

ミトコンドリアDNA 16S リボゾームRNA 遺伝子解析による奥尻島周辺のカキ類の種判別

川崎琢真^{*1}, 清水洋平¹, 岩佐 睦², 吉田眞也³, 乗原康裕⁴

¹北海道立総合研究機構栽培水産試験場, ²奥尻地区水産技術普及指導所, ³渡島水産技術普及指導所,
⁴北海道立総合研究機構網走水産試験場

Identification of oysters in Okushiri Island by mitochondrial 16S rRNA analysis

TAKUMA KAWASAKI^{*1}, YOHEI SHIMIZU¹, MUTSUMU IWASA², SHINYA YOSHIDA³ and
YASUHIRO KUWAHARA⁴

¹ Mariculture Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, *Muroran, Hokkaido 051-0013*

² Okushiri Fishery Technical Guide Office, *Okushiri, Hokkaido 043-1401*

³ Oshima Fishery Technical Guide Office, *Hakodate, Hokkaido 041-8558*

⁴ Abashiri Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, *Abashiri, Hokkaido 099-3119, Japan*

Oysters around Okushiri Island are difficult to classify based on appearance. Therefore, we had identified their species using DNA analysis. After obtaining the results, we explored the relationship between species and habitat. Oysters were collected by scuba divers at 1-9 m depth in the sea at 7 different areas around Okushiri Island from November 2011 to the next November. It was difficult to identify the 297 oysters based on their morphological characters. Therefore, we analyzed the nucleotide sequences of mtDNA 16S rRNA genes. Polymerase chain reaction with a template of total DNA from muscle tissues of oysters successfully amplified DNA fragments of 464 bp in the 16S rRNA gene, which were identified as *Crassostrea gigas*, *C. nippona*, *Ostrea circumpecta*, and *Saccostrea* sp. All of the areas had at least two different species, and species matched their characteristic shell size and depth of habitation, but these were insufficient for certain classification. Therefore, the DNA fingerprinting technique were shown to be beneficial for the classification of oysters.

キーワード：PCR, カキ類, シーケンス, 種判別, 分布, ミトコンドリアDNA

北海道南西部日本海沿岸に位置する奥尻島では、近年新たな特産品としてイワガキ *Crassostrea nippona* (Seki, 1934) に注目しており、奥尻ブランドの確立に向け養殖試験に取り組んでいる。しかし、奥尻島の軟体動物相の報告(木下, 1939)ではカキ類は未報告であり、島周辺に生息しているカキ類は主要な漁獲対象ではないことからその種類や分布状況についてはほとんど調べられておらず、採苗用の母貝採取や蓄養用の種採取が困難な状況にある。これまで北海道周辺にはマガキ *C. gigas* (Thumberg, 1793) の他、寿都町および熊石町に天然イワガキが生息していることが報告された(浜口, 2000)。同報告ではこれら2種を外観で見わけることが困難なため、

種の判別には遺伝子の解析を併用している。カキ類の遺伝子解析による種の判別法として、ミトコンドリアDNA上のチトクロームc酸化還元酵素サブユニット1 (O'Foighil *et al.*, 1998) および16SリボゾームRNAの塩基配列の違いを利用したもの(O'Foighil *et al.*, 1995) の他、リボゾームDNAのITS領域の長さの違いを利用した方法(浜口, 2000)があり、天然カキ類の種判別においてはDNAの鑑定が最も信頼性が高いとされている(飯塚・荒西, 2008)。

そこで本研究では、奥尻島周辺のカキ類の生息状況を明らかとするため、解析が簡便でデータベースへの登録数が比較的多いミトコンドリアDNAの16SリボゾームRNA遺伝子の塩基配列の解析を行い、種の判別を行った。

報文番号 A512 (2014年8月6日受理)

*Tel: 0143-22-2323. Fax: 0135-23-7605. E-mail: kawasaki-takuma@hro.or.jp

試料および方法

試料

本研究には, 2011年11月から2012年11月にかけて, 奥尻島周辺の7海域 (A~G) から潜水により採集された天然のカキ類297個体を用いた (Table 1)。得られたカキ類は外観撮影および殻高測定を行った後, 開設して閉殻筋の一部を採取した。閉殻筋試料は, DNA抽出に用いるまで -30°C で保存した。尚, 本報告では密漁防止の観点から採集地点に関する情報は明示していない。

