

**環境 DNA によるウナギ産卵イベントの探索に関する研究**  
**Environmental DNA study on the detection of spawning events of freshwater eels**

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源生産科学専攻  
博士後期課程

竹内 綾  
Aya Takeuchi

2019

## 目次

第1章 緒言	1
第2章 ウナギ検出のための環境DNA法の検討	5
第1節 目的	5
第2節 次世代シーケンサーを用いたウナギ属魚類の環境DNA法の検討	7
第1項 材料と方法	7
第2項 結果	11
第3節 リアルタイムPCRを用いたニホンウナギの環境DNA法の検討	18
第1項 材料と方法	18
第2項 結果	22
第4節 考察	26
第3章 環境DNAの放出と分解	35
第1節 目的	35
第2節 尾数が環境DNA放出量に与える影響	35
第1項 材料と方法	35
第2項 結果	38
第3節 発育段階が環境DNA放出量に与える影響	38
第1項 材料と方法	38
第2項 結果	41
第4節 産卵行動が環境DNA放出量に与える影響	45
第1項 材料と方法	45
第2項 結果	49
第5節 水温の違いが環境DNAの分解に与える影響	49
第1項 材料と方法	49
第2項 結果	52
第6節 考察	52
第4章 ニホンウナギ産卵場における環境DNAの検出	59
第1節 目的	59
第2節 海洋調査船「なつしま」による環境DNA調査	59
第1項 材料と方法	59
第2項 結果	61

第3節 深海潜水調査支援母船「よこすか」による環境DNA調査	62
第1項 材料と方法	62
第2項 結果	67
第4節 考察	69
第5章 総合考察	74
第1節 環境DNA検出とウナギの産卵生態	74
第2節 環境DNA法の有用性と限界	77
第3節 水産学的意義	79
第4節 今後の課題	80
要旨	81
謝辞	84
引用文献	85



## 第1章 緒言

世界には、19 種亜種のウナギ属魚類が分布している (Ege, 1939; Castle & Williamson, 1974; Watanabe, 2003; Watanabe et al., 2009)。これらは全て降河回遊魚であり、川を成育場、海を産卵場としてそれぞれ利用している (Tsukamoto et al., 2002)。ウナギ属魚類の産卵場の特定は、まず外洋においてレプトセファルスと呼ばれる透明な葉形仔魚を採集することから始まる。産卵場に近づくにつれて、より小さく若いレプトセファルスが採集されるためである (Schmidt, 1935; Tsukamoto, 1992; Shinoda et al., 2011)。1920 年代、デンマークの海洋生物学者ヨハネス・シュミットは、全長約 10–45 mm のレプトセファルスを採集して、これらの全長が同心円状に徐々に小型化することを見出し、ヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* とアメリカウナギ *A. rostrata* の産卵場が大西洋のサルガッソ海にあることを世界で初めて突き止めた (Schmidt, 1922, 1925)。

この発見の後を追って、1930 年代から太平洋でニホンウナギ *A. japonica* の産卵場調査が始まった。1961 年に台湾の南方海域で、全長 50 mm のニホンウナギのレプトセファルス 2 個体が初めて採集された (Ozawa et al., 1991; Shinoda et al., 2011)。1991 年には、北緯 12–19°、東経 131–137° で、全長 7.9–34.2 mm のニホンウナギのレプトセファルス 991 尾が採集され、本種の産卵場はグアム島の西方海域にあると推定された (Tsukamoto, 1992)。さらに、2005 年、全長 4.2–6.5 mm のプレレプトセファルスと呼ばれる孵化直後の前期仔魚が北緯 142–143°、東経 14–17° にて発見され、ニホンウナギの産卵場は西マリアナ海嶺の南端部であると強く推測された (Tsukamoto, 2006)。

その他 5 種のウナギ属魚類の産卵場も推定されている。ニホンウナギの産卵場近傍にて、全長 4.3–50.9 mm のオオウナギ *A. marmorata* のレプトセファルスとプレレプトセファルスが採集されたため、オオウナギはニホンウナギと同所的な産卵場を持つと考えられている (Miller et al., 2002; Kuroki et al., 2006; Kuroki et al., 2014)。また、全長 8.5–35.4 mm のボルネオウナギ *A. borneensis*、12.3–47.8 mm のセレベスウナギ *A. celebesensis* のレプトセファルスの採集により、ボルネオウナギはセレベス海、セレベスウナギはセレベス海とトミニ湾で産卵していることが示唆された (Aoyama et al., 2003, 2018; Miller et al., 2009)。2016 年には、全長 7.8 mm のオオウナギ *A. marmorata*、9.0 mm のオーストラリアウナギ *A. australis*、12.4 mm のオーストラリアロングフィンウナギ *A. reinhardtii* の小型レプトセファルスが南太平洋にて採集され、オオウナギはニューカレドニアからサモアの間およびフランス領ポリネシアの周辺の海域、オーストラリアウナギはバヌアツ諸島の西方海域、オーストラリアロングフィンウナギは珊瑚海の東側に産卵場が存在すると推定されている (M. Kuroki, unpublished data)。ニュージーランドオオウナギ *A. dieffenbachii* を除き、上述した以外のウナギ属魚類 9 種亜種のレプトセファルスも採集されているが、24 mm 以上の大型個体や 1 尾のみの採集であるため、それらの産卵場の推定は困難であった (Kuroki et al., 2014)。また、レプトセファルスとプレレプトセファルスの採集により推定される産卵場は、あくまで産卵が行われたと“推察される海域”に過ぎない。より正確な産卵地点の特定には、受精卵を発見するか親ウナギの産卵行動を観察する必要がある。

ウナギ属魚類 19 種亜種のうち、産卵場が最も正確に特定されている種はニホンウナギである。なぜなら、本種の推定産卵場がある西マリアナ海嶺の南端部で、2008 年に雌雄の産卵親魚 (Chow et al., 2009; Kurogi et al., 2011)、2009 年に天然卵 (Tsukamoto et al., 2011) が取れているからである。卵の発見に至るまで、様々な研究手法が駆使されてきた。例えば、卵や仔魚を採集するための大型プランクトンネットサンプリング (ORI-BigFish や IKMT ネットなど) (Tsukamoto, 1992; Shinoda et al., 2011; Tsukamoto et al., 2011; Aoyama et al., 2014) を主に、産卵時期を知るための仔稚魚の耳石日周輪解析 (Tsukamoto, 1990; Tsukamoto et al., 1989; Tsukamoto et al., 1998; Ishikawa et al., 2001)、産卵場付近における親ウナギの行動を知るための音響テレメトリーシステム (Aoyama et al., 1999a)、親ウナギの産卵回遊経路を明らかにするためのポップアップタグ (Manabe et al., 2011; Higuchi et al., 2018)、航海中に採集した卵と仔魚を種同定するための船上用リアルタイム PCR システム (Watanabe et al., 2004a; Minegishi et al., 2009a; Yoshinaga et al., 2011) などが挙げられる。長年に渡り、これらの研究手法を用いて産卵場調査を行ったことにより、ニホンウナギの産卵生態に関する知見は飛躍的に増加した。例えば、親ウナギは一斉産卵すること (Tsukamoto et al., 1998)、高塩分と低塩分の境界線である塩分フロントを超えた南側に産卵場が存在すること (Tsukamoto, 1992; Tsukamoto et al., 2011)、親ウナギが西マリアナ海嶺の南端部にある海山を目印に産卵場に集合すること (Tsukamoto et al., 2003, Tsukamoto et al., 2011) などが示された。しかし、産卵生態が最も理解されているニホンウナギでさえ、産卵行動は未だ観察されていない。

ニホンウナギの産卵イベントは、産卵集団形成 (spawning aggregation)、雌が放卵および雄が放精する産卵行動 (spawning)、産卵集団の崩壊 (breakdown of spawning aggregation)、親ウナギの離散 (leaving) から成ると想定される (Dou et al., 2007, 2008; Okamura et al., 2014) (Fig. 1-1)。水槽内にて産卵直前に、ニホンウナギの雄が頭で雌の鰓蓋や泌尿生殖孔付近を突く行動、雄と雌および雌同士が寄り添って遊泳する行動が観察されている (Dou et al., 2007)。加えて、雌は体を激しく振り水中に卵を放出し (Dou et al., 2008)、その直後に雄が雌や卵の周りを旋回遊泳するといった行動も確認されている (Okamura et al., 2014)。また、分子遺伝学的手法を用いて、ニホンウナギの産卵集団サイズを調べた結果、約 10–1000 万尾の親魚が 1 回の産卵行動に参加している可能性が示唆された (吉澤, 2006)。86 個体のプレレプトセファルス/MITコンドリア DNA のハプロタイプ数から少なくとも 77 尾の雌が産卵行動に参加していたという推定結果もある (Tsukamoto et al., 2011)。以上の観察結果から、集団の形成時期は不明であるが、ニホンウナギは産卵集団を形成して、近距離に集合し産卵行動を行なっているものと推測される。水槽内において産卵直後の雌雄は、すぐに塩ビパイプ内に戻るか、もしくは水槽の底で静止状態になったため (Dou et al., 2007)、産卵後、集団はすぐに消失し、親ウナギは産卵地点から離散すると予測される。また、2011 年に産卵場で採集されたニホンウナギ雌親魚の卵巣の組織学的観察から、この個体は排卵後濾胞と大きなサイズの卵母細胞を有していたため、本種は 1 産卵期に複数回産卵する多回産卵魚である可能性が示された (Tsukamoto et al., 2011)。よって、海洋におけるニホンウナギの産卵イベントは、少なくとも 2 回繰り返されると考えられた。

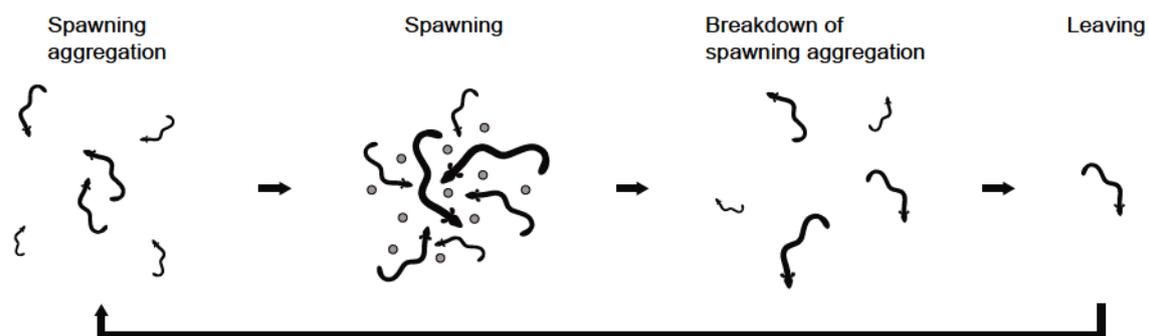


Fig. 1-1 Expected Spawning events of the Japanese eel consist of spawning aggregation, spawning, breakdown of spawning aggregation and leaving.

1998年から、小型潜水艇や水中カメラシステムを用いて、産卵海域においてニホンウナギ産卵行動の観察が試みられている。2012年のよこすか航海（YK12-11）では、ディープ・トゥという水中カメラシステムを用いて、ウナギらしき魚体の前方部が撮影された（Tsukamoto et al., 2013）。2013年のなつしま航海（NT13-11）では、Una-Cam と呼ばれる漂流式カメラシステムを用いて観察が行われたが、失敗に終わった（Fukuba et al., 2015）。観察が失敗した原因は、親ウナギの産卵地点に小型潜水艇や水中カメラシステムを仕掛けられていなかったからであると考えられる。つまり、産卵地点を未だ正確に特定できておらず、小型潜水艇や水中カメラシステムを仕掛ける地点と水深に関する指標が欠如していた。卵の採集地点の近くで親ウナギが産卵していると思われるが、産卵行動を観察するには、産卵地点をさらに絞り込む必要がある。

そこで本研究では、環境DNA法を用いて、ニホンウナギの産卵地点を絞り込むことにした。環境DNA法では、水中を漂っている各生物種固有のDNA塩基配列を検出することにより、それらの存在を簡便かつ非侵襲的に調査できる（Ficetola et al., 2008; Jerde et al., 2011; Taberlet et al., 2012a; Thomsen & Willerslev, 2015; Goldberg et al., 2016）。環境DNA法は、絶滅危惧種や外来種の分布調査（Ficetola et al., 2008; Jerde et al., 2011; Fukumoto et al., 2015; Davison et al., 2016）、生物相の把握（Thomsen et al., 2012a; Miya et al., 2015; Valentini et al., 2016; Yamamoto et al., 2017）、産卵イベントの探索（Erickson et al., 2016; Bylemans et al., 2017; Sakata et al., 2017; Takeuchi et al., 2019a）などに使用されている。ニホンウナギの環境DNAを船上で検出することができれば、調査航海中に親ウナギの分布状況を把握し、産卵が起りうる地点と水深を予測できる可能性がある。しかし、ウナギ属魚類を検出するためのプライマーはなく、また、産卵場にて得られるニホンウナギの環境DNA検出がその産卵イベントを反映するか全く不明であった。

本論文の目的は、環境DNA法のウナギ産卵イベントの探索における有用性を検討し、本法を用いてニホンウナギの産卵地点を発見することである。本章の緒言に続き、第2章では、ウナギ属魚類全種の環境DNAを識別できるユニバーサルプライマー（Takeuchi et al., 2019b）を設計するとともに、外洋水中の極めて希薄なニホンウナギ環境DNAを特異的に検出する方法を検討し、“ウナギ環境DNA法”を確立した。第3章では、野外にて得られる環境DNA検出結果からニホンウナギの産卵イベントを推測するため、環境条件をコントロールできる室内実験において、本種の環境DNAの放出量（Takeuchi et al., 2019c）と分解過程を調べた。第4章では、2回のニホンウナギ産卵場調査航海に環境DNA法を適用し、外洋における本法の有用性を検証するとともに、本種の産卵イベントを探索した。最後に第5章の総合考察では、本研究で得られた結果に基づき、環境DNA検出がどのようにウナギ産卵生態研究に役立つかをまとめ、加えて、環境DNA法の有用性と限界についても考察した。

## 第2章 ウナギ検出のための環境DNA法の検討

## 第1節 目的

ウナギ属魚類の資源量の減少が世界的に懸念されている (Dekker, 2003; Tsukamoto et al., 2009a; Jacoby et al., 2015)。国際自然保護連合 (IUCN) のレッドリストによると (IUCN, 2019)、ヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* は深刻な危機 (Critically Endangered)、ニュージーランドオオウナギ *A. dieffenbachii*、ニホンウナギ *A. japonica*、アメリカウナギ *A. rostrata* は危機 (Endangered)、ボルネオウナギ *A. borneensis* は危急 (Vulnerable)、オーストラリアウナギ *A. australis*、ベンガルウナギ *A. bengalensis*、バイカラウナギ *A. bicolor*、セレベスウナギ *A. celebesensis*、ルソンウナギ *A. luzonensis* は準絶滅危惧 (Near Threatened)、オオウナギ *A. marmorata*、モザンビークウナギ *A. mossambica*、オーストラリアロングフィンウナギ *A. reinhardtii* は低懸念 (Least Concern)、ニューギニアウナギ *A. interioris*、ポリネシアロングフィンウナギ *A. megastoma*、ポリネシアショートフィンウナギ *A. obscura* はデータ不足 (Data Deficient) に分類されている。ただし、上記の評価ではオーストラリアショートフィンウナギ *A. australis australis* とニュージーランドショートフィンウナギ *A. australis schmidtii*、インドベンガルウナギ *A. bengalensis bengalensis* とアフリカベンガルウナギ *A. bengalensis labiata*、インドヨウバイカラウナギ *A. bicolor bicolor* とタイヘイヨウバイカラウナギ *A. bicolor pacifica* の亜種を区別していなかった。ウナギ属魚類を保全するため、本属魚類の資源に影響を与えず、その分布や生態調査ができる手法の確立が急務である。

環境DNA法を用いることにより、ウナギ属魚類を捕獲せず非侵襲的に、その分布や生態調査を実行できるものと着想した。環境DNAの検出法は2通りある。1つは、次世代シーケンサーを用いて、複数種の環境DNAを同時に検出できる環境DNAメタバーコーディング法である (Taberlet et al., 2012b; Thomsen & Willerslev, 2015)。環境DNAメタバーコーディング法には、目的とする分類群のDNA部分塩基配列を同時に増幅できるユニバーサルプライマーを使用する。例えば、魚類232種を検出できたMiFishプライマー (Miya et al., 2015)、42種の十脚甲殻類を検出できたMiDecaプライマー (Komai et al., 2019)、さらに、哺乳類用プライマーMiMammal (Ushio et al., 2017) や鳥類用プライマーMiBird (Ushio et al., 2018a) などが開発されている。魚類多様性調査にはMiFishプライマーが頻用されるが、このプライマーでは、マグロ属 (Miya et al., 2015)、トラフグ属やメバル属 (Yamamoto et al., 2017)、そして、ウナギ属魚類の種判別が不可能であった (Fig. 2-1a)。

もう1つの方法は、リアルタイムPCR機器を用いて、1生物種の環境DNAを特異的に検出する単一種検出法である (Goldberg et al., 2016)。魚類では、本法をハクレン *Hypophthalmichthys molitrix* (Jerde et al., 2011; Jerde et al., 2013; Mahon et al., 2013; Wilson et al., 2014; Amberg et al., 2015) やコイ *Cyprinus carpio* (Takahara et al., 2012; Mahon et al., 2013; Eichmiller et al., 2014; Hinlo et al., 2017; Ghosal et al., 2018) などのコイ科、カワマス *Salvelinus fontinalis* (Wilcox et al., 2015; Schumer et al., 2019) やブラントラウト *Salmo trutta* (Gustavson et al., 2015; Banks et al., 2016; Fernandez et al., 2018; Deutschmann et al., 2019) などのサケ科へ適用した研究事例が多い。その他、ドジョウ *Misgurnus*

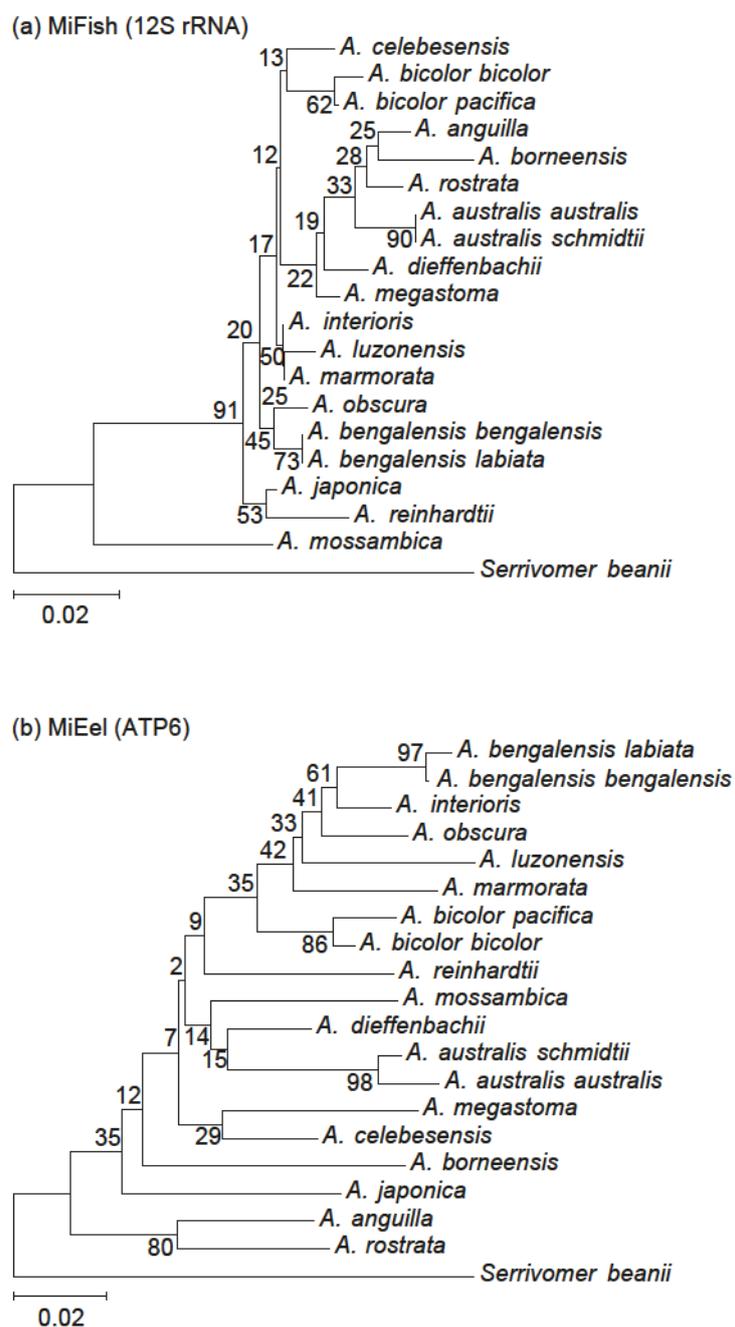


Fig. 2-1 Neighbor-joining tree of 19 species and subspecies the genus *Anguilla* plus *Serrivomer beanii* as an out-group based on the amplified regions of (a) MiFish (12S rRNA) and (b) MiEel primers (ATP6) (b). Distance was calculated using the Kimura two parameter model with all sequences containing gaps being eliminated, and numerals beside the internal branches are bootstrap probabilities of 300 replicates. This analysis of phylogenetic tree was conducted in MEGA6 (Tamura et al., 2013).

*anguillicaudatus* (Hinlo et al., 2018)、ブルーギル *Lepomis macrochirus* (Takahara et al., 2013)、ゼニタナゴ *Acheilognathus typus* (Sakata et al., 2017)、ハゼ科の一種 *Neogobius melanostomus* (Nevers et al., 2018) など様々な種で単一種検出法が確立されている。しかし、ニホンウナギを目的種として単一種検出法を検討した事例はなかったため、水中のニホンウナギ DNA を正確に検出できるか不明であった。

本章では、ウナギ属魚類全種の環境DNAを識別できる新しいユニバーサルプライマーと、ニホンウナギ環境DNAの単一種検出法を開発することを目的とした。環境DNA法の外洋への適用を想定して、海水中の希薄なウナギ属魚類のDNAを検出できる“ウナギ環境DNA法”を確立することを狙いとした。

### 第2節 次世代シーケンサーを用いたウナギ属魚類の環境DNA法の検討

#### 第1項 材料と方法

##### 2.1.1. プライマー設計

環境DNAメタバーコーディング法に用いるプライマーを設計するには、下記の3つの条件に注意する必要がある。3つの条件とは、(1) 環境DNAは劣化が進み断片化していることが多いため、増幅領域は200bp未満であること、(2) 増幅領域には目的とする全種を識別できるだけの種間変異を含むこと、(3) 種間変異の多い領域の両端に保存的な領域があることである (Miya et al., 2015; Komai et al., 2019; Takeuchi et al., 2019b)。ウナギ属魚類19種亜種のミトコンドリアゲノム(ミトゲノム)全長塩基配列を、日本DNAデータバンク(DDBJ)からダウンロードした(Accession number AB038556, AP007233–AP007249, AB469437; Minegishi et al., 2005, 2009b)。MAFFT v. 6.956 (Katoh & Toh, 2008)を用いて、これらの配列のアライメントをとり、MESQUITE v. 2.75 (Maddison & Maddison, 2010)を用いて、上記3つの条件を満たす配列を探した。設計したプライマー配列について、OligoCalc (Kibbe, 2007)を用いて、GC含量と最近接塩基対法(Nearest neighbor method)によりT<sub>m</sub>値を算出した。本研究にて新しく設計したプライマーと、既報のMiFishプライマー(Miya et al., 2015)が増幅するウナギ属魚類の塩基配列をもとに、MEGA6 (Tamura et al., 2013)を用いて遺伝距離を求め、近隣結合法(Neighbor-joining method)により系統樹を作成した。

WebLogo (Crooks et al., 2004)を用いて、新しく設計したプライマーとウナギ目魚類の塩基配列を比較して、プライマーがウナギ属魚類以外の環境DNAを非特異的に増幅してしまう可能性を検討した。19種のウナギ目魚類のミトゲノム全長配列をDDBJからダウンロードした(Accession number AB038381, AP002976–AP002978, AP010840, AP010844–AP010846, AP010848–AP010850, AP010852, AP010854–AP010856, AP010858, AP010859, AP010861, AP010864; Inoue et al., 2010)。これらのウナギ目魚類はウナギ属魚類に近縁で、浅海や大陸棚、外洋中深層に生息する種であり、ウナギ属魚類と分布が重複する可能性があった。また、新プライマーが増幅するウナギ目魚類19種とウナギ属魚類19種亜種の塩基配列をもとに、MEGA6 (Tamura et al., 2013)を用いて遺伝距離を求めて、ウナギ属魚類とそれ以外のウナギ目魚類を識別可能か調べた。

新しく設計したプライマーを用いてウナギ属魚類19種亜種のDNAを特異的に増幅可能か調べるため、本属魚類全種の筋肉、肝臓、鱭のいずれかの組織からDNAを抽出して、新プライマーの性能を検証した。DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany) を用いて、ウナギ属全種各1個体の組織からDNAを抽出した。抽出方法は、付属説明書に従い、最終溶出量を100 µlに調製した。組織には、以前に形態形質と分子形質を用いて正確に種同定され(渡邊, 2001)、10年以上99%エタノールで保存されていた標本を使用した。NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて、抽出したDNA濃度を計測し、滅菌蒸留水で5 ng/µlに希釈した。PCR反応液は、2×Gflex PCR buffer 3.82 µl (Takara, Japan)、Tks Gflex DNA polymerase 0.16 µl (Takara)、5 µMの新しく設計したプライマー各0.38 µl、および組織DNA抽出溶液0.64 µlに滅菌蒸留水を加えて最終容量を7.67 µlとした。反応にはGeneAmp PCR システム9700 サーマルサイクラー (Applied Biosystems, USA) を用いて、94°C・1分間加熱した後、熱変性98°C・10秒、アニーリング50°C・10秒、伸長反応68°C・10秒の過程を35回繰り返し、最後の伸長反応を68°C・7分で行なった。PCR産物は、2%のアガロースゲル(L03; Takara)を用いて電気泳動に供し、臭化エチジウム染色と紫外線照射により、増幅産物の有無を確認した。ExoSap-IT (Affymetrix, USA) を用いて、PCR産物中の残留プライマーや酵素を除去した後、BigDye terminator v. 1.1 (Applied Biosystems) を用いて、Dye Termination反応を行なった。PCRに用いたものと同じサーマルサイクラーとプライマーをこの反応に使用し、反応条件はApplied Biosystems社の付属説明書に従った。ABI 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、反応産物の塩基配列を決定した。

### 2.1.2. 組織抽出DNAを用いたプライマーの性能の検証

新しく設計したプライマーを用いて得られるPCR増幅産物の塩基配列により、本属魚類全種について検出の成否を検証した。ウナギ属魚類全種の組織抽出DNA溶液を5 ng/µlに希釈して、最少2種から最多19種の組織抽出DNA溶液を等量混合し、計6つの試験用DNAサンプルを調製した。これら試験用DNAサンプルを用いて、ファーストPCR(以下1st PCR)とセカンドPCR(以下2nd PCR)を行い、増幅したDNA塩基配列にシーケンスのためのアダプター配列、増幅配列を見分けるためのインデクス配列、次世代シーケンサーMiSeq用フローセルへの結合配列を付加させた。インデクス配列の付加により、1回のシーケンスにて、複数サンプル由来のDNA塩基配列を識別可能となった。1st PCR反応液は、2×KAPA HiFi HotStart Ready Mix 6.0 µl (KAPA Biosystems, USA)、新しく設計したプライマー各0.3 µM、および試験用DNAサンプル2 µlに滅菌蒸留水を加えて最終容量を12 µlとした。反応にはGeneAmp PCR システム9700 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) を用いて、95°C・3分間加熱した後、熱変性98°C・20秒、アニーリング65°C・15秒、伸長反応72°C・15秒の過程を35回繰り返し、最後の伸長反応を72°C・5分で行なった。コンタミネーションの可能性を試験するため、試験用DNAサンプルの代わりに、PCR反応液に滅菌蒸留水を加えて1st PCRブランクを作製した。

MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて1st PCR産物を精製後、TapeStation 2200 (Agilent

Technologies, USA) を用いてその濃度を計測した。1st PCR 産物を滅菌蒸留水で 0.1 ng/μl に希釈し、2nd PCR の鋳型 DNA として使用した。

2nd PCR の反応液は、2×KAPA HiFi HotStart Ready Mix 6.0 μl (KAPA Biosystems)、インデクス配列を付加したプライマー各 0.3 μM、および 0.1 ng/μl に希釈した 1st PCR 産物 1 μl に滅菌蒸留水を加えて最終容量を 12 μl とした。A/D501–508 のフォワードプライマー、A/D701–712 のリバースプライマーを用いて 2nd PCR を行うことにより、6 つの試験用 DNA サンプルに由来する DNA 塩基配列に異なるインデクス配列をそれぞれ付加した (Miya et al., 2015; Takeuchi et al., 2019b)。反応には、GeneAmp PCR システム 9700 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) を用いて、95°C・3 分間加熱した後、熱変性 98°C・20 秒、アニーリングと伸長反応 72°C・15 秒の過程を 12 回繰り返す、最後の伸長反応を 72°C・5 分で行なった。1st PCR 産物の代わりに、PCR 反応液に滅菌蒸留水を加えて 2nd PCR ブランクを作製した。

全ての 2nd PCR 産物を 1 つの 1.5 μl チューブに入れて、E-Gel Power Snap Electrophoresis System (Invitrogen, USA) を用いて、2% E-Gel Size Select agarose gel (Invitrogen) から目的サイズである 364 bp の増幅産物をピペットで吸い出した。Qubit ds DNA HS assay Kit (Life Technologies, USA) を用いて、ゲルから吸い出した溶液の濃度を計測した。MiSeq v2 Reagent Kit for 2×150 bp PE (Illumina, USA) と次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) を用いて、付属説明書に従い、ペアエンド法で試験用 DNA サンプルの塩基配列を決定した。

### 2.1.3. 環境水を用いたプライマーの性能の検証

新しく設計したプライマーを用いて、環境水サンプルからウナギ属魚類の DNA 検出を試みた。環境 DNA の劣化を避けるため、現場濾過法を用いて試料の採水を行なった (Miya et al., 2016)。バケツで表層水を採り、50 ml シリンジ (Terumo, Japan) を用いて、0.45 μm の粒子保持能を持ったステリベクス (Merck Millipore, USA) に濾過量が 500 ml になるまで水を通した。RNAlater™ Stabilization Solution 1.6 ml (Thermo Fisher Scientific) をステリベクス内に添加し、DNA の分解を防止した。バケツは 0.5% の次亜塩素酸溶液で殺菌して、水道水でよく洗浄し、採水する河川水で共洗いしてから使用した。使い捨ての手袋をつけて採水と濾過を行い、地点ごとに手袋を交換した。2017 年 8 月 22 日、宮崎県にある水槽水と人工池から採水した。*A. bicolor bicolor* または *A. australis* sp. (全長 70cm) の単一種を収容した水槽 (縦 120×横 45×高さ 40 cm, 水量 205 L) から、それぞれ 500 ml を採水してその場で濾過した。同日、20 尾の *A. japonica* (全長 52–80 cm) を飼育している人工池 (縦 45×横 20×水深 1 m, 水量 850,000 L) から同様に採水してその場で濾過した。2017 年 9 月 10 日、静岡県にある伊東宮川の河口 (35.002°N, 139.082°E) と中流 (35.003°N, 139.080°E)、伊東仲川の河口 (35.005°N, 139.083°E)、烏川の河口 (35.008°N, 139.085°E) および東京都にある海老取川の河口 (35.550°N, 139.752°E) の計 5 地点から採水してその場で濾過した。静岡県の河川では、電気ショッカーを用いて *A. japonica* を捕獲している現場を確認した。東京都の河川では釣りによる *A. japonica* の採集を伝聞した。採水する時は、地点間のコンタミネーション

を避けるため、河川に入らず作業をした。1日の採水が終わった後、蒸留滅菌水 500 ml を同じ方法で濾過し、計2つの濾過ブランクを作製した。10個のステリベクスを氷冷状態で研究室に輸送し、環境DNA抽出まで1–20日間、 $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で保存した。

環境水サンプルを分析する時、コンタミネーションを最小限に抑えるための作業を実施した。部屋の机や使用する機器類を0.5%の次亜塩素酸溶液が染み込んだキムワイプで拭いた。実験にはフィルターチップを使い、PCRの前と後で作業を実施する部屋を変えた。コンタミネーションの有無を判断するため、抽出、1st PCR、2nd PCRそれぞれの工程でブランクを作製した。DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて、10個のステリベクスから環境DNAを抽出した。抽出方法は、付属説明書と Miya et al. (2015, 2016) に従った。

1st PCR には、MiFish (Miya et al., 2015) と新しく設計したプライマーを用いた。1st PCR 反応液は、 $2\times$ KAPA HiFi HotStart Ready Mix 6.0  $\mu\text{l}$  (KAPA Biosystems)、プライマー各 0.3  $\mu\text{M}$ 、および環境水サンプル 2  $\mu\text{l}$  に滅菌蒸留水を加えて最終容量を 12  $\mu\text{l}$  とした。生物が存在するが検出できないという偽陰性を回避するため、ブランクを除き、1環境水サンプルあたり8つの1st PCR 反応液を調製した。各サンプルに由来する8つの1st PCR 産物を1つの1.5 ml チューブにまとめ、MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて最終容量 12  $\mu\text{l}$  で精製した。精製した1st PCR 産物を、滅菌蒸留水で 0.1 ng/ $\mu\text{l}$  に希釈し、2nd PCR の鋳型DNAとして使用した。1st PCR に使用するプライマーセットの数と複製回数を除き、PCR や MiSeq のシーケンス条件などは、試験用DNAサンプルを分析した際と全て同じ手順で行なった。

#### 2.1.4. シーケンスデータ解析

MiSeq から得られたシーケンスデータの解析には、USEARCH v10.0.240 (Edgar, 2010) を使用した。fastq\_mergepairs コマンドを用いて、フォワードおよびリバース側からペアエンド法で読んだリードを混合して、アライメントにより結合させた。この間、閾値として Phred score が 20 ( $10^2$ のエラー率) 以下の塩基を含む低品質リード、およびアライメントした配列内 (約 70 bp) に 5 塩基以上の違いがあるリードを除去した。fastx\_truncate コマンドを用いて、結合させた配列からフォワードおよびリバースプライマーの配列を切り取った。fastq\_filter コマンドを使って、推定エラー率が 1%以上および 120 bp 以下の低品質リードを除去した。fastx\_uniques コマンドを使って、クラスタリングにより解析可能な数を持つリードを絞り込み、シングルトン、ダブルトン、トリプレトンのリードは、Edgar (2010) に従って解析から除いた。unoise3 コマンドを使って、キメラやエラー配列であると思われるリードを除去した。usearch\_global コマンドを使って、得られたリードをリファレンス配列と比較して種を同定した。リファレンス配列と 98.5%以上の類似性を示すリードを種同定されたものとして扱った。全てのブランクからリードが検出されない時のみ、得られたシーケンス結果を有効なデータとした。

## 第2項 結果

## 2.2.1. ウナギ属魚類用“MiEel”プライマー

ウナギ属魚類19種亜種のみトゲノム全長配列を比較した結果、ATP6遺伝子内に167bpの可変領域を見つけた。この可変領域の両端に保存的な配列が存在したため、ここに新しいウナギ属魚類用プライマー“MiEel”を設計した（Table 2-1, Table 2-2）MiEelのフォワードプライマーは5'-CTTACAGCAAACCTGACAGCAG-3'で、リバースプライマーは5'-

TTGGTGTGCCATTATACGTTTTCTTG-3'であった。フォワードとリバースの配列はそれぞれ22塩基と26塩基、T<sub>m</sub>値は55.7°Cと55.9°C、GC含量は50%と38%であった。ウナギ属魚類19種亜種のうち、12種とフォワードプライマーの配列間に1塩基の不一致がみられた（Fig. 2-2, Fig. 2-3a）。一方で、リバースプライマーの配列は本属魚類全種のものとも一致した（Table 2-2, Fig. 2-3b）。

ウナギ属魚類19種亜種間において、MiEelプライマーが増幅するATP6領域部分配列の遺伝子距離は0.6–13.2%（平均9%）であり、塩基の変異数は1–22個（平均14個）であった（Fig. 2-1b）。これらの塩基の変異の数は、MiFishプライマーが増幅する12S rRNA領域部分配列の0–14個（平均6）より多いことが分かった（Fig. 2-1）。また、MiEelプライマーの増幅領域において、最小の1塩基の変異は*A. bengalensis*の亜種間に存在した。3塩基の変異は、*A. australis*と*A. bicolor*の亜種間に見つかった。

MiEelプライマーとウナギ目魚類19種の配列が似ていたため、本プライマーは、ウナギ属魚類以外のウナギ目魚類の環境DNAを増幅してしまう可能性が考えられた（Fig. 2-3c,d）。一方で、本プライマーで増幅されるウナギ目19種とウナギ属魚類19種亜種の配列をもとに、遺伝距離を算出したところ13.2–33.2%（平均22.7%）であった（Fig. 2-4）。

アダプター配列を除いたMiEelプライマーを用いて、ウナギ属魚類19種亜種の組織から抽出したDNAをPCRにかけた結果、全種において良好な増幅を確認した。得られた塩基配列は、GENETYX-MAC v.17（Genetyx）を用いて編集し、DDBJに登録した（Accession number LC198042–198060）。

## 2.2.2. 組織抽出DNAからの検出

MiEelプライマーを用いて、6つの試験用DNAサンプルを分析した。その結果、2亜種*A. australis schmidtii*と*A. bengalensis bengalensis*を除き、17種亜種が検出できた（Table 2-3）。おおむね、ウナギ属魚類全種の組織から抽出した溶液を混ぜたとおり、各試験用DNAサンプルから種を正しく検出できた。このことから、MiEelプライマーは、ウナギ属魚類を種レベルであれば識別可能であると判断した。また、検出されるリード数は、種により大きく異なった（Table 2-3）。試験用DNAサンプルに加えたウナギ属魚類の組織抽出溶液の種数が増えると、検出される各種のリード数が全体的に減る傾向があった。*A. bicolor pacifica*と*A. borneensis*は、それらの組織抽出溶液を試験用DNAサンプルに混ぜたが、サンプル#2と#5から検出されず、他の種に比べて、これら2種の検出されたリード数は3–14リードと少なかった。一方で、*A. anguilla*は、組織抽出溶液を加えていないのに

Table 2-1 Sequences of MiEel primers for metabarcoding eDNA from the genus *Anguilla* for the first-round PCR (1st PCR). Underlines show universal sequences for the genus *Anguilla*.

