

(9) ふくいの磯根生物持続的利用技術開発事業

中嶋 登・原 誠二・谷保 文野

富永 修・浜口 昌巳（福井県立大学 海洋生物資源学部）

1 目的

浅海域に生息するウニ類、アワビ類、サザエ等の動物や食用の海藻等は磯根資源と呼ばれている。福井県内のウニ類、アワビ類およびサザエの漁獲量は、アワビ類を除いて大幅に減少している。特にウニ類については、1970年代は約200トンの水揚げがあったが、現在では数トンに減少しており、減少量は極めて大きい。ウニ類の漁獲量が減少した原因は、資源量が減少したためであると考えられている。

これらの生物の資源量を増大させる方法として、人工種苗の放流や漁場環境の改善などが挙げられる。一般的に、魚類に比べてこれらの生物の移動能力は低いため、放流場所の環境が生物にとって良好でなければ、放流効果は小さくなると予想される。餌料環境は漁場環境を評価するための重要な指標の一つであるが、福井県内のウニ類の摂餌生態を詳細に調べた事例はNakano *et al.* (2017) を除き皆無であった。本事業の前進事業である「ふくいの海藻増養殖技術開発事業」では、Nakano *et al.* (2017) の方法に基づき、ムラサキウニ *Heliocidaris crassispina* とバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* が摂餌している海藻の種類を調査し、漁場環境の把握に有益な知見を得た。一方で、県内の沿岸域に生息するウニ類の中でも、バフンウニと並び主要な漁業対象種となっているアカウニ *Pseudocentrotus depressus* についても調査を行ってきたが、ムラサキウニやバフンウニと同様の方法では十分に餌料海藻種を特定することができず、調査方法の改良が課題となっていた。本研究では、磯根生物が摂餌した海藻の種同定方法の確立を目的とし、アカウニの胃内容物のDNA抽出方法、DNAサンプルを用いたMetabarcoding等解析方法の検討およびアカウニの炭素・窒素安定同位体比の検討を行った。

2 方法

1) 磯根生物採集

福井県若狭町世久見海岸（以下、「世久見海岸」と言う。）を調査場所として設定した。図1に示す3漁場を調査地点として設定し、2022年8月29日、11月11日および2023年2月27日に、素潜りによりアカウニを各10個体採集した。また、ウニの採集時に採集場所周辺の海藻の種組成および主要な海藻種の割合を目視で確認し記録すると共に、主要な大型海藻を採集した。採集したウニと海藻は福井県水産試験場栽培漁業センター（以下、栽培C）へ持ち帰った。

採集したアカウニは電子ノギス（ABS クーラントプルーフキャリパ CD-P20M, 株式会社ミットヨ製）を用いて殻径と殻高を0.1 mm単位で測定した。また、電子天秤（FX-3000iWP, 株市会社エー・アンド・ディ製）を用いて湿重量を0.01 g単位で測定し、解剖して生殖巣を取り出し、生殖巣重量を前述の電子天秤を用いて0.01 g単位で測定した。さらに、次の式により生殖巣指数を算出した。

$$(\text{生殖巣指数})(\%) = 100 \times (\text{生殖巣重量}) / (\text{湿重量}).$$

採集したウニの消化管内から胃内容物を取り出し、1.5 mLのマイクロチューブに保存した。また、ウニの口器、消化管の一部および重量測定後の生殖巣の一部を1.5 mLのマイクロチューブもしくはチャック付きポリ袋に保存した。胃内容物は、後述のDNA抽出作業を行うまで、口器、消化管、生殖巣は炭素・窒素安定同位体比分析のためのサンプル作製作業を行うまで、-30°Cで保存した。

本研究では、2022年8月29日および11月11日に採集したアカウニの胃内容物を胃内容物解析用の標本として、8月29日および11月11日に採集したアカウニの口器筋肉および11月11日に烏辺島前で採集したアカウニの生殖腺と消化管を安定同位体比分析用の標本として使用した。

2) アカウニの胃内容物の DNA 抽出および Metabarcoding 等解析方法の検討

これまで、ウニ類の消化管内容物の分子生物学的手法を活用した同定方法は、Nakano *et al.* (2017) がバフンウニで用いた方法がある。この論文は世界に先駆けて遺伝子解析に夜ウニ類の消化管内容物中の海藻の種を同定した画期的な論文である。この論文による方法では、バフンウニの消化管内容物の海藻片をそれぞれ一つずつ取り出して DNA を抽出して *rbcl* 領域を標的とした *direct-sequencing* による DNA-barcoding によって同定している。しかしながら、この論文で使われている方法には、以下の 4 つの問題点が挙げられる。

- ①海藻片の取り出しにおけるデータ抽出の偏りが生じる恐れがあること
- ②*rbcl* 領域の PCR の成功率が低いこと
- ③消化管内容物等の混合物中からの *direct-sequencing* では遺伝子の重複が起こりやすいこと
- ④解析する遺伝子領域の長さが長く、消化等による DNA の修飾を受けた場合の検出率が低下する恐れがあること

これらの改良のためには、①は消化管内容物全体から DNA を抽出する方法、②は他の遺伝子領域を使うこと、③では遺伝子の重複を避けるために *clone-library* 等による個々の遺伝子を正確に取り出す方法を使うこと、④では解析する遺伝子領域の長さを短くすること、などの対策が考えられる。加えて、大型褐藻類の詳細な種同定では、*Sargassum* 属であれば核 DNA の ITS-2 による分類やミトコンドリア DNA の COI や COIII 領域などが DNA-barcoding に使われることが多い^{3,15)}。また、近年では動物の消化管内容物の同定や海洋環境中の海藻・海草由来の環境 DNA の分析には、次世代シーケンサー (NGS) を活用した網羅的 DNA barcoding 法である Metabarcoding 解析が多用されている^{3,8,11,13)}。Rodriguez-Barreras *et al.* (2020) はプエルトリコの沿岸で採取した複数種のウニ類の消化管内容物を NGS を活用した Metabarcoding 解析によって検討している。そこで、本研究ではアカウニの消化管内容物の同定を遺伝子解析手法を用いてより高精度に行うために Nakano *et al.* (2017) の方法の①～④までの問題点を解決するとともに、DNA の抽出や NGS による Metabarcoding 解析手法を適用するにあたっての技術的な検討を行った。その結果をもとに、アカウニの消化管内容物中の餌生物について、より高精度に判定するために NGS による Metabarcoding 解析を主体として、それを補完する形で *clone-library* 法を併用した方法によって分析した。以下はその詳細を記す。

