

<特集>環境DNAを用いた環境調査の現状と展望

マクロ生物調査のための環境DNA分析

—種の検出と定量およびその他の応用における可能性と課題—

深谷 肇一

(国立環境研究所 生物多様性領域)

1. はじめに

水や土壌、空気などの環境中から抽出されるDNAのことを環境DNAと呼ぶ¹⁾。その実態は、様々な生物に由来する、多様な状態で存在するDNAが混ざったものである。環境中に生息する微生物そのものや、マクロ生物の体から環境中に遊離した組織の一部や細胞など、または細胞から遊離した状態で存在するDNA分子などが含まれる。環境DNA分析は、こうした環境DNAを集めて分析することで、生物の分布や遺伝情報、生理状態などの手がかりを得るための手法である。環境DNA分析はもともと、環境中の微生物や、安定環境下で長期保存された古生物のDNAを対象に行われていたが、近年は現生のマクロ生物への応用が大きく発展した。フランスのウシガエル個体群を対象に環境DNA分析の適用可能性を示した研究²⁾が発表されて以降、魚類や哺乳類、昆虫などの無脊椎動物、植物などを含む幅広い分類群に環境DNA分析が応用されている³⁻⁴⁾。マクロ生物の環境DNA分析は、対象種の目視や捕獲などによって行われてきた従来の生物調査に比べて、簡便で感度の高い、また生態系への影響が少ない新たな調査方法として、その利用が急速に拡大している。ここでは、現生のマクロ生物を対象とした、主に水域での環境DNA分析の応用に焦点を当て、その現状と課題を述べる。環境DNA分析の技術的な詳細については他の解説やマニュアルなど(例えば文献 5-6)を参照してほしい。

2. 環境DNA分析の手順とアプローチ

環境DNA分析を行うためには、まず水などの環境試料を収集し、試料に含まれるDNAを抽出して分析用のサンプルを生成する必要がある。手順の詳細は試料の種類などによって異なるが、例えば河川水を対象とする場合は、1L程度の水をフィルターでろ過した後、フィルターからDNAを抽出して精製する。こうして得られるサンプルの中には、河川水に含まれていた環境DNAが濃縮され、純度が高められた状態で存在するため、遺伝子実験によるDNA分析に供することができる。

サンプル中のDNAの分析方法として、PCRを用いて短いDNA配列を増幅するアプローチが広く用いられている。増幅の標的となるDNA配列はミトコンドリアDNAや葉緑体DNAの特定の遺伝子領域(例えばミトコンドリアの場合は、COIやcytb, 12S rRNAなど)に含まれる100~400bp程度であることが多いが、核DNAの配列を標的とする場合もある。PCRを用いた環境DNAの分析手法は、単一の種のDNA配列のみを増幅して検出する種特異的手法と、多数の種のDNA配列を同時に増幅してその配列を決定する網羅的手法の2つに大別される。

種特異的手法では、対象種のDNA配列のみを選択的に増幅するように設計された種特異的プライマーを用いてPCRを行うことで、サンプルに含まれる対象種のDNA配列を検出する。リアルタイムPCRやデジタルPCRなどの定量性の高いPCR法が利用されることが多く、しばしば対象種のDNA配列の濃度(単位試料体積当たりの配列コピー数など)が定量的に計測される。

網羅的手法では、対象の分類群のDNA配列をまとめて増幅するように設計されたユニバーサルプライマーを用いてPCRを行う。増幅されたDNAの配列を次世代シーケンサーを用いて決定し、データベースに登録された既知の種のDNA配列と照合することで、DNA配列がサンプルに含まれる種を特定する。環境DNAとして存在する特定の遺伝子領域のDNA配列(DNAバーコード)を一度に多数読み取ることから、このアプローチは環境DNAメタバーコーディングと呼ばれている⁷⁾。ただしこの方法では、データベースに配列が登録されていないなどの理由により、検出されたDNA配列を種に割り当てられない場合も生じうる。

2つの手法は一般に、目的などに応じて使い分けられる。種特異的手法は、簡便かつ迅速な分析手順によって対象種のDNAを感度良く検出・定量でき、少数の種に着目した個体群レベルの研究やモニタリングに適している。一方、網羅的手法は、少ない労力で生息種の一覧を作成でき、群集レベルの研究やモニタリングに適している。

