



種特異的な環境DNA検出によるマクロ生物の生態調査 (特集 水環境における環境DNAを用いた生物モニタリング)

源, 利文

(Citation)

水環境学会誌, 41(4):123-127

(Issue Date)

2018-04

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90005808>



種特異的な環境 DNA 検出によるマクロ生物の生態調査*

源 利 文

1. はじめに

近年著しく発展する環境 DNA を用いたマクロ生物の分布調査手法には、大きく分けて2つのアプローチがある。一つは対象種の DNA を特異的に検出する種特異的なアプローチ、もう一つは特定の分類群の DNA を網羅的に検出するメタバーコーディングとよばれる手法を用いた分類群内の網羅的なアプローチである。後者の網羅的なアプローチに関しては、本特集の宮の論文¹⁾に詳しいので参照されたい。本稿では、前者の種特異的な環境 DNA 検出を用いたマクロ生物調査手法について、主に筆者のこれまでの研究成果を例として解説する。

マクロ生物の環境 DNA 分析は 2008 年の Ficetola et al.²⁾ によるウシガエル (*Lithobates catesbeiana*) の検出が世界で初めての報告である。ここでは種特異的にウシガエルの DNA を検出するアプローチが取られている。狙った生き物の分布状況を水を汲むだけで明らかにできるこの手法は大変魅力的であり、様々な応用事例がこれまでに報告されている。初期の研究事例では多くが外来種の分布域の把握を目指したものであった。その後、本手法は希少種の生息域把握にも使われるようになり、それらの情報を利用した生息適地の推定なども行われ始めている。ごく最近では、単に生物分布を知るだけでなく、生物の行動や状態を明らかにすることも可能であることが見出され、繁殖の場所やタイミングの推定、生死の判別なども行われるようになってきている。本稿では種特異的な環境 DNA 検出手法を用いてできることを著者らの研究を中心に紹介する。

2. 外来種の分布域の推定

上で述べたように、マクロ生物の環境 DNA 分析は外来種の検出から始まった。ヨーロッパのチームのウシガエルの検出²⁾、アメリカのチームのアジア原産コイ科魚類の検出³⁾などが先駆的な研究例として知られている。わが国でも、著者を含むグループによる、ブルーギル (*Lepomis macrochirus*) の分布状況を調べた事例⁴⁾や外来種であるチュウゴクオオサンショウウオ (*Andrias davidianus*) と在来種であるオオサンショウウオ (*Andrias japonicus*) を区別して検出した事例⁵⁾などがあるのでここで紹介する。

ブルーギルは北米原産のサンフィッシュ科の魚類であり、1960 年に日本に持ち込まれた個体群が拡散し、各地で繁殖を繰り返してその分布を広げた。その繁殖力と魚食性の高さなどから、現在では特定外来生物にも指定される侵略的外来種である。Takahara et al.⁴⁾では、広島県のため池 70 ヶ所を対象として、目視によりブルーギルの生息状況の調査と、環境 DNA 分析による同種の DNA 検出を行った。環境 DNA の検出には TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法 (TaqMan プローブ法) が用いられている。通常のエンドポイント PCR 法では、増幅したい対象 DNA の特異性が 2 種類のプライマーで決定されるのに対して、TaqMan プローブ法では、増幅産物の検出に用いるプローブによって検出の特異性を高めることができる。そのため、エンドポイント PCR 法よりも特異性を高く保つことが可能であり、様々な種類の DNA が混在する環境 DNA を対象とした種特異的な検出においては TaqMan プローブ法が用いられることが多い。分析の結果、目視観察によってブルーギルの確認された 8 ヶ所すべてで環境 DNA が検出されたほか、目視では確認できなかった 11 ヶ所の池でも環境 DNA が検出され、環境 DNA 分析が通常の見視調査よりも感度が高いことが示された (図 1)。この研究のみならず、これまでの多くの報告において、環境 DNA 分析では通常の採捕や目視をとまなう調査よりも対象種の検出感度が高いことが示されている。

このように、環境 DNA による外来種検出の有用性は様々な研究によって示されているが、環境 DNA 分析が真に役立つのは対象となる生物種が発見困難な場合である。ここでは、調査の難しい動物への適用例として、京都の桂川水系におけるオオサンショウウオ類の例を紹介する。オオサンショウウオは日本の固有種であり、天然記念物にも指定される希少種である。京都府の桂川水系には、在来種であるオオサンショウウオのほか、人為的に導入された外来種であるチュウゴクオオサンショウウオもあり、在来種との交雑も進んでいることが知られ



