

平成16年度 厚岸湖・別寒辺牛湿原学術研究奨励補助成果報告書
「カワシンジュガイ科貝類とサケ科魚類の宿主-寄生関係と遺伝的多様性」

北海道大学大学院水産科学研究科生命資源科学専攻
栗原善宏

【はじめに】

カワシンジュガイ *Margaritifera laevis* は冷水性淡水二枚貝であり、日本列島では北海道から本州に分布する。最近50～60年間では、本州南西部の多くの河川で本種の地域個体群が絶滅し、その他の地域でも生息地の縮小や個体群サイズの減少が急速に進行した。その結果、現在、カワシンジュガイは絶滅危惧II類（環境省レッドリスト）に選定され、遺伝学的・生態学的理論に基づいた保全施策の構築が急務となっている。近年、希少淡水魚類を対象とした保全生物学的研究は数多く行われているが、カワシンジュガイ科やイシガイ科などの希少淡水二枚貝に関するこの分野での研究は少なく、科学的で有効な保全施策の提唱には至っていない。

特に淡水二枚貝類イシガイ目は魚類との間に宿主-寄生という密接な共生関係を保ちながら河川生態系を構成する生物群であり（Kat & Davis 1984, McMahon 1991）、カワシンジュガイ科は宿主-寄生関係に種特異的な対応関係を有することで知られている（Ziuganov et al. 1994, Bauer 1997, Araujo et al. 2001, Araujo et al. 2002）。従って本種の保全には、遺伝的・生態的多様性に配慮した生息環境保全とともに、この生物間相互作用の好適維持の視点から保全施策を構築する必要がある。本研究では、本科貝類の生物多様性の実態把握ならびに保全施策構築の基盤となる1)日本産カワシンジュガイ2種とサケ科魚類の宿主-寄生関係とその種特異性を解明すること、2)日本産カワシンジュガイ2種の遺伝的多様性の実態を把握することを目的とする2つの調査を実施した。

1. カワシンジュガイとサケ科魚類の宿主-寄生関係およびその種特異性

本種は幼生期に魚類に寄生する生態的特性を有し、魚類との間に密接な共生関係を保ちながら河川生態系を構成する生物群である。この宿主-寄生関係は稚貝のリクルートに密接に関与する一方で、河川支流間の移動分散および局所個体群の形成に深く関与していると予測される。従って、この生物間相互作用の十分な理解と健全性の維持が本種の保全において極めて重要な課題といえる。これまで日本産カワシンジュガイ *Margaritifera laevis* は数種のサケ科魚類を宿主とすることが報告されているが、従来単一の種として扱われてきた *M. laevis* に2つの独立種（A種とB種）が含まれていることが明らかとなっており、現在、2種の宿主-寄生関係は明らかでない。本研究では、日本産カワシンジュガイ2種の宿主-寄生関係およびその種特異性の解明を目的とする野外生態調査を実施した。

【調査方法】

幼生放出期から寄生終了期（5月から9月）にかけて、2種の同所的生息地3河川（標津川・春別川・別当賀川）において野外生態調査を実施した。各河川にはそれぞれ1地点ずつ調査地点を設け、定期的に魚類を捕獲しカワシンジュガイ幼生の寄生成功・寄生率・寄生期を魚種別に調査した。魚類への寄生は目視で確認することができたが、野外調査時に2種の幼生を識別することが困難であることから、寄生していた幼生の一部は研究室に持ち帰り、遺伝子マーカー（本研究で開発：mtDNA 16SrRNA 遺伝子領域に設計）を用いて幼生の種判別を行い、2種それぞれの宿主魚類・寄生率・寄生期を特定した。さらに別寒辺牛川および石狩川においても魚類への寄生を観察し、宿主魚類調査および種特異性の検証に用いる標本として幼生を採集した。

【結果と考察】

各調査地点にはシロザケ・カラフトマス・ニジマスなどのサケ科魚類やその他魚種が生息していたが、カワシンジュガイ幼生の寄生が認められたのはサクラマス・アメマス・オショロコマの3種のみであった。標津川では寄生はサクラマス・アメマス・オショロコマに認められ、春別川・別当賀川ではサクラマス・アメマスのみ認められた。別寒辺牛川ではアメマスへの寄生は認められたが、サクラマスは数個体しか採集できず定量的な観察ができなかった。石狩川では、ブラウントラウト・アメマス・

