

令和2年度 資源・漁獲情報ネットワーク構築事業 報告書

大課題名：資源環境情報ネットワーク

海域名(中課題名)：環境ゲノムのデータ収集と解析

【参画機関】

水産研究・教育機構 水産資源研究所横浜庁舎、水産資源研究所釧路庁舎、水産資源研究所塩釜庁舎、水産資源研究所新潟庁舎、水産資源研究所長崎庁舎、水産資源研究所石垣島庁舎

【実施計画】

小課題1:環境-DNA 解析

②環境 DNA 用サンプル採集

- ・ N、S、A、SI、O、CK、IU、紋別ラインにおいて、定期的に生物環境モニタリングを実施
- ・ メタバーコーディング (MB) 解析のための海水採集および船上ろ過し、ろ紙を凍結保存
- ・ MB 解析のための動物プランクトンの NORPAC ネット採集、エタノール固定
- ・ 植物・微小動物プランクトン種査定用に海水 1L を採集、終濃度 4% でルゴール固定

②環境 DNA データの収集

- ・ 真核 18S、28SrRNA 遺伝子による原生生物、動植物プランクトンの出現種情報の網羅収集
- ・ 細菌 16S rRNA 遺伝子による細菌叢の網羅収集
- ・ MB 解析結果から、各出現種の分布範囲・季節的出現特性の把握、各海域間の生物多様性の比較等を実施

③動物プランクトン優占種の種名および標的遺伝子配列情報の収集

- ・ 真各海域コペポダを中心に優占種 30 種の形態的特徴による種同定
- ・ MB 解析標的遺伝子情報 (18S、動物プランクトン用 28S 配列) の収集と取得した配列の DDBJ 等の公的核酸データベース (DB) への配列登録

④瀬戸内海における環境 DNA から魚類 DNA の検出

- ・ 魚類の MB 解析による魚種出現情報の網羅的収集

小課題2:環境ゲノム解析—定量化に向けた検討

(1) メタバーコーディング (MB) 解析の高度化

①新規ユニバーサルプライマー (UP) の開発と種同定精度の検討・評価

- ・ Nanopore 社 MinION (携帯型第三世代シーケンサー) を用いた MB 解析のための 18S rRNA 遺伝子全長解析用ユニバーサルプライマー (UP) の開発
- ・ Nanopore 社 MinION を用いた MB 解析のための 18S+ITS+D1D2 領域 rRNA 遺伝子解析用ユニバーサルプライマー (UP) の開発

②環境 DNA 解析プラットフォームの改良

- ・現在、使用しているプログラムの改良（メモリ消費の抑制、細菌 OTUs の同定など）

(2) 定量性の評価

①メタバーコーディング(MB)解析データの相対的出現割合による定量性の評価

- ・デジタル PCR (dPCR) を用いた 1 個体あたりの標的遺伝子コピー数の絶対定量法の開発

②メタバーコーディング(MB)技術による魚卵の正確な種同定・定量法の開発

- ・マサバ、ホルマリン固定サンプルからの PCR 増幅法
- ・黒潮海域魚卵サンプルのメタバーコーディング解析

【今年度の成果】

- ・N、S、A、SI、O、CK、IU ラインにて採集した環境 DNA サンプルを用いて、2018～2020 年度の 3 年間に、海水 1,681 サンプル、動物プランクトンネット 580 サンプルを採集した。
- ・3 年間に解析した海水中の真核 18S、28S、渦鞭毛藻用 28S のサンプル数は、合計 1,573 個、細菌 16S では 849 サンプル、動物プランクトンネットにおける 18S の解析サンプル数は 465 サンプルであり、合計 2,887 データを得た（紋別市を除く）。
- ・紋別市の 1 定点において週 1 回 7 年間実施した時系列モニタリングにおいて、18S、28S の 2 遺伝子領域を用いた MB 解析の結果、渦鞭毛藻 189 種、繊毛虫 170 種、珪藻 236 種、菌類 650 種、動物プランクトン 474 種、リザリア 69 種、他の藻類約 300 種、合計 2,238 種の同定に成功した。
- ・2018 年度より、各モニタリングラインにおいて、NORPAC ネットで採集されたコペポダを中心として動物プランクトン優占種上位 20-30 種をソーティングし、形態的特徴に基づく種同定を行い、かつ MB 解析に使用する遺伝子領域の配列を取得した。2018 年度、収集したサンプルにおいて、18S および動物プランクトン用 28S でそれぞれ 166、165 標本の配列収集を完了したので、公的核酸データベース（DDBJ）へ配列の登録を完了した。
- ・2019、2020 年北鳳丸、2020 年第六開洋丸調査において、それぞれ合計 369、361、114 個の魚卵サンプルについて MB 解析を行った。その結果、2019、2020 年北鳳丸、2020 年第六開洋丸調査サンプルにおいて、それぞれ 24、20、20 個の OTUs を検出し、18 (75%)、17 (85%)、17 個 (85%) の OTUs で種同定に成功した。

【実施概要】

小課題 1: 環境-DNA 解析

②環境 DNA 用サンプル採集

対象水域は、北海道紋別市地先、北海道オホーツク海（N、S-ライン）、道東・東北沖（A-ライン）、静岡県御前崎沖（O-ライン）、石垣島周辺海域、東シナ海（CK-ライン）、日本海（SI-ラ

