PNA クランピングを用いたヒラメ稚魚と稚アオリイカにおける 食性解析の試み

手賀 太郎,^{1a} 丹羽健太郎,² 張 成年^{3*}

(2015 年 8 月 13 日受付, 2015 年 12 月 11 日受理, 2016 年 2 月 18 日 J-STAGE 早期公開)

¹福井県水産試験場, ²(国研)水産総合研究センター増養殖研究所,

³(国研)水産総合研究センター中央水産研究所

An attempt to clarify the diets of olive flounder and bigfin reef squid juveniles using PNA clamping

TARO TEGA,^{1a} KENTARO NIWA² AND SEINEN CHOW^{3*}

¹Fukui Prefectural Fisheries Experimental Station, Tsuruga, Fukui 914-0843, ²National Research Institute of Aquaculture, Yokosuka, Kanagawa 238-0316, ³National Research Institute of Fisheries Science, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan

Peptide nucleic acid (PNA)-directed PCR clamping was used to efficiently detect prey animals in the predators' stomach. Two oligo PNAs (19 and 18 mer) having sequences specific to the 16S rDNAs of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and bigfin reef squid *Sepioteuthis lessoniana* were designed. PCR amplification of the 16S rDNAs of these species was successfully inhibited in the presence of these PNAs. This method was applied to DNAs extracted from the stomach contents of olive flounder and bigfin reef squid juveniles caught in Tsuruga Bay, Japan. Goby DNAs were detected in nine of 11 flounder juveniles examined, and DNAs of the Japanese anchovy *Engraulis japonicus* and the Japanese silver-biddy *Gerres oyena* were detected in each of the remaining flounder juveniles. Anchovy DNA was also detected in two of nine squid juveniles, while fish species could not be identified for short sequences (118 bp) obtained from the other squid juveniles.

キーワード：16S rDNA, PNA クランピング, アオリイカ, 消化管内容物解析, 食性, ヒラメ

動物の生態研究において捕食被食関係は最も重要な基本情報の一つであり, 消化管内容物分析が古くから行われている。しかしながら咀嚼による断片化や消化によって原型をとどめない消化管内容物の種組成を形態から査定することは困難である場合が多い。近年では PCR 増幅を基礎として, 消化管内容物から抽出した DNA だけでなく非殺傷的な分析を行うために排泄物から抽出した DNA を用いた食性解析が行われている。^{1,2)} 消化により DNA は断片化が進むため, 通常はリボソーム DNA といった多重遺伝子族やマルチコピーであるミトコンドリア DNA (mtDNA) の遺伝子が分析対象として利用される。¹⁾ ある限定した生物だけを検出することが目的であれば, その生物に特異的な塩基配列に基づいた PCR プライマーを用いた検出系を構築することができる。³⁾ 一方, 消化管あるいは排泄物中の多岐にわたる生物を網

羅的に把握する場合には幅広い生物群を対象とした PCR プライマーすなわちユニバーサルプライマーが必要となり, その場合には消化管内容物中の異種生物だけでなく捕食者 (ホスト) そのものの DNA も増幅されるため分析効率が低下することが予想される。実際にイセエビ *Panulirus japonicus* 幼生の中腸腺から抽出した DNA を 18S rDNA 用のユニバーサルプライマーを用いて増幅しクローニングしたところ, 70–90% 以上のポジティブクローンのプラスミドにはイセエビの 18S rDNA が挿入されていた。^{4,5)} 制限酵素を用いてホスト DNA を特異的に切断することによってその後のホスト DNA の増幅を抑制する方法も考案されているが,^{6,7)} ホスト DNA のみを切断している保障はない。より効果的にホスト DNA の増幅を抑制する方法として, locked nucleic acid (LNA) や peptide nucleic acid (PNA) と

いった人工合成分子が利用されている。LNA は RNA アナログ、PNA は主鎖にペプチド構造を持つ核酸類似分子であり、これらの人工核酸は特異性が高いだけでなく人工核酸/DNA の 2 重鎖は DNA/DNA の 2 重鎖よりも結合力が強いという特徴を持つ。また、これらの人工核酸は DNA polymerase に認識されない。そのため、種特異的なオリゴ人工核酸を添加した PCR 反応系では、オリゴ人工核酸が結合した部分でプライマーからの DNA 合成伸長が停止する。このような機序により 1 対のプライマーで挟まれた領域の増幅は標的種のみで阻害される。^{8,9)} この方法を利用して希少な変異体検出や SNPs 検出が行われており、¹⁰⁻¹²⁾ 水産動物での応用としてはウナギ *Anguilla japonica* やイセエビ幼生の食性を調査するために応用されている。^{13,14)} これらのウナギとイセエビ幼生を対象とした先行研究では、核リボソーム DNA のスペーサー領域 (internal transcribed spacer 1: ITS1) を分析対象としている。ITS1 では塩基の置換や挿入欠失が頻繁に起こっているが、リボソーム DNA の特徴として種内変異が低く種間では差異が大きい。このことは PNA の設計に必要な種特異的の配列を得るには好都合であるものの、ITS1 の長さが生物種によって大きく異なることによって PCR 増幅効率にバイアスを生じる可能性が指摘されている。¹³⁻¹⁵⁾ さらに、動物 ITS1 のデータベースはまだ貧弱であることから、検出した配列の種査定ができない場合が多いことも課題となっている。^{13,14)} データベースが充実しかつ種査定によく使われている遺伝子としては、核の 18S rDNA、ミトコンドリア DNA の 16S rDNA、シトクローム b (cyt b) や近年 DNA バーコーディングの対象とされているシトクロームオキシダーゼサブユニット I (COI) が挙げられるが、18S rDNA は非常に保存性が高いこと、ミトコンドリア DNA のタンパク質コーディング領域も比較的保存性が高くかつ塩基置換が第 3 コドンに集中していることから、種特異的の配列を持つ人工核酸のデザインが困難である。

