

シジミ同定技術確立試験

(シジミ同定技術確立試験事業)

三浦 常廣・後藤 悦郎

1. 研究目的

近年、全国的にみて漁場の減少等によりシジミ漁獲量は漸減傾向にある。一方、シジミの需要は根強いものがあるほか、最近ではシジミに含まれる栄養食品としての機能も注目されており、価格は上昇傾向にある。これらを反映して外国産の輸入シジミが急増しており、一部市場では外国産シジミを宍道湖産ヤマトシジミと称したり、あるいは一部を増量のため混入して市場出荷され流通している事例が県内外で指摘されているが、その詳細は不明である。また、輸入されたシジミの一部が生きたまま放流され自然界で繁殖している事例もあり、本邦在来のシジミ類に与える影響も危惧されている。

ヤマトシジミをはじめとする在来のシジミと外来産輸入シジミを外観から判別することは極めて困難であることから、ミトコンドリア DNA 等を用いた遺伝子技術を用いて同定する手法を早急に確立し対策を立てていく必要がある。

2. 研究方法

平成 15 年度は、シジミ類の判別でもっとも先進的な取り組みを行っている三重大学生物資源学部浅海増殖研究室の古丸 明 助教授にお願いし、判別技術の習得等を主体に実施したので以下にその内容について報告する。また、日本産ヤマトシジミと大陸産汽水シジミ等のミトコンドリア DNA による分析の判別技術確立に向けての試験を、同じく古丸助教授のご指導のもとに実施したのでその概要を別様で報告する。

I シジミ同定技術研究

- (1) 研究日時：平成 15 年 7 月 14 日～7 月 18 日
- (2) 研究場所：三重大学生物資源学部浅海増殖研究室
- (3) 指導教官：助教授 古丸 明
- (4) 研究概要：

研究目的

シジミ価格の上昇に伴い、外国産シジミの輸入量が急増するとともに、宍道湖とその周辺水域においても投棄された外来シジミの一部の生き残ったものが繁殖している可能性が危惧されている。

在来のヤマトシジミの資源保護をはかるためには、外来シジミと在来シジミを判別することが重要である。しかしながら、シジミはその生息環境(底質、餌等)により、様々に色及び形が変化することから、単純に外見で分けることは極めて困難である。

そこで、形態学、組織学、遺伝学等総合的に判別する手法を導入するため、この研究を計画した。

A. シジミ同定技術研究内容

あらかじめ、メール及び電話で実施したい下記の研究内容を古丸先生へ伝え、それをもとに行った。

1) 形態学的分類法

三重大学において分類のために用いている図鑑及び参考文献等の収集

2) 組織学的分類法

雌雄異体型(ヤマトシジミ、セタシジミ)及び雌雄異体型(マシジミ、タイワンシジミ等)の分類

- 3) 精子観察方法
- 4) 保育囊観察方法
雌雄同体型(マシジミ、タイワンシジミ等)は卵胎生である。
- 5) 遺伝学的判別手法について
アロザイム法、PCR法 (RAPD-PCR、TREP-PCR、ミトコンドリアPCR)
- 6) ミトコンドリアDNA(以下 mtDNA と記載)のPCR技術

B. シジミ同定技術研究日程

月日	午 前	午 後
7月14日(月)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 打ち合わせ ・ サンプル処理(島根県より送付) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ サンプル処理 外套膜→倍数体観察用 生殖腺→染色 (雌雄同体・異体) 足→mtDNA抽出
7月15日(火)	<ul style="list-style-type: none"> ・ mtDNA抽出法 (フェノール クロロホルム抽出) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ DAPI染色による蛍光顕微測光による倍数性判定法
7月16日(水)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 既染色済みシジミ生殖腺組織を用いた顕微鏡観察による雌雄同体・異体型判別法 ヘマトキシレン・エオシン染色 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 既染色済みシジミ生殖腺による観察手法 (雌雄同体型判別法) ・ 講座ゼミ参加 (ムラサキイガイの mtDNA 変異体の両性遺伝について)
7月17日(木)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 宍道湖採取活きシジミ観察 (生殖腺、精子、保育囊) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 電気泳動法による DNA 抽出確認 ・ DNA 濃度測定 ・ PCR 増幅法 ・ 生殖腺組織固定手法
7月18日(金)	<ul style="list-style-type: none"> ・ 生殖腺固定-パラフィン処理手法 ・ PCR 増幅結果確認(電気泳動) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 生殖腺組織切片作成-染色法 ・ DNA-PCR 実験試薬、実験機器

