

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450248

研究課題名(和文) 海の牧草スケルトネマの簡便で定量的な同定方法開発とそれを用いた生理生態特性の解明

 研究課題名(英文) Development of a qualitative method for identifying species of the diatom genus *Skeletonema* and elucidation of the physiological and ecological characteristics of each species

研究代表者

山田 真知子 (Yamada, Machiko)

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：30438303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：珪藻*Skeletonema*属は、水中生態系の基礎生産者あるいはノリ有害藻の一つとして重要な植物プランクトンである。2005・2007年に分類同定法が提案され11種が確立されたが、これは画期的ではあったものの作業が煩雑で同定に日数を要し、高額なうえに定量的ではない。そこで、これら短所を凌駕すべく、リアルタイムPCR(qPCR)を用いた同定法の開発を試みた。各種についてrDNAプライマーを設計し、海水中の栄養細胞のみでなく堆積物中の休眠細胞について定量的に検討を行った結果、優占種に加え従来法では検出されなかった少量の種も同定され、リアルタイムPCR法の現場での汎用が見込まれた。

研究成果の概要(英文)：Diatoms of the genus *Skeletonema* are important primary producers in aquatic ecosystems; some adversely impact Nori culture. In 2005 and 2007 Sarno et al. classified each of 11 *Skeletonema* species and established a method to distinguish them. Their method is reliable except for classification of *S. dohrnii* and *S. marinoi*, which are cryptic species; however, it is complicated, time-consuming, expensive, and non-quantitative. To make a better method, we developed a method based on quantitative real-time PCR (qPCR); the rDNA primers were designed for the ten species that occur in Japanese coastal waters. The use of qPCR allowed us to identify not only vegetative cells in the water column but also resting cells in the sediments. We successfully identified dominant species found by conventional methods as well as less abundant co-occurring species. Our experience has been that qPCR is most frequently the best method for identifying *Skeletonema* species in both the water column and sediment.

研究分野：水産学 水界生態学

キーワード：Skeletonema属各種 リアルタイムPCR法 プライマー rDNA 同定 定量 安価 簡便

1. 研究開始当初の背景

(1) 珪藻 *Skeletonema* 属は、南極海を除く世界各地の沿岸海域、汽水域および淡水域に出現するコスモポリタンの植物プランクトンである。本属は、水域生態系の基礎生産者として食物連鎖を支える重要なプランクトンである一方、世界中で赤潮を頻繁に形成し、ノリ養殖では有害藻としても知られている。さらに、本属に関する論文が過去 15 年間で約 588 報に及ぶことから、その重要性が理解される。

(2) この *Skeletonema* 属は 2005・2007 年に Sarno et al. によって微細形態観察と DNA 解析を用いた分類基準が報告され、*Skeletonema costatum* s.l. (sensu lato) とされていた種が *Skeletonema ardens*, *S. costatum* s.s. (sensu stricto), *Skeletonema dohrnii*, *Skeletonema grethae*, *Skeletonema grevillei*, *Skeletonema japonicum*, *Skeletonema marinoi*, および *Skeletonema pseudocostatum* の 8 種で構成されていることが示された。また、従来から報告されている *Skeletonema menzelii*, *Skeletonema subsalsum*, および *S. tropicum* の 3 種に加え、2014 年には Duleba によって淡水産種の *Skeletonema potamos* の塩基配列が報告され、*Skeletonema* 属は 12 種類に分類された。当研究室では 2015 年に *S. pseudocostatum* の隠蔽種である *Skeletonema* sp. cf. *pseudocostatum* を識別しており、また、*S. dohrnii* と *S. marinoi* は *cox1* の遺伝子配列と微細形態から互いに隠蔽種であることを確認し、これを *Skeletonema marinoi-dohrnii* complex と呼称することとした (Yamada et al. 2016)。以上のことから、現在、*Skeletonema* 属は 12 種が存在する。

