

令和4年度 修士学位論文

# 天然海域における着底期以降のアサリの食性

三重大学大学院 生物資源学研究科

水圏資源生物学教育研究分野

尾崎 真奈

## 目次

第1章 緒言.....	1
第2章 DNA-MBに基づくアサリの食性解析手法の確立.....	6
第3章 DNA-MBに基づくアサリの食性解析.....	17
第4章 総合考察.....	31
引用文献.....	34
要約.....	40
謝辞.....	41
図表.....	42

## 第1章 緒言

日本のアサリ資源量は1980年代以降急激に減少し、現在に至るまで長期的に低迷している。アサリ資源量の急減は、干潟の埋め立てによる生息地の減少と、その後の過剰な漁獲による資源崩壊が主な原因となって引き起こされたと考えられている。その一方で、種苗の移植・放流や漁業規制、覆砂や耕耘による海底環境の改善といった様々な方策が試みられているにもかかわらず、アサリ資源量が全く回復に転じない原因については未解明な部分が多く残されている。現在のところ、過剰な漁獲に加え、捕食者による食害、疾病や寄生生物の蔓延などといった漁場ごとに異なる複数の要因が複雑に絡み合っており、資源が回復できない状況が慢性的に持続していると考えられている（鳥羽 2017）。これらのアサリの資源に悪影響をおよぼす種々の要因の中で、近年、特に問題視されているのが、下水処理の高度化に起因する沿岸域の貧栄養化と、それに伴う微細藻類の減少と組成の変化である。

栄養塩の減少に伴う微細藻類の減少は、瀬戸内海周防灘（岩男 2001）、播磨灘（板倉・山口 2007）、伊勢・三河湾（国分 2019）といった複数の内湾域で認められており、このうち播磨灘においては、優占する珪藻の属組成が変化してきたことも報告されている。これらの変化と各海域におけるアサリ資源量の減少は同期していたことから、植物プランクトンの総量の減少ならびに、アサリの餌料として適した種の減少が、アサリ資源量の減少の一因になっていた可能性が指摘されている（浜口 2011, 鶴島ら 2019, 曾根ら 2019, Uchida et al. 2023）。この状況を打開するために、下水処理施設における栄養塩処理水準を緩和して沿岸域への栄養塩供給量を増加させる試みが、全国的に実施されている（後藤ら 2015, 西嶋 2018, 永尾・中村 2018）。本施策は、アサリをはじめとする水産重要種の生産量を回復させる有効な手段となり得る一方で、「アサリの餌料として不適な微細藻類」の増加といった、意図しない負の効果をもたらす可能性も懸念される。今後、本施策を継続あるいは他海域で展開していくにあたっては、本施策がアサリの餌料環境に及ぼす影響を科学的に検

証することが不可欠であるが、現在のところ、天然海域におけるアサリの具体的な食性に関する理解も十分に進んでおらず、餌料環境を正確に評価する手法も確立されていない。従来、二枚貝の餌料環境を評価するための普遍的な方法として、微細藻類の総量の指標であるクロロフィル *a* 濃度が用いられてきた。ところが、天然海域には多種多様な微細藻類が混在しており、その中には二枚貝の餌料として適さない種も多く含まれている可能性がある。

一般的に、濾過食者である二枚貝は餌料粒子を丸ごとそのまま摂食するため、口や食道径より大きな粒子を摂食できない (Raby et al. 1994)。しかし、沿岸域では、長さ 100  $\mu\text{m}$  を超える大型の珪藻や、巨大な群体を形成する珪藻が圧倒的な優占種となることがある。これらの大型の珪藻は、殻長数 mm 以上の稚貝や成貝にとっては摂食可能な餌料となるものの (清水 2020 年度修士学位論文)、殻長 1 mm に満たない初期稚貝や浮遊幼生にとっては大きすぎて餌料とならない (伯耆 2021)。また、二枚貝は胃内部の「桿晶体」というゼラチン質の構造を回転させ (林 2006)、丸飲みした珪藻のシリカの殻をすり潰して細胞内容物を消化吸収する。アサリ成貝は、物理強度 (破壊時の応力) が 300  $\mu\text{N}$  を超える堅い珪藻を消化管で効率的に破壊できる一方、消化機構が未発達な浮遊幼生や初期稚貝は、物理強度 100  $\mu\text{N}$  を超える堅い珪藻をほとんど破壊できないため、これらを栄養源として利用できない可能性が指摘されている (Houki et al. 2018)。このように、初期発育段階のアサリは、殻長数 mm 以上の稚貝や成貝に比べて、餌料として利用可能な微細藻類が限定的であることが示唆されている。

天然海域において、アサリの食性を明らかにしようとした試みは比較的多い。例えば、光学顕微鏡に基づく消化管内容物観察では、アサリ成貝の消化管において、多様な底生珪藻が優占して検出されたことが報告されている (伊藤ら 2005, Kasim & Mukai 2006; 2009, 小池ら 1989, 小池 1992)。また、炭素窒素安定同位体比分析に基づく研究では、底生珪藻を主体とする底生微細藻類のほか、懸濁態有機物、デトリタスなどがアサリの栄養源と推定さ

れている（小池 1992, Watanabe et al. 2009, Kanaya et al 2005, Komorita et al. 2014）。ところが、これらの先行研究で対象とされてきたのは、解剖や分析が可能な殻長 5 mm 以上の比較的大型の個体のみであり、体サイズの小さい着底初期稚貝や小型の稚貝の食性に関する知見はごく僅かである。さらに、稚貝や成貝を対象とした上述の先行研究では、その手法の特性上、具体的な餌料となっていた微細藻類を網羅的かつ詳細に特定することはできない。例えば、光学顕微鏡では、消化管内で破壊されにくい比較的堅い殻を持つ珪藻や渦鞭毛藻などを観察することはできても、消化管において破壊・消化が進んだ微細藻類を観察・同定することは難しい。一方、安定同位体比分析では、実際に消化・同化された餌料源の推定が可能であるが、餌料源候補は、懸濁態有機物、堆積態有機物といった事前に解析者が想定した大まかなカテゴリに限られるため、実際に餌料となっている具体的な生物種の特定まではできない。

近年、環境中や動物の消化管内の餌料生物を網羅的に検出する方法として、DNA メタバーコーディング (DNA-MB) が用いられるようになってきた。本手法は、対象生物群に共通する DNA 領域をユニバーサルプライマーにより増幅した後、次世代シーケンシングで配列を解読し、データベース上の既知の生物種の配列と照合することによって生物相を解析する手法である。DNA-MB に基づく海産無脊椎動物の消化管内容物解析においては、ミトコンドリア COI 領域、rRNA18S 領域といった真核生物のユニバーサルプライマーが多く用いられている (Maloy et al. 2013, Novotny et al. 2021, Vignier et al. 2021, Tran et al, 2022)。ただし、真核生物のユニバーサルプライマーを用いた解析では、餌料生物だけでなく捕食者である対象動物（本研究においてはアサリ）の配列も増幅されてしまうため、PCR 産物中における摂食された餌生物のリード数は極めて少なくなり、検出力や定量性が著しく低下することが知られている（藤井ら 2018）。そのため、多くの先行研究では、対象動物の DNA に特異的に結合するブロックングプライマーを設計するとともに、PCR の際に PNA (Peptide Nucleic Acid) や LNA (Locked Nucleic Acid) を用いることで、それらの配列の増

幅を阻害するといった工夫がなされている (Vestheim & Jarman 2008, Nakamura et al. 2020, 鳥居ら 2022)。しかし、全ての動物種についてブロッキングプライマーを設計できるわけではなく、ブロッキングを実施した場合においても、対象動物の DNA 配列の増幅を十分に阻害できなかった例も報告されている (Nakamura et al. 2020)。一方、植食者を対象とする DNA-MB に基づく食性解析では、葉緑体ゲノム上に設計されたユニバーサルプライマーを用いることで、対象動物の DNA を増幅することなく、餌料植物の DNA のみを増幅することが可能である。これまでに葉緑体プライマーを用いた DNA-MB に基づく食性解析については、陸上哺乳類を対象とした研究例がいくつか報告されているが (Soininen et al. 2013, Goldberg et al. 2020, 安藤ら 2020a)、海洋無脊椎動物を対象とした例は極めて少なく、アサリをはじめとする二枚貝については一切報告がない。しかし、微細藻類や珪藻の網羅的解析を目的とした葉緑体ユニバーサルプライマー自体は既に設計されており (Ardura et al. 2020, Alindonosi et al. 2021, Sureshkumar et al. 2022)、データベースも徐々に充実してきていることから (Bruder & Medlin 2007, Rimet et al. 2019, Khaw et al. 2020, Sureshkumar et al. 2022)、これらを実験にアサリの食性解析に応用すること自体は可能と考えられる。以上の背景から、本研究では、着底期以降の天然海域のアサリの食性を解明することを目的として、珪藻を主体とする微細藻類を対象とした DNA-MB を試みた。本研究で着目した珪藻は、沿岸域の微細藻類の主要な構成分類群であり、アサリを含む多くの懸濁物食性の動物プランクトンやベントスの重要な餌料と位置付けられている。加えて、珪藻は、細胞の大きさや形状、細胞殻の強度などの物理学的特性や、生活型 (浮遊・底生) や群体性の有無といった生態学的特性が大きく異なる様々な属・種から成る極めて多様な分類群であるため、アサリが餌料として利用可能な珪藻を把握することは、本種の摂食、消化能力や摂餌様式などを包括的に理解することに繋がると考えられる。これらのことから、アサリの食性解析を珪藻に注目して実施することの学術的意義は非常に大きいといえる。

本研究では、まず、第 2 章において、葉緑体ゲノム上に設計された 2 種類のユニバーサ

ルプライマーを用いて、DNA-MB に基づくアサリの食性解析手法を確立した。また、DNA-MB で得られた解析結果を、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた解析結果と比較することで、確立した手法の妥当性・有効性を検証した。第 3 章においては、第 2 章において確立された DNA-MB に基づいて、物理化学的環境の異なる複数の海域で採集された着底初期稚貝から成貝に至る各発達段階のアサリに対して食性解析を実施することで、各海域における本種の餌料を解明した。それと同時に、消化管内容物と餌料環境 (環境水・環境砂泥) の珪藻組成を比較することで、成長に伴う食性や摂餌生態の変化について考察した。第 4 章においては、第 2 章、第 3 章の結果を受け、本種の摂餌生態と食性、その成長に伴う変化について、先行研究の知見も含めて包括的に考察するとともに、本種の餌料環境研究における本研究の寄与と課題について議論した。

## 第2章 DNA-MBに基づくアサリの食性解析手法の確立

### 材料と方法

#### アサリ・環境水・環境砂泥試料の採集と処理

三重県津市志登茂川河口の潮間帯 (Fig. 2-1: A) において、2020年6月9日の干潮時に、干出した砂泥の表面約1 cmをスクレーパーで掬い取って採取した。採取した砂泥を目開き45  $\mu\text{m}$ のメッシュネットに入れ、水道水を通して脱塩した後、300 mLの広口T型瓶に収容し、99%エタノールを加えて即座に固定した。また、砂泥採集地点に隣接する潮下帯の水深10 cmの地点において1 Lのポリエチレン製ボトルに環境水を直接採取した。砂泥試料および環境水試料をクーラーボックスに収容し、研究室に持ち帰った。実体顕微鏡下で、砂泥試料中から二枚貝をソーティングし、その中から、アサリの着底初期稚貝および稚貝を形態的特徴に基づいて同定した上で、画像解析ソフト (WinRoof 2015, 三谷商事) を用いて殻長を計測した。なお、本研究では殻長1 mm未満の個体を着底初期稚貝、殻長1~5 mmの個体を稚貝、殻長7 mm以上の個体を成貝として扱った。

採取した環境水のうち500 mLについては、アスピレーターで吸引濾過し、懸濁物を直径47mmのガラス繊維フィルター (GF/F, Whatman) 上に捕集した後、DNA抽出まで-20  $^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。残りの環境水500 mLについては、懸濁物を直径47mmのメンブレンフィルター (MILLIPORE) 上に捕集したのち、蒸留水を数回に分けて通して十分に脱塩した後、60  $^{\circ}\text{C}$ の定温乾燥機内で12時間以上乾燥させてSEM観察まで常温で保存した。

エタノール中の砂泥試料を攪拌し、その懸濁液を1.5 mLチューブに移したのち、6000 $\times g$ で5分間遠心して上澄み液を除去した。残った沈殿を環境砂泥上の微細藻類試料としてDNA抽出まで-20  $^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。なお、環境砂泥については微細藻類のSEM観察は実

施しなかった。

## DNA 抽出

着底初期稚貝および殻長 4 mm 未満の稚貝については、解剖によって消化管内容物を抽出することが困難であったため、体全体から DNA を抽出した。その際、貝殻表面に付着した微細藻類等のコンタミネーションを防ぐため、Novotny et al. (2021) の方法を一部改変し、5%に希釈した次亜塩素酸ナトリウム漂白剤（キッチンハイター、花王）に 10~20 秒間浸漬した後、蒸留水で十分に洗浄した。QIAamp Micro DNA Kit (QIAGEN) を用いて、標準的なマニュアルを一部改変した以下の方法で DNA を抽出した。着底初期稚貝あるいは稚貝を 1 個体ずつ 1.5 mL チューブに入れ、Buffer ATL 100  $\mu$ L および Proteinase K 10  $\mu$ L を添加し、ボルテックスで 15 秒間攪拌した後、50  $^{\circ}$ C に設定したインキュベーターで 2 時間以上静置し、軟体部組織を完全に溶解させた。1.5 mL チューブを卓上遠心機で数秒間遠心した後に、キット付属のキャリア RNA 溶液を 5  $\mu$ L 添加した。1.5 mL チューブに Buffer AL 100  $\mu$ L を添加してボルテックスで数秒間攪拌した後に 100%エタノール 100  $\mu$ L を加えてボルテックスで数秒間攪拌し、室温で 3 分間静置した。卓上遠心機で数秒間遠心した後に、1.5 mL チューブ内の液体をスピнкаラムに全て移し、6000 $\times$ g で 1 分間遠心した。スピнкаラムを新しい 2 mL コレクションチューブにセットし、Buffer AW1 を 300  $\mu$ L 添加した後に、6000 $\times$ g で 1 分間遠心した。スピнкаラムを新しい 2 mL コレクションチューブにセットして Buffer AW2 を 300  $\mu$ L 添加した後に、10000 $\times$ g で 1 分間遠心した。スピнкаラムを 1.5 mL の低吸着チューブ（Eppendorf）にセットした後、スピнкаラムのメンブレンフィルター中央に Buffer AE 20  $\mu$ L を添加し、常温で 30 分~1 時間静置した。その後、10000 $\times$ g で 1 分間遠心して DNA を溶出した。抽出した DNA 試料を 5  $^{\circ}$ C の冷蔵庫内で PCR まで保存した。

環境水試料および環境砂泥試料からの DNA 抽出には DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いた。環境水中の微細藻類試料については、懸濁物を捕集した GF/F フィルターの 4 分

の1をハサミで切り出して2 mL チューブに入れ、Buffer ATL 180  $\mu$ L と Protenase K 20  $\mu$ L を添加した上で、50  $^{\circ}$ Cのインキュベーターで2~3時間反応させた。その後、2 mL チューブを6000 $\times$ gで1分間遠心し、上澄み液を全て1.5 mL チューブに移した。環境砂泥試料については、試料の入った1.5 mL チューブに Buffer ATL 180  $\mu$ L と Protenase K 20  $\mu$ L を添加した上で、50  $^{\circ}$ Cに設定したインキュベーターで2時間以上反応させた。その後は、環境水試料、環境砂泥試料ともに以下の共通の方法で処理を行った。Buffer AL 200  $\mu$ L を添加してボルテックスで数秒間攪拌した後に100%エタノール200  $\mu$ L を加えて再度ボルテックスで数秒間攪拌した。卓上遠心機で軽く遠心をかけた後に、スピнкаラムにチューブ内の液体を全て移し、6000 $\times$ gで1分間遠心した。スピнкаラムを新しい2 mL コレクションチューブにセットし、Buffer AW1 を500  $\mu$ L 添加した後に、6000 $\times$ g (8000 rpm) で1分間遠心した。スピнкаラムを新しい2 mL コレクションチューブにセットし、Buffer AW2 を500  $\mu$ L 添加した後に、14000  $\times$  g で1分間遠心した。スピнкаラムを新しい1.5 mL チューブにセットし、Buffer AE 200  $\mu$ L を添加した後に、常温で10分程度静置した。その後、10000 $\times$ gで遠心することでDNAを抽出した。抽出したDNA試料を5  $^{\circ}$ Cの冷蔵庫内でPCRまで保存した。

### PCRによる目的遺伝子の増幅と次世代シーケンシング

本章では、アサリの食性解析のための葉緑体ユニバーサルプライマーとして、2つの異なる領域のプライマーを比較検討した。ひとつは、単細胞光合成生物のユニバーサルプライマーとして生物技研(株)によって設計された光化学系II反応中心のD1タンパクをコードするpsbA領域プライマー、もうひとつは淡水産珪藻のDNA-MB用に設計された、RubisCOのサブユニットであるrbcL領域プライマー(Bruder & Medlin 2007, Vasselon et al. 2017, Rimet et al. 2019, Maitland et al. 2020)である。それぞれのプライマー配列、およびアダプター配列は以下のとおりである。

### **psbA プライマー (286 bp)**

Forward : psbA\_597f (TNCAYTTCTAYCCNVHTHTGGGA)

Reverse : psbA\_927r (RNCATGTGGAATGGGTGCAT)

### **rbcL プライマー (312 bp)**

Forward : 以下の 3 プライマーを等量混合

Diat\_rbcL\_708F\_1 (AGGTGAAGTAAAAGGTTTCWACTTAAA)

Diat\_rbcL\_708F\_2 (AGGTGAAGTTAAAGGTTTCWTAYTTAAA)

Diat\_rbcL\_708F\_3 (AGGTGAAACTAAAGGTTTCWACTTAAA)

Reverse : 以下の 2 プライマーを等量混合

Diat\_rbcL\_R3\_1 (CCTTCTAATTTACCWACTG)

Diat\_rbcL\_R3\_2 (CCTTCTAATTTACCWACAACAG)

### **アダプター配列 (各プライマーの 5' 末端に付与)**

Forward (5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT -3')

Reverse (5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT -3')

サーマルサイクラー用チューブに 20  $\mu$ L の PCR 反応液 (ミリ Q 水 10.2  $\mu$ L, PCR Buffer 2.0  $\mu$ L, 10mM dNTP 1.6  $\mu$ L, Forward プライマー 1.0  $\mu$ L, Reverse プライマー 1.0  $\mu$ L, Ex-Taq 0.2  $\mu$ L, DNA 抽出液 4.0  $\mu$ L) を作成し、あらかじめ 90  $^{\circ}$ C 以上に設定したサーマルサイクラーにセットして 1st PCR を行った。psbA プライマーを用いた PCR においては、98  $^{\circ}$ C で 30 秒間、50  $^{\circ}$ C で 30 秒、68  $^{\circ}$ C で 90 秒を 1 サイクルとし、これを 35 サイクル繰り返した。rbcL プライマーを用いた PCR においては、Maitland et al. (2020) に従い、98  $^{\circ}$ C で 30 秒、52  $^{\circ}$ C もしくは 55  $^{\circ}$ C で 30 秒、68  $^{\circ}$ C で 90 秒を 1 サイクルとし、これを 35 サイクル繰り返した。1st

PCR産物を1%アガロースゲル中で電気泳動した後、トランスイルミネーター上で対象領域の増幅の有無を確認した。増幅が確認された1st PCR産物を以下の解析に供試した。

2nd PCR およびシーケンシングについては、生物技研（株）において以下の方法で実施した。PCR産物15 $\mu$ Lに10.5 $\mu$ LのAMPure XP（BECKMAN COULTER）を添加してPCR産物を精製した後に、Synergy H1（Bio Tek）とQuantiFluor dsDNA System（Promega）を用いて溶液の濃度測定を行った。その後、1試料あたり計10 $\mu$ LのPCR反応液（ミリQ水5.1 $\mu$ L, PCR Buffer 1.0 $\mu$ L, 10mM dNTP 0.8 $\mu$ L, フォワードプライマー 0.5 $\mu$ L, リバースプライマー 0.5 $\mu$ L, Ex-Taq 0.1 $\mu$ L, 精製PCR産物 2.0 $\mu$ L）を作成して2nd PCRを行い、ライブラリーを作製した。その後、Synergy H1とQuantiFluor dsDNA Systemを用いて、ライブラリーの濃度測定を行い、Fragment AnalyzerとdsDNA 915 Reagent Kit（Advanced Analytical Technologies）を用いて品質確認を行った上で、MiSeqシステム上でMiSeq Reagent Kit v3（Illumina）を用いて配列決定を行った。決定された配列については、GenBank上に登録されているDNA配列をデータベースとしてBLUSTによる相同性検索を行った。その結果に基づき、相同率95%以上を目安に属レベルで同定を行った後に、微細藻類の属ごとに集計して組成を算出した。

#### 走査型電子顕微鏡観察に基づく微細藻類組成

アサリ着底初期稚貝および稚貝をブアン氏液（ピクリン酸, ホルマリン, 酢酸を15 : 5 : 1の比率で混合）に1~2時間浸漬し、貝殻を脱灰するとともに軟体部組織を固定したのち、定法に従い、エタノールによる脱水、レモゾールによる透徹を経て、試料をパラフィンに包埋した。ミクロトーム（RX-860, YAMATO）を用いて作成した厚さ10 $\mu$ mの連続切片をスライドガラス（APS-01 WHITE, 松浪硝子工業株式会社）上に伸展し、試料の切片が載っている部分をガラスカッターで切り出した。スライド小片をレモゾールに浸漬してパラフィンを除去し、100%エタノールを介してt-ブチルアルコールに浸漬した。t-ブチルアルコ

ール中のスライド小片を-20 °C の冷凍庫で凍結させたのち、冷却水循環装置 (LTC-450 $\alpha$ , AS ONE) を接続した真空凍結乾燥機 (VFD-03, AS ONE) 内で真空凍結乾燥を施した。凍結乾燥を終えたスライド小片を導電テープと銅箔テープを用いて SEM 用試料台 (Type-GM, 日新 EM 株式会社) に貼り付けた。環境水試料については、懸濁物を捕集したメンブレンフィルターの一部をハサミで切り出し、導電テープで SEM 用試料台 (Type-GM, 日新 EM 株式会社) に貼り付けた。イオンスパッター (E-1010 HITACHI) を用いて試料表面に金を蒸着して観察試料とした。