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* は重要な養殖魚であるだけでなく、種苗放流が最も盛んに行われている魚種でもある。筆頭著者が所属する福井県においても年間 40 万尾前後が放流されており、放流魚の回収率は 4% 程度と推定されている。¹⁶⁾ 放流ヒラメの回収率に影響する要素として、餌料環境、放流のサイズと時期、漁獲率及び移動が挙げられる。¹⁷⁾ 福井県では漁獲された稚アオリイカ *Septoteuthis lessoniana* を蓄養し出荷している。稚アオリイカへの初期餌料はアミ mysid shrimp が有効であることがわかっているが、胴長 20 mm 程度から斃死が多くなるといった問題を抱えており、自然界で利用している餌生物の情報を入手することが重要な課題である。

前述の DNA 解析を用いた餌料に関する先行研究での

課題を克服すべく、本研究ではデータベースが豊富な mtDNA の 16S rDNA においてヒラメとアオリイカそれぞれに特異的な PNA を設計しヒラメ稚魚と稚アオリイカの胃内容物分析に応用した結果を報告する。

材料と方法

ヒラメ稚魚と稚アオリイカは敦賀湾で漁獲されたものである (Fig. 1)。ヒラメは、平成 23 年及び 24 年に敦賀湾で標識放流された後、調査等で採捕された 41 個体、アオリイカは、平成 24 年 8 月 31 日に糠定置網で混獲された 30 個体である。そのうち胃内容物が目視で確認できたヒラメ 11 個体 (PO1-PO11) 及びアオリイカ 9 個体 (SL1-SL9) を供試魚とした (Table 1)。

漁獲時に凍結あるいはエタノール固定した供試個体を実験室にて解剖して胃を取り出し、胃表面をよく洗浄した後に切り開いて内容物を確認した。ヒラメの胃内容物中で形態がよく保存されている魚類は、滅菌蒸留水でよく洗浄して肉片を採取し DNA 抽出用標本とした。また、原型をとどめない魚類、無脊椎動物や消化されて識別出来ない組織片や肉片は全てまとめてホモジナイズし DNA 抽出用標本とした。これらの標本から DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いて粗 DNA を抽出した。

mtDNA の 16S rDNA 部分領域を分析対象とした。動物全般の 16S rDNA 部分領域を PCR 増幅するためのユニバーサルプライマーは Palumbi *et al.*¹⁸⁾ の 16Sar-L と 16Sbr-H を参考とし、汎用性をさらに高める目的でフォワード、リバーズ側それぞれ同じ部分で配列が若干異なる 3 種類のプライマー (16sar-L1-16sar-L3, 16sbr-H1-16sbr-H3) を設計した。さらに、対象とした 16S rDNA 部分領域でヒラメとアオリイカそれぞれについて種特異的な配列を探索し、ヒラメ特異的 PNA (PO16SPNA01) とアオリイカ特異的 PNA (SL16SPNA01) を設計した。PO16SPNA01 はヒラメ 16S rDNA 増幅領域の中央部付近、SL16SPNA01 はアオリイカ 16S rDNA 増幅領域のリバーズプライマー近くに位置する。これらのプライマー及び PNA の配列と変性温度を Table 2 に示した。ユニバーサルプライマーの普遍性を確認するために、水産総合研究センター増養殖研究所が保管している海産動物 DNA 標本のうち刺胞動物 (花虫綱)、軟体動物 (多板綱、二枚貝綱、腹足綱)、節足動物 (甲殻綱)、棘皮動物 (ウニ綱)、脊索動物 (硬骨魚綱) 5 動物門 7 綱から 16 種標本を選択し鋳型として用いた (Table 3)。1 検体あたりの PCR 反応液組成は、Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN) 7.2 μ L, 10 μ M プライマー各 0.5 μ L, template DNA 1.0 μ L であり、滅菌蒸留水を加えて総量を 15.5 μ L とした。PCR 反応液を 94°C で 4 分間熱変性した後に、35 サイクルの 94°C 1

Fig. 1 Map showing Tsuruga Bay, where bigfin reef squid *Sepioteuthis lessoniana* and hatchery raised and released olive flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles were caught. Bigfin reef squid was caught by set net at Nuka (closed circle).

Table 1 Catch date and biological data of olive flounder and bigfin reef squid juveniles used in this study

Species	Catch date	Code	Total length* (mm)	Weight (g)
Olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	August 2, 2012	PO1	116.0	13.0
	August 2, 2012	PO2	103.8	9.2
	September 12, 2012	PO3	176.3	50.2
	February 12, 2011	PO4	159.3	35.2
	February 15, 2011	PO5	120.3	17.8
	February 16, 2012	PO6	199.6	68.2
	July 26, 2012	PO7	123.7	10.7
	August 2, 2012	PO8	93.0	6.6
	August 2, 2012	PO9	149.6	41.0
	August 2, 2012	PO10	117.8	14.0
	August 26, 2012	PO11	126.0	20.6
Bigfin reef squid <i>Sepioteuthis lessoniana</i>	August 31, 2012	SL1	39.5	8.0
	August 31, 2012	SL2	51.1	21.1
	August 31, 2012	SL3	53.2	18.0
	August 31, 2012	SL4	55.2	18.3
	August 31, 2012	SL5	70.0	42.4
	August 31, 2012	SL6	79.1	38.8
	August 31, 2012	SL7	66.2	30.4
	August 31, 2012	SL8	61.5	24.1
	August 31, 2012	SL9	42.1	9.4

* Mantle length of squid.

