

【報 文】

アマモ群落の再生産維持機構の解析のための マイクロサテライトマーカーを用いた個体識別法

吉 田 司*¹・Chunj ie TIAN*²・岡 本 英 明*¹・田 中 義 人*³
芝 修 一*¹・鈴 木 輝 明*⁴・高 倍 昭 洋*^{2,3}

Individual Discrimination in *Zostera marina* L. Using Microsatellite Markers for the Elucidation of Reproduction Structure in Eelgrass Community

Tsukasa YOSHIDA, Chunj ie TIAN, Hideaki OKAMOTO, Yoshito TANAKA,
Syuichi SIBA, Teruaki SUZUKI, Teruhiro TAKABE

Abstract

The spatial distribution of genotypes in *Zostera marina* L. community in Ise Bay using six microsatellite markers was examined. Allele sizes of six microsatellite markers were the same between rhizome connected shoots in Kosugaya community, but different at the other shoots. This result shows that these microsatellite markers can discriminate individuals and be useful of studying community structure in *Z. marina*. This fact suggests that most of the reproduction in Kosugaya community was maintained by cross-fertilization and seeds transferred from some other community. And also the distribution of vegetative reproduction was found to be within the limits of about 0.5m. These reproduction structure showed in Kosugaya community seem to be caused by geographical features of the seabed.

1. はじめに

アマモ *Zostera marina* L. は静穏な海域の砂泥質の浅所に生育し、繁茂期には草丈が 1 ~ 2 m となり、単一種で大きな群落を形成する。その群落は、浅場生態系の中で生産者として食物連鎖の基礎となり、さらに水産動物の産卵・索餌場所や逃避の場、また水質浄化の場として漁業生産上重要な役割を担っている^{1), 2), 3)}。しかし、アマモ群落は、近年、埋め立てなど人間活動による影響を受けて、減少あるいは消滅⁴⁾しており、その保全や修復の取り組みが、現在、日本各地の沿岸で試みられている。

アマモ群落の保全や修復に関する研究は、アマモの生

育を制限する水温や光などの外的環境要因についての研究が多く^{5), 6)}、それらの知見に基づいて造成好適範囲を推定し、播種や種苗移植による修復事業が行われてきた。しかし、その群落を長期にわたって維持することが出来た事例は少なく⁷⁾、また安易な播種や種苗移植は遺伝的多様性を損ない、長期的には生態系の攪乱につながるなどの批判もある⁸⁾。

アマモは、地下茎の伸長、分枝により株を増やす栄養繁殖と種子による有性繁殖の 2 つの繁殖法を持つ植物である⁹⁾。したがって、アマモ群落は、栄養繁殖により 1 つの群落が 1 つの地下茎によってつながった 1 つの株あるいは地下茎が切断されて分離した遺伝的に同一の株、

2004年12月21日受付, 2005年7月14日受理

キーワード: アマモ, 個体識別, マイクロサテライトマーカー, 伊勢湾

Key words: *Zostera marina* L., Individual discrimination, Microsatellite marker, Ise Bay

*¹ Chateau Marine Survey Co., Ltd. 1-4-2, Katamachi, Miyakojima, Osaka 534-0025, Japan. (株式会社シャトー 海洋調査 〒534-0025 大阪市都島区片町1-4-2)

*² Research Institute of Meijo University, 1-501 Siogamaguchi, Tenpaku, Nagoya 468-8502 (名城大学総合研究所 〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口1-501)

*³ Graduate School of Environmental & Human Sciences, Meijo University, 1-501 Siogamaguchi, Tenpaku, Nagoya 468-8502 (名城大学大学院総合学術研究科 〒468-8502 名古屋市天白区塩釜口1-501)

*⁴ Marine Resources Research Center Aichi Fisheries Research Institute, 2-1, Toyohama, Minamichita, Chita-gun, Aichi 470-3412, Japan (愛知県水産試験場漁業生産研究所 〒470-3412 愛知県知多郡南知多町豊浜2-1)

