

## 学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名：

Name 本間 千穂

学位論文題目：

Title of Dissertation

アオブダイ毒化原因生物の特定を目指したアオブダイの餌生物の網羅的  
解明

学位論文要約：

Dissertation Summary

アオブダイは、時として毒化することが報告されており、毒化したアオブダイの筋肉や内臓の喫食により、食中毒を引き起こす。本中毒は、喫食してから数時間から十数時間以内に発症し、その症状として横紋筋融解による筋肉痛、溶血によるミオグロビン尿症、頭痛、歩行困難、胸部圧迫、呼吸困難、麻痺、痙攣、衰弱などを伴う (谷山 2002; Fusetani et al. 1985)。また、中毒患者の血液検査により、発症後数時間から数日にかけて、血清クレアチンホスホキナーゼ (CPK)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) および乳酸脱水素酵素 (LDH) が異常に高いレベルを示すことが報告されている (谷山 2002)。本中毒の回復には数日から数週間かかり、最悪の場合には死に至ることもあり、その致死時間は十数時間から数日間と広範囲であることが報告されている (Noguchi et al. 1987; Okano et al. 1998; 吉嶺ら 2001)。本中毒はアオブダイのみならず、ハタ科魚類やハコフグ科魚類でも起こることが知られており (谷山ら 2003)、我が国における食の安全を脅かしている。アオブダイによる中毒はこれまでに国内にて 30 件報告され、患者数は 100 名に上る一方で、アオブダイと同海域に生息するブダイ科魚類であるブダイ (*Calotomus japonicus*) については、それによる中毒は 1 例の疑い事例が知られているに過ぎず (谷山ら 2003)、本魚種による中毒の可能性は極めて低いと考えられる。

本中毒に関して、アオブダイやハタ科魚類を食した場合であっても中毒が起こる頻度は低いことから、これらの魚自身が原因毒を産生するのではなく、食物連鎖を介して餌生物由来の毒がアオブダイ等の体内に蓄積していると考えられている (Taniyama et al. 2003)。これまで、本中毒の原因毒については、パリトキ

(様式 5) (Style5)

シン (PLTX) あるいはその構造類似体である可能性が指摘されており (Noguchi et al. 1987)、これらは底生性渦鞭毛藻 *Ostreopsis* 属により生産されることが知られていることから、この *Ostreopsis* 属藻が本中毒の原因生物ではないかと推察されてきた (谷山 2002)。しかし、Ito and Yasumoto (2009) は PLTX やその構造類似体をマウスに経口投与することにより、その毒性を検討した結果、いずれの毒素もマウスに対する致死毒性を示さなかったことを報告した。また、Suzuki et al. (2013) はアオブダイ中毒検体を LC-MS/MS を用いて分析した結果、本検体にはパリトキシンやパリトキシン構造類似体はいずれも含まれないことを明らかにした (Suzuki et al. 2013)。以上のことより、アオブダイ等による中毒の原因毒はパリトキシンやパリトキシン構造類似体ではない可能性が極めて高いことが明らかとなり、本結果を踏まえると *Ostreopsis* 属はアオブダイの毒化原因生物ではないことが強く示唆された。よって、アオブダイ等による中毒の発生を考える上で、原因毒を特定することに加えて、本毒を産生する毒化原因生物を特定することが極めて重要と考えられる。そこで、アオブダイの毒化原因生物を明らかにするためには、まずアオブダイの餌生物を明らかにすることが重要と考えられる。さらに、中毒が多数報告されているアオブダイおよび中毒が殆ど報告されていないブダイの餌生物を網羅的に明らかにした上で、これらと比較しその類似点および相違点を明らかにすることは、本中毒の毒化原因生物の解明を目指す上で基盤的な知見となると考えられる。

魚類の餌生物を網羅的に同定する方法として、近年メタバーコーディングが頻用されている (Sousa et al. 2019)。本法では、魚類の消化管内容物に由来する DNA を抽出し、これを鋳型として用いることにより、特定の遺伝子領域を PCR 増幅させ、その産物をハイスループットシーケンサー (HTS) に供することにより一度に大量の塩基配列を獲得する (Sousa et al. 2019)。その際に用いられる遺伝子として、18S rRNA 遺伝子 (18S rDNA) が頻用され、その DNA 増幅のために様々な餌生物を検出可能な 18S rDNA ユニバーサルプライマーがしばしば用いられている (Chow et al. 2019; Clarke et al. 2020; Takahashi et al. 2020)。しかし、本プライマーを魚類の餌生物の解析に用いた場合、餌生物に由来する遺伝子のみならず捕食者である魚類自身に由来する遺伝子も増幅され、時として得られた塩基配列の殆どを当該魚類の配列が占める

(様式 5) (Style5)