・消化管内容物からの DNA 抽出前処理

今回は、世久見地先の 3 漁場 (図 1) において、夏場の主要な漁期期間中である 8 月 29 日に採取された各漁場の 5 個体を解析に使用した。解凍した消化管内容物を、0.2 μ m のフィルタ-でろ過した後オートクレーブした滅菌海水で 3 回洗浄した。さらに、分子生物研究用エタノールで 2 回洗浄した後、消化管内容物を入れた 1.5ml チューブを、シリカゲルを封入した密封できるビニール袋に入れ、消化管内容物が完全に乾燥できるまで室温保存した。アカウニを採取した海域で採取された *Sargassum* 属 3 種 (イソモク、ノコギリモク、ジョロモク) については DNA 抽出に必要な量を切り取り、消化管内容物と同様の処理を行った。

・消化管内容物からの DNA 抽出

消化管内容物および海藻類 3 種を入れた 1.5ml チューブに Stainless Steel Beads (5 mm diameter ; Qiagen 社製) を 1 個入れ、Tissulyser LT (Qiagen 社製) で 3 分間破碎した。破碎後、DNeasy Plant mini Kit (Qiagen 社製) の添付のマニュアルに記載されている 2 倍量で DNA を抽出した。抽出した DNA の定量は Nano drop Lite (ThermoFisher 社製) を使用した。

・解析用遺伝子領域の選択

近年、海草・海藻類の DNA-barcoding や metabarcoding 解析、各種系統解析等に使用されている表 1 に示す PCR プライマーについて、アカウニを採取した海域で採取された *Sargassum* 属 3 種 (イソモク、ノコギリモク、ジョロモク) の DNA および前述の方法で抽出したアカウニ消化管内容物 DNA を用いて使用する遺伝子領域を検討した。なお、全ての PCR は、DNA polymerase に KOD FX neo (ToYoBo 社製) を使用し、それぞれの PCR プライマー毎のアニーリング温度や、得られる PCR 産物の長さによって伸展時間を設定して行った。また、得られた PCR 産物については、*direct-sequencing* や必要に応じてサブクローニングを行い、DNA ジェネティックアナライザ 3500

(ThermoFisher 社製) を用いて塩基配列を決定して以下の解析に使用できるか、などを検討した。

- ・次世代シーケンサー (以下、NGS とする) による Metabarcoding 解析

Ortega *et al.* (2020) で報告されている多種の海藻・海草類に使用できる 18S rRNA の V8-V9 領域について Matsubara *et al.* (2023) の方法によって Metabarcoding 解析を行った。

- ・clone-library 法による *Sargassum* 属の同定

NGS による Metabarcoding 解析の結果では *Sargassum* 属内の種判別が不明瞭であったので、Gaz2F および Gaz2R による PCR 産物から TOPO TA cloning Kit (ThermoFisher) を用いて Clone-library を作成した。各個体 16 clones の塩基配列を解析して *Sargassum* 属の種構成比率を検討した。

3) アカウニの炭素・窒素安定同位体比の検討

安定同位体比分析用のサンプルを作製するため、ウニの口器、生殖腺、消化管を解凍し、口器は解剖して付着している筋肉組織を採取した。回収した筋肉組織、生殖腺および消化管の一部を個体毎に培養用の 12 穴シャーレに入れて 60°C で約 48 時間乾燥した。乾燥した組織を乳鉢に広げて乳棒で磨り潰して粉末状にし、サンプル毎に 1.5 mL のテストチューブに保存した。

粉末状にしたサンプルは専用の錫箔に封入した。ウニ標本の封入量は約 0.7 mg で調整した。安定同位体比分析は、2022 年 11 月 29 日～12 月 2 日の期間に東京大学大気海洋学研究所において元素分析計に接続した安定同位体質量分析計 (DELTA V plus, Thermo Fisher Scientific) を用いて分析した¹⁷⁾。炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) および窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) は以下の式を用いて算出した。

$$\delta_{\text{Sample}} = \{(R_{\text{Sample}}/R_{\text{Standard}}) - 1\} \times 1000$$

なお、R Sample 及び R Standard はそれぞれ試料と標準物質の安定同位体比を示している。窒素安定同位体比の標準物質は大気中の窒素、炭素安定同位体比は化石炭酸塩鉱物 Vienna Pee-Dee Belemnite (VPDB) である。測定値補正のために 2 次標準物質として DL-2-Aminopropionic Acid を分析した。

分析に用いた標本は、2022 年 8 月 29 日および 11 月 11 日に、箱崎、岡鶴および鳥辺島で採集された。漁場間の比較では、口器筋肉を用いた。また、食性比較の精度を上げるためエンドメンバーを増やすことを目的として、11 月 11 日の鳥辺島前で採集されたアカウニの生殖腺、消化管および口器筋肉の安定同位体比を比較し、可能性を検討した。なお、漁場間と器官間の安定同位体比は TukeyHSD 検定で比較し、有意水準 α は 0.05 とした。

3 結果と考察

1) アカウニの消化管内容物の DNA 抽出および Metabarcoding 解析の方法

① DNA の抽出処理及び解析に使用する PCR プライマー等の分析条件の設定

DNA 抽出作業については、今回、採取したアカウニ胃消化管内容物について人為的操作による偏りを避けるために、全量から DNA を抽出することを検討した。しかしながら、アカウニの消化管内容物の量が多かったため、試料の乾燥に時間を要した。今後は凍結乾燥等についても検討する必要がある。試料の乾燥後は、TissueLyser による破碎とその後の DNA 抽出作業には問題はなかった。

近年、NGS の普及に伴って、網羅的遺伝子解析を行うために遺伝子領域や PCR プライマーに関する報告が多い (例えば、Ortega *et al.*, 2020)。そこで、本研究で使用する PCR プライマーであるが、これらの情報を基にリストアップして、それぞれについて消化管内容物および海藻類 DNA を用いて PCR を行って試したところ、表 1 に示す◎という結果が得られたものから以下の解析に用いるものを選択した。Hamaguchi *et al.* (2018) は海洋環境中における海藻由来の DNA についてその分解過程から、300bp 以下の短い断片で種判別できることが望ましいと報告している。表 1 の *rbcL* については PCR 産物が短いので、消化管内容物の解析には適当と考えられたが、得られる塩基配列情報では *Sargassum* 属の種の判定度が低いという結果となった。一方、様々な局面で Metabarcoding 解析に使用されている 18S rRNA V8-V9 領域を標的とした V8F, 1500r は消化管内容物や海藻類 3 種にも良く反応し、PCR

