

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2012

課題番号：20241003

研究課題名（和文） 分子マーカーによる動物プランクトン初期幼生の判別・自動計測と生態学的研究への応用

研究課題名（英文） Identification and automated counting of egg and larvae of zooplankton by molecular probes and its application to life history analysis

研究代表者 津田 敦 (TSUDA ATSUSHI)
東京大学・大気海洋研究所・教授
研究者番号：80217314

研究成果の概要（和文）：本研究は種特異的な分子プローブを作成し、今まで形態学的には同定できなかった幼生期プランクトンを同定し、フローサイトメータを用いて、自動計測することを目的に研究を行った。自動計測は手法上の問題で実用化しなかったが、幼生期の同定はリアルタイム PCR を用いて実用化し、親潮域で優占する近縁 3 種カイアシ類の初期生活史（ノープリウス幼生期）を解明し、特に 1 種では、ノープリウス期に休眠期があることを初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The goal of this study was to develop species identification with molecular probes and automated counting system. We have developed species identification methods by real-time PCR for *Neocalanus* copepods, although we have failed to develop a automated counting system with flow-cytometer by technical problems. Using this method, we revealed early life histories of three species of *Neocalanus* copepods. Especially, one species of *Neocalanus* newly showed dormancy during their nauplius stages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010 年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	37,700,000	11,310,000	49,010,000

研究分野：生物海洋

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：分子マーカー、動物プランクトン、自動計測、生物海洋、環境計測

1. 研究開始当初の背景

【地球観測としての動物プランクトン】地球規模での炭素の動態は、近年の温暖化気体としての二酸化炭素問題を背景に、国際的協調のもと、大気海洋結合モデルに生態系モデルを組み込んだ計算により、現状の把握と温暖化シナリオに基づいた将来予測が精度を上

げつつある。動物プランクトンは、旧来のモデルでは、植物プランクトンを安定化させる項目としての効果程度しかなかったが、近年の観測研究により、南極海や亜寒帯太平洋では大型動物プランクトンが、夏季に表層で植物プランクトンを摂餌し、炭素に富む脂肪を貯え 1000m 以深に潜り、越冬し、産卵死亡

することによって運ばれる炭素量が、たとえば北太平洋だけで $1.06 \times 10^{14} \text{gC/y}$ となることが推定されている。このように地球規模での炭素循環の中でも有意な炭素を深層に輸送する動物プランクトンの役割が認識され、近年の生態系モデルでは動物プランクトンの鉛直移動が組み込まれ、物質循環や生物遷移に大きく影響することが明らかになりつつある。しかし、植物プランクトンが海色衛星情報、物理パラメータが衛星やアルゴバイ情報により全球的な観測網が整備され、モデルに同化されるのに対して、動物プランクトンは船舶観測および採集試料の検鏡によってしか、有役な情報は得られない。動物プランクトンの効率的な計測には想定される範囲では、音響による方法と、連続採集と自動計測の組み合わせがあるが、本研究では生態学的な応用範囲も広い後者を採用した。

【形態分類学と分子系統】近年、形態による分類を生業とする学問分野は新しい学問分野の台頭とともに衰退の一途をたどっており、たとえば国内には動物プランクトンの形態分類の専門家は多く見ても5人以下であり、15年以内に絶滅すると考えられる。それと同時に、ミトコンドリアDNAなどを用いた分子系統学は、機器の進歩とともに急速に進歩しており、来るべき10年間に形態分類から分子への移行をスムーズに図らなければならない。形態分類は熟練を要する技術であるのに対して、分子生物学的手法はプロトコルに従えば、だれがいつやっても、同じ結果を導くことができ、時代とともに継承していく方法論としては価値が高い。動物プランクトンの分子系統学的研究は、植物プランクトンや海洋細菌に比べると知見は極端に少ないが、連携研究者の町田や、米国、欧州の少数の研究者によってではあるが、知見が蓄積されつつあり、種判別や自動計測など応用的分野の基礎は整ったと考えられていた。