ことも報告されている (Shehzad et al. 2012)。よって、解析対象とする魚類の餌生物を網羅的に解明する上で、捕食者自身の遺伝子の DNA 増幅を抑制しながら、餌生物に由来する塩基配列を出来るだけ多く獲得することが重要である。この様な状況の下で、特定の遺伝子の DNA 増幅を抑制するブロッカーとして、ブロッキングプライマーおよび peptide nucleic acid (PNA) clamp が報告されている (Shehzad et al. 2012)。しかし、いずれのブロッカー (ブロッキングプライマーおよび PNA clamp) が、より効率良く魚類自身の DNA の増幅を抑制して、魚類の餌生物の解明を目指したメタバーコーディングに適しているかについては未だ明らかにされていない。この様な状況の下で本研究では、メタバーコーディングによるアオブダイの餌生物の網羅的解析に先立ち、まずアオブダイを含めた藻食魚類自身の DNA 増幅の抑制が可能なブロッカーを用いた、藻食魚類の餌生物の解明に有用なメタバーコーディングを開発することを目指した。次に、アオブダイによる中毒がしばしば発生している長崎県、高知県および徳島県にて様々な季節に採捕された多数のアオブダイ検体の消化管内容物から抽出した DNA を用いて、本研究にて確立したメタバーコーディングに供することにより、アオブダイの餌生物を網羅的に明らかにしようとした。その際、中毒が多数報告されているアオブダイの検体に加えて、中毒が殆ど報告されていないブダイ検体を比較対照として用いてそれらの餌生物の解析を行い、両者の餌生物を比較することによりアオブダイに特徴的な餌生物を探索し、アオブダイの毒化原因生物の解明に役立つ基盤的知見を得ることを目指した。

まず、ブダイ科魚類を始めとした真骨魚類の DNA 配列の PCR 増幅を抑制するために、真骨魚類に特異的に結合し、かつユニバーサルプライマーのリバースプライマーの 3'末端に 5 bp オーバーラップするブロッキングプライマーである BlockFish5、10 bp オーバーラップする BlockFish10 およびオーバーラップ長は 6 bp であるがその配列長が 34 塩基と最も長い BlockFish\_long6 をそれぞれ設計した。また、Blockfish5 と同じ DNA 配列に結合する PNA clamp として、BlockfishPNA も設計した (Fig. 1)。これらの中から、魚類の DNA の増幅抑制に適したものを選抜するために、アオブダイの筋肉から抽出した DNA を鋳型として、ブロッキングプライマーあるいは PNA clamp をそれぞれ添加し、60°C、65°Cおよび 66°Cの条件下に

(様式 5) (Style5)

て PCR を行った。その結果、ユニバーサルプライマーに対して 5 bp あるいは 10 bp オーバーラップするように設計したブロッキングプライマーである Blockfish5 あるいは Blockfish10 は、アニーリング温度が 60°C および 65°C の条件下では有意な増幅抑制効果を示さず、66°C の条件下においてのみ有意な増幅抑制効果を示した (Fig. 2)。しかし、アニーリング温度が 66°C の条件では、ブロッキングプライマーを添加しない場合であっても得られた増幅産物量が著しく少なくなるため、これらのブロッカーはメタバーコーディングには不適と考えられた。次に、ブロッキングプライマーである BlockFish\_long6 は、アニーリング温度 65°C および 66°C の条件下にて有意な DNA 増幅抑制効果を示した。一方、PNA clamp である BlockFishPNA は、いずれの温度帯においても魚類の DNA 増幅を完全に抑制した (Fig. 2)。そのため、魚類の DNA 増幅抑制に適したブロッカーとして、アニーリング温度が 65°C の条件下にて増幅抑制効果を示した BlockFish\_long6 およびいずれの温度帯においても高い増幅抑制効果を示した BlockFishPNA を選抜した。次に、これら 2 種のブロッカーの添加至適量を明らかにするために、これらブロッカーをユニバーサルプライマーに対して 1 倍、5 倍および 10 倍量となるようにそれぞれ添加した条件下にて PCR を行った結果、BlockFish\_long6 はその添加量を高めるにつれて高い増幅抑制効果を示し、ユニバーサルプライマーに対して 10 倍量添加した場合に最も高い効果を示した。一方、BlockFishPNA はいずれの添加量においても魚類の DNA 増幅を完全に抑制した。よって、BlockFish\_long6 はユニバーサルプライマーの 10 倍量を、BlockFishPNA はユニバーサルプライマーの等量を添加至適量として選定した。次に、これらのブロッカーが藻食魚類の消化管内容物を鋳型として用いたメタバーコーディングに適用可能か検討するために、アオブダイ自身の DNA に加えて、アオブダイの餌生物の可能性を有する多様な生物、すなわち紅藻、褐藻、緑藻、渦鞭毛藻、節足動物、環形動物および刺胞動物の DNA を混合した疑似消化管内容物試料 (Mock 試料, Table 1) を鋳型として用い、上記の検討にて選定した条件下にて PCR 行い (Table 2)、得られた増幅産物をハイスループットシーケンサーに供し、配列を決定するメタバーコーディングを行った。その結果、BlockFish\_long6 添加区では、アオブダイに由来する配列が全体に占める割合は、非添

(様式 5) (Style5)

加区と比較して 3.3~33.2%減少した。一方、BlockfishPNA 添加区では、アオブダイに由来する配列が全体に占める割合は、99.2~99.9%減少した (Fig. 3)。これらの結果をまとめると、BlockFish\_long6 は、魚類 (アオブダイ) の DNA のみを鋳型とした場合に高い DNA 増幅の抑制効果を示した一方で、アオブダイの DNA に加えて、その餌生物と想定される生物の DNA を混合した Mock 試料を鋳型として用いたメタバーコーディングを行った場合は、その魚類の DNA 増幅の抑制効果は低かった。これに対して、本研究にて設計した PNA clamp である BlockFishPNA は、Mock 試料を鋳型としてメタバーコーディングを行った場合においても、魚類の DNA 増幅を高効率に抑制した。従って、BlockFishPNA はアオブダイの餌生物の解明に向けたメタバーコーディングに最適であると考えられた。

