

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660162

研究課題名(和文)海産生物の生活史初期個体の食性解析手法の開発および生態調査への応用

研究課題名(英文)Development of method for investigation of feeding habit of marine organisms during early life stages: application to ecological research

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：海産生物幼若個体の食性解析を行うための手法開発を行った。様々な生物分類群の28S rDNAを増幅するユニバーサルプライマーと、捕食者(シャコ)DNA増幅を特異的に阻害するPNAプローブを用いてPCRを行い、クローンライブラリ法により増幅産物の塩基配列を決定した。PNAにより捕食者DNAの増幅阻害が認められ、消化管組織から刺胞動物、菌類、植物・動物プランクトンおよび尾索動物が検出された。一方、餌生物以外にも消化管内の常在菌や、体表付着由来の生物とみられる遺伝子も検出されたため、これらを餌生物の遺伝子と判別する手法を考案する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We developed a method of PCR-based diet analysis using the peptide nucleic acid (PNA) as a blocking probe for inhibiting DNA amplification of mantis shrimp from Tokyo Bay. We designed universal primers to amplify 28S rDNA for aquatic organisms of a wide range of taxon, and also designed a PNA probe specific to mantis shrimp 28S rDNA. We analyzed DNA template of host (mantis shrimp) and non-host organisms with the universal primers and PNA probe, and confirmed that inhibition of host DNA amplification. PNA-based analysis on samples including stomach and adjacent tissues (e.g., carapace and pleopod) of larvae and juveniles detected potential prey organisms, such as copepods and polychaetes. However, we also detected sequences of non-prey organisms, such as ctenophores whose mucus was attached to the external surface of the host organism. Further modification is required to minimize the effect of non-host contamination, and achieve more efficient detection of prey organisms.

研究分野：海洋生態学

キーワード：食性解析 ペプチド核酸 底棲魚介類 初期生活史 東京湾

## 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、小型底曳網漁業について平成19年度から水産庁と関係自治体による資源回復計画が施行され、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。

申請者は、東京湾における優占種であるシャコについて生活史初期の個体数減少（初期減耗）が資源量の多寡を決定することに着目して研究を進め、貧酸素水塊や河川流入量などの環境因子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を明らかにした。しかし、これらの環境因子だけでは資源量変動を完全に説明できず、被食や捕食の影響などの生物種間関係についても精査する必要がある。

生物種間関係の解明の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。近年、ペプチド核酸を利用して分子生物学的に甲殻類幼生の餌生物種組成を調査する手法が開発され、生活史初期における食性解明についての端緒が開かれた。しかし、餌生物種別の摂餌量の推定や個体群の資源量変動と食性の関係などの生態学的調査への応用は進んでいない。

そこで、本研究ではシャコ的生活史初期個体を対象として、ペプチド核酸を利用した分子生物学的な餌生物推定手法を進展させ、定量PCRと組み合わせることにより摂餌量を餌生物種別に推定する方法を開発する。また、本研究で実施する野外調査に加えて、申請者らによる過去の野外調査から得られた生活史初期個体のエタノール固定試料も用いることにより、シャコ的生活史初期個体の餌生物種組成と摂餌量の経年変化について明らかにし、生活史初期の食性と資源量変動の関係性を明らかにする。

## 2. 研究の目的

海産生物の幼若個体の消化管内容物から餌生物種組成および摂餌量を推定する手法を開発する。東京湾において資源量減少が著しいシャコ的生活史初期個体を研究対象とする。捕食者（シャコ）の消化管組織を含む

消化管内容物から抽出したDNAを鋳型として、ペプチド核酸を用いたPCRを行い、捕食者のDNA増幅を阻害しつつ、餌生物由来のDNAのみ増幅する。得られた増幅産物の塩基配列から判明した餌生物種に特異的なプライマーを用いて定量PCRを行い、摂餌量を餌生物種別に推定する方法を開発する。また、食性を経年的に解析して、個体数密度と捕食された餌生物の種組成と量の間関係を調査することにより、生活史初期における摂餌生態が資源量変動に及ぼす影響を評価する。

