

シジミ同定技術確立試験

(宍道湖・中海水産振興事業)

遺伝子および Sr/Ca 比を用いた日本産ヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) と外国産シジミ (*C. Sp.*) の産地判別方法の確立

古丸 明・安木 茂

1. 研究目的

シジミは国内内水面水産業における重要な生物資源であり、中でもヤマトシジミは最重要種である。しかし、国内のシジミ生産量は生息環境の悪化などにより減少の一途をたどっている。こうした資源の減少と価格高騰に伴い、中国、韓国、北朝鮮、ロシアからのシジミ輸入量は年々増加し、平成 13 年には国内生産量を上回るまでになった。

外国産シジミの輸入量増加により交雑種の形成、新たな疾病の発生、偽装表示問題などさまざまな問題が懸念されている。シジミ類は同種においても貝殻の形態が生息場所によって異なり、さらに遺伝的変異性に富む。その分類は形態のみについて行われてきたため混乱が生じ、大陸産シジミについては現在も種が同定できていないものが多い。

こうしたことから外国産シジミと国内産ヤマトシジミとを判別する手法の早急な開発が必要とされてきた。

本研究では、ミトコンドリア DNA の 16SrRNA 領域を遺伝子マーカーに用いた塩基配列解析()、一塩基多型 (SNP) による解析() および、貝殻断面結晶構造の分析()、貝殻中に含まれるストロンチウム (Sr)/カルシウム(Ca)比測定()の 4 手法によりヤマトシジミと外国産シジミの産地判別法の開発を試みた。

2. 研究方法

日本産ヤマトシジミは青森県小川原湖、千葉県江戸川、三重県揖斐川、島根県宍道湖、島根県神西湖のものを、マシジミは長崎県壱岐島幡鉾川、台湾産シジミは岐阜県揖斐川、三重県菟川で採集したものをを用いた。

外国産シジミは中国福建省ミン江、中国江蘇省太湖、朝鮮半島北部鴨緑江、北朝鮮元山の個体を用いた。ちなみに採集地が特定できたのは鴨緑江のみでその他は市場での産地表示に従っている。

ミトコンドリア DNA16SrRNA 解析については、シジミの閉殻筋からフェノール・クロロホルム法により DNA を抽出し、PCR 法によりミトコンドリア DNA の 16SrRNA の領域約 450bp を増幅させ、シークエンス解析により塩基配列を読み取った。一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms/SNP) を用いた産地判別では、ABI PRISM3100Genetic Analyzer (Applied Biosystem) により SNP を検出し、ABI GeneScan (Applied Biosystem) により解析を行った。貝殻断面結晶構造の観察については、種・産地特有の情報を有していると予測される貝殻断面結晶構造をエポキシ樹脂で包囲し、ダイヤモンドカッターでカットし光学顕微鏡および電子顕微鏡により貝の断面を観察した。EPMA (Electron Probe Micro Analyzer) を用いた貝殻 Sr/Ca 比測定については EPMA により得られた X 線強度値を用いて貝殻平面および断面の Sr/Ca 比を測定した。

三重大学生物生産学部教授

3. 研究結果と考察

ミトコンドリア DNA16SrRNA 解析

日本産ヤマトシジミについてミトコンドリア DNA16SrRNA の塩基配列を比較したところ、12 のハプロタイプが見られた。そのうち青森県小川原湖では50 個体分析した結果1 つのハプロタイプ(J2:北日本型)のみ確認され、島根県宍道湖では40 個体中35 個体が北日本以外の地域で最も一般的なハプロタイプ(J1 : 南西日本型)であったが、後の5 個体はすべて異なるハプロタイプであった。島根県神西湖でも、20 個体中16 個がJ1 で、残りの4 個体はすべて異なるハプロタイプであったが、宍道湖のJ1 以外のハプロタイプとは一致しなかった。千葉県江戸川では20 個体中19 個がJ1 で残りの1 個体は宍道湖や神西湖とは異なるハプロタイプであった。三重県揖斐川ではすべてJ1 であった。

宍道湖と国内他産地のヤマトシジミを比較すると、小川原湖では52 番目のサイトが小川原湖でアデニン(A)であることからはっきりと分離することが可能である。その他の産地についてはJ1 以外のハプロタイプがすべて異なることから、個体数を充実することにより判別可能であると考えられた。

日本産ヤマトシジミと外国産シジミについて塩基配列の比較を行ったところ、計43 サイトで変異が見られ、29 のハプロタイプが見られた。日本産ヤマトシジミと外国産シジミについては、315 番目のサイトにおいて、日本産ヤマトシジミでは全個体で欠失していたのに対し、外国産シジミでは元山の少数のハプロタイプを除きすべてチミン(T)であった。これにより日本産シジミと外国産シジミは315 番目のサイトにより判別が可能であると考えられた。

一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms/SNP) を用いた産地判別

小川原湖の個体を20 個体分析した結果、すべて北日本型ヤマトシジミと判定され、宍道湖、神西湖はすべて南西日本型ヤマトシジミと判定され、塩基配列解析の結果と一致した。プライマーを新たに設計することにより詳細な判別も可能と考えられる。

貝殻断面結晶構造の観察

全サンプルにおいて層による稚貝は見られたが、種・産地間で構造上の顕著な稚貝は見られなかった。

EPMA (Electron Probe Micro Analyzer) を用いた貝殻 Sr/Ca 比測定

神西湖ヤマトシジミ、小川原湖ヤマトシジミ、揖斐川ヤマトシジミの間で Sr/Ca 比に明瞭な差が見られた。塩分濃度 10 ~ 30psu の高塩分汽水湖である神西湖で最も高く、Sr/Ca 比は5-10 であった。塩分濃度0.1 ~ 1.5psu である小川原湖では、比が3-5 であった。淡水のマシジミで最も比が低く0-2 であった。

塩分濃度の異なる3 つの産地で Sr/Ca 比の差が見られたことにより、生息環境の塩分濃度をある程度反映していることが認められ、生息環境の情報が少ない外国産シジミのたまかな環境推定が可能であると考えられた。