【生態学的応用】形態分類は主に成体の形態を基にして構築されており、幼生や卵の同定は個人的な経験則に基づいていることがほとんどである。また、若いステージになればなるほど種を特定する形質は減少し、たとえば代表的な動物プランクトンであるカイアシ類ではノープリウス幼生や卵では種同定はほぼ不可能である。本研究で応用例として考えているカイアシ類 *Neocalanus plumchrus* と *N. flemingeri* は北太平洋で炭素を深層に輸送する主役であるが、両種は形態が非常に似ており、熟練した経験者でもコペポダイトII期幼生以下は同定できず、初期生活史は推測するしかなかった。しかし初期幼生期は炭素の輸送や個体群形成にとって最も重要な時期であり、分子マーカーの利用により、同定が可能になれば大きなブレイクスルーになる。特に *N. plumchrus* では産卵

時期と表層における初期コペポダイト幼生の出現時期が6か月ずれており、ノープリウス幼生期での休眠が予想されているが、ノープリウス期の同定ができないため、その証拠は得られていない。海洋に2000種以上生息するカイアシ類であるが、ノープリウス期での休眠は報告がなく、カイアシ類の生活史戦略を考える上でも意義は大きい。

2. 研究の目的

以上のような背景から本研究では、大きく以下3項目の目標を掲げる。

(1) リアルタイムPCRを用いた準リアルタイムのカイアシ類同定法確立

(2) 上記方法を用いた *Neocalanus plumchrus* および *N. flemingeri* の初期生活史解明

(3) 種特異的分子プローブと連続フロー画像解析を用いた自動計測法の確立

3. 研究の方法

本研究で用いた *Neocalanus* 属カイアシ類を対象とした試料は、2008年白鳳丸航海 KH-08-2 次航海、2009年の水産総合研究センター調査船、北光丸、若鷹丸による10月、2010年1, 3, 5, 7月の親潮域航海において、多層鉛直曳ネットVMPSまたは閉鎖型NORPACネットにより水深2000mから表面までを8層に分け採集した。*Neocalanus* 属カイアシ類3種および代表的な他種を採集し、エタノール標本として、プローブ分析の基礎資料とした。また蛍光染色法に代わる手法として開発を目指した、網羅的解析に用いる試料は、淡青丸航海、水産総合研究センター調査船蒼鷹丸による御前崎沖航海、および白鳳丸航海 KH-11-11 航海において得た。試料はすべてエタノール固定し、固定から24時間後に固定液を交換し、試料はすべて遮光下、冷蔵保存とした。

4. 研究成果

(1) *Neocalanus* 属3種に対する種特異的プローブ、プライマーの制作

1細胞に多くのコピー数を持ち、種特異的な変異を持つ領域としてmDNA COI領域を対象として種特異的プライマー、加水分解プローブセットを設計した。対象は親潮域で優占する近縁種3種 *Neocalanus plumchrus*, *N. flemingeri*, *N. cristatus* とし、形態分類から同定した雌成体の配列および、データベースにある3種 *Neocalanus* 属カイアシ類の配列および、データベース上にある、同海域に出現する可能性のあるカイアシ類の配列を参照し設計した。

N. plumchrus, *N. flemingeri*, *N. cristatus* に対してプローブプライマーセット Nep1、Nef1、Nec1を作成し、データベースを用いた

相同性検索の結果、相同配列を有する他のカイアシ類は存在しなかった。しかし、Nep1 と Nef1 の両方で、目的種以外の他のカイアシ類でもサイクル数を増やすと、増幅曲線が形成される事が分かった。また、DNA 抽出の際、全てのサンプルから同じ DNA 量を抽出する事が出来なかった為、目的種の個体間で増幅曲線の立ち上がりサイクル数のばらつきが生じた。しかし、目的種と非目的種では増幅曲線が立ち上がるまでに大きな差があり、実験から得られたグラフから目的種を判別する事が可能である。また、ノープリウス幼生で解析を行う際に、試料を成長段階ごとに分類し、体長が同じ個体群で解析を行う事により、ある程度抽出する DNA 量を統一し、目的種の増幅曲線の立ち上がりサイクルのばらつきを抑え、正確に目的種を判別できると考えられる。しかしさらなる検討の結果、DNA を抽出した溶液の DNA 濃度を測定し、リアルタイム PCR における Ct 値との関係式を得て、関係式からの偏差を基準として種判別する方法を開発した。この手法によって、より正確な種判別が可能となった (図 1)。