着底初期稚貝・稚貝については、加速電圧を 8 または 10 kV に印加した走査型電子顕微鏡 (S-4000, HITACHI) を用いて、4000 倍または 8000 倍で観察し、消化管断面を撮影した。アサリ 1 個体につき最大で 20 枚の消化管内容物の画像を取得した。環境水試料については、加速電圧を 8 または 10 kV に印加した走査型電子顕微鏡 (S-4000, HITACHI) を用いて 1000 倍で観察し、観察試料一つあたり 20 枚の画像を取得した。PC に表示した SEM 画像上に一辺が 1  $\mu\text{m}$  に相当する格子を重ねて表示し、格子の交点 (以下、プロットとする) と重なった微細藻類を属レベルまで同定した。その後、微細藻類と重なったプロットをそれぞれ属ごとに計数・集計することで消化管内容物に占める微細藻類各属の割合を投影面積として定量的に算出した。なお消化管内壁などのアサリの体組織や、メンブレンフィルター、粘液等と重なったプロットについては計算から除外した。

## 結果

### 各手法において検出された微細藻類

psbA および rbcL プライマーを用いた DNA-MB（以下、psbA および rbcL とする）と SEM 観察によって、各対象試料から検出された微細藻類（一部、微細藻類以外の配列も含む）の高次分類群および属を Table 2-1~4 に示す。psbA では、珪藻 48 属、珪藻を除く不等毛藻 6 属、渦鞭毛藻 5 属、クリプト藻 4 属、ハプト藻 1 属、緑藻 19 属、繊毛虫 1 属、藍藻 5 属 およびウイルス（ファージ）が検出された。rbcL では珪藻 63 属、珪藻を除く不等毛藻 4 属、渦鞭毛藻 1 属、緑藻 1 属、有殻アメーバ 1 属が検出された。また SEM 観察では、上記 2 手法と比較して検出された微細藻類の属数は顕著に少なく、珪藻 22 属、珪藻以外の不等毛藻 1 属に留まっていた。

3つの手法間において共通して検出された属とそうでない属の数を Fig. 2-2 に示す。珪藻については、psbA と rbcL で共通して検出された属は 27 属、psbA のみで検出された属は 21 属、rbcL のみで検出された属は 36 属であった。また、SEM 観察で検出された珪藻属の多くは、psbA あるいは rbcL でも検出されていたが、SEM のみで検出された珪藻も 4 属あった。珪藻以外の微細藻類に関しては、psbA において 42 属と最も多く検出されており、そのうち 40 属が psbA のみで検出された属であった。一方、rbcL のみ、あるいは SEM 観察のみで検出された珪藻以外の微細藻類は、それぞれ 5 属、1 属のみであった。

### psbA 領域を用いた解析に基づく微細藻類組成

psbA により各試料において検出された微細藻類の属組成の積み上げ棒グラフを Fig. 2-3 に示す。環境水においては、珪藻が 43%、渦鞭毛藻が 24%、緑藻が 17%、クリプト藻が 7% を占めていた。そのうち珪藻では *Skeletonema* spp.、*Cyclotella* spp.、*Rhizosolenia* spp.、*Chaetoceros* spp. が優占していた。環境砂泥においては、珪藻が 80%、渦鞭毛藻が 13%、緑

藻が 5%を占めていた。珪藻については *Cocconeis* spp.、*Odontella* spp.、*Navicula* spp.、*Seminavis* spp.、*Nitzschia* spp.等が優占していた。殻長 0.28 mm のアサリ着底初期稚貝からは、珪藻が 83%、次いで渦鞭毛藻が 10%、藍藻が 1%、ウイルスが 6%を占めていた。珪藻では特に *Navicula* spp.が優占していたほか、*Placoneis* spp.、*Haslea* spp.が主に検出された。一方、殻長 0.87 mm のアサリ着底初期稚貝においては、70%をウイルス（ファージ）が、18%を藍藻が占めており、真核微細藻類の占める割合は 10%程度と極めて少なかった。

### rbcL 領域を用いた解析に基づく微細藻類組成

rbcLにより各試料において検出された微細藻類の属組成の積み上げ棒グラフを Fig. 2-4 に示す。環境水においては、珪藻が約 83%、珪藻以外の不等毛藻が 15%を占めていた。珪藻では *Dactyliosolen* spp.が最も優占していたほか、*Cyclotella* spp.、*Thalassiosira* spp.、*Chaetoceros* spp.等が高い割合で検出された。環境砂泥においては、珪藻が 99.9%を占めており、*Nitzschia* spp.、*Planothidium* spp.、*Amphora* spp.等が特に優占していた。アサリ着底初期稚貝 2 個体においては、検出されたリードは全て珪藻であり、殻長 0.28 mm の個体では、*Seminavis* spp.、*Haslea* spp.、*Navicula* spp.が、殻長 0.87 mm の個体では、*Fallacia* spp.、*Amphora* spp.、*Diploneis* spp.が優占していた。

### SEM 観察に基づく微細藻類（珪藻）組成

SEM 観察により検出された微細藻類の属組成の積み上げ棒グラフを Fig. 2-5 に示す。環境水では *Amphora* spp.、*Anorthoneis* spp.、*Cocconeis* spp.といった底生珪藻が優占していた。また、着底初期稚貝や稚貝の消化管内において、上記の 3 属に加え *Licmophora* spp.等が優占していた。しかし、その中には細胞殻が破壊されていない状態で観察されたものも認められた (Fig. 2-5)。

## 考察

本章において試みた、*psbA*、*rbcL* 領域に基づく DNA-MB、SEM 観察のいずれの食性解析手法においても、珪藻を主体とする微細藻類の属同定および組成の算出は可能であった。しかし、検出可能な微細藻類の分類群や、算出された微細藻類の組成は 3 つの手法間で大きく異なっていた。

*psbA* 領域に基づく DNA-MB においては、8 高次分類群 90 属の微細藻類等が検出され、3 つの手法の中で最も幅広く多様な分類群を検出できることが示された。また、環境水や環境砂泥中だけでなく、着底初期稚貝の消化管からも、珪藻、渦鞭毛藻、緑藻、藍藻など多様な分類群の微細藻類が検出され、アサリ着底初期稚貝が天然海域でこれらを摂食していることが初めて明らかになった。これらの結果から、幅広い分類群の微細藻類を網羅的に解析する場合において、本プライマーを用いた DNA-MB は有用と考えられる。その一方で、本章で解析試料とした殻長 0.87 mm のアサリ着底初期稚貝の消化管内容物においては、シアノファージ（ウイルス）が 70%を、その宿主と考えられる藍藻が 20%を占めており、真核微細藻類は 10%に留まっていた。同様に、シアノファージや藍藻の配列が消化管内において優占する現象は、同プライマーを用いてアコヤガイの食性解析を実施した疋田（2021 年度卒業論文）においても確認されている。ウイルス自体が二枚貝の餌の主体になるとは考えにくく、その宿主である藍藻についても、真核微細藻類に比べると生物量は非常に小さいと推察される。さらにアサリにおいて、藍藻の同化効率は、珪藻や緑藻といった真核微細藻類と比べて非常に低いことも実験的に確かめられている（Sorokin & Giovanardi 1995）。これらの事から、藍藻が多い環境下において本プライマーを使用した DNA-MB を実施した場合には、本来の餌料と想定される真核微細藻類のリード数が著しく少なくなり、それらの定量性にも問題が生じる可能性があることが明らかとなった。

*rbcL* 領域に基づく DNA-MB においては、5 高次分類群 70 属の微細藻類が検出され、その

大部分は珪藻であった。また、珪藻に限定すれば、*rbcL* では、*psbA* よりも多くの属が検出された。本プライマーは淡水産珪藻を対象とした DNA-MB を目的に設計されたプライマーであるが (Vasselon et al. 2017, Apothéloz-Perret-Gentil et al. 2020, Barry-Martinet et al. 2021)、本研究において、汽水産、海産珪藻も幅広く増幅できることが示された。加えて、珪藻だけではなくラフィド藻や黄金色藻やペラゴ藻といった、珪藻と比較的系統の近い不等毛植物門に属する微細藻類も検出されたが、その属数や各属のリード数は概して少なかった。これらの事から、珪藻に着目した場合、多様な属を網羅的かつ安定的に検出するという点において本プライマーは有用と考えられた。

DNA-MB に基づく種同定の正確性は、対象配列のプライマー領域の保存性や種間の変異率、参照するデータベースの充実度に依存する (安藤ら 2020b)。本研究で用いた 2 種類のプライマー間において解析結果が大きく異なったのは、両プライマーが対象とする生物分類群が異なっているためである。*psbA* は藍藻類を含む幅広い微細藻類を、*rbcL* は珪藻を対象に設計されたプライマーであるため、後者で珪藻以外の微細藻類の検出がほとんど見られなかったのは当然である。しかしながら、いずれのプライマーでも検出可能な珪藻についても、共通して検出された属がある一方で、いずれか一方でしか検出されなかった属も多かった。このような解析結果の差異は、各領域におけるデータベースの充実度に起因すると推察される。本章で使用した 2 種のプライマーのうち、より多様な珪藻属が検出された *rbcL* については、データベース上の珪藻の配列がより充実しており、同定の正確性も高いと推察される。以上のことから、第 3 章においては *rbcL* を用いてアサリの食性解析を実施することにした。

SEM 観察については、環境砂泥中の微細藻類で実施していない一方で、アサリ着底初期稚貝の解析数が DNA-MB に比べて多い。そのため、これらの結果を単純に比較することはできないが、SEM 観察によって検出された微細藻類の属は 2 高次分類群 23 属と、3 つの手法の中で最も少なかった。この主な要因は、SEM では、珪酸質などの比較的硬質な細胞殻

を有する微細藻類しか観察できず、細胞殻の強度が脆弱、または殻を持たない微細藻類属を観察・同定できなかつたことであると考えられる。加えて、アサリ着底初期稚貝の消化管内容物観察においては、微細藻類の細胞殻が破壊されて断片化したり、粘液に覆われたりすることで、属の同定が困難な場合が多かつた。それゆえ、観察できた微細藻類の中にも、誤同定、あるいは同定できなかつたものが多かつた可能性も考えられる。その一方で、SEM 観察では、DNA-MB では検出されなかつた珪藻 2 属 (*Anorthoneis* spp.および *Licmophora* spp.) が環境水、アサリ消化管中いずれにおいても優占していた。DNA-MB において、充実したデータベースを用いることは、同定の信頼性を高める上で極めて重要であるが (Bohmann et al. 2018)、現在のところ、海産底生珪藻については分類学的に十分に整理されておらず、GenBank 上に登録されている配列情報も充実しているとはいえない (Zimmermann et al. 2014)。今回のように DNA-MB と SEM 観察を併用することで、データベース上に登録されていない微細藻類についても検出できる可能性が示された。また、着底初期稚貝の消化管内容物の SEM 観察の結果、細胞殻がほとんど、あるいは全く破壊されていない珪藻も頻繁に観察された。これらは、摂食されたとしても未消化のまま排泄されるため、栄養源として寄与しない可能性が考えられる (伯耆 2015)。したがって、アサリの天然海域における餌料 (摂食・消化可能な微細藻類) を解明するためには、DNA-MB による解析と同時に、消化の可否、すなわち、細胞殻の破壊の可否を判定できる SEM 観察を併用することが望ましいと考えられる。

## 第3章 DNA-MBに基づくアサリの食性解析

### 材料と方法

#### 調査海域および調査地点

本研究では、2020年6月から2022年7月にかけて、以下の3海域の調査地点において調査を実施した。各調査地点の特徴は以下の通りである。

#### 三重県志登茂川河口 (Fig. 2-1: A)

調査地点の特徴は第2章に記述した通りである。本章では、2020年6月9日、2022年7月18日に採集した試料を用いた。

#### 京都府阿蘇海 (Fig. 2-1: B)

京都府北部に位置する宮津湾の一部が天橋立（砂州）により隔絶された潟湖である。流入する河川水の影響で3m以浅の塩分濃度は外海の宮津湾の2/3程度となる。例年、アサリが天然発生し、それらの稚貝は養殖用種苗として販売されている（山田ら 2020）。年間を通して干満の差が小さく、アサリの生息場所も潮下帯のみに限られる。調査地点は最大干潮時の水深が約50cmの潮下帯であり、底質は砂泥質である。本章では2020年11月12日、2021年3月22日、11月16日、2022年3月2日に採集した試料を用いた。

#### 愛知県三河湾 (Fig. 2-1: C)

知多半島と渥美半島に囲まれた平均水深約9mの浅い内湾であり、湾口部が狭く外海水との交換が少ない閉鎖性海域である。三河湾東部の六条潟では毎年アサリ稚貝が大量発生

し、発生した稚貝は碎石覆砂を施した漁場に移植・放流されている（蒲原 2014, 中村・鈴木 2021）。調査地点は最大干潮時の水深が約 1 m の潮下帯の砂泥底である。本章では 2022 年 7 月 27 日に採集した試料を用いた。

### 試料採集および分析の前処理

志登茂川河口においては、着底初期稚貝・稚貝を含む砂泥の表面約 1 cm をスクレーパーで掬い取って採集した。成貝については鋤簾を用いて採集し、貝殻腹縁部をペンチで破壊した後に 99.5%エタノールで固定した。阿蘇海および三河湾では、軽量グラブ採泥器（25×25 cm, 東京久栄）を用いて海底の砂泥を掴み取り、その表面約 1 cm をスクレーパーで掬い取って採集した。また、砂泥とともに採集された成貝の貝殻後部をペンチで破壊した後に 99.5%エタノールで固定した。採取した砂泥を目開き 45  $\mu\text{m}$  のメッシュネットに入れ、水道水を通して脱塩した後、300 mL 塩化ビニル製広口瓶に収容し、99.5%エタノールで固定した。

環境水中の珪藻組成を把握するため、志登茂川河口では砂泥採集地点に隣接する潮下帯の水深 10 cm の地点において 1 L のポリエチレン製ボトルに環境水を直接採取した。阿蘇海では水深 50 cm の地点において海底直上の環境水 1 L をポリエチレン製ボトルに直接採取した。三河湾では、船上からバンドーン採水器を用いて海底直上の環境水を採取し、1 L のポリエチレン製ボトルに収容した。なお、2020 年 11 月 12 日の阿蘇海においては、環境水試料を採取していない。これらの試料をクーラーボックスに収容して、研究室に持ち帰った。2021 年 10 月以前に採集した砂泥・成貝については常温で保存し、2021 年 11 月以降に採集した砂泥および成貝試料については -20  $^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

実体顕微鏡下で、砂泥試料中からマイクロピペットを用いて二枚貝をソーティングし、形態的特徴に基づきアサリの着底初期稚貝・稚貝を同定した後、画像解析ソフト（WinRoof Lite 2015, 三谷商事）を用いて殻長を計測した。殻長約 3 mm 以上の個体につい

では電子ノギスを用いて殻長を計測した。採取した環境水をアスピレーターで吸引濾過し、懸濁物を直径 47mm のガラス繊維フィルター (GF/F, Whatman) 上に捕集した後、DNA 抽出まで -20 °C で冷凍保存した。

### **DNA 抽出・PCR 法による遺伝子増幅・次世代シーケンシング**

着底初期稚貝および殻長 4 mm 未満の稚貝、環境水、環境砂泥については、第 2 章と同様の方法で DNA を抽出した。殻長 4 mm 以上の稚貝および成貝については、実体顕微鏡下でメスおよびピンセットを用いて解剖し、胃および腸（消化管）から抽出した内容物を試料とした。DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて、環境砂泥と同様の方法で DNA を抽出した。その後、第 2 章と同様の方法で、1st PCR、2nd PCR、シーケンシング、BLUST による相同性検索を行い、相同性検索の結果に基づき、相同率 95%以上を目安に属レベルで同定を行った後に、珪藻の属ごとに集計して組成を算出した。

### **データ解析**

本章では、珪藻類に注目した食性解析を実施するため、珪藻以外の微細藻類と帰属不明のリードを除外し、珪藻の配列のみを属ごとに集計したデータを解析に用いた。また、本章では Round et al. (1990) に記されている生活型に基づき、検出された珪藻属を浮遊珪藻 (planktonic)、底生珪藻 (benthic, attached, epiphytic, epilithic, epipellic 等) に大別した。なお、結果においては、浮遊珪藻、底生珪藻それぞれについて、各採集日に優占した上位 7 属を上限に属名を表記し、それ以外の属については「その他の浮遊珪藻」、「その他の底生珪藻」としてまとめて表記した。

### **多次元尺度構成法 (MDS, Multi-Dimensional Scaling) による珪藻組成の相違の可視化**

サンプル間の類似性を 2 次元上の距離として示す MDS を用いて、同日・同所的に採集さ

れた環境水中、環境砂泥上、アサリ消化管中の珪藻組成の類似性を検討した。統計ソフトウェア R ver. 4.2.2 上で vegan パッケージの vegdist 関数を用いて、各試料の珪藻属組成に基づいた Morisita 指数を総当たりで算出し、cmdscale 関数を用いて 2 次元座標上にマッピングした。

#### 全試料の包括的解析：成長に伴う食性の変化の検証

アサリの成長に伴って食性や摂餌生態が変化するかどうか、また、その変化が異なる海域を跨いで認められる普遍的な現象かどうかを調べるため、本研究で採集した全試料を用いた包括的な解析を実施した。まず、解析に用いた全てのアサリを対象として、消化管中の浮遊珪藻の割合をアサリの殻長ごとに散布図にプロットした。さらに、全ての調査日、調査海域のアサリ消化管中、環境水中、環境砂泥中の珪藻組成に基づいた Morisita 指数を総当たりで算出した。その上で、各調査日のアサリの消化管中と環境水の Morisita 指数、アサリの消化管中と環境砂泥の Morisita 指数を抽出し、アサリの殻長ごとに散布図にプロットした。なお、Morisita 指数は 0 から 1 の値をとり、2 試料中の組成が完全に同一である場合には 1 を、構成要素が全く重複しない場合には 0 をとる。

## 結果

### 環境水・環境砂泥・アサリ消化管中の珪藻組成

#### 志登茂川河口（2020年6月9日）

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻に占める各生活型の割合と、それらの属組成を Fig. 3-1 に示す。環境水においては、*Dactyliosolen* spp.、*Thalassiosira* spp.、*Cyclotella* spp. といった浮遊珪藻が優占していた。環境砂泥においては、*Nitzschia* spp.、*Planothidium* spp.、*Amphora* spp.、*Navicula* spp. といった底生珪藻が大部分を占めており、浮遊珪藻はほとんど検出されなかった。アサリ着底初期稚貝の消化管中には、いずれの個体においても底生珪藻が優占しており、浮遊珪藻の割合は極めて少なかった。着底初期稚貝の多くの個体においては、*Seminavis* spp.、*Navicula* spp.、*Fallacia* spp.、*Hippodonta* spp. などが共通して検出された一方で、優占する属は個体間で異なっていた。

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻組成に基づく MDS マップを Fig. 3-2 に示す。着底初期稚貝は、環境水よりも環境砂泥に近接しており、かつ、着底初期稚貝同士は互いに離れ、マップ上に広く分散している傾向が認められた。

#### 志登茂川河口（2022年7月18日）

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻に占める各生活型の割合と、それらの属組成を Fig. 3-3 に示す。環境水においては、*Thalassiosira* spp.、*Skeletonema* spp.、*Cyclotella* spp.、*Chaetoceros* spp. といった浮遊珪藻が優占し、珪藻全体の 90%以上を占めていた。環境砂泥においても、*Thalassiosira* spp.、*Skeletonema* spp.、*Chaetoceros* spp. 等の浮遊珪藻が 50%を占めており、残りの 50%を *Navicula* spp.、*Seminavis* spp.、*Haslea* spp. 等の底生珪藻が占めていた。アサリ着底初期稚貝および成貝の消化管内容物については、いずれの個体においても

浮遊珪藻が優占し、底生珪藻の割合は 10%未満であった。着底初期稚貝については、*Thalassiosira* spp.が圧倒的に優占していた一方で、成貝については、*Thalassiosira* spp.が 50～60%を、*Cyclotella* spp.が約 30%を占めていた。

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻組成に基づく MDS マップを Fig. 3-4 に示す。着底初期稚貝は MDS 上で環境水、環境砂泥いずれからも離れた位置にあったが、着底初期稚貝同士は互いに近接していた。成貝は環境砂泥よりの環境水に近くに位置しており、成貝同士は互いに近接していた。

#### 阿蘇海（2020 年 11 月 12 日）

環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻に占める各生活型の割合と、それらの属組成を Fig. 3-5 に示す。環境砂泥においては、*Amphora* spp.、*Diploneis* spp.、*Navicula* spp.、*Odontella* spp.などの底生珪藻が 99%以上を占めており、浮遊珪藻はほとんど検出されなかった。アサリ着底初期稚貝の消化管中においては、*Diploneis* spp.、Monoraphid diatom、*Melosira* spp.、*Nitzschia* spp.等の底生珪藻が優占していたが、着底初期稚貝 2 個体においては、浮遊珪藻である *Detonula* spp.や *Chaetoceros* spp.が検出された。また、稚貝 1 個体の消化管内からは底生珪藻である *Diploneis* spp.のみが検出された。

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻組成に基づく MDS マップを Fig.3-6 に示す。着底初期稚貝および稚貝は、互いに離れて位置しており、マップ上に広く分散していた。

#### 阿蘇海（2021 年 3 月 22 日）

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻に占める各生活型の割合と、それらの属組成を Fig. 3-7 に示す。環境水においては、*Detonula* spp.、*Dactyliosolen* spp.などの浮遊珪藻が優占していた。環境砂泥においては、*Cocconeis* spp.、*Odontella* spp.、*Melosira* spp.などの底生珪藻が大部分を占めていたが、*Detonula* spp.などの浮遊珪藻も 10%程度検出された。アサ

り着底初期稚貝および稚貝の消化管中においては、ともに底生珪藻が優占しており、浮遊珪藻は検出されないか、低い割合で検出された。多くの着底初期稚貝および稚貝の消化管中においては、*Monoraphid diatom*、*Navicula spp.*、*Diploneis spp.*、*Nitzschia spp.*などが優占して検出された。

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻組成に基づく MDS マップを Fig. 3-8 に示す。稚貝 1 個体を除き、着底初期稚貝および稚貝は、環境水からも環境砂泥からも離れて位置し、かつ、互いに離れてマップ上に広く分散している傾向が認められた。

