



多分類群一斉環境DNA分析法の開発と 水国調査全項目の環境DNA適用に向けた試行調査

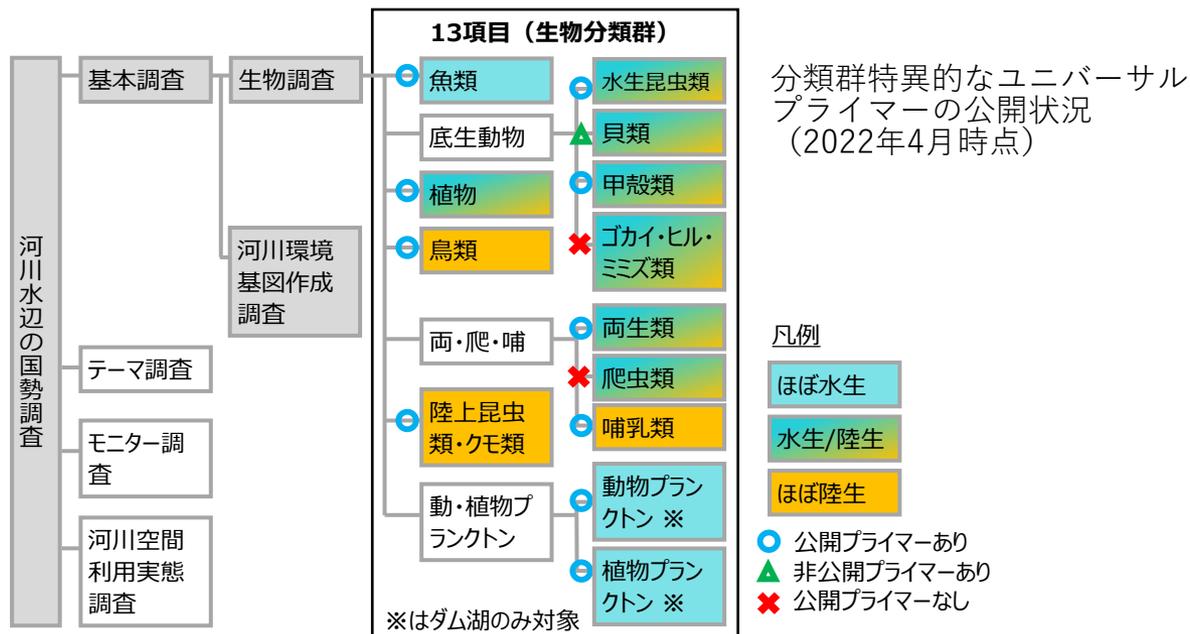


- ✓ 例えば、魚類と鳥類では全く調査方法や必要なスキルが異なるように、従来型の生物調査は、対象となる分類群ごとに調査方法が変わる上に、高度な種同定スキルが求められる。
- ✓ 一方で、環境DNA調査は、基本的には分類群が変わっても現地調査の方法や種同定のスキームは変わることがなく、標準化が可能である。さらには、1つの環境DNA試料を使って複数の分類群を調査することも可能であり、環境DNA分析技術は生物調査の高度化に役立つツールとして期待されている。
- ✓ 本研究では、河川流域だけでなく沿岸域までも含めた広範なエリアに生息する多種多様な生物を対象に、それらを包括的に環境DNA調査で把握しようとする際の現場適用性や課題を検証することを目的とした。

| 環境調査の目的 | 環境DNAを活用する際の課題 | 研究テーマ |
|---------------|---|---|
| 生物相の把握 | <ul style="list-style-type: none">● 水国調査の全11項目のうち、現時点で網羅的解析が適用できない生物分類群（環形動物・爬虫類）がある。 | テーマ① 環形動物及び爬虫類を検出対象とした網羅的解析法の開発 |
| | <ul style="list-style-type: none">● 複数の分類群に適用が広がると、分析コストが膨大となる。● 水国調査の全11項目（ダムは13項目）に対して、現時点で環境DNA調査がどの程度適用可能であるのか、その調査精度等に関する情報がない。 | テーマ② 多分類群一斉環境DNA分析法の開発と水国調査全項目の環境DNA適用に向けた試行調査 |

テーマ① 環形動物及び爬虫類を対象とした網羅的解析手法の開発

- ✓ 環境DNAメタバーコーディング（以降、網羅的解析とする）では、魚類特異的に設計されたMiFishプライマーに代表されるように、分類群特異的なユニバーサルプライマーが必要不可欠である。しかし、生物調査の対象となる主要な分類群すべてにおいてユニバーサルプライマーが公開されているわけではない。
- ✓ そこで、研究テーマ①では、現時点で網羅的解析のためのユニバーサルプライマーが公開されていない分類群のうち、河川水辺の国勢調査（以降、水国調査とする）の項目である「底生動物：環形動物（ゴカイ類・ヒル類・ミミズ類）」と「爬虫類」の2つの分類群を対象に、新たな検出手法を開発を行った。



1) 爬虫類の検出対象と設計領域

- 検出対象は、カメ目、トカゲ亜目、ヘビ亜目、ワニ目のうち、日本爬虫両棲類学会が公開する「日本産爬虫両生類標準和名リスト（2022年11月6日版）」をベースに**日本に生息する爬虫類117種**とした。なお、日本には、ワニ目は生息しないが、プライマーの汎用性を高めるため、海外に生息する主要なワニ類も検出対象に追加した。
- プライマーを設計する遺伝子領域は、他の分類群で実績があるミトコンドリアDNAの12S rRNA及び16S rRNAを候補とした。前述の117種を検索対象に国際塩基配列データベースから参照可能な12S rRNA及び16S rRNAの配列をダウンロードし、プライマー設計に適した領域の有無を探索した。

2) 環形動物の検出対象と設計領域

- 検出対象は、ゴカイ綱、ミミズ綱、ヒル綱、スジホシムシ綱、サメハダホシムシ綱のうち、令和4年度河川水辺の国勢調査のための生物種リスト（2022年11月7日版）をベースに、**日本に生息する陸産・淡水産・海産の環形動物1935種**とした。
- プライマーを設計する遺伝子領域は、ミトコンドリアDNAの16S rRNA及び核DNAの28S rRNAを候補とした。前述の1935種を対象に国際塩基配列データベースから参照可能な16S rRNA及び28S rRNAの配列をダウンロードし、プライマー設計に適した領域の有無を探索した。

3) プライマー設計条件（爬虫類・環形動物共通）

- 分類群特異性：理想的には、検出対象とする全種のDNAが増幅でき、それ以外の生物のDNAは増幅しないこと。
- PCR増幅産物の長さ：次世代シーケンサーによりpaired-endの配列決定が可能な500bp以下であること。
- 種の同定精度：読み取った配列情報から、種または属レベルの同定が可能であること。

1) 爬虫類特異的ユニバーサルプライマー

- 設計領域：ミトコンドリアDNAの16S rRNA
- PCR増幅産物の長さ：186-269 bpの範囲であるが、多くの種は250 bp付近。

スッポンは、特徴的なミスマッチをもつこと、淡水域での検出可能性が高いことから、種特異的な改変プライマーを設計した。

| プライマー名 | プライマー配列 (5'→3') | 配列長 (bp) | Tm (°C) | GC比 (%) | 3'安定性 | ペナルティ |
|-------------------------------|----------------------|----------|---------|---------|-------|-------|
| Reptile16S_U-F | AGACSAGAAGACCCTGTGRA | 20 | 59.9 | 55.0 | 4.0 | 0.113 |
| Reptile16S_U-R | CTWRRAKRRGATDGCCTGT | 20 | 59.9 | 55.0 | 4.4 | 0.107 |
| Reptile16S_Pel-R (スッポン検出用) | CTGTGACGGGATTGCGCTGT | 20 | 59.9 | 60.0 | — | — |

2) 環形動物特異的ユニバーサルプライマー

- 設計領域：核DNAの28S rRNA
- PCR増幅産物の長さ：205-645 bpの範囲であるが、350-420 bpにほとんどの種が納まる。

ヒル綱及びウロコムシ科は、特徴的なミスマッチをもつこと、淡水域や沿岸海域での検出可能性が高いことから、低次分類群特異的な改変プライマーを設計した。

| プライマー名 | プライマー配列 (5'→3') | 配列長 (bp) | Tm (°C) | GC比 (%) | 3'安定性 | ペナルティ |
|------------------------------------|----------------------|----------|---------|---------|-------|-------|
| Annelida28S_U_F | ████████████████████ | 19 | 59.8 | 63.2 | 4.5 | 1.224 |
| Annelida28S_hiru_F (ヒル綱検出用) | ████████████████████ | 19 | 69.0 | 63.2 | — | — |
| Annelida28S_U_R | ████████████████████ | 20 | 60.3 | 55.0 | 4.4 | 0.250 |
| Annelida28S_uroko_R (ウロコムシ科検出用) | ████████████████████ | 20 | 58.5 | 50.0 | — | — |

※環形動物特異的ユニバーサルプライマーは、論文執筆中のため、現時点はプライマー配列を非表示とさせていただきます。

テーマ② 多分類群一斉環境DNA分析法の開発と水国調査全項目の環境DNA適用に向けた試行調査

- ✓ 水国調査では、まずは魚類を対象とした環境DNA調査の実装が検討されているが、将来的にそれ以外の生物分類群にも適用範囲を広げることができれば、生物調査をさらに高度化できる。しかし、1つの採水試料から複数の分類群を包括的に検出した研究は、まだごく少数の事例があるだけである（参考文献1）。
- ✓ 1つの採水試料から複数の分類群を包括的に検出しようとした場合、1分類群ごと個別に網羅的解析を行った上で統合することになるが、そうすると1試料当たりの分析コストが膨大になってしまう。仮に、1回の分析で複数の分類群をまとめて一斉に分析できれば、調査の効率化と分析コストの削減につながり、様々な分類群で網羅的解析の適用が進むと期待される。
- ✓ そこで、研究テーマ②では、マルチプレックスPCR法を網羅的解析に応用し、複数の分類群をまとめて1回の分析で同時に検出する手法の開発を試み、その検出精度を検証した。【多分類群一斉分析法】
- ✓ さらに、水国調査におけるすべての生物調査項目（魚類、底生動物、植物、鳥類、両生類・爬虫類・哺乳類、陸上昆虫類、ダム湖は動・植物プランクトンを追加）を対象に試行的な環境DNA調査を実施し、従来調査（採捕調査）の過年度調査結果との比較を行うことで、その現場適用性を分類群別に検証した。

