

## 4

DNAバーコーディング法を用いた  
植食性魚類胃内容物中藻類断片の  
種同定の検討

矢澤 拓海

## 1. はじめに

近年、磯焼けの発生、継続要因として植食動物の食害が大きな要因であるとされている（水産庁 2021）。それに伴い、アイゴ *Siganus fuscescens* やブダイ *Calotomus japonicus*、タカノハダイ *Goniistius zonatus* のような植食性魚類の採餌行動が藻場造成の成否を左右する大きな制限要因となり、海藻養殖にも影響を及ぼすことが理解されるようになってきた（野田ら、2011）。海藻のアラメ属 *Eisenia* sp. やカジメ属 *Ecklonia* sp. で構成される造成藻場の主な消失原因が植生魚類の食害であったことを明らかにした報告は多く、特に食害魚種としてアイゴの食圧の強さを指摘する報告は多い（野田ら、2011）。

海産植食性動物が摂餌した胃内容物を解明する方法として、胃内容物中の藻体断片の形態分析（野田ら、2011）やDNAバーコーディング法（飯島ら、2019）が知られている。当社では外部、内部形態の観察による海藻類の分析を実施しているが、胃内容物のような断片化した藻体では、同定が困難となることがある。このような場合、DNAバーコーディング法が有効であれば、同定精度が向上する可能性がある。

本稿では、植食性魚類の胃内容物中の藻体断片を対象に、DNAバーコーディング法を用いて種まで同定することを試みた。

## 2. 調査方法

## 2.1 調査日および地点

試料は、神奈川県小田原市江之浦で2024年7月に漁業者により刺し網で採捕されたブダイ16個体（BL: 272 mm～382 mm）、アイゴ3個体（BL: 275 mm～278 mm）、タカノハダイ1個体（BL: 284 mm）を使用した（図1, 2）。試料は採捕後、冷凍にて保管され、胃内容物の採取時に全長、体長、湿重量を測定し、個体ごとに胃を取り出した後、再度冷凍した。

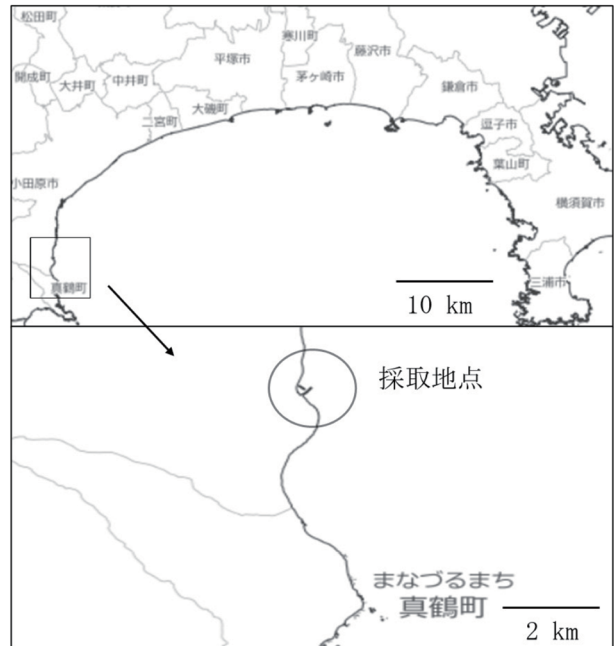


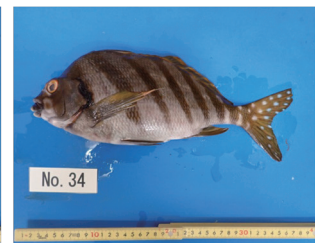
図1 採取地点（国土地理院地図より引用）



ブダイ



アイゴ



タカノハダイ

図2 試料写真

## 2.2 ソーティングおよびPCR

胃内容物のソーティングは、個体ごとに胃を流水で解凍し、色調と形態的特徴からより多くのタイプを網羅できるように藻体断片を選び出した。選び出した藻体断片 96 検体は可能な範囲で形態による同定を行った。胃内容物中の藻体断片は、断片が極小である、劣化しているなどの理由から種までの同定が難しい場合は上位分類群までの同定とした。藻体断片の表面に付着している汚れや付着藻類が認められた場合には、可能な限り解剖バサミ等を用いて除去した。

