

令和3年度姫路市大学発まちづくり研究助成事業

「環境DNAによる絶滅危惧種・  
外来種の網羅的把握」  
に関する報告書

令和4年2月

兵庫県立大学大学院情報科学研究科  
土居研究室

## 目次

1	背景	・・・	1
2	研究方法	・・・	6
2.1	調査地点	・・・	6
2.2	採水	・・・	19
2.3	ろ過	・・・	19
2.4	DNA 抽出	・・・	22
2.5	メタバーコーディング解析	・・・	23
2.6	シーケンスデータ解析	・・・	25
3	結果と考察	・・・	27
4	謝辞	・・・	37
5	引用文献	・・・	37

## 1 背景

持続的開発目標 (SDGs)においても、生態系の維持管理の重要性が強調されている。このような健全な生態系の維持管理には、生態系の状況把握が欠かせない。特に、絶滅危惧種や外来種などその生態系にとって重要、もしくは攪乱する生物種については特に詳細な分布状況などの把握が必要である。そこで、絶滅が危惧されている希少な生物種の保護・管理や外来種の駆除を行う上で最も基本的かつ重要な情報は、生物の生息分布や個体数、生物量である。生物の分布や個体数推定には、様々な手法や分布予測モデルが提案されてきており、その行政事業への活用が期待されている。しかし、これらの従来分布調査では、生物の生息場所や生息量を知るためには、目視で数える、採集を行う、網を仕掛けるなど、多大な労力と時間をかけて調査を行う必要があった。実際、播磨地域の淡水生態系においても多くの調査がこのような方法で行われてきた。一方で、近年は“環境 DNA (environmental DNA、 eDNA)”と呼ばれる DNA 分析を用いた新たな生物調査方法、環境 DNA 手法が開発されつつある (Minamoto et al. 2012, Maruyama et al. 2014, Fujiwara et al. 2015, Yamanaka et al. 2016, Uchii et al. 2016, Kakuda et al. 2019、土居・近藤 2021)。

環境中、例えば、水中、土壌中、空気中などあらゆる場所には、そこに生息している生物由来の DNA が存在していると考えられている。その DNA を総称して、環境 DNA (environmental DNA、 eDNA) と呼ばれている。これらの環境 DNA を採取し分析することで、生物の在不在や生物量・個体数、さらには遺伝情報などの膨大なデータを得ることが可能となってきた (Takahara et al. 2012、 2013、 Doi et al. 2015、 2017、概略図：図 1 参照)。そして、ため池

や河川をはじめとした淡水域の多くの水域、分類群に応用されつつある  
(Minamoto et al. 2012, Fukumoto et al. 2015, Fujiwara et al. 2015, Yamanaka et al.  
2016, Uchii et al. 2016, Kakuda et al. 2019)。

## 環境DNA (eDNA)

動植物の排泄物，組織片などに  
由来する水中に存在するDNA断片

1リットルの水から，環境DNAを調べることで

環境DNAの有無から生物の存在を推定

環境DNAの量から生物量を推定



図1 環境DNAについての概略

環境 DNA 技術とは、これまで述べられた通り、水中に存在する生物由来の DNA 断片を採取、分析することによって、生物の分布（在・不在）や生物量、個体数について推定する手法である。これまでは主に、種特異的な DNA 断片を増幅し、リアルタイム PCR や電気泳動などにより 1 種ずつ判別してきた (Minamoto et al. 2012, Fukumoto et al. 2015, Fujiwara et al. 2015, Yamanaka et al. 2016, Uchii et al. 2016, Kakuda et al. 2019)。しかし、これら種特異的な分析によって、環境 DNA から生物群集を明らかにすることは容易ではないことは想像に難くない。何十、何百種といる各生態系の生物種について、1 種ずつ分析することは、非常に手間と労力が必要である。

そこで近年では、これまでの種特異的な手法に加えて、超並列シーケンサ（次世代シーケンサとも呼ばれてきたもの）と呼ばれる DNA 解析装置を用いることで、環境水に含まれるある分類群（例えば魚類）に属する全ての種の DNA を同時並行的に解析する手法、いわゆるメタバーコーディング手法の開発が進んでいる。メタバーコーディングとは、対象分類群の種判別を可能にする遺伝子領域の DNA 断片配列をまとめて PCR 増幅し、超並列シーケンサを用いて塩基配列を決定し、それらをデータベースと照合することで種組成を明らかにする手法である。かつては DNA バーコーディングと呼ばれていたが、超並列シーケンサ登場以降、多種の DNA を同時並列でバーコーディングすることが可能となった。そこで、「メタ」バーコーディングと呼ばれている。

メタバーコーディングにより、わずか 1 リットルの水を汲むだけで、何十、何百という魚の種組成を明らかにできるようになった (Miya et al. 2015)。メタバーコーディング法の開発には、ターゲットとする分類群に属する種(のマーカー遺伝子)を網羅的に増幅するユニバーサルプライマーを作成する必要がある。これまで、ミトコンドリア DNA の COI や 12S 領域を対象とした様々なユニバー

