

報文

メタバーコーディング法によるアサリ餌料推定： 碎石敷設が生息地の生物相及びアサリ消化管内容物組成に与える影響

藤井太一¹⁾、南基泰¹⁾、白子智康²⁾、田中真規子²⁾

¹⁾中部大学大学院応用生物学研究科, ²⁾いであ株式会社

要 旨

アサリ生息地への碎石敷設が生息地の生物相及びアサリ消化管内容物組成に与える影響をメタバーコーディング法で 2016, 2017 年に推定した。底質直上水の生物相組成は両年で著しく異なり, 2016 年は脊索動物門が, 2017 年には珪藻植物門が最も多くなった。両年共に底質では碎石敷設に関係なく珪藻植物門が最も多く検出されたが, アサリ消化管内容物からはわずかに検出されただけであった。アサリ消化管内容物は, 2016 年は碎石敷設されていない生息地では渦鞭毛虫門が, 碎石敷設された生息地では緑藻植物門が最も多く検出された。一方, 2017 年は碎石の有無に関係なく扁形動物門がほぼ占めていた。両年共にアサリ消化管のほとんどの内容物は底質由来の生物相で占められていた。これまで報告されたことのない餌料候補の生物種が門レベルで推定され, 特に扁形動物門がアサリ餌料となっていることを初めて明らかにできた。ただし, アサリ消化管内容物の生物相組成の相違は, 碎石敷設よりもサンプリング時期の相違の方が大きく影響していた。

キーワード : アサリ, 次世代シーケンサー, 餌料, メタバーコーディング

1. はじめに

アサリ(*Ruditapes philippinarum*)は, 日本では古くから沿岸漁業の重要種であったが, 近年その漁獲量は減少傾向にある(伊藤, 2002; 多賀ら, 2005; 松川ら, 2008)。特に, 国内で最もアサリ漁獲量の減少が顕著な熊本県有明海では, 1977年に約6万5千トンあった漁獲量が, 2000年にはその1%まで落ち込んでいる(関口・石井, 2003)。また, 有明海では生息数の減少だけでなく, 放流貝の成長遅延も報告されている海域がある(地元漁業関係者からの私言)。このようなアサリの漁獲量減少要因は, 干潟の消失, 過剰漁獲だけでなく(松川ら, 2008), 餌料環境の変化も要因と考えられている(関口・石井, 2003)。これまでのアサリ餌料調査の結果, アサリ生息地の底泥懸濁物を形成する植物プランクトン由来のデトリタス(黒倉ら, 1988), 植物色素を含む粒子(沼口, 1985)及び着泥性・着砂性・着藻性の珪藻類(小池ら, 1989; 小池ら, 1992)などが報告されている。アサリは潮間

帯から水深約10mまでの砂礫泥底に生息する潜砂性の二枚貝で, 底泥直上の海水を吸入, ろ過し, 懸濁物を餌料とする懸濁物食者である(松隈, 2004)。そのため, アサリの生息地内に餌料となる生物等が付着することのできる泥底・砂礫・海藻が存在するかどうかは, 餌料環境の適性に大きく影響することになる。

実際に, 熊本県玉名市横島の有明海では碎石表面の付着藻類や付着微生物等の生物種がアサリの良い餌料になることも含めて稚貝の着生, 生残に寄与すると考えられ, 漁業者による干潟への碎石の敷設が行われた。その結果, アサリの生残数の増加に一定の成果が認められている(地元漁業関係者からの私言)。本研究では干潟への碎石敷設による餌料環境改善効果を検証するため, アサリ生息地の底質直上水, 底質の生物相及びアサリ消化管内容物組成の相違をメタバーコーディング法で推定した。