C. シジミ同定技術研究実験材料

- ①6月?日宍道湖西部採取冷凍シジミ(マシジミ系?)
- ②6月9日県漁連から入手した北朝鮮元山産ヤマトシジミ・韓国産ヤマトシジミ・中国太后産淡水シジミ-何れも冷凍
- ③6月14日新建川上流採取冷凍シジミ (?)
- ④6月24日高津川用水路冷凍シジミ(マシジミ?)
- ⑤6月24日八戸川採取シジミ(殻だけ)
- ⑥7月10日斐伊川河口(マシジミ?)・新建川河口部採取シジミ (?)
- ⑦7月16日宍道湖斐伊川河口部採取活シジミ (ヤマトシジミ、マシジミ?-2種類)

以上のうち、⑥の斐伊川河口(マシジミ?)を用いて、DAPI染色による蛍光顕微測光による倍数性判定、PCR増幅及び新建川河口部採取シジミ(?)を用いてヘマトキシレン・エオシン生殖腺組織染色による雌雄同体・異体判別の実験材料に用いた。また、⑦の宍道湖斐伊川河口部活シジミ(ヤマトシジミ、マシジミ?-2種類)を用いて、顕微鏡による雌雄同体・異体の判別、精子鞭毛数及び保育囊の観察を行った。

D. シジミ同定技術各論

1) 形態学的分類法

- ・特に決まったシジミ分類のための図鑑、マニュアル的な文献はない。
- ・シジミは色形のバリエーションに富むため外観だけで分類するのは極めて困難で危険である。
- ・シジミは1種類でシノニムで分けられるとするブライアンモルトンの説もあるが、雌雄同体と雌雄異体のものまで同一種とみなすのは無理がある。
- ・マシジミとタイワンシジミは、側歯に棚状のものがあるのがマシジミ、ないのがタイワンシジミとしていたが中間的なものもあり、決定的なものではない。
- ・上記③の7月新建川上流採取冷凍シジミ(?)は形が扁平で、側歯も非常に薄く、今まで見たことのないタイプとのことであった。

2) 光学顕微鏡の生殖腺直接観察による分類法

①生殖腺観察(繁殖期に有効)

- ・シジミの雌雄同体のものは精子と卵子が同時に観察される。
- ・タイワンシジミでは比較的周年生殖能力がある場合がある。

②精子観察

- ・頭部の大きさ：3倍体(マシジミ)>2倍体(雄性発生)>2倍体(雌雄異体)
- ・鞭毛数：雌雄同体型2本、雌雄異体型1本

③保育嚢

- ・雌雄同体のシジミは鰓に保育嚢を有し、梅雨明け時に観察されやすい。

④その他

- ・未成熟で、雌雄同体かどうか区別が付かない場合、好適条件下で飼育すれば、判別しやすくなる可能性もある。

3) 染色による倍数体顕微鏡観察による分類法

- ・染色体数はマシジミが通常3倍体、タイワンシジミ、セタシジミ及びヤマトシジミ等の汽水種は2倍体である。しかしながら、マシジミでも九州で1例2倍体、タイワンシジミも国内外で数例3倍体と4倍体のものも見つかっており、絶対的なものではない。
- ・染色法により倍数性を観察する手法としては次の2つがある。

①核染色法

- ・生殖細胞等、分裂の盛んな組織をもちいて染色体そのものの組み合わせで観察する方法
- ・組織切片をうまく作ることが肝要であり、人間用には自動カウントする装置も開発されているが、シジミで用いるには相当な熟練と手間が必要となる。

②DAPI染色による顕微蛍光測定法(シジミ2倍体と3倍体の区別にもちいる)