次に、実際にアオブダイによる中毒が発生している長崎県、高知県および徳島県にて様々な季節に採捕されたアオブダイ 20 検体およびブダイ 12 検体 (Table 3 and Fig. 4) の消化管内容物からそれぞれ抽出した DNA を、上記の検討によって確立した BlockFishPNA を用いた条件下にて PCR を行った。その増幅産物をハイスループットシーケンサーに供し塩基配列を決定し、得られた配列情報を 97%の相同性に基づき operational taxonomic units: OTUs にまとめた。これらの餌生物の OTUs をデータベースである pr2 ver. 4.12.0. を参照配列として用いて同定した。さらに、両者の餌生物を比較することにより、アオブダイに特徴的な餌生物を検索し、アオブダイの毒化原因生物の探索に役立つ基盤的知見を得ることを目指した。また、熱帯域に生息するブダイ科魚類である *Scarus* 属がシアノバクテリアを摂食している可能性が Clements et al. (2017) より示唆されたことから、本研究においてもアオブダイおよびブダイがシアノバクテリアを摂食している可能性を検討するために、シアノバクテリアを標的とした 16S rDNA に結合するプライマーセット (Nübel et al. 1997) を用いてメタバーコーディングを行った。

その結果、アオブダイおよびブダイは Rhodophyta (紅色植物門・紅藻) および Ochrophyta (不等毛植物門・褐藻) を主に摂食していることが明らかとなり、特にアオブダイはブダイよりも紅藻を多く摂食し、ブダイはアオブダイよりも褐藻を多く摂食していることが明らかとなった (Fig. 5)。また、アオブダイおよびブ

(様式 5) (Style5)

ダイの消化管内容物からは、Cnidaria (刺胞動物門) および Arthropoda (節足動物門) を始めとする動物に由来するリードが高い割合で検出されたことから、両魚種はこれまで主要な餌生物と考えられてきた藻類のみならず、動物性の餌も摂食していることが明らかになった (Fig. 5)。また、両魚種の消化管内容物から、渦鞭毛藻門や単細胞緑藻といった微小な生物 (<1 mm) も検出された (Fig. 6)。これら微生物は、大型藻類や岩の表面などに付着することが考えられ、アオブダイおよびブダイは藻類と同時にこれら微生物を混食していることが考えられた。

アオブダイの毒化原因生物を考察するために、まずアオブダイとブダイの大型生物の餌生物を比較した結果、スギノリ目の紅藻 Gigartinales OTU2 を始めとするアオブダイからのみ検出された餌生物の存在が明らかとなった。スギノリ目の紅藻が毒を産生するという報告はこれまでに無いが、紅藻の中にアオブダイ中毒の原因毒を産生するものが存在する可能性が考えられた。また、ブダイと比較してアオブダイからより多く検出された微生物の餌生物として、シガテラ中毒の原因毒とされるシガトキシンや、麻痺性貝毒の原因毒とされるサキシトキシンを産生する種を含む渦鞭毛藻 *Gambierdiscus* 属および *Alexandrium* 属が見出された。また、アオブダイからは、そのリード数は少ないものの、既報の有毒種を含む Microcystaceae 科、Oscillatoriaceae 科および *Lyngbya* 属 (Sharp et al. 2009; Harke et al. 2016) のシアノバクテリアが検出された。これらのことから、アオブダイに摂食されたこれら微生物の中に、アオブダイによる中毒の原因毒を産生する生物が存在している可能性が考えられた。このように、本研究においてアオブダイおよびブダイの餌生物の類似点および相違点を網羅的に明らかにしたことから、アオブダイの毒化原因生物を解明する上で基盤的な知見を得ることが出来た。

本研究では、アオブダイを始めとする藻食魚類の消化管内容物のメタバーコーディングに応用可能な魚類自身の DNA 増幅を抑制するブロッカーを複数種設計し、これらの DNA 増幅抑制効果を検討した。その結果、PNA clamp の 1 種である BlockFishPNA は、Mock 試料を鋳型としたメタバーコーディングを行った際、魚類の DNA 増幅を高効率に抑制した。従って、本研究にて開発した BlockFishPNA を用いたメタバー

(様式5) (Style5)

コーディングは、アオブダイだけでなく様々な藻食魚類の餌生物の検出ならびにその組成の分析に有用と考えられ、その応用が期待される。

今後、本研究によって明らかとなったオブダイに特徴的な餌生物の中から、アオブダイの毒化原因生物の特定が望まれる。毒化原因生物が明らかとなった暁には、その生物の発生量や発生条件を調査することにより、アオブダイの毒化機構の全容解明ならびに毒化予知に繋がる知見が得られることが期待される。

本中毒はアオブダイのみならずハタ科魚類やハコフグ科魚類においても発生している。そのため、本中毒の毒化機構の解明は、それらの魚類の毒化予知に繋がり、魚食文化が広く根付いた本邦における食の安全確保に貢献するものと期待される。

(様式5) (Style5)

Table 1 Details of the experimental design and the organisms used to create the three mock community samples (Mock1-3) used for the metabarcoding.

