

カイガラアマノリの新産地 ～山口県厚東川河口域～

阿部真比古^{1†}, 村瀬昇¹, 畑間俊弘², 鹿野陽介², 金井大成²

New record of *Pyropia tenuipedalis* from Koto river estuary, Yamaguchi prefecture.

Mahiko Abe^{1†}, Noboru Murase¹, Toshihiro Hatama², Yosuke Shikano² and Taisei Kanai²

Abstract : We collected the reddish foliose thalli from Koto river estuary, Yamaguchi Prefecture, on March 11, 2011. In order to identify the species, we carried out the field collections of foliose thalli from February, 2012 to March, 2013, the morphological observation in culture and PCR-RFLP analysis using the two regions of the partial mitochondrial DNA. This species at Koto river estuary was recognized visually in November, and the length of foliose thalli reached to the maximum in February. The maturation period in this species was the range from February to March. As for the morphological survey, the spherical cells were formed at the tips of conchocelis and developed to foliose thalli. The fragment patterns of this species in PCR-RFLP analysis were matched with *Pyropia tenuipedalis* from Jigozen, Hiroshima prefecture. In the present study, the foliose thalli collected at Koto river were identified with *Py. tenuipedalis* which is endangered species surrounding the coast of Japan. This species was newly recorded at Koto river estuary, Yamaguchi Prefecture.

Key words : *Pyropia tenuipedalis*, morphology, new record, PCR-RFLP

諸 言

紅藻カイガラアマノリ *Pyropia tenuipedalis* は, Miura¹⁾ により新種記載され, 環境省のレッドデータブックで絶滅危惧 I 類に指定されている (環境省 2012, 植物 II (藻類), 第 4 次レッドリスト http://www.env.go.jp/press/fileh_view.php?serial=20558&hou_id=15619). 本種は, 貝殻に穿孔した糸状体に形成された球形細胞が直接葉状体に生長する特異な生活史を有するアマノリ類である²⁾. 本種の分布域は, 全国的にも東京湾, 伊勢湾, 大阪湾および瀬戸内海のみで, 山口県においては平成 9 年から 13 年の 5 年間にわたる調査で山口湾榎野川河口域, 秋穂湾および佐波川河口域で確認されている³⁻⁵⁾. 本種が自生する山口湾沿岸部では, 以前から打ち上げられた藻体を「赤のり」として食材利用

していた。山口県は平成 16 年度から本種の増養殖生産技術の開発に取り組み, 平成 20 年度からは地域特産品として試験販売を始めている。

著者らは, 平成 22 年度から山口県内に生育するアマノリ類の分布調査を行っており, 未利用のアマノリ類を探索するとともに, 新規増養殖種への展開を目指している。この調査の中で, 宇部市地先の厚東川河口域において 2011 年 3 月 11 日に護岸に打ち上げられている赤みの強いアマノリ類と思われる葉状体を発見した。その後, 本河口域において継続調査および室内での培養による形態観察を行ったところ, 本葉状体はカイガラアマノリと同定され, 本河口域はカイガラアマノリの新たな生育地として認められたので報告する。

¹ 独立行政法人水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

² 山口県水産研究センター内海研究部 (Inland Sea Division, Yamaguchi Prefectural Fisheries Research Center)

