



環境DNAモニタリング手法の課題と展望（特集 生物分布調査における環境DNA分析の可能性）

源, 利文
内井, 喜美子
高原, 輝彦
土居, 秀幸

(Citation)

環境技術, 46(12):648-652

(Issue Date)

2017-12

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90005807>



特集・生物分布調査における環境 DNA 分析の可能性

環境 DNA モニタリング手法の課題と展望

源 利文*・内井喜美子**・高原輝彦***・土居秀幸****

キーワード：時空間スケール，社会実装，データベース，ビッグデータ

1. 環境 DNA 研究の到達点

本特集では、環境 DNA 分析を用いたマクロ生物のモニタリング手法について、現時点の到達点を示してきた。繰り返し述べられていたとおり、環境 DNA 分析では現場での作業が採水だけであるため、誰もが比較的簡単に調査に参加することができる¹⁾。ろ過などで DNA を濃縮してしまえば、そこから先の DNA 抽出や、PCR などの分子生物学的実験技術はこれまでに長年かけて蓄積されてきたものの転用であり、DNA を扱った経験のある生物学者にとって決して高くないハードルである。

このように、比較的簡単にできてしまう環境 DNA 分析であるが、その応用性は幅広く、種特異的な検出による希少種や外来種の検出²⁾、環境 DNA 定量による生物量の推定や季節移動の検出³⁾、環境 DNA メタバーコーディングによる生物群集の網羅的解析⁴⁾などに用いられ、大きな成果をあげてきた。初期には魚類や両生類が主なターゲットであったが、軟体動物、節足動物、刺胞動物などへの適用も進み、最近では水生植物や陸生ほ乳類への適用も報告されるなど、あらゆるマクロ生物に適用可能であるのではないかと考えられている。

一方で、環境 DNA の世界にはわかっていないことがいまだ多くある。例えば、その由来一つとっても、排泄物や分泌物などいろいろな可能性が指摘されているものの、実証的な研究は不足してお

り、水中の環境 DNA 量のどれくらいの割合が排泄物に由来するかなどの具体的な情報は皆無である⁵⁾。同様に、我々が環境 DNA と呼んでいるものがどのような状態で水中に存在するのかも不明である¹⁾。このような、最も基礎的な項目すら理解されていない状況であるが、水を汲めばどこに何が生息しているかがわかるというそのシンプルさのおかげで、環境 DNA を用いた生物モニタリングは大きく発展を遂げてきた。しかし、ここで一旦立ち止まって、現時点での課題について整理する必要があるだろう。

本稿では、マクロ生物の環境 DNA 分析に関する課題を、環境 DNA から得られる情報と実際の生物分布の間の時空間的な齟齬の問題、生死を含む生物の状態を知ることができないという問題、種の判定を DNA 塩基配列データベースに依存するがゆえのデータベース不足に関する問題にわけて状況を整理した。その上で、今後の研究の発展について述べる。

2. 環境 DNA 分析の課題

2.1 時空間的な齟齬

環境 DNA 分析に残された大きな課題が、環境 DNA から得られた情報と実際の生物分布との間に生じうる空間的、時間的な齟齬である。ここでは、生物の在・不在を判定するときに問題になることと、生物量を推定する際に問題になることに分けて論じたい。前者の場合、最も問題になるのは、外部からの環境 DNA の流入であろう。本特

集の内井の論文²⁾でも触れられているとおり、特に流水環境においては、系外から水とともに流入してくる環境 DNA に注意しなければならない。生物個体から離れた DNA は、周囲に拡散する過程において、生物的作用（微生物活性など）と物理化学的作用（水温、紫外線、pH など）を受け分解されていく⁵⁾。拡散する速度と距離が大きい場合（すなわち河川のような流水環境）、DNA が分解される前に別の系に運ばれてしまうことがある。河川の上流から下流へ、または河川からそれが流入する湖沼や海洋へといった具合である。したがって、調査地の環境（流入河川の有無や流速など）を考慮しなければ、環境 DNA 情報から生物の在・不在を正しく判定することはできない。

