

## MiFish 法における種の識別性に関する判定基準（2023 年 3 月版）

MiFish 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、②MiFish 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

MiFish 法では、サンプルから最終的に得られた MiFish 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魚種の塩基配列（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、専門家の意見を踏まえて「一致率 98.5%以上」を MiFish 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 98.5%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（177bp） ※bp とは塩基配列の長さを表す単位

CACCGCGGTTAAACGAGAGGGTTACGGAACA..中略..AAACATATGATCCCACGAAAGCTGAGAAA



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 = ミナミアカヒレタビラ（177bp） 一致率 100%

CACCGCGGTTAAACGAGAGGGTTACGGAACA..中略..AAACATATGATCCCACGAAAGCTGAGAAA

リファレンス配列 B = キタノアカヒレタビラ（177bp） 一致率 98.87%

CACCGCGGTTAAACGAGAGGATTACGGAACA..中略..AAACATATGATCCCACGAAAGCTGAGAAA

リファレンス配列 C = アカヒレタビラ（177bp） 一致率 98.31%

CACCGCGGTTAAACGAGAGGATTACGGAACA..中略..AAACATACGATCCCACGAAAGCTGAGAAA

※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 ミナミアカヒレタビラ の配列であると判定する。

## 2. MiFish 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魚種（種内系統も含む）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、仮にミナミアカヒレタビラ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キタノアカヒレタビラとなり、その一致率も 98.87%と判定基準を上回るため、同定結果はキタノアカヒレタビラとなってしまいます。

また、一部の淡水魚類は、遺伝的特徴が異なる複数の系統を種内に含んでいることがあり、これを本資料では種内系統（地域集団や地域個体群などと呼ばれることもあります）と呼びます。種内系統の中には、MiFish 配列が 3 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 98.5%以下になってしまうことがあります。

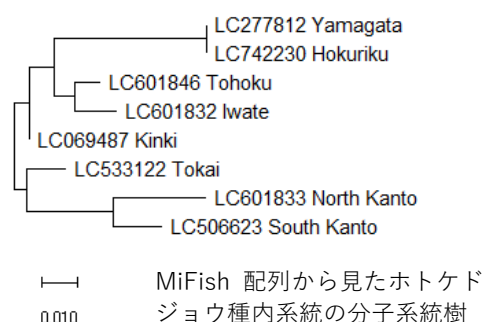
したがって、参考資料 1「リファレンス（MiFish 配列）登録状況及び種特異的プライマー整備状況一覧」のうち、「MiFish 配列の登録の有無」から、サンプルを採水した地点に生息する可能性のあるすべての魚種（種内系統も含む）のリファレンス配列が登録されていることを必ず確認しましょう。リファレンス配列が登録されていない魚種（種内系統も含む）が生息する可能性がある場合は、その種の配列が検出された場合に、一致率が基準である 98.5%を超えないことも考えられるため、後述する分子系統樹の情報も含めて総合的に解釈する必要があります。

#### （種内系統の例）

ホトケドジョウには、北陸型、近畿型、東海型、山形型、東北型、北関東型、南関東型、岩手型と 8 つの種内系統の存在がこれまでに報告されています。これらの種内系統は MiFish 配列がそれぞれ異なっており、最も差が大きい南関東型と山形型・北陸型では互いに計 14 塩基の違いがあります。

例えば、特徴的な MiFish 配列をもつ山形型や北陸型では、それらと最も相同性が高い近畿型であっても一致率が 95.40%と低くなっています。仮に、山形型や北陸型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（98.5%）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。

日本産の淡水魚類には、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 30 種以上存在するため、MiFish 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（98.5%）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