[†] 別刷り請求先 abemahi@fish-u.ac.jp

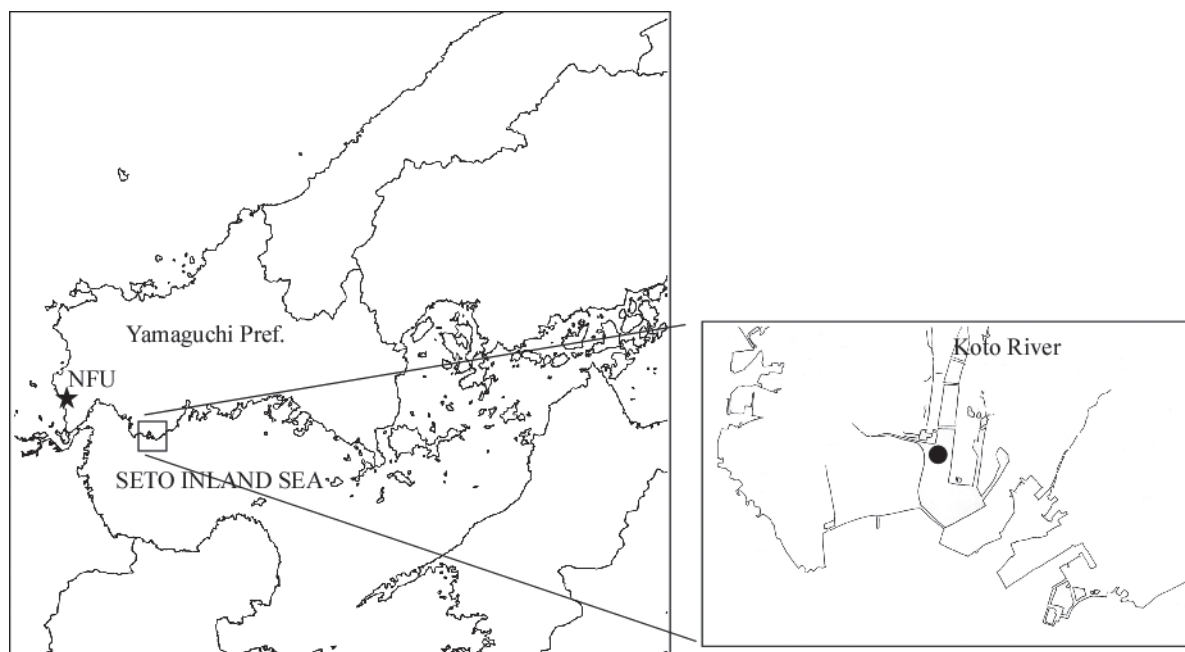


Fig. 1. Maps showing the sampling site. ★ :National Fisheries University (NFU); ● :Collecting site.

材料と方法

アマノリ類の分布調査は、山口県宇部市地先の厚東川河口域 (Fig. 1) で2012年2月21日, 11月15日, 11月28日, 12月14日, 2013年1月11日, 1月29日, 2月26日, 3月12日の計8回行った。干潮時に徒歩で目視調査し、アマノリ類を中心に採集した。採集した藻体は、低温・暗条件下で水産大学校藻場生態系保全研究室に持ち帰った。採集日ごとに、貝殻に付着し、赤色を呈する葉状体10~15個体を腊葉標本にし、葉厚、葉長、葉幅の計測を行った。また、2月以降では、葉状体の一部に雌雄の成熟が確認されたことから、雌雄生殖細胞の分裂表式を観察した。雌雄生殖細胞の分裂表式は、後述する室内培養により得られた葉状体においても観察を行った。より確実な同定を行うために、室内培養も行った。2012年2月21日に採集された葉状体の成熟部分をカミソリで切り取り、滅菌海水を約20mL入れた直径9cmの滅菌シャーレに浸し、接合胞子を放出させ、糸状体を得た。この糸状体を温度20℃、光量子量40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、光周期12時間明期:12時間暗期で振盪培養し、糸状体から葉状体までの生長過程を観察した。培養液には改変型1/2SWM-III培地 (SWM-III⁶⁾ からS-3vitamin, 土壌抽出物, Trisおよび肝臓抽出物を除去)を用い、1週間に1回の換水を行った。

また、2013年2月26日に採集された葉状体5枚から約

1cm四方の葉片を切り出し、TNES-8M Urea 緩衝液⁷⁾中に浸漬保存し、DNAの抽出に用いた。全DNAの抽出は、TNES-8M Urea 緩衝液中で葉片を細断し、Koike et al.⁸⁾の方法に従い加熱処理した溶液をGeneClean Kit (MP biomedical)を用いて精製した。本手法によるDNA抽出は、玉城ら⁹⁾により1900塩基以上のDNAをPCR増幅できることが確認されている。精製したDNAを鋳型としてAbe et al.¹⁰⁾によるPCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)法を用いた種判別を行った。

結 果

形態観察

採集された貝殻に付着したアマノリ葉状体は、赤みが強く、11月から視認され、2月に葉長が最大となり、2~3月に雌雄が成熟した。葉状体の形態観察の結果をTable 1に示した。葉状体の形状は、11~12月では線形、2月頃までは披針形や倒披針形、成熟する3月頃は卵形や倒卵形が多く観察された。葉長は最大39.8cm、葉幅は最大13.1cmであった。葉状体の縁辺部には鋸歯がなく、葉状体の色は、赤みがかかった橙色ないし、紫味がかかった赤色をしていた。葉状体は一層細胞であった。室内培養した葉状体の葉厚は17.6 - 38.3 μm であった。精子嚢と接合胞子嚢は、同一の葉状体上に形成され、雌雄同株であった。精子