イン) である。紋別市においては、週 1 回を基本として、表層 1 点をバケツ採水し、MB 解析用サンプルを収集した (図 1)。

NS-ラインでは 2020 年のオホーツク海環境調査 2 回 (6、9 月) において各調査 8 測点でサンプリングを実施した。MB 解析用、植物色素測定用、植物・微小動物プランクトン種査定用には 10m 層を中心に採水を行った。ネット動物プランクトンの MB 解析用には、最深 150m からの NORPAC ネット (目合い 100 μ m) の曳網を行った。また、2021 年 1-3 月にもオホーツク海氷期海洋調査 3 回 (計 3 測点) で同様のサンプリングを行う予定である。加えて、ネット動物プランクトンを用いて優占種 30 種を種同定・ソーティングし、個々の遺伝情報分析用のサンプルとした。

A ラインでは 2020 年度に計 4 回 (2020 年 5 月、7 月、10 月、2021 年 1 月) 調査航海を行い、メタゲノム用動物プランクトン試料を 55 検体、メタゲノム用の植物プランクトン試料を 52 検体採集した。動物プランクトン試料はノルパックネット (口径 45cm、目合 100 μ m) による 0-150m の鉛直曳網にて採集した。植物プランクトン試料はニースキン採水器を用いて水深 10m から採集した。ネット動物プランクトンを用いて優占種 30 種を種同定・ソーティングし、個々の遺伝情報分析用のサンプルとした。さらに 2021 年 3 月の実施予定の A ラインモニタリング航海でも、13 定点でサンプルを取得する予定である。

O-ラインでは、2019 年度の黒潮低次生産調査航海 4 回 (9、11、1 月、3 月に 4 回目の調査を予定) において、5-8 測点でサンプリングを実施した。MB 解析用、植物色素測定用、植物・微小動物プランクトン種査定用には、表面および 10m 層を中心に 1-6 層で採水を行った。ネット動物プランクトンの MB 解析用には、最深 150m からの NORPAC ネット (目合い 100 μ m) の曳網を行った。加えて、ネット動物プランクトンを用いて優占種 30 種を種同定・ソーティングし、個々の遺伝情報分析用のサンプルとした。

SI-ラインでは、2020 年度は日本海低次生産調査航海 4 回 (4、6、9、2 月) において、各航海 5 地点でサンプリングを行った。動物プランクトン MB 解析用には NORPAC 曳網 (0.1mm、0-150m) を行い、2 層 (10m、30m) の採水により MB 解析用、植物色素測定用、植物・微小動物プランクトン種査定用の試料を採取した。加えて、ネット動物プランクトンを用いて優占種 30 種を種同定・ソーティングし、個々の遺伝情報分析用のサンプルとした。予備採集として 11 月に動物プランクトン MB 解析用の NORPAC 曳網 (0.1mm、0-150m) を SI-ライン 5 地点で実施した。

CK-ラインおよび隣接する東シナ海域では、2020 年度の陽光丸による調査航海 6 回 (4、6、7、10、2、2-3 月) において、3-5 測点でサンプリングを実施した。MB 解析用の試水は 10m 層およびクロロフィル亜表層極大層 (SCM) において採取し、植物色素測定用、植物・微小動物プランクトン種査定用の試水は、0、10、30、50、100 m 層 および SCM から採取した。動物プランクトンの MB 解析用試料は目合い 100 μ m の改良型 NORPAC を鉛直曳 (150-0m) して採集した。

IU-ライン（石垣島）においては、浦底湾 1 地点で月 1 回、石西礁湖周辺海域 2 地点で年 4 回の観測を行い、表層および中層（浦底湾：10m、石西礁湖：15m）において海水を採集し、MB 解析用、植物色素測定用、植物・微小動物プランクトン種査定用を採水した。ネット動物プランクトンの MB 解析用には、海底直上 1m から表層までの NORPAC ネット（目合い 100 μ m）の曳網を行った。

紋別市では、基本、週 1 回のモニタリングを実施した。MB 解析用、植物・微小動物プランクトン種査定用には表層採水を行い、動物プランクトンの MB 解析用試料は目合い 100 μ m の NORPAC ネットを底層-1m から鉛直曳網して採集した。また、ネット動物プランクトンを用いて優占種 30 種を種同定・ソーティングし、個々の遺伝情報分析用のサンプルとした。

②環境 DNA データの収集

N、S、A、SI、O、CK、IU ラインおよび紋別市における環境 DNA サンプルとして、2018～2020 年度の 3 年間に、海水 1,654、動物プランクトンネット 580 サンプルを採集した（表 1）。2018 年および 2019 年の細菌 16S、プランクトン 18S と 28S 等の解析を終了した（合計 2,887 データを収集）。公的 DB による相同性検索（Blast）を行い、既知の遺伝子配列対し 98% 以上の相同性を示し、かつ単一種のみがヒットした場合にのみ種同定成功という基準を設けて解析を行ったところ、18S・28S 解析を合わせて、>1,000 種を検出・同定することができた（紋別市を除く）。現在、渦鞭毛藻あるいは動物プランクトンを標的とした 28S を用いた解析も始めており、今後、モニタリングを継続することで、>1,500 種の検出が可能になると予想している。

紋別市 1 定点におけるモニタリングは、約 9 年前から継続して行っており、7 年間の環境 DNA サンプル（n = 394）を用いて 18S、28S、動物プランクトンを特異的に増幅する 28S、渦鞭毛藻特異的に増幅する 28S、真菌類特異的 ITS 領域の 5 個の異なる遺伝子領域を用いて MB 解析を実施した。18S・28S の 2 遺伝子領域を用いた解析データの Blast による相同性検索の結果、渦鞭毛藻 189 種、繊毛虫 170 種、珪藻 236 種、菌類 650 種、動物プランクトン 474 種、リザリア 69 種、他の藻類約 300 種、合計 2,238 種の同定に成功した。動物プランクトン特異的 28S、渦鞭毛藻特異的 28S および菌類の ITS 領域（現在、データ解析中）の解析結果を含めると、>2,500 種は検出されるのではないかと推測している。