(3) *Skeletonema* 属は、海水中で浮遊生活する栄養細胞に加え、生存に不適となった場合には堆積物中で発芽を待機する休眠細胞の 2 ステージを有する。水産技術者がこのような生活史を持つ *Skeletonema* 属各種の赤潮発生機構や個体群動態などを調べる場合には、2 ステージについて調査される必要がある。

(4) しかし、これまで *Skeletonema* 属各種の同定は Sarno et al. (2005.2007) の方法に基づいて行われてきており、この方法では *Skeletonema* 属を単離培養しなければならず、その後の操作も煩雑である。このように、この方法は、同定までに時間を要し、解析費用が高価で、さらに定量的ではない。水産技術者が、この方法を汎用するには課題が残る。

2. 研究の目的

(1) 水産技術者が *Skeletonema* 属各種の同定を日常的に行えるように、操作が簡便で安価、定量的、なおかつ調査当日に同定できるリアルタイム PCR を用いた手法の開発を試みた。そのために、種に特異的な rDNA プライマーを設計した。

栄養細胞と休眠細胞の両方のステージについて、定量的な同定手法の開発を試みた。

リアルタイム PCR を用いた手法と Sarno et al. (2005.2007) の単離培養法で同定された *Skeletonema* 属各種の比較検討を行い、リアルタイム PCR 法の特徴を検討した。

(2) プライマーは *Skeletonema* 属 10 種について設計した。*S. dohrnii* と *S. marinoi* は互いに隠蔽種であることから 1 種としてプライマーを設計し、*S. subsalsum* は世界で塩基配列が 1 株しか確認されておらず現在では株保存所から消失していることから、また *S. sp. cf. pseudocostatum* も世界での報告例が少ないことから対象から除外した。一方、*S. potamos* は Sarno et al. (2005・2007) 以降に出現が確認されたことから、プライマーの設計対象とした

3. 研究の方法

(1) 種特異的なプライマーの設計 10 種の rDNA 塩基配列を clustal X を用いてアライメントを行い、種毎の特異的な配列域を選定しプライマー (Katano et al. 投稿中) として表 1 に示した。

表 1 *Skeletonema* 属 10 種のプライマー塩基配列

種	対象遺伝子	名称	プライマー	
				塩基配列
<i>S. ardens</i>	28S	arde	F	GTTAATCGACGTTGTTATCG
			R	GCCGACAATGCCTTCTATAA
<i>S. costatum</i> s.s.	28S	cost	F	TCAGCATTGGCTTGATCT
			R	TCCAGGATATGAAGAGTGG
<i>S. grethae</i>	28S	gret	F	ATTTGAACCTGCCGAGGTC
			R	CCAAGGAAGTCCGAAGGG
<i>S. grevillei</i>	28S	grev	F	TGGAAGCGAATGAACAAGT
			R	CGACCCAGAACATGAATAAT
<i>S. japonicum</i>	28S	japo	F	CTTGATTGATGCTGCGA
			R	TCC GAA GGA AGT CCG AA
<i>S. marinoi-dohrnii</i> complex	18S	mado	F	AATTGCATGACCACGTGT
			R	CAACAGAGTTTGTGGTCAGT
<i>S. menzelii</i>	28S	menz	F	TCCCTGATTGATGTTGC
			R	GACCTCCGAAGAGAGT
<i>S. potamos</i>	28S	pota	F	GTCAGCATTGGCTTGACTT
			R	CAACCCAGGATATGAAGAGT
<i>S. pseudocostatum</i>	28S	pseu	F	GAGTCCGGTTAACTGTATTG
			R	CGCAACAARTCCAGGCAT
<i>S. tropicum</i>	28S	trop	F	GAATCTGGGTTAAGTGCATTG
			R	GCACAACAATCTAGGCAT

