

(8) ふくいの磯根生物持続的利用技術開発事業

谷保 文野・中嶋 登・原 誠二
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。本事業の前身事業である「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

福井県三方上中郡若狭町世久見地先の3地点(図1)において、2023年5月26日、2023年8月22日および11月9日に1地点あたり10個体のアカウニを採集した。また、ウニの採集時に採集地点周辺の主要な大型海藻についてシュノーケリングで観察するとともに、8月22日にはSCUBA潜水を行い、50cm×50cmの方形枠を用いて被度を調査した(図2)。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へ持ち帰った。なお、冬季の同海岸の海藻の繁茂状況を調べるために、12-2月の間に調査を行う予定であったが、本年度は悪天候の日が多く、調査は実施できなかった。

餌料海藻の遺伝子解析用サンプルとして、ウニの消化管内容物を取り出し、1.5 mLのマイクロチューブに保存した。消化管内容物は、後述のDNA抽出作業を行うまで-30°Cで保存した。全ての標本採集終了後、各採集地点および各標本採集日に十分な量の消化管内容物が得られた5個体を選定し、消化管内容物解析用の標本とした。なお、本年度は夏季に記録的な猛暑であったためか、8月22日の試料では消化管内容物が少ない個体が散見された。

安定同位体比分析用のサンプルとして、ウニの口器、生殖腺、消化管を取り出し、個体ごとにチャック付きのビニール袋に入れて、分析用のサンプルを調整するまで-30°Cで保管した。また、採集した海藻は、採集地点毎に分けてタコネットに入れて冷蔵保管し、採集した翌日に種を同定した。同定した海藻は、チャック付きのビニール袋に入れて-30°Cで保管した。

2) アカウニの消化管内容物の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よる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。昨年度はこの論文による方法の問題点を改良するとともに、さらに高精度でアカウニの消化管内容物の解析方法について大型褐藻類の詳細な種同定(Stiger *et al.*, 2005; Bartolo *et al.*, 2020)

や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 の分析に用いられている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 (Moura Queiros et al 2019; Reef *et al.*, 2017; Ortega *et al.*, 2020; Bartolo *et al.*, 2020) の検討を行った。そのなかで、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が、主にその手法を参考にして metabarcoding 解析によるアカウニの餌生物の網羅的解析を行うとともに、世久見海岸のアカウニの主要な餌生物と考えられる4種のガラモ類(ジョロモクは *Sargassum* 属ではないので本報告書では以降はガラモ類と表記する) の定量分析方法を検討した。

(1) 消化管内容物からの DNA 抽出前処理

世久見地先の3地点(図1)で2023年5月26日、2023年8月22日、2023年11月9日に採取したアカウニの試料について、それぞれ5~6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のフィルターでろ過した後オートクレーブした滅菌海水で3回、分子生物研究用エタノールで1回洗浄した後、小型シャーレに入れて60°Cで6時間程度消化管内容物が完全に乾燥できるまで処理した。アカウニを採取した海域で採取されたガラモ類5種(ヤツマタモク、イソモク、ノコギリモク、ジョロモク、フシスジモク)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。

(2) 消化管内容物からの DNA 抽出

乾燥処理した消化管内容物約500mgおよび海藻類5種を入れた2.0mlチューブにStainless Steel Beads (5 mm diameter; Qiagen 社製)を1個入れ、Beads crusher (TITEC 社製)で2000rpmで30秒間破碎した。破碎後、Nucleospin from soil (MACHEREY-NAGEL 社製)の添付のマニュアルに記載されている方法でDNAを抽出した。抽出したDNAの定量はNano drop One (ThermoFisher 社製)を使用した。なお、実験に使用したチューブ類はすべてDNA低吸着性のものを使用した。

(3) metabarcoding 解析用のガラモ類用の新規解析用 PCR プライマーの検討

昨年度の metabarcoding 解析は18SrRNAのV8-V9領域で行った。この方法では海藻類から動物まで多種多様な餌生物の解析が可能であった。昨年度の解析結果から、世久見のアカウニはヤツマタモクやノコギリモクなどのガラモ類を主要な餌生物としていることが明らかとなった。しかし、昨年度も検討したがガラモ類の種を効率よく解析できる metabarcoding 解析用 PCR プライマーを見つけることができなかった。そこで、世久見海岸で採取されるガラモ類によく反応する PCR プライマーGaz2F、Gaz2R (Lane *et al.*, 2007) を用いてアカウニを採取した海域で採取されたガラモ類5種(イソモク、ノコギリモク、ヤツマタモク、ジョロモク、フシスジモク)のDNAの解析を行った。なお、全てのPCRは、DNA polymeraseにKOD FX neo (ToYoBo 社製)を使用し、得られたPCR産物については、direct-sequencing法で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た。得られた塩基配列情報および国際DNAデータベース上にあるガラモ類複数種の塩基配列情報を加え、ガラモ類に共通して反応し、metabarcoding 解析に適したPCR産物が350bp程度となるように新たなPCRプライマーを設計した。

(4) 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草・海藻類に使用できる18SrRNAのV8-V9領域と新規のPCRプライマーGazMRFとGaz2Rを用いてMatsubara *et al.* (2023)の方法によってmetabarcoding解析を行った。

(5) 世久見海岸のアカウニの主要な餌となるガラモ類の定量分析手法の開発

昨年度の解析結果から世久見のアカウニはヤツマタモクやノコギリモク種群(DNA情報からノコギリモク、ウスバノコギリモク、エゾモクがほぼ同じであったので種群とした)が主要な餌生物であることが明らかとなった。そこで、これらの2種及び現場海域で繁茂量が多い、イソモクとジョロモクを加えた4種についてアカウニがどの程度捕食しているかを調べるために種特異的な定量的PCRについてDual-labeled probe(以下、DLPとする)法による検出方法を構築した。構築した手法はHamaguchi *et al.*, (2022)で報告されている反応および定量的のための条件を満たすことを確認した。なお、定量的PCRに用いたチューブ類はすべてDNA低吸着性のものを使用した。

3) アカウニの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、ウニの口器周辺に付着する筋肉を用いた。回収した筋肉組織、

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、2024 年 2 月 14 日～2 月 17 日の期間に京都大学生態学研究センター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 (Tayasu *et al.*, 2011)。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。

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

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、2023 年 5 月 26 日および 8 月 22 日に、箱崎、岡鶴および烏辺島で採集された。漁場間の比較では、口器筋肉を用いた。なお、漁場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) 今年度採取したアカウニの状態および採取地点の海藻類の繁茂状況

今年度採取したアカウニの殻径、体重および生殖腺重量は図 3～5 に示す。本年度の 3 回の調査期間中における烏辺島前、箱崎、岡鶴のアカウニの殻径と体重には差が見られなかった。しかし、生殖全重量は 8 月 22 日では烏辺島前と岡鶴、箱崎と岡鶴の間で差があり (Kruskal-Wallis test いずれも $p < 0.01$)、烏辺島前が一番重く、次いで箱崎、岡鶴の順であり、岡鶴が一番軽かった。11 月 9 日の調査では烏辺島前と岡鶴の間で差があり (Kruskal-Wallis test $p < 0.05$)、烏辺島前が一番重く、次いで箱崎、岡鶴の順であった。昨年度 8 月ではアカウニの生殖腺重量は烏辺島前と岡鶴と比較して箱崎が一番軽かったが、今年度と昨年度の差はアカウニの状態か、あるいはそれぞれの場所の海藻の繁茂量に差があるのではないかと考えられた。一方で、8 月 22 日のアカウニ採取日には、SCUBA 潜水による海藻類の景観被度の調査 (図 2) も行ったが、その結果は図 6 に示す。景観被度は烏辺島前と箱崎、烏辺島前と岡鶴の間で差があり (Kruskal-Wallis test いずれも $p < 0.01$) 烏辺島前が一番高く、次いで箱崎、岡鶴の順であり、岡鶴が一番低かった。この結果から、岡鶴のアカウニの生殖腺重量が一番軽かったのは、景観被度が一番低かったからではないかと考えられる。しかしながら、8 月 22 日の海藻類の繁茂状況を撮影した画像からは、ヤツマタモクやノコギリモクがどの場所でも繁茂しており、アカウニの餌となる生物が岡鶴だけ極端に少なかったという印象はない。一方で、ダイビングコンピューターの記録から 10 か所の景観被度用 50cm×50cm の方形枠の設置場所の平均深度は烏辺島前が 5.8m、箱崎が 7.3m、岡鶴が 4.3m と岡鶴は他の二か所と比較すると浅く、加えて調査時の平均水温は烏辺島前が 29.2°C、箱崎が 29.3°C、岡鶴が 30.3°C と岡鶴が 1°C ほど高かった。これらの結果から、岡鶴では水温が高く、このことがアカウニの生殖腺重量が低かった原因ではないかと考えられる。今夏は記録的猛暑であったので、高水温の時期も長かったと推測される。安成 (2015) は、アカウニは 31°C より高いとへい死すると報告しているため、岡鶴の今夏の水温はアカウニにとって極めて影響が大きく、これによって衰弱していた可能性がある。したがって、海藻類は繁茂しており餌はある程度はあったにもかかわらず、高水温の影響で岡鶴のアカウニが衰弱しており、その結果生殖腺重量が軽かったのではないかと考えられる。現在、地球温暖化が進行しており、気温や水温が上昇している。今後も温暖化が進行し、水温がさらに上昇するとアカウニがへい死する事例も増えるのではないかと危惧される。