Toshifumi Minamoto
博士 (理学)

平成15年 京都大学大学院理学研究科博士後
期課程修了
同年 同大学生態学センター研究機
関研究員
17年 産業技術総合研究所生物機能工学
研究部門特別研究員
19年 総合地球環境学研究所プロジェ
クト上級研究員
24年 神戸大学大学院人間発達環境学研
究科特命助教
29年 同大学院人間発達環境学研究
科准教授
科学技術への顕著な貢献2016 (ナイスステッ
プな研究者) 受賞

* Ecological Surveys of Macro-Organisms Based on Species-Specific Detection of Environmental DNA

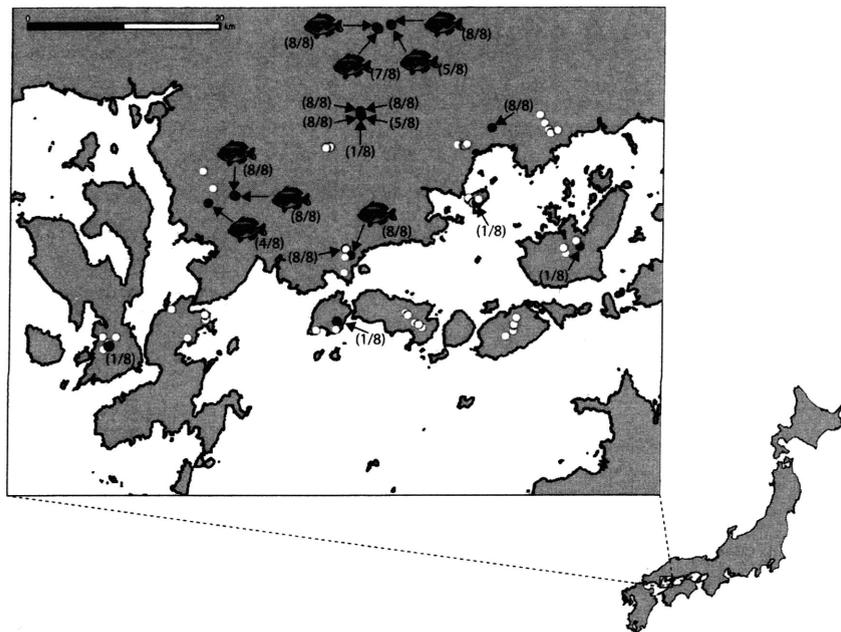


図1 広島県の70ヵ所のため池におけるブルーギルの環境DNA検出地点。塗りつぶした丸はブルーギルの環境DNAが検出された地点を示し、白丸は非検出の地点である。目視調査でブルーギルが観察された池は魚の絵で示した。Takahara et al.⁴⁾のFigure 1を改変した。

ている。両種ともに夜行性であること、外見では両種を区別できないこと、また在来種は天然記念物であることなど、これらの種の調査には困難が多い。そこで、Fukumoto et al.⁵⁾では、環境DNA分析を用いて両種を区別して検出する技術を確認し、それを桂川流域全域に適用した。TaqManプローブ法を用いても非常に近縁な2種の区別は困難であるが、ミトコンドリアNADH1領域に両種を区別できる遺伝子配列を発見して、検出系を確立した。確立した検出系を用いて、桂川水系全域で調査をした結果、例えば鴨川などのすでに外来種あるいは交雑種が生息することがわかっているエリアでは確かに両種の環境DNAが検出されるなど、これまでに知られているチュウゴクオオサンショウウオの分布状況と整合的な結果が得られた。また、採捕をともなう分布調査が及んでいなかった地域においても外来種の環境DNAが検出され、外来種あるいは交雑種の分布域が知られている以上に広がっていることが明らかになった。このように、環境DNA分析は生態的な特徴から発見の困難な生物種であっても適用可能である点で従来の採捕をともなう手法を補完することが可能である。また、種判別をDNA配列に基づいて行うため、形態的な区別が困難な種同士の判別に力を発揮する。この研究で用いられた検出系は、以下でも述べるとおり在来種の生息適地推定に用いられているほか、国内各地における外来種生息状況調査にも用いられている。例えば、2018年1月に公表された岡山県の吉井川における交雑種の発見も環境DNA調査による外来遺伝子の検出がきっかけであった。このように、環境DNA分析による外来種の分布域把握はすでに実務的な応用も始まるなど、研究および実践利用がとくに進んでいる。