植食性魚類の胃内容物中の藻体断片を同定するにあたり、遺伝子の対象領域は褐藻類、紅藻類でDNAメタバーコーディングの実績があり（村澤, 2017）、NCBI (National Center for Biotechnology Information) に登録されている生物種が多い *rbcL* 領域を選択した。

藻体断片からのDNA抽出については、最初に 5 mm 程度の断片（湿重量 100 mg 以下）を切り取り、1.5 mL マイクロチューブに入れ、ペッスルを用いてホモジナイズした。藻体断片が微小な場合は全量を使用した。その後は DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) のプロトコルに従い、DNA抽出を行った。

プライマーはDNAメタバーコーディング向けに開発され、褐藻類および紅藻類のどちらも分析可能な *rbcL*-F118\_tak (ACNTGCACNGTWTGDTGGAC) および *rbcL*-R876new (CATCCAYTTACARATWACACKR) を用いた（村澤, 2017）。緑藻類については本プライマーの標的ではないが、検出が可能であるか確認するため、分析からは除外しなかった。

反応酵素には KOD FX Neo (TOYOBO) を用い、PCR 反応組成液は、2 × Buffer for KOD FX Neo 5.0 μL、2 mM dNTPs 2.0 μL、10 μM に調整したプライマー各 0.2 μL、KOD FX Neo 0.2 μL、テンプレート DNA 1.0 μL、DW 1.4 μL の総量 10.0 μL を調整した。PCR 条件は、94°C で 2 分の初期熱変性後、94°C で 15 秒の熱変性 → 45°C で 30 秒のアニーリング → 68°C で 30 秒の伸長反応のサイクルを 38 回繰り返し、これを PCR 産物とした。電気泳動による PCR 産物の増幅の確認を行った後、シーケンスを行い、塩基配列を決定した。

決定した塩基配列は NCBI が運営する BLAST 検索を利用し、相同性検索を実施した。

## 3. 結果

DNA バーコーディング解析の結果を表 1 に、解析に供した藻体断片の一部を図 3 にそれぞれ示した。

DNA バーコーディング解析に供した 96 検体のうち、塩基配列を取得できたのは 43 検体 (44.8%) であった。そのうち 29 検体 (30.2%) では種までの同定が可能であった。

塩基配列が取得できたのは、褐藻類で 11/19 検体 (57.9%)、紅藻類で 32/75 (42.7%) 検体であった。紅藻類の中では、外部形態でピリヒバ *Corallina pilulifera*、カニノテ属 *Amphiroa* sp.、モサズキ属 *Jania* sp. などと同定した石灰藻類は 10/18 検体 (55.6%) で塩基配列が取得できた。一方で、藻体断片が微小であったイグス属 *Campylaephora* sp. など石灰藻類以外の紅藻類は 22/57 検体 (38.6%) しか塩基配列の取得ができなかった。緑藻類は、解析に供した 2 検体どちらも塩基配列の取得ができなかった。

外部形態による同定結果と遺伝子解析による同定結果が一致した検体は 8 検体であった。それに対し、遺伝子解析の結果が外部形態による同定結果より下位の階級になった検体は 31 検体あり、外部形態ではアミジグサ科 Dictyotaceae としていたものが遺伝子解析ではサナダグサ *Dictyota coriacea* に、ムカデノリ科 Grateloupiaceae としていたものがヒトツマツ *Grateloupia chiangii*、キントキ *Grateloupia angusta*、ヒラムカデ *Grateloupia livida* のように種まで同定できたものがあった。一方、枝状で有節の外部形態（図 4）からピリヒバ *C. pilulifera*、ヘリトリカニノテ属 *Marginisporum* sp. とした 4 検体が遺伝子解析による結果ではいずれも *Corallina berteroi* に同定された。Calderon *et al.* (2021) に基づき、平面に広がり無節石灰藻類に酷似する外部形態で国内ではピリヒバと区別されてきたサビモドキ *Corallina melobesioides* (*Yamadaea melobesioides*) の和名が *C. berteroi* にあてられ、外部形態と遺伝子解析の結果が一致しなかった。