2) アカウニの消化管内容物の DNA 抽出および metabarcoding 等解析方法の検討

(1) 消化管内容物からの DNA 抽出前処理

昨年度は採取したアカウニ消化管内容物について DNA を抽出する作業の前処理として、シリカゲルと共に封入して室温で乾燥させたが、乾燥までに数日を要した。そこで本年度は、アカウニ消化管内容物を蒸留水やエタノー

ルで洗浄した後、60°Cで乾燥させたが、これだと数時間で済み、抽出した DNA の以下の解析にもほとんど影響はなかったため、以降は今年度の DNA 抽出前処理を行った後、DNA を抽出した。

(2) metabarcoding 解析用のガラモ類用の新規解析用 PCR プライマーの検討

イソモク、ノコギリモク、ヤツマタモク、ジョロモク、フシスジモクについて PCR プライマー-Gaz2F, Gaz2R で増幅されるミトコンドリア DNA の Cytochrome c oxidase subunit I の部分領域の塩基配列から、この領域のほぼ中央部付近に位置する部位に複数の PCR プライマーを設計した。これらについて各種ガラモ類の DNA やアカウニの消化管内容物から抽出した DNA を用いた PCR の結果から GazMRF:5' - CCGGTACAGGTTGGACTGT-3' を選択した。これと Gaz2R で得られた PCR 産物について metabarcoding 解析を行った。その結果、昨年度は clone-library 法でしか解析できなかったガラモ類を含む褐藻類や、昨年度解析できなかった紅藻類の網羅的解析が可能となった。そのため、本年度のアカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析は、海藻類以外にもすべての生物群を網羅する 18SrRNA V8-V9 領域とガラモ類や紅藻類を対照した GazMRF と Gaz2R の PCR 産物の 2 つの領域を使って実施した。

3) アカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析による分析結果

18SrRNA の V8-V9 領域を活用した Metabarcoding 解析の結果のうち、アカウニ由来の Operationally taxonomic unit (以下、' OTU とする) の割合を図 7 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ためアカウニの DNA も検出する。5 月 26 日に採取したアカウニの消化管内容物は海藻類が多く、アカウニ DNA の混入率も低かったが、8 月 22 日と 11 月 9 日に採取した試料ではアカウニ DNA の混入率が高かった。特に、8 月 22 日の試料では消化管内に海藻類の断片がほとんどない状態の個体が多く、そのような試料ではアカウニ DNA の混入率が高い傾向を示した。一方、11 月でも 8 月と同様な傾向を示しており、前述したように夏場の高水温の影響等でアカウニが疲弊し、11 月になってもまだ回復していないのではないかと推測された。

図 8-10 に示すアカウニ DNA の関わる ' OTU を排除した後の消化管内容物の Metabarcoding 解析結果から、全期間を通じて褐藻類が多く、次いで紅藻類が捕食されていた。また、昨年度と同様、烏辺島前ではサンゴ藻類を捕食していた。なお、海藻類以外のその他の生物は決まった生物種がみられず、海藻類以外の餌生物の寄与はほとんどないと考えられた。

次に、昨年度は十分に解析できなかった世久見海岸のアカウニの主要な餌生物である褐藻類と紅藻類について今年度開発した新規 PCR プライマーによる metabarcoding 解析によって詳細な情報が得られた。まず、褐藻類について説明する。アカウニの消化管内容物中の褐藻類の ' OTU 数には季節変動が見られ、夏場が少ないという結果となった (図 11, Kruskal-Wallis test いずれも $p < 0.01$)。一般的に、夏場はガラモ類がほとんど繁茂していないので、この結果は周辺のガラモ類のバイオマスの減少によるものと考えられる。ガラモ類の構成種については図 12~14 に示す。全期間を通じてアカウニの消化管内容物中にはノコギリモク種群 (昨年度も記載しているが遺伝子解析ではノコギリモク、ウスバノコギリモク、ヨレモク、アキヨレモク等が識別できないので種群とした) が多く、次いでヤツマタモクであった。昨年度の結果と比較して今年度はヤツマタモクの比率が低いようである。これら 2 種以外にはイソモク、アカモクなども散見されるが、和名が不詳の *Sargassum* 属 2 種 (ホンダワラ類 1 と 2 と表記する) も捕食されており、夏場以降にはこのうちホンダワラ類 2 が捕食されていた。

褐藻類に次いで紅藻類も捕食されていたが、紅藻類も褐藻類と同様に夏場に検出される ' OTU が低下した (図 15, Kruskal-Wallis test いずれも $p < 0.01$)。烏辺島前で採取されたアカウニでは 5 月 26 日と 11 月 9 日に *Acrochaetium* 属の紅藻類を捕食していたが、この属はハネベニノイト (Lee and Lindstrom, 1979) などの種が報告されているが不明な点が多く、今後とも文献調査を進める予定である。岡鶴ではイギス類の捕食も見られた (図 16~18)。

次に、世久見のアカウニが捕食している主要なガラモ類のうち、イソモク、ジョロモク、ノコギリモク、ヤツマタモクのそれぞれの種毎の定量 PCR の技術を今回開発したが、検量線を図 19 に示す。いずれも、Hamaguchi et al. (2022) で総説されている sloop および efficiency 等定量 PCR 分析に必要な条件を満たしており、定量 PCR に使用できることが明らかとなった。そこで、それぞれの種について定量分析を行った結果を図 20 に示す。DNA コピー数を比較するとノコギリモク種群が最も多く、ついでほぼ同じレベルでヤツマタモク、これら 2 種と比較すると 1/10 程度でイソモクとジョロモクが検出された。イソモクは 5 月 26 日の 1 個体で本種をほぼ専食していたのみであったが、ジョロモクは烏辺島前や岡鶴で捕食されていた。一方、昨年度、箱崎はノコギリモク種群を、烏辺島前

や岡鶴はヤツマタモクを主に捕食していたという結果を報告したが、本年度も同様であった。8月22日のSCUBA潜水による観察結果からも、箱崎は比較的水深が深く、他の場所と比較するとノコギリモク種群が芽吹いている密度が高い状況がみとれた。したがって、本種のバイオマスが多く、待ち伏せ型の捕食行動をとるアカウニにとっては比較的得やすい餌海藻なのかもしれない。

このように漁場間で主要な餌海藻類が異なる傾向は昨年度と同様であった。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。

昨年度は報告書を提出した後に、福井県栽培漁業センターの中島研究員と飼育条件下でアカウニにヤツマタモクとノコギリモクを投与して選択性があるか、について検討したが、選択性は無いという結果となった。このことから少なくとも世久見海岸に生息するアカウニはガラモ類を好むが、種の選択性はなく生息場内でバイオマスが多いガラモ類を捕食しているのではないかと考えられる。また、昨夏は記録的猛暑であったが、そのために海水温も高く、今回調査した3地点でも岡鶴では他の2地点と比較して水温が高かったため、その影響によりアカウニが衰弱したのではないかと考えられる。その結果、夏場には箱崎および岡鶴では消化管内容物がほとんど無い個体が多く、生殖腺重量も低かった。一方、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。今回の8月22日のSCUBA潜水の調査結果から烏辺島前と比較して、箱崎や岡鶴は海藻類の景観被度が低いので、海藻類のバイオマス自体も少なく、このことが漁場間の生殖腺重量に差があったことの原因のひとつと考えられる。今後は、アカウニ採集時の環境データに加え、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。

4) 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海藻類の $\delta^{13}\text{C}$ 値と $\delta^{15}\text{N}$ 値の比較

本年度はアカウニの餌料となる海藻を箱崎、岡鶴および烏辺島で5月と8月に採集し、 $\delta^{13}\text{C}$ 値と $\delta^{15}\text{N}$ 値を比較した(図21)。5月の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、3つの海域で3.67‰から5.73‰の範囲で、烏辺島でやや高い傾向が見られた。一方、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は、箱崎と岡鶴では最小値が-20‰以下であったが、烏辺島では-17.01‰と低い値を示す藻類は得られなかった。一般に $\delta^{13}\text{C}$ 値は炭素源と光合成速度と関連する同位体分別により決定される。炭素源は海水のpHと関連するものの海域別に大きく異ならない。そのため、 $\delta^{13}\text{C}$ 値の差は、光合成速度の違いによる同位体分別の可能性が大きい。栄養塩が少ない場合や光合成の速度が速くなる条件(光、温度)が生じると同位体分別が小さくなり、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は高くなる。今後、3海域の一次生産の環境条件を検証する必要がある。