生物量推定の際に問題となるのは、外部からの環境 DNA の流入に加え、生物からの DNA の放出速度の変動と環境 DNA の残留性である。本特集の論文^{2,3)}を参照してもらいたいが、同種でも成長段階や生理状態の違いによって DNA の放出速度は変化し、また環境 DNA の初期量の99%が消失するまでの時間は、環境条件に応じて数日から2週間程度まで変動する。つまり、同じ生物量であっても、成長段階や栄養条件等によって変化する生物からの DNA 放出速度と、環境条件に左右される DNA 残留性によって、検出される環境 DNA 量は変動する。したがって、自然条件下において、環境 DNA 量から単純に生物量を割り出せると思っはいけない。さらに、生物自体の移動も、環境 DNA 量の解釈を難しくする。極端な例をあげると、じっとしている種ではその近傍の環境 DNA 濃度が高くなるのに対し、長距離を速く移動するような種では、広い範囲において環境 DNA 濃度が一定になると推測される。どの程度の時空間スケールで環境 DNA 量が生物量を反映するかは、生息地の環境条件や対象種の移動性に依って変化すると考えるべきである。内湾におけるマアジ (*Trachurus japonicus*) の例では、魚群探知機から得られたリアルタイムの生物量との比較により、環境 DNA 量が周囲150 m 程度の生物量を反映すると推定されている⁶⁾。今後、このような、環境 DNA 分析とは別の手法（捕獲、バイオテレメトリー、音波探知機など）から得られた情報と環境 DNA 情報との比較検討を進めるこ

とにより、環境 DNA 分析によって、より正確な生物量の推定が可能になると期待される。

時空間的齟齬の解決に向けた試みとして、最新の研究⁷⁾では、マアジをモデルとして、長い DNA 断片 (719 bp) と短い DNA 断片 (127 bp) それぞれを増幅する2組のプライマーセットを用いて実験を行い、断片長の長い DNA の方が水中に放出されてから速く崩壊することを実証した。このことは、断片長の違う環境 DNA を使い分けることで、対象種の生息状況を異なる時空間スケールで推定できることを示唆しており、今後のさらなる発展に期待したい。

2.2 生死や状態がわからない

環境 DNA 研究において、採水場所で検出された DNA がどここの場所からたどりついたものなのか(例えば、河川の上流何十メートルなど)といったソースに関わることと同様に、その DNA を環境中に放出した種がどのような状態なのかについて明らかにできる手法はまだ確立していない。つまり、環境 DNA を調べることで、その DNA の持ち主は、成体なのか、幼体なのか、卵の状態なのか、あるいは、そもそも生きているのか、死んでいるのかを判別することは現在の技術では難しい。例えば、コクレン (*Hypophthalmichthys nobilis*) の死骸からは28日間以上経過しても DNA が放出されることがわかっている⁸⁾。このことは、採水場所近辺に対象種の死骸があれば、その対象種の DNA の検出によって間違った生息情報を導き出してしまふことを示唆している。このような偽陽性（対象種が居ないのに居ると判定する間違い）の可能性をできる限り排除することは、今後の環境 DNA 研究の大きな課題である。

また、生体高分子の DNA に加えて、RNA (リボ核酸) に着目した研究も今後発展していくと思われる。化学構造の違いによって、RNA は DNA よりも不安定であり急速に分解されることから、環境中の RNA (環境 RNA) を環境 DNA と同様に検出する技術が確立されれば、対象種の直近の生息状態を評価できるようになると考えられる。加えて、発育段階や生死に関わる遺伝子の発現に関与する環境 RNA が検出できれば、上述のような課題を一気に解決できるかもしれない。ただし、現状では、RNA の取り扱い上の難しさや塩基配

列情報の不足などから、この技術が確立されるまではまだ時間を要すると思われる。

2.3 データベースの不足

生物群集の網羅的解析が可能なメタバーコーディングに関する論文でも述べられたとおり、シーケンスデータから種のリストを作成するには、その参照となる種の DNA 塩基配列がデータベースに登録されている必要がある⁴⁾。データベースに登録されていない種は、その生物の DNA 塩基配列がシーケンスされていたとしても、種リストに反映することができない。よって、データベースの不足は、特にメタバーコーディング手法では、一番大きな問題になると考えられる。実際、最もデータベースが充実していると考えられる魚類では、約32,000種中26,325種について少なくとも一部のミトコンドリア DNA 塩基配列データが登録されているが(2017年10月25日現在)、それでも全種を網羅できていない。節足動物などは、そもそも種数も非常に多く、データベースの整備が全く追いついていないのが現状である。

