

リアルタイムPCR法で推定した北海道東部海域におけるアナメ、スジメ、アイヌワカメの遊走子放出時期（資料）

高谷義幸^{*1}, 合田浩朗²

¹北海道立総合研究機構中央水産試験場,

²北海道立総合研究機構釧路水産試験場

The release period of zoospores of three species of Laminariales *Agarum clathratum*, *Costaria costata* and *Alaria praelonga* off the coast of eastern Hokkaido by real-time PCR (Note)

YOSHIYUKI TAKAYA^{*1} and HIROO GODA²

¹ Central Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, Yoichi, Hokkaido 046-8555,

² Kushiro Fisheries Institute, Hokkaido Research Organization, Kushiro, Hokkaido 085-0027, Japan

キーワード：アイヌワカメ，アナメ，スジメ，遊走子

北海道東部のコンブ漁場では、雑海藻の繁茂によって漁場が狭小化するのを防ぐため、これらを駆除している。雑海藻駆除は、コンブの遊走子が着生できるように基質面を更新するのが目的であるため、有用なコンブ類が遊走子を放出する時期に合わせて行われると効果的である（桐原ら，2002）が、海況や現地の都合によって、必ずしも適切な時期に実施されてはいない。また、駆除の際に、雑海藻が胞子を放出していると、駆除によって更新された基質面にこれらが着生してしまい、駆除効果が低減する。コンブ漁場に生育する主要な雑海藻類の胞子放出時期を調べることで、より効果の高い駆除時期を選定することが可能である。しかし、当該海域における有用海藻類以外の生態については知見が少ない。いくつかの海藻類については、藻体表面に出現する子嚢斑の形成状況からおおよその成熟時期わかっている（名畑，1995）が、海中に胞子が実際に放出されているかを調べた事例はほとんどない。そこで、リアルタイムPCR法を用いて、北海道東部の3海域において、今回プライマーの設計ができたアナメ *Agarum clathratum*、スジメ *Costaria costata* およびアイヌワカメ *Alaria praelonga* の3種類について海水中の遊走子密度の季節変動を調べ、これらの放出時期を推定した。

材料と方法

採水と濾過 遊走子定量用の採水は北海道東部の根室管内根室市落石沖（以下、落石）、釧路管内浜中町嶮暮帰沖（以下、浜中）および十勝管内広尾町女子別沖（以下、広尾）の3海域で行った（図1）。落石では2017年6月～2017年10月にかけてSt.AとSt.Bの海面付近と水深3m、St.Cの海面付近と海底付近（水深2.5～3m）、浜中では、2015年8月～2016年11月にかけて海面付近（以下、表層）と海底付近（水深およそ3m、以下底層）、広尾では2015年8月～2017年9月にかけて海面付近からそれぞれ海水を採取した（表1）。濾過水量が30、40、50mLの場合は、採水後速やかにシリンジを用いて直径13mm、孔径0.8μmのセルロース混合エステルメンブレンフィルター（ADVANTEC社製）で試水を濾過し、冷蔵して実験室に持ち帰った。一方、濾過水量が200mLの場合は、試水を全量持ち帰り、そのうちの200mLを直径47mm、孔径0.8μmのポリカーボネートメンブレンフィルター（ADVANTEC社製）で濾過した。これらのフィルターは、分析まで-30℃で冷凍保存した。

DNA抽出 釧路水産試験場に保管されていたアナメ（2014年3月26日浜中町嶮暮帰で採集）およびアイヌワカメ（2016年2月2日釧路市桂恋で採集）の乾燥標本、また、2015年1月22日に小樽市忍路で採集したスジメから葉片