Primers for the first-round PCR Sequence (5'-3')	
MiEel (forward)	ACACTCTTTCCCTACACGACGGCTCTTCCGATCTNNNNNCTT <u>ACAGCAAACCTGACAGCAG</u>
MiEel (reverse)	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNNNTTGGTGTGCCATTATACGTTTTCTTG

Table 2-2 Nucleotide sequences and base compositions of the MiEel forward primer (MiEel-F) and reverse primer (MiEel-R).

MiEel-F	5'-	C	T	T	A	C	A	G	C	A	A	A	C	C	T	G	A	C	A	G	C	A	G	-3'			
	A	0	0	0	19	0	19	0	0	18	19	19	0	0	0	0	9	19	0	19	0	0	19	0			
	C	19	0	1	0	19	0	0	19	0	0	0	18	19	0	0	0	19	0	0	19	0	0	19	0		
	G	0	0	0	0	0	19	0	1	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	19	0	0	19	0			
	T	0	19	18	0	0	0	0	0	0	0	1	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
MiEel-R	5'-	T	T	G	G	T	G	T	G	C	C	A	T	T	A	T	A	C	G	T	T	T	C	T	T	G	-3'
	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	19	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	C	0	0	0	0	0	0	0	19	19	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	19	0	
	G	0	0	19	19	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	19	
	T	19	19	0	0	19	0	19	0	0	0	0	19	19	0	19	0	0	0	19	19	19	19	0	19	19	

MiEel-F	5' - C T T A C A G C A A A C C T G A C A G C A G - 3'
<i>A. anguilla</i>	. . . . .
<i>A. australis australis</i>	. . . . .
<i>A. australis schmidtii</i>	. . . . .
<i>A. bengalensis bengalensis</i>	. . . . . A . . . . .
<i>A. bengalensis labiata</i>	. . . . . A . . . . .
<i>A. bicolor bicolor</i>	. . . . . A . . . . .
<i>A. bicolor pacifica</i>	. . . . . A . . . . .
<i>A. celebesensis</i>	. . . . .
<i>A. dieffenbachii</i>	. . C . . . . .
<i>A. interioris</i>	. . . . . A . . . . .
<i>A. japonica</i>	. . . . .
<i>A. luzonensis</i>	. . . . . A . . . . .
<i>A. borneensis</i>	. . . . . A . . . . .
<i>A. marmorata</i>	. . . . . A . . . . .
<i>A. megastoma</i>	. . . . .
<i>A. mossambica</i>	. . . . .
<i>A. obscura</i>	. . . . . A . . . . .
<i>A. reinhardtii</i>	. . . . . G . . . . .
<i>A. rostrata</i>	. . . . . T . . . . .
<i>Stemonidium hypomelas</i>	. . . . . A . . . . .
<i>Nemichthys scolopaceus</i>	. . G . . C . . C . . T . . A . . C . . . .
<i>Moringua edwardsi</i>	. . . . . T . . T T . A . . . . .
<i>Conger myriaster</i>	. . . . . T . . A . . . . . T .
<i>Rhinomuraena quaesita</i>	. . . . .
<i>Gymnothorax kidako</i>	. . . . . T . . . . . T .
<i>Muraenesox bagio</i>	. . C . . . . . T . A . . . . .

Fig. 2-2 Nucleotide variations in the MiEel forward primers (MiEel-F) among 19 species/subspecies of *Anguilla* and other anguilliforms (*Stemonidium hypomelas*, *Nemichthys scolopaceus*, *Moringua edwardsi*, *Conger myriaster*, *Rhinomuraena quaesita*, *Gymnothorax kidako*, *Muraenesox bagio*). Dots indicate that nucleotides are identical to those of MiEel-F on the top line.

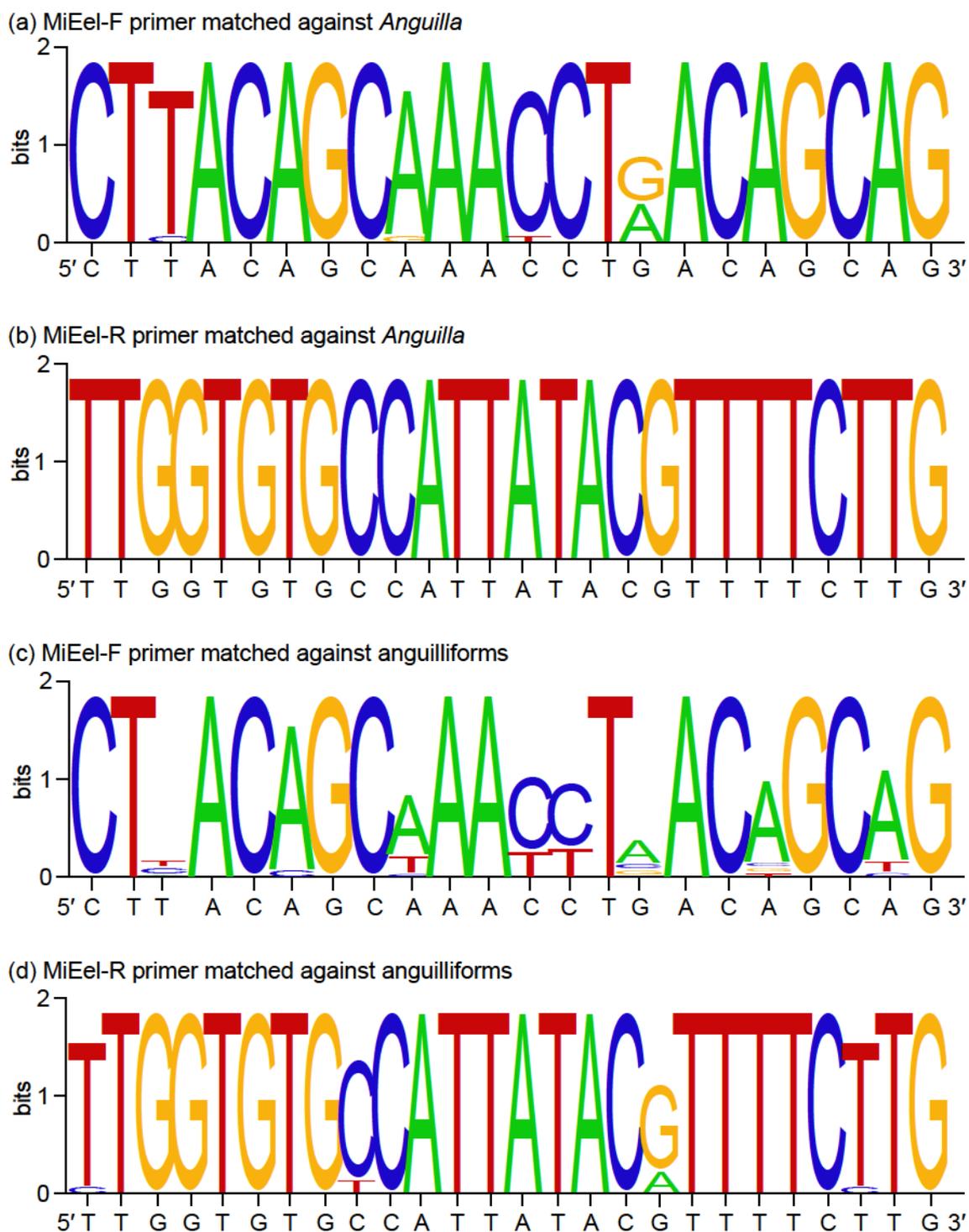


Fig. 2-3 Sequence logo plots using WebLogo (Crooks et al., 2004) between the MiEel-F/R primers and the genus *Anguilla* (a, b), and 19 species of the anguilliforms (c, d).

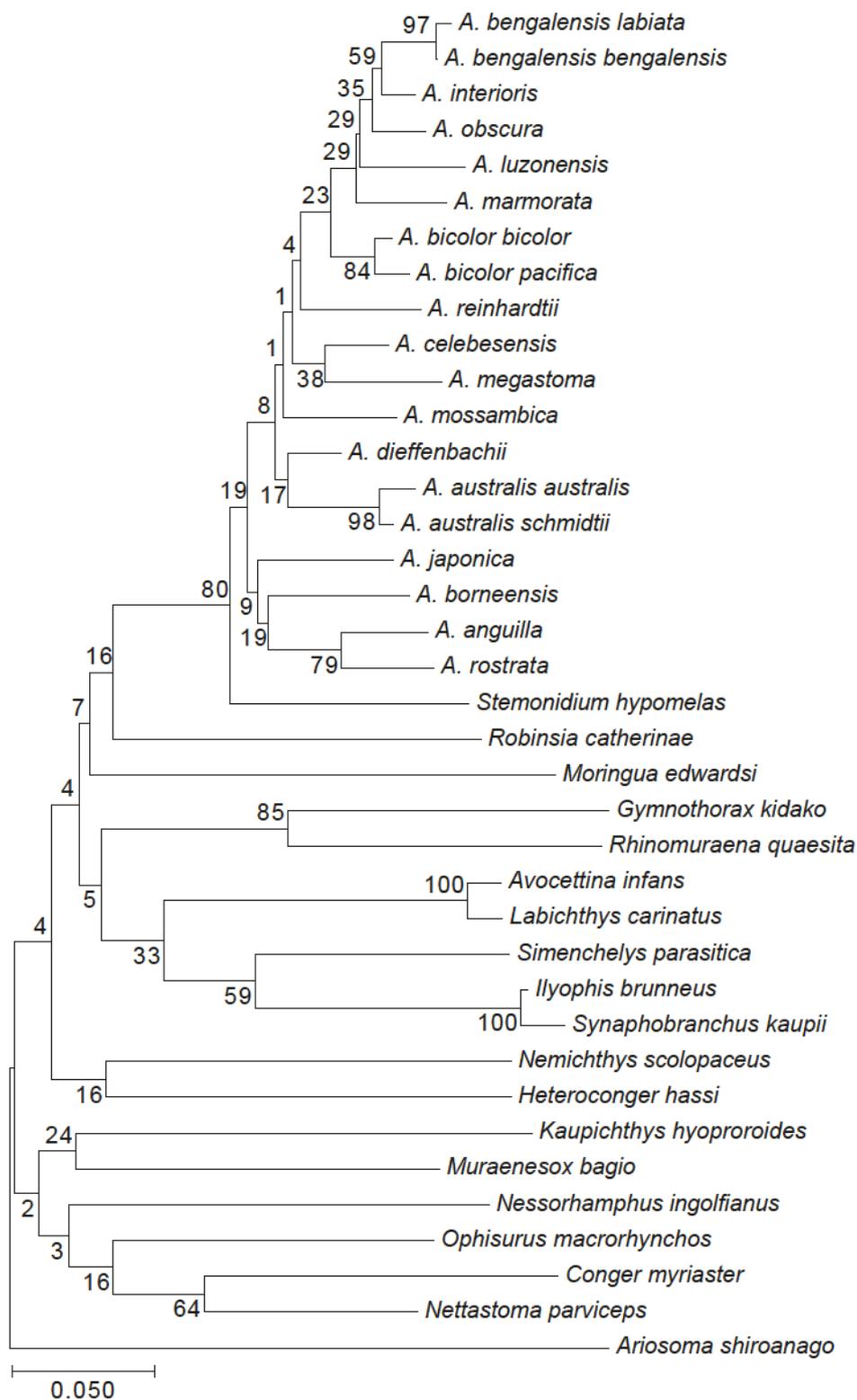


Fig. 2-4 Neighbor-joining tree of 19 *Anguilla* and 19 anguilliforms based on the variable sequences of 167 bp within the ATP6 region. Distance was calculated using the Kimura two parameter model with all sequences containing gaps being eliminated, and numerals beside the internal branches are bootstrap probabilities of 300 replicates. This analysis of phylogenetic tree was conducted in MEGA6.

Table 2-3 The number of sequence reads with identity of more than 98.5% from six mock communities. The gray shading shows the species whose extracted DNA were added to mock communities.

Species	Number of sequence reads from each mock community					
	#1	#2	#3	#4	#5	#6
<i>A. anguilla</i>	7627	7	18,978	0	1239	0
<i>A. australis australis</i>	0	12,036	0	0	8602	0
<i>A. australis schmidtii</i>	0	0	0	0	0	0
<i>A. bengalensis bengalensis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>A. bengalensis labiata</i>	0	0	0	3649	541	0
<i>A. bicolor bicolor</i>	792	185	0	706	113	321
<i>A. bicolor pacifica</i>	6	0	0	0	0	3
<i>A. celebesensis</i>	0	58	0	223	27	0
<i>A. dieffenbachii</i>	0	462	0	0	300	0
<i>A. interioris</i>	0	1764	0	0	1031	0
<i>A. japonica</i>	13,957	0	0	0	2753	16,250
<i>A. luzonensis</i>	0	1991	0	6654	1104	0
<i>A. borneensis</i>	0	0	0	14	0	0
<i>A. marmorata</i>	2237	463	0	1339	233	725
<i>A. megastoma</i>	0	0	0	0	5479	0
<i>A. mossambica</i>	0	0	0	9109	1734	0
<i>A. obscura</i>	0	192	0	0	122	0
<i>A. reinhardtii</i>	0	436	0	0	259	0
<i>A. rostrata</i>	0	0	10,980	0	685	0
Total	24,619	17,587	29,958	21,694	24,222	17,299

もかわらず、試験用DNAサンプル#2から7リードが検出された。同じ手順で分析した1st PCRと2nd PCR ブランクから、リードは検出されなかった。

### 2.2.3. 環境水からの検出

MiEelプライマーを用いて、環境水サンプルを分析した。その結果、水槽水からは飼育している *A. bicolor bicolor* と *A. australis australis* が正しく検出できた (Table 2-4)。人工池からは、8014の *A. japonica* のリードが検出された。そして、静岡県と東京都の河川にて採水した全5試料から、*A. japonica* が検出された。海老取川では、*A. japonica* はわずか8リードしか検出されない一方、その他の4地点では約295以上のリードが検出された (Table 2-4)。同じ手順で分析した濾過、抽出、1st PCR、2nd PCR ブランクから、リードは検出されなかった。

## 第3節 リアルタイムPCRを用いたニホンウナギの環境DNA法の検討

### 第1項 材料と方法

#### 3.1.1. 水槽水を用いた予備実験

ニホンウナギの環境DNAを水試料から検出できるかを検証するため、リアルタイムPCRを用いて予備実験を行なった。ニホンウナギ3尾 (全長40–80 cm) を水槽 (縦45×横89×高さ45 cm, 水量100 L) に収容した。水槽内にエアレーションを設置し、水を循環させた。水温は約20°Cであった。供試魚には、時間を決めず週に2–3回の給餌をした。プラスチックボトル (ASONE, Japan) で水槽水500 mlを採水し、直径47 mmのガラス繊維ろ紙 (粒子保持能0.3 μm, Advantec, Japan) をマグネットフィルターファンネル (ASONE) に装着して、5連マニホールド (サンプラテック, Japan) とアスピレーター (ASONE) を用いて加圧濾過した。濾過後、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を使ってろ紙から環境DNAを抽出した。抽出法は、付属の説明書と Miya et al. (2015) に従い、最終溶出量を50 μlに調節した。Nano-drop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて環境DNA抽出物の濃度を計測し、純水で10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001 ng/μlに希釈した。

リアルタイムPCR反応液は、2×FastStart Essential DNA Probes Master Mix 10 μl (NIPPON Genetics, Japan)、プライマー各0.5 μM、加水分解プローブ0.1 μM、および希釈した環境DNA抽出物5 μlにPCRグレード水 (NIPPON Genetics) を加えて最終容量を20 μlとした。反応にはLight Cycler® Nano (Roche, Switzerland) を用いて、95°C・10分間加熱した後、熱変性95°C・20秒、アニーリングと伸長反応60°C・40秒の過程を65回繰り返した。ニホンウナギの組織から抽出したDNAをポジティブコントロールとした。また、純水500 mlを同じ方法で濾過、抽出、リアルタイムPCRで分析することにより、ブランクを作製した。リアルタイムPCRには、ニホンウナギ卵の種同定に使われてきたプライマーとプローブを用いた (Watanabe et al., 2004a; Minegishi et al., 2009a)。Watanabe et al. (2004)は、ニホンウナギとその近縁種であるオオウナギ *A. marmorata*、タイヘイヨウバイカラウナギ *A. bicolor pacifica*、マアナゴ *Conger myriaster*、モトノコバウナギ *Serrivomer sector*、タケウツボ *Strophidon ui*、ハナヒゲウツボ *Rhinomuraena quaesita*、*Uropterygius* sp.、ヒメノコバウナギ

Table 2-4 The number of sequence reads with identify of more than 98.5% from water samples from two tanks, the controlled pond and four natural rivers. An individual *A. bicolor bicolor* (Bibi) was in one tank, and an *A. australis* sp. (Aust) was in second tank. *Anguilla japonica* is expected to be present the controlled pond and four rivers.

Species	Number of sequence reads from two aquarium tanks, a controlled pond and four natural rivers						
	Bibi tank	Aust tank	Controlled pond	Ebitorigawa	Karasugawa	Ito-nakagawa	Ito-miyagawa estuary upstream
<i>A. australis australis</i>	0	16,360	0	0	0	0	0
<i>A. australis schmidtii</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. bicolor bicolor</i>	224	0	0	0	0	0	0
<i>A. japonica</i>	0	0	8014	8	479	702	299
Total	224	16,360	8014	8	479	702	299
							466

*Stemonidium hypomelas* の組織から抽出したDNAを用いてリアルタイムPCRを行い、*A. marmorata* でわずかに増幅したものの、*A. japonica* でのみ再現性のある増幅がみられたことを報告した。また、Minegishi et al. (2009a)は、*A. japonica*、*A. marmorata*、*A. bicolor pacifica* の組織DNA溶液2.0–7.0 ng/μlをリアルタイムPCRで分析し、7.0 ng/μl以下であれば、*A. japonica* のみを特異的に検出できると結論した。水試料中のDNA濃度は希薄であるため、これらのプライマーとプローブは、水中の*A. japonica* の環境DNAを特異的に検出できると考えられた。フォワードプライマーの配列は5'-AATCAGTAATAAGAGGGCCCAAGC-3'、リバースプライマーの配列は5'-TGTTGGGTAAACGGTTTGTGGTA-3'、加水分解プローブの配列は5'-CACATGTGTAAGTCAGAACGGACCGACC-3'であった。このプライマーセットを用いることにより、ミトコンドリアDNA内の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列107 bpが増幅され、154 bpの増幅産物が得られる。本研究では、プライマーおよびプローブの配列を、*A. japonica*、*A. bicolor pacifica*、*A. marmorata*、クビナガナゴ *Derichthys serpentinus*、モトノコバウナギ *Serrivomer sector* のものと比較した。上記の種は、*A. japonica* に近縁な種であり、本種の産卵場に分布する可能性があった (Watanabe et al., 2004a; Minegishi et al., 2009a; Inoue et al., 2010; Kuroki et al., 2014)。コンタミネーションを回避するため、採水、濾過、抽出、リアルタイムPCRを行う際は使い捨ての手袋を着用し、手袋をたびたび交換した。

### 3.1.2. クローニング法

希薄な環境DNAからニホンウナギを確実に種同定するために、DNAの単離と大量培養が可能なクローニング法を検討した。1個体のニホンウナギ(全長70 cm)を収容した水槽(縦45×横89×高さ45 cm, 水量100 L)の水500 mlを採水し、50 ml シリンジ(Terumo)と0.45 μmの粒子保持能をもつステリベクス(Merck Millipore)を用いて、その場で水を濾過した(Miya et al., 2016)。同じ手順で、紫外線殺菌した純水500 mlを濾過し、濾過ブランクを作製した。濾過後すぐに、DNeasy Blood & Tissue Kitを用いて、ステリベクスから環境DNAを抽出した。抽出法は付属説明書とMiya et al. (2015, 2016)に従い、最終溶出量を100 μlとした。未希釈の環境DNA抽出溶液と、紫外線殺菌した純水で10倍、100倍、1,000倍および10,000倍希釈したものを調製した。試薬類中のコンタミネーションの有無を調べるため、抽出ブランクを作製した。

定量PCR反応液は、2×FastStart Essential DNA Probes Master Mix 5 μl (NIPPON Genetics)、プライマー各0.5 μM、加水分解プローブ0.1 μM、および調製した環境DNA抽出物2 μlにPCRグレード水(Roche)を加えて最終容量を10 μlとした。反応にはLight Cycler® Nano (NIPPON Genetics)を用いて、95°C・10分間加熱した後、熱変性95°C・20秒、アニーリングと伸長反応60°C・40秒の過程を50回繰り返した。定量PCRには、水槽水を用いた予備実験と同じプライマーとプローブを用いた(Watanabe et al., 2004a; Minegishi et al., 2009a)。採水、抽出、qPCRブランクおよび環境DNA抽出物1サンプルを全て3繰り返して分析した。ニホンウナギの目的配列を挿入したプラスミドDNA溶液 $3 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^2$ 、 $3 \times 10^1$ 、 $3 \times 10^0$  copies/μlをスタンダード溶液として、

各濃度3繰り返しで分析した。これら7点の定量値を用いて検量線を作成し、水槽水に由来する環境DNAの濃度を推定した。

コンタミネーションを避けるため、部屋の机や使用する機器類を0.5%の次亜塩素酸溶液を染み込ませたキムワイプで拭いた。フィルターチップを使用し、抽出作業はクリーンベンチ内で実施した。定量PCRの前と後で部屋を分けて作業を行い、作業中は手袋を着用し、たびたび交換した。

定量PCR産物からクローニング法を用いて、ニホンウナギDNAを単離し、その塩基配列の決定を試みた。DNA中のウラシルの存在は、クローニングの成功に影響する可能性が指摘されていた(Jensen et al., 2018)。本研究にて、定量PCRに用いたFastStart Essential DNA Probes Master Mixには、デオキシチミジン三リン酸(dTTP)の代わりにデオキシウリジン三リン酸(dUTP)が含まれるため、得られるPCR産物にはウラシルが組み込まれる。よって、定量PCR産物のクローニングにはウラシルを合成できる大腸菌CJ236(Takara)とウラシルを合成できない大腸菌JM109(Nippon Gene)を使用した。1サンプルに由来する3つの定量PCR産物を0.2 mlチューブにまとめ、2%アガロースゲル(Takara)を用いて産物を電気泳動に供し、154 bp付近のバンドをゲルから切り出した。Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)を用いてゲルを精製し、紫外線殺菌した純水30 µlで溶出した。プラスミドベクターへの目的配列のインサート効率を向上させるため、増幅産物の3'末端にアデニン塩基を付加する反応を行なった。精製したPCR産物9 µlにdA-overhang reaction Mix 1 µl (Nippon Gene)を加えて、65°C・10分間で反応を進めた。その後、2×rapid ligation buffer 2.5 µl (Promega)、pGEM-T Easy Vector 0.5 µl (Promega)、T4 DNA ligase 0.5 µl (Promega)および反応液1.5 µlを混合して、ライゲーション反応を行なった。反応溶液を一晩4°Cで保存した。

定量PCR産物とライゲーションしたプラスミドベクターを大腸菌CJ236とJM109へ導入し、形質転換を行なった。形質転換の方法は、各大腸菌の付属説明書に従った。形質転換後の溶液を80 µlずつ、計3枚の2×YT培地プレートに全量まき、37°Cの恒温槽にプレートを入れて約20時間保温した。大腸菌JM109の溶液をプレートにまく前、X-gal/IPTG solution (フナコシ, Japan) 100 µlをプレートに添加した。ただし、CJ236をクローニングに用いた際はこの作業を行わなかった。各プレートから10個の白コロニーを選択し、PCR法によるプラスミドインサートチェックを行なった。PCR反応液は、Go Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase 0.05 µl (Promega)、2 mMのdNTPs 0.2 µl (Toyobo, Japan)、5×Green Go Taq Reaction Buffer 2 µl (Promega)、プライマー各0.5 µMに紫外線殺菌した純水を加えて最終容量を10 µlとした。PCR反応液をチューブに分注後、選択した白コロニーを滅菌した爪楊枝で取り、新しい2×YT培地プレートに移した後、楊枝をPCR反応液に浸けた。反応にはT100<sup>™</sup> Thermal cycler (BioRad)を用いて、95°C・3分間加熱した後、熱変性95°C・30秒、アニーリング50°C・30秒、伸長反応72°C・90秒の過程を25回繰り返し、最終伸長反応を72°C・3分で行なった。プラスミドインサートチェックには、ニホンウナギに特異的なプライマーを用いた(Watanabe et al., 2004a, Minegishi et al., 2009a)。PCR反応物を1%アガロースゲル(Takara)上で電気泳動にかけ、バンドがある場合、プラスミドベクターの大腸菌へのインサートが成功したものと判断した。インサートが成功したコロニー3つを爪楊枝で2 mlの2×YT液体培地に接種し、ウォーターバス内

で37°C・約16時間震盪しながら培養した。Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いて、プラスミド DNA を精製した。DNA 濃度を NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) を使用して計測した。

Bigdye terminator v. 1.1 (Applied Biosystems) を用いて、Dye Termination 反応を行なった。PCR に用いたものと同じサーマルサイクラーをこの反応に使用し、反応条件は Applied Biosystems 社の付属説明書に従った。プライマーは、プラスミドベクター内のシーケンス用配列の相補鎖である T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') と SP6 (5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3') を用いた。残留した蛍光色素やプライマーなどを除去するため、MagSi-DT removal (magtivio, Netherlands) を用いて、反応後の溶液を精製した。ABI 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、反応産物の塩基配列を決定した。ClustalW を用いて3つのプラスミド DNA から得られたシーケンスデータのアライメントを取り、BLAST を用いて配列の種同定をした。

## 第2項 結果

### 3.2.1. ニホンウナギの環境 DNA 法の検証

プライマーおよびプローブのニホンウナギへの特異性を調べた結果、ニホンウナギを除き、プライマーの3'末端から5塩基以内に変異や欠損がみられた (Fig. 2-5)。プローブの配列にも、*A. japonica* を除いた種において1-5塩基の違いがあった (Fig. 2-5)。よって、プライマーとプローブは、ニホンウナギに特異性を有するものと考えられた。

リアルタイム PCR 機器と上記のプライマーおよびプローブを用いて、ニホンウナギの水槽水を分析した結果、10、1、0.1 ng/μl の環境 DNA 抽出溶液 (PCR1 反応あたり 50、5、0.5 ng の eDNA を含む) で DNA 増幅がみられた (Fig. 2-6)。これらの Ct 値 (PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数) は、それぞれ 28.4、31.8、34.8 であった。一方で、0.01、0.001、0.0001 ng/μl の環境 DNA 抽出物はいずれも DNA 増幅を示さなかった。

### 3.2.2. クローニング法によるニホンウナギの検出

水槽水から抽出した環境 DNA を未希釈および10倍、100倍、1,000倍希釈した溶液は、定量 PCR で3回分析したうち、全て DNA 増幅を示した (Table 2-5)。一方で、10,000倍希釈では、DNA は全く増幅されなかった。定量 PCR の検量線の決定係数は 0.9995、傾きは -3.9、y 切片は 36.72 であった。増幅効率率は 80.3% であった。濾過、抽出、定量 PCR ブランクから DNA 増幅は確認できず、全て陰性反応を示した。

ウラシル合成能を持つ大腸菌 CJ236 を用いたクローニング法により、定量 PCR 産物からニホンウナギの増幅配列を得ることに成功した (Table 2-5)。得られた配列は、ニホンウナギのものと 100% の相同性を示した。一方、ウラシルを合成できない大腸菌 JM109 をクローニングに使用した場合、いずれの希釈系列からもニホンウナギのシーケンスを得ることはできなかった (Table 2-5)。大腸菌 JM109 を形質転換した溶液をプレートにまくと、白いコロニーが生育し、さらにインサートチェッ

```

Japomt-F 5'- A A T C A G T A A T A A G A G G G C C C A -- A G C -3'
A. japo      . . . . . -- . . .
A. bipa      . . . . . A T . . . -- . C T
A. marm      . . . . . A . . . -- . T
D. serp      . . . T . . . . . A T T A . C - A G A A
S. sect      . . . . . G . T . . C A G . .

Japomt-R 5'- T G T T G G G T T A A C G G T T T G T G G T A -3'
A. japo      . . . . .
A. bipa      . . . . . A . . . . G
A. marm      . . . . . G . . . G
D. serp      . . . . . A . . . . A A . T A - G
S. sect      . . . . . A A - - - - G

mt-Probe 5'- C A C A T G T G T A A G T C A G A A C G G A C C G A C C -3'
A. japo      . . . . .
A. bipa      . . . . . A . . .
A. marm      . . . . . A . . .
D. serp      . . . . C . . . . . A . T . . . . A A . . .
S. sect      . . . . . G . . C . . . . T C . . .
    
```

Fig. 2-5 Nucleotide variations in the forward primer (Japomt-F), reverse primer (Japomt-R) and probe 1(mt-Probe) among three *Anguilla* and two other anguilliforms. Sequences of *A. japonica* (*A. japo*), *A. bicolor pacifica* (*A. bipa*) and *A. marmorata* (*A. marm*) were obtained from Watanabe et al., (2004) and Minegishi et al., (2009). Those of *Derichthys serpentinus* (*D. serp*, accession number AP010851), and *Serrivomer sector* (*S. sect*, accession number AP007250) were downloaded from the DNA Data Bank of Japan. Dots indicate nucleotides are identical to those of the primers and probe on the top lines, and gaps show insertions/deletions.

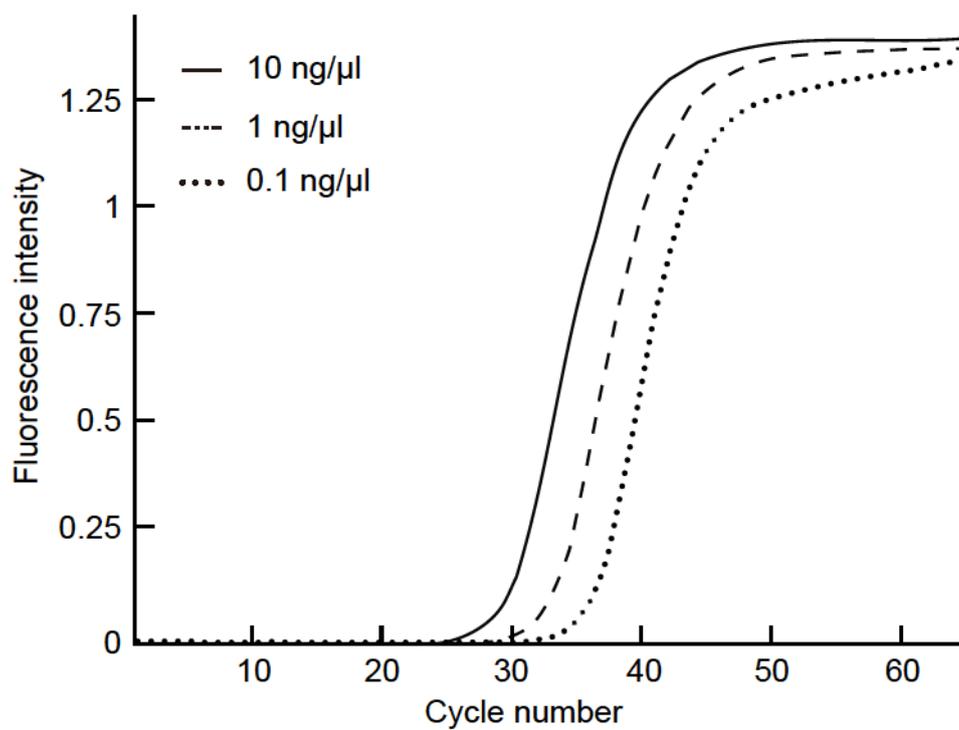


Fig. 2-6 Amplification curves from the real-time PCR analysis for the Japanese eel using eDNA extracts from tank water with 10, 1, 0.1 ng/μl concentration (50, 5, 0.5 ng eDNA per PCR reaction, respectively).

Table 2-5 Results of the preliminary laboratory experiment. The cloning with *E. coli* CJ236 provided sequences of the Japanese eel at 100% homology (*A. japonica*), while JM109 produced no sequence data (No sequence). The 10,000-fold diluted extract showed non-detection of eDNA in qPCR (ND), and its qPCR product was not subjected to the cloning and sequencing.

