

松山市重信川水系における淡水産シジミ類の生態遺伝学的研究

(愛媛大学教育学部) 石井隆志

(理科教育講座) 中村依子

(愛媛大学名誉教授) 家山博史

Ecological genetics of freshwater clams in Matsuyama, Ehime Prefecture

Takashi ISHII, Yoriko NAKAMURA, Hiroshi IEYAMA

(平成 29 年 8 月 31 日受理)

抄録： マシジミは日本の在来種で、タイワンシジミは中国や台湾に分布する種である。2004年に松山平野における重信川右岸の水路でタイワンシジミの生息が確認されたが、現状は不明である。本研究では、両種を分類するための形態的指標を再検討して殻形態の変異を5タイプに分け、最初の調査から12年後の2016年現在の松山平野における両種の生息状況を11地点で調査した。また、タイプごとの核ゲノムの違いを調べるためにPCRによるDNA解析を行った。2004年の調査ではタイワンシジミは重信川左岸では生息が確認されなかったが、現在では左岸すべての調査地点でタイワンシジミが確認されたことから、タイワンシジミが生息地を広げていることが示唆された。

Abstracts : The freshwater clam *Corbicula leana* is a species living in Japan, while the freshwater clam *Corbicula fluminea* is a species living mainly in China and Taiwan. In 2004, *Corbicula fluminea* were found in canals within the right bank of the River Shigenobu in the Matsuyama plain, but their presence thereafter was unknown. In this study, we reviewed the morphological characteristics of the two species, classified the two species into five types according to their morphological shell variation, and re-examined their inhabiting situation at 11 points in the Matsuyama Plain in 2016. We also investigated genomic characteristics of the five types of the clams by PCR analysis. Although *Corbicula fluminea* were not found within the left bank of the River Shigenobu in 2004, they made their habitat at all 4 points investigated within the left bank in 2016. Our results suggest that the habitation area of *Corbicula fluminea* is increasing.

キーワード： マシジミ、タイワンシジミ、DNA、淡水産シジミ類、生息分布、松山、PCR

Keywords : *Corbicula leana*, *Corbicula fluminea*, DNA, Freshwater clam, Habitat distribution, Matsuyama, PCR

1. はじめに

軟体動物門二枚貝綱マルスダレガイ目シジミ科シジミ属は日本及び周辺地域に約18種が存在し、日本には日本、朝鮮半島、中国の汽水域に広く生息するヤマトシジミ (*Corbicula japonica* Prime, 1864)、琵琶湖固有

種のセタシジミ (*C. sandai* Reinhardt, 1878)、東北から四国・九州と奄美大島の淡水域に広く分布するマシジミ (*C. leana* Prime, 1864) の3種が生息している¹⁾。1980年代以降、川の水質汚濁や護岸工事などによる環境の変化により日本産ヤマトシジミの漁獲量が減

少し、中国や朝鮮半島から安価な外国産シジミの輸入量が増加したことに伴って、日本産とは異なる殻形態のシジミ類が確認されるようになった^{2,3)}。これは日本各地での、中国や朝鮮半島産の輸入シジミの蓄養、放流、生きたままの投棄などが原因とされている³⁾。外来のシジミの生息確認は1987年⁴⁾に始まり、石橋・古丸(2003)⁵⁾は琵琶湖淀川水系では大和川を除くほとんどの水域でマシジミが姿を消し、外来のヤマトシジミとともにタイワンシジミ(*C. fluminea* Müller, 1774)が繁殖していると報告している。日本の在来種マシジミは3倍体で殻内面が薄い紫色をしている⁶⁾が、タイワンシジミは中国や台湾の淡水域に分布している種で、2~4倍体で殻内面の色は主に白色であるが、紫色の個体も確認されている⁷⁾。2004年には松山平野における重信川右岸の水路でもタイワンシジミの生息が確認されており、下流(西部)から上流(東部)へマシジミに対するタイワンシジミの比率が上がっていることから、東温市の川内地区の取水路から内川の取水路を經由してタイワンシジミが広がったと推測されているが⁸⁾、現状は不明である。

本研究では、2004年の調査から12年後の現在の松山平野重信川水系におけるマシジミとタイワンシジミの生息状況を明らかにすることを目的とし、重信川水系でのマシジミ、タイワンシジミの標本採集を行い、従来の形態的な判断基準を用いて種の同定を行い、各採集地の両種の比率を調査した。また、マシジミとタイワンシジミの中間的な形質をもつ個体について、形態的指標を再検討し、タイプごとの生息状況を明らかにした。さらに、両種では鰓細胞の染色体上の5S rDNAと18S rDNAのそれぞれの局在数と位置、45S rDNAのITS領域の長さなどの各ゲノムの相違も報告されている⁹⁾ことから、タイプごとのシジミ類の核ゲノムの違いを検出するPCRによってDNA解析を行った。

2. 材料および方法

2-1. 実験材料

本研究では、松山平野を流れる重信川水系の11地点(図1)の水路からマシジミおよびタイワンシジミを採集した。採集は2016年10-11月に行った。採集時の

水質はパックテスト(共立理化学研究所株式会社)でCODを測定した。



図1 松山平野のシジミ類の採集地点

- St. 1 東温市(旧川内町)吉久:調査日 2016.10.15
- St. 2 東温市(旧重信町)牛渕:調査日 2016.10.15
- St. 3 東温市(旧重信町)北野田:調査日 2016.10.15
- St. 4 松山市南高井町:調査日 2016.10.15
- St. 5 松山市南土井町:調査日 2016.10.15
- St. 6 松山市井門町:調査日 2016.10.15
- St. 7 東温市(旧重信町)開発:調査日 2016.10.15
- St. 8 松山市小村町:調査日 2016.10.15
- St. 9 伊予郡松前町徳丸:調査日 2016.10.15
- St. 10 伊予郡松前町恵久美:調査日 2016.10.15
- St. 11 東温市則之内:調査日 2016.11.26

(国土地理院の電子地形図に追記して掲載)

2-2. 定量採集

定量採集のために、25 cm 四方の方形枠を水底に設置し、手網とシャベルを用いて土砂とともに方形枠内の底生生物を採取した。土砂を含む底生生物をポリ瓶に移した後、最終濃度が5~10%になるようにホルマリンを加え固定した。実験室に持ち帰ったサンプルは、水洗してバットに移し、ピンセットでシジミ類だけをシャーレに分別し自然乾燥後、地点毎に保存した。