産物のサイズがNGS解析に向いていることからアカウニ消化管内容物の網羅的解析に使用することとした。この領域は広く真核生物に反応するために、海藻類以外、例えば、アカウニが特定の動物を餌としていた場合でもその同定は可能である。欠点としては、アカウニ自体のDNAにも反応するので、DNA抽出時の洗浄作業等を強化することによって、その混入率を低下させる必要があることである。今回、本領域によるMetabarcoding解析の結果、アカウニのDNAの混入率は平均17.5%程度であったので、消化管内容物の特定には問題がないと判断した。

しかし、この領域では*Sargassum* 属の種の同定の解像度が低く、他の領域による補完が必要であった。そこで、文献等情報を調べて試したが、なかなか*Sargassum* 属に適用できるPCRプライマーが無かった。例えば、(株)生物技研推奨の褐藻類用とされるPCRプライマー gKasso はコンブ類には良く反応するが、*Sargassum* 属ではノコギリモク種群以外には使用可能でなかった。Hamaguchi *et al.* (2022) は海底堆積物中の*Sargassum* 属由来の環境DNAを検出する目的で、SubSar および TemSar というPCRプライマーを設計しているが、それを一部改変した SubSar2 や TemSar3 は*Sargassum* 属によく反応する。図2は今回、アカウニの消化管内容物について SauSar2 によるPCRを行った結果であるが、アカウニの消化管内容物にも良く反応している。これらのPCRプライマーは Stiger *et al.* (2005) の分類に従って*Sargassum* 属を2群に分けるために設計されているが、SabSar2 は今回試料を採取した漁場ではヤツマタモクが属する群によく反応する。図2の結果からも、鳥辺島前と岡鶴漁場ではヤツマタモクを主に摂食しており、箱崎はヤツマタモク以外の*Sargassum* 属を摂食しているのではないかと、ということがうかがい知れる。しかしながら、これらのプライマーについては*Sargassum* 属以外のジョロモク等への反応性は調べられていない。そのため、今回の漁場のようにジョロモクを摂食している可能性がある環境下では使用できない。

一方、PCRプライマーGaz2F、Gaz2RはPCR産物が650bp程度と消化管内容物を特定するためには少し長い、ジョロモクにも良く反応するため、今回はこのPCRプライマーを使用して、clone-library法による補完を行うこととした。今後は、この*Sargassum* 属に適用できるMetabarcoding解析用の遺伝子領域およびPCRプライマーについて詳細に検討する必要がある。

②アカウニの消化管内容物の網羅的遺伝子解析による分析結果

まず、表1に示すPCRプライマーのうち、18SrRNAのV8-V9領域を活用したMetabarcoding解析の結果を図3に示す。この領域では、動物から海藻類まで幅広く生物種を同定することが出来る。アカウニの8月29日に今回調査した3つの漁場で採取したアカウニは褐藻類とサンゴ藻類を多く捕食していることが明らかとなった。なお、海藻類以外のOTUについては特定の動物種は見られなかった。これらのことから、この採集場所のアカウニの主要な餌は褐藻類、緑藻類、サンゴ藻類といった海藻類であることが明らかとなった。次に、アカウニの各個体の半数以上を占める褐藻類について、Metabarcoding解析とclone-library法を併せて検討した結果を図4に示す。今回調べた3つの漁場間で捕食している海藻類が異なり、鳥辺島前と岡鶴漁場では個体番号11のように一部例外があるがヤツマタモクが多く、箱崎漁場ではノコギリモク種群(ノコギリモク、ウスバノコギリモク、エゾモク等が含まれるので種群とした)が主体であった。また、鳥辺島前と岡鶴漁場ではこれらの主要海藻種のほかに、ジョロモク、フタエオオギ、アミジグサ類、サンゴ藻類等多様な種を捕食していることが明らかとなった。それに対し、箱崎ではノコギリモク種群が90%以上を占めていた。このように漁場間で主要な餌海藻類が異なっていた。野田ら(2014)は海藻類を捕食するアイゴで餌選択性があることを報告している。一方、今井・新井(1986)はアカウニの消化管内容物と生息地の海藻類の比較と、実験環境下における摂餌選択性実験の両面から検討した結果、アカウニには主体的な餌選択性があると報告している。しかしながら、海藻類がない場合は、生息場所の基質に付着したフジツボやカイメン類など手当たり次第に捕食するのではないかと考察している。今回の調査地点での各漁場の海藻類の種類と被度を目視で観察した結果を表2に示す。この3つの漁場共に優占する海藻類はヤツマタモクであり、次いで、ノコギリモク、ジョロモク、ヨレモクの順である。ジョロモクは鳥辺島前と岡鶴漁場で観察されているが、これらの漁場ではアカウニはジョロモクを捕食していた。仮に、アカウニが現場に多い海藻類を無作為に捕食するのであるとすると、箱崎のアカウニがほぼノコギリモク種群のみを捕食しているということを説明できない。今井・新井(1986)は摂餌選択性があると報告しているが、箱崎には目視被度ではヤツマタモクの方が多いので(表2)、何らかの原因でノコギリモクに対する選択性が高いか、あるいはヤツマタモクを捕食できない要因があるのではないかと考えられる。図5は今回の調査の前後に当方で小浜湾内や世久見地区に近い、志積海岸の藻場調査時に撮影し

た写真である。当方では前職の藻場干潟環境研究室時代に西日本各地の海草・海藻類で構成される藻場の潜水調査を行ってきたが、福井県沿岸の藻場の分布や垂直方向の食性は西日本の太平洋側と大きく異なっている。おそらく、志積や世久見海岸は北側が開放的な海岸地形であるため、冬季の風浪の影響が強いと考えられる。そのせいか、浅場は大型海藻類が少なく、水深 4m 前後から安定した藻場が観察された。また、幅が広いアラメ、カジメ類はほとんど観察されず、図 5A に示すように小浜湾内のテトラポット等にクロメらしい種が観察されたのみである。大部分の大型褐藻類はガラモであり、志積ではやや浅い場所にノコギリモクが多く（図 5B）、水深 10m 前後になるとそれ以外のガラモが優先しているように見えた（図 5C）。浅場ではアイゴ稚魚の大群がジョロモクらしいガラモを捕食していた（図 5D）。したがって、今回採取されたアカウニの水深帯によっては、植生が異なる可能性があり、その結果、消化管内容物の構成種が変化している可能性もある。