3. 環境DNA分析の応用

3.1 種の分布と多様性の評価

環境DNA分析は、周辺環境における種の生息(在・不在)を確認する目的で広く利用されている。環境DNA分析は種を高い感度で検出できることから、特に個体密度の低い種の調査において従来手法より有効である。この特徴は希少種の生息地の把握や外来生物の分布拡大の監視などにおいて重要であり、生物多様性保全や生態系管理の取り組みを効率化できる⁸⁻⁹⁾。また環境DNA分析は、生息環境へのアクセスが困難であるなどの理由により発見や観察が難しい種の調査においても高い効果を発揮し、研究の進んでいない種の生態の解明にも役立つと考えられる¹⁰⁻¹¹⁾。さらに環境DNA分析は、野外で求められる作業が簡便で広域・多地点での調査も比較的容易に実施できることから、種の分布評価や生物多様性モニタリングの規模や密度を向上できる。

環境DNA分析によって示唆される種の分布や多様性は、一般に、捕獲などの従来手法による調査の結果と大きくは矛盾しないと考えられ(例えば文献12))、環境DNA分析による種検出の有効性や妥当性は現在では広く受け入れられている。しかし、環境DNA分析では、種の生息について誤った認識につながる可能性のある検出誤差が生じうることには注意が必要である。種の検出誤差には、生息する種(の環境DNA)が検出されない偽陰性と、生息しない種(の環境DNA)が検出される偽陽性がある。偽陰性と偽陽性は環境DNA分析の様々な段階で生じる可能性がある¹³⁻¹⁴⁾。例えば、野外での試料収集の段階では、DNA濃度の不均一性が原因で偽陰性が生じることや、上流からのDNAの輸送や生活排水などによるDNAの流入が原因で偽陽性が生じることなどが考えられる。遺伝子実験の段階では、サンプルにPCR阻害物質が含まれることが原因で偽陰性が生じることや、サンプル処理の過程におけるコンタミネーションが原因で偽陽性が生じることなどが考えられる。次世代シーケンサーによる配列決定を行う網羅的手法では、PCR増幅効率の種間不均一性や、シーケンスエラー、不十分なシーケンス深度、塩基配列データベースの不完全性などが検出誤差の要因となりうる。

検出誤差は必ずしも環境DNA分析に固有の問題ではないが、対象種の生息を直接確認しない環境DNA分析では、検出誤差の発生を最小限に抑えることに加えて、データに誤差が含まれる可能性を考慮して注意深く結果を解釈することが重要である。検出誤差の発生を最小化するための取り組みとして、環境DNA分析の手順やバイオインフォマティクス解析の高度化と最適化が進められている¹⁵⁻¹⁶⁾。検出誤差を含むデータから種の分布を確実に評価するための方法として、検出誤差を考慮した統計解析手法が提案されている¹⁷⁻¹⁸⁾。

3.2 種の個体群サイズの評価

種の個体数や個体密度、または生物量(これらは種個体群の異なる特性であるが、以下ではまとめて個体群サイズと呼ぶ)の評価に環境DNA分析を利用する試みも進められている。種特異的手法を用いた研究では、環境DNAの濃度と種の個体群サイズの間には正の相関関係が広く見出されており¹⁹⁻²⁰⁾、環境DNAの濃度は周辺環境に生息する種の個体群サイズを大まかには反映するものと考えられる。しかし、この相関関係は、制御された実験環境に比べて、自然環境ではより不明瞭である¹⁹⁾。これは、環境DNAの放出や分解、輸送の過程が野外では様々に異なり、環境DNA濃度と個体群サイズの関係がより複雑であるためと考えられる¹⁹⁻²⁰⁾。そのため、自然環境で種の個体群サイズを確実に評価するためには、環境DNAの濃度を規定する要因として、水の流れ、種の空間分布や体サイズ分布、温度などの環境因子の影響を(それが重要な場合には)明示的に考慮したサンプリングと解析を行う必要がある²¹⁾。これらの要因を考慮せず、計測された環境DNA濃度を単純に個体群サイズの指標とみなすと、誤った結論に至る可能性がある。