サルプライマーが開発されてきている。例えば、HCOI、LCOIなどのCOI領域を増幅するもの、ecoPrimerなどがある (Miya et al. 2020)。それらのユニバーサルプライマーは、これまで様々な場面で利用されてきたが決して性能 (増幅効率やユニバーサル性など) が良いものではなかった。そこで、Miya et al. (2015) では、新たに魚類のミトコンドリア DNA の 12S 領域を網羅的に増幅できるユニバーサルプライマーとして MiFish を開発し、現在では全世界的に利用されている (Miya et al. 2020)。

そこで、本研究では、この環境 DNA メタバーコーディングを用いた生物調査手法の確立として、姫路市・播磨地域でのため池を対象として、そこに生息する絶滅危惧種や、外来種を網羅的に明らかにする手法の開発を目指した。

本環境 DNA 手法が姫路市・播磨地域でのため池で確立されることにより、これまで採捕や目視で行なっており大変労力がかかっていた調査を、環境 DNA を用いることでより簡便に行うことができる。環境 DNA を用いることで、採水のみで調査できることから、これら生物の生息場所をほとんど乱すことなく生物調査が可能となる。さらに、多くの外来種検出を試みることで播磨地域の外来種侵入状況についても評価することが可能となる。

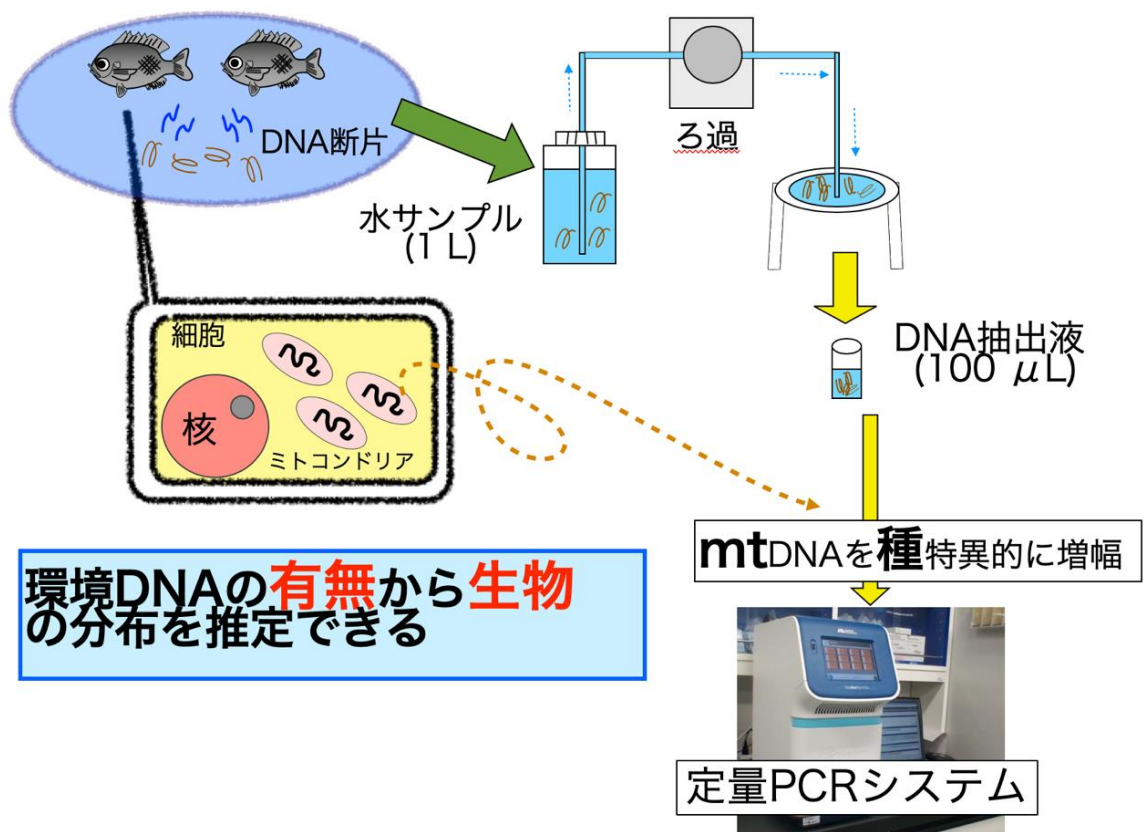


図3 環境DNA調査の概略図

## 2 研究方法

### 2.1 調査地点

本研究では、姫路市水族館のご協力を得て、採水調査を行った。2018年度に採集した兵庫県赤穂市、姫路市内（図4）のため池9面（St. 1-1 1、図5-9など）に加えて、兵庫県赤穂市、姫路市内（図10）のため池5面（St. 10-1 4）において、2019年11月に調査を行った。これら調査地は、市街地のため池から農村地や山林に位置するため池を含む。調査地点の詳細な地理情報については生物種保護の観点から公表を差し控える。本研究ではこの2年度にわたって採集したデータを用いて解析を行った。