Extract from laboratory tank	Replicate 1		Replicate 2		Replicate 3		Cloning		Sequencing	
	Ct value	Concentration (copies/ $\mu$ l)	Ct value	Concentration (copies/ $\mu$ l)	Ct value	Concentration (copies/ $\mu$ l)	<i>E. coli</i> JM109	<i>E. coli</i> CJ236	<i>E. coli</i> JM109	<i>E. coli</i> CJ236
Undiluted extract	26.39	443.51	26.47	421.42	26.54	404.21	Failed	Good	No sequence	<i>A. japonica</i>
Diluted extract (1:10)	30.51	39.00	30.61	36.77	30.39	41.88	Failed	Good	No sequence	<i>A. japonica</i>
Diluted extract (1:100)	34.05	4.82	33.90	5.27	33.88	5.35	Failed	Good	No sequence	<i>A. japonica</i>
Diluted extract (1:1000)	38.00	0.47	38.32	0.39	37.25	0.73	Failed	Good	No sequence	<i>A. japonica</i>
Diluted extract (1:10,000)	ND	0.00	ND	0.00	ND	0.00	-	-	-	-

クにてニホンウナギの増幅配列の長さとも一致する 154 bp 付近にバンドが確認できた。しかし、これらのコロニーに由来する配列データは、未決定塩基のみを含んでいた。

#### 第4節 考察

##### 2.4.1. 次世代シーケンサーによる検出

本研究にて新しく開発したプライマー “MiEel (Fig. 2-1, Table 2-1)” は、ウナギ属魚類全種を識別でき、本属魚類を同時に検出できる環境 DNA メタバーコーディング法に使用可能であると考えられた。MiEel プライマーの配列はウナギ属魚類 19 種亜種のものとはほぼ一致していたため (Fig. 2-2, Fig. 2-3a, b)、本属魚類の組織から抽出した全ての DNA を増幅できた。MiEel が増幅する ATP6 領域の 167 bp には、亜種を除き 5–22 塩基 (3.0–13.2%) の種間差があり、ウナギ属全種を識別できる十分な変異を有していた。また、MiEel プライマーの配列は、他のウナギ目魚類のものとも類似性が高かった (Fig. 2-2, Fig. 2-3c, d)。本プライマーはウナギ属以外のウナギ目魚類の環境 DNA も増幅してしまう可能性が考えられるが、ウナギ属魚類とウナギ目魚類の増幅領域に 13.2–33.2% (平均 22.7%) と種同定に十分な変異が認められたため (Fig. 2-4)、ウナギ属魚類を他の分類群と誤同定する可能性は低いと考えられた。

実際に MiEel を用いて、ウナギ属魚類全種の組織から抽出した DNA を混ぜて調製した試験用 DNA サンプルを分析した結果、*A. bengalensis bengalensis* と *A. australis schmidtii* の 2 亜種を全く検出できなかったものの、ウナギ属魚類全 16 種を問題なく検出できた (Table 2-3)。さらに、水槽、人工池、河川から採水した計 8 つの環境水サンプルを分析した結果、そこに分布すると思われる種を正しく検出することにも成功した (Table 2-4)。このことから、ウナギを捕獲せずに、その在不在を把握できるようになったといえる。MiEel を用いた環境 DNA メタバーコーディング法は、資源の減少が世界的に懸念されているウナギ属魚類の非侵襲的な分布調査を可能にすると期待される。

MiEel プライマーを用いた環境 DNA メタバーコーディング法は、複数種のウナギ属魚類が同所的に出現する水圏環境にて、本属魚類の在不在を明らかにしたい場合、最も有用な手法であると考えられた。例えば、インドネシア諸島周辺では *A. bengalensis*、*A. bicolor*、*A. borneensis*、*A. celebesensis*、*A. interioris*、*A. marmorata*、*A. megastoma*、*A. obscura* の計 8 種が採集された (Sugeha et al., 2008)。また、南太平洋には *A. australis*、*A. dieffenbachii*、*A. marmorata*、*A. megastoma*、*A. obscurra*、*A. reihardtii* の計 6 種が分布し産卵している可能性がある (Aoyama et al., 1999b; Jellyman, 2003; Kuroki et al., 2014)。しかし、ウナギ属魚類の形態的な種同定は困難である。レプトセファルス属の形態形質は部分的または全体的に重複しており (Aoyama et al., 1999b; Kuroki et al., 2009)、親ウナギの種同定でも同様の問題がある (Watanabe et al., 2004b)。ウナギ属魚類の正しい種同定のため、ミトコンドリア DNA 内の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を用いた分子遺伝学的手法による種査定が行われている (Aoyama et al., 1999b; Kuroki et al., 2009; Watanabe et al., 2008)。つまり、従来、ウナギ属魚類の産卵場や分布調査は、魚体を採集したうえで、形態学と分子遺伝学的に種同定をして行われてきた。一方で、MiEel を用いた環境 DNA メタバーコーディング法は、水からウナギ属魚類の環境 DNA を検出すること

により、魚体を捕獲せずに本属魚類の存在を把握できる (Table 2-4)。専門的な形態学の知識とサンプリングの労力も必要としない。よって、MiEel はウナギ属魚類の効率的な分布調査に役立つと期待される (Takeuchi et al., 2019c)。

しかし、本研究では、*A. australis*、*A. bengalensis*、*A. bicolor* の3亜種間の識別に懸念が残った。MiEel の増幅領域には、*A. bengalensis* 亜種間で1塩基、*A. australis* と *A. bicolor* の亜種間で3塩基の変異しかなかった (Fig. 2-1b)。ウナギ属魚類 19 種亜種のミトゲノム全長配列を確認して、他のプライマー設計領域を検査したが、MiEel プライマーの増幅領域よりも種間および亜種間において変異を有する領域を発見できなかった。増幅領域に塩基の違いが少ないと、PCR やシーケンス時のエラーに由来する塩基置換のせいで配列の識別が失敗し、偽陽性や偽陰性の結果が起きてしまう恐れがある (Edgar, 2010; Taberlet et al., 2012b; Miya et al., 2015; Takeuchi et al., 2019c)。亜種の識別を目的としたプライマーを設計し、これを PCR 反応に加えることによって、塩基配列の亜種レベルの同定が可能となるかもしれない。

次世代シーケンサーから得られた配列をより正しく種同定するには、リファレンス配列の充実が重要である (Miya et al., 2015; Thomsen & Willerslev, 2015; Klymus et al., 2017)。リファレンス配列のデータベースは、形態学的かつ分子遺伝学的に正しく種同定された標本の組織に由来する DNA 情報から構築されなければならない。本研究では、本章の第2節でウナギ属魚類 19 種亜種の組織から 167 bp の ATP 領域の塩基配列を決定し、これらをリファレンス配列とした。本研究で決定したウナギ属魚類 13 種の 167 bp の配列は、Minegishi et al. (2005, 2009b)により DDBJ に登録されていたウナギ属魚類 13 種のものと完全に一致していた。しかし、*A. australis schmidtii*、*A. dieffenbachii*、*A. reinhardtii* には1塩基、*A. celebesensis* と *A. bicolor pacifica* には2塩基の変異がみられた。DDBJ などに登録されているウナギ属魚類の ATP6 領域の配列が少ないため、これらの変異は種内変異であるか否か判断できなかった。よって、得られた配列の種同定精度を改良していくには、形態学的に正しく種同定のなされた標本を用いて、ATP6 領域の配列の数を増やしていく必要がある。

環境DNA研究では、偽陽性（目的種は環境中に存在しないが検出される）と偽陰性（目的種は環境中に存在するが検出されない）について議論がよくなされる (Miya et al., 2015; Thomsen & Willerslev, 2015; Klymus et al., 2017)。本研究では、試験用DNAサンプル#2から *A. anguilla* の7リードが検出された (Table 2-3)。*A. anguilla* の組織DNA抽出溶液を#2のサンプルに加えていないため、この検出は偽陽性であると結論できる。遺伝子実験をする部屋では、PCR機器を頻用し、何億万といったDNAコピーが生産される。そのため、偽陽性を引き起こす可能性のあるエアロゾル化したDNAが部屋の空気中に散在している (Zhang et al., 2006; Yang et al., 2017)。本研究では試験用DNAの調製を、ウナギ属魚類の組織を抽出およびPCRに供した部屋で行なった。よって、試験用DNAサンプルを調製した際、空気中にあった *A. anguilla* のエアロゾルDNAにより#2のサンプルが汚染された可能性があった。1st PCR と 2nd PCR ブランクからウナギ属魚類のリードは検出されなかったため、これらPCR時にコンタミネーションが起きた可能性は低い。

反対に、*A. australis schmidtii*、*A. bengalensis bengalensis*、*A. bicolor pacifica*、*A. borneensis* は、8種以

上の組織抽出DNA溶液を含む#2、#4、#5の試験用DNAサンプルから検出されなかった (Table 2-3)。これら4種のDNA溶液を試験用DNAサンプルに加えたが非検出であったので、この検出結果は偽陰性であった。プライマーと目的種の配列間のミスマッチにより、PCRで増幅しやすい種と増幅しにくい種が存在し、不完全な検出結果が得られる (Miya et al., 2015)。偽陰性を改善するため、1サンプルあたりの1st PCRの回数を増やすという対策が推奨されている (Miya et al., 2015; Ficetola et al., 2015; Schmidt et al., 2013)。これにより、生物種の検出率の向上が期待される。

試験用DNAサンプルを分析する際、予期しない種のリードが検出されたため (Table 2-3)、環境水サンプルの分析の際にはコンタミネーションのリスクを最小限にし、検出率を向上させる作業を行なった。例えば、コンタミネーションを回避するため、抽出やPCRの前後で部屋をわけたことが挙げられる。これにより、濾過、抽出、1st PCR、2nd PCR ブランクからリードが全く検出されず、コンタミネーションは生じなかったと判断された。また、検出率をあげるため、現場濾過法を使用し、1st PCRの繰り返し数を8回に増やした。現場濾過法は、環境DNAの劣化を防ぐことができる (Miya et al., 2016)。Ficetola et al. (2015)は、検出率が低い場合、1サンプルあたり1st PCRを8回実施するのが望ましいと報告している。こうしたコンタミネーションの回避や検出率を向上する作業により、水槽、人工池、天然河川からの環境DNA検出は、信頼性の高い結果であると考えられる。

#### 2.4.2. リアルタイムPCRによる検出

一般的に環境DNAの単一種検出法は、プライマーやプローブの設計、それらの特異性の検証、組織由来のDNAや水槽水を用いたプライマーおよびプローブの性能試験といった手順で確立される (Goldberg et al., 2016)。続いて本法は、プロトコールの最適化が行われ、実際の野外調査へ適用される。本研究では、既報のプライマーとプローブを用いて (Watanabe et al., 2004a; Minegishi et al., 2009a)、500 mlの水槽水からニホンウナギDNAを検出でき (Fig. 2-6, Table 2-5)、本プライマーとプローブが環境DNAの単一種検出法に使えるものと考えた。2019年に、同じプライマーとプローブを用いた環境DNAの単一種検出法は、外洋におけるニホンウナギの産卵行動の探索 (Takeuchi et al., 2019a) と河川における本種の分布と密度推定 (Itakura et al., 2019) に使用された。

単一種検出法は、絶滅危惧種 (Fukumoto et al., 2015; Bergman et al., 2016) と外来種 (Ficetola et al., 2008; Takahara et al., 2013) の分布調査によく適用される。しかし、本法を野外に適用する際、偽陽性と偽陰性の結果に特に注意する必要がある。偽陽性が起これば、絶滅危惧種がいないのにいると判定してしまい、その分布状況を過大評価することになる。反対に、偽陰性が起これば、外来種の拡散を過小評価してしまう。これらの結果は、絶滅危惧種の保全と外来種の駆除を行うにあたり、誤った方針を提供し得る。こうした事態を避けるために、野外調査の前に研究室内で十分な単一種検出法の検証が必要であると考えられた。

単一種検出法の成功には、特異的なプライマーとプローブの設計が重要である。まず目的種に対して、高い増幅効率を持ったプライマーを設計することにより、偽陰性の結果を回避できる。Wilcox et al. (2013)は、DNA濃度が0.5 copies/ $\mu$ lになるとリアルタイムPCRの検出率が約70%になること

を報告した。この時のプライマーセットの増幅効率は約 93%であった。リアルタイム PCR の増幅効率は一般的に 75–100%が望ましい (Broeders et al., 2014)。本研究で検証したニホンウナギのプライマーセットの増幅効率は約 70–80%であり、Wilcox et al. (2013)のプライマーセットに比べて 10%以上も増幅効率が低いため、ニホンウナギの環境 DNA 濃度が低い場合、その検出率は下がる可能性がある。こうした偽陰性を回避するには、PCR の繰り返し数を増やすことが考えられている (Piggott, 2016; Doi et al., 2017)。PCR 反応を 12 回行なったうち 1 回のみ DNA 増幅に成功した例もあり (Tréguier et al., 2014)、これは単純に約 8%という低い確率でしか目的種を検出できないことになる。正確な環境 DNA 検出結果を得るには、高い特異性と増幅効率を示すリアルタイム PCR 実験系の確立が必要である。

また、プライマーが非目的種を増幅する可能性を排除することは、偽陽性が生じるリスクの減少につながる。種特異的なプライマーとプローブは、目的種とその近縁種の配列を比較して、変異の違いが最大になるように設計される (Wilcox et al., 2013; Fukumoto et al., 2015; Sakata et al., 2017; Takeuchi et al., 2019a)。また、プローブよりもプライマーに多くの変異、特にプライマーの 3'末端に変異があると、その特異性は向上する (Whiley & Sloots, 2005; Wilcox et al., 2013)。信頼性の高い実験系を確立することで、単一種検出法は生物のモニタリングに貢献すると考えられる。

#### 2.4.3. リアルタイム PCR 産物のクローニング法

本研究では、ウラシルを合成可能な大腸菌 CJ236 を用いたクローニング法により、1 copies/ $\mu$ l 以下の微量な環境 DNA からでもニホンウナギの塩基配列を取得できた (Table 2-5)。これにより、定量 PCR 産物から塩基配列を決定し、定量 PCR における DNA 増幅の正確性を確認できるようになった。塩基配列を確認することにより、単一種検出法から得られた環境 DNA データの信頼性が向上し、これは、対象種の存在について正確な解釈を導くと考えられる。

これまで外洋における環境 DNA の単一種検出法では、定量 PCR 産物の塩基配列の決定に煩雑な作業を要していた。例えば、外洋にて採水した海水試料を定量 PCR で分析した時は、定量 PCR 産物の配列を決めるため、次世代シーケンサーを用いていた (Knudsen et al., 2019)。もしくは、PCR にて数十個のプライマーセットを使用することにより、それぞれ単一種を増幅し、次世代シーケンサーとクローニング法を用いて PCR 産物から塩基配列を決定していた (Thomsen et al., 2012b)。また、外洋水中の極めて希薄な環境 DNA 濃度は、シーケンスを失敗させる一因であると考えられた。

河川における単一種検出法では、ExoSap-IT (Affymetrix) を用いて定量 PCR 産物を精製した後、その塩基配列を決定するが多い (Takahara et al., 2012; Wilcox et al., 2013; Hunter et al., 2015; Doi et al., 2017)。以前筆者は、単一種検出法を用いて、外洋水からニホンウナギの環境 DNA を検出できたため (Takeuchi et al., 2019a)、ExoSap-IT を用いて定量 PCR 産物を精製した後、その塩基配列の決定を試みた。しかし、これは失敗し、また、同じ定量 PCR 産物を、大腸菌 JM109 を用いたクローニング法に供したが、ニホンウナギの配列を得ることはできなかった。Jensen et al. (2018)も、定量 PCR 産物のクローニングをしたが、*A. anguilla* の配列を得られなかった。この原因は、リアルタイ

ムPCRや定量PCRに用いるマスターミックスにデオキシウリジン三リン酸(dUTP)が含まれているからであると考えられた。dUTPの使用は、次の定量PCRに前回の産物がキャリーオーバーすることを避け、偽陽性が生じるリスクが減る(Longo et al., 1990)。環境DNAの単一種検出法では、dUTPを含んだマスターミックスがよく使われる(Takahara et al., 2012; Fukumoto et al., 2015; Hunter et al., 2015; Doi et al., 2017; Bylemans et al., 2018; Takeuchi et al., 2019a, c)。このマスターミックスを定量PCRに使った場合、得られたPCR産物中のDNAにウラシルが組み込まれる(Longo et al., 1990; Howe, 2007a)。PCR産物のクローニングに失敗した研究(Jensen et al., 2018; Takeuchi et al., 2019a)では、TaqMan Environmental Master Mix(Thermo Fisher)やFastStart Essential DNA Probes Master Mix(NIPPON Genetics)など、dUTPを含むマスターミックスを定量PCRに使用していた。また、これらの研究は、クローニングにウラシルを合成できない大腸菌 One Shot<sup>®</sup> Mach1<sup>™</sup>-T1R competent cells(The TOPO TA one-shot kit; Life Technologies)やJM109を用いていた。これらの大腸菌は、ウラシルグリコシラーゼを産生する遺伝子を持っていて、ウラシルを含むDNAを増殖させることができない(Kunkel, 1985; Howe, 2007a; Jensen et al., 2018)。ウラシルグリコシラーゼは、ウラシルを含むDNAからウラシル塩基を除去する能力を持った酵素である(Longo et al., 1990; Longerich & Storb, 2005; Howe, 2007a)。つまり、定量PCR産物からシーケンスを得るには、ウラシルグリコシラーゼを産生する遺伝子が欠損した大腸菌(例えばCJ236)をクローニングに使わなければならない。

ウラシル合成能を持つ大腸菌CJ236を用いたクローニングには、2つの短所が考えられた。1つ目は、時間と費用がかかることである。ExoSap-ITを用いてダイレクトシーケンスをする場合、1日か2日で定量PCR産物の塩基配列を決定することができる。だが、本研究で行なったクローニング法を用いた場合、塩基配列を得るまでに最低4日を要するうえ、クローニングに必要な試薬類と消耗品を購入する必要がある。

2つ目は、プラスミドインサートチェックにて、より多くの白いコロニーをPCRに供し、インサートの成功を調べなければならない点である。筆者の研究室では、ウラシルを含むDNAを合成できない大腸菌JM109を用いてクローニング法を実施してきた。大腸菌JM109は、青白コロニー選択に適したよう設計されたものである。青白コロニー選択とは、目的配列を持ったコロニーは白色を呈し、反対に、失敗したコロニーは青色を示すといったことである(Howe, 2007b)。プレート状に生育したコロニーの色の違いにより、目的配列のインサートの成否を簡単に判定できる。しかし、ウラシルを持ったDNAを合成できる大腸菌CJ236をクローニングに使用した場合、青白コロニー選択を行うことができない。なぜなら、大腸菌CJ236は青白コロニー選択に必要な*lacZ*遺伝子が欠損しているからである。

#### 2.4.4.2つの環境DNA検出法の長所と短所

環境DNAメタバーコーディング法と単一種検出法をウナギ属魚類に適用したことから、両法を比較して、それらの感度、効率、技術的難易度、定量性、特異性、および、本研究では環境DNA法を外洋に適用することを想定しているため、船上での有用性を評価した(Table 2-6)。環境DNA検

Table 2-6 Comparison of the abilities of eDNA metabarcoding and single-species detection methods.

Ability	eDNA metabarcoding	Single-species detection
Sensitivity	○	-
Efficiency	○	-
Technical difficulty	○	-
Quantification	-	○
Specificity	-	○
Utility onboard	-	○

出結果を得るまでの速度やコストなども評価項目の候補であるが、サンプル数によって判断結果が変わると予期されたため除外した。どちらの手法にも長所と短所があり、環境DNA法を用いて“何を明らかにしたいのか”によって手法を選択すべきである。

感度 (sensitivity) は、環境DNAメタバーコーディング法のほうが高いと結論した。環境DNAメタバーコーディング法は、環境DNAサンプル中の全ての増幅配列を網羅的にシーケンスし、得られた塩基配列をもとに、複数種の存在を決定している。一方で、単一種検出法では、論文により環境DNA検出の陽性基準が異なり (Goldberg et al., 2016)、必ずしもPCR産物から塩基配列を決定して存在を解釈しているわけではない。例えば、リアルタイムPCRの全ての増幅産物から塩基配列を取得する研究 (Takahara et al., 2012; Amberg et al., 2015; Bylemans et al., 2017; Clusa & Garcíá-Vázquez, 2018) やそれらの一部から塩基配列を決定する研究がみられた (Jerde et al., 2011; Mahon et al., 2013; Hinlo et al., 2018)。PCR産物中の配列を決定した場合は、環境DNAメタバーコーディング法と同等の感度を持って、生物の存在を判定していると考えられる。しかし、全てのPCR産物の塩基配列を決定している研究は少なく、シーケンスについて言及していない研究が多数見受けられた。これらの研究は定量PCRやリアルタイムPCRにおける増幅の有無のみを用いて、環境DNA検出を陽性と判断しているものと考えられた (e.g. Eichmiller et al., 2014; Gustavson et al., 2015; Wilson et al., 2014; Bergman et al., 2016; Erickson et al., 2016; Antognazza et al., 2019; Bracken et al., 2019; Takeuchi et al., 2019a)。こうした状況において、Thomsen & Willerslev (2015) と Goldberg et al. (2016) は、単一種検出法を用いた野外調査にて環境DNA検出結果を正しく解釈するため、定量PCR産物の塩基配列を決定する必要があると主張している。環境DNAサンプルには、様々な生物に由来するDNAが含まれている。しかし、公共の遺伝子データベース (e.g. DDBJ) には塩基配列が登録されていない種が当然存在する。これらの種の塩基配列はプライマーやプローブの設計時に扱うことができず、増幅の有無を検討することは不可能である。種特異的プライマーは、非目的種を増幅してしまう可能性を少なからず持っていると考えられる。したがって、PCR産物の塩基配列を確認しなければ、水試料中に目的種のDNAが存在するという確実な証拠はない。全てのPCR産物中の塩基配列を決定する環境DNAメタバーコーディング法は、より正確に生物の分布状況を反映しているものと考えられる。

効率 (efficiency) は、単一種検出法に比べて、環境DNAメタバーコーディング法で高い。その理由は、後者は生物の検出について高い網羅的性をもっており、一度に分析できる環境DNAサンプルの数を飛躍的に向上させたからである (Shokralla et al., 2012; Taberlet et al., 2012a; Miya et al., 2015; Valentini et al., 2016)。本法は、インデックス配列の組み合わせにより複数の環境サンプルに由来する増幅配列を識別できる (Miya et al., 2015)。使用する試薬類によって異なるが、本研究で用いたIllumina社の次世代シーケンサーMiSeqでは、1ランで $7 \times 10^6$ の塩基配列を得ることが可能である (Shokralla et al., 2012)。一方で、定量PCRやリアルタイムPCRでは1ランで分析できる数は最大96サンプルである。1環境水サンプルあたり概ね3繰り返して分析するため、1ランで分析できるサンプル数は少なくなってしまう。つまり、大量のサンプルを同時に処理したい場合は、環境DNAメタバーコーディング法を選択すべきであると考えられる。

技術的難易度 (technical difficulty) について、環境 DNA メタバーコーディング法は、より難しい手法であると判断した。環境 DNA メタバーコーディング法と単一種検出法において、採水、濾過、DNA 抽出、PCR を実施する点は同様である。しかし、環境 DNA メタバーコーディング法の場合、次世代シーケンサーで決定した大量の塩基配列をバイオインフォマティクスにより処理する必要がある (Taberlet et al., 2012a; Miya et al., 2015; Takeuchi et al., 2019b)。得られた生の塩基配列データから、プライマー配列の除去、高品質のリードの選択、塩基配列の種同定などを実行する。大量の塩基配列を分析するためのプログラムが公開されているが (Miya et al., 2015)、分子遺伝学的な専門知識とは別に、情報科学や統計学に基づいて、そのプログラムによる分析の仕組みを理解する必要がある。一方で、単一種検出法では、DNA 増幅を示した PCR 産物から、サンガー法を用いて 1 種の塩基配列を決定する。これは、従来から行われてきた塩基配列の決定法であるため、複雑な手順を含まない。よって、環境 DNA メタバーコーディング法は、特に塩基配列の種同定に関して、技術的難易度が高いと考えられる。

定量性 (quantification) は、単一種検出法の長所である。単一種検出法に頻用される定量 PCR は、分析したいサンプルと濃度既知のスタンダード溶液を同時に分析することで、試料中の目的種の DNA の濃度を定量できる (Bustin et al., 2009; Broeders et al., 2014)。実験室内や野外調査において、環境 DNA 濃度と目的種の生物量、密度、捕獲量の間には正の相関関係が確認されている (Takahara et al., 2012; Pilliod et al., 2013; Doi et al., 2017; Itakura et al., 2019)。これにより単一種検出法は、非侵襲的に生物の資源量調査ができる手法になり得ると期待されている (Rees et al., 2014; Lacoursière-Roussel et al., 2016; Goldberg et al., 2016)。ただし、野外調査では、環境 DNA 濃度と生物量、密度、捕獲量に相関関係がなかったという報告もある (Spear et al., 2015)。野外では DNA の希釈や水流を考慮しなければならないため、単一種検出法を用いて具体的な数字で尾数を推定することは不可能である。しかし、複数尾がいる地点や目的種がよく利用する地点などは、単一種検出法で特定できると考えられる。

一方で、環境 DNA メタバーコーディング法では、検出リード数の多い種と DNA 濃度に明確な相関関係はなかった (Kelly et al., 2014; Velantini et al., 2016; Takeuchi et al., 2019c)。これは、種によってユニバーサルプライマー配列との間に塩基の不一致があり、増幅効率が異なるためである (Kelly et al., 2014; Miya et al., 2015)。近年では、採水地点に生息しない魚種の濃度既知の DNA 溶液をスタンダードとして、環境水サンプルと同時に次世代シーケンサーで分析し、環境 DNA メタバーコーディング法においても環境 DNA の濃度を定量可能にしようとする試みが報告されている (Ushio et al., 2018b)。検出された全種と DNA 配列数に相関が見られたが (Ushio et al., 2018b)、ユニバーサルプライマーは種ごとに増幅効率が異なるため、環境 DNA メタバーコーディング法による 1 種ずつの同時定量は困難であると考えられる。

特異性 (specificity) は、単一種検出法が優れている。そもそも環境 DNA メタバーコーディング法は、目的とする複数種の環境 DNA を全て増幅するために、ユニバーサルプライマーを設計する。対して、単一種検出法は、特定の 1 種のみを増幅するプライマーとプローブを設計するため (Wilcox

et al., 2013)、特異性が高くなる。

最後に、船上での有用性 (utility onboard) が高い手法は、単一種検出法である。最大の理由は、リアルタイム PCR 機器が船上に持ち運びできるからである。すでに、リアルタイム PCR 機器は船上に運び込まれ、調査航海中にニホンウナギ卵の種同定を行なったという実績がある (Watanabe et al., 2004a; Yoshinaga et al., 2011)。本研究で使用しているリアルタイム PCR 機器は、幅 24×奥行 27×高さ 23 cm、重さ約 7 kg とその移動と設置が簡便である。この機器は揺れる船の上でも正常に作動することを確認し、すでに船上におけるニホンウナギ DNA の検出に使われた (Takeuchi et al., 2019a)。一方で、環境 DNA メタバーコーディング法に用いる次世代シーケンサーは高価な機器であり、船上に持ち運び、その作動を検証することは困難である。本章の第2節で用いた Illumina 社の Miseq は、検証例はないが、揺れる船の上での使用はできないものと想定される。

## 第3章 環境 DNA の放出と分解

## 第1節 目的

環境 DNA 法は、近年急速に発展している手法であり、多くの野外調査へ適用されている。しかし、環境 DNA 自体についての情報は少ない。例えば、環境 DNA は何に由来するのか、その放出量はなぜ変わるのか、生物から放出された後どのような過程を経て消失していくのかなど全く不明である。Barnes & Turner (2016)は、環境 DNA の由来、状態、移流、分解の4つの項目について理解する必要があることを強調している。そこで、本章では、飼育したニホンウナギを用いて、環境 DNA の放出や分解に関する基礎情報を蓄積することを目的とした。これにより、野外で得られる環境 DNA 検出結果から、ニホンウナギの分布状況と産卵行動が起り得る地点を推測できるようになることを狙った。

## 第2節 尾数が環境 DNA 放出量に与える影響

## 第1項 材料と方法

## 3.2.1. 実験水槽

愛知県にある株式会社いらご研究所（ニホンウナギの人工種苗生産施設）において、環境 DNA 実験に使用するためのニホンウナギ DNA を含まない水を選定した。本研究所の室内の海水および室外の海水と淡水を 500 ml ずつスパウトパウチ (Yanagi, Japan) を用いて採水した。これらスパウトパウチを保冷剤と一緒にクーラーボックスに入れて、約 20 分間かけて実験室に輸送した。実験室に到着後すぐに、海水の入ったスパウトパウチの排出口に 5 ml チップ (WATSON, Japan) と 0.45  $\mu\text{m}$  の粒子保持能をもつステリベクス (Merck Millipore) を装着した。ルアーロック (アイシス, Japan)、シリコン栓 (ASONE)、ホース、アスピレーター (ASONE)、マニホールド (サンプラテック)、ステリベクス、5 ml チップ、スパウトパウチを連結して、海水を濾過した。同様に、純水 500 ml も濾過し、濾過ブランクを作製した。

DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて、ステリベクスから環境 DNA を抽出した。抽出法は付属説明書と Miya et al. (2015, 2016) に従い、最終溶出量を 100  $\mu\text{l}$  に調製した。使用した試薬類中のコンタミネーションの有無を調べるため、抽出ブランクを作製した。これらの抽出した環境 DNA を鋳型に定量 PCR を行なった。

定量 PCR 反応液は、2×FastStart Essential DNA Probes Master Mix 5  $\mu\text{l}$  (NIPPON Genetics)、プライマー各 0.5  $\mu\text{M}$ 、加水分解プローブ 0.1  $\mu\text{M}$ 、および環境 DNA 抽出物 2  $\mu\text{l}$  に PCR グレード水 (Roche) を加えて最終容量を 10  $\mu\text{l}$  とした。反応には Light Cycler<sup>®</sup> Nano (NIPPON Genetics) を用いて、95°C・10 分間加熱した後、熱変性 95°C・20 秒、アニーリングと伸長反応 60°C・40 秒の過程を 55 回繰り返した。プライマーとプローブは、既報のニホンウナギに特異的なものを使用した (Watanabe et al., 2004a; Minegishi et al., 2009a)。ニホンウナギの目的配列を挿入したプラスミド DNA 溶液  $3 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^2$ 、 $3 \times 10^1$ 、 $3 \times 10^0$  copies/ $\mu\text{l}$  をスタンダード溶液とした。水試料とスタンダー

ド溶液を3繰り返し、濾過ブランク、抽出ブランク、PCRブランクを1回ずつ同じPCR反応で分析した。スタンダード6点の定量値を用いて検量線を作成し、水試料から得られた環境DNAの濃度を推定した。

コンタミネーションを避けるため、作業時は必ず手袋を装着し、サンプルごと、作業ごとなど頻りに交換した。0.5%の次亜塩素酸溶液を染み込ませたキムワイプで、実験室内にある机や器具類を拭いた。また、定量PCRの前後で部屋を分けた。

本実験には、ニホンウナギDNAを含まないと判断した室外の海水を使用した。この海水の水温は19.8°C、塩分は30.4–33.3 psuであった。実験に使用した黄ウナギは、淡水で飼育したのち、半海水で2日、海水で1日間馴致した個体群を使用した。実験開始の1週間前から餌止をした。定規と電子天秤 (Sartorius, Germany) を用いて、本実験に使用した黄ウナギ27尾の全長 (mm) と湿重量 (g) を計測した (Table 3-1)。なるべく体サイズに近い黄ウナギを実験に使用した。計測時に黄ウナギが暴れることを避けるため、計測前に0.08%の2-フェノキシエタノールを用いて黄ウナギに麻酔をかけた。麻酔の影響をなくすため、黄ウナギを400Lの大型水槽内で最低1日放置した。

大型水槽 (縦100×横100×高さ70 cm) に海水350Lを入れ、換水率を約1L/minに調整してから、水槽に黄ウナギ1尾を收容し、1日の馴致期間を設けた。また、大型水槽に收容する黄ウナギの尾数を3、9および27尾に変えて同様の作業を繰り返した。水槽に入れる尾数を変えるたびに、残留したDNAを除去するため、大型水槽や流入と排水に使用する塩ビパイプ、ホースを0.5%の次亜塩素酸溶液で最低5分以上消毒した。消毒後、海水で器具をよく洗浄し、次亜塩素酸溶液を完全に洗い流した。この消毒作業の効果を証明するため、黄ウナギが水槽に入っていない時を0尾とした。

### 3.2.2. サンプルの調製と解析

馴致期間の後、大型水槽の排水口からスパウトパウチ (Yanagi) を用いて海水500mlを採水した。尾数を変えて大型水槽から採水するたびに、濾過ブランクを作製するための純水500mlを採水した。水槽に收容する黄ウナギの尾数を0、1、3、9、および27尾に変え、同様の手順で採水を実施した。本章の第2節の第1項にて研究所の水を分析した時のプロトコールに準じ、全ての水試料を研究室に輸送し、濾過、環境DNA抽出、定量PCRを行なった。

定量PCR分析から得られた水試料の定量値をもとに、一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて、水槽に收容したウナギの個体数が1、3、9および27尾の際、環境DNA放出量と1尾あたりの環境DNA放出量に差があるかをそれぞれ調べた。さらに、Tukey法を用いて多重比較検定を行った。水槽から検出された環境DNA濃度 (copies/ $\mu$ l) を水槽に收容したウナギの尾数で除することにより、1尾あたりの環境DNA放出量 (copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual) を算出した。さらに、スピアマンの順位相関係数の検定を用いて、環境DNA濃度 (copies/ $\mu$ l) と生物量 (g/L) の関係を調べた。生物量は、水槽に收容した全ての黄ウナギ個体の総湿重量 (g) を大型水槽内の海水の容積 (350L) で除することにより算出した。統計解析にはR ver. 3.3.2を使用した。

Table 3-1 Total lengths (mm) and wet weight (g) of 27 yellow eels that were used for the experiment to examine the relationship between eDNA concentration (copies/ $\mu$ l) and the number of eels in the tank.