3. 希少種の調査

在来希少種の分布域の把握にも環境DNA分析は力を発揮しつつある。環境DNAの量はそこに生息する対象

種のバイオマスと相関することが知られているため、希少種の環境DNAは量的に少ないことが予想され、その適用は困難があるとも考えられたが、採水量やPCRに供する鋳型DNA量を増やすことでそれらも検出可能であることがわかってきた。ヨーロッパの研究チームによる初期の環境DNA研究では採水量が15 mL程度と少量であったが、現在では数百mL～数L程度を採水するのが主流になりつつある。また、リアルタイムPCRに用いる試薬も環境中に存在するPCR阻害物質の影響を受けづらいものが市販され、PCRの鋳型量を増力することができるようになった。そのような技術の進展の恩恵を受け、希少種の繁殖地を特定するに至った例が次に紹介する研究例である⁶⁾。

ゼニタナゴ (*Acheilognathus typus*) はコイ目コイ科に属するいわゆるタナゴ類の一種であり、かつては関東地方および東北地方の広いエリアに生息していた。しかし、現在では東北地方の4県の10ヵ所程度に生息が確認されるのみとなっており、環境省のレッドリストでは絶滅危惧IA類として掲載されている。本種は他のタナゴ類と同様に二枚貝に産卵するが、その産卵期はタナゴ類としては例外的に秋である。二枚貝の中で孵化した後は冬の間を貝の中で過ごし、春になると貝を離れて自由に遊泳するようになる。本来の生息地は霞ヶ浦や八郎潟といった大きな湖沼やそれに接続する大河川であったが、現在知られている繁殖地はいずれも小さな池や灌漑用の水路などといった人工的な小水域である。そこで、我々は大河川における残された生息地や繁殖地を探るため、秋田県の雄物川で大規模な環境DNA調査を行った⁶⁾。2016年の8月に雄物川の河口から112 kmの区間にわたり、99ヵ所で1 Lの水を採水した。この水からろ紙を用いて環境DNAを捕集、抽出し、我々の設計したリアルタイムPCR系によってゼニタナゴの環境DNAの検出を試みた。第一段階では得られた100 μLのDNAサンプルのうち、2 μLを鋳型としてリアルタイムPCRを行ったが、99サ

ンプルすべてについて陰性であった。そこで、次の段階では鋳型量を5 μLに増量して実験を行ったところ、2つのサンプルでゼニタナゴのDNAが検出された。次に、同年の秋に、この2サンプルを得た地点で採捕調査を試みた。小型の定置網や二枚貝トラップを用いた採捕を行ったところ、2地点のうち1地点でゼニタナゴの成魚雌雄各1個体を得ることができた。ここで採捕された個体は婚姻色や産卵管の伸長といった繁殖期特有の形態的特徴を示し、この地点がゼニタナゴの残された繁殖地の一つであることが明らかになった。雄物川におけるゼニタナゴ成魚の確認は実に11年ぶりである。この事例は、非常に希少な種の繁殖地を大河川の中で特定するに至った例であり、これまでのマクロ生物の環境DNA研究の中でもとくに貴重な成功例といえるかもしれない。希少種のDNAは環境中でもとくに希薄である可能性があり、検出上の難しさがあるが、本研究で行ったように採水量や鋳型DNA量を増加させることによって検出確率を高めることが可能であり、今後の技術のいっそうの進展によって、適用範囲をさらに拡げることが可能になるであろう。

環境DNA分析の希少種への適用例はゼニタナゴのほかにも、魚類（カワバタモロコ [*Hemigrammocypris rasborella*])⁷⁾、両生類（ハコネサンショウウオ [*Onychodactylus japonicus*])⁸⁾、甲殻類（ニホンザリガニ [*Cambaroides japonicus*])⁹⁾、水生昆虫（ヒメタイコウチ [*Nepa hoffmanni*])¹⁰⁾、水生植物（クロモ [*Hydrilla verticillata*])¹¹⁾などが国内で報告されている。このように、環境DNAを用いた水生マクロ生物の検出は希少種への適用例も増えており、また水生の生物であれば様々な分類群に適用可能である。一般にリアルタイムPCRは感度が高く、鋳型DNA中に1分子でも対象遺伝子が存在すれば検出可能であるとされるため、とくに保全対象となる生物種が特定されているようなケースでは、種特異的な環境DNA検出が今後も役に立つ事例がますます増えると考えられる。

