

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07893

研究課題名(和文)内湾域の底棲魚介類の初期減耗に餌料環境が及ぼす影響の解明

研究課題名(英文)Effect of feeding habit and prey availability on mortality in early life history of coastal megabenthic animals

研究代表者

児玉 圭太 (KODAMA, KEITA)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号：90391101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：東京湾の優占種かつ資源減少の著しいシャコの生活史初期個体について、食性解析を行うための手法を開発した。捕食者生物(シャコ)のDNA配列に特異的に結合するペプチド核酸(PNA)プローブを用いて消化管内容物についてPCRを行った結果、捕食者生物のDNA増幅を阻害できることを確認した。得られた増幅産物について次世代シーケンス解析を行い、消化管内容物の推定を行った。その結果、稚シャコにおいては、多毛類と甲殻類が主要餌生物である可能性が示された。環境中あるいは捕食者体内に存在する餌生物以外の生物に由来するDNAも検出されたことから、これらを餌生物由来のDNAと明確に区分するための手法改善が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、内湾漁業において深刻な問題となっているシャコ資源量減少に関して、特に初期生活史における餌料条件が資源量減少に及ぼす影響の解明への寄与が期待される。また、提示した食性解析手法は、他の生物分類群にも広く応用でき、現時点で知見が乏しい水生生物の生活史初期の食物網構造を明らかにすることが可能となることから、生物学および生態学分野における学術的発展にも寄与するであろう。

研究成果の概要(英文)：We developed a technique to examine the feeding habit of mantis shrimp at the early life stages. We designed peptide nucleic acid (PNA) probes that are specifically bind to ribosomal DNA (rDNA) of mantis shrimp, and confirmed that it restricts the amplification of mantis shrimp rDNA during PCR of the gut contents. Using the products of PNA-oriented PCR, next-generation sequencing was conducted to investigate taxonomic composition of the gut contents of juveniles of mantis shrimp. The results suggested that polychaetes and crustaceans are main prey organisms for the juveniles. On the other hand, genes of non-prey organisms for the juveniles, e.g. phytoplankton from the ambient environment and/or fungal species existing in the intestine, were also detected during our NGS analysis. Further modification of the procedure is required to improve the accuracy of outcomes of the analysis of feeding habit.

研究分野：水圏生態学

キーワード：食性 生活史初期 底棲魚介類 甲殻類 東京湾 ペプチド核酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

沿岸域は多くの水生生物の産卵場や成育場としての機能を有する重要な場であるが、日本各地の沿岸域において生物相の衰退が生じている。主要な内湾の一つである東京湾においては、底棲魚介類の資源量は 1980 年代の前期から中期にかけて高水準であったが、1980 年代末に非漁獲対象種も含め複数の魚種が同調的かつ急激に減少し、現在も資源量は低水準で推移している。こうした状況を受けて、小型底曳網漁業において休漁や禁漁区設定などの自主的な漁獲管理が実施されてきた。しかしながら、漁獲対象種および非漁獲対象種の資源量は減少の一途を辿り、回復の兆しがみられない。この事実は漁獲努力量以外の要因が、複数の魚種の資源量増加を抑制している可能性があることを示唆する。

東京湾の底棲魚介類群集と環境因子の年変動を解析した先行研究の結果から、魚介類の種組成・漁獲量の変化に、水温の上昇、溶存酸素濃度の低下、および栄養塩濃度や動物プランクトン密度の低下が相関することが見出されている。また、優占種のシャコについては、貧酸素水塊が生活史初期段階における生残に影響する可能性があることも示されている。しかし、これらの要因だけでは資源量変動を完全に説明できず、他の要因の寄与についても精査する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では海産生物の生活史初期段階の生残に影響する主要因の一つとされている餌料環境が、東京湾の底棲魚介類の資源変動に及ぼす寄与の程度を明らかにすることを目的とする。本研究では、東京湾の優占種であり、漁獲量減少が著しく、また、過去の調査結果の蓄積があるシャコを調査対象種とする。

