

Amph16S 法における種の識別性に関する判定基準（2025 年 3 月版）

Amph16S 法において種を識別する際には、①一致率を基準とした判定、②Amph16S 配列の登録の有無、③分子系統樹を基にした判定の 3 つの観点から総合的に解釈し、最終的な種同定の結果を確定する必要があります。

1. 一致率を基準とした判定

Amph16S 法では、サンプルから最終的に得られた Amph16S 領域の塩基配列（問い合わせ配列）と国際塩基配列データベースに登録されている様々な両生類の塩基配列（リファレンス配列）を比較し、両配列がどの程度一致しているかという基準から問い合わせ配列の種を判定します。その基準には、問い合わせ配列に対してリファレンス配列が一致する割合を示す「一致率」と呼ばれる数値が採用されます。環境省では、暫定的に「**一致率 97.0%以上**」を Amph16S 法における判定基準として採用しており、問い合わせ配列と最も相溶性が高いリファレンス配列との一致率が 97.0%以上であった時に、リファレンス配列の登録学名と同じ種であると判定することとしました。

（判定例）

問い合わせ配列（250bp） ※bp とは塩基配列の長さを表す単位

CAAACCTCAACATACACCTCTACGCACCTAAAT ..中略.. GGCCTAACGCCCTTATCCACGAACTACA



国際塩基配列データベース内の登録配列と比較する

リファレンス配列 A = トウキョウダルマガエル（250bp） **一致率 100%**

CAAACCTCAACATACACCTCTACGCACCTAAAT ..中略.. GGCCTAACGCCCTTATCCACGAACTACA

リファレンス配列 B = ナゴヤダルマガエル（250bp） **一致率 99.60%**

CAAACCTCAACATACACCTCTACGCACCTAAAT ..中略.. GGCCTAACGCCCTTATCCACGAACTCA

リファレンス配列 C = トノサマガエル（249bp） **一致率 97.60%**

CAAACCTCAACATATACCTCTACGCACCTAAAC ..中略.. GGCCTTACGCCCTTATCCACGAACTACA

※問い合わせ配列と塩基が異なる部分を赤字で示した。



一致率を基準とした判定

問い合わせ配列は、一致率が 100%であった **トウキョウダルマガエル** の配列であると判定する。

2. Amph16S 配列の登録の有無

サンプルを採水した地点に生息するすべての両生類のリファレンス配列がデータベースに登録されているかという点も、種同定の結果を精査するためには重要です。上記の判定例において、仮にミトウキョウダルマガエルの配列がデータベースに登録されていなかった

とすると、問い合わせ配列と最も相同性が高いリファレンス配列はナゴヤダルマガエエルとなり、その一致率も 99.60%と判定基準を上回るため、同定結果はナゴヤダルマガエエルとなってしまいます。

一部の両生類では、種内に Amph16S 配列が 7 塩基以上異なる系統が知られており、同じ種でありながら、異なる種内系統のリファレンス配列しか登録されていない場合には、一致率が基準である 97.0%以下になってしまうことがあります。

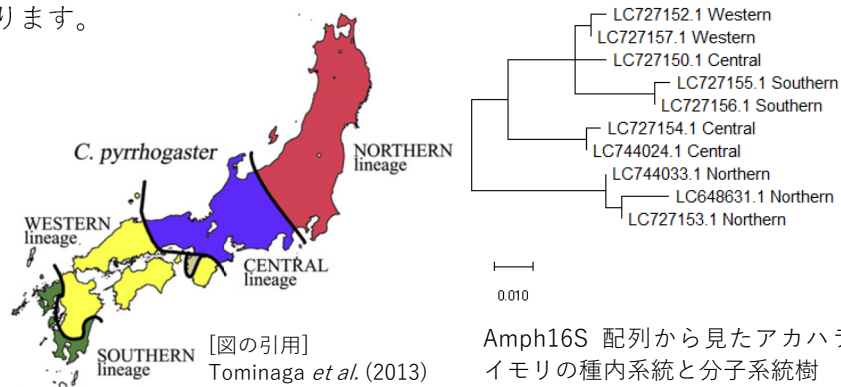
したがって、参考資料 6「リファレンス (Amph16S 配列) 登録状況及び種特異的プライマー整備状況一覧」のうち、「Amph16S 配列の登録の有無」から、サンプルを採水した地点に生息する可能性のあるすべての両生類 (種内系統も含む) のリファレンス配列が登録されていることを必ず確認しましょう。リファレンス配列が登録されていない両生類 (種内系統も含む) が生息する可能性がある場合は、その種の配列が検出された場合に、一致率が基準である 97.0%を超えないことも考えられるため、後述する分子系統樹の情報も含めて総合的に解釈する必要があります。