しかしながら、いずれにしても今後は、アカウニの消化管内容物の遺伝子による同定法がほぼ確立されたので、他の場所等での調査事例を増やしてこの問題についてはさらに検証を進める必要がある。特に、アカウニを採取する周辺の海藻類の定量的な調査が必要ではないかと考えられる。

一方、主要な餌海藻が異なる烏辺島前・岡鶴漁場と箱崎漁場のアカウニの体サイズ等について比較してみた。図 6 は 8 月 29 日に 3 漁場で採取したアカウニの体重、殻径、GSI および生殖腺重量を示す。これらについて統計的検討を行った結果、体重や殻径には有意差は認められなかったが、生殖腺重量と GSI は烏辺島前と岡鶴漁場と箱崎では差が認められた（Kruskal-Wallis test $p < 0.01$ ）。アカウニの商品価値は生殖腺の重量によって決まるが、ヤツマタモクや多様な海藻類を捕食していた烏辺島前と岡鶴漁場と、ノコギリモク種群のみを捕食していた箱崎では差があることが明らかとなった。その後、この生殖腺重量の漁場間の差は 11 月 11 日の調査時には無くなっていたが、やはり箱崎が小さい傾向は変わらなかった（図 7）

吾妻（1997）や吾妻（2011）では、北海道の沿岸のキタムラサキウニの成長と生殖腺の量的な発達、餌となるコンブ目褐藻群落の現存量によって決定されることを報告している。このことから、生殖腺重量は餌の質や量に影響を受けると想像されるが、今回のデータだけでこれらの漁場間の生殖腺重量に差があったことを証明することはできないと考えられるので、今後は先にも触れたようにアカウニ試料を採取する際には、採取場所周辺の海藻の現存量をより詳細に調べ、また、アカウニ自体の捕食量などを加味して詳細に検討する必要がある。

2) アカウニの安定同位体比分析の結果

①異なる漁場で採集されたアカウニの $\delta^{13}\text{C}$ 値と $\delta^{15}\text{N}$ 値の比較

本年度は箱崎、岡鶴および烏辺島で 8 月と 11 月に採集されたアカウニの口器筋肉の $\delta^{13}\text{C}$ 値と $\delta^{15}\text{N}$ 値を比較した（図 8）。餌料源を反映する $\delta^{13}\text{C}$ 値は、8 月と 11 月ともに烏辺島前の標本が他の 2 漁場に比べて有意に低い値を示した。一方、8 月の $\delta^{15}\text{N}$ 値は 3 つの漁場間で有意差が認められなかったが、11 月では箱崎、岡鶴、烏辺島の順で低くなり、箱崎と烏辺島の間に有意差がみられた。

消化管内容物の DNA 解析では、箱崎が他の 2 漁場と明確に異なる食性を示していたが、炭素安定同位体比分析でも烏辺島と箱崎間では大きく異なり符合していた。2021 年の本事業報告書の結果では、烏辺島の胃内容物で優占するヤツマタモクの $\delta^{13}\text{C}$ 値が、箱崎で優占するノコギリモクに比べてやや低い傾向があり、本年度の傾向とは矛盾しなかった。

一方、岡鶴は DNA 解析では箱崎と異なっていたが、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は両漁場間で有意差が無く、烏辺島とは有意に異なっていた。岡鶴の $\delta^{13}\text{C}$ 値は箱崎と烏辺島の間の中間の値であり、 $\delta^{13}\text{C}$ 値が組織中で反映されるまでには、時間的なラグがあるため、夏季までの食性が箱崎と類似していた可能性がある。今後、海藻類の安定同位体比分析と濃縮係数の検証を進めることで、さらに食性解析の結果を考察することができる。

②アカウニの器官別安定同位体比

安定同位体比ミキシングモデルを用いて、各餌料の寄与率（組成%）を推定する場合、できるだけ多くのエンドメンバーを調べる必要がある。基本的に、1 器官の $\delta^{13}\text{C}$ 値と $\delta^{15}\text{N}$ 値だけを用いるならば、2 つの餌生物の寄与率しか正確に見積もることができない。しかし、複数の器官を利用することで、1 個体から多くの安定同位体比の情報を得ることができる。

餌料に含まれる炭水化物、タンパク質および脂質などは、それぞれ固有の代謝経路によって動物組織へと同化される。この代謝経路は、それぞれ固有の同位体効果を示すため、生物、餌、および器官・部位による代謝経路の違いや生理状態の違いによって異なる同位体比の変化を示す¹⁸⁾。本年度は生殖腺、消化管および口器筋肉の $\delta^{13}\text{C}$ 値と $\delta^{15}\text{N}$ 値を調べた結果、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は3つの器官の間に有意差が認められ、その値もほとんど重複していなかった(図9)。また、 $\delta^{15}\text{N}$ 値も口器筋肉と他の2器官で重複しておらず、これら3つの器官を用いることで、合計6個のエンドメンバー情報を得ることができることが示された。

今後の課題として、各器官の濃縮係数を確認する必要がある。飼育実験により濃縮係数や古い餌料の安定同位体比と新しい餌料の安定同位体比のちょうど中間になるまでに要する時間(半更新時間)を検証することができれば、さらに多くの餌料種の組成を推定することが可能になる。DNA解析による定性的解析と安定同位体比分析による、実際に同化している有効な餌料の組成を定量的解析と組み合わせることで、アカウニの野外での食性の実体をさらに明確にすることが可能になる。