さらに、追加サンプルとして、2021年度には6面の新たなため池についても調査を行った。





図4 St. 1-11の調査地点エリア（希少種保護のため詳細は場所については、情報を差し控える。）。Google Mapの地図を参照した。





図5 St. 1 のため池風景





図 6 St. 2 のため池風景





図7 St. 3のため池風景







図8 St. 4のため池風景





図9 St. 5 のため池風景（上）と St. 6 のため池風景（下）

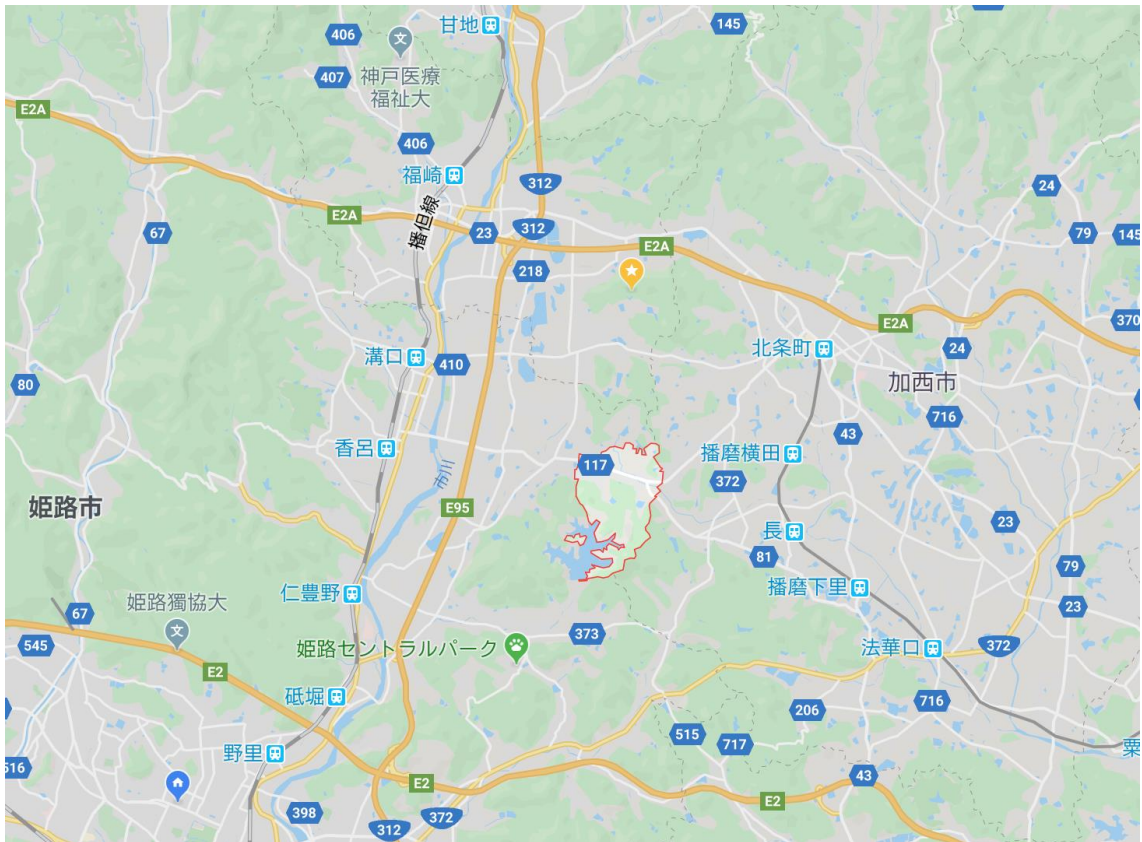


図10 St.12-16の調査地点エリア（希少種保護のため詳細は場所については、情報を差し控える。）。Google Mapの地図を参照した。

## 2.2 採水

両年度の調査ともに同様に調査を行った。採水は各ため池の沿岸 1 箇所において、1L のポリ瓶 1 本用いて表層水を採水した。採水したポリ瓶は、クーラーボックスで冷蔵して実験室に持ち帰った（図 1 1）。また、調査時のコンタミネーションの有無を確認するため、サンプル水と同様のポリ瓶に入れた 1L の DNA フリー脱イオン水をクーラーボックスに入れ、調査開始前から実験室帰着まで持ち歩いたものをネガティブコントロールとして使用した（クーラー・ネガティブコントロールとした）。

## 2.3 ろ過

それぞれの 1L のサンプル水について、1 枚ずつ GF/F ガラスフィルター (GE Healthcare) を用いて濾過した。サンプル水の濾過後、GF/F フィルターは次の測定まで -20 度で冷凍保存した。サンプル水の濾過後、クーラー内、濾過作業時（1L の DNA フリー脱イオン水）の 2 種類のネガティブコントロールもサンプル水と同様に濾過した。サンプル間のコンタミネーションを防ぐため、採水及び濾過に用いた器具類は 10 倍に希釈した塩素系漂白剤（ハイターE 花王株式会社）で洗浄した。なお、採水、ろ過については姫路市水族館職員の皆様にご協力いただいた。





図 11 姫路水族館でのサンプル水の濾過

## 2.4 DNA 抽出

フィルターからの環境 DNA 抽出は、兵庫県立大神戸情報科学キャンパスにおいて行った。キアゲン社の DNA 抽出キット (DNeasy blood and tissue kit, Qiagen 社)を用いて、Uchii et al. (2016),及び環境 DNA 学会発行の環境 DNA 調査・実験マニュアル ver.2.1 (<http://ednasociety.org/manual>) に従って、以下の通り行った。