分の熱変性, 45°C 30 秒のアニーリング, 72°C 1 分の伸長反応を行い, 最後に 72°C 7 分の伸長反応を行った。

ホスト DNA の増幅を阻害する PNA の適正濃度を決めるために, ヒラメ及びアオリイカの DNA を鋳型とした PCR 反応液に, 1 検体あたり異なる濃度の PNA を加え, 上述のサイクルで PCR 反応を行った。

充分量と判断された PNA を加えて, 胃内容物から抽出した DNA を鋳型として行った PCR 産物は TA cloning kit (Target Clone, 東洋紡) を用いてクローニングした。アオリイカでは 1 回目の PCR で増幅産物が確認できない個体が多く, その場合にはインターナルプライマー (16SscrA) とリバースプライマー (16sbr-H1-16sbr-H3) を用いて 2 回目の PCR を行いクローニングした。1 回目の PCR で増幅産物が確認できたヒラメ全 11 個体とアオリイカ 2 個体では 16S rDNA 用ユニバーサルプライマー (16sar-L1-16sar-L3, 16sbr-H1-16sbr-H3) を用いてホワイトコロニーから直接 PCR を行った。1 回目の PCR で増幅産物が確認できず 2 回目の PCR を行ったアオリイカ 7 個体ではプラスミドベクター用のユニバーサルプライマーのうち M13-20 と M13 reverse を用いてホワイトコロニーから直接 PCR を行った。1 個体あたりの分析コロニー数は 48 を上限とした。ただし, ヒラメ 3 個体 (PO2, 3, 7) それぞれの胃内容にはハゼ類であることが分かる程度に形態が残っている魚類が 1 個体のみ見られたため, 個体ごとに採

Table 2 Nucleotide sequences of PCR primers and peptide nucleic acids (PNA)

Code	Orientation	Sequence	<i>T_m</i> (°C)
PCR primer			
16sar-L1	forward	5'-YCGCCTGTTTAACAAAAACA-3'	60.7
16sar-L2	forward	5'-YCGMCTGTTTACCAAAAAACA-3'	58.2
16sar-L3	forward	5'-YCGCCTGTTTATCAAAAAACA-3'	60.6
16sbr-H1	reverse	5'-GCCGGTYTGAACCTCARATCA-3'	64.8
16sbr-H2	reverse	5'-RCCGGTCTGAACTCAGATCA-3'	62.3
16sbr-H3	reverse	5'-CCCGGTCTGAACTCAAAATCA-3'	65.0
16SscrA	forward	5'-TTACCCTAGGGATAACAGCG-3'	60.5
PNA			
PO16SPNA01		NH ₂ -CCTACAAGCTAGAGCGACA-CONH ₂	78.4
SL16SPNA01		NH ₂ -GTGGGTAAATCTGTTCGA-CONH ₂	76.4

Table 3 Animal species used to evaluate universal utility of 16S rDNA primers

Phylum	Class	Family	Species	Common name
Cnidaria	Anthozoa	Actiniidae	<i>Actinia equina</i>	beadlet anemone
Mollusca	Polyplacophora	Chitonidae	not determined	chiton
	Bivalvia	Mytilidae	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mediterranean mussel
	Gastropoda	Turbinidae	<i>Astraea haematraga</i>	Pacific star shell
		Cypraeidae	<i>Cypraea</i> sp.	cowrie
Arthropoda	Crustacea	Pennellidae	<i>Pennella</i> sp.	parasitic copepod
		Euphausiidae	<i>Euphausia superba</i>	Antarctic krill
		Inachidae	<i>Macrocheira kaempferi</i>	giant Japanese spider crab
		Portunidae	<i>Scylla serrata</i>	mud crab
Echinodermata	Echinoidea	Echinometridae	<i>Anthocidaris crassispina</i>	Japanese purple sea urchin
		Strongylocentrotidae	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	Japanese green sea urchin
Chordata	Osteichthyes	Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i>	Japanese eel
		Soleidae	<i>Heteromycteris japonica</i>	bambu sole
		Pleuronectidae	<i>Pleuronectes yokohamae</i>	righteye flounder
		Paralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i>	olive flounder
		Paralichthyidae	<i>Tarphops oligolepis</i>	large-tooth flounders

取した組織片からDNA抽出しそのPCR産物をTA cloningせず、ダイレクトシーケンスを行った。全てのPCR産物は、ExoSAP-IT (USB)で精製し、サイクルシーケンス反応のテンプレートとした。BigDyer® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンス反応を行った。シーケンス反応に用いたプライマーはフォワードプライマー (16sbr-L1-16sbr-L3)あるいはインターナルプライマーによる2回目のPCR増幅を行ったイカ個体についてはM13 reverseプライマーである。得られた塩基配列のアライメントはMEGA ver. 6¹⁹⁾を用いて行い、異なる配列ごとにOTU (operational taxonomic unit) 番号を付けた。各OTU配列についてNCBIのBLAST検索を用いて種同定を試みた。検索結果で最高位にランクされた配列とOTU配列間の類似性についてはギャップも含めた相同性 (% identity) で評