一部の先行研究では、種特異的手法によって定量された環境DNA濃度から魚類の個体群サイズが推定されている。文献22)は、個体群サイズと環境DNA濃度の相関関係(ただし体サイズの違いによる個体のDNA放出率の不均一性を考慮したもの)に基づき、カナダにある12 haほどの広さの湖に生息するカワマス(*Salvelinus fontinalis*)の個体数を3,286匹、その全体の生物量を143kgとそれぞれ推定した。文献23)は、水の流れ、DNAの個体当たり放出率、分解率などを考慮した統計モデルを用いて、舞鶴湾に生息するマアジ(*Trachurus japonicus*)の個体数を2,230万匹と推定した。これらの応用では、環境DNA濃度のデータに加えて、体サイズ分布や、対象水域における水の流れ、放出率、分解率などに関する情報が推定のために追加で取得されている。少なくとも現在のところ、個体群サイズの絶対的な定量を目的とした用途では、環境DNA分析は従来の資源評価手法と比較して必ずしも性能や利便性が高いわけではない。

網羅的手法では、次世代シーケンサーで読み取られた種ごとのDNA配列の数(リード数と呼ばれる)がデータとして得られる。リード数は環境DNA分子の濃度を定量するものではない。また、ユニバーサルプライマーによるPCRの増幅効率は一般に種によって異なるため、各種のリード数の多寡をもって種の個体群サイズの大小を比較できるとも限らない。しかし経験的には、種の配列のリード数は群集における種の相対個体群サイズと相関することが多いようである²⁰⁾。また、最近では網羅的手法におい

てもDNA配列の濃度を定量可能な新しい技術がいくつか提案されている²⁴⁻²⁵⁾。こうした技術は同時に多数の種の環境DNAを定量できるため、種の個体群サイズを評価するための効果的で新しいアプローチとなるかもしれない。しかし、上で述べたように、環境DNAの濃度計測に基づき種の個体群サイズを確実に推定するためには、野外における様々な生物的・非生物的要因を考慮することが重要であり、これは多くの種が関係する場合には一層難しい問題となることが予想される。網羅的手法による種の個体群サイズの評価は今後の課題である。

4. 関連する技術発展と応用の広がり

4.1 水以外の環境試料の分析

水環境中の堆積物からは、水中の環境DNAの一部が沈降したものと考えられるDNAが検出される。堆積物中の環境DNAは、水中の環境DNAに比べて高濃度で存在し、また分解が制限されることで長期間に渡り検出可能な状態で残存する²⁶⁻²⁷⁾。堆積物コアの環境DNA分析では、異なる年代の試料を連続的に分析することで過去の個体群動態や生物相の変化を復元できる。例えば、別府湾の海底堆積物コアを分析した研究では、カタクチイワシ (*Engraulis japonicus*)、マイワシ (*Sardinops melanostictus*)、マアジの各種について、過去300年間におよび資源量の変化が推定されている²⁸⁾。古生物学の研究では、極地で収集された湖底堆積物コアの環境DNA分析により、過去数万年におよぶ生態系の変化が推測されている²⁹⁾。

空気中の環境DNAを分析した研究では、脊椎動物³⁰⁻³¹⁾、昆虫³²⁾、植物³³⁾などが検出されている。現在のところ空気中の環境DNAを分析した事例は限られているが、今後、手法の最適化が進むことで陸域での環境DNA分析の活用が広がるかもしれない。花や葉の食痕に付着した節足動物の環境DNAを分析することで、送粉や植食など、植物と昆虫の相互作用の手がかりが得られる³⁴⁻³⁵⁾。

4.2 遺伝的多様性の評価

環境DNA分析で種内の遺伝的変異を検出することもできる。例えば、日本のコイ (*Cyprinus carpio*) の個体群では、在来集団とユーラシア大陸産外来集団それぞれの遺伝子型の存在比を定量する手法が開発され、外来集団の侵入状況の広域評価や集団ごとの季節移動パターンの解明に利用されている³⁶⁻³⁷⁾。また、次世代シーケンサーを用いた集団のハプロタイプ多様性の評価も行われている³⁸⁻⁴⁰⁾。正確な評価のためにはPCRエラーやシーケンスエラーにより生じる偽陽性ハプロタイプを除去することが重要であるが、陽性対照の設定、デノイジング手法の適用、分子バーコードの利用など、いくつかの対処法が提案さ