さらには、一般に動物種においてはミトコンドリア DNA の COI 領域を対象として DNA バーコーディングを進めることが国際的に決まっている。よって、例えば節足動物では COI のデータは比較的充実しているが、COI 領域は種内でも塩基の変異が多いためにユニバーサルプライマーでの増幅に適さないことが多い。一方で、MiFish⁹⁾などで使われているミトコンドリア DNA の12S rRNA 領域は、ユニバーサルプライマーによる PCR 増幅には向いているが、データベースに登録されている配列が非常に少ないという問題がある。このように、データベース上の情報不足がメタバーコーディングを律速することも多い。

DNA データベースの拡充を進めるには、生物個体を集め、それらをこれまでの手法(形態学的手法など)で種同定し、組織から DNA を抽出した後にシーケンスして DNA 塩基配列を決定していく必要があり、1種1種について地道な作業が必要となる。このことから、データベースの充実には多くの労力と時間が必要であり、そのような地道な研究にこそ、今後研究費などが投資されていく必要がある。

将来的には、ナノポアシーケンスをはじめと

した一分子シーケンサなどにより、PCR を介さずそのまま環境 DNA をシーケンスできるようになると考えられる。これまでは、ユニバーサルプライマーを用いた PCR によって増えたある生物群の特定の遺伝子領域(例えば、MiFish で増幅できる魚類のミトコンドリア DNA 12S rRNA 領域)だけの塩基配列データを得ていたが、一分子シーケンサではその環境 DNA サンプル内のすべての DNA 分子について塩基配列を解読することが原理的に可能であり、これまでの PCR からのシーケンス解析をはるかに上回る膨大なデータが得られることになる。しかも PCR 増幅されたものではないので、データベースに参照配列のない不明な塩基配列が数多く出てくることが考えられる。そのようなデータを解析する場合にも、充実したデータベースが重要なポイントになるであろう。

3. 環境 DNA のこれから

3.1 環境 DNA の応用可能性

ここまで環境 DNA 分析の課題について述べてきたが、それでもなお環境 DNA 分析は様々な可能性を秘めており、応用可能性も幅広い。ここでは、いくつかの学問分野における環境 DNA 分析の応用可能性について述べる。

最も大きな影響を受けるのは生態学分野ではないだろうか。生物個体がどこにどれだけ生息しているかを把握することは、生態学の基礎中の基礎である。水中生物の世界ではそれを知ることが著しく困難であったが、環境 DNA 分析の登場によって一気に解決するかもしれない。また、これまでの調査手法では得ることが難しかった多種の情報をまとめて、かつ高頻度で得ることも可能になると考えられ、生態学者はこれまでに得ることが困難であった生態学的ビッグデータを得ることができるようになる。これにより、データ駆動型の新たな生態学が発展することが期待され、例えば、生物群集の短期動態の予測などにもつながる可能性がある。

より応用的な学問分野としては、水産学分野における様々な利用が想定される。単純に、どの魚がいつどこにいるのかといった魚群のスナップショットを高解像度で得られることは大きなメ

リットである。現在の分析手法では採水からデータが出てくるまでに少なくとも数時間を要するが、現場でのDNA解析が可能になれば、リアルタイムに状況を理解することが可能となり、漁業の効率化につながるだろう。また、生態学的应用でも述べたような動態予測技術が進歩すれば、水産有用種の動態をより高精度に予測できるようになるかもしれない。このような発展は水産資源の持続的利用に向けた重要な貢献となるだろう。さらに、有害生物の発生予測や、水産養殖における感染症のコントロールなどへの応用も期待される。

医学あるいは獣医学における感染症対策においても、環境DNA分析は有望な応用可能性を持つ。最も単純には病原生物の分布把握に用いることが想定され、例えばラオスの淡水域におけるタイ肝吸虫の分布把握などへの利用がすでに報告されている¹⁰⁾。さらに、感染症への対処としては症状に応じて薬を処方するなどの対症療法がとられるのが一般であるが、近年では人々の生活を取り巻く環境の健全性に着目したエコヘルス的な概念の重要性が理解されつつある。つまり、感染症の対策には病原体と宿主生物、そしてそれを取り巻く生態系の全体像を理解する必要がある。ヒトのDNAも病原体のDNAも基本的な性質は同じであり、我々が環境DNAと呼んでいるものにはあらゆる生物種のDNAが含まれている。つまり、環境DNAを用いることで、病原体と宿主の分布情報を同時に得られるだけでなく、生態系全体の状況を診断できる大きな可能性を秘めている。