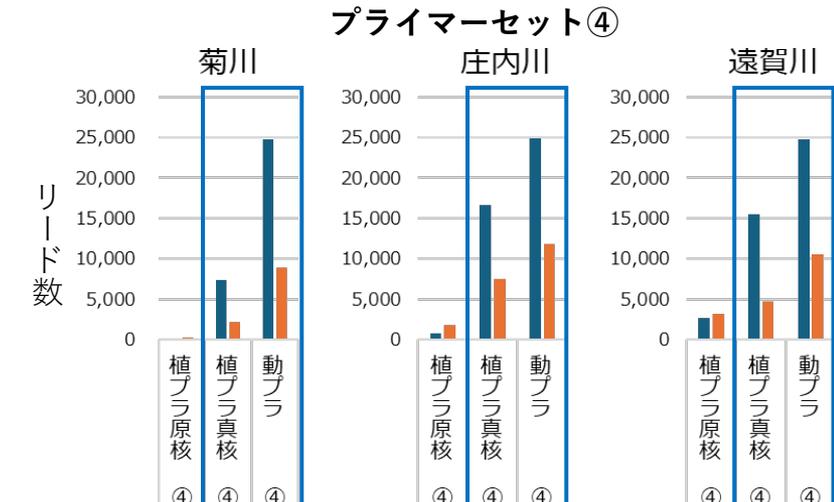
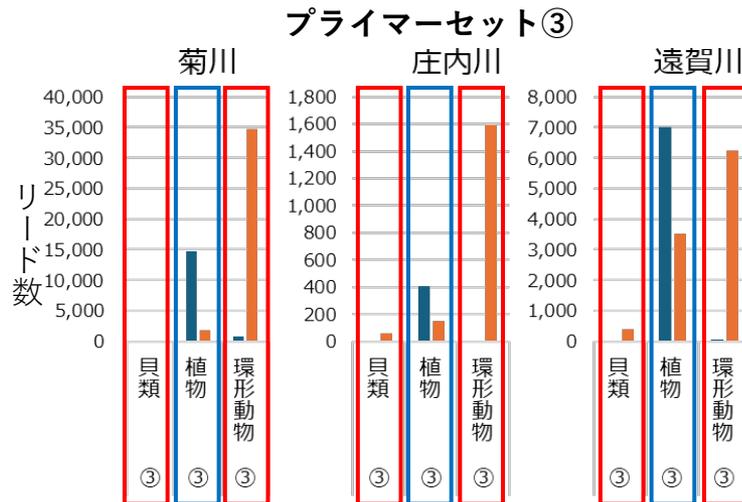
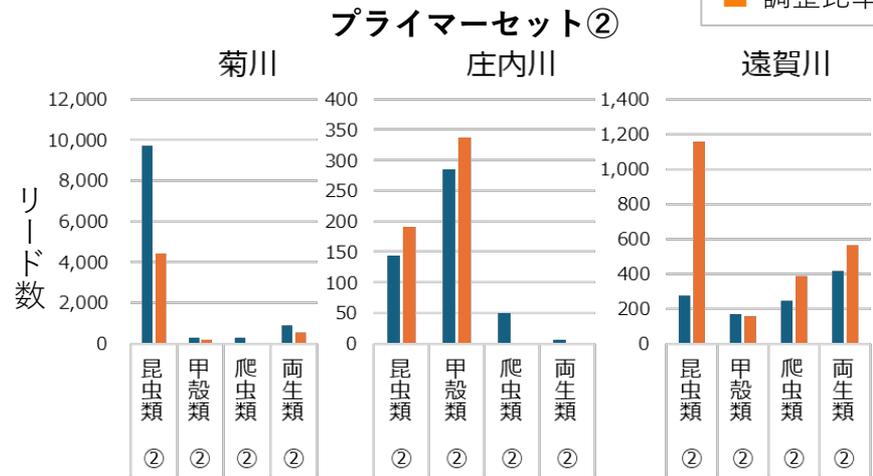
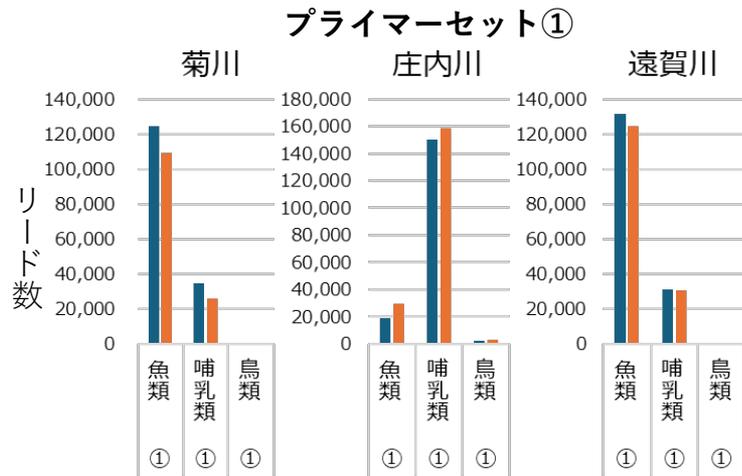
【全分類群試行調査】

- ✓ 予備的な分析の結果を受けて、下表の4セットの組み合わせで、かつ、プライマーの混合比を変えて、マルチプレックスPCR法による1st PCRを行った。

| No. | 検出対象分類群 | プライマー名(略称) | プライマーの出典 | プライマー組合せセット | 増幅断片長 (bp) | アニーリング温度 (°C) | プライマー等量比率混合 | プライマー調整比率混合 |
|-----|---------------|--------------|----------------------------------|-------------|------------|---------------|-------------|-------------|
| 1 | 魚類 | MiFish | Miya M, et al. (2015) | ① | 180 | 65 | 0.4 | 0.5 |
| 2 | 哺乳類 | MiMammal | Ushio M, et al. (2017) | | 170 | 65 | 0.4 | 0.35 |
| 3 | 鳥類 | MiBird | Ushio M, et al. (2018) | | 180 | 65 | 0.4 | 0.35 |
| 4 | 昆虫類 (水生・陸上) | MtInsect-16S | Takenaka M, et al. (2023) | ② | 120-220 | 55 | 0.3 | 0.3 |
| 5 | 甲殻類 | MiDeca | Komai T, et al. (2019) | | 200 | 60 | 0.3 | 0.25 |
| 6 | 爬虫類 | Reptile16S | This Study | | 250 | 55 | 0.3 | 0.4 |
| 7 | 両生類 | Amph16S | Sakata MK, et al. (2022) | | 250 | 58 | 0.3 | 0.25 |
| 8 | 貝類 | Mollusca28S | Nakamura M, et al. (unpublished) | ③ | 360-420 | 60 | 0.4 | 0.5 |
| 9 | 植物 | ITS2-p3/u4 | Cheng T, et al. (2016) | | 360-450 | 55 | 0.4 | 0.2 |
| 10 | 環形動物 | Annelida28S | This Study | | 340-420 | 60 | 0.4 | 0.5 |
| 11 | 植物プランクトン (原核) | 341F/518R | Klindworth A, et al. (2013) | ④ | 140 | 55 | 0.4 | 0.6 |
| 12 | 植物プランクトン (真核) | 1380F/1510R | Amaral-Zettler, LA et al. (2009) | | 110-160 | 55 | 0.4 | 0.3 |
| 13 | 動物プランクトン | 1389F/1510R | Amaral-Zettler, LA et al. (2009) | | 110-160 | 55 | 0.4 | 0.3 |

- ✓ セット①②の分類群では、混合比率の違いによるリード数の差は小さかった。
- ✓ 貝類・環形動物(□)は混合比率を上げることでリード数が明らかに増えたが、動植物プランクトン(□)は等量混合した方がリード数が多かった。

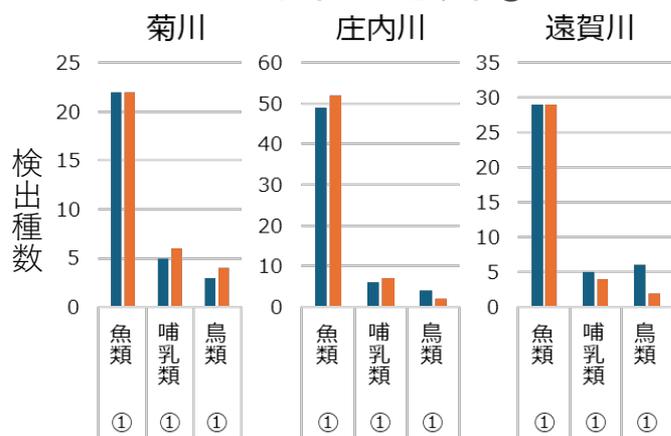
■ 等量比率で混合
■ 調整比率で混合



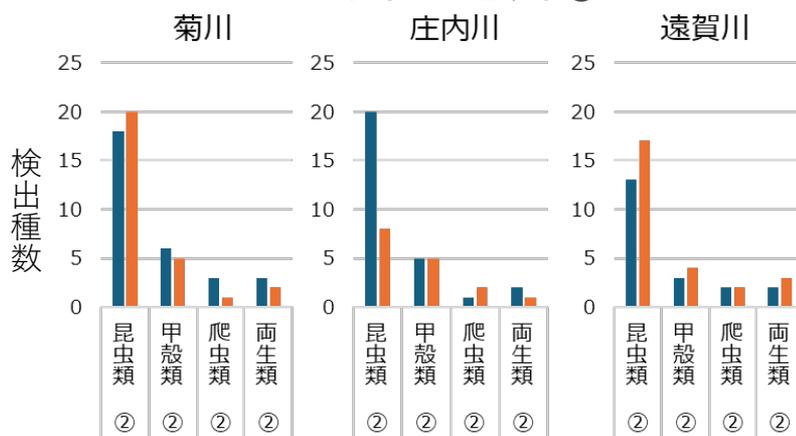
- ✓ セット①②の分類群では、混合比率の違いによる検出種数の差は小さかった。
- ✓ リード数と同様に、貝類・環形動物(□)は混合比率を上げることで検出種数が増え、動植物プランクトン(□)は等量混合した方が検出種数が多かった。