8月は岡鶴のジョロモクの $\delta^{15}\text{N}$ 値が高い値を示した。今回は、1標本で測定しているため、検証が必要である。このジョロモクを除くと、3海域の $\delta^{15}\text{N}$ 値の範囲は、3.45‰から5.25‰と変化は小さかった。 $\delta^{13}\text{C}$ 値も同様に3海域でその範囲は、ほぼ重複していた。

メタゲノム解析によりアカウニの主要餌生物と考えられる、イソモク、ジョロモク、ノコギリモク、ヤツマタモクの $\delta^{15}\text{N}$ 値は、それぞれ5月では、4.1‰~5.73、3.73‰から4.09‰、4.42‰、4.30‰~4.5‰、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は-16.79‰から-15.35‰、-18.86‰~-15.6‰、-17.15‰、-14.81‰~-12.3‰であった。8月の $\delta^{15}\text{N}$ 値、 $\delta^{13}\text{C}$ 値は、ジョロモクは4.21‰~7.27‰と-18.38‰~-16.11‰、ノコギリモクは4.05‰~4.21‰と-14.42‰~-14.08‰、ヤツマタモクは4.98‰と-16.45‰であった。

(2) 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5月と8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22)。餌料源を反映する $\delta^{13}\text{C}$ 値は、5月では3海域間で有意差は認められなかったが8月では岡鶴が箱崎に比べて有意に低い値を示した。烏辺島と箱崎間には有意差が無かったが、岡鶴で低い値を示した。一方、5月の $\delta^{15}\text{N}$ 値

は箱崎と烏辺島間で有意差が認められ、箱崎、岡鶴、烏辺島の順で低下する傾向が認められた。この傾向は 2022 年 8 月と同様であった。2023 年 8 月の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、 $\delta^{13}\text{C}$ 値と同様で岡鶴が箱崎に比べて有意に低い値を示し烏辺島と箱崎間には有意差が無かった。

消化管内容物の metabarcoding 解析では、イソモク、ジョロモク、ノコギリモク、ヤツマタモク特にノコギリモクとヤツマタモクの重要性が示された。一般に捕食者の $\delta^{13}\text{C}$ 値はその餌料との間で 0~1% の同位体濃縮しか生じないために、餌料を反映すると考えられている。しかし、生物種によっては同位体の濃縮係数は大きく異なる。一方、捕食者の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、餌料よりも 3%~4% 濃縮される傾向にある。仲野 (2018) は、バフンウニの $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ 値をそれぞれ 6.5‰ と 2.5‰ と推定している。この濃縮係数を用いて 5 月のアカウニの餌料を評価すると、箱崎、岡鶴、烏辺島では、 $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ 値がそれぞれ -21.4‰ と 4.6‰、-21.7‰ と 4.1‰、-20.9‰ と 3.5‰ となる。一方、8 月は箱崎、岡鶴、烏辺島で、それぞれ -20.7‰ と 5.1‰、-21.9‰ と 3.7‰、-21.0‰ と 4.3‰ となった。 $\delta^{13}\text{C}$ 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、8 月は 5 月海藻の同位体比を反映することが考えられる。metabarcoding 解析で最も特徴的な結果であった 5 月の箱崎では、ノコギリモクが優占していた。安定同位体比分析でもノコギリモクの $\delta^{13}\text{C}$ および $\delta^{15}\text{N}$ 値が合理的な結果になっており、またバラツキも少ないことから、DNA 解析の結果を反映していると考えられる。しかし、 $\delta^{13}\text{C}$ がやや高いことから、今後、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必要がある。

4 文献

- 1) 安成淳 (2015) アカウニの耐水温試験. Bull. Yamaguchi Pref. Fish. Res. Ctr. 12, 41-44.
- 2) 吾妻行雄 (1997) キタムラサキウニの個体群動態に関する生態学的研究. 北水試研報, 51, 1-66.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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>.
- 7) 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.
- 8) Kogome, K., Uwai, S., Shimada, S., Masuda, M. (2005) A study of sexual populations of *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae) in Hokkaido, northern Japan, using molecular markers. European Journal of Phycology, 40, 313-322.
- 9) Lane, C. E., Lindstrom, S. C., Saunders, G. W. (2007) A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. Molecular phylogenetic Evolution, 44, 634-648.
- 10) Lee, Y.P. and Lindstrom, S.C. 1979. *Audouinella kurogii*, a new marine red alga (Acrochaetiaceae) from eastern Hokkaido. Japanese Journal of Phycology 27: 115-122.
- 11) 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>,
- 12) 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.
- 13) 仲野大地 (2018) DNA バーコーディング法および炭素・窒素安定同位体比分析を用いたバフンウニの食性解析に関する研究. 福井県立大学博士学位論文, 119pp.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) Ortega, A.; Geraldi, N. R.; Duarte, C. M. (2020) Environmental DNA identifies marine macrophyte contributions to blue carbon sediments. *Limnology and Oceanography*, 9999, 1-11.
 - 17) Ortega, A., Geraldi, 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) Stiger, V., Horiguchi, T., Yoshida, T., Coleman, A.W. and Masuda, M. (2003) . Phylogenetic relationships within the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) , inferred from it ITS nrDNA, with an emphasis on the taxonomic revision of the genus. *Phycological Research* 51: 1-10
 - 22) Tayasu et al. 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 DOI : 10.1007/s10201-011-0345-5 (2011) .



