

# リアルタイムPCR法による二枚貝幼生検出法の開発

火力発電所と地域漁業との共生を目指して

## Development of a Bivalve Larva Detection Method Utilizing Real-time PCR

For Symbiosis between Thermal Power Plants and Local Fisheries

(電力技術研究所 バイオG)

火力発電所と地域漁業との共生を目的として、リアルタイムPCR技術を用いて、三河湾における漁業対象として重要な二枚貝10種の幼生検出技術を開発し、従来法との比較試験を行った結果、高い検出精度を有することを確認した。本検出法は二枚貝の資源を保護する上で鍵となる技術であり、近年、急激な資源減少に悩む三河湾の二枚貝漁業への貢献が期待される。

(Bio Technology Group, Electric Power Research and Development Center)

For the purpose of symbiosis between thermal power plants and local fisheries, we developed a technology for detecting the larvae of 10 important bivalve species as fishery targets in Mikawa Bay using real-time PCR technology, and as a result of comparison tests with conventional methods, we confirmed that the technology has high detection accuracy. This detection method is a key technology for the protection of bivalve resources and is expected to contribute to the bivalve fishery in Mikawa Bay, which has experienced a rapid decrease in resources in recent years.

### 1 研究の背景と目的

最近、新型コロナウイルスの検出法としてリアルタイムPCR法が広く知られるようになったが、同法はDNAの塩基配列の違いから生物種を判別する新たな生物検出法であり、特に判別が難しい生物の検出に優れることから、当社では火力発電所における海洋付着生物対策等に用いてきた。

一方、伊勢湾に次いで火力発電所が多い三河湾はアサリの国内漁獲量の7割を占める好漁場であるが、近年は漁獲量が急減し、地域漁業に深刻な状況になっている。今後も二枚貝漁業を持続的に行っていくには、二枚貝資源を保護するために資源量を的確に推定し、それに合わせて漁獲量をコントロールすることが重要となる。

資源量を推定する上で未来の資源となる幼生（子供）の発生量は重要な指標のひとつであるが、二枚貝幼生の種判別は極めて難しく、アサリ・トリガイ以外では幼生検出法が確立されていない。そこで、火力発電所と地域漁業との共生を目的として、リアルタイムPCR法を用いた二枚貝幼生検出法の開発を行った。

