

学際連携研究報告書

平成28年度

東京大学 大気海洋研究所

はじめに

学際連携研究は、平成23年度より開始した公募型の共同研究事業である。本共同研究では、全国の個人またはグループの研究者と本研究所の教員が協力して、海洋や大気に関わる基礎的研究および地球表層圏の統合的理解の深化につながる研究を実施する。特に、複数の学問分野の連携による学際的な共同研究の推進を目指すことから、「学際連携研究」と名付けられた。本共同研究には以下の二つの形態がある。

(1) 特定共同研究

本研究所が提案し、地球表層圏変動研究センターが中心となって計画的に推進する特定共同研究課題について、所内の研究グループと所外の研究者が協力して進める共同研究。

(2) 一般共同研究

全国の個人またはグループが提案する研究テーマについて、所外と所内の研究者が協力して進める共同研究で、本所の研究目的に貢献が期待できるもの。新しい研究の展開のきっかけとなるポテンシャルを秘めた萌芽的あるいは試行的研究を歓迎する。また、新規プロジェクトの立案にむけてのフィージビリティ研究（打ち合わせ会議や予備調査の実施などを含む）も審査の対象とする。

平成28年度の実績は、特定共同研究の応募数が3件（同採択数2件）、一般共同研究の応募数が11件（同採択数8件）であった。

本冊子は、平成28年度採択課題の成果報告をまとめたものである。関連分野の研究者の皆様に有効にご活用いただけると幸いである。

東京大学大気海洋研究所
共同利用運営委員会
学際連携研究部会

平成28年度学際連携研究 一覧

【特定共同研究】

番号	申込者氏名	所属機関	役職	研究課題	大気海洋研究所 共同研究教員
1	須藤 雄気	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(薬学系)	教授	海洋微生物ロドプシンの多様な光エネルギー利用機構の解明	木暮 一啓 吉澤 晋
2	平瀬 祥太郎	東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所	助教	更新世日本海隔離によって生じたアゴハゼ2グループの交雑集団のゲノミクス	木暮 一啓 岩崎 渉

【一般共同研究】

番号	申込者氏名	所属機関	役職	研究課題	大気海洋研究所 共同研究教員
1	田副 博文	弘前大学被ばく医療総合研究所	助教	海洋魚類の脊椎骨のネオジム同位体比分析による回遊経路推定手法の確立	白井 厚太郎 北川 貴士
2	松石 隆	北海道大学大学院水産科学研究院	准教授	放射性炭素同位体比・安定同位体比測定を組み合わせた鯨類の生態学研究	横山 祐典 永田 俊 宮島 利宏
3	橋岡 豪人	国立研究開発法人海洋研究開発機構	研究員	太平洋の広域観測データに基づく新たな窒素固定モデルの開発	伊藤 進一 伊藤 幸彦
4	高見 英人	国立研究開発法人海洋研究開発機構	上席研究員	次世代型メタゲノム解析手法MAPLEを用いた北太平洋表層アーキア群集の代謝ポテンシャル解析	濱崎 恒二
5	則末 和宏	新潟大学理学部	准教授	海洋中の懸濁粒子態微量元素の研究を推進するためのクリーン分析システムの開発	蒲生 俊敬 小畑 元
6	神田 真司	東京大学大学院理学系研究科生物学専攻	助教	遺伝学的・生理学的アプローチによる環境適応研究の推進	兵藤 晋
7	山口 幸	神奈川大学工学部情報システム創成学科	特別助手	宿主上での移動性を持った寄生性生物の性転換の実証と理論研究:小型腹足類キクスズメを例に	入江 貴博
8	遠藤 広光	高知大学理学部	教授	有用小型深海性底魚類の分類学的再検討	猿渡 敏郎

目次

学際連携研究報告書

【特定共同研究】

1. 海洋微生物ロドプシンの多様な光エネルギー利用機構の解明
2. 更新世日本海隔離によって生じたアゴハゼ2グループの交雑集団のゲノミクス

【一般共同研究】

1. 海洋魚類の脊椎骨のネオジウム同位体比分析による回遊経路推定手法の確立
2. 放射性炭素同位体比・安定同位体比測定を組み合わせた鯨類の生態学研究
3. 太平洋の広域観測データに基づく新たな窒素固定モデルの開発
4. 次世代型メタゲノム解析手法 MAPLE を用いた北太平洋表層アーキア群集の代謝ポテンシャル解析
5. 海洋中の懸濁粒子態微量元素の研究を推進するためのクリーン分析システムの開発
6. 遺伝学的・生理学的アプローチによる環境適応研究の推進
7. 宿主上での移動性を持った寄生性生物の性転換の実証と理論研究：小型腹足類キクスズメを例に
8. 有用小型深海性底魚類の分類学的再検討

海洋微生物ロドプシンの多様な光エネルギー利用機構の解明

Elucidation of light energy conversion mechanisms in the ocean by microbial rhodopsins

須藤 雄気, 岡山大・院医歯薬(薬), E-mail: sudo(at)okayama-u.ac.jp

木暮 一啓, 東大・大気海洋研, E-mail: kogure(at)aori.u-tokyo.ac.jp

吉澤 晋, 東大・大気海洋研, E-mail: yoshizawa(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Yuki Sudo, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Kazuhiro Kogure, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Susumu Yoshizawa, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

In organisms, including human beings and microorganisms in ocean, biological protein molecules are responsible for the light reception. However, in general, proteins are transparent and are thus not responsive in the visible light region. Therefore, photoreceptive proteins have evolved that can bind a chromophore molecule, which can absorb visible wavelengths of light. One of the largest groups of photoreceptive proteins is the rhodopsin protein family (also called retinal protein), where vitamin-A aldehyde retinal is employed as a chromophore. On the basis of the background, rhodopsins serve as models for membrane-embedded proteins, for photoactive proteins and as a fundamental tool for optogenetics, a new technology to control biological activity with light. In this study, we found and analyzed several new rhodopsin molecules from the microorganisms living in ocean surface for understanding the use of light energy on the earth.

1. はじめに

「どんな海洋生物が太陽の光エネルギーを利用しているのか？」と問われると「藻類などのクロロフィルを持つ光合成生物」、と答えるのがこれまでの常識であった。しかし、10年ほど前に海洋細菌がプロテオロドプシンという新しいタイプの光受容タンパク質を持つことがわかり、この常識はくずれつつある。プロテオロドプシンはレチナールを発色団として持つ光受容タンパク質・ロドプシンの仲間で、光が当たると細胞内からプロトン (H^+) を排出するポンプとして働き、これを ATP 合成に結びつけることによって光エネルギーを利用することができる。海洋表層では実に13—80%もの原核生物がプロテオロドプシンを持つと見積もられており、ロドプシンが受け取る太陽光エネルギー量の推定は海洋生態系の理解に必要不可欠であると考えられている。

また近年の遺伝子解析技術の発展に伴い、未知ロドプシンが海洋細菌を中心に続々と見つかり、機能理解のみならず、光操作ツールへの応用までを含む基礎・応用の両面で注目されている。東京大学大気海洋研究所の木暮・吉澤らのグループは、海洋性微生物のロドプシンタンパク質の単離・同定の世界的トップランナーとして、2013年に光が当たるとナトリウムイオン (Na^+) を細胞内から細胞外に輸送するロドプシン (NaR)、2014年に塩化物イオン (Cl^-) を細胞外から細胞内に輸送するロドプシン (ClR) などの新規ロドプシンを海洋細菌から相次いで発見している。これにより、ロドプシンを介した光エネルギー利用がこれまで考えられていた以上に多様であることが示されてきた。一方、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(薬学系)の須藤グループでは、様々なロドプシンの分光学的解析を通じて、機能発現メカニズムの詳細を続々と明らかにしており、ロドプシン解析の世界的トップランナーとして認められている。このような背景のもと、本プロジェクトでは、これら2つのグループの相互の利点を生かした新規ロドプシンの探索と機能発現メカニズムの解明に焦点をあて、共同研究の推進を計画した。

2. 問題設定・方法

本研究は、海洋を中心とした環境中から新しいロドプシン

を探索し、発現・精製および機能解析を行うことで、太陽光エネルギーと海洋生態系を繋ぐ、“微生物型ロドプシンによる新しい光合成機能”の多様性を解明することを目的とした。木暮・吉澤グループでは、これまでの研究で蓄積してきた「海洋メタゲノムデータおよび海洋細菌ゲノムデータ」から未知ロドプシンをバイオインフォマティクスを駆使することで見つけ出し(選定は共同で行った)、同グループが保有する「ロドプシン機能解析システム」で未知ロドプシンの機能の初期的な解析を行った。須藤グループでは、見出された未知ロドプシンを細胞中に発現させ、発現タンパク質を精製後、「分光学的解析システム」を用いて、タンパク質のフェムト秒〜ミリ秒スケールでの変化を測定することで、ロドプシン機能の詳細を明らかにした。

本共同研究は 1. メタゲノム・微生物ゲノム解析によるビッグデータから目的遺伝子を探索する技術、2. 全遺伝子合成 DNA を用いた異種発現技術、3. 開発したロドプシン機能解析システムを用いた未知機能解析技術、4. フェムト〜ミリ秒スケールでの分光解析技術を統合的に駆使することで可能となったものであり、世界的に見ても極めて独創的な研究テーマである。

3. 結果と考察

本共同研究期間内に論文発表(もしくは掲載決定)した成果について、以下に時系列的な箇条書きでその結果と考察を述べる。

- ① 真正細菌 γ -プロテオバクテリアの *Pantoea vagans* より、光駆動外向き H^+ ポンプタンパク質を発見し、PvR と命名した。PvR の分光学的解析から、PvR は緑色光を吸収し ATP を合成していることが明らかとなった。一般に光合成生物はクロロフィルを利用し、青・赤色光で ATP を合成することが知られており、両者が異なる色の光を利用し、環境中で共存していることが明らかとなった [1]。
- ② 真核生物藻類の *Guillardia theta* よりアニオンチャネル型タンパク質を見出し、保存性アミノ酸である Arg84 がイオン透過活性に対して阻害的な役割を担うことを明らかにした [2]。

- ③ 好熱性真正細菌の*Rubrobacter xylophilus* DSM9941^T株より、光駆動外向きH⁺ポンプタンパク質を発見し、RxRと命名した [3]。これまでのロドプシンの中で最も熱に対して安定なロドプシンであることが明らかとなり、RxRを基礎としたイオン透過メカニズム原理の解明や、光材料ならびに光操作研究などの生命工学的研究への展開が期待される。
- ④ 海洋性真正細菌の*Nonlabens marinus*より、2013年に見出された光駆動内向きCl⁻ポンプタンパク質の分光学的精密解析を行い、基質存在下・非存在下での比較実験から、そのイオン輸送機構モデルを提案した [4]。
- ⑤ 真正細菌の*Synechocystis* sp. PCC 7509より、光駆動内向きSO₄²⁻ポンプタンパク質を見出し、SyHRと命名した。二価イオンを運ぶ初めてのロドプシンの発見となり、基礎的観点のみならず応用的観点からも注目されている [5]。

とに成功しており、その分光学的解析を鋭意進めている。このように、今後も、更なる成果が得られることが強く期待される。

ロドプシンを介した太陽光エネルギー利用の理解は、微生物生態系の理解には必要不可欠であり、本研究による成果は「海洋生態系における新しい光エネルギーフローモデル」を創出するという大きなインパクトがある。また地球表層域でのエネルギーフローの概念を変えるだけでなく、進化上の起源、異なる微生物系統群の間での遺伝子の分布と伝播パターン、他のロドプシンファミリーの中での進化的および機能的な位置づけ、などに関する多様な研究領域へのインパクトも期待される。加えて、ロドプシンを動物細胞に発現させ光で生命現象を操る手法（光遺伝学：オプトジェネティクスと呼ばれる）への応用も現在試みており、幾つかのロドプシンについては、既に成功している。このように、未知ロドプシンの機能解明は神経科学や環境科学を中心とした他分野の発展にも大きく貢献することが期待される。

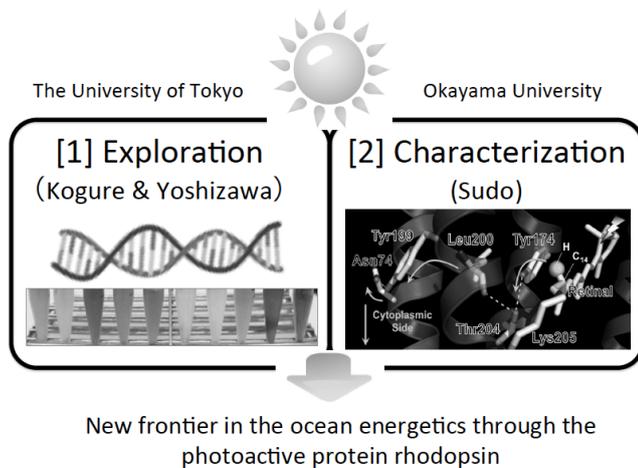


Fig. 1 Schematic collaboration diagram.