## 4. 考察

今回、塩基配列を取得できなかった検体が半分以上であっ

た。これはDNA抽出時の藻体断片の破碎不足、ソーティング時に試料となる海藻に微小な藻類が付着していたことによるPCR反応の阻害などが考えられる。刺し網で採捕した個体の消化管内容物は時間の経過により消化排泄が進み、内容物が少ない状態であることが多いとしている(野田ら, 2011)。また、刺し網によって採捕された個体は胃や腸の内容物があっても、大半が消化の進んだ状態であったためであると考えられる。そのため、藻体の劣化が進み塩基配列の取得が難しかったと考えられ、魚類胃内容物中の海藻を用いて塩基配列をより正確に取得するためには、採捕した直後に胃内容物の採取や処理を行う必要があると考えられる。

解析に用いた試料のうち、紅藻綱の有節石灰藻は塩基配列の取得が容易であった。湿重量の95%が炭酸カルシウムで構成されており、とても固い(加藤, 2017)。そのため、藻体を破碎しやすく、DNA抽出が成功しやすかった。藻体が柔らかく、破碎しにくい分類群に対しては、DNA抽出の際に液体窒素などを用い、藻体を破碎することで今後検出率を増加させることができると考えられる。

今回、形態に基づく分析では胃内容物中の海藻は微小な藻片であったため上位分類群までの同定にとどまったが、DNA解析によって、より詳細な同定をすることができた。DNAバーコーディング法を用いた微細な海藻断片の同定は外部形態による同定に比べ、知識や経験を必要としない手法である。加えて胃内容物のように藻体が断片化されており、同定形質が確認できないような場合でも有効な手法であることが示唆された。

塩基配列を取得することができなかった検体は緑藻類、紅藻類、褐藻類のそれぞれで存在した。今回対象とした*rbcL*領域は葉緑体の遺伝子であり、葉緑体遺伝子の変異が比較的大きいとされている緑藻類(井上, 2005)は検出することができなかった。DNAバーコーディングによる微細な海藻断片の同定は形態に基づく同定に比べ、知識や経験を必要としない手法である一方で、塩基配列のデータベースへの登録が無い種については同定が不可能である。遺伝子を用いた海藻の研究はほかの分類群に比べると未だ少なく、登録されている塩基配列情報が多いとされている*rbcL*遺伝子でもDNAデータベースが不足している。今後海藻類を対象としたDNA解析を行うためにも、分類群ごとに適した手

法を検討しながら、得られた塩基配列をデータベースに登録する必要がある。そのうえで、目的に応じて外部形態による同定と今回用いたDNAバーコーディング法を組み合わせることで、更に精度の高い同定が可能になると考えられる。