■ 等量比率で混合
■ 調整比率で混合

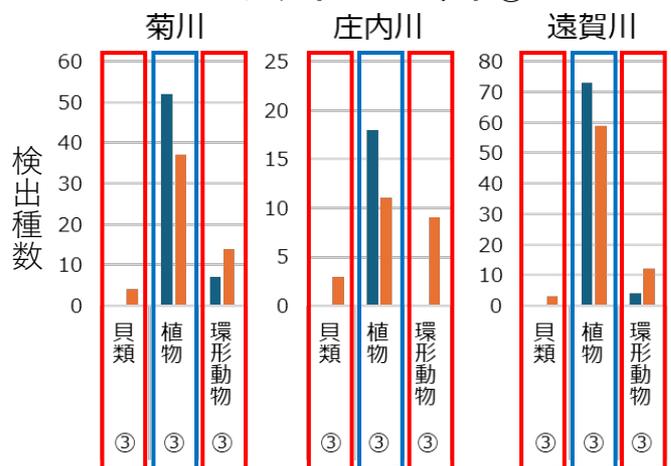
プライマーセット①



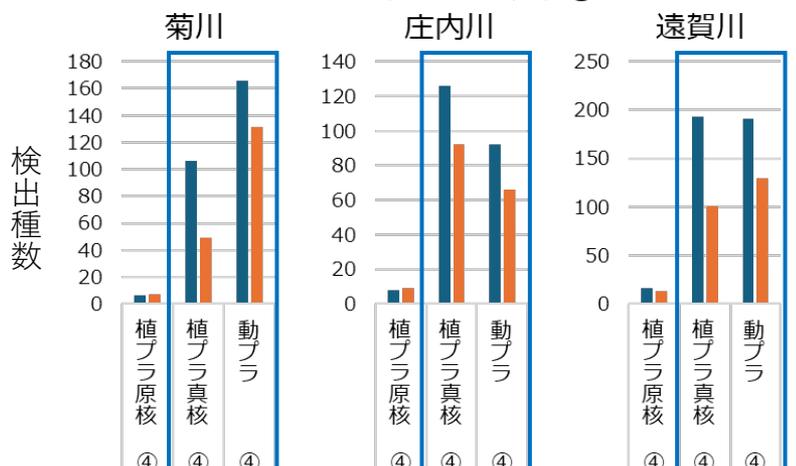
プライマーセット②



プライマーセット③



プライマーセット④



✓ 国土交通省が直轄管理する河川及びダム湖において現地採水を実施し、水国調査の調査対象である13の分類群について環境DNA分析を実施した。

- 採水頻度：年2回（夏季、冬季）
- 分析検体数：ダム湖3か所×2地点×2回 = 12検体
河川3か所×3地点×2回 = 18検体
干潟（海水試料）5か所×2地点×2回（小櫃川干潟は1回） = 18検体
合計11か所、25地点、48検体
- 分析項目：水国調査のすべての調査項目（魚類、両生類、爬虫類、哺乳類、鳥類、昆虫類（水生・陸上）、甲殻類、環形動物、貝類、植物、ダム湖は植物プランクトン（原核・真核）、動物プランクトンを追加）
- 分析方法：多分類群一斉分析法（一部の試料のみ分類群ごとの個別分析も実施）

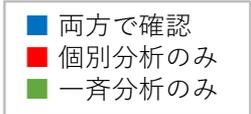
ダム湖と河川の採水地点は、原則として水国調査地点近傍に設定した

✓ 河川環境データベースに収録されている従来調査（採捕調査）の過年度調査結果と比較し、①両者で確認された種、②水国調査（採捕）のみで確認された種、③環境DNA調査のみで確認された種の3区分に分けた上で、分類群別にカバー率を求めて環境DNA調査の現場適用性を検証した。

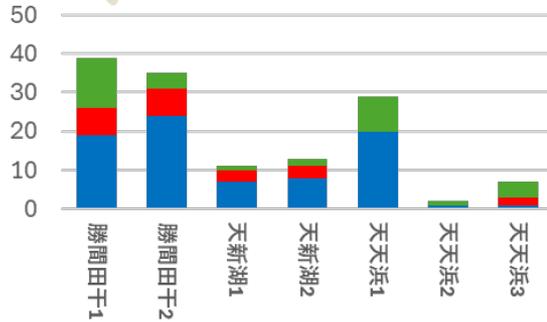
| 区分 | 都道府県 | ダム名・河川名 | 地点数 | 調査回 |
|-----|------|---------|-----|--------|
| ダム湖 | 愛知 | 新豊根ダム | 2 | 2（夏・冬） |
| ダム湖 | 愛知 | 矢作ダム | 2 | 2（夏・冬） |
| ダム湖 | 鹿児島 | 鶴田ダム | 2 | 2（夏・冬） |
| 河川 | 静岡 | 天竜川 | 3 | 2（夏・冬） |
| 河川 | 三重 | 鈴鹿川 | 3 | 2（夏・冬） |
| 河川 | 福岡 | 矢部川 | 3 | 2（夏・冬） |
| 干潟 | 静岡 | 勝間田川河口 | 2 | 2（夏・冬） |
| 干潟 | 三重 | 朝明川河口 | 2 | 2（夏・冬） |
| 干潟 | 福岡 | 筑後川河口 | 2 | 2（夏・冬） |
| 干潟 | 東京 | 多摩川河口 | 2 | 2（夏・冬） |
| 干潟 | 千葉 | 小櫃川河口 | 2 | 1（夏） |
| 合計 | | | 25 | |

※カバー率 = ① ÷ ② × 100

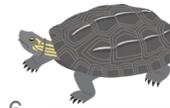
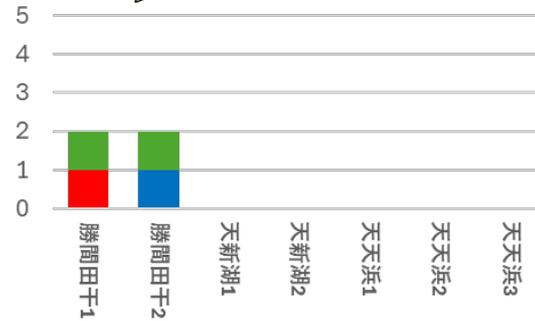
- ✓ 多分類群一斉分析法の検出感度を確認するため、同一の試料を分類群ごとに個別に分析した結果と比較した。その結果、個別分析でのみ検出された種が散見され、一斉分析ではある程度の偽陰性が生じていることが明らかとなった。