サンプル水を濾過した GF/F フィルター 1 枚を、サリベット (ザルスタット社) に入れ、Buffer AL、Proteinase K を添加し、56 °C の定温乾燥機 (DX402 Yamato) に 30 分放置した。その後 5000 G で 5 分間遠心に向け、フィルターに 220 µL の TE(pH8.0) を添加し、室温で 1 分間放置した後、再び 5000 G で 5 分間遠心した。溶出した濾液には 200 µL の Buffer AL、600 µL の 100% エタノールを添加し、ピペッティングによりよく混合した後、DNeasy 付属のスピンカラムに、約 650 µL 移して 6000 G で 1 分間遠心した。遠心によって出た廃液を捨て、サリベット内の濾液がなくなるまで以上の行程を繰り返した。以後は、DNeasy blood and tissue kit 付属マニュアルに従って、カラムを新しいコレクションチューブに移し、500 µL の Buffer AW1 を添加し、6000 G で 1 分間遠心、カラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW2 を 500 µL 添加、12000 G で 3 分間遠心した。カラムを未使用の 1.5 mL チューブに移し、Buffer AE を 200 µL 添加、室温にて 1 分間静置後、6000 G で 1 分間遠心し DNA を溶出した。得られた DNA 溶液は -20 °C で冷凍保存した。



## 2.5 メタバーコーディング解析

まずは、ユニバーサルプライマーを用いた PCR を行う。今回の手法では 2 段階の PCR を用いて、ユニバーサルプライマーによる対象領域の DNA 増幅 (1st PCR) と、インデクス配列やアダプター配列 (詳細については後述) の 1st PCR の産物への付加を行なっている (2nd PCR)。今回の解析では、サンプルとともに 2 種類のネガティブコントロールについても同様に解析を行なった。

1st PCR では、MiFish ユニバーサルプライマーによる対象領域の DNA を増幅させた (魚類ミトコンドリア DNA 1 2 S 領域, Miya et al. 2015)。

MiFish-U-F GTCGGTAAACTCGTGCCAGC

MiFish-U-R CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG

環境 DNA の場合は、その DNA 濃度が非常に薄いため、PCR テンプレートに抽出された生物種の DNA が入らない場合もある。そのため、多くの場合はいくつかの繰り返し (4-8 など) をもって 1st PCR を行うことが多い。その 1st PCR の産物について、8 繰り返しを混合した上で、2nd PCR にて、インデクス配列やアダプター配列を付加した。ここでのインデクスとは図 2 にあるように、河川 1, 河川 2, ため池 1 などそれぞれの環境 DNA サンプルに個別のインデクス配列を割り当てることで、これらのサンプル全てを一度にシーケンス解析した時、後からインデクス配列を参照することでどのサンプル由来の DNA 配列かを見分けることができる。つまり、多数のサンプルを一度にシーケンスすることができる。イルミナシーケンスでは、フローセルというシーケンスに入った DNA が結合する塩基配列があり、それ

を基盤として、シーケンスが行われる。アダプター配列とは、そのフローセルにある塩基に結合する配列のことである。この2段階のPCRを経て、図12のような配列が作られた。

これらの配列について、プライマーの除去や、電気泳動などによるターゲット配列の切り出しを行って、イルミナシーケンスに導入する産物（ライブラリ）を作成する。このライブラリについて、超並列シーケンスを行う。シーケンスは、イルミナ社 MiSeq を用いて、V3 キットにより解析した。300bp に渡って両側で解読される方法（ペアエンドシーケンス）によりシーケンスを行った。