| Organism                   | Taxon          | Location   | Date         | Acc. No. of 18S rDNA | Mock1 | Mock2 | Mock3 |
|----------------------------|----------------|--|--------------|----------------------|-------|-------|-------|
| <i>Scarus ovifrons</i>     | Teleostei      | Muroto Misaki, Muroto City, Kochi, Japan (33.266, 134.160) | 2015. 07. 13 | LC639933             | 1     | 10    | 100   |
| <i>Zonaria diesingiana</i> | Ochrophyta     | Otsuki, Hata, Kochi, Japan (32.463, 132.433)               | 2019. 08. 27 | LC639948             | 1     | 1     | 1     |
| <i>Gelidium</i> sp.        | Rhodophyta     | Otsuki, Hata, Kochi, Japan (32.463, 132.433)               | 2019. 08. 27 | LC639950             | 1     | 1     | 1     |
| <i>Ulva reticulata</i>     | Chlorophyta    | Otsuki, Hata, Kochi, Japan (32.463, 132.433)               | 2019. 08. 27 | LC639946             | 1     | 1     | 1     |
| <i>Symbiodinium</i> sp.    | Dinoflagellate | Pet shop*1   | 2019. 11. 13 | LC639945             | 1     | 1     | 1     |
| <i>Pagurus filholi</i>     | Arthropod      | Tei, Konan City, Kochi, Japan (33.311, 133.451)            | 2019. 10. 04 | LC639951             | 1     | 1     | 1     |
| Nereididae sp.             | Annelida       | Tei, Konan, City, Kochi, Japan (33.311, 133.451)           | 2019. 10. 04 | LC639947             | 1     | 1     | 1     |
| Euphylliidae sp.           | Cnidaria       | Pet shop*1   | 2019. 11. 13 | LC639949             | 1     | 1     | 1     |

: *Symbiodinium* sp. DNA was obtained from a Euphylliidae sp. purchased from a pet shop located in Kochi City, Kochi, Japan.



(様式 5) (Style5)

Table 2 Samples used for evaluating suppression of fish 18S rDNA amplification with and without blockers using the mock community samples as templates.

| <b>Sample No.</b> | <b>Blocker</b>  | <b>Annealing temp.<br/>(°C)</b> | <b>Template<sup>*1</sup></b> |
|-------------------|-----------------|---------------------------------|------------------------------|
| 1                 | -               | 65                              | Mock1                        |
| 2                 | -               | 65                              | Mock2                        |
| 3                 | -               | 65                              | Mock3                        |
| 4                 | BlockFish_long6 | 65                              | Mock1                        |
| 5                 | BlockFish_long6 | 65                              | Mock2                        |
| 6                 | BlockFish_long6 | 65                              | Mock3                        |
| 7                 | -               | 60                              | Mock1                        |
| 8                 | -               | 60                              | Mock2                        |
| 9                 | -               | 60                              | Mock3                        |
| 10                | BlockFishPNA    | 60                              | Mock1                        |
| 11                | BlockFishPNA    | 60                              | Mock2                        |
| 12                | BlockFishPNA    | 60                              | Mock3                        |

\*1: Mock samples described in Table 1.

Table 3 Details of parrotfish samples from Japan.

| Species /Sample name       | Date       | Sampling site <sup>*1</sup>              | Fishing method   | Depth (m)        | Standard length (cm) | Weight (kg)      | Provider                            |
|----------------------------|------------|--|------------------|------------------|----------------------|------------------|-------------------------------------|
| <i>Scarus ovifrons</i>     |            |  |                  |                  |                      |                  |                                     |
| KM02                       | 2015/7/13  | Murotomisaki, Muroto city, Kochi, Japan  | bait fishing     | 9                | ND <sup>*2</sup>     | ND <sup>*2</sup> | K. Yamagata                         |
| KM03                       | 2015/9/7   | Murotomisaki, Muroto city, Kochi, Japan  | bait fishing     | 10               | 33.5                 | 1.6              | K. Yamagata                         |
| KM05                       | 2015/9/28  | Murotomisaki, Muroto city, Kochi, Japan  | bait fishing     | 10               | 39                   | 3.4              | K. Yamagata                         |
| KM06                       | 2015/10/5  | Murotomisaki, Muroto city, Kochi, Japan  | bait fishing     | 10               | 31                   | 1.4              | K. Yamagata                         |
| TT01                       | 2012/5/14  | Tomoura, Kaiyou town, Tokushima, Japan   | gill net fishery | 15-20            | 40.5                 | 2.0              | Tomoura Japan Fisheries cooperative |
| TT24                       | 2017/10/18 | Tomoura, Kaiyou town, Tokushima, Japan   | ND <sup>*2</sup> | ND <sup>*2</sup> | 64                   | 6.6              | Tomoura Japan Fisheries cooperative |
| TT25                       | 2018/4/12  | Tomoura, Kaiyou town, Tokushima, Japan   | ND <sup>*2</sup> | ND <sup>*2</sup> | 66                   | 6.5              | Tomoura Japan Fisheries cooperative |
| NN02                       | 2017/8/31  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 6                | 63.0                 | 5.5              | H. Yamamoto                         |
| NN10                       | 2018/2/8   | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 23               | 53.0                 | 7.0              | H. Yamamoto                         |
| NN13                       | 2018/2/24  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | ND <sup>*2</sup> | 42.0                 | 4.3              | H. Yamamoto                         |
| NN15                       | 2018/3/30  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 15               | 46.0                 | 4.6              | H. Yamamoto                         |
| NN16                       | 2018/3/30  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 15               | 53.0                 | 6.0              | H. Yamamoto                         |
| NN20                       | 2018/9/7   | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | ND <sup>*2</sup> | 30.0                 | 1.5              | H. Yamamoto                         |
| NN22                       | 2018/7/29  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | ND <sup>*2</sup> | 36.0                 | 2.2              | H. Yamamoto                         |
| NN23                       | 2018/8/3   | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 25               | 32.0                 | 2.0              | H. Yamamoto                         |
| NN25                       | 2018/10/10 | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 10               | 50.0                 | 5.4              | H. Yamamoto                         |
| NN28                       | 2019/2/26  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | ND <sup>*2</sup> | 49.0                 | 8.0              | H. Yamamoto                         |
| NN31                       | 2019/3/23  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 15-25            | 57.0                 | 9.7              | H. Yamamoto                         |
| NN38                       | 2019/9/25  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 20               | 42.0                 | 3.5              | H. Yamamoto                         |
| NN42                       | 2020/1/11  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 25               | 41.0                 | 3.5              | H. Yamamoto                         |
| <i>Calotomus japonicus</i> |            |  |                  |                  |                      |                  |                                     |
| KT01B                      | 2012/11/5  | Kutsu, Susaki city, Kochi, Japan         | spearfishing     | ND <sup>*2</sup> | 41.7                 | 1.5              | Z. Imoto                            |
| KT02B                      | 2012/12/17 | Kutsu, Susaki city, Kochi, Japan         | spearfishing     | ND <sup>*2</sup> | 32.2                 | 1.0              | Z. Imoto                            |
| KU02B                      | 2020/5/23  | Usa town, Usa city, Kochi, Japan         | spearfishing     | 4                | 23.0                 | 1.06             | T. Ataka                            |
| TS02B                      | 2014/12/28 | Shishikui, Kaiyou town, Tokushima, Japan | ND <sup>*2</sup> | ND <sup>*2</sup> | 42.0                 | 1.6              | Market                              |
| TS03B                      | 2014/12/28 | Shishikui, Kaiyou town, Tokushima, Japan | ND <sup>*2</sup> | ND <sup>*2</sup> | 39.0                 | 1.5              | Market                              |
| NN01B                      | 2018/7/29  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 12               | 30.0                 | 0.9              | H. Yamamoto                         |
| NN02B                      | 2018/8/3   | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | ND <sup>*2</sup> | 28.0                 | 0.7              | H. Yamamoto                         |
| NN03B                      | 2018/8/3   | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | ND <sup>*2</sup> | 35.0                 | 1.5              | H. Yamamoto                         |
| NN04B                      | 2018/10/9  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 35               | 31.0                 | 1.6              | H. Yamamoto                         |
| NN05B                      | 2019/3/23  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 15-25            | 37.5                 | 1.5              | H. Yamamoto                         |
| NN06B                      | 2019/8/3   | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 20               | 25.0                 | 1                | H. Yamamoto                         |
| NN09B                      | 2020/1/11  | Nomozaki, Nagasaki city, Nagasaki, Japan | gill net fishery | 25               | 30.0                 | 1.5              | H. Yamamoto                         |