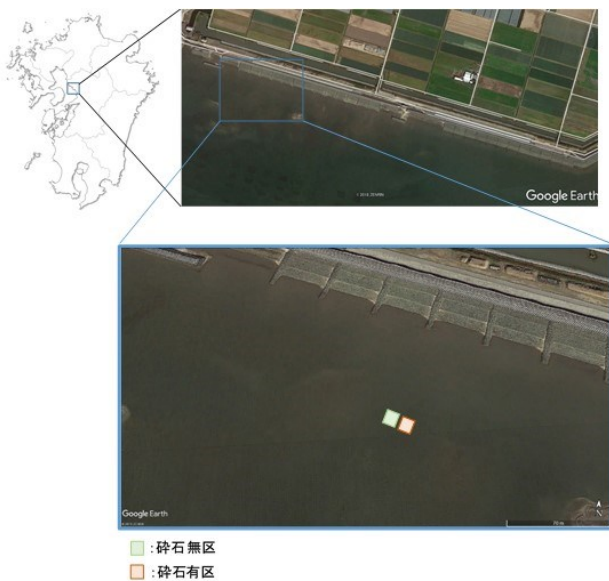


図-1

熊本県玉名市横島の干潟概要及び試験区概要

本干潟に砕石を敷設した砕石有区と砕石無区

地図データ：Google, DigitalGlobe

2. 材料及び方法

2-1. 試料採取地及び分析試料

本研究は熊本県玉名市横島地先の有明海干潟で実施した(32°50'33.7"N, 130°33'19.9"E) (図-1). 砕石を敷設した区画(砕石有区)と砕石を敷設していない区画(砕石無区)は、アサリ漁場の回復を目的とした水産庁による試験区(2016年7月5, 6日に砕石設置)を使用した。それぞれの区画は3m×3m程度であり、直径約5~13mmの砕石が5~10cm厚となるように均されている。稚貝の散布はされておらず、自然に流入もしくは着生してきたものを解析対象とした。2016年9月20, 21日及び2017年7月24日の低潮時に底質直上水、各区画の底質及びアサリをサンプリングした(表-1)。これらの試料は全DNA抽出まで冷凍保存(-20℃)した。

2-2. メタバーコーディング法

2016年は作業効率を優先し、底質直上水、底質及びアサリ消化管内容物共に土壌、堆積物中の細菌、微生物、藻類から全DNAを効率的に抽出できるNucleospin Soil (Macherey-Nagel)を用いた。2017年については、各DNA抽出試料に特化したDNA抽出

表-1

サンプル採取日	底質直上水	砕石有区		砕石無区	
		底質	アサリ 消化管	底質	アサリ 消化管
2016年9月20-21日	1.2 L	524mg	3個体	665mg	3個体
2017年7月24日	1.0 L	10.0g	6個体	10.0g	6個体

キットとして、底質直上水は DNeasy PowerWater Sterivex Kit (QIAGEN)、底質は PowerMax Soil DNA Isolation Kit (MOBio)、アサリ消化管内容物は DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN)を用いた。

各 DNA 抽出試料については、アサリ消化管内容物のみを抽出することは困難であったため、各区画より3~6個体分(表-1)の消化管を抽出し、バルクとしたものを全 DNA 抽出試料とした。また、底質直上水はろ過(フィルター:0.45 µm Sterivex filter, Millipore)した後、フィルター上に残った残渣を全 DNA 抽出用試料とした。底質試料は細かい砂礫も含めたものを全 DNA 抽出用試料とした。抽出した全 DNA を鋳型に 18Sr RNA の V9 領域を増幅するプライマー (Amaral-Zettler et al., 2009)を使用し、真核生物全般の DNA を増幅した。次世代シーケンサーによる解析には MiSeq (illumina) の MiSeq Reagent Kit v3 を用いて、PCR 産物の両端から300bp ずつの塩基配列を決定した。

2-3. 相同性検索

得られた塩基配列データは Claident プログラム (Tanabe and Toju, 2013)を用いて解析し、使用したコマンド及びオプションの詳細は表-2に記載した。具体的な手順として、clsplitseq を用いて各塩基配列よりタグ配列を区別し、clconcatpair でフォワード側とリバース側の塩基配列を結合した。vsearch で低品質配列の除去、clicleanseqv でノイズ・キメラ配列の除去を行った。その後、clclassseqv を用いて OTU (Operational Taxonomic Unit) を構築した。構築された OTU の代表配列は clidentseq を用いて Qcauto アルゴリズム (Tanabe and Toju, 2013)による相同性検索を行った。なお、海洋生物は DNA データベースに種レベルで登録されているものが少なかった。そのため、本研究では門レベルで推定し、底質直上水及び底質の生物相、アサリ消化管内容物組成を比較した。

