

# シジミ同定技術確立試験

(宍道湖・中海水産振興事業)

安木 茂・開内 洋

## 1. 研究目的

近年、漁場の減少等により全国的にシジミ漁獲量は漸減傾向にある。一方、シジミの食品としての機能成分も注目されるようになり、シジミ需要は高まる傾向にある。これに呼応するように外国産シジミの輸入量は増加傾向にあり、外国産シジミを宍道湖産ヤマトシジミと称したり、あるいは一部を增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、在来のシジミ類に悪影響をおよぼす恐れも危惧されている。しかし、在来のヤマトシジミと外国産シジミとを外観から判断することは極めて困難であることから、偽装表示や天然水域への混入実態については明らかにされにくいのが実情である。

本研究では多種多様のシジミ類が輸入され、天然水域での繁殖も懸念される現状において、ミトコンドリア DNA を用いた遺伝的判別技術を確立することを目的とする。

## 2. 研究方法

今年度は、三重大学生物資源学部の古丸明教授の指導の下に実施した「シジミ類の DNA の抽出からシークエンス解析までの技術」、水産総合センター独立行政法人養殖研究所において開催された「制限酵素を用いた簡便なシジミ類の判別技術」という二つの研修に参加した。

また、島根県産業技術センターの協力の下に、シジミ類のミトコンドリア DNA の一部を増幅させ、塩基配列を読み取るシークエンス解析も行った。なお、研究にあたっては、遺伝子工学実験ノート<sup>1)</sup>、DNA 人類進化学<sup>2)</sup>を参考とした。

## 3. 研究結果と考察

### 1) 三重大学での研修

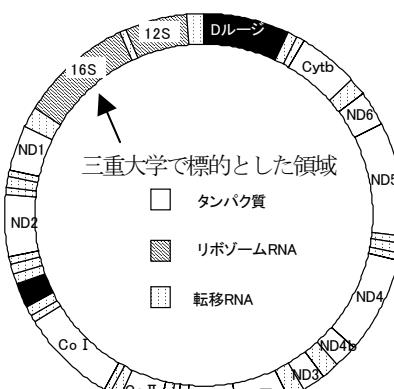
前年に引き続き、シジミ類の判別でもっとも先進的な取り組みを行っている三重大学の古丸明教授に、ミトコンドリア DNA を用いた遺伝的判別方法の技術指導を受けた。

今回の研修では昨年実施したような、形態学的、組織学的分類方法のレクチャーは受けずに、ミトコンドリア DNA の 16 S rRNA 領域(図 1)を PCR 法により増幅し、シークエンサーにかけて塩基配列の違いを見るに焦点を絞って行った。用いたサンプルは、①宍道湖、②斐伊川河口、③新建川、④斐伊川上流(木次)、⑤斐伊川上流(三刀屋)で採取したシジミである。

ミトコンドリア DNA の抽出とシークエンス解析までの概略を記す。

①フェノールクロロフォルム法により足筋肉から粗 DNA を抽出する。

②これを PCR 用の錆型として、ミトコンドリア DNA の 16 S rRNA 領域をユニバーサルプライマーで増幅する。



宝来聰著「DNA 人類進化学」より

図1 ミトコンドリアDNAの遺伝子の配置

③更にPCR産物をゲルfiltrationし、常法によりABIシーケンサーにより、塩基配列を解読した。用いたプライマーは以下の通りである。

(forward) CGCCTGTTATCAAAACAT

(reverse) CCGGTCTGAACTCAGATCACGT

島根県から持ち込んだ5カ所のサンプルのうち、新建川、斐伊川河口の2ヶ所については、電気泳動によるバンドがはっきり現れなかつたため、シーケンス解析はできなかつた。バンドが現れた、宍道湖、斐伊川上流(木次)、斐伊川上流(三刀屋)のシジミについてはシーケンスをかけて、三重大学がすでに実施している、宍道湖、小川原湖、ロシア、中国、韓国、北朝鮮のサンプルとの比較を行つた。

## 2) 養殖研究所での研修

平成16年12月16日～17日に水産総合研究センター

養殖研究所玉城庁舎において、シジミ類の種判別技術の研修を受けた。この技術は、独立行政法人水産総合研究センターの運営費交付金プロジェクト研究「外来シジミの判別技術の開発および繁殖生態に関する基礎的研究」において、三重大学と共同で開発した技術である。