## 謝辞

最後に、試料提供、情報提供をいただき、調査にご協力いただいた小田原藻場再生活動組織代表の野瀬晃治氏に心から感謝申し上げます。

## 引用文献

- Calderon, M. S., Bustamante, D. E., Gabrielson, P. W., Martone, P. T., Hind, K. R., Schipper, S.R. and Mansilla, A. 2021. Type Specimen Sequencing, Multilocus Analyses, and Species Delimitation Methods Recognize the Cosmopolitan *Corallina berteroi* and Establish the Northern Japanese *C. yendoi* sp. Nov. (Corallinaceae, Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 57: 1659-1672.
- 飯島純一・高瀬智洋. 2019. DNAバーコーディングを用いた伊豆諸島におけるサザエ消化管内容物中の微細海藻片の同定. 水産技術 = *Journal of fisheries technology*, 11 (2) : 49-55.
- 井上 勲. 2005. 真核光合成生物の系統と進化-真核生物における植物化のプロセス-. *Biological Sciences in Space*, 19: 276-283.
- 加藤亜記. 2017. 石灰藻サンゴモ類の多様性-生きた石になる海藻の分類と生態-. *月間海洋号外*, 60: 125-132.
- 村澤博基. 2017. メタゲノム解析による磯焼け域の潜在的植生検出. 東京海洋大学, 修士論文.
- 野田幹雄・大原啓史・浦川賢二・村瀬 昇・山元憲一. 2011. 響灘藍井島のガラモ場に出現したアイゴ成魚の餌利用-大型褐藻類の採餌との関連-. *日本水産学会誌*, 1008-1019.
- 水産庁 (2021) 「第3版 磯焼け対策ガイドライン」 [https://www.jfa.maff.go.jp/j/gyoko\\_gyozyo/g\\_gideline/index.html](https://www.jfa.maff.go.jp/j/gyoko_gyozyo/g_gideline/index.html), 2025年1月7日確認

表 1 DNAバーコーディング解析の結果

No.	魚体No.	魚種	形態同定による結果	遺伝子解析による結果				
				候補種	学名	和名	塩基配列の一致率 (%)	Accession No.
1	cj-2	ブダイ	褐藻類					
2	cj-3	ブダイ	紅藻類	候補種1	<i>Grateloupia chiangii</i>	ヒトツマツ	98.34	MW690931.1
3	cj-7	ブダイ	ガラガラ属					
4	cj-8	ブダイ	紅藻類					
5	cj-10	ブダイ	スギノリ属	候補種1	<i>Chondracanthus tenellus</i>	スギノリ	100	KR909587.1
6			テングサ科	候補種1	<i>Gelidium johnstonii</i>	ツヤクサ	99.85	MG887896.1
7	cj-11	ブダイ	褐藻類					
8			紅藻類					
9	cj-12	ブダイ	ムカデノリ科	候補種1	<i>Grateloupia angusta</i>	キントキ	100	KF475727.1
10			ピリヒバ	候補種1	<i>Corallina berteroi</i>	サビモドキ	100	MZ262654.1
11			ヘリトリカニノテ属	候補種1	<i>Corallina aberrans</i>	フサカニノテ	100	OQ632297.1
				候補種2	<i>Corallina crassissima</i>	ヘリトリカニノテ	99.42	OQ632284.1
12			モサズキ属	候補種1	<i>Jania verrucosa</i>	モサズキ属の一種	90.47	MK125393.1
13			カニノテ属	候補種1	<i>Amphiroa</i> sp.	カニノテ属	90.97	MT005407.1