No.	Total length (mm)	Wet weight (g)
1	498	159
2	524	167
3	445	134
4	468	157
5	508	180
6	464	144
7	492	145
8	476	164
9	498	152
10	496	172
11	490	147
12	496	159
13	580	171
14	496	159
15	504	148
16	508	155
17	496	160
18	516	165
19	494	152
20	560	162
21	492	146
22	478	154
23	516	174
24	500	177
25	506	150
26	494	146
27	468	145
Average	498.6	157.2
Standard deviation	27.0	11.5

## 第2項 結果

黄ウナギの尾数の変化が環境 DNA 放出量に及ぼす影響を調べた結果、水槽に収容したウナギの個体数が増加するとともに、水槽から検出される環境 DNA 量も増加した (Fig. 3-1a)。1尾の黄ウナギを収容した水槽から 225.6、362.3、341.0 copies/ $\mu$ l (平均 309.6 copies/ $\mu$ l) の環境 DNA が検出された。3尾の黄ウナギを収容した水槽から 2917.1、1775.2、2186.7 copies/ $\mu$ l (平均 2293.0 copies/ $\mu$ l) の環境 DNA が検出された。9尾の黄ウナギを収容した水槽から 18,122.9、14,310.9、15,091.3 copies/ $\mu$ l (平均 15,841.7 copies/ $\mu$ l) の環境 DNA が検出された。27尾の黄ウナギを収容した水槽から 20,823.5、29,592.3、25,330.0 copies/ $\mu$ l (平均 25,248.6 copies/ $\mu$ l) が検出された。1、3、9 および 27 尾の黄ウナギから放出された環境 DNA 量に有意な平均値差がみられた (ANOVA,  $P < 0.001$ )。また、水槽に収容した黄ウナギの尾数が 1尾と 9尾、1尾と 27尾、3尾と 9尾、3尾と 27尾、および 9尾と 27尾の間で有意差があった (Tukey の多重比較検定,  $P < 0.01$ )。

1尾あたりの環境 DNA 放出量 (copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual) を調べた結果、水槽内にいる黄ウナギの数が 9尾のときに 1尾あたりの環境 DNA 放出量が最大となった (Fig. 3-1b)。1尾あたりの環境 DNA 放出量は、1尾の水槽では 225.6、362.3、341.0 copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual (平均 309.6 copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual)、3尾の水槽では 972.4、591.7、728.9 copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual (平均 764.3 copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual)、9尾の水槽では 2013.7、1590.1、1676.8 copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual (平均 1760.2 copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual)、27尾の水槽では 771.2、1096.0、938.1 copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual (平均 935.1 copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual) であった。水槽に収容した黄ウナギの個体数が 1、3、9 および 27 尾の間で、1尾あたりの環境 DNA 放出量に有意な平均差がみられた (ANOVA,  $P < 0.001$ )。また、1尾あたりの環境 DNA 放出量について、水槽に収容した黄ウナギの数が 1尾と 9尾、1尾と 27尾、3尾と 9尾、9尾と 27尾の間で有意差があった (Tukey の多重比較検定,  $P < 0.01$ )。

環境 DNA 濃度 (copies/ $\mu$ l) と生物量 (g/L) の関係を調べたところ、相関係数 ( $r$ ) は 0.97 で、両者の間に強い正の相関がみられた (スピアマンの順位相関係数の検定,  $P < 0.01$ ) (Fig. 3-2)。濾過、抽出、定量 PCR ブランクから DNA 増幅は確認できず、全て陰性反応を示した。

## 第3節 発育段階が環境 DNA 放出量に与える影響

## 第1項 材料と方法

## 3.3.1. 実験水槽

本実験には、ニホンウナギの DNA が含まれない海水を使用した。4つの水槽 (縦 38.5 $\times$ 横 50 $\times$ 高さ 30 cm, 水量 30 L) を準備し、海水をかけ流しの状態にした。本実験時、海水の塩分は 32.9–33.9 psu、水温は 24.3–25.1 $^{\circ}$ C、換水率 0.7–1.03 L/min であった。飼育したニホンウナギの受精卵、プレレプトセファルス、レプトセファルス、シラスウナギ、クロコウナギ、黄ウナギ、親ウナギを 3尾ずつ使用し、各発育段階が放出する環境 DNA 量を調べた。卵とプレレプトセファルスは海水、レプトセファルスは半希釈海水 (約 17.5 psu) で飼育されていた。また、最低 1 週間、海水 (約 34.5 psu) で飼育したシラスウナギ、クロコウナギ、黄ウナギ、親ウナギを実験に使用した。実験を実施する

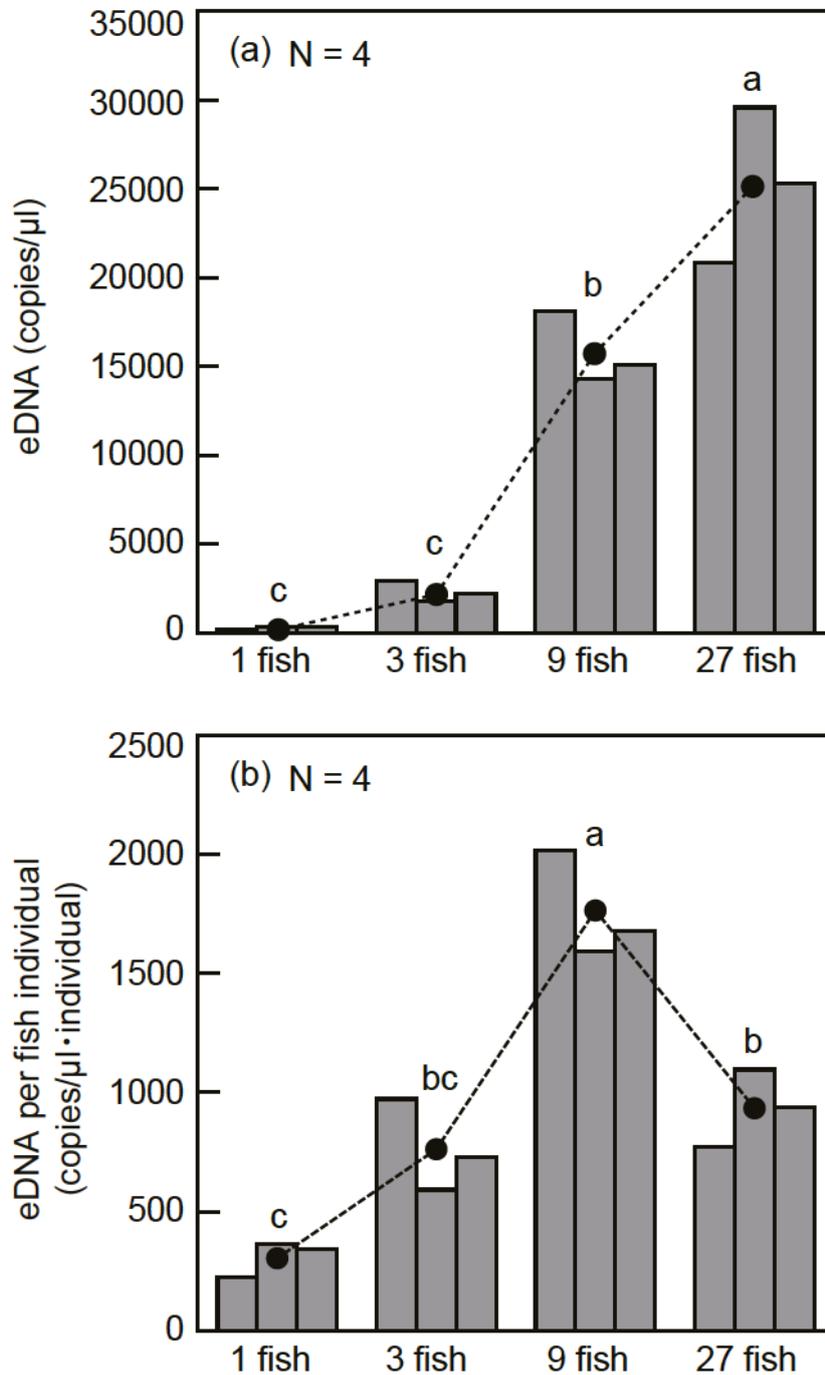


Fig. 3-1 Relationships between (a) eDNA concentration (copies/μl) and the number of eels in the tank, between (b) eDNA concentration per fish individual (copies/μl · individual) and the number of fishes in the tank. A water sample of each control tank was analyzed in three qPCR replicates. Black circles show averages of each control tank. Different letters indicate significant differences among the number of eels in the tank ( $P < 0.01$ ).

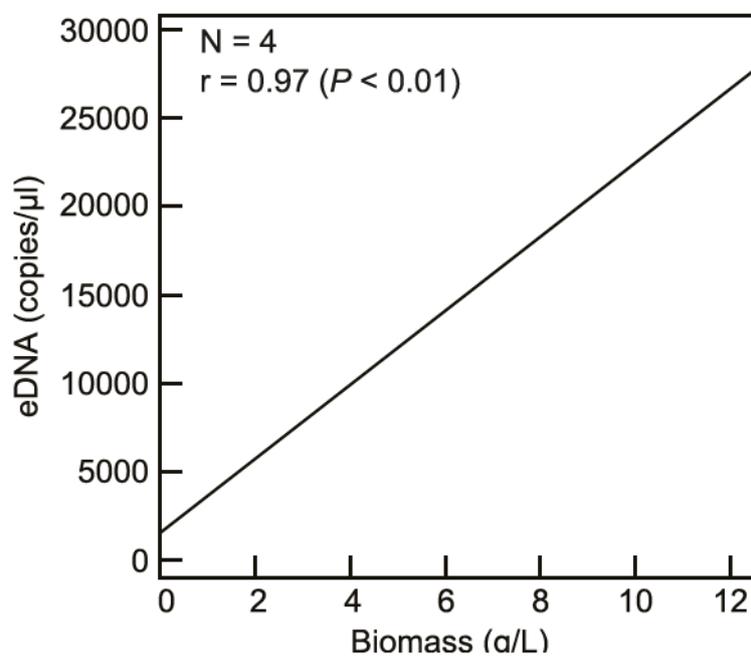


Fig. 3-2 A relationship between eDNA concentration (copies/μl) and biomass (g/L). “r” shows a correlation coefficient (Spearman correlation test,  $P < 0.01$ )

前に、最低2日間、卵とプレレプトセファルスを除き、全発育段階のウナギ個体に餌止をした。各発育段階1個体ずつを3つの水槽にそれぞれ収容し、残り1つの水槽にはウナギ個体を入れずに水槽ブランクとした (Fig. 3-3)。水槽ごとにウナギ1個体を収容し、24時間の馴致期間を置いた。卵のみ、親ウナギ由来の環境 DNA が付着している可能性があったため、海水で5回洗浄したのち水槽に収容した。卵、プレレプトセファルス、レプトセファルス、シラスウナギ、クロコウナギは、目視で見えなくなることや水槽から逃げ出したりすることが予想されたので、小型のケース (直径6.5×長さ11 cm, Azoo, Japan) に入れて水槽に収容した。実験後、本章の第2節と同様の方法で、全てのウナギ個体の全長 (mm) と湿重量 (g) を計測した (Table 3-2)。卵は、卵径 (mm) を計測した。卵とプレレプトセファルスの湿重量は、総湿重量を総個体数で除することにより推定した。本実験には、サケの脳下垂体の抽出液を隔週で2-4回注射して、雌化を人工的に誘導している最中の親ウナギを使用した (Ohta et al., 1997)。よって、親ウナギはすべて雌とみなした。本章の第2節に準じ、0.5%の次亜塩素酸溶液を用いて、水槽や機器類から DNA を除去し、7つの発育段階ごとに実験水槽を設置し直して実験を行なった。

### 3.3.2. サンプルの調製と解析

馴致後、水槽の排水口から海水 500 ml を採水した。採水、水試料の輸送、濾過、環境 DNA 抽出、定量 PCR の方法は、本章の第2節に準じた。1つの水試料を定量 PCR で3回分析して得られた3つの定量値の平均値を求めた。3回の定量 PCR 分析にて、全て陰性反応を示した試料を 0 copies/ $\mu$ l とした。定量 PCR にて3回分析したうち、1回しか DNA 増幅を示さなかった場合、その定量値をそのまま解析に用いた。一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて、全発育段階の間で平均環境 DNA 量 (copies/ $\mu$ l) に差があるかを調べた。さらに、多重比較検定 (Tukey 法) を用いて、プレレプトセファルスとレプトセファルス、レプトセファルスとシラスウナギ、シラスウナギとクロコウナギ、クロコウナギと黄ウナギ、黄ウナギと親ウナギの発育段階間で、平均環境 DNA 放出量に差があるかを調べた。卵を除き、プレレプトセファルス、レプトセファルス、シラスウナギ、クロコウナギ、黄ウナギ、親ウナギの平均環境 DNA 量を全長 (mm) および湿重量 (g) で除することにより、1 mm あたりの環境 DNA 放出量 (copies/ $\mu$ l $\cdot$ mm) および 1 g あたりの環境 DNA 放出量 (copies/ $\mu$ l $\cdot$ g) を算出した。さらに、スピアマンの順位相関係数の検定を用いて、平均環境 DNA 放出量 (copies/ $\mu$ l) と全長 (mm) および湿重量 (g) の関係を調べた。ただし、卵の発育段階については、全長の代わりに卵径のデータを計測したため、解析から除外した。統計解析には R ver. 3.3.2 を使用した。

## 第2項 結果

ニホンウナギの環境 DNA は、プレレプトセファルス、レプトセファルス、シラスウナギ、クロコウナギ、黄ウナギ、親ウナギを収容した水槽から検出された一方、卵を収容した水槽から全く検出されなかった (Table 3-2, Fig. 3-4)。プレレプトセファルス由来の環境 DNA は、9回の定量 PCR 分析のうち、2回の反応からしか検出されず、78%の確率で偽陰性が生じた。検出された環境 DNA

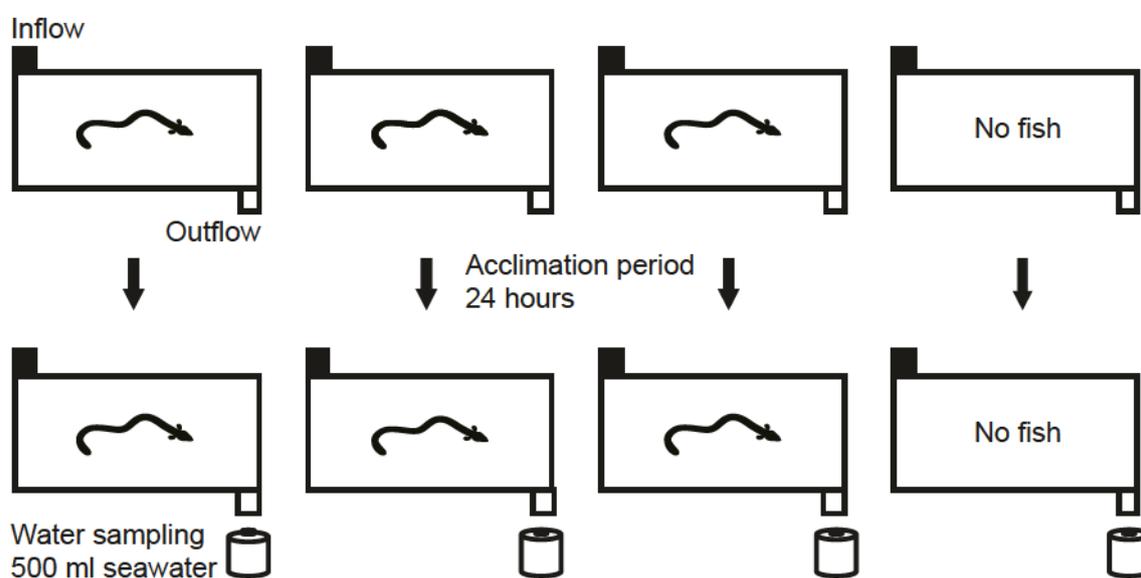


Fig. 3-3 Experimental design showing the tanks used to hold the different life history stages of the Japanese eel. Three tanks with single individuals and a negative control tank (water volume in all tanks is 30 L) were set-up for testing each of seven stages. Seawater was collected from each outflow of the tanks.

Table 3-2 Ages, total lengths (mm), wet weights (g) and mean eDNA concentration (copies/ $\mu$ l) of all life history stages of the Japanese eel. 0 copies/ $\mu$ l shows that no eDNA was detected in three qPCR replicates. dph, days post-hatching; mth, months; yrs, years. <sup>a</sup>Values divided the total wet weight by number of individuals examined. <sup>b</sup>Samples showing one eDNA amplification in three qPCR replicates.

Life history stage	Age	Total length (mm)	Wet weight (g)	Mean eDNA (copies/ $\mu$ l)
Egg	-1.25 dph	1.12 (diameter)	0.0013 <sup>a</sup>	0
	-1.25 dph	1.12 (diameter)		0
	-1.25 dph	1.49 (diameter)		0
Preleptocephalus	0.1 dph	3.54	0.00022 <sup>a</sup>	0
	0.1 dph	4.27		0.2 <sup>b</sup>
	0.1 dph	4.04		0.1 <sup>b</sup>
Leptocephalus	211 dph	41	0.17	1.4
	211 dph	36	0.18	2.9
	211 dph	32	0.1	2.4
Glass eel	219 dph	47	0.13	0.4
	219 dph	49	0.12	0.3
	219 dph	48	0.12	0.5
Elver	ca. 7 mths	129	1.67	9.4
	ca. 7 mths	122	1.36	7.6
	ca. 7 mths	114	1.12	6.1
Yellow eel	ca. 1.5 yrs	498	159	6.7
	ca. 1.5 yrs	524	167	133.1
	ca. 1.5 yrs	445	134	184.8
Adult female eel	ca. 2.5 yrs	770	500	293.7
	ca. 2.5 yrs	640	390	206.3
	ca. 2.5 yrs	650	280	446.9

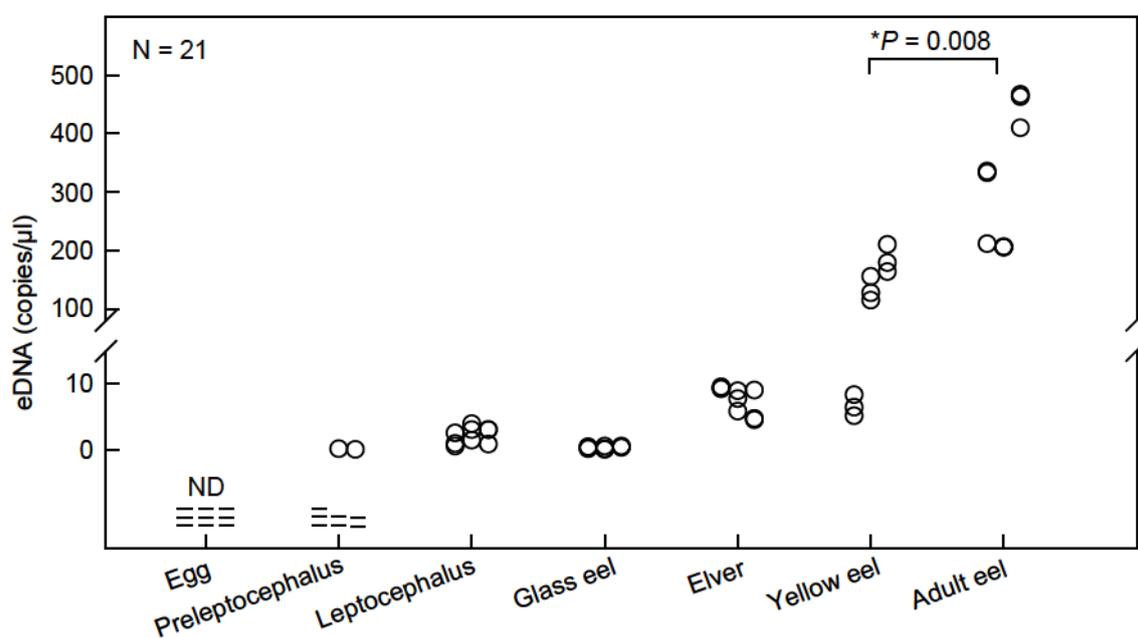


Fig. 3-4 eDNA concentration (copies/μl) released by each life history stage and statistical comparison results. Dashes show non-detections of eDNA (ND).

はそれぞれ、プレレプトセファルスで 0.1 と 0.2 copies/ $\mu$ l、レプトセファルスで 0.6–4.0 copies/ $\mu$ l、シラスウナギで 0.1–0.6 copies/ $\mu$ l、クロコで 4.6–9.6 copies/ $\mu$ l、黄ウナギで 5.2–210.6 copies/ $\mu$ l、親ウナギで 205.8–467.2 copies/ $\mu$ l であった (Fig. 3-4)。つまり、環境 DNA 放出量は、発育段階が進むにつれて増加する傾向にあった (Fig. 3-4)。レプトセファルス (平均全長 36 mm) よりシラスウナギ (48 mm) の全長が大きいものの、レプトセファルスの環境 DNA 放出量 (平均 2.2 copies/ $\mu$ l) は、シラスウナギ (0.4 copies/ $\mu$ l) よりもわずかに高い濃度を示した (Table 3-2)。全ての発育段階の間の平均環境 DNA 放出量には有意な差がみられた (ANOVA,  $P < 0.01$ )。また、平均環境 DNA 量は、黄ウナギと銀ウナギ ( $P = 0.008$ ) で有意差があった (Tukey の多重比較検定) (Fig. 3-4)。一方で、卵とプレレプトセファルス ( $P = 1.0$ )、プレレプトセファルスとレプトセファルス ( $P = 1.0$ )、レプトセファルスとシラスウナギ ( $P = 1.0$ )、シラスウナギとクロコウナギ ( $P = 0.99$ )、クロコウナギと黄ウナギ ( $P = 0.38$ ) の平均環境 DNA 量に有意差はなかった (Tukey の多重比較検定)。1 個体の黄ウナギは、クロコウナギと同様の低濃度の環境 DNA 放出量約 5–10 copies/ $\mu$ l を示した (Table 3-2, Fig. 3-4)。水槽にウナギ個体を投入して 2 時間後および採水直前に、全ての発育段階のウナギ個体の行動を確認したが、全ての個体は水槽内で静止状態にあり、異常な行動は観察されなかった。また、本実験にて作製した水槽、濾過、抽出、定量 PCR ブランクは全て陰性反応を示した。

プレレプトセファルス、レプトセファルス、シラスウナギ、クロコウナギ、黄ウナギ、親ウナギの全長 1 mm あたりの環境 DNA 放出量 (copies/ $\mu$ l $\cdot$ mm) は、発育段階の進行とともに増加した (Fig. 3-5a)。反対に、上記の発育段階の湿重量 1g あたりの環境 DNA 放出量 (copies/ $\mu$ l $\cdot$ g) は、発育段階の進行とともに減少した (Fig. 3-5b)。また、平均環境 DNA 放出量と全長の関係を調べたところ、相関係数 ( $r$ ) は 0.91 で強い正の相関関係がみられた (スピアマンの順位相関係数の検定,  $P < 0.01$ ) (Fig. 3-6a)。同じく、平均環境 DNA 放出量と湿重量の関係を調べたところ、相関係数 ( $r$ ) は 0.95 で強い正の相関関係が確認された (スピアマンの順位相関係数の検定,  $P < 0.01$ ) (Fig. 3-6b)。

#### 第4節 産卵行動が環境 DNA 放出量に与える影響

##### 第1項 材料と方法

###### 3.4.1. 実験水槽

本実験には、ニホンウナギ DNA を含まない海水を使用した。実験時の海水の塩分と水温は、それぞれ 32.9–33.9 psu と 22.6–23.6°C であった。いらご研究所にて人工的にニホンウナギの産卵を誘発する前日に、1000L の大型水槽 2 つと実験に使用する器具類を全て、0.5% の次亜塩素酸溶液に浸けて最低 5 分間以上放置して海水で 5 回洗浄し DNA を除去した。水槽内の排水口に 0.5 mm 以下のメッシュサイズの網をつけて、卵が水槽内から流出するのを防いだ。水槽に海水を貯めて、水槽に DNA が残留していないことを確認するため、ウナギを入れていない水槽から海水 500ml を採水した。水槽にウナギを入れる前に、人工成熟させた 2 尾のメスウナギと 6 尾のオスウナギの全長 (mm) と湿重量 (g) をそれぞれ計測した (Table 3-3)。親魚を成熟させるため、オスにはヒト絨毛性ゴナドロピン、メスにはサケの脳下垂体の抽出液を隔週で約 10 回注射し、その後メスには排卵

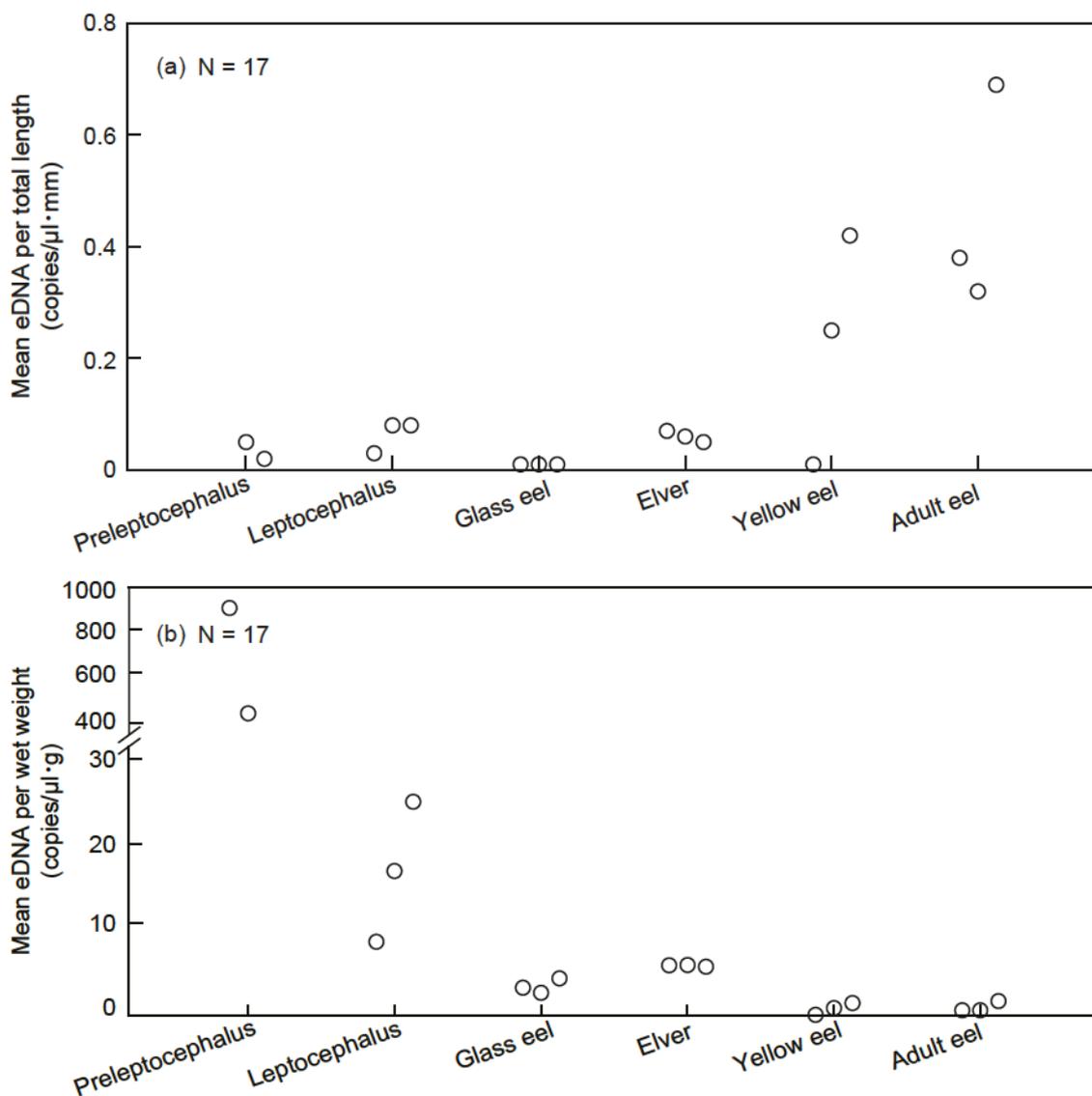


Fig. 3-5 (a) Mean eDNA concentration per total length (copies/μl•mm) and (b) Mean eDNA concentration per wet weight (copies/μl•g). No eDNA was detected from one preleptocephalus (see Table 3-2).

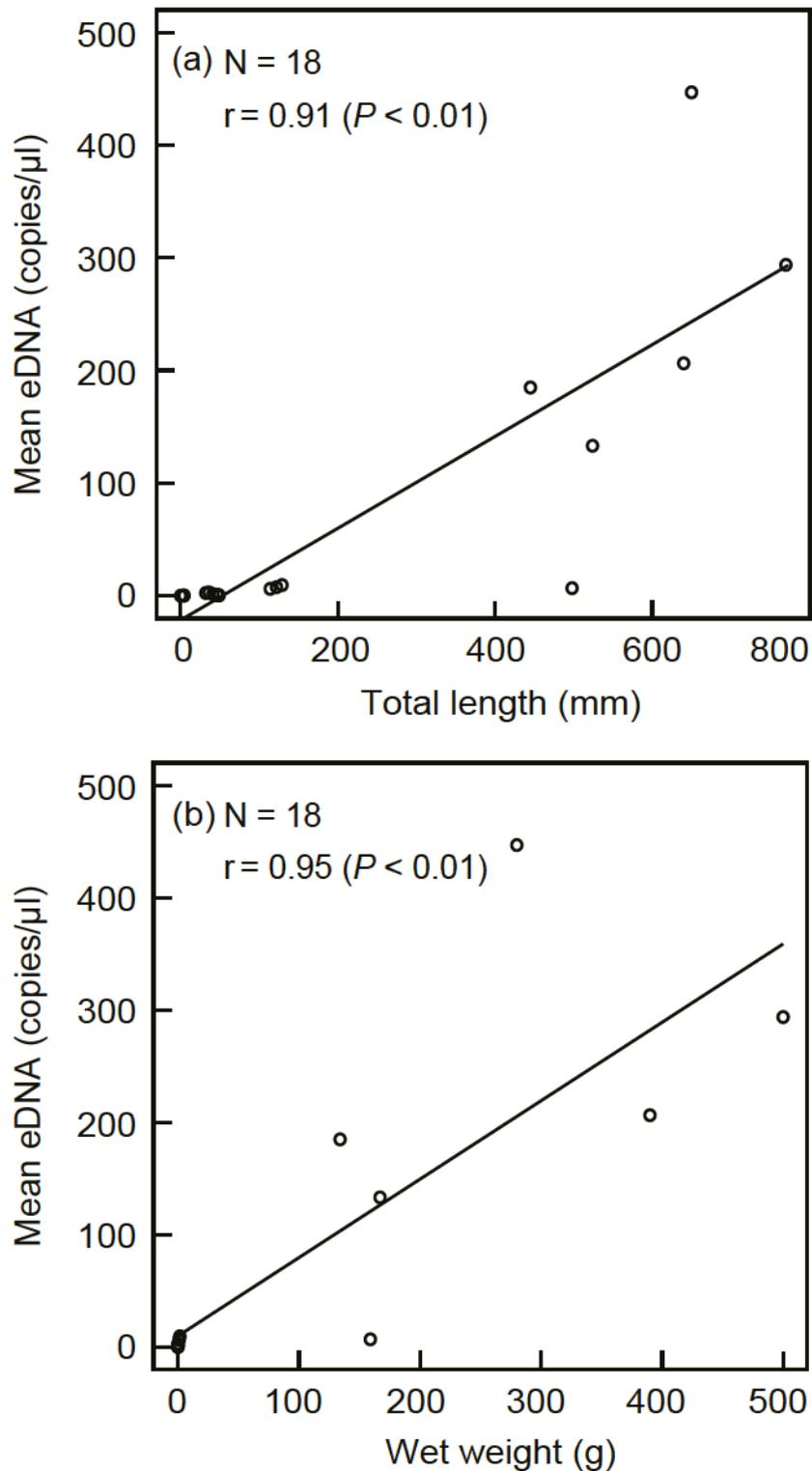


Fig. 3-6 Relationships between (a) mean eDNA concentration (copies/ $\mu$ l) and total length (mm), and (b) wet weight (g). ‘r’ show correlation coefficients (Spearman correlation test,  $P < 0.01$ ).

Table 3-3 Total lengths and wet weights of two artificially matured female and six male eels.

Sex	Tank 1		Tank 2	
	Total length (mm)	Wet weight (g)	Total length (mm)	Wet weight (g)
Female	810	1409	800	1060
	590	322	650	338
Male	710	530	630	364
	738	592	731	608

誘発剤 (17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, DHP) を注射して、水槽内で自然産卵を起こした (Ohta et al., 1997)。水槽の水をかけ流し状態にし、換水率を 3.0–3.2 L/min に調節した後、大型水槽に 1 尾のメスウナギと 3 尾のオスウナギをそれぞれ収容した (Fig. 3-7)。

#### 3.4.2. サンプルの調製と解析

17:00 に 4 尾のウナギを各水槽に収容し、19:00 に各水槽から海水 500 ml を採水した。これらの水サンプルを産卵前とした。その後ウナギが逃げないように、大型水槽に蓋をして人工的に産卵を誘発した。翌日、2 つの水槽内に卵が見られ、産卵が行われたことを確認した。この 2 つの大型水槽から海水 500 ml を採水した (Fig. 3-7)。これらの水サンプルを産卵後とした。採水、水サンプルの輸送、濾過、環境 DNA 抽出、定量 PCR の方法は、本章の第 2 節に準じた。

### 第 2 項 結果

水槽 1 の 3 回の定量 PCR 分析から検出された環境 DNA 量は、産卵前が 1328、1460、1443 copies/ $\mu$ l で、産卵後が 10,263、10,777、11,484 copies/ $\mu$ l であった (Fig. 3-8a)。同じく水槽 2 の場合は、産卵前が 70、124、139 copies/ $\mu$ l で、産卵後が 14,655、15,003、16,892 copies/ $\mu$ l であった (Fig. 3-8b)。産卵前に比べて、産卵後の水槽から、約 10–200 倍の高濃度の環境 DNA が検出された。産卵後、水槽内の水は白く濁っており、親ウナギが放出した精子を含んでいた。また、水槽内には卵と卵巣片が確認された。本実験にて作製した水槽、濾過、抽出、定量 PCR ブランクは全て陰性反応を示した。

### 第 5 節 水温の違いが環境 DNA の分解に与える影響

#### 第 1 項 材料と方法

##### 3.5.1. 実験水槽

実験には、ニホンウナギ DNA を含まない海水を使用した。実験に使用した海水の塩分と水温は、それぞれ 32.9–33.9 psu と 24.3–25 $^{\circ}$ C であった。実験前に、4 つの同形同大の水槽 (縦 38.5 $\times$ 横 50 $\times$ 高さ 30 cm, 水量 30 L)、塩ビパイプなど実験に使用する機器類を 0.5% の次亜塩素酸溶液に最低 5 分間浸し、海水で 5 回よく洗浄した。本章の第 3 節と同様に、3 つの水槽に黄ウナギ 1 尾をそれぞれ収容し、ウナギを収容しない水槽 1 つを準備した。本実験に使用した黄ウナギは本章の第 3 節に用いた 27 尾のうちの 3 個体で、その全長は 498、524、445 mm、湿重量は 159、167、134 g であった (Table 3-2)。海水をかけ流し状態にして、換水率を 1 L/min に調整した。その後、3 つの水槽に 1 尾ずつ黄ウナギを入れ、1 日馴致期間を置いた。

##### 3.5.2. サンプルの調製と解析

馴致期間後、各水槽から 500 ml の海水計 35 サンプルを採水した。採水、水試料の輸送は、本章の第 2 節に準じた。輸送後、すぐに各水槽から採水した 1 サンプルを濾過し、計 4 サンプルの経過

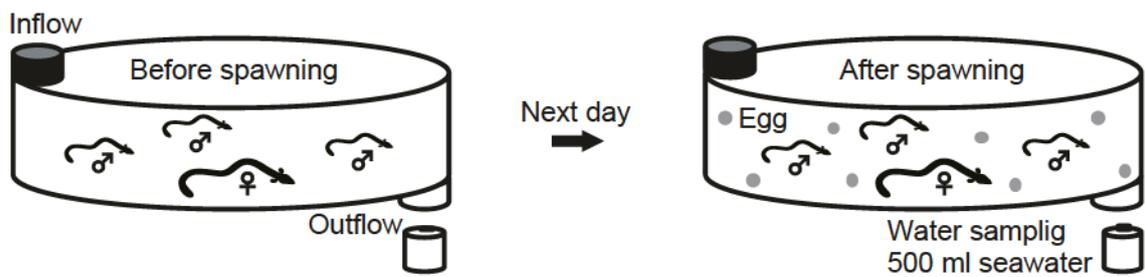


Fig. 3-7 A polyvinyl tank with a capacity of 1000 L seawater was prepared for holding one artificially matured female eel and three males that spawned in the tank.