#### 阿蘇海（2021 年 11 月 16 日）

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻に占める各生活型の割合と、それらの属組成を Fig. 3-9 に示す。環境水においては、*Dactyliosolen spp.*、*Chaetoceros spp.*といった浮遊珪藻が約 96%を占めていた。環境砂泥においては、*Amphora spp.*、*Seminavis spp.*、*Odontella spp.*といった底生珪藻が 98%を占めていた。アサリ着底初期稚貝および稚貝の消化管からは浮遊珪藻、底生珪藻いずれもが認められたが、その組成は個体間で大きく異なっており、底生珪藻が優占している個体と浮遊珪藻が優占している個体いずれもが認められた。多くの着底初期稚貝および稚貝の消化管からは、浮遊珪藻の *Thalassiosira spp.*、底生珪藻の *Amphora spp.*、*Seminavis spp.*、*Fragilaria spp.*、*Navicula spp.*などが共通して検出された他、*Halamphora spp.*、*Encyonema spp.* のように特定の個体からのみ多く検出される属も認められた。一方、成貝においては、全個体において浮遊珪藻が優占していたが、環境水中で優占していた *Dactyliosolen spp.*はほとんど検出されず、*Thalassiosira spp.*が高い割合で検出された（約 70~95%）。

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻組成に基づく MDS マップを Fig. 3-10 に示す。

着底初期稚貝および稚貝の多くは、環境水よりも環境砂泥に近接していた。また、着底初期稚貝はマップ上に広く分散しているのに対し、稚貝は比較的集中して認められた。成

貝については、環境水からも砂泥からも離れて位置しており、かつ、成貝同士は互いに近接していた。

### 阿蘇海（2022年3月2日）

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻に占める各生活型の割合と、それらの属組成を Fig. 3-11 に示す。環境水においては、*Chaetoceros* spp.、*Detonula* spp.を含む浮遊珪藻が優占しており、全体の 99%以上を占めていた。環境砂泥においては、*Navicula* spp.、*Amphora* spp.、*Monoraphid diatom*、*Nitzschia* spp.、*Melosira* spp.といった底生珪藻が 90%を占めていた。アサリ着底初期稚貝においては、*Navicula* spp.、*Fragilaria* spp.、*Nitzschia* spp.、*Amphora* spp.などの底生珪藻が優占して検出された個体が多かった一方、*Thalassiosira* spp.や *Skeletonema* spp.などの浮遊珪藻が高い割合で検出された個体も見られた。着底初期稚貝と同様に、稚貝の消化管からも、浮遊珪藻と底生珪藻のいずれもが検出され、個体によってそれらの割合は異なっていた。稚貝の中には、*Navicula* spp.、*Melosira* spp.、*Fragilaria* spp.などの底生珪藻が高い割合で検出された個体と、*Chaetoceros* spp.、*Thalassiosira* spp.などの浮遊珪藻が高い割合で検出された個体が混在していた。成貝 1 個体においては、底生珪藻である *Melosira* spp.が最も優占していた。

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻組成に基づく MDS マップを Fig. 3-12 に示す。着底初期稚貝および稚貝はいずれも広く分散しており、環境水より環境砂泥に近接する傾向が認められた。成貝 1 個体は、環境水と近接していた。

### 三河湾（2022年7月27日）

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻に占める各生活型の割合と、それらの属組成を Fig. 3-13 に示す。環境水においては、*Cyclotella* spp.、*Minutocellus* spp.などの浮遊珪藻が優占しており、珪藻全体の 99%以上を占めていた。環境砂泥においては、*Navicula* spp.、

*Odontella* spp.といった底生珪藻が約 95%を占めていた。アサリ着底初期稚貝の中には、*Minutocellus* spp.や *Cyclotella* spp.などの浮遊珪藻が優占して検出された個体と、*Haslea* spp.、*Navicula* spp.などの底生珪藻が優占する個体が混在していた。着底初期稚貝については、浮遊珪藻 *Minutocellus* spp.、*Cyclotella* spp.と底生珪藻 *Haslea* spp.、*Navicula* spp.のように多く個体に共通して出現する属があった一方、底生珪藻 *Nitzschia* spp. のように特定の個体にのみ多く出現する属も存在した。成貝については、いずれの個体からも *Minutocellus* spp.、*Cyclotella* spp.、*Thalassiosira* spp.を中心とした浮遊珪藻が優占して検出された。

環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻組成に基づく MDS マップを Fig. 3-14 に示す。着底初期稚貝および成貝は、ともに環境砂泥より環境水の近くに位置していたが、着底初期稚貝同士は互いに離れて広く分散していたのに対し、成貝同士は互いに近接し、環境水の近くに集中していた。

#### 全試料の包括的解析：成長に伴う食性の変化の検証

##### アサリの殻長と消化管中の浮遊珪藻の割合の関係

各海域のアサリについて、消化管中の浮遊珪藻の割合を殻長ごとにプロットした散布図を Fig. 3-15 に示す。浮遊珪藻の割合は、殻長 2 mm 未満の個体では大きくばらついていたものの、多くの個体で低い傾向が認められた。一方、殻長 8 mm 以上の成貝については、どの個体においても浮遊珪藻の割合は高く、すべての個体において 80 %を上回っていた。

##### 餌料環境と消化管中の珪藻組成の類似度とアサリの殻長の関係

各海域のアサリについて、消化管中と環境水中の珪藻組成の類似度を殻長ごとにプロットした散布図を Fig. 3-16 に示す。志登茂川河口および阿蘇海の殻長 2 mm 未満の個体については、消化管中と環境水中の珪藻組成の類似度は非常に低い傾向が認められた。一方、

殻長 14 mm 以上の個体については、消化管中と環境水中の珪藻組成の類似度は概して高い傾向が認められた。阿蘇海の殻長 8~10 mm の 5 個体（2021 年 11 月 16 日）については、環境水との類似度は非常に低かった。

アサリの消化管中と環境砂泥中の珪藻組成の類似度を殻長ごとにプロットした散布図を Fig. 3-17 に示す。殻長 2 mm 未満の着底初期稚貝や稚貝については、環境砂泥との類似度は大きくばらついていた。殻長 2 mm 以上の個体については、環境砂泥との類似度は概して低い傾向が認められたが、志登茂川河口の殻長 14~22 mm の 3 個体（2022 年 7 月 18 日採集）については、環境砂泥との類似度がやや高かった。

## 考察

### アサリ消化管中の浮遊珪藻および底生珪藻の由来

環境水中、環境砂泥中の珪藻組成は、調査地点や調査日によって大きく異なったものの、2022年7月18日の志登茂川を除き、環境水においては浮遊珪藻が、環境砂泥においては底生珪藻がそれぞれ優占していた。先行研究において、潮間帯や潮下帯上部では、波浪や潮汐流などによって底生珪藻が高密度に懸濁することが報告されており (Shaffer & Sullivan, 1988, de Jong & de Jonge, 1995, Lucasetat et al. 2001)、これらがアサリなどの二枚貝にとっての重要な餌料となっている可能性が指摘されている (Houki & Kawamura, 2020)。しかしながら、本研究において、物理化学的環境の異なる複数の海域で数回にわたって調査を実施したにもかかわらず、環境水中に底生珪藻が高密度に懸濁している状況は認められなかった。一方、2022年7月18日の志登茂川においては、環境水中に優占していた *Thalassiosira* spp. を主体とする浮遊珪藻が環境砂泥からも高い割合で検出された。本研究では珪藻の細胞数密度や生物量を調べていないが、環境水中に浮遊珪藻が高密度に懸濁しており、海底にもこれらの浮遊珪藻が沈殿していた可能性が考えられる。これは、2022年7月18日志登茂川河口で採集した成貝3個体の消化管中と環境砂泥中の珪藻組成の類似度が高かった要因と推察される。これらのことから、基本的には、アサリが摂食した浮遊珪藻は環境水に、底生珪藻は環境砂泥にそれぞれ由来すると考えられるが、浮遊珪藻が環境砂泥に多く沈殿していることもあり、その場合には、アサリ消化管内に認められた浮遊珪藻が環境水に由来するのか、環境砂泥に由来するのかを判別することが困難となる。

### アサリの成長に伴う食性および摂餌様式の変化

本章で実施した DNA-MB に基づく全餌料を用いた包括的解析において、アサリの消化管中の珪藻組成と環境砂泥の珪藻組成の類似度は、着底初期稚貝や小型の稚貝では幅広く分

散していたが、殻長が大きくなると低くなる傾向が認められた。一方、消化管中の珪藻組成と環境水の珪藻組成の類似度は、着底初期稚貝や稚貝では低い傾向にあったが、殻長が大きくなると高くなる傾向が認められた。これらの解析結果は、着底初期稚貝や小型の稚貝は環境砂泥上の底生珪藻を摂食する傾向にあり、成長するにしたがって環境水中の浮遊珪藻を摂食するようになることを示している。本解析で認められたこのようなアサリの食性の変化の傾向は、アサリの採餌器官の発達過程ならびに摂餌行動の変化と深く関係していると推察される。

一般的に、懸濁物食性二枚貝であるアサリは、入水管から環境水を取り込み、鰓で懸濁物を濾しとる *filter-feeding* を行うことが知られている。アサリの出水管および入水管は、後部外套膜が変化・癒合して形成された器官であり、そのうち、腹側に位置する入水管は、環境水を殻内へ吸い込む経路としての役割を果たす（林 2006）。アサリにおいては、出水管および入水管は殻長 0.4 mm 前後で形成され始めるものの、入水管は殻長 2 mm 以上にならなければ完成しない（井上 1980）。また、殻長 1 mm 未満のアサリ着底初期稚貝は、底生珪藻などを足でかき集めて摂食する *pedal-feeding* を行う（Toba et al. 1992）。効率的な *filter-feeding* に重要な役割を果たす入水管が未完成な着底初期や稚貝期のアサリが、環境砂泥中の底生珪藻を高い割合で摂食していたという本研究の結果は、上述の先行研究の記述とよく一致する。おそらく、着底初期から入水管が完成する殻長 2 mm までの間の稚貝（以下、小型稚貝とする）は、環境砂泥上の底生珪藻を *pedal-feeding* によって摂食するが、入水管が完成して以降には効率的な *filter-feeding* が徐々に可能となり、環境水中の浮遊珪藻を摂食するようになると考えられる。

#### 小型稚貝における消化管中の珪藻組成の個体差と摂餌の選択性

消化管中の浮遊・底生珪藻の割合を全体的に見ると、小型稚貝の消化管中には底生珪藻が概して優占しており、消化管中の珪藻組成も環境水よりも環境砂泥中の組成に近い傾向

が認められた。その一方で、小型稚貝の消化管中の珪藻組成は、同日・同所的に採集された場合であっても個体間で著しく異なっており、MDS マップ上においては分散して位置していた。このような個体差が生じた原因の 1 つとして、小型個体の体サイズならびに消化管容積が極めて小さく、1 度に摂食できる珪藻の細胞数が少ないことが考えられる。環境中に多数の珪藻が存在する条件下において、消化管中に取り込める細胞数が極端に少ない場合には、消化管中の珪藻組成には必然的に個体差が生じると考えられる。

また、調査日によっては、小型稚貝の中には、底生珪藻を多く摂食している個体と浮遊珪藻を多く摂食している個体が混在していた。2022 年 7 月 18 日の志登茂川河口においては、着底初期稚貝の消化管から浮遊珪藻が高い割合で検出されたが、これは、先述の通り、環境水中だけでなく環境砂泥上にも *Thalassiosira* spp.などの浮遊珪藻が高い密度で存在していたことが原因と推察される。ところが、2021 年 11 月 16 日の阿蘇海や 2022 年 7 月 27 日の三河湾のように、環境砂泥上に浮遊珪藻がほとんど認められないにも係わらず、小型稚貝の中には、浮遊珪藻を高い割合で摂食している個体が認められた。この結果は、入水管が未発達な着底初期稚貝や稚貝であっても、環境砂泥上だけではなく、環境水中からも餌料を摂食できる場合があることを示している。本研究においては、環境水中の珪藻の細胞数や生物量を評価していないため議論の根拠に乏しいが、これらの調査時においては、環境水中の浮遊珪藻が比較的高密度であり、濾過能力に乏しい小型稚貝であっても外套膜縁辺から、あるいは *pedal-feeding* によって偶発的に環境水中の浮遊珪藻を摂食可能であった可能性が考えられる。

小型稚貝の消化管内容物組成は個体間において大きく異なっていたため、これらが環境中からどのような形態、体サイズの珪藻を選択して摂食しているのかについては判然としない。しかしながら、*Odontella* spp.のように、細胞が比較的大型で、かつ群体を形成する属の中には、環境中には比較的高い割合で検出されたにも係わらず、小型稚貝の消化管からはほとんど検出されなかったものも認められたことから、底生珪藻の中にも、小型稚貝

にとって摂食に適さない種が存在している可能性が示唆された。

### 成貝における摂餌の選択性

成貝においては、小型稚貝とは異なり、消化管中の珪藻組成は個体間で類似しており、なおかつ環境水中の珪藻組成に類似する傾向が認められた。この結果は、成貝が環境水中の浮遊珪藻を非選択的に摂食していたことを示している。

アサリをはじめとする懸濁物食性二枚貝は、鰓で懸濁物粒子を濾し取って摂餌するが、口や食道の直径よりも大きい粒子については、鰓や唇弁で選別され、偽糞として殻外へ排出される (Levinton et al. 1996)。また、アサリにおいては 20  $\mu\text{m}$  以上の粒子が偽糞として排出されやすいことが報告されている。(Defossez & Hawkins 1997)。本研究においては、*Chaetoceros* spp.、*Skeletonema* spp.、*Thalassiosira* spp.といった群体を形成する浮遊珪藻が、環境水からもアサリの消化管からも高い割合で検出されたことから、アサリはこれらの珪藻を効率的に摂食可能であったと考えられた。この結果は、アサリが浮遊珪藻の群体をその長さに係わらず短く折って摂食可能であることを実験的に証明した清水 (2020 年度修士学位論文) の結果とも矛盾しない。一方で、上述で例外として挙げた 2021 年 11 月 16 日阿蘇海においては、環境水中で圧倒的に優占していた *Dactyliosolen* spp.が、成貝の消化管内からほとんど、あるいは全く検出されなかった。*Dactyliosolen* spp.は、細胞径が 10~70  $\mu\text{m}$ 、細胞長が 40~80  $\mu\text{m}$  の比較的大型の珪藻で、なおかつ直鎖状やらせん状の大型の群体を形成する (Round et al. 1990, 末友ら 2013)。清水 (2020 年度修士論文) が実験で使用した *Chaetoceros contortus* および *Eucampia zodiacus* と *Dactyliosolen* spp.の形態や物理的特性にどの程度の差異があるかは検証できていないが、*Dactyliosolen* spp.はアサリ成貝にとって非常に摂食しにくいと考えられる。

## 第4章 総合考察

近年、沿岸域の貧栄養化に伴う微細藻類（植物プランクトン）の減少や組成の変化が、アサリ資源量の長期的な減少・低迷傾向の一因と見做されるようになり（浜口 2011, 鶴島ら 2019, 曾根ら 2019, Uchida et al. 2023）、下水道管理運転における栄養塩排出基準の緩和といった、国や自治体を挙げた大規模な取り組みが始まっている（後藤ら 2015, 西嶋 2018, 永尾・中村 2018）。このような状況下において、天然海域における微細藻類の量や質の変化がアサリに及ぼす影響を把握することが重大な課題となっている。しかしながら、現在のところ、アサリの具体的な餌料に関する知見は極めて乏しく、科学的根拠に基づいた餌料環境の評価も難しい状況にある。このような背景のもと、本研究では、アサリが環境中の多種多様な微細藻類の中からどのような微細藻類を摂食しているのか、アサリの成長に伴って食性や摂餌生態がどのように変化するのかを解明することを目的として、着底初期稚貝から成貝までのアサリを対象とした食性解析を複数海域において実施した。第2章においては、2種類の葉緑体ユニバーサルプライマーを用いた DNA-MB によるアサリの食性解析の方法を検討し、淡水珪藻を対象に設計された既存の葉緑体 *rbcL* プライマーが（Bruder & Medlin 2007, Vasselon et al. 2017, Rimet et al. 2019, Maitland et al. 2020）、海産珪藻の DNA 配列を増幅可能で、アサリの食性解析にも応用できることを検証した。第3章では、物理化学的環境が異なると想定される3つの異なる海域において、*rbcL* プライマーを用いた DNA-MB に基づくアサリの食性解析を実施した。その結果、着底初期稚貝や殻長 2 mm 未満の小型の稚貝は環境砂泥上の底生珪藻を摂食する傾向が認められたのに対し、それよりも大型の稚貝や成貝は環境水中の浮遊珪藻を非選択的に摂食することが明らかになった。そして、このような摂餌様式および食性の変化は、*filter-feeding* のための入水管が殻長 2 mm 前後で完成する（井上 1980）ことに起因すると考えられた。

これらの結果から、アサリの食性・餌料研究においては、その生活史段階を入水管の完成時期（2 mm）を境に区分するのが妥当と考えられる。また、特に、入水管の形成期以前のアサリを研究対象とする場合においては、環境砂泥中の微細藻類の量や組成を評価する必要があると考えられる。ただし、本研究においては、環境水中に浮遊珪藻が高密度に発生している場合や、海底砂泥上にそれらが沈殿している状況下においては、殻長 2 mm 未満の稚貝であっても浮遊珪藻を多く摂食することも明らかになったことから、小型稚貝の餌料環境を調査する際にも、環境水中の微細藻類の量や組成についても調べる必要はある。

本研究においては、着底初期稚貝、成貝いずれにおいても、粒子サイズに基づいて選択的に摂餌を行っている可能性が示唆され、アサリは、*Dactyliosolen* spp.や*Odontella* spp.などの比較的大型で、かつ群体を形成する珪藻を効率的に摂食できないと考えられた。また、第二章で実施した消化管内容物の SEM 観察の結果から、着底初期稚貝や小型の稚貝においては、底生珪藻の細胞殻を消化管の中で破壊できていない可能性が示唆された。本研究と同様、二枚貝浮遊幼生の消化管内容物を SEM で観察した先行研究においては、細胞殻が比較的堅いと考えられる *Thalassiosira* spp.などの細胞が、破壊されていない状態で観察されたことが報告されている（伯耆 2021）。一方で、殻長 5 mm 以上のアサリは、堅い細胞殻を有する底生珪藻を、消化管内において効率的に破壊できることが明らかになっている（Houki et al. 2018）。おそらく、消化管内の餌料破壊機構が未発達な着底初期稚貝や浮遊幼生においては、摂食された珪藻のうち堅い細胞殻を持つものは効率的に破壊できず、栄養源として利用できていないと推察される。このように、環境水中に、アサリの餌料とはならない珪藻が存在する可能性については、本種の餌料環境を評価する上で十分に加味されるべきである。現在のところ、アサリの摂食に適さない珪藻や、破壊・消化できない珪藻についての具体的な知見は十分ではないため、本研究で実施したような DNA-MB に基づく解析を幅広く実施する他、飼育実験や消化管内容物の SEM 観察を積み重ねることが直近の課題といえる。

本研究では、沿岸域において微細藻類の中でも生物量が大きく、比較的安定的に存在し、物理的・生態的特性が多様な分類群である珪藻に注目した食性解析を実施した。アサリの具体的な餌料を特定するとともに、食性・摂餌様式の成長に伴う変化を理解するという本研究の目的は達成された一方、珪藻以外の餌料がどれだけ貢献しているのかについてはほとんど議論できなかった。天然海域に生息するアサリにとっては、珪藻以外の微細藻類や従属栄養生物、真菌、細菌、デトリタスなど、あらゆる有機物粒子が栄養源となっている可能性が考えられるが、現在のところ、これらを網羅的に検出・定量する共通の手法は存在しない。今後、生物分類群ごとに設計された複数のユニバーサルプライマーを用いたDNA-MB や、安定同位体比分析の結果を総合的に解釈することで、各餌料源の重要性などを定性的・定量的に評価できるようになることが期待される。

## 引用文献

- Alindonosi A. R., Baeshen M. N., Elsharawy N. T. 2021. Prospects for diatoms identification using metagenomics: a review. *Ecology & Environmental Research* 19: 4281-4298.
- 安藤温子, 安藤正規, 井鷲裕司 2020a. 植物食性動物を対象とした食性解析手法. *日本生態学会誌* 70: 77-89.
- 安藤温子, 小村健人, 向井喜果, 安藤正規, 井鷲裕司 2020b. 技術的課題と適切なデータ解釈の重要性. *日本生態学会誌* 70: 103-104.
- Apothéloz-Perret-Gentil L., Bouchez A., Cordier T., Cordonier A., Guéguen J., Rimet F., Vasselon V., Pawlowski J. 2020. Monitoring the ecological status of rivers with diatom eDNA metabarcoding: A comparison of taxonomic markers and analytical approaches for the inference of a molecular diatom index. *Molecular Ecology* 30: 2959-2968.
- Ardura A., Borrell Y. J., Fernández S., Arenales M. G., Martínez J. L., Garcia-Vazquez E. 2020. Nuisance algae in ballast water facing international conventions. Insights from DNA metabarcoding in ships arriving in bay of Biscay. *Water* 12: 2168.
- Barry-Martinet R., Védie E., Bressy C., Briand J. F. 2021. Using metabarcoding and «Diat.Barcode» database to perform molecular identification on marine biofilms. *Alpha Conference Abstracts* 4: e65046.
- Bruder K., Medlin L. K. 2007. Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in the naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*. *Nova Hedwigia*. 85: 331-352.
- Defossez J. M., Hawkins A. J. S. 1997. Selective feeding in shellfish: size-dependent rejection of large particles within pseudofaeces from *Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussatus*. *Marine Biology* 129: 139-147.
- de Jong D. J., de Jonge V. N. 1995. Dynamics and distribution of microphytobenthic chlorophyll-a in the Western Scheldt estuary (SW Netherlands). *Hydrobiologia* 311: 21-30.
- 藤井太一, 南基泰, 白子智康, 田中真規子 2018. メタバーコーディング法によるアサリ餌料推定: 砕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. *生物機*

能開発研究所紀要 19: 94-100.

Goldberg A. R., Conway C. J., Tank D. C., Andrews K. R., Gour D. S., Waits L. P. 2020. Diet of a rare herbivore based on DNA metabarcoding of feces: Selection, seasonality, and survival. *Ecology and Evolution* 10: 7627-7643.

Bohmann S., Gopalakrishnan S., Nielsen M., Nielsen L. D. S. B., Jones G., Streicker D. G., Gilbert M. T. P. 2018. Using DNA metabarcoding for simultaneous inference of common vampire bat diet and population structure. *Molecular Ecology Resource* 18: 1050-1063.