4. 生息適地の推定

環境DNA分析のメリットの一つに、調査地での作業が簡便であり、調査の広域化が容易であるという点がある。一般的な環境DNAの分析そのものから得られるデータは対象種がその近辺に生息するかどうかという情報だけであるが、特定の種について広域の在／不在データを集めることができれば、生息地における環境情報を利用することで、当該種の生息適地を推定することが可能になる。本稿執筆時点では、環境DNAのデータを用いた生息適地モデルの作成は多くの研究例がないが、今後利用が増えると見込まれる応用例の一つである。ここでは、オオサンショウウオの生息適地モデル分析の事例¹²⁾を紹介する。

外来種の項でも述べたとおり、オオサンショウウオは国の特別天然記念物であることや、夜行性であることなど、通常の採捕をとまなう調査に困難がある。そこで、著者らの研究チームでは、オオサンショウウオの西日本全域における生息地を環境DNA分析を用いて明らかにするとともに、得られたデータを利用してオオサンショウウオの生息適地モデルを作成した。3年かけて西日本

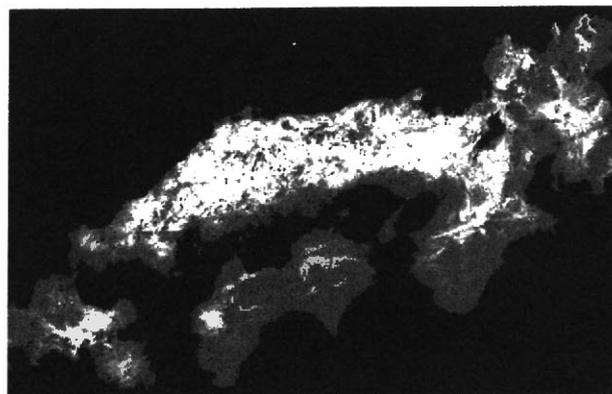


図2 環境DNA分析データに基づいて作成したオオサンショウウオの生息適地モデル。色の明るいところほど、生息確率が高い地点として推定されたことを示す。

の各県を代表する河川を回り、約500サンプルの解析の結果、127地点でオオサンショウウオの環境DNAを検出することに成功した。オオサンショウウオの生息地は中国山地に多く見付き、西は大分県、東は岐阜県まで広域にわたっていた。ここで示された生息域は過去の知見とも整合的である¹³⁾。3年という限られた期間に広域で100ヵ所以上の生息地情報を得られた点は環境DNA分析ならではである。これらの生息地の情報をもとに、標高や気温などの環境パラメータを利用して生息適地モデルをソフトウェアMaxtentを利用して作成したのが図2である。この図を眺めると、オオサンショウウオの生息確率の高いエリアが、中国山地を中心として近畿地方まで続く大きなエリア、東海地方の隔離されたエリア、大分県を中心とした九州のエリアの3つに大別され、また四国にも生息確率の高いエリアがあることがわかる。四国のオオサンショウウオは人為分布の可能性が指摘されており、我々は四国では環境DNA調査を行わなかったのだが、その生息が知られる吉野川水系などを正確に捉えることができている。環境DNAのデータに基づく生息適地モデルの作成が有用であることがわかる。

このような環境DNA分析と生息適地モデルの組み合わせは海外からも報告されている。例えば、Renan et al.¹⁴⁾は生きた化石ともよばれるパレスチナイロワケガエル (*Latonia nigriventer*) の生息地を環境DNA分析で明らかにするとともに、生息適地モデルを用いて生息ポテンシャルの高いエリアを特定することに成功した。このような情報は、保全政策などを決定する上で重要である。このように、単に希少種がどこに生息するかという情報だけでなく、生息に適した場所がどこであるかを明らかにすることができる生息適地モデルの作成にあたり、環境DNAデータを用いることで、短期間に取得した多くのデータを与えることができる。つまり、現時点のスナップショット的な情報を用いたりリアルタイムなデータを利用することができるという点で、環境DNA分析と生息適地モデルは相性のよい組み合わせといえるだろう。