いわゆるクローンから形成されている可能性もあれば、有性繁殖により遺伝子流動 (gene flow) を盛んにして遺伝的多様性を確保していることも考えられる。したがって、修復するアマモ群落を安定的に長期にわたって維持する上では、対象とする海域におけるアマモ群落の繁殖生態を正確に把握することは最も重要である。有性繁殖により維持されている場では栄養繁殖を期待できないし、その逆もありうる。繁殖生態の実態を把握せず、単に移植や播種のみを行っても修復が成功する確率は低い。

アマモ群落内での栄養繁殖の程度を調べるためには、直接海底を掘って丹念に地下茎のつながりを追跡する方法¹⁰⁾があるが、アマモ場そのものを痛めてしまう可能性が高く、かつ非常に労力を必要とし、大面積にわたって長期的に調査することはほとんど不可能に近い。また、アマモ群落の構造を遺伝子解析により明らかにした研究は海外で見られるが^{11), 12)}、アマモ場の修復を主目的とした繁殖生態について検討されたものはほとんどなく、陸上の植物群落と比較すると著しく遅れているのが現状である。

繁殖生態を把握するためには、親子判定と遺伝子交流の程度などを調べる必要があり、そのためには精度の高い個体識別が不可欠である。また、個体識別を行うためには、植物群落を破壊することなく、簡便で広い調査範囲にも使える手法でなくてはならない。本研究は、このような条件を満たすマイクロサテライトマーカー-PCR-キャピラリーシーケンス法を採用し、それぞれ地形的に分断された不連続な3ヶ所 (愛知県常滑市の樽水地先、刈谷地先、小鈴谷地先, Fig. 1) のアマモ群落からアマモの6つのマイクロサテライトマーカーの塩基数を求め、その違いを確認した。そして、本手法により小鈴谷地先のアマモ群落において、実際にアマモの個体識別を試みた。

2. 方法

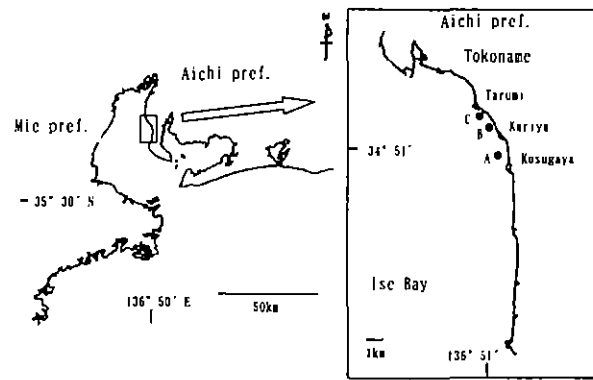
1) 調査海域

調査の対象としたのは、Fig. 1に示す伊勢湾東岸域の愛知県常滑市地先の3ヶ所 (小鈴谷地先、刈谷地先、樽水地先) のアマモ群落である。

この内、個体識別を行った小鈴谷地先のアマモ群落の分布状況は、2004年5月に撮影された航空写真 (撮影高度1530m, 縮尺1/10000) をもとに、2004年5月17日から5月19日にかけて船上からの目視とスキューバ潜水により把握した。目視観察を行った場所はDGPS (古野電気社製) により、その位置を計測した。

2) アマモの採取

アマモは、2004年5月20日に、Fig. 1に示す小鈴谷地先 (定点A: $136^{\circ} 51' 43''$, $34^{\circ} 50' 03''$), 刈屋地先 (定点B: $136^{\circ} 51' 23''$, $34^{\circ} 51' 40''$), 樽水地先 (定



A: $136^{\circ} 51' 43''$, $34^{\circ} 50' 03''$,
B: $136^{\circ} 51' 23''$, $34^{\circ} 51' 40''$,
C: $136^{\circ} 50' 30''$, $34^{\circ} 52' 20''$

Fig. 1 Map of Ise Bay (left) and survey spots in Chita peninsula (right) indicating the location of the three *Z. marina* population (A, B, C). Genetic structure analysis was examined at site A.