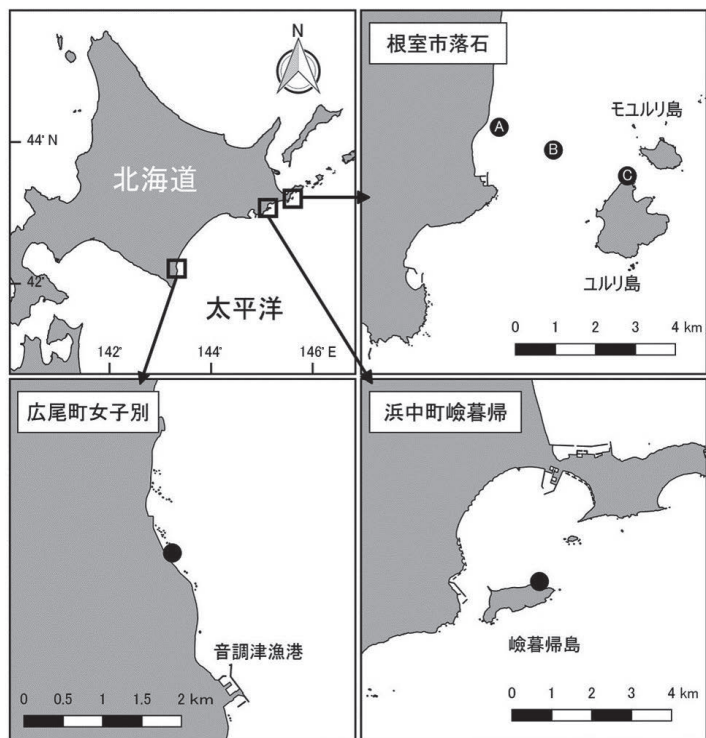


図1 調査地点

表1 採集状況

場 所	採 水 日	水 深	濾過水量(ml)
根室市落石 St.A,B,C	2017/6/14	0m, 3m	50
	2017/7/13	0m, 3m	50
	2017/8/17	0m, 3m	50
	2017/9/22	0m, 3m	50
	2017/10/16	0m, 3m	50
浜中町嶮暮帰	2015/8/6	0m, 3m	200
	2015/9/25	0m, 3m	200
	2015/11/6	0m, 3m	200
	2015/12/9	0m, 3m	200
	2016/2/1	0m, 3m	200
	2016/6/4	0m, 3m	200
	2016/7/27	0m, 3m	200
	2016/8/4	0m, 3m	200
	2016/9/13	0m, 3m	200
	2016/11/1	0m, 3m	200
広尾町女子別	2015/8/28	0m	200
	2015/9/24	0m	200
	2015/10/27	0m	200
	2016/1/7	0m	200
	2016/3/11	0m	200
	2016/4/25	0m	200
	2016/5/26	0m	200
	2016/6/23	0m	200
	2016/7/19	0m	200
	2016/9/16	0m	200
	2016/10/14	0m	200
	2016/10/31	0m	40
	2016/11/17	0m	40
	2016/12/1	0m	40
	2017/3/1	0m	40
2017/4/26	0m	30	
2017/5/24	0m	30	
2017/6/26	0m	50	
2017/7/24	0m	40	
2017/8/22	0m	50	
2017/9/21	0m	30	

アナメ用プライマー
 Forward primer (agarum-ITS2-1F) 5'-TTCCGGAGTCCCATGCT-3'
 Reverse primer (agarum-ITS2-1R) 5'-ACGGTTTCCAAAAGGTCTCG-3'

スジメ用プライマー
 Forward primer (costa-ITS2-F) 5'-CTCCGAGTGACACCTAATCTCG-3'
 Reverse primer (costa-ITS2-R) 5'-GAAAGTGGTACGGTTTCCATCA-3'

アイヌワカメ用プライマー
 Forward primer (ala-a2F) 5'-CGTTTGATACGGCGGTCTTGTA-3'
 Reverse Primer (ala-a2R) 5'-GCGCTTTGATTCGAGGGTTTA-3'

図2 リアルタイムPCRに用いたプライマー

を切り出し, GM quicker2 (ニッポン・ジーン社製) とアルギン酸分解酵素 (ニッポン・ジーン社製) を用い, 同社が作成したコンブ用のプロトコルに従ってDNAを抽出した (<http://www.nippongene.com/siyaku/product/extraction/alginate-lyase/hulk-alginate-lyase.html#example>, 2017年6月7日)。これらのDNA抽出液をリアルタイムPCRのスタンダードサンプルとして用いた。

試水を濾過したフィルターに付着した生物からのDNA抽出は, 既知の方法に従った (高谷ら, 2016)。これらのDNA抽出液をテンプレートとしアナメ, スジメおよびアイヌワカメに種特異的なリアルタイムPCR用プライマーセットを用い (図2), Thermal Cycler Dice Real Time System Lite (タカラバイオ社製) を用いてこれら3種のDNA量を定量した。なお, PCRの反応液はアイヌ