- ・外套膜あるいは鰓等の小片をカルノア液(メタノール3:酢酸1)で固定した後、酢酸中で細胞をバラバラにして、DAPI染色し、蛍光顕微鏡で見る手法である(染色体が蛍光体と結びつき染色体数が多いものほど発色することを応用)。
- ・DAPI染色液は光に弱いので手早く観察する必要があるが、比較的簡便な方法である。しかしながら蛍光装置の外に200万円~300万円以上する読取の装置(PHOTOMETER)が必要である。

4) 生殖腺顕微鏡観察法

- ・生殖腺を切り出し10%中性ホルマリンで固定し、定法によりパラフィン切片を作りヘマト

キシリン・エオシン染色を行い、顕微鏡観察する方法である。生殖腺の発達する時期には非常に有効かつ得られる情報も多い。一雌雄同体・異体がはっきり区別でき、生殖細胞の数、精子の形成能力等がわかる。

- ・鰓と一緒に切った場合保育嚢が見られる場合もある。

(参考図書；顕微鏡標本の作り方 (株)裳華堂 田中克己、浜清 著作)

5) mtDNA-PCR 法

- ・アイソザイムや他の PCR と比べると簡単で取り組みやすいとのことである。
- ・mtDNA の抽出はフェノールクロロホルム法で行う。
- ・mtDNA の 16SrRNA 領域と CO I 領域を PCR により増幅して最終的にシーケンサーで遺伝子配列を読み取る方法である。
- ・mtDNA から見たシジミの類縁関係は大きく淡水産種(マシジミ、タイワンシジミ、セタシジミ)とヤマトシジミ等の汽水産種に分類できる。
- ・淡水産種のうちセタシジミは雌雄異体で、卵生(浮遊期は持たない)であること、更に染色体数も明らかに異なり両性発生であることから別種とみなされる。しかしながら、タイワンシジミとマシジミ間においては、遺伝子配列を見る限りにおいては明確に別種であるとの差は見いだされていない。(マシジミでは、アイソザイムや他の PCR 法でも地域的に離れていても遺伝的均一性が極めて高いことが知られている。)
- ・汽水種の雌雄異体型ではヤマトシジミ以外では韓国が原産地と思われるウスシジミが利根川で見つかっている。これについては、mtDNA で種類分けが出来たとしている。
- ・ウスシジミはヤマトシジミと交配可能なことがわかっているが、生息量の絶対数が違う限りあまり問題がないだろうということであった。
- ・mtDNA の 16SrRNA 領域は変異性が少ないことから、日本産ヤマトシジミと外国産雌雄異体型のシジミの分類に有効であろうということであった。
- ・mtDNA の CO I 領域は変異性が大きく、国内ヤマトシジミの分類に有効で、大きく北方系と南方系に分けることが出来るとのことであるが、違いは余りなく、しかも、移植放流が行われている河川や湖沼では特に区分けは難しいだろうということであった(交雑の可能性が少ない小河川に生息するヤマトシジミを用いて mtDNA 調査を行う必要がある)。

E. シジミ同定技術研究のまとめ及び成果

- ①特にシジミ繁殖期においては、産業的に重要なヤマトシジミ(雌雄異体型)と現在宍道湖西岸で見られる他のシジミ(雌雄同体型)を DNA 等の特殊技術を使わなくても、光学顕微鏡(生殖腺、精子鞭毛、組織切片)を用いて区別できることがわかった。
- ②倍数性(別添)及び生殖腺の組織学的検査による分類方法の技術習得が出来た。
- ③mtDNA のフェノール・クロロホルム抽出及び PCR 増幅法のマニュアルと分析に必要最低限の薬品と器具のリスト(別添)をピックアップできた。
- ④mtDNA でヤマトシジミと他の大陸系雌雄異体型シジミが区別できることがわかった。(汽水性-雌雄異体型のシジミが見つかったときに対応が可能である。)
- ⑤ここ 1~2 年のうちに mtDNA の遺伝子配列をシーケンサーで読み取る方法でなく、ヤマトシジミ mtDNA の特定領域のみに対応した増幅用プライマーを開発することにより、PCR 装置と電気泳動装置のみでヤマトシジミと他のシジミを分類する手法を開発予定であるとのこ

