

— 2020年度日本海洋学会岡田賞受賞記念論文 —

分子生物学的手法を用いた動物プランクトンの群集構造解析と多様性に関する研究*

平井 惇也[†]

要 旨

海洋漂泳区の重要な生物群である動物プランクトンは形態分類に高度な専門知識や経験を要し、隠蔽種や未成体個体では形態による識別が困難である。そこで、形態情報に依存せずに動物プランクトン群集を把握するため、超並列シーケンサーによる大量遺伝子配列に基づき群集構造を復元するメタバーコーディングに着目した。はじめに、動物プランクトンで優占し高い多様性を誇るカイアシ類を対象に有用な遺伝子マーカーの選出を行い、メタバーコーディングの手法確立を行った。次に、確立された手法を太平洋広域の表層・中層の動物プランクトン試料へ適用し、太平洋広域のカイアシ類の種多様性・群集構造を網羅的に明らかにした。さらに、海洋の食物網構造や生態系変化を把握するため、メタバーコーディングを水産重要種の食性解析や動物プランクトンのモニタリングへ適用した。

キーワード：動物プランクトン，多様性，群集構造，メタバーコーディング，太平洋

1. はじめに

後生生物 (Metazoa) に属する動物プランクトンは海洋の漂泳区生態系で優占し、2次・3次生産者として食物網、物質循環で重要な役割を果たしている。また、動物プランクトンは海洋生態系の指標生物として有用であり、その群集構造は温暖化や人為汚染をはじめとする環境変化に迅速に応答する。そのため、動物プランクトン群集の正確な把握は海洋生態系の変化を理解する上で非常に

重要である。従来、動物プランクトンは形態的特徴に基づき個体ごとに分類され、その群集構造が把握されてきた。しかし、海洋性動物プランクトンは約7,000種 (Bucklin *et al.*, 2010a) と種多様性が高く、形態分類による種同定には高度な専門知識や経験を必要とし、広範囲の群集構造や多様性の把握には多くの時間・労力を要する。中でも、太平洋は地球上の表面積の30%を占める最大の海盆であり、大西洋に比べ広範囲の動物プランクトンの群集構造・多様性の研究例は限られている。過去には1960-1970年代に主要動物プランクトンの種分布調査がされているが (Briton, 1962; McGown, 1971)、網羅的に動物プランクトン群集を調べた研究例は不足しているのが現状である。

高度な技術を要する形態分類の律速に加え、動物プランクトンには形態的特徴により判別の困難な隠蔽種や未

* 2020年11月26日受領 2020年12月22日受理
著作権：日本海洋学会, 2021年

† 東京大学 大気海洋研究所
〒277-8564 千葉県柏市柏の葉5-1-5
e-mail: hirai@aori.u-tokyo.ac.jp

成体の問題も存在する。これらの問題を解決するため、1990年代に分子生物学的手法が導入され、隠蔽種の検出 (Goetze, 2003), 集団構造の把握 (Goetze, 2005), 分類体系の再検討 (Blanco-Bercial *et al.*, 2011) 等の研究へ発展した。また、2000年代には国際プロジェクト Census of Marine Zooplankton (CMarZ) が始動し、形態情報に依らず動物プランクトンの種同定が可能な DNA バーコーディングの技術が広く浸透した (Bucklin *et al.*, 2010b)。DNA バーコーディングは専門家により形態分類された動物プランクトン種から DNA 抽出を行い、特異的なプライマーを用いた PCR 法による特定の遺伝子領域の増幅後、サンガー法シーケンスにより塩基配列を決定する (Fig. 1)。得られた配列は GenBank 等のデータベースに登録され、遺伝子配列を参照することで種同定が可能となる。CMarZ 等の活動を通じ様々な動物プランクトン種の DNA バーコーディングデータが蓄積され、多くの未記載種の発見にもつながった (Bucklin *et al.*, 2010a)。一方、DNA バーコーディングは個体ごとの遺

伝子解析を必要とし、群集構造や種多様性の全容を把握するには依然として時間・労力のかかる作業であった。

分子生物学的手法の発展は目覚ましく、2000年代半ばに高速かつ高精度に大量の塩基配列を解読可能な超並列シーケンサーが誕生した。この技術は生態学でも導入され、複数種を含む DNA から目的の遺伝子領域の増幅し、塩基配列の解読を網羅的に行うことで群集構造を明らかにするメタバーコーディングへ発展した (Fig. 1)。筆者が分子生物学的手法を用いた動物プランクトンの多様性研究を始めた 2011 年当時、この技術は難培養や現存量の少ない種を含めた微生物群集を網羅的に解明可能な技術として既に活用されていた (Sogin *et al.*, 2006)。一方、海洋における後生生物を対象としたメタバーコーディングはメイオファウナを対象とした研究例等に限定していた (Fonseca *et al.*, 2010)。動物プランクトン群集を対象としたメタバーコーディングは 2013 年まで報告例がなく (Lindeque *et al.*, 2013), その有用性は明らかにされていなかった。そこで、筆者はメタバーコーディングの技術

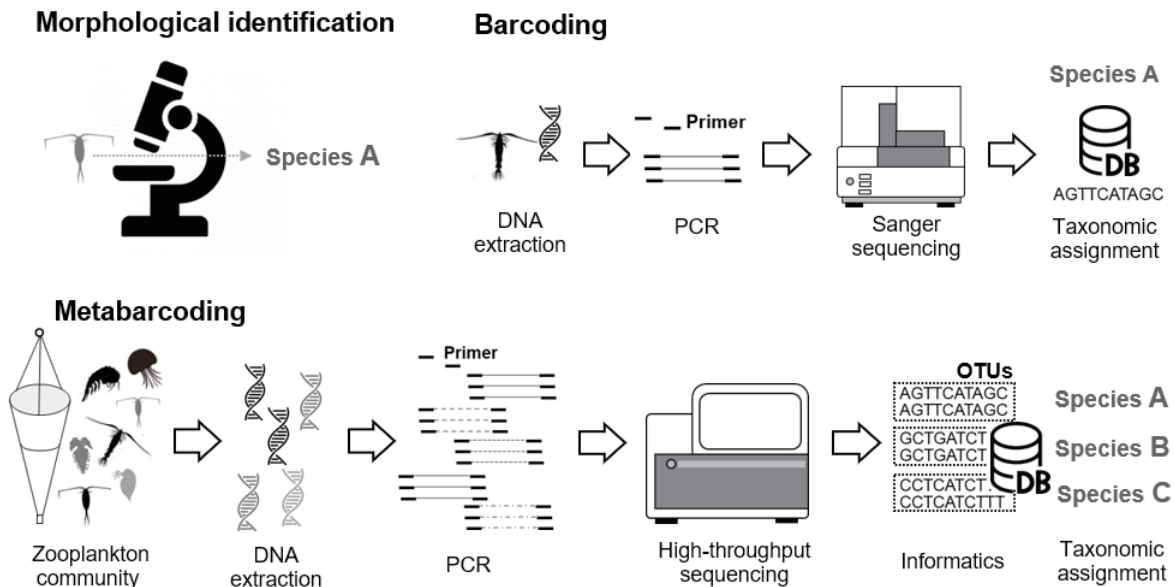


Fig. 1. Schematic of morphological identification, barcoding, and metabarcoding of zooplankton. In metabarcoding, zooplankton samples are collected using a plankton net, and total DNA is extracted from the zooplankton community. Target regions of molecular markers are amplified using polymerase chain reaction (PCR), and sequence data are obtained using a high-throughput sequencer. After bioinformatics analysis, sequence data are clustered into operational taxonomic units (OTUs). The taxonomy of OTUs is determined based on sequence data from public databases.