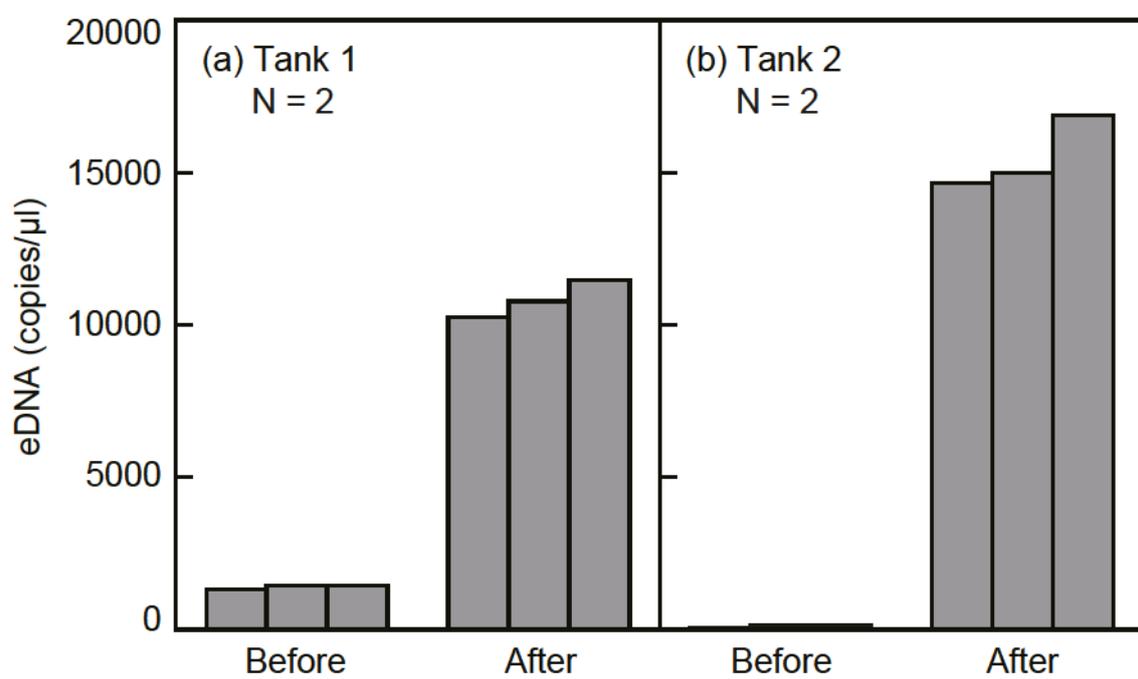


Fig. 3-8 A polyvinyl tank with a capacity of 1000 L seawater was prepared for holding one artificially matured female eel and three males that spawned in the tank.

時間を0時間と設定した (Fig. 3-9)。各水槽の残り 34 サンプルを、17 サンプルずつ 2 グループに分けた。2 グループのうち、空調機を用いて、1 グループの 17 個の水サンプルを 25°C で保存した。冷蔵庫を用いて、もう一方のグループの 17 個の水サンプルを 5°C で保存した。それぞれの温度区より、3、6、9、12、15、18、21、24、36、48、60、72、84、69、120、144 および 168 時間後に、2 つの温度区から 1 サンプルずつを取り出して濾過した (Fig. 3-9)。環境 DNA 抽出まで、濾過後のステリボックスを -20°C で保存した。濾過、環境 DNA 抽出、定量 PCR の方法は、本章の第 2 節に準じた。

定量 PCR 分析の 3 繰り返しから得られた環境 DNA 量の平均値を統計解析に供した。この値をもとに nls 関数を用いて非線形回帰分析を行なった。25°C と 5°C とともに、対数近似曲線 ( $y = a \times \log(x) + b$ ) に平均環境 DNA 量を当てはめ、環境 DNA の分解過程を推定した。解析には R ver. 3.3.2 を使用した。

## 第2項 結果

水温に関わらず、環境 DNA は 24 時間以内に急激に分解される傾向にあった (Fig. 3-10)。また、24 時間以後、高水温中の環境 DNA はより分解が早いものと推測された。7 日後、25°C では非検出または、0.26 と 3.6 copies/μl の微量の環境 DNA のみが検出されるのに対して、5°C では平均 59.1 copies/μl の環境 DNA が検出された。さらに、非線形回帰モデルにより、25°C:  $y = -68.64 \times \log(x) + 323.09$ 、5°C:  $y = -40.28 \times \log(x) + 233.98$  の対数関数を得た (Fig. 3-10)。両方の温度で 0 時間と設定した水サンプルから、約 300 copies/μl の環境 DNA が検出された。そこで、この 2 つの関数の  $y$  に 30 を代入して、初期の環境 DNA 量の約 90% が分解される日数を推定した結果、25°C では約 3 日間、5°C では 7 日間要することが明らかとなった。

## 第6節 考察

### 3.6.1. 環境 DNA の放出

本研究では、尾数が増える (Fig. 3-1a)、発育段階が進む (Fig. 3-4)、産卵行動が起こる (Fig. 3-8) ことにより、環境 DNA 放出量が増えることを明らかにした。このうち、環境 DNA 放出量と発育段階および産卵行動の関係を調べた研究は、環境 DNA 分野において初の報告となった。

環境 DNA 放出量と尾数および生物量の間には正の相関関係があることは、両生類 (Thomsen et al., 2012a; Pilliod et al., 2013, 2014)、魚類 (Takahara et al., 2012; Klymus et al., 2015) ですでに知られている。同様に本研究でも、水槽に収容したニホンウナギの尾数が増えることにより環境 DNA 放出量が増加し (Fig. 3-1a)、さらに、環境 DNA 放出量と生物量の間には正の相関関係があることを確認できた (Fig. 3-2)。環境 DNA 量が増加した原因として、単純に水中に放出される環境 DNA 源が個体数分増加したことが考えられる。例えば、ウナギが呼吸する際に鰓を通過した水やウナギが排泄する尿などには環境 DNA が含まれていて、1 尾より 27 尾でこれらの量は多くなると推測できる。また、水槽に収容した黄ウナギが多い場合、黄ウナギ同士および黄ウナギと水槽が接触する回数が増

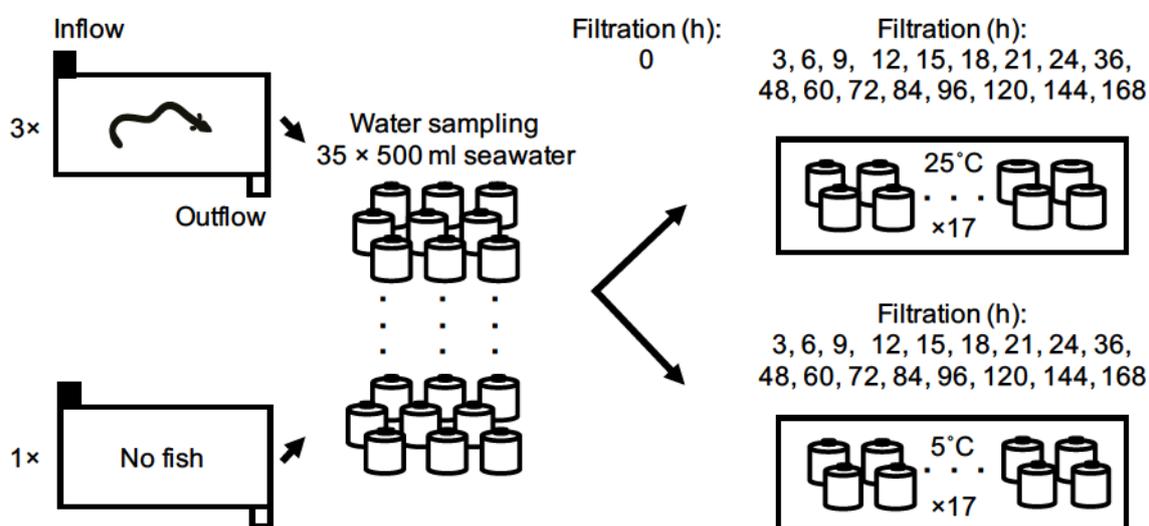


Fig. 3-9 Diagram of the experiment to examine degradation processes of Japanese eel eDNA. Three tanks contained a single yellow eel and the remaining one did not include an eel (water volume in all tanks is 30 L). After the water sampling, one 500 ml seawater sample was immediately filtered. Remaining seawater samples were kept at 25°C and 5°C respectively, and then filtered one by one at each set time.

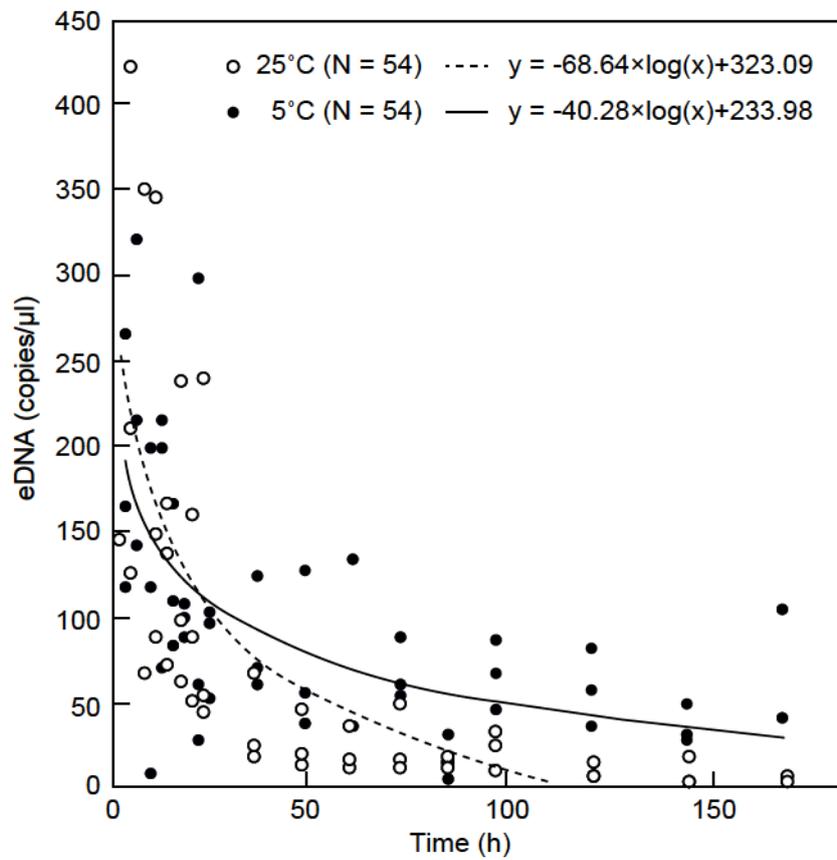


Fig. 3-10 eDNA concentration (copies/ $\mu$ l) in a water sample at each filtered time (h). White circles and black circles show values measured at 25°C and 5°C, respectively.

えて、環境 DNA 源である皮膚片がより多く剥落すると考えられる。

ウナギ 1 尾あたりの環境 DNA 放出量 (copies/ $\mu$ l  $\cdot$  individual) は、水槽に収容したウナギの数が 1、3 および 9 尾の場合に増加したが、27 尾になると減少した (Fig. 3-1b)。この原因として、黄ウナギが 27 尾の群になることによって正の群効果が働き、これが環境 DNA 放出量に影響を及ぼしたと考えた。正の群効果とは、魚が一定の範囲に同種個体の存在を認めることによって心理的に落ち着き、運動量やエネルギー代謝量が低いレベルで安定に保たれることであり、メダカ (Kanda & Itazawa, 1986) やゴンズイ (Kanda & Itazawa, 1981) で確認されている。また、ウナギ属魚類の一種であるヨーロッパウナギ 7 尾 (全長約 38.4 cm、体重 106.6 g) を 4000 L のスタミナトンネルに入れ、強制的に遊泳させ続けた結果、単一個体に比べて、群で遊泳するとエネルギー消費が少ないことが分かった (Burgerhout et al., 2013)。よって、本研究では 27 尾の黄ウナギを収容した水槽で、正の群効果が働き、1 尾あたりの運動量や代謝量が低い状態で安定となり、その環境 DNA 放出量も減少した可能性が考えられた。加えて、その他の原因として、いずれかの黄ウナギの環境 DNA 放出量が極端に少なかった可能性も考えられる。本章の第 3 節では、2 尾の黄ウナギの環境 DNA 量 133.1 と 184.8 copies/ $\mu$ l に比べて、残り 1 尾の黄ウナギの環境 DNA 量が 6.7 copies/ $\mu$ l と低濃度であった (Table 3-2)。27 尾のうち、数匹の個体が 10 copies/ $\mu$ l しか環境 DNA を放出していなければ、1 尾あたりの環境 DNA 放出量は少ない結果となりうる。

生物の発育段階は、環境 DNA 放出量に影響を及ぼす要因であることが示された (Fig. 3-4)。ニホンウナギの発育段階が進むことにより全長や湿重量などの体サイズが大きくなったため、環境 DNA 放出量が増加したものと推測された。本研究では、ニホンウナギの環境 DNA 放出量と全長 (Fig. 3-6a) および湿重量 (Fig. 3-6b) に正の相関関係があることが分かった。先行研究は、環境 DNA の放出が生物の体サイズに依存すると予想していた (Thomsen et al., 2012a; Pilliod et al., 2014)。体サイズが大きくなると、魚の場合、周囲の水環境と接触する皮膚の面積も大きくなる。魚では、上皮細胞が壊死した場合、組織を維持するため、その細胞は剥落し、その後、基底膜にあった細胞が新しく分化すると報告されている (Rakers et al., 2010)。また、ニホンウナギは表皮に粘液細胞を持ち、外界から侵入してくる病原体を古い細胞を含む粘液と一緒に放出している (Tasumi et al., 2004)。これらのことから、体サイズの大きなウナギは、剥離する細胞や粘液などのかたちで環境 DNA をより多く放出しているため、環境 DNA 量が増加したと考えられる。

生物の体表面積も環境 DNA 量に影響を及ぼすとも考えられた。本研究に用いたシラスウナギの全長は、レプトセファルスよりわずかに大きかった (Table 3-2)。一方で、シラスウナギの環境 DNA 放出量と湿重量は、レプトセファルスよりわずかに小さい値であった (Table 3-2)。レプトセファルスがシラスウナギに変態する時、その全長や体高が縮む負の成長を示し、体表面積は 8.0 mm<sup>2</sup> から 2.3 cm<sup>2</sup> まで約 3 分の 1 に減少した (Tsukamoto et al., 2009b; Kuroki et al., 2010)。シラスウナギに比べて、レプトセファルスは体表面積が大きい。つまり、わずかに高濃度のレプトセファルスの環境 DNA 量は、体表面積の差に由来する可能性が考えられた。

他の重要な結果としては、ニホンウナギの卵 1 個を入れた 30 L 水槽の水 500 ml から環境 DNA

が全く検出されなかったことである (Table 3-2, Fig. 3-4)。硬骨魚類の卵膜は、受精後の卵膜硬化に関与すると思われる 3-4 つのタンパク質からなる (Lubzens et al., 2010)。ニホンウナギは、孵化する時、胚内の孵化腺細胞から分泌されるタンパク質分解酵素 (孵化酵素) を用いて強靱な卵膜を溶解する (Hiroi et al., 2004)。よって、受精後、DNA を持つミトコンドリアと核は、非細胞性の硬い卵膜によって外界から隔離されていると考えられる。また、魚類の卵膜は、水や栄養分などの特定の物質を選択的に透過させる (Fausto et al., 1994; Rawson et al., 2000)。一方で、分子量の大きな有機化合物は、卵膜を透過できないことも示唆されている (Henn et al., 2011)。高分子量の DNA が卵膜を通過できるか否かは不明である。しかし、もし DNA が卵膜を通過可能であるとしても、ニホンウナギの卵 1 個から放出される環境 DNA 量は、本研究に用いた定量 PCR の検出限界を下回っていると推測する。プレレプトセファルスを受容した水槽水から 9 回のうち 2 回しか環境 DNA が検出されなかったため、この時検出された 0.1 copies/ $\mu$ l が本研究の定量 PCR の検出限界であろう (Table 3-2)。卵の環境 DNA 放出の有無を明らかにするため、大量の卵を水槽に収容して、その水槽水を採水し分析する必要があると考えられた。

環境 DNA 放出量は、同じ条件下、同じ発育段階の個体であっても個体差がみられた (Klymus et al., 2015; Takeuchi et al., 2019c)。本研究では、1 尾の黄ウナギは他の 2 尾 (130 copies/ $\mu$ l 以上) に比べて、6.7 copies/ $\mu$ l と低濃度の環境 DNA しか放出していなかった (Table 3-2, Fig. 3-4)。しかし、黄ウナギ 2 尾の環境 DNA 量が正常であるか否かは判断できなかった。1 尾の黄ウナギに由来する微量な環境 DNA は、水槽内における環境 DNA の分布が不均一で、少ない DNA を含む水塊を採水してしまったことが原因として考えられた。また、環境 DNA 放出量の個体差は、ウナギにかかったストレスやその行動に左右されると予測されるが、本実験にていずれのウナギ個体にも異常な行動は見られなかった。環境 DNA の個体差はオオサンショウウオ *Dicamptodon aterrimus* でも報告されている (Pilliod et al., 2014)。しかし、環境 DNA の個体差を生じさせる決定的な要因は明らかでない。

興味深い結果として、体重 1 g あたりの環境 DNA 放出量 (copies/ $\mu$ l  $\cdot$  g) が、発育段階の進行とともに減少することが分かった (Fig. 3-5b)。最も湿重量の軽いプレレプトセファルスにおいて、体重 1 g が顕著に高濃度の環境 DNA を放出しているという結果が得られた。ブルーギル *Lepomis macrochirus* の湿重量あたりの環境 DNA 放出量 (copies/h) は、親魚より稚魚でわずかに高かった (Moriyama et al., 2014)。コイ *Cyprinus carpio* (Oikawa & Itazawa, 1984)、マダイ *Pagrus major* (Oikawa & Itazawa, 1993)、カライワシ上目 4 種のレプトセファルス (Bishop & Torres, 1999) において、代謝率は体重の増加とともに減少した。同一種内では若く小型の時期ほど、生命活動に必須で代謝活性の高い脳や内臓諸器官の体全体に対する重量比が大きい一方、成長した高齢で大型の個体になると、筋肉や骨、脂肪など生命活動への重要性がやや低く代謝活性も低い組織の体全体に対する重量比が大きくなる (Itazawa & Oikawa, 1986)。また、ウナギ目の仔魚は、体サイズを急速に大きくするため、活発に代謝し、大量の老廃物を放出している (Bishop & Torres, 1999)。したがって、湿重量あたりの環境 DNA 量の減少は、親魚と比べて、仔魚 1 g あたりの高い代謝率に起因すると推測された。

産卵行動が生じることも環境 DNA 放出量を増加させる要因であった (Fig. 3-8)。これまで、ア

メリオオサンショウウオ *Cryptobranchus alleganiensis* (Spear et al., 2015; Takahashi et al., 2018)、アユ *Plecoglossus altivelis* (Doi et al., 2017)、パーチの一種 *Macquaria australasica* (Bylemans et al., 2017)、ニシン科の *Alosa alosa* と *Alosa fallax* (Antognazza et al., 2019) など体外受精する生物の産卵時期と卵の採集地点で、河川水から一時的に高濃度の環境 DNA が検出された。これは、産卵行動が起こることによって、大量の環境 DNA が水中に放出されることを意味する。また、この高濃度の環境 DNA 量は、オスが放出した精子由来である可能性が最も高い (Takeuchi et al., 2019c)。ニホンウナギの精子は、頭部が 5  $\mu\text{m}$  で、横幅が 1  $\mu\text{m}$  である (Okamura et al., 2000)。本研究に使用したステリベクスの粒子保持能は 0.45  $\mu\text{m}$  であるため、濾過により精子を採集することが可能である。その他、親ウナギに由来する卵巣片、体腔液、粘液なども環境 DNA 源であると推測された。産卵行動による放卵と放精によって、大量の環境 DNA が水中に放出されると考えられる。

環境 DNA の放出に影響する様々な要因を明らかにすることで、野外での生物量の推定や生物の行動を簡単に調査可能となりうる。例えば、野外調査にて複数の個体が存在する地点では高濃度の環境 DNA が検出できる (Takahara et al., 2012)。よって、目的種が好んで使用する生息場所や集合地点には局所的に高濃度の環境 DNA が漂っているものと推測される。このことは、高濃度の環境 DNA が検出される周囲の環境を保全することにより、希少種の効率的な保全効果が見込まれる。一方で、目的種が外来種であれば、高濃度の環境 DNA 検出点で重点的に捕獲作業を行うことにより、効率的に外来種を駆除できる可能性が考えられる。また、環境 DNA 法、特に単一種検出法は、環境 DNA 放出量を簡単に把握できるため、産卵や遡上などの季節的な行動 (Erickson et al., 2016; Bylemans et al., 2017; Sakata et al., 2017; Antognazza et al., 2019; Levi et al., 2019; Takeuchi et al., 2019c) や摂餌 (Klymus et al., 2015; Ghosal et al., 2018) をする時期の推測に役立つことが示されている。環境 DNA の放出について、今後さらなる基礎実験が実施されることにより、生態学や資源保全学にブレイクスルーをもたらす環境 DNA 法の使用法が考案されていくものと期待される。

### 3.6.2. 環境 DNA の分解

本研究では、高水温中の環境 DNA はより早く分解することが分かった (Fig. 3-10)。同様に室内実験にて、より高い水温は環境 DNA の分解を促進すると報告されている (Stricker et al., 2015; Tsuji et al., 2017; Jo et al., 2019)。これは、水温上昇に伴う酵素や微生物活性の増加に DNA の分解が影響を受けるからである (Dejean et al., 2011; Barnes et al., 2014)。水温は、環境 DNA の分解要因として、二次的に作用するものであると考えられる (Barnes & Turner, 2016; Jo et al., 2019)。Tsuji et al. (2017) は、環境 DNA を分解させる直接的な要因を明らかにするため、DNA の分解過程を追うとともに、水試料中に含まれる微生物を寒天培地で培養し、コロニー数をカウントした。その結果、環境 DNA の分解と微生物量に有意な相関はないと報告している。ただし、この方法で計数した微生物が環境 DNA 分解に寄与しているのかは不明である。このように、環境 DNA 分解に直接的な影響をもたらす要因を調べ、その分解機構を解明していく必要がある。

環境 DNA は、少なくとも二段階で分解される可能性が考えられた。既存の環境 DNA 分解実験

は、生物種に依存せず、実験開始から 1-8 日以内に急激に環境 DNA 量が減少し、その後ゆっくりと分解が進む傾向にあった (Thomsen et al., 2012b; Barnes et al., 2014; Eichmiller et al., 2016; Sassoubre et al., 2016; Bylemans et al., 2018; Tsuji et al., 2017)。本研究では、水温に関わらず 24 時間以内に、ニホンウナギの環境 DNA は、初期環境 DNA 量 300 copies/ $\mu$ l から約 50 copies/ $\mu$ l まで急激に減少し、その後、分解は緩やかになった (Fig. 3-10)。このことから、分解過程には緩急の段階があるものと考えられた。環境 DNA はフミン酸などの有機化合物や泥の粒子などと凝集し、粒子状になって水中に漂っていると考えられている (Turner et al., 2014; Eichmiller et al., 2016)。Eichmiller et al. (2016)は、この凝集体のなかで、分解を受けやすい物質が先に、続いて難分解性の物質が消失していくことにより、環境 DNA の分解が二段階から成ると考察している。しかし、分解を受けやすい物質と難分解性の物質に吸着している環境 DNA 量にまでは言及していなかった。分解を受けやすい物質から構成される凝集体に多くの環境 DNA が吸着していれば、凝集体が維持できなくなった際、濾過により環境 DNA を含む粒子を収集できなくなると考えられ、環境 DNA の検出率が大幅に減少すると予想される。検出される環境 DNA が水中にどのような状態で存在しているのか詳細に明らかにしていく必要がある。

環境 DNA の分解に与える影響は大きく 3 つ、すなわち、DNA 自体の特性、非生物学的要因、生物学的要因であると考えられている (Barnes & Turner, 2016; Sassoubre et al., 2016; Jo et al., 2017)。DNA 自体の特性とは、水中での存在状態や DNA を包んでいる細胞膜の有無などである。非生物学的要因とは、光、酸素、pH、塩分などがある。そして、生物学的要因とは、微生物の活動と組成である。これらの要因が環境 DNA の分解に与える影響を明らかにしていくことにより、生物量や生物がいた地点と時刻をより正確に推定できるようになるかもしれない (Barnes & Turner, 2016)。例えば、Sassoubre et al. (2016)は、室内実験にて得られた分解率をモデル式に組み込み、カタクチイワシの尾数推定を試みた。また、環境 DNA の分解要因の解明は、野外調査を実施する際、採水する頻度や時間、水の保存方法を最適化するのに役立つ (Eichmiller et al., 2016; Tsuji et al., 2017)。例えば、オオサンショウウオでは、低水温中の環境 DNA の分解が遅いため、冬季に採水サンプリングを実施することにより環境 DNA 検出率の向上が見込まれている (Fukumoto et al., 2015)。

## 第4章 ニホンウナギ産卵場における環境DNAの検出

### 第1節 目的

ニホンウナギの産卵行動は未だ見つかっていない。河川から外洋まで3000kmの大回遊をしてきたオスとメスはどのようにして広い海の中で出会うのか、どのように卵を産んでいるのか、産卵地点にはどんな特徴があるのか、ペア産卵か乱婚か、など産卵生態学的に興味深い問題が山積している。これらの疑問に答えるには、ニホンウナギの産卵行動を実際に観察しなければならない。すでに塩分フロント仮説と海山仮説を基に、卵が取れる海域を特定できるようになった(Tsukamoto et al., 2011; Aoyama et al., 2014)。しかし、この海域は広範囲に及んでいる。産卵行動を観察するには、産卵地点をさらに絞り込む必要がある。そこで、本章では、ニホンウナギの産卵場調査航海中に船上で環境DNA法を実施し、本種の産卵行動を見つけることを目的とした。

### 第2節 海洋調査船「なつしま」による環境DNA調査

#### 第1項 材料と方法

##### 4.2.1. 調査海域の設定

2015年5月5-21日に行われた海洋調査船「なつしま」(国立研究開発法人 海洋研究開発機構)による研究航海(NT15-08)に参加し、環境DNA調査を実施した。本航海中、2回の台風が発生したことにより調査期間が短縮されたため、5月19日(新月1日後)と20日(新月2日後)の2日間のみ、調査海域にてサンプリングが行われた(Fig. 4-1a,b)。新月仮説(Tsukamoto et al., 1998; Ishikawa et al., 2001; Tsukamoto et al., 2003)と以前の卵の採集日時(Tsukamoto et al., 2011)によると、上記2日間の調査期間には、親ウナギの産卵はすでに終了したと推測された。そこで、卵(Tsukamoto et al., 2011; Aoyama et al., 2014)と親ウナギ(Chow et al., 2009; Kurogi et al., 2011)の採集実績がある“カイヨウポイント(北緯13°, 東経142°)”の周辺に計9測点を設けた(Fig. 4-1c)。また、これらの測点は、親ウナギが内部潮汐エネルギーの高い地点集まり産卵しているのではないかという内部潮汐仮説に基づいて設定された(樋口, 2019)。

##### 4.2.2. サンプルの調製と解析

Conductive temperature depth profiler (CTD) システムに装着したニスキン採水器を用いて、9測点の水深100、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000mから、それぞれ2Lの海水をプラスチックボトル(ASONE)で採水した。さらに、海中の水深約3.6mから引いている海水2Lを船上の蛇口から採水し、表層水試料とした。各測点の海水を採水するとともに、純水2Lを同じ手順で採水し、ブランクを作製した。第2章の第3節の第1項に準じ、粒子保持能0.3µmのガラス繊維ろ紙(Advantec)を用いて、各測点について、計11水深から採水した海水試料と1つの濾過ブランクを作製した。

船上にて環境DNA検出の結果が得られるかを試験するため、濾過30分後、測点C1、C2、C3、

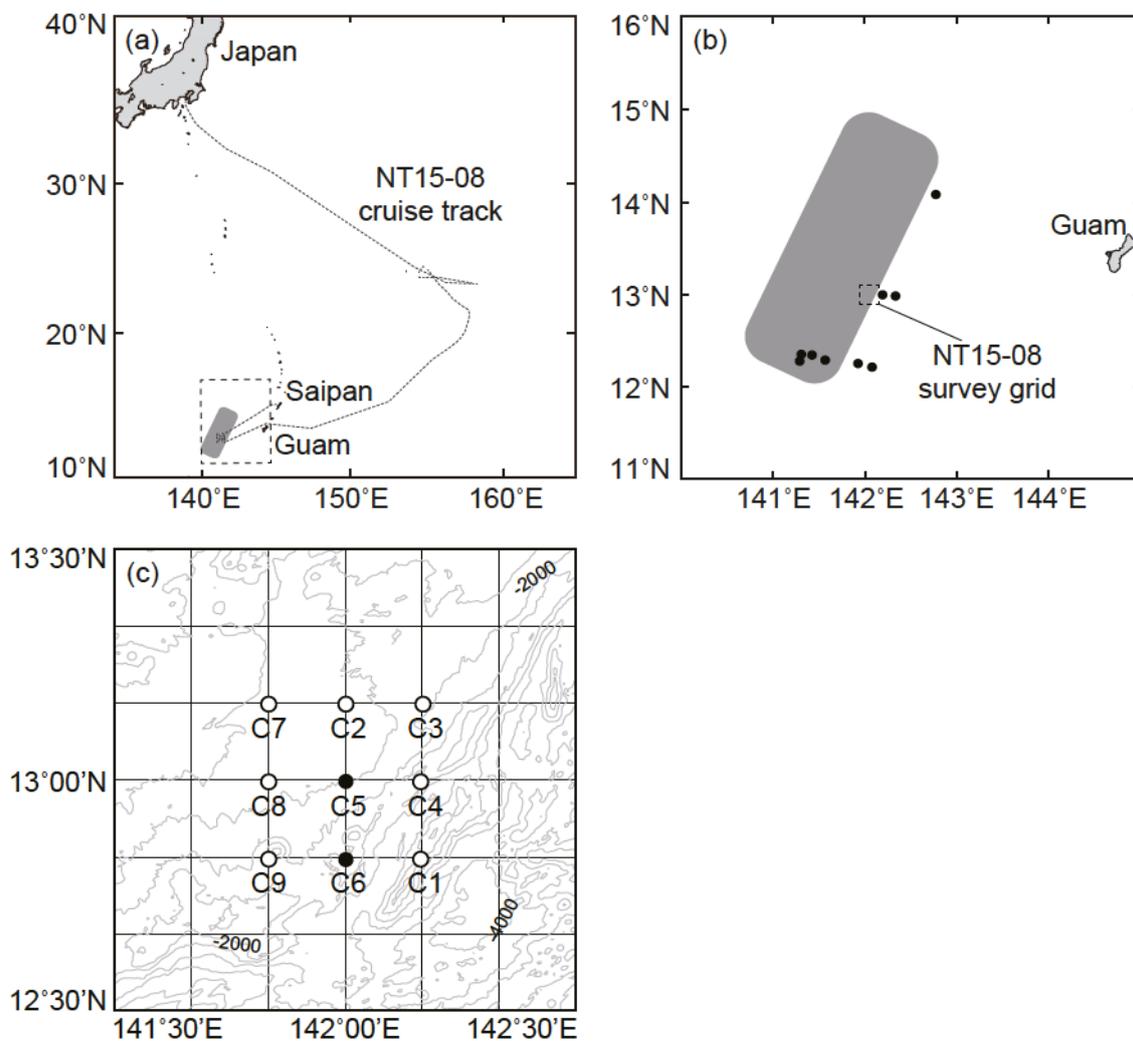


Fig. 4-1 Study area, showing (a) the cruise track of the NT15-08 research cruise, (b) the locations where adults of the Japanese eel (black circles) and preleptocephali (gray shaded area) were collected in previous cruises from 2005 to 2009, and (c) the NT15-08 survey grid that consisted of nine water sampling stations (circles) along the western side of the south West Mariana Ridge. Black circles in (c) show the stations that were real-time PCR positive for eDNA analysis.

