

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15577

研究課題名（和文）微細藻類の「大きさ」と「堅さ」に基づいた二枚貝の餌料としての適・不適の基準

研究課題名（英文）Suitability of microalgae as food for bivalves based on size and hardness

研究代表者

伯耆 匠二（HOUKI, Shouji）

三重大学・生物資源学研究科・助教

研究者番号：10809354

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：アサリ（浮遊幼生～成貝）とアコヤガイ（着底稚貝～成貝）を対象として、天然海域における具体的な餌（微細藻類）を調べるとともに、摂食可能な微細藻類の大きさと、消化可能な微細藻類の堅さを調べた。その結果、生活史初期（浮遊幼生～殻長数mm）の二枚貝にとって利用可能な餌は、長径が約8～15μm未満、細胞殻の強度が約70～100μN未満の小型で脆い微細藻類に限定されている一方で、大きく成長すると100μmを超える大型の群体を作る浮遊珪藻や、300μNを超える堅い殻を持つ底生珪藻も餌として利用できるようになることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

餌料環境の正確な把握は、危機的な状況にある我が国の二枚貝類の増養殖における緊急かつ重要な課題と位置付けられている。ところがこれまで、天然海域における二枚貝の具体的な餌料すら明らかになっていなかったため、餌料環境の正確な評価は不可能な状況にあった。餌として適した微細藻類の特徴を二枚貝の成長段階ごとに解明した本研究の結果は、沿岸域への栄養塩供給方策の二枚貝資源におよぼす効果の正確な評価や、海面養殖における信頼性の高い環境収容力の算定など、餌料環境に起因すると想定されている二枚貝増養殖を取り巻く諸問題の解決のための不可欠な知見となると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Species compositions of microalgae which are fed by *Ruditapes philippinarum* (larvae to adults) and *Pinctada fucata martensii* (settled spat to adults) in the natural environment, as well as the suitable size and hardness of microalgae for feeding and digesting were examined. The results showed that the available food for bivalves in their early life stage (larvae to small juveniles) was limited to small and fragile microalgae with diameter of less than about 8-15μm and a strength of less than about 70-100μN. On the other hand, bivalves that grow to more than a few millimeters in shell length are able to feed on planktonic diatoms forming long colonies exceeding 100μm, and digest benthic diatoms with a hard cell walls exceeding 300μN.

研究分野：海洋生態学

キーワード：二枚貝 食性 DNAメタバーコーディング 珪藻 餌料環境 アサリ アコヤガイ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

我が国の二枚貝増養殖において、餌料環境の正確な把握は重要かつ緊急の課題である。ここ数十年にわたり、日本のアサリ資源は全国的に極めて低い水準で低迷しており、その一因として、沿岸域の貧栄養化に伴う微細藻類の減少が指摘されている。特に、飢餓耐性の低い生活史初期（浮遊幼生期や着底初期）における餌料不足は致命的であり、本種の資源加入量を著しく減少させる危険性を孕んでいる。さらに、2019 年に三重県、愛媛県においてアコヤガイ稚貝が大量斃死し、その原因究明が急務となっている。現時点での知見は限定的であるが、冬季の高水温と餌料不足が、飢餓耐性の低い稚貝の斃死をもたらした可能性が指摘されている。このように、天然の微細藻類に依存する二枚貝増養殖において、餌料不足は普遍的かつ深刻な死亡要因と位置付けられている。