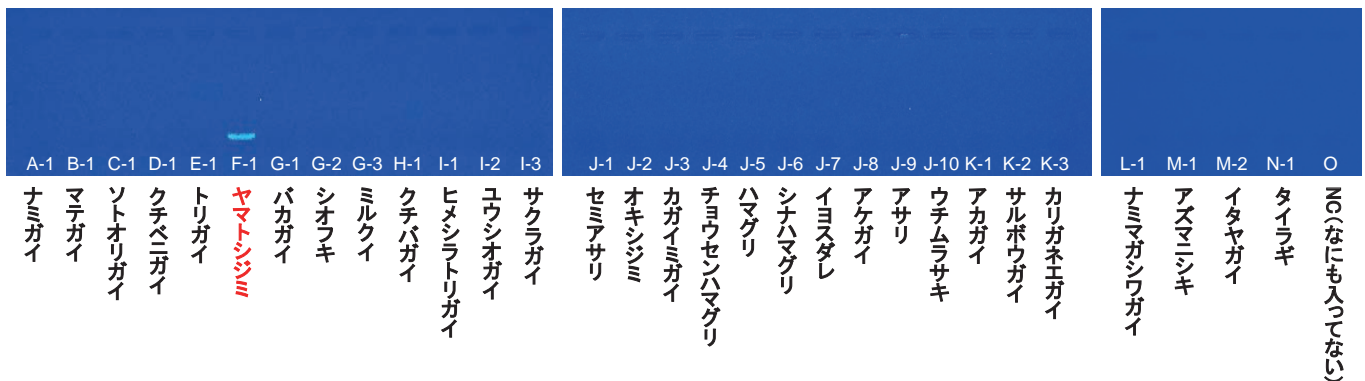
### 2 研究の概要

#### (1) 検出法の構築、種特異性および定量性の検証

三河湾において水産上重要な二枚貝10種（アサリ、ウチムラサキ〔大あさり〕、ハマグリ、トリガイ、アカガイ、バカガイ、ミルクイ〔本ミル〕、ナミガイ〔白ミル〕、ヤマトシジミ、タイラギ）を市場および野外採集にて入手し、3ヶ所の遺伝子領域について塩基配列の解読を行い（計648個体）、同じく三河湾に生息する二枚貝20種（計276個体）および塩基配列が公開されている他の二枚貝種と比較した。

その結果、アサリ、ウチムラサキ、ハマグリ、トリガイ、バカガイ、ミルクイ、ヤマトシジミ、タイラギの8種類は、2ヶ所の塩基配列の違いで種を判別できる「SYBR法」での幼生検出法の構築が可能であった。

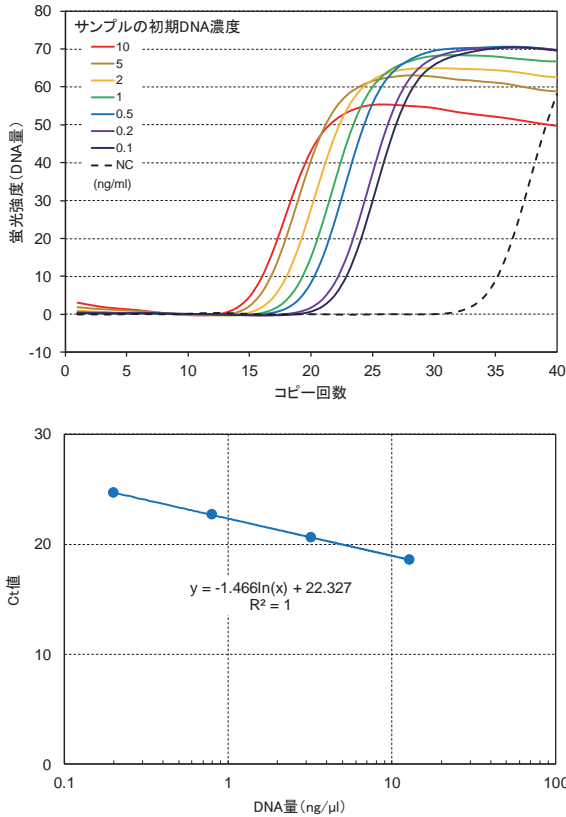
一方、ナミガイ、アカガイの2種については近縁種との塩基配列の違いが少なく、SYBR法での判別が難しかったことから、3ヶ所の塩基配列の違いで判別する「Taqmanプローブ法」により検出法を構築した。



第1図 種特異性の確認結果（ヤマトシジミの例）

リアルタイムPCR法により検出された場合、その生物種名の位置にバンド（黄緑色）が現れるが、上記の例ではヤマトシジミ（F-1）以外にバンドは確認されず、他種を誤検出しないことが確認できる。

構築した二枚貝10種の幼生検出法について種特異性の確認を行った結果、全てにおいて他種の誤検出は確認されず（第1図）、また検出DNA量の定量性も確認されたことから（第2図）、各々、二枚貝幼生の検出に活用できると判断された。