れている^{38, 41-42)}。解決すべき技術的課題も多いが⁴³⁻⁴⁴⁾、組織サンプルの取得を必要としない簡便さは環境DNA分析の大きな利点と考えられる。将来的に、系統地理学研究や野生生物集団の遺伝的多様性モニタリングなどにおいて環境DNA分析が活用されるかもしれない。

4.3 環境RNA分析

マクロ生物の体からは、DNA分子に加えて、メッセンジャーRNAなどのRNA分子も周辺環境に放出されていると考えられる⁴⁵⁾。環境DNAと同様に、環境中に遊離したRNA分子(環境RNA)を対象とした分析も行うことができる。死んだ個体から放出される可能性があるDNAとは対照的に、RNAは代謝活性の高い生きた個体からのみ放出され、また環境中では速やかに分解されると考えられる。そのため、環境RNA分析を用いることで、環境DNA分析よりも種の検出を正確に行えるようになることが期待される⁴⁵⁾。河川における魚類のメタバーコーディングの事例では、調査地に生息しないはずの海水魚や汽水魚の検出が、環境RNA分析を用いることで効果的に抑制されることが示されている⁴⁶⁾。また、環境RNAは周辺環境に生息する個体の遺伝子発現に関する情報を与えることから、環境試料に基づき生物の代謝や生理を非侵襲的に評価する新しい手法の開発も期待される^{45, 47-48)}。環境DNAと環境RNAを総称して環境核酸と呼ぶ。

4.4 環境DNA分析を活用した生態系モニタリング

環境DNA分析の簡便さや感度の高さは、大きな費用や労力が必要な、広域または長期の生態系モニタリングの可能性を大きく広げている。日本では環境DNA分析を用いた生物多様性観測ネットワークであるANEMONEが組織され、研究者だけでなく企業や市民ボランティアも参加して全国規模での観測が行われている⁴⁹⁾。専門家でなくとも比較的容易にサンプリングを行えることは環境DNA分析の大きな利点である。ANEMONEではこの利点を活かして非常に多くの地点(文献49)によれば、2022年10月時点で1000地点以上)での観測を実現している。収集されたデータはオープンデータとして公開されており、生態系保全や自然教育などへの活用が期待される。国土交通省では、全国で行われている河川・ダム生物調査(河川水辺の国勢調査)における環境DNAメタバーコーディングの適用可能性が検討されている⁵⁰⁾。今後、国や自治体による生態系モニタリングにおいても環境DNA分析の活用が進み、従来の生物調査手法による評価を補うことが期待される。また、環境DNAの収集や分析を遠隔・自動で行うための機器の開発が進められており⁵¹⁻⁵²⁾、環境DNA分析による自動化された生態系モニタリングも近い将来に実現するかも

しれない。

5. 今後の課題

現生のマクロ生物を対象とした近年の環境DNA分析の発展は目覚ましく、生態系の研究やモニタリングのための有望な手法の1つとなっている。しかし、環境DNA分析は依然として発展途上の技術であり、その応用の可能性を最大限に引き出すためには一層の研究や基盤整備が不可欠である。最後に、今後のさらなる取り組みが望まれる3つの課題を強調する。

第一に、自然環境下での環境DNAの動態について基礎的な理解を深めることが重要である。具体的には、環境DNAの生成や分解、輸送、状態について、関連する要因やメカニズムを明らかにすることが求められる⁵³⁻⁵⁴。環境DNAの性質や振る舞いがよく分からないために、環境DNA分析の結果の解釈に大きな不確実性が残ることは少なくない。環境DNAそのものに対する基礎知識は、環境DNA分析の結果を背景にある生態学的過程と適切に関連付け、信頼性の高い生物多様性評価を実現する上で不可欠である。環境DNAの性質を深く理解することはまた、環境DNA分析の新しい応用にもつながるだろう。しかし、関連する研究事例は比較的少ないのが現状である⁵⁴。