ただし現在のところ、天然海域における二枚貝の適餌料すらよく分かっておらず、餌料環境を正確に把握することも困難である。海洋の環境水中には多種多様な微細藻類が混在しており、沿岸域では、長大な群体をつくる浮遊珪藻が時に圧倒的な優占種となるほか、非常に堅いシリカの細胞殻を持つ珪藻類も多い。従来は、それらすべてが二枚貝の餌料となるという前提のもと、微細藻類の総量の指標であるクロロフィル a 濃度が餌料環境の評価に利用されてきた。しかしながら、二枚貝の摂食や消化に適さない微細藻類が多い場合にはクロロフィル a 濃度は餌料環境の指標として適当ではない。近年、二枚貝資源の餌料環境の改善を目的として、排水規制基準を緩和して沿岸域へ栄養塩を供給する試みが瀬戸内海を中心に始まった。ところが、天然海域における二枚貝の適餌料が未解明である以上、栄養塩水準と二枚貝の餌料環境との関係も不明瞭であり、栄養塩の供給が二枚貝資源におよぼす影響についても現段階での評価・予測は難しい。申請者はこれまで、アサリの摂餌生態・消化機構と珪藻類の関係に着目して研究を進め、珪藻類の「大きさ」と「細胞殻の堅さ」が二枚貝の餌料としての適・不適を決める重要な要因であり、二枚貝の成長に伴って「適餌料」も変化することを明らかにしてきた。濾過食者である二枚貝は、環境水中の粒子を丸飲みして摂食するが、大きすぎる粒子を摂食することはできない。特に、体サイズの小さい浮遊幼生や初期稚貝は、沿岸域で優占する長大な群体性の珪藻をほとんど摂食できていないことが明らかになった。また、二枚貝は、胃内部の「桿晶体」というゼラチン質の構造を回転させることで丸飲みした珪藻のシリカの細胞殻をすり潰して細胞内容物を消化吸収するが、「堅い」種の消化管内での破壊率は「脆い」種と比べて有意に低い。さらに、それらの「堅い」珪藻は、消化機構が未発達な浮遊幼生や初期稚貝の消化管内では破壊にくく、栄養源として寄与しづらいことも分かってきた。

2．研究の目的

本研究では、アサリ（調査海域：三重・愛知県伊勢湾、京都府阿蘇海）およびアコヤガイ（調査海域：三重県英虞湾）の浮遊幼生から成貝を対象に、電子顕微鏡観察と分子学的手法に基づく消化管内容物解析、給餌実験、微細藻類の細胞殻の物理的強度の測定を組み合わせることによって、適餌料となる微細藻類の「大きさ」と「堅さ」の基準を確立することを目的とした。

3．研究の方法

二枚貝は、天然海域の環境水中に存在する種々の微細藻類のうち、摂食に適した大きさの種を選択的に摂食していると考えられている。本研究では、消化管内および環境水中から抽出した総

DNA 試料を、微細藻類のユニバーサルプライマー（珪藻特異的なプライマーと光合成生物を網羅的に増幅可能なプライマー）を用いて PCR で増幅後、次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディング解析を行った。その後、環境水、環境砂泥、アサリ消化管内容物中の微細藻類組成を、多次元尺度構成法を用いて解析するとともに、どのような大きさ、形態の微細藻類が二枚貝の摂食に適さないかを検証した。また、大きさが可塑的な群体性の浮遊珪藻については、野外から単離・培養した群体性の浮遊珪藻を二枚貝に給餌し、どの長さの群体が良く摂食されたかを検討した。

二枚貝が摂食した微細藻類の中には、破壊・消化されずに排泄されてしまう「堅い細胞殻を持つ種」も存在し、それらは栄養源として寄与しない。本研究では、各微細藻類の消化管における破壊の有無を調べるため、野外から採集した二枚貝の消化管断面の SEM 観察を用いて、細胞殻およびその断片の形態から微細藻類を種同定した。加えて、二枚貝が破壊可能な微細藻類の「堅さ」の基準を確立するため、微粒子の物理的強度を測定する装置「ナノインデント」を用いて環境水中から採集した種々の微細藻類の細胞殻の堅さを定量的に測定した。

4．研究成果

天然海域で採集した殻長 100 μm 程度の浮遊幼生から殻長 80 mm 程度の成貝に至る各成長段階のアサリおよびアコヤガイについて、DNA 抽出方法（解剖、DNA 抽出キットの選択）、PCR における DNA 希釈倍率などの各種条件を検討し、安定して対象領域を増幅可能な手法を確立した。光合成植物を網羅的に増幅するプライマーを用いた DNA-MB 解析の結果、アコヤガイ初期稚貝および成貝の消化管内からは珪藻だけでなく、藍藻やハプト藻、クリプト藻、ピングイオ藻等の多様な微細藻類が検出された一方で、シアノファージを中心とするウィルス類やデータベース上に配列情報がない同定不能な生物種が非常に高い割合で検出された。この結果を受け、以後の解析においては、主に珪藻特異的なプライマーを用いた DNA-MB 解析を実施した。アサリおよびアコヤガイの着底初期稚貝、稚貝、成貝について、葉緑体 *rbcL* 領域上に設計された珪藻類のユニバーサルプライマーを用いた DNA メタバーコーディングに基づく食性解析を実施し、両種の食性とその成長に伴う変化を検討した。その結果、各海域で採集されたアサリ、アコヤガイいずれについても、着底初期稚貝は基質上の底生珪藻を、成長するにしたがって徐々に環境水中の浮遊珪藻を摂食するようになることが明らかとなった。さらに、アサリについては、このような食性の変化は、入水管が完成する殻長約 2 mm を境に生じることも明らかとなった。