C4の水深200、250、300、600、700、800、900mのろ紙から環境DNAを抽出した (Fig. 4-1c)。同様に、4測点の濾過ブランクからもDNAを抽出した。抽出法は、付属の説明書と Miya et al. (2015) に従い、最終溶出量を50  $\mu$ lにした。第2章の第3節の第1項に準じ、これら計32個の抽出溶液を鋳型に、リアルタイムPCR分析を行なった。この時、PCRブランクも加えて分析した。PCRにより得られた増幅産物を $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。調査の時間が限られていたため、残り85枚のろ紙をアルミホイルで包み、 $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

調査航海後、全てのろ紙、環境DNA抽出溶液、定量PCR産物を、保冷剤を詰めたクーラーボックスに収容して、陸上の研究室に輸送した。濾過ブランク5枚を含む計85枚のろ紙から環境DNAを抽出した。抽出ブランクを作製して、試薬類にコンタミネーションが起きていないかを試験した。これらの抽出DNAを鋳型に、リアルタイムPCR分析を行なった。抽出法、リアルタイムPCR法は、船上で行なった方法と同様であり、第2章の第3節の第1項に準じた。

船上と研究室内にて得られたリアルタイムPCR産物のうち、1回でもDNA増幅を示したサンプルを、2%アガロースゲルを用いて電気泳動に供した。PCR産物を、SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) で染色し、Gel Doc<sup>TM</sup> EZ imager (BioRad) を用いて、ニホンウナギの増幅全長である154bpの増幅産物の有無を確認した。リアルタイムPCRにて増幅を示し、かつ電気泳動で目的サイズのバンドが確認できたサンプルを陽性として扱った。

全海水試料のうち、11個の試料にて、陽性とみなしたサンプルよりも、リアルタイムPCRにて低い増幅曲線が確認され (蛍光強度0.5以下)、PCR阻害の可能性が考えられた。阻害の確認試験を行い、11個の海水試料のPCR増幅について阻害の有無を調べた。第2章の第3節の第1項に準じ、リアルタイムPCR法を用いて、ニホンウナギの組織抽出物100pgを含む溶液を8回分析した。これら8サンプルのCt値は、0.01–0.62の範囲にあった。次に11個の海水試料に由来する抽出DNA溶液にニホンウナギの組織抽出物100pgを加えて、リアルタイムPCRで同様に分析した。これらと同じPCR反応で、ニホンウナギ組織抽出物100pgを含む溶液を分析した。11個の海水サンプルとニホンウナギ組織抽出物のみを含む溶液のCt値を比較して、その差が0.6以下の場合、海水サンプルに阻害はないものと判断した。

調査航海と研究室において、コンタミネーションを最小限にする作業を行った。環境DNA調査に使用した全ての器具類を、0.5%の次亜塩素酸溶液に少なくとも5分間浸けてDNAを除去した。作業部屋の机や機器類を0.5%の次亜塩素酸溶液を含ませたキムワイプで拭いた。これまでにPCR産物を扱ったことのない部屋にて、フィルターチップを用いて、環境DNA抽出とPCRの準備を行なった。作業中、使い捨ての手袋を着用し、地点、サンプル、作業間でクロスコンタミネーションがないよう手袋を交換した。

### 第2項 結果

船の上でニホンウナギの存在を把握し、また環境DNA法の実用性を検証するため、32個の海水サンプルを船上で分析した結果、DNA増幅は全くみられなかった。そして、陸上の研究室で残り

85 サンプルを分析した結果、全 117 の海水サンプルのうち、3 サンプルが DNA 増幅を示した。これら 3 つの海水サンプルは、測点 C5 (北緯 13°00', 東経 142°00') の水深 400m、および測点 C6 (北緯 12°50', 東経 142°00') の水深 250m と 400m にて、新月 1 日後である 5 月 19 日の 19:20、21:20、21:30 にそれぞれ採水されたものであった (Fig. 4-1c, Table 4-1)。また、3 サンプルが取れた水深の水温は、7.75、13.58、8.16°C、塩分は 34.34、34.43、34.31 であった (Table 4-1)。3 サンプルの Ct 値は、37.6、38.3、39.5 であった (Fig. 4-2b, Table 4-1)。これら 3 サンプルはリアルタイム PCR で 3 回ずつ分析されたが、いずれも 1 回のみの DNA 増幅を示した。これらの PCR 産物を電気泳動に供し、154 bp 付近にバンドが確認できたため、ニホンウナギ DNA を検出できたとみなした。

阻害の確認試験の結果、低い増幅曲線を示した 11 個の海水試料は、全て阻害されていないと判断された。11 サンプルとニホンウナギの組織抽出溶液の Ct 値を比較したところ、0.6 以上の差はみられなかった。11 サンプルを電気泳動に供し、PCR 産物の存在が無いことを確認した。よって、これらの 11 サンプルは陰性であり、ニホンウナギ DNA を含まないと判定された。本実験に用いた全てのブランクで DNA 増幅は確認できず、コンタミネーションは発生しなかったと判断された。

船上において、環境 DNA 検出結果を得るまでに約 9.5 時間を要した。CTD の投入から回収までに約 2 時間、CTD に装着したニスキンボトルから 10 L の活栓タンクに水を移す作業に約 1 時間、海水の濾過に約 1 時間 30 分、ステリベクスからの DNA 抽出に約 1 時間 30 分、セットアップを含めたリアルタイム PCR 分析に約 2 時間、使用した器具類のブリーチ作業に約 1 時間半を必要とした。

### 第3節 深海潜水調査支援母船「よこすか」による環境DNA調査

#### 第1項 材料と方法

##### 4.3.1. 調査海域の設定

2017 年 5 月 13-27 日にかけて行われた深海潜水調査支援母船「よこすか」(国立研究開発法人海洋研究開発機構)による研究航海(YK17-10)にて、環境DNA調査を実施した。まず、西マリアナ海嶺の西側にある測点 X1 から南に下り、その後東側にある測点 X17 まで、X-CTD (Tsurumi Seiki, Japan) を用いて、計 17 測点の水深 0-1000m までの塩分を調べた (Fig. 4-3)。X-CTD のデータをもとに塩分フロントの位置を決定し、海山列との交点を定め、卵が採集されると思われる海域を特定した (Tsukamoto et al., 2003, 2011; Aoyama et al., 2014)。さらに、内部潮汐エネルギーの高い地点に集まって親ウナギが産卵しているのではないかという内部潮汐仮説から (樋口, 2019)、北緯 13°05'、東経 142°00' 付近に調査海域を設定した (Fig. 4-3)。調査海域には以下計 5 測点、ステーション 1 (北緯 13°00', 東経 141°55')、ステーション 2 (北緯 13°07', 東経 141°58')、ステーション 3 (北緯 13°05', 東経 142°00')、ステーション 4 (北緯 13°03', 東経 142°02')、ステーション 5 (北緯 13°10', 東経 142°05') を設けた (Fig. 4-4)。

Table 4-1 Summary of the sampling time, water depth, hydrographic characteristics, and real-time PCR threshold (Ct) value of each water sample that had a positive eDNA detection in the NT15-08 cruise. All three samples were collected on 19 May 2015 (one day after new moon).

Station	Sampling time (h)	Water depth (m)	Temperature (°C)	Salinity	Ct value
C5	19:20	400	7.75	34.34	39.5
C6	21:20	250	13.58	34.43	37.6
C6	21:30	400	8.16	34.31	38.3

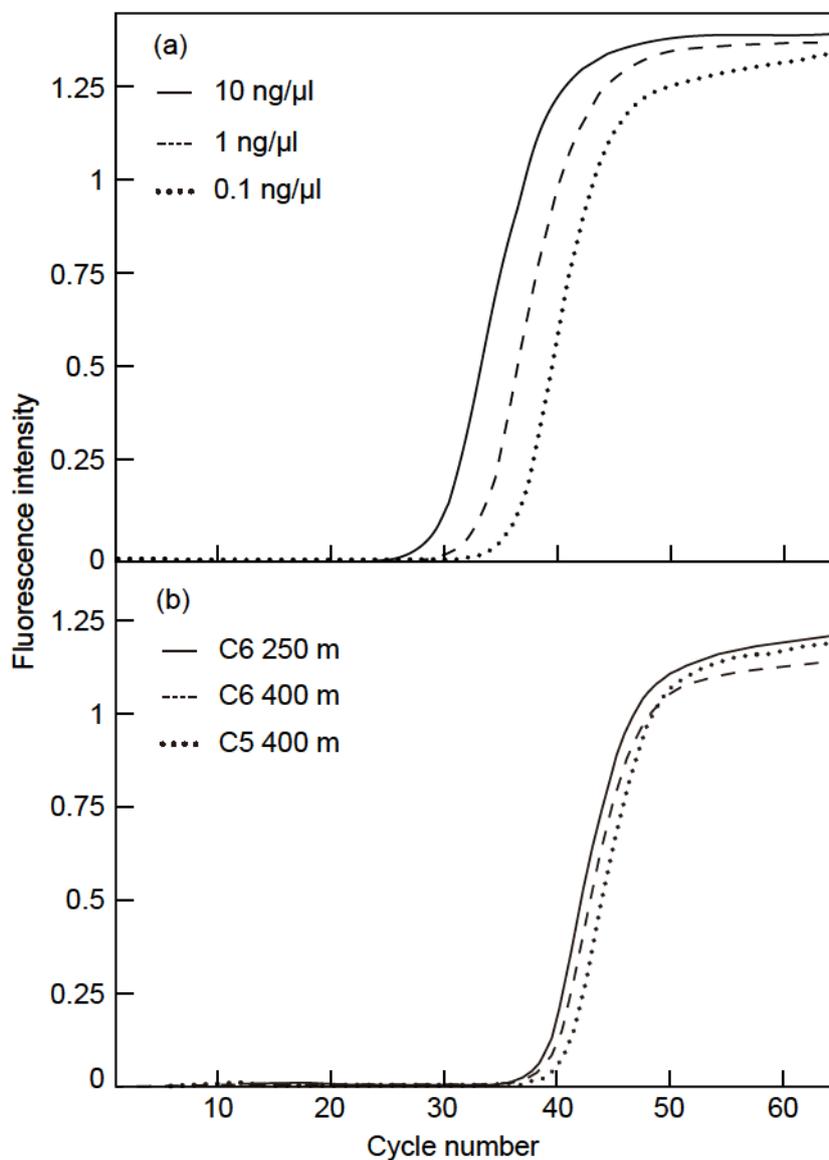


Fig. 4-2 Amplification curves from the real-time PCR analysis for Japanese eel using (a) eDNA extracts from 500 ml tank water with 10, 1, 0.1 ng/μl concentration (50, 5, 0.5 ng of DNA amount per a real-time PCR reaction, respectively), and (b) eDNA extracts from 2 L seawater from station C5 at a depth 400 m and station C6 at 250 and 400 m. All eDNA extracts in (b) were analyzed with three real-time PCR replicates, but only one successful amplification curve from each seawater sample is depicted.

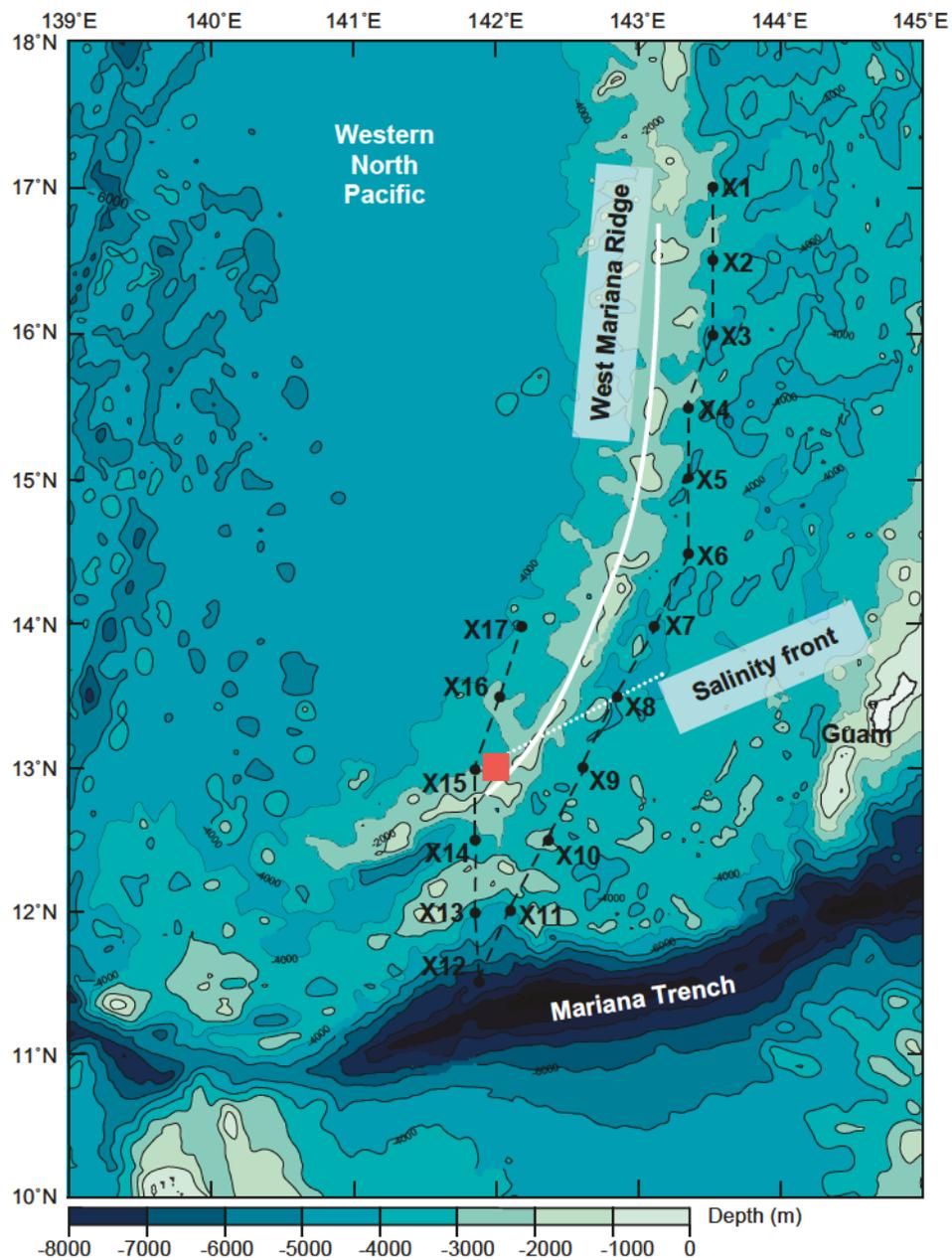


Fig. 4-3 Map of the X-CTD stations during the YK-17 research cruise along the West Mariana Ridge in May 2017. According to the location of the salinity front and West Mariana Ridge, the study area (red box) was defined.

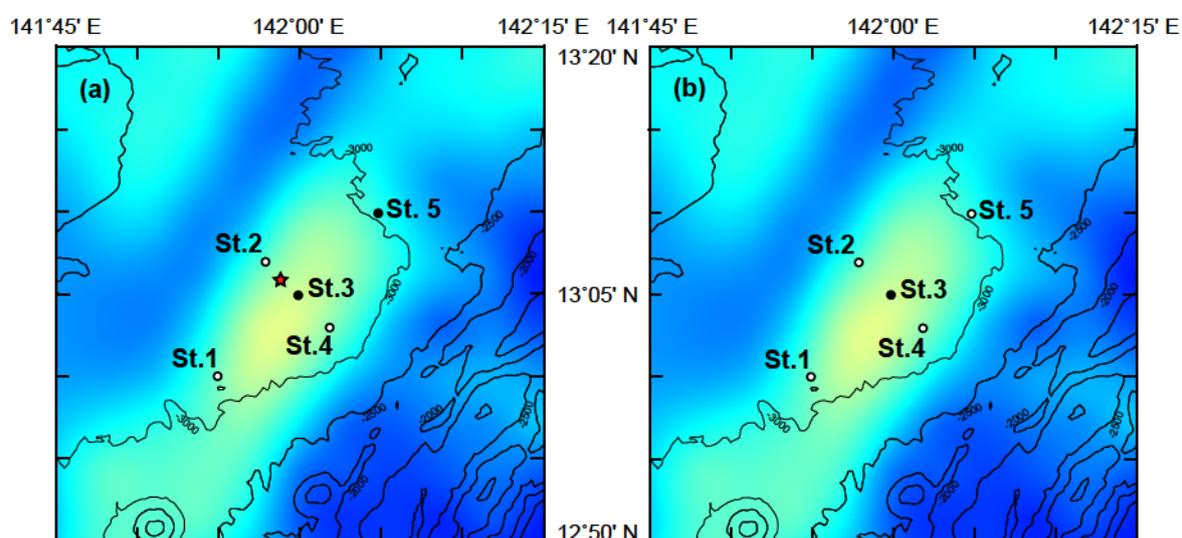


Fig. 4-4 Detection of eDNA in study area (a) on 20 May and (b) on 23 May 2017. Study area consisted of five water sampling stations (circles) for eDNA analysis. The qPCR positive results and sequences of the Japanese eel were obtained at black circles in (a) and (b). A video showing the appearance of likely Japanese eel was recorded at a red star in (a). Light yellow in (a) and (b) show high energy patches of the internal tide.

## 4.3.2. サンプルの調製と解析

5月20日(新月6日前)、ニスキンボトルを装着したディーブ・トウを用いて、全5測点の水深50、100、150、200、400、600、800、1000 mから海水10 Lをそれぞれ採水した。続いて、5月21日(新月5日前)から22日(新月2日前)にかけて、調査海域の中央にあるステーション3でのみ上述の水深から同じ方法で海水10 Lを採水した。ニスキンボトル内の海水を10 Lの活栓付きタンクに移し、0.45  $\mu\text{m}$ の粒子保持能をもつステリベクス(Merck Millipore)を用いて船上にて海水を濾過した。この大量濾過システムは、Miya et al. (2016)を参考にした。各ステーションの海水サンプルを濾過した後、同様の方法で純水10 Lを濾過し、濾過ブランクを作製した。濾過後2時間以内に、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いてステリベクスから環境DNAを抽出した。コンタミネーションを試験するため、抽出ブランクを作製した。抽出法は、付属の説明書とMiya et al. (2016)に従い、最終溶出量を100  $\mu\text{l}$ に調節した。

船上において、コンタミネーションの防止を考慮して作業を行なった。作業部屋の机や機器類を0.5%の次亜塩素酸溶液を染み込ませたキムワイプで拭いた。作業部屋にクリーンベンチを設置し、フィルターピペットを用いて、ベンチ内で環境DNA抽出とPCRのセットアップをした。空気中へのエアロゾルの分散を防ぐため、定量PCR産物が入ったチューブは作業部屋で開封しなかった。全作業中、使い捨ての手袋を必ず着用し、たびたび手袋を取り替えた。使用した10 Lタンクやピンセット等は、0.5%の次亜塩素酸溶液に最低5分間浸けたあと、水道水でよく洗浄し、乾かしてから再利用した。

定量PCRを用いて、船上で環境DNA抽出物を分析した。定量PCR反応液の組成やPCR条件は、第2章の第3節の第1項のクローニング法に記した方法に準じた。ただし、検量線を作成する時は、 $3 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^3$ 、 $3 \times 10^2$ 、 $3 \times 10^1$ 、 $3 \times 10^0$ のスタンダード溶液の計6点の定量値を使用した。航海中、環境DNA抽出物と定量PCR産物は $-20^\circ\text{C}$ で冷凍保存された。航海後、氷を詰めたクーラーボックスにDNA抽出物とPCR産物を入れ、陸上の研究室に輸送し、その後 $-20^\circ\text{C}$ で冷凍保存した。

定量PCR3反応のうち、1回でもDNA増幅を示したサンプルを、研究室にて解凍した。3つの定量PCR産物を1つの0.2  $\mu\text{l}$ チューブにまとめた。ウラシル合成能を持つ大腸菌CJ236を用いて、定量PCR産物のクローニングを行い、そのシーケンスをした。クローニングおよびシーケンスの方法は、第2章の第3節の第1項のクローニング法に準じた。

## 第2項 結果

5月20日(新月6日前)に、全5測点で環境DNA調査を行なった結果、8:42にステーション3の水深600 mから0.99 copies/ $\mu\text{l}$ 、10:58にステーション4の水深800 mから17.26 copies/ $\mu\text{l}$ 、13:33にステーション5の水深400 mから14.52 copies/ $\mu\text{l}$ の微量な環境DNAが検出された(Fig. 4-4a, Table 4-2)。Ct値はそれぞれ、38、35.82、37.03であった。これら3サンプルは、定量PCR3反応のうち、1回のDNA増幅を示した。

Table 4-2 Summary of the date, sampling time, water depth, hydrographic characteristics, qPCR result and sequencing determination of each water sample that showed a qPCR positive in the YK17-10 cruise. Each of three water samples collected from three stations on 20 May showed non-detection of eDNA in qPCR (ND) twice.

Station	Date (day before new moon)	Sampling time (h)	Water depth (m)	Temperature (°C)	Salinity
St. 3 (13°05'N, 142°00'E)	20 May (6)	8:42	600	6.43	34.45
St. 4 (13°03'N, 142°02'E)	20 May (6)	10:58	800	5.61	34.50
St. 5 (13°10'N, 142°05'E)	20 May (6)	13:33	400	9.22	34.40
St. 3 (13°05'N, 142°00'E)	23 May (3)	7:54	400	8.56	34.43

Station	qPCR			Sequencing			
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	
	Ct value	Concentration (copies/ $\mu$ l)	Ct value	Concentration (copies/ $\mu$ l)	Ct value	Concentration (copies/ $\mu$ l)	
St. 3	38	0.99	ND	0	ND	0	<i>A. japonica</i>
St. 4	35.82	17.26	ND	0	ND	0	Unidentified
St. 5	37.03	14.52	ND	0	ND	0	<i>A. japonica</i>
St. 3	28.74	54.52	28.73	55.07	28.68	56.44	<i>A. japonica</i>

5月23日(新月3日前)の7:54、ステーション3の水深400mから54.52、55.07、56.44 copies/μl(平均55.34 copies/μl)の高濃度の環境DNAが検出された(Fig. 4-4b, Table 4-2)。Ct値は、28.74、28.73、28.68(平均28.71)であった。このサンプルは、3繰り返しの定量PCR分析において、全てDNA増幅を示した。また、新月5、4および2日前に、ステーション3で同様の環境DNA調査を実施したが、定量PCRにおいてDNA増幅は見られなかった。本実験で作製した濾過、抽出、定量PCRブランクは全て陰性を示したため、コンタミネーションは生じなかったと判断した。

調査航海後、陸上の研究室内でDNA増幅を示した上記4サンプルの定量PCR産物を解凍して、電気泳動に供したところ、154bp付近にバンドが確認できた。研究に使用したニホンウナギ用プライマーセットは、154bpを増幅した(Watanabe et al., 2004a; Minegishi et al., 2009a; Takeuchi et al., 2019a)。このバンドを切り出して、クローニング法に供し、定量PCR産物の塩基配列を決定した結果、5月20日にステーション3とステーション5、および5月23日にステーション3で得られた海水サンプルから、ニホンウナギの配列と100%の類似性を示す塩基配列が得られた(Table 4-2)。よって、新月6日前にはステーション3と5で相対的に微量な、新月3日前にはステーション3で相対的に高濃度のニホンウナギ環境DNAをそれぞれ検出できた。

一方で、5月20日にステーション4で採水した海水サンプルから得られた76bpの配列(CGGA ACTGGTATCTCGCGTGCCAGGTCTTGGACCAGTGGGGCCGGAGGGGTTCGACCTCGCGGCCTCGCCATCCCGA)は、ニホンウナギのものと全く一致しなかった(Table 4-2)。この配列は、公共の遺伝子データベース(例えばDDBJ)に登録されていなかったため、種同定ができず、どの生物に由来する環境DNAであるか判断できなかった。

#### 第4節 考察

##### 4.4.1. 環境DNAの分布から推定するニホンウナギの行動

2015年のなつしま航海では、新月1日後に外洋水からニホンウナギの環境DNAを検出できた(Fig. 4-1c, Table 4-1)。これは、外洋において特定の種の環境DNAを狙って検出した初の研究報告となった。リアルタイムPCRで水槽水に由来するDNA抽出物10、1、0.1 ng/μlと、外洋水に由来するものを分析して、それらのCt値を比べてみた結果、外洋水サンプルのほうがより高いCt値を示した(Fig. 4-2)。Ct値とDNA濃度には負の相関関係があるため(Minegishi et al., 2009a; Takeuchi et al., 2019a)、高いCt値を示した外洋水サンプルに含まれるニホンウナギのDNA濃度は、水槽水に比べて低いものと推定された。

2017年のよこすか航海では、新月6日前に2地点で微量なニホンウナギの環境DNAが検出できた(Fig. 4-4a, Table 4-2)。また、同日の夜21:42、ステーション3から北西方向に約3.24 km離れた地点で親ウナギらしき映像の撮影にも成功している(YK17-10 Cruise Report, 2017)(Fig. 4-4a, Fig. 4-5)。この微量な環境DNA検出とウナギの映像から、本航海で推定した産卵場付近にニホンウナギが存在していたことが示された。

さらに、よこすか航海では、新月3日前、ステーション3で高濃度の環境DNAが検出できた

(Fig. 4-4b)。第3章の第4節にて、ニホンウナギの産卵行動が起こると大量の環境DNAが水中に放出されることを明らかにした。このことから、外洋にて産卵行動が起きた場合、産卵地点の近くで採水ができれば、かなり高濃度の環境DNAが検出されるものと予測した。事実、以前に、河川において魚の産卵日や卵の採集地点で局所的に大量の環境DNAが検出できたという研究が報告されている (Bylemans et al., 2017; Sakata et al., 2017; Doi et al., 2017)。また、ニホンウナギは新月4-2日前の夜に産卵し、その産卵ピークは新月3日前であると推測されている (Tsukamoto et al., 2011; T. Higuchi, unpublished data)。産卵が起きた証拠となる卵や産卵行動の映像は見つかっていないが、高濃度の環境DNA検出から、新月3日前の夜、ステーション3の近傍で産卵イベントが起きたものと推測した。

高濃度の環境DNAは、朝7:54の水深400mで検出された (Fig. 4-5, Table 4-2)。先行研究にて、ニホンウナギにポップアップタグを装着しその産卵回遊経路を調べた結果、親ウナギは昼に水深約800mを、夜に水深約200mを遊泳するという日周鉛直移動を毎日繰り返していることが分かった (Manabe et al., 2011; Higuchi et al., 2018)。これらの研究によると、高濃度の環境DNAが検出された朝8:00ごろ、親ウナギは日の光を避けて800mほどの深い水深に潜り終えたと推測された。朝8:00より前に、親ウナギは水深約400mを遊泳し通過したものと思われた。したがって、高濃度の環境DNAは、産卵直後の親ウナギが明け方深い水深へ潜る途中に放出したものであると考えられた。

産卵場には卵、プレレプトセファルス、レプトセファルス、親ウナギが分布している。第3章第3節のニホンウナギの各発育段階の環境DNA放出量を調べた室内実験では、卵を収容した水槽水から環境DNAを検出できなかった (Fig. 3-4, Table 3-2)。プレレプトセファルスやレプトセファルスの環境DNA放出量は、親ウナギに比べて、約70倍以上も低濃度であった (Table 3-2)。また、プレレプトセファルスは、これまで新月1日前から4日後にかけて、水深163と188mで大量に採集されているため (Tsukamoto et al., 2011)、少なくとも200m以浅の水深に分布していると考えられた。2015年のなつしま航海や2017年のよこすか航海において、環境DNAは水深250、400、600mから検出された。プレレプトセファルスは水深250-600mの水深に存在しないと考えられるため、航海にて検出された環境DNAはプレレプトセファルス由来である可能性は低い。また、レプトセファルスは、前の月に孵化して成長した個体が産卵場付近に存在し得るが、これらは北赤道海流によって産卵場から西方向へ輸送される (Tsukamoto 2009; Shinoda et al., 2011)。2回の航海中、産卵場に設定した環境DNA調査点に、レプトセファルスが分布する可能性は低い。以上より、仔魚の環境DNA放出量の希薄さと分布する水深、環境DNAが検出された日と水深の情報を総合すると、2回の調査航海にて検出された環境DNAは、親ウナギに由来する可能性が最も高いと考えられる。

産卵場調査航海における環境DNAの分布から、少なくともニホンウナギは新月6日前に産卵場に集合しており、新月3日前の深夜に産卵行動をし、その後、産卵場付近を日周鉛直移動するものと考えられた (Fig. 4-5)。

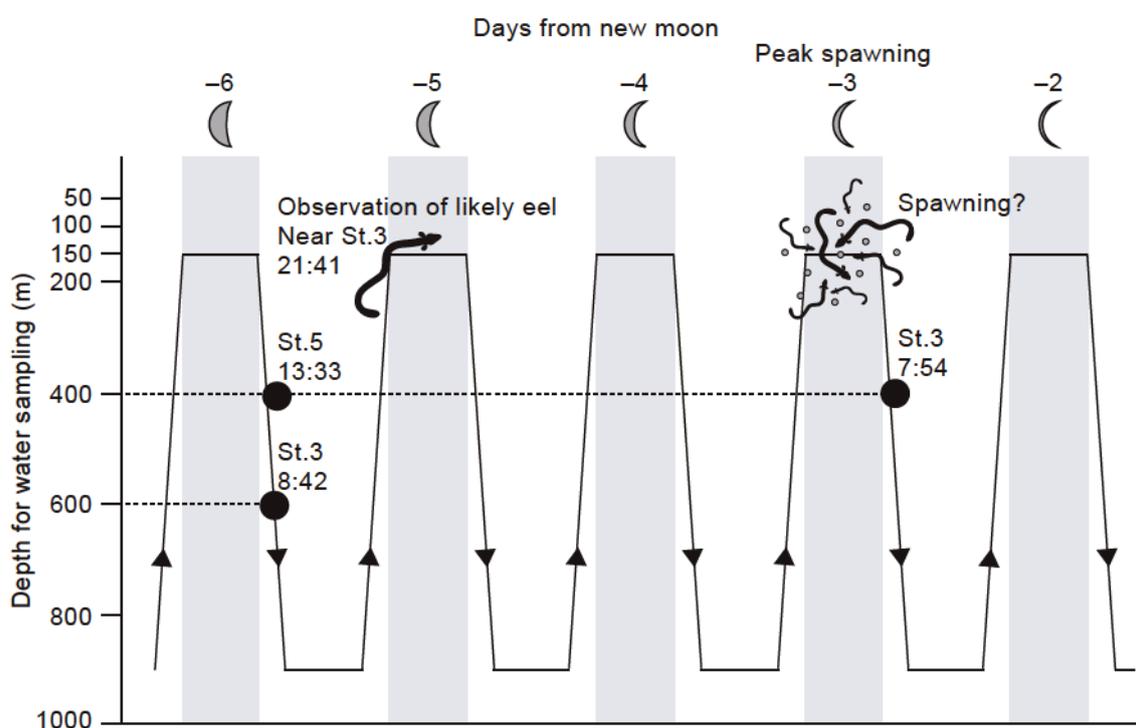


Fig. 4-5 Interpretation of spawning events and behavior of the Japanese eel according to the eDNA detection (●). Gray zones show night times.

## 4.4.2. ニホンウナギ産卵イベント探索への環境DNA法の有用性

外洋において、親ウナギとその産卵イベントに由来すると思われる環境DNAが検出できたことから (Table 4-1, Table 4-2)、環境DNA法は、ウナギ産卵イベントの探索に役立つ手法であると結論した。

船上にて環境DNA法を実施可能にしたことにより、調査航海中にニホンウナギがどこに分布し、どこで産卵が起こるのか予測できるようになったと考えられる。ニホンウナギは新月4-2日前 (Tsukamoto et al., 2011; T. Higuchi unpublished data) に産卵する可能性が高い。新月4日前や3日前に高濃度の環境DNA検出から、親ウナギが産卵したと思われる地点を特定する。親ウナギは翌日、同じ地点で産卵を行うと予想されるため、産卵行動の予測が可能になると推測される。また、これまで大型のネットを用いて仔魚や卵 (Schmidt, 1935; Tsukamoto et al., 2011; Shinoda et al., 2011)、親ウナギ (Chow et al., 2009; Kurogi et al., 2011; Tsukamoto et al., 2011) を採集してきたが、ネットは数十分間から数時間にわたり異なる水深を曳網されるため、ウナギ個体が採集された正確な水深や地点を知ることは不可能であった。反対に、環境DNA検出は生物の分布を概ね反映するため (Ficetola et al., 2008)、環境DNA法では採水によりニホンウナギが存在する、もしくは存在していた地点と水深を把握できる。これにより、環境DNA検出を指標として、ニホンウナギが分布すると思われる地点と水深に水中カメラシステムを設置できるようになった。このことから、環境DNA法は、ニホンウナギの産卵行動を観察する機会を高めるものと考えられた。

第3章の第4節から、産卵行動が起きることにより、大量の環境DNAが水中に放出されることが明らかとなった。ニホンウナギの産卵行動の前と後で、環境DNA量が桁違いに変化した。環境DNAの単一種検出法は、定量PCRを用いて、産卵イベントによって生じる環境DNA量の差を捉えることが可能である (Bylemans et al., 2017; Takeuchi et al., 2019c)。これが、環境DNA法が産卵イベントの探索に役立つ理由である。今までは天然の卵やプレレプトセファルスが採集されないかぎり、産卵行動が起きたという証拠は得られなかった。一方で、高濃度の環境DNA検出を得ることによって、産卵イベントが起きた地点を従来よりもピンポイントで絞り込むことができるようになった。また、ニホンウナギは、新月数日前から徐々に産卵地点に集まりはじめ、この地点周辺の水塊にいる親ウナギの数は増加していくものと予想される。複数尾が存在する地点では、高い濃度を持った環境DNAが局所的に検出されるため (Takahara et al., 2012)、環境DNA法は産卵行動が起こる地点を予め検知できる可能性を有している。

## 4.4.3. 外洋における魚類の環境DNAの検出

環境DNA法は、アクセスしやすい河川、池、湖などによく適用されている。対して、外洋と沿岸域でも、海水中の様々な生物に由来する環境DNAを利用した研究が報告されるようになってきた (Hansen et al., 2018)。先駆的な研究は、Thomsen et al. (2012b)のPCRを用いた海水魚の多様性調査である。続いて、環境DNAメタバーコーディング法を用いて、アメリカのピュージェット湾 (Kelly et al., 2017) やハドソン川 (Stoeckle et al., 2017) でも海水魚の魚類相が調査された。また、潮汐は環

境DNA検出に影響があまりないこと (Kelly et al., 2018) や、環境DNA検出から推定した生物相は約75mの範囲内にあるものを反映していた (Port et al., 2016; O'Donnell et al., 2017) ということも報告されている。対して、単一種検出法では、舞鶴湾にてマアジ *Trachurus japonicus* の環境DNA検出と生物量を調べた研究が報告されている (Yamamoto et al., 2016)。

しかし、上述した研究は、沿岸域にて海水を採水している。本研究は、外洋において魚類の産卵場調査に環境DNA法を導入した初の研究であった。外洋における環境DNAの研究事例が少ないのは、大型の研究船が必要だからである。現在、外洋において環境DNA法を実施した研究は、ニホンウナギの産卵地点を探索した本研究 (Takeuchi et al., 2019a) と、6種の魚類の環境DNA量と漁獲量の関係を調べた研究 (Knudsen et al., 2019) のみであろう。これらの研究により、生物密度が低い外洋でも魚類の環境DNAが検出できることが明らかになった。

外洋における環境DNA調査において海流による環境DNAの輸送距離が問題視される (Thomsen et al., 2012b) が、海水中の環境DNAには分解が優位に作用すると考えている。水流が環境DNAの輸送距離に及ぼす影響は、淡水 (Deiner & Altematt, 2014; Jane et al., 2015; Jerde et al., 2016) と海水 (Thomsen et al., 2012b; Port et al., 2016; O'Donnell et al., 2017) 両方において大きな課題とされている。淡水では、環境DNAの放出源から最低約200m (Jerde et al., 2016)、最大約12km (Deiner & Altematt, 2014) 離れた地点において環境DNAが検出された。外洋では海流があるため、海水中の環境DNAが長距離輸送されることは容易に想像できる。しかし、海水中の環境DNAは、淡水に比べて分解が早い (Sassoubre et al., 2016)、数百m以内にいる生物の環境DNAを検出しているのではないかと考えられるようになった (Thomsen et al., 2012b; Yamamoto et al., 2016)。事実、Foote et al. (2012) は、海水の沿岸域にて、ネズミイルカ *Phocoena phocoena* をケージに収容し、ケージから10m以内でないと、その環境DNAが検出できなかったことを報告している。類似研究として、マアジを用いた Murakami et al. (2019) では、マアジを収容したケージから10、30、100、300、600、1000mと離れた地点で採水をした結果、本種の環境DNAの検出率は30m以内で80%であったのに対し、100mを超えるとほぼ0%であったことを明らかにした。これらの結果から、外洋において魚類から放出された環境DNAの検出率は、放出源から離れるとともに、急激に減少するのではないかと推測された (Thomsen et al., 2012b)。このことから、外洋における環境DNA検出は、数百m以内にいる、もしくはいた魚の存在を反映しているものと予想された。

## 第5章 総合考察

## 第1節 環境DNA検出とウナギの産卵生態

環境DNAメタバーコーディング法(Miya et al., 2015; Thomsen et al., 2016; Port et al., 2016; Yamamoto et al., 2017; Kelly et al., 2018)と単一種検出法(Takeuchi et al., 2019a; Knudsen et al., 2019)は、海水中の環境DNAを十分に検出できる能力を持つ。環境DNA法は、DNAを増やすPCRを約50サイクル数以上で行うため、外洋の極めて希薄な環境DNAも問題なく検出可能であると思われた。第2章の第2節では、ウナギ属魚類全種を識別できるMiEelプライマーを開発して、本属魚類の環境DNAメタバーコーディング法を可能にした。さらに、第2章の第3節ではニホンウナギの環境DNAを特異的に検出する単一種検出法を検討した。これらの環境DNA法を用いて、外洋においてウナギ属魚類の環境DNAを検出することにより、本属魚類の産卵生態のさらなる理解が進むものと期待される。

ニホンウナギの産卵イベントは、産卵集団の形成、産卵行動、集団崩壊、親ウナギの離散から成ると仮定した(Fig. 1-1)。産卵イベントに由来する環境DNAは、周囲の水塊と比べて、相対的に高濃度になると予想されるため、環境DNAの単一種検出法は、上記の4つの状態全てを検出できる可能性をもっている。親ウナギが産卵すると思われる新月数日前(Tsukamoto et al., 2011; Aoyama et al., 2014)、産卵場において複数尾の親ウナギが産卵集団を徐々に形成すると考えられている(Dou et al., 2007, 2008; Tsukamoto et al., 2011)。また、環境DNA量と尾数には正の相関関係が確認されている(Takahara et al., 2012; Thomsen et al., 2012a; Pilliod et al., 2013)。よって、産卵地点周辺には、複数尾の親ウナギに由来する高濃度の環境DNAが漂っている可能性がある。また、第3章にて尾数が増える、発育段階が進む、産卵行動が起きることにより環境DNA放出量が急増すること、また環境DNAは1日で急激に分解されることを明らかにした。このことから、外洋にてニホンウナギの産卵行動が起きた場合、当日か翌日であれば、かなり高濃度の環境DNAを検出できると予測した。産卵後には、大量の環境DNAが水中に放出され、また、雄は精子を放出しながら遊泳していると考えられ、高濃度の環境DNAの検出源になると考えられる。ただし、検出された高濃度の環境DNAが、産卵集団の形成、産卵行動、産卵集団の崩壊、親ウナギの離散、どの状態に由来するものなのかを特定することは難しい。環境DNA検出のみだけでなく、環境DNAが検出された日時、親ウナギの遊泳水深データ、仔魚の分布などを総合的に用いて、高濃度の環境DNA検出を解釈する必要がある。

第4章の第3節では、本種の産卵ピークである新月3日目の翌朝8:00頃、産卵イベントに由来すると思われる高濃度の環境DNAを検出できた。ポップアップタグに由来する親ウナギの遊泳水深データ(Manabe et al., 2011; Higuchi et al., 2018)を考慮すると、本研究では、産卵集団から離散した産卵直後の親ウナギに由来する高濃度の環境DNAを検出したと考えられた(Fig. 5-1)。これにより、内部潮汐エネルギーの最も高い地点であるステーション3の近傍で産卵行動が起きたと推測され、広範囲に及ぶ産卵場をピンポイントの産卵地点に絞り込むことに成功した。環境DNA法を調

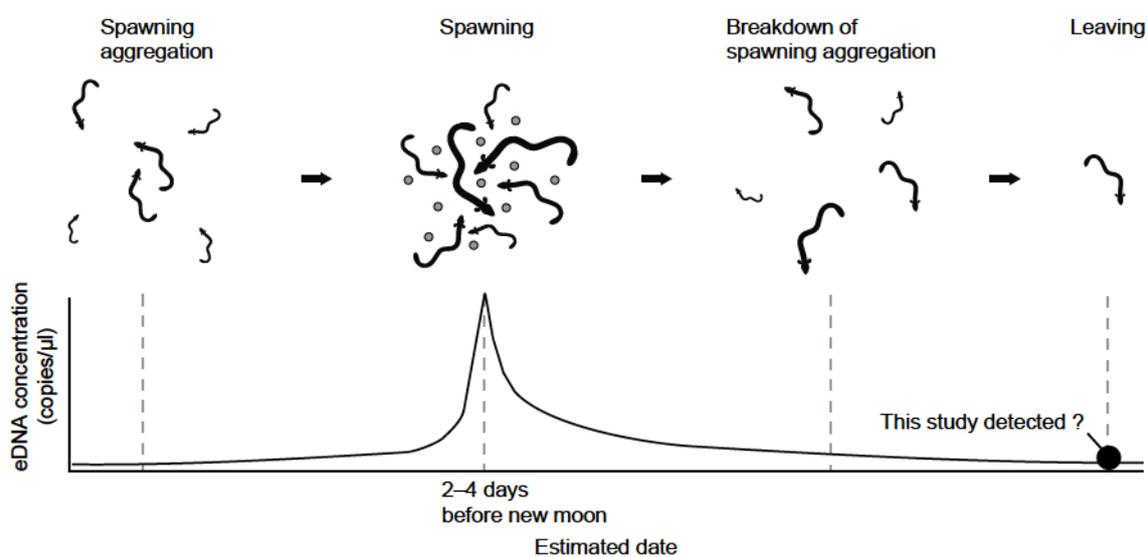


Fig. 5-1 Expected change of eDNA concentration during spawning events of the Japanese eel.