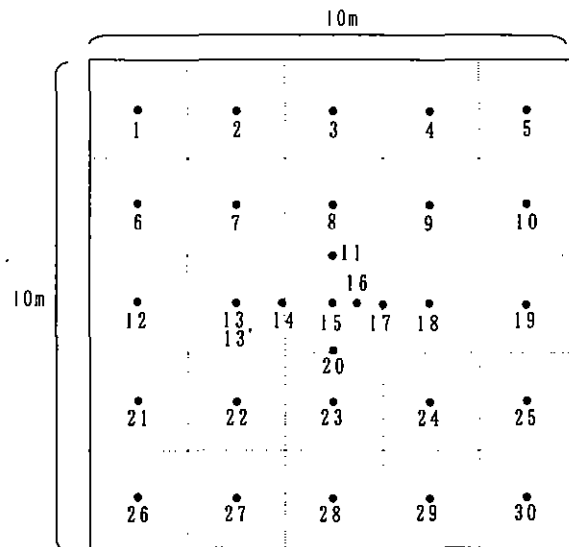


Fig. 2 Sampling spots at site A. *Z. marina* was sampled on 30 spots by collection one shoot. 13 and 13' were sampled from rhizome connected shoots.

点C: $136^{\circ} 50' 30''$, $34^{\circ} 52' 20''$) の3ヶ所で、葉部のみを採取を行った。

その内、小鈴谷地先ではFig. 2に示すように10×10m (100m²) の調査範囲を沈子付きのロープで2mメッシュに分割して、その中心の測点でアマモを各1株ずつ葉部のみを合計30株採取した。なお、測点15付近ではアマモの採取は0.5~1.0m間隔とした。また、測点13では実際に地下茎でつながっている株 (測点13と13' 地下茎の長さ15cm) を採取した。それぞれ採取したアマモは、冷暗所に保存し、実験室に持ち帰り、アルミホイルに包み-80℃で冷凍保存した。

3) アマモのマイクロサテライトマーカーによる個体識別

アマモのDNA抽出は、冷凍保存したアマモ生葉を湿重量で0.1~0.2g(葉の長さ:5~10cm)を切り取り、試料を蒸留水で洗浄し、ペーパータオルで水分を拭き取った後、解剖はさみで2mm角程度に細断して、植物において一般的に用いられるCTAB法¹³⁾を行った。

アマモのマイクロサテライトマーカーは、Table 1に示す6つ^{14), 15)}を用いた。

PCR増幅は、95℃、10分間の予備変性を行った後、95℃、1分間、57℃1分、72℃1分のサイクルを30回繰り返し、最後に72℃、7分の伸長反応を行った。PCRに使用したDNA量は、1反応あたり20ngとなるように濃度調整を行った。PCR増幅による産物は、1/10希釈になるように12 μ lのHiDi formamide (+1/40 vol.-500 Rox size standard)と混合して、キャピラリーシーケンス用の試料とした。キャピラリーシーケンスは、310 Genetic Analyzer (ABI社製)を用いた。

各マイクロサテライトマーカーの塩基数は、GeneScan-500 Rox size standardに基づいて、310 GeneScan 2.1 (ABI社製)でエレクトロフェログラムから求めた¹⁶⁾。

3. 結果および考察

1) 小鈴谷地先の海底地形とアマモ群落

2004年5月、現地調査により確認した小鈴谷地先のアマモ群落は、Fig. 3に示すとおりである。小鈴谷地先は典型的な前浜干潟である。前浜は、満潮位斜面とテラス部分からなり、テラスは幅200~300mの多段バートラフ部とその岸側の平坦部からなる。小鈴谷地先のアマモ群落の総面積は約25haであった。

D. L. (基本水準面、以下同様) - 2m ~ -1.0mの多段バートラフ部に分布するアマモ群落は、サンドウェーブ

の凸部に挟まれた凹部に沿うように帯状に分布し、その岸側のD. L. -1.0~0.0mの平坦部には島状の群落のみられた。多段バートラフ部での帯状の群落形成は、流速が低下するサンドウェーブの凹部においては、種子が集中的に沈降、埋没、発芽する可能性が高く、逆にサンドウェーブの凸部では流速が早く底質が浮遊移動の状態にあるため種子が定着できなかったことなどによると考えられた。