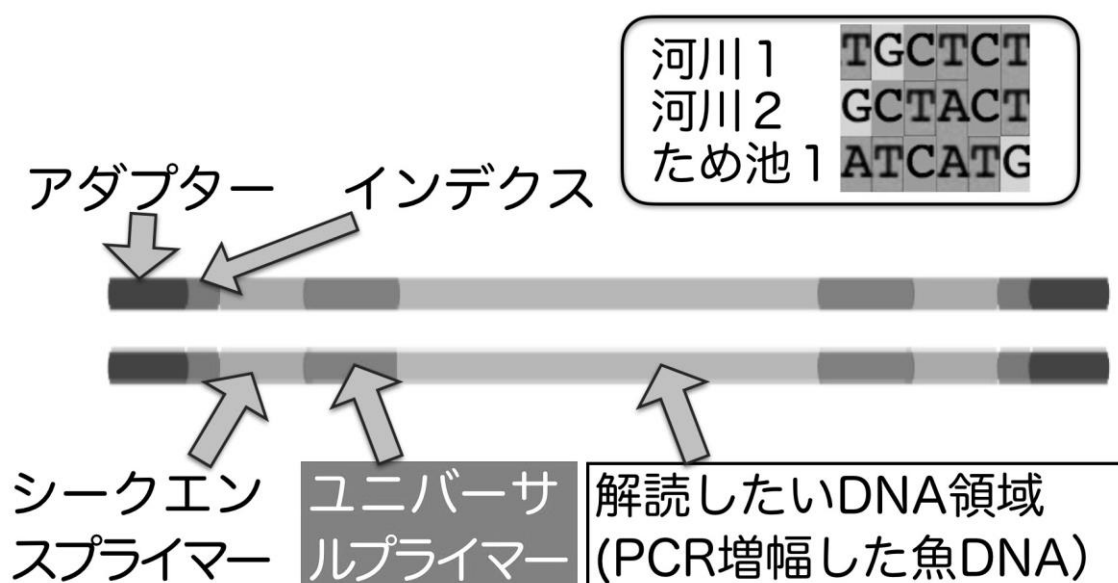


図12 作成するイルミナシーケンスライブラリの概略

## 2.6 シーケンスデータ解析

シーケンスされた塩基配列データについては、バイオインフォマティクス解析を経て、環境 DNA サンプルに含まれていた生物種のリストの完成となる。バイオインフォマティクス解析には Claident と R パッケージの DADA2 を用いた。超並列シーケンサから得られたデータは、Claident により Demultiplex によりサンプルに分けられる。そこから、DADA2 によりまずは一次データ処理に供される。その中で、シーケンスラン全体のクオリティの評価、シーケンスの末端部、ペアエンドシーケンスの結合、信頼度の低いシーケンスの除去、プライマー配列の除去、そして最後に同一配列のグループ化 (ASV、Amplicon sequence variant にクラスタリング) が行われる。このグループ化された配列について、Claident を用いて配列データベースに対する配列類似性検索 (BLAST 検索) が行われる。データベースにすでに登録されている配列と、環境 DNA サンプルに含まれていた配列が、98.6% 一致率の配列相同性を持つものをその種の配列として、種リストとして作成する。

## 2.7 統計解析

得られた種テーブルから、2 種類のネガティブコントロールでリードが出ている種については、ネガティブコントロールで得られたリード数を引いた値を用いた。つまりネガティブコントロールで得られたリード数以上得られなければ、そこは非検出とすることとした。

このデータについて群集解析を行なった。リード数というデータが得られるが、リード数は半定量的であり、定量データとして使うには適さないため、全てのデータは在不在 (0、1) に変換して以後解析を行なった。種多様性指数  $H'$  と ASV 数 (分類数) を計算した。さらに、Jaccard 指数によりため池間の類似度を算出し NMDS (Non-metric multidimensional scaling) により座標として表示

した。さらに、PERMANOVA による解析を行い、ため池間や採集年間での類似度の分散について考察した。

### 3 結果と考察

姫路市近郊のため池 20 面の解析を行なったが、1 つ Site 1 のデータ（データ解析の結果、シーケンスが 0）が取れなかったため、以後の解析においては 19 面を対象に行った。

表 1 a-d に示した通り、各ため池でさまざまな種類の魚種が検出された。特にカワムツなどのコイ科、オオクチバスなど兵庫県のため池で優占する種がみられた。また、外来種のオオクチバスについては 2 面で、そして絶滅危惧種（兵庫県では要注目）のミナミメダカについても 1 面で認められた。

種数については（図 1 3）、各ため池で大きなばらつきがあったが、最大で 47 ASV が得られ多様性の高さが示された。一方で数種しか得られなかったところもあり、それについては多様性の低下が危惧される。

多様性指数（図 1 4）についても同様の傾向を示したが、概ね差異が小さい傾向があった、これは全体的に総じて多様性が低い傾向があるからであると考えられた。

Jaccard 類似度指数により、NMDS にて類似度座標空間を表示した（NMDS stress= 0.1377372、図 1 5）。ため池間では空間的にばらつきが大きく見られた。同じ年（近い場所）においてもばらつきが見られた。これは先程の種数にもあるようにため池間で魚類群種が大きく異なるためと考えられた。ただ、本研究では環境データを取っていないのでこのばらつきがどこからもたらされるかについては今後の検証が必要である。

PERMANOVA 解析の結果（表 2）から、NMDS にて類似度座標空間について、ため池間と、同じ年（近い場所）においてのばらつきについては有意な傾

向は無かった。それはばらつきが大きいもののそれが採集場所や時期に限らず生じていることを示しておりこのため池のもつ環境や水質、他の生物の存在などの要因が関連していると考えられた。

表1 メタバーコーディングにより得られた主な魚種（一部優占種のみ表示）

a) Site 2-6

種	和名	S2	S3	S4	S5	S6
<i>Zacco platypus</i>	カワムツ	0	437	0	0	0
<i>Oncorhynchus</i>	サケ	0	0	2	0	0
Cyprinidae	コイ科	8882	0	0	0	0
<i>Rhinogobius</i>	ヨシノボリ	0	0	8667	63928	0
<i>Lepomis macrochirus</i>	オオクチバス	8259	0	0	0	0
	ス					
Cyprinidae	コイ科	0	0	0	0	57122
Cyprinidae	コイ科	257	0	0	0	0
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	ドジョウ	0	0	27691	15693	3185
<i>Carassius</i>	コイ	90	0	0	0	0
<i>Zacco platypus</i>	カワムツ	0	0	0	0	0
<i>Pseudorasbora parva</i>	モツゴ	0	2	0	0	0
<i>Engraulis</i>	イワシ	0	0	0	0	0