ニジマス等のサケ科魚類が生息していたが、寄生が認められたのはサクラマスのみであった。尚、オシヨロコマが生息するのは調査河川中、標津川のみである。

標津川・春別川・別当賀川における魚種別の寄生率と寄生期間を図1に示す。アメマス・オシヨロコマへの寄生は5月～8月の間に、サクラマスへの寄生は8月～9月の間に観察され、アメマス・オシヨロコマとサクラマスでは寄生期に大きく差があることが明らかとなった。この寄生期の偏り傾向は3河川(標津川・春別川・別当賀川)いずれにおいても認められた。研究室に持ち帰ったサンプルについて遺伝子マーカーを用いて幼生の種判別を行った結果、いずれの河川(別寒辺牛川・標津川・春別川・別当賀川・石狩川)においても、サクラマスからはA種のみが、アメマス・オシヨロコマからはB種のみが検出された(図2)。従って、日本産カワシンジュガイ2種はそれぞれ異なる宿主に寄生していることが示され、さらに道東部の河川では繁殖期も大きく異なることが強く示唆された。また、各魚種への寄生率および宿主魚類のサイズ別の寄生成功にも若干の違いが認められている(表1)。日本産カワシンジュガイ2種の保全には、2種それぞれの対応関係をふまえた上で、宿主魚類の個体数減少や河川内移動の制限などに配慮し、この宿主-寄生関係の健全性を維持する施策を構築する必要がある。

日本産カワシンジュガイの幼生放出期は広島県高梁川で5月中旬～下旬(内藤、1988)、北海道千歳川で7月下旬～8月下旬(栗倉、1964)と報告されている(これらはA種個体群と考えられる)。道東部の河川では、5月にはB種幼生の寄生が認められたことに対し、A種幼生は8月からのみであった。従って、道東の河川で2種の繁殖期が大きく異なること(特にA種の寄生期が8月以降に遅滞していたことが、種間競争あるいはそれぞれの宿主魚類の降海に伴う淘汰等の結果を反映していることも十分考えられる。日本産カワシンジュガイ2種と宿主魚類の対応関係や寄生期の差異がどのように進化してきたかを明らかにするためには、今後さらなる調査が必要である。また、これら3種の宿主魚類(アメマス、オシヨロコマ、サクラマス)はそれぞれ河川内分布が異なり、支流間の移動や降海時期なども異なる。従って、成貝の移動分散能力が乏しい本種群の個体群動態や遺伝的多様性の創出・維持機構に対し、これらの宿主魚類がどのような作用を与えているかを解明することが、本科貝類の多様性創出・維持機構を探る上で重要といえる。

2. 日本産カワシンジユガイ 2 種の遺伝的多様性および集団構造

生物進化の基本的な過程は、遺伝子置換と集団内の遺伝子頻度の変化である (Nei, 1987)。従って、集団内の遺伝的変異が種間変異に変換されるプロセスおよび種内の遺伝的変異の維持機構を理解することは生物進化を考える上で最も基本的な課題の一つといえる。一方、生物多様性保全は進化の基本単位である種内変異を含めて維持することを目的としており、対象生物が保有する遺伝的多様性を正確に把握し、適切に保全することが、生物多様性保全における重要な優先事項の一つとして位置づけられている (McNeely et al. 1990)。しかしながら、本種を対象としたこの分野の研究は行われておらず、遺伝的多様性および遺伝的集団構造の実態は明らかでない。本研究では、日本産カワシンジユガイ 2 種の遺伝的多様性を 3 つの階層 (種内・地域個体群内・個体群内) に分けて調査するとともに、個体群間の遺伝的分化および遺伝的集団構造を調査した。

【調査方法】

種内・地域個体群内・個体群内の遺伝的多様性は、14 酵素 16 遺伝子座に支配されるアロザイムをもちいて調査した。本解析には、北海道・東北・信州の 3 つの地域 (合計 12 河川) より採集した 17 集団 (A 種: 11 集団、B 種: 6 集団) を用いた (表 2)。対立遺伝子頻度から 5 つの遺伝的多様性指標 (A , AP , P_{95} , H_o , H_e) を求め、2 種各集団の遺伝的多様性を調査した。特に、3 つの地域間 (北海道・東北・信州) の遺伝的多様性は一元配置分散分析を用いて比較した。また、遺伝的差異・分化の指標として固定指数 (G_{ST} ・ F_{ST}) を算出し、2 種それぞれの集団間の遺伝的差異および遺伝的集団構造を調査した。本研究ではさらに信濃川 (長野県) および別寒辺牛川 (北海道) の集団について、高い遺伝的多型の検出力を有する RAPD 法およびマイクロサテライト DNA 解析法を用いて河川個体群内の遺伝的変異を調査した。