ワカメおよびスジメの場合とアナメの場合で異なっており、前者ではSYBR Premix DimerEraser（タカラバイオ社製）、後者ではGeneAce SYBR qPCR Mix α（ニッポン・ジーン社製）を用い、前述のプライマーのアニーリング温度と使用するポリメラーゼの特性を考慮して反応条

アナメの反応液の調整 GeneAce SYBR qPCR Mix α 12.5μL Forward primer (10μM) 0.5μL Reverse primer (10μM) 0.5μL 滅菌蒸留水 9.5μL Template 2.0μL		アイヌワカメ、スジメの反応液の調整 TB Green Premix DimerEraser 12.5μL Forward primer (10μM) 0.75μL Reverse primer (10μM) 0.75μL 滅菌蒸留水 9.0μL Template 2.0μL	
アナメのPCRプロトコル 95°C 10分 ↓ 95°C 30秒 ← ↓ 59°C 1分 ← ↓ 融解曲線分析 40cycle		アイヌワカメ、スジメのPCRプロトコル 95°C 30秒 ↓ 95°C 5秒 ← ↓ 60°C 30秒 ← ↓ 72°C 1分 ← ↓ 融解曲線分析 40cycle	

図3 反応液の組成とPCRプロトコル

件を設定した（図3）。

遊走子量の推定 スタンダード用のDNA抽出液とこれをEASY Dilution（タカラバイオ社製）で2倍、4倍、8倍に希釈して希釈系列を調整した。これらを用いて検量線を作成し、各試料に含まれるDNA量を相対定量し、海水中に存在する遊走子の多寡を推定した。図4から図6では、PCRで増幅の見られた試料のうち、種類別、地点別に最もCt値が小さかった試料のDNA量を100とし、これに対する相対値をそれぞれの試料中に含まれる遊走子数として示した。

また、スタンダードサンプルと増幅の見られた試料については、PCR後に融解曲線分析を行い、Tm値に差がないことを確認した。さらに、一部の試料については、キャピラリーシーケンサー ABI PRISM310ジェネティックアナライザー（Applied Biosystems 社製）を用いて、PCR産物の塩基配列を遺伝子データベース（アナメ FJ042762、スジメ AB087246、アイヌワカメ EF218905 または AF319004）と比較し、シークエンス結果が不明瞭