査航海に適用したことにより、撮影目標である産卵行動に近づいたと考えられる。

産卵行動直後の高濃度の環境 DNA 検出に失敗した原因は、産卵行動直後に採水を実施していないからであると考えられる。親ウナギの産卵時刻は、新月 3 日前の夜 21 時前後であると推定されている (樋口, 2019)。第 3 章の第 4 節で産卵行動が起こることにより桁違いの環境 DNA が検出できたため (Fig. 3-8)、環境 DNA 量は産卵行動直後にピークを示すと予想された (Fig. 5-1)。野外調査において、第 4 章の第 3 節のように親ウナギが産卵していると思われる内部潮汐エネルギーの高い地点にて (樋口, 2019)、夜 21 時以降に継時的に採水ができれば、産卵行動に由来するさらに高濃度の環境 DNA を検出できると考えられた。

ニホンウナギの環境 DNA を検出することにより、その分布状況を明らかにできる。また、環境 DNA 濃度と生物の尾数、生物量および密度の間に正の相関関係が確認されている (Takahara et al., 2012; Thomsen et al., 2012a; Pilliod et al., 2013; Jane et al., 2015)。よって、単一種検出法を用いて、複数尾のニホンウナギがいる地点から、相対的に高濃度の環境 DNA が検出されると推測される。このことから、まず単一種検出法は、河口域においてニホンウナギが産卵回遊を開始するタイミングの推定に使えようと考えられる。ニホンウナギは、秋から冬にかけて川を下り、産卵回遊の準備をする (Okamura et al., 2002; Tsukamoto, 2009)。この時、大量の銀ウナギが河口域に集中するため、河口で検出される環境 DNA 量は一時的なピークを示すものと予想される。その後、銀ウナギが海へ旅立っていくと、河口にいる個体数が減少し、河口から検出される環境 DNA 量は徐々に減少していくだろう。事実、タイヘイヨウサケ属 *Oncorhynchus* の親魚が河川へ遡上する、および稚魚が降河するタイミングを環境 DNA 検出から推定できたという報告例がある (Levi et al., 2019)。環境 DNA 法は、ウナギが産卵回遊を開始する時期の推定にも役立つ可能性がある。

環境 DNA 法を用いることにより、レプトセファルスへのサンプリング効率を改良できる可能性がある。これまで、ウナギ属魚類のレプトセファルスの分布を調べるには、それらをネットサンプリングで採集する方法しかなかった。対して、環境 DNA 法では、その検出から、仔魚がいる、もしくはいた地点を推測できる。第 3 章の第 3 節の結果から、レプトセファルス、プレレプトセファルスも微量ながら環境 DNA を水中に放出していることが分かった。産卵場から離れるほど、水中の仔魚が分散するため環境 DNA 検出は難しくなると想定されるが、外洋における産卵場付近であれば、それらの環境 DNA を検出可能であると推測する。環境 DNA 法とネットサンプリングを併用することで、効率的な仔稚魚の分布調査が可能になるものと考えられた。

小型のデータロガーは、親ウナギの産卵回遊経路を調べるためによく使われる。親ウナギに装着したロガーは、設定した日時が来ると魚体から切り離され、浮上し、衛星を介して、彼らが遊泳した水深や水温を提供する。ポップアップタグを用いた研究は、ニホンウナギ (Manabe et al., 2011; Higuchi et al., 2018)、ヨーロッパウナギ *A. anguilla* (Aarestrup et al., 2009; Righton et al., 2016)、オオウナギ (Schabetsberger et al., 2013)、ニュージーランドオオウナギ *A. dieffenbachii* (Jellyman & Tsukamoto, 2005; Watanabe et al., 2019)、ポリネシアロングフィンウナギ *A. megastoma* (Schabetsberger et al., 2013)、ポリネシアショートフィンウナギ *A. obscura* (Schabetsberger et al., 2013) で行われた。しかし、小型

のポップアップタグはウナギを放流後すぐに浮上してしまう場合がある。親ウナギがマグロやカジキなどに捕食されてしまう事例もある (Manabe et al., 2011)。そのため、親ウナギの遊泳水深や水温のデータが常に取得できるわけではない。こうした場合、MiEel プライマーを使った環境 DNA メタバーコーディング法を併用すれば、ウナギ属魚類の環境 DNA の分布を推定できる。親ウナギの詳細な遊泳水深や水温は不明であるものの、環境 DNA の分布は、おおまかにウナギ属魚類の存在を反映すると考えられる。外洋で網羅的な採水を実施し、ウナギ属魚類の環境 DNA を検出することによって、本属魚類の産卵回遊経路をより簡便に調べ、ウナギの産卵回遊経路の推定に役立つ補足的な情報を得られる可能性がある。

同じく、環境 DNA メタバーコーディング法は、ウナギ属魚類の産卵場推定にも役立つ手法であると考えられる。ウナギ属魚類は熱帯の深海魚起源であるが (Inoue et al., 2010)、熱帯に生息する大半のウナギ属魚類の産卵場は未発見である (Kuroki et al., 2014)。そこで、これら熱帯ウナギの仔魚が採集されている海域内にて、なるべく多地点で環境 DNA 用の採水を実施する。海水サンプルを分析して、ウナギ属魚類の環境 DNA 検出の有無をマップ上に記す。環境 DNA 検出からウナギ属魚類の分布状況を推定でき、仔魚が採集されずとも、産卵場の特定につながる可能性がある。産卵場が推定できたら、そこでネットサンプリングを行って、小型のレプトセファルス、プレレプトセファルス、卵の採集を試みる。熱帯に生息するウナギ属魚類の産卵場が特定されれば、本属魚類の産卵回遊の進化にまで研究を展開できるものと考えている。

## 第2節 環境 DNA 法の有用性と限界

本研究では、外洋における魚類の産卵イベント探索への環境 DNA 法の有用性を、室内実験と実際の野外調査の結果から初めて実証した。これは、産卵イベントにより生じる環境 DNA 量の変化を環境 DNA 法が検知可能であるからであった。高濃度の環境 DNA 検出から、ピンポイントに産卵地点を絞り込むことができた。しかし、産卵行動は観察されなかったため、高濃度の環境 DNA が検出された地点で産卵行動が起きたと断定することはできなかった。環境 DNA 調査を実施するとともに、産卵行動の観察、卵やプレレプトセファルスの採集を行い、産卵行動の確実な証拠を提示すべきであると考えられた。

環境 DNA 法は、生物の分布調査のために有用な手法であり、従来の調査方法、例えば電気ショックャーや網を用いた調査よりも高い、または同等の検出力を持っている (Thomsen et al., 2012b; Shaw et al., 2016)。信頼性の高い環境 DNA 法を確立できれば、高い検出率を持った分布調査ができるようになる。環境 DNA 法は、サンプリング地点にいる“生物リスト”を作るのに最も適した手法になりつつあると考えている。

本研究では主に水中の環境 DNA を扱ってきたが、環境 DNA は堆積物からも検出可能である。コクレンの環境 DNA は、1 ml の湖沼の表層水と比べて、1 g の堆積物中に約 8–1800 倍も高濃度に存在していた (Turner et al., 2015)。これは、環境 DNA を含む凝集体が沈降しているか、土壌中の環境 DNA の分解が遅いためであると考えられた。しかし、堆積物から魚類の環境 DNA を検出

した研究は数が少なく、知見が不足している。今後、土壌サンプルの採取計画が整備されることによって、堆積物を用いた環境 DNA 研究も事例が増加していくだろう。

環境 DNA 法において、最も期待されているのは資源量推定である。これが可能になることにより、水中にいる生物の大まかな尾数が把握できるようになる。魚類の場合は、水中にいる尾数が採水だけで把握できれば、漁獲可能量の設定に資する情報が得られる。すでに実験室内 (Takahara et al., 2012; Thomsen et al., 2012a; Klymus et al., 2015) と野外 (Pilliod et al., 2013) において、生物の数と環境 DNA 量に正の相関関係が確認された。しかし、この関係は、野外調査にて不明瞭であることが報告された (Spear et al., 2015)。目的種が複数いる地点や好んで使用する場所では、検出される環境 DNA 量が増えるといった傾向が確かに認められる。しかし、野外では、環境 DNA 検出に影響を及ぼす要因を十分に考慮したうえで採水を実施しないと、生物の在不在しか推定できない。環境 DNA の放出と分解、輸送距離が完全に解明されない限り、より具体的な数値で生物の数を推定することは不可能であると考えている。

環境 DNA は遺伝的多様性解析にも使われ始めた。遺伝的多様性は、集団内でどれくらい遺伝子型に変異があるかを示す指標である。種内で遺伝的多様性が高いと、環境が変化した場合に、その変化に適応して生存するための遺伝子が種内にある確率が高くなる。反対に、遺伝的多様性が低いと、環境の変化に適応できず、種は絶滅する恐れがある (フランカムら., 2017)。しかし、遺伝的多様性は、目視調査で調べることはできない。そこで、水中を漂う DNA を網羅的に読む環境 DNA メタバーコーディング法が使用されるようになった。ジンベエザメ (Sigsgaard et al., 2017)、ネズミイルカ (Parsons et al., 2018)、アユ (Tsuji et al., 2019) などで、種内の遺伝的多様性を調べるための環境 DNA 研究が展開されている。水中の DNA を利用して遺伝的多様性が把握できれば、種の保全に有益な情報を提供すると期待される。

環境 DNA 法は、研究のベースとなる分布情報を提供し、生態学や保全学など様々な研究分野、多様な生物種への展開が期待される。しかし、現在のところ、本法では調査不可能である限界も数多く存在する。まず、環境 DNA 法を使った場合に、その发育段階や性別などの形態情報は決して得られない点である (Goldberg et al., 2016)。これは、生物自体を捕獲しないために起こる問題で、非侵襲的な調査が可能であるのに対して、環境 DNA 法の大きな弱点でもある。

配偶子由来と体細胞由来の環境 DNA を判別できない点も問題である。1 細胞あたりに存在するミトコンドリア DNA は豊富なため、環境 DNA 研究はミトゲノム領域にプライマーを設計することが多い (Rees et al., 2014)。しかし、上記のプライマーは、配偶子由来と体細胞由来の環境 DNA どちらも検出してしまう。つまり、高濃度の環境 DNA が検出された場合、産卵行動に由来するものなのか、ただ集団を作っているだけなのか、判断することは困難であると考えられる。また、ミトゲノム領域に設計したプライマーを用いた場合、ハイブリッドの区別も不可能となる (Fukumoto et al., 2015)。ミトコンドリアは母系遺伝であるため、母親が目的種と同種の場合はハイブリッド種も検出されてしまうと予想される。

環境 DNA から生物の生死を判断できないことも欠点である。Merkes et al. (2014)は、魚類の死体

や捕食者の糞から、目的種の環境 DNA が検出されることを示した。Yamamoto et al. (2016)では、漁港付近で高濃度の環境 DNA が検出され、漁獲された魚に由来する環境 DNA を検出してしまった。つまり、生物の生死に関わらず、生物が存在すれば、環境 DNA は検出されてしまうため、注意深い解釈が必要である。

しかし、環境 DNA 検出結果の解釈は、所詮推測の域を過ぎないという指摘がある (Goldberg et al., 2016)。環境 DNA 自体の放出、状態、分解、輸送について不十分な知見しかないからである。環境 DNA 法は様々な分野への展開が期待できるが、本法は単独で使うというよりも、従来の調査方法と相補的に使用することによって、その有用性を最大限に引き出せると考えている。

### 第3節 水産学的意義

本研究にて、環境 DNA 法は、ウナギ産卵イベントの探索に有用であると考えられた。環境 DNA 法を導入した 2017 年の調査航海では、ニホンウナギの産卵イベントに由来すると思われる高濃度の環境 DNA 検出と、その検出点の近くでウナギらしき魚影の撮影に成功した。環境 DNA 法を調査航海に導入したことにより、ニホンウナギ産卵行動観察の達成に確実に近づいたと考えている。環境 DNA 法を用いて産卵行動を観察できたら、ニホンウナギの産卵生態の全貌が解明される。これにより、これまで全く不明であった産卵集団サイズや性比など、資源管理に役立つ情報が得られる。将来的に魚群探知機を用いてウナギ産卵集団規模を推定し、さらに性比と 1 尾の雌の産卵数の知見が合わされば、1 回の産卵量が把握できるようになる可能性が考えられる。したがって、産卵行動の観察は、ウナギの資源管理に関する研究に資すると期待される。

ウナギ産卵行動の観察は、人工シラスウナギの大量生産の実用化を促進させると考えられる。すでにニホンウナギでは、卵から親魚まで人工的に成長させることが可能で、研究室内レベルで完全養殖技術が確立されている (Tanaka et al., 2003; Okamura et al., 2014)。しかし、これらの研究は、これまで正常なウナギの生殖に関する知見が存在しないまま手探り状態で進んできた。卵質、仔魚の餌、飼育法に問題があり、低コストで種苗となるシラスウナギを大量生産できないため、完全養殖は実用化されていない。産卵行動の観察から餌や飼育法の改善に役立つ情報を得るのは困難であるが、卵質の改善への一助になると考えられる。近年、最終成熟・排卵誘起のためのホルモン投与を行なった雌雄の親魚を同水槽に収容して、自然に産卵させる誘発産卵法が行われている (Okamura et al., 2014; 田中, 2019)。しかし、誘発産卵法により生じる産卵行動は、外洋の産卵行動と異なると推定されるため、天然と比べて卵質は悪く、仔魚の生残率が減少すると考えられる。近年、ニホンウナギの卵 (Tsukamoto et al., 2011) や親ウナギ (Chow et al., 2009; Kurogi et al., 2011) が発見され、本種の産卵生態に関する知見は飛躍的に増加したが、繁殖特性や海洋環境に関する詳細なデータをより集積することが必要である。これらの情報から、誘発産卵法をより天然の状態に近づけて実施することにより、完全養殖技術で 1 つの問題となっている卵質の改善に役立つと期待できる。

本研究では、環境 DNA 法を用いて、ウナギ属魚類の非侵襲的な分布調査を可能にした。世界的に資源が激減している本属魚類にとって、成育場がある河川と産卵場がある海において、その正確

な分布状況を把握することは重要である。特に河川では、ウナギの加入量が多い河川環境を特定し、その河川に侵入したシラスウナギと産卵回遊する銀ウナギに漁獲規制をかけることによって、その効力の向上が期待できる。過剰漁獲を避けて、産卵に貢献する親魚を出来る限り外洋の産卵場まで戻すことが重要である。シラスウナギの加入する河川や量は年によって変動すると予測されるが、加入量の多い河川は、環境 DNA 法を用いた定期的なモニタリングで特定できる可能性が示唆されている (Itakura et al., 2019)。

#### 第4節 今後の課題

本研究では、ニホンウナギの産卵イベント由来の環境 DNA を検出するため、尾数、発育段階、産卵行動に着目して環境 DNA 放出量を調べた。また、水温に着目して環境 DNA の分解過程の違いを明らかにした。しかし、環境 DNA 法を野外に適用した研究に比べて、環境 DNA 自体の放出、放出後の状態と輸送、そして分解についての研究は圧倒的に少ない (Barnes & Turner, 2016)。例えば、本研究では、環境 DNA 放出量とウナギの体表面積、活動度、密度、酸素消費量などについて、今後さらなる基礎実験が必要であると考えられた。また、塩分の違いが環境 DNA の分解に及ぼす影響も調べる必要があるだろう。環境 DNA 自体について基礎実験が進み、環境 DNA 検出をもとに、生物のいる、もしくはいた地点や時刻、その行動をより高い精度で推定可能になるものと期待する。

今後は、核環境 DNA の研究にも取り組むべきである。尾数が増える、産卵行動が起こると環境 DNA 放出量が増えることが分かった。しかし、実際の産卵行動が撮影されていないため、高濃度の環境 DNA 検出点に、複数尾のウナギがただ存在していただけなのか、それとも、ウナギの産卵行動が起きたのか、両者を区別することは不可能である。この問題は、水試料中の核環境 DNA 量とミトコンドリア環境 DNA 量の割合を調べることにより解決できる可能性がある (Bylemans et al., 2017)。産卵行動が起こることにより放出される大量の環境 DNA は、主にウナギの精子に由来する (Takeuchi et al., 2019c)。体細胞はミトコンドリアを数百から数千個持っているのに対し、精子のもつミトコンドリアは数個から数十個と少ない (Lahnsteiner, 2003; Okamura et al., 2000)。よって、産卵行動後、大量の精子が水中に放出されることにより、水試料中のミトコンドリア DNA に対する核 DNA の割合が増加すると予測される。この増加を単一種検出法で検出できれば、産卵行動が起きたと断定できるようになると考えられた。本研究ではミトコンドリア環境 DNA しか扱わなかったが、核環境 DNA の定量も必要である。

## 要旨

## 1. 緒言

降河回遊魚のウナギ属魚類はその 19 種亜種全てが外洋で産卵すると考えられている。このうちニホンウナギでは、すでに産卵場の決定的な証拠となる卵や親魚が発見されているが、その他の種では一切見つかっていない。しかし、研究の進んだニホンウナギでさえ、実際の産卵行動は未だ観察されたことはない。そこで、本研究では、水を取るだけで生物の存在を調査できる環境 DNA 法を、ウナギ産卵イベントの探索に適用することにした。目的は、環境 DNA 法がウナギ産卵イベントの探索に有用か否かを検討し、本法を用いてニホンウナギの産卵地点を発見することにある。

## 2. ウナギ環境 DNA 法の検討

ウナギ属魚類の環境 DNA を正確に検出するため、ウナギ属全種を一挙に検出できる次世代シーケンサー用プライマーを開発した。ミトコンドリア DNA 内にある ATP6 領域に新プライマー“MiEel”を設計した。MiEel を用いた PCR ではウナギ属全種の DNA を増幅できた。その増幅領域には、亜種を除き 5~22 塩基の種間差がみられた。これより、MiEel は本属魚類を種レベルで識別可能であると判断した。実際に MiEel を用いて、2~16 種のウナギ属魚類の DNA を混合して調製した計 6 つの試験用サンプルを分析したところ、全 16 種を正確に検出することができた。本研究で開発した MiEel は、世界的に資源減少が問題となっているウナギ属魚類の非侵襲的調査を可能にし、その生態研究や保全・管理に役立つものと期待される。

次に、外洋調査を想定してニホンウナギの微量な環境 DNA を特異的に検出するための定量 PCR 法を検討した。まず既報のリアルタイム PCR 用プライマーを使って、ニホンウナギ 1 尾（全長 70 cm）を収容した水槽（100 L）の水 500 ml から抽出した DNA 溶液を 1000 倍に希釈して分析した結果、平均 0.53 copies/ $\mu$ l と微量な環境 DNA が検出された。この PCR 産物を大腸菌 CJ236 でクローニングした結果、ニホンウナギと 100% の類似性を示す配列が得られた。これより、リアルタイム PCR で陽性反応を示したが頻用の精製法ではシーケンシングできない希薄環境 DNA からも、塩基配列を得てニホンウナギと確認することができるようになった。つまり、海水中の希薄なウナギ DNA も検出可能な“ウナギ環境 DNA 法”を確立できた。

## 3. 環境 DNA の放出と分解

野外調査で得られる環境 DNA データを正しく解釈するため、ニホンウナギの卵、仔魚、稚魚、親魚を用いて室内実験を行なった。環境 DNA の放出量に関する 3 つの室内実験の結果、(a) 産卵行動が起こったり、(b) 発育段階が進んだり、(c) 尾数が増えたりすることにより、環境 DNA 放出量が急増することが明らかになった（図 1）。

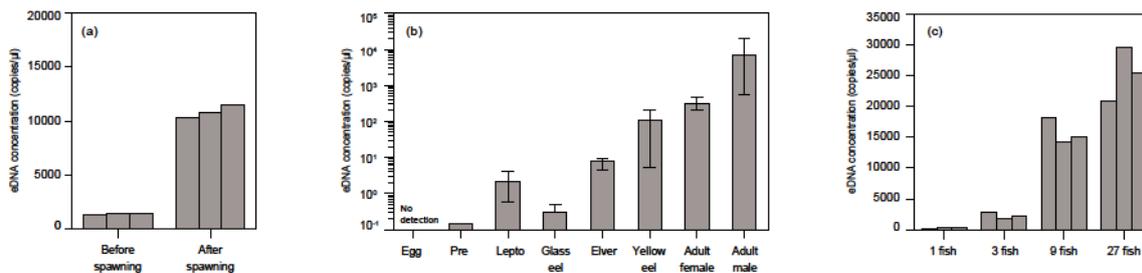


図1. (a)産卵前後と環境DNA放出量の関係、(b)各発育段階における環境DNA放出量、(c)尾数と環境DNA放出量の関

次に、環境DNAの分解過程を明らかにするため、5°Cと25°Cの室温で水サンプルをそれぞれ保存し、7日間にわたって環境DNAの消長を観察した。その結果、いずれの温度でも環境DNAは1日間の内に急激に分解されることが分かった。また、7日後、5°Cでは平均59.1 copies/μlの環境DNAが検出されたのに対し、25°Cでは非検出または、0.26と3.6 copies/μlの微量環境DNAのみ検出されたことから、高水温中の環境DNAは分解が早いものと推測された。以上より、外洋で産卵行動が起きた場合、産卵当日と翌日であれば、かなり高濃度の環境DNAが検出されるものと予想された。

#### 4. ニホンウナギ産卵場における環境DNAの検出

ニホンウナギの産卵イベントを見つけるため、2015年のなつしま航海 (NT15-08) と2017年のよこすか航海 (YK17-10) に参加して、環境DNA調査を実施した。

なつしま航海では、天然卵や親ウナギの採集実績がある地点“カイヨウポイント”に計9測点を設けた。各測点で水深100、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000mの計11層から海水を2L採水し、リアルタイムPCRで分析したところ、3測点の水深250mと400mから微量な環境DNAが検出された。このことから本航海では、外洋におけるニホンウナギ環境DNAの初検出に成功し、また、本法の全過程、すなわち採水、濾過、環境DNA抽出、リアルタイムPCRが船上にて実施可能であることを確認した。よこすか航海では、塩分フロントと海底山脈の交点直南で内部潮汐エネルギーが高いパッチを探し、ここで産卵が起ると予想してパッチ内に計5測点を設けた (図2)。各測点で水深50、100、150、200、400、600、800、1000mの計8層から海水を10Lずつ採水した。海水を船上で分析した結果、新月6日前の朝8:42にSt.3の水深600mから、昼13:33にSt.5の400mから、それぞれ0.99と14.5 copies/μlの環境DNAが検出された (図2, 3)。同日の夜21:41には、St.3から北西方向に約3.22 km離れた地点で親ウナギと思われる映像も得られた。さらに、ニホンウナギの産卵ピークである新月3日前の翌朝7:54には、St.3の水深400mから3回の定量PCR分析で平均55.3 copies/μlと高濃度の環境DNAも検出された (図2, 3)。この高濃度の環境DNAは、産卵イベント直後の親ウナギが明け方に深所へ潜る途中に放出したものと考えられた。以上の結果を総合的に解釈すると、親ウナギは少なくとも新月6日前から産卵地点付近に集まり、新月3日前の深夜に内部潮汐エネルギーが最大の地点 (St.3) 付近で産卵したと推測された (図3)。

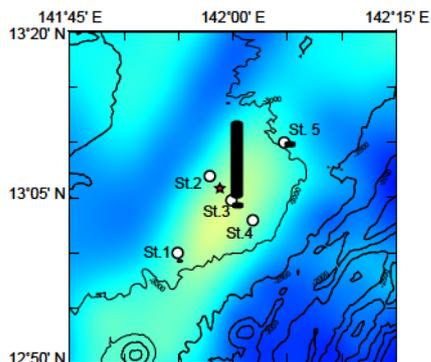


図2. よこすか航海における環境 DNA 採水点(○). 円柱は環境 DNA 検出点、高さはその濃度を示す. 星は親ウナギらしき映像が撮影された地点を示す.

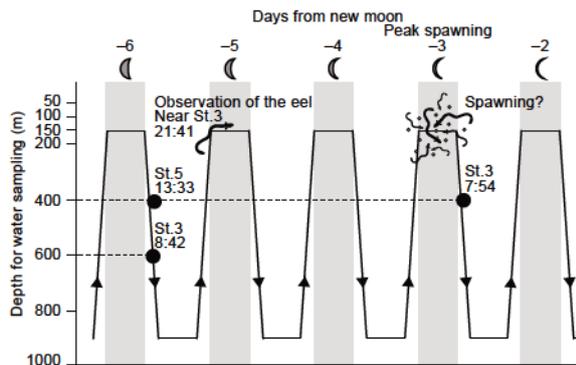


図3. 環境 DNA 検出から推定するニホンウナギの行動. 親ウナギは、昼に水深約 200 m、夜に約 800 m を泳ぐという日周鉛直移動をする. 灰色は夜の時間帯を表す.

## 5. 総合考察

本研究では、実際の調査航海でニホンウナギの産卵行動に由来すると思われる環境 DNA のシグナルを得ることができた。これによって環境 DNA 法を用いてニホンウナギの産卵イベントが探索できることを示せた。今後、この環境 DNA 法がニホンウナギの産卵行動の発見に繋がり、さらには他のウナギ属魚類の産卵場調査にも展開されていくことによって、ウナギ産卵生態の解明が大きく進むものと期待される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始温かいご指導ご鞭撻をいただき、研究の楽しさを教えてくださった東京大学農学生命科学研究科の塚本勝巳特任教授、ならびに日本大学生物資源科学研究科の小島隆人教授に深く感謝の意を表す。日本大学生物資源科学研究科の森司教授、鈴木美和教授、糸井史朗准教授には、温かく研究生活を見守っていただき、論文審査に際して多くの貴重なご指摘をいただいた。深くお礼申し上げます。

近畿大学の渡邊俊講師には、公私にわたりあらゆる局面において、数多くのご助言をいただいた。心よりお礼申し上げます。

千葉中央博物館の宮正樹博士、佐土哲也博士、後藤亮博士（現 千葉県教育庁教育振興部）、神戸大学大学院人間発達環境学研究科の源利文准教授、京都大学理学研究科の山本哲史助教には、環境 DNA 法に関する実験技術を懇切丁寧にご教示いただき、論文作成に関して有益なご助言をいただいた。心より感謝申し上げます。

東京大学農学生命科学研究科の Micheal J. Miller 博士には、論文執筆に際して、多くの貴重なご助言をいただいた。同研究科の萩原聖士博士には、学会発表や学位論文をまとめるにあたって、有益なご助言をいただいた。同研究科の金子豊二教授と黒木真理助教には、様々な局面においてご助言とご協力をいただいた。厚くお礼申し上げます。

株式会社いらご研究所の山田祥朗博士、岡村明浩博士、堀江則行博士、三河直美博士には、長期にわたる環境 DNA の基礎実験に多大なるご援助をいただき、論文作成について有益なご助言をいただいた。また、同研究所の高橋正志氏、久保田敦氏、岡山ひろみ氏ならびに研究所で勤務する皆様には、研究を進めるにあたってご理解とご協力をいただくとともに、温かい励ましの言葉をいただいた。厚く感謝申し上げます。

国立研究開発法人海洋研究開発機構の三輪哲也博士と福場辰洋博士には、2015 年のなつしま航海の成果を原著論文としてまとめる際に、貴重なご指摘をいただいた。厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、東京大学農学生命科学研究科の大矢真知子氏と日本大学生物資源科学部の山梨津乃氏（現 全国内水面漁業協同組合連合会）には、研究を円滑に進めるにあたってご理解とご協力をいただき、公私にわたって常に温かい励ましをいただいた。心よりお礼申し上げます。

本研究では、サンプルの採水と解析、論文作成に際して、非常にたくさんの方々のご援助、ご協力をいただいた。日本大学生物資源科学部ウナギ学研究室の卒業生である飯島卓也氏、覺前航氏、河邊真子氏には、室内実験の成功に大きく貢献していただいた。また、同研究室の大学院生、学部学生諸君にも多くの援助と貴重な示唆をいただいた。心より感謝申し上げます。

なお、本研究は、平成 28 年度に笹川科学研究助成金、平成 29 年および平成 30 年度に日本学術振興会特別研究員奨励費の援助を受けた。付記して謝意を表す。

最後に、大学院進学に理解を示し、終始支えてくれた家族に深く感謝する。

## 引用文献

- Aarestrup, K., Økland, F., Hansen, M. M., Righton, D., Gargan, P., Castonguay, M., ... McKinley, S. R. (2009). Oceanic spawning migration of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Science*, 325(5948), 1660.
- Amberg, J. J., McCalla, G. S., Monroe, E., Lance, R., Baerwaldt, K. & Gaikowski, P. M. (2015). Improving efficiency and reliability of environmental DNA analysis for silver carp. *Journal of Great Lakes Research*, 41(2), 367–373.
- Antognazza, M. C., Britton R. J., Potter, C., Franklin, E., Hardouin, A. E., Roberts, G. C., ... Andreou, D. (2019). Environmental DNA as a non-invasive sampling tool to detect the spawning distribution of European anadromous shads (*Alosa* spp.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(1), 148–152.
- Aoyama, J., Hissmann, K., Yoshinaga, T., Sasai, S., Uto, T. & Ueda, H. (1999a). Swimming depth of migrating silver eels *Anguilla japonica* released at seamounts of the West Mariana Ridge, their estimated spawning sites. *Marine Ecology Progress Series*, 186, 265–269.
- Aoyama, J., Mochioka, N., Otake, T., Ishikawa, S., Kawakami, Y., Castle, P., ... Tsukamoto, K. (1999b). Distribution and dispersal of anguillid leptocephali in the western Pacific Ocean revealed by molecular analysis. *Marine Ecology Progress Serie*, 188, 193–200.
- Aoyama, J., Wouthuyzen, S., Miller, J. M., Inagaki, T. & Tsukamoto, K. (2003). Short-distance spawning migration of tropical freshwater eels. *The Biological Bulletin*, 204(1), 104–108.
- Aoyama, J., Watanabe, S., Miller, J. M., Mochioka, N., Otake, T., Yoshinaga, T. & Tsukamoto, K. (2014). Spawning sites of the Japanese eel in relation to oceanographic structure and the West Marian Ridge. *PloS one*, 9(2), e88759.
- Aoyama, J., Wouthuyzen, S., Miller, J. M., Sugeha, Y. H., Kuroki, M., Watanabe, S., ... Tsukamoto, K. (2018). Reproductive ecology and biodiversity of freshwater eels around Sulawesi island Indonesia. *Zoological Studies*, 57(30), 1–11.
- Banks, C. J., Demetras, J. N., Hogg, D. I., Knox, A. M. & West, W. D. (2016). Monitoring brown trout (*Salmo trutta*) eradication in a wildlife sanctuary using environmental DNA. *New Zealand Natural Sciences*, 41, 1–13.
- Barnes, A. M. & Turner, R. C. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1–17.
- Barnes, A. M., Turner, R. C., Jerde, L. C., Renshaw, A. M., Chadderton, L. W. & Lodge, M. D. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1819–1827.
- Bergman, S. P., Schumer, G., Blankenship, S. & Campbell, E. (2016). Detection of adult green sturgeon using environmental DNA analysis. *PloS one*, 11(4), e0153500.