\*1: Each sampling site was shown in Fig. 4.; \*2: no data

(様式 5) (Style5)

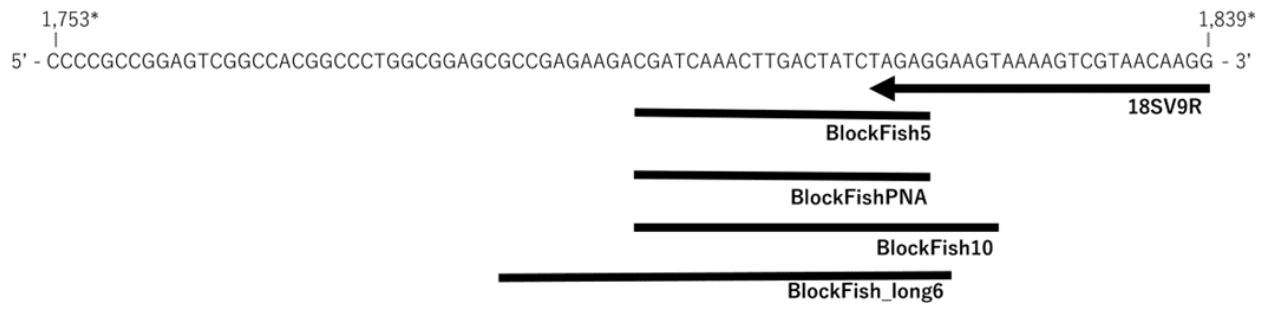


Fig. 1 Binding site of each blocking primer and PNA clamp used in this study. The arrow indicates the binding site of the universal reverse primer, 18SV9R. The bars indicate the blocking primers or the PNA clamp.

\*: Base position based on the 18S rDNA sequence of *Verasper variegatus* (Acc. No. EF126043)