Table 1. Comparison of morphological characteristics between the foliose thalli collected at Koto river estuary and *Pyropia tenuipedalis*

Characters	Foliose thalli collected at Koto river estuary (this study)	<i>Pyropia tenuipedalis</i> *
Thallus shape	oblanceolate, lanceolate, ovate, obovate, elliptic	oblanceolate, lanceolate, ovate, obovate, elliptic
Base of foliose thallus	cuneate, cordate, usually conspicuous stipe present	cuneate, cordate, usually conspicuous stipe present
Maximum thallus length (cm)	39.8	56
Maximum thallus width (cm)	13.1	13
Serration	lacking	lacking
Color of thalli	reddish orange, fire red, blackish purple	(light) reddish orange, fire red, blackish purple
Thickness of vegetative portion (μm)	17.6 -38.3 (with cultured samples)	24.7 - 49.3
Division formula of spermatangia	64 (a/4, b/4, c/4) (with cultured samples)	64 (a/4, b/4, c/4) 128 (a/4, b/4, c/8)
Division formula of zygotosporangia	16 (a/2, b/2, c/4) (with cultured samples)	16 (a/2, b/2, c/4)
Sex type	monoecious	monoecious

*Referred to Miura¹⁾, Miura¹¹⁾ and Kikuchi et al.^{4,12)}

囊の分裂表式は 64 (a/4, b/4, c/4), 接合孢子囊の分裂表式は 16 (a/2, b/2, c/4) であった。

室内培養においては, 得られた糸状体は鮮やかな赤色を呈し (Fig. 2a), 糸状体の先端に本種特有の球形細胞が形成された (Fig. 2b)。球形細胞は分裂し (Fig. 2c), 単列藻体となり (Fig. 2d), その後も分裂を繰り返して葉状体へと生長した (Fig. 2e)。糸状体期における殻胞子の形成や両世代における原胞子の放出などによる栄養繁殖は認められなかった。

PCR-RFLP 分析

制限酵素 *Taq* I を用いたミトコンドリア DNA の *trnC* - *rns* を含む領域 (以後, *trnC* - *rns*), 制限酵素 *Ssp* I, *Aci* I, *Bmg*T120I および *Alu* I を用いたミトコンドリア DNA の *ATP6* 関連領域 (以後, *ATP6*) の PCR-RFLP 分析の結果を Fig. 3 に示す。ミトコンドリア内の 2 領域の PCR では, *trnC* - *rns* で約 1400 塩基対および *ATP6* で約 670 塩基対の増幅産物が得られた。*trnC* - *rns* では制限酵素 *Taq* I で処理すると, 約 850, 500 塩基対の断片が確認された。*ATP6* で

は制限酵素 *Bmg*T120I で処理すると, 約 580, 100 塩基対の断片が確認され, それ以外の制限酵素では断片化されなかった。

考 察

厚東川河口域で採集された葉状体の形態は, Miura¹⁾, 菊地ら⁴⁾, Miura¹¹⁾ および Kikuchi et al.¹²⁾ におけるカイガラアマノリのそれと一致していた。精子囊の分裂表式においては, これまでに 128 (a/4, b/4, c/8) も確認されている^{1, 11)} が, 本研究では菊地ら²⁾ と同様に 64 (a/4, b/4, c/4) までしか観察することができなかった。また, カイガラアマノリの糸状体では, 殻胞子の形成が認められず, 葉状体は糸状体から直接発出することが報告されている^{1, 4)}。本研究における室内培養による糸状体の観察の結果, 厚東川河口域で採集された藻体では, 糸状体に形成された球形細胞が直接葉状体に生長することが明らかとなり, カイガラアマノリの特徴と一致していた。