後藤祐哉, 横山佳裕, 内田唯史, 中嶋雅孝 2015. 博多湾における「高度な栄養塩管理手法」の一考察. *土木学会論文集* 71: II 369-II 376.

浜口昌巳 2011. 一次生産の変化と有用種の関係 (二枚貝). *水産総合研究センター研究報告* 34: 33-47.

林 勇夫 2006. 軟体動物 (Mollusca), *水産無脊椎動物学入門*, 恒星社厚生閣, 東京. p126-131

疋田 陸 2021 年度卒業論文. 天然海域におけるアコヤガイの食性解析.

Houki S., Kawamura T., 2020. Feeding and digestion periodicity of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in natural intertidal and subtidal zones estimated from the morphological condition of the crystalline style. *Journal of Molluscan Studies* 86: 361-371.

伯耆匠二 2015. アサリの摂餌生態と消化機構に関する研究. 東京大学博士論文.

Houki S., Kawamura T., Ogawa N., Watanabe Y. 2018. Efficient crushing of hard benthic diatoms in the gut of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* – Experimental and observational evidence. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 505: 35-44.

伯耆匠二 2021. 消化管内容物の走査型電子顕微鏡観察に基づく二枚貝浮遊幼生の食性解析. *日本水産学会* 87: 424-426.

井上 泰 1980. 山口・大海湾におけるアサリの生態と環境について. *水産土木* 16: 22-35.

板倉 茂, 山口峰生 2007. 瀬戸内海の赤潮発生機構と環境変動. *日本ベントス学会誌* 62: 57-61.

伊藤絹子, 加賀敏樹, 佐々木浩一, 大森迪夫 2005. 干潟二枚貝の生産過程と餌料環境. *水産総合研究センター研究報告* 3: 1-15.

岩男 昂 2001. 一次生産の変化と有用種の関係 (二枚貝). *大分県海洋水産研究センター調査*

研究報告 3: 19-25.

- 蒲原 聡 2014. 愛知県豊川河口域に発生するアサリ稚貝の移植. 豊かな海 33: 44-51.
- Kanaya G., Nobata E., Toya T., Kikuchi E. 2005. Effects of different feeding habits of three bivalve species on sediment characteristics and benthic diatom abundance. Marine Ecology Progress Series 299: 67-78.
- Kasim M., Mukai H. 2006. Contribution of benthic and epiphytic diatoms to clam and oyster production in the Akkeshi-ko estuary. Journal of Oceanography 62: 267-281.
- Kasim M., Mukai H. 2009. Food sources of the oyster (*Crassostrea gigas*) and the clam (*Ruditapes philippinarum*) in the Akkeshi-ko estuary. Plankton and Benthos Research 4: 104-114.
- Khaw Y. S., Khong N. M. H., Shaharuddin N. A., Yusoff F. M. 2020. A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an emphasis on primers. Journal of Microbiological Method 172: 2168.
- 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. 日本ベントス研究会誌 37: 1-10.
- 小池裕子 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. 水産工学 29: 105-112.
- 国分秀樹 2019. 伊勢湾における栄養塩類と水産資源の長期変動. 土木学会論文集 B2 (海岸工学) 75: 1123-1128.
- Komorita T., Kajihara R., Tsutsumi H., Shibamura S., Yamada T., Montani S. 2014. Food Sources for *Ruditapes philippinarum* in a Coastal Lagoon Determined by Mass Balance and Stable Isotope Approaches. PLOS ONE 9: e86732.
- Levinton J., Ward J., Thompson R. J. 1996. Biodynamics of particle processing in bivalve molluscs: models, data, and future directions. Invertebrate Biology 115: 232-242.
- Lucasetat, C. H., Banham C., Holligan P. M. 2001. Benthic-pelagic exchange of microalgae at a tidal flat. 2. Taxonomic analysis. Marine Ecology Progress Series 212: 39-52.
- Maitland V. C., Robinson C. V., Porter T. M., Hajibabaei M. 2020. Freshwater diatom biomonitoring through benthic kick-net metabarcoding. PLoS ONE 15: e0242143.
- Maloy A. P., Culloty S. C., Slater J. W. 2013. Dietary analysis of small planktonic consumers: a case

- study with marine bivalve larvae. *Journal of Plankton Research* 35: 866-876.
- 永尾謙太郎, 中村由行 2018. 伊勢湾における窒素・リン濃度に対する微生物ループの応答. 土木学会論文集 I74: I1243-I1248.
- 中村憲司, 鈴木輝明 2021. 三河湾奥部河口干潟におけるアサリ稚貝の大量発生現象について. *水産海洋研究* 85: 14-23.
- Nakamura Y., Tuji A., Makino W., Matsuzaki S., Nagata N., Nakagawa M., Takamura N. 2020. Feeding ecology of a mysid species, *Neomysis awatschensis* in the Lake Kasumigaura: combining approach with microscopy, stable isotope analysis and DNA metabarcoding. *Plankton and Benthos Research* 15: 44-54.
- 西嶋 渉 2018. 瀬戸内海における栄養塩濃度管理法. *沿岸海洋研究* 56: 13-19.
- Novotny A., Zamora-Terol S., Winder M. 2021. DNA metabarcoding reveals trophic niche diversity of micro and mesozooplankton species. *The Royal society* 288: 20210908.
- Raby D., Mingelbier M., Dodson J. J., Klein B., Lagadeuc Y., Legendre L. 1997. Food-particle size and selection by bivalve larvae in a temperate embayment. *Marine Biology* 127: 665-672.
- Rimet F., Gusev E., Kahlert M., Kelly M. G., Kulikovskiy M., Maltsev Y., Mann D. G., Pfannkuchen M., Trobajo R., Vasselon V., Zimmermann J., Bouchez A. 2019. Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. *Scientific Reports* 9: 15116.
- Round F. E., Crawford R. M., Mann D.G. 1990. *The diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press, New York. p 747.
- Shaffer G. P., Sullivan M. J. 1988. Water column productivity attributable to displaced benthic diatoms in well-mixed shallow estuaries. *Journal of Phycology* 24: 132-140.
- 清水 卓 2020 年度修士学位論文. 懸濁物食性二枚貝に対する珪藻群体の被食防御効果.
- 曾根亮太, 和久光靖, 石田俊朗, 宮脇 大, 山田 智 2019. 六条潟におけるアサリ *Ruditapes philippinarum* の秋季減耗要因について. *水産海洋研究* 83: 252-259.
- Soininen E. M., Zinger L., Gielly L., Bellemain E., Bråthen K. A., Brochmann C., Epp L.S., Gussarova G., Hassel K., Henden J. A., Killengreen S. T., Rämä T., Stenøien H. K., Yoccoz N. G., Ims R. A. 2013. Shedding new light on the diet of Norwegian lemmings: DNA metabarcoding of stomach content. *Polar Biology* 36: 1069-1076.

- Sorokin Y. I., Giovanardi O. 1995. Trophic characteristics of the Manila clam (*Tapes philippinarum* Adams and Reeve). *Marine Science* 52: 853-862.
- 末友靖隆, 松山幸彦, 上田拓史, 上野俊士郎, 久保田信著, 鈴木紀毅, 木元克典, 佐野明子, 副島美和, 濱岡秀樹, 中島篤巳 2013. 単細胞生物ケイ藻類, 日本の海産プランクトン図鑑 (第二版) . 共立出版, 東京. 131p.
- Sureshkumar P., Thomas J., Bhakta S. 2022. Development of DNA barcode for freshwater microalgae species revealing it's evolutionary insights on diversity in Noyyal river of Western ghats, India. *Research Square* : DOI (<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1330489/v1>).
- Toba D. R., Thompson D. S., Chew K. K., Anderson G. J., Miller M. 1992. Guide to Manila clam culture in Washington. Washington Sea Grant Program, Washington, U.S.A., 80p.
- Tran B. T., Kim K. Y., Heo J. S., Park S. J., Park H. K., Choi Y. H. 2022. Determination of the Pacific oyster *Magallana gigas* (*Crassostrea gigas*) diet composition in two aquaculture farms by fecal DNA metabarcoding. *Aquaculture* 552: 738042.
- 鶴島大樹, 永尾謙太郎, 中田喜三郎 2019. 数値シミュレーションを用いた伊勢湾におけるアサリの餌料不足に関する一考察. *土木学会誌論文集 B2 (海岸工学)* 75: 1111-1116.
- 鳥羽光晴 2017. アサリ資源の減少に関する議論への再訪. *日本水産学会誌* 83: 914-941.
- 鳥居春己, 高野彩子, 村上興正, 白子智康 2022. DNA メタバーコーディング法によるヌートリアのイシガイ科二枚貝類採食解析. *Wildlife and Human Society* 10: 43-50.
- Uchida M., Ishihi Y., Watanabe S., Tsujino M., Tezuka N., Takada Y, Niwa K. 2023. Trophic state-dependent distribution of asari clam *Ruditapes philippinarum* in Japanese coastal waters: possible utilization of asari stable isotope ratios as a production indicator. *Fisheries Science*: in press.
- Vasselon V., Rimet F., Tapolczai K., Bouchez A. 2017. Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNA extraction methods matter? *Freshwater Science* 36: 162-177.
- Vestheim H., Jarman S. N. 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology* 5: 1-11.
- Vignier J., Laroche O., Rolton A., Wadsworth P., Kumanan K., Trochel B., Pochon X., King N. 2021.

Dietary Exposure of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae to Compromised Microalgae Results in Impaired Fitness and Microbiome Shift. *Frontiers in Microbiology* 12: 2319.

Watanabe S., Katayama S., Kodama M., Cho N., Nakata K., Fukuda M. 2009. Small-scale variation in feeding environments for the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in a tidal flat in Tokyo Bay. *Fisheries Science* 75: 937-945.

山田充哉, 尾崎 仁, 久田哲二, 田中雅幸 2020. 阿蘇海における秋季のアサリ浮遊幼生の出現傾向. 京都府農林水産技術センター研究報告 42: 17-28.

Zimmermann J., Abarca N., Enk N., Skibbe O., Kusber W.-H., Jahn R. 2014. Taxonomic Reference Libraries for Environmental Barcoding: A Best Practice Example from Diatom Research. *PLOS ONE* 9: e108793.

## 要約

近年、沿岸域の貧栄養化に伴う微細藻類の減少や組成の変化が、アサリの資源量の長期的な減少の一因と見做されており、本種の餌料環境の評価が重要な課題と位置付けられるようになってきた。しかし、本種の食性に関する知見は少なく、特に、天然海域における具体的な餌料についてはほとんど解明されていない。本研究では、天然海域において本種がどのような微細藻類を摂食しているのか、本種の成長に伴って食性や摂餌生態がどのように変化するのかを解明することを目的として、複数の海域（三重県志登茂川河口、京都府阿蘇海、愛知県三河湾）において採集されたアサリ着底初期稚貝、稚貝、成貝を対象に、DNA メタバーコーディング（DNA-MB）に基づく食性解析を実施した。

葉緑体 *rbcL* プライマーを用いた DNA-MB に基づいて各成長段階のアサリの食性を解析したところ、着底初期稚貝や殻長 2 mm 未満の稚貝は、環境砂泥上の底生珪藻を、それよりも大型の稚貝や成貝は、環境水中の浮遊珪藻を摂食する大まかな傾向が認められ、このような摂餌様式および食性の変化は、*filter-feeding* のための入水管が殻長 2 mm 前後で完成することに起因すると結論付けられた。この結果から、本種の食性研究においては、入水管完成の前後で生活史段階を区分するのが妥当であり、入水管完成以前のアサリの餌料環境を調べる際には、環境水中のみならず、環境砂泥上の微細藻類の量や組成を調べる必要があると考えられた。また、環境中と消化管中の珪藻組成の比較から、着底初期稚貝、成貝いずれにおいても、大型の群体性珪藻を摂食できない可能性が示唆されたほか、補足的に実施した消化管内容物の走査型電子顕微鏡観察の結果から、着底初期稚貝や小型の稚貝は、強固な細胞殻を有する底生珪藻を消化できない可能性も示唆された。このように、環境中にアサリの餌料とならない珪藻が混在する可能性についても、本種の餌料環境を評価する上では加味されるべきである。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教員として終始丁寧な御指導と御鞭撻をいただいた、三重大学大学院生物資源学研究科水圏資源生物学教育研究分野の伯耆匠二助教に心より感謝申し上げます。また、同研究科水圏資源生物学教育研究分野の古丸 明教授、生物海洋学教育研究分野の石川 輝教授、水圏分子生態学教育研究分野の河村功一教授には、本論文を校閲して頂き、御助言と御指摘を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

水産研究・教育機構水産技術研究所の山田充哉博士には、京都府阿蘇海における野外採集調査に御協力いただきました。また、京都府漁業協同組合宮津支所の長谷川隆嗣氏には、京都府阿蘇海における野外採集調査の許可を快く承諾いただき、野外採集調査にも御協力いただきました。愛知県水産試験場の日比野 学博士および進藤 蒼氏には、愛知県三河湾における野外採集調査に御協力いただきました。

三重大学 医学部電子顕微鏡室の小川 覚氏には、電子顕微鏡の使用に関して御指導をいただきました。水圏資源生物学教育研究分野の佐野菜摘博士には、DNA 解析について多大な御指導と御助言をいただきました。最後に、水圏分子生態学教育研究分野ならびに水圏資源生物学教育研究分野の皆様には終始に渡り様々な御協力をいただきました。以上の方々に、心より感謝申し上げます。

本研究の一部は、文部科学省科研費（課題番号 20K15577）、および「水産庁令和 4 年度漁場環境改善推進事業のうち栄養塩の水産資源に及ぼす影響の調査」を受けて遂行しました。

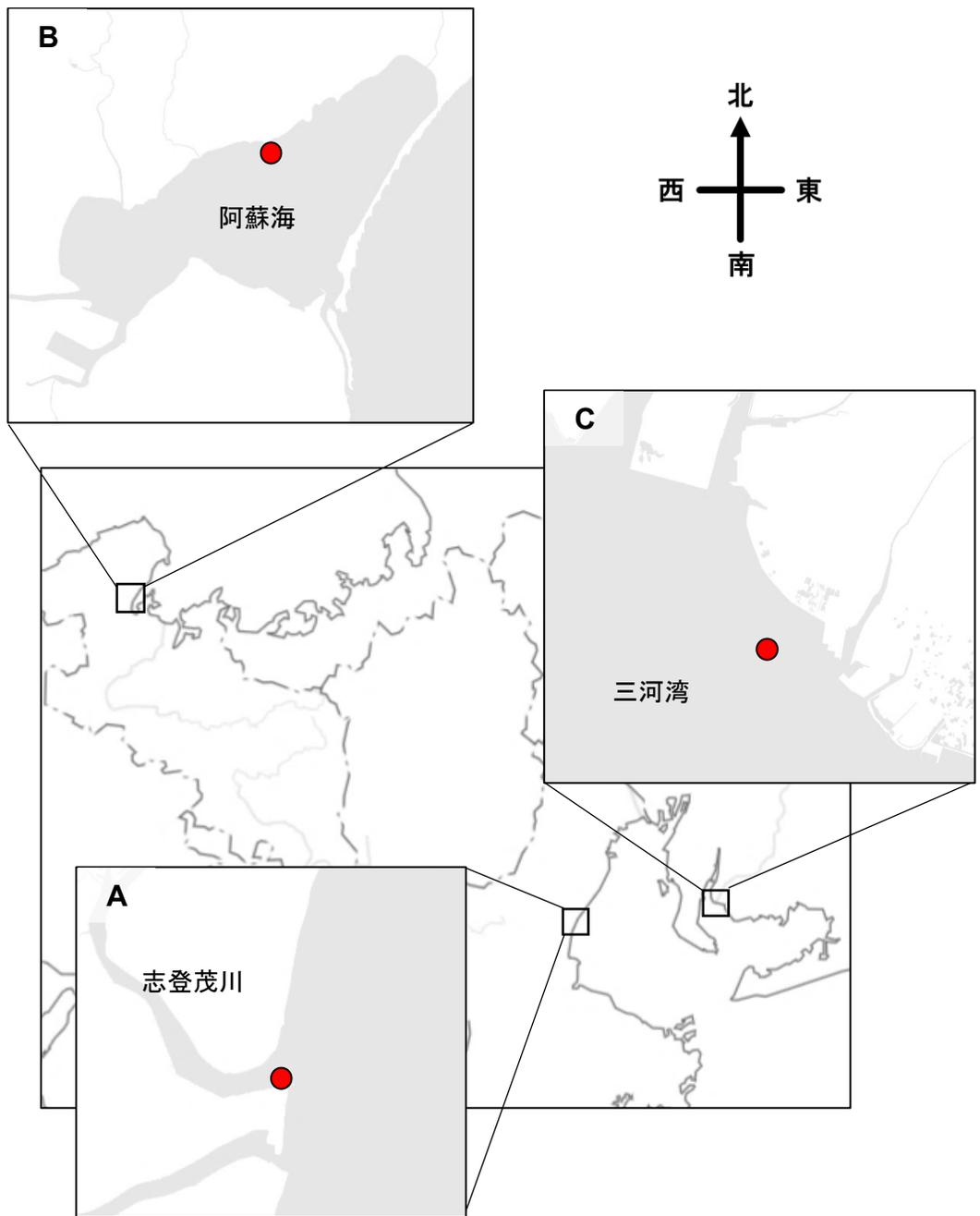


Fig. 2-1

本研究の調査海域および調査地点.

A: 志登茂川河口(34.735182N, 136.529120E).

B: 阿蘇海(35.575638N, 135.183735E).

C: 三河湾(34.79430N, 137.00583E).

Table. 2-1  
psbAおよびrbcLに基づくDNA-MB、SEM観察により検出された中心類珪藻.

属	DNA-MB		SEM観察
	psbA	rbcL	
<i>Conticribra</i> spp.	-	○	-
<i>Thalassiosira</i> spp.	-	○	○
<i>Skeletonema</i> spp.	○	○	○
<i>Detonula</i> spp.	-	○	-
<i>Cyclotella</i> spp.	○	○	○
<i>Discostella</i> spp.	-	○	-
<i>Melosira</i> spp.	-	-	○
<i>Paralia</i> spp.	○	-	-
<i>Aulacoseira</i> spp.	-	○	○
<i>Coscinodiscus</i> spp.	○	-	-
<i>Triceratium</i> spp.	-	○	-
<i>Odontella</i> spp.	○	○	-
<i>Cerataulus</i> spp.	-	○	-
<i>Plagiogramma</i> spp.	○	-	-
<i>Dimeregramma</i> spp.	○	○	-
<i>Eucampia</i> spp.	-	○	-
<i>Cerataulina</i> spp.	○	○	-
<i>Bellerocha</i> spp.	○	-	-
<i>Ditylum</i> spp.	-	○	-
<i>Plagiogrammopsis</i> spp.	-	○	-
<i>Minutocellus</i> spp.	-	○	-
<i>Arcocellulus</i> spp.	-	○	-
<i>Extubocellulus</i> spp.	-	○	-
<i>Pseudoleyanella</i> spp.	-	○	-
<i>Rhizosolenia</i> spp.	○	-	○
<i>Dactyliosolen</i> spp.	-	○	○
<i>Chaetoceros</i> spp.	○	○	○
<i>Leptocylindrus</i> spp.	○	○	-
出現属数	12	22	8

各手法によって検出された微細藻類属を○で示した。

Table. 2-2  
psbAおよびrbcLに基づくDNA-MB、SEM観察により検出された羽状類珪藻  
(無縦溝).

属	DNA-MB		SEM観察
	psbA	rbcL	
Fragilariaceae	○	-	-
<i>Fragilaria</i> spp.	○	-	-
<i>Asteroplanus</i> spp.	○	-	-
<i>Punctastriata</i> spp.	-	○	-
<i>Staurosira</i> sp.	-	○	-
<i>Pseudostaurosira</i> spp.	○	-	-
<i>Plagiostriata</i> spp.	○	-	-
<i>Tabularia</i> spp.	○	-	○
<i>Opephora</i> spp.	○	○	-
<i>Asterionellopsis</i> spp.	-	○	-
<i>Gedaniella</i> spp.	-	○	-
<i>Licmophora</i> spp.	-	-	○
<i>Thalassionema</i> spp.	○	○	○
出現属数	8	6	3

各手法によって検出された微細藻類属を○で示した。  
属が不明な微細藻類に関しては可能な限り下位の分類名を表記した。

Table. 2-3

psbAおよびrbcLに基づくDNA-MB、SEM観察により検出された羽状類珪藻  
(縦溝).

属	DNA-MB		SEM観察
	psbA	rbcL	
<i>Eunotia</i> spp.	○	-	-
<i>Lyrella</i> spp.	-	○	-
<i>Petroneis</i> spp.	-	○	-
<i>Placoneis</i> spp.	○	-	-
<i>Cymbella</i> spp.	○	-	-
<i>Encyonema</i> spp.	○	-	-
<i>Cymbopleura</i> spp.	-	○	-
<i>Encyonopsis</i> spp.	○	-	-
<i>Gomphonema</i> spp.	○	○	-
<i>Planothidium</i> spp.	-	○	-
<i>Cocconeis</i> spp.	○	○	○
<i>Anorthoneis</i> spp.	-	-	○
<i>Halamphora</i> spp.	○	○	-
<i>Neidium</i> spp.	○	-	-
<i>Scoliopleura</i> spp.	-	○	-
<i>Sellaphora</i> spp.	○	○	-
<i>Fallacia</i> spp.	○	○	-
<i>Pinnularia</i> spp.	○	-	○
<i>Diploneis</i> spp.	-	○	-
<i>Navicula</i> spp.	○	○	○
<i>Trachyneis</i> spp.	-	○	-
<i>Seminavis</i> spp.	○	○	-
<i>Haslea</i> spp.	○	○	○
<i>Cymatoneis</i> spp.	-	○	-
<i>Fistulifera</i> spp.	○	○	-
<i>Hippodonta</i> spp.	-	○	-
<i>Envekadea</i> spp.	-	○	-
<i>Gyrosigma</i> spp.	○	○	-
<i>Plagiotropis</i> spp.	-	-	○
<i>Meuniera</i> spp.	○	○	-
<i>Stauroneis</i> spp.	-	○	-
<i>Craticula</i> spp.	○	○	-
<i>Astartiella</i> spp.	-	○	-
<i>Dorofeyukea</i> spp.	-	○	-
<i>Schizostauron</i> spp.	○	○	-
<i>Amphora</i> spp.	-	○	○
<i>Psammodictyon</i> spp.	○	-	-
<i>Tryblionella</i> spp.	○	○	-
<i>Cymbellonitzschia</i> spp.	-	○	-
<i>Nitzschia</i> spp.	○	○	○
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	○	○	○
<i>Cylindrotheca</i> spp.	○	○	○
<i>Entomoneis</i> spp.	○	○	○
<i>Surirella</i> spp.	-	○	-
<i>Campylodiscus</i> spp.	○	-	-
<i>Cymatopleura</i> spp.	○	-	-
Monoraphid diatom	-	○	-
出現属数	28	35	11

各手法によって検出された微細藻類属を○で示した。

属が不明な微細藻類に関しては可能な限り下位の分類名を表記した。

Table. 2-4

psbAおよびrbcLに基づくDNA-MB、SEM観察により検出された珪藻以外の微細藻類等.