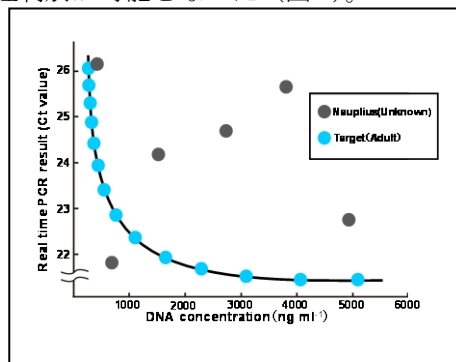


図 1 試料中 DNA 量と対象種 (青) と非対象種 (黒) の Ct 値の関係

作成したプローブプライマーセットを用いて同定された *Neocalanus* 属カイアシ類を各種 100 個体以上、および、その他のカイアシ類と同定されたカイアシ類 100 個体以上の DNA 抽出試料を PCR 増幅し mDNA COI 領域を配列を読み同定を検証した。その結果、*N. plumchrus* および *N. cristatus* に関してはほぼ 100%、*N. flemingeri* に関しては 90% 程度の同定率であり、生態学的な応用には十分耐えうる精度を示すことが出来た (業績 31, 32)。その他のカイアシ類と同定されたノープリウス幼生の多くは *Meteridia pacifica* と同定され、その分布は 200m 以深にもおよび、本種は表層産卵・成長と考えられていたが、新しい示唆が得られた。

さらに *N. flemingeri* には、大型・小型の 2 形が出現することが知られているが、分析の過程で、この 2 形が種レベルよりは変異が小

さいが遺伝的に異なる集団であることが、ミトコンドリア COI と 12S 遺伝子配列の解析によって明らかとなった。この大型・小型の遺伝距離はミトコンドリア COI, 12S 遺伝子でそれぞれ、0.036、0.006 (p) と近縁種間の遺伝距離と比較すると小さく (例えば *N. plumchrus* と *N. cristatus* の遺伝距離 (p) はそれぞれ、0.162、0.076)、比較的近年に出現した集団であることが推察された (業績 10, 12)。

(2) *Neocalanus* 属カイアシ類の初期生活史

3 種は、産卵時期、産卵水深、ノープリウス幼生期の成長パターン、表層への移動時期が異なっていた。*N. cristatus* はノープリウス卵黄蓄積量が多く、幼生は常に深層に分布し 10 月に最も多く分布し、1 月にはノープリウス現存量は減少した。これら、初期生活史は報告されている後期幼生期の生活史によく一致する。また、表層へ移動は最終期幼生で観察された。*N. flemingeri* は秋 (10 月) からすべての成長段階のノープリウス幼生が観察され、季節とともに後期幼生が増加し、従来後期幼生期の生活史研究から推測されていた、産卵・成長パターンと一致した。本種は産卵深度も浅く、ノープリウス III-IV 期で主に表層へ移動する。これに対して最も優占する *N. plumchrus* は 1 月までは後期ノープリウス幼生が出現せず、ノープリウス III 期幼生が季節とともに増加し、3 月に少数の後期幼生が観察され、4 月以降に後期ノープリウス幼生が数多く出現した。すなわち、*N. plumchrus* はノープリウス III 期幼生で、成長を停滞 (休眠) させ、あるトリガーで時間的に同期し成長を再開させることが強く示唆された。カイアシ類においてはノープリウス幼生期での休眠は報告がなく、非常に大きな発見であることが示唆される。10 月には 1000 m 以深の深層で産卵し、ノープリウス幼生もこの深度に分布するが、季節の冬から春にかけては親の分布深度が 200-500 m 程度に浅くなることが明らかとなった。ノープリウス幼生は産卵深度にほぼ留まると考えら