## 3. 研究の方法

シャコ的生活史初期個体を研究対象とし、ペプチド核酸を利用した餌生物の種組成推定および定量を行う手法を開発する。ユニバーサルプライマーを用いたPCRにより幅広い分類群の真核生物の遺伝子を増幅すると同時に、ペプチド核酸により捕食者であるシャコの遺伝子増幅を阻害する。得られた増幅産物の塩基配列を解析し、餌生物種組成を推定する。次に、推定された餌生物種に特異的なプライマーを用いて定量PCRを行い、シャコが各餌生物種をどの程度の摂餌したか推定する。この手法の妥当性について、飼育試験により検証する。また、野外調査から得られた生活史初期個体について食性を解析し、実環境中における餌生物の種組成および摂餌された量を推定する。生活史初期の生残率が高い年と低い年の幼生・幼体試料について食性解析を実施し、餌条件がシャコの資源量変動に及ぼす影響を評価する。

## 4. 研究成果

甲殻類の1種であるシャコの幼若個体（幼生・稚シャコ）の食性解析手法の開発を行った。消化管内容物において、形態観察から種判別が困難な未知の餌生物の種組成を遺伝子の塩基配列解析により明らかにするため、多数の真核生物群の情報を利用できる18S rDNAおよび28S rDNAを解析対象遺伝子とした。様々な生物分類群の18S rDNA、および28S rDNAの部分領域を増幅するユニバーサルプライマーを設計した。また、消化管内容物の解析のためにシャコ幼若個体から消化管を摘出する際に、体サイズが微小であるため、捕食者であるシャコ自身の組織も混入し、PCRによる消化管内容物の遺伝子増幅を行うとシャコの遺伝子が増幅産物において優占し、餌生物の検出が困難となる。よって、ユニバーサルプライマーにより増幅される領域内に、捕食者（シャコ）のDNA増幅を特異的に阻害するためのPNAプローブを設計し、これを用いてPCRを行い、クローンライブラリ法により増幅産物の塩基配列を決定し、餌生物の種組成を調査した。

PNAを利用した餌生物同定手法の有効性を検証するため、飼育下で孵化した幼生に種が既知の生物を給餌し、幼生の消化管内容物が

ら得られた DNA を調べる予定であった。しかし、飼育下でシャコ幼生が得られなかったため、シャコとサルエビの筋肉から抽出した DNA を混合し、それについて PNA を用いた PCR を行うことによりシャコ DNA の増幅阻害が生じるか確認を行った。その結果、28S rDNA では PCR 増幅産物からシャコの DNA は検出されずサルエビの DNA が検出されたことから、PNA によってシャコ DNA の増幅阻害が生じることが確認できた。一方、18S rDNA では PNA によるシャコ DNA の増幅を阻害することはできなかった。このため、東京湾において採集した幼若個体の食性調査に際しては 28S rDNA を解析対象遺伝子とした。

東京湾においてシャコ幼生および稚シャコを採集して、消化管を摘出して DNA を抽出し、PNA を用いた PCR 法により、目～種レベルで実棲息環境における餌生物を推定した。幼生については、体サイズが微小であり、消化管内容物の摘出は困難なので、消化管と周辺組織を合わせて摘出し、DNA を抽出した。発達段階初期の微小な幼生は複数個体をプールして 1 検体とし、計 22 検体を解析した。捕食者のシャコ自身の塩基配列の検出率は 21% で、PNA の使用は宿主生物の DNA 増幅阻害に効果があった。シャコ以外に検出された生物分類群（検出率）は、刺胞動物（47%）、菌類（41%）、植物プランクトン（29%）、動物プランクトン（18%）および尾索動物（6%）であった。これらの生物の一部には、シャコ幼生の体表に付着した生物や、消化管内の常在菌等が検体に混在した可能性もある。このため大型幼生 1 個体を用いて、消化管を含む頭胸甲、消化管を除いた頭胸甲、および消化管を含まない腹節～尾節、の 3 部位について、検体を純水により洗浄した後に DNA 抽出し、PNA を用いて PCR 増幅産物の塩基配列を解析した。消化管を含む頭胸甲組織からは、橈脚類と珪藻類が検出された。腹節～尾節組織からは渦鞭毛藻類と刺胞動物が検出されたが、消化管組織において検出された生物は認められなかった。一方、消化管を含まない頭胸甲組織からは、消化管で検出して珪藻類が認められ、刺胞動物も検出された。よって、消化管試料では消化管内容物以外に体表付着した生物の DNA を検出する可能性がある。以上の結果より、PNA を用いて幼生の餌生物を調べることは可能であるが、消化管以外の体組織を含む検体について解析する場合は、消化管を含まない組織における解析もあわせて実施し、体表付着由来の生物種判別を行うことが必要である。