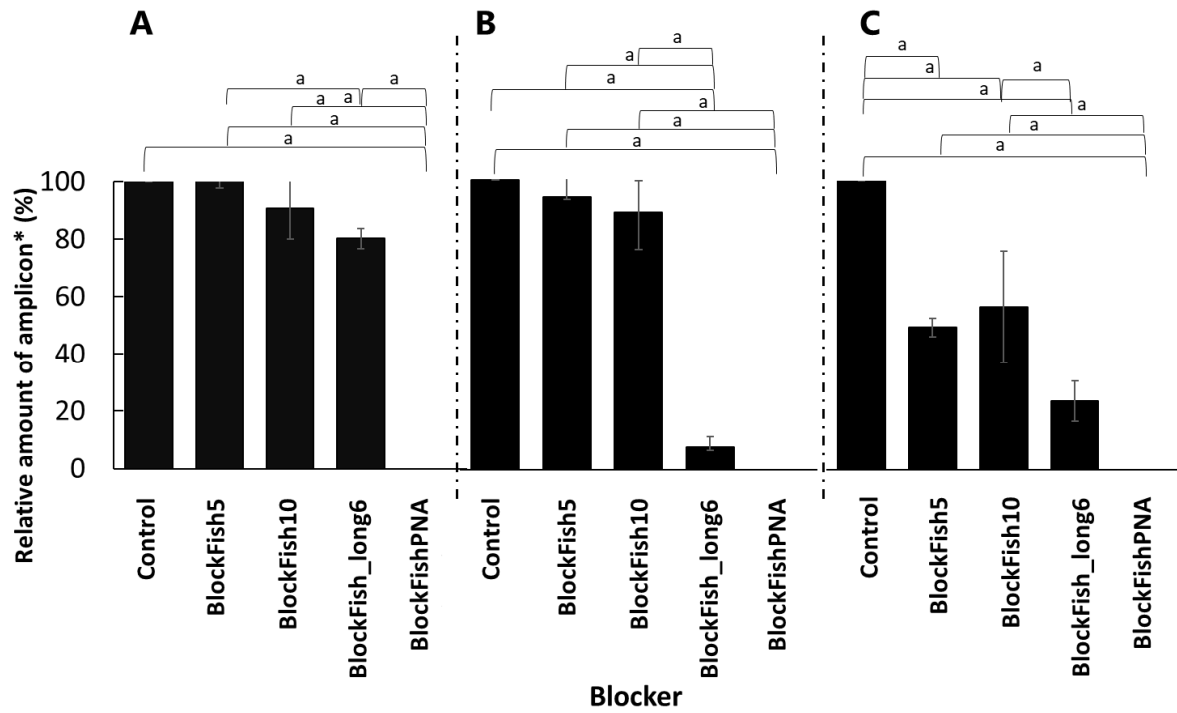


Fig. 2 Suppression of fish 18S rDNA amplification with the blocking primers and the PNA clamp.

A: Annealing temperatures: 60°C; B: 65°C; C: 66°C.

Control: 18S rDNA amplification without the blocking primer or the PNA clamp.

a: Tukey-Kramer test:  $p < 0.01$

\*: Relative amount of amplicon when the amount of amplicon of the control was regarded as 100%.

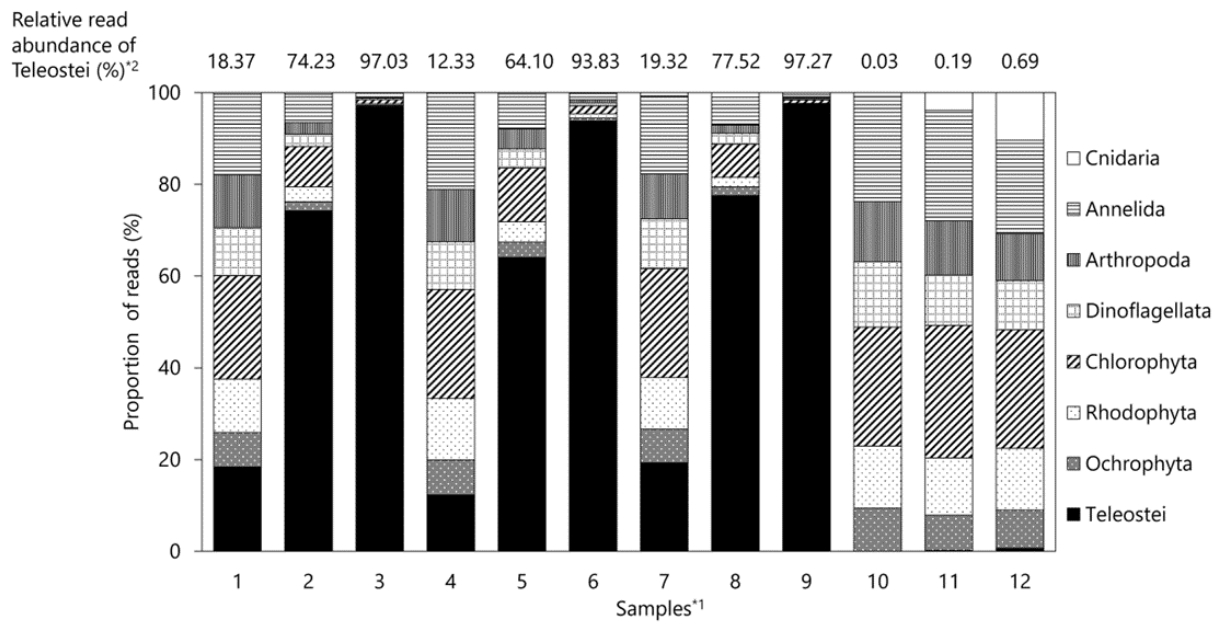


Fig. 3 Proportion of read numbers of the organisms contained in the mock community samples obtained by metabarcoding.

\*<sup>1</sup>: Samples shown in Table 2.

\*<sup>2</sup>: The proportion of fish reads to all reads obtained in each sample.