を導入し、動物プランクトンの群集構造や種多様性を迅速かつ網羅的に把握することを試みた。本稿では、筆者らが確立したカイアシ類のメタバーコーディング手法について説明する。次に、確立された手法を用いた太平洋広域のメタバーコーディング解析を紹介する。また、動物プランクトンのメタバーコーディングによる食性解析および生物モニタリングの研究例を紹介する。

2. カイアシ類のメタバーコーディング手法の確立

メタバーコーディング手法の確立には最適な遺伝子マーカーを選択し、従来法である形態分類との比較からその有用性の検証する必要がある。また、超並列シーケンサーから出力される大量の遺伝子配列は目的配列以外のエラー配列も含み、正確に目的の群集構造を把握するための情報処理法（インフォマティクス）を確立する必要がある。そこで、本章でははじめにカイアシ類の種同定のための遺伝子マーカーの選択について紹介する。また、メタバーコーディング手法の確立とその有用性の確認について紹介する。さらに、カイアシ類のメタバーコーディング手法の低コスト・高精度化についても紹介する。

2.1. 種同定のための遺伝子マーカーの選択

国際プロジェクト CMarZ では塩基配列の変異率が高く、種間で十分な遺伝子配列の差が得られ、汎用プライマー（Folmer *et al.*, 1994）が利用可能なミトコンドリア DNA Cytochrome c oxidase subunit I（COI）領域が DNA バーコーディングの標準的な遺伝子領域として使用された（Bucklin *et al.*, 2010a）。COI 領域の有用性は疑いようがないが、一方で多種多様な動物プランクトンの COI 領域を汎用プライマーで PCR 増幅するのは困難であった。そこで、筆者は海洋性動物プランクトンの中でも優占し、既知種が約 2,700 種（Razouls *et al.*, 2020）と高い種多様性を誇るカイアシ類を対象に、種同定のための遺伝子領域の再検討を行った（Hirai *et al.*, 2013）。

核 DNA はミトコンドリア DNA に比べ進化速度が遅く、カイアシ類でも種間で塩基配列の差が少ない（Blanco-Bercial *et al.*, 2011）。一方、核 DNA は保存領域の塩基配列の違いが種間で少なく、多様な種に適用可能な汎

用プライマーの設計が容易という利点がある。そこで、核 DNA の遺伝子領域の中でも比較的配列の変異の大きく、領域同士が隣接する 28S 領域および ITS2 領域に着目した。ITS2 領域および 28S の D1/D2 領域をまたぐプライマーを用いて PCR を行ったところ、カイアシ類 244 個体（59 種）のうち 232 個体で PCR 増幅に成功した。一方、COI 領域は 244 個体中 77 個体のみで PCR 増幅が認められた。また、ITS2-28S D1/D2 領域は種間で配列の差が見られ、複数の形態種からは隠蔽種と考えられる種内の遺伝子グループが検出された。これらの結果から、ITS2-28S D1/D2 領域はカイアシ類の種同定に有用な遺伝子マーカーであることが確認された。

2.2. カイアシ類のメタバーコーディング

メタバーコーディングの遺伝子領域の条件として、様々な種が増幅可能なプライマーが構築可能なこと、種間で塩基配列の差があること、超並列シーケンサーで解析可能な長さであることが挙げられる。研究当時、メタバーコーディングで一般的な超並列シーケンサーは 454 GS システム（Roche 社）であり、約 400-700 bp の配列を 1 ランあたり 10-100 万配列取得可能であった。一方、ITS2-28S D1/D2 は約 1,000 bp であり、メタバーコーディングのため遺伝子マーカーの選定が必要であった。ITS2 領域は変異が大きく、配列は解析可能な長さであるが、データベースに登録されている配列情報の不足、種内・個体間で配列の変異が大きいという問題があった。一方、28S D2 領域はカイアシ類で約 400 bp と最適な長さであり、比較的塩基配列の変異が大きい、データベースが ITS に比べて充実、系統関係を反映可能という利点が挙げられた。構築した 28S D2 領域のプライマーは 100 種以上のカイアシ類全てで PCR 増幅が確認されたため、カイアシ類のメタバーコーディングに 28S D2 領域を採用した。

遺伝子マーカーの選定後、カイアシ類のメタバーコーディング手法の確立を行った（Hirai *et al.* 2015a）。メタバーコーディングでは大量配列をインフォマティクスにより解析し、相同性に基づいた便宜的な種である Operational Taxonomic Units（OTUs）に分類する。そこで、28S D2 領域の配列を取得済みのカイアシ類 33 種を使用し、メタバーコーディング解析を行った。エラーを除去

しつつ、種間の解像度を残し OTUs に分類する方法が検証され、試料中のカイアシ類の情報はメタバーコーディングの結果にも反映された。次に、黒潮域 3 点 (黒潮内側・流軸・外側) で得られた動物プランクトン試料を分割し、メタバーコーディングと形態分類の結果と比較した。その結果、優占種や優占分類群は各解析で一致し、OTU 内の遺伝子配列数 (リード数) は由来する種の生物量を反映することが示唆された (Fig. 2)。OTU 数は形態分類で得られた種数より各地点で高く、メタバーコーディングが隠蔽種を含め高感度に試料内の種多様性を検出することが示された。さらに、確立した手法を太平洋熱帯・南北亜熱帯の表層試料 (0-200 m) に適用したところ、既往知見と一致する水塊構造に応じた異なる群集構造や種多様性パターンが検出された (Hirai and Tsuda, 2015)。低緯度域は種多様性が高く形態分類も困難であるが、メタバーコーディングにより広範囲のカイアシ類の群集構造や種多様性が迅速に解明可能であることが示

された。

2.3. メタバーコーディング手法の高度化

カイアシ類のメタバーコーディング手法は確立されたが、シーケンサー技術の発展は目覚ましく、手法開発で使用した 454 システム (Roche 社) は 2016 年でサービス提供が終了することとなった。代わりに台頭したのは 1 ランあたり約 2,500 万配列が解読可能な MiSeq システム (Illumina 社) を用いたメタバーコーディングである。Illumina 社の超並列シーケンサーは読み取り長が短いのが特徴であったが、配列の両端から最長 300 bp を高精度に解読する技術が開発され、メタバーコーディングに広く利用された。そこで、筆者らも動物プランクトンにおけるメタバーコーディングの将来性を考慮し、MiSeq システムを用いたカイアシ類のメタバーコーディングを行い、インフォマティクスの改良や参照とするデータベースの更新も行った (Hirai *et al.*, 2017a)。454 システムを