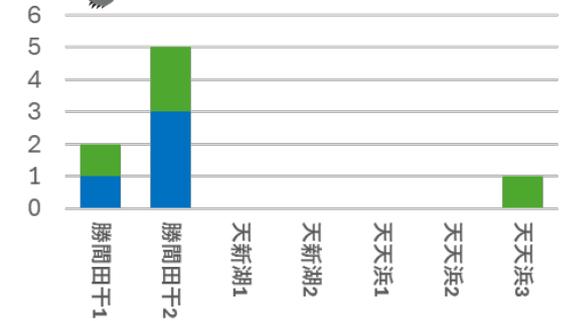
魚類



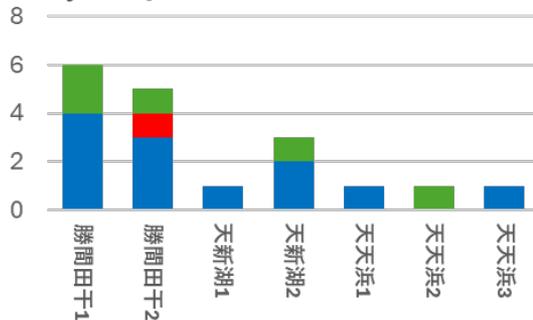
両生類



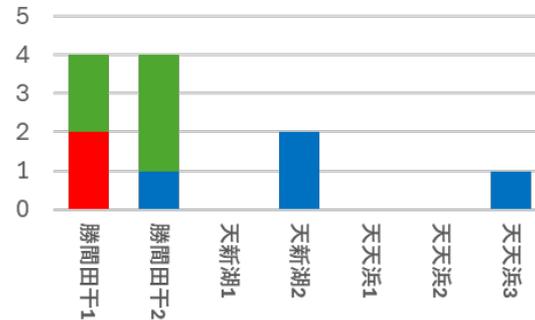
爬虫類



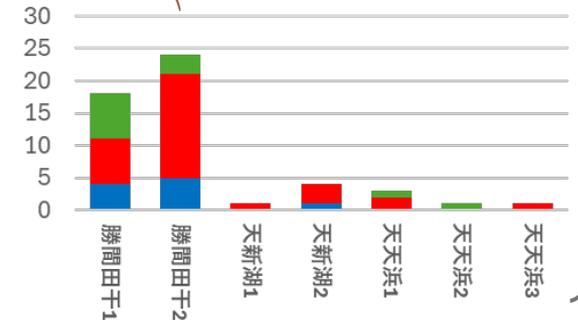
哺乳類



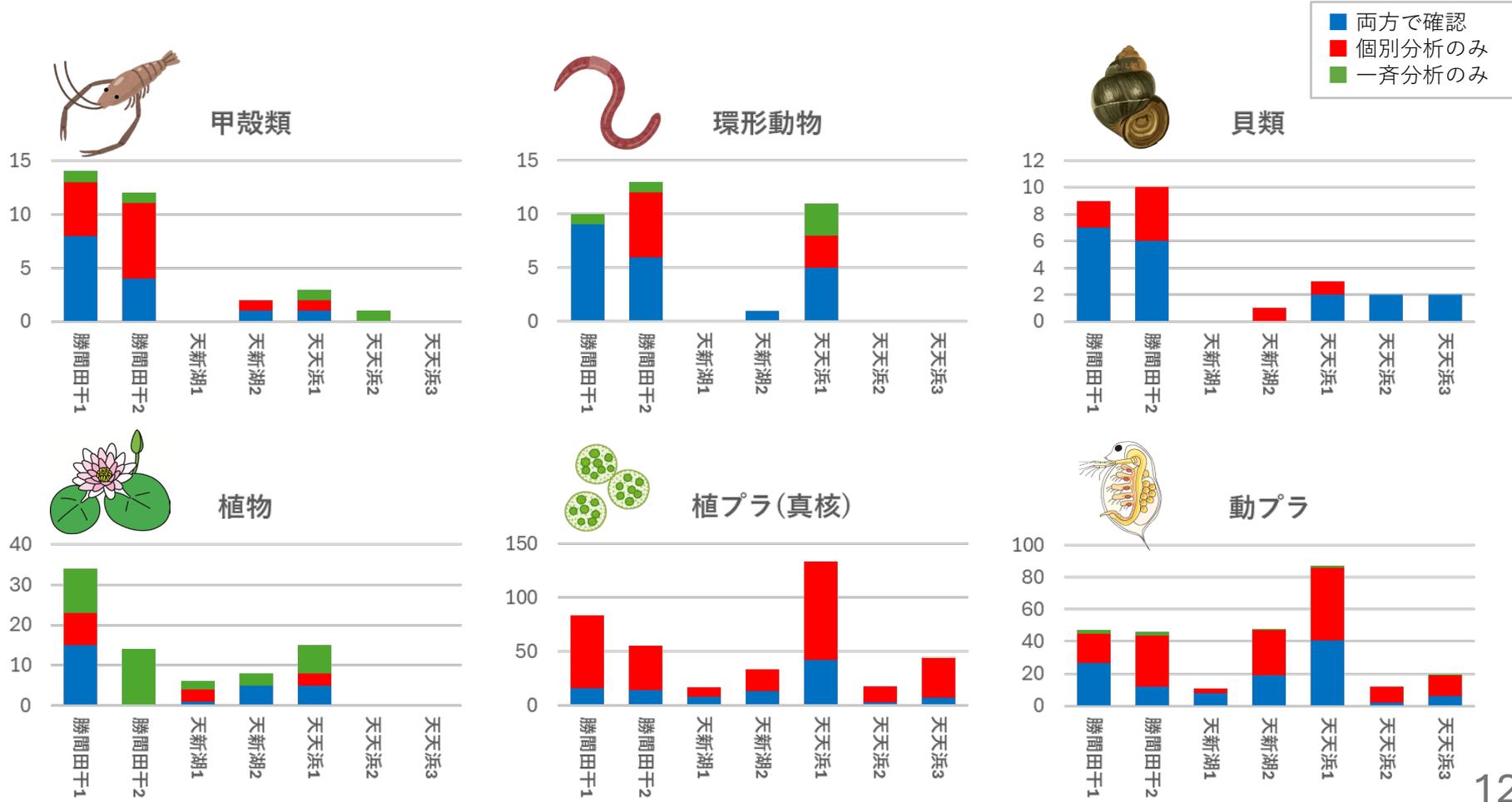
鳥類



水生昆虫



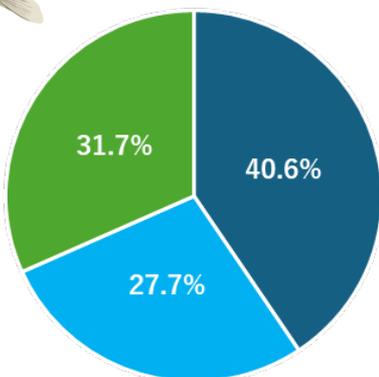
- ✓ 偽陰性は、総種数が多い試料で生じる割合が高いことから、相対的にDNA濃度が低い種が一斉分析では検出しにくくなっているものと考えられた。この傾向は、脊椎動物に比べて、無脊椎動物で顕著であった。
- ✓ 検出感度を優先したい場合は、分類群ごとに個別に分析する必要がある。



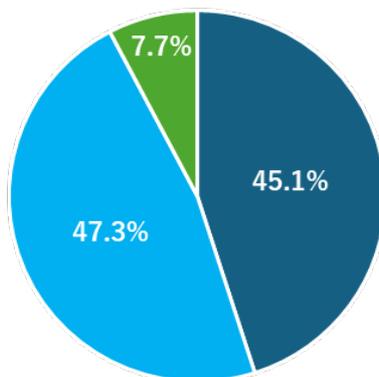
- ✓ 魚類は、採捕のみで確認された種（すなわち環境DNAが検出できなかった種）には、河口地点に生息する汽水性魚類の割合が多かった。
- ✓ 環境DNAのみで確認された種には、ダムへの流入河川側に生息する種や採捕が難しい種（例：ニホンウナギ）が含まれていた。



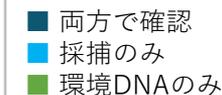
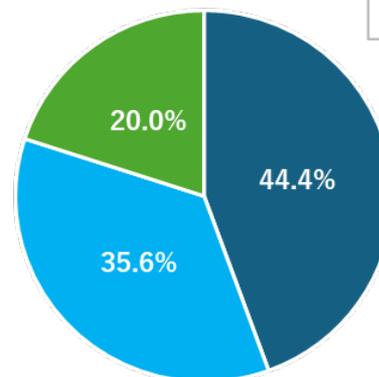
魚_矢部川



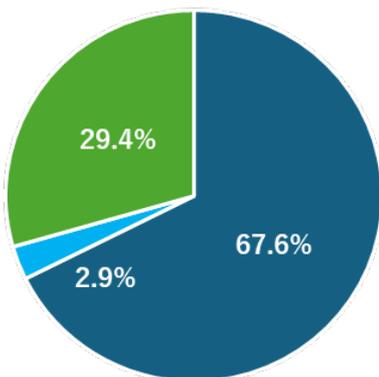
魚_鈴鹿川



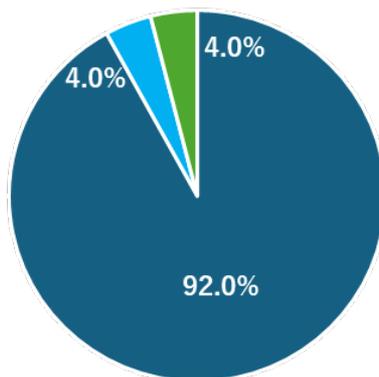
魚_天竜川



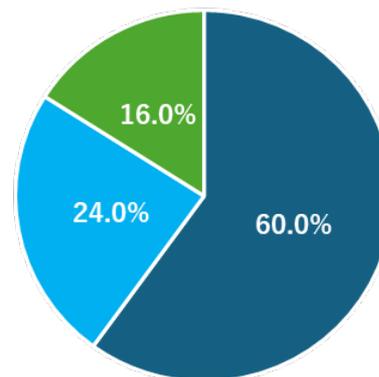
魚_鶴田ダム



魚_矢作ダム



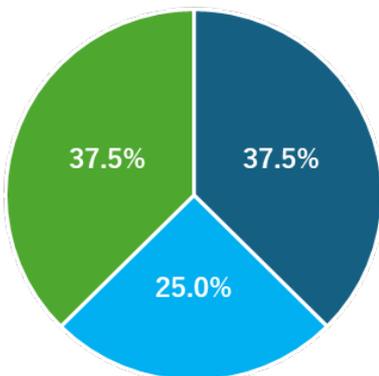
魚_新豊根ダム



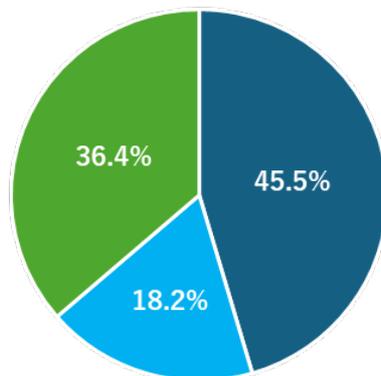
- ✓ 両生類は、採捕調査での確認種数（カバー率の分母）が元々少ないこと、採捕調査地点と採水地点の位置が異なることから、カバー率のばらつきが大きい。
- ✓ タゴガエルやカジカガエルが特に検出されにくかった。採水時期（夏・冬）には、すでに成体が陸上に上がっている種が多かったことが影響している？



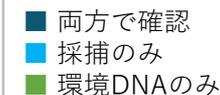
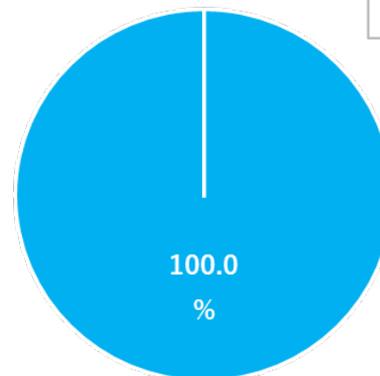
両生_矢部川