4 文献

- 1) 吾妻行雄 (1997) : キタムラサキウニの個体群動態に関する生医学的研究. 北水試研報, 51, 1-66.
- 2) 吾妻行雄 (2011) : 海藻群落におけるウニ類の個体群動態に関する生態学的研究. 日本水産学会誌, 77, 352-355.
- 3) Bartolo, A. G., Zammit, G., Peters, A. F., and Frithjof C. Küpper, F. C. (2020): The current state of DNA barcoding of macroalgae in the Mediterranean Sea: presently lacking but urgently required. *Botanica Marina*, 63, 253-272.
- 4) Hamaguchi, M., Shimabukuro, H., Hori, M., Yoshida, G., Terada, T., and Miyajima, T. (2018) Quantitative real-time PCR and droplet digital PCR duplex assays for detecting *Zostera marina* DNA in coastal sediments. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16:253-264.
- 5) Hamaguchi, M., Miyajima, T., Shimabukuro, H., Hori, M. (2022): Development of Quantitative Real-Time PCR for Detecting Environmental DNA Derived from Marine Macrophytes and Its Application to a Field Survey in Hiroshima Bay, Japan. *Water*, 14, 827. <https://doi.org/10.3390/w14050827>.
- 6) 今井利為・新井章吾 (1986) : アカウニの食性と摂餌量について. 水産増殖, 34, 157-166.
- 7) Matsubara, T., Yamaguchi, M., Abe, K., Onitsuka, G., Abo, K., Okamura, T., Sato, T., Mizuno, K.-I., Lagarde, F., Hamaguchi, M. (2022): Factor driving the settlement of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae in Hiroshima Bay, Japan., *Aquaculture* 563, 738911. DOI:<http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738911>,
- 8) Moura Queiros, A.; Stephens, N.; Widdicombe, S.; Tait, K.; McCoy, S. J.; Ingels, J.; Ruhi, S.; Airs, R.; Beesley, A.; Carnovale, G.; Cazenave, P.; Dashfield, S.; Hua, E.; Jones, M.; Lindeque, P.; McNeill, C. L.; Nunes, J.; Parry, H.; Pascoe, C.; Widdicombe, C.; Smyth, T.; Atkinson, A.; Krause-Jensen, D.; Somerfield, P. J. (2019): Connected macroalgal-sediment systems: blue carbon and food webs in the deep coastal ocean. *Ecol. Monogr.* 89, e01366.
- 9) Nakano, D., Kamiya, M., Tominaga, O. (2017): Molecular identification of macroalgal fragments in gut contents of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Fisheries Science*, 83:425-432.
- 10) 野田幹雄・大原啓史・村瀬 昇・池田 至・山本憲一 (2014) : アイゴによるアラメおよび数種のホンダワラ類の被食過程と群落構造の関係. 日本水産学会誌, 80, 201-213.
- 11) Ortega, A.; Gerald, N. R.; Duarte, C. M. (2020): Environmental DNA identifies marine macrophyte contributions to blue carbon sediments. *Limnology and Oceanography*, 9999, 1-11.
- 12) Ortega, A., Gerald, N. R., Diaz-Rua, R., Orberg, S. B., Wesselmann, M., Krause-Jensen, D., Duarte, C. M. (2020): A DNA mini-barcode for marine macrophytes. *Molecular Ecology Resources*, 20, 920-935.
- 13) Reef, R.; Atwood, T. B.; Samper-Villarreal, J.; Adame, M. F.; Sampayo, E. M.; Lovelock, C. E. (2017): Using eDNA to determine the source of organic carbon in seagrass meadows. *Limnology and Oceanography*, 62, 1254-1265.
- 14) Rodriguez-Barreras, R., Goday-Vitorino, F., Prabel, K., Wangensteen, O. S. (2020): DNA metabarcoding unveils niche overlapping and competition among Caribbean sea urchins. *Regional Studies in Marine Science*, 40, 101537.
- 15) Stiger, V., Horiguchi, T., Yoshida, T., Coleman, A. W., Masuda, M. (2000): Phylogenetic relationships of *Sargassum*

(Sargassaceae, Phaeophyceae) with reference to a taxonomic revision of the section *Phyllocystae* based on ITS-2 nrDNA sequences. *Phycological Research*, 48, 251-260.

- 16) Stiger, V., Horiguchi, T., Yoshida, T., Coleman, A.W. and Masuda, M. (2003): Phylogenetic relationships within the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae), inferred from its ITS nrDNA, with an emphasis on the taxonomic revision of the genus. *Phycological Research* 51: 1-10
- 17) Tayasu, I., Hirasawa, R., Ogawa N., Ohkouchi, N., Yamada, K. (2011): New organic reference materials for carbon- and nitrogen-stable isotope ratio measurements provided by Center for Ecological Research, Kyoto University, and Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology *Limnology* 12:261-266.
- 18) 高井則之・富永 修 (2008) 水産学シリーズ 159 安定同位体比分析を始める人たちに。安定同位体スコープで覗く海洋生物の生態—アサリからクジラまで (富永 修・高井則之編), 恒星社厚生閣 東京, 9-30.