4. まとめと今後の展望

参考文献に記したように、本共同研究を推進した1年弱の間に、5報の原著論文を発表（もしくは掲載決定）していることが示す通り、極めて順調に研究が進んでいる。また、これら以外にも、論文未発表の様々なロドプシンを続々と見出すこ

参考文献

- (1) *Sudo Y, & *Yoshizawa S, 2016: "Functional and photochemical characterization of a light-driven proton pump from the gammaproteobacterium *Pantoea vagans*", *Photochem. Photobiol.*, 92, 420-427.
- (2) Doi S, Tsukamoto T, Yoshizawa S, *Sudo Y, 2017: "An inhibitory role of Arg-84 in anion channelrhodopsin-2 expressed in *Escherichia coli*" *Sci. Rep.*, 7, 41879.
- (3) Kanehara K, Yoshizawa S, Tsukamoto T, *Sudo Y, 2017: "A phylogenetically distinctive and extremely heat stable light-driven proton pump from the eubacterium *Rubrobacter xylophilus* DSM 9941^T", *Sci. Rep.*, in press
- (4) *Tsukamoto T, Yoshizawa S, Kikukawa T, Demura M, & *Sudo Y, 2017: "Implications for the light-driven chloride ion transport mechanism of *Nonlabens marinus* rhodopsin 3 by its photochemical characteristics", *J. Phys. Chem. B*, in press
- (5) Niho A, Yoshizawa S, Tsukamoto T, Kurihara M, Tahara S, Nakajima Y, Mizuno M, Kuramochi H, Tahara T, Mizutani Y, & *Sudo Y, 2017: "Demonstration of a light-driven SO₄²⁻ transporter and its spectroscopic characteristics", *J. Am. Chem. Soc.*, in press

更新世の日本海隔離によって生じたアゴハゼ 2 グループの交雑集団のゲノミクス

Genomic consequence of hybridization between the two groups of *Chaenogobius annularis* caused by isolation events of the Sea of Japan

平瀬祥太朗, 東大・水実, E-mail: ashirase@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
細谷 将, 東大・水実, E-mail: ahosoya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
菊池 潔, 東大・水実, E-mail: akikuchi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
吉澤 晋, 東大・大気海洋研, E-mail: yoshizawa@aori.u-tokyo.ac.jp
木暮一啓, 東大・大気海洋研, E-mail: kogure@aori.u-tokyo.ac.jp
岩崎 渉, 東大・理学, E-mail: iwasaki@bs.s.u-tokyo.ac.jp

Shotaro Hirase, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
Sho Hosoya, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
Kiyoshi Kikuchi, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
Susumu Yoshizawa, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Kazuhiro Kogure, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Wataru Iwasaki, Department of Biological Sciences, The University of Tokyo

Abstract

Hybridization between divergent groups is recognized as a powerful mechanism of speciation and driving force in generating the biodiversity. *Chaenogobius annularis* is an intertidal goby distributed around Japanese archipelago with two geographical groups: the Sea of Japan and Pacific Ocean groups. Our previous studies revealed that these two groups exhibit substantial genetic divergences and are forming a hybrid population that consists of mainly post-F₂ hybrids at the Taro coast of Iwate prefecture. Here, we performed restriction site-associated DNA sequencing (RAD-seq) and whole genome sequencing (WGS) of *Chaenogobius annularis* to investigate the genomic status of the hybrid population. RAD-seq data demonstrated that the hybridization between the two divergent groups has generated a stable hybrid population with novel genomic composition. In addition, WGS made us develop single nucleotide polymorphism markers located in genes which enable to trace their introgression in the hybrid population and identify genomic incompatibility and/or adaptive introgression.

1. はじめに

異所的に進化した集団間の交雑は、遺伝的変異の新たな組み合わせを生み出す重要な進化プロセスである (Seehausen, 2004)。ハゼ科魚類のアゴハゼには、更新世の日本海の隔離によって分岐した 2 つのグループが存在し、それらの交雑集団が分布境界にあたる岩手県田老に存在している (Hirase & Ikeda, 2015)。一般的には、交雑集団を介してグループ間のゲノム浸透が進行することが予測されるが、田老の交雑集団は数万年前に生じ、独自のゲノム組成を保持してきたことが示された (Hirase & Ikeda, 2015)。田老の海水温が他の沿岸域より低く、温帯生物にとって劣悪な環境であることを考え合わせると、この交雑集団は当該環境に適応した新規なグループである可能性がある。

2. 問題設定・方法

遺伝的に異質な集団間の交雑で生じた個体はゲノム不和合を回避する必要があるが、さらに両親集団との戻し交配も可能であることを考えると、一般には交雑集団が独立した第 3 のグループへ進化するのは困難である (Mallet, 2007)。しかし、ゲノム不和合を回避でき、両親集団からもたらされた多様なゲノム構成に起因する適応進化によって新規ニッチを獲得した場合には、第 3 のグループへの進化へと発展し得る (Mallet, 2007)。もし、このようなユニークな進化現象が生じていた場合、それらに関与する特定の遺伝子型を、交雑集団における偏ったゲノム浸透として検出できる可能性がある (Gompert & Buerkle, 2011)。本研究は、2 グループの交雑集団のゲノム組成を一塩基多型 (SNP) マーカーを用いて調査し、交雑集団に偏って浸透しているゲノム領域を探索することで、上記の進化現象が実際に生じているかどうかを検証す

ることを目的としている。平成 28 年度の本学際連携研究では、貴所地球表層圏変動研究センター生物遺伝子変動分野との連携により、①ゲノムワイド SNP マーカーを用いたゲノム解析と②遺伝子内 SNP マーカーによる解析を行うための予備的解析に取り組んだ。

3. 結果と考察

(1) ゲノムワイド SNP マーカーを用いた解析

太平洋グループと日本海グループ、田老周辺の集団の RAD-seq 解析を行い、分布境界域の集団構造ならびに田老の交雑集団のゲノム構成を調査した。RAD-seq で得られた 1163 SNP マーカーを用いてクラスタリング解析を行った結果、田老の交雑個体は約 50%の混合比で各グループ由来のゲノムを有していることが示唆され、クラスター数を 3 と仮定した場合、田老の交雑集団は第 3 の独立したクラスターに帰属された (Fig. 1)。また、田老の交雑集団に 2 グループのゲノムがランダムに浸透しているかどうかを調べたところ、60%の座で一方のグループに偏ったゲノムの浸透が生じており、2 グループの交雑によって新たなゲノム構成を有するグループが生まれたことが示唆された。

(2) 遺伝子内 SNP マーカーによる解析を行うため予備解析

遺伝子内の変異はゲノム不和合や適応進化に直接関係する可能性が高いため (Trier *et al.*, 2014)、遺伝子領域内の SNP マーカーは本研究における必須の解析対象である。当初の計画ではこれらの SNP マーカーを、太平洋グループと日本海グループの RNA シーケンス解析によって取得する予定であったが、RNA シーケンスでは発現量が多い遺伝子の配列しか取得できないという問題点があった。そこで、既に別プロジ

エクトで得られているアゴハゼの全ゲノムシーケンスデータを用いて *De novo* ゲノムアッセンブル・遺伝子予測を行った上で、アゴハゼ 2 グループの全ゲノムシーケンスを行い、遺伝子領域内の SNP マーカーを探索することとした。

まず、PacBio RS II と HiSeq のシーケンスデータを用いて、Platanus (Kajitani *et al.*, 2014) と DBG20LC (Ye *et al.*, 2016) によるハイブリッドアッセンブルを行った結果、高精度のリファレンスゲノムを構築することができた (ゲノムサイズ: 0.7Gb ; N50:0.9Mb)。また、遺伝子予測によっておおよそ 7 万個の遺伝子が推定された。既にリファレンスゲノムが構築されている 4 種 (イトヨ、メダカ、タラ、トラフグ) のタンパク質配列に対して BLASTP 解析を行い、3 万個に遺伝子名が付加された。

次に、アゴハゼの太平洋グループと日本海グループのそれぞれ 6 個体分の全ゲノムシーケンスデータをリファレンスゲノムにマッピングし、SNP マーカーを探索した結果、2 グループ間でアレルの共有のない ($F_{ST} = 1$) SNP マーカーが 57 万個見つかった。また、その内の 2 万個の SNP マーカーは遺伝子領域内に存在していることが明らかになった。これらの SNP マーカーは、交雑集団において偏って浸透している遺伝子を探索するための有効なマーカーになり得ると考えられた。

4. まとめと今後の展望

ゲノムワイド SNP マーカーを用いた研究によって、田老の交雑集団の多くのゲノム領域で片方のグループに偏ったゲノムの浸透が生じており、交雑集団が新規のゲノム構成を有していることが示唆された。このような偏ったゲノム浸透は、遺伝的浮動のような偶発的なイベントに起こる可能性もあるが、ゲノム不和合や適応進化が関与している可能性もある。

今後は、遺伝子内の SNP マーカーを対象としたアンプリコンシーケンスも行い、交雑集団の遺伝子領域に着目してゲノム構成を調査する。仮に、2 グループ間で分化の程度が大きく、交雑集団において偏った遺伝子浸透を示す遺伝子があった場合、その遺伝子はゲノム不和合や適応進化に関連しており、新たなグループの成立に導いた遺伝基盤を発見できる可能性がある。

参考文献

- (1) Seehausen, O., 2004: "Hybridization and adaptive radiation", *Trends Ecol. Evol.*, 19, 198-207.
- (2) Hirase, S., Ikeda, M., 2015: "Hybrid population of highly divergent groups of the intertidal goby *Chaenogobius annularis*", *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 473, 121-128.
- (3) Mallet, J., 2007: "Hybrid speciation", *Nature*, 446, 279.
- (4) Gompert, Z., Buerkle, C., 2011: "Bayesian estimation of genomic clines", *Mol. Ecol.*, 20, 2111-2127.
- (5) Trier, C. N., Hermansen, J. S., Sætre, G. P., Bailey, R. I., 2014: "Evidence for mito-nuclear and sex-linked reproductive barriers between the hybrid Italian sparrow and its parent species", *PLoS Genet.*, 10, e1004075.
- (6) Kajitani, R., Toshimoto, K., Noguchi, H., Toyoda, A., Ogura, Y., Okuno, M., Yabana, M., Harada, M., Nagayasu, E., Maruyama, H., Kohara, Y., 2014: "Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads", *Genome Res.*, 24, 1384-1395.
- (7) Ye, C., Hill, C. M., Wu, S., Ruan, J., Ma, Z. S., 2016: "DBG20LC: efficient assembly of large genomes using

long erroneous reads of the third generation sequencing technologies", *Sci. Rep.*, 6, 31900.

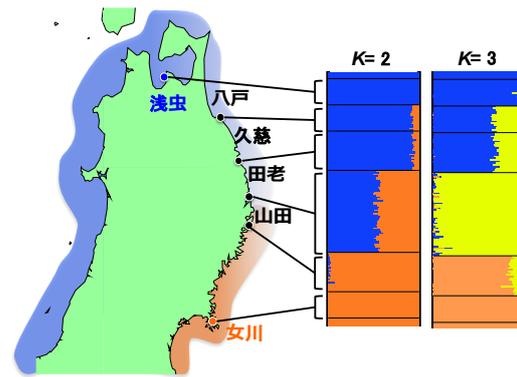


Fig. 1 Assignment plots of the Taro hybrid population and surrounding populations generated using ADMIXTURE software.

海洋魚類の脊椎骨のネオジウム同位体比分析による回遊経路推定手法の確立

Estimation of migration route of fully marine fish based on Neodymium isotopic ratio of vertebra

田副 博文, 弘前大・被ばく医療研, E-mail: tazoe(at)hirosaki-u.ac.jp
白井 厚太郎, 東大・大気海洋研, E-mail: kshirai(at)aori.u-tokyo.ac.jp
北川 貴士, 東大・大気海洋研, E-mail: takashik(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Hirofumi Tazoe, Institute of Radiation Emergency Medicine, Hirosaki University
Kotaro Shirai, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Takashi Kitagawa, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Neodymium isotopic composition applied to vertebra of marine fish in order to establish new tool for estimation of migration route. Trace metal concentrations (Mn, Cu, Ba, and Nd) were also determined. For preliminary experiment, Japanese horse mackerel (*Trachurus japonicas*) samples obtained from Miyako, Sado Island, and Kochi were performed. Nd in vertebra were separated using solid phase extraction method, and then measured isotopic composition by multicollector ICP-mass spectrometer. Both Nd isotopic composition and trace elements concentrations were characteristic each sampling site, which indicated that the marine fish vertebra preserved the information of their habitat. Proposed method will be applied to the vertebra samples of young Pacific Bluefin Tuna from Kyoto and Kochi and validate as a chemical tracer to estimate of migration route. Automated solid phase extraction system was developed to simplify chemical separation procedure. This system is made from robust to highly concentrated acids and corrosive hydrofluoric acid and can be operated without expertise for chemistry.

1. はじめに

クロマグロ資源は減少が著しく、2014年にはレッドリストに指定された。クロマグロには、日本海と東シナ海の大きく二つの産卵群が存在する。その後、西太平洋や東太平洋を生育場とするが、東西太平洋間を大規模に回遊する個体も存在する。しかし、日本海と東シナ海の産卵群がそれぞれ生まれた海域に回帰するのか、再生産への寄与が大きい個体群は、どちらの産卵場の個体群で、どのような回遊経路を経験してきたかという知見はほとんどない。適切な資源管理のためには、正確な回遊生態の理解が必要不可欠である。

本研究ではクロマグロの脊椎骨に含まれるネオジウム (Nd) に着目し、回遊経路推定の指標としての有用性を検証する。従来、魚類耳石の化学・同位体組成は形成時の環境を反映しているため、回遊履歴や個体群構造などの情報を明らかにするために用いられてきた。河川生活を経験する淡水魚や両側回遊魚ではストロンチウム同位体比 ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) が非常に有用な回遊生態の指標として利用されている。その理由として、指標となる放射壊変起源の ^{87}Sr の影響のみを抽出でき、河川や地域ごとに大きく異なる固有の組成を示すからである。海洋の場合、このような特徴 (海域ごとに固有の同位体組成を示す) を持つ元素としては、Nd が挙げられる。Nd の濃度および同位体比 ($^{143}\text{Nd}/^{144}\text{Nd}$) は海域、水深、水塊によって特徴的な組成を示す (Amakawa et al. 2013; Lacan et al. 2012)。例えば日本海では $\epsilon_{\text{Nd}} = -8.9 \sim -7.2$ 、太平洋の大部分は $\epsilon_{\text{Nd}} = -7 \sim -2$ を示す。本研究では、日本海および東シナ海のクロマグロ当歳魚の脊椎骨の Nd 同位体比を分析し、海水の Nd 同位体比の報告値と比較する事で、指標としての有用性を検証する事を最終的な目的とし、そのための基盤的な知見の収集と分析技術の確立を行う。

2. 問題設定・方法

耳石の Nd 同位体比が分析できれば海洋における理想的な回遊指標となり得るが、耳石が小さいうえ、Nd 濃度が極めて低い (約 1 ng/g) ため、現在の技術では高精度で分析する事は