第2図 定量性の確認結果（アサリの例）

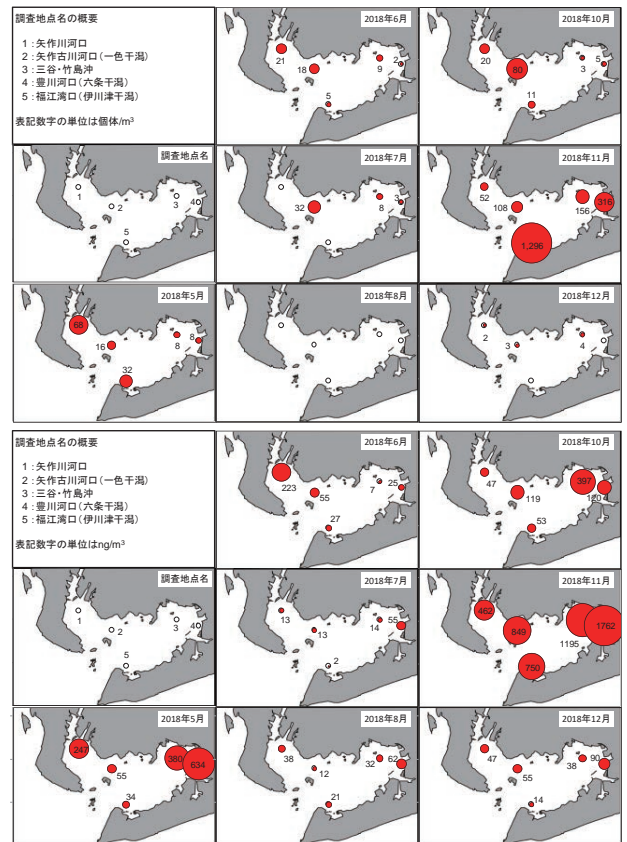
上図はDNA濃度別のリアルタイムPCRの増幅曲線、下図はそれを基に作成した検量線。Ct値とは、DNA量が一定濃度に達するまでに要したコピー回数を示す。

## (2) 幼生検出への適用性の検証

リアルタイムPCR法の検出精度の検証のため、実際に三河湾で採集したサンプルを用いて二枚貝幼生を同定・計数し、従来法（形態識別法）と比較した。なお、対象種は従来法で幼生を識別できないウチムラサキ、ナミガイ、ミルクイの3種は除外し、残る7種とした。

サンプルは三河湾内5ヶ所（水深2m層）からプランクトンネット（目合い100μm）で採集し、2018年5月～12月（9月除く）の間、計7回実施したが、アカガイ、ハマグリは2種は幼生が出現しなかったため、比較ができなかった。残る5種（アサリ、トリガイ、バカガイ、ヤマトシジミ、タイラギ）で比較したところ、バカガイを除く4種では従来法の月別幼生数とリアルタイムPCR法で検出したDNA量が良く一致した（第3図）。バカガイで一致しなかった点について、従来法として用いた形態識別法ではバカガイと近縁のシオフキの幼生識別ができないことから、同法によるバカガイ幼生数にはシオフキ幼生が混じって計数されることが原因と推察された。

また、従来法との比較から除外したウチムラサキ、ナミガイ、ミルクイについても、文献で繁殖期とされる時期にリアルタイムPCR法で幼生由来のDNAが検出されたことから、幼生検出法としての有効性が確認された。



第3図 月別幼生検出数の比較（アサリの例）

上図が従来法、下図がリアルタイムPCRによる結果。円の大きさおよび数値は上図が幼生数（個体/m<sup>3</sup>）、下図がDNA量（ng/m<sup>3</sup>）。

## 3 まとめ

三河湾において水産上重要な二枚貝10種について、リアルタイムPCR法を用いることにより、二枚貝の資源保護を図る上で重要な幼生検出法を確立した。

## 4 今後の進め方

本研究で得られた検出法を活用して三河湾における二枚貝幼生の発生量を把握し、それらと着底稚貝の出現量および漁獲量（成貝量）との相関関係を明らかにすることにより、最終的な目標である二枚貝資源推定法の確立を目指す。

なお、本研究の成果については、2019年度日本水産学会秋季大会にて報告した。また、研究の実施にあたっては一般財団法人電力中央研究所に多大なるご協力をいただいた。関係各位に厚く御礼申し上げます。



執筆者／濱田 稔