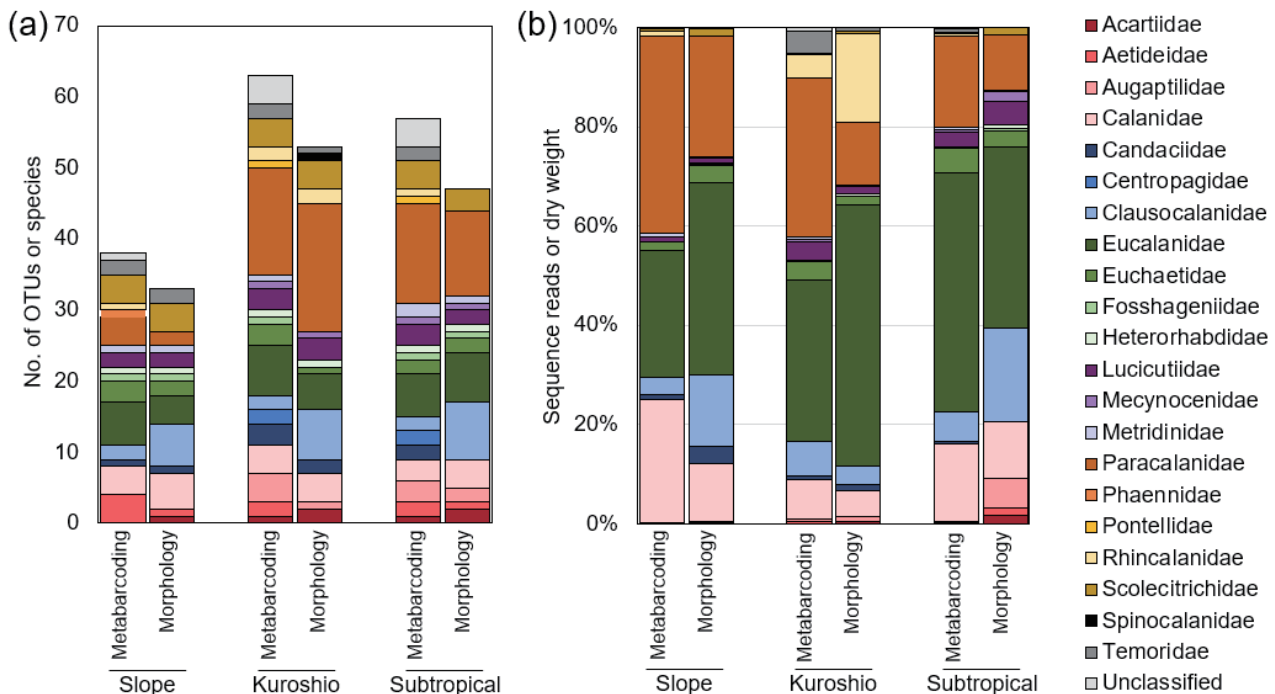


Fig. 2. Comparison of metabarcoding and morphological analyses of epipelagic calanoid copepods at three stations (Slope, Kuroshio, and Subtropical) in the Kuroshio region. (a) Numbers of operational taxonomic units (OTUs) and morphological species. Different colors show family-level taxonomy. (b) Family-level taxonomic proportions of sequence read and dry weight. This figure is modified from Hirai *et al.* (2015a).

用いた結果と比較し、新たな手法はより多くのエラー配列を除去し、OTUの種への分解能が高くなることが明らかとなった。MiSeqシステムは454システムに比べ1試料あたりのランニングコストも安く、MiSeqシステムを用いることでより高精度、低コストでカイアシ類のメタバーコーディングが可能となった。

3. 太平洋広域のメタバーコーディング解析

2011-2017年に白鳳丸航海を中心とした研究航海に乗船し、太平洋外洋域を中心に動物プランクトンの群集試料を採集した。採集には鉛直多層式開閉ネット (Vertical Multiple Plankton Sampler: VMPS) を用い、表層 (0-200 m) および中層2層 (200-500 m, 500-1,000 m) の全3

層で動物プランクトン試料を得た。黒潮域の試料は中央水産研究所の蒼鷹丸に乗船し、採集を行った。これらの計73地点205試料に前章で確立されたカイアシ類のメタバーコーディングを適用し、約300万の28S D2領域の配列が1,659 OTUsに分類された。本章ではこれらのOTUsの情報から得られた太平洋広域のカイアシ類の群集構造と種多様性の研究 (Hirai *et al.*, 2020) について紹介する。

3.1. カイアシ類の群集構造

カイアシ類の群集構造は各層で大きく異なり、特に表層と中層の間で大きな群集構造の変化が見られた (Fig. 3の(a))。表層では環境変化が大きく、海域間での変化が特に明確であった。一方、中層は環境変化に乏しい

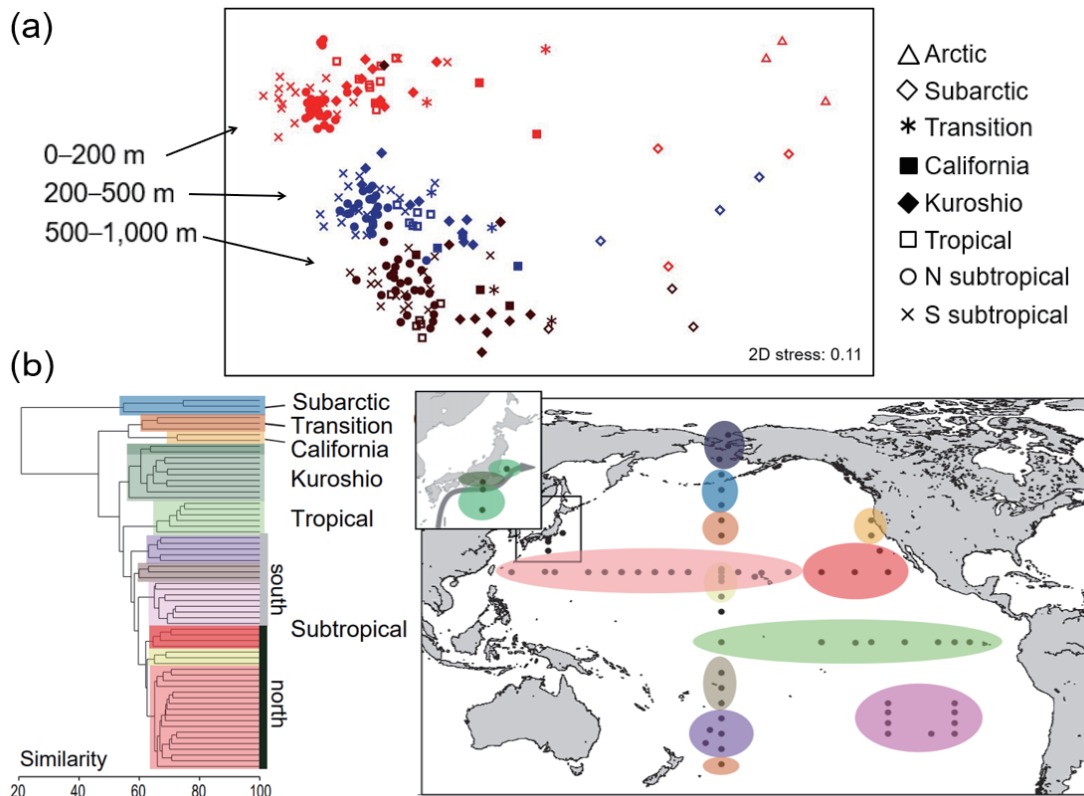


Fig. 3. Community structure of copepods using Sørensen similarity based on the presence/absence of operational taxonomic units (OTUs) from the metabarcoding analysis in the Pacific region. (a) Multidimensional scaling analysis of all samples. Sampling depths are indicated by colors (red: 0-200 m, blue: 200-500 m, and brown: 500-1,000 m). (b) Cluster analysis through the sampling layers (0-1000 m) and geographic distribution of clustered groups. This figure is modified from Hirai *et al.* (2020).