図1 磯根生物の採集場所

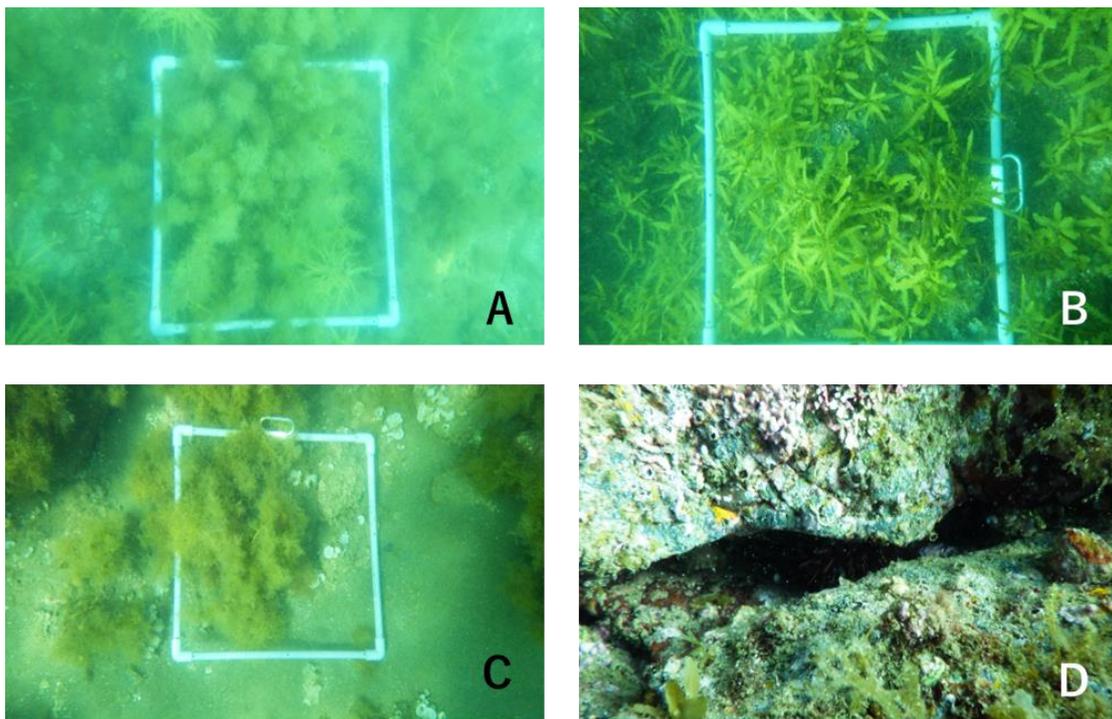


図2 8月22日SCUBA潜水による調査時のアカウニ採取場所の藻場の状況
A: 烏辺島前、B: 箱崎、C: 岡鶴、D: 岡鶴のアカウニ

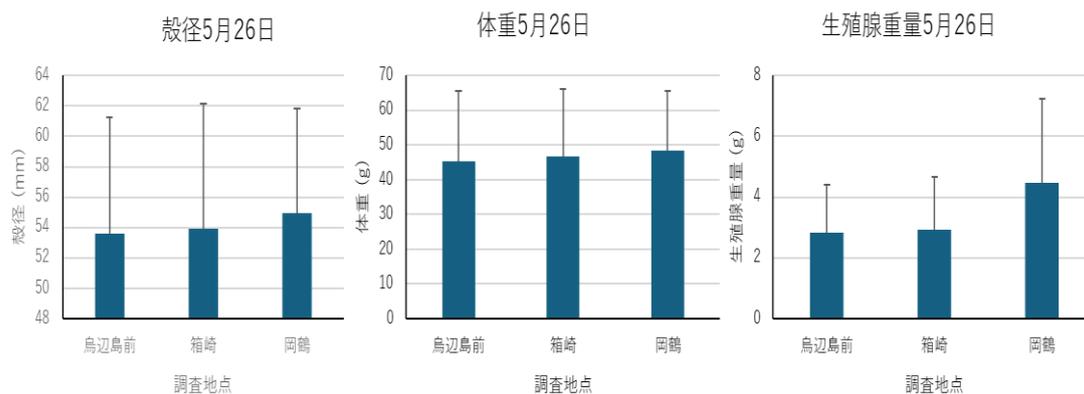


図3 5月26日に採取したアカウニの殻径、体重および生殖腺重量

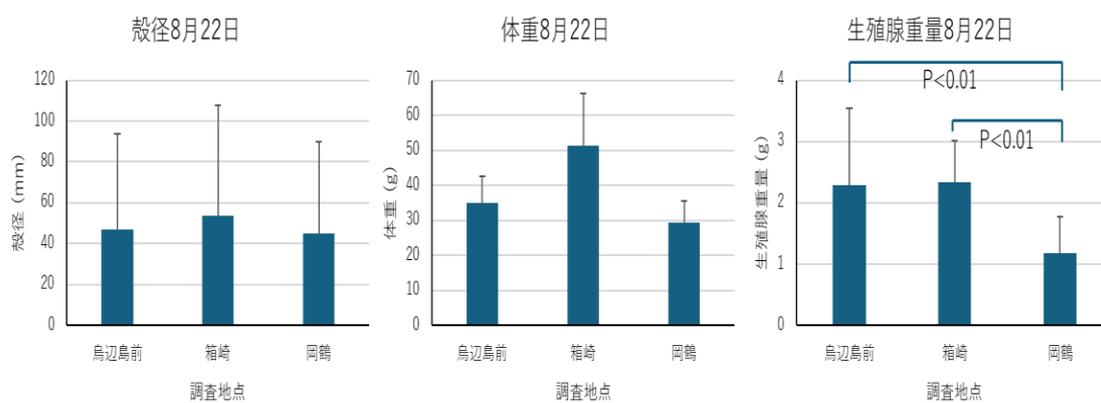


図4 8月22日に採取したアカウニの殻径、体重および生殖腺重量

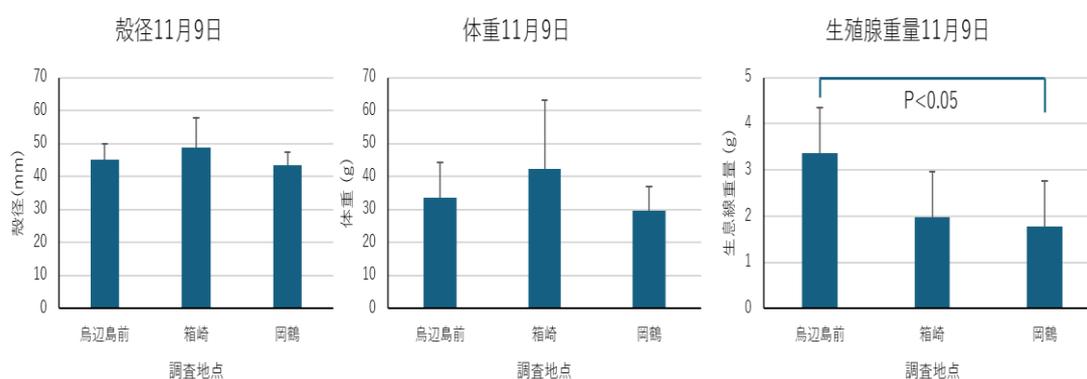


図5 11月9日に採取したアカウニの殻径、体重、生殖腺重量

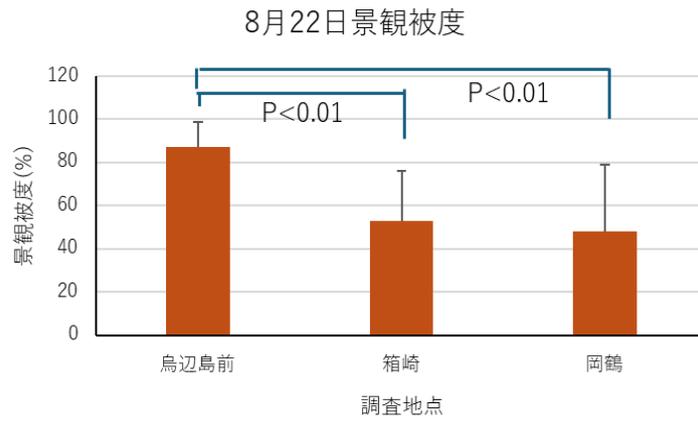


図6 8月22日の各調査地点の藻場の景観被度

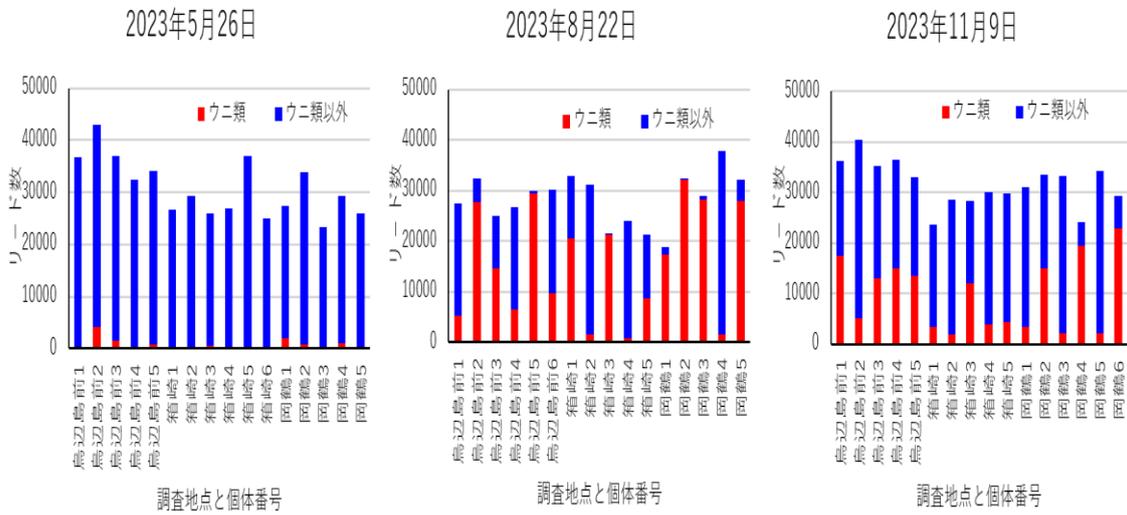


図7 18SrRNA の metabarcoding 解析で得られたリード数中のアカウニOTUの比率

2023年5月26日

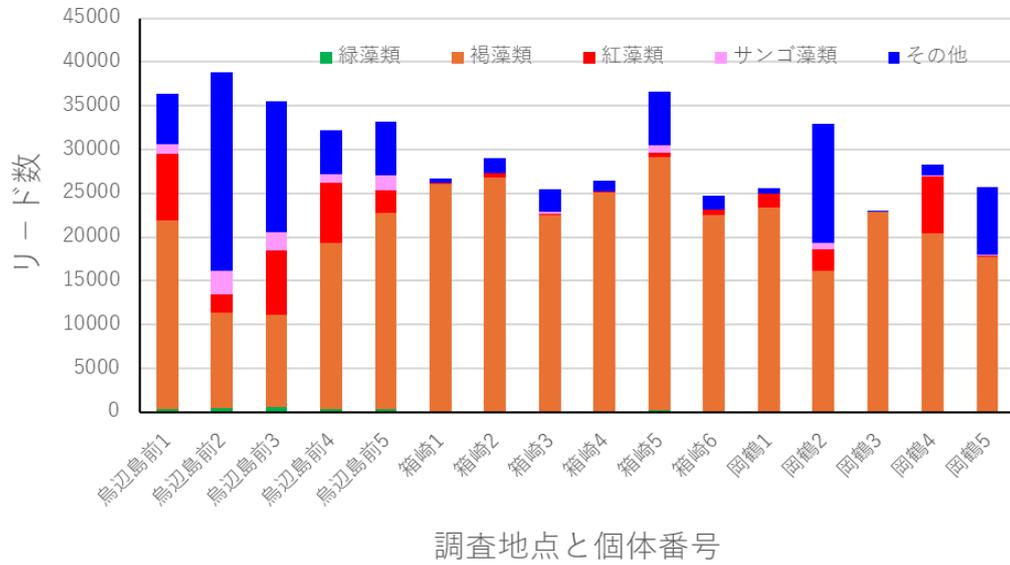