Table 1 Number of oyster samples per collecting point and depth

Sampling location	Depth			Total
	1~3m	4~6m	7~9m	
A	40	0	0	40
B	28	0	20	48
C	36	20	0	56
D	26	0	0	26
E	52	0	0	52
F	21	0	0	21
G	10	24	20	54
	Total			297

DNA抽出

カキ類から採取した閉殻筋より, 尿素-SDS-Proteinase法 (飯塚ら, 2008) 又はDNA抽出キット (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit Promega社) によりゲノムDNAを抽出した。得られたDNA溶液は分光光度計 (Nanodropサーモフィシャーサイエンティフィック社) を用いて濃度測定を行い, PCR反応に供するまで -30°C で保存した。

PCR反応

閉殻筋より抽出したゲノムDNAを鋳型とし, ミトコンドリアDNA 16SリボゾームRNA遺伝子の部分配列をPCR法により増幅した。PCR反応には16Sar:5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'および16Sbr:5'-CG GTCTGAACTCAGATCACG-3'のプライマーセットを用いた (Kessing *et al.*, 1989)。PCR反応液は, 10 μL 反応系にて10 \times Ex Taq Buffer (タカラバイオ株式会社) 1 μL , 2.5mM dNTP Mixture (タカラバイオ株式会社) 0.8 μL , 5 μM プライマー各0.5 μL , TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社) 0.05 μL , およびDNAのサンプル10-100ngの割合で混合して作成した。PCR反応条件は, サーマルサイクラー (Veriti[®] ライフテクノロジー社) を用いて 94°C で2分間の初期変性反応の後, 94°C で30秒間の変性/ 52°C で1分間の会合/ 72°C で2分間の伸張を40回繰り返し, 72°C で7分間の最終伸張を行った。PCR産物は, PCR産物精製キット (ExoSAP-IT[®] 岩井化学薬品) を用いてプライマーおよび未反応dNTPsの除去を行い, 塩基配列解析用サンプルとして -30°C で保存した。

塩基配列解析

PCR産物を鋳型とし, シークエンスPCRキット (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ライフテクノロジー社) を用いて反応を行ない, シークエンスPCR産物を得た。得られたシークエンスPCR産物はシークエンス産物精製キット (Agencourt CleanSEQ kit ベックマンコールター社) を用いて残存したシークエンスPCR試薬類を除去した。精製済みのシークエンスPCR産物を試料として, キャピラリーシークエンサー (Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザライフテクノロジー社) を用いて塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列はNCBIのBLASTプログラム (Kaminuma *et al.*, 2010) によりアライメントを行い, 99%以上の相同性がある種を判別種とした。種の特定のための比較対象として用いたカキ類 (3属9種) の16SリボゾームRNA遺伝子の部分配列はDDBJデータベース (日本DNAデータバンク) から取得し, コケゴロモガキ *Ostrea circumpicta* Pilsbry, 1904に関してのみ飯塚・荒西 (2008) にて報告されている配列を用いた。塩基配列の種間比較および樹形図の作成はClustalXプログラム (Thompson *et al.*, 1997) およびMEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) を用いた。

結果

カキ類の16SリボゾームRNA遺伝子の部分配列を解析した結果, マガキ, イワガキの2種についてデータベース登録情報と99%以上の塩基配列が一致したものを判別種とした。また, 塩基配列がオハグロガキ属の1種 *Saccostrea* sp. (Liu *et al.*, 2011) として報告されているものと完全に一致した標本も含めて, 99%以上一致したものについては, オハグロガキ属の1種とした。飯塚・荒西 (2008) にて報告されているコケゴロモガキの配列と100%一致したものについて, コケゴロモガキと判別した。今回得られた塩基配列と国内に生息する主要なカキ類の塩基配列情報を用いて樹形図を作成した結果, オハグロガキ属の1種については, ケガキ *Saccostrea kegaki* Torigoe & Inaba, 1981とクロヘリガキ *S. echinata* (Quoy & Gaimard, 1835) の間に位置した (Fig.1)。