(2) 株の培養と DNA 抽出 実験には、表 2 に示すように、*Skeletonema* 属 10 種 23 株を用いた。これらの株の培養は温度 15~25℃、光強度 80μE m⁻²s⁻¹、明暗周期 14L:10D の条件下で ESM 培養液を用いて行った。各株の DNA の抽出には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いた。ウルトラピュア 99 μL にゲノム DNA 1 μL を加え、分光光度計で 260nm における吸光度を測定し、DNA 濃度を計算した。

(3) プライマーの種特異性の確認 リアルタイム PCR は Roche 社の Light Cycler 480 を、蛍光物質に SYBR® Green I を用いた。PCR の

表 2・プライマーの種特異性の確認に用いた *Skeletonema* 属 10 種 23 株とその登録番号

種	株 ID	登録番号
<i>S. ardens</i>	CCMP794	DQ396492
	FDK003	AB572611
	FDK005	AB572613
<i>S. costatum</i> s.s.	FDK009	AB572617
	FHO007	LC192737
<i>S. grethae</i>	CCMP2508	AJ633523
<i>S. grevillei</i>	FON073	AB948131
	HPL001	LC192748
<i>S. japonicum</i>	FON070	AB948133
	FDK154	AB572762
	CCMP1281	AJ633524
<i>S. marinoi-dohrnii</i> complex	CCMP779	LC258373
	CCMP2480	AB948146
	FDK033	AB572641
<i>S. menzelii</i>	CCMP1009	AJ535165
	CCMP787	AJ633527
	CCMP790	AJ633528
	DM08090730	AB555561
<i>S. potamos</i>	FDK222	AB572830
	FCH10#20	LC258398
<i>S. pseudo-costatum</i>	CCMP2472	LC258394
	CCMP2475	AJ633510
<i>S. tropicum</i>	CCMP2802	DQ396502

操作手順は、全株とも Pre-incubation を 95 5 分, Amplification を 95 10 秒, 58 10 秒, 72 10 秒で 45 回繰り返し, Melting curve は 95 で 5 秒, 65 で 1 分, さらに 97 まで上昇させ 40 で cooling を行った。これらのプライマーの種特異性は、全種株を用いてリアルタイム PCR で確かめた。また、各種株の DNA 濃度は、5ng/μL, 0.5ng/μL, 50pg/μL, 5pg/μL の 4 段階で検量線を作成して求めた。

(4) 現場試料への適用 有明海と筑後川感潮域の海水と堆積物を用いて、開発したリアルタイム PCR を用いた定量的 *Skeletonema* 属同定法の有用性を検討した。

有明海の湾奥西部海域の 428 号鋼管で、堆積物の採取を 2015 年 10 月~12 月に 3 回、海水の採取を 2016 年 1 月~3 月に 7 回にわたって行い、サンプルとした。水質(温度、塩分)測定を採水時に行った。筑後川の六五郎橋と有明海北東部に位置する佐賀大学観測タワーの 2 地点で 2016 年 10 月 15 日に堆積物を採取し、解析に供した。海水からの DNA の抽出は、サンプルをポリカーボネイト製 2.0μm の濾紙を用いて濾過を行い、このフィルター残渣を -20 で冷凍保存し Park et al. (2012) の方法に従って行った。また、堆積物からは、0.5g を ISOIL for Beads Beating (NIPPON GENE) を用い DNA を得て、

これを 100 μl の TE buffer で抽出した。なお、これまでの調査で日本に出現の確認されていない *S. grethae* は、Kooistra et al. (2008) によれば、出現が北米のみに限定されていることから、本種は野外調査の検討から除外した。

海水中の *Skeletonema* 属の密度は、光学顕微鏡下で総細胞密度を求め、リアルタイム PCR から得た各種の DNA 量の割合から、各種の細胞密度を算出した。