価した。OTU配列内のNは検索配列と同義とした。OTU配列間の塩基置換率はMEGA ver. 6¹⁹⁾によりKimura 2 parameter distance (K2P)を算出した。尚、N及び挿入欠失は無視した。同種と判断される類似OTUのうち最も長い配列あるいは同じ長さであれば出現頻度が高いタイプをデータベースに登録した (DDBJ/EMBL/GenBank accession no. LC074452-LC074470)。

結 果

ユニバーサルプライマーの検証及びPNAによる特異的増幅阻害 ユニバーサルプライマーを用いて広範囲な動物5分類群16種のDNAを鋳型としてPCRを行ったところ、用いた全種で増幅断片が確認された。増幅断片の長さは約600-650 bpの範囲であった。濃度調整したPNAの存在下でヒラメDNAを鋳型としたPCR増幅を行ったところ、ヒラメでは100 μMのPO16SP-

NA01 を 4 μ L 添加した場合に PCR 増幅が阻害された。一方、アオリイカの場合は 10 μ M–100 μ M の SL16SP-NA01 を 2 μ L 添加した場合の全てにおいて PCR 増幅が阻害された。

ヒラメ ヒラメ 11 個体中 3 個体 (PO2, 3, 7) の胃中には消化があまり進んでいない 1 個体のハゼ科魚類のみが見られたため、これらの個体から抽出した DNA を鋳型としてユニバーサルプライマー (16sar-L1–16sar-L3, 16sbr-H1–16sbr-H3) を用いて PCR を行い、ダイレクトシークエンスを行った。その他のヒラメ個体については胃内容物全部をホモジナイズした標本から抽出した DNA を鋳型として 100 μ M の PO16SPNA01 を 4 μ L 添加した状態で PCR 増幅し、クローニング後シークエンス解析を行った。1 個体あたり 9 から 48 個のコロニーをピックアップし総計 268 コロニーを解析した結果、81 コロニーで最短で 164 bp から最長で 594 bp の配列結果が得られた。アライメントの結果、81 コロニーは 21 種類の配列に分類された。BLAST 検索によってこれらの塩基配列に最も類似性が高いと判断された種を Table 4 に示した。21 種類の OTU は全て硬骨魚類のものと判断され、これらの配列に対する BLAST 検索のベストヒットは、OTU1-1–OTU1-10 ではモヨウ

ハゼ *Acentrogobius pflaumii*, OTU2-1–OTU2-4 ではスミウキゴリ *Gymnogobius petschiliensis* あるいはウキゴリ *Gymnogobius urotaenia*, OTU3-1–OTU3-4 ではミナミクロサギ *Gerres oyena*, OTU4-1–OTU4-2 ではカタクチイワシ *Engraulis japonicus*, OTU5 ではヒラメであった。データベースのハゼ類の配列と類似 OTU 配列間の相同性は 90.0–96.0% であり、データベースには無い種と判断された。また、OTU の塩基配列が短いほど相同性が低くなる傾向が見られた。一方、ミナミクロサギ、カタクチイワシ、ヒラメ配列とそれぞれの類似 OTU 配列間の相同性は 99.7% 以上であり種特定ができたものと考えられた。ただし、データベースのミナミクロサギ *G. oyena* とクロサギ *G. equulus* の 16S rDNA 配列間に塩基置換は全く無いため、実際にはどちらの種かはわからないが、分布から判断するとクロサギであると考えられた。モヨウハゼ類似の OTU1-1–OTU1-10 間の塩基置換率 (K2P) は 0.17–1.27%, ウキゴリ類似の OTU2-1–OTU2-4 間の塩基置換率は 0.17–0.82%, クロサギと判定された OTU3-1–OTU3-4 間の塩基置換率は 0.22–0.55%, カタクチイワシと判定された OTU4-1 と OTU4-2 間の塩基置換率は 0.3% であった。ハゼ類では解読塩基配列長が短い OTU がいくつかあり、それらが類似

Table 4 Results of BLAST homology search for 16S rDNA sequences obtained from olive flounder stomach

OTU	Top species	Accession No.	% Identity (bp)*	<i>Paralichthys olivaceus</i> (PO) individual										
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1-1	<i>Acentrogobius pflaumii</i>	JX029961	94.2 (571)	1										
1-2	<i>Acentrogobius pflaumii</i>	JX029961	94.1 (571)				1							
1-3	<i>Acentrogobius pflaumii</i>	JX029961	94.2 (191–571)				1	9				5		6
1-4	<i>Acentrogobius pflaumii</i>	JX029961	94.1 (571)				1							
1-5	<i>Acentrogobius pflaumii</i>	JX029961	94.1 (571)				1							
1-6	<i>Acentrogobius pflaumii</i>	JX029961	94.2 (571)				2							
1-7	<i>Acentrogobius pflaumii</i>	JX029961	90.7 (289)					1						
1-8	<i>Acentrogobius pflaumii</i>	JX029961	90.5 (239)					1						
1-9	<i>Acentrogobius pflaumii</i>	JX029961	94.1 (571)									1		
1-10	<i>Acentrogobius pflaumii</i>	JX029961	94.2 (571)											1
2-1	<i>Gymnogobius petschiliensis</i>	AY525784	95.8 (575)			1								
2-2	<i>Gymnogobius petschiliensis</i>	AY525784	96.0 (164–576)				1		6	1			7	
2-3	<i>Gymnogobius urotaenia</i>	KF415395	91.7 (244)						1					
2-4	<i>Gymnogobius petschiliensis</i>	AY525784	95.0 (444)										1	
3-1	<i>Gerres oyena</i>	AB355913	100 (474)	29										
3-2	<i>Gerres oyena</i>	AB355913	99.7 (386)	1										
3-3	<i>Gerres oyena</i>	AB355913	99.8 (455)	1										
3-4	<i>Gerres oyena</i>	AB355913	99.8 (438)	1										
4-1	<i>Engraulis japonicus</i>	AB246181	99.4 (357)									1		
4-2	<i>Engraulis japonicus</i>	AB246181	100 (303)									1		
5	<i>Paralichthys olivaceus</i>	AB028664	99.8 (594)									1		
Number of colonies examined				48	—	—	10	48	48	—	48	9	48	9
Sequencing failed				16	—	—	3	37	41	—	45	3	40	2

* Longest sequence within each OTU was used for BLAST.