遺伝子の解析により判別した種を海域別に整理すると, 海域AおよびFでは4種, 海域CおよびEでは3種, 海域B, DおよびGでは2種のカキ類が生息していた。このうち, 海域B, EおよびFではマガキが, 海域A, CおよびGではイワガキが, 海域Dではオハグロガキ属の1種が主要な構成種であった (Table 2)。これらの結果より, 奥尻島周辺には4種のカキ類が生息しており, 調査した7海域すべてにおいて複数種のカキ類が同所的に生息していることが明らかとなった。

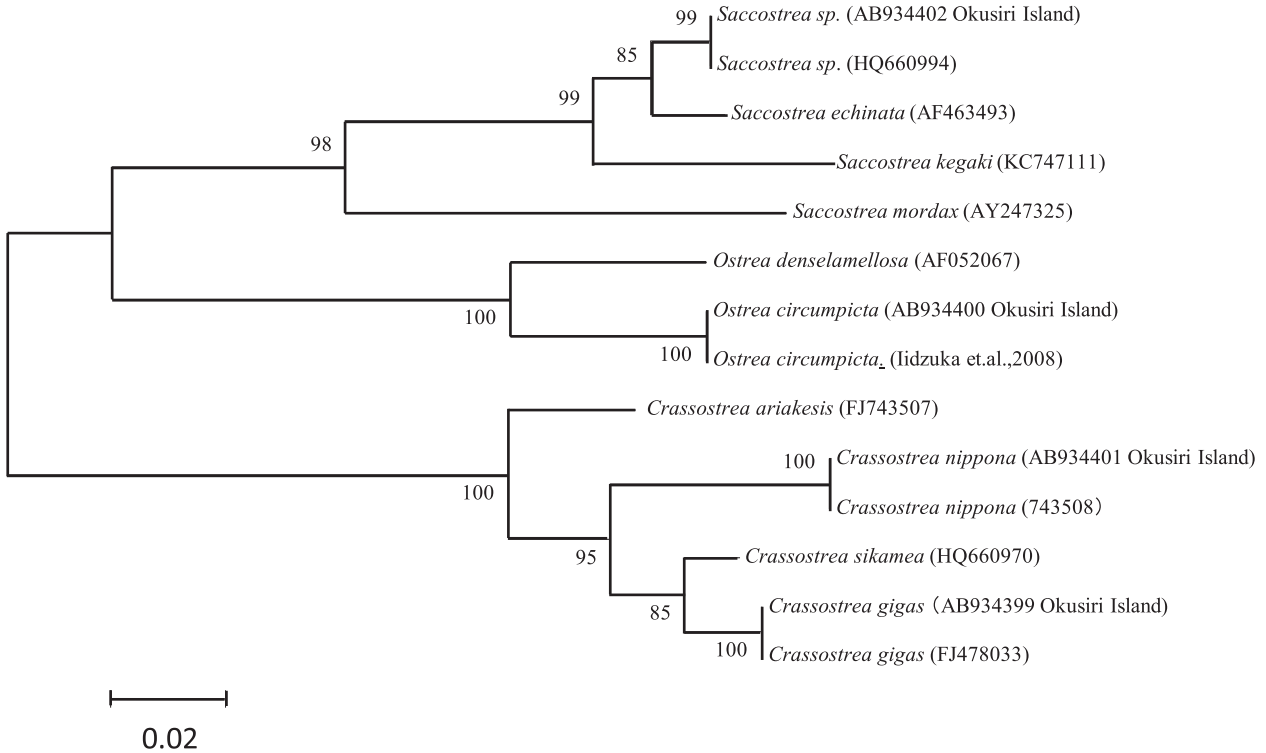


Fig.1 Tree diagram based on a partial sequence (464 bp) of the 16S ribosomal RNA gene of *Ostreidae* major and the Okushiri oysters. Symbols and numbers in parentheses indicate the Genebank accession number. The numbers in the branched graph shows the match percentage from 1000 bootstrap extractions.