Skeletonema 属の単離培養は現場に近似した水質で行い、*cox1* を用いた同定 (Yamada et al. 2016) を行った。

4. 研究成果

(1) プライマーの種特異性の確認 リアルタイム PCR 用のプライマーの種特異性は、予備実験から、塩基増幅のアニーリング温度は 10 種全てで 58 , 伸長時間は *S. marinoi-dohrnii* complex のみ 16 秒でその他の種は 10 秒であることを確認した。また、10 種のプライマーの検量線は、設定した 4 段階の DNA 濃度において傾き -3.14 ~ -3.96 , efficiency 1.79 ~ 2.04 , R² は 0.99 ~ 1.00 であった。プライマー 10 種を *Skeletonema* 属 23 株用いて種特異性の検討を行った結果、表 3 に示すように、これらの各々は対象種に対してのみ特異的に結合することが認められ、野外調査に使用できることが確認された。

(2) 現場試料への適用

海水中の *Skeletonema* 属 有明海の 428 号鋼管において、水温は 2016 年 2 月 28 日まで 6.9 ~ 9.2 で、以降の 3 回の調査では 10.1 ~ 12.8 へと昇温していた。塩分は全調査で 28.6 ~ 30.4 であった。図 1 に示すように、428 号鋼管で採取された海水についてリアルタイム PCR 法で同定を行った結果、優占種は 3 月 10 日までの 6 サンプルでは *S. marinoi-dohrnii* complex で、最終調査日の 3 月 24 日のサンプルでのみ *S. japonicum* であった。一方、単離培養法では、優占種は 2 月 23 日までの 5 サンプルでは *S. marinoi-dohrnii* complex で、以降の 2 サンプルでは *S. japonicum* であった。このように 6 サンプルでは両方法の優占種は一致したが、3 月 10 日のサンプルでは一致しなかった。3 月 10 日の海水中 *Skeletonema* 属は海水中の密度が低く単離培養法では *Skeletonema* 属を単離できなかつたため、栄養塩を海水に添加し増殖を待機した。この海水培養の 1 週間に *S. japonicum* は増殖が誘導期から対数増殖期に入りサンプル中で多量増殖したが、一方凋落傾向の *S. marinoi-dohrnii* complex は旺盛な増殖はできなかつたことが推定され、これが両法での優占種の相違に關与していると推測された。

表3 *Skeletonem* 属プライマー各種の種特異性

種	プライマー										
	株ID	arde	cost	gret	grev	japo	mado	menz	pota	pseu	trop
<i>S. ardens</i>											
	CCMP794	+	-	-	-	-	ND	-	ND	-	ND
	FDK003	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FDK005	+	-	-	-	-	ND	-	ND	-	ND
<i>S. costatum</i> s.s.											
	FDK009	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	FHO007	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. grethae</i>											
	CCMP2508	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. grevillei</i>											
	FON073	-	-	-	+	ND	-	-	ND	-	-
	HPL001	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. japonicum</i>											
	FON070	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	FDK154	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	CCMP1281	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>S. marinoi-dohrnii</i> complex											
	CCMP779	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	CCMP2480	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	FDK033	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	CCMP1009	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>S. menzelii</i>											
	CCMP787	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	CCMP790	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	DM0809730	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	FDK222	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. potamos</i>											
	FCH10-20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. pseudocostatum</i>											
	CCMP2472	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	CCMP2475	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. tropicum</i>											
	CCMP2802	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+, 陽性; -, 陰性; ND, 分析しなかった。

また,リアルタイム PCR 法では優占した 2 種その他, *S. costatum* と *S. grevillei* など 5 種が少量, 随伴種として確認された。

堆積物中の *Skeletonema* 属 有明海の 428 号鋼管において, 栄養細胞の調査に先立ち 10 月 ~ 12 月の月上旬に 3 回程, 堆積物の *Skeletonema* 属休眠細胞の種組成を調べた(図 2)。その結果,リアルタイム PCR 法では全サンプルで *S. marinoi-dohrnii* complex が優占し,

S. costatum をはじめ *S. potamos*, *S. grevillei*, *S. japonicum*, *S. menzelii* および *S. tropicum* などの 5 種が少量, 随伴種として認められた。単離培養法においても, 3 サンプル全てで *S. marinoi-dohrnii* complex が優占し, *S. costatum* が少量混生して,リアルタイム PCR 法の結果と優占種が一致した。