OTU 間の置換率を押し上げているものと考えられた。ヒラメ 1 個体 (PO8) の胃内容物には形態的に明らかに甲殻類であるアミ類 (Mysidacea) が観察できたにもかかわらずアミ類の DNA は検出されなかった。

アオリイカ 100 μ M の SL16SPNA01 を 2 μ L 添加した状態で稚アオリイカ 9 個体の胃内容物標本から抽出した DNA を鋳型としてユニバーサルプライマー (16sar-L1-16sar-L3, 16sbr-H1-16sbr-H3) を用いて PCR 増幅を行ったところ, 2 個体のみ (SL3 及び 4) で増幅産物が確認できた。他の 7 個体の PCR 産物を鋳型としてインターナルプライマー (16ScurA) と 16sbr-H1-16sbr-H3 を用いて 2 回目の PCR を行い増幅産物をクローニングに用いた。全般的に出現コロニー数が少なく, SL3 のみ 32 コロニー, その他の個体では 8 コロニーをピックアップし総計 96 コロニーを解析した結果,

88 コロニーで良好な配列結果が得られた。各配列に対して BLAST 検索を行った結果を Table 5 に示した。1 回目の PCR 産物をクローニングした SL3 及び 4 では解読配列長が長い (376-492 bp) ことからカタクチイワシ (OTU4) とヒト *Homo sapiens* (OTU20) と特定できる結果が得られた。SL3 と 4 でそれぞれ検出した 29 と 8 クローン計 37 クローンのカタクチイワシ類似配列は 14 種 (OTU4-3-OTU4-16) に分けられたが, 14OTU 間の塩基置換率が平均で $0.62 \pm 0.16\%$ であったことから全てカタクチイワシと判断した。SL9 の 8 クローンのうち 3 クローンは解析配列が 85 から 118 bp と短い BLAST 結果の上位 100 は全てヒトであった。ヒト類似配列は全てコンタミネーションと判断した。2 回目の PCR 産物を用いた 7 個体 (SL1, 2, 5-9) で分析したヒト類似配列以外の 47 クローンの解読配列長は

Table 5 Results of BLAST search for 16S rDNA sequences obtained from bigfin reef squid stomach

OTU	Top species	Accession No.	% Identity (bp)*	<i>Sepioteuthis lessoniana</i> (SL) individual								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
4-3	<i>Engraulis japonicus</i>	JQ178225	99.8 (376-491)			15						
4-4	<i>Engraulis japonicus</i>	JQ178225	99.8 (529)			1						
4-5	<i>Engraulis japonicus</i>	JQ178225	99.6 (529)			1						
4-6	<i>Engraulis japonicus</i>	JQ178225	100 (376-492)			5						
4-7	<i>Engraulis japonicus</i>	JQ178225	99.6 (492)			1						
4-8	<i>Engraulis japonicus</i>	JQ178225	99.6 (492)			1						
4-9	<i>Engraulis japonicus</i>	JQ178225	99.4 (491)			1						
4-10	<i>Engraulis japonicus</i>	JQ178225	99.6 (492)			1						
4-11	<i>Engraulis japonicus</i>	JQ178225	99.6 (488)			1						
4-12	<i>Engraulis japonicus</i>	JQ178225	99.8 (488-490)			2						
4-13	<i>Engraulis japonicus</i>	AB246181	99.8 (487)				1					
4-14	<i>Engraulis japonicus</i>	AB246181	100 (450-490)				5					
4-15	<i>Engraulis japonicus</i>	AB246181	99.6 (488)				1					
4-16	<i>Engraulis japonicus</i>	AB246181	99.6 (488)				1					
6	ND†		100 (118)	3				4	3	5	1	2
7	<i>Nemateleotris magnifica</i>	MB060901	100 (118)	1					2	2	2	2
8	ND		100 (118)									1
9	ND		100 (118)	1								
10	ND		100 (118)								1	
11	<i>Nemateleotris magnifica</i>	MB060901	99.2 (118)								1	
12	<i>Nemateleotris magnifica</i>	MB060901	99.2 (118)								1	
13	ND		99.2 (118)	1								
14	ND		99.2 (118)							1		
15	ND		99.2 (118)	1								
16	<i>Gerres oyena</i>	AB355913	99.2 (118)								1	
17	<i>Gazza minuta</i>	AB355910	100 (118)		5			4				
18	<i>Gazza minuta</i>	AB355910	99.2 (118)		1							
19	<i>Gazza minuta</i>	AB355910	99.2 (118)		1							
20	<i>Homo sapiens</i>	JQ705321	100 (85-464)			1						3
Number of colonies examined				8	8	32	8	8	8	8	8	8
Sequencing failed				1	1	2	0	0	3	0	1	0

* Longest sequence within each OTU was used for BLAST. † Not determined.