第二に、環境DNAの動態や、環境DNA分析に固有の誤差要因などを考慮した、環境DNA分析のためのデータ解析手法の開発が求められる^{14,55}。例えば、環境DNAの濃度分布に水の流れが強く影響する河川や海では、種の分布や個体群サイズを評価するためにDNAの輸送過程を組み込んだ解析が必要になるかもしれない^{23,56}。種の分布や多様性の評価において偽陰性や偽陽性の影響が無視できない場合には、環境DNA分析の異なる段階で生じる検出誤差を説明する統計モデルが必要だろう¹⁷⁻¹⁸。こうしたモデルは、種を効率的に検出できる研究デザインの特定にも役立てられる¹⁸。また、環境DNA分析と従来の調査手法の欠点を互いに補うために、両者のデータを組み合わせる解析することも有効だろう。これら2種類のデータを組み合わせた解析は、複数の異なるデータセットを同時にモデル化する枠組みを用いることで効果的に実現できる可能性がある⁹。

最後に、環境DNA分析の基盤となる配列データの充実化が必要である。塩基配列データベースに登録された配列データの豊富さは、地域や分類群、バーコード領域によって大きく異なり⁵⁷、配列データの登録が限られた地域や分類群では環境DNA分析の可能性を十分に活かさない可能性がある。例えば、次世代シーケンサーで決定された環境DNAの配列を既知のDNA配列と照合する環境DNAメタバーコーディングでは、既知の配列情報の利用可能性

が結果に大きく影響する。実際、日本の水生昆虫では、公共のデータベースにおけるバーコード配列データの不足によって、環境DNAメタバーコーディングの性能が著しく制限されている⁵⁸。また、環境RNA分析では、マクロ生物のメッセンジャーRNA配列やトランスクリプトームデータが不足していることが、手法の開発と応用における重大な制約となっている⁴⁷。生態系モニタリングなどで環境DNA分析を活用するためには、適用を目指す地域や分類群ごとに配列データの不足を戦略的に解消していくことが重要だろう。

6. 引用文献

- 1) Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg L. H : Environmental DNA. *Molecular Ecology*, **21**, 1789-1793, 2012
- 2) Ficetola G. F, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P : Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, **4**, 423-425, 2008
- 3) Bohmann K, Evans A, Gilbert M. T. P, Carvalho G. R, Creer S, Knapp M, Yu D. W, de Bruyn M : Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, **29**, 358-367, 2014
- 4) Thomsen P. F, Willerslev E : Environmental DNA—an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, **183**, 4-18, 2015
- 5) 土居秀幸, 近藤倫生 : 環境DNA—生態系の真の姿を読み解く—, p. 300, 共立出版, 東京, 2021
- 6) Minamoto T, Miya M, Sado T, Seino S, Doi H, Kondoh M, Nakamura K, Takahara T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Iwasaki W, Kasai A, Masuda R, Uchii K : An illustrated manual for environmental DNA research : water sampling guidelines and experimental protocols. *Environmental DNA*, **3**, 8-13, 2021
- 7) Miya M : Environmental DNA metabarcoding : a novel method for biodiversity monitoring of marine fish communities. *Annual Review of Marine Science*, **14**, 161-185, 2022
- 8) Mizumoto H, Mitsuzuka T, Araki H : An environmental DNA survey on distribution of an endangered salmonid species, *Parahucho perryi*, in Hokkaido, Japan. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **8**, 569425, 2020
- 9) Keller A. G, Grason E. W, McDonald P. S, Ramón-Laca A, Kelly R. P : Tracking an invasion front with