難しい。そこで本研究では、耳石よりも多くの分量の採取が可能であり、耳石のように代謝が低く年輪が観察可能な脊椎骨に着目し、その Nd 同位体比を分析する事でクロマグロの回遊経路を推定するための新たな手法を確立する事を目的とする。以前は、脊椎骨は代謝されるため時系列で履歴を記録していないと考えられてきたが、最近では代謝される量がそれほど多くなく、耳石のように利用できる事が受け入れられるようになってきた (例えば Kerr and Campana 2014)。脊椎骨にも成長輪が見られる事が多く、耳石のように回遊履歴を時系列で復元できるだけでなく、個体あたりの体積が大きいため濃度の低い元素を分析できるという利点がある。

クロマグロが回遊し得る日本海・東シナ海・西太平洋・東太平洋で海水の Nd 同位体比は大きく異なるため、脊椎骨の Nd 同位体比はそれぞれの海域の滞在時間を反映すると予想される。つまり脊椎骨の Nd 同位体比を分析する事が回遊経路の特定につながる。しかし、Nd 同位体比の分析には試料処理に時間がかかるため、魚類の回遊生態を十分に理解するために必要な個体数の解析には多大な労力が必要となるという問題があった。幸いな事に、平成 27 年度の学際連携研究の予備的な成果を基に、科学研究費基盤研究 B「高度な地球化学分析手法を用いた回遊魚類の生息域履歴推定法の確立」(分野名: 食料循環研究, 代表者: 白井厚太郎, 分担者: 田副博文, 北川貴士, 横内一樹, 水川薫子, 連携研究者: 飯塚毅, 平成 28 年度から 30 年度) が採択され、より長期的に研究に取り組むことが可能な体制が整った。そこで平成 28 年度は、長期的なサンプルスループットの効率化を目指し、Nd 同位体比分析の前処理の効率化に取り組んだ。平成 28 年度学際連携研究の成果としてキレート樹脂固相抽出法による Nd の迅速分離法を開発したが、高濃度の強酸の使用や多検体を同時に注視する精密な作業は将来的な水産研究への普及を考えた場合、技術的な障壁となる。そこで、分析法の高度化として高耐蝕性自動切替バルブ・チューブポンプのシーケンサー制御による自動分離システムの構築を試みた。この分析システムの導入により専門的な化学的ハンドリングに精通した技術者以外への

普及を図り、応用研究分野の拡大が期待される。

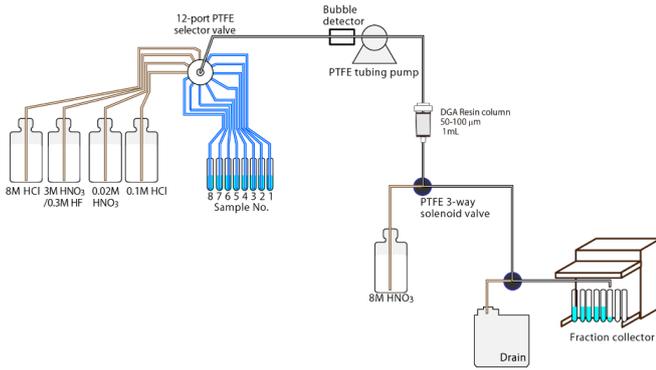


図 1 シーケンサー制御による自動固相抽出システムの模式図

3. 結果と考察

Ndの分離操作に用いるキレート樹脂 DGA Resin (米国アイクром社)はNdに対して極めて高い選択的吸着性を示す特徴がある。そのため、Caなど骨試料の主成分に妨害されることなく、定量的に回収し、さらに展開溶媒となる酸の種類・濃度を変えることで共存イオンを除去することが可能である。これらの吸着・溶離条件による固相-液相間の分配係数の装置が明瞭であるため、精密なクロマトグラフィーの制御は不要で、単純な定速送液とタイマー制御による流路切替バルブの操作のみで、マニュアル操作によるクロマトグラムを再現することができる。

自動固相抽出システム(図1)の構築にあたって、それぞれの部材の選定を行った。高濃度の強酸を送液するため、接液部には耐薬性の高い素材を用いる必要がある。また、必要に応じて交換が容易であることも考慮した。送液はパイトン製もしくはPTFE製のチューブを使用可能なペリスタルティックポンプ(MP4000, Eyela)を用いた。分析試料および試薬は、テフロン製12方切り替えバルブ(RV-SN2-SCB-PT, Bio-Chem Fluidics)に接続し、カラムへの導入液を選択する。試料の導入効率を上げるため、送液ポンプの直前に気泡センサー(BE-A201, Panasonic)を設置し、液枯れを検知するまで送液をしたのち、8M硝酸溶液を逆方向へ流して再度カラムへ

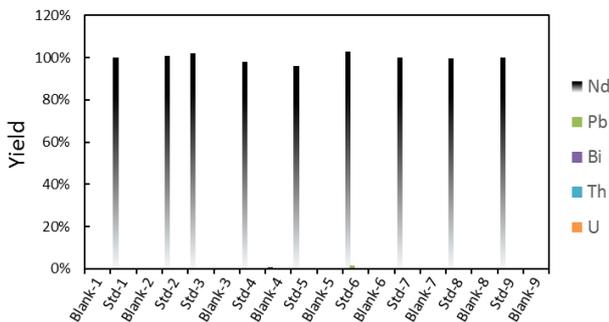


図 2 自動固相抽出システムによる模擬試料+ブランク試料の性能試験

導入する。これによりカラムへの空気の混入を避けつつ導入効率を増加し、さらに送液ライン内のリンスを行うことができるようになった。各部の制御はI/O制御型リモートタイマーRT231(GL Science)で行った。本システムでは8試料の連続分離操作が可能であり、1日2回の運用を行うことで16試料の分離が可能である。

本開発システムを用いて繰り返し試験を行った。Ndおよび希土類元素を含む混合標準溶液(XSTC-1)と海水主要成分を含む混合標準溶液(XSTC-12)から模擬試料を調整した。ブランク試料として8M HNO₃を用いて、これらを交互に分離し、回収液中のNd回収率および共存イオン濃度を調べた。この結果、合計24回の繰り返し操作を行ってもNdの回収率の低下は見られず、他の元素(Th, U, Pbなど)の除去効率は10⁵以上(ICP-MSの定量下限に依存)であった。このことから自動固相抽出装置が実用に耐える性能を持つことが実証された。今後、長期的な運用によるバルブ等の耐久性についても試験を継続しつつ、実試料の分析を行う予定である。

4. まとめと今後の展望

魚類の脊椎骨を用いたNd同位体比による回遊経路推定手法の確立のため、Nd同位体分析の前処理の自動化に取り組んだ。クロマグロの産卵親魚の脊椎骨の入手を本研究と並行して進めている。産卵親魚の脊椎骨が入手できた際には、当歳魚に相当する部位を、サイズ・形状を揃えて脊椎骨から削り出しNd同位体比を分析し、本研究で得られる基礎データと比較する事で、その産卵親魚が日本海・太平洋のどちらで生まれた個体なのかを判別する事が可能となると期待できる。また、東太平洋と西太平洋は海水のNd同位体比が大きく異なるため、東太平洋での滞在時間の情報を引き出す事も可能になると期待される。十分な試料数の解析が本年度の成果で現実的になったため、基礎研究Bの枠組みのもと今後2年間の研究により、再生産への寄与を回遊経路や産卵場ごとに明らかにできるようになると期待される。

参考文献

- (1) Amakawa, H., Tazoe, H., Obata, H., Gamo, T., Sano, Y., and Shen, C.-C., 2013: "Neodymium isotopic composition and concentration in the Southwest Pacific Ocean", *Geochem. J.*, 47 (2013) 409-422.
- (2) Lacan, F., Tachikawa, K. and Jeandel, C., 2012: "Neodymium isotopic composition of the oceans: A compilation of seawater data", *Chem. Geol.*, 300, 177-184.
- (3) KERR, L. A., and CAMPANA, S. E., 2014: "Chemical composition of fish hard parts as a natural marker of fish stocks.", In: Cadrin, S. X., Kerr, L. A., and Mariani, S. (ed). *Stock Identification Methods*. 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA. P. 205-234.
- (4) Tazoe, H., Obata, H., Yamagata, T., Karube, Z., Nagai, H., and Yamada, M., 2016: "Determination of strontium-90 from direct separation of yttrium-90 by solid phase extraction using DGA Resin for seawater monitoring", *Talanta*, 152, 219-227.

放射性炭素同位体比・安定同位体比測定を組み合わせた鯨類の生態研究

Study on cetacean ecology by using the combined analysis of radio carbon and stable isotope

松石 隆, 北大・水産, E-mail: catm(at)fish.hokudai.ac.jp

松田 純佳, 北大・水産, E-mail: matsuda(at)fish.hokudai.ac.jp

宮島 利宏, 東大・大気海洋研, E-mail: miyajima(at)aori.u-tokyo.ac.jp

永田 俊, 東大・大気海洋研, E-mail: nagata(at)aori.u-tokyo.ac.jp

宮入 陽介, 東大・大気海洋研, E-mail: miyairi(at)aori.u-tokyo.ac.jp

横山 祐典, 東大・大気海洋研, E-mail: yokoyama(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Takashi Matsuishi, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University

Ayaka Matsuda, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University

Toshihiro Miyajima, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Toshi Nagata, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Yosuke Miyairi, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Yusuke Yokoyama, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract (Times New Roman 10pt)

Radio carbon isotope could be useful tool for investigating migration patterns by using the difference of concentration value of carbon 14 on each sea area such as the Oyashio current and Kuroshio current. In this study, migration pattern of humpback whale *Megaptera novaeangliae* and common minke whale *Balaenoptera acutorostrata* which were stranded in Hokkaido were estimated by radio carbon isotope, carbon-14. For humpback whale, migration pattern of south to north was observed and the whale might be lost the way to north at Sea of Japan. For common minke whale, migration pattern for two years was observed and the whale migrated only in Kuroshio current.

(Abstract should not be longer than 10 lines).

1. はじめに

鯨類は一生を海中で暮らすため、その行動を継続的に観察することは困難である。近年バイオロギング技術の発展により、行動を追跡することが可能となったが、本研究では化学トレーサーを用いることで、その行動履歴を推測することを試みた。窒素炭素安定同位体比は食性推定法として鯨類にも応用されており、昨年度の本学際研究において成果を発表したが(松石 2016)、新たに放射性炭素同位体比の測定を行うことで、食性のみではなく、鯨類の回遊の推定を行った。

2. 問題設定・方法

日本近海における海水中の放射性炭素 (^{14}C) 濃度が、親潮系の海流と黒潮系の海流で異なることを利用した。

ヒゲクジラの口内には、ケラチン質であるヒゲ板が何枚も存在する。このヒゲ板は成長とともに伸び続ける一方で摂餌の過程ですり減っていく。このヒゲ板を成長方向に沿って分析することで、各成長過程でどこにいたかを測定することが可能であると考えた。

分析には、北海道留萌郡小平町において 2010 年 3 月に漂着したザトウクジラ *Megaptera novaeangliae* と、2014 年 4 月に北海道小樽市に漂着したミンククジラ *Balaenoptera acutorostrata* のヒゲ板をそれぞれ用いた。ザトウクジラ、ミンククジラのヒゲ板を根元から 1 cm 間隔で切断し、5.00~10.00 mg ずつ分析に供した。

3. 結果と考察

3-1. ザトウクジラの回遊履歴の推定

ザトウクジラのヒゲ板を分析した結果、図 1 のように親潮域と黒潮域の差を検出することができた。ザトウクジラは赤道海域を除き、極地付近にまで分布する。日本近海では、冬に小笠原諸島及び沖縄周辺海域を繁殖場として利用し、夏に

オホーツク海からベーリング海にかけての餌場を利用する回遊を行っていると言われていた(森 2002)。ごくまれに日本海でも目撃例や漂着例があるが、どのようなルートで日本海へ来遊しているかは不明であった。本研究に用いたザトウクジラは、2010 年 3 月に北海道日本海側で漂着したメス個体であり、体長は 10.2m であった(ストランディングネットワーク北海道 2011)。ヒゲ根元から最も遠い先端が、親潮域の値を反映していることから、最も古い履歴が餌場へ来遊した記録と考えられる。その後、黒潮域の値を反映している箇所が、冬の繁殖上での値を示していると推察される。そして根元にかけて、値は低下しているが、親潮域の値まで達しなかった。このことから、繁殖場から北上している過程で日本海側に迷入したと推察された。また、根元付近で値が停滞していることから、日本海側で北上するルートを見失った可能性が考えられた。ザトウクジラのヒゲ板の年間伸長率は正確には分かっておらず、体サイズと他のヒゲクジラとの比較から、年間約 15 cm 伸びると考えられていたが(Ryan et al., 2013)、本研究結果からは年間約 30 cm 伸びると推測された。

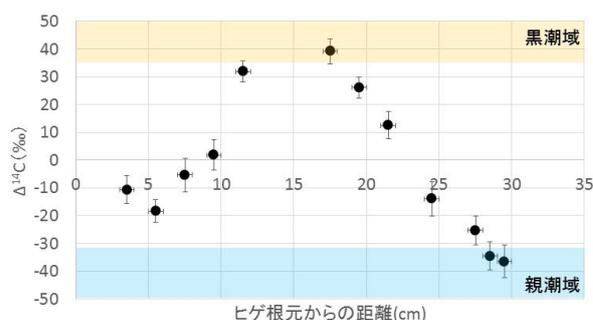


図 1. ザトウクジラヒゲ板の炭素 ^{14}C 分析結果.

