

令和元年6月20日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07525

研究課題名(和文) 磯焼け域に生息する表在性巻貝類を利用した海藻シードバンクの検出

研究課題名(英文) Detection of macroalgal seed bank using epilithic gastropod inhabiting deforested area

研究代表者

藤田 大介 (Fujita, Daisuke)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：70361813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウニなどの食害により海藻が生えなくなっている磯焼け域の海底でも海藻の胞子や微小世代(海藻シードバンク)が存在し、潜在的植生となっているが、無節サンゴモを主食とするため磯焼け域に多産する小型軽量のカサガイを用いて検出する方法を考案した。磯焼け域の4水深帯から採集したカサガイの殻を用い、培養のほか、殻の剥削物を用いたメタゲノム解析の2法により検出を試みた。培養によって各水深帯のカサガイから10～14種の海藻を検出できたが、メタゲノムではさらに多くの海藻を検出でき、種もしくは属のレベルで正確に同定ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウニが増えすぎて海藻が生えない磯焼けでは、その駆除による藻場回復が続けられている。駆除した海底に海藻シードバンク(胞子や微小世代)が含まれていれば速やかに群落が回復するが、そうでなければ徒労に終わり、スポアバッグなど補助手段が必要になる。従来は海底の重たい石を採集し、数カ月間、清浄で富栄養の海洋深層水を用いて培養し、海藻シードバンクを検出していた。本研究は、小型のカサガイを利用し、メタゲノム解析も導入し、水中作業の軽減と海藻シードバンクの同定・確認の迅速化を図った。本研究は、国内の磯焼け研究で初めてメタゲノム解析を始めて導入し、ウニ除去の適地選択に科学的根拠を与える手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Spores and micro-generations of macroalgae are present as potential vegetation even on the urchin barrens; the information on such 'macroalgal seed bank' is important to restore algal beds by removing sea urchins. To detect the components of the seed bank, heavy cobbles were collected to incubate for a few months. In the present study, a new method using barren-ground dominant small limpet was developed. Shells of limpets were collected from different zones in different seasons. Incubation with the shell revealed the presence of 10 to 12 macroalgal species on urchin barrens. Metagenomic analysis (DNA metabarcoding) identified more number of species with the accuracy of species or generic level from the residues scraped off from the limpet shell surfaces. This technique makes the sampling easier and shorten the time for detecting the macroalgal seed bank.

研究分野：応用藻類学

キーワード：ユキノカサガイ シードバンク 潜在的植生 磯焼け 遺伝子解析 メタゲノム解析 培養

## 1. 研究開始当初の背景

藻場が顕著に衰退し磯焼けが持続すると魚介類も激減するため、藻場回復の努力が行われている。磯焼けとなった場所でも、植食動物を除去すると藻場が回復することが多い。これは、除去後に飛来した海藻の孢子だけでなく、貧植生域でも孢子や微小世代（海藻シードバンク）が潜在的植生として存在することによる。しかし、これも衰退しタネ不足となった場所で多大な労力や資金を費やし植食動物を除去しても藻場は回復せず、適地として海藻シードバンクに関する迅速な診断が望まれる。

海藻シードバンクは、磯焼け域から採集した人頭大の礫に清浄かつ栄養塩の豊富な海洋深層水（海藻の孢子を含まない）をかけ流し海藻を成長させて検出した。しかし、流水培養施設が必要で、培養に数カ月を要し、採集や持ち帰りの容易な拳大の石（海底では不安定で海藻の孢子が着底しづらい）は使えない。

後に、磯焼け域の海底基質をブラシで表面を掻き落とし、その懸濁物から DNA を抽出して次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析により海藻シードバンクの検出に成功した。

## 2. 研究の目的

海藻シードバンク（潜在的植生）の診断は、サンプリングが容易で、磯焼け域を代表する基質で、地点間で比較しやすいことが望ましいため、本研究では磯焼け域に多産する表在性腹足類をモニタリング貝として活用し、磯焼け域における海藻シードバンクの迅速かつ効率よく診断する技術の確立を目的とする。