3.2 環境DNA分析の社会実装に向けて

ここまで述べてきたように、環境DNA分析技術は様々な学問分野における応用が期待されている。とくに、環境アセスメントなどの生物調査での利用は最も実現が近いものの一つであり、その有用性が期待されている。これまで述べられてきたとおり、環境DNA分析手法は簡便な調査法であり、そのまま社会実装できそうだという意見もしばしば耳にする。しかし、その社会実装に向けては未だにいくつかの課題がある。

第一に、環境DNA分析手法を標準化する必要がある。環境DNA分析には、水試料のろ過-DNA抽出-DNA分析に到るまでの一連の作業が含まれるが、国内外において様々な方法が提案

されており、どの手法を（少なくとも日本における）標準的な手法として採用するかを取り決める必要がある。これには標準化を策定する枠組みが必要となるであろう。さらに、これらの技術は日進月歩で開発が進んでおり、今後策定した標準技術よりもさらに優れた手法が提案される可能性が十分ある。このような手法の更新についてもどのように対応していくかも問題となるであろう。特に長期的な調査で環境DNA分析を用いる場合は、手法の一貫性も重要となってくるので注意が必要である。

第二には、環境DNAの調査・実験手法などの周知であろう。これについては著者らなども普及のためのワークショップなどを開催しているが、一般社会で使われていくには、人々が手法を学ぶ機会や場所を整備することが必要であろう。加えて、詳細なマニュアルや仕様の策定も必要になる。

第三には、方法の問題点・限界点の周知も必要であろう。環境DNA分析はメリットも多く、検出力も高いことがわかってきているため、どのような場面や生態系においてでも汎用的に利用できると考えられがちである。しかし、実際には腐植質などによりPCR阻害が起こることや、サンプルや実験器具を慎重に取り扱わなければ外部からのDNAの混入が起こることなど、様々な問題点や限界がある。また、本稿でも述べてきたように、採取された環境DNAもその場所で放出されたものか、河川の上流など別の場所で放出されたものかなど、様々な点を考慮する必要がある。しかし、これらの問題点や限界点については、一般によく理解されているとは言い難い。よって、このような手法の限界についても周知する必要がある。現状としては、環境DNA分析は、そのままこれまでの採捕などの手法に取って代わるものではなく、お互いに補完する形で利用していくべきである。そして、広域や長期のモニタリングや外来種分布のスクリーニングなど、環境DNA分析が大きな力を発揮する領域においては、積極的に活用していくことが望ましいであろう。

以上のような問題や課題が解決されれば、すでにある程度確立された手法、例えば種特異的な生物の検出などから、環境DNA分析の社会実装が進められると期待される。環境DNA分析が実際

に社会で使えるようになることこそ、環境 DNA 研究のゴールと言えるであろう。

参考文献

- 1) 源利文；水域生態系における環境 DNA モニタリング手法開発の現在，環境技術，**46**，p.624-629，2017.
- 2) 内井喜美子；環境 DNA による外来種および希少種の迅速な検出，環境技術，**46**，p.630-635，2017.
- 3) 高原輝彦；水生動物の生物量，季節分布と移動における環境 DNA を用いた推定，環境技術，**46**，p.636-641，2017.
- 4) 土居秀幸；環境 DNA メタバーコーディング解析による生物群集解析，環境技術，**46**，p.642-647，2017.
- 5) Barnes MA et al.; The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics, Conservation Genetics, **17**, p. 1-17, 2016.
- 6) Yamamoto S et al.; Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: a case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan, PLoS ONE, **11**, e0149786, 2016.
- 7) Jo T et al.; Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA, Molecular Ecology Resources, **17**, p.e25-e33, 2017.
- 8) Merkes CM et al.; Persistence of DNA in carcasses, slime and avian feces may affect interpretation of environmental DNA data, Plos One, **9**, e113346, 2014.
- 9) Miya M et al.; 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, 2015.
- 10) Hashizume H et al.; Application of environmental DNA analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in water samples, Acta Tropica, **169**, p.1-7, 2017.