Table 2. Results of classification by DNA fingerprinting

Sampling location	Number of each species				Total
	Japanese Oyster (<i>Classostrea gigas</i>)	Rock Oyster (<i>Classostrea nippona</i>)	<i>Saccostrea</i> sp.	<i>Ostrea circumpicta</i>	
A	2	28	8	2	40
B	29	19	0	0	48
C	0	26	14	16	56
D	0	7	19	0	26
E	40	11	0	1	52
F	11	1	3	6	21
G	0	53	0	1	54
Total	82	145	44	26	297

DNA 鑑定により種が明らかとなったカキのうちマガキ、イワガキおよびコケゴロモガキの3種については外観からの種判別は困難であった (Fig.2)。オハグロガキ属の1種と考えられるカキでは、殻の辺縁部に棘状の突起が形成されている点特徴的で、外部形態により上記3種から識別可能であった (Fig.3)。調査したすべての海域に生息していたイワガキについて外部形態の比較観察を行った結果、同一種であっても、採取地点により外観が様々であった (Fig.4)。海域による外観の多様性については、他の3種にも共通であった。

DNA 鑑定により種判別した4種のカキ類について、種毎に殻高組成の比較を行った結果、マガキでは殻高40

~11mm (平均74.7±24.5mm) の範囲のものが最も多く、イワガキは110~180mm (平均118.6±33.4mm) とマガキに比べて大きな貝が多い傾向にあった。オハグロガキ属の1種では、特に殻高30~50mm (平均41.3±8.0mm) に集中していた。コケゴロモガキは個体数が少なく特徴は明確ではないが、10~120mm (平均75.6±32.8mm) の範囲で少数が幅広く出現した (Fig.5)。

採取された水深帯別の出現頻度を解析した結果、マガキは水深3m以浅に多く、イワガキは水深1~9mまで広く分布していた。オハグロガキ属の一種は3m以浅でのみ見られた。コケゴロモガキは主に3m以浅に分布していたが、7~9mにもわずかに見られた。(Fig.6)