が、表層環境と対応した海域間の群集構造の変化が見られ、表層からのフラックス等が中層のカイアシ類群集構造に影響を与えると考えられた。また、群集構造は高緯度の冷水域と低緯度の暖水域で大きく異なり (Fig. 3 の (b)), 表層水温が広域のカイアシ類の群集構造に最も影響を及ぼす環境要因であった。群集構造は冷水域・暖水域内でも細かく変化し、暖水域内では水温とともにクロロフィル *a* 濃度の影響も大きく、植物プランクトン量もカイアシ類の群集構造に関わる重要な環境要因であることが明らかとなった。また、亜寒帯等の他の海域と比較して環境変化の乏しい亜熱帯においても南北亜熱帯域で群集構造は異なり、各亜熱帯域においても東西差や緯度変化があることが判明した。これらは遺伝子配列に基づくメタバーコーディングならではの結果であり、外洋域においても物理的距離や細かな環境変化がカイアシ類の群集構造に影響を与えることを示している。形態分類では低緯域の広範囲に分布するカイアシ類が多く報告されているが、カイアシ類は各地域の環境に応じて適応進化し、現在の細分化された群集構造 (Fig. 3 の (b)) が形成されていると考えられる。

3.2. 多様性の水平・鉛直変化

種多様性の指標である OTU 数の水平変化は表面水温に強く影響を受け、各層で種多様性が低緯度域で高く、高緯度域で低くなる緯度変化が見られた (Fig. 4 の (a) (b))。均衡度や系統的な多様性も低緯度域で高く、貧栄養海域においてカイアシ類は限られた資源を分け合い、多様な分類群の種が共存関係にあることを示す結果となった。また、OTUs の配列データを利用しカイアシ類の各科で系統解析を行ったところ、高緯度の OTUs は低緯度の OTUs から派生し、進化的に比較的新しい傾向が示された (Fig. 4 の (c))。この結果は低緯度域の群集は進化的な歴史が長く、高頻度の種分化により種多様性が高くなる 'out of the tropics 仮説' (Jablonski *et al.*, 2006) を支持する結果であった。また、OTU 数は北太平洋亜熱帯循環で最大となり、熱帯から南太平洋亜熱帯は明確な違いのない非対称的な種多様性の緯度変化が見られた。北太平洋は南太平洋に比べ海洋の面積も広く、北太平洋中層水と南極中層水の二つが交わり、西岸境界流である黒潮が存在する。これらの複雑な水塊構造が種分化に働

き、高い種多様性が低緯度域特有の共存関係で維持されていると考えられる。

種多様性の鉛直変化は従来の知見と同様に、中層で高い OTU 数が各海域で観察された (Fig. 4 の (a))。一方、系統的な多様性は深度に伴い減少した。中層は Augaptiloidea, Bathpontioidea, Spinocalanoidea 等に属する特定の分類群の OTUs により主に構成され、各分類群内の適応放散により現在の高い種多様性が形成されたと考えられた。そのため、カイアシ類の種多様性は現在の環境要因のみならず、進化的な要因が大きく関わることでメタバーコーディングにより明らかとなった。中層において近縁種は細分化された鉛直分布を示すことが報告されており (Kuriyama and Nishida, 2006)、多様な分類群が共存する表層とは異なる種多様性の維持機構が中層には存在すると考えられる。また、中層の種多様性は群集構造と同じく表層環境、特に水温の影響を大きく影響を受けていた。そのため、現在進行する地球温暖化は表層のみならず中層の群集構造や種多様性にも影響を及ぼすと予想される。また、表層種と中層種の進化過程に関する明確な関係性は本研究のみからは見いだされず、今後の課題となった。

4. 食性解析・生物モニタリングへの応用

メタバーコーディングは配列情報から群集構造が把握可能であり、形態的特徴に乏しい消化管内容物の解析にも適している。また、データが容易に比較可能であるため、動物プランクトンの群集構造や種多様性の長期的な変化をモニタリング可能であり、海洋モニタリングにおいて導入が進められている (Berry *et al.*, 2019; Djurhuus *et al.*, 2020)。そこで、本章ではメタバーコーディングを食性解析および生物モニタリングに適用した研究を紹介する。

4.1. イワシ類仔魚につながる食性解析

小型動物プランクトンはイワシ類仔魚期の重要な餌料であるが、仔魚の微小なサイズ、形態情報に乏しい消化管内容物から詳細な餌の情報は得られていない。そこで、2015年2月に土佐湾で試料を採集し、真核生物全体を対象とする 18S メタバーコーディングを行いマイワシ・ウ

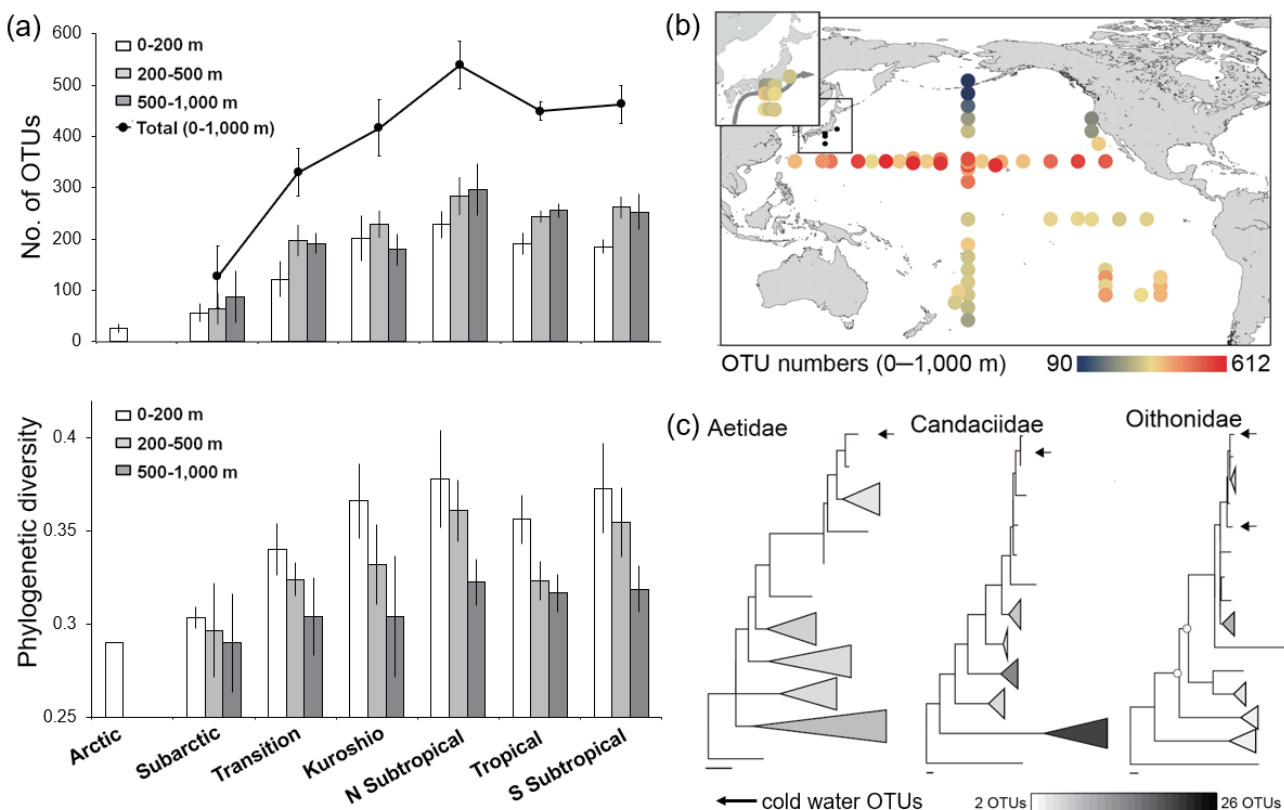


Fig. 4. (a) Horizontal and vertical patterns of species diversity based on the number of operational taxonomic units (OTUs) and phylogenetic diversity in copepods. (b) The geographic distribution of OTUs in the sampling layers (0–1000 m) is indicated by the colors at each location. (c) Examples of phylogenetic analysis in taxonomic families of copepods for OTUs with warm-water and cold-water distributions. OTUs with cold-water distributions are indicated by arrows. Genetic lineages containing multiple OTUs with warm-water distributions are presented as triangles for simplicity. The number of OTUs within each triangle is represented by the white-black (low to high) spectrum. Scale bars indicate 0.02 genetic distances. This figure is modified from Hirai *et al.* (2020).