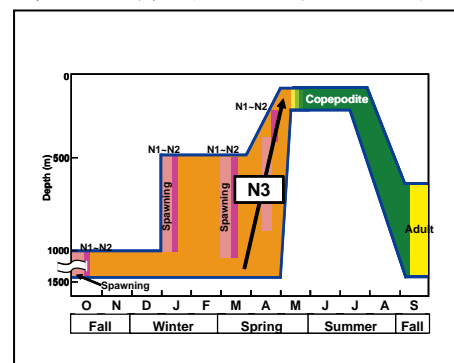


図 2 *N. plumchrus* の全生活史 (横軸は季節、縦軸は水深)。オレンジ色の部分が今回の研

究で明らかになった初期生活史

れ、結果としてノープリウス幼生分布範囲は、季節が進むと深層から 200 m までと幅広くなることが明らかとなった（業績 17, 19）。

以上のように、3 種の生活史は亜成体で分かっていた生活史の差より、より顕著な差が初期幼生期にあることが、新しい手法を導入することにより解明でした（業績 1, 22, 23）。

（3）画像解析による自動計数

本研究では種特異的な遺伝子プローブに蛍光物質を付加し、種特異的な染色を施し、それをフローサイトメータで、計数・定量する予定であった。初年度に、この分野で先駆的な研究を行っている仏国研究者と連絡をとり、手法を伝授してもらったが、細菌や単細胞生物とはことなり、外骨格をもつ甲殻類では、この組織を軟弱化させ、プローブの浸透性を高めなくてはならなかった。この方法では、染色は出来ても、他の用途に試料を融通することは出来ず、生態学的研究には不向きであることが、判明した。いくつかの方法を試みたが、画像解析に耐え、種特異的な染色ができ、体の形状をとどめる方法の開発には至らなかった。そこで、本研究では、自動計測ではないが、処理時間を従来法（顕鏡による同定と計数）よりは圧倒的に処理時間を短縮できる超並列シークエンサーを用いた網羅的解析の手法開発を目指した。また、購入したメーキングフローサイトメーター（FlowCAM）に関しては、微小動物プランクトン（繊毛中、放散虫）の定量化を試み、濃縮方法と測定条件の検討を行い、気泡除去画像解析プログラムを開発し、白鳳丸航海で繊毛虫を対象として定量測定を実施した。

（4）カイアシ類群集の網羅的解析手法開発

形態分類に代わる分子手法として、可能性を模索した結果、*Neocalanus* で用いた mtDNA COI 領域は、他のカイアシ類で PCR 成功率が低く（変異が激しいため）、広い分類群に使用可能な領域の探査を行った結果、核 DNA の 28S rDNA 領域が、保存性の高い領域に挟まれ、種レベルの分解能を持った領域であることが日本近海の主要動物プランクトンを用いた結果で明らかになった。さらに、この領域にはある程度の変異が存在する D1/D2 領域が含まれ、これらの領域が 400–600bp であることから、超並列シークエンサーで分析できることから、準リアルタイムで、種同定や生物量測定ができる可能性が示された。当初想定した分子プローブによる染色と画像解析を組み合わせる方法とは別であるが、目的としていた迅速な計測には一定の道筋をつけることができた（業績 2, 15, 16, 18, 24, 27）。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 26 件）

- (1) 津田敦 亜寒帯北太平洋における動物プランクトン津田敦を中心とした低次生態系の動態に関する研究 海の研究 (in press), 査読あり
- (2) Hirai, J., S. Shimode and A. Tsuda (2013) Species identification of calanoid copepods in the subtropical regions off the coast of Japan by using a new molecular marker ITS2-28S D1/D2. *Journal of Plankton Research*, doi: 10.1093/plankt/fbt016, 査読あり
- (3) Moore, C.M., M. M. Mills, K. R. Arrigo, I. Berman-Frank, L. Bopp, P. W. Boyd, E. D. Galbraith, R. J. Geider, C. Guieu, S. L. Jaccard, T. D. Jickells, J. La Roche, T. M. Lenton, N. M. Mahowald, E. Marañón, I. Marinov, J. K. Moore, T. Nakatsuka, A. Oschlies, M. A. Saito, T. F. Thingstad, A. Tsuda and O. Ulloa (2013) Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geoscience*, doi: 10.1038/NGEO1765, 査読あり
- (4) Shimode, S, K. Takahashi, Y. Shimizu, T. Nonomura and A. Tsuda (2012) Distribution and life history of two planktonic copepods, *Rhincalanus nasutus* and *Rhincalanus rostrifrons*, in the northwestern Pacific Ocean. *Deep Sea Research I*, 65: 133-145. 査読あり
- (5) Tada, Y., A. Taniguchi, I. Nagao, T. Miki, M. Uematsu, A. Tsuda, and K. Hamasaki (2011) Major phylogenetic groups of marine bacteria differ in growth response to natural phytoplankton blooms in the western North Pacific. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 4055-4065. 査読あり
- (6) Nonomura, T, S. Nishida, A. Tsuda, I. Yasuda (2011) Morphological characters for practical identification of the copepodite stages of three sympatric *Calanus* species in the western North Pacific. *Journal of Plankton Research*, 33: 1496-1509. 査読あり
- (7) Shimode, S., K. Takahashi, A. Tsuda (2012) Life history of *Eucalanus californicus* Johnson (Copepoda: Clanoidea) in the northwestern Pacific

