

海洋測機（CTD）に付着した動物断片の DNA分析による種判別

Molecular species identification of animal fragment attached on Conductivity Temperature Depth profiler (CTD)

柳本 卓^{1a}、岡崎 誠²、黒木洋明¹、張 成年¹

Takashi YANAGIMOTO,^{1a}

Makoto OKAZAKI,¹ Hiroaki KUROGI,² Seinen CHOW¹

所属研究機関：

¹国立研究開発法人水産総合研究センター中央水産研究所

²国立研究開発法人水産総合研究センター国際水産研究所

¹ National Research Institute of Fisheries Science,
Fisheries Research Agency,

² National Research Institute of Far Seas Fisheries,
Fisheries Research Agency,

Abstract

Unusual values of water temperature, salinity, and dissolved oxygen monitored by Conductivity Temperature Depth profiler (CTD) were observed during oceanographic survey. The animal fragment attached on the CTD sensor was suspected to be the cause of the unusual values. In order to identify the animal species, we determined the partial nucleotide sequences of mitochondrial 16S rDNA (16S) and nuclear 18S rDNA (18S) and internal transcribed spacer 1 (ITS1). Database homology search indicated that all sequences to be of Cnidaria and 16S and 18S sequences to be affiliated with apolemiid siphonophore. Based on phylogenetic analysis using 16S data, the animal fragment was identified to be a species of the genus *Apolemia* of the family Apolemiidae.

Key words

CTD, animal fragments, 16S rDNA, 18S rDNA, ITS1, Cnidaria, *Apolemia* sp.

平成27年9月18日から11月9日の間、ニホンウナギ幼生の分布密度と海洋環境との関係調べるため、水産庁漁業調査船開洋丸にてニホンウナギ生態解明調査

が行われた。海洋調査では通常、海洋測器の一つであるConductivity Temperature Depth profiler（以下、CTDと略記）を昇降させて水温、塩分、溶存酸素、ク

ロプロフィールなどの鉛直データを収集する。同じ地点で限られた時間に同じ水塊中を昇降するため、通常は降下時と上昇時ではほぼ同じデータが得られるはずである。平成27年10月20日に、緯度15度1.73分、経度131度3.56分で、CTDによる海洋観測を実施した際、降下時と上昇時の各計測値が大きく異なっている現象が見られた (Fig. 1)。また、上昇時の計測値にはバラツキが大きかった (Fig. 1)。CTD観測ではときたまこのような異常現象が見られ、センサーの一時的な不具合として片づけられることが多い。このCTDを揚収した際、センサー部分に動物の一部と思われる組織が付着していた (Fig. 2)。異常データはこの組織片の付着が原因である可能性が高いものと考えられた。本報告では、DNA分析によりこの動物 (以下、UMA) の特定を試みた結果を報告する。

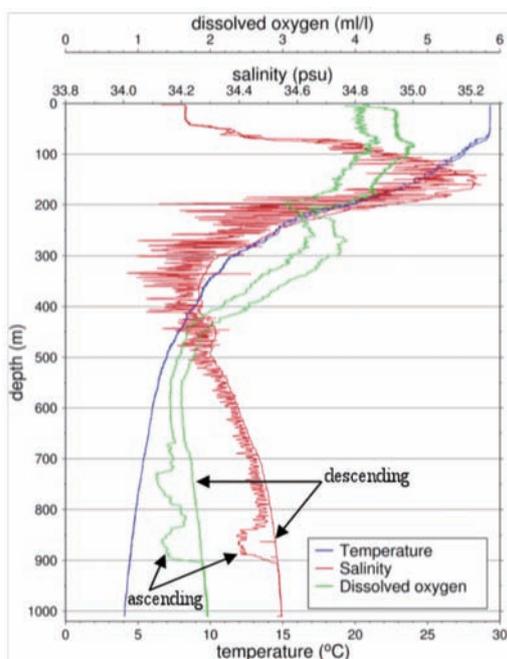


Fig. 1. Vertical profiles of water temperature (blue line), salinity (red) and dissolved oxygen (green) obtained by CTD. Note large differences in salinity and dissolved oxygen values between descending and ascending CTD.