ルメイワシ仔魚の消化管内容物および環境中のプランクトン相を調べた (Hirai *et al.*, 2017b)。形態からは識別が困難な原生生物やゼラチン質プランクトンが検出されるとの事前の予想に反し、真核生物全体の解析からは後生動物が、後生動物の解析からは従来の知見の通りカイアシ類の配列が大部分を占めた (Fig. 5)。カイアシ類の中では黒潮内側域の大型種 *Calanus sinicus* 由来の配列が最も検出され、仔魚の体サイズを考慮すると *C. sinicus* の未成体個体が重要な餌料であると考えられた。魚種による明確な餌料の違いは見られず、マイワシ・ウルメイワシは好適な産卵場は異なるが、仔魚が同所的に分布す

る際は競合関係になることが示された。環境中の小型プランクトンのメタバーコーディングの結果、優占種は小型種の *Paracalanus* sp. であり、*C. sinicus* の未成体は2番目に優占していた。そのため、環境中の優占度だけでなく、カイアシ類の発育段階も仔魚の餌料選択に大きく影響を及ぼすことが確かめられ、大型カイアシ類の重要性が明らかとなった。

さらに、イワシ類仔魚の重要な餌料として検出された *C. sinicus* の雌成体を対象とし、消化管内容物解析を同様のメタバーコーディング手法により行った (Hirai *et al.*, 2018)。その結果、主要な餌料として認識されている

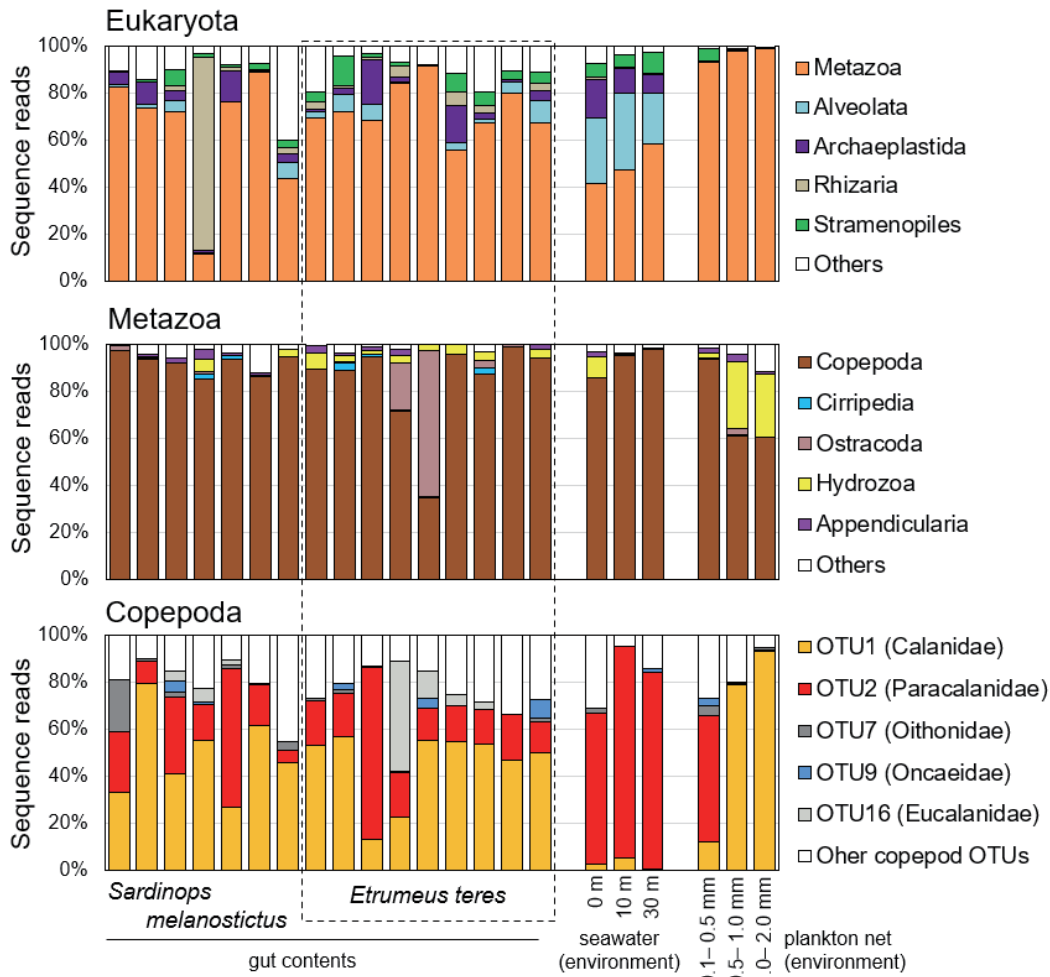


Fig. 5. Dietary analysis of the gut contents of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) and Pacific round hering (*Etrumeus teres*) larvae in the Tosa Bay using 18S metabarcoding analysis. Results of environmental plankton communities are also presented for samples of filtered seawater and size-fractionated zooplankton. This figure is modified from Hirai *et al.* (2017b).

植物プランクトンや小型甲殻類に加え、アメーバ様の原生生物であるラビリンチュラ類も消化管内容物から検出された。ラビリンチュラ類はイワシ類にも多く含まれるDHAなど高度不飽和脂肪酸を細胞内に多く蓄積することが知られている。また、ラビリンチュラ類は従属栄養性の生物群であり、本研究で検出された *Aplanochytrium* 属は生きた珪藻を捕食することが近年報告されている (Hamamoto and Honda, 2019)。そのため、これまでに認識されていない捕食-被食関係が日本周辺のカイアシ類、またイワシ類等の水産重要種の生産を支える一つの

要因である可能性が示唆された。

4.2. 黒潮域における小型カイアシ類のモニタリング

水産重要種の仔魚期の餌として重要な小型カイアシ類であるが、その群集構造のモニタリングは従来法では困難であった。そこで、中央水産研究所が黒潮域で年5回実施する海洋モニタリング (O-line) に参加し、サイズ別のカイアシ類のメタバーコーディングを行った (Hirai *et al.*, 2021)。動物プランクトン試料は2013-2016年に北太平洋標準プランクトンネット (目合い 100 μm) を用い

て表層 (0-200 m) で採集し、黒潮外側 (主に北緯 30 度)・内側域 (主に北緯 34 度) の小型カイアシ類画分 (< 0.5 mm) の季節・経年変化を調べた (Fig. 6 の (c))。また、得られた結果は白鳳丸航海で採集した亜熱帯循環 (北緯 23 度) の試料と比較した。その結果、黒潮内側・外側は季節を通じて異なる特徴的なカイアシ類の群集構造を示した。また、夏季には亜熱帯循環に分布する種が黒潮域に流入し、季節的に非常に高い種多様性が黒潮域で示された。さらに、黒潮域では大型種由来の配列の割合が小型カイアシ類画分で高く (黒潮内側: 平均 28.8%, 黒潮外側: 平均 24.7%, 亜熱帯循環: 平均 11.9%), 大型種の未成体個体が重要であった。小型画分は水温等の環境要因の影響を受けやすく、黒潮内側域でイワシ類仔魚の餌として重要な *C. sinicus* を含む大型種未成体の割合も大きな季節・経年変化を示し、これらの変動は水産重