資源変動と餌料環境の関係を解明するためには食性解析が必須であるが、体サイズが微小な生活史初期の個体、特に餌生物を咀嚼して消費する甲殻類については、消化管内容物の観察から餌生物を同定することが困難である。これまでにペプチド核酸による捕食者生物の遺伝子増幅抑制を利用したクローンライブラリ法により、甲殻類の餌生物種組成を調査する手法の開発に取り組み、生活史初期における食性解明の実現可能性を示した。しかし、解析精度およびコストの観点から手法の改善が必要と判断され、次世代シーケンス解析の手法を取り入れた解析手法の開発に取り組んでいるところであるが、ペプチド核酸を用いる際の解析条件や、餌生物以外（例えば、体表に付着した生物の試料への混入）の解析結果への影響など野外採集サンプルへの適用可能性について検討すべき事項が多く残されている。

本研究では、これらの課題を解決するため、ペプチド核酸による捕食者生物の遺伝子増幅抑制、および捕食者の消化管内容物試料の調製方法が、次世代シーケンス解析結果に及ぼす影響を明らかにする。これにより、餌生物の種構成を高い精度で把握する手法を確立する。

3. 研究の方法

東京湾においてシャコの生活史初期個体（浮遊幼生、および変態し着底した稚シャコ）を採集する。採集した個体の食性を、ペプチド核酸（peptide nucleic acid; PNA）による捕食者生物の遺伝子増幅抑制を利用した次世代シーケンス解析により調査する。空胃率や餌生物種組成について、時間的変化、および空間的（異なる底質の水域間、および貧酸素水塊発生・非発生水域間）な差異の有無を明らかにする。東京湾において動植物プランクトンの採集、およびマクロベントスの採集を行う。動植物プランクトンおよびマクロベントスの種組成、個体数密度について、時間的および空間的（異なる底質の水域間、および貧酸素水塊発生・非発生水域間）な差異の有無を明らかにする。シャコの餌生物および非餌生物の個体数密度から餌選択性指数を算出し、シャコの餌利用可能度の時間的・空間的な差異の有無を調査する。得られたデータにより、幼生から稚シャコの期間の食性および生残率と、餌生物の種組成・個体数密度の関係を解析する。

以上の結果をとりまとめ、餌料環境の変化がシャコ生活史初期における生残に及ぼす影響について考察する。

4. 研究成果

幅広い生物分類群の 18S rDNA および 28S rDNA を増幅するユニバーサルプライマー、および捕食者として解析対象とするシャコの DNA 増幅を特異的に阻害するための PNA プローブを製作し、PCR により増幅阻害効果の検討を実施した。目視により消化管内容物の存在が認められた稚シャコ 6 検体について、18S rDNA、28S rDNA とともに PNA プローブを添加した場合、増幅産物からシャコ類の DNA は検出されなかった。一方、PNA プローブを添加しなかった場合、増幅産物の 30～88% にシャコ類の DNA が検出された。これらの結果より、稚シャコの食性解析において、PNA プローブが捕食者生物（シャコ）の DNA 増幅阻害に有効であることが確認された。

次に、東京湾で採集したシャコ幼生 4 検体（微小サイズのため消化管内容物の存在は確認困

難)について MiSeq による次世代シーケンス解析を実施したところ、PNA プローブ添加の有無に関わらず、全ての検体においてシャコ類の DNA が検出された。増幅産物に占めるシャコ類 DNA の比率は、PNA プローブを添加しなかった場合 100%であったが、PNA プローブを添加した場合は 7 ~ 77%と幅がみられた。これらの結果は、幼生において PNA プローブによるシャコ DNA の増幅阻害効果は認められたが、その効果には変動がみられること、およびその原因として、消化管内容物が無い場合(空胃)またはその量が著しく少ない場合に検体中のシャコ DNA の存在比率が高くなり、増幅阻害効果の低減が生じるものと推察される。したがって、本手法によりシャコ幼生の食性解析を行うためには、供試個体の消化管内容物の有無を解析前に確認する必要があると考えられた。