付着していたUMAの組織から約10mgを摘出し、QuickGene (TOYOBO) を用いてDNAを抽出した。これをテンプレートとして、ミトコンドリアDNAの16S rRNA遺伝子の部分領域 (以下、16Sと略記) と核DNAの18S rRNA遺伝子の部分領域 (以下、18S) 及びinternal transcribed spacer 1 (ITS1) について、PCR増幅を試みた。使用したプライマーは、16S用に16SAR (5'-TCGACTGTTTACCAAAAACATAGC-3') と16SBR (5'-ACGGAATGAACTCAAATCATGTAAG-3') (Cunningham and Buss 1993)、18S用に18SF (5'-TCCAGTTCGCTGGGCTTT-3') と18SR (5'-TTCAC TCTTAGATTCTGTTCA-3') (Salim and Maden, 1981)、ITS1用にKP2 (5'-AAAAAGCTTCCCGTAGGTGAACCTGCG-3') と5.8SH (5'-AGCTTGCGTTCTTCATCGA-3') (Sajdax and Phillips 1997) である。抽出DNA溶液 1 μ l、2.5mM dNTP溶液

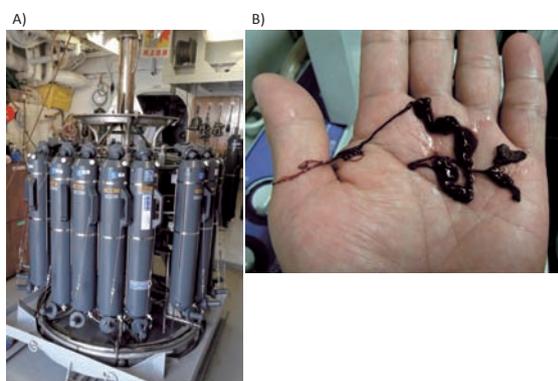


Fig. 2. Entire view of Conductivity Temperature Depth profiler (CTD) (A) and animal fragment (B) attached on the CTD sensor.

2.5 μ l, 10 \times Buffer (TaKaRa) 2.5 μ l, 50 μ M の各プライマー0.5 μ l, TaKaRa Ex Taq Polymerase 0.125U、総量が25 μ lになるように超純水を加えPCR反応液とした。サーマルサイクラーABI9700 (Applied Biosystems) を用いて、94 $^{\circ}$ C 2分加熱後、94 $^{\circ}$ C 30秒、55 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 2分を30サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cで7分加熱して、PCR反応を行った。PCR産物を1.5%アガロースゲル (NuSieve 3 : 1, TaKaRa) で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色によって増幅産物を確認した。

PCR産物を泳動したところ、3領域ともに単一の断片が増幅されていることを確認した。得られた増幅産物をQIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) によりカラム精製し、PCRで用いたプライマーによりBigDye Terminator Kit Ver3.1 (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシーケンス反応を行った。ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で電気泳動をして塩基配列を決定した。

ITS1について201bp、18Sについて551bp、および16Sについて641bpの配列が得られた。これらのアクセッション番号はそれぞれLC151471、LC151472、LC151473である。

これらの塩基配列についてBlast検索を行い上位10までにランクされた生物種をTable 1に示した。ITS1領域は146bpのITS1部分配列と55bpの5.8Sr DNA部分配列から構成されておりITS1部分配列のみをBlast検索に用いた。尚、環境DNAは検索対象から除外した。

16Sでは、クダクラゲ目 (Siphonophorae) 胞泳亜目 (Physonectae) ケムシクラゲ科 (Apolemiidae) ケムシクラゲ属の *Apolemia rubriversa* がUMAとの一致率97.3%で相同性が最も高く、次いで同属の6種 (*Apolemia* sp. 1~4, *Apolemia lanosa*, *Apolemia uvaria*) の相同性が一致率95-96%で高かった。8から10位までは一致率が約90%で、同じ胞泳亜目であるが異なる科の種であった。

18Sでも上位6種はケムシクラゲ属で

Table 1 The results of Blast analysis for nucleotide sequences of the animal fragments attached on CTD