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree drawn based on K2P distances among 28 short (118 bp region) 16S rDNA sequences. Four OTUs (1-3, 2-2, 3-1, and 5) detected from olive flounder juveniles are shown in bold, and 16 OTUs (4-3, 6-20) detected from bigfin reef squid juveniles are shown in italic. Eight sequences obtained from the database were the best BLAST hits for these OTUs.

短く (118 bp), 14 種類の OTU (6-19) に分けられた。広範囲にわたる魚類以外の動物 16S rDNA 配列との比較によりこの 118 bp 部分領域の配列は硬骨魚類には間違ったことが示されたが, BLAST 検索結果ではかなり離れた分類群に属する魚種が同じ相同性を示すこと, OTU 配列との塩基置換数が 0 または 1 の硬骨魚が複数種上位にランクされることから, 種判定には情報が不足しているものと考えられた。例えばヒラメで検出されたハゼ類似配列 (OTU2-2) とヒラメ類似配列 (OTU5) は明らかに異なる魚種のものであるが, この 118 bp 部分には塩基置換が無かった。アオリイカで検出された OTU のうち種特定ができなかった 14 種 (6-19), カタクチイワシの代表として OTU4-3, ヒト類似配列の OTU19, そしてヒラメで検出された OTU1-3, 2-2, 3-1, 5 及びこれらの OTU に対して BLAST 検索でトップにランクされた魚種を加えて 118 bp 部分の配列情報によ

る系統樹を作成した (Fig. 2)。系統樹はヒト配列を除いて大きく 4 クレード (I-IV) より構成され, 各クレード内配列間及びクレード間の平均塩基置換率 (K2P) はそれぞれ 0-1.71% 及び 5.09-7.14% であった。クレード IV 以外でヒラメとアオリイカから検出された OTU が混在し, クレード II はクロサギ類似, クレード III は明らかにカタクチイワシと考えられた。クレード IV はアオリイカから検出された OTU のみで構成されヒラギ科 Leiognathidae の魚種と類似していた。

考 察

設計したプライマーを用いた予備試験的 PCR により, 硬骨魚類, 甲殻類, 軟体動物, 棘皮動物, 刺胞動物といった幅広い動物分類群間で 16S rDNA 遺伝子の一部と考えられる断片の増幅がみられた。一方で実際にヒラメ胃内容にはアミが観察されたにもかかわらずアミ類

DNA が検出できないという結果も得られた。これはプライマー配列が一致しない分類群があることや消化による DNA の断片化が原因として考えられる。そこで Bybee *et al.*²⁰⁾ が報告したアミ類 (Mysidacea) 3 種の 16S rDNA 配列と、本研究で用いたプライマーの配列と比較したところ 3' 末端のみならず全般的に配列はよく一致していたことから、プライマーのミスマッチが原因ではないことが示された。このことは消化程度によって検出感度が異なることを意味し、自己消化速度、消化しやすさの違いや嚥下されてからの経過時間によって結果が左右されることを示している。このように、DNA 分子を用いた分析は定性的でありかつ検出分子種数については常に過小評価の傾向及びバイアスがあることを念頭に置くべきであろう。

ヒラメとアオリイカ特異的 PNA を PCR 反応液に加えることによって、これら 2 種の DNA の増幅を効率的に阻害することができた。しかし、増幅阻害に必要な PNA 量がヒラメとアオリイカで異なることが示され、ヒラメでは最大でアオリイカの 20 倍にあたる濃度の PNA が必要であった。実際に増幅阻害を逃れてきたヒラメ 16S rDNA を持つクローンが検出されたことから、ヒラメでの増幅阻害効率はアオリイカより低かったことがうかがえる。イセエビ幼生での試験では 2 μ M の PNA 濃度で増幅阻害できることが報告されている。¹⁴⁾ ウナギ¹³⁾ やイセエビ¹⁴⁾ で用いられた PNA の変性温度は本研究のものより低いことから、用いた PNA の変性温度の違いが原因ではないと考えられる。また、増幅阻害を逃れてきたヒラメの 16S rDNA 配列 (OTU20) は PNA と一致していたので、PNA と宿主 DNA 間のミスマッチも原因ではない。このように、ヒラメとアオリイカで増幅阻害に必要な PNA 量が異なっていた原因は特定できないが、用いたヒラメとアオリイカ DNA 中の mtDNA の分子数が異なっていた可能性や、PNA がクランピングする位置によって増幅阻害効率が異なる可能性も考えられる。

食性解析を行うために適した DNA 配列の条件として、1) 多重遺伝子族や mtDNA のように分子数が多いこと、2) データベースが充実していること、3) ユニバーサルプライマーの設計が可能であること、4) 増幅断片長ができるだけ短いこと、が挙げられる。クランピングを応用する場合には宿主特異的配列が存在することが追加条件となる。PNA クランピングによる食性解析はすでにウナギやイセエビ幼生で試みられているが、^{13,14)} 動物についてはデータベースが充実しているとは言えない ITS1 (internal transcribed spacer 1) を分析対象としたために検出 DNA 配列の半数程度について種特定ができないままになっている。また、ITS1 を対象とした場合には、種によって増幅断片長が大きく異なるため、¹⁴⁾