③動物プランクトン優占種の種名および標的遺伝子配列情報の収集

2018 年度より、各モニタリングラインにおいて、NORPAC ネットで採集されたコペポダを中心として動物プランクトン優占種上位 20-30 種について、形態的特徴に基づく種同定に成功したサンプルについて、標的遺伝子の配列収集（18S、28S）を行ってきた。2018 年度のソーティングサンプルにおいて、18S については 166 標本中 166 標本、動物プランクトン 28S 用については 166 標本中 165 標本の配列収集を完了したので、公的核酸データベース（DDBJ）へ配列の登録を完了した。2019 年度に収集したソーティングサンプル 220 標本についても、

18S、28S の配列を取得した（合計 440 配列）。現在、配列の確からしさを確認中である。また、本年度、採集する約 200 標本（予定）については、現在、解析中である。以上、同一種の標本が複数含まれているが、3 年間で合計 586 標本の収集を予定している。

2018 年度に得られた標本用サンプルにおいて、種名まで同定できたのは合計 161 本であり、18S および 28S では、それぞれ 161 個、160 個の配列を登録したのであるが、公的 DB に同一種の登録がどの程度あるか確認してみた。その結果、18S・28S では同一種の登録が、それぞれ 48%、62% しかなく、残りは、属レベルかそれ以下の登録しかないような状況であり（図 2）、今だ、動物プランクトンの標的遺伝子配列の情報量は十分ではなく、継続した情報の蓄積が必要であることを再確認することが出来た。加えて、紋別市 1 定点において 2012～2016 年の 4 年間、基本週 1 回の間隔で採集されたノルパックネットサンプル（合計 195 個）の 18S および動物プランクトン用 28S を用いた MB 解析の結果において、今回、得られた 18S（161 個）、28S（160 個）の標的遺伝子配列を登録する前と登録した後に、種同定の結果がどの程度、改善されるかについて評価した。その結果、18S および 28S において、それぞれ 316 種、119 種の同定に成功した。このうち 18S、28S において、それぞれ 24 種（7.5%）、18 種（15.1%）は、今回の新規登録配列により種同定が可能であり、動物プランクトンの新規登録配列を蓄積することにより、MB 解析の種同定精度が向上することを確認した。土佐湾沖で採集されたマイワシ、ウルメイワシ、産卵後 2-3 日の仔魚の胃内容部が MB 解析を用いて解析された結果、カイアシ類が主要な餌生物であることが報告されている（Hirai et al. 2017）。水産重要魚種の仔魚期の主要な餌生物が動物プランクトンであることから、これら餌生物の種同定精度を向上させる必要がある。2019、2020 年度に得られた標本に関しても、鋭意、登録作業を進めたいと考えている。

④瀬戸内海における環境 DNA から魚類 DNA の検出

本課題は、昨年度から本格的に始まったもので、魚類の MB 解析による魚種出現情報の網羅的収集と将来の資源量推定に資する情報収集を目的とする。昨年度、瀬戸内海水域から採集された環境 DNA 326 個について、魚類検出用プライマーを用いて DNA ライブラリー作製を試みたところ、16 サンプルについてのみ PCR 増幅が見られ、DNA ライブラリー作製が可能であった。MB 解析は終了し、結果を主担当者に送付した。

小課題 2: 環境ゲノム解析—定量化に向けた検討

(1) メタバーコーディング解析の高度化

①新規ユニバーサルプライマー(UP)の開発と種同定精度の検討・評価

これまで真核生物（動植物プランクトン、原生動物、菌類）全体を標的とする UP（18S、28S）を用いた MB 解析を行ってきたが、生物群によっては種同定のための解像度が十分ではなく、属レベルまでしか同定できない。更なる高度化を図るために、本年度は、Nanopore 社 MinION

(携帯型第三世代シーケンサー) を用いた MB 解析のための①18S rRNA 遺伝子全長解析用ユニバーサルプライマー(UP)、②18S+ITS+D1D2 領域 rRNA 遺伝子解析用ユニバーサルプライマー(UP)の開発を行った。手法の概略としては、①NCBI 等の公的核酸 DB から 18S、SSU、LSU、28S、rRNA 等のキーワードで標的遺伝子の登録配列をダウンロード、②新たにプライマーを設計したい 18S、28S を含む配列をそれより外側に設計された UP を用いて In Silico PCR により取得、③得られた配列をマルチプルアライメント、④保存性の高い領域にプライマーを設計、⑤プライマーの PCR 増幅効率やユニバーサリティーを確認、となる。その結果、全ての真核生物を標的とする 18S 遺伝子全長解析用 UP (約 1,800 bp) および 18S+ITS+D1D2 領域 rRNA 遺伝子解析用ユニバーサルプライマー(UP) (約 1,750 bp) の開発に成功した。現在、PCR 条件を最適化するための条件検討を実施中である。

②環境 DNA 解析プラットフォームの改良

現在、使用している MB 解析プラットフォームの改良を実施中である。理由は、解析のステップの一部に解析サーバのメモリ消費が大きくなる工程があり、時折、サーバが停止し、再起動を余儀なくされる事態が度々発生した。このため、メモリを使用しないプログラムに変更が完了した(図 2)。加えて、細菌 16S の解析においては、微細藻類の葉緑体 16S 由来の OTUs を除去するプログラムの付加、さらに、検出された細菌 OTUs をより確実に分類できるよう、QIIME2 で使用されている classifier というプログラムを本プラットフォームに搭載することで、綱、目、科、属、種に区分して出力できるようにした(図 2)。