<i>Oryzias latipes</i>	ミナミメダ カ	0	0	0	0	0
------------------------	------------	---	---	---	---	---

---



b) Site 7-11

種	和名	S7	S8	S9	S10	S11
<i>Zacco platypus</i>	カワムツ	0	0	0	0	0
<i>Oncorhynchus</i>	サケ	312	0	0	0	0
Cyprinidae	コイ科	0	0	0	0	0
<i>Rhinogobius</i>	ヨシノボリ	0	0	482	0	0
<i>Lepomis macrochirus</i>	オオクチバ ス	0	0	0	0	0
Cyprinidae	コイ科	0	3333	0	0	0
Cyprinidae	コイ科	0	0	0	0	0
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	ドジョウ	0	43057	7	0	0
<i>Carassius</i>	コイ	0	0	18437	16098	0
<i>Zacco platypus</i>	カワムツ	0	0	0	0	0
<i>Pseudorasbora parva</i>	モツゴ	0	0	0	18709	0
<i>Engraulis</i>	イワシ	0	0	0	0	5978
<i>Oryzias latipes</i>	ミナミメダ カ	0	0	0	0	0



c) Site 11-16

種	和名	S12	S13	S14	S15	S16
<i>Zacco platypus</i>	カワムツ	4793	0	0	0	0
<i>Oncorhynchus</i>	サケ	0	583	373	0	0
Cyprinidae	コイ科	0	0	0	0	657
<i>Rhinogobius</i>	ヨシノボリ	0	0	0	0	0
<i>Lepomis macrochirus</i>	オオクチバ ス	0	0	0	0	#####
Cyprinidae	コイ科	0	0	0	3531	0
Cyprinidae	コイ科	0	0	0	0	0
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	ドジョウ	0	0	0	0	111
<i>Carassius</i>	コイ	0	0	0	5892	0
<i>Zacco platypus</i>	カワムツ	0	0	0	0	0
<i>Pseudorasbora parva</i>	モツゴ	0	0	0	0	0
<i>Engraulis</i>	イワシ	0	0	0	0	0

<i>Oryzias latipes</i>	ミナミメダ カ	0	0	0	5287	0
------------------------	------------	---	---	---	------	---

---

d) Site 17-20

種	和名	S17	S18	S19	S20
<i>Zacco platypus</i>	カワムツ	0	0	10649	6250
<i>Oncorhynchus</i>	サケ	0	0	4339	5214
Cyprinidae	コイ科	0	0	4010	0
<i>Rhinogobius</i>	ヨシノボリ	716	36787	0	0
<i>Lepomis macrochirus</i>	オオクチバス	0	0	0	0
	ス				
Cyprinidae	コイ科	0	12053	38568	0
Cyprinidae	コイ科	0	0	0	974
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	ドジョウ	0	1028	7355	0
<i>Carassius</i>	コイ	0	0	0	0
<i>Zacco platypus</i>	カワムツ	0	0	2100	0
<i>Pseudorasbora parva</i>	モツゴ	0	0	0	0
<i>Engraulis</i>	イワシ	0	777	0	1242