PCR 増幅効率が種間で異なるといったバイアスが生じる可能性が高い。本研究では 16S rDNA を分析対象としたことから、生物種間で増幅断片の長さに大きな差異はなく増幅効率についてのバイアスは除外できる。さらに、データベースが充実していることから、検出 DNA 分子の解読配列長が充分長ければ種あるいは所属分類群 (科以下レベル) の特定が可能であった。ヒラメ稚魚から検出されたハゼ類と推定される OTU の中で BLAST 検索配列との相同性が低いものが見られたが、これら (OTU1-7, 1-8, 2-3) の解読配列は短いために相対的に相同性が低くなっているものと考えられる。解読配列が短いことは OTU 間の塩基置換率推定にも影響しており、これら 3 種の OTU は各グループ内 OTU 間の平均置換率を上げている原因でもあった。増幅断片長については、消化による断片化が予想されるため対象領域は短かいほうが望ましいが、できるだけ下位の分類レベルまで特定するだけの情報が得られなければならないという制約がある。本研究で用いた領域に関してはアオリイカの例で示されたように、118 bp という短い配列では魚種特定ができない場合が多いことがわかった。1 回目の PCR では増幅断片が得られない個体が多かったために 2 回目の PCR 産物を用いた結果であるが、このことは断片化した分子は検出されにくいことを強く示唆し検出分子種のバイアスに繋がるものと考えられる。分析対象領域にもよるが、種を特定するために必要な情報量と消化による断片化を考慮すると、300–400 bp 前後の DNA 断片が適しているのかもしれない。

魚類の 16S rDNA における同種個体間での塩基置換率は $0.23 \pm 0.11\%$ 、同属異種間では $2.66 \pm 0.46\%$ 、同科異属間では $4.35 \pm 0.35\%$ と推定されていることから、²¹⁾ ヒラメで検出されたクロサギとカタクチイワシと類似した OTU 間の塩基置換は種内変異と考えられる。ハゼ類については種の特定ができなかったが、OTU1-1–OTU1-10 がキララハゼ属 (*Acentrogobius*)、OTU2-1–OTU2-4 がウキゴリ属 (*Gymnogobius*) の種であると判断される。福井県沿岸に出現するハゼ類でデータベースに 16S rDNA 配列情報が無い種を検索したところ、キララハゼ属ではスジハゼ *Acentrogobius virgatus* が候補として考えられた一方、ウキゴリ属では登録 DNA 情報が無い種が多いため候補を絞ることができなかった。

今回分析したヒラメ 11 個体中 9 個体の胃内容からハゼ類が検出された。一方、カタクチイワシやクロサギ等の中層で遊泳する魚種も検出されたが、それぞれヒラメ 1 個体でのみ検出された。これは、放流ヒラメ稚魚が中層遊泳性魚類より底棲性の魚類を多く摂餌していることを示唆している。しかし、全個体でハゼ類が検出されたわけではなく、カタクチイワシやクロサギが検出された

個体ではハゼ類は検出されていない。このことは、個体によっては嗜好性が異なる可能性、あるいはヒラメ稚魚が生息していた環境によっては魚種組成が異なっていた可能性も考えられる。材料のひとつとしてヒラメを用いたが、本研究でも観察されたように個体によっては餌動物の形態が残っている場合もあった。ただし、形態によって種まで査定するには困難な場合が多く、DNAによる判定が必要な場合もあろう。一方、アオリイカでは餌生物の全体が残っていた場合は無く、内容物は不定形であったためDNAによる判定は非常に有効と考えられるが、前述したように断片長の問題で種特定できない場合が多かった。しかしながら、カタクチイワシは明らかに共通して検出されており、系統樹でも示されたようにクロサギ類似の配列が検出されている。そのため、ヒラメ稚魚とある程度似たような餌生物を利用していることが示唆されるもののハゼ類は検出されなかったことから、ヒラメよりは中層遊泳性の動物を多く利用しているのかもしれない。

本研究において、ヒラメ稚魚及び稚アオリイカの胃内容から効率よく異種動物ゲノムを検出する手法を開発できた。ヒラメ胃内容物からは底棲性のハゼ類のDNAが多く検出され、これらの情報はヒラメの放流適地を餌から探索するうえで、初期餌料の点から非常に重要である。また、この技術は、動物全般に応用できる技術であり、特に破碎食者である甲殻類や不定形有機物を利用している動物の食性調査に非常に有効である。近年、次世代シーケンサー (NGS) を用いた大規模かつ網羅的な解析技術の進歩が著しく、食性解析にも応用が開始されている。^{22,23)} 今回のようにクローンライブラリに基づいた手法では分析検体数におのずと制約があるため、絶対量が少ないあるいは消化が進行した動物のDNAは検出できなかった可能性が高い。NGSによる解析とクランピング手法を組み合わせることによって、解析効率及び検出感度をさらに向上させることができるものと考えられる。

謝 辞

放流ヒラメを回収する追跡調査に協力いただいた福井県水産試験場船舶職員の柴野富士夫福井丸船長、栗駒治正若潮丸船長、千田友広一等航海士、川端昭弘主任、松見金幸主任、升谷肇一等機関士、森下泰敬主任、岡田和裕通信長、南秀明主査、山田敏博主査及び本研究の機会を与えて頂くとともに、ご協力いただいた福井県水産試験場の石原孝場長 (現福井県内水面総合センター魚の相談員)、杉本剛士課長 (現福井県水産試験場長)、木下仁徳部長 (現福井県栽培漁業センター所長)、同試験場漁業管理グループの渥美正廣主任研究員 (現企画支援室室長)、河野展久主任研究員、児玉晃治研究員 (現水産課