天然海域で採集したアサリの浮遊幼生、着底稚貝、初期稚貝の消化中の微細藻類組成を走査型電子顕微鏡で観察した結果、浮遊幼生、着底初期稚貝いずれにおいても、消化管内からは多様な珪藻類が観察された。浮遊幼生の消化管内においては、*Minidiscus* spp.、*Chaetoceros* spp.、*Pseudo-nitzschia* spp.、*Thalassiosira* spp.、*Cyclotella* spp.などの浮遊珪藻が優占して認められた。そのうち、*Chaetoceros* spp.、*Pseudo-nitzschia* spp.のように比較的薄い細胞殻を有する珪藻は、破壊されて断片化していたのに対し、厚い細胞殻を有する *Thalassiosira* spp.、*Cyclotella* spp.などは、大きく損傷することなく原形を保った状態で観察された。浮遊幼生の消化管内における珪藻全体に占める破壊されていた珪藻の割合は、およそ 30～80%程度であった。一方、着底・初期稚貝の消化管内においては、*Amphora* spp.、*Licmophora* spp.、*Anorthoneis* spp.を主体とする底生・付着珪藻が大部分を占めており、浮遊珪藻は数個体の消化管からわずかに認められたのみであった。この結果は、上記の DNA-MB の結果とよく一致していた。一方、底生珪藻のうち、*Licmophora* spp.を除く大部分の珪藻属については、細胞殻がほとんど破壊されていない状態で認められた。消化管内に認められた破壊されていない珪藻の長径の最大値は、浮遊幼生で約 8 μm 、着底稚貝で約 12

μm、初期稚貝で約 15 μm であったが、観察個体数が少ないため十分な検証はできなかった。

群体性珪藻を用いた飼育実験の結果、アサリ稚貝や成貝は、長い群体の存在下では、摂食速度が有意に低下するものの、長い群体性珪藻を摂食時に短く折ることで飲み込むことが可能であることが明らかになった。

各成長段階のアサリが破壊可能な珪藻類の物理的強度を調べるために、消化管内容物の SEM 観察において「破壊されていなかった珪藻」の細胞殻の堅さを、ナノインデントを用いて測定した結果、着底初期稚貝や殻長 2 mm 未満の稚貝では、150 μN 程度の堅さの *Cocconeis* spp. や 100 μN 程度の *Amphora* spp. などの底生珪藻も効率的に破壊できないことが明らかになった。

以上の研究結果から、浮遊幼生期や着底初期の二枚貝の餌料環境は、環境水中のクロロフィル a 濃度では評価できず、基質上に付着・堆積する微細藻類の種組成やそれらの物理的強度を調べることが重要と考えられた。一方、殻長数 mm 以上に成長した稚貝や成貝は、大型の群体を形成する珪藻や堅い細胞殻を有する珪藻を含む、環境中の微細藻類の大部分を餌料として利用できると考えられるため、環境水中の微細藻類の総量の指標であるクロロフィル a 量が餌料環境の指標として有用と推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 HOUKI SHOUJI	4. 巻 87
2. 論文標題 Dietary analysis of bivalve larvae based on observation of the stomach contents using a scanning electron microscope	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NIPPON SUISAN GAKKAISHI	6. 最初と最後の頁 424 ~ 426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2331/suisan.20-00069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎真奈・伯耆匠二
2. 発表標題 消化管内容物の電子顕微鏡観察に基づくアサリ着底初期稚貝の食性解析
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伯耆匠二
2. 発表標題 DNAメタバーコーディングに基づくアコヤガイの食性解析
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾崎真奈・伯耆匠二
2. 発表標題 DNAメタバーコーディングに基づく 天然海域における着底期以降のアサリの食性解析
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------