2) アマモのマイクロサテライトマーカーによる個体識別

Table 2は、小鈴谷地先の地下茎がつながったアマモ(測点13と13')と、地形的に分断された不連続な群落で

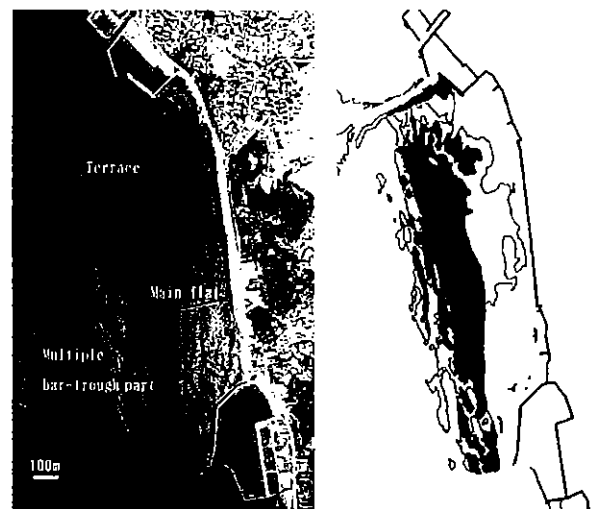


Fig.3 An aerial photograph on the west coast in Chita peninsula (left) and horizontal distribution of *Z. marina* (right). Black areas indicate 50% vegetation coverage of

Table 1 Description of six microsatellite primers in *Z. marina*.^{14), 15)}

Microsatellite locus	Primer name	DNA sequences of primer (5'→3')
CT12	Zosmar CT-12f	CGTTCATCTTGTCCTCGTCC
	Zosmar CT-12r	TTTCATTTCCATTTCCCACC
GA3	Zosmar GA-3f	CGACGATAATCCATTGTTGC
	Zosmar GA-3r	GCTTTTCATTTATCCAATAGTTTGC
GA2	Zosmar GA-2f	GGCAGCGATCTAATAACAATTAAGG
	Zosmar GA-2r	ACGTCACATCTTTTCACGACC
CT17	Zosmar CT-17H-f	TCTTTACCAACCGATCTCCG
	Zosmar CT-17H-r	AAACACAAGCAAAACAGTTAGTCAG
CT3	Zosmar CT-3f	TGAAGAAATCCCAGAAATCCC
	Zosmar CT-3r	AGACCCGTAAAGATACCACCG
CT20	Zosmar CT-20f	TGGAAGGAGTTTCGATGTATCC
	Zosmar CT-20r	GGGAGATTTGCAGTGTAGAATTTAG

Table 2 Allele size (bp) of six microsatellite markers at Kosugaya (site A), Kariya (site B) and Tarumi (site C).

	CT12		GA3		GA2		CT17		CT3		CT20	
Kosugaya (13)	126	132	119	119	163	163	100	158	111	117	150	163
Kosugaya (13')	126	132	119	119	163	163	100	158	111	117	150	163
Kariya	126	132	108	117	157	163	150	162	111	111	159	163
Tarumi	126	126	108	119	161	163	109	156	111	111	152	167

Table 3 Number of allele, observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) for six microsatellite markers at site A.

Microsatellite marker	Number of allele	H_o	H_e
CT12	11	0.76	0.87
GA3	12	0.84	0.74
GA2	6	0.76	0.61
CT17	36	0.96	0.97
CT3	11	0.85	0.87
CT20	12	0.84	0.77
Mean	15	0.84	0.81
Total	88		

ある苧屋地先と樽水地先のアマモにおけるマイクロサテライトマーカーの塩基数 (bp) を示した。小鈴谷地先の測点13と13'では6つのマイクロサテライトマーカーの塩基数 (bp) がすべて一致し、遺伝的に同一個体 (クローン) である可能性が高いことが確認できた。また、苧屋地先と樽水地先の群落において採取されたアマモと小鈴谷地先のアマモの塩基数 (bp) が異なったことは、別の遺伝子構成を持った個体と考えられ、マイクロサテライトマーカーを用いた本手法によるアマモの個体識別の可能性が示唆された。