(2) 定量性の評価

①メタバーコーディング解析データの相対的出現割合による定量性の評価

・デジタル PCR (dPCR) を用いた 1 個体あたりの標的遺伝子コピー数の絶対定量法の開発

昨年度の研究で、18S の V7-9 領域の保存性の高い領域にプライマーとプローブを設計することで、dPCR を用いて、1 個体当たりの標的遺伝子 (18S) のコピー数を絶対定量できる方法の開発に成功した。取り急ぎ、16 種の有害赤潮種、有毒渦鞭毛藻の培養株 (31 株) を用いてコピー数を算出したところ、50-200 万コピーと種により大きく変動することが判明した。18S の配列を公的核酸 DB からダウンロード (約 100 万配列) し、プライマーおよびプローブに設計した領域の保存性を確認したところ、プライマー、プローブともに保存性は十分高く、多くの単細胞性植物プランクトンや動物プランクトン 1 個体の遺伝子コピー数を定量できることが判った。

本年度、dPCR で標的遺伝子のコピー数をより正確に定量する上で気になる点を見出した。それは、抽出 DNA 断片の長さ (フラグメントサイズ) である。使用した dPCR のチップ 1 個は 15,000 個のパーティション (PT) に仕切られており、複数個の PT において、PCR 増幅による蛍光強度の上昇が見られた PT を計数することで、絶対定量が可能となる。問題は、dPCR の性

質上、1個のPTに複数の標的遺伝子コピーが入った場合でも2コピーではなく1コピーと計算されることである。この問題を検証するため、本プロジェクトで採用してきた5% Chelex bufferによるDNA抽出産物(>10,000 bp)をオリジナルDNAとし、2種類の渦鞭毛藻(*Karenia mikimotoi*、*Heterocapsa circularisquama*)の抽出DNAを用いて、G-TubesとCOVARIS(S220)により、フラグメントサイズが9,000、5,000、3,000、1,500 bpのDNA断片を作成し、dPCRによるコピー数の定量および異なるフラグメントサイズのDNAサンプル間のコピー数の差異を比較した。その結果、両種のDNA共に、フラグメントサイズが小さくなるにつれて、コピー数が少なくなり、オリジナルと1,500 bpの間には統計学的に有意な差異が検出された(図3)。rRNAユニットおよびその間の領域(intergenic spacer region: IGSR)のサイズは生物種により大きく異なり、それぞれ7,597-45,306 bp、577-33,686bpである(Guo et al. 2019)。微細藻類のrRNAユニット+IGSRは>10,000 bpと予想され、これらの要因により、オリジナルDNAよりもコピー数が大きい値を示したフラグメントサイズ実験区は確認されなかったと示唆される。以上、本プロジェクトで使用したDNA抽出法は、この点問題はなかったことを確認した。

MB解析の長所は、網羅的に出現種を検出することが可能な点であるが(紋別の7年間の時系列MB解析の結果では約2,200種の検出に成功)、欠点は定量性に欠ける点である。MB解析の各種あるいはOTUsごとの配列数に影響を及ぼす要因として、①DNA抽出効率の差異、②PCR増幅効率の差異、③1個体あたりの標的遺伝子コピー数の差異などが考えられる。①や②に関しては、数百種のDNAが同時に混在するため、DNA抽出効率やPCR増幅効率を正確に見積もり、補正することはほとんど不可能に近い。しかし、③に関しては、本プロジェクトで開発した手法で、各種の遺伝子コピー数の情報を蓄積していけば、ある程度の補正が可能である。紋別市の週1回7年間の時系列MB解析の結果、NGSの相対値において、多くの種で明瞭な出現(ブルーム)のピークが検出され、かつ水温との間に統計学的に有意な正あるいは負の相関関係が認められた。定量PCRのような定量性は無いが、これらの結果は、時系列MB解析の相対値が、それなりに定量的評価が可能であることを示すものである。従って、各出現種の1細胞/個体当たりの標的遺伝子コピー数を測定し、データを蓄積することが重要である。

②メタバーコーディング技術による魚卵の正確な種同定・定量法の開発

- ・魚類MB解析用のユニバーサルプライマーの資源評価対象種における種同定精度の確認

水産庁により資源評価対象種を200種程度に拡大する方針が打ち出されたので、この方針に応じて、産卵調査で対象となる魚種も拡大する必要がある。このため、現在、使用している魚類のMB解析プライマー(MiFish)の資源評価対象魚種における種同定の可否を確認した。本プライマーはミトコンドリア12S領域が使用されており、対象にした82種の配列をnt_DBからダウンロードし、近縁種の配列との比較により精査したところ、72種は種同定可能であ

り、10種は不可であった。マサバ・ゴマサバも不可であるが、昨年度、本事業で種特異的プライマーを作成し、種同定が可能となったので、実際は、74種は種同定可能である（図4）。

・ホルマリン固定標本（マサバ・ゴマサバ卵）からのPCR検出の検討について

ホルマリン固定1日以内の天然マサバ・ゴマサバ卵（94個）を種特異的なプライマーで種同定したところ、93個で増幅が見られ、このうち形態ベースで種同定されたゴマザバ3個はマサバであった。形態ベースによる種同定の精度に若干、問題のあることが示唆された。次いで、人口採卵されたマサバ卵を用いて、PCR増幅に及ぼすホルマリン固定期間の長さ（1、2、3、5週間、2年間）の影響について評価した。その結果、固定1週間の卵では、全てPCR増幅が確認できたが、それ以上の卵ではPCR増幅は見られなかった（図5）。船上での作業の効率化を考えると、ホルマリン固定とエタノール固定の両法でサンプルを入出するのは困難が予想される。形態に基づく従来法に比して、MB解析による魚卵の種同定技術は網羅的かつ正確なのは自明であり、今後、MB解析を実用的な技術として広く普及させるためには、ホルマリン固定後、2、3週間が経過した魚卵サンプルからでもPCR増幅が可能なDNA抽出方法を見出すこと必要であり、今後の課題として残された。