2-3. 貝殻の観察

メスとカミソリを用いてシジミの開殻筋を切断して貝殻を開いた後、ピンセットで軟体部分を除去し、室内で自然乾燥させた。殻の色を見やすくするために、殻内面にグリセリン(ナカライテスク株式会社)を綿棒で塗布し、肉眼と双眼実体顕微鏡(カートン光学株

式会社、M-9199) で観察した。

2-4. DNA の抽出と精製

(1) 100%エタノールで固定したシジミの軟体部から、足を約 5 mg 切り取り、メスとピンセットを用いて細かく刻んだ。

(2) 1.5 mL チューブに試料をいれ、150 μ L の抽出溶液 (5M NaCl 3 mL、1M Tris-HCl (pH 8.0) 1 mL、0.5M EDTA 2 mL、SDS 0.1 g を DW に溶解し 100 mL とした) に懸濁し、氷上で数分間ホモジナイザーペッスル (ケニス株式会社) を用いてホモジナイズした。

(3) 10% SDS 溶液を 30 μ L 添加後、55°C で 1 時間攪拌加熱した。

(4) 180 μ L のフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール混合液 (25 : 24 : 1) (ナカライテスク株式会社) を加えて強く上下に振り、10 分間転倒混和し、6000 rpm で室温、10 分間遠心分離を行った。

(5) 2 層に分離した上層を回収して新しいチューブに移した後、再度 180 μ L のフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコールを加え、強く上下に振り 10 分間転倒混和し、6000 rpm で室温、10 分間遠心分離して抽出を行った。

(6) 2 層に分離した上層を回収し新しいチューブに移した後、2 倍量の 100%エタノールを加えて数秒間振り混ぜ、15000 rpm で 4°C、30 分間の遠心分離を行った。

(7) チューブを傾けて内部の液体を捨て、100 μ L の 70%エタノールを加え 15000 rpm で 4°C、10 分間の遠心分離を行った。

(8) チューブを傾けてエタノールを捨て、蓋を開けた状態で逆さまにし、約 30 分静置した。

(9) チューブに 25 μ L の TE 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) を加え、沈殿を溶解した DNA をテンプレートとして用いた。

2-5. PCR 法による DNA の増幅・電気泳動

rRNA の遺伝情報をコードしている rDNA 領域には、18S rDNA と 5.8S rDNA の間にそれぞれ ITS と呼ばれるスペーサー領域が存在している。ITS 領域は塩基置換の速度が速いため、属レベルの種間や同種の集団間での比較検討に適している¹⁰⁾。本実験では、18S rDNA と 5.8S rDNA の間の ITS 領域を増幅するために ITS1、ITS2 のプライマーを用いた。プライマーの塩基配列は以下の通りである。

ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS2 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'

10 μ L の PCR の反応液を調製し、PCR 反応を行った。PCR の条件は DNA の変性を 96°C で 5 分間行った。続いて 96°C で 30 秒間、55°C で 60 秒間、72°C で 60 秒間のステップを 30 回繰り返した。その後の伸長反応は 72°C で 5 分間行った。PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで電気泳動した。泳動後エチジウムブロマイド溶液で染色し、ゲル撮影装置 SCOPE21 (アズワン社) を用いて写真を撮影し解析した。

3. 結果

3-1. 従来の同定法によるマシジミとタイワンシジミの個体数の割合について

本研究では松山平野における 10 か所の調査地点 (図 1 の St. 1~St. 10) から、1640 個体のシジミ類の貝殻を採集し、外部形態の特徴から種同定を行った。増田と内山 (2004)⁶⁾ および家山 (2004)⁸⁾ の分類方法に従い、殻頂部分のはげたところが紫色を呈し (図 2A、黒い矢印)、殻内面は紫色を呈し (図 2B、黒い矢印)、殻表面に放射状線を有する (図 2C、D、黒い矢印) ものをマシジミ、殻頂部分のはげたところが桃色を呈し (図 2E、黒い矢印)、殻内面が白色を呈し (図 2F、黒い矢印)、殻表面に放射状線が無いもの (図 2G、H、黒い矢印) をタイワンシジミとした。

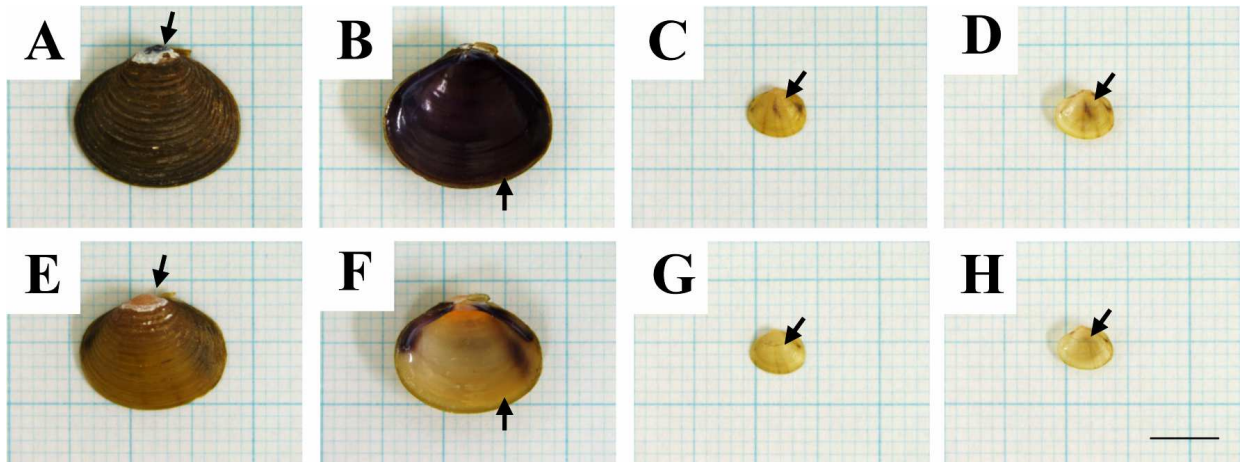


図2 マシジミとタイワンシジミの貝殻の形態

(A) マシジミの左殻表面(成貝) (B) マシジミの右殻内面(成貝) (C) マシジミの左殻表面(幼貝)
 (D) マシジミの右殻内面(幼貝) (E) タイワンシジミの左殻表面(成貝) (F) タイワンシジミの右殻内面(成貝)
 (G) タイワンシジミの左殻表面(幼貝) (H) タイワンシジミの右殻内面(幼貝) スケールバーは5 mm