Table 3は、小鈴谷地先の定点Aにおける100m²の範囲に分布するアマモ個体の各マイクロサテライトマーカーの塩基数である。それぞれのマイクロサテライトマーカーにおける対立遺伝子数は平均15であり、6つのマイクロサテライトマーカーでは88となった。ヘテロ接合度¹⁷⁾は0.75~0.96で、その平均は0.84となった。その中で、各マイクロサテライトマーカーがヘテロで一致する親子関係にあると考えられた個体は、Table 4に示すように測点4と測点10および測点21と23のみであり、その他の個体は、それぞれ異なった塩基数となった。

このことは、小鈴谷地先の調査範囲内 (100m²) のアマモは、栄養繁殖による広がりには非常に狭く、0.5m程度以下で維持されていると考えられ、群落内での他家受粉や他地域の群落から運ばれてきた種子による有性繁殖が主体の群落と推定された。このことは今回調査の対象

とした定点Aが、種子の沈降、埋没しやすいサンドウェーブの凹部に位置していたことによる可能性が高い。しかし、バルト海の河口に形成されたアマモ群落のクローンサイズは32m²に及ぶものも報告されており¹²⁾、アマモの繁殖生態には物理的環境が影響している可能性が示唆された。今後は、物理的環境が異なる複数ヶ所のアマモ群落 (バートラフ部と平坦部や地形的に分断されている群落など) における調査を行い、マイクロサテライトマーカーによる解析事例を増やすとともに、ヘテロ接合度などの有意性について検討する予定である。

今回行ったマイクロサテライトマーカーを利用した個体識別法は、未だ十分な解析事例を有していないが、アマモの葉部0.1~0.2g (湿重量) の微量なサンプルで、群落にダメージを与えることなく比較的簡便に実施でき、かつアマモ群落の再生産維持機構を理解するために有効な手法であることが明らかになった。

5. ま と め

- ① 修復するアマモ群落を安定的に長期にわたって維持する上では、対象とする海域におけるアマモ群落の繁殖生態を正確に把握することは最も重要である。
- ② マイクロサテライトマーカーを利用した個体識別法は、アマモの葉部0.1~0.2g (湿重量) の微量なサンプルで群落にダメージを与えることなく比較的簡便で、広い調査範囲にも使える。このため、アマモ群落の再生産維持機構を理解するためにはきわめて有効な手法である。
- ③ 今回の調査対象とした小鈴谷地先の多段バートラフ部に分布するアマモ群落は、群落内での他家受粉や他地域の群落から運ばれてきた種子による有性繁殖が主体の群落であると推定された。また、他地域の事例と考え合わすとアマモの繁殖生態は物理環境が影響している可能性が示唆された。
- ④ 今後は、アマモのマイクロサテライトマーカーを用いた本手法の事例を増やし、物理環境が異なるアマモ群落についての繁殖生態を比較し、アマモ群落の修復に必要な知見を集積して行っていく予定である。

Table 4 Size of alleles (bp) for six microsatellite markers at site A. Number was assigned in Fig.2. Parentage is detected at 4 and 10, 21 and 23 with showing the same alleles boldfaced Gothic type.