表-2 底質直上水及び底質の生物相, アサリ消化管内容物の推定に使用したコマンド及びオプション一覧

Unix コマンド	解析内容	Option
clsplitseq	タグ配列によるサンプル仕分け	--run name= ## --index1file= ##.txt --index2file= ##.txt --primerfile= ##.txt --reverseprimerfile= ##.txt --minqualtag= 30 --num threads= ## 入力ファイル1 入力ファイル2 入力ファイル3 入力ファイル4 output
clconcatpair	フォワード側とリバース側の結合	--mode= OVL --max mismatch= 20 --minovlen= 20 --compress= GZIP --num threads= ## output.forward.fastq output.reverse.fastq demultiplex.fastq
vsearch	低品質配列の除去	--fastq_filter ## --fastq_maxee 0.1 --fastqout ##
clcleanseqv	ノイズ・キメラ配列の除去	--derepmode= PREFIX --primarymismatch= 0 --secondarymismatch= 1 --pnaisycluster= 0.5 --num threads= ## demultiplex.fastq cleaned_demultiplex.fastq
clclassseqv	配列クラスタリングによるOTU作成 (塩基配列の類似度97%以上の配列を OTUとしてまとめる)	--minident= 0.97 --num threads= ## primarycluster.cleaned.fasta.gz OTU_output
clidentseq	相同性検索 (ClaidentのQcautoアルゴリズム(Tanabe and Toju, 2013)を使用)	--blastdb= overall_genus --num threads= ## OTU代表配列.fasta BLAST-Result_output

3. 結果・考察

2016 年, 2017 年に「碎石無区」及び「碎石有区」の両区画よりサンプリングした底質直上水, 底質及びアサリ消化管内容物のメタバーコーディングの結果, 18 門の真核生物が検索された(表-3). 底質直上水, 底質及びアサリ消化管内容物より検出された軟体動物門は, ほとんどがアサリ由来と考えられる二枚貝綱の DNA であった. そのため, 本研究では各試料より軟体動物門を除外した 17 門を解析対象とした. また, 各試料のリード数上位 5 門の比率を図-2 に示した.

底質直上水の生物相は, 2016 年と2017 年の間で顕著に異なっていた(表-3). 2016 年は最も多く検出されたのが脊索動物門で, 次いで子囊菌門となった. しかし, 2017 年は珪藻植物門, 扁形動物門の順となった(図-2). 両年の底質直上水中の生物相組成が異なるのは, 採水時期が異なることも一因であると考えられる. 本研究では年 1 回のサンプリングであったため, 両年の底質直上水の生物相が大きく異なった要因については考察ができないので, 今後の検討課題として残った.

底質については両年共に碎石敷設に関係なく珪藻植物門が最も検出され, 次いで環形動物門が検出された(ただし, 2016 年碎石有区は渦鞭毛虫門). 2016 年は碎石敷設による生物相の種組成に対しては影響が認められなかったが, 環形動物門, 節足動物, 纖毛虫門のリード数は減少した. 一方, 2017 年については碎石敷設によって環形動物門, 扁形動物門のリード数は増加したのに対して, 渦鞭毛藻虫門, 珪藻植物門, 節足動物門のリード数は減少した.