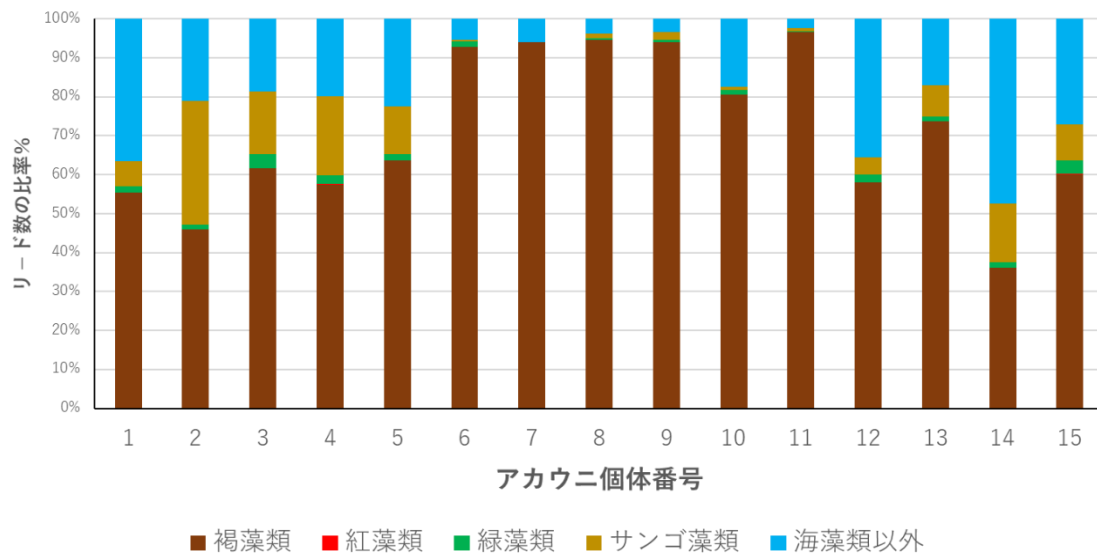
5 図表等



図1 磯根生物の採集場所

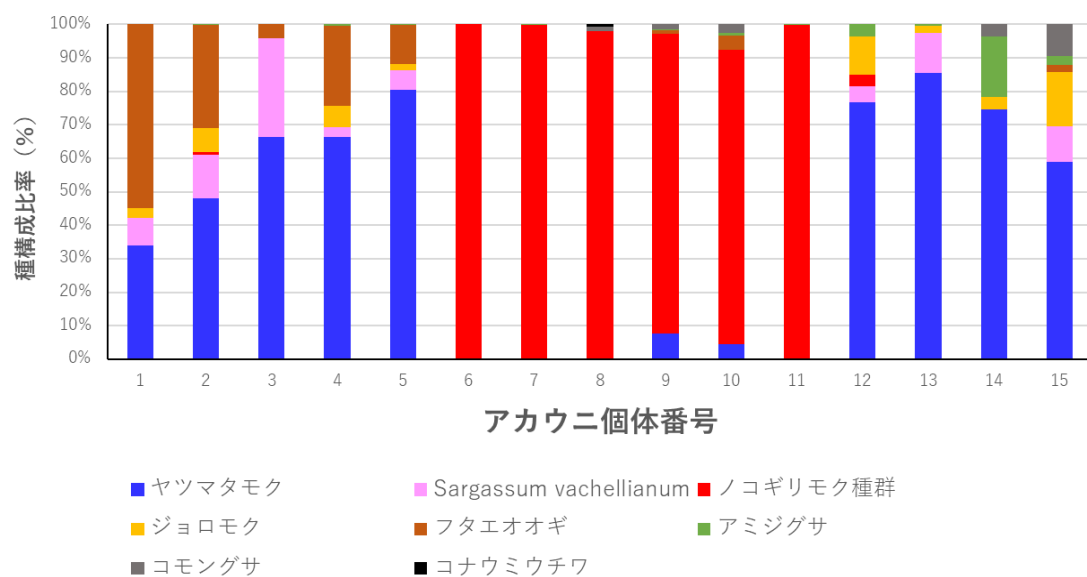
表1 本研究で比較したPCRプライマー

標的DNA	プライマー名	標的領域	長さ	PCRの結果		文献情報他
				<i>Sargassum</i> 属3種	アカウニ胃内容物	
Mitochondrial DNA	GazF2, R2	COI	650	◎	◎	Lane et al. (2007)
	CAF4A, CAR4A	COIII	543	×	×	Kogome et al (2005)
Plastid DNA	Kasso-rbcL-F, R	rbcL	720	○	△	Nakano et al (2017)
	rbcL	rbcL	146	◎	◎	Ortega et al (2020)
	gKasso	rbcL	345	△	○	(株)生物技研推奨
Nuclear DNA	V8F, 1500r	18SrRNA	350	◎	◎	Matsubara et al (2023)
	SubSar2	ITS-2	125	◎	◎	Hamaguchi et al (2022)
	TemSar3	ITS-2	98	◎	◎	Hamaguchi et al (2022)



1-5：烏辺島前 6-10：箱崎 11-15：岡鶴

図3. 18SrRNA V8-V9 領域の Metabarcoding 解析結果



1-5：鳥辺島前 6-10：箱崎 11-15：岡鶴

図4. 18SrRNA V8-V9 領域の Metabarcoding 解析と clone-library 法によるアカウニ胃内容物中の褐藻類の種構成

表2 各漁場の目視による海藻構成種と被度

海藻植生 (%)						
調査方法：海藻の種類と藻場に占める割合を目視で判定						
	科	種名	調査日 地点名	2022/8/29		
				鳥辺島前	箱崎	岡鶴
褐藻	ホンダワラ科	ヤツマタモク		60	50	50
褐藻	ホンダワラ科	ノコギリモク		20	40 +	
褐藻	ホンダワラ科	ジョロモク		10		20
褐藻	ホンダワラ科	フシスジモク		+		+
褐藻	ホンダワラ科	ヨレモク		+	+	10
褐藻	ホンダワラ科	ヤナギモク			+	
褐藻	ホンダワラ科	マメタワラ			+	
褐藻	ホンダワラ科	イソモク			+	
褐藻	ホンダワラ科	エゾノネジモク			+	
褐藻	ホンダワラ科	アカモク				
褐藻	ネコアシコンブ科	クロメ		+		
褐藻	アミジグサ科	アミジグサ		+	+	
褐藻	アミジグサ科	ウミウチワ		+	+	10
褐藻	アミジグサ科	シワヤハズ			+	
褐藻	アミジグサ科	ヘラヤハズ				+
褐藻	カヤモノリ科	フクロノリ				
褐藻	カヤモノリ科	カゴメノリ				
褐藻	チガイソ科	ワカメ				