A) 16S							
Order	Acc No.	suborder	family	Species name	Japanese name	Identities	Identities (%)
1	KF214713	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia rubriversa</i>	ケムシクラゲ属の一種	570/585	97
2	AY935290	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia</i> sp. 3	ケムシクラゲ属の一種	580/600	96
3	AY935289	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia</i> sp. 2	ケムシクラゲ属の一種	578/599	96
4	AY935273	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia</i> sp. 1	ケムシクラゲ属の一種	578/598	96
5	KF214712	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia lanosa</i>	カノコケムシクラゲ	567/587	96
6	AY935291	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia</i> sp. 4	ケムシクラゲ属の一種	566/587	96
7	EU999228	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia uvaria</i>	ケムシクラゲ属の一種	490/514	95
8	AY935319	Physonectae	Erennidae	<i>Erenna</i> sp.	アワハダクラゲ属の一種	519/574	90
9	DQ080007	Physonectae	Agalmatidae	<i>Marrus claudanielis</i>	ヒノホビクラゲ	517/573	90
10	AY935280	Physonectae	Stephanomidae	<i>Stephanomia amphitridis</i>	オオダゲクラゲ	516/575	89

B) 18S							
Order	Acc No.	suborder	family	Species name	Japanese name	Identities	Identities (%)
1	KF214714	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia lanosa</i>	カノコケムシクラゲ	532/533	99
2	AY937332	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia</i> sp. 4	ケムシクラゲ属の一種	532/533	99
3	AY937331	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia</i> sp. 3	ケムシクラゲ属の一種	532/533	99
4	AY937330	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia</i> sp. 2	ケムシクラゲ属の一種	532/533	99
5	AY937315	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia</i> sp. 1	ケムシクラゲ属の一種	532/533	99
6	KF214715	Physonectae	Apolemiidae	<i>Apolemia rubriversa</i>	ケムシクラゲ属の一種	529/533	99
7	AF358071	Physonectae	Agalmatidae	<i>Nanomia bijuga</i>	シダレザクラクラゲ	533/543	98
8	AF358069	Calycophorae	Hippopodiidae	<i>Hippopodius hippopus</i>	ヒカリクラゲ	5833/543	98
9	AY937360	Calycophorae	Diphyidae	<i>Lenisia conoidea</i>	ゴリュウナガタイノウコフタクラゲ	525/533	98
10	AY937353	Calycophorae	Diphyidae	<i>Sulculeolaria quadrivalvis</i>	フタツクラゲ科の一種	525/533	98

C) ITS1							
Order	Acc No.	order	family	Species name	Japanese name	Identities	Identities (%)
1	AB505775	Aphragmophora	Sagittidae	<i>Caecosagitta macrocephala</i>	メクラヤムシ	126/153	82
2	AB377567	Siphonophorae	Prayidae	<i>Rosacea plicata</i>	ニイコアイオイクラゲ	126/153	82
3	AB377537			<i>Cnidaria</i> sp.	刺胞動物の一種	110/130	85
4	AB505766	Aphragmophora	Sagittidae	<i>Caecosagitta macrocephala</i>	メクラヤムシ	125/153	82
5	AB377540			<i>Cnidaria</i> sp.	刺胞動物の一種	113/137	82

あり一致率99%以上であった。7~10位の配列は98%台の一致率を示し、同じ胞泳亜目の異なる科 (Agalmatidae) に属するシダレザクラクラゲ (*Nanomia bijuga*) と鐘泳亜目 (Calycophorae) の2科3種であった。

ITS1では相同性が低かったため、上位5種のみをTable 1Cに示す。メクラヤムシ (AB505775、AB505766) とニイオアイオイクラゲ (AB377567) が一致率82%、未同定の刺胞動物 (AB377537) と未同定の刺胞動物 (AB377540) が一致率85%と82%であった。