綱以上	属	DNA-MB		SEM観察
		psbA	rbcL	
不等毛藻	<i>Heterosigma</i> spp.	○	○	-
不等毛藻	<i>Ochromonas</i> spp.	○	○	-
不等毛藻	<i>Nannochloropsis</i> spp.	○	-	-
不等毛藻	Heterokontophyta	-	○	-
不等毛藻	Pelagophyceae	-	○	-
不等毛藻	<i>Aurearena</i> spp.	○	-	-
不等毛藻	<i>Synura</i> spp.	○	-	-
不等毛藻	<i>Dictyocha</i> spp.	-	-	○
不等毛藻	<i>Phaeosaccion</i> spp.	○	-	-
渦鞭毛藻	<i>Dinophysis</i> spp.	○	-	-
渦鞭毛藻	<i>Heterocapsa</i> spp.	○	-	-
渦鞭毛藻	<i>Kryptoperidinium</i> spp.	○	-	-
渦鞭毛藻	<i>Prorocentrum</i> spp.	○	-	-
渦鞭毛藻	<i>Protodinium</i> spp.	○	-	-
渦鞭毛藻	Dinophyta	-	○	-
クリプト藻	<i>Chroomonas</i> spp.	○	-	-
クリプト藻	<i>Falcomonas</i> spp.	○	-	-
クリプト藻	<i>Rhodomonas</i> spp.	○	-	-
クリプト藻	<i>Teleaulax</i> spp.	○	-	-
ハプト藻	<i>Prymnesium</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Bathycoccus</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Chlorella</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Diclostera</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Micractinium</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Oocystis</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Planctonema</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Tetraselmis</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Eutreptiella</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Micromonas</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Ostreococcus</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Prasinoderma</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Pyramimonas</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Protosiphon</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Ankyra</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Asterarcys</i> spp.	-	○	-
緑藻	<i>Mychonastes</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Pseudopediastrium</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Raphidocelis</i> spp.	○	-	-
緑藻	<i>Choricystis</i> spp.	○	-	-
緑藻	Trebouxiophyceae	○	-	-
藍藻	<i>Cyanobacterium</i> spp.	○	-	-
藍藻	<i>Aphanizomenon</i> spp.	○	-	-
藍藻	<i>Cyanothece</i> spp.	○	-	-
藍藻	<i>Cyanobium</i> spp.	○	-	-
藍藻	<i>Synechococcus</i> spp.	○	-	-
繊毛虫	<i>Mesodinium</i> spp.	○	-	-
有殻糸状根足虫	<i>Pauliella</i> spp.	-	○	-
ファージ	Phage	○	-	-
	出現属数	42	7	1

各手法によって検出された微細藻類属を○で示した。

属が不明な微細藻類に関しては可能な限り下位の分類名を表記した。

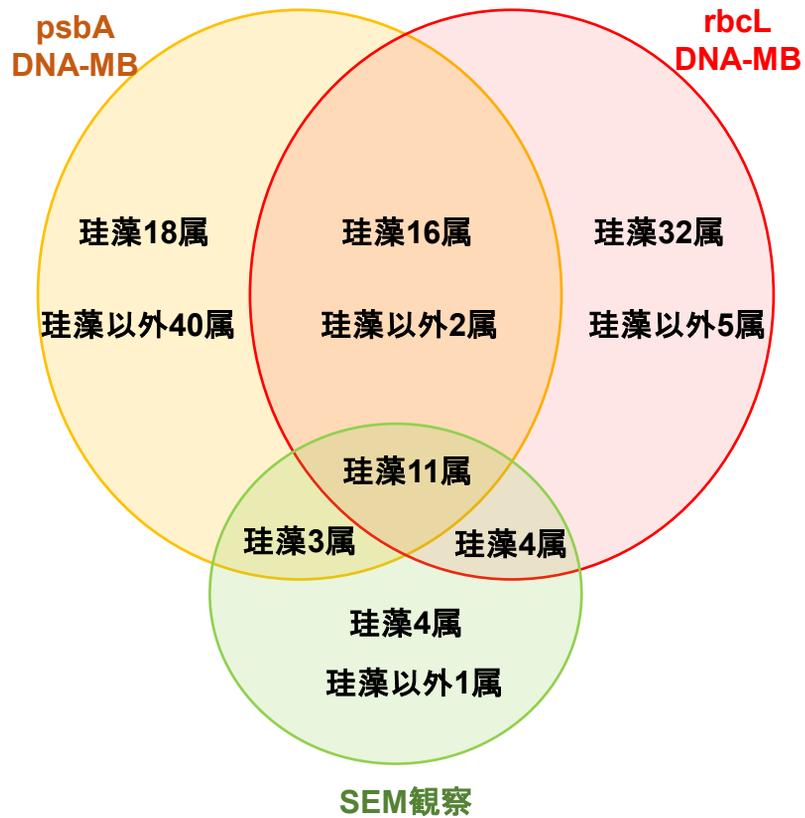


Fig. 2-2  
 psbAおよびrbcLに基づくDNA-MB、SEM 観察によって検出された微細藻類の属数.

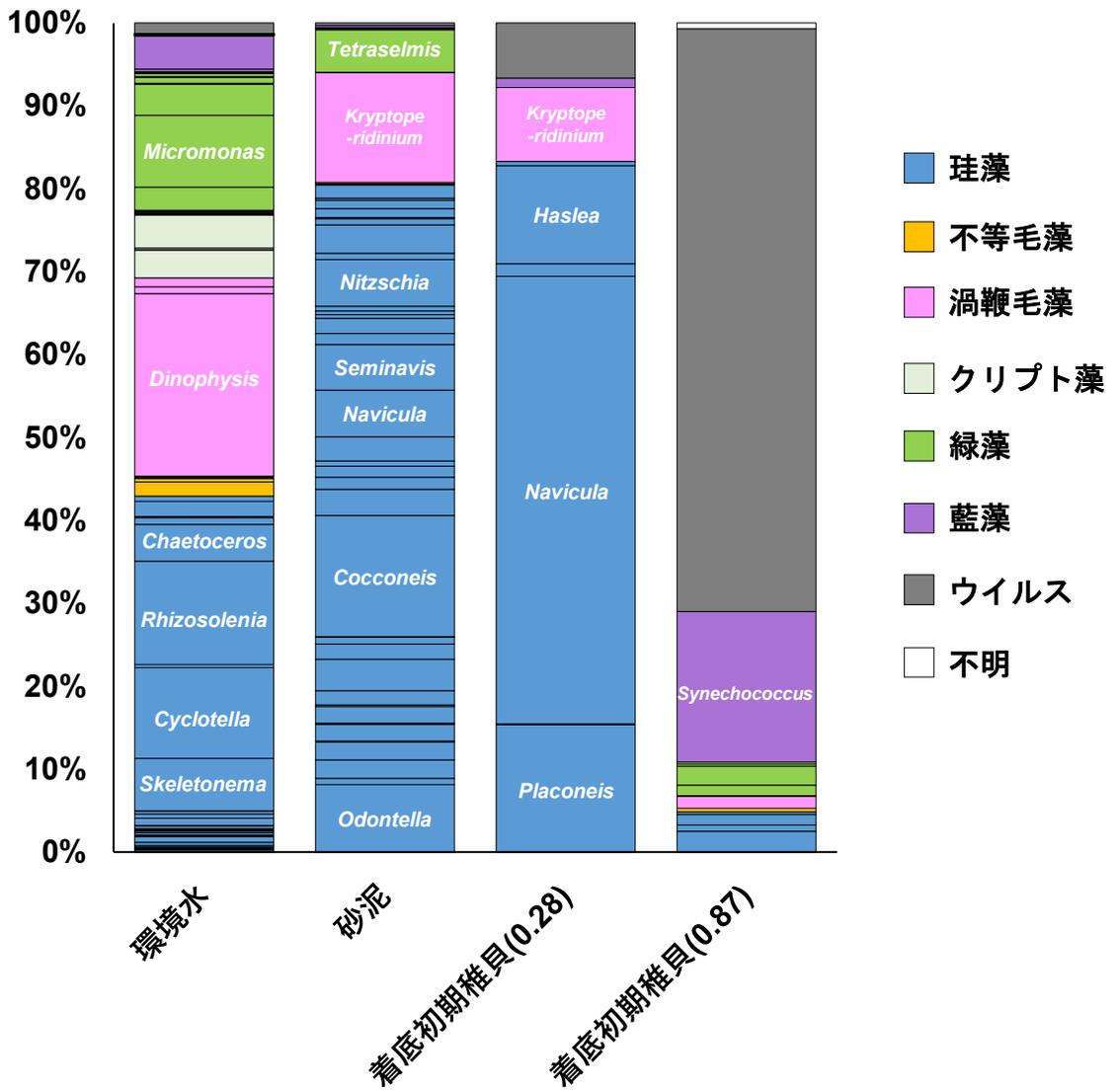


Fig. 2-3

psbAに基づくDNA-MBにより、志登茂川河口の環境水・環境砂泥・着底初期稚貝2個体から検出された微細藻類の属組成。

( ) 内の数字はアサリの殻長 (mm) を示す。

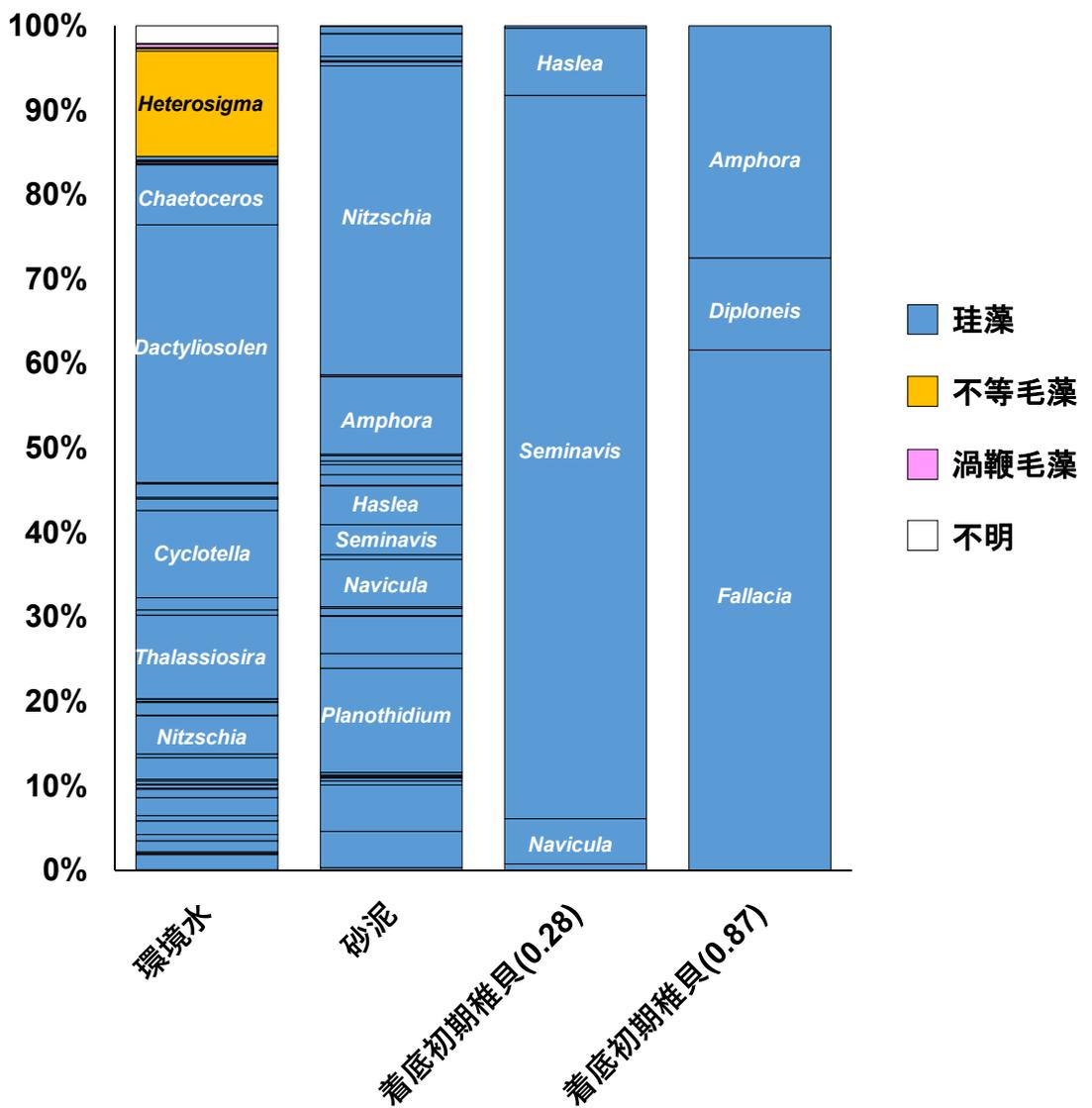


Fig. 2-4  
 rbcLに基づくDNA-MBにより、志登茂川河口の環境水・環境砂泥・着底初期稚貝2個体から検出された微細藻類の属組成。  
 ( )内の数字はアサリの殻長(mm)を示す。

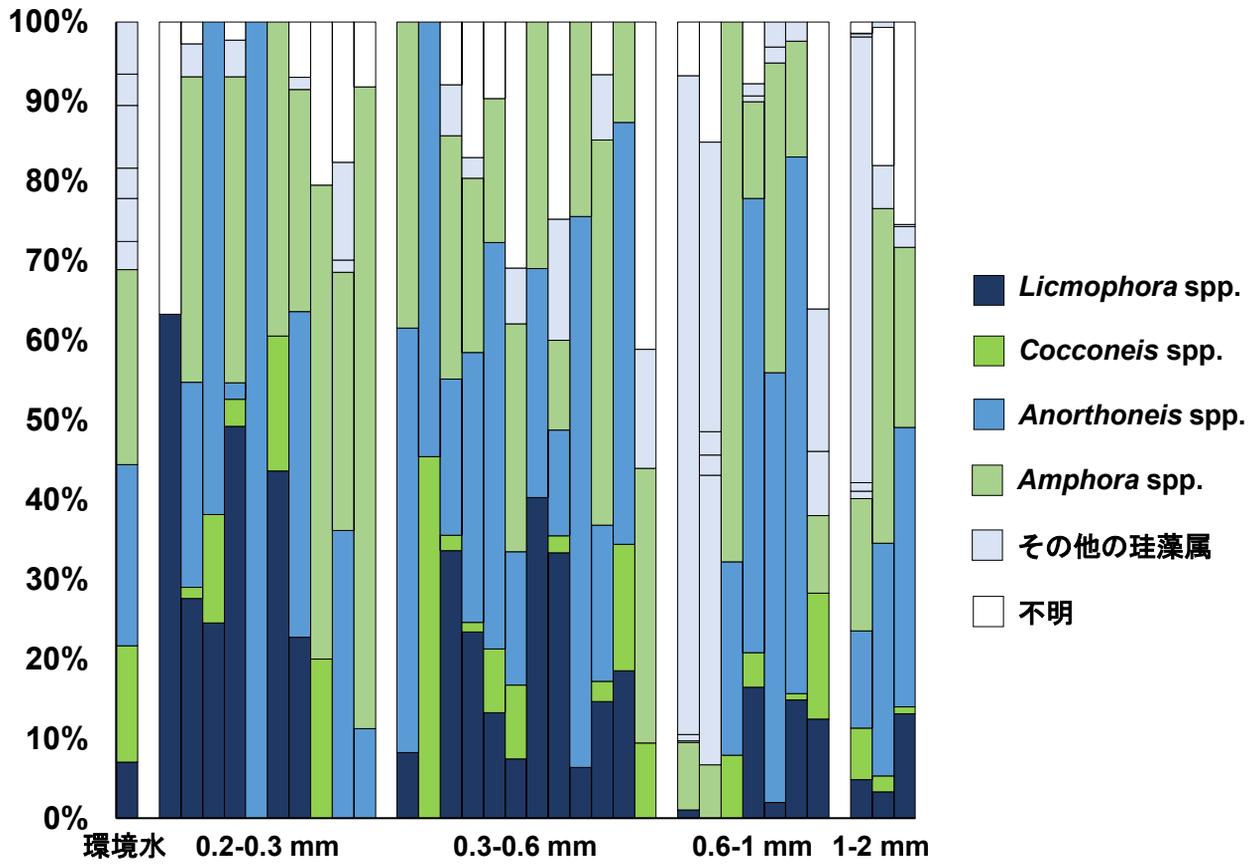


Fig. 2-5  
SEM観察により志登茂川河口の環境水、着底初期稚貝29個体、稚貝3個体から検出された微細藻類の属組成.

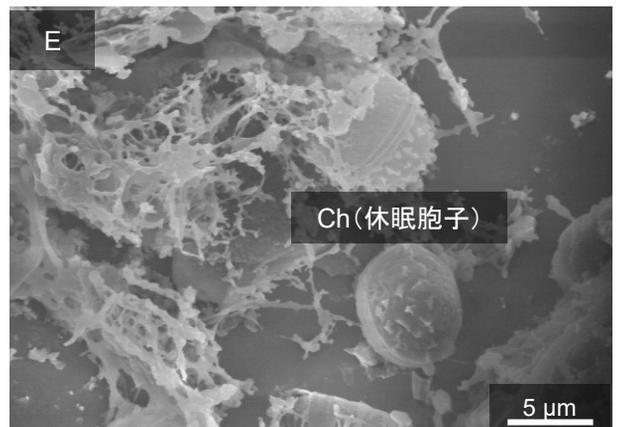
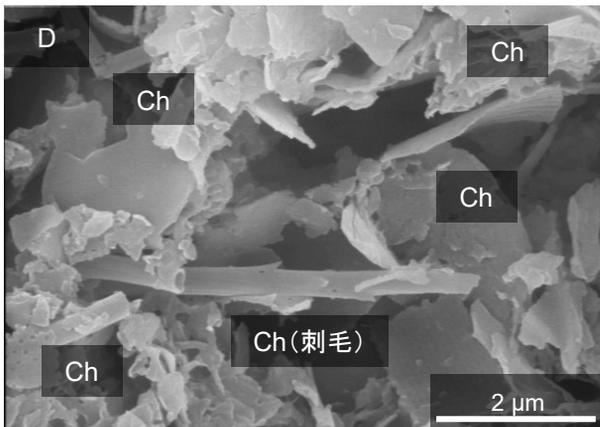
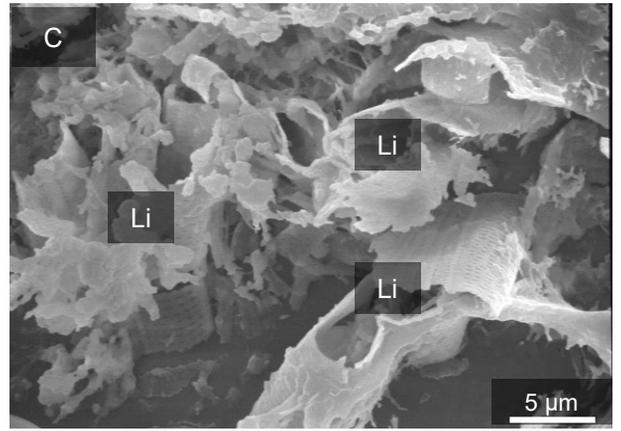
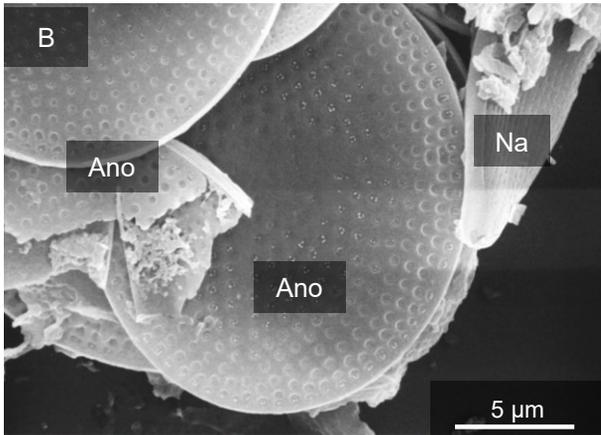
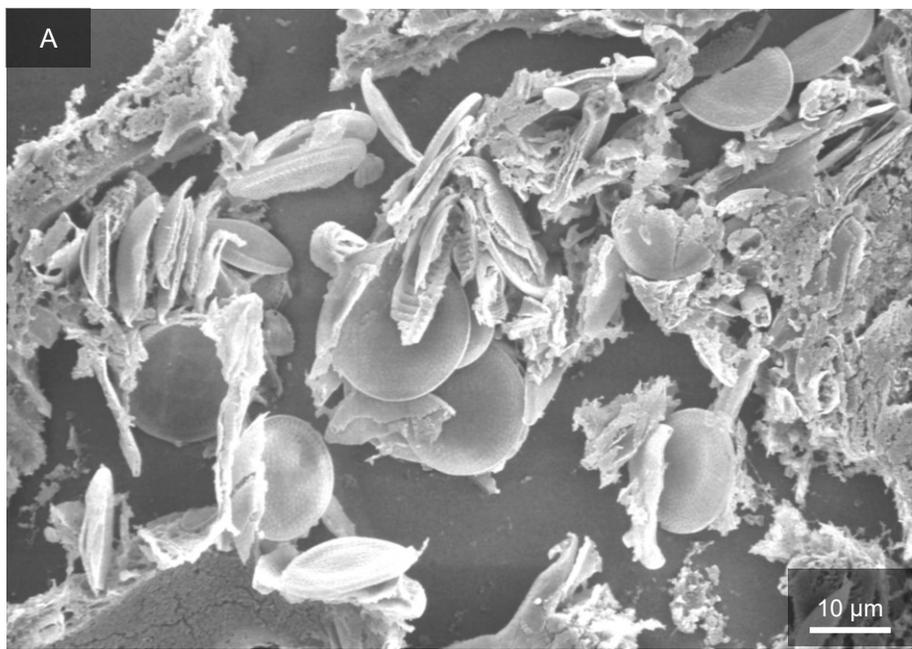


Fig. 2-6

志登茂川河口のアサリ着底初期稚貝、稚貝の消化管内で観察された珪藻のSEM画像.