10 地点で採集されたシジミ類 1640 個体中、マシジミは 1133 個体、タイワンシジミは 507 個体であった。各地点のそれぞれの個体数は以下の通りである。

(1) 東温市(旧川内町)吉久(St. 1)

水深 6~7 cm、川幅 1 m95 cm、COD 5 mg/L であった。マシジミは 118 個体、タイワンシジミは 103 個体採集された(表 1)。マシジミとタイワンシジミの個体数比は、マシジミが 53%、タイワンシジミが 47%であった。

(2) 東温市(旧重信町)牛湊(St. 2)

水深 24~43 cm、川幅 4 m26 cm、COD 5 mg/L であった。マシジミは 117 個体、タイワンシジミは 33 個体採集された(表 1)。マシジミとタイワンシジミの個体数比は、マシジミが 78%、タイワンシジミが 22%であった。

(3) 東温市(旧重信町)北野田(St. 3)

水深 5~6 cm、川幅 2 m47 cm、COD 3 mg/L であった。マシジミは 598 個体、タイワンシジミは 309 個体採集された(表 1)。マシジミとタイワンシジミの個体数比は、マシジミが 66%、タイワンシジミが 34%であった。

(4) 松山市南高井町(St. 4)

水深 18~20 cm、川幅 1 m85 cm、COD 5 mg/L であった。マシジミは 47 個体、タイワンシジミは 21 個体採

集された(表 1)。マシジミとタイワンシジミの個体数比は、マシジミが 69%、タイワンシジミが 31%であった。

(5) 松山市南土井町(St. 5)

水深 9~18 cm、川幅 29 cm、COD 3 mg/L であった。マシジミは 10 個体、タイワンシジミは 2 個体採集された(表 1)。マシジミとタイワンシジミの個体数比は、マシジミが 83%、タイワンシジミが 17%であった。

(6) 松山市井門町(St. 6)

水深 8~10 cm、川幅 1 m66 cm、COD 5 mg/L であった。マシジミは 1 個体採集され、タイワンシジミは 0 個体であった(表 1)。マシジミとタイワンシジミの個体数比は、マシジミが 100%、タイワンシジミが 0%であった。

(7) 東温市(旧重信町)開発(St. 7)

水深 19~27 cm、川幅 2 m3 cm、COD 5 mg/L であった。マシジミは 54 個体、タイワンシジミは 49 個体採集された(表 1)。マシジミとタイワンシジミの個体数比は、マシジミが 52%、タイワンシジミが 48%であった。

(8) 松山市小村町(St. 8)

水深 2~3 cm、川幅 58 cm、COD 5 mg/L であった。マシジミは 1 個体、タイワンシジミは 74 個体採集され

た(表1)。マシジミとタイワンシジミの個体数比は、マシジミが1%、タイワンシジミが99%であった。

(9) 伊予郡松前町徳丸 (St. 9)

水深6~7 cm、川幅44 cm、COD 5 mg/Lであった。マシジミは57個体、タイワンシジミは16個体採集された(表1)。マシジミとタイワンシジミの個体数比は、マシジミが78%、タイワンシジミが22%であった。

(10) 伊予郡松前町恵久美 (St. 10)

水深23~24 cm、川幅78 cm、COD 5 mg/Lであった。マシジミは採集されず、タイワンシジミは30個体採集された(表1)。マシジミとタイワンシジミの個体数比は、マシジミが0%、タイワンシジミが100%であった。

表1 各地点の環境とマシジミ、タイワンシジミの個体数と個体数比

採集地と環境	625 cm ² あたりのマシジミの個体数 (個体数比)	625 cm ² あたりのタイワンシジミの個体数 (個体数比)
東温市 (旧川内町) 吉久 (St. 1) 水深 6~7 cm, 川幅 1 m95 cm, COD 5 mg/L	118 (53%)	103 (47%)
東温市 (旧重信町) 牛淵 (St. 2) 水深 24~43 cm, 川幅 4 m26 cm, COD 5 mg/L	117 (78%)	33 (22%)
東温市 (旧重信町) 北野田 (St. 3) 水深 5~6 cm, 川幅 2 m47 cm, COD 3 mg/L	598 (66%)	309 (34%)
松山市南高井町 (St. 4) 水深 18~20 cm, 川幅 1 m85 cm, COD 5 mg/L	47 (69%)	21 (31%)
松山市南土井町 (St. 5) 水深 9~18 cm, 川幅 29 cm, COD 3 mg/L	10 (83%)	2 (17%)
松山市井門町 (St. 6) 水深 8~10 cm, 川幅 1 m66 cm, COD 5 mg/L	1 (100%)	0 (0%)
東温市 (旧重信町) 開発 (St. 7) 水深 19~27 cm, 川幅 2 m3 cm, COD 5 mg/L	54 (52%)	49 (48%)
松山市小村町 (St. 8) 水深 2~3 cm, 川幅 58 cm, COD 5 mg/L	1 (1%)	74 (99%)
伊予郡松前町徳丸 (St. 9) 水深 6~7 cm, 川幅 44 cm, COD 5 mg/L	57 (78%)	16 (22%)
伊予郡松前町恵久美 (St. 10) 水深 23~24 cm, 川幅 78 cm, COD 5 mg/L	0 (0%)	30 (100%)

表1のように10地点の中で採集されたマシジミの個体数が最も多かったのは東温市(旧川内町)北野田(St. 3)、1個体も採集されなかったのは伊予郡松前町恵久美(St. 10)だった。10地点の中で採集されたタイワンシジミの個体数が最も多かったのは東温市(旧重信町)北野田(St. 3)、1個体も採集されなかったのは松山市井門町(St. 6)だった(表1)。マシジミとタイワ

ンシジミの個体数比について、マシジミの個体数がタイワンシジミを上回ったのは8地点(St. 1、2、3、4、5、6、7、9)で、そのうちマシジミのみが1地点(St. 6)あった。タイワンシジミの個体数がマシジミを上回ったのは2地点(St. 8、10)で、タイワンシジミのみが1地点(St. 10)あった。