5. 行動や状態の推定

ここまで紹介してきた環境DNAの種特異的検出では、対象種がいるかないかの情報を得ることが目的であっ

た。これまでの環境 DNA 分析の一つの弱点といえるのが、生物の行動や状態を知ることはできないという点である。しかし、ごく最近になって、これらの情報の取得に環境 DNA 分析が適用できる可能性が報告されているので、ここで紹介したい。

水中における環境 DNA 量の季節的な変動については、これまでにいくつかの報告があった。とくに、体外受精である魚類などの水生生物は、繁殖期に環境 DNA 量が増加する可能性が指摘されていた¹⁵⁾。これは、繁殖にもなって活動が活発になることに加え、精子を環境中に放出することによって、環境 DNA の放出量が劇的に増加するためである。しかし、環境 DNA 量は水温などの環境要因にも依存すると考えられるため、単に環境 DNA 量の変動のみから繁殖期や繁殖行動を特定することは困難である。そこで、Bylemans et al.¹⁶⁾ は精子にはミトコンドリアが少ないことを利用して、核 DNA とミトコンドリア DNA の比率の変動から繁殖行動を推定できる可能性を見出した。彼らは実験水槽内に精子を投入すると核/ミトコンドリア DNA 比が高まることや、野外の河川においても繁殖シーズンに対応して同様の比率の変動が見られることを報告した。一方で、繁殖シーズンにはすべての観測地点で核/ミトコンドリア DNA 比が高まり、繁殖地の特定はできなかった。これは、彼らの調査地点間の距離が短く、サイトごとの違いを十分に反映できる設定になっていなかったためと考えられる。

著者らの研究チームでも、兵庫県内の河川におけるオオサンショウウオに同様な手法を適用して、繁殖地や繁殖期の推定を試みている。これまでのところ、知られている繁殖期と同様の時期に環境 DNA 量の極端な増加が見られることや、核/ミトコンドリア DNA 比が高まることが見出され、Bylemans et al.¹⁶⁾ と同様の結果を得ることができている。また、比較的広域のサンプリングを行った結果、重要な繁殖地を含むと考えられるエリアを特定することにも成功している。このような複数の環境 DNA マーカーを利用した生物の行動の検出が繁殖以外の行動に適用可能かどうかは未知数であるが、適切なマーカーの利用によって、環境 DNA 分析を単なる分布を知る手段から、行動の検出のための手段へと進化させた点で、これらの研究は重要なステップとなる。

DNA を検出した生物がどのような状態にあるか、とくに生きているかどうかを知ることも重要であるが、これまでの一般的な環境 DNA 分析ではそれを知ることはできなかった。著者を含む研究チームでは、マーカーとなる遺伝子領域の長さによって分解速度が異なることを利用することで、死んだ個体由来する DNA と生きた個体由来する DNA を区別できる可能性を見出した¹⁷⁾。この研究のベースとなったのは舞鶴湾におけるマアジの個体数と環境 DNA 量を比較した Yamamoto et al.¹⁸⁾ の研究であるが、ここでは水揚げ漁港付近にマアジ環境 DNA 量の極端に高い地点があり、港に引き上げられたマアジ個体由来する環境 DNA であると考えられた。このときのサンプルについて、より長い遺伝子領域をマーカーとした環境 DNA (長鎖環境 DNA) 分析を行った結果、漁港付近の環境 DNA ピークは消え、魚群探知機によって推定されたマアジ分布と長鎖環境 DNA 量の分布の間に相関が見出された¹⁷⁾。これは、死個体からの影

響をキャンセルすることができたことを意味していると考えられる。この場合も、複数マーカーのデータを比較することで生死を区別して検出しており、環境 DNA 分析から生物の状態を識別できることを示した事例として重要である。

6. 環境 DNA 分析を実践する上で重要なポイント

本稿の終わりに、環境 DNA 分析を実践する上で注意すべきポイントについて簡単に述べたい。第一に、サンプリングの回数や、一回にサンプルする水の量、本数である。これについては実証的なデータが不足している。また、対象種の生息密度や生態系によっても異なる可能性があるので一概にはいえないが、著者の経験に基づいて大雑把に述べると、生息がわかっている場所について、一つのサンプルから対象種が検出される確率は平均的に 60-70% 程度である。仮に 65% とすると、3 回 (あるいは 3 本) サンプリングを行えば、95% 以上の確率でいずれかのサンプルから検出できることが期待される。ただし、サンプリングの季節には注意が必要である。上述のように繁殖期には環境 DNA の量が増えるので、対象種の繁殖期を狙うと検出の確率は高まると考えられる。また、冬季は検出率が下がる傾向があるようなので、できるだけ春から秋にかけて採水調査を行うことが望ましい。