【結果と考察】

5 つの遺伝的多様性指標 (A , AP , P_{95} , H_o , H_e) をもとに A 種と B 種それぞれについて遺伝的変異性を調査した結果 (表 3)、A 種の個体群はいずれも高い変異性を有し、3 つの地域間 (北海道・東北・信州) の遺伝的多様度には違いは認められなかった (one-way ANOVA A , AP , P_{95} , H_o , H_e はそれぞれ $F=2.89$, $P=0.11$, $F=3.26$, $P=0.09$,

$F=0.84$, $P=0.47$, $F=0.52$, $P=0.61$ and $F=0.76$, $P=0.50$)。種としてみても A 種の遺伝的多様性 ($P_{95}=23.3$, $A=1.35$, $AP=2.21$, $H_0=0.078$, $H_e=0.081$) は海外のカワシジギガイ科貝類より高く ($H_0=0.014$, $H_e=0.015$, Machordom et al. 2003; $H_0=0.000$, $H_e=0.000$, Curole et al. 2004) 一般的な淡水二枚貝類と同等の値を示した ($H_0=0.78$, Davis & Duller 1981)。これは、減少傾向にありながらも、A 種の各個体群が進化的変化を可能とする遺伝的変異を維持していることを意味する。一方、B 種では全ての遺伝子座が同一の対立遺伝子に固定され、種内・地域個体群内・個体群内の遺伝的多様性は全く認められなかった (表 3)。さらに、アロザイム遺伝子で調査した限り、グループ B では個体間でさえも遺伝的差異は一切認められていない。このような B 種のクローン性を検証するために、高い検出力を有する RAPD 法およびマイクロサテライト DNA 解析法を用いて、個体群を構成する個体間の遺伝的変異を調査中である (本解析は現在遂行中であり、後に結果をまとめ提出する)。

固定指数 ($G_{ST} \cdot F_{ST}$) を指標として算出し、種内集団間の遺伝的差異および分化を調査した結果、B 種では集団間の遺伝的差異・分化は一切認められず、さらに、高い集団内変異性を有する A 種でさえ、集団間の遺伝的分化はきわめて低く、明瞭な遺伝的集団構造は見出されなかった (表 4)。調査に用いた個体群間は、現在、遺伝子流動を欠いており、少なくとも、3 つの地域集団間 (北海道、東北、信州) には遺伝的分化を遂げるだけの隔離年代が存在すると考えられる。さらに、このような低い遺伝的分化は他のカワシジギガイ科貝類にも認められていることから (Chesney et al. 1993, Machordom et al. 2003, Curole et al. 2004) 移住や歴史的事象 (隔離年代、創始者効果、瓶首効果) 以外に、本科貝類の生物的・生態的特性が遺伝的分化を抑制するメカニズムとして働いている可能性が高い。その要因として、本科貝類で認められている雌雄同体現象、長い繁殖寿命、配偶子をプールする交配システム、宿主魚類の移動と個体群動態などが考えられるが現時点で特定することはできない。今後、この要因を特定し遺伝的多様性の創出・維持機構を解明することが、本種の生物多様性理解と保全において重要な課題といえる。

【謝 辞】

本研究を遂行するにあたり渋谷辰生氏をはじめとする厚岸水鳥観察館のスタッフの皆様には多大なる援助を頂き、様々な便宜を図っていただきました。改めて厚くお礼申し上げます。また、独立行政法人水産大学校の高橋洋氏、富山大学の山崎裕治氏、北海道大学大学院水産科学研究科の鶴田哲也氏、野田隆之氏、久米学氏、北村武文氏、町田善康氏、有岡英明氏にはフィールドでのサンプリングにご協力をいただきました。ここに記して感謝の意を表します。最後になりましたが、別寒辺牛川流域で調査する機会を与えていただいた厚岸町町長 若狭靖氏はじめ関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。

【参考文献】

- Araujo, R., Bragado, D. & Ramos, M.A. (2001) Identification of the river blenny, *Salaria fluviatilis*, as a host to the glochidia of *Margaritifera auricularia*. *Journal of Molluscan Studies*, 67: 128-129.
- Araujo, R., Camara, N. & Ramos, M.A. (2002) Glochidium metamorphosis in the endangered freshwater mussel *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793): a histological and scanning electron microscopy study. *Journal of Morphology*, 254: 259-265.
- 栗倉輝彦 (1964) サケ科魚類に寄生したカワシンジュガイ幼生について. 北海道水産孵化場研究報告 19:1-16
- Bauer, G. (1997) Host relationships at reversed generation times: *Margaritifera* (Bivalvia) and salmonids. In: *Vertical food web interactions: evolutionary patterns and driving forces* (Dertner, K. Bauer G. & Volkl, W. eds.), 69-79. Springer Verlag, Berlin.
- Chesney, H.C.G., Oliver, P.G. & Davis, G.M. (1993) *Margaritifera durrovensis* Phillips, 1928: taxonomic status, ecology and conservation. *Journal of Conchology*, 34: 267-299.