一方、着底後間もない稚シャコ 1 個体について、PNA を用いた PCR 法により消化管内容物の解析を実施した。消化管内容物は消化が進行して形態学的観察による種同定は不可能であったが、PCR 増幅産物の塩基配列を解析した結果、ゴカイ類の DNA が検出された。稚シャコは幼生より体サイズが大きく、遺伝子解析対象となる体組織試料において体表

面組織を混入させず、消化管組織を摘出可能であるため、体表に付着する生物は遺伝子抽出試料に混在する可能性は低い。よって、PNA を用いた PCR 法は、稚シャコの食性解析において有効な手法であると考えられる。

以上の結果から、シャコの生活史初期個体の食性解析において、ペプチド核酸（PNA）を用いた PCR 法の有用性が示唆された。ただし、野外で採集した幼生を解析する際には、摂餌時刻や体表面に付着した生物の影響を考慮する必要がある。また、今後はシャコ以外の他の生物への応用可能性についても検証の必要がある。

## 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 5 件）

Sakurai T, Serizawa S, Isobe T, Kobayashi J, Kodama K, Lee JH, Maki H, Zushi Y, Sevilla-Nastor JB, Imaizumi Y, Suzuki N, Horiguchi T, Shiraishi H (2015) Temporal trends for inflow of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) to Tokyo Bay, Japan, estimated by a receptor-oriented approach. *Sci. Total Environ.*, 539, 277-285, doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.142, 査読有

児玉圭太, 堀口敏宏 (2015) 東京湾の底棲魚介類群集の経年変化と潜在的な影響因子. 内湾生態系における放射性核種の挙動と影響評価に関する研究, 国立環境研究所研究報告 SR-111-2015, 25-31, <https://www.nies.go.jp/kanko/tokubetu/pdf/sr-111.pdf>, 査読無

大畑聡, 赤羽祥明, 小宮朋之, 児玉圭太, 李政勲, 堀口敏宏 (2015) 東京湾北部海域における底層 D0 の推移と大型底生生物の出現状況. 千葉県水産総合研究センター研究報告, 9, 27-34, <http://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/3020199498>, 査読無

石井光廣, 大畑聡, 児玉圭太, 堀口敏宏 (2015) 東京湾におけるアカガイ科貝類およびタイラギの稚貝の出現状況. 東京湾の漁業と環境, 6, 13-15, <http://nria.fra.affrc.go.jp/hakko/kyo/6.pdf>, 査読無

Kodama K, Tajima Y, Shimizu T, Ohata S, Shiraishi H, Horiguchi T (2014) Disturbance of recruitment success of mantis shrimp in Tokyo Bay associated with effects of hypoxia on the early

life history. Mar. Pollut. Bull., 85, 433-438,  
doi:10.1016/j.marpolbul.2014.04.028,  
査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

児玉圭太, 荒巻能史, 白石寛明, 堀口敏宏 (2016) 東日本大震災・原発事故後の福島県沿岸域における底棲魚介類の群集構造. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 同講演要旨集, 94, 2016 年 3 月 29 日, 東京海洋大学品川キャンパス (東京都港区).

石井光廣, 内藤大輔, 児玉圭太, 堀口敏宏, 片山知史 (2016) 東京湾におけるマコガレイ稚魚の分布・移動・へい死に対する底層水温・DO の影響. 平成 28 年度日本水産学会春季大会平成 28 年度日本水産学会春季大会, 同講演要旨集, 169, 2016 年 3 月 29 日, 東京海洋大学品川キャンパス (東京都港区).

荒巻能史, 堀口敏宏, 児玉圭太, 三浦太一, 高原伸一 (2016) 福島県極沿岸域におけるトリチウムの精密測定. 日本海洋学会 2016 年度春季大会, 同講演要旨集, 203, 2016 年 3 月 16 日, 東京大学本郷キャンパス (東京都文京区).

児玉圭太 (2015) 東京湾における底棲魚介類の資源変動と環境要因. 第 16 回 東京湾シンポジウム ~ 東京湾の水環境に関する研究 ~, 同講演要旨集, 30-33, 招待講演, 2015 年 10 月 23 日, 横浜赤レンガ倉庫 (神奈川県横浜市).

Kodama K., Aramaki T., Tanaka A., Ohara T., Shiraishi H., Horiguchi T (2015) Present status of the megabenthic community in the coastal areas of Fukushima Prefecture, Japan after the Great East Japan Earthquake. International Conference on Biodiversity, Ecology and Conservation of Marine Ecosystems 2015, Abstracts, 84, 2015 年 6 月 1 日, The University of Hong Kong (Hong Kong, China).