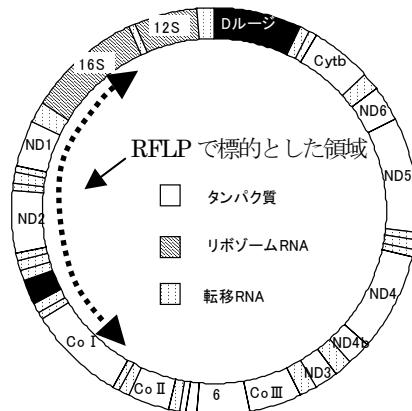
この研修で用いた手法はPCR-RFLP法と呼ばれている。

まず、標的とするDNA領域をPCRにより増幅し次に制限酵素で切断する。標的とするDNA領域に制限酵素の切断部位がある場合、それを電気泳動によってバンドの位置の違いという目に見える形で現れる。

この手法を種判別に応用する場合、種特異的な制限酵素切断部位が存在するような標的DNA領域および制限酵素を選ぶ必要がある。今回の研修で用いたDNA領域はミトコンドリアDNAの中のCOI(チトクロームオキシダーゼI)から16SrRNAにかけての約5Kbp(図2)を標的として増幅し、この増幅領域を制限酵素MspIで切断したDNAの断片長多型で種判別を行つた。

用いたサンプルは島根県宍道湖産、北朝鮮元山産、中国太湖産、琵琶湖産の4種を用いた。また、DNAの抽出には閉殻筋(貝柱)を用いた(図3)。

DNA抽出から最終的な電気泳動による断片長多型による判別までのプロトコールを図4-1、4-2に示す。



宝来聰著「DNA 人類進化学」より

図2 ミトコンドリアDNAの遺伝子の配置

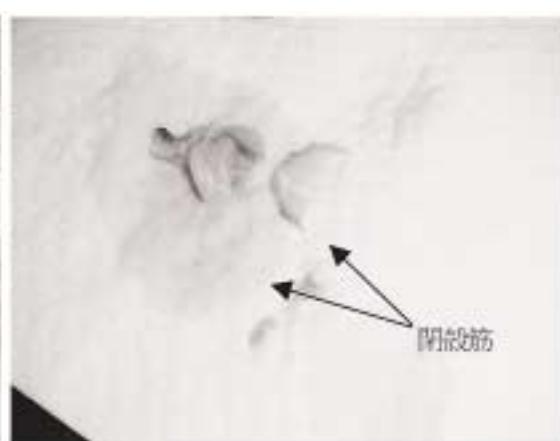


図3 用いたサンプルとDNA抽出部位(閉殻筋)