とであった。

⑥古丸先生の今までの成果と今回の研究で島根県内(宍道湖中心)において生息分布している可能性があるシジミの種類が明らかになった。

- ・ヤマトシジミ *Corbicula japonica* 雌雄異体型 両性生殖 卵生
- ・マシジミ *C. leana* 雌雄同体型 雄性生殖 卵胎生 3倍体
- ・タイワンシジミ? *C. fluminea*? (もともと宍道湖にも生息していた可能性もあり) 雌雄同体型 雄性生殖 卵胎生 2倍体 現在のところ遺伝子配列でマシジミと明確な判別が困難 斐伊川上流部や江川に生息分布するものと違うのか更に調査が必要である。
- ・不明種 *C. sp* 新建川及び斐伊川河口に分布 雌雄同体型 卵胎生
 前回(4月14日に送付)生殖腺が発達しておらず雌雄異体型と見られていたが今回の研修で雌雄同体型であることが判明した。貝殻の形、貝殻内部の隔壁の色等マシジミやタイワンシジミと異なる。
- ・不明種 *C. sp* 新建川上流部に生息していたもの 詳細不明

⑧雌雄同体型と雌雄異体型の交雑は考えにくいとのことであった。

産業的に重要なヤマトシジミに関係が深いものについては、ある程度突っ込んだ調査も必要と思われる。なお、小川原湖等で問題になっている、バチ型シジミ(中国原産、淡水種、両性・雌雄異体型、卵生)の *C. larlirti* は、宍道湖では今のところ見つかっていない。

以下に、現在までに分かっているシジミの簡便な判別方法を参考までに記載した。

ヤマトシジミとそれ以外のシジミの判定手法

汽水性種か淡水性種かどうかの判定(茨城県内水面水産試験場)

試験区	水管：○出る ×出ない		
真水	○	○	×
塩水 (0.8%)	○	×	×
判断	汽水性	淡水性	活性の問題

汽水種



雌雄異体・雌雄同体かどうかの判別

- ① 生殖腺検査(卵と精子を同時に持つ→雌雄同体)
- ② 精子検査(頭の大きさ、鞭毛数→大きく、2本→雌雄同体)
- ③ 性生殖腺組織検査(卵巣と精巣が混在→雌雄同体)