図8 18SrRNA 領域による5月26日に採取したアカウニの消化管内容物のmetabarcoding解析結果

2023年8月22日

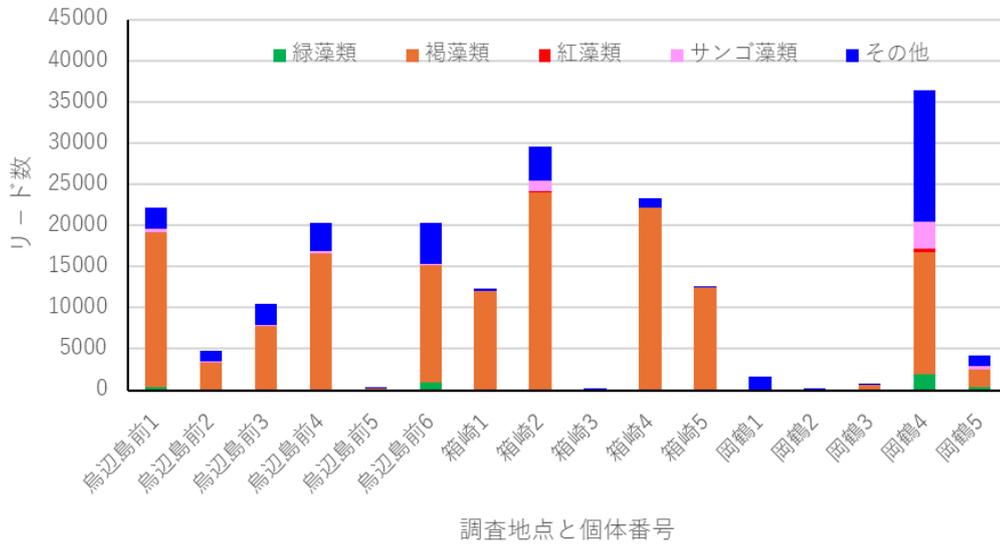


図9 18SrRNA 領域による8月22日に採取したアカウニの消化管内容物のmetabarcoding解析結果

2023年11月9日

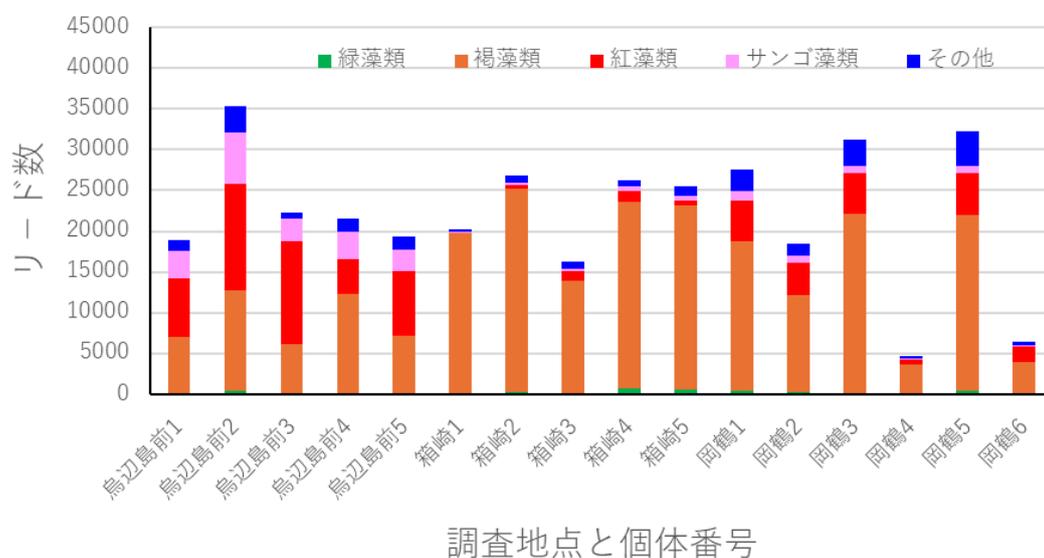


図 10 18SrRNA 領域による 11 月 9 日に採取したアカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析結果

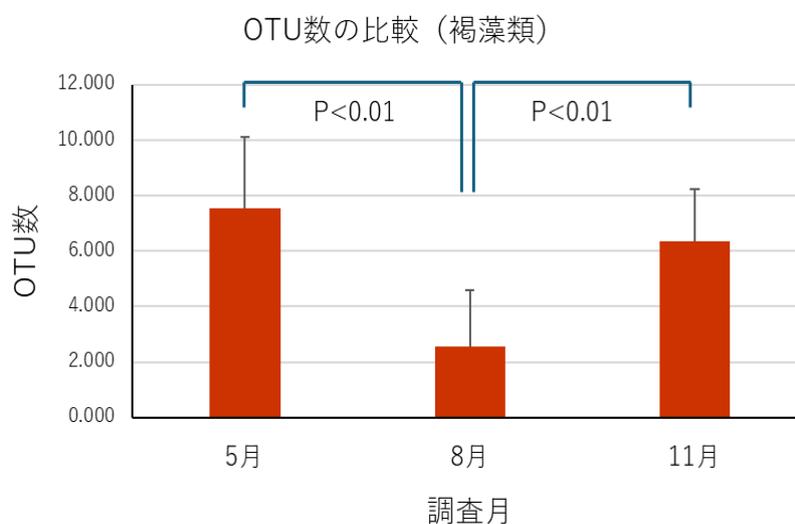


図 11 GazMRF と Gaz2R 領域による採取したアカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析結果のうち褐藻類の季節変化

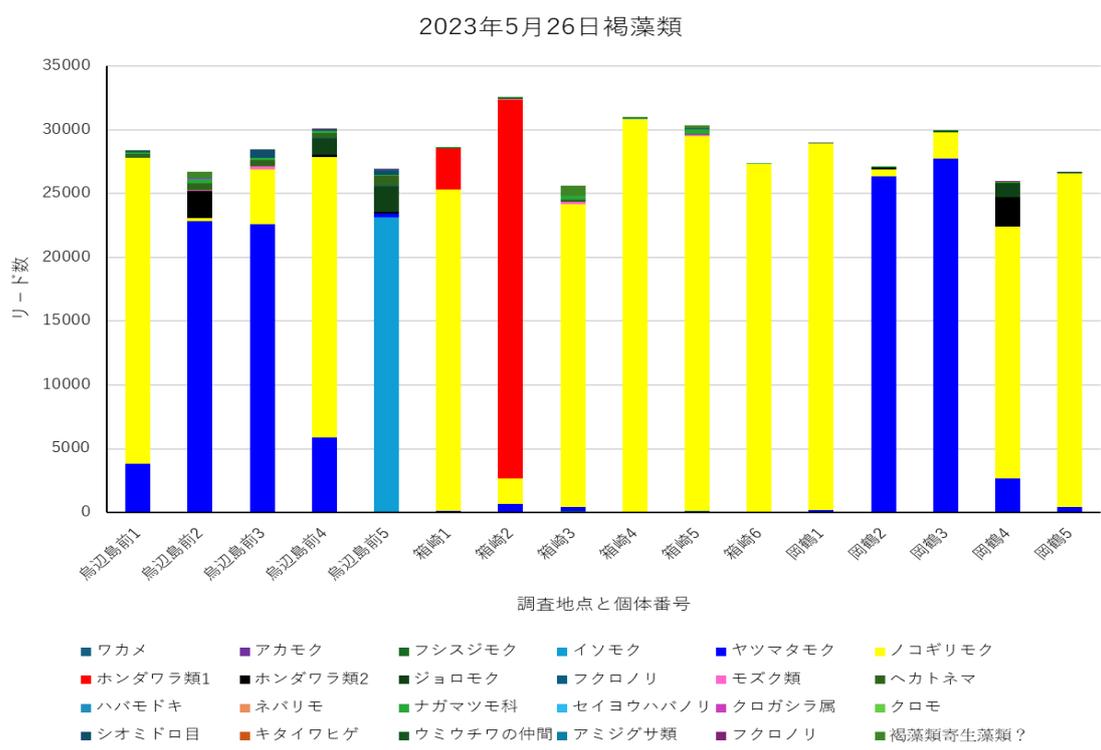


図 12 GazMRF と Gaz2R 領域による 5 月 26 日に採取したアカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析結果 (褐藻類)