- environmental DNA. *Ecological Applications*, **32**, e2561, 2022
- 10) Wada T, Doi H, Togaki D, Kaida R, Nagano M, Katano I, Suzuki M, Ohtani T, Mitsuhashi H: Exploring a legendary giant squid: an environmental DNA approach. *Marine Biology*, **167**, 160, 2020
- 11) Fujiwara Y, Tsuchida S, Kawato M, Masuda K, Sakaguchi S. O, Sado T, Miya M, Yoshida T: Detection of the largest deep-sea-endemic teleost fish at depths of over 2,000 m through a combination of eDNA metabarcoding and baited camera observations. *Frontiers in Marine Science*, **9**, 945758, 2022
- 12) Nakagawa H, Yamamoto S, Sato Y, Sado T, Minamoto T, Miya M: Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshwater Biology*, **63**, 569-580, 2018
- 13) Zhan A, MacIsaac H. J.: Rare biosphere exploration using high-throughput sequencing: research progress and perspectives. *Conservation Genetics*, **16**, 513-522, 2015
- 14) Burian A, Mauvisseau Q, Bulling M, Domisch S, Qian S, Sweet M: Improving the reliability of eDNA data interpretation. *Molecular Ecology Resources*, **21**, 1422-1433, 2021
- 15) Tsuji S, Takahara T, Doi H, Shibata N, Yamanaka H: The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—a review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, **1**, 99-108, 2019
- 16) Mathon L, Valentini A, Guérin P.-E, Normandeau E, Noel C, Lionnet C, Boulanger E, Thuiller W, Bernatchez L, Mouillot D, Dejean T, Manel S: Benchmarking bioinformatic tools for fast and accurate eDNA metabarcoding species identification. *Molecular Ecology Resources*, **21**, 2565-2579, 2021
- 17) Guillera-Arroita G, Lahoz-Monfort J. J., van Rooyen A. R., Weeks A. R., Tingley R.: Dealing with false-positive and false-negative errors about species occurrence at multiple levels. *Methods in Ecology and Evolution*, **8**, 1081-1091, 2017
- 18) Fukaya K, Kondo N. I., Matsuzaki S.-I. S., Kadoya T: Multispecies site occupancy modelling and study design for spatially replicated environmental DNA metabarcoding. *Methods in Ecology and Evolution*, **13**, 183-193, 2022
- 19) Yates M. C., Fraser D. J., Derry A. M.: Meta-analysis supports further refinement of eDNA for monitoring aquatic species-specific abundance in nature. *Environmental DNA*, **1**, 5-13, 2019
- 20) Rourke M. L., Fowler A. M., Hughes J. M., Broadhurst M. K., DiBattista J. D., Fielder S., Wilkes Walburn J., Furlan E. M.: Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: a review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, **4**, 9-33, 2022
- 21) Yates M. C., Cristescu M. E., Derry A. M.: Integrating physiology and environmental dynamics to operationalize environmental DNA (eDNA) as a means to monitor freshwater macro-organism abundance. *Molecular Ecology*, **30**, 6531-6550, 2021
- 22) Yates M. C., Glaser D. M., Post J. R., Cristescu M. E., Fraser D. J., Derry A. M.: The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling. *Molecular Ecology*, **30**, 3068-3082, 2021
- 23) Fukaya K, Murakami H, Yoon S, Minami K, Osada Y, Yamamoto S, Masuda R, Kasai A, Miyashita K, Minamoto T, Kondoh M: Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modelling. *Molecular Ecology*, **30**, 3057-3067, 2021
- 24) Hoshino T, Inagaki F: Application of stochastic labeling with random-sequence barcodes for simultaneous quantification and sequencing of environmental 16S rRNA genes. *PLoS ONE*, **12**, e0169431, 2017
- 25) Ushio M, Murakami H, Masuda R, Sado T, Miya M, Sakurai S, Yamanaka H, Minamoto T, Kondoh M: Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics*, **2**, e23297, 2018
- 26) Turner C. R., Uy K. L., Everhart R. C.: Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, **183**, 93-102, 2015
- 27) Sakata M. K., Yamamoto S., Gotoh R. O., Miya M., Yamanaka H., Minamoto T.: Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA*, **2**, 505-518, 2020
- 28) Kuwae M, Tamai H, Doi H, Sakata M. K., Minamoto T, Suzuki Y: Sedimentary DNA tracks decadal-centennial changes in fish abundance. *Communications Biology*,