				候補種2	<i>Amphiroa</i> cf. <i>beauvoisii</i> 2	ウスカワカニノテ	90.81	MG838457.1
14			カニノテ属	候補種1	<i>Amphiroa</i> sp.	カニノテ属	89.48	MG838456.1
	候補種2	<i>Amphiroa vanbosseae</i>		カニノテ属の一種	89.48	MG784069.1		
15			テングサ科					
16			カイノリ					
17			マサゴシバリ科					
18			アミジグサ科	候補種1	<i>Dictyota coriacea</i>	サナダグサ	100	LC764921.1
19	cj-14	ブダイ	褐藻類					
20			ソゾ属					
21			ハイウスバノリ属					
22			ハイウスバノリ属	候補種1	<i>Acrosorium polyneurum</i>	スジウスバノリ	99.69	AF254153.1
23			フシツナギ					
24			シオミドロ					
25			ヒメコザネ					
26			イギス属					
27			イトグサ属					
28	cj-16	ブダイ	ピリヒバ	候補種1	<i>Corallina berteroi</i>	サビモドキ	100	MZ262654.1
29			カニノテ属	候補種1	<i>Amphiroa</i> sp.	カニノテ属	93.67	KM369163.1
				候補種2	<i>Amphiroa</i> cf. <i>fragilissima</i> 3	ホソエダカニノテ	90.51	MG784082.1
30			モサズキ属	候補種1	<i>Jania rubens</i>	モサズキ属	95.15	KM044024.1
				候補種2	<i>Jania verrucosa</i>	モサズキ属	92.12	MK125393.1
31			カイノリ	候補種1	<i>Chondracanthus intermedius</i>	カイノリ	100	KU640261.1
32	褐藻類	候補種1	<i>Chondracanthus intermedius</i>	カイノリ	99.84	KU640261.1		
33			褐藻類					
34			ツノマタ属					
35			テングサ科	候補種1	<i>Gelidium prostratum</i>	テングサ属の一種	98.76	JQ340415.1
				候補種2	<i>Gelidium eucorneum</i>	テングサ属の一種	98.76	HM629815.1
36			ムカデノリ科	候補種1	<i>Grateloupia jejuensis</i>	ムカデノリ属の一種	99.85	KJ648563.1
37			緑藻類					
38			ヘリトリカニノテ属	候補種1	<i>Corallina berteroi</i>	サビモドキ	100	MZ262654.1
39	cj-17	ブダイ	ワツナギソウ					
40			ムカデノリ科	候補種1	<i>Grateloupia livida</i>	ヒラムカデ	100	KY486746.1
41			褐藻類	候補種1	<i>Dictyopteris prolifera</i>	ヘラヤハズ	100	AY422678.1
42	cj-18	ブダイ	紅藻類					
43			ピリヒバ	候補種1	<i>Corallina berteroi</i>	サビモドキ	100	MZ262654.1
44			カニノテ属					
45			ヒメコザネ					
46	cj-19	ブダイ	アミジグサ科	候補種1	<i>Dictyota coriacea</i>	サナダグサ	100	LC764921.1
47			テングサ属	候補種1	<i>Gelidium japonicum</i>	オニクサ	98.96	HM629830.1
48			ムカデノリ科	候補種1	<i>Grateloupia angusta</i>	キントキ	100	KF475727.1
49			緑藻類					
50			スギノリ属	候補種1	<i>Chondracanthus okamurae</i>	スギノリ属の一種	100	KR909573.1