東京湾で稚シャコを採集し、目視により消化管内容物の存在が認められた稚シャコ 6 検体について PNA プローブを用いた食性解析を行った。幅広い生物分類群の 18S rDNA および 28S rDNA を増幅するユニバーサルプライマー、および宿主生物(シャコ)の DNA 増幅を特異的に阻害するための PNA プローブを用いて PCR を行った。増幅産物を用いて MiSeq による次世代シーケンス解析を行った。PNA プローブ添加により、18S rDNA においては増幅産物からシャコ類の DNA は検出されなかった。一方、28S rDNA においては増幅産物からシャコ類の DNA が検出されたが、組成比は 0.4%と非常に低かった。以上より、18S rDNA、28S rDNA とともに PNA プローブによりシャコ類 DNA の増幅阻害が可能であることが確認された。次に、18S rDNA の増幅産物の分類群組成を調査した結果、後生動物、渦鞭毛藻類、珪藻類の 3 分類群で組成比の 96%を占めた。後生動物については更に下位の分類群について組成比の内訳を調べたところ、多毛類が最も高く、次いで魚類、甲殻類であり、この 3 分類群で後生動物の組成比の 99%を占めた。一方、28S rDNA の増幅産物の分類群組成をみると、18S rDNA と同様に後生動物、渦鞭毛藻類および珪藻が優占し、これらの 3 分類群で組成比の 91%を占めた。後生動物については更に下位の分類群について組成比の内訳を調べたところ、18S rDNA と同様に多毛類が 69.8%で最も優占し、次に甲殻類が 20.6%の組成比を示した。一方、18S rDNA で優占した魚類は 28S rDNA では検出されず、逆に 18S rDNA で検出されなかった軟体類が 28S rDNA において 8.3%の組成比で検出された。さらに、稚シャコの消化管内容物の種組成と、環境中の餌生物の豊度および種組成を調査し、稚シャコの餌生物選択性について検討した。東京湾で採集した稚シャコを供試個体とし、目視により消化管内容物の存在が認められた 15 検体について、28S rDNA を解析対象遺伝子として PNA プローブを用いた食性解析を行った。増幅産物からシャコ類の DNA が検出されたが組成比は 0.5%であり、PNA によりシャコ DNA の増幅阻害の有効性を確認した。検出された生物分類群の組成比を調査した結果、渦鞭毛藻をはじめとする藻類が 64.6%、菌類等の餌生物ではないとみられる分類群が 13.3%を占めた。この結果は、シャコの摂餌にともない、消化管内にこれらの生物分類群を含んだ環境水が混入することが要因と推察される。一方、増幅産物中において餌生物である可能性のある分類群および組成比は、甲殻類 8.4%、軟体類 5.4%、多毛類 5.1%、扁形類 2.6%であった。棲息環境中における餌選択性を調査するため Ivrev 指数を算出した結果、甲殻類で 0.97 および軟体類で 0.36 と高い嗜好性を示した一方、多毛類についての嗜好性は 0.79 と低かった。ただし、Ivrev 指数の算出においては、環境中の餌生物密度は採泥器により採集されたベントス類に基づいており、魚類や底層直上水に浮遊しているため本解析に反映されなかった生物群の密度は過少評価されているので、より高精度の餌選択性を推定するためにはこれらの生物群の密度も反映させる必要がある。