このように, 両方法では優占種は一致したものの, 休眠細胞の種類数はリアルタイム PCR

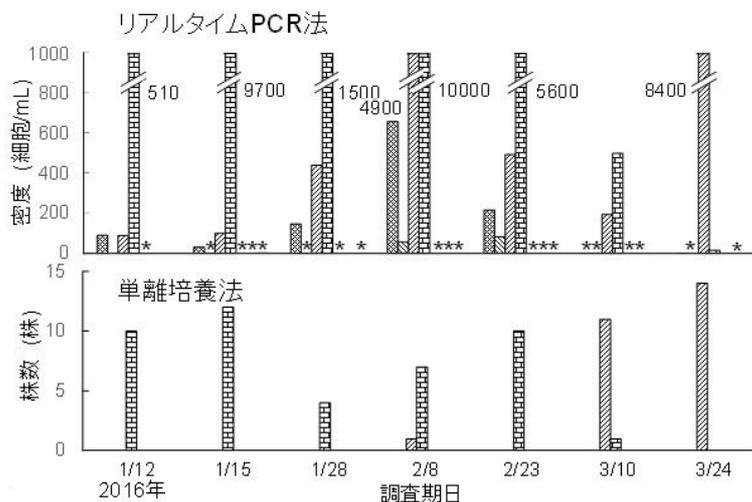


図1 有明海428号鋼管における海水中の*Skeletonema*各種をリアルタイムPCR法と単離培養法とで同定した結果の比較 * , 0.1~7.1細胞/mL出現; *S. costatum*; *S. grevillei*; *S. japonicum*; *S. marinoi-dohrnii* complex; *S. menzelii*; *S. potamos*; *S. pseudocostatum*.

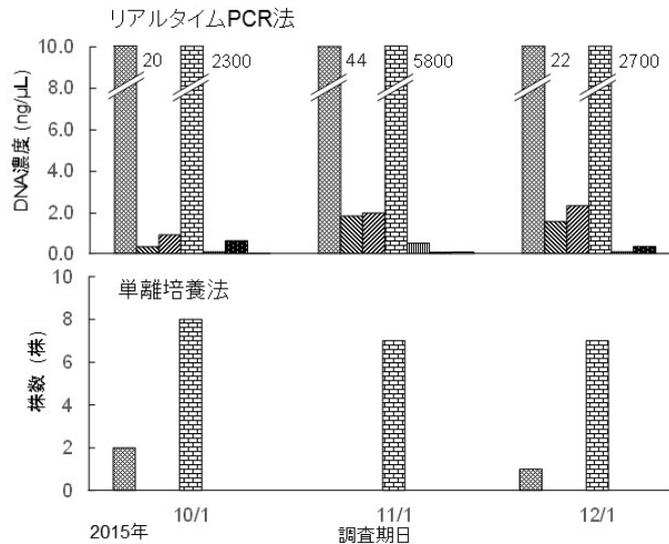


図2 有明海428号鋼管における堆積物中の*Skeletonema*各種をリアルタイムPCR法を用いて同定した結果と堆積物から発芽した*Skeletonema*各種を単離培養法で同定した結果の比較

■, *S. costatum*; ▨, *S. grevillei*; ▩, *S. japonicum*; ▤, *S. marinoi-dohrnii complex*; ▥, *S. menzeli*; ▦, *S. potamos*; ▧, *S. tropicum*.