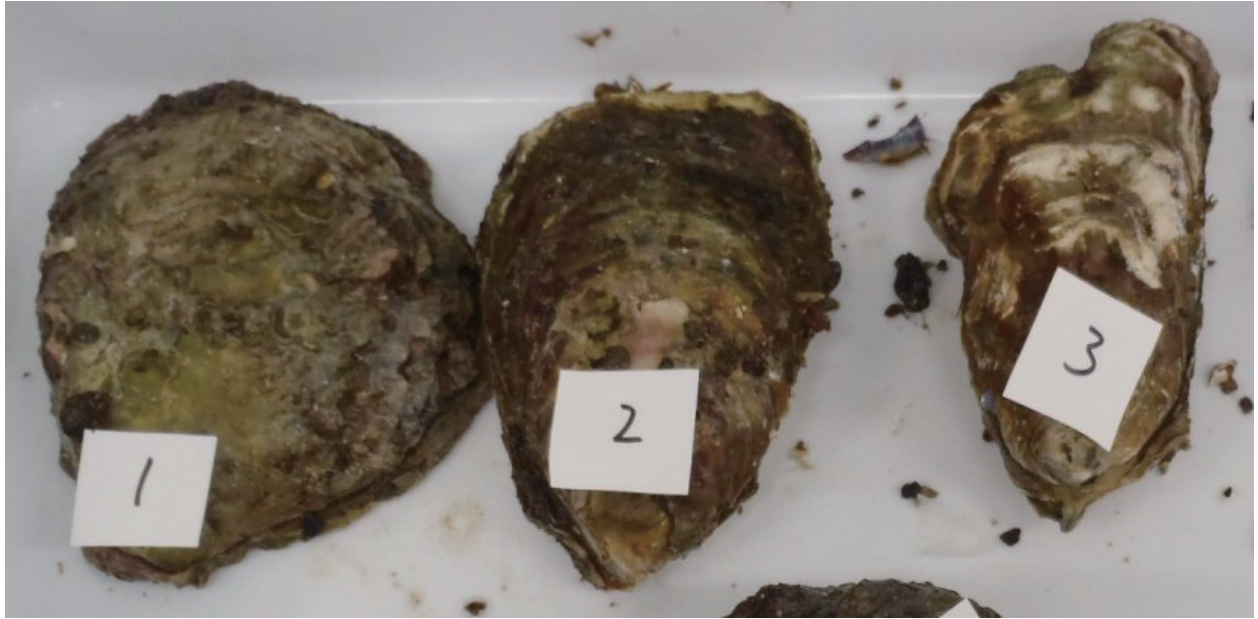


Fig.2 Shells of oysters from station F. Left: *Ostrea circumpicta*, Center: *Crassostrea nippona*, Right: *Crassostrea gigas*.



Fig.3 Characteristic shell shape (arrow) of *Saccostrea* sp.

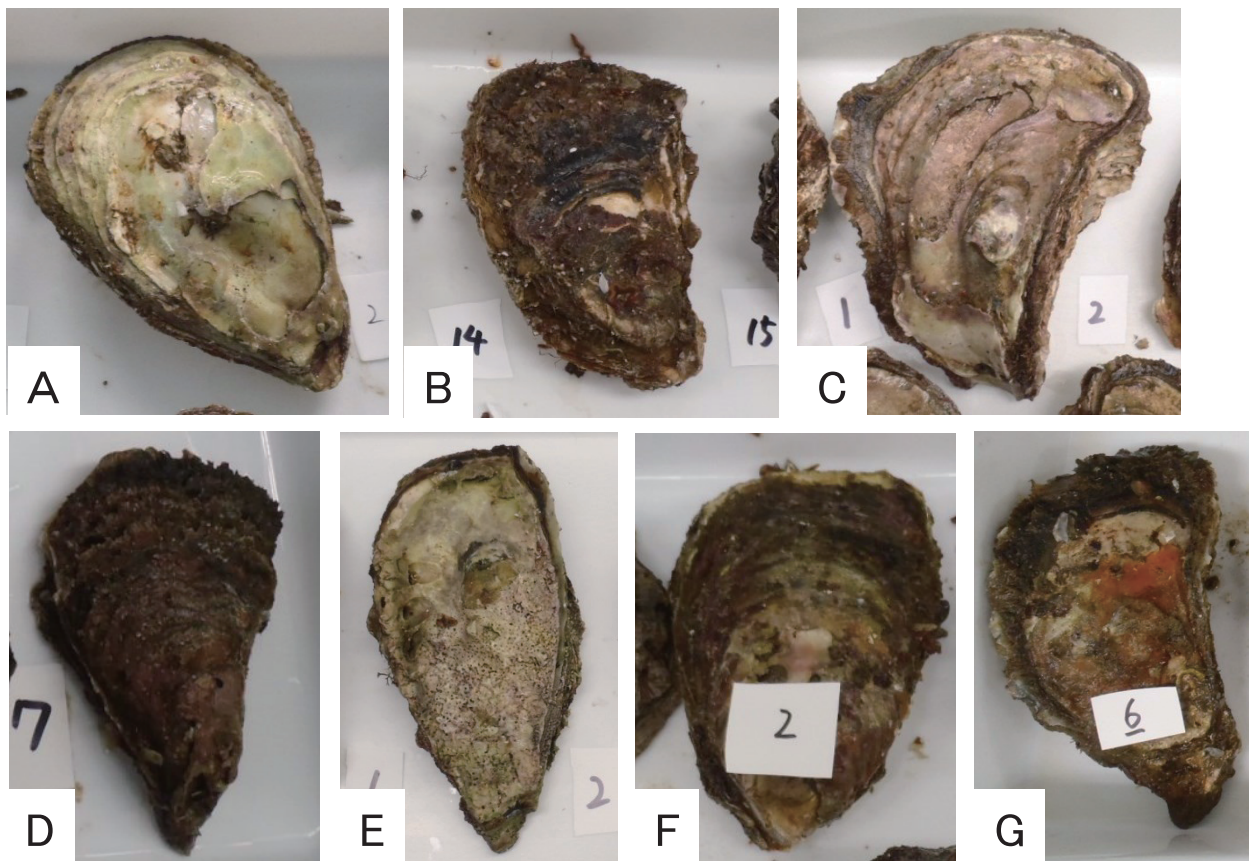


Fig.4 Shells of Rock Oysters (*Crassostrea nippona*) from each station.