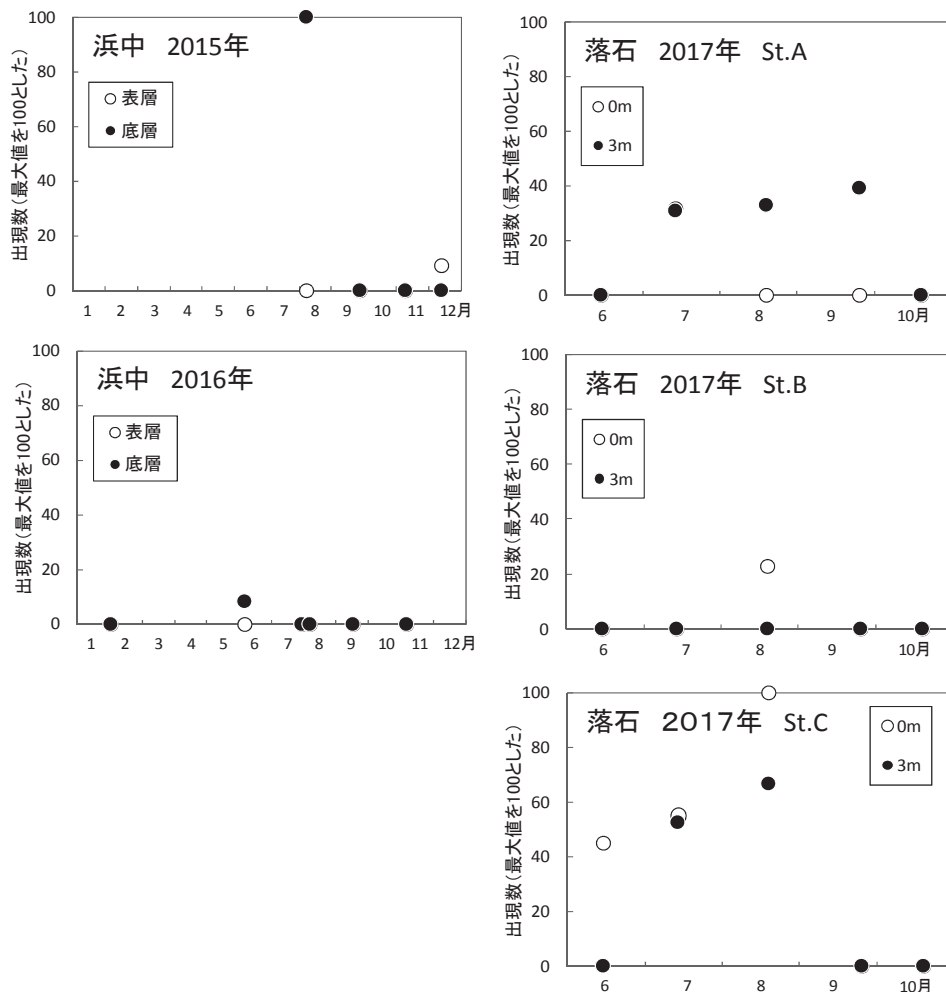


図4 浜中と落石におけるアナメの遊走子出現状況

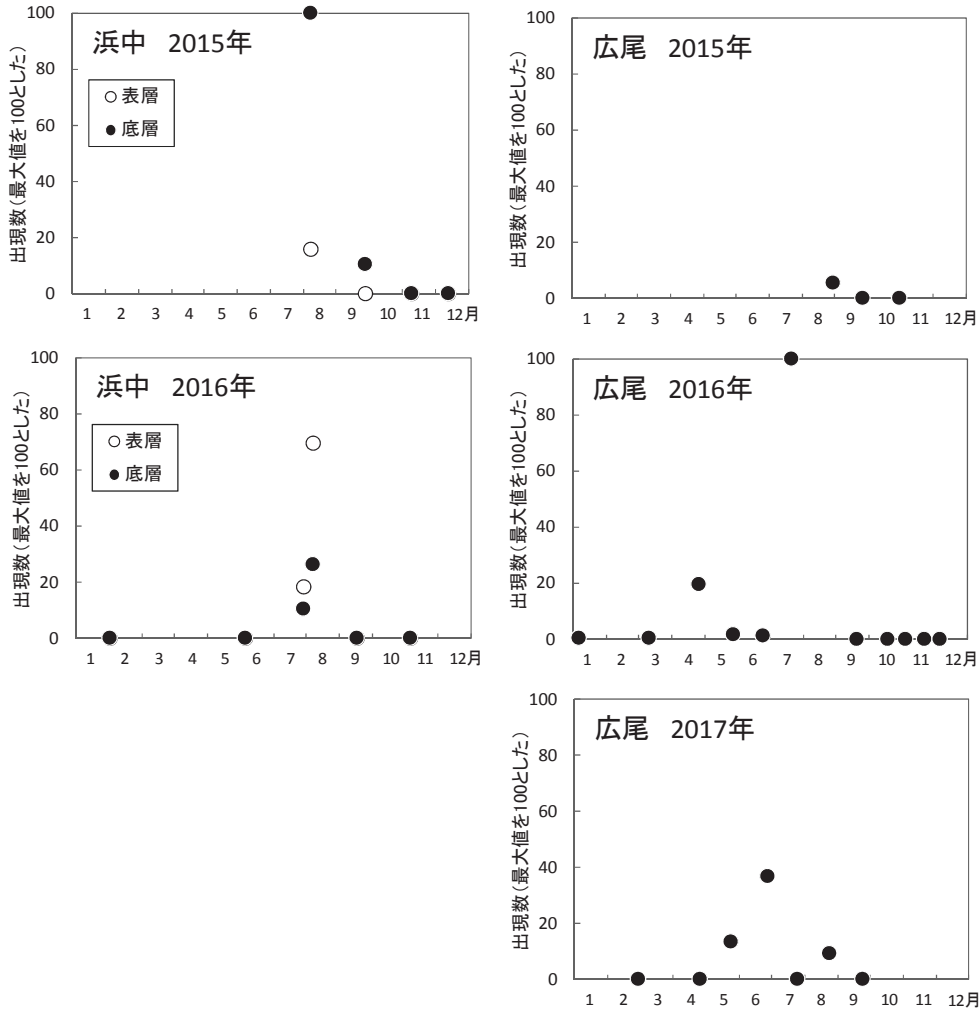


図5 浜中と広尾におけるスジメの遊走子出現状況

で判別できなかった部分を除いて両者が一致している事を確認した。

結果と考察

アナメ アナメの遊走子検出は、浜中と落石の標本について行った。浜中においては遊走子の出現が全体に少なかったが、2015年の調査では8月にピークが見られた(図4左)。2017年の落石の調査では、St.Aで7月から9月に、St.Cでは6月から8月に遊走子が出現した(図4右)。St.Aでは7月に0m層で検出された以外は3m層からの検出であった。St.Cでは6月には3m層で未検出だったが、7、8月は0m層、3m層とも検出された。最も遊走子数が多かったのは、St.Cにおける8月の0m層サンプルからであった。なお、St.Bでは8月の0m層でわずかに遊走子が出検されたのみであった。

アナメの成熟時期は北海道南部海域において夏季であるとされている(藤原ら, 1998)。今回、6月から9月に

遊走子が出検されたことから、北海道東部海域においても主に夏季に成熟し、遊走子が出放されていると考えられる。なお、2015年12月に浜中でわずかながら遊走子の出現が認められた。高橋ら(2000)は12月に、Nakahara and Yamada(1974)は、道内各地で11月~2月の冬期に成熟個体を採集して遊走子を出放させている。また、Kanda(1941)は、室蘭においてアナメの子嚢斑は晩冬から早春に形成されると報告している。これらのことから、本種の成熟盛期は夏季であるが、夏季以外にも成熟している個体が存在するものと推察される。本種については、標本採集と遊走子検出を組み合わせてさらに調査を進めていく必要がある。

スジメ スジメの遊走子検出は、浜中と広尾の標本について行った。浜中においては調査を行った2年間とも7月下旬から8月上旬にピークが見られた(図5左)。広尾においては、4月から遊走子の出現が見られ8月まで継続し、2016年と2017年のいずれも6月から7月末にピークが見られた(図5右)。