A: 殻長0.6 mmの着底初期稚貝消化管の断面

B: 殻長0.6 mmの着底初期稚貝消化管中の底生珪藻の2属(非破壊).

C: 殻長0.3~0.6 mmの着底初期稚貝消化管中の*Licmophora* spp.(破壊).

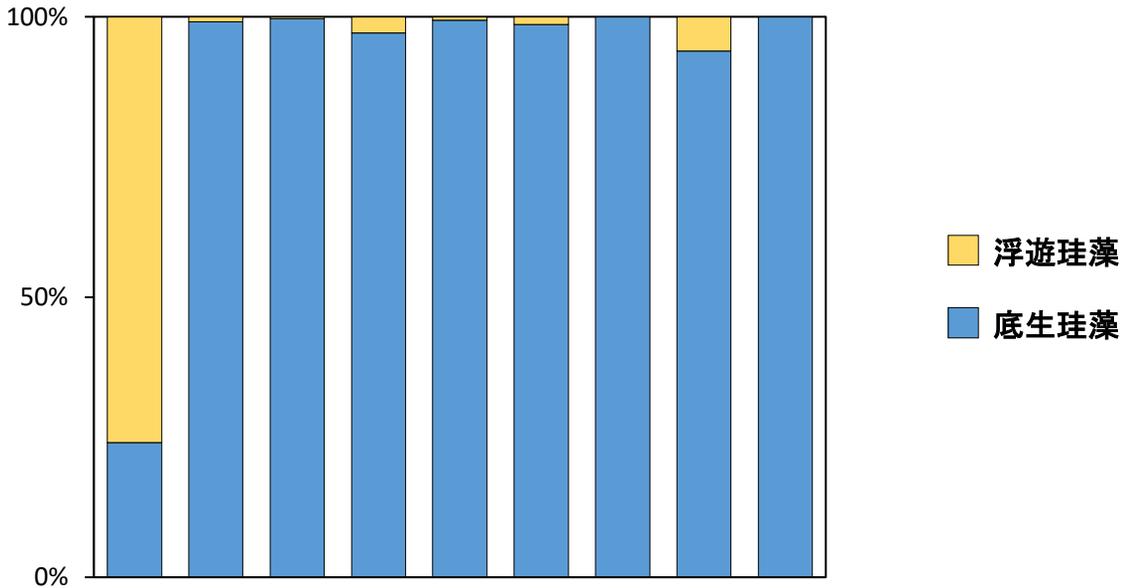
D: 殻長0.8 mmの着底初期稚貝消化管中の*Chaetoceros* spp.の刺毛(破壊).

E: 殻長1 mmの稚貝消化管中の*Chaetoceros* spp.の休眠孢子(非破壊).

Ano: *Anorthoneis* spp., Na: *Navicula* spp., Li: *Licmophora* spp.,

Ch: *Chaetoceros* spp..

A



B

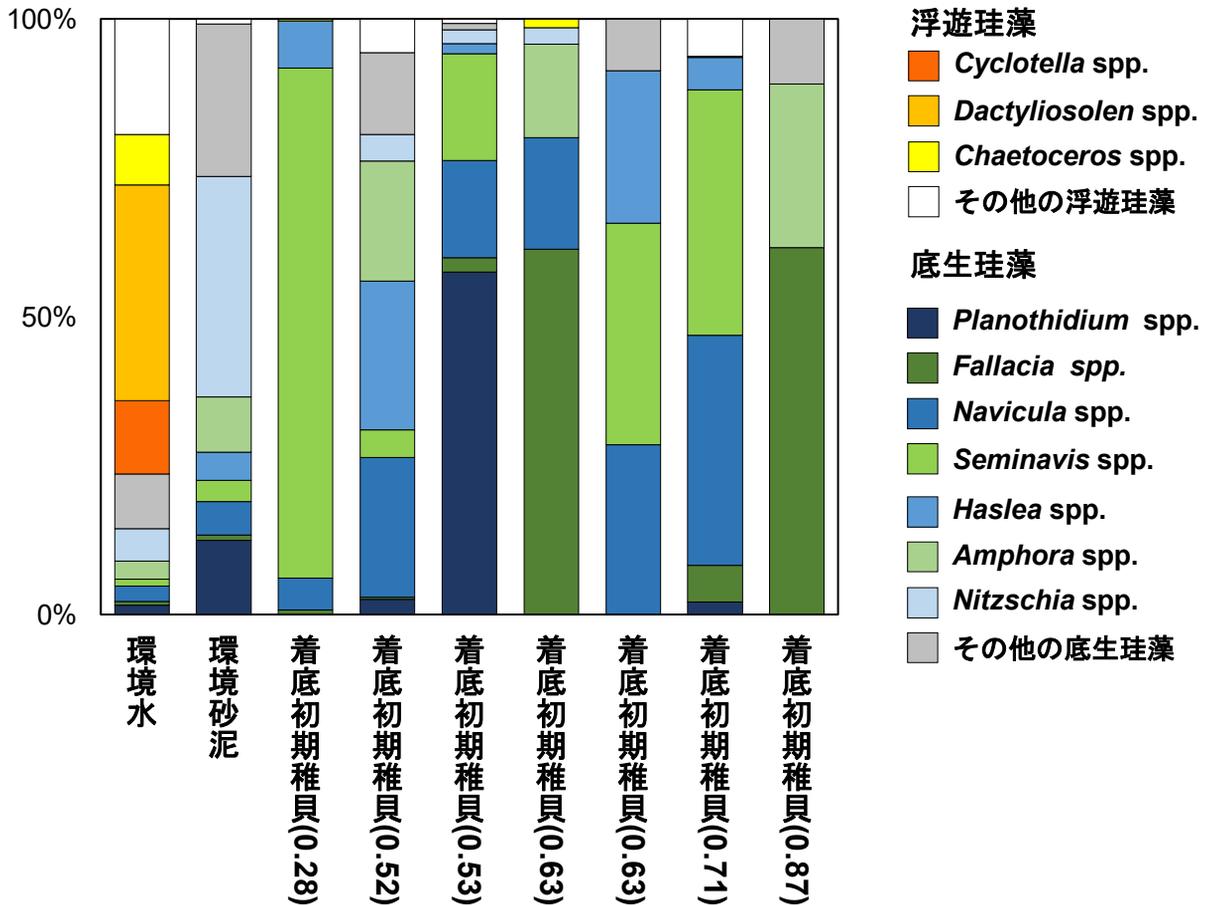


Fig. 3-1

2020年6月9日志登茂川河口における環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻属組成. ( )内の数字はアサリの殻長(mm)を示す.

A: 浮遊珪藻および底生珪藻の割合.

B: 優占した属の組成.

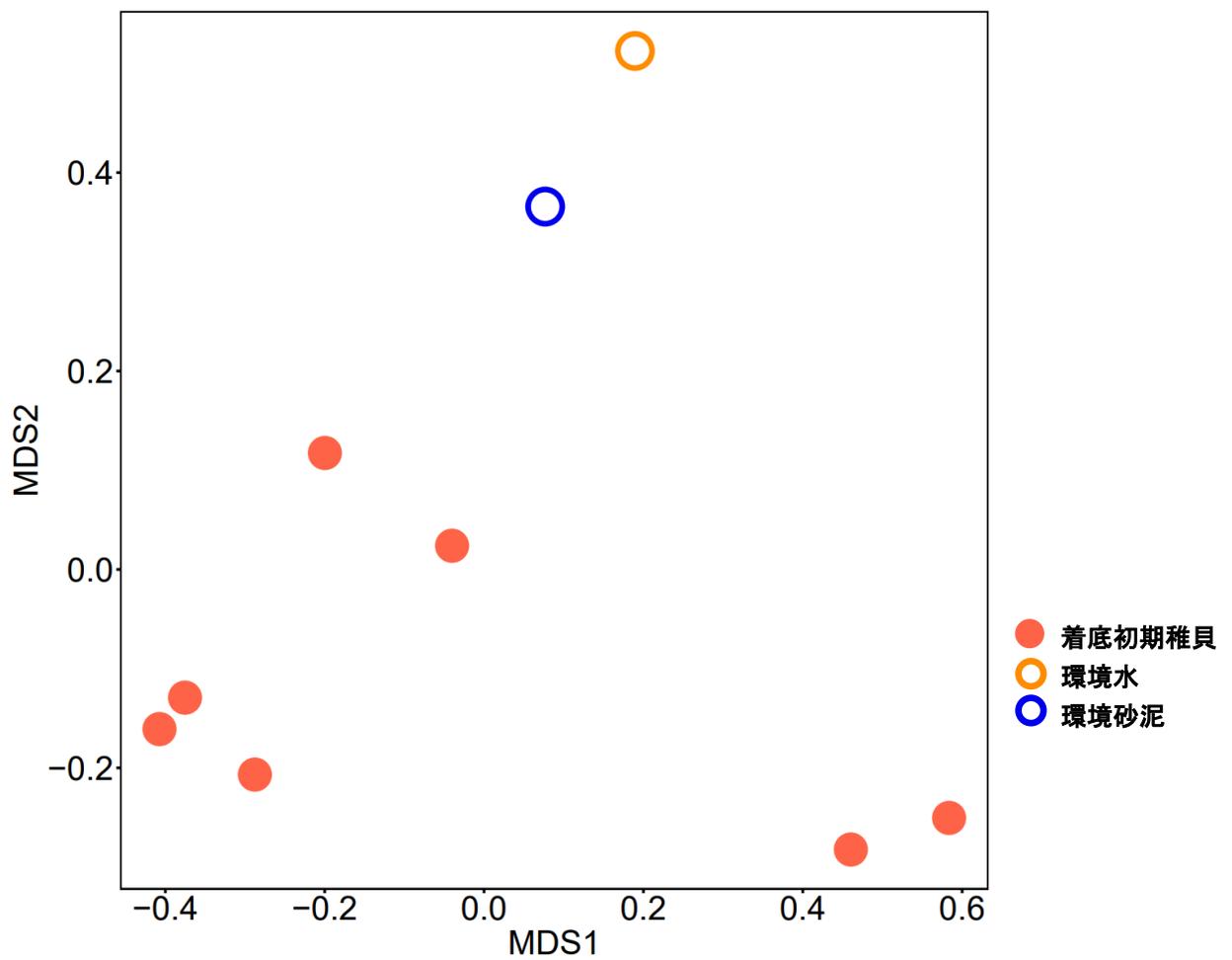
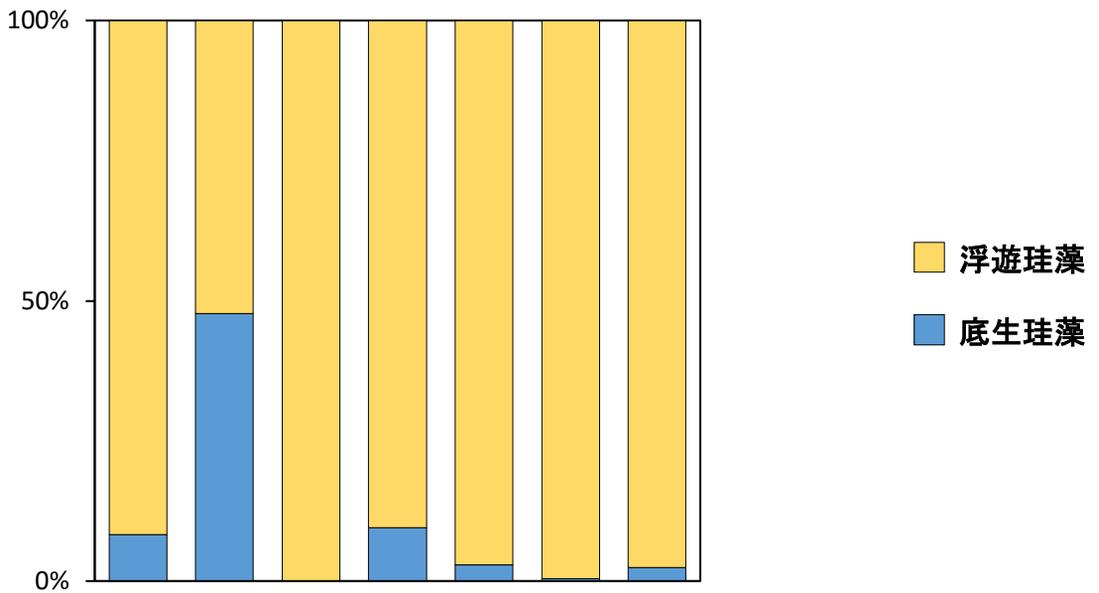


Fig. 3-2  
2020年6月9日志登茂川河口において採集されたアサリ、環境水、環境砂泥中の珪藻属組成のMorisita指数に基づくMDSマップ。

**A**



**B**

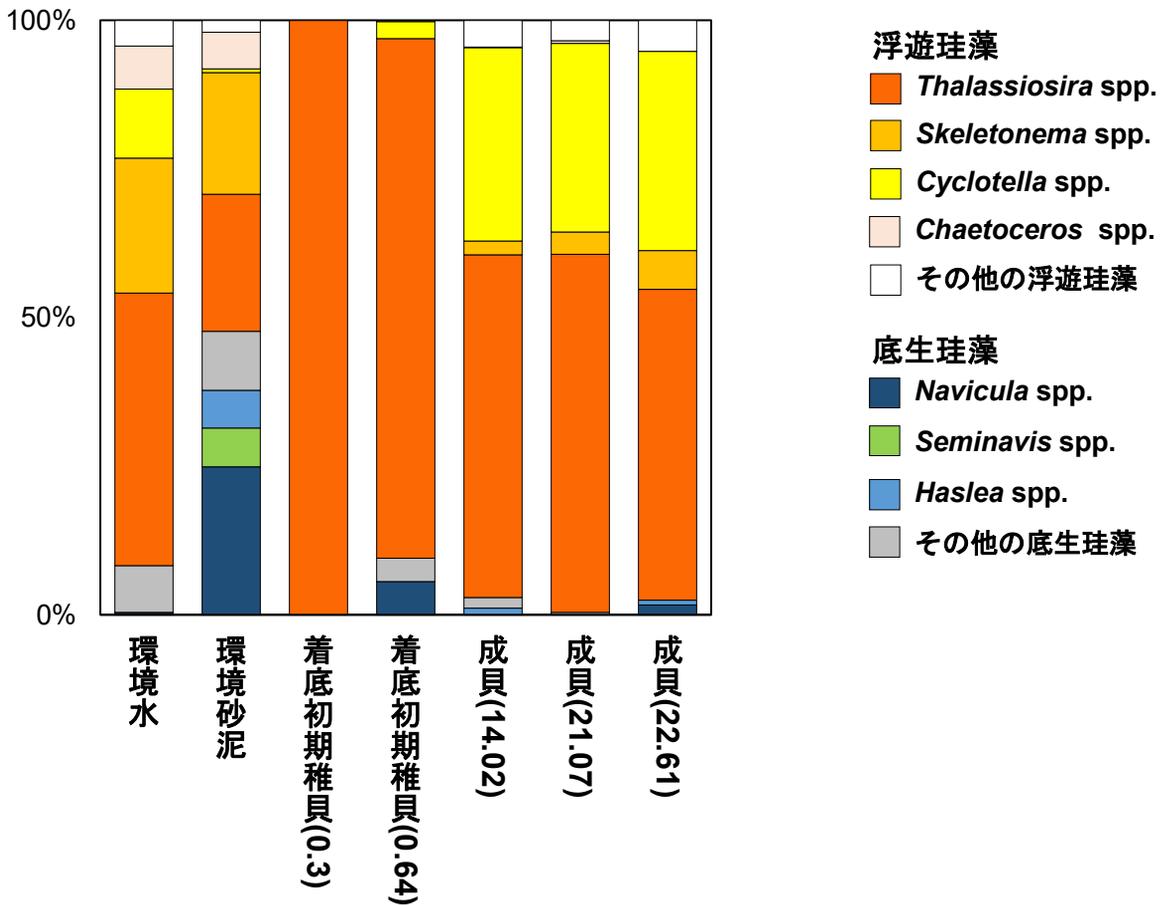


Fig. 3-3

2022年7月18日志登茂川河口における環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻属組成. ( )内の数字はアサリの殻長(mm)を示す.

A: 浮遊珪藻および底生珪藻の割合.

B: 優占した属の組成.

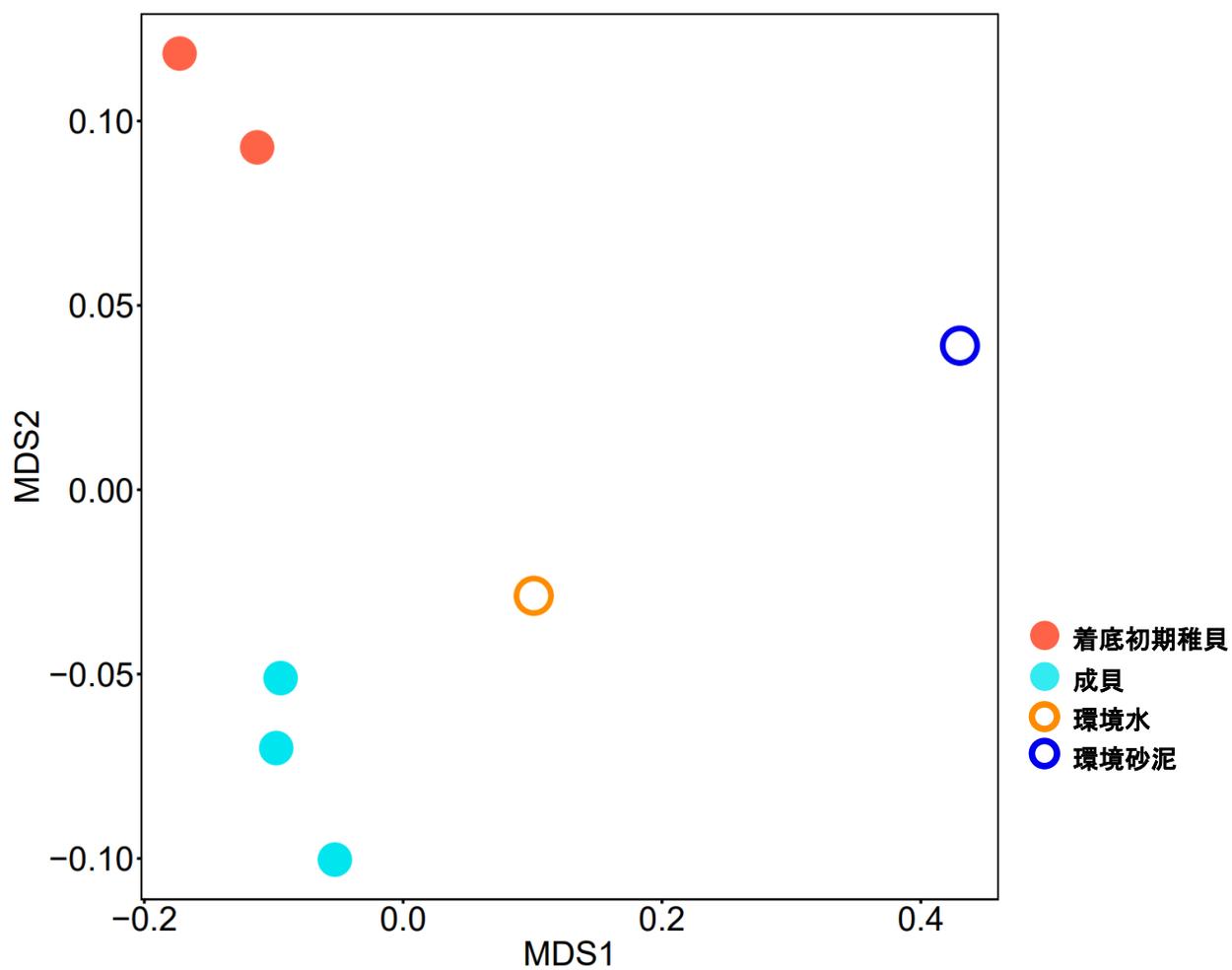
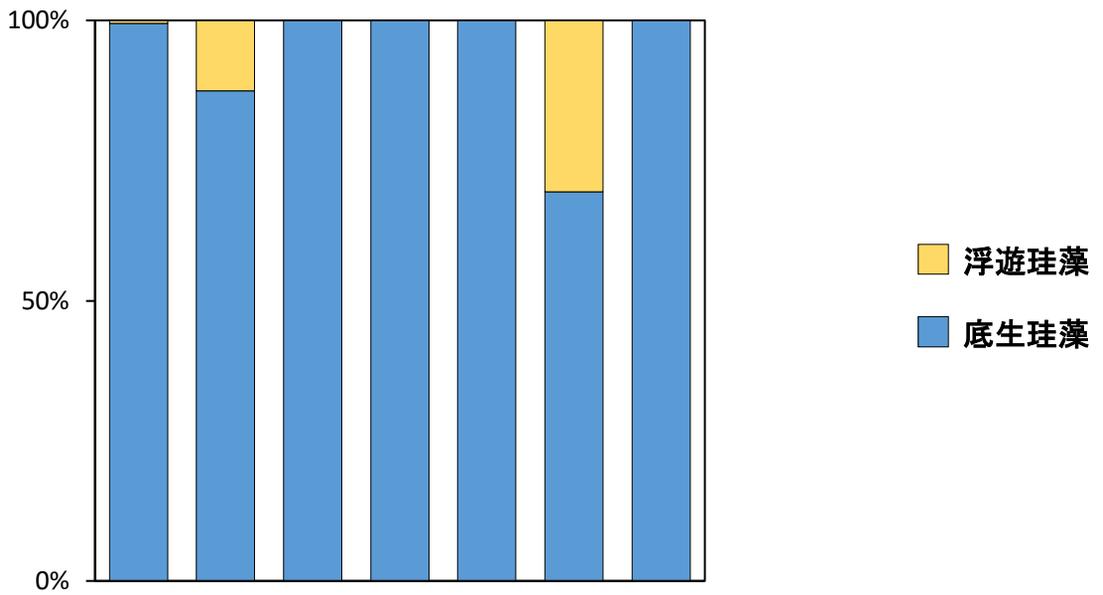