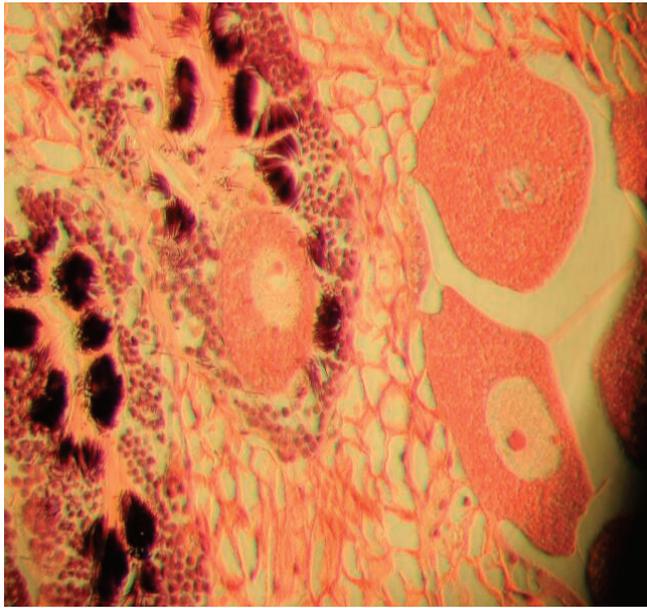


雌雄異体型

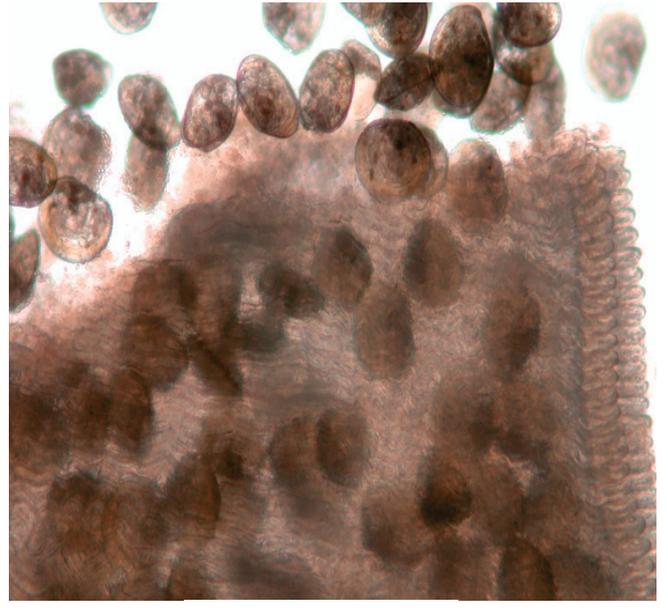


雌雄同体型

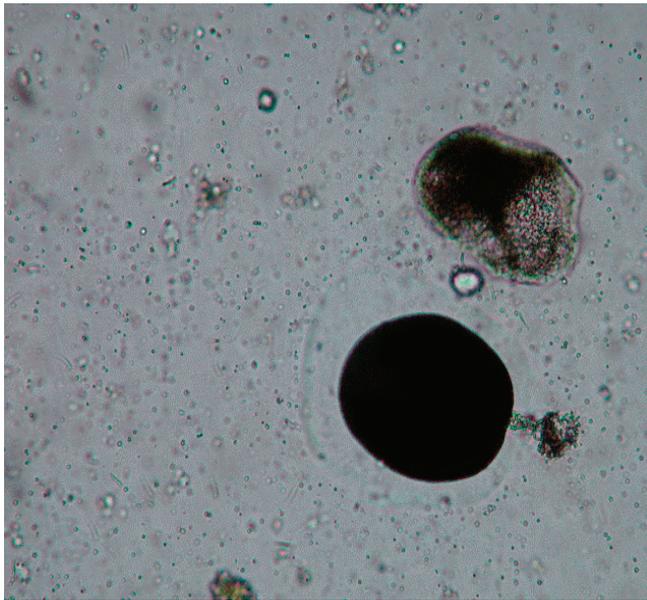
汽水種で雌雄異体のシジミは、更に遺伝子解析等を行う必要がある。



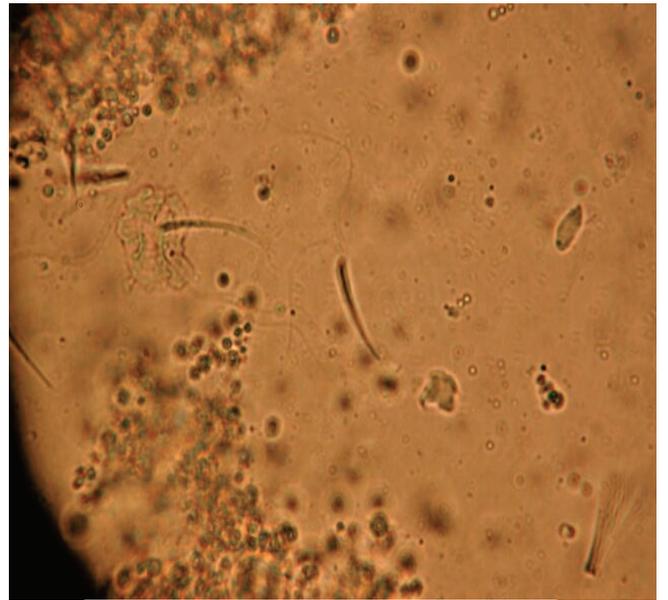
① 生殖腺 (卵細胞と精細胞 (精子))



② 鰓内の幼生



③ 卵と精子



④ 精子 (2本の鞭毛を有する)