(種内系統の例)

アカハライモリには、Northern 系統、Central 系統、Western 系統、Southern 系統と 4 つの種内系統の存在がこれまでに報告されています (Tominaga *et al.*, 2013)。これらの種内系統は Amph16S 配列がそれぞれ異なっており、最も差が大きい Northern 系統と Southern 系統では互いに計 22 塩基も違いがあります。

仮に、Southern 系統の配列がデータベースに登録されていなかったとすると、この配列がサンプルから検出された際には、一致率が判定基準 (97.0%) を超えないため、種を判定することは難しいと言えます。そのため、種としてのリファレンスの有無だけでなく、種内系統も含めたリファレンスの登録の有無も、一致率を基準とした種の判定を行う上で重要なポイントとなります。

日本産両生類には、こうした遺伝的特徴が異なる複数の種内系統を含む種がいくつか存在するため、Amph16S 法による環境 DNA 調査を実施する場合は、一致率が判定基準 (97.0%) 以下で検出された配列の中に、リファレンスが登録されていない種内系統と推測されるものが含まれている可能性がないか、分析結果を十分に精査する必要があります。



3. 分子系統樹を基にした判定

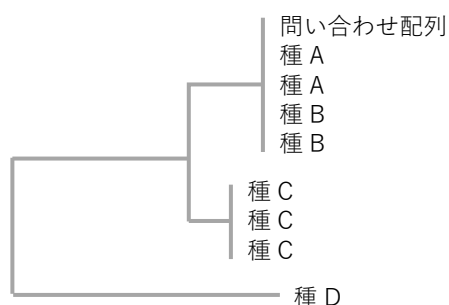
分子系統樹は、塩基配列の違いの大きさを「遺伝距離」という数値データに変換し、その遺伝距離の長さを配列間の相同性ととも図示化したものです。したがって、2つの配列データがあり、それらが全く同じ配列であれば、系統樹上では、両者は全く同じ位置にデータが並ぶことになります。

一部の両生類では、互いに近縁な2種もしくはそれ以上の種間において、Amph16S配列が完全に同じ場合があります。そのような近縁種間（仮にA種とB種とします）で同一の配列をもつ種群の配列がサンプルから検出された場合には、実際にはA種の配列であっても、Amph16S法の分析結果としてB種と同定されることがあります。このように、全く同一のAmph16S配列をもつ種群については、参考資料5の「Amph16S法における種・種内系統の識別性」の欄においては、「識別は要注意（現時点では不可能）」、参考資料6では「識別は要注意」と示しています。

（分子系統樹の例①）「識別は要注意（現時点では不可能）」と判定される場合

サンプルから得られた問い合わせ配列は、系統樹上ではA種とB種が並ぶ枝（クラスターとも呼びます）に含まれるため、この問い合わせ配列は、A種もしくはB種のどちらかであるが、種の識別は不可能であると判定されます。

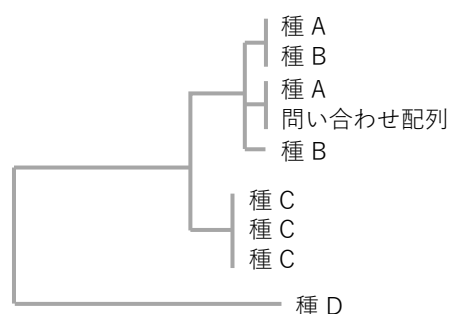
このタイプに該当する主な種群としては、シロアゴガエル / ホンコンシロアゴガエルなどがあります。



（分子系統樹の例②）「識別は要注意（現時点では不可能）」と判定される場合

サンプルから得られた問い合わせ配列は、系統樹上ではA種の枝に含まれますが、A種とB種が同じ枝に含まれる枝も確認されるため、A種とB種は種の識別は不可能であるとみなします。そのため、この問い合わせ配列は、A種もしくはB種のどちらかであるが、種の識別は不可能であると判定されます。

このタイプに該当する主な種群としては、タゴガエル / ナガレタゴガエルがあります。



資料4「Amph16S 法における種の識別性を確認するための分子系統樹」は、日本国内に生息する主要な両生類を対象として、国際塩基配列データベースから取得した Amph16S 配列を基に分子系統樹を作成したもので、種の識別性やリファレンス配列ごとの相同性などを確認することができます。なお、資料4及び参考資料5～6は、資料作成時点における種の識別性を示したものであり、この識別性は確定したものではないことに注意が必要です。今後、データベース上のリファレンスが増えることで、種の識別性に対する判断が変更される可能性があります。