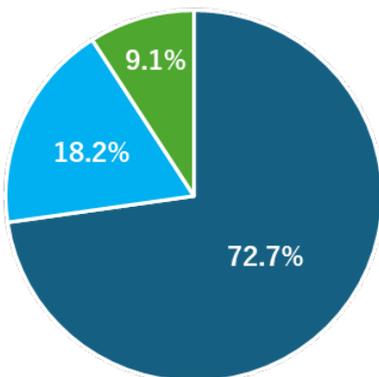
両生_鈴鹿川



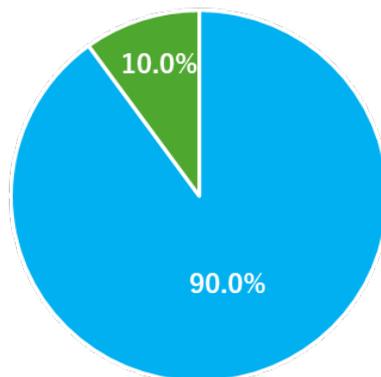
両生_天竜川



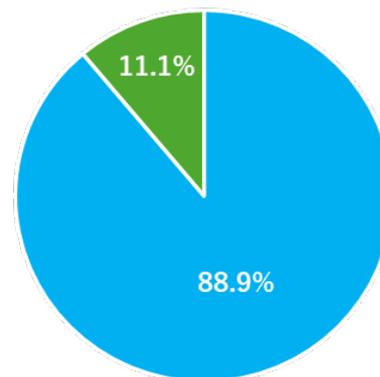
両生_鶴田ダム



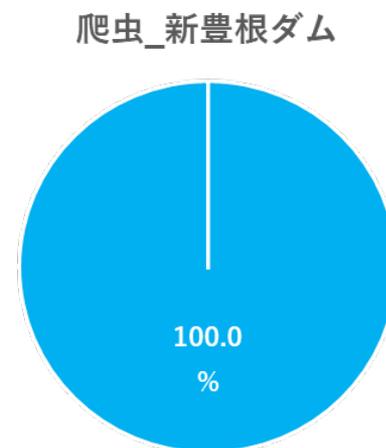
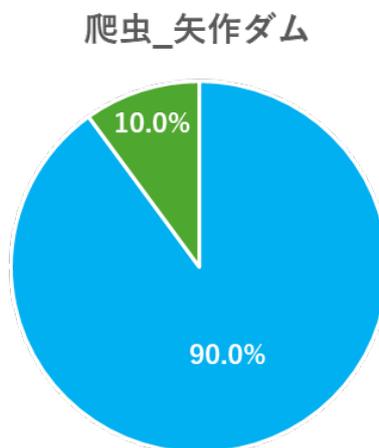
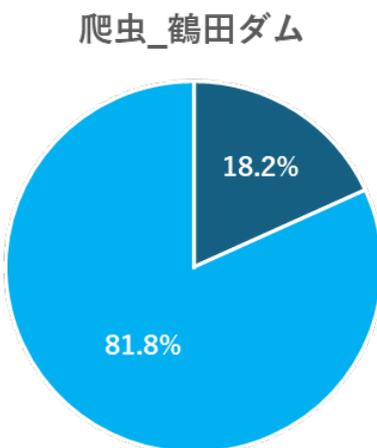
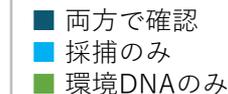
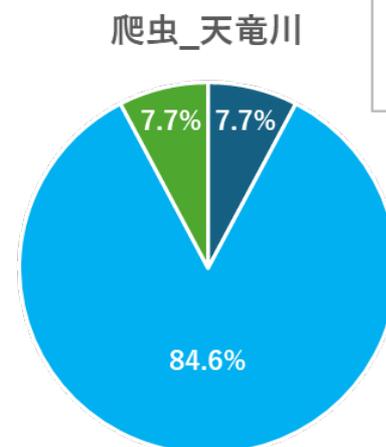
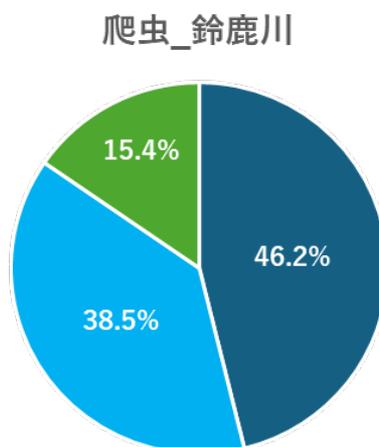
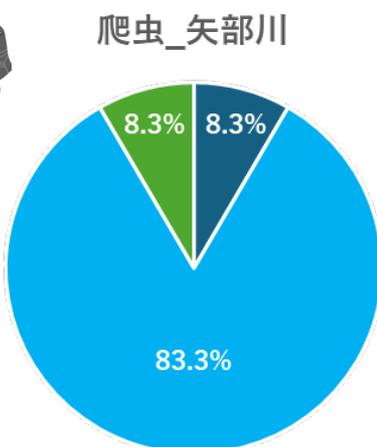
両生_矢作ダム



両生_新豊根ダム



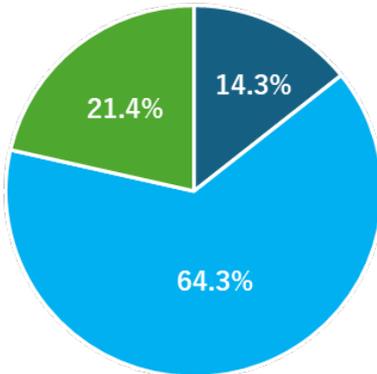
- ✓ 爬虫類もカバー率のばらつきが大きい。水辺やその周囲に生息するカメ類・ヘビ類は検出されるが、トカゲ類は全く検出されなかった。
- ✓ 採捕が難しいニホンスッポンは、複数の地点において環境DNAのみで確認された。



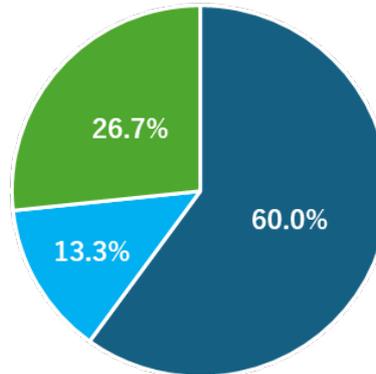
- ✓ 哺乳類は、生息密度が高いネズミ類、イノシシ、ニホンジカのカバー率が高いが、ムササビ、コウモリ類など滅多に地上に降りない種は検出できていない。
- ✓ 環境DNAのみで確認された種には、水への依存度が高い種（カワネズミ、ヌートリア）や従来調査で確認することが難しい種（スナメリ）が含まれていた。



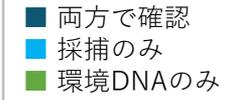
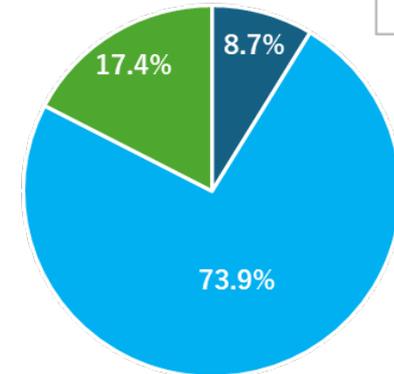
哺乳_矢部川



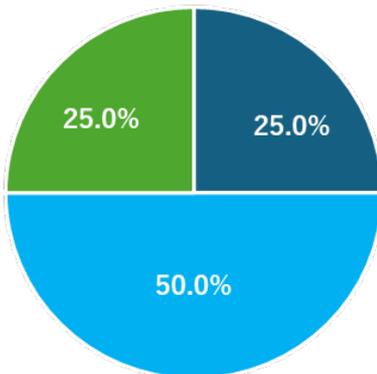
哺乳_鈴鹿川



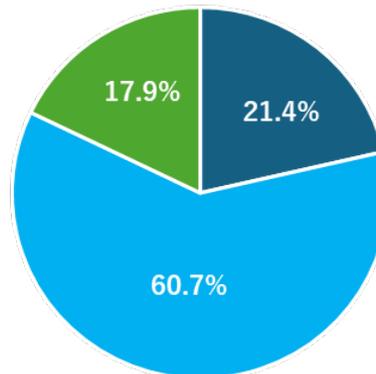
哺乳_天竜川



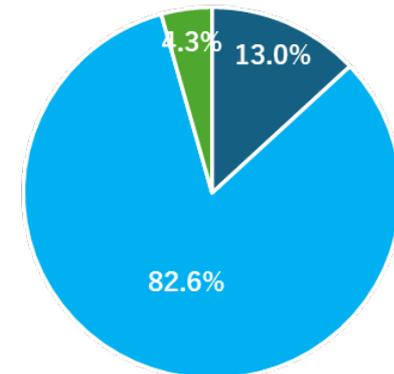
哺乳_鶴田ダム



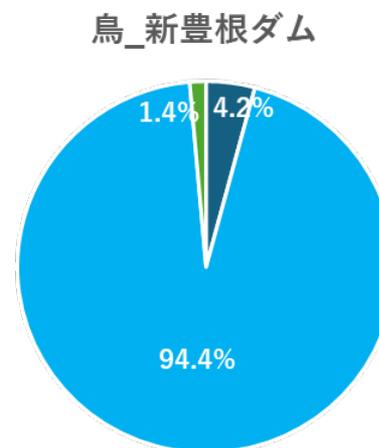
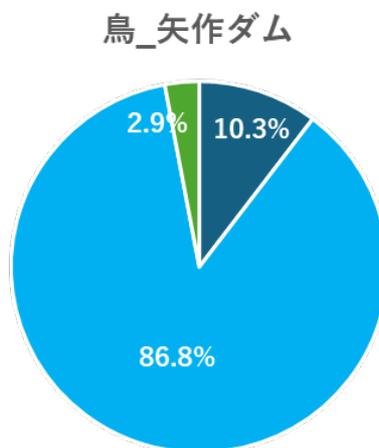
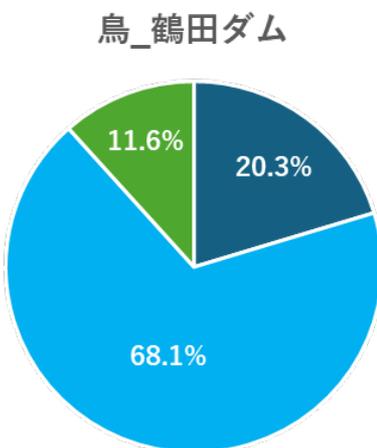
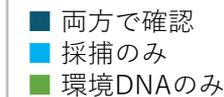
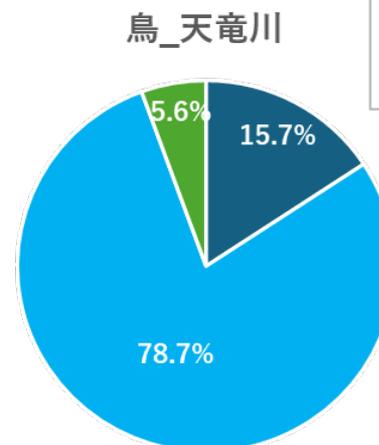
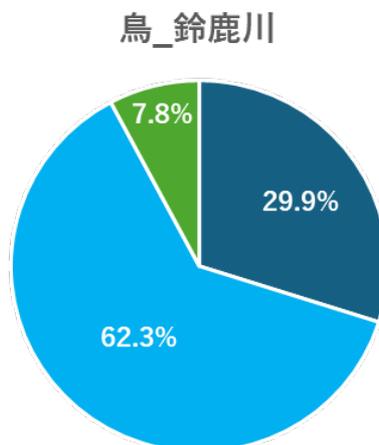
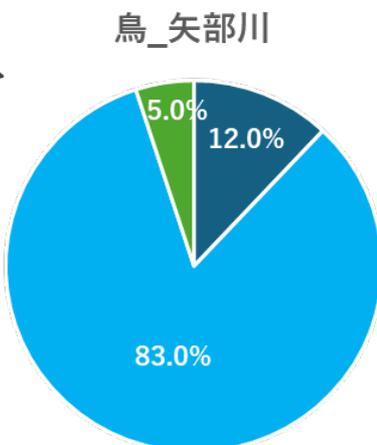
哺乳_矢作ダム