Horiguchi T, Kodama K, Akatsuka T, Shiraishi H (2015) Changes of sessile organisms around the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant after nuclear accidents in March 2011. SETAC Europe 25th Annual Meeting. Abstracts, 445, 2015 年 5 月 6 日, The Barcelona Congress Centre (Barcelona, Spain).

荒巻能史, 堀口敏宏, 牧 秀明, 児玉圭

太, 朴 正彩, 赤塚徹志, 宮田佳樹, 井上睦夫, 長尾誠也, 熊本雄一郎 (2015) 東京湾表層における放射性セシウム水平分布の経時変化. 日本海洋学会 2015 年度秋季大会, 同講演要旨集, 187, 2015 年 9 月 27 日, 愛媛大学城北キャンパス (愛媛県松山市).

櫻井健郎, 芹澤滋子, 小林 淳, 児玉圭太, 李 政勲, 牧 秀明, 頭士泰之, 今泉圭隆, 鈴木規之, 堀口敏宏, 白石寛明 (2015) 東京湾への PFOS および PFOA の流入速度の経年変化 (2004-2010). 第 24 回環境化学討論会, 同講演要旨集, 2C-08, 2015 年 6 月 25 日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市).

児玉圭太, 赤塚徹志, 真鍋明弘, 山川卓, 清水誠, 白石寛明, 堀口敏宏 (2015) 東京湾底棲魚介類群集の長期変動: 1977 ~ 2014 年の解析結果. 平成 27 年度 日本水産学会春季大会, 同講演要旨集, 145, 2015 年 3 月 28 日, 東京海洋大学品川キャンパス (東京都港区).  
堀口敏宏, 児玉圭太, 白石寛明 (2015) 東日本大震災以降の福島県の潮間帯における付着生物群集. 平成 27 年度 日本水産学会春季大会, 同講演要旨集, 115, 2015 年 3 月 30 日, 東京海洋大学品川キャンパス (東京都港区).

牧秀明, 錦織達啓, 林誠二, 児玉圭太, 堀口敏宏 (2015) 東京湾流入河川における放射性セシウムの分布. 第 49 回日本水環境学会年会, 同講演要旨集, 47, 2015 年 3 月 16 日, 金沢大学 (石川県金沢市).

櫻井健郎, 芹澤滋子, 児玉圭太, 堀口敏宏, 牧秀明, 頭士泰之, 今泉圭隆, 鈴木規之, 白石寛明, 小林淳, 李政勲 (2015) PFOS および PFOA の東京湾への流入速度の経年変化 (2004-2010). 第 49 回日本水環境学会年会, 同講演集, 179, 2015 年 3 月 17 日, 金沢大学 (石川県金沢市).

Lee JH, Kodama K., Shiraishi H., Horiguchi T (2014) Exploration of factors affecting abundance in early-life stages of marbled sole *Pseudopleuronectes yokohamae* in Tokyo Bay, Japan. The 6th Bilateral Seminar Italy-Japan "Physical and Chemical Impacts on Marine Organisms: Supporting Blue Growth in Meaningful Mutual Symbiosis with the Marine Environment", Abstracts, 25, 招待講演, 2014 年 11 月 19 日, Consiglio Nazionale

delle Ricerche (Palermo, Italy).

Sakurai T, Serizawa S, Kobayashi J, Kodama K, Lee J, Maki H, Imaizumi Y, Suzuki N, Horiguchi T, Shiraishi H (2014) Emission of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in the Tokyo-Bay catchment basin, Japan in 2004-2010. Society of Environmental Toxicology and Chemistry North America 35th Annual Meeting, Abstracts, 403, 2014年11月12日, Vancouver Convention Center (Vancouver B.C., Canada).

櫻井健郎, 芹澤滋子, 小林淳, 児玉圭太, 李政勲, 牧秀明, 今泉圭隆, 鈴木規之, 堀口敏宏, 白石寛明 (2014) 東京湾に流入する淡水中の PFOS および PFOA 濃度の経年変化 (2004-2010). 環境化学討論会 第 23 回, 同要旨集, 52-53, 2014 年 5 月 14 日, 京都大学百周年記念時計台記念館 (京都府京都市).

## 6. 研究組織

### (1) 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・

環境リスク研究センター・主任研究員

研究者番号：90391101