- 3, 558, 2020
- 29) Wang Y, Pedersen M.W, Alsos I.G, De Sanctis B, Racimo F, Prohaska A, Coissac E, Owens H.L, Merkel M.K.F, Fernandez-Guerra A, Rouillard A, Lammers Y, Alberti A, Denoëud F, Money D, Ruter A.H, McColl H, Larsen N.K, Cherezova A.A, Edwards M.E, Fedorov G.B, Haile J, Orlando L, Vinner L, Korneliusson T.S, Beilman D.W, Bjørk A.A, Cao J, Dockter C, Esdale J, Gusarova G, Kjeldsen K.K, Mangerud J, Rasic J.T, Skadhauge B, Svendsen J.I, Tikhonov A, Wincker P, Xing Y, Zhang Y, Froese D.G, Rahbek C, Nogues Bravo D, Holden P.B, Edwards N.R, Durbin R, Meltzer D.J, Kjær K.H, Möller P, Willerslev E : Late Quaternary dynamics of Arctic biota from ancient environmental genomics. *Nature*, **600**, 86–92, 2021
- 30) Clare E.L, Economou C.K, Bennett F.J, Dyer C.E, Adams K, McRobie B, Drinkwater R, Littlefair J.E : Measuring biodiversity from DNA in the air. *Current Biology*, **32**, 693–700, 2022
- 31) Lynggaard C, Bertelsen M.F, Jensen C.V, Johnson M.S, Frøslev T.G, Olsen M.T, Bohmann K : Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. *Current Biology*, **32**, 701–707, 2022
- 32) Roger F, Ghanavi H.R, Danielsson N, Wahlberg N, Löndahl J, Pettersson L.B, Andersson G.K.S, Boke Olén N, Clough Y : Airborne environmental DNA metabarcoding for the monitoring of terrestrial insects—a proof of concept from the field. *Environmental DNA*, **4**, 790–807, 2022
- 33) Johnson M.D, Fokar M, Cox R.D, Barnes M.A : Airborne environmental DNA metabarcoding detects more diversity, with less sampling effort, than a traditional plant community survey. *BMC Ecology and Evolution*, **21**, 218, 2021
- 34) Thomsen P.F, Sigsgaard E.E : Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods. *Ecology and Evolution*, **9**, 1665–1679, 2019
- 35) Kudoh A, Minamoto T, Yamamoto S : Detection of herbivory : eDNA detection from feeding marks on leaves. *Environmental DNA*, **2**, 627–634, 2020
- 36) Uchii K, Doi H, Minamoto T : A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources*, **16**, 415–422, 2016
- 37) Uchii K, Doi H, Yamanaka H, Minamoto T : Distinct seasonal migration patterns of Japanese native and non-native genotypes of common carp estimated by environmental DNA. *Ecology and Evolution*, **7**, 8515–8522, 2017
- 38) Parsons K.M, Everett M, Dahlheim M, Park L : Water, water everywhere : environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species. *Royal Society Open Science*, **5**, 180537, 2018
- 39) Sigsgaard E.E, Nielsen I.B, Bach S.S, Lorenzen E.D, Robinson D.P, Knudsen S.W, Pedersen M.W, Jaidah M.A, Orlando L, Willerslev E, Möller P.R, Thomsen P.F : Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology and Evolution*, **1**, 4, 2016
- 40) Tsuji S, Maruyama A, Miya M, Ushio M, Sato H, Minamoto T, Yamanaka H : Environmental DNA analysis shows high potential as a tool for estimating intraspecific genetic diversity in a wild fish population. *Molecular Ecology Resources*, **20**, 1248–1258, 2020
- 41) Tsuji S, Miya M, Ushio M, Sato H, Minamoto T, Yamanaka H : Evaluating intraspecific genetic diversity using environmental DNA and denoising approach : a case study using tank water. *Environmental DNA*, **2**, 42–52, 2020
- 42) Yoshitake K, Fujiwara A, Matsuura A, Sekino M, Yasuie M, Nakamura Y, Nakamichi R, Kodama M, Takahama Y, Takasuka A, Asakawa S, Nishikiori K, Kobayashi T, Watabe S : Estimation of tuna population by the improved analytical pipeline of unique molecular identifier-assisted HaCeD-Seq (haplotype count from eDNA). *Scientific Reports*, **11**, 7031, 2021
- 43) Adams C.I.M, Knapp M, Gemmill N.J, Jeunen G.-J, Bunce M, Lamare M.D, Taylor H.R : Beyond biodiversity : can environmental DNA (eDNA) cut it as a population genetics tool?. *Genes*, **10**, 192, 2019
- 44) Sigsgaard E.E, Jensen M.R, Winkelmann I.E, Möller P.R, Hansen M.M, Thomsen P.F : Population-level inferences from environmental DNA—current status and future perspectives. *Evolutionary Applications*, **13**, 245–262, 2020
- 45) Cristescu M.E : Can environmental RNA revolutionize biodiversity science?. *Trends in Ecology and Evolution*, **34**, 694–697, 2019
- 46) Miyata K, Inoue Y, Amano Y, Nishioka T, Yamane M, Kawaguchi T, Morita O, Honda H : Fish environmental

- RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity. *Ecological Indicators*, **128**, 107796, 2021
- 47) Tsuru K, Ikeda S, Hirohara T, Shimada Y, Minamoto T, Yamanaka H: Messenger RNA typing of environmental RNA (eRNA): a case study on zebrafish tank water with perspectives for the future development of eRNA analysis on aquatic vertebrates. *Environmental DNA*, **3**, 14–21, 2021
- 48) Yates M. C, Derry A. M, Cristescu M. E.: Environmental RNA: a revolution in ecological resolution?. *Trends in Ecology and Evolution*, **36**, 601–609, 2021
- 49) ANEMONE: ANEMONE, <https://anemone.bio/> (2022. 11. 22アクセス)
- 50) 北川哲郎, 村岡敬子, 山田拓也, 中村圭吾: 河川水辺の国勢調査(魚類)における環境DNAメタバーコーディング解析の試行事例分析. 河川技術論文集, **26**, 319–324, 2020
- 51) Yamahara K. M, Preston C. M, Birch J, Walz K, Marin III R, Jensen S, Pargett D, Roman B, Ussler III W, Zhang Y, Ryan J, Hobson B, Kieft B, Raanan B, Goodwin K. D, Chavez F. P, Scholin C: In situ autonomous acquisition and preservation of marine environmental DNA using an autonomous underwater vehicle. *Frontiers in Marine Science*, **6**, 373, 2019
- 52) Hansen B. K, Jacobsen M. W, Middelboe A. L, Preston C. M, Marin III R, Bekkevold D, Knudsen S. W, Møller P. R, Nielsen E. E: Remote, autonomous real-time monitoring of environmental DNA from commercial fish. *Scientific Reports*, **10**, 13272, 2020
- 53) Barnes M. A, Turner C. R: The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, **17**, 1–17, 2016
- 54) Jo T, Takao K, Minamoto T: Linking the state of environmental DNA to its application for biomonitoring and stock assessment: targeting mitochondrial/nuclear genes, and different DNA fragment lengths and particle sizes. *Environmental DNA*, **4**, 271–283, 2022
- 55) Harrison J. B, Sunday J. M, Rogers S. M: Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **286**, 20191409, 2019
- 56) Carraro L, Hartikainen H, Jokela J, Bertuzzo E, Rinaldo A: Estimating species distribution and abundance in river networks using environmental DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**, 11724–11729, 2018
- 57) Weigand H, Beermann A. J, Čiampor F, Costa F. O, Csabai Z, Duarte S, Geiger M. F, Grabowski M, Rimet F, Rulik B, Strand M, Szucsich N, Weigand A. M, Willassen E, Wyler S. A, Bouchez A, Borja A, Čiamporová-Zaťovičová Z, Ferreira S, Dijkstra K. -D. B, Eisendle U, Freyhof J, Gadawski P, Graf W, Haegerbaeumer A, van der Hoorn B. B, Japoshvili B, Keresztes L, Keskin E, Leese F, Macher J. N, Mamos T, Paz G, Pešić V, Pfannkuchen D. M, Pfannkuchen M. A, Price B. W, Rinkevich B, Teixeira M. A. L, Várbíró G, Ekrem T: DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: gap-analysis and recommendations for future work. *The Science of the Total Environment*, **678**, 499–524, 2019
- 58) Miyata K, Inoue Y, Amano Y, Nishioka T, Nagaike T, Kawaguchi T, Morita O, Yamane M, Honda H: Comparative environmental RNA and DNA metabarcoding analysis of river algae and arthropods for ecological surveys and water quality assessment. *Scientific Reports*, **12**, 19828, 2022