要種の資源量変動にも関わると考えられた。

4.3. 紋別における動物プランクトンのモニタリング

北海道北東部に位置する紋別では沖合約 1 km に位置するオホーツクタワーにおける海洋モニタリングが行われ、動物プランクトンも週 1 回の試料採集が継続的に行われている。採集地点は水深約 10 m の沿岸域に位置し、底生生物の浮遊幼生を含む小型動物プランクトンが多く、形態分類による詳細な解析は困難であった。そこで、形態分類に加えて 18S 領域のメタバーコーディングを導入し、動物プランクトン群集のモニタリングを行った。初めに、モニタリングで使用される目合い 100 μm の北原式定量ネットと目合い 335 μm の北太平洋標準プランクトンネットの比較を行い、細かい目合いのほうが底生生物の浮遊幼生を含む網羅的な種多様性評価が可能であ

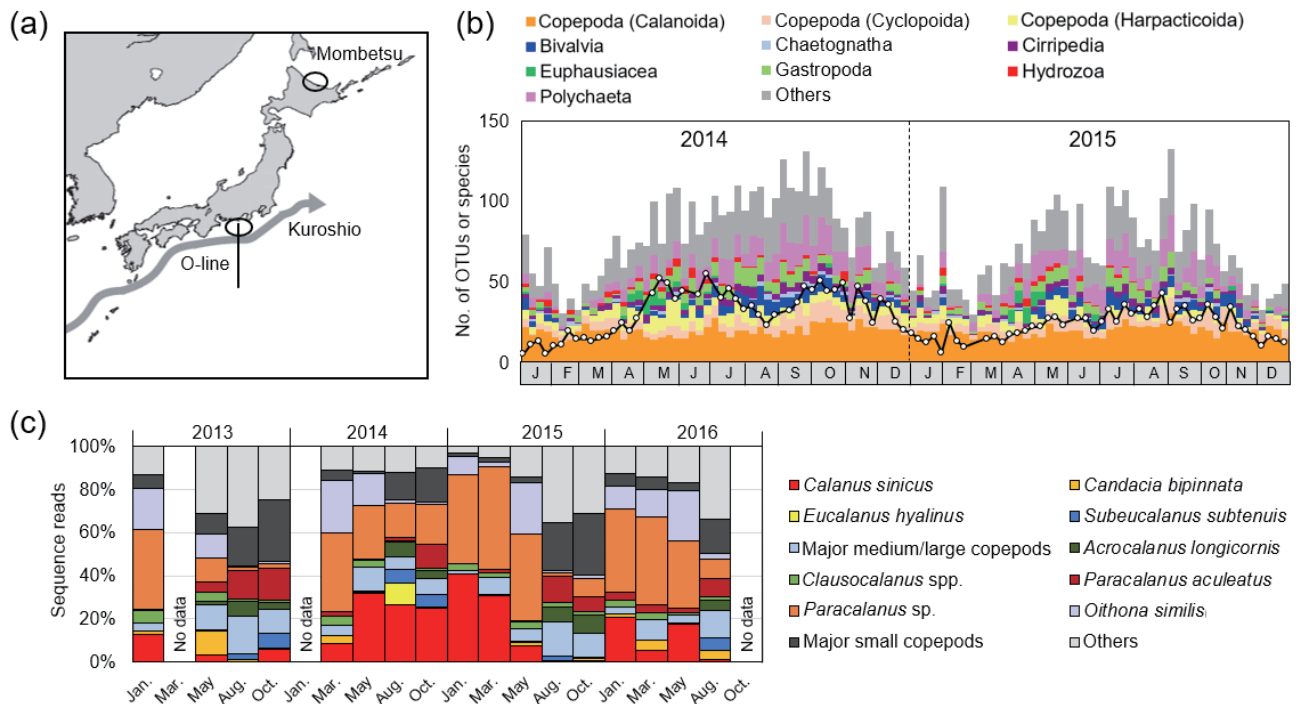


Fig. 6. Biomonitoring of zooplankton communities using metabarcoding analysis. (a) Map of study sites. (b) Weekly changes in the taxonomic composition of zooplankton based on the numbers of operational taxonomic units (OTUs) in 2014-2015 in the coastal waters of the Okhotsk Sea off Mombetsu city. The white circle represents the number of species based on the morphological classifications. (c) Seasonal changes in the dominant copepod OTUs in the small size fraction (0.1-0.5 mm) in 2013-2016 are presented for the O-line in the Kuroshio Current's in-shore area. This figure is modified from Hirai *et al.* (2017c) and Hirai *et al.* (2021).

り、よりメタバーコーディングの利点を活かせることが確かめられた (Hirai *et al.*, 2015b)。次に、2014-2015年の採集された動物プランクトン試料をメタバーコーディング解析し、形態分類で得られた結果との比較を行った (Hirai *et al.*, 2017c)。その結果、メタバーコーディングではより多くの生物が検出され、水温を中心とした季節変化に応じた生物相や種多様性の変化の結果が明確に得られた (Fig. 6の (b))。また、底生生物の浮遊幼生の詳細な解析も可能となり、ホタテガイ幼生など水産重要種の検出にも有用であることが示された。海洋の昇温化や酸性化が進む現在、動物プランクトン群集のモニタリングを継続し、メタバーコーディングのような高精度解析により生物分布や生態系の変化を追うことは今後の重要な課題であると考えられる。

5. おわりに

本論文では動物プランクトンのメタバーコーディングの研究例について紹介した。研究開始当時に比べ、コストの低下や解析技術のノウハウの蓄積により、動物プランクトンを対象としたメタバーコーディングも一般的になりつつある。国際的な活動では、地球規模の動物プランクトンのDNAバーコーディングデータの充実およびメタバーコーディング解析の発展のため、Scientific Committee on Oceanic Research (SCOR) のワーキンググループ MetaZooGene も 2019年に始動した。また、本稿で紹介した研究や Tara Ocean Project (de Vargas *et al.*, 2015) をはじめとし、広範囲の動物プランクトンのメタバーコーディングデータが蓄積されつつある。しかし、プランクトンのパラドックス (Hutchinson, 1961) として知られ、同所的に多種が共存する種多様性の維持機構は依然として明らかにされていない。今後はメタバーコーディングデータの蓄積により、半世紀議論が続くプランクトンのパラドックスの解明につながることを期待される。生物モニタリングや食性解析でもメタバーコーディングは広く利用されつつあり、本稿で紹介した手法もクロマグロ仔魚 (Kodama *et al.*, 2017; 2020) や黒潮域の魚類仔魚 (Kume *et al.*, 2021) の食性解析に適用されている。将来的にはメタバーコーディングのデータが蓄積され、環境変化に対する動物プランクトン群集の応答や海

洋食物網構造の知見が蓄積されるはずである。

群集構造や種多様性の網羅的な手法として認知されつつあるメタバーコーディングであるが、シーケンス技術やインフォマティクスの技術の発展は目覚ましく、現在進行形で最適な手法は変化している。例えば、環境中の水をフィルター上にろ過し、メタバーコーディング解析を行うことで生物相を明らかにする環境DNAの技術開発は魚類を中心に近年盛んに行われている。動物プランクトンでは研究例が少ないが (Djurhuus *et al.*, 2018; Suter *et al.*, in press)、この技術は微生物から大型生物まで同一の試料から検出が可能であり、動物プランクトンにおいても細かな水平・鉛直分布の調査等に活用可能であると考えられる。また、採集手法の違いが動物プランクトンのメタバーコーディングの手法標準化の律速となっているが、環境DNAを用いることで地球規模のデータ比較も容易になる可能性がある。シーケンサーの低コスト・高精度化もさらに進んでおり、小型シーケンサーを用い船上でプランクトン相がリアルタイムに把握可能になりつつある。新たな技術の導入により膨大データを取得可能になるが、これらはあくまで動物プランクトンの生態を理解するための手段にすぎない。そのため、何を知りたいのかを明確に考えた上、最新技術を動物プランクトンの生態学の発展に活かすことが重要である。