- Curole, J.P., Foltz, D.W. & Brown, K.M. (2004) Extensive allozyme monomorphism in threatened species of freshwater mussel, *Margaritifera hembeli* Conrad (Bivalvia: Margaritiferidae). *Conservation Genetics*, 5: 271-278.
- Davis, G.M. & Fuller, S.L.H. (1981) Genetic relationship among recent Unionacea (Bivalvia) of North America. *Malacologia*, 20: 217-253.
- Frankham, R. (1995) Conservation genetics. *Annual review of genetics*, 29: 305-327.
- Kat, P.W. & Davis, G.M. (1984) Molecular genetics of peripheral populations of Nova Scotian Unionidae (Mollusca: Bivalvia). *Biological Journal of the Linnean Society*, 22: 157-185.
- Kondo, T., Yamada, M., Kusano, Y. & Sakai, K. (2000) Fish host of the freshwater pearl mussels *Margaritifera laevis* (Bivalvia: Margaritiferidae) in the Furebetsu River, Hokkaido. *Venus*, 59: 177-179.
- Machordom, A., Araujo, R., Erpenbeck, D. & Ramos, M.A. (2003) Phylogeography and conservation genetics of endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionoidea). *Biological Journal of the Linnean Society*, 78: 235-252.
- McMahon, R. F. (1991) Mollusca: Bivalvia. In: Thorp J. H. and Covich, A. P. (eds), *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates*. Academic Press. pp. 315-390.
- McNeely, J.A., Miller, W.V., Mittermeier, R.A. & Werner, T.B. (1990) *Conserving the World's Biological Diversity*. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington, DC.
- 内藤順一 (1988) 広島県におけるカワシンジュガイの繁殖生態 1. *比婆科学博物館研究報告* 27:7-15
- Ziuganov, V., Zotin, A., Nezlin, L. & Tretiakov, V. (1994) *The freshwater pearl*

mussels and their relationships with salmonid fish. VNIRO Publishing House, Moscow.