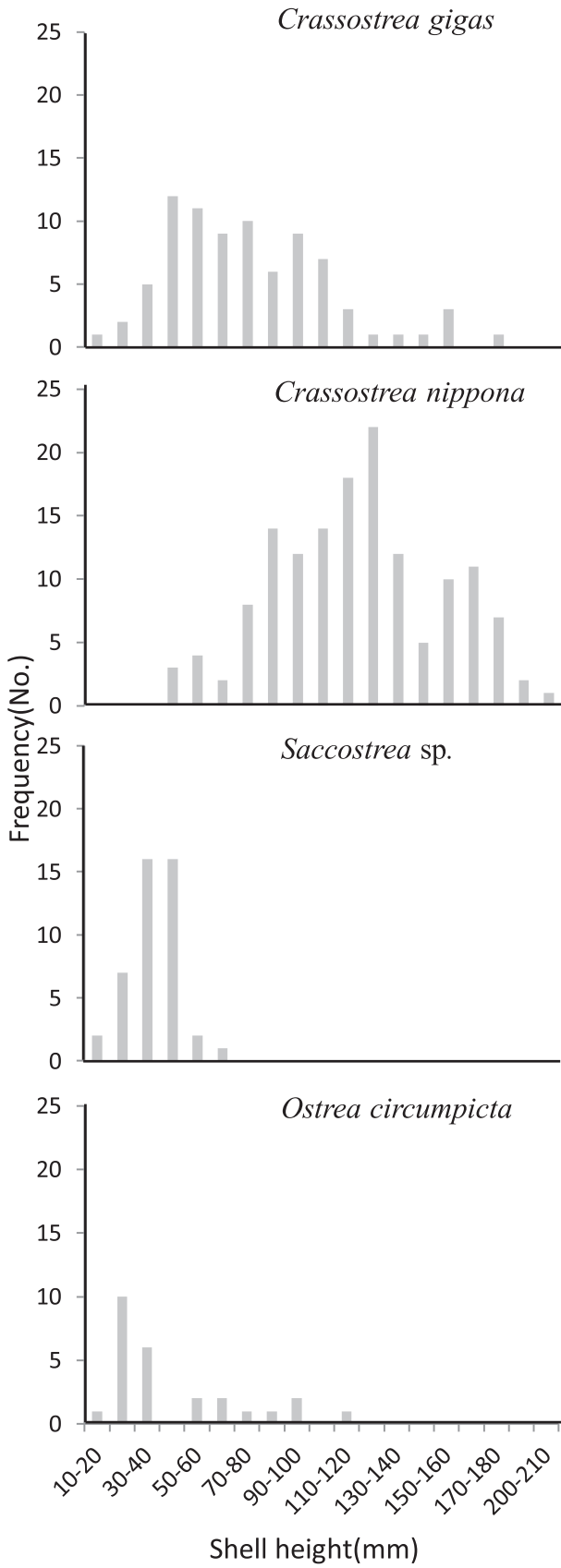


Fig.5 Frequency distribution of shell height.