- Bishop, E. R. & Torres, J. J. (1999). Leptocephalus energetics: metabolism and excretion. *Journal of Experimental Biology*, 202(18), 2485–2493.
- Bracken, A. S. F., Rooney, M. S., Kelly-Quinn, M., King, J. J. & Carlsson, J. (2019). Identifying spawning sites and other critical habitat in lotic systems using eDNA “snapshots”: a case study using the sea lamprey *Petromyzon marinus* L. *Ecology and Evolution*, 9(1), 553–567.
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., ... Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of quantitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 115–126.
- Burgerhout, E., Tudorache, C., Brittijn, A. S., Palstra, P. A., Dirks, P. R. & Van den Thillart, M. J. E. E. G. (2013). Schooling reduces energy consumption in swimming male European eels, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 448, 66–71.
- Bustin, A. S., Benes, V., Garson, A. J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, T. C. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
- Bylemans, J., Furlan, M. E., Hardy, M. C., McGuffie, P., Lintemans, M. & Gleeson, D. (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.
- Bylemans, J., Furlan, M. E., Gleeson, M. D., Hardy, M. C. & Duncan, P. R. (2018). Does size matter? an experimental evaluation of the relative abundance and decay rates of aquatic environmental DNA. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6408–6416.
- Castle, P. H. J. & Williamson, G. R. (1974). On the validity of the freshwater eel species *Anguilla ancestralis* Ege from Celebes. *Copeia*, 2, 569–570.
- Chow, S., Kurogi, H., Mochioka, N., Kaji, S., Okazaki, M. & Tsukamoto, K. (2009). Discovery of mature freshwater eels in the open ocean. *Fisheries Science*, 75(1), 257–259.
- Clusa, L. & García-Vázquez, E. (2018). A simple, rapid method for detecting seven common invasive fish species in Europe from environmental DNA. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28: 619–629.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M. & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Research*, 14(6), 1188–1190.
- Davison, I. P., Créach, V., Liang, W. J., Andreou, D., Britton, R. J. & Dopp, H. G. (2016). Laboratory and field validation of a simple method for detecting four species of non-native freshwater fish using eDNA. *Journal of Fish Biology*, 89(3), 1782–1793.
- Deiner, K. & Altermatt, E. (2014). Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PloS one*, 9(2), e88786.

- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P. & Miaud, C. (2011). Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystem. *PloS one*, 6(8), e23398.
- Dekker, W. (2003). Worldwide decline of eel resources necessitates immediate action: Québec declaration of concern. *Fisheries*, 28(12), 28–30.
- Deutschmann, B., Müller, A., Hollert, H. & Brinkmann, M. (2019). Assessing the fate of brown trout (*Salmo trutta*) environmental DNA in a natural stream using a sensitive and specific dual-labelled probe. *Science of The Total Environment*, 655, 321–327.
- Doi, H., Inui, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T. & Minamoto, T. (2017). Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology*, 62(1), 30–39.
- Dou, Z. S., Yamada, Y., Okamura, A., Tanaka, S., Shinoda, A. & Tsukamoto, K. (2007). Observations on the spawning behavior of artificially matured Japanese eels *Anguilla japonica* in captivity. *Aquaculture*, 266(1–4), 117–129.
- Dou, Z. S., Yamada, Y., Okamura, A., Shinoda, A., Tanaka, S. & Tsukamoto, K. (2008). Temperature influence on the spawning performance of artificially-matured Japanese eel, *Anguilla japonica*, in captivity. *Environmental Biology of Fishes*, 82(2), 151–164.
- Edgar, C. R. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461.
- Ege, V. (1939). A revision of the genus *Anguilla* Shaw, a systematic phylogenetic and geographical study. *Dana Report*, 16, 1–256.
- Eichmiller, J. J., Bajer, G. P. & Sorensen, W. P. (2014). The relationship between the distribution of Common carp and their environmental DNA in a small lake. *PloS one*, 9(11), e112611.
- Eichmiller, J. J., Best, E. S. & Sorensen, W. P. (2016). Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environmental Science & Technology*, 50(4), 1859–1867.
- Erickson, A. R., Rees, B. C., Coulter, A. A., Merkes, M. C., McCalla, G. S., Touzinsky, F. K., ... Amberg, J. J. (2016). Detecting the movement and spawning activity of bigheaded carps with environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 16(4), 957–965.
- Fausto, M. A., Carcupino, M., Scapigliati, G., Taddei, R. A. & Mazzini, M. (1994). Fine structure of the chorion and micropyle of the sea bass egg *Dicentrarchus labrax* (Teleostea, Percichthyidae). *Italian Journal of Zoology*, 61(2), 129–133.
- Fernandez, S., Sandin, M. M., Beaulieu, G. P., Clusa, L., Martinez, L. J., Ardura, A. & García-Vázquez, E. (2018). Environmental DNA for freshwater fish monitoring: insights for conservation within a protected area. *PeerJ*, 6, e4486.
- Ficetola, F. G., Miaud, C., Pompanon, F. & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423–425.

- Ficetola, F. G., Pansu, J., Bonin, A., Coissac, E., Giguët-Covex, C., Barba, D. M., ... Taberlet, P. (2015). Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 543–556.
- Foote, D. A., Thomsen, F. P., Sveegaard, S., Wahlber, M., Kielgast, J., Kyhn, A. L., ... Gilbert, P. T. (2012). Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PloS one*, 7(8), e41781.
- フランカム, R., バルレー, D. J. & プリスコー, A. D. (2017). 保全遺伝学入門 (西田睦監訳). 文一総合出版. 東京都.
- Fukuba, T., Miwa, T., Watanabe, S., Mochioka, N., Yamada, Y., Miller, J. M., ... Tsukamoto, K. (2015). A new drifting underwater camera system for observing spawning Japanese eels in the epipelagic zone along the West Mariana Ridge. *Fisheries Science*, 81(2), 235–246.
- 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.
- Ghosal, R., Eichmiller, J. J., Witthuhn, A. B. & Sorensen, W. P. (2018). Attracting Common carp to a bait site with food reveals strong positive relationships between fish density, feeding activity, environmental DNA, and sex pheromone release that could be used in invasive fish management. *Ecology and Evolution*, 8(13), 6714–6727.
- Goldberg, S. C., Turner, R. C., Deiner, K., Klymus, E. K., Thomsen, F. P., Murphy, A. M., ... Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1299–1307.
- Gustavson, S. M., Collins, C. P., Finarelli, A. J., Egan, D., Conchúir, Ó. R., Wightman, D. G., ... Carlsson, J. (2015). An eDNA assay for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. *Journal of Fish Biology*, 87(5), 1254–1262.
- Hansen, K. B., Bekkevold, D., Clausen, W. L. & Nielsen, E. E. (2018). The skeptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish and Fisheries*, 19(5), 751–768.
- Henn, K. & Braunbeck, T. (2011). Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(1), 91–98.
- Higuchi, T., Watanabe, S., Manabe, R., Kaku, T., Okamura, A., Yamada, Y., ... Tsukamoto, K. (2018). Tracking *Anguilla japonica* silver eels along the West Mariana Ridge using pop-up archival transmitting tags. *Zoological Studies*, 57(24), 1–14.
- 樋口貴俊. (2019). ニホンウナギの回遊と産卵に関する生態学的研究. 日本大学博士論文.
- Hinlo, R., Furlan, E., Sutor, L. & Gleeson, D. (2017). Environmental DNA monitoring and management of

- invasive fish: comparison of eDNA and fyke netting. *Management of Biological Invasions*, 8(1), 89–100.
- Hinlo, R., Lintermans, M., Gleeson, D., Broadhurst, B. & Furlan, E. (2018). Performance of eDNA assays to detect and quantify an elusive benthic fish in upland streams. *Biological Invasions*, 20(11), 3079–3093.
- Hiroi, J., Maruyama, K., Kawazu, K., Kaneko, T., Ohtani-Kaneko, R. & Yasumasu, S. (2004). Structure and developmental expression of hatching enzyme genes of the Japanese eel *Anguilla japonica*: an aspect of the evolution of fish hatching enzyme gene. *Development Genes and Evolution*, 214(4), 176–184.
- Howe, C. (2007a). Gene Cloning and Manipulation. In C. Howe (Ed.), *Modification and mutagenesis* (pp. 143–161). Cambridge University Press, Cambridge.
- Howe, C. (2007b). Gene Cloning and Manipulation. In C. Howe (Ed.), *Simple cloning* (pp. 52–73). Cambridge University Press, Cambridge.
- Hunter, E. M., Oyler-McCance, J. S., Dorazio, M. R., Fike, A. J., Smith, J. B., Hunter, T. C., ... Hart, M. K. (2015). Environmental DNA (eDNA) sampling improves occurrence and detection estimates of invasive Burmese pythons. *PloS one*, 10(4), e0121655.
- Inoue, G. J., Miya, M., Miller, J. M., Sado, T., Hanel, R., Hatooka, K., ... Tsukamoto, K. (2010). Deep-ocean origin of the freshwater eels. *Biology Letters*, 6(3), 363–366.
- Ishikawa, S., Suzuki, K., Inagaki, T., Watanabe, S., Kimura, Y., Okamura, A., ... Tsukamoto, K. (2001). Spawning time and place of the Japanese eel *Anguilla japonica* in the North Equatorial Current of the western North Pacific Ocean. *Fisheries Science*, 67(6), 1097–1103.
- Itakura, H., Wakiya, R., Yamamoto, S., Kaifu, K., Sato, T. & Minamoto, T. (2019). Environmental DNA analysis reveals the spatial distribution, abundance, and biomass of Japanese eels at the river-basin scale. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(3), 361–373.
- Itazawa, Y. & Oikawa, S. (1986). A quantitative interpretation of the metabolism-size relationship in animals. *Experientia*, 42(2), 152–153.
- IUCN. (2019). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-2. <https://www.iucnredlist.org>
- Jacoby, P. M. D., Casselman, M. J., Crook, V., DeLucia, M., Ahn, H., Kaifu, K., ... Gollock, J. M. (2015). Synergistic patterns of threat and the challenges facing global anguillid eel conservation. *Global Ecology and Conservation*, 4, 321–333.
- Jane, F. S., Wilcox, M. T., McKelvey, S. K., Young, K. M., Schwartz, K. M., Lowe, H. W., ... Whiteley, R. A. (2015). Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15(1), 216–227.
- Jellyman, J. D. (2003). Eel Biology. In K. Aida, K. Tsukamoto, & K. Yamaushi (Eds.), *The distribution and biology of the South Pacific species of Anguilla* (pp. 275–292). Springer, Tokyo.
- Jellyman, J. D. & Tsukamoto, K. (2005). Swimming depths of offshore migrating longfin eels *Anguilla*

- dieffenbachii*. *Marine Ecology Progress Series*, 286, 261–267.
- Jensen, R. M., Knudsen, W. S., Munk, P., Thomsen, F. P. & Møller, R. P. (2018). Tracing European eel in the diet of mesopelagic fishes from the Sargasso Sea using DNA from fish stomachs. *Marine Biology*, 165(8), 130.
- Jerde, L. C., Mahon, R. A., Chadderton, L. W. & Lodge, M. D. (2011). “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4(2), 150–157.
- Jerde, L. C., Chadderton, L. W., Mahon, R. A., Renshaw, A. M., Corush, J., Budny, L. M., ... Lodge, M. D. (2013). Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(4), 522–526.
- Jerde, L. C., Olds, P. B., Shogren, J. A., Andruszkiewicz, A. E., Mahon, R. A., Bolster, D. & Tank, L. J. (2016). Influence of stream bottom substrate on retention and transport of vertebrate environmental DNA. *Environmental Science & Technology*, 50(16), 8770–8779.
- Jo, T., Murakami, H., Masuda, R., Sakara, K. M., 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), 25–33.
- Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R. & Minamoto, T. (2019). Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution*, 9(3), 1135–1146.
- Kanda, T. & Itazawa, Y. (1981). Group effect on oxygen consumption and growth of the catfish eel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47, 341–345.
- Kanda, T. & Itazawa, Y. (1986). When does the group effect on oxygen consumption appear in fish?. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, 30, 197–207.
- Katoh, K. & Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 286–298.
- Kelly, P. R., Port, A. J., Yamahara, M. K. & Crowder, B. L. (2014). Using environmental DNA to census marine fish in a large mesocosm. *PloS one*, 9(1), e86175.
- Kelly, P. R., Closek, J. C., O’Donnell, L. J., Kralj, E. J., Shelton, O. A. & Samhouri, F. J. (2017). Genetic and manual survey methods yield different and complementary views of an ecosystem. *Frontiers in Marine Science*, 3, 283.
- Kelly, P. R., Gallego, R. & Jacobs-Palmer, E. (2018). The effect of tides on nearshore environmental DNA. *PeerJ*, 6, e4521.
- Kibbe, W. A. (2007). Oligocalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research*, 35(2), 43–46.
- Klymus, E. K., Richter, A. C., Chapman, C. D. & Paukert, C. (2015). Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*.

- Biological Conservation*, 183, 77–84.
- Klymus, E. K., Marshall, T. N. & Stepien, A. C. (2017). Environmental DNA (eDNA) metabarcoding assays to detect invasive invertebrate species in the Great Lakes. *PloS one*, 12(5), e0177643.
- Knudsen, W. S., Ebert, B. R., Hesselsoe, M., Kuntke, F., Hassingboe, J., Mortensen, B. P., ... Møller, R. P. (2019). Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 510, 31–45.
- Komai, T., Gotoh, O. R., Sado, T. & Miya, M. (2019). Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding and Metagenomics*, 3, e33835.
- Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(2), 488–492.
- Kurogi, H., Okazaki, M., Mochioka, N., Jinbo, T., Hashimoto, H., Takahashi, M., ... Chow, S. (2011). First capture of post-spawning female of the Japanese eel *Anguilla japonica* at the southern West Mariana Ridge. *Fisheries Science*, 77(2), 199–205.
- Kuroki, M., Aoyama, J., Miller, J. M., Wouthuyzen, S., Arai, T. & Tsukamoto, K. (2006). Contrasting patterns of growth and migration of tropical anguillid leptocephali in the western Pacific and Indonesian Seas. *Marine Ecology Progress Series*, 309, 233–246.
- Kuroki, M., Aoyama, J., Miller, J. M., Yoshinaga, T., Shinoda, A., Hagihara, S. & Tsukamoto, K. (2009). Sympatric spawning of *Anguilla marmorata* and *Anguilla japonica* in the western North Pacific Ocean. *Journal of Fish Biology*, 74(9), 1853–1865.
- Kuroki, M., Fukuda, N., Yamada, Y., Okamura, A. & Tsukamoto, K. (2010). Morphological changes and otolith growth during metamorphosis of Japanese eel leptocephali in captivity. *Coastal Marine Science*, 34(1), 31–38.
- Kuroki, M., Miller, J. M. & Tsukamoto, K. (2014). Diversity of early life-history traits in freshwater eels and the evolution of their oceanic migrations. *Canadian Journal of Zoology*, 92(9), 749–770.
- Lacoursière-Roussel, A., Côté, G., Leclerc, V. & Bématez, L. (2016). Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology*, 53(4), 1148–1157.
- Lahnsteiner, F. (2003). The spermatozoa and eggs of the cardinal fish. *Journal of Fish Biology*, 62(1), 115–128.
- Levi, T., Allen, M. J., Bell, D., Joyce, J., Russell, R. J., Tallmon, A. D., ... Yu, W. D. (2019). Environmental DNA for the enumeration and management of Pacific salmon. *Molecular Ecology Resources*, 19(3), 597–608.
- Longerich, S. & Storb, U. (2005). The contested role of uracil DNA glycosylase in immunoglobulin gene diversification. *Trends in Genetics*, 21(5), 253–256.
- Longo, C. M., Beminger, S. M. & Hartley, L. J. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over

- contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93(1), 125–128.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J. & Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 367–389.
- Maddison, W. P. & Maddison, D. R. (2019, November 14). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. version 2.75, <http://www.mesquiteproject.org>
- Mahon, R. A., Jerde, L. C., Galaska, M., Bergner, L. J., Chadderton, L. W., Lodge, M. D., ... Nico, G. L. (2013). Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiment. *PloS one*, 8(3), e58316.
- Manabe, R., Aoyama, J., Watanabe, K., Kawai, M., Miller, J. M. & Tsukamoto, K. (2011). First observations of the oceanic migration of Japanese eel, from pop-up archival transmitting tags. *Marine Ecology Progress Series*, 437, 229–240.
- Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M. & Minamoto, T. (2014). The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PloS one*, 9(12), e114639.
- Merkes, M. C., McCalla, G. S., Jensen, R. N., Gaikowski, P. M. & Amberg, J. J. (2014). Persistence of DNA in carcasses, slime and avian feces may affect interpretation of environmental DNA data. *PloS one*, 9(11), e113346.
- Miller, J. M., Mochioka, N., Otake, T. & Tsukamoto, K. (2002). Evidence of a spawning area of *Anguilla marmorata* in the western North Pacific. *Marine Biology*, 140(4), 809–814.
- Miller, J. M., Kimura, S., Friedland, K. D., Knights, B., Kim, H., Jellyman, J. D. & Tsukamoto, K. (2009). Review of oceanic-atmospheric factors in the Atlantic and Pacific Oceans influencing spawning and recruitment of anguillid eels. *American Fisheries Society Symposium*, 69, 231–249.
- Minegishi, Y., Aoyama, J., Inoue, G. J., Miya, M., Nishida, M. & Tsukamoto, K. (2005). Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus *Anguilla* based on the whole mitochondrial genome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(1), 134–146.
- Minegishi, Y., Yoshinaga, T., Aoyama, J. & Tsukamoto, K. (2009a). Species identification of *Anguilla japonica* by real-time PCR based on a sequence detection system: a practical application to eggs and larvae. *ICES Journal of Marine Science*, 66(9), 1915–1918.
- Minegishi, Y., Aoyama, J., Inoue, G. J., Azanza, R. V. & Tsukamoto, K. (2009b). Inter-specific and subspecific genetic divergences of freshwater eels, genus *Anguilla* including a recently described species, *A. luzonensis*, based on whole mitochondrial genome sequences. *Coastal Marine Science*, 33, 64–77.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, Y. J., Sato, K., ... Iwasaki, W. (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.
- Miya, M., Minamoto, T., Yamanaka, H., Oka, S., Sato, K., Yamamoto, S., ... Doi, H. (2016). Use of a filter cartridge for filtration of water samples and extraction of environmental DNA. *Journal of Visualized*

- Experiments*, e54741.
- Murakami, H., Yoon, S., Kasai, A., Minamoto, T., Yamamoto, S., Sakata, K. M., ... Masuda, R. (2019). Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fisheries Science*, 85(2), 327–337.
- Nevers, B. M., Byappanahalli, N. M., Morris, C. C., Shively, D., Przybyla-Kelly, K., Spoljaric, M. A., ... Roseman, F. E. (2018). Environmental DNA (eDNA): a tool for quantifying the abundance but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). *PloS one*, 13(1), e0191720.
- O'Donnell, L. J., Kelly, P. R., Shelton, O. A., Samhuri, F. J., Lowell, C. N. & Williams, D. G. (2017). Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat. *PeerJ*, 5, e3044.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Inuma, N., Hirose, K. (1997). Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17(1–6), 163–169.
- Oikawa, S. & Itazawa, Y. (1984). Allometric relationship between tissue respiration and body mass in the carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 77(3), 415–418.
- Oikawa, S. & Itazawa, Y. (1993). Allometric relationship between tissue respiration and body mass in a marine teleost, porgy *Pagrus major*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 105(1), 129–133.
- Okamura, A., Zhang, H., Yamada, Y., Tanaka, S., Horie, N., Mikawa, N., ... Oka, P. H. (2000). Re-examination of the spermatozoal ultrastructure of eels: observations of the external morphology of spermatozoa in three species. *Journal of Fish Biology*, 57(1), 161–169.
- Okamura, A., Yamada, Y., Tanaka, S., Horie, N., Utoh, T., Mikawa, N., ... Oka, P. H. (2002). Atmospheric depression as the final trigger for the seaward migration of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series*, 234: 281–288.
- Okamura, A., Yamada, Y., Mikawa, N., Horie, N. & Tsukamoto, K. (2012). Effect of starvation, body size, and temperature on the onset of metamorphosis in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Canadian Journal of Zoology*, 90(12), 1378–1385.
- Okamura, A., Horie, N., Mikawa, N., Yamada, Y. & Tsukamoto, K. (2014). Recent advances in artificial production of glass eels for conservation of anguillid eel populations. *Ecology of Freshwater Fish*, 23(1), 95–110.
- Ozawa, T., Kakizoe, F., Tabeta, O., Maeda, T. & Yuwaki, Y. (1991). Japanese eel leptcephali from three cruise in the western North Pacific. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(10), 1877–1881.
- Parsons, M. K., Everett, M., Dahlheim, M. & Park, L. (2018). Water, water everywhere: environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species. *Royal Society Open Science*, 5(8), 180537.
- Piggott, P. M. (2016). Evaluating the effects of laboratory protocols on eDNA detection probability for an endangered freshwater fish. *Ecology and Evolution*, 6(9), 2739–2750.

- Pilliod, S. D., Goldberg, S. R., Arkle, R. S. & Waits, P. L. (2013). Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(8), 1123–1130.
- Pilliod, S. D., Goldberg, S. C., Arkle, S. R. & Waits, P. L. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 109–116.
- Port, A. J., O'Donnell, L. J., Romero-Maraccini, C. O., Leary, R. P., Litvin, Y. S., Nickols, J. K., ... Kelly, P. R. (2016). Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 25(2), 527–541.
- Rakers, S., Gebert, M., Uppalapati, S., Meyer, W., Maderson, P., Sell, F. A., ... Paus, R. (2010). 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Experimental Dermatology*, 19(4), 313–324.
- Rawson, M. D., Zhang, T., Kalicharan, D. & Jongebloed, L. W. (2000). Field emission scanning electron microscopy and transmission electron microscopy studies of the chorion, plasma membrane and syncytial layers of the gastrula-stage embryo of the zebrafish *Brachydanio rerio*: a consideration of the structural and functional relationships with respect to cryoprotectant penetration. *Aquaculture Research*, 31(3), 325–336.
- Rees, C. H., Maddison, C. B., Middleditch, J. D., Patmore, M. R. J. & Gough, C. K. (2014). The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450–1459.
- Righton, D., Westerberg, H., Feunteun, E., Økland, F., Gargan, P., Amilhat, E., ... Aarestrup, K. (2016). Empirical observations of the spawning migration of European eels: the long and dangerous road to the Sargasso Sea. *Science Advances*, 2(10), e1501694.
- Sakata, K. M., Maki, N., Sugiyama, H. & Minamoto, T. (2017). Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, *Acheilognathus typus*, in a natural river in Japan. *The Science of Nature*, 104(11–12), 100.
- Sassoubre, M. L., Yamahara, M. K., Gardner, D. L., Block, A. B. & Boehm, B. A. (2016). Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. *Environmental Science & Technology*, 50(19), 10456–10464.
- Schabetsberger, R., Økland, F., Aarestrup, K., Kalfatak, D., Sichrowsky, U., Tambets, M., ... Miller, I. P. (2013). Oceanic migration behaviour of tropical Pacific eels from Vanuatu. *Marine Ecology Progress Series*, 475, 177–190.
- Schmidt, J. (1922). The breeding places of the eel. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 211(382–390), 179–208.
- Schmidt, J. (1925). The breeding places of the eel. *Annual Reports*, Smithsonian Institution, 1924, 279–316.
- Schmidt, J. (1935). Danish eel investigations during 25 years (1905–1930). Carlsberg Foundation.

- Schmidt, P., Bálint, M., Greshake, B., Bandow, C., Römbke, J. & Schmitt, I. (2013). Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biology and Biochemistry*, 65, 128–132.
- Schumer, G., Crowley, K., Maltz, E., Johnston, M., Anders, P. & Blankenship, S. (2019). Utilizing environmental DNA for fish eradication effectiveness monitoring in streams. *Biological Invasions*, 21(11), 3415–3426.
- Shaw, A. L. J., Clarke, J. L., Wedderburn, D. S., Barnes, C. T., Weyrich, S. L. & Cooper, A. (2016). Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation*, 197, 131–138.
- Shinoda, A., Aoyama, J., Miller, J. M., Otake, T., Mochioka, N., Watanabe, S., ... Tsukamoto, K. (2011). Evaluation of the larval distribution and migration of the Japanese eel in the western North Pacific. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21(3), 591–611.
- Shokralla, S., Spall, L. J., Gibson, F. J. & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21(8), 1794–1805.
- Sigsgaard, E. E., Nielsen, B. I., Bach, S. S., Lorenzen, D. E., Robinson, P. D., Knudsen, W. S., ... Thomsen, F. P. (2017). Population characteristic of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution*, 1(1), 0004.
- Spear, F. S., Groves, D. J., Williams, A. L. & Waits, P. L. (2015). Using environmental DNA methods to improve detectability in a hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) monitoring program. *Biological Conservation*, 183, 38–45.
- Stoeckle, Y. M., Soboleva, L. & Charlop-Powers, Z. (2017). Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in urban estuary. *PloS one*, 12(4), e0175186.
- Strickler, M. K., Fremier, K. A. & Goldberg, S. G. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85–92.
- Sugeha, Y. H., Suharti, R. S., Wouthuyzen, S. & Sumadhiharga, K. (2008). Biodiversity, distribution and abundance of the tropical anguillid eels in the Indonesian waters. *Marine Research in Indonesia*, 33(2), 129–137.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L. H. (2012a). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789–1793.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C. & Willerslev, E. (2012b). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045–2050.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H. & Kawabata, Z. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS one*, 7(4), e35868.
- 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.
- Takahashi, K. M., Meyer, J. M., McPhee, C., Gaston, R. J., Venesky, D. M. & Case, F. B. (2018). Seasonal and

- diel signature of eastern Hellbender environmental DNA. *The Journal of Wildlife Management*, 82(1), 217–225.
- Takeuchi, A., Watanabe, S., Yamamoto, S., Miller, J. M., Fukuba, T., Miwa, T., ... Tsukamoto, K. (2019a). First use of oceanic environmental DNA to study the spawning ecology of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series*, 609, 187–196.
- Takeuchi, A., Sado, T., Gotoh, R. O., Watanabe, S., Tsukamoto, K. & Miya, M. (2019b). New PCR primers for metabarcoding environmental DNA from freshwater eels, genus *Anguilla*. *Scientific Reports*, 9(1), 7977.
- Takeuchi, A., Iijima, T., Kakuzen, W., Watanabe, S., Yamada, Y., Okamura, A., ... Tsukamoto, K. (2019c). Release of eDNA by different life history stages and during spawning activities of laboratory-reared Japanese eels for interpretation of oceanic survey data. *Scientific Reports*, 9(1), 6074.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Unuma, T. & Nomura, K. (2003). The first production of glass eel in captivity: first reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1–4), 493–497.
- 田中秀樹 (2019). 種苗生産の歴史と現状. In 塚本勝巳 (編) ウナギの科学. 朝倉書店. 東京都. pp171–176.
- Tasumi, S., Yang, W., Usami, T., Tsusui, S., Ohira, T., Kawazoe, I., ... Suzuki, Y. (2004). Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(4), 325–335.
- Thomsen, F. P., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, P. T. M. ... Willerslev, E. (2012a). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11), 2565–2573.
- Thomsen, F. P., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, R. P., Rasmussen, M. & Willerslev, E. (2012b). Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PloS one*, 7(8), e41732
- Thomsen, F. P. & Willerslev, E. T. (2015). Environmental DNA – an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4–18.
- Thomsen, F. P., Møller, R. P., Sigsgaard, E. E., Knudsen, W. S., Jørgense, A. O. & Willerslev, E. (2016). Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PloS one*, 11(11), e0165252.
- Tréguier, A., Paillisson, J., Dejean, T., Valentini, A., Schlaepfer, A. M. & Roussel, J. (2014). Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkia* in freshwater ponds. *Journal of Applied Ecology*, 51(4), 871–879.
- Tsukamoto, K. (1990). Recruitment mechanism of the eel, *Anguilla japonica*, to the Japanese coast. *Journal of*

- Fish Biology*, 36(5), 659–671.
- Tsukamoto, K. (1992). Discovery of the spawning area for Japanese eel. *Nature*, 356(6372), 789.
- Tsukamoto, K. (2006). Spawning of eels near a seamount. *Nature*, 439(7079), 929.
- Tsukamoto, K. (2009). Oceanic migration and spawning of anguillid eels. *Journal of Fish Biology*, 74(9), 1833–1852.
- Tsukamoto, K., Umezawa, A., Tabeta, O., Mochioka, N. & Kajihara, T. (1989). Age and birth date of *Anguilla japonica* leptocephali collected in western North Pacific in September 1986. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(6), 1023–1026.
- Tsukamoto, K., Lee, T. & Mochioka, N. (1998). Synchronized spawning of *Anguilla japonica* inferred from daily otolith increments in leptocephali. *Ichthyological Research*, 45(2), 187–193.
- Tsukamoto, K., Aoyama, J. & Miller, J. M. (2002). Migration, speciation, and the evolution of diadromy in anguillid eels. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(12), 1989–1998.
- Tsukamoto, K., Otake, T., Mochioka, N., Lee, T., Fricke, H., Inagaki, T., ... Suzuki, Y. (2003). Seamounts, a new moon and eel spawning: the search for the spawning site of the Japanese eel. *Environmental Biology of Fishes*, 66(3), 221–229.
- Tsukamoto, K., Aoyama, J. & Miller, J. M. (2009a). Present status of the Japanese eel: resources and recent research. *American Fisheries Society Symposium*, 58, 21–35.
- Tsukamoto, K., Yamada, Y., Okamura, A., Kaneko, T., Tanaka, H., Miller, J. M., ... Tanaka, S. (2009b). Positive buoyancy in eel leptocephali: an adaptation for life in the ocean surface layer. *Marine Biology*, 156(5), 835–846.
- Tsukamoto, K., Chow, S., Otake, T., Kurogi, H., Mochioka, N., Miller, J. M., ... Tanaka, H. (2011). Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific. *Nature Communications*, 2, 179.
- Tsukamoto, K., Mochioka, N., Miller, J. M., Koyama, S., Watanabe, S. & Aoyama, J. (2013). Video observation of an eel in the *Anguilla japonica* spawning area along the West Mariana Ridge. *Fisheries Science*, 79(3), 407–416.
- Tsuji, S., Ushio, M., Sakurai, S., Minamoto, T. & Yamanaka, H. (2017). Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS one*, 12(4), e0176608.
- Tsuji, S., Miya, M., Ushio, M., Sato, H., Minamoto, T. & Yamanaka, H. (2019). Evaluating intraspecific genetic diversity using environmental DNA and denoising approach: a case study using tank water. *Environmental DNA*, 1–11.
- Turner, R. C., Bames, A. M., Xu, Y. C. C., Jones, E. S., Jerde, L. C. & Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7), 676–684.
- Turner, R. C., Uy, L. K. & Everhart, C. R. (2015). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, 183, 93–102.

- Ushio, M., Fukuda, H., Inoue, T., Makoto, K., Kishida, O., Sato, K., ... Miya, M. (2017). Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), 63–75.
- Ushio, M., Murata, K., Sado, T., Nishiimi, I., Takeshita, M., Iwasaki, W. & Miya, M. (2018a). Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10.
- Ushio, M., Murakami, H., Masuda, R., Sado, T., Miya, M., Sakurai, S., ... Kondoh, M. (2018b). Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2, e23297.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, F. P., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929–942.
- 渡邊 俊. (2001). ウナギ属魚類 (genus *Anguilla*) の分類に関する研究. Taxonomic study of the freshwater eels, the genus *Anguilla*, Schrank 1798. 東京大学博士論文.
- Watanabe, S. (2003). Eel Biology. In K. Aida, K. Tsukamoto, & K. Yamaushi (Eds.), Taxonomy of the freshwater eels, genus *Anguilla* Schrank, 1798 (pp. 3–18). Springer, Tokyo.
- Watanabe, S., Minegishi, Y., Yoshinaga, T., Aoyama, J. & Tsukamoto, K. (2004a). A quick method for species identification of Japanese eel (*Anguilla japonica*) using real-time PCR: an onboard application for use during sampling surveys. *Marine Biotechnology*, 6(6), 566–574.
- Watanabe, S., Aoyama, J. & Tsukamoto, K. (2004b). Reexamination of Ege's (1939) use of taxonomic characters of the genus *Anguilla*. *Bulletin of Marine Science*, 74(2), 337–351.
- Watanabe, S., Aoyama, J. & Tsukamoto, K. (2008). The use of morphological and molecular genetic variations to evaluate subspecies issues in the genus *Anguilla*. *Coastal Marine Science*, 32(1), 19–29.
- Watanabe, S., Aoyama, J. & Tsukamoto, K. (2009). A new species of freshwater eel *Anguilla luzonensis* (Teleostei: Anguillidae) from Luzon Island of the Philippines. *Fisheries Science*, 75(2), 387–392.
- Watanabe, S., Higuchi, T., Noshiro, M., Manabe, R., Miller, J. M., Jellyman, J. D. & Tsukamoto, K. (2019). Reexamination of the spawning migration of *Anguilla dieffenbachii* in relation to water temperature and the lunar cycle. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 1–17.
- Whiley M. D. & Sloots, P. T. (2005). Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *Journal of Clinical Virology*, 34(2), 104–107.
- Wilcox, M. T., McKelvey, S. K., Young, K. M., Jane, F. S., Lowe, H. W., Whiteley, R. A. & Schwartz, K. M. (2013). Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PloS one*, 8(3), e59520.
- Wilcox, M. T., McKelvey, S. K., Young, K. M., Lowe, H. W. & Schwartz, K. M. (2015). Environmental DNA particle size distribution from Brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Conservation Genetics Resources*,

- 7(3), 639–641.
- Wilson, C., Wright, E., Bronnenhuber, J., MacDonald, F., Belore, M. & Locke, B. (2014). Tracking ghosts: combined electrofishing and environmental DNA surveillance efforts for Asian carps in Ontario waters of Lake Erie. *Management of Biological Invasions*, 5(3), 225–231.
- Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K., Takahashi, K., Sawada, H., Murakami, H., ... 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.
- Yamamoto, S., Maduda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki, H., Kondoh, M., ... Miya, M. (2017). Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal area. *Scientific Reports*, 7, 40368.
- Yang, W., Zhu, R., Zhang, C. & Li, Z. (2017). Application and performance test of a small aerosol sensor for the measurement of aerosolized DNA strands. *Aerosol and Air Quality Research*, 17, 2358–2366.
- YK17-10 Cruise Report. (2017). Understanding the spawning ecology of freshwater eels. Cruise Report to JAMSTEC. pp. 21. [http://www.godac.jamstec.go.jp/catalog/data/doc\\_catalog/media/YK17-10\\_all.pdf](http://www.godac.jamstec.go.jp/catalog/data/doc_catalog/media/YK17-10_all.pdf)
- Yoshinaga, T., Miller, J. M., Yokouchi, K., Otake, T., Kimura, S., Aoyama, J., ... Tsukamoto, K. (2011). Genetic identification and morphology of naturally spawned eggs of the Japanese eel *Anguilla japonica* collected in the western North Pacific. *Fisheries Science*, 77(6), 983–992.
- 吉澤菜津子. (2006). ニホンウナギの集団構造と産卵生態に関する研究. 東京大学修士学位論文.
- Zhang, C., Xu, J., Ma, W. & Zheng, W. (2006). PCR microfluidic devices for DNA amplification. *Biotechnology Advances*, 24(3), 243–284.