	ミナミメダ				
<i>Oryzias latipes</i>		0	0	0	0
	カ				

---

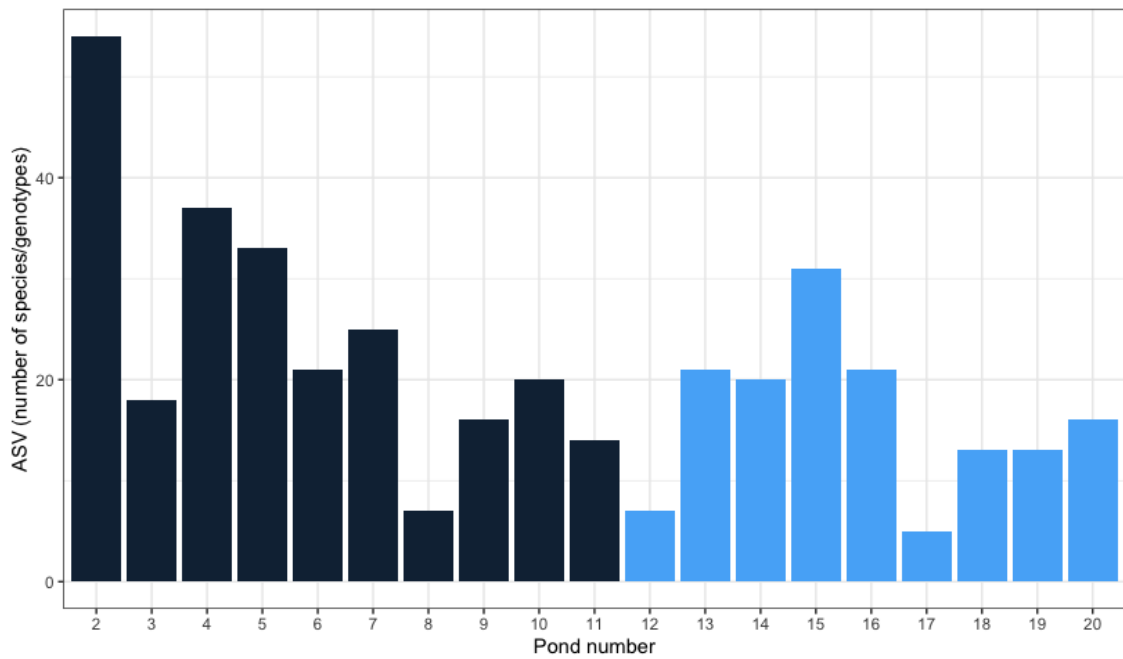


図13 ため池間でのASV数（遺伝的多様性も含めた分類群数）の比較。  
黒が2018年、青が2019年採水

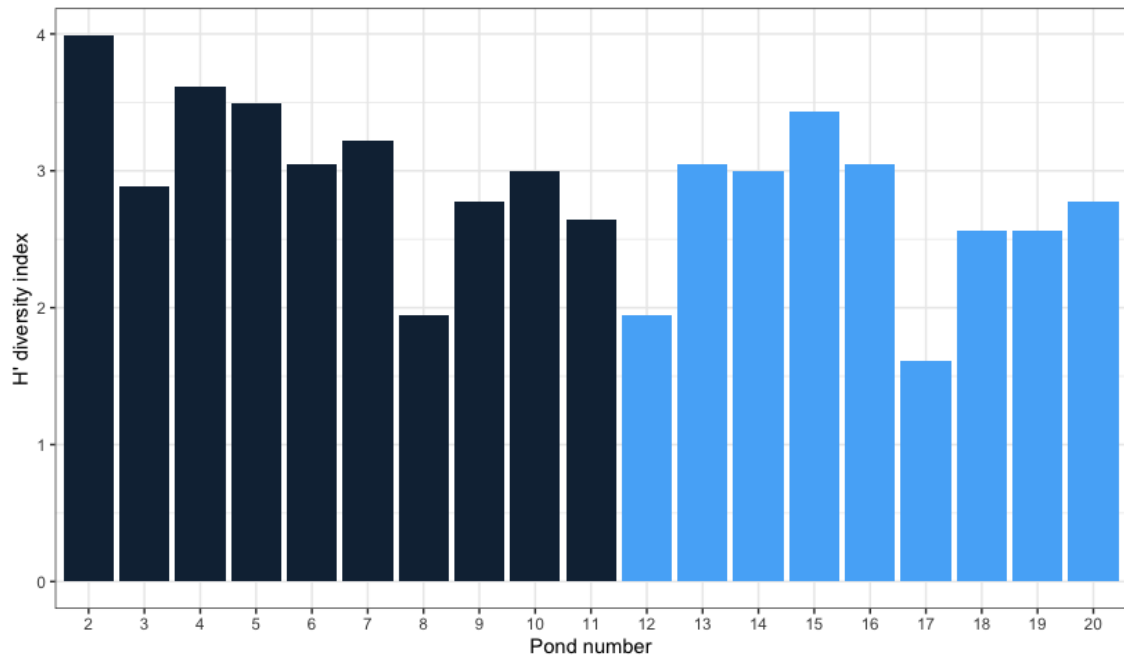


図14 ため池間でのH'多様性指数の比較。黒が2018年、青が2019年採水

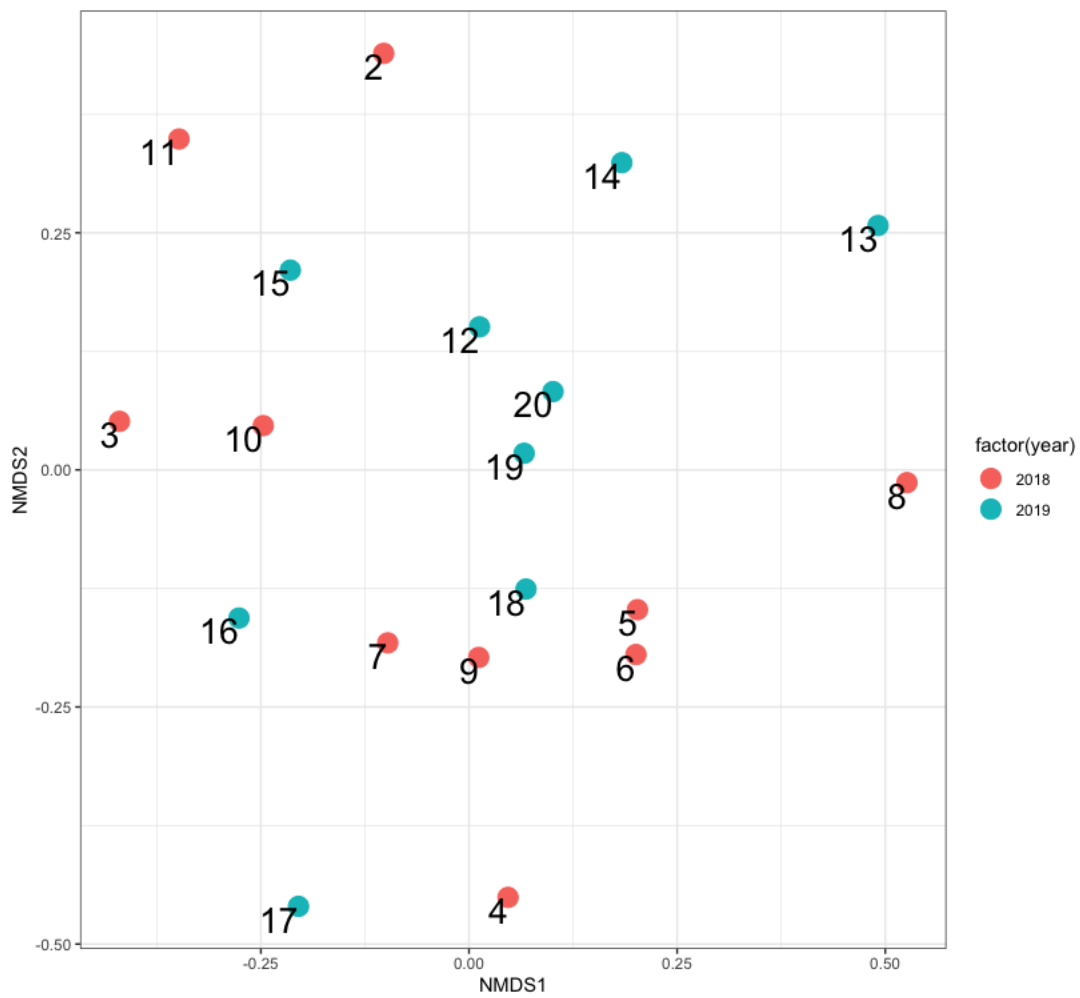


図 1 5 NMDS による類似度座標空間、各数値がため池番号を示す。赤が 2018年、青が2019年採水



表 2 PERMANOVA による結果。habitat\$site はため池、year\$year は採  
集年を示す。

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
habitat\$site	1	0.3410	0.34104	0.93048	0.05139	0.481
year\$year	1	0.4612	0.46116	1.25821	0.06949	0.195
habitat\$site:year\$year	1	0.3359	0.33587	0.91638	0.05061	0.533
Residuals	15	5.4979	0.36652		0.82850	
Total	18	6.6359			1.00000	

これらの結果より、播磨地域でのため池の魚類群集について環境 DNA によるメタバーコーディングにより網羅的に検出が可能であることが明らかとなった。本研究により、環境 DNA 手法による魚種や魚類群集の生息調査手法の開発を行うことができた。今後は、これまで採捕や目視で行い大変な労力がかかっていた生息調査を、環境 DNA 手法を用いることでより簡便に行うことができる (Miya et al. 2017, Yamamoto et al. 2017)。さらに、今後は、採水地点数や、季節的な環境 DNA の検出、種多様性と環境との関係について精査し、魚類の生息調査としての環境 DNA 手法を確立する。

#### 4 謝辞

本研究は、令和 3 年度姫路市大学発まちづくり研究助成事業により行われた。姫路市水族館職員の方に採水や濾過などの作業を行っていただいた、土居研究室においては、永野真理子、齊藤達也氏に実験の手伝いをいただいた、ここに感謝申し上げます。

## 5 引用文献

Doi, H., Fukaya, K., Oka, S. I., Sato, K., Kondoh, M., & Miya, M. (2019) Evaluation of detection probabilities at the water-filtering and initial PCR steps in environmental DNA metabarcoding using a multispecies site occupancy model. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.

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.

Fujiwara, A., Matsubashi, S., Doi, H., Yamamoto, S., Minamoto, T. (2016) Use of environmental DNA to survey the distribution of an invasive submerged plant in ponds. *Freshwater Science* 35 (2), 748-754.

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.

Kakuda, A., Doi, H., Souma, R., Nagano, M., Minamoto, T., & Katano, I. (2019) Environmental DNA detection and quantification of invasive red-eared sliders, *Trachemys scripta elegans*, in ponds and the influence of water quality. *PeerJ*, 7, e8155.