アサリ消化管内容物については, 2016 年は両区共に渦鞭毛虫門, 緑藻植物門, 珪藻植物門が主に検出された. 一方, 2017 年は両区共に内容物の大半は扁形動物門で占められていた. これまでの報告によるとアサリの餌料は植物プランクトン由来のデトリタス(黒倉ら, 1988), 植物色素を含む粒子(沼口, 1985)及び着泥性・着砂性・着藻性の珪藻類(小池ら, 1989; 小池ら, 1992)とされている. アサリは生息地である底質直上の海水を吸入, ろ過し, 懸濁物を餌料

とする懸濁物食者である(松隈, 2004). しかし, 本研究結果ではアサリ消化管内容物のほとんどは底質由来の生物相で占められていたことから, 底質直上の海水中よりも底質中の生物相がアサリ餌料として重要であることが示唆された. しかし, 両年共に碎石敷設に関係なく, 底質からは大量の珪藻植物門が検出されたが, アサリ消化管内容物からはわずかに検出されただけであった.

アサリ消化管内容物の生物相組成の相違は碎石敷設よりもサンプリング時期の相違の方が大きく影響していたと考えられた. また, これまで報告されたことのない餌料候補の生物種が門レベルで推定され, 特に扁形動物門がアサリの餌料となっていることを初めて明らかにできた. 従来の顕微鏡観察では, 珪藻等の消化されにくい生物種由来の餌資源が確認されており, 消化のされやすい動物質の餌資源は確認されなかった可能性がある. DNA 分析を用いることで, 消化が進み, 顕微鏡観察では確認できない微小な生物片についても検出できる可能性が示唆された.

4. 今後の課題

本研究で用いたメタバーコーディング法は, アサリ生息地の底質直上水及び底質の生物相, アサリ消化管内容物の生物種(門レベル)を推定するための有益な方法であることが明らかになった. 今後, 従来法である顕微鏡観察の結果と比較することで, 効果を検証できると考えられた. しかし, メタバーコーディング法で検出されるリード数は生物種毎に異なるため(Saitoh et al., 2016), リード数には定量性はない. そのため, 植物プランクトン由来の餌料については, クロロフィル量, フェオ色素量(沼口, 1985)などの調査結果や植物プランクトンを対象とした定量PCRと合わせて考察していく必要がある. また, 餌料とアサリ成長との関係性を解析するためには, アサリの大きさ(西沢ら, 1992)などの生育指標を設定し, 生息地の生物相や消化管内容物との関係性についても調査する必要がある. また, 本研究ではすべてのサンプルにおいてアサリ由来と思われる軟体動物門が多く

検出され、特にアサリ消化管からは顕著であった。このことから、今後はアサリ由来の DNA を増幅させな

表-3 18Sr RNA の V9 領域より推定された底質直上水及び底質の生物相、アサリ消化管内容物の各生物種のリード数

門	2016年 底質直上水	2016年 砕石無区 底質	2016年 砕石有区 底質	2016年 砕石無区 アサリ 消化管	2016年 砕石有区 アサリ 消化管	2017年 底質直上水	2017年 砕石無区 底質	2017年 砕石有区 底質	2017年 砕石無区 アサリ 消化管	2017年 砕石有区 アサリ 消化管
担子菌門	4133	244	130	30	1	3	2	0	0	0
アピコンプレックス門	0	104	60	96	56	8	4	3	0	0
渦鞭毛虫門	0	2571	2318	178	3	168	1414	384	0	2
オクロ植物門	0	97	51	0	5	90	46	10	5	10
クリプト藻植物門	2078	16	0	0	0	14	2	0	0	0
環形動物門	0	4068	954	0	0	94	4353	5344	0	0
珪藻植物門	0	12961	12752	108	51	34157	12274	6479	38	74
子囊菌門	6154	651	383	59	28	8	9	6	1	0
刺胞動物門	0	76	0	0	0	5	0	15	0	0
ストレプト植物門	2942	11	76	9	0	1	1	0	1	1
脊索動物門	9142	174	128	5	1	0	1	0	0	0
節足動物門	0	2177	1848	4	0	1593	3590	1765	13	26
線形動物門	0	62	0	0	0	0	625	840	0	0
繊毛虫門	0	1466	905	23	7	281	495	123	0	1
扁形動物門	0	30	78	10	1	20066	1557	3793	19572	13167
軟体動物門	67229	24450	26762	122439	109224	1870	11894	66524	66637	85094
放散虫門	0	0	0	0	0	17	3	0	0	0
緑藻植物門	0	3774	3215	146	92	451	420	114	1	4
門レベルで推定不可	0	1564	1271	100	35	2063	2697	1177	12	30