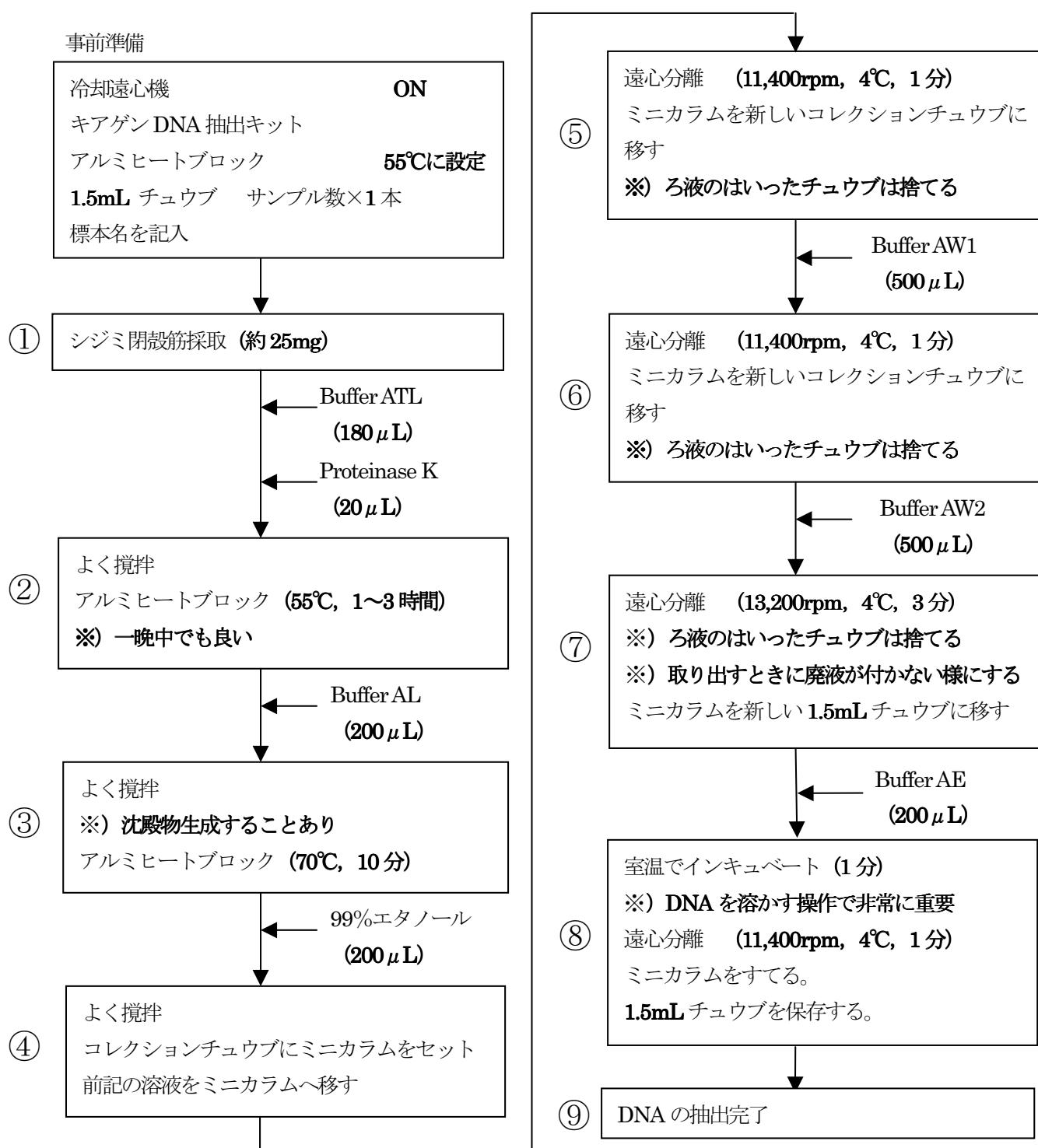


図4-1 シジミ類同定法プロトコール (DNA抽出)