Number	CT12		GA3		GA2		CT17		CT3		CT20	
1	126	132	113	140	157	163	114	139	109	111	161	163
2	126	128	119	119	156	163	170	182	119	119	165	167
3	126	135	115	115	157	157	146	196	113	117	150	171
4	124	126	119	140	155	163	139	150	109	115	159	163
5	128	132	109	113	157	161	124	154	107	111	163	163
6	126	132	115	117	157	157	148	169	101	109	163	171
7	132	132	108	115	155	159	170	172	109	111	150	150
8	126	132	108	115	163	163	108	177	113	119	152	163
9	132	134	109	117	155	157	152	206	117	121	150	150
10	126	136	119	119	155	163	150	150	115	115	159	167
11	132	137	117	119	155	155	181	183	109	119	150	167
12	122	132	117	136	155	163	148	204	109	113	142	150
13	126	132	119	119	163	163	100	158	111	117	150	163
14	126	170	119	119	156	163	124	156	101	115	159	163
15	132	137	117	121	155	157	146	173	109	111	152	167
16	128	134	108	108	155	159	110	170	109	111	150	165
17	126	132	117	123	157	157	156	158	101	109	161	163
18	126	132	108	123	155	157	106	152	109	117	150	150
19	124	126	111	140	155	155	139	168	108	117	141	162
20	122	134	108	117	157	159	137	173	111	117	167	167
21	126	126	109	119	155	163	110	171	111	111	167	167
22	122	128	109	119	159	159	139	164	113	115	142	163
23	126	137	111	119	155	163	171	180	111	117	162	167
24	122	126	117	123	163	163	165	167	117	121	150	165
25	126	132	109	113	157	157	110	158	117	119	163	167
26	126	126	117	119	161	161	110	154	99	115	158	162
27	126	132	108	121	155	157	110	171	107	111	167	167
28	126	132	119	119	159	163	141	200	101	111	150	152
29	126	126	106	119	157	163	150	168	111	111	142	163
30	122	139	108	119	155	163	144	194	109	117	161	163

参考文献

- 小松輝久：沿岸漁場環境 幼稚仔成育場の環境 藻場・海中林、沿岸の環境圏、フジ・テクノシステム、東京、pp.407-419, 1998.
- 佐々木克之：内湾および干潟における物質循環と生物生産—アマモとアオサの成長と窒素およびリンの循環—。海洋と生物、16(5), pp.400-406, 1994.
- 鈴木輝明・家田喜一：三河湾奥に存在するアマモ場内・外の魚類群集の相違。愛知水試研報、10, pp.21-24, 2003.
- 環境庁自然保護局、(財)海中公園センター：第4回自然環境保全基礎調査。海域生物環境調査報告書(干潟、藻場、珊瑚礁調査)一藻場一、2、400pp, 1994.
- 吉田 司・芝 修一・小山善明・新井義昭・鈴木輝明：アマモ場造成に必要な生育環境条件に関する研究。水産工学、40(3), pp.205-210, 2004
- 川崎保夫・石川雄介・丸山康樹：アマモ場造成の適地選定法。沿岸海洋研究ノート、27(2), pp.136-144, 1990.
- 和泉安洋・広沢 昇・團 昭紀・森口朗彦・森脇利信：底質安定化マットによる4年間のアマモの生長と成熟。水産工学、39(2), pp.139-143, 2002.
- 相生啓子：アマモ場造成と環境保全機能。海洋と生物、26(4), pp.303-308, 2004.
- 川崎保夫：藻場造成の現状と課題。水産の研究、7(6), pp.44-48, 1988.
- 川端豊喜・茅田弘荘・乾 政秀・平山和次・柳井湾における春期から夏期のアマモ *Zostera marina* の生長様式。日水誌、59(3), pp.445-453, 1993.
- R. S. Alberte, G. K. Suba, G. Procaccini, R. C. Zimmerman, and S. R. Fain: Assessment of genetic diversity of seagrass populations using

- DNA fingerprinting : Implications for population stability and management. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**, pp.1049-1053, 1994.
- 12) A. Hammerli and T. B. H. Reusch : Inbreeding depression influences genet size distribution in a marine angiosperm. *Molecular Ecology*, **12**, pp.619-629, 2003.
- 13) S. J. Isaac PG : Isolation of DNA from plants. *Methods Mol. Biol.*, **28**, pp.9-15, 1994.
- 14) T. B. H. Reusch : Five microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* and a test of cross-species amplification in *Z. noltii* and *Z. japonica*. *Molecular Ecology*, **9**, pp.365-378, 2000.
- 15) T. B. H. Reusch, W. T. Stam, J. L. Olsen : Microsatellite loci in eelgrass *Zostera marina* reveal marked polymorphism within and among populations. *Molecular Ecology*, **8**, pp.317-321, 1999.
- 16) 310 User Bulletin. Applied Biosystems Japan Ltd. 2002.
- 17) M. Nei : Analysis of gene diversity in subdivided population. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, pp.3321-3323, 1973.