法の方が単離培養法より多かった。リアルタイム PCR 法での水中で低密度の栄養細胞が堆積物中の休眠細胞の発芽細胞，あるいは堆積物からの舞い上がりかどちらであるのか判定するため，発芽の認められた海水をリアルタイム PCR 法で確認する必要がある。なお，今回の調査および2011年に同地点で行った調査(山田ら 2016)によれば，冬季の海水中の優占種が *S. marinoi-dohrnii complex* であったことから，*Skeletonema* 属のノリ養殖有害藻として本種も関与していることが示唆された。

佐賀大学有明海観測タワーと筑後川の六五郎橋における秋季の堆積物中の *Skeletonema* 属組成を，図3に示した。海域に位置するタワーでは，リアルタイム PCR 法において優占種は *S. marinoi-dohrnii complex* で，*S. japonicum* や *S. costatum* など5種も少量，随伴的に認められた。単離培養法においても，*S. marinoi-dohrnii complex* が優占し，*S. costatum* と *S. japonicum* の2種も少量単離された。一方，汽水産種の *S. costatum* が優占し，淡水産種の *S. potamos* も混成した。単離培養法では，*S. costatum* のみが確認された。このように，両地点の堆積物からはリアルタイム PCR 法と単離培養法では優占種が同一であったものの，前者の方が多くの種類を確認できた。

(3) 今後の課題とまとめ

リアルタイム PCR 法の今後の課題として，同一種の株による DNA 含量や Tm 値の相違の検討などが挙げられる。また，堆積物中の *Skeletonema* 属休眠細胞の色々な条件下での

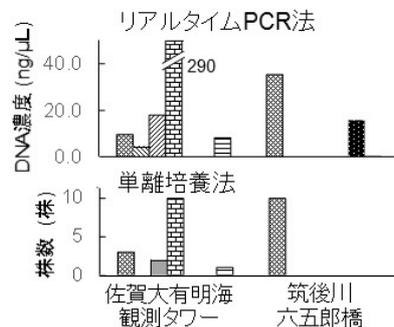


図3 佐賀大学有明海観測タワーと筑後川六五郎橋における堆積物中の*Skeletonema*各種をリアルタイムPCR法を用いて同定した結果と堆積物から発芽した*Skeletonema*各種を単離培養法で同定した結果の比較 (2016年10月15日に採泥) 記号は図2と同じ

発芽能を，リアルタイム PCR 法で検討する必要もある。しかし，リアルタイム PCR 法は従来法の単離培養法と比較し，優占的あるいは随伴的に出現する *Skeletonema* 属各種を栄養細胞のみでなく休眠細胞についても，調査当日に簡便な操作で安価かつ定量的に同定を行えることを確認した。水産技術者の本法の汎用が見込まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Machiko Yamada, Mayuko Otsubo, Yuki Tsutsumi, Chiaki Mizota, Yuka Nakamura, Kazuya Takahashi & Mitsunori Iwataki, Utility of mitochondrial-encoded cytochrome c oxidase I gene for phylogenetic analysis and species identification of the planktonic diatom genus *Skeletonema*. Phycological Research, 2017, Version of record online: 19 1-9, 査読有

2. 山田真知子, 大坪繭子, 多田邦尚, 中野義勝, 松原 賢, 飯田直樹, 遠藤宜成, 門谷 茂, 亜熱帯から亜寒帯に及ぶ我が国の5海域における珪藻 *Skeletonema* 属の種組成, 日本水産学会誌, 83, 2016 25-33, 査読有
3. Machiko Yamada, Mayuko Otsubo, Masashi Kodama, Keigo Yamamoto, Tetsuya Nishikawa, Kazuhiko Ichimi, Kuninao Tada & Paul J. Harrison, Species composition of *Skeletonema* (Bacillariophyceae) in planktonic and resting-stage cells in Osaka and Tokyo Bays Plankton Benthos Res, 9, 2014, 168-175, 査読有

〔学会発表〕(計12件)