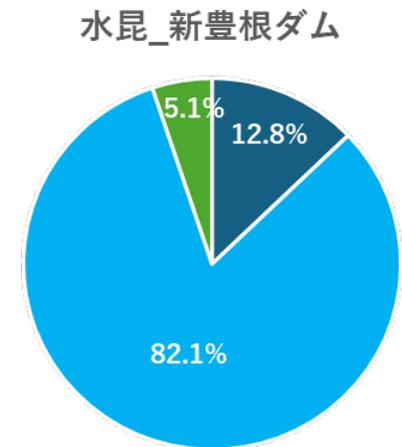
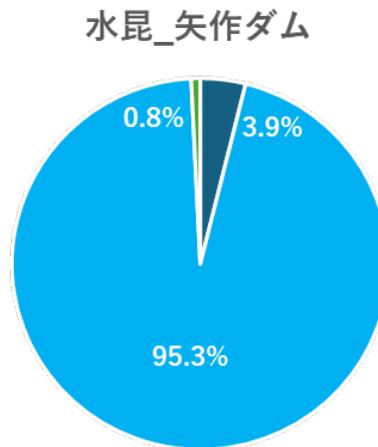
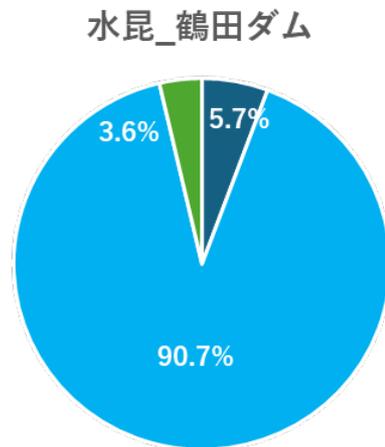
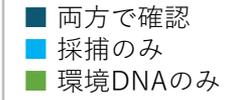
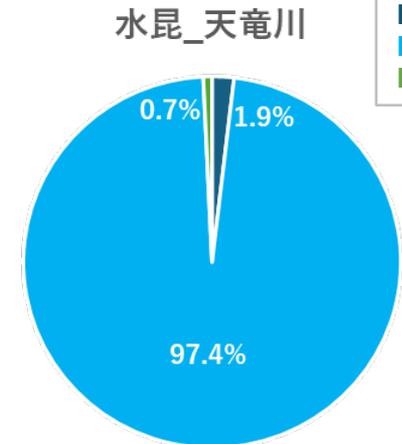
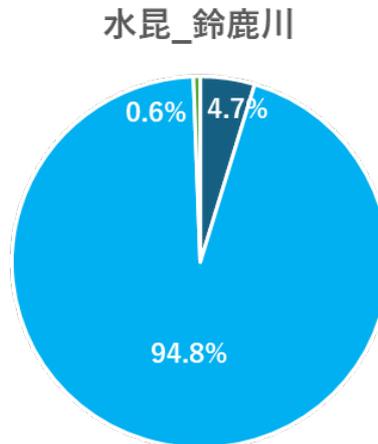
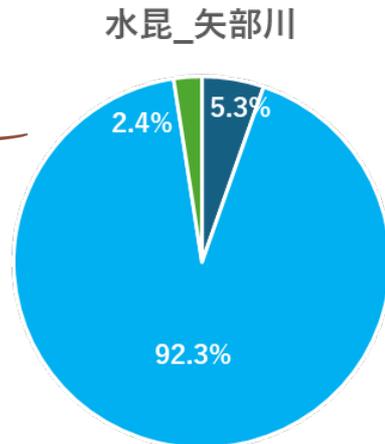
哺乳_新豊根ダム



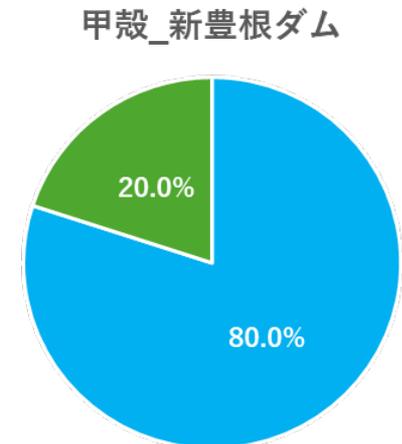
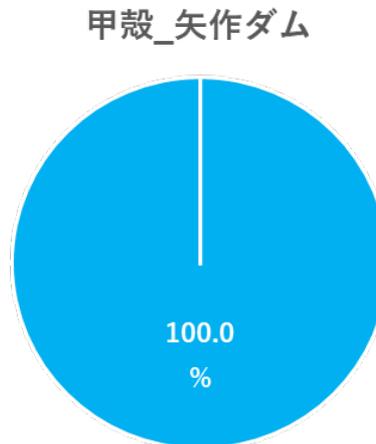
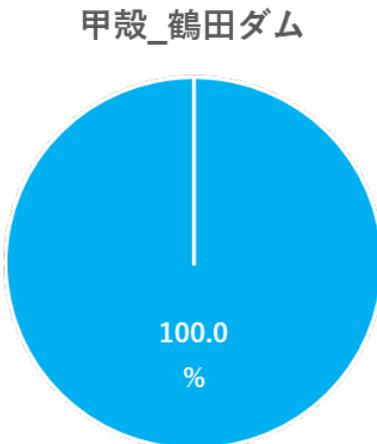
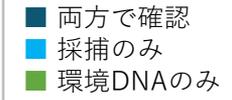
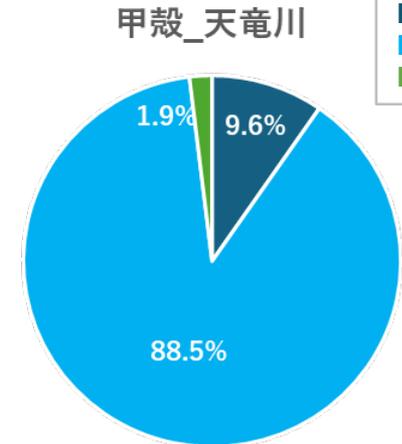
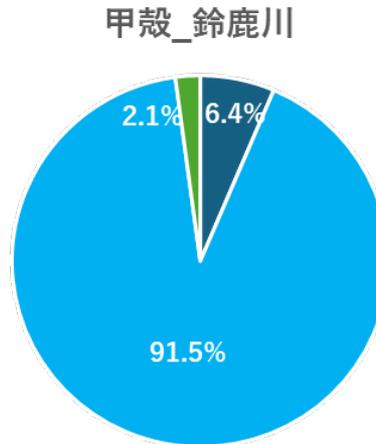
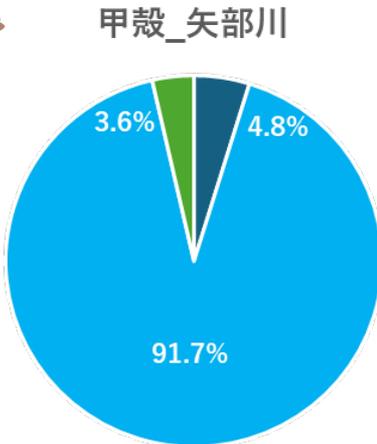
- ✓ 鳥類は、一般的に"水鳥"と呼ばれるカモ類、カイツブリ、サギ類、ウ、バンのほか、生息密度が高いカラス、ヒヨドリ、スズメなどはカバー率が高かったが、それ以外の森林性の種はほとんど検出されなかった。



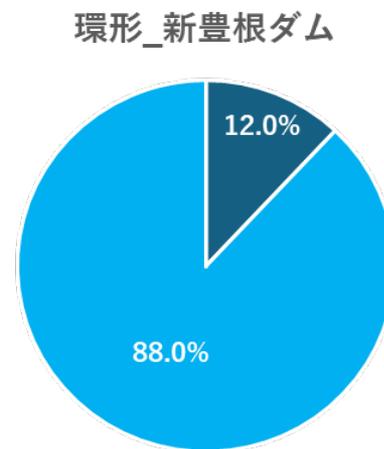
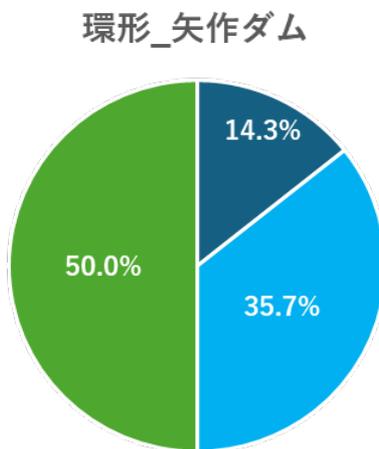
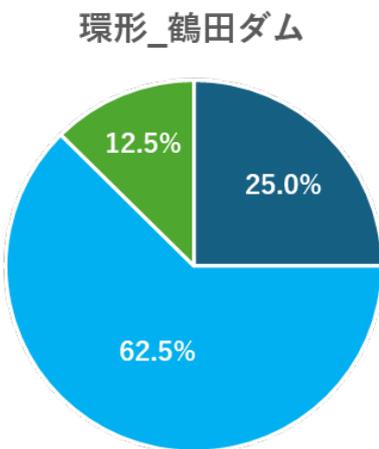
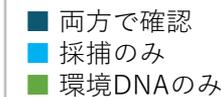
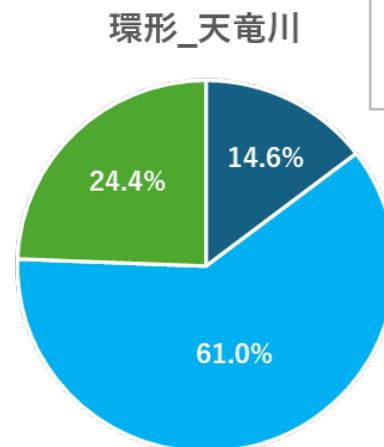
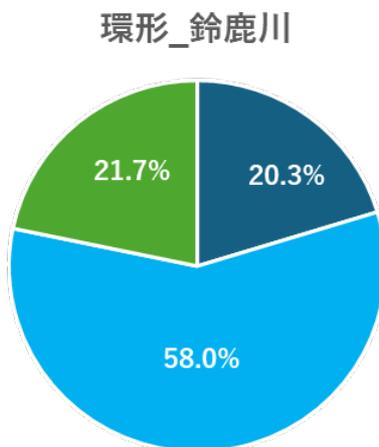
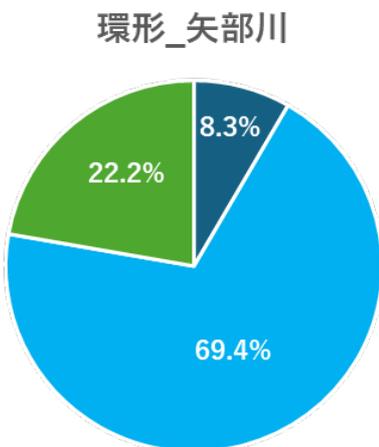
- ✓ 陸上昆虫は、ほぼ検出されない。水生昆虫（底生動物調査で確認された種）も、カバー率はどの地点もおおむね低いが、採捕調査での確認種数が過大評価になっている可能性もある。
- ✓ その上で、カバー率が高い種には、カゲロウ類がほとんどを占めていた。