3-2. ミンククジラの回遊履歴の推定

ミンククジラのヒゲ板を分析した結果、図2のように黒潮域の値のみを反映した結果となった。ミンククジラのヒゲ板は年間12cm伸長することが分かっている(Mitani 2006)ことから、約1年半の回遊履歴を得ることができた。本分析に用いたミンククジラは、2014年4月に北海道日本海側で漂着したメス個体であり、体長は740.5cmであった(ストランディングネットワーク北海道 2015)。日本近海のミンククジラは遺伝学的及び繁殖時期の違いなどから、東シナ海から日本海に分布する日本海—黄海—東シナ海系群(J系群)及び北太平洋からオホーツク海にかけて分布するオホーツク海—北西太平洋系群(O系群)が存在することが知られて(IWC 1983, 藤瀬 1996, IWC 2001)おり、分析に用いた個体はJ系群の個体であると考えられる。結果では、ヒゲ根元から5cm付近と15cm付近においてピークが見られる、二峰性を示したことから、日本海側における南北移動を反映している可能性がある。放射性炭素濃度の黒潮域における地域固有差を精査することで、今後詳細な回遊履歴を追跡することが期待される。

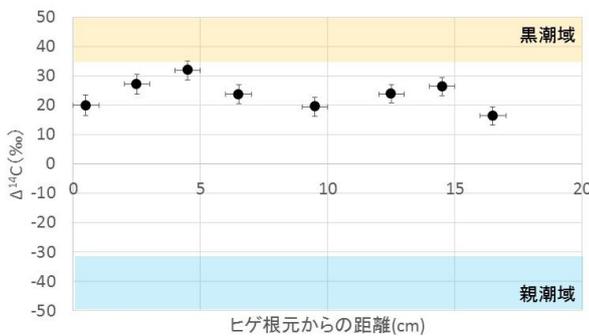


図2. ミンククジラヒゲ板の炭素¹³C分析結果.

4. まとめと今後の展望

本研究では、試験的にヒゲ板の放射性炭素の分析を行い、2個体の回遊履歴を高精度で追うことに成功した。今後各海域の詳細な放射性炭素濃度の違いとの比較や、個体数を増やすことで、各鯨種の回遊履歴を鯨類の死体から解き明かすことが可能になるだろう。また、放射性炭素による回遊履歴の推定と、窒素炭素安定同位体比分析結果を組み合わせることで、どこで何を食べていたかを、化学トレーサーにより紐解くことが期待される。

参考文献

- (1) 藤瀬良弘, 1996: ミンククジラ, 日本動物大百科 2 哺乳類II, 44-45. 平凡社, 東京.
- (2) IWC, 1983: "Report on the Scientific Committee. Rep. Int. Whal. Comm", 33: 52-53.
- (3) IWC, 2001: "Report of the Workshop to Review the Japanese Whale Research Programme under Special Permit of North Pacific Minke Whales (JAPAN)", J. Cetacean Res. Manage. 3 (Suppl.), pp377-413.
- (4) 松石隆, 松田純佳, 宮島利宏, 永田俊, 宮入陽介, 横山佑典, 2016: "放射性炭素同位体比・安定同対比測定を組み合わせた鯨類の生態学研究" 平成 27 年度学際連携研究報告書, 東京大学.
- (5) Mitani Y, Bando T, Takai N, Sakamoto W, 2006: "Patterns of stable carbon and nitrogen isotopes in the baleen of common minke whale *Balaenoptera acutorostrata* from the western North Pacific" Fisheries Sci 72:69-76.
- (6) 森恭一, 2002: "1枚の写真からイルカやクジラの移動を探る—分布生態" イルカ・クジラ学, 第4章, 73-90.
- (7) Ryan C, McHugh B, Trueman CN, Sabin R and others, 2013 "Stable isotope analysis of baleen reveals resource partitioning among sympatric rorquals and population structure in fin whales" Mar Ecol Prog Ser 479:251-261.
- (8) ストランディングネットワーク北海道, 2011: "2010年度ストランディングネットワーク北海道活動報告書", ストランディングネットワーク北海道, 函館.
- (9) ストランディングネットワーク北海道, 2015: "2014年度ストランディングネットワーク北海道活動報告書", ストランディングネットワーク北海道, 函館.

太平洋の広域観測データに基づく新たな窒素固定モデルの開発

Development of a new N₂ fixation model based on wide area observations in the North Pacific

橋岡 豪人, 海洋研究開発機構, E-mail: hashioka@jamstec.go.jp
塩崎 拓平, 海洋研究開発機構, E-mail: takuhei.shiozaki@jamstec.go.jp
相田 真希, 海洋研究開発機構, E-mail: macky@jamstec.go.jp
安中 さやか, 海洋研究開発機構, E-mail: yasunaka@jamstec.go.jp
重光 雅仁, 海洋研究開発機構, E-mail: ma-shige@jamstec.go.jp
伊藤 進一, 東大・大気海洋研, E-mail: goito@aori.u-tokyo.ac.jp
伊藤 幸彦, 東大・大気海洋研, E-mail: itohsach @aori.u-tokyo.ac.jp
Taketo Hashioka, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
Takuhei Shiozaki, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
Aita Maki, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
Sayaka Yasunaka, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
Masahito Shigemitsu, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
Shin-ichi Ito, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Sachihiko Ito, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

N₂ fixation is the largest external influx process of nitrogen from the atmosphere to the ocean, but the observation based global estimation still has large uncertainties. As a results, several different approaches have been proposed to model the N₂ fixation process, and only few earth system models have explicitly introduced the N₂ fixation process. In this study, we re-estimated the global distribution of N₂ fixation based on a new observational data of the Pacific, and based on our new estimation we have been developing a new N₂ fixation model. Our new global estimation showed significantly different spatial pattern of N₂ fixation in the North Pacific compared with previous studies. This result suggests a possibility of overestimation of global N₂ fixation rate in previous studies. In parallel with the data analysis, we introduced a preliminary version of N₂ fixation model into our earth system model, MIROC-ESM. This is the first framework to test the N₂ fixation in ESMs of Japan. Further improvement is currently in progress.

1. はじめに

どのような窒素固定者が、どのようなメカニズムを持ち、全球の窒素固定に対してどれだけの寄与をなしているかは、未だ様々な仮説が提唱されている段階で、Luo *et al.*, 2014 の最新の観測データに基づく全球窒素固定量の見積もりにおいても、全球積算量は 51~110 TgNyr⁻¹ (平均値 74 TgNyr⁻¹) という幅広い誤差範囲を持って見積もられている。結果、現在の各国研究機関の地球システムモデルにおいても窒素固定過程は各モデルで独自の方法により定式化され、再現される窒素固定の時空間分布にモデル間で大きな違いが生じている。さらには、鍵となる環境要因がモデル間で異なることにより、温暖化予測においても応答が大きく異なる可能性が示唆されている。したがって、窒素固定過程に本質的に重要な要素の同定と、それに基づく新たな窒素固定モデルの開発が必要とされている。特に、Luo らの見積もりでは、太平洋が全球窒素固定量の 74% を占めることが示唆されており、太平洋における窒素固定過程の解明こそが鍵となる。

2. 問題設定・方法

昨年度、塩崎らの太平洋における新たな観測データの解析から、Luoらの推定値(Fig. 1a)は太平洋の亜熱帯域において窒素固定速度を過大評価している可能性が示唆された(Fig. 1b)。そこで、塩崎らの太平洋のデータに基づき、自己組織化マップ(SOM: Self-Organizing Map)の手法を用い、全球的な窒素固定速度の分布を推定した(Fig. 2a)。これにより、先行研究における全球積算の窒素固定量の見積もりが過大である可能性を示唆した。また、自己組織化マップによる分布推定にあたり、複数の説明変数の組み合わせを評価することで、観測データの再現に重要な変数として、海面水温、溶存鉄濃度、P* (硝酸塩とリン酸塩の濃度比) が

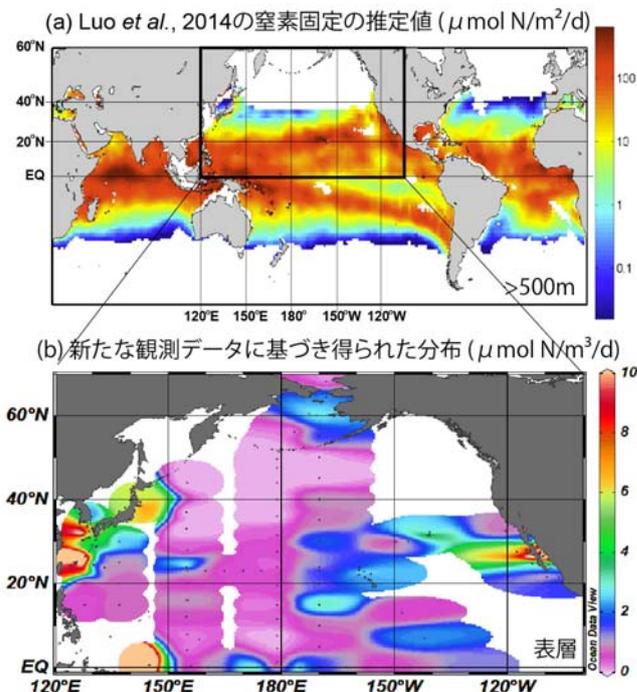


Fig. 1 (a) Global estimation of vertically integrated N₂ fixation rate by Luo *et al.*, 2014. (b) Surface N₂ fixation rate in the North Pacific obtained from a new observational data.

示唆された。その一方で、窒素固定過程のモデル化にあたり、説明変数間の相対的重要性の評価(自己組織化マップの手法での

評価は困難)が課題であった。

本年度は、自己組織化マップによる推定とあわせて、新たに一般化加法モデル (Generalized Additive Models: GAM) による推定を行い、手法間の推定の違いを比較するとともに、最適な説明変数の組み合わせを評価した。一般化加法モデルの説明変数には、先行研究から重要性が示唆されている、海面水温、溶存鉄濃度、硝酸塩濃度、リン酸塩濃度、P*、光合成有効放射を用い、窒素固定データには、Luoらの用いたMAREDAT (Buitenhuis et al., 2013)の全球データベースに、塩崎らの太平洋の新たなデータを加えたものを用いた(昨年の見積もりは塩崎らのデータによる)。

3. 結果と考察

一般化加法モデルにおける、複数の説明変数の組み合わせを、赤池情報量基準 (AIC) により評価した結果、海面水温・光合成有効放射・溶存鉄濃度・リン酸塩濃度 (あるいはP* : ほぼ同程度) の組み合わせが、観測データの再現に最適であった。これらの組み合わせにより推定された表層窒素固定速度の全球分布が図2bである。大局的な分布はLuoらの推定と同様、中・低緯度の広域において窒素固定が起こるといふ分布を示したが、北太平洋の亜熱帯域においては(黒・白の枠内)、Luoらの見積もりに比べ低い値を示し、太平洋の新たなデータを加味した推定の重要性が示唆された。これにより全球窒素固定量に対する各海盆の寄与も大きく変わる可能性がある。局所的には、自己組織化マップによる推定、Luoらの推定ともに、空間構造の異なる部分があり(インド洋や、北大西洋赤道域、南太平洋亜熱帯循環域など)、手法間で用いる環境変数が異なるため、複数の組み合わせを評価することで、各海域で重要となる環境要因を同定することが今後の課題である。

データ解析と並行し、昨年度、窒素固定過程を導入した地球システムモデルMIROC-ESMの改善に取り組み、本年度は新たに河川起源の栄養塩を導入した。これにより、窒素固定を含む、大気・陸域・海洋間の窒素循環・収支のより定量的な評価可能な枠組みが構築された。MIROC-ESMにおける窒素固定過程も、一般加法モデルと同様、水温・太陽放射・リン酸塩濃度・溶存鉄濃度により定式化されており、再現された分布(図2c)にも共通性が見られる。今後、両者を比較し、局所的な違いが、窒素固定過程の定式化・パラメータの違いによるものか、環境要因(物理環境や栄養塩濃度)の再現性によるものか同定し、モデルの改善につなげる。具体的には、MIROC-ESMで再現された物理・化学環境に今回用いた一般化加法モデルを適用することで、問題点の切り分けが可能となる。

4. まとめと今後の展望

太平洋の相対的に低い窒素固定速度分布は、本研究から新たに増えてきた描像であり、全球窒素固定量の見直しにつながる結果である。今後の解析では、表層だけでなく鉛直積算量においても空間分布を推定することで、Luo らの鉛直積算窒素固定速度 (Fig. 1a) との直接的な比較を可能とし、各海盆の寄与を再評価する。

現在各国の地球システムモデルにおいて、様々な窒素固定過程の定式化がなされ、再現される分布もモデル間で大きく異なる。

今回の一般化加法モデルの手法を、MIROC-ESMと同様、各国のモデルで再現された物理・化学環境に適用することで、窒素固定の違いは、再現された物理・化学環境の違いによるものか、定式化の違い(説明変数の選び方を含む)によるものかを判断する大きな材料となることが期待される。

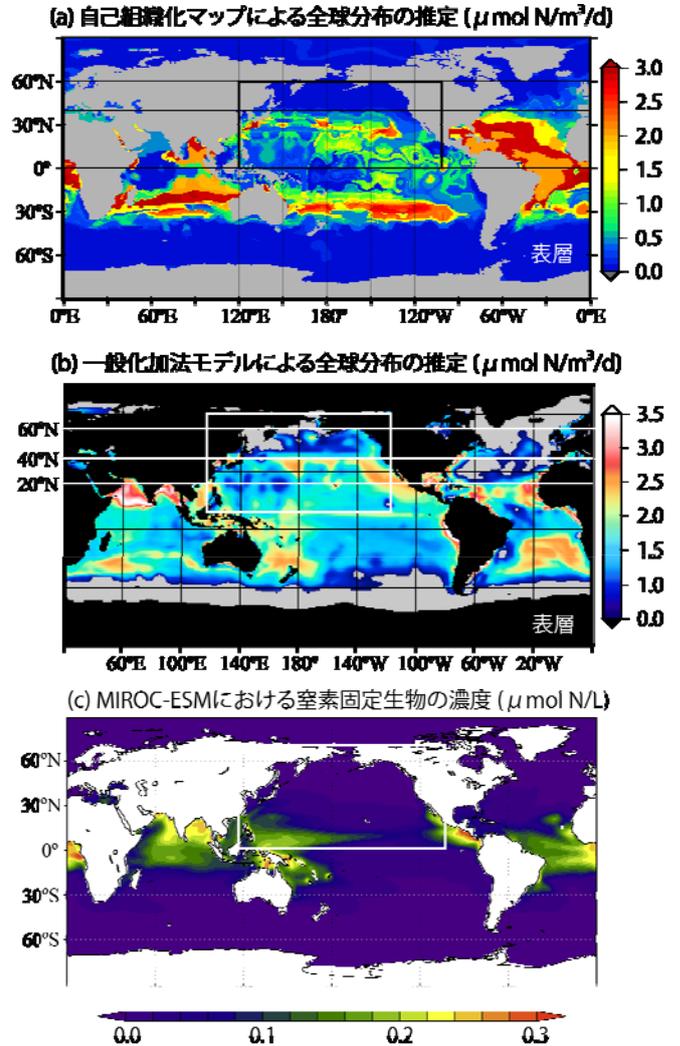


Fig. 2 (a) Estimation of global distribution of surface N_2 fixation rate obtained by SOM. (b) Estimation by GAM. (c) Global distribution of nitrogen fixer calculated by MIROC-ESM including a N_2 fixation model.