図1 雌雄同体型のシジミの特徴

II シジミ判別技術確立試験

日本産ヤマトシジミと大陸産シジミ等の

ミトコンドリア DNA 分析結果

*三重大学生物資源学部 古丸 明

緒言

現在、外国から輸入されたシジミが日本産シジミと産地表示されて市場に多く出回っている。新 JAS 法によれば、これは違法な行為である。この問題の背景として、日本産ヤマトシジミの絶対量の不足、輸入シジミが国内産シジミのに比較してかなり価格が安いこと、更に輸入されたシジミの貝殻外観が非常によく似ており、外観からは種判別が極めて困難であることがあげられる。本研究では、島根県宍道湖産等の国産ヤマトシジミと大陸産汽水シジミ等のミトコンドリア DNA の塩基配列を解読した。また、日本国内で分布が確認されている雌雄同体種であるタイワンシジミとマシジミ、琵琶湖特産種である雌雄異体のセタシジミについても同様な手法で解読していることから併せて遺伝子配列の相違を見た。更に、それらの違いから国産ヤマトシジミと、輸入されたシジミ等の判別が可能かどうか検討を加えたので報告する。

材料と方法

日本産ヤマトシジミとして宍道湖産、青森県小川原湖産、十三湖産、三重県一木川産及び三渡川産の個体を標本とした。輸入シジミ標本としては、中国産汽水種、ロシア産汽水種のシジミおよび輸入された産地不詳の輸入シジミを材料とした。これらはいずれも雌雄異体の標本であった。また、淡水産の雌雄同体種であるタイワンシジミは京都市の平安神宮の用水路で採取したもの、マシジミは三重県明和町産、雌雄異体種であるセタシジミは琵琶湖産を使用して分析を行ったものである。

分析方法としては、フェノールクロロフォルム法により足筋肉から粗 DNA を抽出した。これを PCR 用の鋳型として、ミトコンドリア 16S リボソーム RNA 領域をユニバーサルプライマーで増幅した。更に PCR 産物をゲル濾過し、常法により ABI シークエンサーにより、塩基配列を解読した。

結果と論議

図 1 に各標本の 16S リボソーム RNA 領域塩基配列を示した。中国産汽水種、ロシア産汽水種及び産地不詳輸入シジミ等は日本産ヤマトシジミとは特定部位の塩基配列が異なっていた。たとえば、185-186 塩基目が国内のヤマトシジミではいずれのサンプルも TT であったのに対し、外国産汽水シジミやその他の種類では AA となっていた。また、269-292 塩基目で日本産ヤマトシジミ、中国産、ロシア産、産地不詳輸入シジミ、その他の淡水産シジミ（タイワンシジミ、マシジミ、セタシジミ）でそれぞれ大きく異なっていた。更に、その他の場所でも塩基配列の相違が見られている。このように大陸産汽水シジミ等とヤマトシジミを判別する事ができるサイト（遺伝子配列）は数多く見出す事ができる。

これらのことから、大陸産シジミ等と日本産ヤマトシジミをミトコンドリア DNA 分析で明確に判別することが可能であることが分かった。また、今回分析した 16SRNA 領域は国内産ヤマトシジミの標本ではほとんど変異のない領域であり、国産ヤマトシジミとそれ以外のシジミの判別を行うのに適当な領域であると判断された。

*現 三重大学生物資源学部 教授

一方、淡水種のタイワンシジミは遺伝子配列においてマシジミと大きな差異がないことが分かった。

今後はさらにできるだけ多くの異なる産地の外国産シジミを入手し、解析することにより、より簡便な判別手法等の確立にむけて遺伝子配列情報を蓄積・整理していく必要がある。