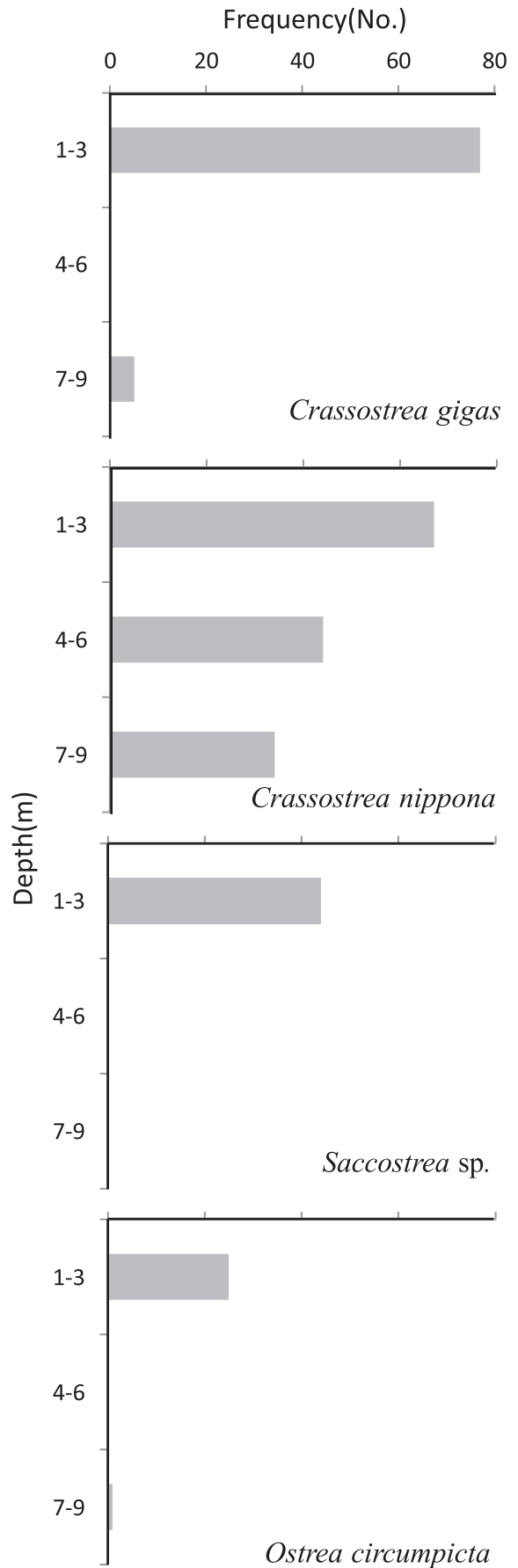


Fig.6 Frequency distribution of collecting depth.

考察

ミトコンドリアDNA 16SリボゾームRNAの部分配列の解析の結果、奥尻島周辺海域にはマガキ、イワガキ、コケゴロモガキ、オハグロガキ属の1種の3属4種のカキが生息していることが明らかとなった。これら4種は海域によっては同所的に混在しており、マガキ、イワガキおよびコケゴロモガキは外観での判別が困難であることから漁獲の際には複数種の混入が懸念される。本研究により奥尻島に生息が確認されたコケゴロモガキは、過去にもイワガキと外観が酷似している（松浦・森，2005）という報告があることから、これらの種の判別にはDNA鑑定を用いるのが有効と考えられる。これらのことから、イワガキを特産品として養殖しようとする際、種苗生産に用いる母貝や天然種苗については、DNA鑑定による種の判別が重要である。

コケゴロモガキは陸奥湾から九州まで分布が確認されており、本研究における奥尻島での発見は北海道初記録である。過去にコケゴロモガキの属するイタボガキ属 *Ostrea* のイタボガキ *Ostrea denselamellosa* Lischke, 1869 の北海道分布報告（波部・伊藤，1965）がある。この種はコケゴロモガキと殻形態が酷似しており、分布も房総半島以南および能登半島以南（稲葉，2004）とされていることから、北海道におけるイタボガキの記録はコケゴロモガキである可能性が高い。

16SリボゾームRNAの部分配列の解析により、オハグロガキ属の1種と考えられたカキは、樹形図から遺伝的にケガキ *Saccostrea kegaki* Torigoe & Inaba, 1981 とクロヘリガキ *S. echinata* (Quoy & Gaimard, 1835) の中間に位置し、姉妹群を形成した。また、オハグロガキ属の1種はケガキやクロヘリガキと同様に殻の縁辺部に円筒状の長棘構造を持つという形態的特徴を有していた。過去に波部・伊藤，（1965）は北海道にケガキが分布していると報告しているが、現在は陸奥湾から奄美大島まで（稲葉，2004）とされており、今回の結果は稲葉（2004）の見解を支持するものである。しかし、本研究で発見したオハグロガキの1種は、外見的特徴がケガキと類似していることから、波部・伊藤，（1965）の報告にてケガキと判断された種が、今回発見されたオハグロガキ属の1種であった可能性もある。