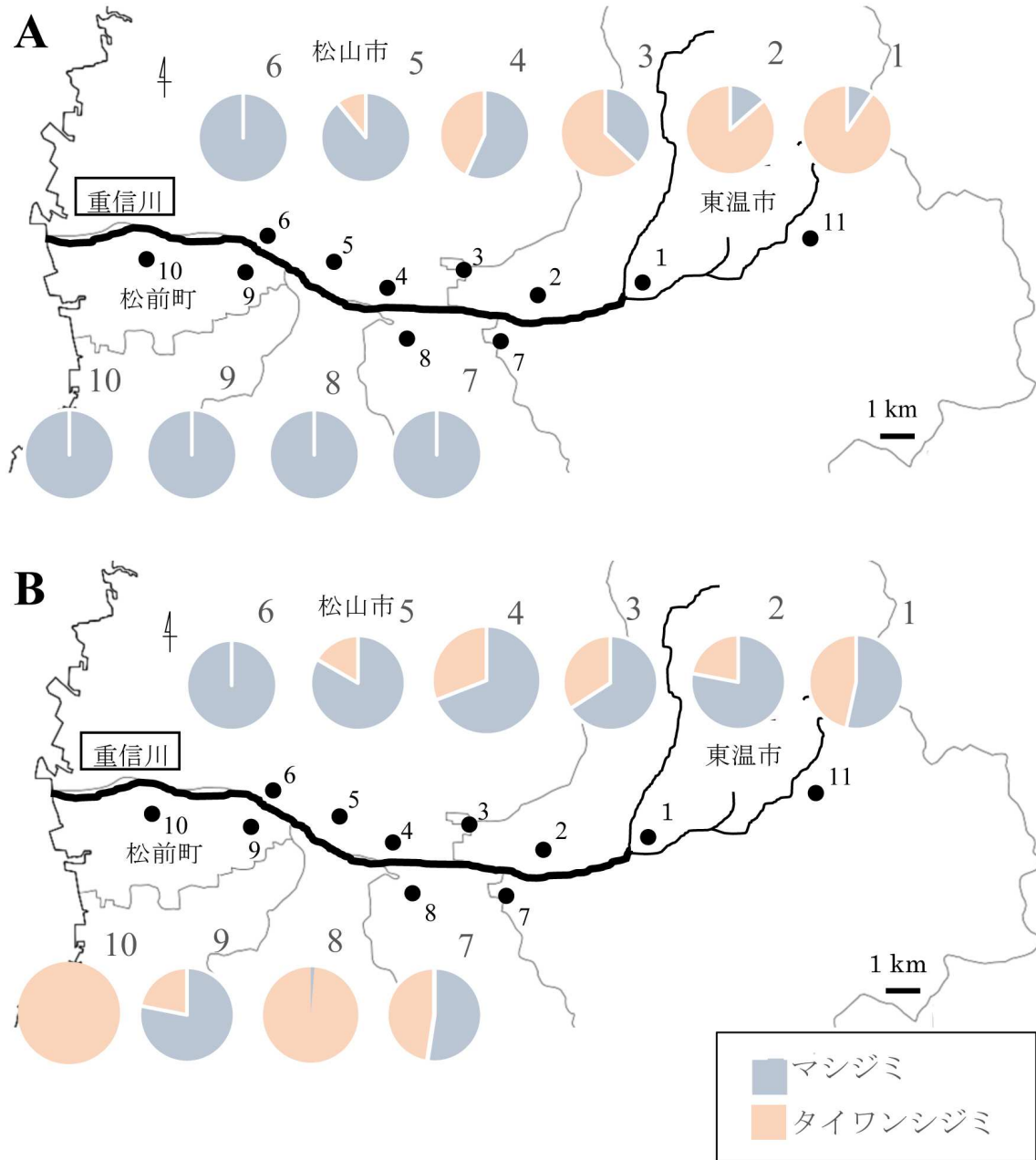


図3 松山平野における各調査地点のマシジミとタイワンシジミの個体数比

(A) 家山(2004)による調査結果 (B) 今回の調査結果. 番号は採集地点(St.)を示す。

3-1. 形態的特徴の再検討

従来の同定方法によるマシジミとタイワンシジミの個体数比を算出すると、家山（2004）では東温市（旧川内町）吉久（St. 1）と東温市（旧重信町）牛淵（St. 2）、東温市（旧重信町）北野田（St. 3）の3地点でタイワンシジミの方が個体数は優勢であったが、今回の調査ではその優勢状況が逆転し、マシジミの個体数の方が上回った（図 3B）。従来の方法で形態的に分類する過程で、マシジミとタイワンシジミの中間的な形質を持つ個体があり、両種の判別が困難な場合があった。そこで、両種の殻形態を詳細に観察し、種同定に有効な形質があるかを調べるため形態的特徴を再検討した。

東温市則之内で採集、種同定したマシジミ 50 個体と東温市（重信町）北野田で採集、種同定したマシジミ 50 個体、タイワンシジミ 50 個体について、殻頂・殻

高・殻幅を計測した。さらに図 4 に示す貝殻の各部を殻表面の 16 項目（腹縁の色、殻色、殻頂部分のはげたところの有無、殻頂部分のはげたところの大きさ、殻頂部分のはげたところの色、殻頂部分のはげたところの緑色、楕面側の放射縞、小月面の着色、小月面側の放射縞、中央の放射縞、不規則な放射縞・同心円状の縞模様、光沢、成長脈の配列、成長脈の鮮明度、斑の有無）および殻内面の 14 項目（殻全体の色の濃淡、緑色、縁から外套線までの殻色、外套線周辺の殻色、外套線から殻頂までの殻色、殻頂部分の殻色、主歯の間の着色、前側歯基部の着色、後側歯基部の着色、前側歯の色、後側歯の色、前側歯外縁の着色、後側歯外縁の着色、殻頂部分のざらつき）について観察した。



図 4 マシジミの貝殻の各部の名称

(A) マシジミの左殻表面 (B) マシジミの右殻内面 (C) マシジミの殻頂部分 スケールバーは 5 mm

検討した形態のうち 5 つの項目において特徴的な差が見られた（表 2）。これらの形質はそれぞれ次のような違いが見られた。殻表面全体の色（表 2、①）については、褐色や暗褐色のような暗色を呈するもの（図 5A-1、A-2、A-3、黒い矢印）と黄褐色やオリーブ色のような淡色を呈するもの（図 5A-4、A-5、黒い矢印）の 2 つに分けられた。殻内面の全体の色（表 2、②）については、紫色を呈するもの（図 5B-1、B-2、B-3、黒い矢印）、乳白色を呈するもの（図 5B-4、黒い矢印）、褐色を呈するもの（図 5、B-5、黒い矢印）の 3 つに分類できた。側歯基部殻内側の着色（表 2、③）については、その着色の有無（図 5B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、黄色い矢印）により 2 つに分類できた。側歯基部殻縁側の着色（表 2、④）については、その着色の有無（図