1. 山田真知子, 水圏環境の変動に対する植物プランクトンの応答とその影響 4. 洞海湾における海域環境の長期変動と植物プランクトン群集の応答, 平成28年度水産環境保全委員会研究会, 近畿大学, 奈良, 2016年9月11日
2. 原田愛美, 新井夏菜子, 柳 哲雄, 大坪繭子, 山田真知子, 洞海湾の過去100年間にわたる堆積物から発芽した珪藻 *Skeletonema* 属の種多様性, 2016年日本ベントス学会日本プランクトン学会合同大会, 熊本, 2016年9月8日
3. 中村友香, 岡村海咲, 藤河 茜, 加藤志保, 大坪繭子, 山田真知子, 東南アジア沿岸水域における海産珪藻 *Skeletonema* 属の種多様性, 2016年日本ベントス学会日本プランクトン学会合同大会, 熊本, 2016年9月8日
4. 宮村咲香, 丸尾愛和, 大坪繭子, 山田真知子, 片野俊也, 園城寺夏美, 堀 恭子, リアルタイム PCR を用いた海産珪藻 *Skeletonema* 属の簡便・安価・定量的同定法の開発, 日本ベントス学会日本プランクトン学会合同大会, 熊本, 2016年9月8日
5. 山田真知子, 大坪繭子, *Skeletonema* 属を中心とした珪藻の分類の現状と課題, 平成27年度水産関係研究開発推進会議・漁場環境保全関係研究開発推進会議 赤潮・貝毒部会ミニシンポジウム, 広島, 2015年12月11日
6. 円城寺夏実, 片野俊也, 大坪繭子, 山田真知子, 珪藻 *Skeletonema* 属における rDNA を対象とした PCR 法による種判別の検討, 2015年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, 北海道 2015年9月5日
7. 濱崎智美, 大坪繭子, 山田真知子, 円城寺夏実, 片野俊也, 藻類の分子同定におけるマーカーチョイスの重要 *Skeletonema* 属を用いて, 2015年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, 北海道, 2015年9月5日

8. 山口翔子, 濱崎智美, 大坪繭子, 山田真知子, 海産珪藻 *Skeletonema* sp. cf. *pseudocostatum* の分子系統学的な位置と微細形態の特徴について, 2015年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, 北海道, 2015年9月5日
9. 岡村海咲, 藤河茜, 加藤志保, 大坪繭子, 山田真知子, 東南アジア湾沿岸域における海産珪藻 *Skeletonema* 属の種多様性, 2015年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, 北海道, 2015年9月5日
10. Machiko Yamada, Mayuko Otsubo & Nataumi Enjoji, Biogeographical and ecological characteristics of *Skeletonema* species (Bacillariophyta) in Japanese coastal waters, Seminar in Research Center for Oceanography, Indonesian Institute of Sciences, Jakarta, 25, Nov. 2014
11. 山田真知子, 大坪繭子, 高橋和也, 岩滝光儀, 珪藻 *Skeletonema potamos*, *S. subsalsum* および *S. costatum* s.s. の分類の検討, 2014日本水産学会, 福岡, 2014年9月21日
12. 藤河 茜, 田中咲季, 円城寺夏美, 加藤滋保, 小島里穂, 大坪繭子, 山田真知子, 韓国沿岸とベトナム沿岸における海産珪藻 *Skeletonema* 属の種多様性, 2014年度日本プランクトン学会・日本ベントス学会合同大会, 広島 2014年9月5日

〔その他〕

謝辞 研究に有用なご助言をいただき, また試料を採取いただいた瀬戸内海区水産研究所松原 賢博士, 佐賀県水産振興センター三根崇幸博士, 堀 恭子技師, および佐賀大学低平地沿岸海域研究センター木村 圭博士に深謝いたします。研究にご尽力いただいた福岡女子大学の中村麻理奈氏, 濱崎智美氏, 宮村咲香, 丸尾愛和氏, および東京海洋大学の円城寺夏実氏に厚くお礼申し上げます。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 真知子 (MACHIKO YAMADA)
福岡女子大学・国際文理学部・教授
研究者番号: 30438303

(2) 研究分担者

片野 俊也 (TOSHIYA KATANO)
東京海洋大学・学術研究院・准教授
研究者番号: 00509820
大坪繭子 (MAYUKO OTSUBO)
福岡女子大学・国際文理学部・助手
研究者番号: 70336965