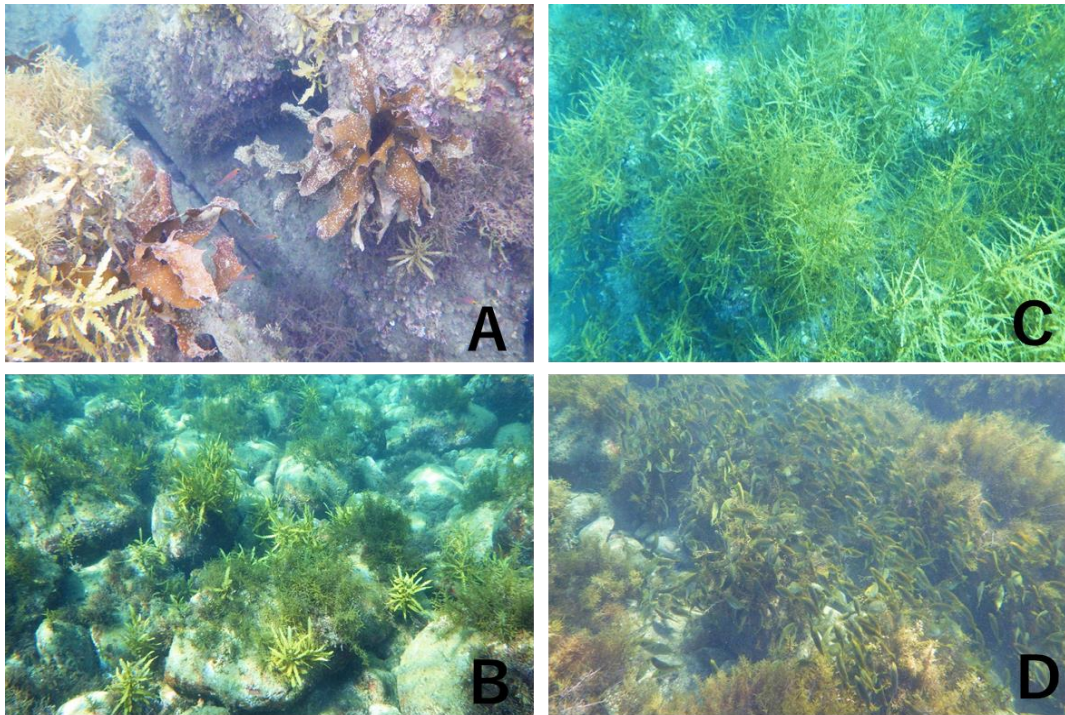


図5. 8-9月の現場周辺海域の藻場の状況

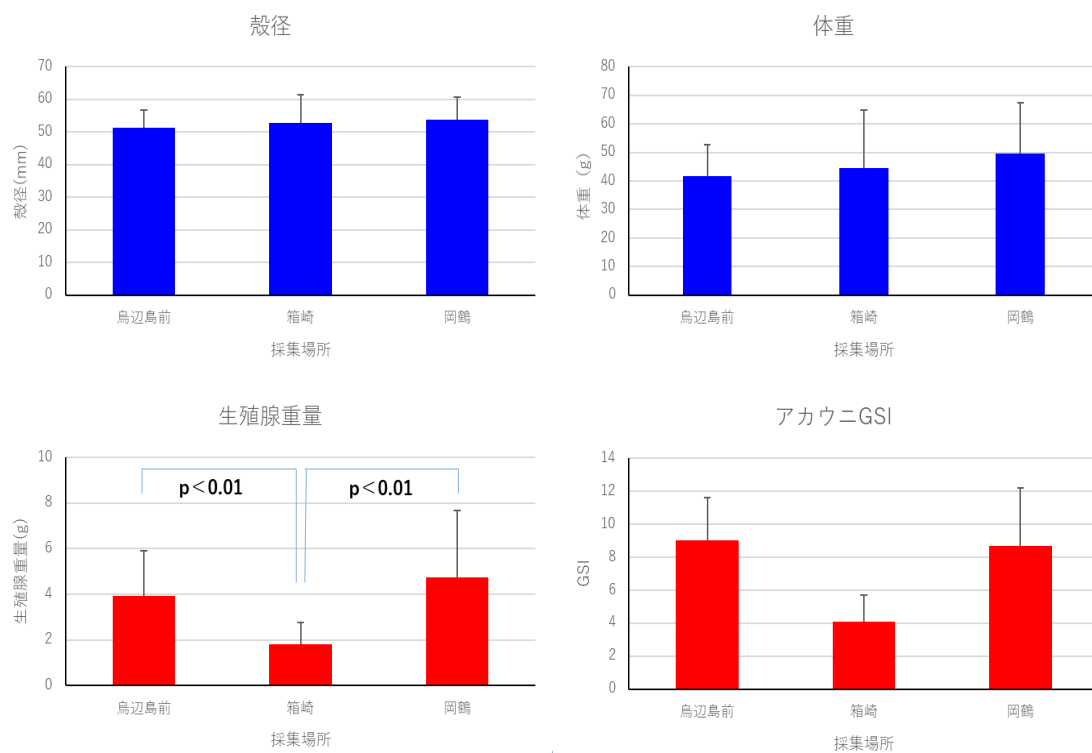


図6. 8月29日に3つの漁場で採取したアカウニの体サイズの比較

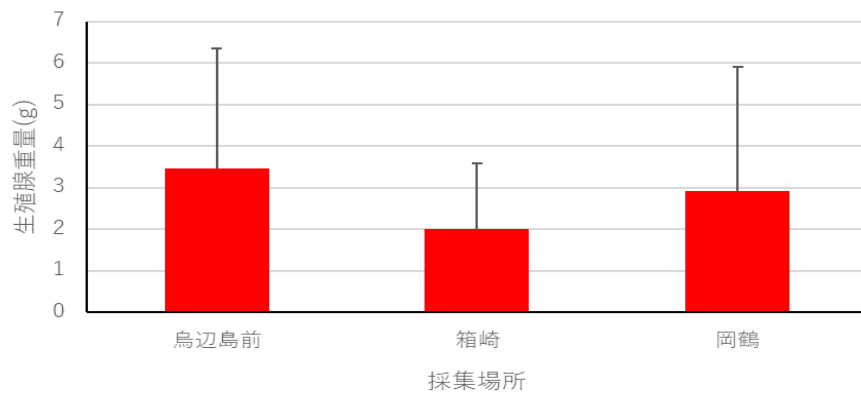


図7. 11月11日に3つの漁場で採取したアカウニの生殖腺重量の比較

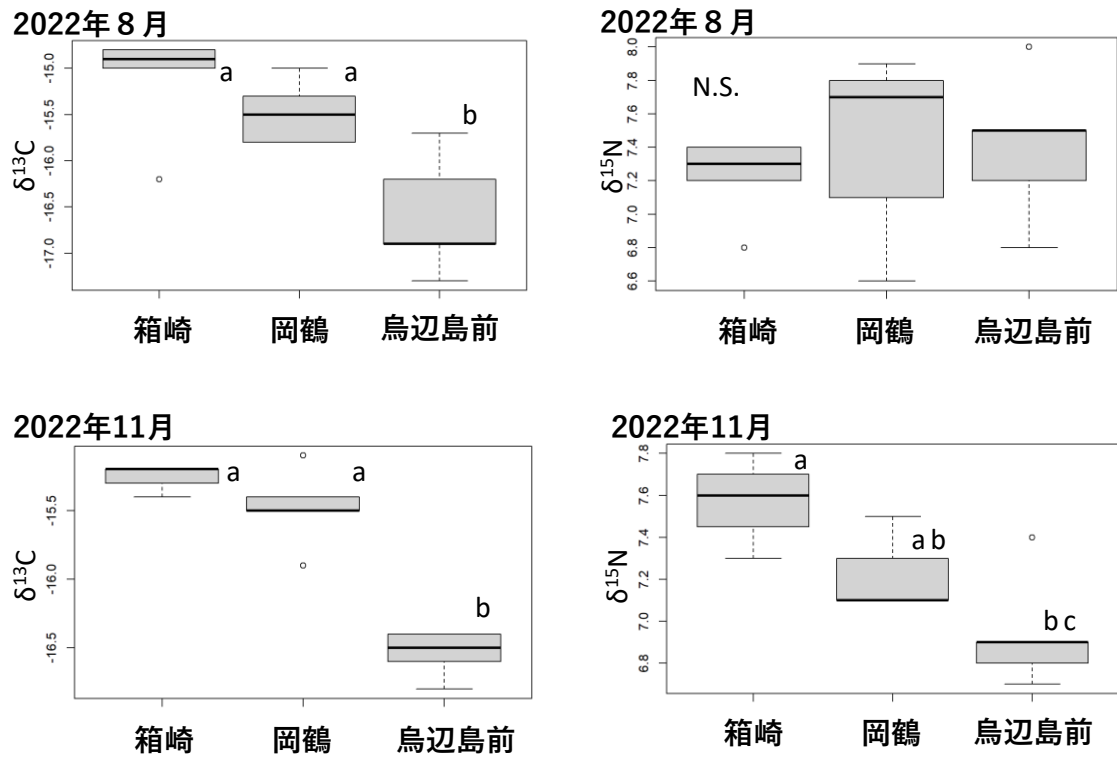


図8. 8月29日と11月11日に3つの漁場で採取したアカウニの口器筋肉の炭素安定同位体比 $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ 値の比較 同アルファベットは有意差なし (TukeyHSD 検定 有意水準 $\alpha=0.05$) N.S.: 3漁場間に有意差なし最大値・第1四分位数・中央値・第3四分位数・最小値

2022年11月

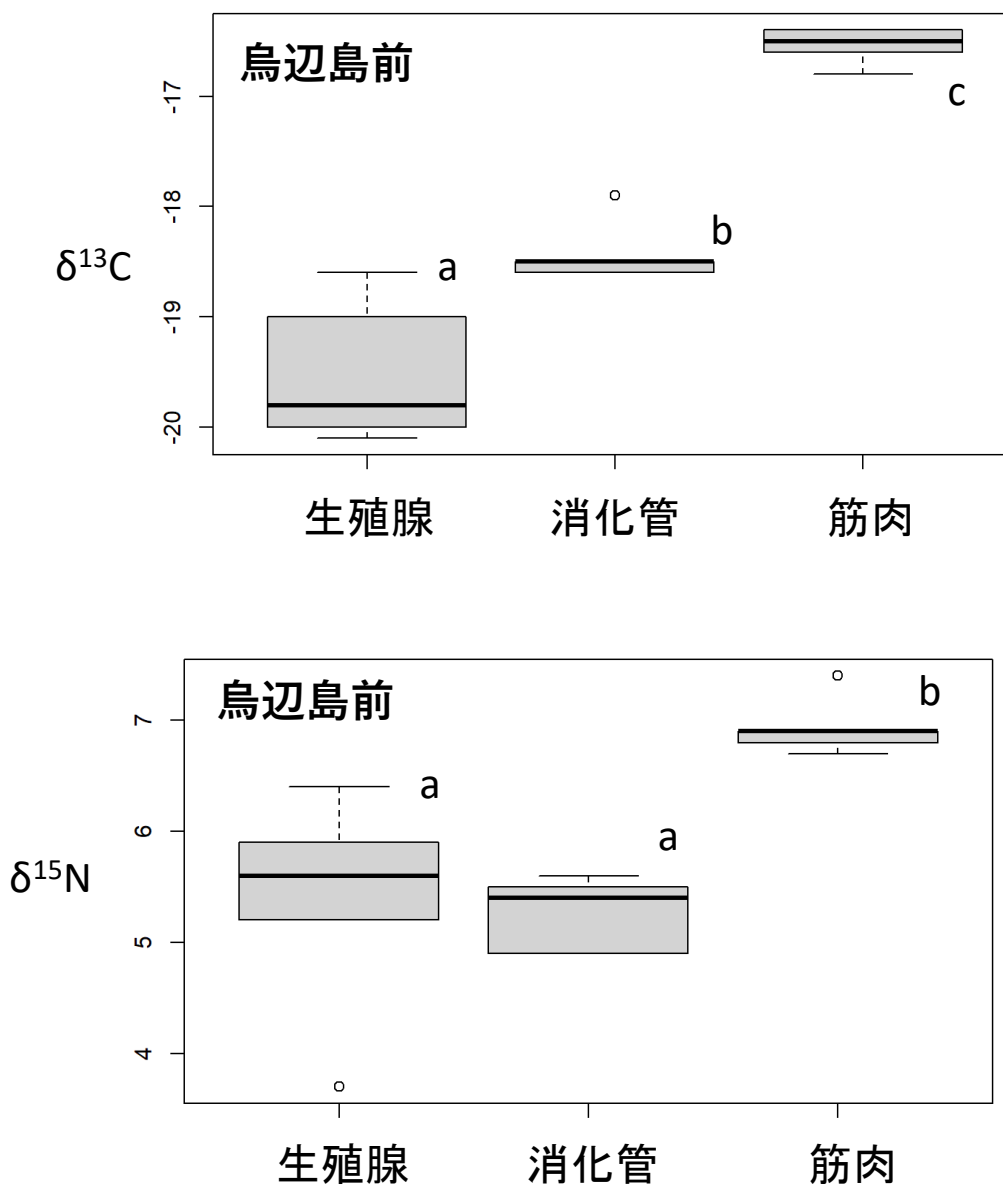


図9. 11月11日に鳥辺島前で採取したアカウニの生殖腺、消化管および口器筋肉の炭素安定同位体比 $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ 値の比較 同一アルファベット器官の間は有意差なし (TukeyHSD 検定 有意水準 $\alpha=0.05$) 最大値・第1四分位数・中央値・第3四分位数・最小値