次にサンプルのろ過についてであるが、可能であれば採水現場でろ過を行うことが望ましい。しかし、現場でのろ過は時として時間がかかりすぎることもあるため、DNA の保存試薬を利用することも有効である。いくつかの保存試薬がありうるが、取扱の手軽さや価格などから塩化ベンザルコニウム溶液の利用を推奨する。ろ過に用いるろ紙等については、ガラス繊維ろ紙またはカートリッジ式のろ過器を用いるのが一般的である。種特異的検出の場合に、どちらを用いるのがよいかについては知見が少なく、今後の課題である。なお、メタバーコーディングを行う際にはカートリッジ式フィルターが有利であることが報告されている¹⁾。

DNA の抽出は市販の DNA 抽出キットを使う例が多い。著者を含め国内の環境 DNA 研究に取り組むチームでは、多くの場合、Qiagen 社の DNeasy カラムを利用して DNA 抽出を行っている。著者の経験では、他社のカラムでもそれなりに回収できるので、目的と予算に応じて使い分けをすることができるかもしれない。

種特異的な環境 DNA 検出においてもっとも重要なポイントは検出系の設計である。ここでは、種特異的検出で主流となっている TaqMan プローブ法による検出系の場合について述べる。検出系の設計のためには、対象とする遺伝子領域を決定する必要がある。多くの場合ミトコンドリアの COI 領域やチトクローム b 領域がマーカーとして使われるが、核 DNA のリボソーム DNA をターゲットとする例も見られる¹⁹⁾。いずれにしても、対象種と調べようとする地域に生息する近縁種の遺伝子データを収集する必要があるため、データベースに十分なデータがある遺伝子領域をマーカーとすることが望ましい。PCR プライマーの設計にあたっては、近縁種の DNA を増幅せず、対象種の DNA だけを増幅するよう、プライマーの 3' 末端側に対象種に特異的な塩基が入るように増幅領域を選ぶ。TaqMan プローブには対象種に特異的な

塩基が配列の中央近くに入るように設計するのがよい。プライマーやプローブの設計が済んだら、次にすべきなのは、理論上および実際の特異性のチェックである。Primer-Blastの機能を利用して、思わぬ種を誤って検出する可能性がないかのチェックをコンピューター上で行うとともに、対象種と近縁種のDNAを鋳型にしたリアルタイムPCRによって、対象種のみが特異的に検出可能であることを確認する。ここまでの準備ができると、一旦は検出系が完成したとあってよい。最終的には環境サンプル由来の増幅産物のシーケンスを確認して、本当に増えたものが対象種のDNAであるかの確認が必要となるが、著者のこれまでの経験では、上記の手続きを踏んで作成した検出系で非特異的な検出がおきたことはない。

7. おわりに

環境DNAの種特異的な検出を行うときには、対象種ごとに上に述べたような検出系の開発を行う必要がある、この部分がこの手法を使う上でのボトルネックとなりうる。これに対して分類群網羅的なアプローチであるメタバーコーディング分析では一度作成した系で様々な種の情報を一度に分析することが可能であり、その面で今後はメタバーコーディング手法がより頻繁に使われるようになると思われる。しかし、種特異的な検出手法も、一旦検出系を確立してしまえば、分析費用や解析にかかる時間の面でアドバンテージがあるうえ、検出感度が高いと考えられるため、希少種の調査などの場面や、上述したような行動や状態の検出に有用である。一度得た環境DNAサンプルは複数のアプリケーションに供することも可能であるため、今後は種特異的な検出と分類群網羅的な検出を目的ごとに使い分けていくことになるであろう。本稿では執筆時点(2018年2月)の最新の情報をもとに、種特異的な環境DNA分析で何ができるかを紹介したが、この分野の進展はめざましく、2~3年後には、今の時点では思いもよらないような新たな技術や解析手法が開発されていることだろう。そのような今後見込まれる技術の発展もあわせて、一杯の水サンプルからどこに、どのような生物が、どのような状態で生息しているか、どのような行動をしているかといったことが、ひとまとめに明らかにできる日が近づいているのかもしれない。