5B-1、B-2、B-3、B-4、B-5、黒い矢印）により 2 つに分けられた。殻頂部分のはげたところの色（表 2、④）については、殻表面の殻頂部分が摩耗しているときに、その色が紫色を呈するもの（図 5C-1、C-2、黒い矢印）と紫色と桃色を呈するもの（図 5C-3、黒い矢印）、桃色を呈するもの（図 5C-4、C-5、黒い矢印）の 3 つに分けられた。この指標に関しては、貝殻の発達に伴って必ず現れるものではなく、砂利などとの物理的な接触が必要な条件であるため、成貝においても、殻頂部分にはげているところがない個体も見られたが、内部の真珠層の色を反映しており、該当個体については内面の色を参考にした。これらの違いから、A、B、C、D、E の 5 つのタイプに分けられた。5 つのタイプの形態的特徴についてまとめると、以下の通りである。

(1) Aタイプ

殻表面全体が暗色（図 5A-1、黒い矢印）で、殻内面全体は紫色（図 5B-1、黒い矢印）であり、側歯基部殻内側と側歯基部殻縁側に着色が見られ（図 5B-1、黄色い矢印、黒い矢頭）、殻頂部分のはげたところは紫色を呈した（図 5C-1、黒い矢印）。

(2) Bタイプ

殻表面全体が暗色（図 5A-2、黒い矢印）で、殻内面全体は紫色であり（図 5B-2、黒い矢印）、側歯基部殻内側に着色が見られ（図 5B-2、黄色い矢印）、側歯基部殻縁側に着色が見られず（図 5B-2、黒い矢頭）、殻頂部分のはげたところは紫色を呈した（図 5C-2、黒い矢印）。

(3) Cタイプ

殻表面全体が暗色（図 5A-3、黒い矢印）で、殻内面全体は紫色であり（図 5B-3、黒い矢印）、側歯基部殻内側に着色が見られ（図 5B-3、黄色い矢印）、側歯基部殻縁側に着色が見られず（図 5B-3、黒い矢頭）、殻頂部分のはげたところは紫色と桃色を呈した（図 5C-3、黒い矢印）。

(4) Dタイプ

殻表面全体が淡色（図 5A-4、黒い矢印）で、殻内面全体は乳白色であり（図 5B-4、黒い矢印）、側歯基部殻内側に着色が見られ（図 5B-4、黄色い矢印）、側歯基部殻縁側に着色が見られず（図 5B-4、黒い矢頭）、殻頂部分のはげたところは桃色を呈した（図 5C-4、黒い矢印）。

(5) Eタイプ

殻表面全体が淡色（図 5A-5、黒い矢印）で、殻内面全体は褐色であり（図 5B-5、黒い矢印）、側歯基部殻内側と側歯基部殻縁側に着色が見られず（図 5B-5、黄色い矢印、黒い矢頭）殻頂部分のはげたところは桃色を呈した（図 5C-5、黒い矢印）。

幼貝については殻頂部分のはげたところが確認できず、殻内面の真珠層の発達が進んでおらず着色が見られない個体が多く、成貝に比べて差異が明瞭に確認できないため、殻長が 5 mm 以下の個体については、従来の判別方法によりマシジミとタイワンシジミに区別した。

表 2 淡水産シジミの形態の 5 タイプ

	Aタイプ	Bタイプ	Cタイプ	Dタイプ	Eタイプ
①殻表面全体の色	暗色			淡色	
②殻内面全体の色	紫色			乳白色	薄褐色
③側歯基部殻内側の着色	有り				無し
④側歯基部殻縁側の着色	有り	無し			
⑤殻頂部分のはげたところの色	紫色		紫色, 桃色	桃色	