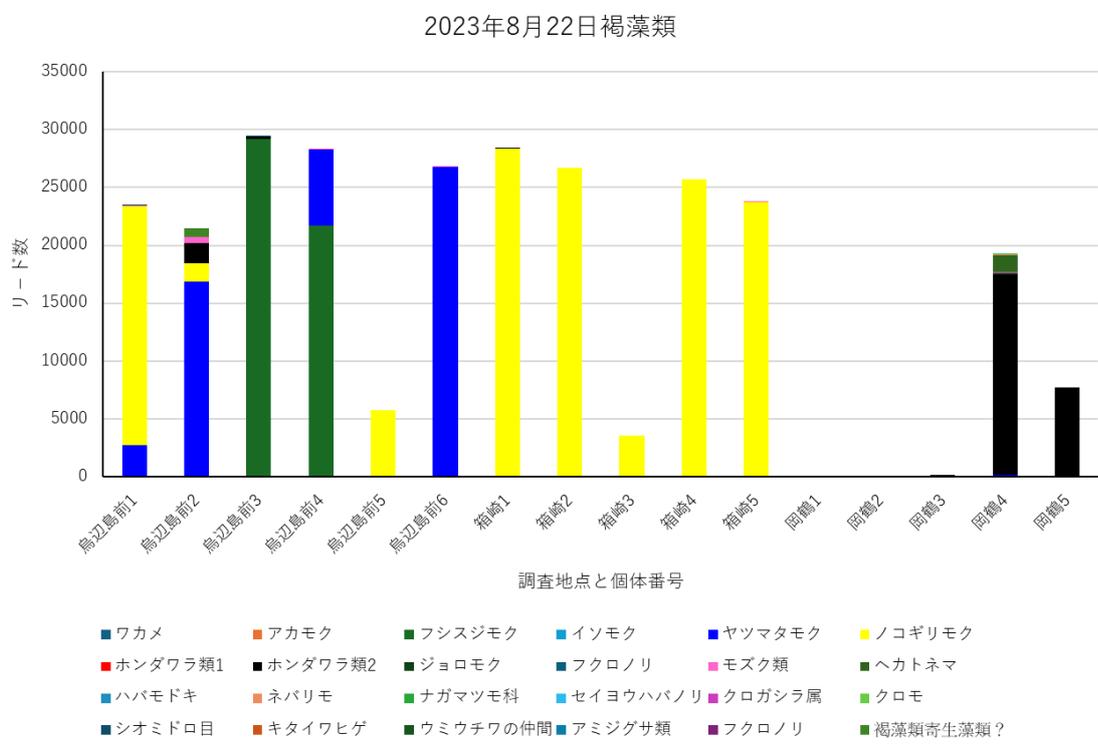


図 13 GazMRF と Gaz2R 領域による 8 月 22 日に採取したアカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析結果 (褐藻類)

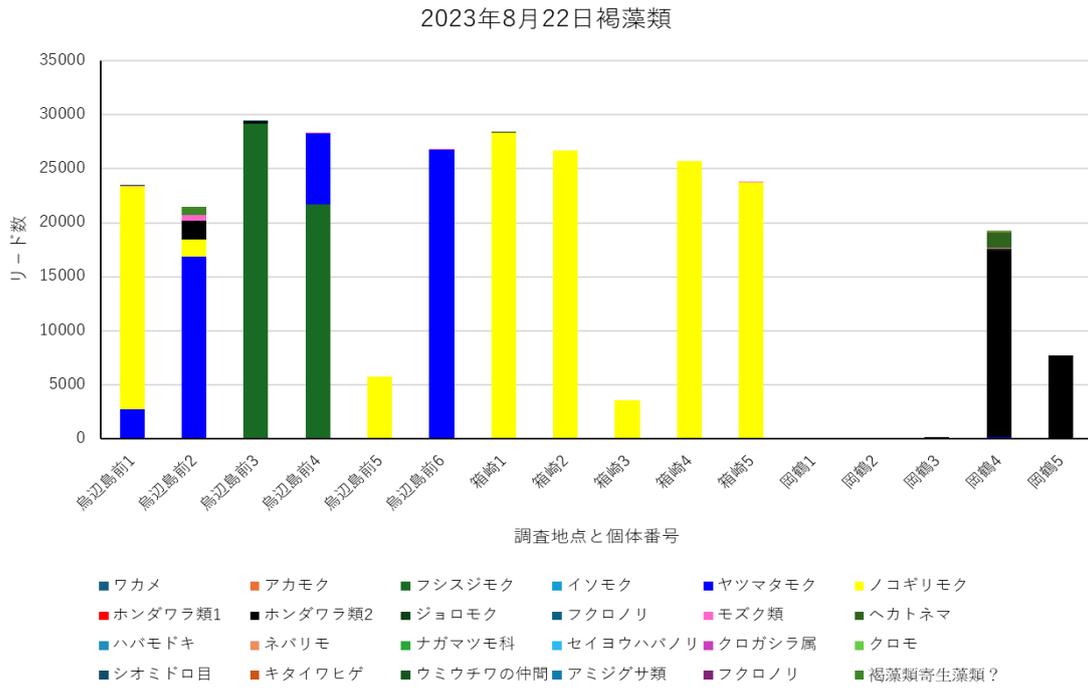


図 14 GazMRF と Gaz2R 領域による 11 月 9 日に採取したアカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析の結果(褐藻類)

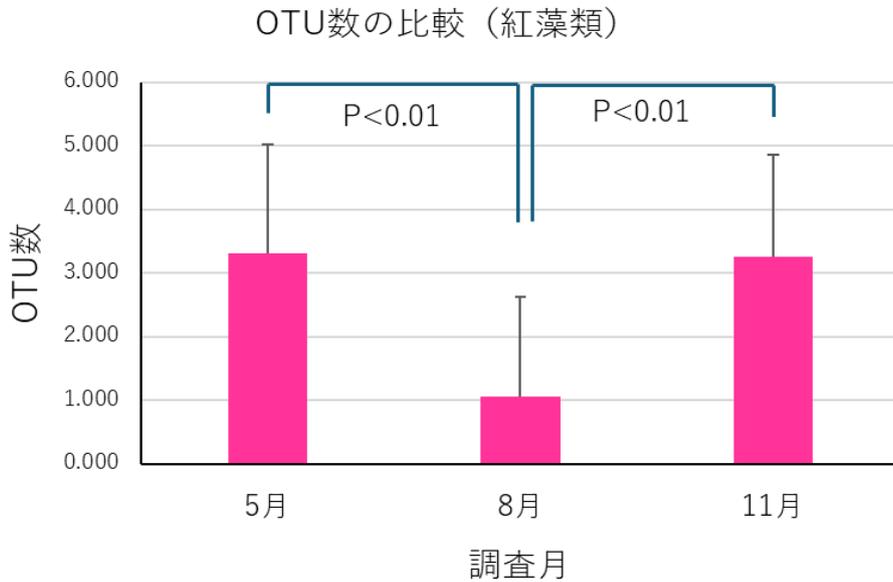


図 15 GazMRF と Gaz2R 領域による採取したアカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析結果のうち紅藻類の季節変化

2023年5月26日紅藻類

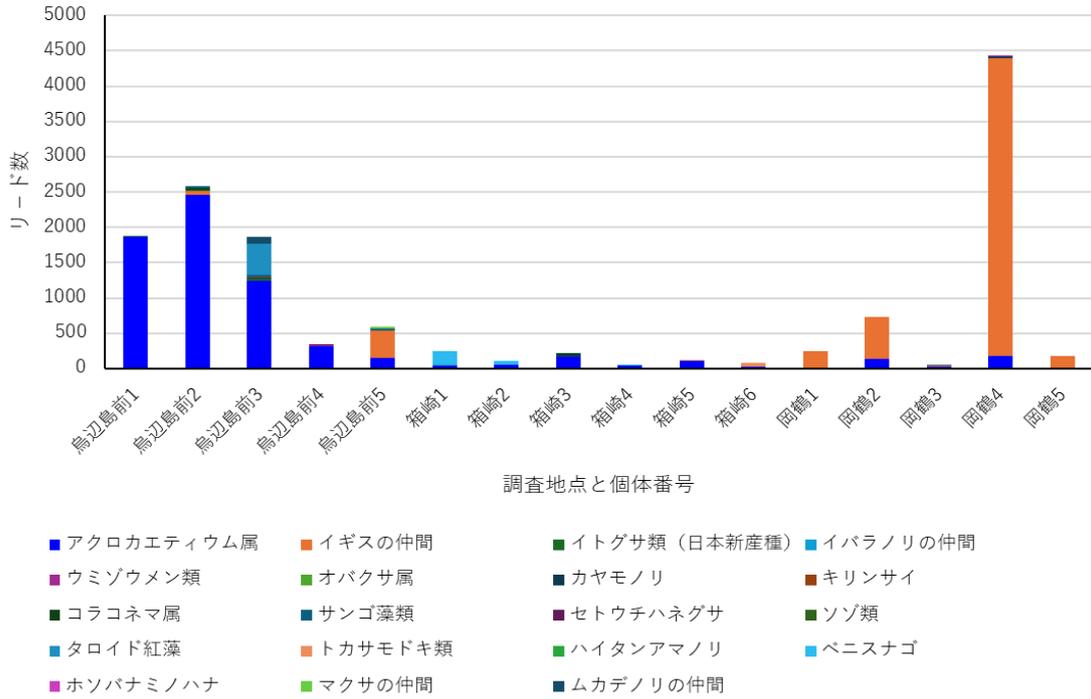


図 16 GazMRF と Gaz2R 領域による 11 月 9 日に採取したアカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析の結果 (紅藻類)