最後に、メタバーコーディングは形態的特徴に依らずに動物プランクトンの群集構造・種多様性を網羅的に解析可能であるが、従来の形態分類の重要性を否定するものでは決してない。動物プランクトンの種名は形態情報に基づいており、これまで分類学者の努力により整った分類体系が確立されている。メタバーコーディングでは参照する遺伝子配列のデータベースが必須であり、これらは CMarZ の活動をはじめとし、分類学者の協力の下に成り立つものである。また、動物プランクトンは重要種であっても分類学的問題を抱えることが多く、これらの問題を解決するには形態および遺伝子解析が必要となる (例えば Hidaka *et al.* 2016)。そのため、今後も分類学者と連携し、各地域における種の遺伝子データの登録、分類体系の整理を地道に行う作業は必須である。

謝 辞

この度は名誉ある日本海洋学会岡田賞に選出いただき、誠に光栄です。推薦ならび選考に携わっていただいた皆様に深く感謝いたします。本賞を励みとし、今後も海洋学の発展に貢献できるよう努めてまいります。

受賞の対象となった研究は博士課程以降に継続的に行った成果であり、多くの方々の協力の下に進めることができました。指導教員である東京大学大気海洋研究所の津田敦先生には観測から論文発表に至る海洋学の研究者としての姿勢を教わりました。また、何よりも研究は多くの人の協力により成立することを学びました。研究室の先輩・同期・後輩と過ごした時間は代え難いものであり、西田周平先生、西川淳先生には多くの助言をいただきました。メタバーコーディングの開発は下出信次教授、栗山美紀子博士らの協力で成果を公表することができました。また、古谷研教授を代表とする新学術領域「新海洋像」の一員としてプロジェクトに参加し、採集機会や様々な研究分野の方から助言をいただけました。卒業後も立花愛子博士らの協力があり、プロジェクトを通じ太平洋の広域試料の採集を継続出来たことは大変幸運でした。

学振特別研究員 (PD) として在籍した中央水産研究所では、受け入れ研究者である市川忠央博士、小笠恒夫博士、杉崎宏哉博士の下、メタバーコーディングのモニタリングや食性解析への適用が実現しました。また、日高清隆博士、清水勇吾博士、廣江豊博士、日下彰博士、森田宏さんをはじめとし、定期観測ライン (O-line) のメンバーと過ごした航海からは観測や海洋学全般について多く学びました。何より、多くの陸上・船舶スタッフに支えられ、チームとして研究を進める楽しさを経験出来たのはこの学振特別研究員の時代です。長井敏博士には分子生物学的手法の専門的な助言をいただき、メタバーコーディングの手法の高度化が実現しました。紋別市での海洋モニタリングは片倉靖次博士に試料を解析する機会を与えていただき、吉田瞳さんをはじめとする現場スタッフの協力の下に研究を進めることが出来ました。

現在の所属先である東京大学大気海洋研究所では白鳳丸を中心とした航海に乗船し、研究をさらに発展させる

機会を得ています。浮遊生物分野の津田先生、研究室を支える西部裕一郎准教授、鈴木友美さん、また国際協力分野の齊藤宏明教授らと協力する中で充実した研究を送っています。また、学生との議論では自分が教えられることも多く、研究について深く考える貴重な時間となっています。自身のこれまでの研究を通し、Erica Goetze 教授からは多くの助言をいただきました。彼女の認める成果を出すことが研究の一つのモチベーションとなっています。また、メタバーコーディングをはじめとする分子生物学的手法を通じ、伊東宏博士、児玉武稔博士、小針統准教授、久米元准教授、本多大輔教授らと共同研究を進めることが出来ました。研究を通じて得られた人脈は何にも代えがたいものであり、人とのつながりを大切に、今後の海洋学の発展に貢献出来るように邁進いたします。最後に、研究者としてだけでなく一人の人間として私を支え成長させてくれる家族に心より感謝を申し上げます。

References

- Berry, T. E., B. J. Saunders, M. L. Coghlan, M. Stat, S. Jarman, and A. J. Richardson (2019): Marine environmental DNA biomonitoring reveals seasonal patterns in biodiversity and identifies ecosystem responses to anomalous climatic events. *PLoS Genet.*, **15**, e1007943.
- Blanco-Bercial, L., J. Bradford-Grieve, and A. Bucklin (2011): Molecular phylogeny of the Calanoida (Crustacea: Copepoda). *Mol. Phylogenet. Evol.*, **59**, 103-113.
- Brinton, E (1962): The distribution of Pacific euphausiids. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr. Univ. Calif.*, **8**, 51-270.
- Bucklin, A., S. Nishida, S. Schnack-Schiel, P. H. Wiebe, D. Lindsay, R. J. Machida, and N. J. Copley (2010a): A census of zooplankton of the global ocean, p 247-265. In *Marine Life: Diversity, Distribution, and Abundance*, edited by A. McIntyre, Wiley-Blackwell, Oxford.
- Bucklin, A., B. D. Ortman, R. M. Jennings, L. M. Nigro, C. J. Sweetman, N. J. Copley, T. Sutton, and P. H. Wiebe (2010b): A "Rosetta Stone" for metazoan zooplankton: DNA barcode analysis of species diversity of the Sargasso Sea (Northwest Atlantic Ocean). *Deep-Sea Res. II*, **57**, 2234-2247.
- de Vargas, C., S. Audic, N. Henry, J. Decelle, F. Mahé, R. Logares, E. Lara, C. Berney, N. Le Bescot, I. Probert, M. Carmichael, J. Poulain, S. Romac, S. Colin, J. Aury, L. Bittner, S. Chaffron, M. Dunthorn, S. Engelen, O. Flegontova, L. Guidi, A. Horák, O. Jaillon, G. Lima-Mendez, J. Lukeš, S. Malviya, R. Morard, M. Mulot, E. Scalco, R. Siano, F. Vincent, A. Zingone, C. Dimier, M. Picheral, S. Searson, S. Kandels-Lewis, Tara Oceans Coordinators, S. G. Acinas, P. Bork, C. Bowler, G. Gorsky, N. Grimsley, P. Hingamp, D. Iudicone, F. Not, H. Ogata, S. Pesant, J. Raes, M. E. Sieracki, S. Speich, L. Stemann, S. Sunagawa, J. Weissenbach, P. Wincker, and E. Karsenti (2015): Eukaryotic plank-