\*遺伝子解析の結果で和名がない種は属の一種として扱った。

\*表中の灰色行は塩基配列が取得できなかったことを示す。

表 1 DNAバーコーディング解析の結果 (続き)

No.	魚体No.	魚種	形態同定による結果	遺伝子解析による結果				
				候補種	学名	和名	塩基配列の一致率 (%)	Accession No.
51			紅藻類	候補種1	<i>Jania rubens</i>	モサズキ属の一種	95.13	KM044024.1
				候補種2	<i>Jania verrucosa</i>	モサズキ属の一種	92.3	MK125393.1
52	cj-19	ブダイ	紅藻類					
53			紅藻類					
54			紅藻類					
55	cj-20	ブダイ	ソゾ属					
56			紅藻類					
57			紅藻類					
58	cj-22	ブダイ	ムカデノリ科	候補種1	<i>Grateloupia jejuensis</i>	ムカデノリ属の一種	99.85	KJ648563.1
59			ハイウスバノリ属	候補種1	<i>Acrosorium polyneurum</i>	スジウスバノリ	100	AF254153.1
60			褐藻類	候補種1	<i>Sargassum hemiphyllum</i>	イソモク	98.95	KY935454.1
61			褐藻類					
62	cj-23	ブダイ	紅藻類					
63			紅藻類					
64	cj-24	ブダイ	紅藻類					
65			紅藻類					
66			紅藻類					
67			ヘリトリカニノテ属					
68			ピリヒバ					
69			カニノテ属					
70			褐藻類	候補種1	<i>Dictyota coriacea</i>	サナダグサ	99.69	LC764921.1
71	sf-26	アイゴ	アミジグサ科					
72			テングサ属					
73			ムカデノリ科	候補種1	<i>Grateloupia jejuensis</i>	ムカデノリ属の一種	100	KJ648563.1
74			ムカデノリ科	候補種1	<i>Grateloupia chiangii</i>	ヒトツマツ	100	MW690931.1
75			紅藻類					
76			スギノリ属	候補種1	<i>Chondracanthus tenellus</i>	スギノリ	100	KR909587.1
77			カイノリ					
78			ムカデノリ科	候補種1	<i>Grateloupia jejuensis</i>	ムカデノリ属の一種	100	KJ648563.1
79			紅藻類	候補種1	<i>Grateloupia jejuensis</i>	ムカデノリ属の一種	100	KJ648563.1
80			褐藻類	候補種1	<i>Dictyota coriacea</i>	サナダグサ	100	LC764921.1
81			ヘラヤハズ					
82			褐藻類	候補種1	<i>Dictyopteris prolifera</i>	ヘラヤハズ	99.84	AY422678.1
83	sf-27	アイゴ	テングサ科					
84			ピリヒバ					
85			紅藻類					
86			紅藻類	候補種1	<i>Chondracanthus okamurae</i>	スギノリ属の一種	98.97	KR909573.1
87			紅藻類					
88			紅藻類					
89			ピリヒバ					
90			ヘリトリカニノテ属					
91			モサズキ属					
92	sf-28	アイゴ	褐藻類	候補種1	<i>Dictyota coriacea</i>	サナダグサ	100	LC764921.1
93			褐藻類	候補種1	<i>Dictyota coriacea</i>	サナダグサ	100	LC764921.1
94			褐藻類	候補種1	<i>Dictyota coriacea</i>	サナダグサ	100	LC764921.1
95			ヘラヤハズ	候補種1	<i>Dictyopteris prolifera</i>	ヘラヤハズ	99.71	AB899283.1
96	gz-34	タカノハダイ	ハイウスバノリ属					