		160	170	180	190	200	
ヤマトシジミ	島根県宍道湖	151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAATTAAG	AAGTTAACTT	200
	青森県十三湖	151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAATTAAG	AAGTTAACTT	200
	青森県小川原湖	151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAATTAAG	AAGTTAACTT	200
	三重県市木川	151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAATTAAG	AAGTTAACTT	200
	三重県三渡川	151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAATTAAG	AAGTTAACTT	200
中国産(雌雄異体)	151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAAA AA AAG	AAGTTAACTT	200	
ロシア産(雌雄異体)	151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAAA AA AAG	AAGTTAACTT	200	
輸入不明種(雌雄異体)	H15.2入手1	151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAAA AA AAG	AAGTTAACTT	200
輸入不明種(雌雄異体)	H15.3入手2	151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAAA AA AAG	AAGTTAACTT	200
タイワンシジミ		151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAAA AA AAG	AAGTTAACTT	200
マシジミ		151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAAA AA AAG	AAGTTAACTT	200
セタシジミ		151 TGGTTTTGACG	GTAAAAAGC	TGTTTTAAAA	ATAAA AA AAG	AAGTTAACTT	200
		260	270	280	290	300	
ヤマトシジミ	島根県宍道湖	251 CTTAATTAGG	ATAGCTTTAT	TTAAAAGATA	TCTAAAATTT	TATTGGGGCA	300
	青森県十三湖	251 CTTAATTAGG	ATAGCTTTAT	TTAAAAGATA	TCTAAAATTT	TATTGGGGCA	300
	青森県小川原湖	251 CTTAATTAGG	ATAGCTTTAT	TTAAAAGATA	TCTAAAATTT	TATTGGGGCA	300
	三重県市木川	251 CTTAATTAGG	ATAGCTTTAT	TTAAAAGATA	TCTAAAATTT	TATTGGGGCA	300
	三重県三渡川	251 CTTAATTAGG	ATAGCTTTAT	TTAAAAGATA	TCTAAAATTT	TATTGGGGCA	300
中国産(雌雄異体)	251 CTTAATTAGG	ATA ACTT-AA	TTAAAAGATA	TCTAAAATTT	TATTGGGGCA	300	
ロシア産(雌雄異体)	251 CTTAATTAGG	ATA ACTT-AT	TTAAAAGATA	TCTAAAATTT	TATTGGGGCA	300	
輸入不明種(雌雄異体)	H15.2入手1	251 CTTAATTAG A	ATA ACTT AA G	TGTA- GGTTA	TTAAAATTT	TATTGGGGCA	300
輸入不明種(雌雄異体)	H15.3入手2	251 CTTAATTAG A	ATA ACTT AA G	TGTA- GGTTA	TTAAAATTT	TATTGGGGCA	300
タイワンシジミ		251 CTTAATTAG A	ATA ACTT-AG	ATGTAG GT T	TTAAAATTT	TATTGGGGCA	300
マシジミ		251 CTTAATTAG A	ATA AC--AAA	ATGTAG GT-A	TTAAAATTT	TATTGGGGCA	300
セタシジミ		251 CTTAATTAG A	-T GA CT--AA	ATGTAG GT-A	TTAAAATTT	TATTGGGGCA	300
		310	320	330	340	350	
ヤマトシジミ	島根県宍道湖	301 ATAGAAAATG	AAAAGAATCA	TTTTTT-ATA	GAATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350
	青森県十三湖	301 ATAGAAAATG	AAAAGAATCA	TTTTTT-ATA	GAATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350
	青森県小川原湖	301 ATAGAAAATG	AAAAGAATCA	TTTTTT-ATA	GAATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350
	三重県市木川	301 ATAGAAAATG	AAAAGAATCA	TTTTTT-ATA	GAATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350
	三重県三渡川	301 ATAGAAAATG	AAAAGAATCA	TTTTTT-ATA	GAATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350
中国産(雌雄異体)	301 ATAGAAAATG	AAAT GAATCA	TTTTTT -TA	TTATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350	
ロシア産(雌雄異体)	301 ATAGAAAATG	AAAT GAATCA	TTTTTT -TA	TTATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350	
輸入不明種(雌雄異体)	H15.2入手1	301 ATAGAAAATG	AAAT GAATCA	TTTTTT -TA	TTATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350
輸入不明種(雌雄異体)	H15.3入手2	301 ATAGAAAATG	AAAT GAATCA	TTTTTT -TA	TTATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350
タイワンシジミ		301 ATAGAAAATG	AAAT GAATCA	TTTTTT -TA	TTATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350
マシジミ		301 ATAGAAAATG	AAAT GAATCA	TTTTTT -TA	TTATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350
セタシジミ		301 ATAGAAAATG	AAAT GAATCA	TTTTTT TTTA	TTATAAGGAT	CCAGTTTTGA	350

図1 日本産ヤマトシジミと大陸産汽水シジミ等の遺伝子配列の相違(一部分)