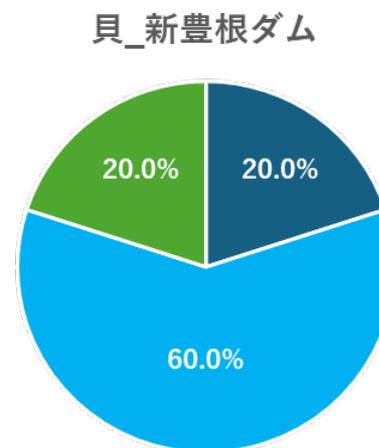
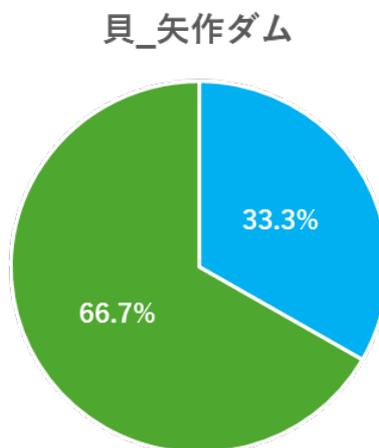
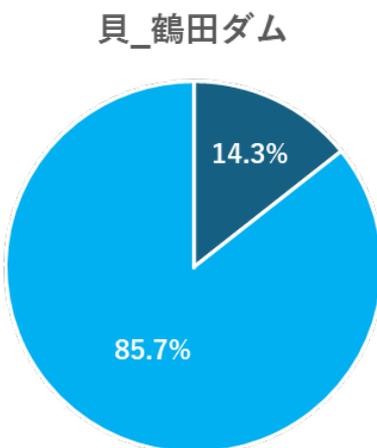
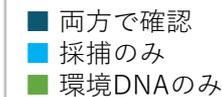
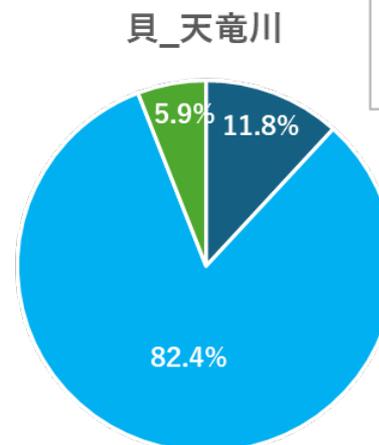
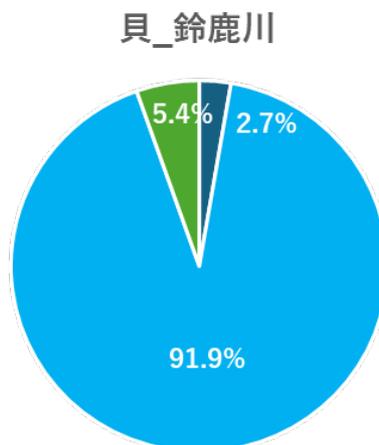
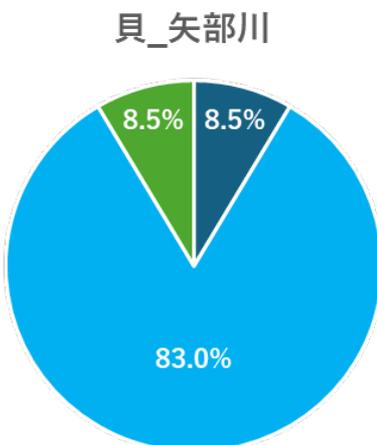
- ✓ 甲殻類は、採捕調査の確認種数が多い河川においても、カバー率は低い。生息密度が比較的高いと思われるヨコエビ類が全く検出されていない（プライマーの問題？リファレンスの問題？）。
- ✓ その上で、カバー率が高い種には、ヌマエビ類、モクズガニなどが該当した。



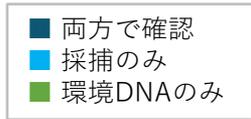
- ✓ 環形動物（ゴカイ・ヒル・ミミズ類）では、水中生活者で生息密度も高いミズミミズ類のカバー率が総じて高い。
- ✓ 環境DNA調査において高いリード数で検出されているにもかかわらず、一致率が97%以下のために種同定ができなかった配列が非常に多かった。



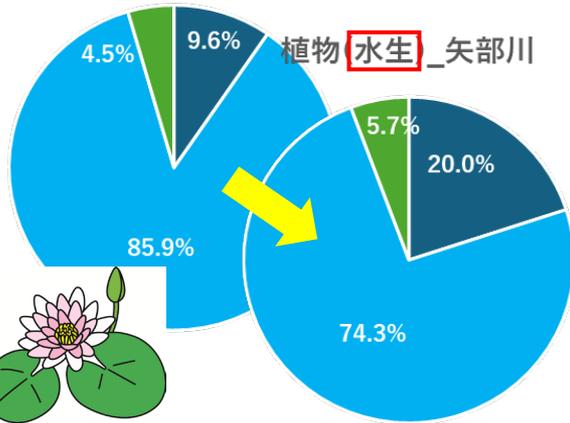
- ✓ 貝類は、ホトトギスガイ、カワヒバリガイ、タイワンシジミのように群体を形成する種ではカバー率が高かったが、それ以外の種（特に腹足類）はほとんど検出されなかった。なお、鈴鹿川では環境DNAのみでドブガイ類が検出されており、採捕が難しい種を捕捉できていた。



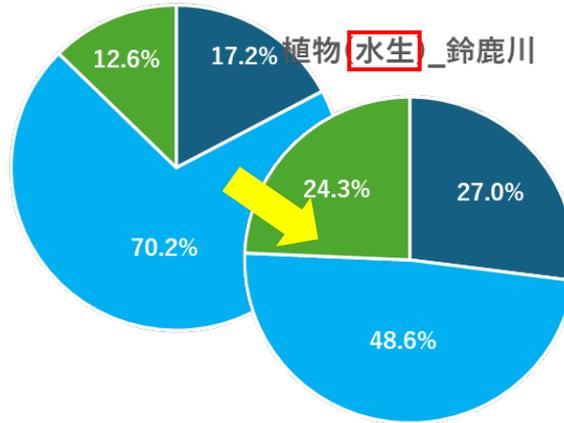
- ✓ 植物（陸上・水生）は、カバー率はどの地点もおおむね低いが、従来調査での確認種数が過大評価になっている可能性もある。
- ✓ 水生植物に限定すると、いずれの地点もカバー率が上昇する。特に沈水植物のカバー率が高く、環境DNAのみで検出される種も複数確認された。