企画主査)、北山和也主事、そして皆様に厚くお礼申し上げる。国立研究開発法人水産総合研究センター増養殖研究所横須賀庁舎実験室での様々な作業にご協力いただいた浅野恭子氏及び野地美紀氏、そして図の作成に協力いただいた水産総合研究センター中央水産研究所の中道礼一郎博士に厚くお礼申し上げる。本研究は福井県の平成24年度農林水産技術等習得派遣事業によって行った。

文 献

- 1) Symondson WOC. Molecular identification of prey in predator diets. *Mol. Ecol.* 2002; **11**: 627-641.
- 2) King RA, Read DS, Traugott M, Symondson WOC. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Mol. Ecol.* 2008; **17**: 947-963.
- 3) Deagle BE, Bax N, Hewitt CL, Patil JG. Development and evaluation of a PCR-based test for detection of Asterias (Echinodermata: Asteroidea) larvae in Australian plankton samples from ballast water. *Mar. Freshwat. Res.* 2003; **54**: 709-719.
- 4) Suzuki N, Murakami K, Takeyama H, Chow S. Molecular attempt to identify prey organisms of lobster phyllosoma larvae. *Fish. Sci.* 2006; **72**: 342-349.
- 5) Suzuki N, Hoshino K, Murakami K, Takeyama H, Chow S. Molecular diet analysis of phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus* (Decapoda: Crustacea). *Mar. Biotech.* 2008; **10**: 49-55.
- 6) Blankenship LE, Yayanos AA. Universal primers and PCR of gut contents to study marine invertebrate diets. *Mol. Ecol.* 2005; **14**: 891-899.
- 7) Dunshea G. DNA-based diet analysis for any predator. *PLOS ONE* 2009; **4**: e2522.
- 8) Ørum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanly C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res.* 1993; **21**: 5332-5336.
- 9) Ørum H. PCR Clamping. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2000; **2**: 27-30.
- 10) Murdock DG, Christacos NC, Wallace DC. The age-related accumulation of a mitochondrial DNA control region mutation in muscle, but not brain, detected by a sensitive PNA-directed PCR clamping based method. *Nucleic Acids Res.* 2000; **28**: 4350-4355.
- 11) Urata M, Wada Y, Kim SH, Chumpha W, Kayamori Y, Hamasaki N, Kang D. High-sensitivity detection of the A3243G mutation of mitochondrial DNA by a combination of allele-specific PCR and peptide nucleic acid-directed PCR clamping. *Clin. Chemist.* 2004; **50**: 2045-2051.
- 12) Takiya T, Futo S, Tsina M, Namimatsu T, Sakano T, Kawai K, Suzuki T. Identification of single base-pair mutation on *uidA* gene of *Escherichia coli* O157: H7 by peptide nucleic acids (PNA) mediated PCR clamping. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004; **68**: 360-368.
- 13) Terahara T, Chow S, Kurogi H, Lee S-H, Tsukamoto K, Mochioka N, Tanaka H, Takeyama H. Efficiency of peptide nucleic acid-directed PCR clamping and its application in the investigation of natural diets of the Japanese eel *leptocephali*. *PLOS ONE* 2011; **6**: e25715.
- 14) Chow S, Suzuki S, Matsunaga T, Lavery S, Jeffs A, Takeyama H. Investigation on natural diets of larval marine animals using peptide nucleic acid (PNA)-directed

- PCR clamping. *Mar. Biotech.* 2011; **13**: 305–313.
- 15) Chow S, Ueno Y, Toyokawa M, Oohara I, Takeyama H. Preliminary analysis of length and GC content variation in the ribosomal first internal transcribed spacer (ITS1) of marine animals. *Mar. Biotech.* 2009; **11**: 301–306.
- 16) 藤本 宏, 山田達也, 山本岳男, 高橋庸一, 森田哲男, 塩澤 聡. 若狭高浜漁協市場におけるヒラメの漁獲実態調査—2 —漁獲尾数の修正と放流効果の推定—. 栽培漁業センター技報 2010; **12**: 32–43.
- 17) 藤田恒雄, 水野拓治, 根元芳春. 福島県におけるヒラメ人工種苗の放流効果について. 栽培漁業技術開発研究 1993; **22**: 67–73.
- 18) Palumbi SR, Martin AP, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G. *The Simple Fool's Guide to PCR. Version 2.0*. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu. 1991.
- 19) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; **30**: 2725–2729.
- 20) Bybee SM, Bracken-Grissom H, Haynes BD, Hermansen RA, Byers RL, Clement MJ, Udall JA, Wilcox ER, Crandall KA. Targeted amplicon sequencing (TAS): a scalable next-gen approach to multilocus, multitaxa phylogenetics. *Genome Biol. Evol.* 2011; **3**: 1312–1323.
- 21) Kochzius M, Seidel C, Antoniou A, Botla SK, Campo D, Cariani A, Vazquez EG, Hauschild J, Hervet C, Hjørleifsdottir S, Hreggvidsson G, Kappel K, Landi M, Magoulas A, Marteinsson V, Nölte M, Planes S, Tinti F, Turan C, Venugopal MN, Weber H, Blohm D. Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. *PLOS ONE* 2010; **5**: e12620.
- 22) Pompanon F, Deagle BE, Symondson WOC, Brown DS, Jarman SN, Taberlet P. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Mol. Ecol.* 2012; **21**: 1931–1950.
- 23) Shehzad W, Riaz T, Nawaz MA, Miquel C, Poillot C, Shah SA, Pompanon F, Coissac E, Taberlet P. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Mol. Ecol.* 2012; **21**: 1951–11965.