-5090.