参考文献

- (1) Luo, Y.-W., Lima, I. D., Karl, D. M., Deutsch, C. A., and Doney, S. C.: Data-based assessment of environmental controls on global marine nitrogen fixation, *Biogeosciences*, 11, 691-708, doi:10.5194/bg-11-691-2014, 2014.
- (2) Buitenhuis, E. T., Vogt, M., Moriarty, R., Bednaršek, N., Doney, S. C., Leblanc, K., Le Quéré, C., Luo, Y. W., O'Brien, C., O'Brien, T., Peloquin, J., Schiebel, R., and Swan, C.: MAREDAT: towards a world atlas of MARine Ecosystem DATA, *Earth Syst. Sci. Data*, 5, 227-239, doi:10.5194/essd-5-227-2013, 2013.

次世代型メタゲノム解析手法 MAPLE を用いた北太平洋表層アーキア群集の代謝ポテンシャル解析

Evaluation of metabolic potential of archaeal community in North Pacific Ocean using the MAPLE system

高見英人, 海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター, E-mail: takamih@jamstec.go.jp

竹本和広, 九工大・情報工学科, E-mail: takemoto@bio.kyutech.ac.jp

濱崎恒二、東大・大気海洋研究所, E-mail: hamasaki@aori.u-tokyo.ac.jp

Hiديو Takami, R&D Center for submarine resource, JAMSTEC

Kazuhiro Takemoto, Kyushu Institute of Technology

Koji Hamasaki, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

We performed functional metagenomics of surface sea water samples collected at 9 sites of low latitude areas in the Pacific Ocean from 2011 to 2012 to highlight difference in functional traits of ocean microbial community. According to community structure analysis based on ribosomal proteins detected by MAPLE, all free-living fractions from 9 sites were mostly composed of bacteria although all particulate associate fractions contained archaea of 3~6.5% and eukaryote of 2.4~5%. We performed canonical correlation analysis based on the module abundance to highlight difference in functional traits between free-living and particle-associate fractions. As a result, we found that free-living fraction correlates to the modules for amino acid biosynthesis and transporters such as amino acid and metal ion.

1. はじめに

これまで極限環境微生物という概念が一般的であったアーキアは、近年では広く海洋環境からも見出されるようになった。残念ながら、実際に分離培養されたものはほぼ皆無であるが、培養を介さず直接環境から取得された全ゲノム(メタゲノム)DNAの解析を通して、新門(分類群)に属する未培養アーキアの全ゲノム配列が解読されている。我々の研究グループでも新門'Aigarchaeota'に属するアーキアゲノム'Caldiarchaicum subterraneum'を解読(*Nucleic Acids Res.* 39, 3204, 2011)し、近年では、真核と原核生物の性質を鮮明に併せ持つ新門'Lokiarchaeota'に属するアーキアゲノムも部分的であるが解読され(*Nature* 521, 173, 2015)、このアーキアと高い相同性を示す遺伝子が我々が解読した海底下掘削コアメタゲノムから検出されている。このように、その機能(硝化、脱窒、CO₂固定、メタン生成等)と存在量が注目されるアーキアは、実際に原核生物の数%~30%以上海洋環境に存在するが、分離・培養された例が少なく、生理・代謝機能も特異的であることから海洋の物質循環におけるアーキアの役割は未解明のままである。

そこで本研究では、共同研究者(東大・大気海洋研)の濱崎恒

赤道域(湧昇域)を挟む南北亜熱帯域(貧栄養海域)表層水の微生物生態系に含まれるアーキアの割合とその機能的特徴付けを目的として、メタゲノム解析を行った。メタゲノム解析は、従来のメタ 16S 解析ではなく、我々が独自に開発した生理・代謝機能ポテンシャル評価システム(MAPLE)¹を用いて行った。

2. 問題設定・方法

本研究では、2011-2012年に白鳳丸の航海による赤道域を挟む南北太平洋域でのサンプリングによって得られた海水(北太平洋:3, 赤道域:3, 南太平洋:3)をフィルターを用いたサイズ分画により付着画分(>3μm)と自由画分(0.2-3μm)に分けて採取し、それぞれの画分からメタゲノムDNAを抽出した。しかし、一部のサンプルから配列解析に十分なDNAが得られなかったため、DNAが十分取得できたサンプルについてもillumina社製のNexteraを用いてDNA増幅を行った。増幅したDNAはMiSeq用の250-bpペアエンドシーケンシングキットを用いて、300-bp以上の長さで連結した配列を各サイト100-250万本産出した。各配列からMetaGeneAnnotatorを用いて遺伝子領域を抽出し、完全長遺伝子は全て、不完全長については30アミノ酸以上の配列を全てMAPLEシステムに供試した(表1)。MAPLEシステムでは、KEGG代謝データベースに登録された機能モジュール(約730種類)に対する充足率を自動計算するが、この他に充足されたモジュールのアバundanceも計算する。今回の解析では主に個別生物の分類群(ITR(門または綱))ごとに算出されたアバundanceの合計値を各モジュールのアバundanceとして、その後の解析に用いた。

次に、目的変数をライフスタイル(自由、付着)と環境要因(硝酸、リン酸、イソプレンなど)、説明変数を各モジュールのITRアバundanceとして正準相関分析を行い、自由、付着画分と相関の強い機能を推定した。これとは別にMAPLEによる解析結果からアーキアにヒットした配列のみを抽出し、再度MAPLEに供試することで、各サイトのアーキア機能を自由、付着画分ごとに比較した。

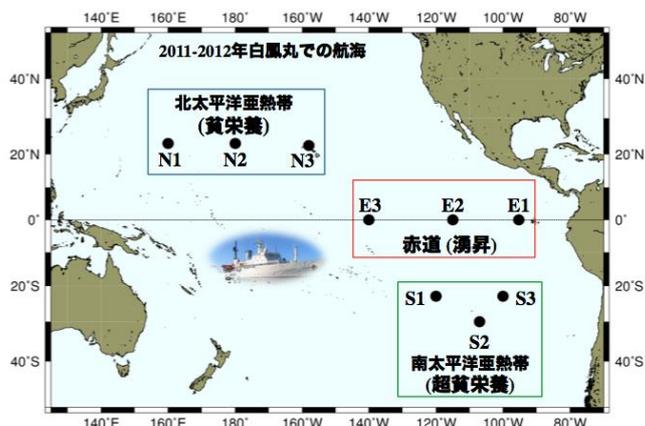


図1.白鳳丸によるサンプリングサイト

教授らの2011-2012年の白鳳丸の航海(図1)によって採取された

3. 結果と考察

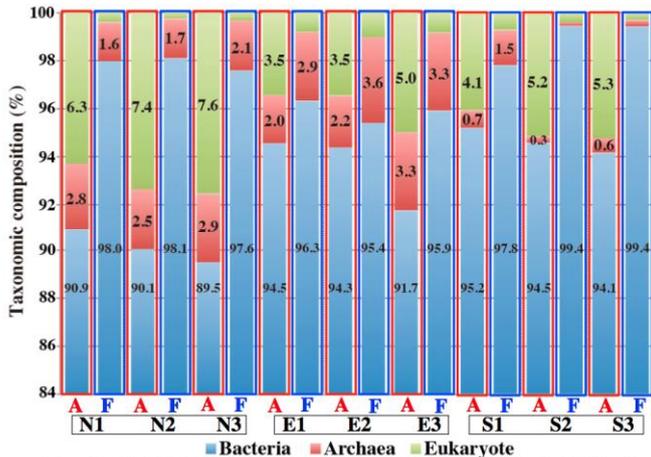


図2. メタゲノム配列中のリボソームタンパクに基づく菌叢の生物種組成
A: 付着画分, F: 自由画分

3.1. 海洋表層の生態系に占めるアーキアの割合

MAPLE によってリボソームタンパク質に割り振られた配列の生物種組成に基づく各海域のアーキアの割合は、北太平洋では付着画分(2.5-2.9%)が自由画分(1.6-2.1%)と比べ高く、赤道域では逆に自由画分(2.9-3.6%)が付着画分(2.0-3.3%)より高い傾向が見られた。南太平洋は付着、自由画分ともアーキアの割合は、他の2海域と比べ極めて低く、S1 自由画分の1.5%を除けば全て1%未満であった。この結果、南太平洋亜熱帯域の超貧栄養海域にはアーキアが極端に少ないことがわかった。

3.2. 海洋表層のアーキアの機能ポテンシャル

MAPLE に供試した配列数は表1に示したが、付着画分の全メタゲノム配列中に含まれるアーキア由来の配列の割合は南太平洋の超貧栄養海域(0.07-0.13%)を除く6サイトでは0.2-0.3%

表1. 各海域のメタゲノム配列中のアーキア由来の配列

付着画分	配列数	配列%	総配列数	自由画分	配列数	配列%	総配列数
N1A	2860	0.20	1417961	N1F	15231	0.59	2595985
N2A	3699	0.22	1658634	N2F	6657	0.59	1137109
N3A	4609	0.27	1714252	N3F	7000	0.66	1056671
E1A	2674	0.24	1128136	E1F	15299	0.76	2021097
E2A	4793	0.27	1765975	E2F	10449	0.81	1283169
E3A	4157	0.29	1424459	E3F	22056	0.84	2620113
S1A	2271	0.13	1762415	S1F	6499	0.39	1680341
S2A	1337	0.10	1347203	S2F	8861	0.36	2479687
S3A	795	0.07	1186584	S3F	9315	0.40	2340983

で南太平洋のアーキア配列の出現頻度は1/2-1/3程度と図2で示した菌叢組成のパターンと類似していた。自由画分も付着画分と同様の傾向を示したが、自由画分でのアーキア配列の出現頻度は、自由画分の2-4倍程度高いという結果であった。そこで、これらアーキア由来の配列を再度 MAPLE に供試し、アーキア配列のみで完成するモジュールとそのアバンダンスを比較した。その結果、パスウェイモジュールでは、セリン、スレオニン、システイン、ロイシンやプロリンなどのアミノ酸合成機能が自由画分の複数のサイトで完成したが、付着画分ではいずれのサイトも不完全であった。一方、これとは逆にスペルミジンなどのポリアミン合成機能は、北太平洋 N3(図1)の付着画分でのみ完成していた。また、面白いことにβ-酸化パスウェイのアシル-CoA 合成や C10-C20 イソプレノイド、アデノシンリボヌクレオチド合成では、貧栄養海域でありアーキア配列の出現頻

説明変数	タイプ	機能	目的変数
M00552	Pathway	D-galactonate degradation, D-galactonate => glycerate-3P	プロベン
M00554	Pathway	nucleotide sugar biosynthesis, galactose => UDP-galactose	
M00123	Pathway	cobalamin biosynthesis, cobinamide => cobalamin	
M00150	Complex	fumarate reductase, prokaryotes	
M00002	Pathway	glycolysis, core involving three-carbon compounds	イソブレン
M00264	Complex	DNA polymerase II complex, archaea	
M00390	Complex	exosome, archaea	
M00343	Complex	archaeal proteasome	
M00018	Pathway	threonine biosynthesis, aspartate => homoserine => cysteine biosynthesis, serine => cysteine	自由画分
M00021	Pathway	ornithine biosynthesis, glutamate => ornithine	
M00028	Pathway	tryptophan biosynthesis, chorismate => tryptophan	
M00023	Pathway	tryptophan biosynthesis, chorismate => tryptophan	
M00190	Complex	iron (III) transport system	
M00239	Complex	peptides/nickel transport system	
M00141	Pathway	C1-unit interconversion, eukaryotes	付着画分

図3. 正準相関分析で相関が認められたモジュールとその機能

度の低い南太平洋 S2, S3 の自由画分の機能アバンダンスが他の海域と比べ非常に高いことがわかった。これとは逆に PRPP (5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate)合成では、S2, S3 の付着画分では、モジュールが未完成であるのに対し、北太平洋の2地点(N1, N2)のアバンダンスが高く赤道域の2倍以上を示した。このように、アーキアの機能は、海域間や同一海域間でも自由画分と付着画分において大きな差が見られることがわかった。今回の解析では、メタゲノム中に含まれるアーキア由来の配列数が少なかったため、これ以上の違いは確認できなかったが、産出するメタゲノム配列数を増加することによってさらに詳細な違いが検出できると期待される。

3.3. 統計モデルを用いた相関分析(正準相関分析)

付着と自由画分および海洋の環境パラメータと相関するモジュール機能の特徴付けを行うため、正準相関分析を行ったところ、自由画分には、スレオニン、システイン、オルニチン、トリプトファンなどのアミノ酸合成機能と鉄やペプチド/ニッケルの輸送体機能などの相関が、付着画分には真核生物由来の葉酸誘導体の相互変換に関与する C1-ユニット相互変換機能との相関が強いことがわかった。これは、自由画分の微生物のライフスタイルは、独立性が高いことを意味しているように思われる。また、植物由来と考えられているイソブレンは、アーキア由来の DNA ポリメラーゼ II、エキソソーム、プロテアソームとの相関があるという結果であったが、現在のところその解釈はまだ不明である。