Fig. 3-4  
 2022年7月18日志登茂川河口において採集されたアサリ、環境水、環境砂泥中の珪藻属組成のMorisita指数に基づくMDSマップ。

**A**



**B**

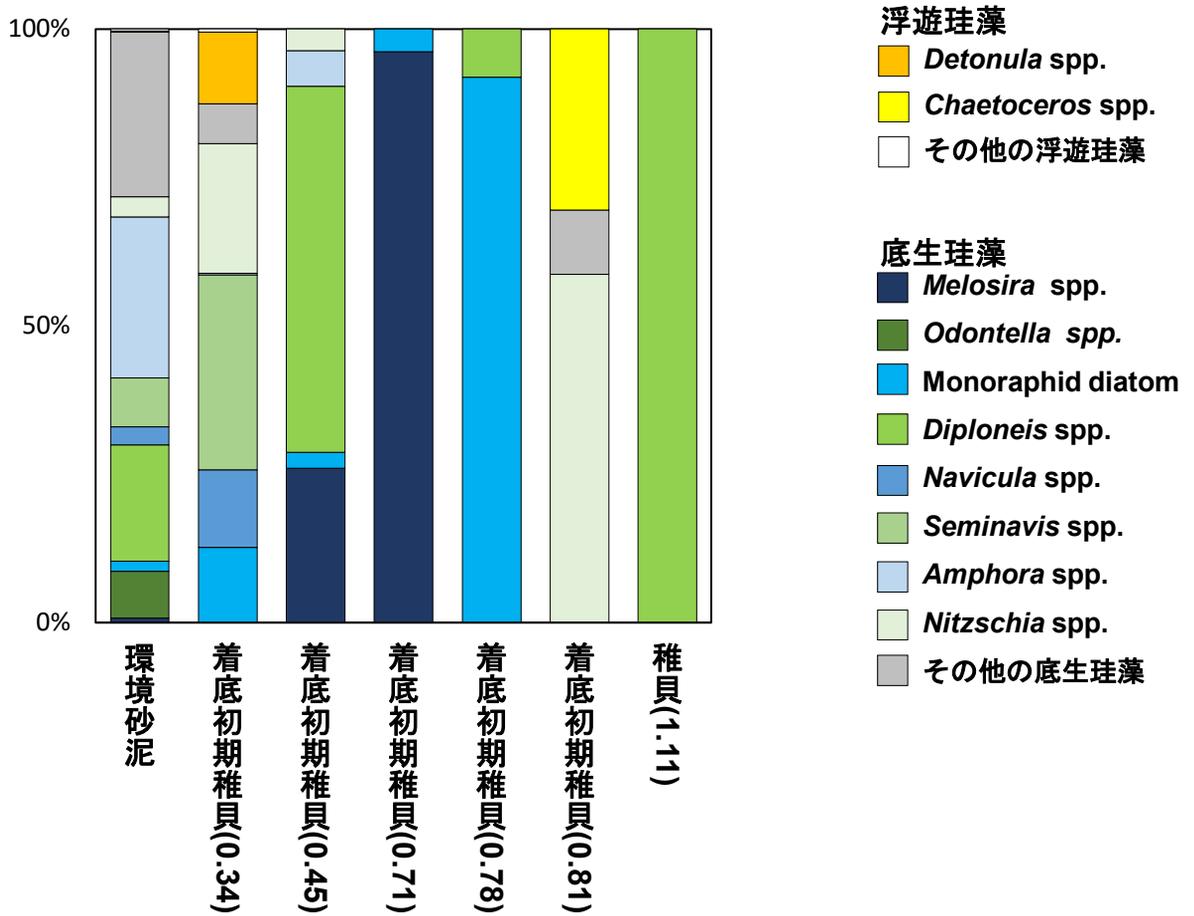


Fig. 3-5

2020年11月12日阿蘇海における環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻属組成。

( )内の数字はアサリの殻長(mm)を示す。

A: 浮遊珪藻および底生珪藻の割合。

B: 優占した属の組成。

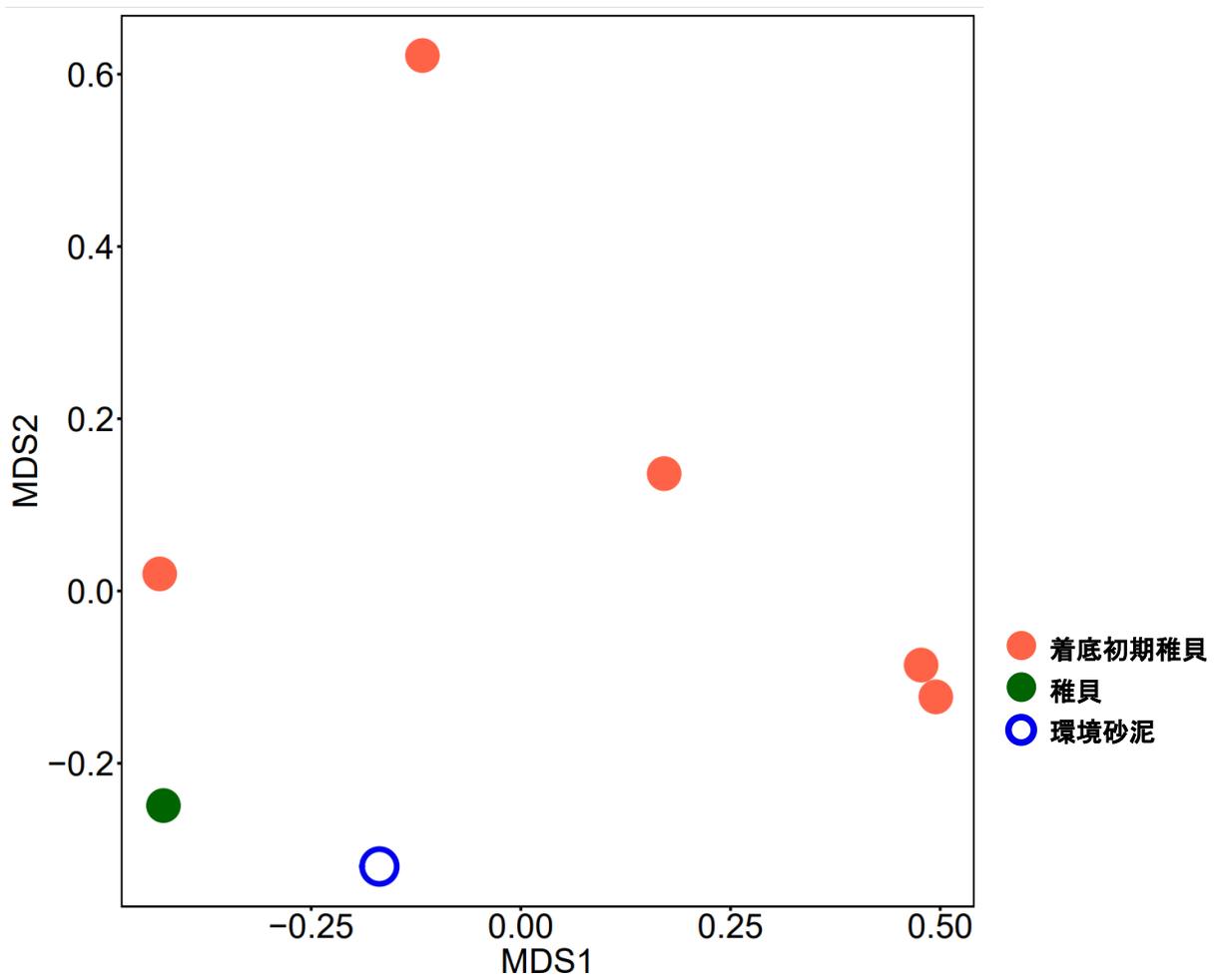


Fig. 3-6

2020年11月12日阿蘇海において採集されたアサリ、環境砂泥中の珪藻属組成のMorisita指数に基づくMDSマップ。

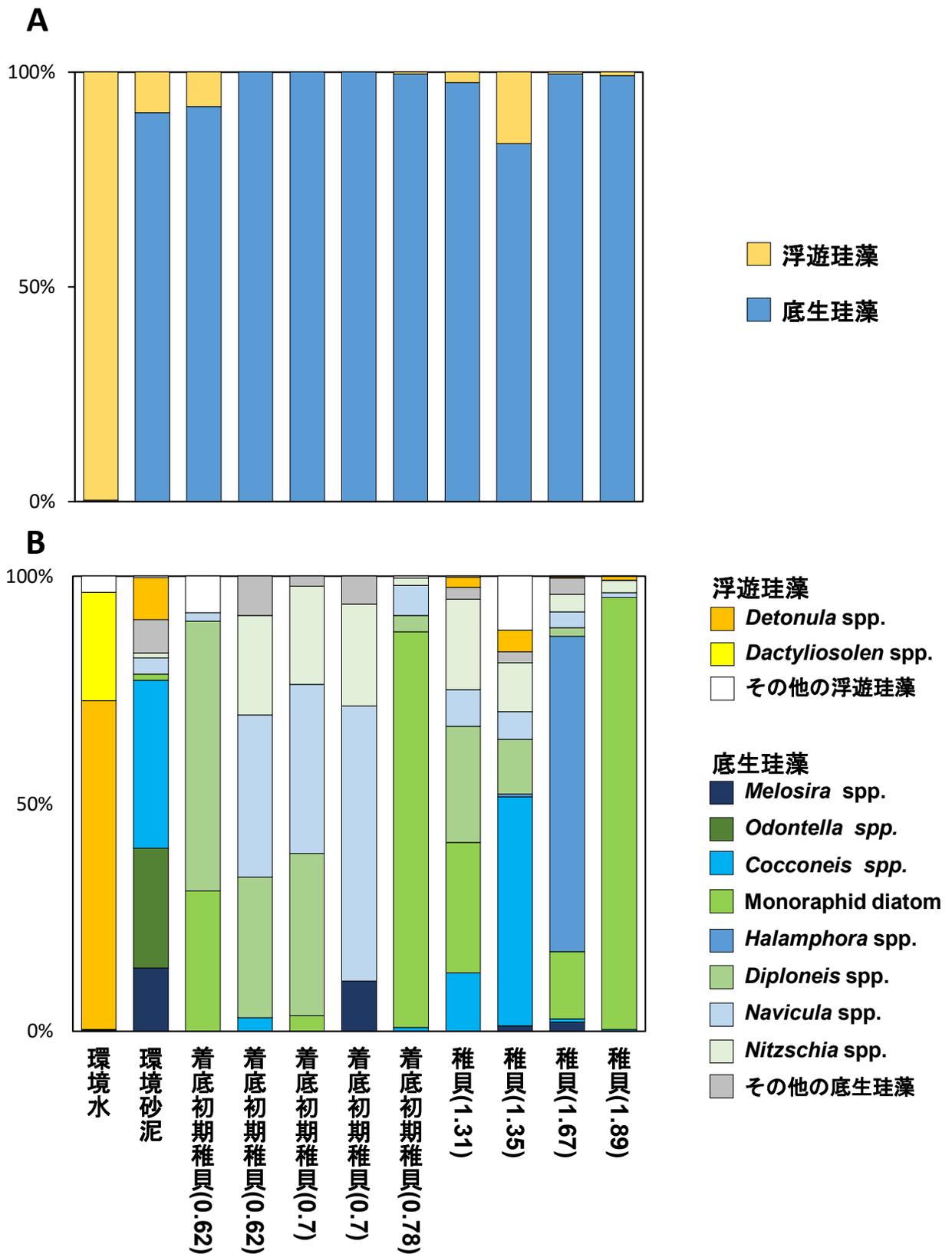


Fig. 3-7

2021年3月22日阿蘇海における環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻属組成. ( )内の数字はアサリの殻長(mm)を示す.

A: 浮遊珪藻および底生珪藻の割合.

B: 優占した属の組成.

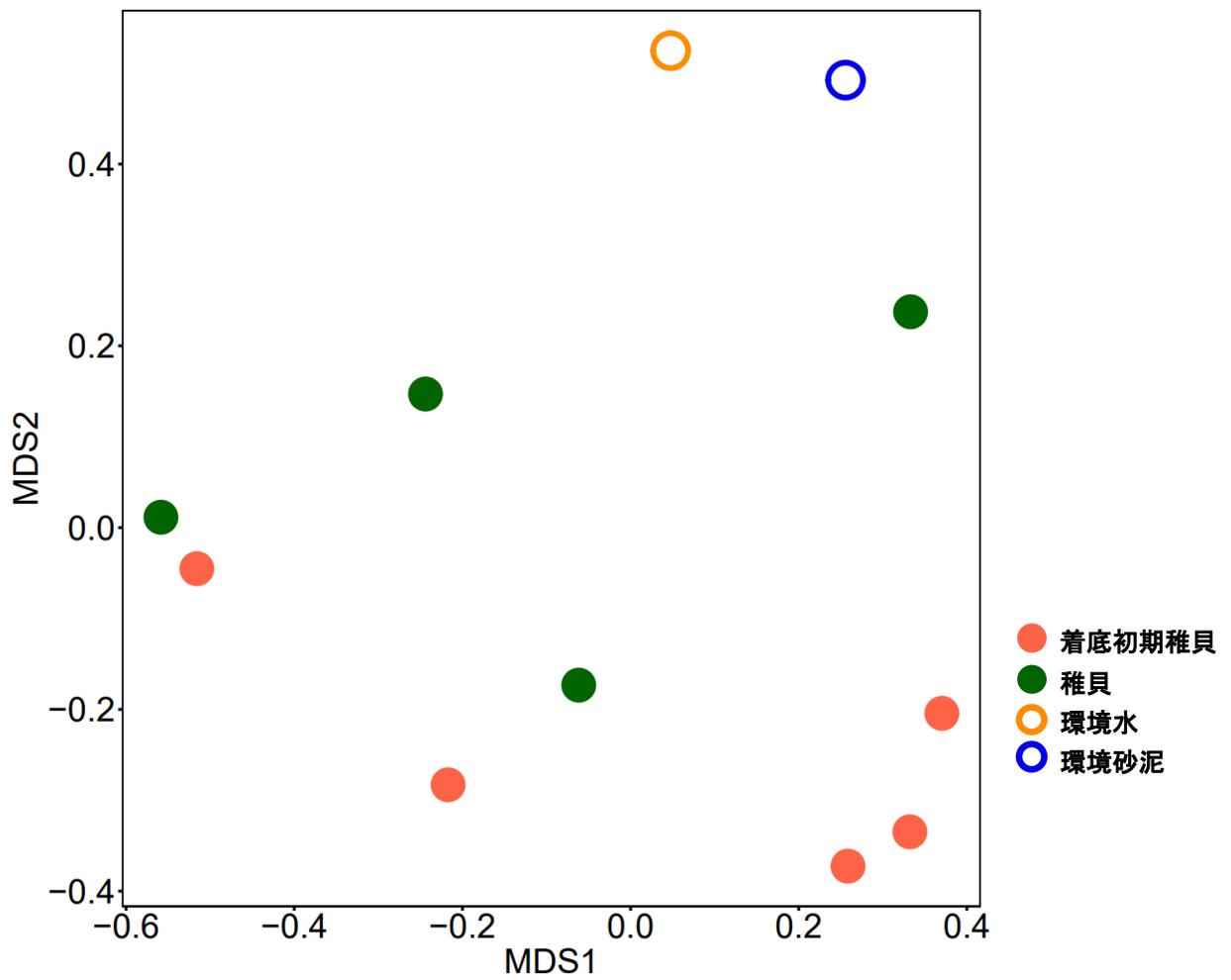


Fig. 3-8

2021年3月22日阿蘇海において採集されたアサリ・環境水・環境砂泥中の珪藻属組成のMorisita指数に基づくMDSマップ。

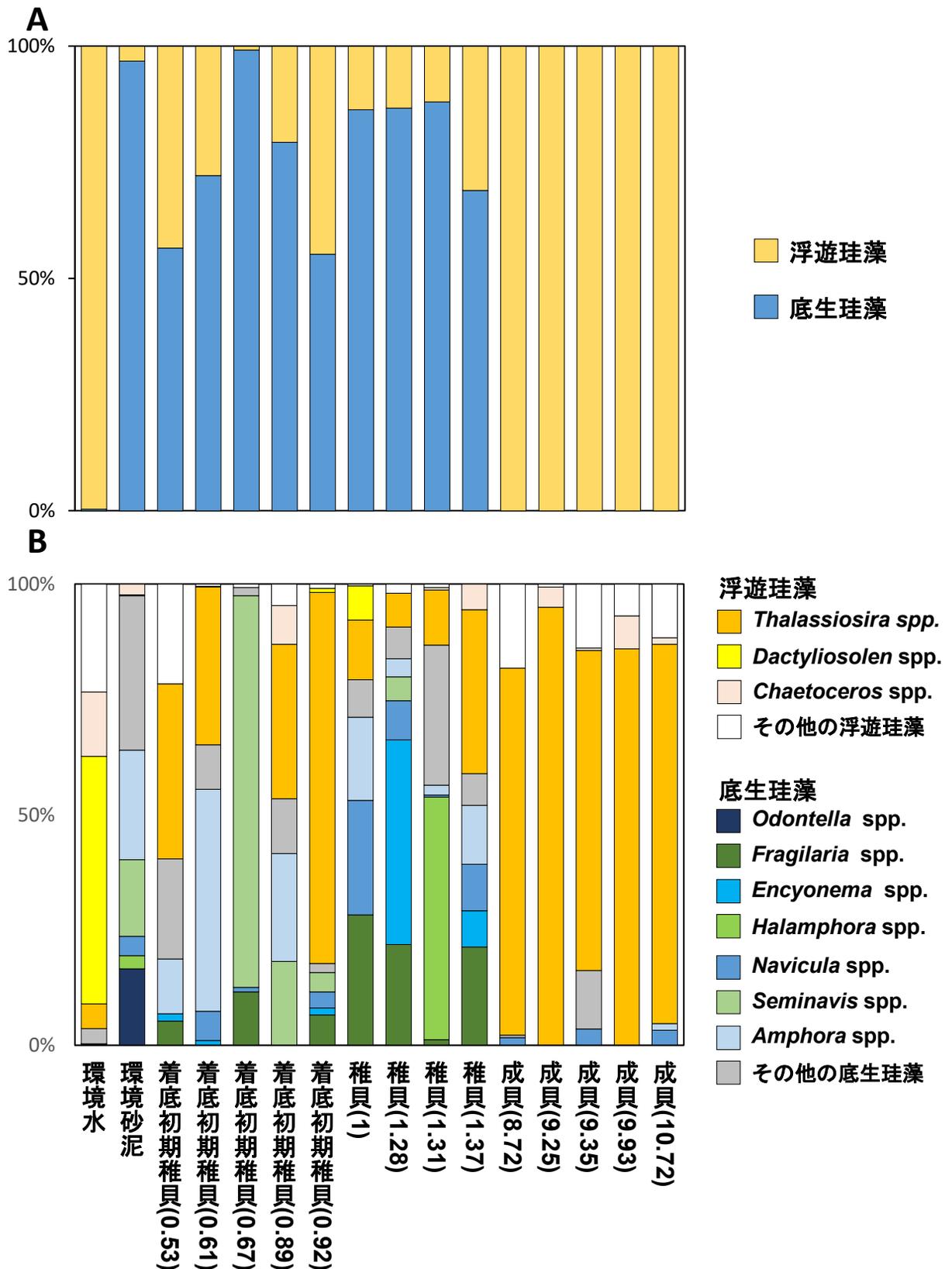


Fig. 3-9

2021年11月16日阿蘇海における環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻属組成。( )内の数字はアサリの殻長(mm)を示す。