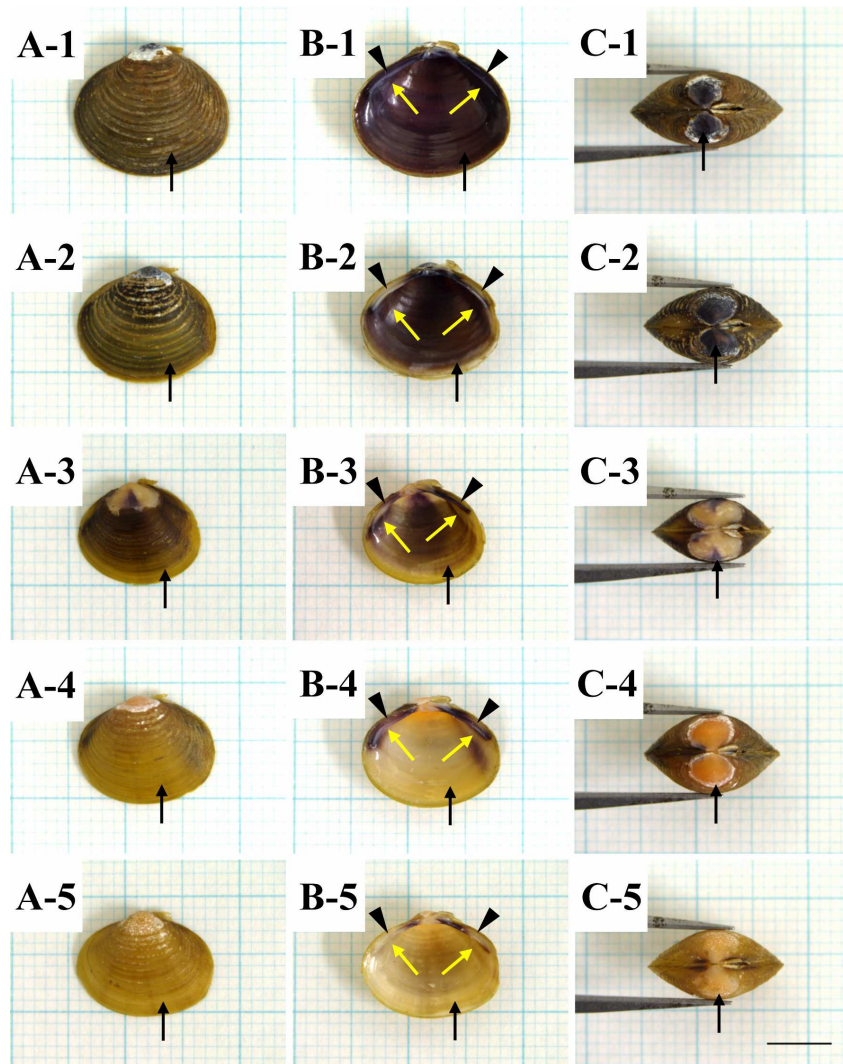


図5 5タイプのシジミの貝殻

(A-1) Aタイプの左殻表面 (B-1) Aタイプの右殻内面 (C-1) Aタイプの殻頂部分 (A-2) Bタイプの左殻表面 (B-2) Bタイプの右殻内面 (C-2) Bタイプの殻頂部分 (A-3) Cタイプの左殻表面 (B-3) Cタイプの右殻内面 (C-3) Cタイプの殻頂部分 (A-4) Dタイプの左殻表面 (B-4) Dタイプの右殻内面 (C-4) Dタイプの殻頂部分 (A-5) Eタイプの左殻表面 (B-5) Eタイプの右殻内面 (C-5) Eタイプの殻頂部分 スケールバーは5 mm

Aタイプは東温市則之内のみで確認された。Aタイプが採集されなかった10地点での4タイプの個体数比について、Bタイプの個体数が最も多かったのは1地点(St. 6)、Cタイプの個体数が最も多かったのは7地点(St. 1、2、3、4、5、7、9)、Dタイプの個体数が最も多かった地点はなく、Eタイプの個体数が最も多かったのは2地点(St. 8、10)だった。図6を見ると、St. 1、2、3、4、5、7、9はCタイプの占める割合が最も高く、St. 1、2、3、4はおよその個体数比のパター

ンが似ている。St. 5ではCタイプとDタイプ、St. 8ではDタイプとEタイプが主に多数を占めており、2タイプが拮抗していた。また、St. 7ではBタイプ、Cタイプ、Dタイプ、Eタイプの4タイプがほぼ拮抗していた。St. 9ではCタイプが半数を占めていたが、その次にBタイプとDタイプがほぼ拮抗していた。St. 10はEタイプのみが占め、St. 11はAタイプのみで占められていた。

表 3 調査地点毎の 5 タイプのシジミの個体数

	A タイプ	B タイプ	C タイプ	D タイプ	E タイプ	マシジミ の幼貝	タイワン シジミの 幼貝
St. 1	0 (0%)	0 (0%)	54 (84%)	4 (6%)	6 (9%)	115	42
St. 2	0 (0%)	3 (3%)	95 (83%)	11 (10%)	6 (5%)	27	8
St. 3	0 (0%)	27 (6%)	334 (76%)	44 (10%)	37 (8%)	295	170
St. 4	0 (0%)	4 (9%)	28 (62%)	10 (22%)	3 (7%)	20	3
St. 5	0 (0%)	0 (0%)	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	7	0
St. 6	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0	0
St. 7	0 (0%)	7 (13%)	19 (35%)	14 (26%)	14 (26%)	36	13
St. 8	0 (0%)	1 (3%)	0 (0%)	16 (40%)	23 (58%)	0	35
St. 9	0 (0%)	19 (27%)	35 (50%)	15 (21%)	1 (1%)	3	0
St. 10	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	28 (100%)	0	2
St. 11	115 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0	0

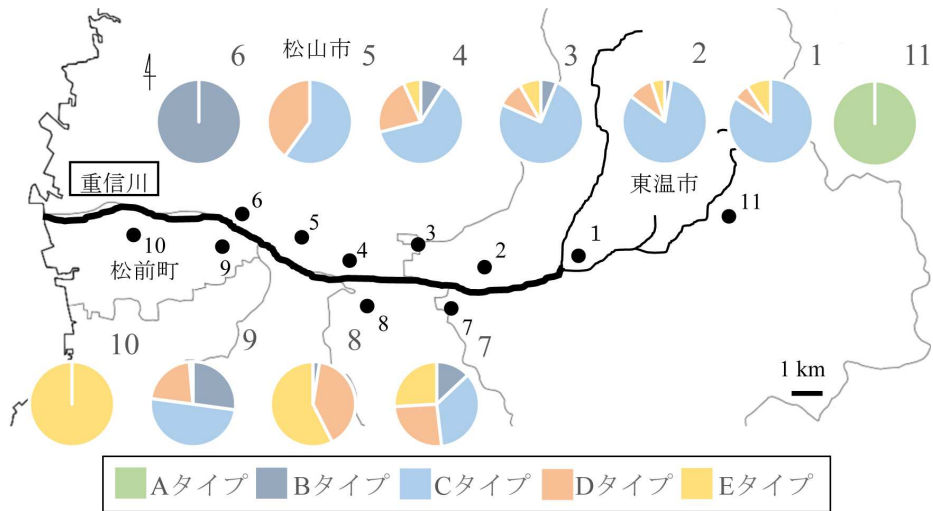


図 6 松山平野における各調査地点の 5 タイプのシジミの個体数比

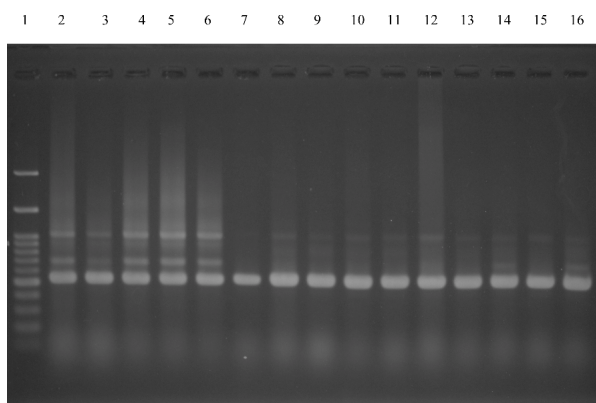
3-3. PCR 法による DNA の検出

東温市則之内 (St. 11) で採集した個体の A タイプおよび、東温市 (旧重信町) 北野田 (St. 3) で採集した個体の B、C、D、E タイプ、伊予郡松前町恵久美 (St.