- Ocean. Progress in Oceanography, 96: 1-13. 査読あり
- (8) 津田敦、西岡純、伊東宏 (2012) 夏季オホーツク西部海域における動物プランクトンの分布-クリオネの起源を追って. 海洋と生物, 34: 25-34. 査読なし
- (9) Tsuda, A., K. Fukami, H. Kiyosawa, K. Suzuki, S. Takeda, J. Nishioka, M. Takahashi, K.W. Johnson, C. S. Wong (2010) Response of lower trophic organisms to nutrients input and effects on carbon budget: a mesocosm experiment. Plankton and Benthos Research, 5: 144-155. 査読あり
- (10) Machida, J.R. and A. Tsuda (2010) Dissimilarity of species and forms of the planktonic *Neocalanus* copepods using mitochondrial COI, 12S, nuclear ITS, and 28S gene sequence. PLOS One 5(4): e10278. doi:10.1371/journal.pone.0010278. 査読あり
- (11) Miyamoto H, Machida RJ, Nishida S (2010) Complete mitochondrial genome sequences of the three pelagic chaetognaths *Sagitta nageae*, *Sagitta decipiens* and *Sagitta enflata*. Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics and Proteomics, 5: 65-72, 査読あり
- (12) Machida RJ, Hashiguchi Y, Nishida M, Nishida S (2009) Zooplankton diversity analysis through single-gene sequencing of a community sample. BMC Genomics, 10: 438. 査読あり
- (13) Shimode, S., Y. Hiroe, K. Hidaka, K. Takahashi and A. Tsuda (2009) Life history and ontogenetic vertical migration of *Neocalanus gracilis* (Dana) in the western North Pacific. Aquatic Biology, 7: 295-306. 査読あり
- (14) Tsuda, A., H. Saito, R.J. Machida, S. Shimode (2009) Meso- and microzooplankton responses to an in situ iron fertilization experiment (SEEDS-II) in the northwest subarctic Pacific. Deep-Sea Research II, 56: 2767-2778. 査読あり
- [学会発表] (計 50 件)
- (15) 平井惇也、「亜熱帯循環におけるカイアシ類のメタ 28S rDNA 解析」、日本海洋学会春季大会, 2013 年 03 月 23 日、東京
- (16) Hirai, J, “A metagenomic method for marine planktonic copepods using 454 pyrosequencing of 28S rDNA gene” ASLO meeting, 2013 年 02 月 18 日、New Orleans, USA.
- (17) Fujioka, H., “Early life cycle of *Neocalanus* copepods in the Oyashio region, western North Pacific” 2013 年 02 月 18 日, New Orleans, USA.
- (18) 平井惇也、「黒潮周辺海域におけるカイアシ類のメタゲノム解析」、日本海洋学会秋季大会、2012 年 09 月 14 日、清水
- (19) Fujioka, H, “Early life cycle of *Neocalanus plumchrus* and *Neocalanus flemingeri* in the Oyashio region, western north Pacific” PICES Annual Meeting, 2012 年 10 月 24 日, 広島
- (20) Shimode, S, ”Ontogenetic vertical migration of two tropical-subtropical copepods, *Rhincalanus nasutus* and *Rhincalanus rostrifrons*, in the northwestern Pacific Ocean: Implication for a variety of life history strategies of *Rhincalanus*. Pacific” PICES Annual Meeting, 2012 年 10 月 23 日、広島
- (21) Tsuda, A., “Comparative study of the life histories of Eucalanidae copepods in the subtropical and subarctic Pacific” ESSAS Open Science Meeting, 2011 年 5 月 21 日, Seattle, USA
- (22) Tsuda, A., “*Neocalanus* vs. *Calanus* oceans. Comparative study on the life histories of *Neocalanus* and *Calanus* copepods, and their global distribution” ESSAS Open Science Meeting, 2011 年 5 月 21 日, Seattle, USA
- (23) 下出信次、「浮遊性カイアシ類 *Neocalanus* 属と *Calanus* 属の分布特性と生活史」、2011 年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会, 2011 年 9 月 3 日, 高知
- (24) 平井惇也、「DNA シークエンスによる亜熱帯性 Calanoida カイアシ類の種同定技術の開発と展」、2011 年度日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会, 2011 年 9 月 3 日, 高知
- (25) Tsuda, A, ”*Neocalanus* and *Calanus* copepods in the western North Pacific, their distribution and life histories” 6th ADOES Workshop, 2011 年 11 月 18 日, Qindao, China
- (26) 下出 信次、「亜熱帯太平洋における Eucalanidae 科カイアシ類の成長に伴う鉛直移動と生活史戦略」、東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会、亜熱帯太平洋のプランクトン生態系および物質循環に関する比較海洋学、2011 年 11 月 25 日、東京