殻高や水深別の分布を解析した結果、奥尻島周辺の4種のカキのうち、イワガキについては殻高や生息水深に特徴が見られた。そのため、水深5m以深で殻高110mm以上のものを漁獲するなどの工夫をすることでイワガキを高い確率で漁獲できる可能性がある。この他の3種では、生息する水深や殻高組成では重複する点が多く、種類の判別は困難と考えられる。

本研究により生息が確認されたコケゴロモガキは食用可能なカキであり、フランスガキ（ヨーロッパガキ）類の一種として特徴づけてブランド化する地域もある（田村，2007）。奥尻島では現状注目している種ではないが、将来の漁獲対象種となる可能性は秘めている。

本研究により、殻形態での類似性が高い奥尻島周辺に生息するカキ類の同定に関してDNA鑑定の有効性が示された。しかし、実際の漁業の現場において詳細な解析はできない。現状では、漁場や殻高の情報からイワガキとその他3種を分ける方法が考えられるが、将来的には種特異的な生化学マーカーを探索し、現場レベルで客観的に種を証明できる簡易な判別キットの開発が必要である。さらに、コケゴロモガキおよびオハグロガキ属の1種の発見は、北海道産海産軟体動物相の種多様性評価への分子生物学的手法の有用性を示す好例と考えられる。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、カキ類の採取を実施して下さったひやま漁業協同組合奥尻支所青年部の皆様に深く感謝の意を表する。

引用文献

- 波部忠重, 伊藤 潔. 原色世界貝類図鑑 (I) 北太平洋編. 保育社. 大阪. 1965; X+176+54 pls.
- 浜口昌巳. イワガキとマガキの識別方法について. 瀬戸内水研ニュース 2000; 4: 1-3.
- 飯塚祐輔, 荒西太士. 九州に分布するイタボガキ科カキ類のDNAの鑑定. LAGUNA 2008; 15: 69-76.
- 稲葉明彦. 世界のカキ (2) 各論西宮市貝類館研究報告 2004; No. 3: 1-63, pl. I-XIII, (1)-(9).
- Kaminuma E, Mashima J, Kodama Y, Gojobori T, Ogasawara O, Okubo K, Takagi T, Nakamura Y. DDBJ launches a new archive database with analytical tools for next-generation sequence data". *Nucleic Acids Research*, 2010; 38; Database issue D33-D38
- Kessing B, Croom H, Martin A, McIntosh C, McMillian WO, Palumbi SP. *The simple fool's guide to PCR*. University of Hawaii, Honolulu, USA. 1989
- 木下虎一郎. 奥尻島の貝類. 北海道水産試験場事業旬報1939, No. 412: 7-10.
- Liu J, Li Q, Kong L, Yu H, Zheng X. Identifying the true oysters (Bivalvia: Ostreidae) with mitochondrial phylogeny and distance-based DNA barcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 2011; 5: 820-830.

- 松浦裕幸, 森 勝義. イワガキとマガキ? 「水産増養殖システム3貝類・甲殻類・ウニ類・藻類 (森勝義編)」恒星社厚生閣, 東京. 2005; 269-278.
- O'Foighil D, Gaffney PM, Hilbish TJ. Difference in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American [*Crassostrea virginica* (Gmelin)] and Asian [*C. gigas* (Thunberg), *C. ariakensis* Wakiya] oyster species. *J. Exp. Mar. Biol.Ecol.*, 1995; 192: 211-220.
- O'Foighil D, Gaffney PM, Wilbur AE, Hilbish TJ. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequence s support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Mar.Biol.*, 1998; 131: 497-503.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 2007; 24: 1596-1599.
- 田村義信. フランスがき類による新たな広島ブランドの開発に向けて. 広島県立総合技術研究所水産海洋技術センター研究発表会要旨集 2007; URL: <http://www.pref.hiroshima.lg.jp/uploaded/attachment/41678.pdf>
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. "The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". *Nucleic Acids Research* 1997; 25 (24): 4876-4882.