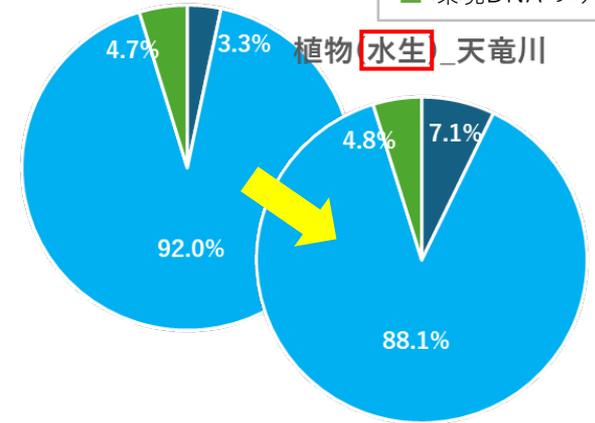
植物_矢部川



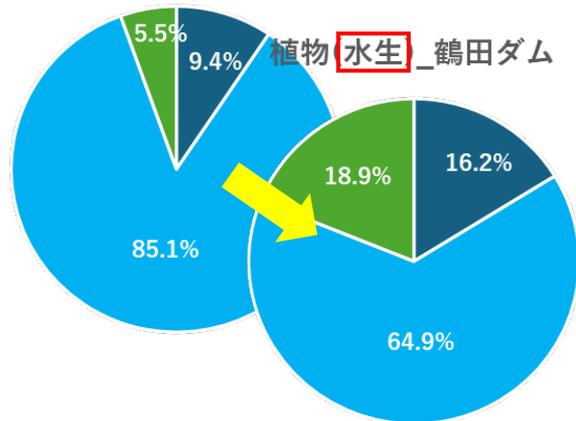
植物_鈴鹿川



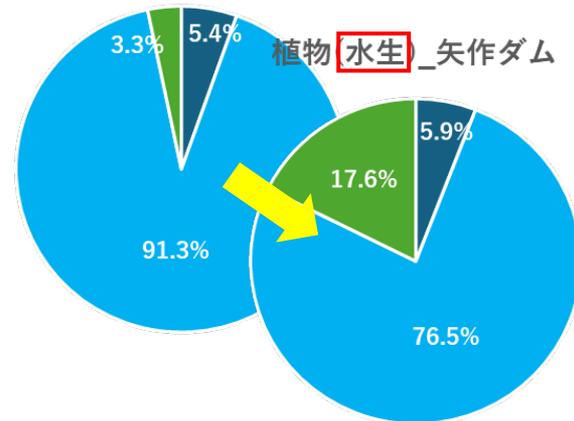
植物_天竜川



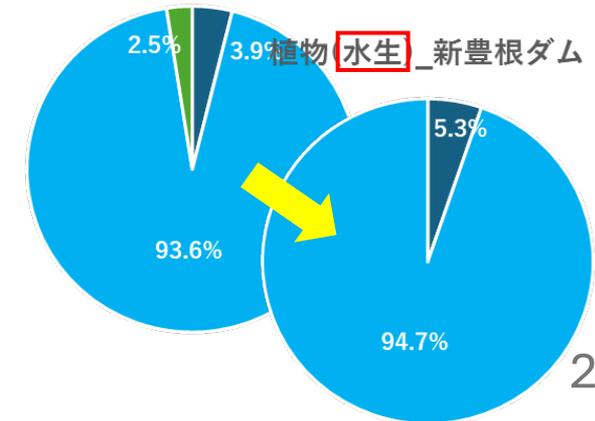
植物_鶴田ダム



植物_矢作ダム



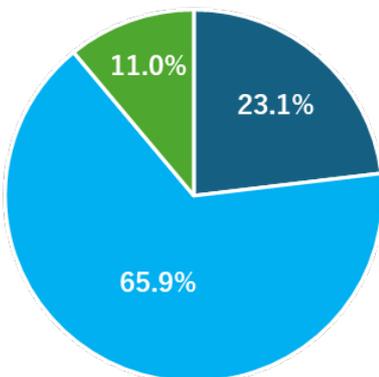
植物_新豊根ダム



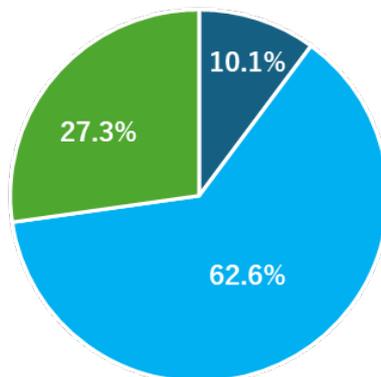
- ✓ 動・植物プランクトンは、従来調査では科や目以上の高次分類群までしか同定できていないものが多く、環境DNA調査の結果との比較が困難なものが多い。
- ✓ さらに、環境DNA調査において高いリード数で検出されているにもかかわらず、一致率が97%以下のために種同定ができなかった配列が非常に多かった。



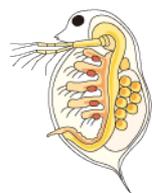
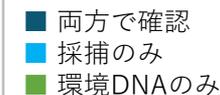
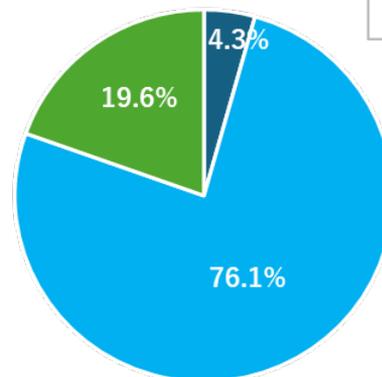
植プラ_鶴田ダム



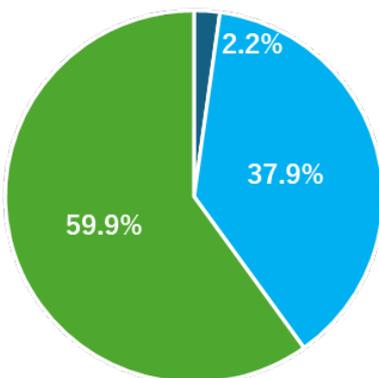
植プラ_矢作ダム



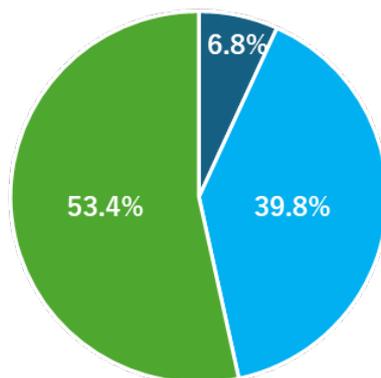
植プラ_新豊根ダム



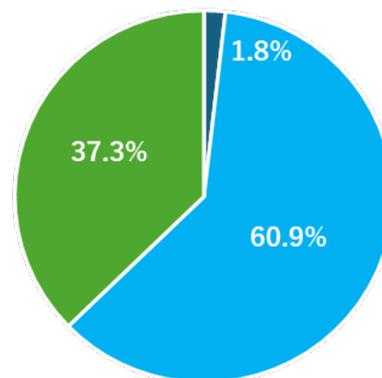
動プラ_鶴田ダム



動プラ_矢作ダム



動プラ_新豊根ダム



- ✓ 多分類群一斉分析法を採用した場合における環境DNA調査の現場適用性を整理した。全体的な傾向としては、生物量が大きい種や水への依存度が高い種は環境DNAが検出されやすい傾向にあると推察された。

| No. | 検出対象 分類群 | 現場適用性 の判定※1 | リファレンス 整備率※2 | 課題 |
|-----|-------------|----------------|-------------------|--|
| 1 | 魚類 | ◎ | 92.3% | さらに偽陰性を減らすには採水方法・頻度・地点の工夫が必要。 |
| 2 | 両生類 | ○ | 87.6% | 採水する時期に工夫が必要。サンショウウオ類のリファレンス不足。 |
| 3 | 爬虫類 | ○ | 55.9% | カメ・ヘビ類には有効だが、トカゲには不向き。リファレンスの不足。 |
| 4 | 哺乳類 | ○ | 66.4% | 水生哺乳類には有効だが、コウモリ類には不向き。 |
| 5 | 鳥類 | ○ | 65.8% | 水鳥類には有効だが、水辺に近寄る頻度が少ない種には不向き。 |
| 6 | 陸上昆虫類 | × | — | 偶発的にしか検出できず、それらも死体や魚類等の糞由来の可能性もある。 |
| 7 | 水生昆虫類 | △ | — | リファレンスの不足。節足動物はDNA放出量が少ない？ |
| 8 | 甲殻類 | △ | 28.3% | リファレンスの不足。節足動物はDNA放出量が少ない？ |
| 9 | 環形動物 | ○ | 13.4% | リファレンスの不足。増幅断片長の長さ(約400bp)が検出に影響？ |
| 10 | 貝類 | △ | 34.1% | リファレンスの不足。増幅断片長の長さ(約400bp)が検出に影響？ |
| 11 | 植物 | ○ | 水生植物のみ (68.4%) | 水生植物・コケ類には有効だが、陸上植物には不向き。 リファレンスの不足。増幅断片長の長さ(約400bp)が検出に影響？ |
| 12 | 植プラ | △ | — | リファレンスの不足。調査間で分類レベルのずれがあり結果の比較が困難。 |
| 13 | 動プラ | △ | — | リファレンスの不足。調査間で分類レベルのずれがあり結果の比較が困難。 |

※1 現場適用性の判定は、現時点におけるものであり、かつ、多分類群一斉分析法を用いた時の評価である。

※2 R6水国調査生物リスト掲載種数に対しての国際DNAデータベースに登録されている種数の割合を示した。

- ✓ 研究テーマ①では、「環形動物（ゴカイ類・ヒル類・ミミズ類）」と「爬虫類」の2つの分類群を検出対象とした網羅的解析のためのユニバーサルプライマーを開発した。これにより、**水国調査における生物調査の対象となっている11分類群（ダムは13分類群）すべてで、網羅的解析が適用可能となった。**
- ✓ 研究テーマ②では、将来的に魚類以外の生物分類群にも環境DNA調査の適用範囲を広げることを想定し、かつ、調査の効率化と分析コストの削減を考慮した分析方法として、多分類群一斉分析法の開発を試みた。これにより、**13分類群を最小で4つのセットに分けて、複数の分類群をまとめて1回の分析で同時に検出することが可能であることを示した。**
- ✓ この多分類群一斉分析法を用いて、国土交通省が直轄管理する河川及びダム湖、さらには沿岸域への適用も検討するために河口干潟においてに採水した試料を環境DNA分析し、河川環境データベースに収録されている従来調査（採捕調査）の過年度調査結果に対する検出状況を評価した。
- ✓ 検出状況は分類群によってそれぞれ特有の傾向を示し、**脊椎動物（魚類・両生類・爬虫類・哺乳類・鳥類）では適用性が比較的高かったものの、無脊椎動物では従来調査に並ぶほどの検出精度ではなかった。**
- ✓ 水国調査の全項目に対して環境DNA調査を適用することに関して、現時点では検出精度に問題がある分類群が残るものの、**リファレンスの整備が大きく進めば、水生無脊椎動物への現場適用性がさらに改善されることが期待された。**

1. Miya M, et al. (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*. 2:150088. 1-33.
2. Ushio M, Fukuda H, Inoue T, et al. (2017) Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular Ecology Resources*, 17(6):e63-e75.
3. Ushio M, Murata K, Sado T, Nishiumi I, Takeshita M, Iwasaki W, Miya M (2018) Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports*, 8: 4493.
4. Takenaka M, Yano K, Suzuki T, et al. (2023) Development of novel PCR primer sets for DNA barcoding of aquatic insects, and the discovery of some cryptic species. *Limnology* 24, 121–136.
5. Komai T, Gotoh RO, Sado T, Miya M (2019) Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding and Metagenomics* 3: e33835.
6. Sakata MK, Kawata MU, Kurabayashi A., Kurita T, Nakamura M, Shirako T, Kakehashi R, Nishikawa K, Hossman MY, Nishijima T, Kabamoto J, Miya M, Minamoto T (2022) Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia. *Metabarcoding and Metagenomics* 6: e76534.

7. Cheng T, et al. (2016) Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16(1): 138–149.
8. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glockner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1): e1.
9. Amaral-Zettler LA, McCliment EA, Ducklow HW, Huse, SM (2009) A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PLoS ONE*, 4: e6372.
10. Eastwood N, Kissane S, Campbell L, Briscoe AG, Egeter B, Orsini L (2024) Single metabarcoding multiplex captures community-level freshwater biodiversity and beyond. *Environmental DNA*, 6(1): e515.