4. まとめと今後の展望

本研究では赤道域(湧昇域)を挟む南北亜熱帯域(貧栄養海域)の表層水をサイズ分画によって、付着と自由画分に分けそれぞれの画分に形成された微生物生態系に含まれるバクテリア、アーキア、真核生物の割合を算出した。今回は、メタゲノムを構成する微生物のコピー数が予測できない16S rRNA 遺伝子ではなく、ほぼシングルコピーのリボソームタンパク質を用いたことにより、より正確な生物種組成が導かれている。この結果、アーキアの組成は南太平洋貧栄養海域を除けば、概ね2-3%存在することがわかった。また、供試した全メタゲノム配列中のアーキア配列の割合は1%未満で、特に付着画分では赤道域でも0.3%未満であった。これは、付着画分はゲノムサイズが大きい真核生物の割合が高いことに起因すると考えられる。アーキア配列のみで完成するモジュールはその種類が限られており、自由画分では主にアミノ酸合成機能が特異的であった。今後は、他の海域についても同様の解析を行ってアーキア存在と機能に関する研究を進める予定である。

参考文献

1. Takami H. *et al.*, 2016: "An automated system for evaluation of the potential functionome: MAPLE version 2.1.0", *DNA Res.*, 23, 467-475

海洋中の懸濁粒子態微量元素の研究を推進するための クリーン分析システムの開発

Development of a clean analytical system for promoting study on suspended particulate trace elements in the ocean

則末 和宏, 新潟大学・理学部, E-mail: knorisue(at)env.sc.niigata-u.ac.jp
丸山 魁, 新潟大学大学院・自然科学研究科, E-mail: f16e009j(at)mail.cc.niigata-u.ac.jp
小畑 元, 東京大学大気海洋研究所, E-mail: obata(at)aori.u-tokyo.ac.jp
蒲生 俊敬, 東京大学大気海洋研究所, E-mail: gamo(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Kazuhiro Norisuye, Faculty of Science, Niigata University

Kai Maruyama, Graduate School of Environmental Science and Technology, Niigata University
Hajime Obata, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo
Toshitaka Gamo, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

International GEOTRACES program aims to clarify the sectional distribution of trace elements in the ocean. Key parameter defined in this project includes Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd and Pb. Though there has been great progress in chemical oceanography on dissolved trace elements in the ocean, limited information is available for particulate trace elements due to the difficulty in observation and chemical analysis. Clean digestion techniques are important especially for contamination-prone trace elements, such as Al, Fe, Mn and Pb. In this study we have designed a new digestion and evaporation system. This system operates in a closed system and benefits to minimization of sample contamination from surroundings.

1. はじめに

海洋における微量元素・同位体の生物地球化学サイクルの解明を目的とした国際 GEOTRACES 計画が立ち上がり、その国際共同研究が日本を含む各国によって活発に進められている。鍵となる微量元素 (Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd, Pb) およびそれらの同位体の「溶存態」および「粒子態」の鉛直断面分布を解明することが当該国際プロジェクトの主題である。粒子態微量元素は、粒子が担う生物地球化学サイクルを解明する上で極めて重要なパラメータであるが、粒子の酸分解と試料溶液の蒸発乾固処理をクリーンに行うことが難しく、確実な試料処理・分析法が確立されたとは言いがたい。その結果、溶存態の研究と比べて粒子態微量元素の研究は遙かに立ち後れている。本研究では、粒子態微量元素の分析法の開発を主な目的とする。対象とする元素は、国際 GEOTRACES 計画における key parameter を含む Al, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Cd, Pb, Bi である。本研究では、閉鎖型分解システムの構築と粒子の分解に関して主に検討した (丸山ら, 2016)。

2. 問題設定・方法

陸源の粒子状物質を分解するには、フッ化水素酸が有効であるが、毒性の強いフッ化水素酸の環境への負荷を低く抑え、かつクリーンに粒子の試料を扱うには、閉鎖型の蒸発乾固システムが適している。簡易な閉鎖型の蒸発・乾固システムが開発できれば有用性は高いが、非常に汚染しやすい微量元素である Al や Fe も研究対象に含めた閉鎖型システムを開発することは難しい。本研究では、市販のテフロン製液体輸送ポートを導入して閉鎖型クリーン分解・乾固システムを新規に構築した。また、構築した系を用いて、操作ブランク実験、フィルターの分解実験、及び微量元素の回収実験を行った。

分析方法の概略を述べる。海水のろ過には孔径 0.2 μm 、直径 47 mm の PES 製親水性メンブレンフィルター (Supor 200 Membrane, Pall 社) を用いた。フィルターを適当なサイズにカットし、15 mL テフロンバイヤルの底部に設置した。8.0 M 硝

酸 4.0 M フッ化水素酸を加えてテフロンバイヤルの蓋をきつく締めて、ホットプレートで 110°C で 4 時間加熱した。その後、テフロンバイヤルをテフロン製液体輸送ポートに接続し、試料の蒸発乾固を行った (Fig. 1)。残渣に 100 μL の濃硝酸を加え再び乾固し、フッ化水素酸を除去した。最終残渣を 0.5 M 硝酸 5 mL で加熱・溶解した。酸蒸気は閉鎖型乾固システム下流のアルカリトラップで吸収した。

3. 結果と考察

3-1. 回収率の検討

懸濁粒子態微量元素の分析法を確立するには、一連の分析操作で対象元素が定量的に回収されることが必要である。揮発性のある元素の場合、蒸発乾固過程でのロスが懸念される。そこで、微量元素 (Al, Mn, Fe, Pb, Bi) の標準溶液をバイヤルに既知量とり、実際の試料と同様に操作を行った。その結果、これらの微量元素の回収率は 101-109% ($n=4$) とほぼ定量的な値となった。

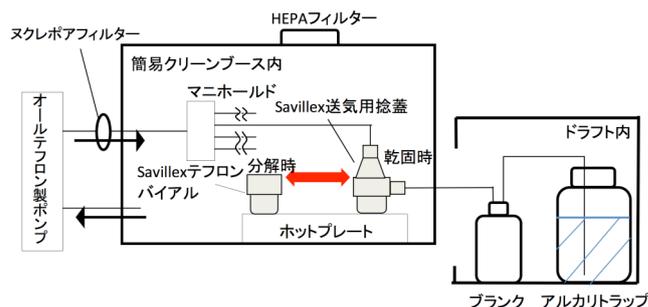


Fig. 1 Digestion and evaporation system for suspended particulate trace elements (Maruyama, K. et al., in prep.). Acid vapor was absorbed in the alkaline trap at the downstream.

3-2. 堆積物試料の分析結果

認証値付きの標準試料の分析を行うことで、本研究で開発した手法の正確さを検証した。本研究では、完全に分解することが比較的難しい陸源鉱物粒子の割合が大きい海底堆積物 MESS-4 を分析した。分析結果は、Al, Ti, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Cd, Pb については、ほぼ定量的な結果となった。すなわち、本操作方法により、粘土鉱物など堆積物由来の懸濁粒子の分析が可能であると考えられる。今後、生物源粒子の標準物質および外洋海水の標準試料の分析も行い、手法の正確さを確実なものとする。

3-3. フィルターなしブランク実験

閉鎖型分解・乾固システムを用いて超微量の粒子態微量元素を精確に分析するには、一連の操作でのブランク値が十分低く抑えられることが重要である。本研究では、まずフィルターなしブランク実験を行い、先行研究 (Nakatsuka et al., 2007; Ohnemus et al., 2014; Twining et al., 2015) のデータと比較した。フィルターなしの条件で検討することで、フィルター由来以外の汚染の最小化を検討することが容易になる。先行研究と結果とフィルターなしブランク値を比較するために、バイヤル当たりのブランク値 (ng/バイヤル) を求めた。

Al, Ti, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Cd, Pb についての我々の分析結果と報告値 (Nakatsuka et al., 2007; Ohnemus et al., 2014; Twining et al., 2015) との比較結果を簡単に述べる。Nakatsuka et al. (2007) では、閉鎖型乾固システムが適用されたが、Al, Mn, Fe のデータが報告されていない。また、Ohnemus et al. (2014) および Twining et al. (2015) のデータは、開放系で得られた結果である。Cu を除く全ての元素について、我々のフィルターなしブランク値は、報告値の 1/2-1/10 と最も低い値となった。このことから、閉鎖型乾固システムが有効であること、さらにはテフロン製液体輸送ポートを導入することで、汚染しやすい微量元素 Al や Fe の分析もより容易になることが示唆さ

れた。Cu のブランク値は報告データよりも数倍高い結果となり今後検討が必要である。

4. まとめと今後の展望

本研究では、市販の液体輸送ポートを新規に導入し、閉鎖型蒸発乾固システムを構築し、海洋中の懸濁粒子態微量元素分析法の確立に向けて諸検討を行った。まず、蒸発乾固過程で研究対象とした元素は定量的に回収された。また、堆積物標準物質を分析したところ、結果は認証値とほぼ一致した。微量元素分析における最重要課題は、ブランク値の低減化と汚染源の特定である。そのために、フィルターなしの操作ブランク実験を行ったところ、既報の分析値よりも Cu 以外の元素については低い値を得ることができた。このことは閉鎖型乾固システムが懸濁粒子態微量元素の分析に有用であることを示している。

今後は、実際にフィルターを用いた操作ブランク実験を進めてゆく。Al, Fe などの元素については、フィルターのブランク値が全操作ブランク値の主要起源になる。まず、Supor フィルターの洗浄法を検討し、フィルターのブランク値を十分低く保つ条件を見出す。また、手法を確立し、GEOTRACES 航海で採取したフィルター試料の分析を行ってゆく。

本研究で用いる Supor フィルターには大量海水をろ過できるという特長がある。この点を活用すれば、本研究で開発する手法は、大量海水のろ過を必要とするパラメーター (例えば、粒子態 Pb 同位体比) の分析にも適用できる。

参考文献

- (1) 丸山 ほか. 2016 年度日本地球化学会年会講演要旨.
- (2) Nakatsuka et al. Anal. Chim. Acta 594 (2007) 52-60.
- (3) Ohnemus et al. Limnol. Oceanogr.: Meth. 12 (2014) 530-547.
- (4) Planquette and Sherrell. Limnol. Oceanogr.: Meth. 10 (2012) 367388.

遺伝学的・生理学的アプローチによる魚類の淡水適応メカニズムの解明

Genetic and physiological analysis of the mechanism underlying adaptation to freshwater in teleosts

神田真司, 東大・院理, E-mail: shinji(at)bs.s.u-tokyo.ac.jp

今野紀文, 富山大・院理工, E-mail: nkonno(at)sci.u-toyama.ac.jp

兵藤晋, 東大・大気海洋研, E-mail: hyodo(at)aori.u-tokyo.ac.jp

Shinji Kanda, Graduate School of Science, The University of Tokyo

Norifumi Konno, Graduate School of Science and Engineering, Toyama University

Susumu Hyodo, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

The mechanism of osmoregulation in fresh water fish is largely unknown, although some of neurosecretory hormones are considered to be involved in that. In this study, by using recently developed genome editing tools, TALEN and CRISPR, we establish knockout lines for isotocin vasotocin, which are orthologous genes for mammalian oxytocin and vasopressin. We successfully induced frameshift mutations to isotocin and vasotocin genes, and the analyses of the knockouts are under way. For the understanding of the mechanism, we are simultaneously performing morphological and electrophysiological analyses by in situ hybridization and patch clamp, respectively. The understanding of the mechanism by these multidisciplinary analyses may give us an answer how adaptation to freshwater occurred in the teleost lineage.

1. はじめに

真骨魚類には、海洋あるいは淡水域のみに生息する魚の他、両環境に適応でき、生涯の中で海水と淡水を行き来する広塩性魚がいる。これまで多くの研究がなされてきたにも関わらず、広塩性を支配するメカニズムは不明である。本研究では、遺伝子改変や組換え技術を駆使することで、広塩性のメカニズム解明に取り組んだ。浸透圧、イオン調節において、哺乳類ではバソプレシンと呼ばれる脳下垂体後葉から放出されるホルモンが抗利尿ホルモンとして知られ、水分を維持する機能を持つが、それ以外の生物での機能は明らかではない。とくに水分排出を必要とする淡水魚においては哺乳類のバソプレシンが示す水分排出機能は不要であるため、その機能はまったく謎に包まれている。本研究では、この進化上のパラドックスの解明のために、遺伝学的ツールを応用した、形態学的、生理学的解析を行うことにした。まずは、イソトシン、バソトシンのノックアウトメダカの作成に着手した。さらに、バソトシンニューロンを特異的に GFP 標識したトランスジェニックメダカ (Kagawa et al., 2016) を活用し、淡水適応へのホルモンの働きを、メダカをモデルにして解明することにした。

2. 問題設定・方法

・ノックアウトの作成

バソトシン・イソトシンファミリーは、2 種のリガンドと、7 種の受容体があり、バソトシンがイソトシンの受容体、イソトシンがバソトシンの受容体にも働きうるため、その関係は非常に複雑である。また、浸透圧を調節する器官は鰓、腎臓、腸と複数存在する。そこで、まずは水分調節に関与するリガンド・受容体をそれぞれ明らかにするため、5 種類のノックアウトを作成することにした。ノックアウトには、Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) 法および、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) 法を用い、d-rR 系統のメダカの 1 細胞期にマイクロインジェクションし、シーケンス解析をともなう継代を繰り返すことでホモノックアウト個体および

ヘテロノックアウト個体を作成した。

・In situ hybridization 法による受容体の検出

バソトシンの機能を解析するためには、実際に腎臓や腸、鰓などの各浸透圧に関与する組織において、いずれの受容体サブタイプが、どの位置に発現しているかを知ることが重要である。そこで、現在までに脳内での mRNA 検出に用いているプロトコル (Kanda et al., 2008, Kanda et al., 2012 など) 複数種類を検討した。

・電気生理学的手法によるバソトシン放出タイミングの推定
現在までに、哺乳類以外のバソトシン・バソプレシンニューロンから電気生理学的な記録は行われておらず、サケ目におけるカルシウムイメージングにとどまる。カルシウムイメージングは、放出のタイミングを示唆することの出来る優れた実験系であり、バソトシンニューロンの浸透圧に対する調節について、一定の示唆を与えている (Saito et al., 2001)。一方で、電気生理学は、他のニューロンからのシナプス入力など、より多くの神経科学的な情報を与える手法である。今回、共同研究者より供与されたバソトシンニューロンに特異的に GFP を発現するメダカにパッチクランプ法の適用を試みた。