また、モデル海域でのモニタリング貝の季節的な分布や移動を明らかにし、季節や水深に伴う海藻シードバンクの出現状況の違いを明らかにする。

## 3. 研究の方法

モニタリング貝として、無節サンゴモを主食とするため磯焼け域の海底で優占し貝殻（海藻着生面）をもつユキノカサガイを選定し、調査は宮城県女川町の御前湾北岸で実施した。磯焼け域を碎波帯、残藻帯、磯焼け帯、冠砂帯の4区画に分け、ユキノカサガイ、ウニおよび小型巻貝の生息密度を記録したほか、各隣接区域で分析用のユキノカサガイを採集した。また、ユキノカサガイについては、成熟期や年齢の推定を行ったほか、貝の移動範囲の確認のため標識放流を行った。

海藻シードバンクの検出は上記4区画帯で採集した貝殻の6~8週間の室内培養実験とメタバーコーディング解析によった。解析では褐藻と紅藻を標的とし、Genbankへの登録数が多い *rbcL* 遺伝子を用いた。

## 4. 研究成果

ユキノカサガイは、各月とも碎波帯から冠砂帯までの全区画に出現したが、冠砂帯では調査期間を通して最も密度が低かった。5月に磯焼け帯で最も密度が高かったのを除けば、碎波帯や残藻帯で密度が高い傾向にあったが、碎波帯では帯内でも分布に偏りがあった。なお、6月と8月には、碎波帯で殻径1cm程度の稚貝が多く出現し、密度も特に高くなった。

ウニは各月とも浅所の区画（碎波帯または残藻帯で高密度となる傾向があった。キタムラサキウニの密度は一番深い冠砂帯で最低となり、最高となった。バフンウニは、6月以降は主に碎波帯で見られ、6月はキタムラサキウニの密度を上回った。小型巻貝の密度は、残藻帯で常に

高く、砕波帯または磯焼け帯がこれに次いだ。冠砂帯では調査期間を通して小型巻貝の密度は低かった。季節的にみると、6月に最も広範囲かつ高密度に分布していた。

標識放流したユキノカサガイは、2ヶ月後でもすべてその放流場所から半径2m以内で発見された。特に砕波帯で発見された標識個体は放流した大きな岩盤の付近で発見され、残藻帯で発見された標識個体は放流した直径約2mの岩に付着したままであった。脱落した標識が各々の放流場所付近で数枚ずつ発見された。

培養に用いたユキノカサガイ150個体の貝殻のほぼすべてで海藻の生育が認められ、14種を同定した。緑藻ではボウアオノリとシオグサ属1種、褐藻ではシオミドロ属1種、紅藻ではイギス属1種とイトグサ属1種の出現率が高く、培養した貝殻1枚当たりの出現率で23~77%を示した。しかし、アラメ、マコンブなど主要藻場形成種は出現しなかった（離れた場所の藻場で採集した貝からはワカメを確認）。

ユキノカサガイの貝殻にワカメやマコンブの遊走子を播種し、クボガイと同居させたのち培養に供した貝殻（食害区）と、貝なしで培養した区（対照区）で殻面に出現した孢子体被度を調べた結果、いずれも食害区の被度が対照区の被度を有意に下回った。現地の観察でも、ユキノカサガイの殻の上には同種（主に稚貝）、クボガイ、ウニなどが載っている様子がしばしば観察され、殻上の植生は多少とも食害を受けていることが示唆された。

重量の体重比の平均値の推移を調べた結果、4月に2.2%と最も低く10月に35.2%と最も高い数値を示した。また、100個体の殻長組成を調べた結果、5段階のピークが認められた。

メタゲノム解析では、全サンプルから57531配列、42 OTU、大型海藻では31 OTUを得ることができた。地点毎の合計リード数は、残藻帯6989リード、磯焼け帯14614リード、砕波帯24641リード、冠砂帯11287リードとなり、砕波帯で最も多くの配列が得られた。地点毎の OTU 数は、残藻帯14 OTU、磯焼け帯11 OTU、砕波帯16 OTU、冠砂帯で26 OTUとなり、冠砂帯で最も多くの OTU が得られた。全サンプルで最もリード数が多く得られたサンプルは砕波帯（10331リード）、最もリード数の少ないサンプルは冠砂帯（47リード）で得られた。また、OTUが最も多いサンプルは冠砂帯（23 OTU）、最も少ないサンプルは磯焼け帯（3 OTU）で得られた。