ITS1については明らかにデータベースが不十分であること (Chow et al., 2011; Terahara et al., 2011)、16S配列に比べ18S配列では種間差が小さく、種査定精度が低いことから、16S配列に基づく系統解析を行った。Blast検索によって示されたUMAの16S配列と類似する配列の上位20種類をデータベースより抽出し、Clustal W (Thompson et al., 1994) によりアライメントを行った。MEGA5.05ソフトウェア (Tamura et al., 2011) によって、pair-wise deletionオプションによりKimura 2-parameter距離 (Kimura, 1980) を求め、近隣接合法 (Neighbor Joining method、以下NJ法と略記) (Saitou and Nei, 1987) により系統樹を作成した。系統樹の信頼性を1000回のブストラップ検定 (Felsenstein, 2011) により評価した。系統樹は大きく3つのクレード (IからIII) に分けられた (Fig. 3)。クレードIはケムシクラゲ属の7種とUMAで構成されており、クレードIIは同じ胞泳亜目の別3科7種、クレードIIIはアントアテカータ目、刺糸亜目、ウミヒドラ科5種で構成されていた。

これらのBlast検索と系統解析の結果

から、UMAはケムシクラゲ科の一種であることは間違いない。ケムシクラゲ科にはケムシクラゲ属のみが記載されている。UMAの16S rDNA部分領域とデータベースに登録されているケムシクラゲ属7種間の差異は2.6%から4.7%であり、ケムシクラゲ属の一種であるものと考えられるが、データベースには登録されていない種である。

ケムシクラゲ類は深度600mから1,500mの深海で目撃あるいは採集されている (Lindsay and Miyake, 2009; Siebert et al., 2013)。今回のCTDデータの異常値は上昇時の深度900m付近から発生しており (Fig. 1)、ケムシクラゲ類の分布深度帯と符合する。付着していた断片から今回の動物の全体像は類推できないが、ケムシクラゲ類は特異的に細長い形態をしており (Siebert et al., 2013) (<http://www.nature.com/scitable/blog/creature-cast/apolemia>)、CTDのような物体に引っかかりやすいものと考えられる。通常、今回のようなCTDの異常値が観察された場合にはセンサーの不具合と判断され、機器の点検、オーバーホールやメンテナンスに費用がかかることが多い。センサー部に付着した物体が小さく肉眼で確認できない場合には、そのまま継続して使用されることになり異常値が続いて発生することになる。今後、CTDの異常値が観察された際にはセンサー部をよく観察し付着している物体が確認できなくても洗浄を入念に行えば問題を解消できる可能性がある。また、何らかの付着物があれば採取してDNA分析をすることによって観察例を蓄積してゆくことも重要であろう。