・黒潮海域魚卵サンプルのメタバーコーディング解析

2019年2月、2020年2月に北鳳丸、2020年2月に第六開洋丸による重要水産資源の産卵生態変動に関する調査が実施され、北鳳丸調査では約50地点、第六開洋丸調査では17地点で魚卵のサンプリングが行われた。残念ながら、いずれの調査でも魚卵の個数は多くなく、1地点で数個の場合も見られた。1魚卵ずつDNA抽出およびDNAライブラリーを作製し、1地点で>96個の魚卵が採集された3地点については96個の魚卵を用いて、メタバーコーディング解析を行った。2019、2020年北鳳丸、2020年第六開洋丸調査において、それぞれ合計369、361、114個の魚卵サンプルについて解析を行った。その結果、2019、2020年北鳳丸、2020年第六開洋丸調査サンプルにおいて、それぞれ24、20、20個のOTUsを検出し、18（75%）、17（85%）、17個（85%）のOTUsで種同定に成功した。一方、形態学的特徴に基づいた魚卵の種同定および卵数計測においては、イトヒキダラ、ウルメイワシ、エゾイソアイナメ、カタクチイワシ、マアジ、マイワシ、マサバの7種類のみが対象魚種であった。各調査において、魚卵数は多くなかったため、各調査において魚卵数が比較的多かった数点においてMB解析の結果と形態情報に基づいた計測結果を比較したところ、7種の検出については、2019年の北鳳丸調査の1地点における形態データでマサバ卵が検出されておらず、大きな差異が見られたが、それ以外は、おおむね両法で検出されていた。加えて、卵数 \times (1/プランクトンネット断面積) \times ((無網試験平均濾水計回転数/無網試験ワイヤー長) \times ワイヤー長 \times COS(ワイヤー傾角 \times $\pi/180$))/濾水計回転数（プランクトンネット断面積は0.159m²）の式により、MB解析により得られた結果を用いて、各地点における魚卵密度/m²を算出した。その結果、2019

、2020年の北鳳丸、2020年の第6開洋丸調査において、最大644.6個（St. 97）、470.9個（St. EX. 5）、272.4個（St. 42）の魚卵が採集された。

資源評価対象魚種200種への拡大方針を鑑み、種が既知の魚卵サンプルを多数の種で確保し、形態ベースによる従来法とMB解析による種同定結果を比較することで、魚卵の種同定技術の向上を図る必要がある。

【図表など】

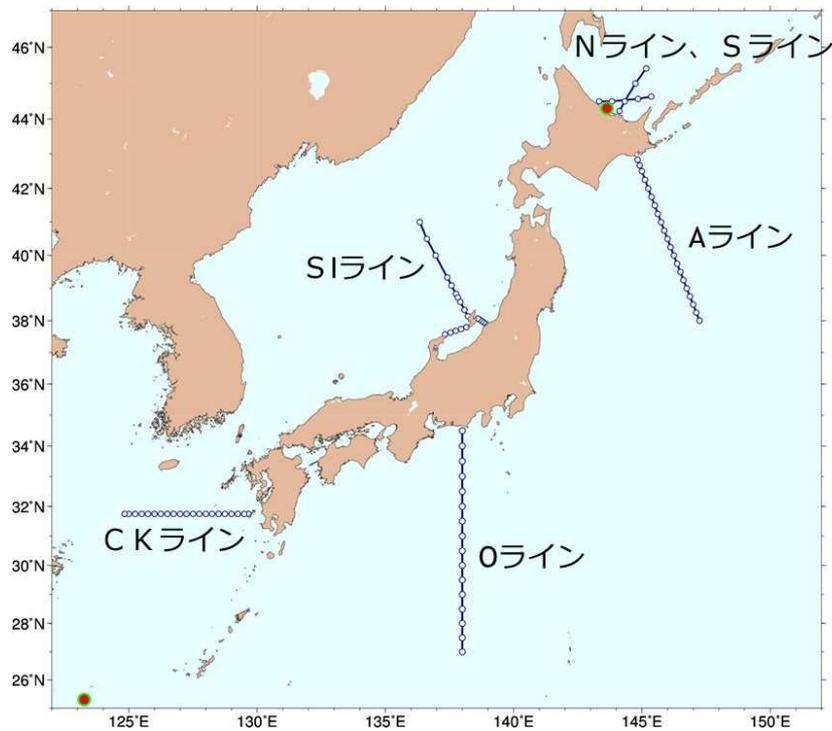


図1 ネットワーク事業におけるモニタリング地点図（紋別市、石垣島を含む）

表1 ネットワーク事業において採集済みサンプル（2021年2月5日現在）

参画機関	海水	動物プランクトン ネット	小計
水産資源研究所釧路庁舎	108	32	140
水産資源研究所塩釜庁舎	412	182	594
水産資源研究所横浜庁舎	435	79	514
水産資源研究所新潟庁舎	222	64	286
水産資源研究所長崎庁舎	189	50	239
水産技術研究所八重山庁舎	165	43	208
紋別市	150	130	280
合計	1,681	580	2,261