以上の結果より、消化管内容物の存在が確認された検体について、宿主生物の DNA 増幅を特異的に阻害するための PNA プローブを用いた PCR 増幅産物について次世代シーケンス解析を行うことにより、生活史初期個体の食性解析の実施可能性が示された。一方で、環境中のプランクトンや菌類等、餌生物ではないとみられる生物の遺伝子も検出されたことから、餌生物とそれ以外の生物の遺伝子を正確に識別するため、本手法をさらに改善していく必要がある。また、次世代シーケンス解析による消化管内容物についての分類群の検索精度向上のため、生息場に存在する潜在的餌生物について解析対象遺伝子配列のデータベースを充実させる必要もある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 1)Park JC, Kodama K, Oyama M, Lee JH, Ohta Y, Yamaguchi A, Shiraishi H, Horiguchi T | 4. 巻 152 |
| 2. 論文標題 Changes in feeding habits of the starspotted smooth-hound, <i>Mustelus manazo</i> , in Tokyo Bay between periods with different stock size levels | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Marine Pollution Bulletin | 6. 最初と最後の頁 online |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.marpolbul.2019.110863 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Lee JH, Kodama K, Shiraishi H, Horiguchi T | 4. 巻 AA2019 |
| 2. 論文標題 Qualitative and quantitative changes in dietary composition of marbled flounder <i>Pseudopleuronectes yokohamae</i> between periods of different stock sizes in Tokyo Bay, Japan | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Aquatic Animals | 6. 最初と最後の頁 1-7 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34394/aquaticanimals.AA2019.0_AA2019-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 児玉圭太, 堀口敏宏 | 4. 巻 41 |
| 2. 論文標題 東京湾：過去・現在・未来（2）：東京湾における底棲魚介類群集および主要種個体群の資源変動 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 海洋と生物 | 6. 最初と最後の頁 211-221 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kodama K, Aramaki T, Horiguchi T | 4. 巻 140 |
| 2. 論文標題 Current status of the megabenthic community in coastal Fukushima Prefecture, Japan, in the wake of the Great East Japan Earthquake | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Marine Environmental Research | 6. 最初と最後の頁 358 ~ 374 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.marenvres.2018.07.005 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Horiguchi T, Kodama K, Aramaki T, Miyata Y, Nagao S | 4. 巻 137 |
| 2. 論文標題 Radiocesium in seawater, sediments, and marine megabenthic species in coastal waters off Fukushima in 2012?2016, after the 2011 nuclear disaster | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Marine Environmental Research | 6. 最初と最後の頁 206 ~ 224 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.marenvres.2018.03.014 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 岡部 久, 児玉圭太, 伊東 宏, 堀口敏宏 | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 シャコ資源に対する貧酸素水塊の影響評価に向けて | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 東京湾の漁業と環境 | 6. 最初と最後の頁 13 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Horiguchi Toshihiro, Kodama Keita, Aramaki Takafumi, Miyata Yoshiki, Nagao Seiya | 4. 巻 137 |
| 2. 論文標題 Radiocesium in seawater, sediments, and marine megabenthic species in coastal waters off Fukushima in 2012?2016, after the 2011 nuclear disaster | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Marine Environmental Research | 6. 最初と最後の頁 206 ~ 224 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.marenvres.2018.03.014 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kodama Keita, Waku Mitsuyasu, Sone Ryota, Miyawaki Dai, Ishida Toshiro, Akatsuka Tetsuji, Horiguchi Toshihiro | 4. 巻 137 |