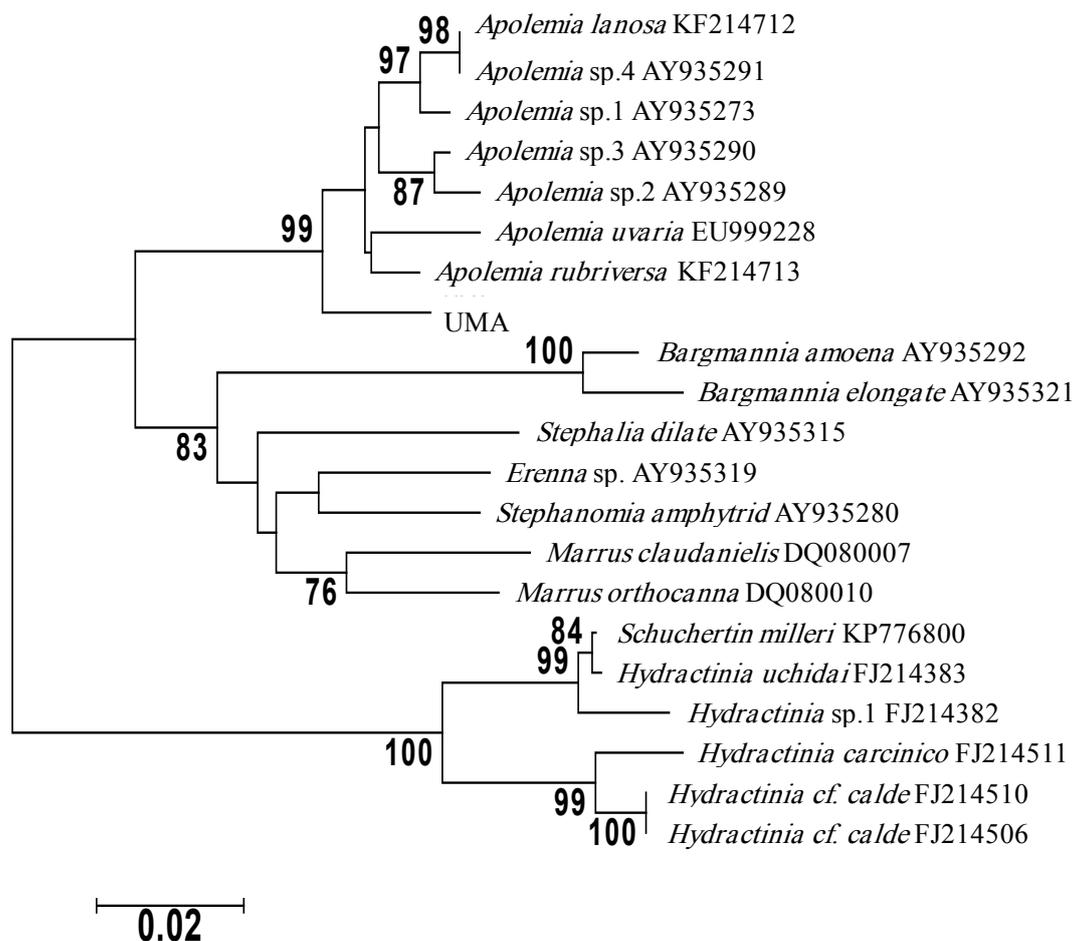


Fig. 3. Neighbour-joining tree based on Kimura-2-parameter distances between mitochondrial 16S rDNA sequences of animal fragments (UMA) and twenty species derived from database. Bootstrap values of >50% (out of 1,000 replicates) are shown at the nodes.

謝辞

本報告で用いた海洋生物の断片は、水産庁漁業調査船開洋丸の乗組員によって

採集することができた。この場を借りて、船長並び乗組員各位に、厚くお礼申し上げる。

文献

- Chow S, Suzuki S, Matsunaga T, Lavery S, Jeffs A, Takeyama H (2011) Investigation on natural diets of larval marine animals using peptide nucleic acid (PNA) -directed PCR clamping. *Mar Biotech* 13 : 305-313.
- Cunningham CW, Buss LW (1993) Molecular evidence for multiple episodes of Paedomorphosis in the family hydractiniidae. *Bio Sys Ecol* 21 : 57-69.
- Felsenstein J (2011) Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evol* 39 : 783-791.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16 : 111-120.

- Lindsay DJ, Miyake H. (2009) A checklist of midwater cnidarians and ctenophores from Japanese waters : species sampled during submersible surveys from 1993-2008 with notes on their taxonomy. Kaiyo monthly, 41 (8) , 417-438 (in Japanese with English abstract).
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor - joining method : A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4 : 406-425.
- Sajdax SL, Phillips RB. (1997) Phylogenetic relationships among Coregonus species inferred from the DNA sequences of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA. Can J Fish Aquat Sci 54 : 1494-1503.
- Salim M, Maden BE. (1981) Nucleotide sequence of *Xenopus laevis* 18S ribosomal RNA inferred from gene sequence. Nature 291 : 205-208.
- Siebert S, Pugh PR, Haddock SH, Dunn CW. (2013) Re-evaluation of characters in Apolemiidae (Siphonophora), with description of two new species from Monterey Bay, California. Zootaxa, 3702 (3), 201-232.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. (2011) MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28 : 2731-2739.
- Terahara T, Chow S, Kurogi H, Lee S-H, Tsukamoto K, Mochioka N, Tanaka H, Takeyama H (2011) Efficiency of peptide nucleic acid-directed PCR clamping and its application in the investigation of natural diets of the Japanese eel leptocephali. PLOS ONE 6 : e25715.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nuc Acids Res 22 : 4673-4680.

【連絡著者】

柳本 卓
〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-4
電話/FAX : 045-788-7620
E-Mailアドレス : yanagimo@affrc.go.jp

【ランニングタイトル】

CTDに付着した生物断片の種判別

【Running title:]

Molecular species identification of animal fragment attached on CTD profiler