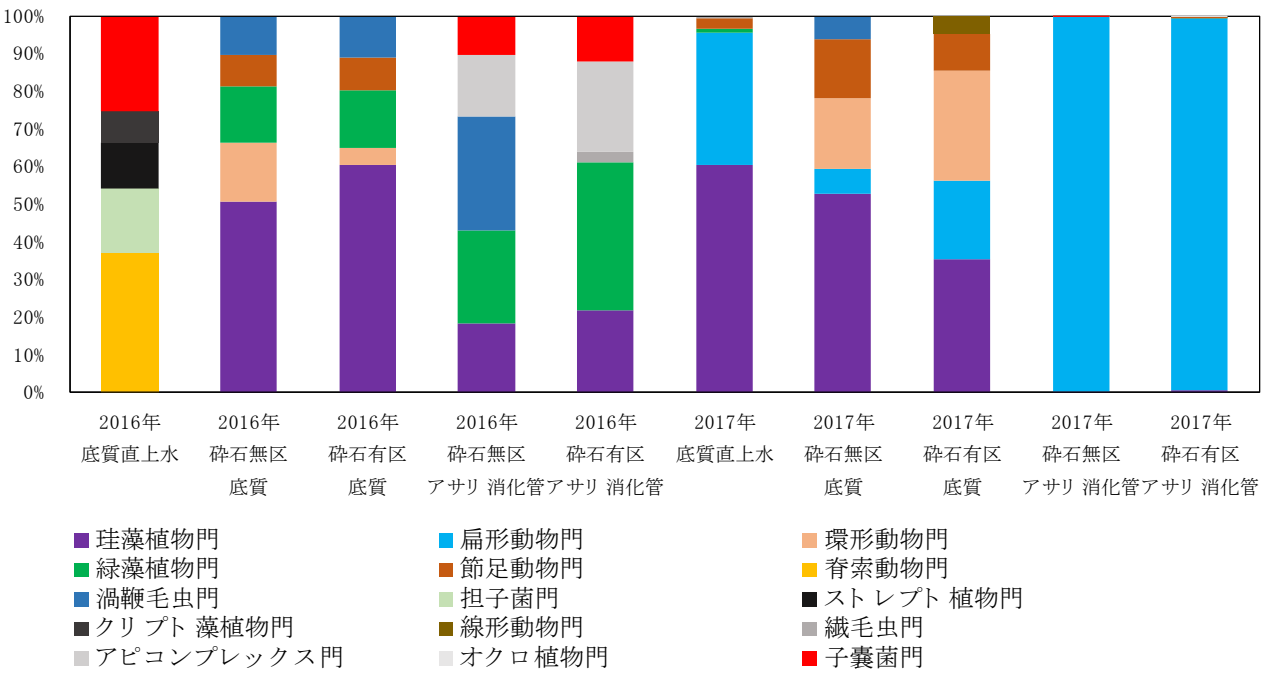


図-2 18Sr RNA の V9 領域より推定された底質直上水及び底質の生物相、アサリ消化管内容物の生物種構成比率
表-3 に記載されている各試料のリード数上位 5 門のみ示す。ただし、軟体動物門はほとんどがアサリ由来と考えられる二枚貝綱の DNA であったため図-2 では除外した。

いたためのブロッキングプライマーを用いた PCR 増幅が必要である。また、本研究では非常に限られたサンプル数であったため、サンプル数を増やして再現性を得るとともに、他の海域においても底質の生物相がアサリの餌料となっているのか、本研究のように扁形動物門が主な消化管内容物となっているのかについても追試を実施していく必要がある。