参考文献

- 1) 宮正樹, 2018. 魚類環境DNAメタバーコーディング法による多様性評価: 技術開発と応用. 水環境学会誌 41(4), 132-136.
- 2) Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* 4(4), 423-425.
- 3) Jerde, C.L., Mahon, A.R., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4(2), 150-157.
- 4) Takahara, T., Minamoto, T., Doi, H., 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLOS ONE* 8(2), e56584.
- 5) Fukumoto, S., Ushimaru, A., Minamoto, T., 2015. A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology* 52(2), 358-365.

- 6) Sakata, M.K., Maki, N., Sugiyama, H., Minamoto, T., 2017. Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, *Acheilognathus typus*, in a natural river in Japan. *Naturwissenschaften* 104(11-12), 100.
- 7) 福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸敦史, 源利文, 2016. 在来希少種カワバタモロコシの環境DNAによる検出系の確立. *日本生態学会誌* 66(3), 613-620.
- 8) Katano, I., Harada, K., Doi, H., Souma, R., Minamoto, T., 2017. Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods. *PLOS ONE* 12(5), e0176541.
- 9) Ikeda, K., Doi, H., Tanaka, K., Kawai, T., Negishi, J.N., 2016. Using environmental DNA to detect an endangered crayfish *Cambaroides japonicus* in streams. *Conservation Genetics Resources* 8(3), 231-234.
- 10) Doi, H., Katano, I., Sakata, Y., Souma, R., Kosuge, T., Nagano, M., Ikeda, K., Yano, K., Tojo, K., 2017. Detection of an endangered aquatic heteropteran using environmental DNA in a wetland ecosystem. *Royal Society Open Science* 4(7), 170568.
- 11) Matsuhashi, S., Doi, H., Fujiwara, A., Watanabe, S., Minamoto, T., 2016. Evaluation of the environmental DNA method for estimating distribution and biomass of submerged aquatic plants. *PLOS ONE* 11(6), e0156217.
- 12) 日高舜介, 勝原光希, 富田勢, 丑丸敦史, 山本哲史, 源利文, 2017. 環境DNA分析手法に基づいて作成した生息適地モデルの評価-オオサンショウウオを例に-. *日本生態学会第64回全国大会*, J01-03.
- 13) Matsui, M., Tominaga, A., Liu, W.Z., Tanaka-Ueno, T., 2008. Reduced genetic variation in the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus* (Amphibia: Caudata). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49(1), 318-326.
- 14) Renan, S., Gafny, S., Perl, R.G.B., Roll, U., Malka, Y., Vences, M., Geffen, E., 2017. Living quarters of a living fossil-Uncovering the current distribution pattern of the rediscovered Hula painted frog (*Latonia nigriventris*) using environmental DNA. *Molecular Ecology* 26(24), 6801-6812.
- 15) Lacoursière-Roussel, A., Côté, G., Leclerc, V., Bernatchez, L., Cadotte, M., 2016. Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology* 53(4), 1148-1157.
- 16) Bylemans, J., Furlan, E.M., Hardy, C.M., McGuffie, P., Lintermans, M., Gleeson, D.M., Gilbert, M., 2017. An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Methods in Ecology and Evolution* 8(5), 646-655.
- 17) Jo, T., Murakami, H., Masuda, R., Sakata, M.K., Yamamoto, S., Minamoto, T., 2017. Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources* 17(6), e25-e33.
- 18) Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K., Takahashi, K., Sawada, H., Murakami, H., Tsuji, S., Hashizume, H., Kubonaga, S., Horiuchi, T., Hongo, M., Nishida, J., Okugawa, Y., Fujiwara, A., Fukuda, M., Hidaka, S., Suzuki, K.W., Miya, M., Araki, H., Yamanaka, H., Maruyama, A., Miyashita, K., Masuda, R., Minamoto, T., Kondoh, M., 2016. Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: a case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLOS ONE* 11(3), e0149786.
- 19) Minamoto, T., Uchii, K., Takahara, T., Kitayoshi, T., Tsuji, S., Yamanaka, H., Doi, H., 2017. Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular Ecology Resources* 17(2), 324-333.