Minamoto, T., Fukuda, M., Katsuhara, K.R., Fujiwara, A., Hidaka, S., Yamamoto, S., Takahashi, K., Masuda, R. (2017) Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLOS ONE* 12 (2), e0173073.

Miya, M., Sato, Y. Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato., K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., 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, 150088.

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.

Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H., Kawabata Z. (2012) Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLOS ONE*, 7 (4), e35868.

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

Minamoto T., Yamanaka H., Takahara T., Honjo M. N., Kawabata Z. (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13(2), 193-197.

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H. and Kondoh, M. (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.

Uchii, K., Doi, H., Minamoto, T. (2016) A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes. *Molecular Ecology Resources* 16 (2), 415-422.

Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki, H., Kondoh, M., Minamoto, T., Miya, M. (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports* 7, 40368.

Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K., Takahashi, K., Sawada, H., Murakami, H., Tsuji, S., Hashizume, H., Kubonaga, S., Horiuchi, T., Hongo, M., Nishida, J., Okugawa, Y., Fujiwara, A., Fukuda, M., Hidaka, S., Suzuki, K. W., Miya, M., Araki, H., Yamanaka, H., Maruyama, A., Miyashita, K., Masuda, R., Minamoto, T., and 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), e1249786.

Yamanaka, H., Minamoto, T. (2016) The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators* 62, 147-153.