10) で採集した個体の E タイプについて、それぞれ 5 個体ずつ計 30 個体から DNA を抽出し、PCR 法を用いて ITS 領域長の比較を行った。

増幅された ITS 領域では、東温市則之内の A タイプで約 500 bp の強いバンドが見られ、約 700 bp と約 1000 bp の弱いバンドも 2 本見られた (図 7A レーン 2-6)。東温市 (旧重信町) 北野田の B タイプではすべての個体で約 500 bp の長さのバンドが 1 本見られ、5 個体中 4 個体で約 1000 bp の弱いバンドが 1 本見られた (図 7A レーン 7-11)。以下同様、東温市 (旧重信町) 北野田の C タイプはすべての個体で約 500 bp と約 1000 bp の長さのバンドが 1 本ずつ見られた。5 個体中 2 個体で約 700 bp の弱いバンドが見られた (図 7A レーン 12-16)。東温市 (旧重信町) 北野田の D タイプはすべてのタイプで約 500 bp、約 700 bp、約 1000 bp の長さのバンドが 3 本見られた (図 7B レーン 1-5)。東温市 (旧重信町) 北野田の E タイプはすべての個体で約 500 bp と約 1000 bp の長さのバンドが 2 本見られた。5 個体中 1 個体で約 700 bp の弱いバンドが見られた (図 7B レーン 6-10)。伊予郡松前町恵久美の E タイプはすべての個体で約 500 bp の長さのバンドが 1 本見られた。5 個体中 4 個体で約 1000 bp の弱いバンドが 1 本見られた (図 7B レーン 11-15)。

A



B

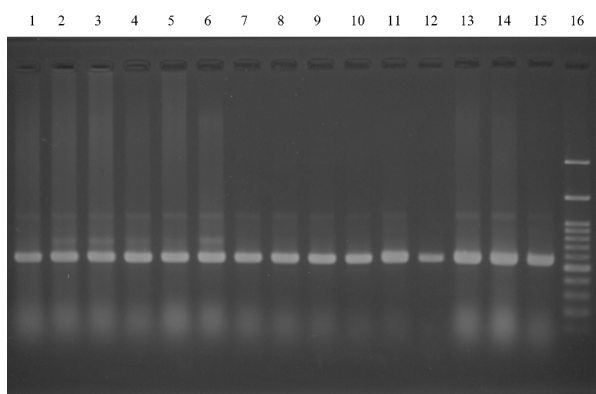


図 7 PCR 法により増幅された ITS 領域

(A) (レーン 1) 100 bp 分子量マーカー (レーン 2-6) 東温市則之内の A タイプ (レーン 7-11) 東温市 (旧重信町) 北野田の B タイプ (レーン 12-16) 東温市 (旧重信町) 北野田の C タイプ

(B) (レーン 1-5) 東温市 (旧重信町) 北野田の D タイプ (レーン 6-10) 東温市 (旧重信町) 北野田の E タイプ (レーン 11-15) 伊予郡松前町恵久美の E タイプ (レーン 16) 100 bp 分子量マーカー

18S rDNA と 5.8S rDNA の間の ITS 領域のバンドのパターンを比較すると、約 500 bp のバンドはすべてのタイプで見られたが、約 700 bp のバンドは A、D タイプのすべての個体で見られ、C と北野田の E タイプではバンドが見られた個体と見られない個体が混在していた。恵久美の個体は北野田と同じ E タイプであるが、すべての個体でバンドが見られなかった。約 1000 bp のバンドは、A、C、D、北野田の E タイプのすべての個体で見られたが、B、恵久美の E タイプではバンドが見られる個体と見られない個体が混在していた (表 4)。

表 4 PCR 法により増幅された ITS 領域のバンドの長さ

	18S rDNA と 5.8r rDNA の間の ITS 領域		
	500 bp 程度のバンド (検出個体数)	700 bp 程度のバンド (検出個体数)	1000 bp 程度のバンド (検出個体数)
A タイプ	++ (5)	+ (5)	+ (5)
B タイプ	++ (5)	-	+ (4)
C タイプ	++ (5)	+ (2)	+ (5)
D タイプ	++ (5)	+ (5)	+ (5)
E タイプ (北野田)	++ (5)	+ (1)	+ (5)
E タイプ (恵久美)	++ (5)	-	+ (4)

(++: 強いバンド、+: 弱いバンド (バンドが見られた個体は混在)、-: バンドが見られない)

4. 考察

4-1. マシジミとタイワンシジミの形態的指標の再検討

本研究では、マシジミとタイワンシジミの分類について明確な同定法が確立されていないため、従来の判断基準に加え、新たな分類形質を検討した。殻が着色していない個体や着色が見られてもその色に濃淡のある中間的な個体があり、成長に伴う殻の発達により成

貝と幼貝の形質が異なることがあるため、明確に2種を区分する方法を提示するには至らなかった。側歯基部殻内側の着色については、マシジミとタイワンシジミ、マシジミとマシジミに近似したタイワンシジミと思われる個体との判断基準として有効と考えられたが、幼貝に関してはその差異が顕著に現れず、決定的な判断基準とは言えなかった。また、形態的特徴を再検討する過程で5タイプの分類と5タイプの個体数比(図6)を算出する際、幼貝を含めず作成した。これは幼貝の未発達な貝殻では、将来的に5タイプの成員のいずれかになるとと思われる個体を区別できるような差異が明確に見られなかったためである。成長に伴って殻も発達することで、幼貝と成員の形態的特徴が変化してしまうことが考えられるが、幼貝、成員を通して区別できる判断基準あるいは、成員につながる幼貝の兆候的な特徴を明確にする必要がある。

4-2. 5タイプのシジミのITS領域のパターンの違い

家山ら(2007)は、18S rDNAと5.8S rDNAの間のITS領域について、マシジミでは500~600 bpの長さの間に1本のバンドと700 bp前後の長さで2本のバンドが確認され、タイワンシジミでは500~600 bpの長さの間に2本のバンドが確認され、両種の増幅領域の長さの違いがあると報告している^{3,9)}。本研究では、5タイプのシジミでITS領域の長さを比較し種同定を試みたが、本研究で得られたITS領域の増幅結果は、家山ら(2007)の結果とは2つの点で異なっていた。1点目はすべてのタイプで約1000 bpの弱いバンドが見られたこと、2点目はタイワンシジミの500~600 bpの長さの間に見られる2本のバンドが1本しか見えなかったことである。2点目については、電気泳動の際のPCR産物の量が多く重なって、2本の近接したバンドが1本に見えている可能性が考えられる。本研究で見られた核ゲノムのパターンの違いは種同定を行う判断材料の一つにはなり得るが、確認できるバンドの位置が異なることは最適なPCRの条件が他にもあることが推測でき、最適なPCR条件の検討を今後も行っていく必要がある。