3. 結果と考察

本研究では、各種ホルモンや受容体のノックアウト個体を作成した。TALEN 法および CRISPR 法で、フレームシフト変異を示す個体が、それぞれのホルモンについて作成でき、今後の研究に活用できる体制が整った。さらに、電気生理学的な解析により、バソトシンニューロンは低浸透圧時に活発にバソトシンを血中に放出していることが示唆された。

ノックアウトメダカの作成、解析

TALEN 法および、CRISPR 法を利用し、ゲノム編集技術をメダカに適用した。イソトシン、バソトシンの両遺伝子については、TALEN 法でフレームシフト変異を示す個体を、

V1aR1, V1aR2, V2aR1, V2bR に関しては、CRISPR 法でノックアウト個体を作成しつづける。すべての遺伝子において、効率よい切断が確認でき、フレームシフト変異を示すヘテロ個体を継代中である。本報告書では、確立したバソトシンノックアウトの遺伝子型を図に示す(図 1)。少なくとも、イソトシン・バソトシンノックアウト個体に関しては致死ではなく、かつ、正常に繁殖をすることを確認しており、今後の浸透圧に関する研究に利用できることがわかっている。

vasotocin KO (23 bp deletion)

• ORF sequence of vt

5'  3' Hormone
ATGCATCCCTCCCTGCTCAGCCTGTGCGCCCTGGGATTCTCGCTdTTG
CCTCCGCCCTGTTACATCCAGAATGCCCCGAGGAGGGGAAGCGAGCA
23 bp deletion TTGCCGGAGGCTGGGATCAGACAG

• Peptide sequence of VT

WT
MHPSSLSSLCALGFLALSSA **CYIQNCPRG** GKRALPEAGIR
vt KO 23 bp deletion MHPSSLSSLCALGFLALSSAWREASIAAGGWDQ

Fig. 1 作成したノックアウトメダカの遺伝子の一例。バソトシン遺伝子の開始コドンより後に、23bp の塩基喪失を導入することができた。これにより、ホルモンとして分泌される配列は、フレームシフトし、正常なバソトシンホルモンは合成されない。これと類似した設計で、イソトシンのノックアウト個体も作成した。

in situ hybridization 法を用いた受容体やトランスポーターの検出

組織中の mRNA 発現を標識する in situ hybridization 法を用いた受容体やトランスポーターの検出も進めている。NKCC などのトランスポーターの発現を腎臓で検出できるようになり、腎細管での発現局在を示すことができた。一方で、V2aR などの受容体に関しては、発現量が少ないからか、明瞭なシグナルとしては観察できていない。現時点では、脳に最適化したプロトコルを用いているので、今後、プロトコルを最適化することにより、腎細管でのより高感度な遺伝子発現検出を可能にする。

バソトシンニューロンの電気生理学的解析

バソトシンニューロンを特異的に GFP で標識したメダカ

を用い、パッチクランプ法でバソトシンニューロンの発火活動を解析した。低浸透圧(真水)で飼育したメダカにおいて、高頻度発火を示し、等張液で飼育したメダカでは低頻度な発火を示すことがわかった。また、高張液で飼育したメダカは、等張液で飼育したメダカと比べ、発火頻度に有意な差は見られなかった。このことは、バソトシンは、低浸透圧時のみ血中に放出されていることを示唆する。興味深いことに、淡水魚でのこの結果は、バソトシンが水分欠乏時に多く放出され、抗利尿作用を示す哺乳類とは真逆の結果である。

4. まとめと今後の展望

本研究ではノックアウトの作成、生理学的、形態学的な解析を行った。その中から、予想とは異なる哺乳類とは違ったバソトシンの機能が見えつつある。現段階では、ノックアウトの表現型は解析途中であるが、大変興味深い傾向が見えつつある。今後、現在までの生理学的解析、形態学的な解析、およびノックアウト解析をさらに進め、陸上生物と水生生物の浸透圧調節の違い、ひいては、何故我々は陸上に進出でき、魚はあらゆる浸透圧の水に適応進化できたのか、という進化上の大きな疑問に対して、挑んでいくつもりである。

参考文献

- (1) Kagawa N, Honda A, Zenno A, Omoto R, Imanaka S, Takehana Y, Naruse K. Arginine vasotocin neuronal development and its projection in the adult brain of the medaka. *Neurosci Lett* 2016; 613:47-53
- (2) Kanda S, Akazome Y, Matsunaga T, Yamamoto N, Yamada S, Tsukamura H, Maeda K, Oka Y. Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 2008; 149:2467-2476
- (3) Kanda S, Karigo T, Oka Y. Steroid sensitive kiss2 neurones in the goldfish: evolutionary insights into the duplicate kisspeptin gene-expressing neurones. *J Neuroendocrinol* 2012; 24:897-906
- (4) Saito D, Urano A. Synchronized periodic Ca²⁺ pulses define neurosecretory activities in magnocellular vasotocin and isotocin neurons. *J Neurosci* 2001; 21:RC178

宿主上での移動性を持った寄生性生物の性転換の実証と理論研究：

小型腹足類キクスズメを例に

Empirical and theoretical studies for sex change in parasites with mobility on hosts: a case study for a small gastropod *Sabia conicus*

山口 幸, 神奈川大・情報システム創成, E-mail: sachi.dwarfmale(at)gmail.com
安岡 法子, 奈良女子大院・人間文化研究科, E-mail: anomalocarid18(at)gmail.com
澤田 紘太, 国際水産資源研究所, E-mail: sawada(at)anet.soken.ac.jp
入江貴博, 東大・大気海洋研, E-mail: irie(at)aori.u-tokyo.ac.jp
Sachi Yamaguchi, Dept. Information Systems Creation, Kanagawa University
Noriko Yasuoka, Graduate School of Humanities and Science, Nara Women's University
Kota Sawada, National Research Institute of Far Seas Fisheries, FRA
Irie Takahiro, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

Molluscs exhibit diverse sexual systems including sex change. In this study, we focused on a small protandrous gastropod *Sabia conicus*, a parasite of other gastropods. Since the previous study reported the mobility of this species, we studied the relationship among movement, site of attachment and reproductive activity. Our results suggest that the mobility is low, while juveniles or transitional (sex-changing) individuals sometimes moved, mostly within hosts. One case of inter-host movement was observed without death of the host. There is no clear relationship between the original sites and the frequency of movement. Small individuals attached on females were more likely to mature as males than those attached on the host shells. This result provides a basis for a theoretical modeling of sexuality and life history in parasitic animals with mobility.

1. はじめに

軟体動物の性表現は、雌雄異体、同時的雌雄同体、性転換など多岐にわたる (Coe, 1943; Hoagland, 1978; Yusa, 2007)。性転換の研究に関しては、腹足類の *Crepidula* 属を中心に野外調査や操作実験など様々な先行研究が行われてきた。しかし、性転換する腹足類のほとんどが固着性、もしくは著しく移動性が低いいため、移動性を考慮に入れた性転換の最適サイズを予測する数理モデルは考えられていない。

キクスズメ *Sabia conicus* は腹足綱スズメガイ科に属する傘状の巻貝で、潮間帯から潮下帯に生息する様々な巻貝上に着生する。着生する際に宿主の貝殻を深く侵蝕することがあり、自身の殻長よりも長い吻を伸ばして宿主の軟体部や糞、宿主上に付着した藻類などを餌としている (松永, 1964)。これまでの観察から、キクスズメは雄性先熟であること、死んだ宿主から生きた宿主へ移動することなどが知られている。しかし、どのような性の個体が移動するのかについては検証されていない。1つの宿主上で自身の繁殖成功率を高めるために、雄が雌の近くに移動する可能性は十分に考えられる。また、栄養を取るために宿主間で移動する可能性も考えられる。そこで、水槽実験により、キクスズメの体サイズと性の分布の関係、キクスズメの移動性を明らかにする。理論面では、移動性を考慮に入れた最適性転換モデルを作成することを目的とした。

2. 問題設定・方法

キクスズメは交尾を行うため、個体間の距離や移動性は繁殖成功と関係すると考えられる。しかし、性成熟に影響する要因や、移動性のパターンは明らかになっていない。そこで本研究では、体サイズや付着位置が性成熟に与える影響を明らかにし、移動性について観察を行った。

①行動観察

2016年7月29日から8月5日の8日間、京都大学瀬戸臨海実験所にて行動観察を行った。まず、白浜水族館で飼育され

ていたヒメクボガイ *Omphalius nigerrimus* およびウズイチモンジ *Trochus rata* に付着したキクスズメの付着場所を記録し、個体識別した。次に、キクスズメの付着した宿主と付着していない宿主を同一の容器 (直径 9 cm, 高さ 4.5 cm, 水深は約 3 cm に設定) に入れて飼育し、1日に1回移動の有無を確認した。最初の付着位置から離れていた場合を「移動あり」とした。観察は止水環境にて行い、1日1回水換えをした。

②解剖による性判別

①で行動観察したキクスズメをエタノールで固定し、体サイズと付着位置 (宿主上・メスの上・オスの上) を記録した。また個体を解剖して、交尾器と抱卵の有無を確認し、性判別した。性は交尾器の観察できた個体をオス、観察できなかった個体のうち最小抱卵サイズの 9.9 mm 以上の個体をメス、それ以外を未成熟とした。交尾器が不完全な個体は移行段階にあるものとみなした。

③統計解析 (GLMM)

未成熟および雄個体について、性成熟 (未成熟もしくは雄) を応答変数、体サイズおよび付着位置を説明変数とする一般化線形混合モデルを用いて、性成熟に影響する要因を解析した。誤差構造は二項分布、リンク関数は logit 関数とし、宿主による差を考慮するため、宿主 ID をランダム要因とした。尤度比検定の結果、交互作用は有意でなかったためモデルから除いた。その後、各説明変数の効果が有意であるかどうか、尤度比検定によって検定した。

3. 結果と考察

①行動観察による移動性の確認

キクスズメ 193 個体中 7 個体 (3.6%) が移動し、これは宿主が死亡しなくても観察された。宿主間移動は 1 例見られたが、ほとんどが同一宿主内での移動であった。移動した個体は未成熟か、性の移行段階である不完全な交尾器をもつ個体であった (表 1)。メスの上に付着していた個体でも移動が見られたため、付着位置と移動性との間には関連がないのかも

しれない。しかし、移動性は高くはないが、メスに性転換をするまでは、移動能力があると示唆された。

表1 キクスズメ移動の7例。*印は宿主間移動を表す。その他は宿主内移動である。移動した個体の平均殻長は 4.26 mm であった。

個体No.	殻長 (mm)	性	元の付着位置
3_13	4.6	未成熟	メスの上
4_12	3.1	未成熟	オスの上
4_25*	1.4	未成熟	オスの上
6_33	6.2	移行段階	オスの上
7_15	5.7	オス	メスの上
7_21	6.0	オス	メスの上
12_1	2.8	未成熟	宿主上

②性、体サイズおよび付着位置の関係

メスよりも大きいオスは見られず、オスと未成熟個体の体サイズには重複があり、オスの方が大きかった (図1)。オスと未成熟個体に限って解析すると、体サイズと付着位置の両方が性成熟 (未成熟またはオス) に影響し、宿主に付着している個体は大きい傾向にあるがオスは少なく (34.9%)、メスの上に付着している個体は小さい傾向にあるがオスが多かった (67.7%) (図2)。キクスズメのオスへの成熟は体サイズと付着位置に影響を受け、メスの上に付着した際には小さなサイズでも早く成熟することが示唆された。

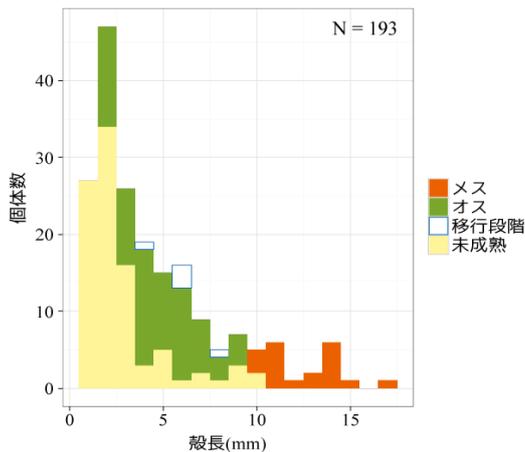


図1 体サイズと性の関係。

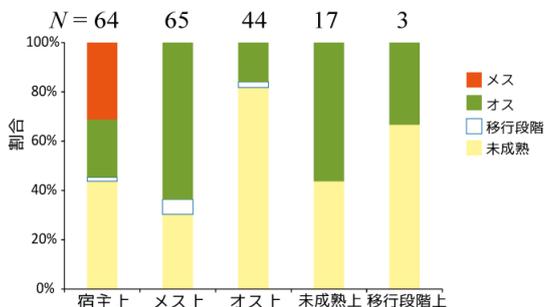


図2 付着位置と性の関係。

4. まとめと今後の展望

本研究では宿主が死亡していなくても、宿主間で移動することがわかった。しかし、それは全 193 個体に対して 1 例のみであった。宿主内移動は 7 例のみ観察され、キクスズメの

移動性が非常に低いことがわかった。メスとオスのサイズ重複はなく、オスはメスより小さいことがわかった。宿主に付着している個体はオスより未成熟個体が多く、メスに付着している個体は未成熟個体よりオスが多かった。

以上のことから、理論研究の展開として次のことができるだろう (図3)。本研究開始当初は、移動性を考慮した性転換モデルの開発を考えていたが、非常に低い移動性を示すことから、稚貝定着時における付着場所選択の意思決定を取り入れたほうがよいだろう。宿主上に付着した個体は、まず未成熟を経て、後に大型メスとして繁殖をおこなう。メス上に付着した個体はオス個体として一生を終えるか、あるいはオスとして繁殖しつつも成長をし、後にメスに性転換するという2つの生活史を持つ。個体は計3つの生活史の中からどの生活史を選ぶか、宿主の年齢に依存した最適な選択割合をダイナミックプログラミングで計算することができる。また宿主の寿命を鑑みて、どの段階で性転換をおこなうか、その最適な性転換年齢 (あるいはサイズ) を計算することができる。この数理モデルの定式化および解析が今後の課題である。

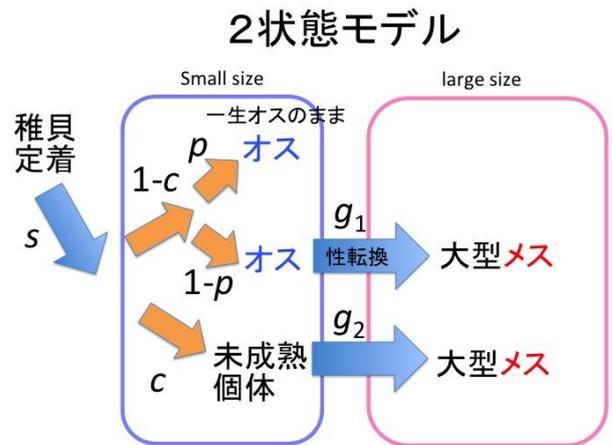


図3 モデルのスキーム。宿主のところにやってきた稚貝は付着場所を選択する。メス上に付着した個体はまずオスとして繁殖する。そのまま一生オスとして終わるか、あるいは成長後メスに性転換するか、2つのルートがある。宿主上に直接付着した個体はまずは未成熟個体になり、その後成長して、大型メスになる。大型メスになるためには、性転換時間あるいは成長への時間をかけなければならない。3つの生活史の割合および性転換タイミングは、宿主の残存時間によって変化する。これらをダイナミックプログラミングで解く。

参考文献

- (1) Coe, W. R., 1943: "Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods", *Quart. Rev. Biol.*, 18(2), 154-164.
- (2) Hoagland, K. E., 1978: "Protandry and evolution of environmentally-mediated sex change-study of Mollusca", *Malacologia*, 17(2), 365-391.
- (3) Yusa, Y., 2007: "Causes of variation in sex ratio and modes of sex determination in the Mollusca—an overview", *Am. Malacol. Bull.*, 23(1), 89-98.
- (4) 松永順夫., 1964: キクスズメの生態に関する考察. 貝類学雑誌, 23(3), 149-157.