- ton diversity in the sunlit ocean. *Science*, **348**, 1261605.
- Djurhuus, A., K. Pitz, N. A. Sawaya, J. Rojas-Márquez, B. Michaud, E. Montes, F. Muller-Karger, and M. Breitbart (2018): Evaluation of marine zooplankton community structure through environmental DNA metabarcoding. *Limnol. Oceanogr. Methods*, **16**, 209–221.
- Djurhuus, A., C. J. Closek, R. P. Kelly, K. J. Pitz, R. P. Michisaki, H. A. Starks, K. R. Walz, E. A. Andruszkiewicz, E. Olesin, K. Hubbard, E. Montes, D. Otis, F. E. Muller-Karger, F. P. Chavez, A. B. Boehm, and M. Breitbart (2020): Environmental DNA reveals seasonal shifts and potential interactions in a marine community. *Nat. Commun.*, **11**, 254.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, and R. Vrijenhoek (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, **3**, 294–299.
- Fonseca, V. G., G. R. Carvalho, W. Sung, H. F. Johnson, D. M. Power, S. P. Neill, M. Packer, M. L. Blaxter, P. J. D. Lamshead, W. K. Thomas, and S. Creer (2010): Second-generation environmental sequencing unmasks marine metazoan biodiversity. *Nat. Commun.*, **1**, 98.
- Goetze, E. (2003): Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **270**, 2321–2331.
- Goetze, E. (2005): Global population genetic structure and biogeography of the oceanic copepods *Eucalanus hyalinus* and *E. spinifer*. *Evolution*, **59**, 2378–2398.
- Hamamoto, Y., and D. Honda (2019): Nutritional intake of *Aplanochytrium* (Labyrinthulea, Stramenopiles) from living diatoms revealed by culture experiments suggesting the new prey-predator interactions in the grazing food web of the marine ecosystem. *PLoS ONE*, **14**, e0208941.
- Hidaka, K., H. Itoh, J. Hirai, and A. Tsuda (2016): Occurrence of the *Paracalanus parvus* species complex in offshore waters south of Japan and their genetic and morphological identification to species. *Plankton Benthos Res.*, **11**, 131–143.
- Hirai, J., S. Shimode, and A. Tsuda (2013): Evaluation of ITS2–28S as a molecular marker for identification of calanoid copepods in the subtropical western North Pacific. *J. Plankton Res.*, **35**, 644–656.
- Hirai, J., and A. Tsuda (2015): Metagenetic community analysis of epipelagic planktonic copepods in the tropical and subtropical Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **534**, 65–78.
- Hirai, J., M. Kuriyama, T. Ichikawa, K. Hidaka, and A. Tsuda (2015a): A metagenetic approach for revealing community structure of marine planktonic copepods. *Mol. Ecol. Resour.*, **15**, 68–80.
- Hirai, J., M. Yasuike, A. Fujiwara, Y. Nakamura, S. Hamaoka, S. Katakura, Y. Takano, and S. Nagai (2015b): Effects of plankton net characteristics on metagenetic community analysis of metazoan zooplankton in a coastal marine ecosystem. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, **469**, 36–43.
- Hirai, J., S. Nagai, K. and Hidaka (2017a): Evaluation of metagenetic community analysis of planktonic copepods using Illumina MiSeq: Comparisons with morphological classification and metagenetic analysis using Roche 454. *PLoS ONE*, **12**, e0181452.
- Hirai, J., K. Hidaka, S. Nagai, and T. Ichikawa (2017b): Molecular-based diet analysis of the early post-larvae of Japanese sardine *Sardinops melanostictus* and Pacific round herring *Etrumeus teres*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **564**, 99–113.
- Hirai, J., S. Katakura, H. Kasai, and S. Nagai (2017c): Cryptic zooplankton diversity revealed by a metagenetic approach to monitoring metazoan communities in the coastal waters of the Okhotsk Sea, northeastern Hokkaido. *Front. Mar. Sci.*, **4**, 374.
- Hirai, J., Y. Hamamoto, D. Honda, and K. Hidaka (2018): Possible aplanochytrid (Labyrinthulea) prey detected using 18S metagenetic diet analysis in the key copepod species *Calanus sinicus* in the coastal waters of the subtropical western North Pacific. *Plankton Benthos Res.*, **13**, 75–82.
- Hirai, J., A. Tachibana, and A. Tsuda (2020): Large-scale metabarcoding analysis of epipelagic and mesopelagic copepods in the Pacific. *PLoS ONE*, **15**, e0233189.
- Hirai, J., K. Yamazaki, K. Hidaka, S. Nagai, Y. Shimizu, and T. Ichikawa (2021): Characterization of diversity and community structure of small planktonic copepods in the Kuroshio region off Japan using a metabarcoding approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **657**, 25–41.
- Hutchinson, G. E. (1961): The paradox of the plankton. *Am. Nat.*, **95**, 137–145.
- Jablonski, D., K. Roy, and J. W. Valentine (2006): Out of the tropics: evolutionary dynamics of the latitudinal diversity gradient. *Science*, **314**, 102–106.
- Kodama, T., J. Hirai, S. Tamura, T. Takahashi, Y. Tanaka, T. Ishihara, A. Tawa, H. Morimoto, and S. Ohshimo (2017): Diet composition and feeding habits of larval Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, in the Sea of Japan: Integrated morphological and metagenetic analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **583**, 211–226.
- Kodama, T., J. Hirai, A. Tawa, T. Ishihara, and S. Ohshimo (2020): Feeding habits of the Pacific Bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) larvae in two nursery grounds based on morphological and metagenetic analyses. *Deep-Sea Res. II*, **175**, 104745.
- Kuriyama M, and S. Nishida (2006): Species diversity and niche-partitioning in the pelagic copepods of the family Scolecitrichidae (Calanoida). *Crustaceana*, **79**, 293–317.
- Kume, G., T. Kobari, J. Hirai, H. Kuroda, T. Takeda, M. Ichinomiya, T. Komorita, M. Aita-Noguchi, and F. Hyodo (2021): Mesopelagic fish larvae do not compete with larvae of fishery-target species in the Osumi Strait according to morphological, DNA metabarcoding, and stable isotope analyses. *Mar. Biol.*, **168**, 6.
- Lindeque, P. K., H. E. Parry, R. A. Harmer, P. J. Somerfield, and A. Atkinson (2013): Next Generation Sequencing Reveals the Hidden Diversity of Zooplankton Assemblages. *PLoS ONE*, **8**, e81327.
- McGowan, J. A. (1971): Oceanic biogeography of the Pacific. p. 3–74. In *The micropaleontology of oceans*, edited by B. M. Funnell and W. R. Riedel, Cambridge University Press, Cambridge.
- Razouls, C., F. de Bovée, J. Kouwenberg, and N. Desreumaux (2005–2020): Diversity and geographic distribution of marine planktonic copepods. (<http://copepodes.obs-banyuls.fr/en>)
- Sogin, M. L., H. G. Morrison, J. A. Huber, D. M. Welch, S. M. Huse, P. R. Neal, J. M. Arrieta, and G. J. Herndl (2006): Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12115–12120.
- Suter, L., A. M. Polanowski, L. J. Clarke, J. A. Kitchener, and B. E. Deagle (in press) Capturing open ocean biodiversity: Comparing environmental DNA metabarcoding to the continuous plankton recorder. *Mol. Ecol.*

Molecular-based approach for revealing community structure and diversity of marine zooplankton

Junya Hirai[†]

Abstract

Zooplankton plays an essential role in marine pelagic ecosystems. They are generally classified into species based on their morphology. The morphological classification requires expertise, resulting in issues with the identification of cryptic species and immature stages of zooplankton, which are difficult to identify morphologically. In this study, we propose a metabarcoding method using high-throughput sequencing to show the diversity and community structure of zooplankton, independent of morphological classification. First, we select an appropriate molecular marker for metabarcoding analysis of copepods, which are highly diverse and abundant. A bioinformatics protocol was also developed to understand copepod communities using large amounts of sequence data. The proposed method was then applied to zooplankton communities in the Pacific area to show large-scale patterns of copepod community structure and species diversity. The metabarcoding approach was applied to a dietary analysis of fish larvae and biomonitoring of zooplankton, contributing to the understanding of food web structures and changes in marine ecosystems.

Key words: zooplankton, diversity, community structure, metabarcoding, Pacific

(Corresponding author's e-mail address: hirai@ori.u-tokyo.ac.jp)

(Received 26 November 2020; accepted 22 December 2020)

(doi: 10.5928/kaiyou.30.1_1)

(Copyright by the Oceanographic Society of Japan, 2021)

[†] Atmosphere and Ocean Research Institute, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8564, Japan
e-mail: hirai@ori.u-tokyo.ac.jp