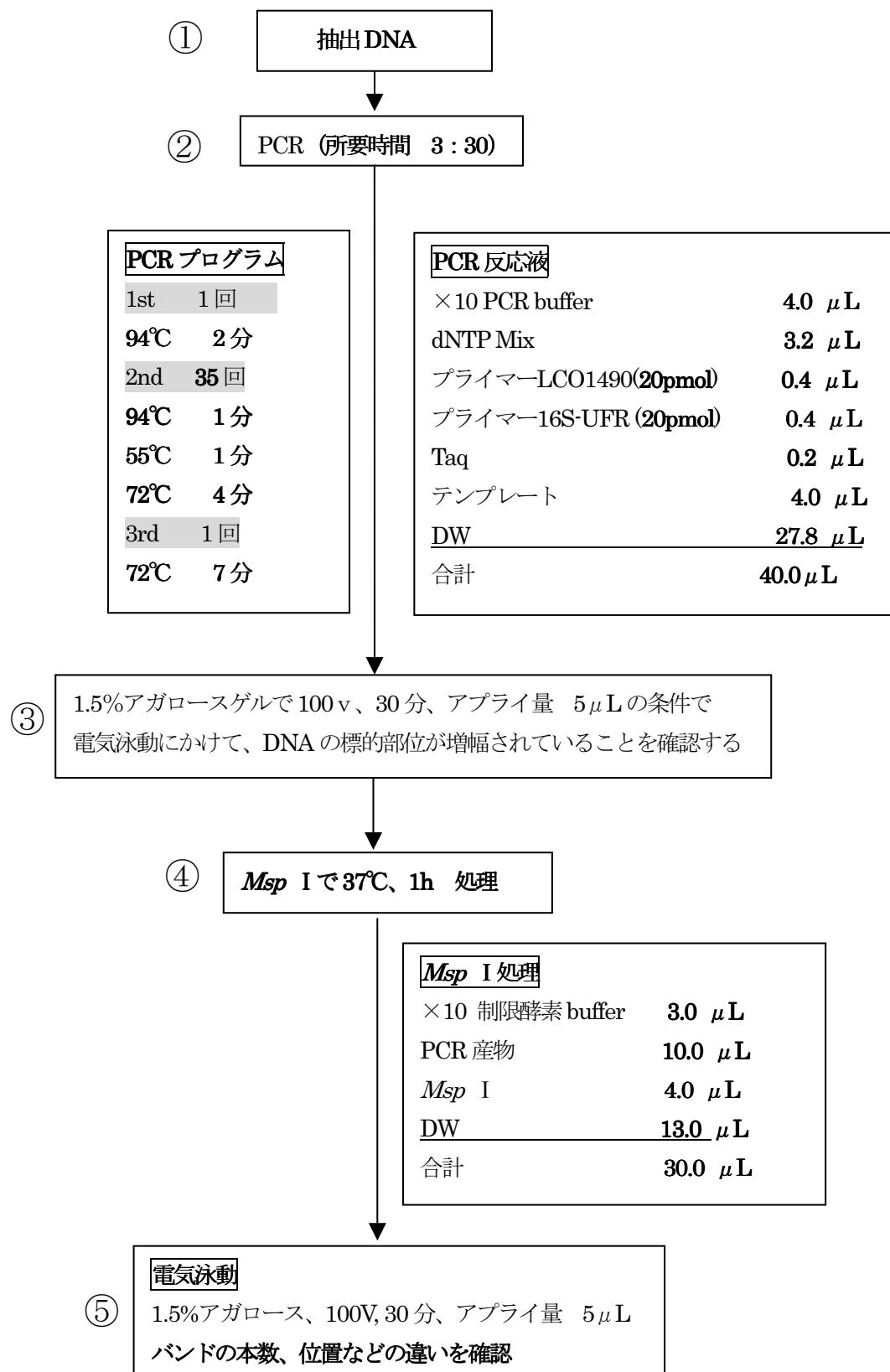


図 4-2 シジミ類同定法プロトコール (RPLF 部分)

図5に電気泳動の結果を示す。宍道湖産は2本、北朝鮮元山産は1本、琵琶湖産および中国太湖産は複数本のバンドが現れた。また、バンドが現れる位置も異なっていた。中国太湖産はきれいにバンドが出ていないが、サンプルの状態が悪かったためと思われる。

DNAのバンドは写真のように比較的きれいに判別出来ている。改良の余地はあるもののシジミの種判別の方法としては、容易に出来る画期的な方法である。

3) 産業技術センターにおけるシークエンス解析  
平成17年2月28日および3月1日にかけて、産業技術センターにおいて、シジミのミトコンドリアDNA16SrRNA領域のシークエンス解析を行った。

用いたサンプルは、ヤマトシジミと思われるもの3箇所(宍道湖、神西湖、小川原湖)、淡水系シジミと思われるもの1箇所(斐伊川河口域)を選定し、それぞれ2個体ずつ塩基配列を見た(図6)。シークエンス解析には(株)アロカのDNAシークエンシングシステムを用いた(図7)。