有用小型深海性底魚類の分類学的再検討: 日本産ニギス属の検討

Taxonomic study on small deep-sea demersal fishes including important commercial species: review of the genus *Glossanodon* in Japan

遠藤 広光, 高知大学理学部, E-mail: endoh@kochi-u.ac.jp

柳本 卓, 水産機構中央水研, E-mail: yanagimo@affrc.go.jp

梨田 一也, 水産機構中央水研, E-mail: knashi@affrc.go.jp

岩田 恵理, いわき明星大学, E-mail: asealion@iwakimu.ac.jp

猿渡 敏郎, 東大・大気海洋研, E-mail: tsaruwat@aori.u-tokyo.ac.jp

Hiromitsu Endo, Faculty of Science, Kochi University

Takashi Yanagimoto, National Research Institute of Fisheries Science, Yokohama, FRA

Kazuya Nashida, National Research Institute of Fisheries Science, Yokohama, FRA

Eri Iwata, Meisei University

Toshiro Saruwatari, Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo

Abstract

The present study of taxonomy and DNA barcoding on the argentine genus *Glossanodon* around Japan revealed the presence of an undescribed species including its juvenile form. This species most resembles *G. semifasciatus* “Nigisu”, a commercially important species, but differs from it in having the following combination of characters: 13 pelvic-fin rays (vs. 10–12), 28–30 gill rakers (vs. 35–40), 6 dark blotches on the dorsum (vs. 7), and a narrow longitudinal silver band on the side (vs. broad). The analyses of the partial mitochondrial COI and 16S genes of two genera and five species of Japanese argentine fishes excluding *G. lineatus* (no sample) indicated that they were distinguished at species level. Further, the juvenile features of *G. microcephalus* and three characters of pigmentation distinguishing the juveniles of *G. lineatus* and *G. kotakamaru* were newly found: e.g., all juveniles examined of *G. microcephalus* (25<mm SL) have no black vertical bars on the body known in the early life history of argentinids.

1. はじめに

ニギス科ニギス属 *Glossanodon* Guichenot, 1867 は、現在世界の熱帯から温帯水域に分布する 15 種が知られ、水深 100m から 500m までの大陸棚から斜面上部、海山や海嶺に生息する (Endo and Nashida, 2010, 2012)。日本周辺には、水産重要種のニギス *G. semifasciatus* (Kishinouye, 1904) の他に、イチモンジイワシ *G. lineatus* (Matsubara, 1943)、コタカニギス *G. kotakamaru* Endo and Nashida, 2010、そしてツマリニギス *G. microcephalus* Endo and Nashida, 2012 が分布する (Endo and Nashida, 2012)。また、土佐湾には日本産のニギス属全 4 種とカゴシマニギス属のカゴシマニギス *Argentina kagoshimae* が出現する。

2015 年 5 月に横浪半島沖の土佐湾で行われた高知県水産試験場の底曳き網調査で、ニギスによく似るが、斑紋の異なる 1 標本が得られた (Fig. 1: BSKU 117782, 90 mm SL)。その後の分類学的調査により、本属のいずれの既知種とも異なる未記載種と判明した。2001 年以降に中央水産研究所が土佐湾で実施したニギスの資源量と初期加入群の調査において、ニギスにツマリニギスが混入していたことが判明し、2012 年に新種記載された。さらなる本属未記載の存在は、本属の仔稚魚と成魚の分類学的再検討が、水産資源の適切な管理や海洋生態系の解明と保全の観点からも必要であることを示唆する。

本研究では形態形質に基づく分類と DNA バーコーディングの手法を用いて、日本産ニギス属の稚魚と成魚について再検討した。

2. 問題設定・方法

(1) 分類学的再検討

本研究では、土佐湾で行われた中央水産研究所の調査船こたか丸と高知県水産試験場の調査船土佐海洋丸の底曳き網調査で採集された仔稚魚および成魚、高知市御豊瀬の大手繰網

漁、そして駿河湾で深海トロール漁で漁獲された標本を用いた。これらの標本は、高知大学理学部の魚類標本コレクション (BSKU) に保管される。標準体長は SL と略した。

(2) DNA バーコーディング

ニギス科 5 種と外群としたソコイワシ科 2 種、アオメエソ科魚類の筋肉組織を約 10mg 摘出し、QuickGene (TOYOBO) を用いて粗 DNA を抽出した。ユニバーサルプライマーを用いて COI 領域と 16S 領域を PCR 法で増幅した。PCR 産物を精製し、サンガー法で塩基配列を決定した。塩基配列を用いて、NJ 系統樹を作成して、各種の遺伝的差異と未同定の稚魚がどの種であるかを調べた。それらサンプルの証拠標本は、高知大学理学部の魚類標本コレクションに登録した。

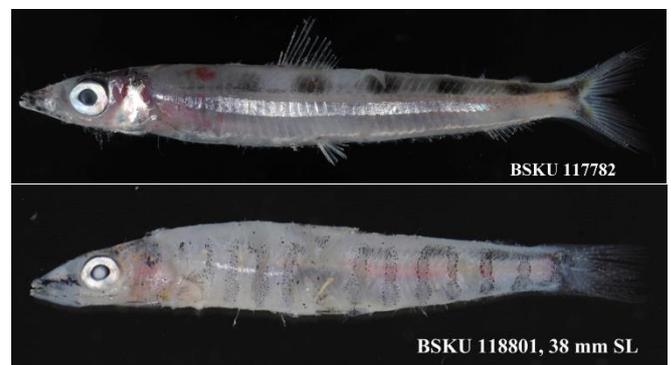


Fig. 1 Two specimens of *Glossanodon* sp. collected from Tosa Bay. Adult, BSKU 117782, 90 mm SL (upper), juvenile, BSKU 118801, 38 mm SL (below).

3. 結果と考察

土佐湾から得られた *Glossanodon* sp. ニギス属の一種は、次の特徴をもつ未記載種と判明した：背鰭鰭条数 12-13、臀鰭鰭条数 12、胸鰭鰭条数 21-22、腹鰭鰭条数 13、第1鰓耙数 28-30、脊椎骨数 50、鰓条骨数 5、舌歯数 5、下顎歯が下顎の一部に分布、頭長 28% SL、体の背側の黒色斑紋数 6、体側に明瞭な1黒色縦線がない、体側の銀色縦帯が細い (Fig. 1)。

ニギス属は2亜属に分類され、本未記載種は肛門が臀鰭直前で、胸鰭鰭条数が多い (18-25) ことから、ニギス亜属 (14種) に含まれる。ニギス亜属は形態から“*lineatus*”グループ (3種を含む)、“*polli*”グループ (8種)、および“*leioglossus*”グループ (3種) に分類され、本種は鰓条骨数と脊椎骨数によりイチモンジイワシを含む“*lineatus*”グループ (vs. 4と43-44, 55-57) と明瞭に異なる。また、本種はコタカニギスを含む“*polli*”グループとは、胸鰭鰭条数と鰓耙数、歯の特徴などで異なる。本種は“*leioglossus*”グループに属し、大西洋産の *G. leioglossus* とは頭長 (vs. 30-32% SL)、背鰭鰭条数 (vs. 12-14)、鰓耙数 (vs. 34) で、ツマリニギスとは胸鰭鰭条数 (vs. 17-19)、腹鰭鰭条数 (vs. 10-12)、脊椎骨数 (vs. 44-45) や斑紋で異なる。本種はその外観がニギスに極めて類似するが、腹鰭鰭条数 (vs. 10-12)、鰓耙数 (vs. 35-40)、背側の黒色斑紋数 (vs. 7)、体側の銀色縦帯 (vs. 太い) などで識別できる。

本未記載種は、これまでの水産資源調査ではニギスとして扱われていたが、出現数は極めて少なく、成熟サイズや最大体長は不明である。また、体に13本の横帯をもち、当初カゴシマニギスの稚魚とされた標本は、計数形質がよく一致し、DNA バーコーディングからも本未記載種と判明した (Fig. 1)。



Fig. 2 Juveniles of *Glossanodon microcephalus*, BSKU 121591, 25.0 mm SL (A), BSKU 121594, 69.4 mm SL (B).

本研究により、ツマリニギスの稚魚の形態が初めて判明した (Fig. 2)。本種の25mm SLの最小個体では、同サイズのニギス稚魚に見られる多数の黒色横帯がなく、斑紋は成魚と同様である。イチモンジイワシとコタカニギスは体側に1黒色縦線をもち、本科他種と識別できる。イチモンジイワシの稚魚は、黒色素胞が下顎先端と脂鰭にあって、峡部がないが、コタカニギスの稚魚では下顎先端と脂鰭がなく、峡部にある。未記載種と別属のカゴシマニギスの稚魚は、共に13本の黒色横帯をもつが、鰓耙数が大きく異なる (28-30 vs. 6-10)。

日本産のニギス科のうち、サンプルが未入手のイチモンジイワシを除く2属5種をDNA バーコーディングにより解析した。いずれも種レベルで明瞭な違いが認められ、ツマリニギスの稚魚と成魚は同じクレードに含まれた。

深海生物と地球環境に関する啓発活動として、駿河湾で採集した深海魚を教材に、私立成蹊中学校、文京区立文林中学校、沼津市立戸田小学校、群馬県立自然史博物館で出前授業を実施した。

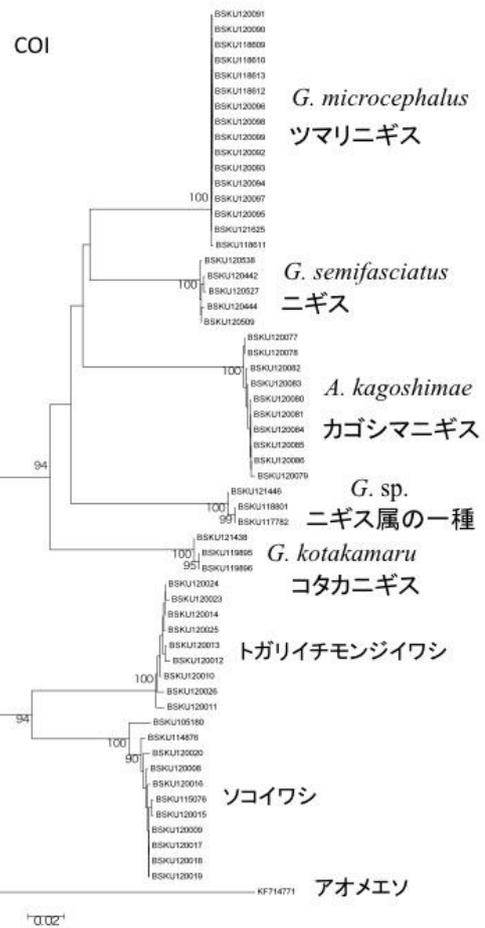


Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method for mitochondrial COI region sequences in five Japanese argentinines and three out-groups. Each value of clade indicates the probability of boot-strap.

4. まとめと今後の展望

日本産ニギス属の分類学的再検討により、1未記載種を発見し、DNA バーコーディングにより4種の遺伝的差異が明瞭となった。また、本属2種の稚魚の形態が新たに判明し、日本産ニギス科2属6種の稚魚の識別が可能となった。今後はニギス属と同様の小型底魚類で、産業重要種のアオメエソを含むアオメエソ属とナガアオメエソ属の分類を再検討する必要がある。本研究成果の一部は、2016年度日本魚類学会年会 (岐阜大学、9月) において、ポスター発表した。

参考文献

- (1) Endo, H., and K. Nashida, 2010: “*Glossanodon kotakamaru*, a new argentine fish from southern Japan (Protacanthopterygii: Argentinidae)”, Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. A, Suppl. 4, 119-127.
- (2) Endo, H., and K. Nashida. 2012: “*Glossanodon microcephalus*, a new argentine fish from Japan and the South China Sea (Protacanthopterygii: Argentinidae)”, Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. A, Suppl. 6, 17-26.
- (3) 遠藤広光, 柳本 卓, 大河俊之, 2016: “土佐湾から得られたニギス科ニギス属の1未記載種”, 2016年度日本魚類学会年会講演要旨集, p. 64