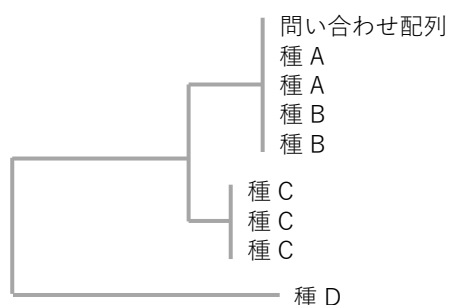
分子系統樹は、塩基配列の違いの大きさを「遺伝距離」という数値データに変換し、その遺伝距離の長さを配列間の相同性ととも図示化したものです。したがって、2つの配列データがあり、それらが全く同じ配列であれば、系統樹上では、両者は全く同じ位置にデータが並ぶことになります。

一部の淡水魚類では、互いに近縁な2種もしくはそれ以上の種間において、MiFish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、MiFish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MiFish配列をもつ種群については、資料2の「MiFish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1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。

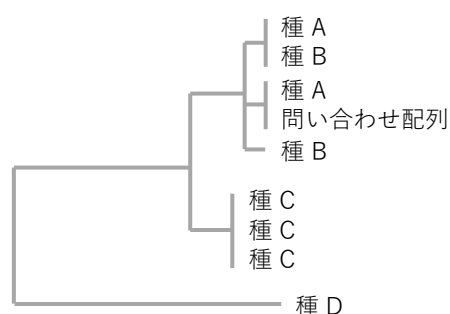
このタイプに該当する主な種群としては、タモロコ/ホンモロコ、アメマス/ニッコウイワナ/ヤマトイワナ/ゴギ、チチブ/ヌマチチブ/ナガノゴリなどがあります。



（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。

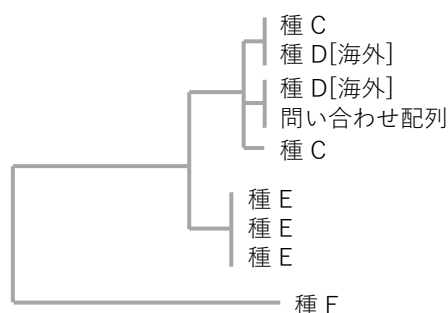
このタイプに該当する主な種群としては、ニゴイ/コウライニゴイ、スゴモロコ/デメモロコ/コウライモロコ、ゴクラクハゼとトウカイヨシノボリを除くヨシノボリ属などがあります。



また、一部の淡水魚類では、MiFish 配列が完全に同じ近縁種間のうち、片方が日本国内で生息が知られる種、もう片方が海外産の種（現時点では日本国内への移入が確認されていない種）という場合があります。そのような近縁種間（仮に国内産種を C 種、海外産種と D 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 C 種の配列であっても、MiFish 法の分析結果として D 種と同定されることがあります。この場合は、C 種と D 種は識別が不可能ですが、D 種が日本国内への移入が確認されていない種であると確実に判断できる場合には、C 種であると判定してもよいと考えます。これに該当するものは、資料 2 の「MiFish 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（海外産種の移入はないと判断される場合は、海外産種の種名・学名を除外することが可能）」、参考資料 1 では「識別は要注意」と示しています。

（分子系統樹の例③）「識別は要注意（海外産種の移入はないと判断される場合は、海外産種の種名・学名を除外することが可能）」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 D 種の枝に含まれますが、C 種と D 種が同じ枝に含まれる枝も確認されるため、C 種と D 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、C 種もしくは D 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。



その上で、D 種が日本国内への移入が確認されていない種であると確実に判断できる場合には、この問い合わせ配列は C 種であると判定してもよいでしょう。ただし、その場合には、D 種ではないと判断した根拠を注釈として記載することが望ましいでしょう。

このタイプに該当する主な種群としては、モツゴ/モツゴ属の一種[海外]、ナマズ/イワトコナマズ/タニガワナマズ/ナマズ属の一種[海外]などがあります。

資料 3「MiFish 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汽水・淡水魚類を対象として、国際塩基配列データベースから取得した MiFish 配列を基に分子系統樹を作成したものです。資料 3 では、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 1～3 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。**