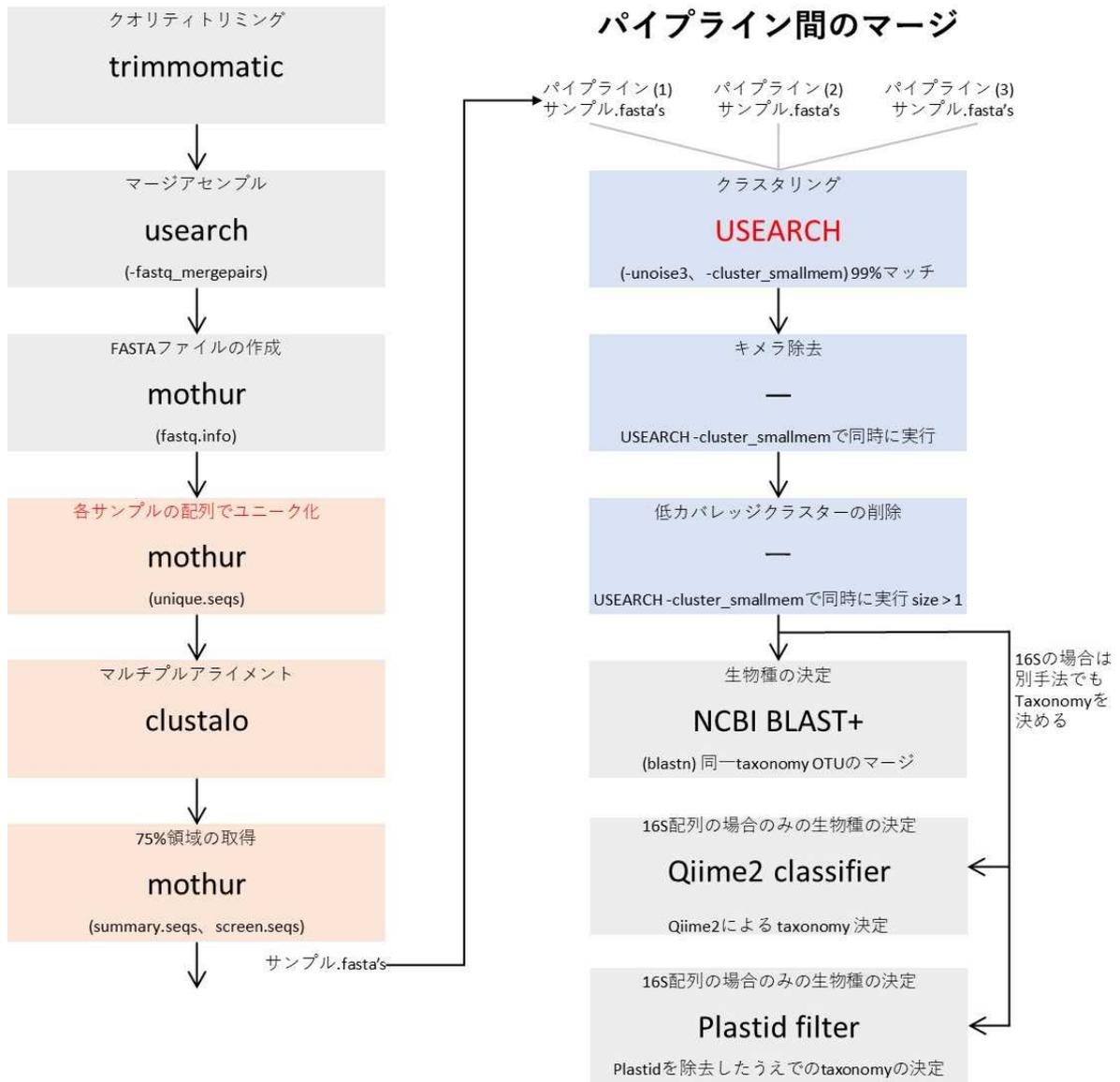


図2 修正したMB解析パイプラインのフロー図

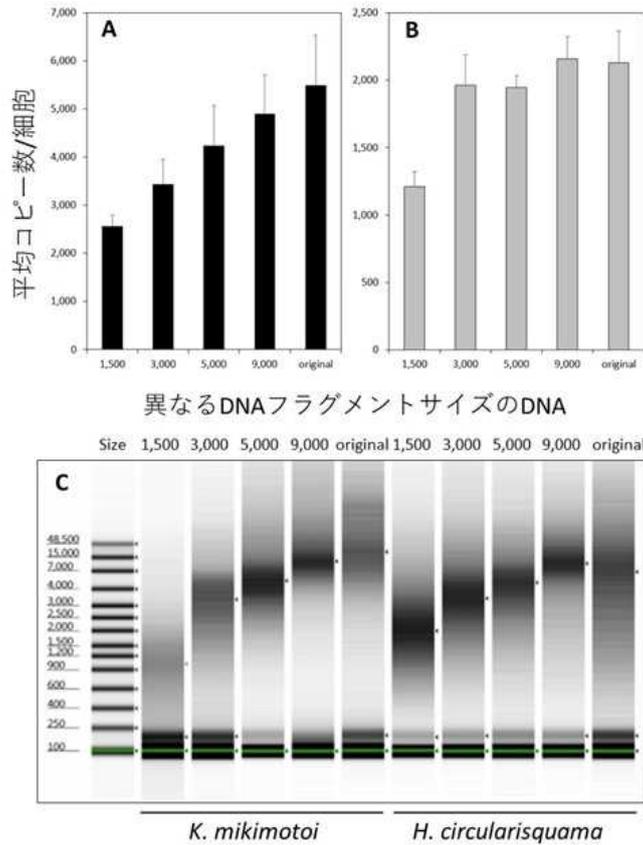


図3 2種の渦鞭毛藻 (*Karenia mikimotoi*、*Heterocapsa circularisquama*) の抽出DNAを用いて、デジタルPCRによるrRNA遺伝子コピー数の絶対定量法におけるDNAフラグメントサイズの影響評価結果