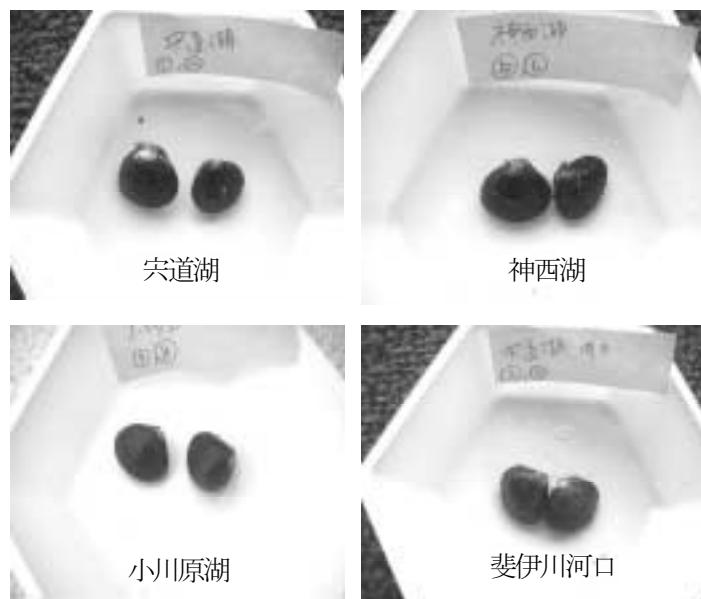


図6 用いたサンプル



図5 電気泳動の結果



図7 シークエンサー

具体的な手法としては、各検体から、QIAGENのGel Extraction Kitにより粗DNAを抽出し、ミトコンドリアDNAの中の16S rRNA領域約500bpを標的としてPCR法にて増幅させ、さらに蛍光色素ついたプライマーで長さの異なるDNA鎖を合成した。これらをアクリルアミドを用いた電気泳動により各塩基(A:アデニン、G:グアニン、C:シトシン、T:チミン)に分離し、スキャナーによりバンドをコンピュータに読み込んだ。表1にシークエンス解析の結果を示す。

表1 シーケンス解析結果  
(網掛けの部分は塩基配列が異なるところ)

当場が実施した宍道湖、神西湖、小川原湖、斐伊川河口域の結果と三重大学で実施した宍道湖、斐伊川中流、三刀屋川（斐伊川支流）のサンプルをあわせて表示した。標的としたミトコンドリア DNA の 16S rRNA

領域は約 500bp であるが、当場が実施したシークエンス結果では、始めの部分と終わりの部分が読み取れなかつた。これは、電気泳動で現れるバンドが不鮮明であったため、読み取れなかつたことが原因である。

次に系統をヤマトシジミ系と淡水シジミ系に分け、当場および三重大学が行った結果を比較した。ヤマトシジミ系と淡水シジミ系では、上流側のプライマーからカウントして 179、180、254、258、262、264、265、267、268、270、272、276、308、321、324、325、409、410、437 番目で塩基配列の相違が見られたが、同じ系列内での相違は見られなかつた。

ヤマトシジミとそれ以外のシジミについては、養殖研究所で実施した電気泳動法だけでも判別することは可能であり、この方法で外国産と日本産シジミをある程度判別できると考えられる。しかし、ヤマトシジミと遺伝的に非常に近縁な種についての判別が可能かどうか疑問である。

シジミの塩基配列を比較するには産地ごとのシジミの塩基配列が解明されている必要がある。現在、三重大学などを中心に、各地のシジミのミトコンドリア DNA の 16S r RNA 領域について塩基配列を特定する研究が進みつつあるが、調べられるサンプル数は 1ヶ所につき数個から 10 数個であることから、統計的信頼性については必ずしも高いとは言えない。従つて、宍道湖のヤマトシジミの DNA の塩基配列について数多く調査し、統計的精度の向上を目指す必要がある。また、各地のデータベースがそろつた場合でも、塩基配列が全く同じものが出てくる可能性が考えられる。これは、ミトコンドリア DNA の 16S r RNA 領域だけで検証する限界といえる。この問題を解決するには、16S r RNA 領域以外の領域で塩基配列を比較する必要があるが、今のところその技術は開発されていない。

#### 4. 研究成果

- シジミ類の同定技術に関して、ミトコンドリア DNA の特定部位を用いた遺伝的判別技術を習得した。
- 水産総合研究センター独立行政法人養殖研究所の開発した、ミトコンドリア DNA の COI (チトクロームオキシダーゼ I) から 16SrRNA にかけての領域を抽出し、制限酵素により DNA を切断し、得られた DNA 断片を電気泳動にかけることにより視覚的に判別する技術を習得した。
- 宍道湖、神西湖、小川原湖、斐伊川河口に生息するシジミについて、その塩基配列をシークエンス解析により明らかにすることができた。

#### 5. 文献

- 1) 遺伝子工学実験ノート 上・下 羊土社 2003.2
- 2) 宝来聰 DNA 人類進化学 岩波科学ライブラリー52 1997.7