2023年8月22日紅藻類

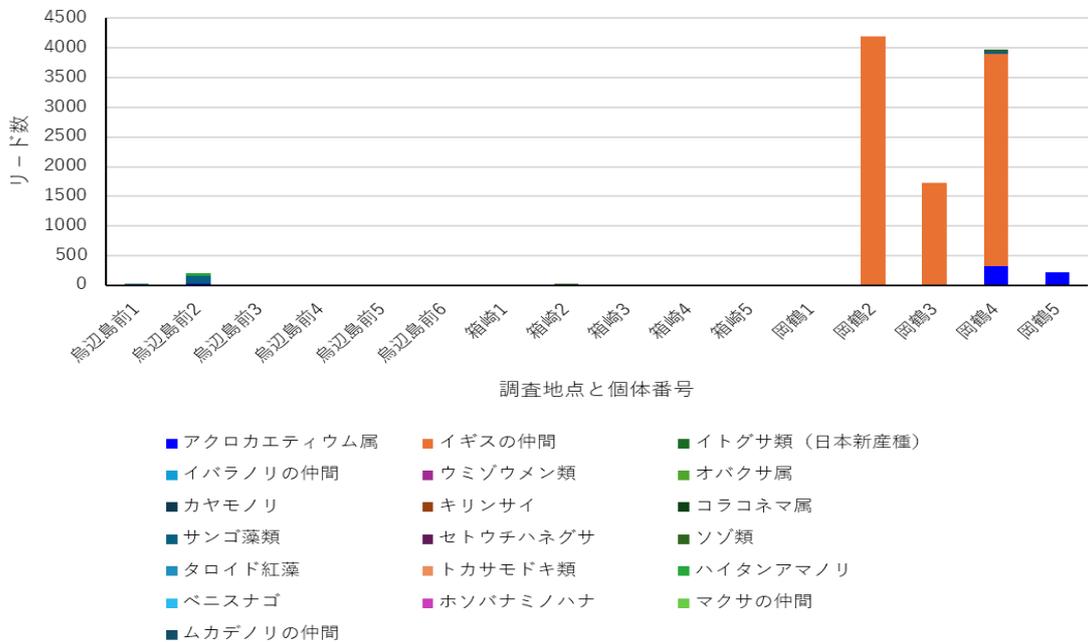


図 17 GazMRF と Gaz2R 領域による 8 月 22 日に採取したアカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析の結果 (紅藻類)

2023年11月9日紅藻類

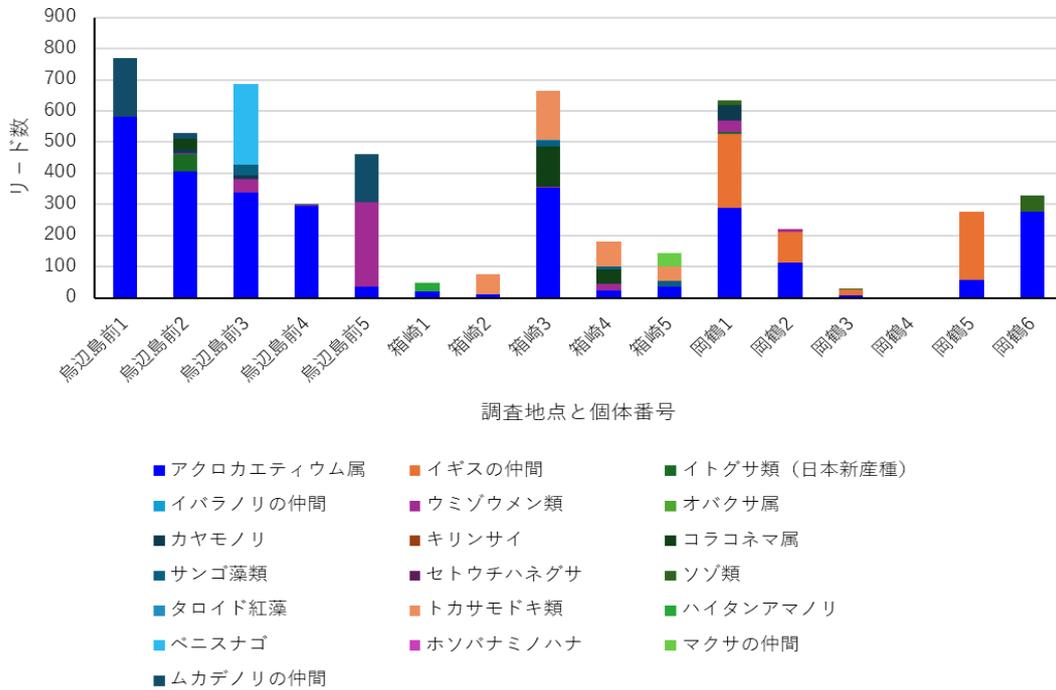


図 18 GazMRF と Gaz2R 領域による 8 月 22 日に採取したアカウニの消化管内容物の metabarcoding 解析の結果 (紅藻類)

表 1 今回設計したイソモク、ジョロモク、ノコギリモク、ヤツマタモクの定量PCRの系

| 海藻類 | 種別 | 塩基配列 | 反応温度 (°C) | 長さ (bp) | Sloop | Efficiency | r2 |
|--------|--------|-----------------------------------|-----------|---------|---------|------------|--------|
| イソモク | DLP | FAM-TTACCCGGACTTGCGAGCTGC-BHQ1 | 60 | 85 | -3.3510 | 0.9880 | 0.9996 |
| | Primer | TCCGGTGTTTTAGGTACAGC | | | | | |
| | Primer | CAATAACATTATACAAGTATAATTTC | | | | | |
| ジョロモク | DLP | HEX-GTTAAGCGGCATACAAGCCACTCG-BHQ1 | 60 | 93 | -3.3001 | 1.0092 | 0.9998 |
| | Primer | CGGTACAGGTTGGACTGTTTA | | | | | |
| | Primer | CACCAGATAAATGCAGACTGAATAT | | | | | |
| ノコギリモク | DLP | Cy5-TCCTCATTAGTGAAGCTGGAGCC-BHQ3 | 60 | 103 | -3.4160 | 0.9622 | 0.9999 |
| | Primer | CGCCATCTATAATACTTCTTTTAGC | | | | | |
| | Primer | CCTGGATACCACTTAAGGGT | | | | | |
| ヤツマタモク | DLP | HEX-AGGTAGACGGTGCATACCCGGA-BHQ1 | 60 | 98 | -3.3566 | 0.9857 | 0.9999 |
| | Primer | TGCTTCTATTTTAGGTGCCAT | | | | | |
| | Primer | AGTAAAAATGCTGTATTATAAACAGA | | | | | |