佐々木 (1978) は羅臼のスジメについて、子嚢斑形成状況と海底に設置したブロックへの胞子体着生状況から、遊走子放出時期が7月から9月であることを明らかにしている。今回の結果から、浜中では羅臼と同様の時期に遊走子を放出していると考えられた。また、広尾ではこれらより少し早い4月下旬から遊走子の放出が始まっていた。スジメの成熟は水温の影響を受け、暖海域である利尻島においては、羅臼よりも約1か月早く成熟する(名畑ら, 1984)。広尾でも水温の影響で羅臼や浜中よりも少し早くから成熟する個体があるものと推察される。スジメの遊走子放出時期は、その場に生育する藻体の子嚢斑の形成状況などと合わせて対象海域ごとに確認していく必要がある。

アイヌワカメ アイヌワカメの遊走子検出は、浜中の標本について行った。遊走子は、2015年は8月から12月まで見られ、出現のピークは9月下旬であった(図6上)。2016年は6月から8月に比較的多くの遊走子が検出され、6月上旬に出現のピークが見られたが、前年ピークとなった9月にはほとんど出現しなかった(図6下)。

名畑 (1993) は胞子葉と子嚢斑の形成状況から本種の遊走子放出時期は5月から10月と推定している。今回の結果でも6月から11月の間に多くの遊走子が検出されたことから、本種は春から秋までの比較的長期間にわたっ

て成熟していることが確認された。ただし、遊走子の放出ピークは年、場所などで異なる可能性が考えられ、今後も調査を継続していく必要がある。

まとめ

以上の通り、北海道東部海域においてコンブ目3種の遊走子放出時期を明らかにした。今後はこれらの遊走子放出盛期を避ける時期に雑海藻駆除を行うことで、駆除効果が高まると考えられる。リアルタイムPCR法で遊走子のDNAを検出する手法は、アナメのように生育場所の水深が深く、標本調査が難しい種類であっても、海水中の遊走子量をDNA量から直接推定できるメリットがある。今後、リアルタイムPCRの技術をさらに向上させ、今回報告した3種以外の雑海藻の胞子放出期を明らかにするとともに、遊走子の絶対数を定量することで、より効果的な雑海藻駆除の時期を提案できると考える。