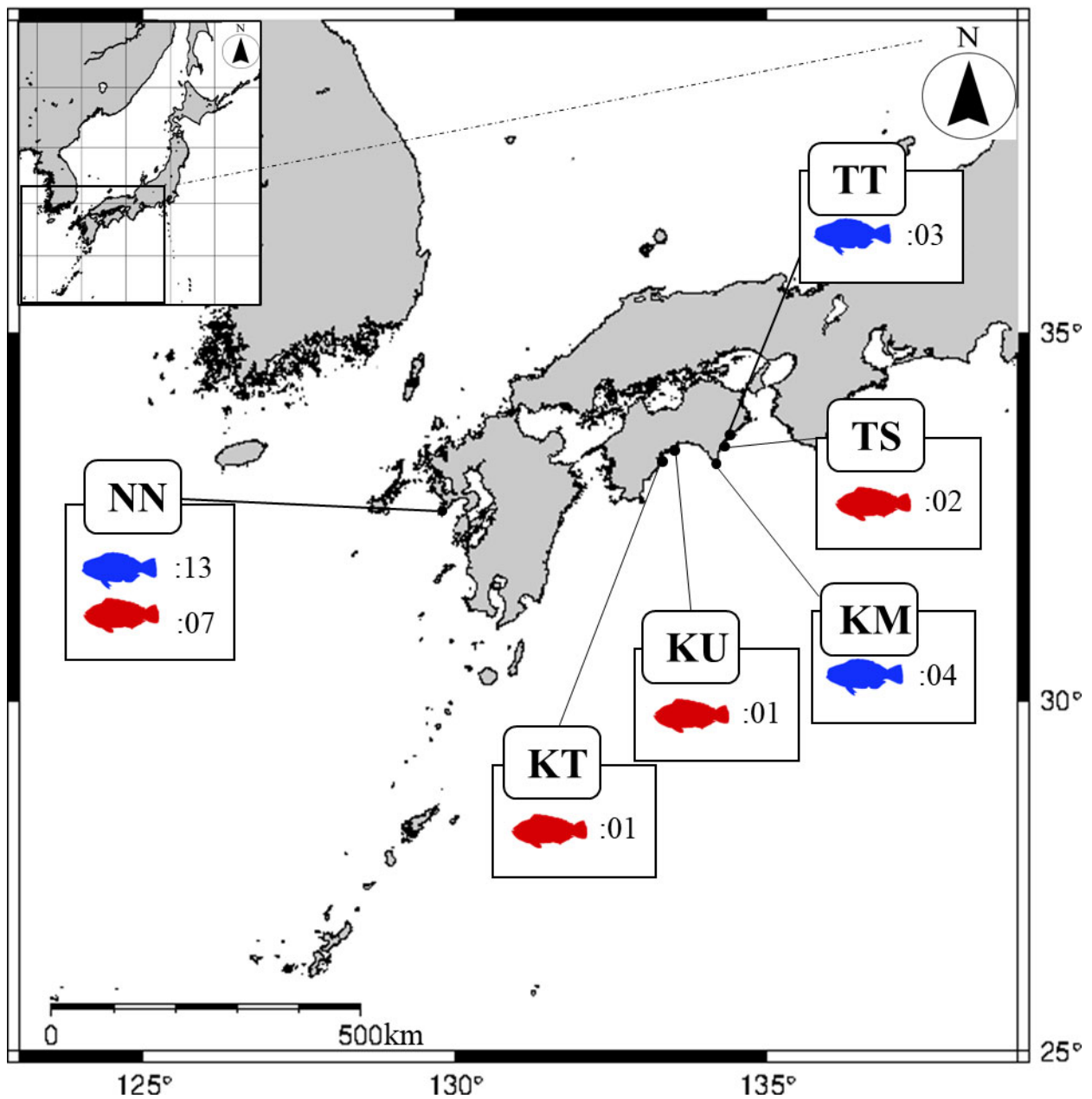


Fig. 4 Sampling sites of parrot fish in Japanese coastal waters.

KM: Murotomisaki, Muroto City, Kochi, Japan; KU: Usa, Tosa City, Kochi, Japan; KT: Kutsu, Susaki City, Kochi, Japan; TT: Tomoura, Kaiyou Town, Tokushima, Japan; TS: Shishikui, Kaiyou Town, Tokushima, Japan; NN: Nomozaki, Nagasaki City, Nagasaki, Japan

Details of these sites were summarized in Table 3.