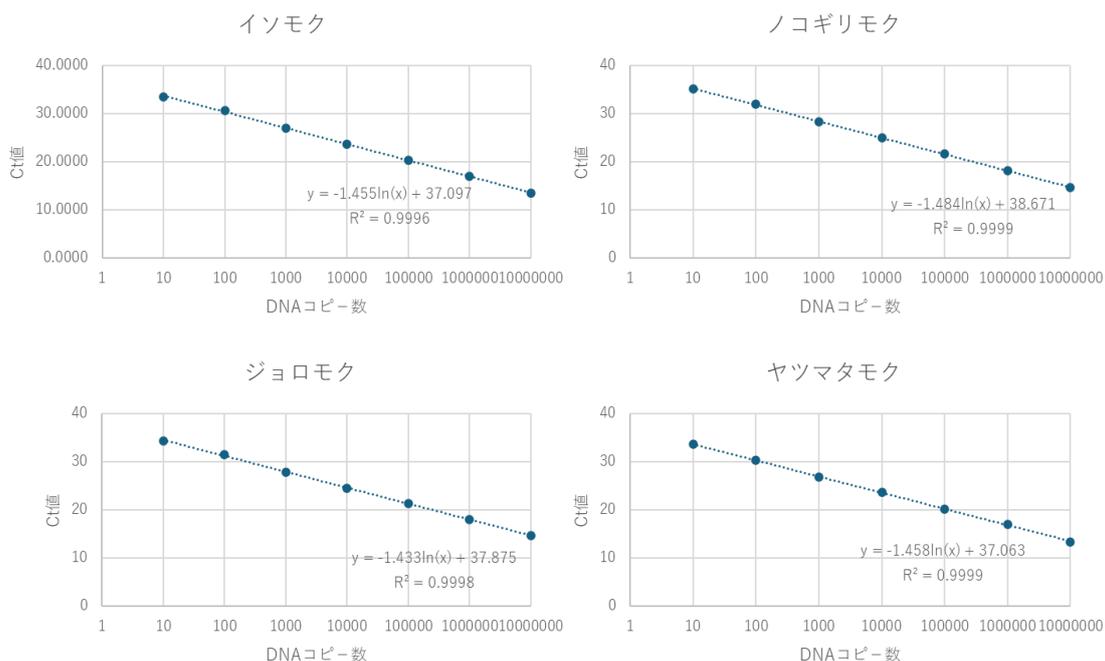


図 19 表 1 の検出系を用いたイソモク、ジョロモク、ノコギリモク、ヤツマタモクの検量線

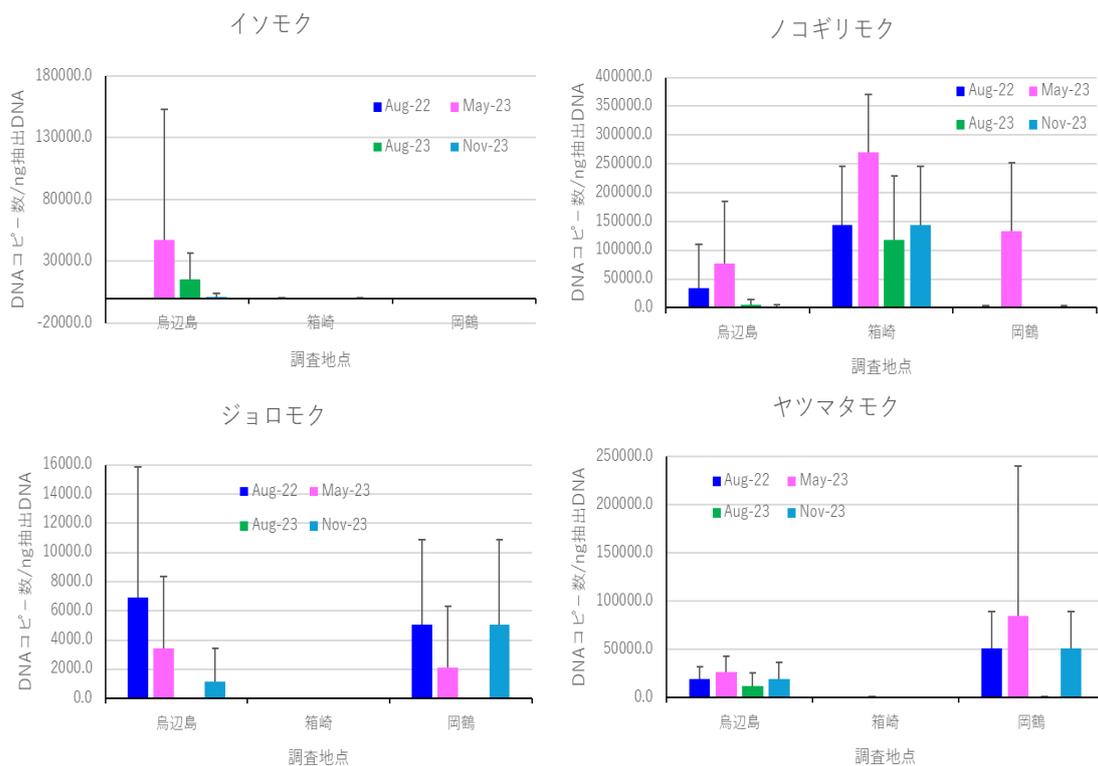


図 20 今年度および前年度のアカウニの消化管内容物のイソモク、ジョロモク、ノコギリモク、ヤツマタモクの定量 PCR による分析結果

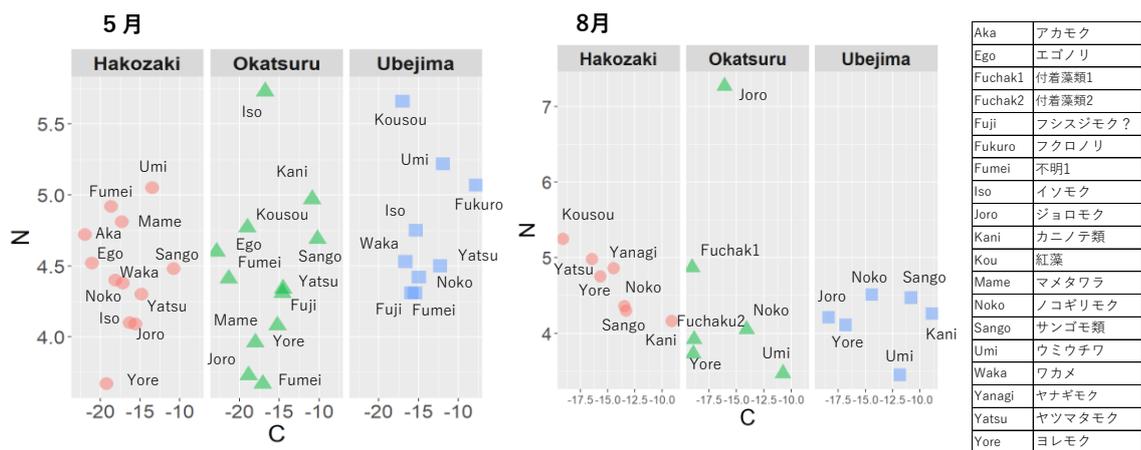


図 21 箱崎、岡鶴、烏辺島で採集された藻類の炭素安定同位体比 (C) および窒素安定同位体比のCNマップ

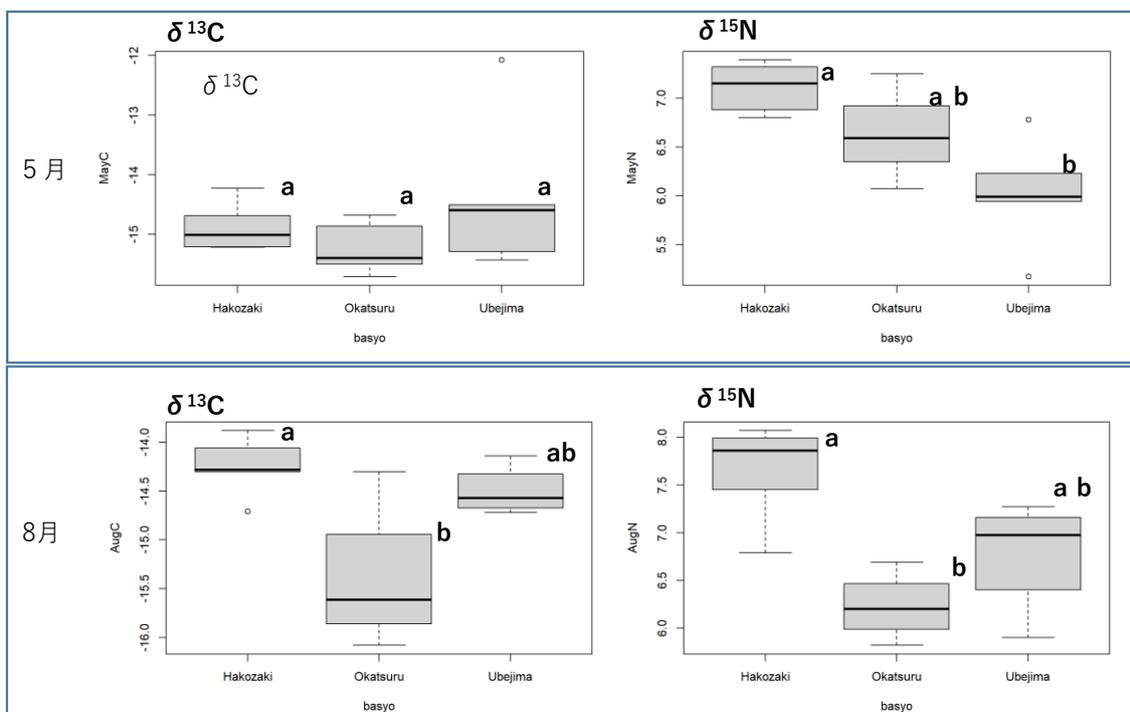


図 22 2023年5月26日(上)および8月22日(下)に箱崎、岡鶴、烏辺島で採集されたアカウニ口器筋肉の炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) および窒素安定同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$)