PCR-RFLP 分析による種判別の結果からは, 本葉状体のバンドパターンは, Abe et al.¹⁰⁾ での広島県地御前産カイ

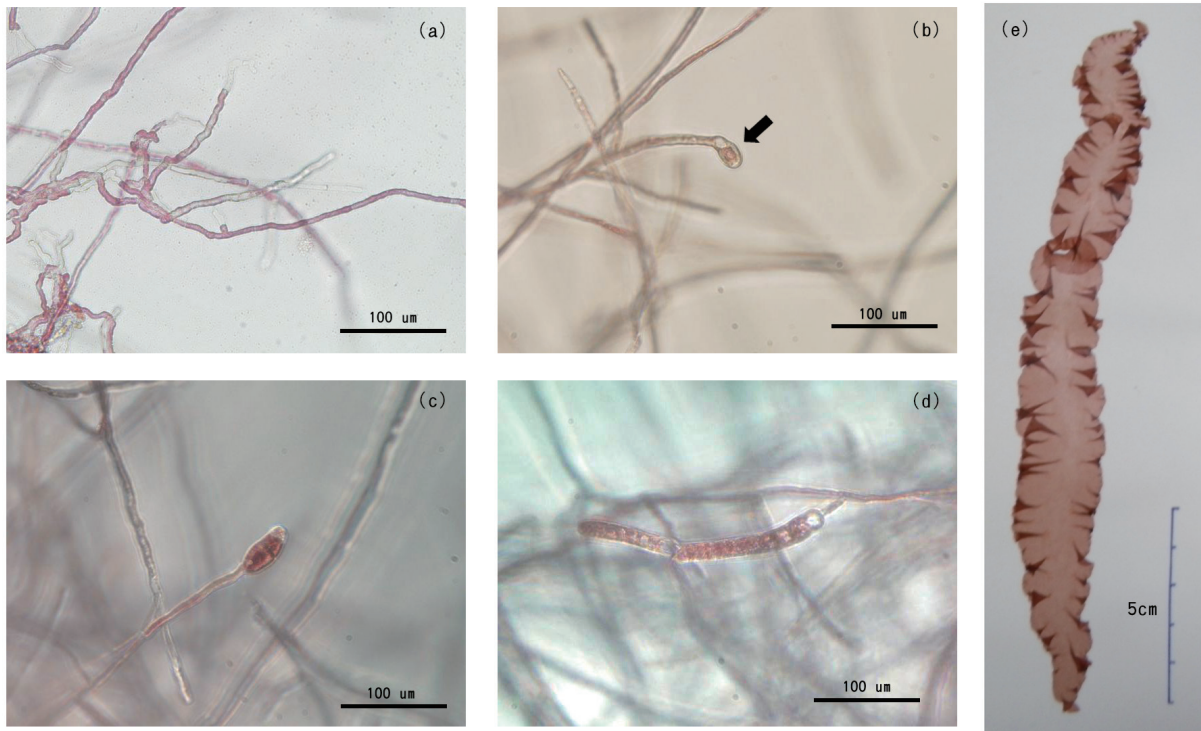


Fig. 2. Photographs showing the growing phase of *Pyropia* sp. (*Py. tenuipedalis*) collected at Koro river estuary, Yamaguchi Prefecture, under the culture condition. (a) conchocelis; (b) conchocelis formed the spherical cell (the allow) at the tip; (c) the germinated spherical cell; (d) uniseriate thallus; (e) foliose thallus.

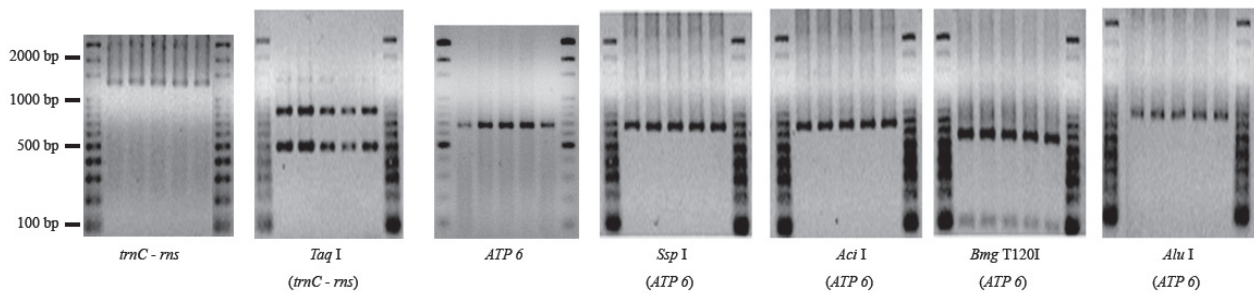


Fig. 3. PCR products of the partial mitochondrial DNA including the *trnC - rns* (*trnC - rns*) and the mitochondrial DNA related to ATP synthase subunit 6 (*ATP6*) of *Pyropia* sp. collected at Koto river estuary, Yamaguchi Prefecture. PCR-RFLP profiles of *TaqI* for *trnC - rns* and *SspI*, *AciI*, *BmgT120I* and *AluI* for *ATP6*.