4-3. 松山平野におけるマシジミとタイワンシジミの生息状況

本研究では、従来の同定方法によるマシジミとタイワンシジミの個体数比をみると、2004年の調査結果でタイワンシジミが確認された最東端の東温市(旧川内町)吉久(St. 1)よりも上流(東部)にある東温市則之内のみでマシジミのみが生息することが確認できた。一方、2004年の調査結果では、タイワンシジミの生息がなかった東温市(旧重信町)開発(St. 7)、松山市小村町(St. 8)、伊予郡松前町徳丸(St. 9)、伊予郡松前町恵久美(St. 10)の重信川左岸の4つの地点でそれぞれ49、74、16、30個体のタイワンシジミの生息が確認でき、松山平野内において外来種であるタイワンシジミ生息領域の拡大が示唆された(図3)。マシジミとタイワンシジミの個体数比を見ると、2004年では重信川の上流(東部)から下流(西部)にかけてタイワンシジミの割合が減少する傾向が見られるが(図3A)、本調査結果ではそういった減少傾向はおおむね見られるものの、各地点でのばらつきがあった。2004年では東温市(旧川内町)吉久(St. 1)と東温市(旧重信町)牛淵(St. 2)、東温市(旧重信町)北野田(St. 3)の3地点でタイワンシジミの方が個体数は優勢であったが、本調査結果ではその優勢状況が逆転し、マシジミの個体数の方が上回った(図3B)。そこで、マシジミとタイワンシジミの形態的指標を再検討して分類し、5タイプの核ゲノムのパターンを解析した。その結果、バンドパターンに先行研究とは相違があるものの、5パターンの殻形態とITS領域の共通性と差異から、形態的にはAタイプがマシジミタイプであると考えられるが、その他の4つのタイプは形態的特徴もマシジミとタイワンシジミとは明確には判別し難く、ITS領域のバンドパターンも様々であった(表4)。本研究ではマシジミとタイワンシジミを分類するため、形態的特徴を再検討し、ITS領域のパターンの違いを調べたが、両者の関連性は見られなかった。マシジミとタイワンシジミの生息状況が異なる3地点でDNAの解析を行ったが、その各タイプについてサンプル数5個体ずつと少なく、各地点内でも1集団でしか検討してない。マシジミとタイワンシジミの交雑を裏付けるためにも、

各地点で多数の個体について形態的特徴や核およびミトコンドリア DNA の分析を行って両種の個体数比を調べるとともに、より多くの地点で調査をする必要がある。そして、マシジミとタイワンシジミを確実に分類できる形態的な特徴と種特異的な DNA マーカーを同定することが必要である。

4-4. タイワンシジミの分布の変遷

5 タイプの殻形態による分類からは、松山平野における 11 地点の 5 タイプの構成比は様々であった(図 6)。松山平野のタイワンシジミは酒井ら (2014)¹¹⁾によると、伊予郡松前町国近川において 1993 年では殻の内側が黒紫色で側歯が淡い褐色に着色するタイプ(本研究の B タイプに相当すると思われるもの)のみが採集され、2012 年では殻の内側が黒紫色で側歯が淡い褐色に着色するタイプ(本研究の B タイプに相当すると思われるもの)に加え、殻の内側は白色または褐色で側歯部分が比較的広く紫色に着色するタイプ(本研究の D タイプに相当すると思われるもの)、殻の内側も側歯も白色は褐色のタイプ(本研究の E タイプに相当すると思われるもの)が採集され、9 年間のうちに集団の組成が変化していることが報告されている。今回の調査では、国近川と同じ水系にあたる伊予郡松前町恵久美(St. 10)で、E タイプのみが採集された。1993 年から 13 年間のうちに B タイプのみの集団から、B、D、E タイプの 3 タイプが共存する集団、そして E タイプのみの集団へと組成が変化している。水質などの環境の変化や人為的な移動などの要素も関係すると考えられるが、同水系でも異なるタイプのシジミの生息域が拡大することが示唆された。シジミ類は河川や用水路という流動的な環境で一生を過ごすため、他地域の個体の流入や拡散には環境的要因が大きく関係していることが予想される。環境的要因とタイワンシジミの殻タイプの関係性を明らかにしていくことが必要である。則之内ではマシジミタイプの A タイプのみの生息が確認された。マシジミとタイワンシジミを分類し、それらの生息状況を明らかにするために、マシジミタイプ

の A タイプのシジミそのものや、則之内のような A タイプのみが生息する地域を保全することが必要である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始多面に渡ってご指導頂いた愛媛大学名誉教授 日詰雅博先生に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 肥後俊一、後藤芳央 日本及び周辺地域産軟体動物エル貝類出版局 (1993)
- 2) 三浦常廣、後藤悦郎 シジミ同定技術確立試験 平成 15 年度島根県内水面水産試験場事業報告 2: 94-101 (2002)
- 3) 玉井直樹、新井範子、稲本安恵、柴部佳子、柴田洋、家山博史 淡水産二枚貝マシジミ属 *Corbicula* の教材化 愛媛大学教育学部紀要 49: 22-35 (2008)
- 4) 増田修、波部忠重 岡山県倉敷市にすみついたカネツケシジミ ちりぼたん 16: 62-63 (1988)
- 5) 石橋亮、古丸明 琵琶湖淀川水系、大和川水系におけるタイワンシジミの出現状況 *Venus* 62: 65-70 (2003)
- 6) 増田修、内山りゅう 日本産淡水貝類図鑑② 汽水域を含む全国の淡水貝類 ビーシーズ (2004)
- 7) Komaru, A., Konishi, K. Non-reductional spermatozoa in three shell color types of the freshwater clam *Corbicula fluminea* in Taiwan *Zoological Science* 16: 105-108. (1999)
- 8) 家山博史 松山平野のタイワンシジミ 愛媛の自然 47: 13-14 (2005)
- 9) 家山博史、柴田洋 同所に生息するマシジミとタイワンシジミのリボソーム DNA に見られる相違 *Venus* 66: 116 (2007)
- 10) Michael, A. Innis et al. 編 斉藤隆監訳 PCR 実験マニュアル HBJ 出版局 (1991)
- 11) 酒井治己、高橋俊雄、古丸明 日本産マシジミおよび外来タイワンシジミ類のアロザイム変異と淡水シジミ類の多様性 *Venus* 72: 109-121 (2014)