| 2. 論文標題 Ontogenetic and temperature-dependent changes in tolerance to hypoxia and hydrogen sulfide during the early life stages of the Manila clam <i>Ruditapes philippinarum</i> | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Marine Environmental Research | 6. 最初と最後の頁 177 ~ 187 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.marenvres.2017.12.019 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 児玉 圭太、曾根 亮太、宮脇 大、石田 俊朗、堀口 敏宏 | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 ヨシエビの生活史初期個体に対する貧酸素および硫化水素曝露の影響 | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 海洋理工学会誌 | 6. 最初と最後の頁 31～37 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14928/amstec.23.2_31 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 小林龍史, 児玉圭太, 堀口敏宏, 佐土哲也, 宮 正樹, 山川 卓, 黒木真理 |
| 2. 発表標題 東京湾における環境DNAメタバーコーディング法と漁獲調査による魚類相推定との比較 |
| 3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 児玉圭太, 近都浩之, 荒巻能史, 堀口敏宏 |
| 2. 発表標題 福島県沿岸域における底棲魚介類群集構造の時空間的特性 |
| 3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀口敏宏, 児玉圭太, 久米 元, 姜 益俊, 川村佳代子, 太田康彦 |
| 2. 発表標題 震災・原発事故後の福島県潮間帯生物相の経時変化 |
| 3. 学会等名 第22回環境ホルモン学会研究発表会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Horiguchi T, Kodama K, Kume G, Kang IJ, Kawamura K, Ohta Y |
| 2. 発表標題 Consecutive sexual maturation in the rock shell, <i>Thais clavigera</i> collected at a site near the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant |
| 3. 学会等名 19th International Symposium on Toxicity Assessment (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kodama K, Horiguchi T |
| 2. 発表標題 Exploration of factors affecting changes in megabenthic community structure in Tokyo Bay, Japan: (I) Long-term community-level study |
| 3. 学会等名 9th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kodama K, Horiguchi T |
| 2. 発表標題 Exploration of factors affecting changes in megabenthic community structure in Tokyo Bay, Japan: (II) Population-level studies in four dominant species |
| 3. 学会等名 9th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 児玉圭太, 黒木真理, 山川 卓, 清水 誠, 堀口敏宏 |
| 2. 発表標題 東京湾における底棲魚介類群集と環境因子の長期変動 (1977 ~ 2018年) |
| 3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Horiguchi T, Kodama K, Kume G, Kang IJ, Kawamura K, Ohta Y |
| 2. 発表標題 Delayed recovery from declines in the population densities and species richness of intertidal invertebrates near the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant |
| 3. 学会等名 SPERA Conference 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀口敏宏, 児玉圭太, 久米元, 姜益俊, 漆谷博志, 川村佳代子 |
| 2. 発表標題 東日本大震災及び原発事故後の福島県における潮間帯生物相の経時変化(第3報) |
| 3. 学会等名 第5回福島第一原発事故による周辺生物への影響に関する勉強会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 児玉圭太, 堀口敏宏 |
| 2. 発表標題 東京湾における底棲魚介類群集および個体群の長期変動 |
| 3. 学会等名 2018年度日本海洋学会秋季大会シンポジウム「東京湾の過去・現在・未来」(招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 児玉圭太, 曽根亮太, 宮脇 大, 石田俊朗, 堀口敏宏 |
| 2. 発表標題 ヨシエビの生活史初期個体に対する貧酸素および硫化水素の影響 |
| 3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 児玉圭太, 堀口敏宏 |
| 2. 発表標題 沿岸域の底棲魚介類に対する貧酸素水塊・硫化水素の影響評価 |
| 3. 学会等名 SATテクノロジー・ショーケース2018 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石井光廣, 三田久徳, 児玉圭太, 堀口敏宏, 堀正和, 片山知史, 内藤大輔 |
| 2. 発表標題 東京湾におけるマコガレイ稚魚の移動経路 |
| 3. 学会等名 2017年度水産海洋学会研究発表大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Horiguchi T, Kodama K, Kume G, Kang IJ |
| 2. 発表標題 Less recovery from decline in intertidal biota around Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant |
| 3. 学会等名 4th International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 児玉圭太, 堀口敏宏 |
| 2. 発表標題 浅海域における底棲魚介類の生活史初期個体に対する硫化水素の影響 |
| 3. 学会等名 平成29年度海洋理工学会春季大会シンポジウム「東京湾の今を知る」(招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Horiguchi T, Kodama K, Kume G, Kang IJ | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 Springer | 5. 総ページ数 65-88 |
| 3. 書名 Delayed recovery from declines in the population densities and species richness of intertidal invertebrates near Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|