ガラアマノリのバンドパターンと一致した。Abe et al.¹⁰⁾によるとカイガラアマノリは、*trnC-rns* で制限酵素 *Taq I* を用いると 845, 495, 7塩基対の断片が、*ATP6* で制限酵素 *BmgT120I* を用いると 562, 108塩基対の断片が得られ、制限酵素 *Ssp I*, *Aci I* および *Alu I* においては、*ATP6* の増幅産物は切断されない。本研究で得られた断片のパターンは、カイガラアマノリのみと一致し、それ以外の他種とは異なった。PCR-RFLP 分析においても、厚東川河口域で得られた葉状体はカイガラアマノリの可能性が高いと判断された。

形態、生活史および DNA 分析の結果から、山口県厚東川河口域で採集されたアマノリ葉状体は、全国的にも希少なカイガラアマノリであると同定された。厚東川河口域は、これまでに山口県でカイガラアマノリの生育が確認されている山口湾、秋穂湾および佐波川河口域に続く 4ヶ所目の生育地となった。山口県では、カイガラアマノリは瀬戸海側の比較的大きな干潟が形成される河口域で発見されていることから、調査を継続することにより今後も類似した海域では本種を発見できる可能性がある。また、カイガラアマノリの生態は不明な点も多いことから、本種が生育する海域環境を詳細に調査・解析し、生育環境を保全していく必要がある。

謝 辞

本研究は、JSPS 科研費 24780199 (MA) の助成を受けたものです。

文 献

- 1) Miura, A: A new species of *Porphyra* and its *Conchocelis*-phase in nature, *J Tokyo Univ Fish*, **47**, 305-311 (1961)
- 2) 菊地則雄: 日本産紅藻アマノリ属藻類一特に分類, 生活史, 絶滅危惧種について一, *海藻資源*, **22**, 2-21 (2010)
- 3) 宮後富博: 藻類優良品種養殖振興試験事業, 山口湾自生のカイガラアマノリについて - I, 山口県水産試験センター, 平成 11 年度 山口県水産試験センター事業報告, 276-277 (2001)
- 4) 菊地則雄, 島村嘉一, 尾上一明: 浦安市沿岸における絶滅危惧種カイガラアマノリ (紅藻綱ウシケノリ目) の生育. *千葉生物誌*, **52**, 71-74 (2003)
- 5) 岸岡正伸, 金井大成: 藻類優良品種養殖振興試験事業 (1) カイガラアマノリ養殖試験, 山口県水産試験センター, 平成 14 年度 山口県水産試験センター事業報告, 177-181 (2003)
- 6) 尾形英二: 新しい海藻培養液 SWM- III について, *藻類*, **18**, 171-173 (1970)
- 7) Asahida T, Kobayashi T, Saitoh K, Nakayama I: Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish Sci*, **62**, 727-730 (1996)
- 8) Koike K, Yamashita H, Ohuchi A, Tamaki M, Hayashibara K: A quantitative real-time PCR method for monitoring *Symbiodinium* in the water column. *Galaxea, JCRS* **9**, 1-12 (2007)
- 9) 玉城泉也, 藤田雄二, 藤吉栄次, 小林正裕, 阿部真比古, 菊地則雄, 須藤裕介: 沖縄県宜野湾市にて採集したツクシアマノリ葉状体の形態的特徴と分子生物学的解析. *沖縄生物学会誌*, **50**, 1-15 (2012)
- 10) Abe M, Kobayashi M, Fujiyoshi E, Tamaki M, Kikuchi N, Murase N: Use of PCR-RFLP for discrimination of Japanese *Porphyra* and *Pyropia* species (Bangiales, Rhodophyta). *J Appl Phycol*, **25**, 225-232 (2013)
- 11) Miura A: Taxonomic studies of *Porphyra* species cultivated in Japan, referring to their transition to the cultivated variety. *J Tokyo Univ Fish*, **75**, 311-25 (1988)
- 12) Kikuchi N, Arai S, Yoshida G, Shin J-A, Broom J E, Nelson W A, Miyata M: *Porphyra migitae* sp. nov. (Bangiales, Rhodophyta) from Japan. *Phycologia*, **49**, 345-354 (2011)