種同定可 72種			
アオダイ	キジハタ	ニギス	ムシガレイ
アオメエソ	キダイ	ババガレイ	ムロアジ類(種不明)
アカアジ	キビナゴ	ハマダイ	メイタガレイ
アカアマダイ	キントキダイ	ハモ	メイタガレイ
アカカマス	キンメダイ	ヒメダイ	モロ
アカガレイ	クエ	ヒラメ	ヤナギムシガレイ
アカムツ	クサヤモロ	ヒレグロ	ヤマトカマス
アブラガレイ	クロエソ	ブリ	ヨロイタチウオ
アユ(沈性卵)	コノシロ	ホウボウ	ワニエソ
イサキ	サッパ	ホシガレイ	
イシガレイ	サメガレイ	ホタルジャコ	
イトヒキダラ	サワラ	マアジ	
イボダイ	シイラ	マアナゴ	
ウルメイワシ	シログチ	マイワシ	
エゾイソアイナメ	スジアラ	マエソ	
オアカムロ	スズキ	マガレイ	
オオヒメ	ソウハチ	マダイ	
オニオコゼ	タカバ	マトウダイ	
カサゴ(卵胎生)	チダイ	マルアジ	
カタクチイワシ	トカゲエソ	ナガレメイタガレイ	
キアンコウ(凝集浮性卵)	キジハタ	マルソウダ	
アオダイ	ナガレメイタガレイ	ミギガレイ	
			種同定不可 10種
			イカナゴ(沈性卵)
			イラコアナゴ
			カイワリ
			クロダイ
			スケトウダラ
			タチウオ
			マコガレイ(沈性卵)
			マナガツオ
			マサバ
			ゴマサバ

図4 産卵調査で対象となる魚種82種のMB解析による種同定の可否について (マサバ・ゴマサバについては、昨年度、種同定可能なプライマーを開発済み)

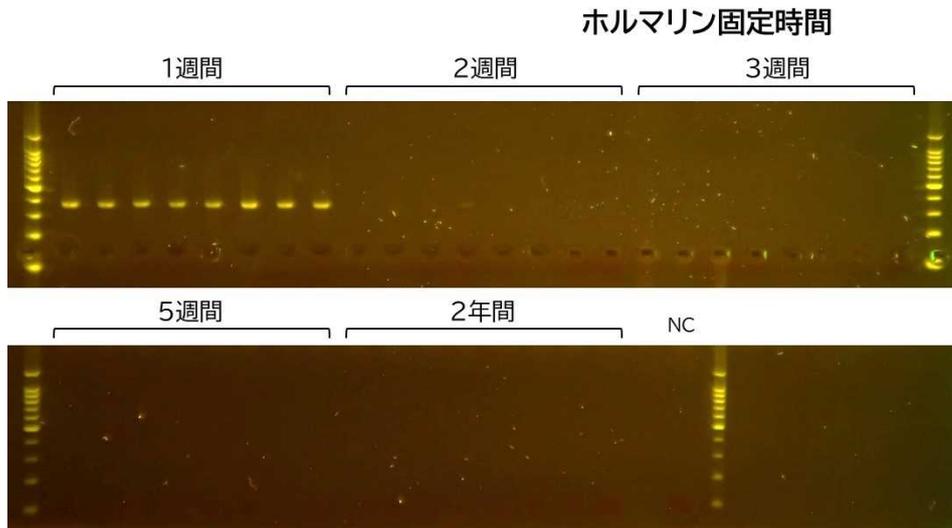


図5 人口採卵マサバ卵を用いた、PCR増幅に及ぼすホルマリン固定時間の影響について
(各条件につき8個の卵を用いた)

【参考文献】

- Hirai J, Hidaka K, Nagai S, Ichikawa T (2017). Molecular-based diet analysis of the early post-larvae of Japanese sardine *Sardinops melanostictus* and Pacific round herring *Etumenus teres*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 564: 99-113.
- Guo Z, Han L, Liang Z, Hou Z (2019). Comparative analysis of the ribosomal DNA repeat unit (rDNA) of *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) and *Perna canaliculus* (Gmelin, 1791). *PeerJ*, 7:e7644 DOI 10.7717/peerj.7644

【実施に当たっての問題点】

- ・コロナ対応で、研究補助職員を1ヶ月以上、在宅勤務にせざるを得ない状況が生じ、研究の実施が大幅に遅れた。
- ・MB解析に使用した魚卵の採集量が形態分類用に使用したものと大きく異なった。これは、エタノール固定を>70%以上の濃度で行うため、採集後、サンプル瓶に30間放置した後、上澄み海水を除去した際に、魚卵も一緒に捨てられた可能性が高く、今後、茶パックなどで捕集し、水切り後、エタノールに浸漬させるような方法に変更する必要がある。

【成果の発表】

- ・Sildever S, Kawakami Y, Kasai H, Shiimoto H, Katakura S, Nagai S (2019). Toxic HAB species from the Sea of Okhotsk detected by a metagenetic approach, seasonality and environmental drivers. *Harmful Algae*, <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101631>
- ・Nagai S, Kawakami Y, Nishi N, Sildever S, Kanno N, Shiimoto H, Katakura S (2019). Time Series monitoring of environmental DNA in Okhotsk Sea. *The proceedings of the 34th International Symposium on the Okhotsk Sea & Polar Oceans*, 2019: 30-31.