A: 浮遊珪藻および底生珪藻の割合。

B: 優占した属の組成。

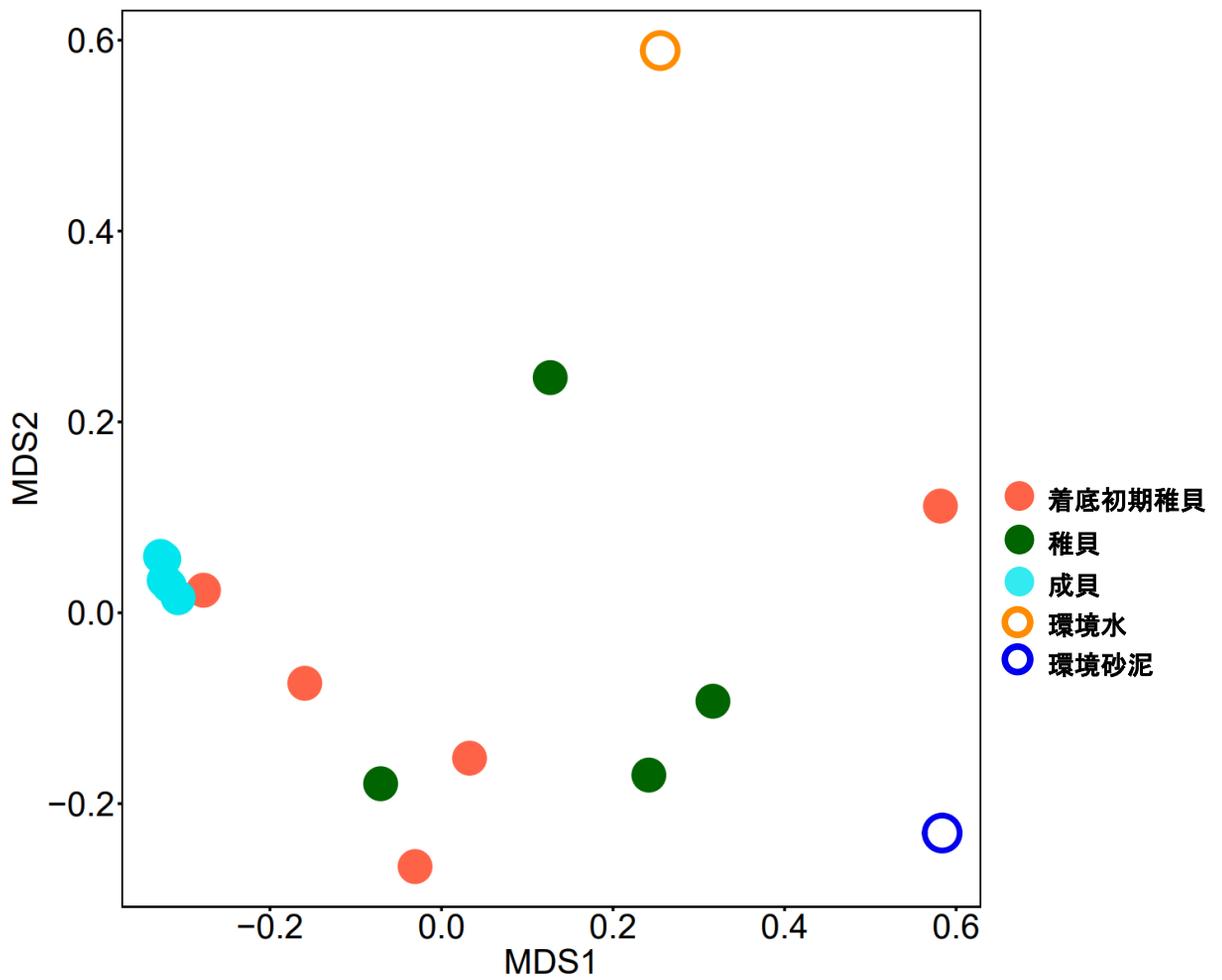


Fig. 3-10  
 2021年11月16日阿蘇海において採集されたアサリ、環境水、環境砂泥中の珪藻属組成のMorisita指数に基づくMDSマップ。

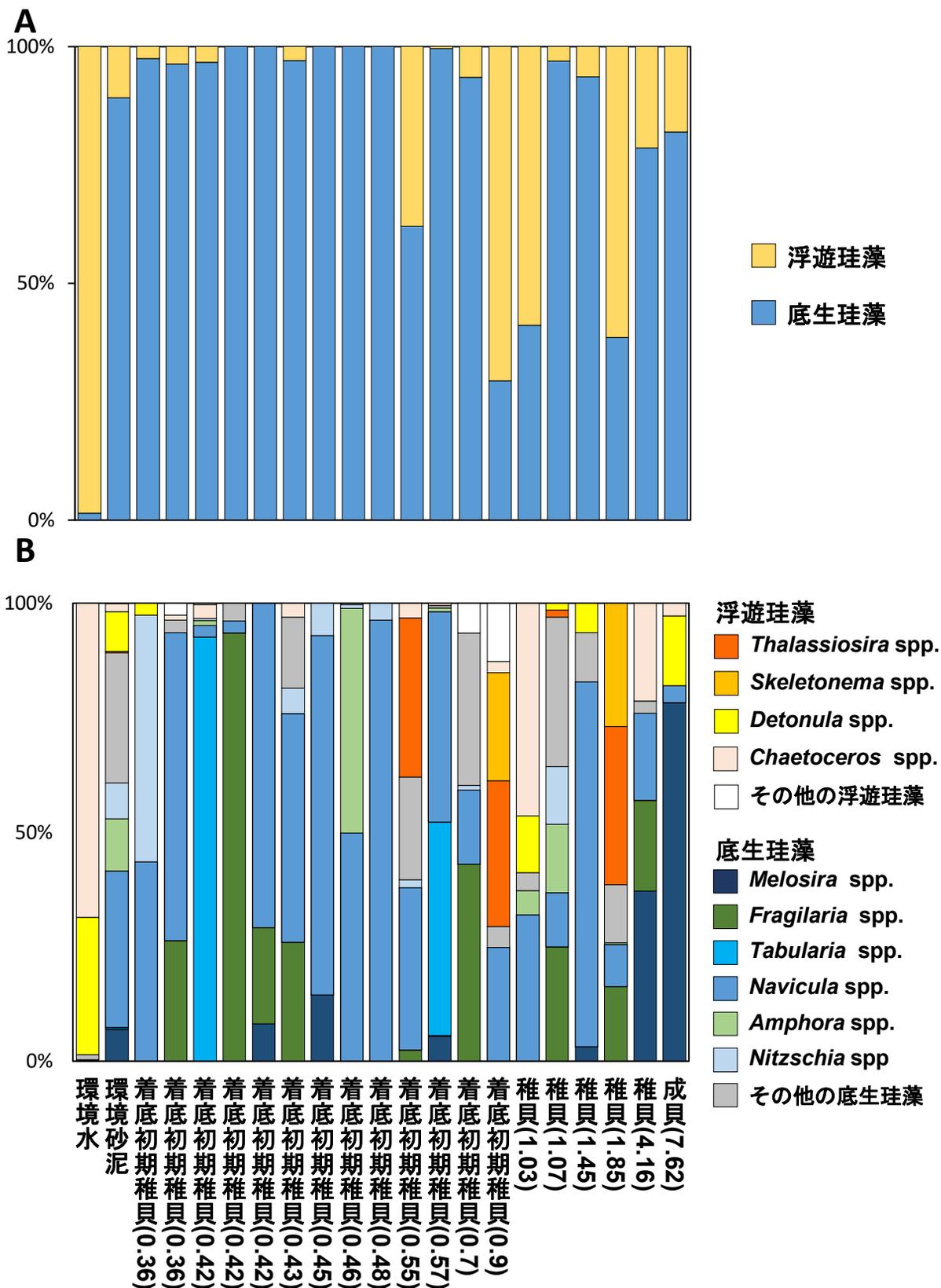


Fig. 3-11

2022年3月2日阿蘇海における環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻属組成。( )内の数字はアサリの殻長(mm)を示す。

A: 浮遊珪藻および底生珪藻の割合。

B: 優占した属の組成。

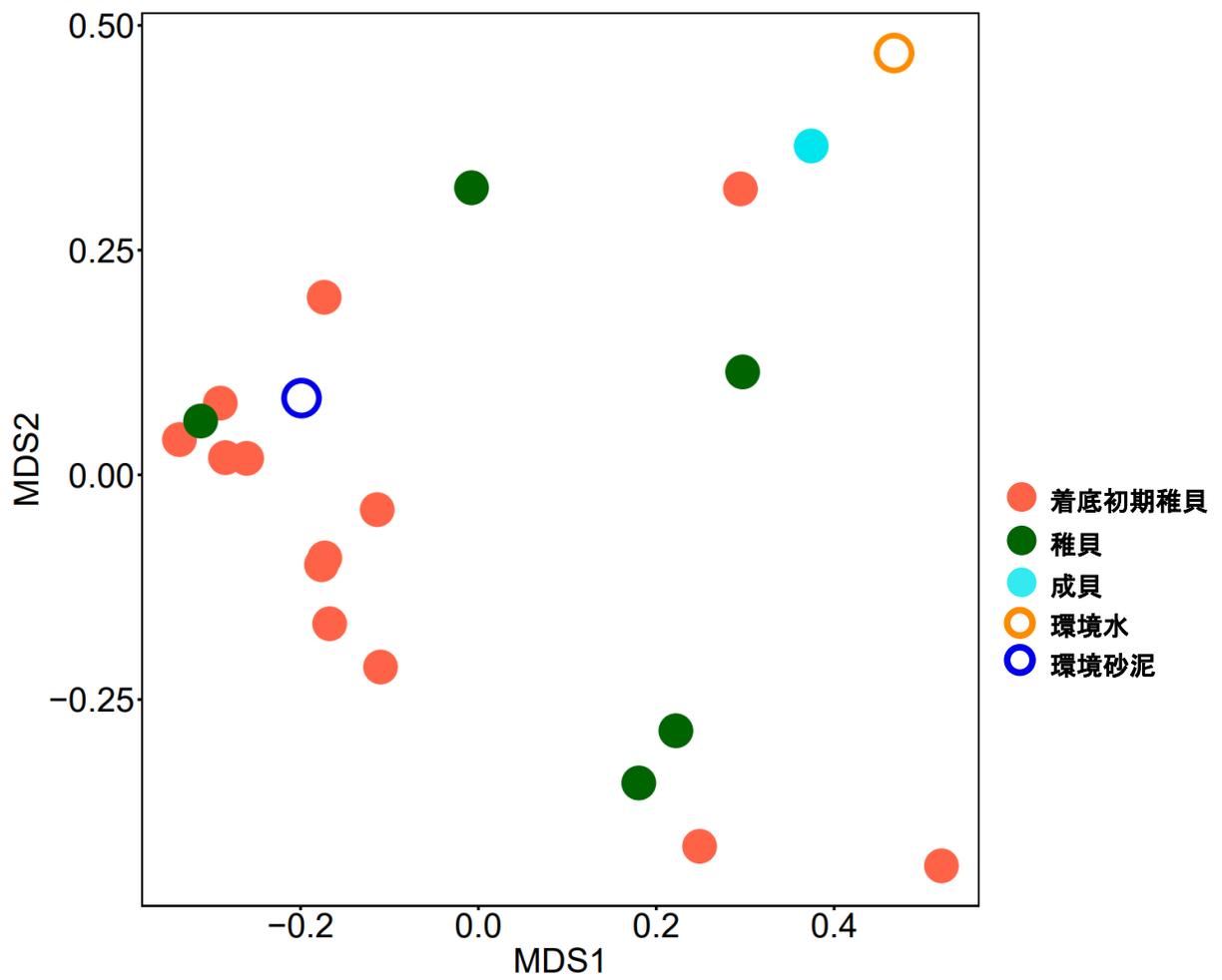


Fig. 3-12  
 2022年3月2日阿蘇海において採集されたアサリ、環境水、環境砂泥中の珪藻属組成のMorisita指数に基づくMDSマップ。

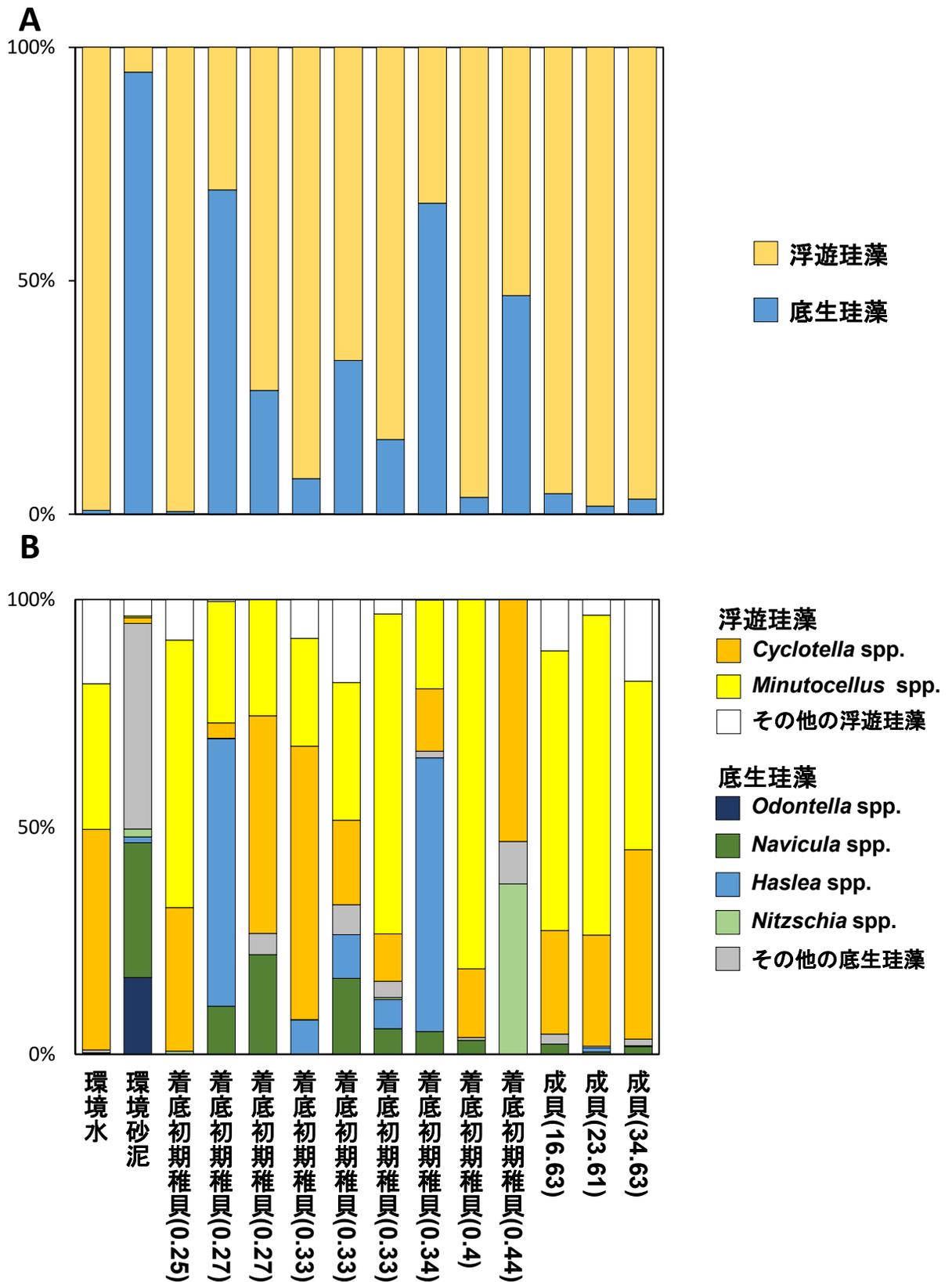


Fig. 3-13

2022年7月27日三河湾における環境水、環境砂泥、アサリ消化管中の珪藻属組成。( )内の数字はアサリの殻長(mm)を示す。

A: 浮遊珪藻および底生珪藻の割合。

B: 優占した属の組成。

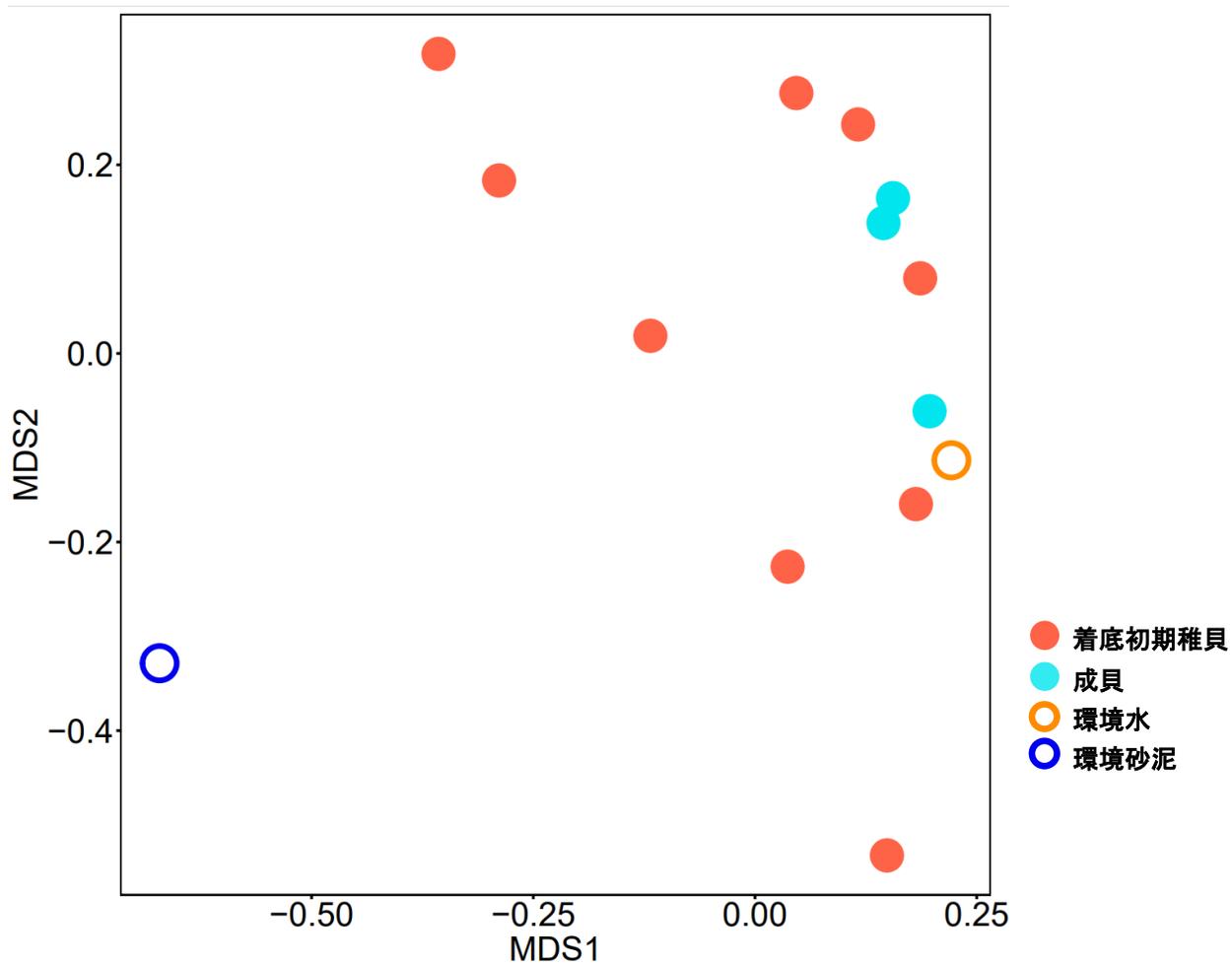


Fig. 3-14

2022年7月27日三河湾において採集されたアサリ、環境水、環境砂泥中の珪藻属組成のMorisita指数に基づくMDSマップ。

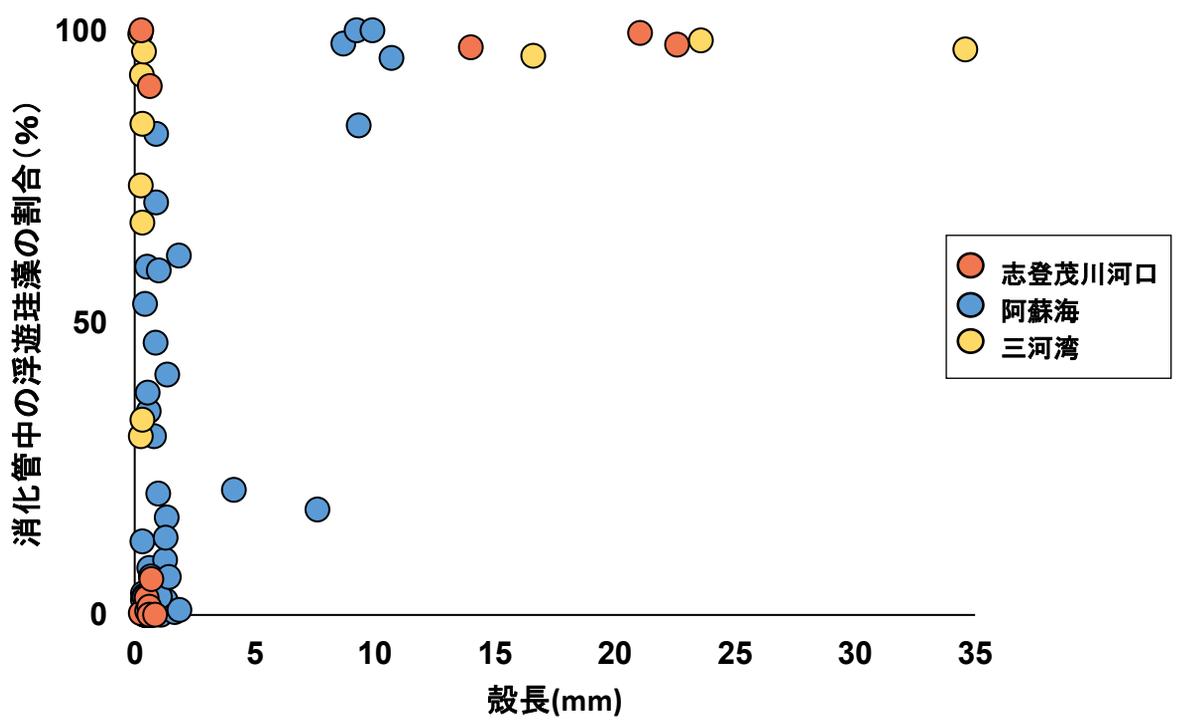


Fig. 3-15  
 アサリの殻長と、消化管中に占める浮遊珪藻の割合の関係.  
 2020年～2022年に採集された全ての試料を用いた.



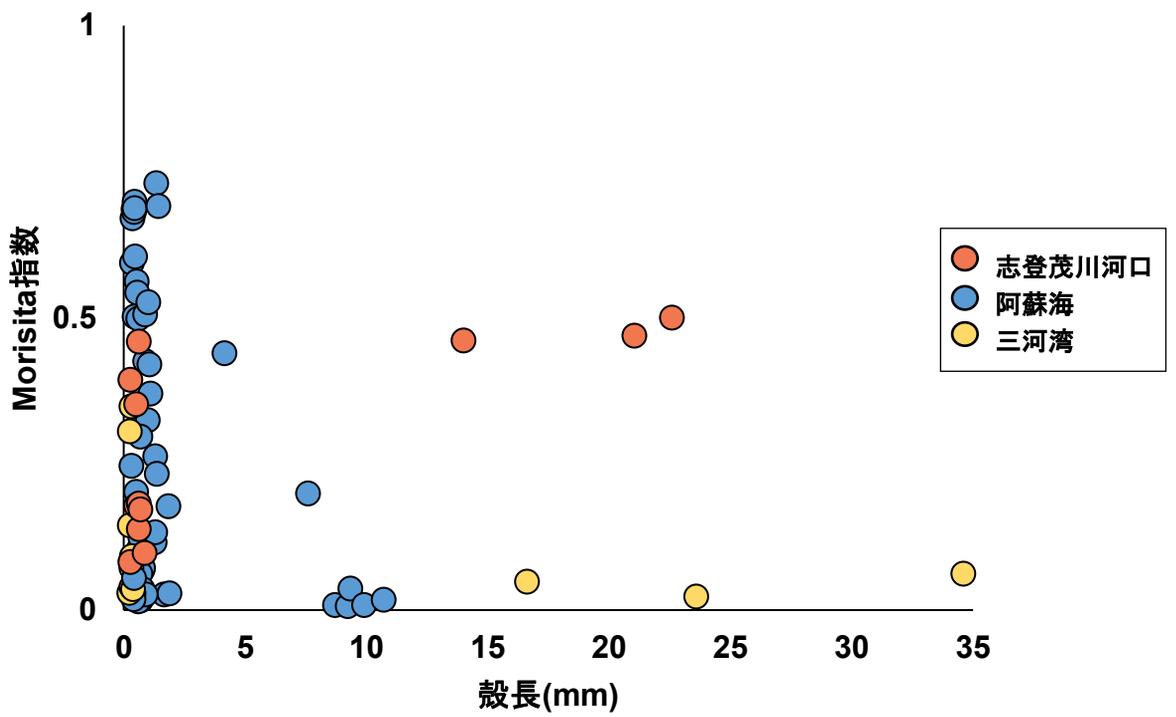


Fig. 3-17  
 アサリの殻長と、消化管中と環境砂泥中の珪藻組成の類似度 (Morisita指数) の関係. 2020年～2022年に採集された全ての試料を用いた.