謝辞

現場での採水、濾過にご協力をいただいた、根室地区、釧路地区、十勝地区の水産技術普及指導所ならびに落石漁業協同組合、浜中漁業協同組合、広尾漁業協同組合の関係諸氏に深謝します。また、本稿の作成にあたり、丁寧な査読と貴重なご意見をいただいた匿名の査読者の方々に謝意を表します。

引用文献

- 藤原孝行, 花田利香子, 高橋和寛, 鳥居茂樹, 山本弘敏, 安井 肇. 北海道尾札部海域における褐藻アナメの生育. 平成10年度日本水産学会秋季大会 講演要旨集 1998 ; 457 : 71.
- Kanda T. On the Gametophytes of Some Japanese Species of Laminariales IV. Scientific papers of the Institute of Algological Research, Faculty of Science, Hokkaido Imperial University 1941 ; 2(2) : 293-308.
- 桐原慎二, 藤川義一, 吉田雅範, 能登谷正浩. 大間地先の海藻除去後の植相. 2002年度日本水産学会大会講演要旨集 2002 : 234.
- 名畑進一. コンブ漁場の雑海藻 一, アイヌワカメ. 釧路水試だより 1993 ; 69 : 11-13.
- 名畑進一. 北海道東部沿岸のコンブ類. 日水誌 1995 ; 61(1) : 101-102.
- 名畑進一, 松田 洋. 利尻島におけるスジメの成長と成熟. 北水試月報 1984 ; 41 : 183-191.

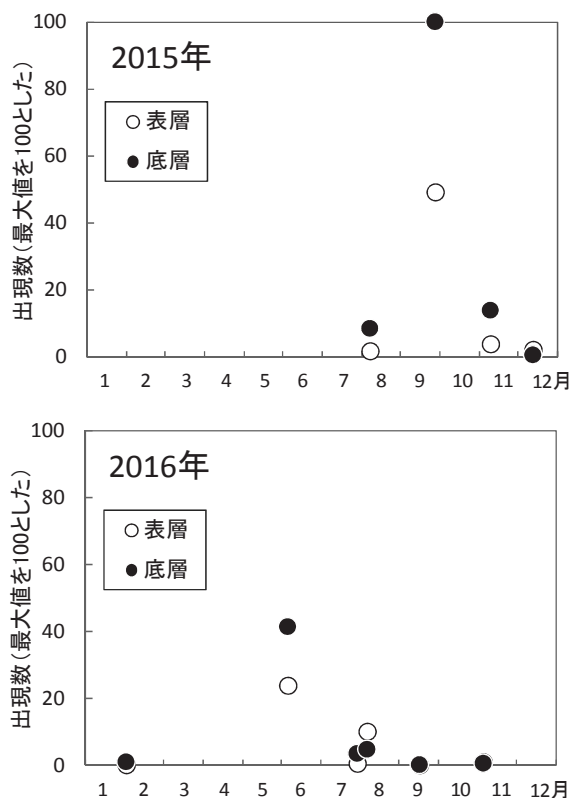


図6 浜中におけるアイヌワカメの遊走子出現状況

Nakahara H, Yamada I. Crossong experiments between four local forms of *Agarum cribrosum* Bory (Phaeophyta) from Hokkaido, northern Japan. *Jorn. Fac. Sci., Hokkaido Univ. Ser. V (Botany)* 1974; 10(1) : 49-54.

佐々木茂. 羅臼産スジメの生活様式. *北水試月報* 1978; 35 : 1-10.

高橋和寛, 西田芳則, 鳥居茂樹, 宮本建樹, 金子 孝, 秋野秀樹, 草刈宗晴. 第 I 章 津軽海峡北海道沿岸

のコンブ藻場 (北海道) 4. 室内実験 (マコンブ, ガゴメ, アナメの配偶体の成熟と幼胞子体の成長に及ぼす光量の影響). 水産業関係特定研究開発促進事業藻場の変動要因の解明に関する研究 総括報告書 平成7~11年度. 2000; 北海道・30-北海道・34.

高谷義幸, 秋野秀樹, 四ツ倉典滋. リアルタイムPCRを用いたホソメコンブ遊走子の定量法 (技術報告). *北水試研報* 2016; 90 : 13-16.