引用文献

- Amaral-Zettle, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W. and Huse, S. M. (2009) A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes, *PloS one* 4(7): e6372.
- 伊藤博(2002)アサリはどんな生き物か:アサリの生態, および漁業生産の推移, 日本ベントス学会誌 57: 134-138.
- 小池裕子・中島徹・中井信之(1989)安定同位体と消化管珪藻分析による干潟植物網の解析について, 日本ベントス研究開始 37:1-10.
- 小池裕子・斎藤徹・小杉正人・柿野純(1992)東京湾小櫃川河口干潟におけるアサリの食性と貝殻成長, 日本水産工学会誌 29(2):105-112.
- 黒倉寿・黒田信行・笠原正五郎(1988)芦田川河口域におけるアサリの生き残り条件に関する研究, 水産増殖 35(4):223-228.
- 松川康夫・張成年・片山知史・神尾光一郎(2008)我が国のアサリ漁獲量激減の要因について, 日本水産学会誌 74(2):137-143.
- 松隈明彦(2004)アサリ. 奥谷喬司(編), 改訂新版 世界文化生物大図鑑 貝類, 世界文化社, 東京, p.332.
- 西沢正・柿野純・田中喜三郎・田口浩一(1992)東京湾盤洲干潟におけるアサリの成長と減耗, 日本水産工学会誌 29(1):61-68.
- 沼口勝之(1985)アサリ漁場における底層水,セジメントおよび底泥のクロロフィル a とフェオ色素量, 養殖研究所研究報告 18:39-50.
- 多賀茂・和西昭仁・馬場俊典・松野進・桃山和夫(2005)山口県瀬戸内海沿岸干潟における放流アサリの成長と生存, 山口県水産研究センター研究報告 3:87-96.
- Tanabe, A. S. and Toju, H. (2013) Two new computational methods for universal DNA barcoding: A benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants, *PloS one* 8(10): e76910.
- Saitoh, S., Aoyama, H., Fujii, S., Sunagawa, H., Nagahama, H., Akutsu, M., Shinzato, N., Kaneko, N. and Nakamori, T. (2016) A quantitative protocol for DNA metabarcoding of springtails (Collembola), *Genome* 59: 705-723.
- 関口秀夫・石井亮(2003)有明海の環境異変:有明海のアサリ漁獲量激減の原因について, 海の研究 12(1):21-36.

Summary

Metabarcoding-based assessment of Japanese littleneck clam (*Ruditapes philippinarum*) food resources: the effects of crushed stones laying on biota of habitats and the composition of gastrointestinal tract contents

Taichi Fujii¹⁾, Motoyasu Minami¹⁾, Tomoyasu Sirako²⁾, Makiko Tanaka²⁾

1) Graduate school of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

2) IDEA Consultants, Inc.

The effects of crushed stones laying in habitats of Japanese littleneck clam (*Ruditapes philippinarum*) on biota of habitats and the composition of gastrointestinal tract contents were evaluated using metabarcoding methods in 2016 and 2017. The biota composition in the upper water of habitats was remarkably different in both years; the phylum Chordata and the phylum Bacillariophyta were mostly detected in 2016 and 2017, respectively. In both years, the phylum Bacillariophyta were most frequently detected from bottom sediment regardless of the crushed stones laying, but only a few were detected from the gastrointestinal tract contents. In 2016, the phylum Dinoflagellata was dominant in gastrointestinal tract contents at the habitats without crushed stones laying, but the phylum Chlorophyta in those contents with crushed stones laying. In 2017, most of the gastrointestinal tract contents were the phylum Platyhelminthes regardless of the crushed stones laying. In both years, most contents of the gastrointestinal tract were originated from the biota of the bottom sediment. The diet of the clam could be estimated at the phylum level, and the phylum Platyhelminthes were detected as food resources of the clam for the first time in our study. Consequently, the differences in the composition of the gastrointestinal tract contents of the clam were influenced by differences in sampling time rather than the crushed stones laying.

Keywords: Japanese littleneck clam (*Ruditapes philippinarum*), Next generation sequencer, food resources, metabarcoding