- Nagai S, Sildever S, Nishi N, Tazawa S, Hirai J, Kasai H, Shiimoto H, Katakura S (2020). Progress of eukaryote metabarcoding in Okhotsk Sea. The proceedings of the 35th International Symposium on the Okhotsk Sea & Polar Oceans, 2020: 165-166.
- Sildever S, Nishi Y, Kasai H, Shiimoto H, Katakura S, Nagai S (2020). Detecting phytoplankton biodiversity and appearance patterns: toxic species. The proceedings of the 35th International Symposium on the Okhotsk Sea & Polar Oceans, 2020: 163-164.
- Dzhembekova N, Rubino F, Nagai S, Zlateva I, Ivanove P, Slabakova N, Moncheva S (2020). Comparative analysis of morphological and molecular approaches integrated into the study of the dinoflagellate biodiversity within the recently deposited Black Sea sediments - benefits and drawbacks. Biodiversity Data Journal, 10.3897/BDJ.8.e55172
- 渡辺 剛, 南雲 保, 田中次郎, 田所和明 (2020). 無縦溝珪藻 *Meridion circulare* (Greville) C. Agardh (Tabellariales, Tabellariaceae) における篩板の形態とその形成過程. Diatom 36: 81-83.
- Nagai S. Application of molecular techniques to detect HAB species -presentation and demonstration. In Varna, Bulgaria, as an invited speaker. October 3, 2018. in Okhotsk Sea in Japan by the metagenetic approach. The 18th International Conference on Harmful Algae. In Nantes, France (2018-10-24).
- Nagai S. Understanding of Harmful algal bloom and outbreak of shellfish poisoning by using molecular tools in Chile. SATREPS kick off meeting, Santiago, Chile (2018-9-5).
- Nagai S. Application of molecular techniques to detect HAB species -presentation and demonstration. In Antofagasta Univ., Chile (2018-12-11).
- Nagai S, Nishi N, Kawakami K, Sildever S, Kanno N, Shiimoto A, Katakura S. Time Series monitoring of environmental DNA in Okhotsk Sea. The 34th International symposium on the Okhotsk Sea & polar Oceans 2019. Mombetsu, Japan (2019-2-19).
- Sildever S, Kawakami Y, Kasai H, Shiimoto H, Katakura S, Nagai S. Detecting phytoplankton biodiversity and appearance patterns: toxic species. International Symposium on aquatic Metagenomics 2019 at Kitasato University, pp35-36 (2019-11-24).
- 寒川 清佳, 下出信次, (2019-09-19), 異なる遺伝子領域による海洋プランクトン群集の DNA メタバーコーディング. 2019 年日本ベントス学会・日本プランクトン学会合同大会 (2019-09-19)
- Nagai S, Sildever S, Nishi N, Tazawa S, Hirai J, Kasai H, Shiimoto H, Katakura S. Recent progress of eukaryotic metabarcoding in Japanese coastal waters. International Symposium on aquatic Metagenomics 2019 at Kitasato University, pp37-38 (2019-11-24).
- Nagai S, Sildever S, Kawakami Y, Kasai H, Shiimoto H, Katakura S. Toxic HAB species from the Sea of Okhotsk detected by a metagenetic approach. 2019 Annual symposium of the Korean society of environmental biology and harmful organisms 2019. Busan, Korea 18p, (2019-04-25).
- Sildever S, Nishi Y, Kasai H, Shiimoto H, Katakura S, Nagai S. Detecting phytoplankton biodiversity and appearance patterns: toxic species. Proceedings of the 35th International Symposium on the Okhotsk Sea & Polar Oceans, Mombetsu, Japan, pp163-164 (2020-02-18). <青田賞受賞>
- Nagai S, Sildever S, Nishi N, Tazawa S, Hirai J, Kasai H, Shiimoto H, Katakura S. Progress of eukaryote metabarcoding in Okhotsk Sea. Proceedings of the 35th International Symposium on the Okhotsk Sea & Polar Oceans, Mombetsu, Japan, pp165-166 (2020-02-18).

- Nagai S. Metabarcoding in marine eukaryotes. Invited lecture. Illumina webinar (2020-06-24).
- 長井 敏. 海洋環境における真核生物のメタバーコーディング. 招待講演、イルミナ社ウェビナー (2020-06-24).
- Nagai S. Detection of HAB species by eDNA technology. Invited speaker, International and National Seminar on Fisheries and Marine Science IX (Indonesia) (2020-09-10).
- Nagai S. Recent progress of eukaryotic metabarcoding in Japanese coastal waters. Invited speaker, PICES-2020 (2020-10-28).
- 長井 敏・浜本洋子・渡井幹雄・入路光雄・西 典子・安田十也. 魚卵のメタバーコーディングについて. 令和2年度 中央ブロック 資源海洋調査研究会 (2020-10-28).
- Nagai S. Acquisition and utilization of marine big data—time series monitoring in Mombetsu Hokkaido Japan as an example. Invited speaker. The Joint meeting of the eDNA Society & the Society of Population Ecology (2020-11-14).
- 長井 敏. 海洋におけるビッグデータの獲得と利用—紋別市における時系列データを例に. 招待講演. 環境DNA学会第3回大会・第36回個体群生態学会合同大会 (2020-11-14).
- Sogawa S, Kuwahara VS, Shimode S, Nagai S. Revealing the temporal variability of marine plankton community through environmental DNA. Oral presentation, Virtual International Conference of Marine Science & Aquaculture (vICOMSA) 2020 (2020-12-9).
- Nagai S. Harmful Algal Blooms in the North Pacific: current dynamics and impact to marine ecosystems. Invited speaker. The Russian Academy of Science international webinar (2020-12-15).
- 長井 敏. メタバーコーディングによる微小プランクトン検出技術の現状. 招待講演. マリンバイオテクノロジー学会秋のシンポジウム 2020 (2020-12-18).