\*遺伝子解析の結果で和名がない種は属の一種として扱った。

\*表中の灰色行は塩基配列が取得できなかったことを示す。

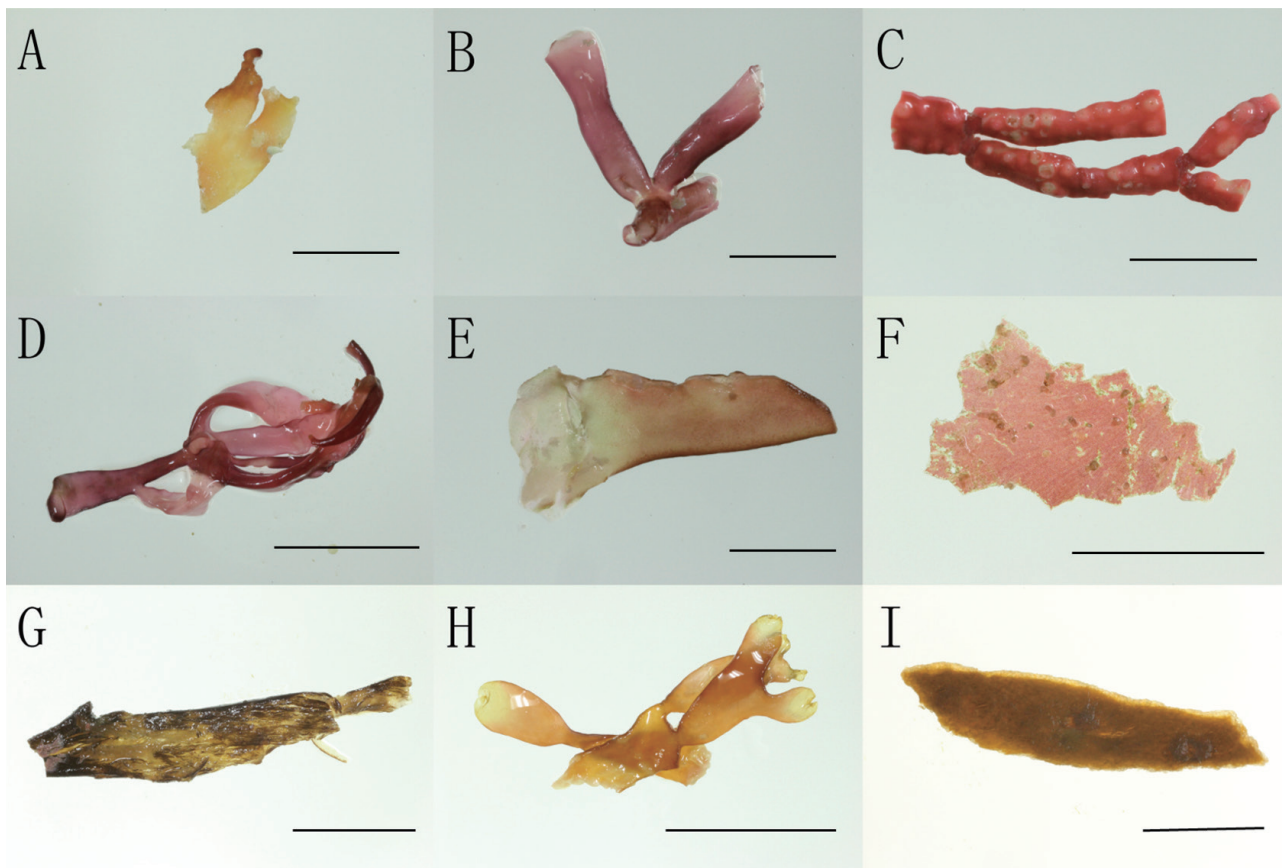


図3 解析に供した藻体断片の一部

A: No.2ヒトツマツ, B: No.5スギノリ, C: No.29カニノテ属, D: No.31カイノリ, E: No.40ヒラムカデ, F: No.59スジウスバノリ, G: No.60イソモク, H: No.74ヒトツマツ, I: No.82ヘラヤハズ; No.は試料No.を、スケールバーは5 mmを示す

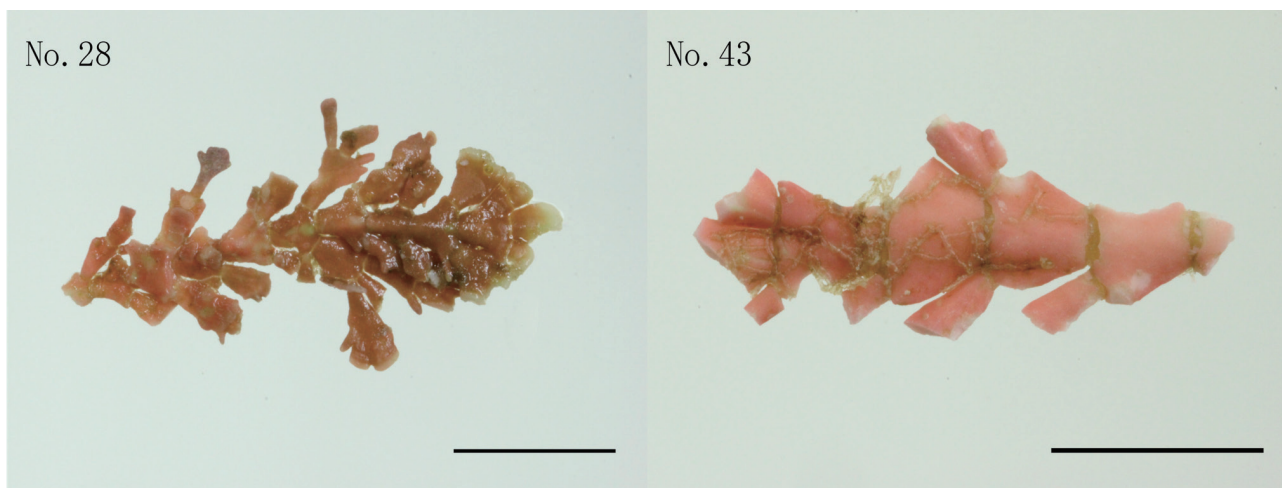


図4 外部形態でペリヒバと同定した藻体断片

図中のNo.は試料No.を、スケールバーは5 mmを示す