 : *S. ovifrons*;  : *C. japonicus*

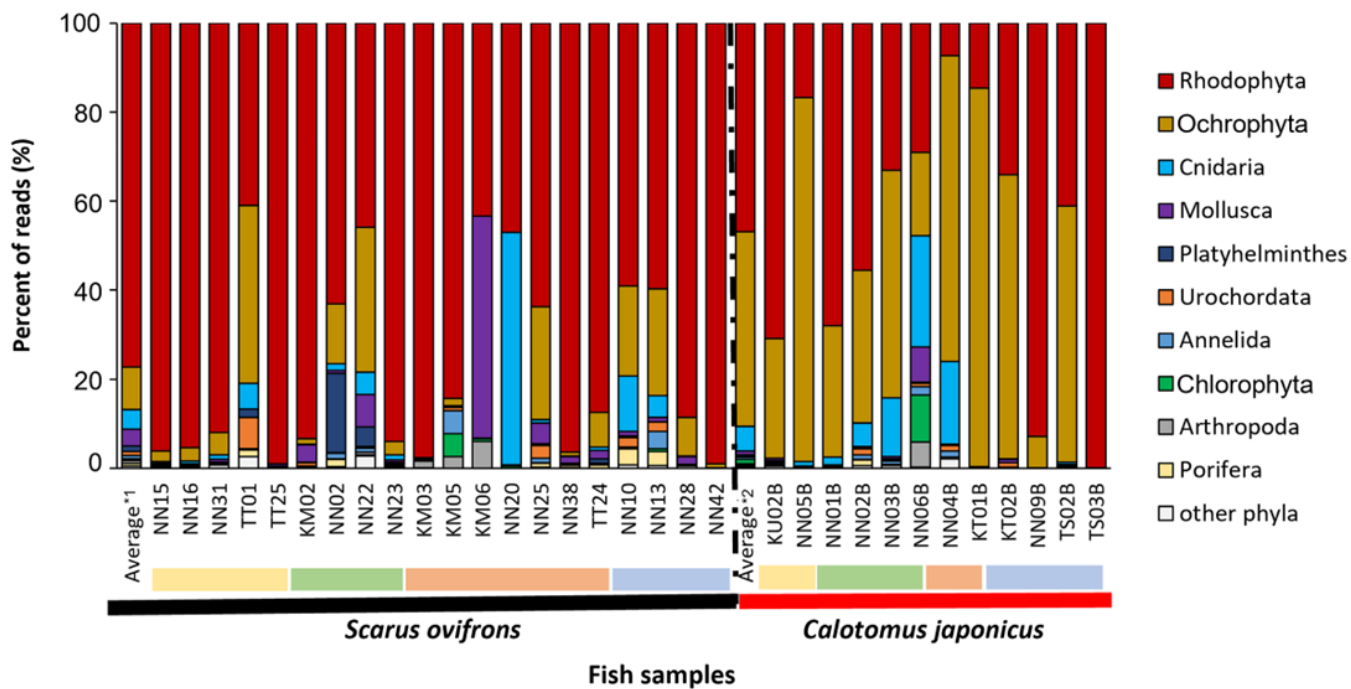


Fig. 5 Read composition of the macroorganisms in gut contents of the two parrotfishes, *Scarus ovifrons* and *Calotomus japonicus*, from Japan.

Yellow : spring, Green : summer, Orange : fall, Blue : winter

\*1: Averaged read composition of the prey organisms of the 20 specimens of *S. ovifrons*.

\*2: Averaged read composition of the prey organisms of the 12 specimens of *C. japonicus*.

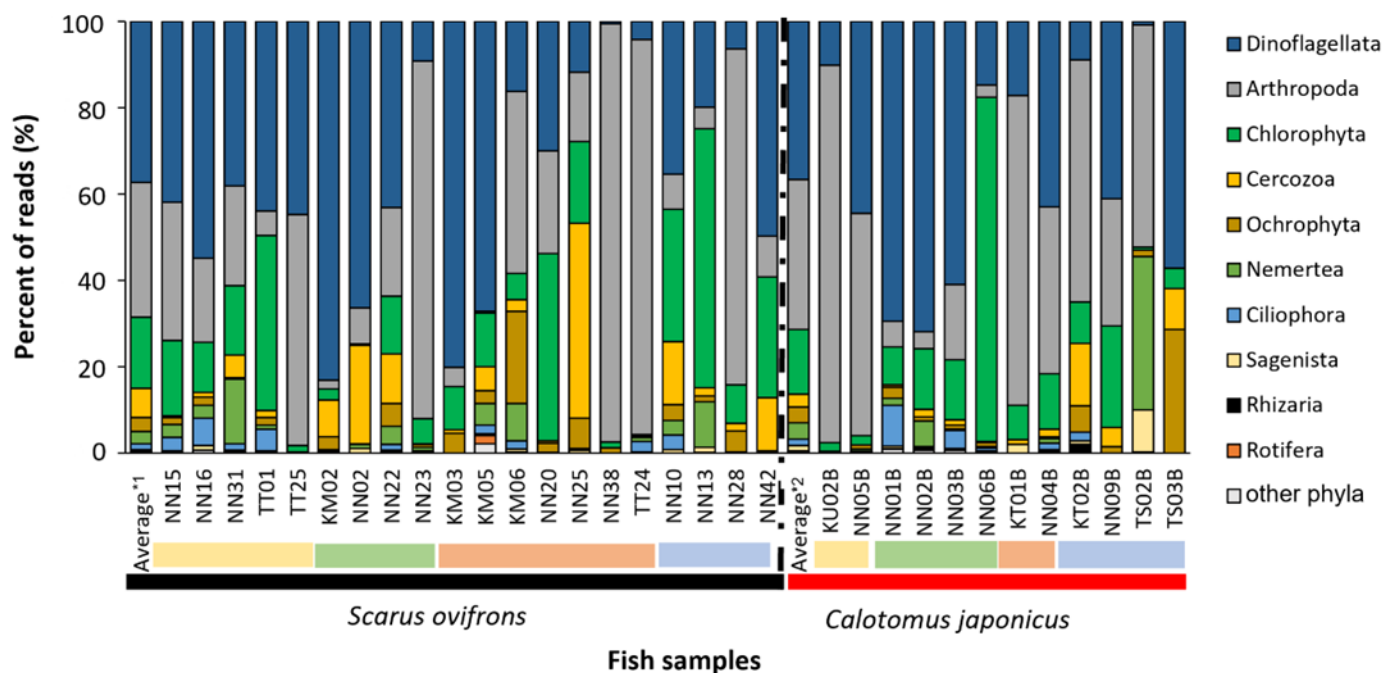


Fig. 6 Read composition of the microorganisms in gut contents of the two parrotfishes, *Scarus ovifrons* and *Calotomus japonicus*, from Japan.

■ : spring, ■ : summer, ■ : fall, ■ : winter

\*1: Averaged read composition of the prey organisms of the 20 specimens of *S. ovifrons*.

\*2: Averaged read composition of the prey organisms of the 12 specimens of *C. japonicus*.