類似度解析の結果、海藻シードバンクのクラスターは概ね各区画帯に分かれたが、残藻帯と磯焼け帯のサンプルが同クラスターに入る場合もあった。各帯でリード数が多かった海藻は、砕波帯では、ワタモ、カヤモノリ、カヤモドキ、残藻帯では、ホシノイト、ヒライボ、磯焼け帯では、イワノカワ、カイノカワ、冠砂帯では、イギス属1種、アミジグサ属1種、イトグサ属1種であった。

Rarefied データでは、OTU 数は砕波帯で8 OTU、残藻帯9 OTU、磯焼け帯6 OTU、冠砂帯13 OTUとなり、normal データの場合と同様に、冠砂帯の OTU が最も多かった。また、クラスター解析を行った結果、リサンプリング処理をしていない元のデータと同様に、サンプリング地点毎にクラスターが分かれ、残藻帯と磯焼け帯のクレードが明瞭になった。NMDS 解析の結果も同様で、各区画帯に明瞭に分かれ、冠砂帯は他の区画帯と最も大きく離れていた。

以上、ユキノカサガイを用いた培養方法では、小型軽量の貝殻を用いるため、複数の採取により広範囲の潜在的植生を調べることができるほか、実際に孢子体の出現につながる検出ができる、などのメリットがあり、実際の事業に繋がりやすいと考えられた。ただし、ユキノカサガイの殻上の植生も、海底の岩石基質上の植生と同様、植食動物の食害を受ける点に留意する必要がある。

メタバーコーディング解析では、データベースに登録されているレベル（種または属）で正確に同定を行うことができた。培養では発芽体や幼体しか得られないことも多いため、遺伝子解析により迅速かつ成果な同定ができる点は優れているが、雌雄の微小配偶体の片方しか存在しないのに検出されることもありえるほか、解析のための試薬や解析委託の費用が高む。また、出現した OUT を BLAST 検索すると複数の海藻が最上位候補として出現する場合があります、*rbcL* 遺伝子の変異が小さく、同属の藻類で全く同じ配列を持つ海藻が存在する、2) NCBI データベースに誤って登録されている、の2つの可能性が考えられ、扱いには注意を要する。さらに、今後、海藻の同定が十分に行えるようにデータベースの拡充が必要である。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計6件)

- ①. 近藤秀城・藤田大介, ユキノカサガイを利用した潜在的植生の検出, 第42回日本藻類学会仙台大会, 2018年3月25日, 仙台.
- ②. Daisuke Fujita・Hiroki Murasawa・Mizuki Kondo・Shingo Urushizaki・Satoshi Nagai, Detection of potential vegetation on urchin barrens: culture or metagenome analysis? Asia Pacific Phycological Forum (招待講演) (国際学会), 2017年10月8日, Kuala Lumpur.
- ③. 村澤博基・近藤秀城・漆崎慎吾・高野義人・藤田大介・長井 敏, 宮城県女川町御前湾におけるメタバーコーディング解析を用いたユキノカサガイ殻表面の潜在的海藻植生の検出, 第41回日本藻類学会高知大会, 2017年03月24日, 高知.
- ④. 近藤秀城・藤田大介, 宮城県女川湾指浜地先のウニ焼け域のユキノカサガイ殻面上の植生に与える影響, 第13回棘皮動物研究集会, 2016年12月03日, 東京.
- ⑤. Daisuke Fujita・Mizuki Kondo, Distribution, density and potential vegetation on a limpet *Niveotectura pallida* dominant on an urchin barren in Northern Japan, The 11th International Temperate Reef Symposium, 2016年06月26日, Pisa.
- ⑥. Daisuke Fujita・Tomohiro Kosako・Yoshihito Takano・Satoshi Nagai, The 22nd International Seaweed Symposium (国際学会), 2016年6月19日, Copenhagen.

[その他] (計1件)

海藻シードバンク検出用メタゲノム解析マニュアル (暫定版) 東京海洋大学大学院 応用藻類学研究室 藤田大介・村澤博基・長井敏 2019.

## 6. 研究組織

(1) 研究協力者

長井 敏

SATOSHI NAGAI

国立研究開発法人水産研究・教育機構, 中央水産研究所 グループ長

研究者番号: 80371962