- (27) 平井 惇也、「ITS2-28S rDNA 配列による亜熱帯性カラヌス目カイアシ類の種同定と展望」、東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会、亜熱帯太平洋のプランクトン生態系および物質循環に関する比較海洋学、2011年11月25日、東京
- (28) 藤岡秀文、「カイアシ類 *Neocalanus plumchrus* の親潮域における初期生活史」、日本海洋学会春季大会、2012年3月26日、つくば
- (29) 津田敦「、亜寒帯北太平洋における動物プランクトンを中心とした低次生態系の動態に関する研究」、日本海洋学会春季大会2012年3月28日、つくば、(招待講演)
- (30) Saito, H., “West meets East: Inter-gyre transportation of *Neocalanus* copepods” PICES 19th Annual Meeting, 2010年10月20日、Portland USA
- (31) Fujioka, H.、”Identification of *Neocalanus plumchrus* and *N. flemingeri* by Real-time PCR method” PICES 19th Annual Meeting, 2010年10月20日、Portland USA
- (32) 藤岡秀文「Real-Time PCR を用いた *Neocalanus plumchrus* および *N. flemingeri* 同定法の確立」日本海洋学会2010年度春季大会、2010年3月26日、東京
- (33) Tsuda, A., “Vertical distribution of large suspension feeding copepods in the Oyashio region during the growing period” PICES 18th Annual Meeting, 2009年10月23日、Jeju, Korea
- (34) Saito, H., “Vertical and horizontal carbon transport through the ontogenetic vertical migration of copepods” Chapman conference on the Biological Carbon Pump of the Oceans, 2009年9月17日、Hampshire, England.

[図書] (計 2件)

- (35) 津田敦: "水圏生物科学入門" 恒星社厚生閣. 37-48 分担執筆 2009
- (36) 津田敦 生物学辞典、東京化学同人、東京、pp1615 分担執筆 2010

[その他]

・海洋研究所一般公開や、海洋学会共催の「研究船で海を学ぼう」に参加し、研究の成果を一般にアウトリーチする試みを行っている。

・研究代表者が、H23年に「亜寒帯北太平洋における動物プランクトンを中心とした低

次生態系の動態に関する研究」で日本海洋学会賞受賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 敦 (TSUDA ATSUSHI)
東京大学・大気海洋研究所・教授
研究者番号：80217314

(2) 研究分担者

町田 龍二 (MACHIDA RYUJI)
東京大学・大気海洋研究所・特任研究員
研究者番号：40401294
2008-2009年