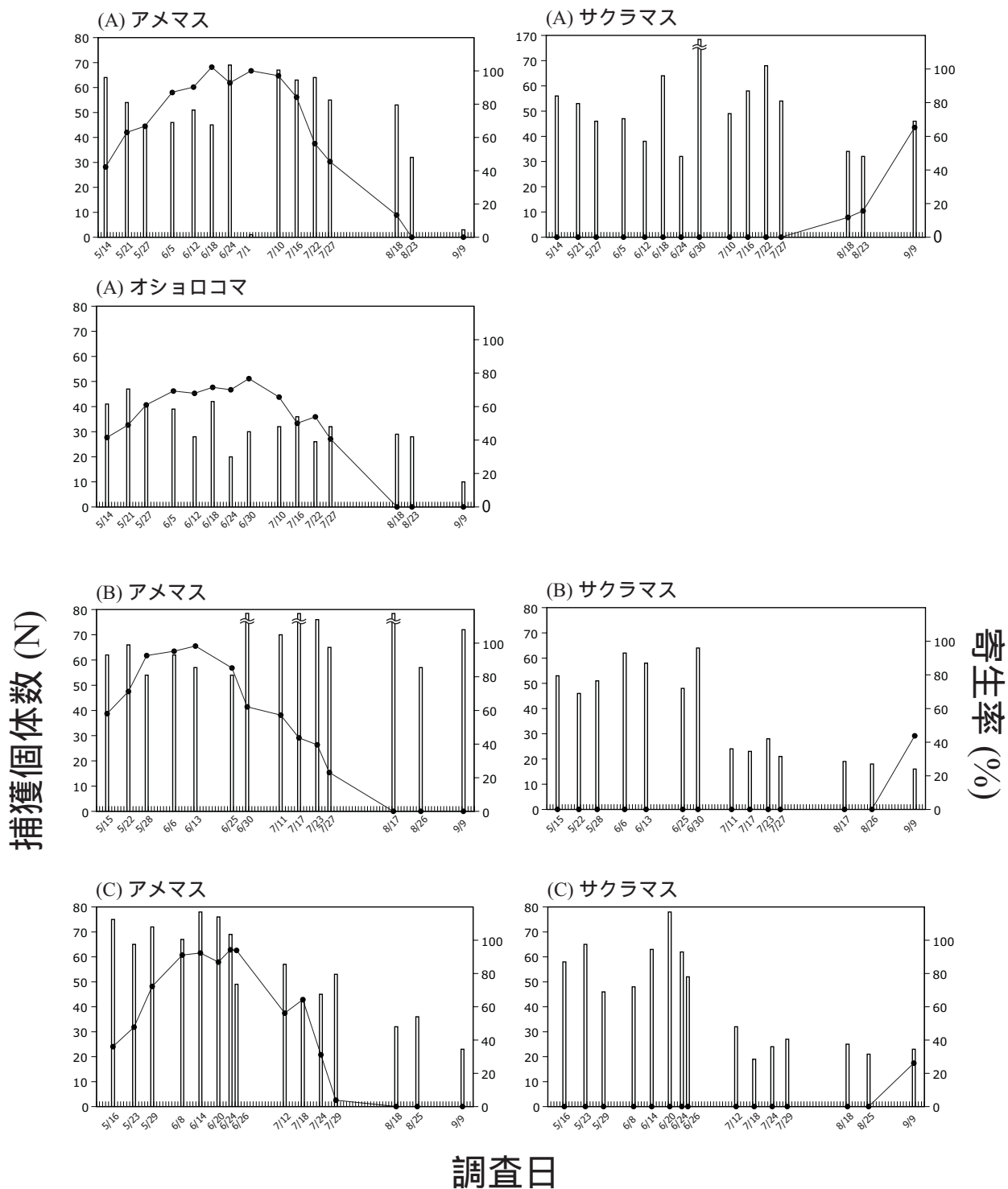


図1. 魚種別の寄生率および寄生期間 (A: 標津川、B: 春別川、C: 別当賀川). 図中のバーは捕獲個体数を、プロットは寄生率を示す.

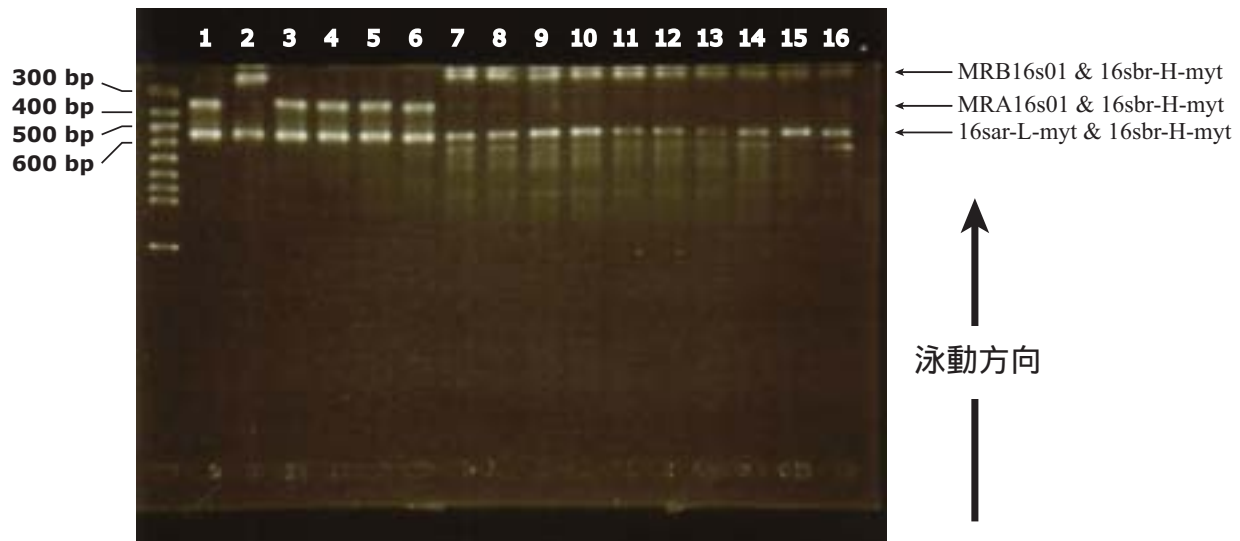
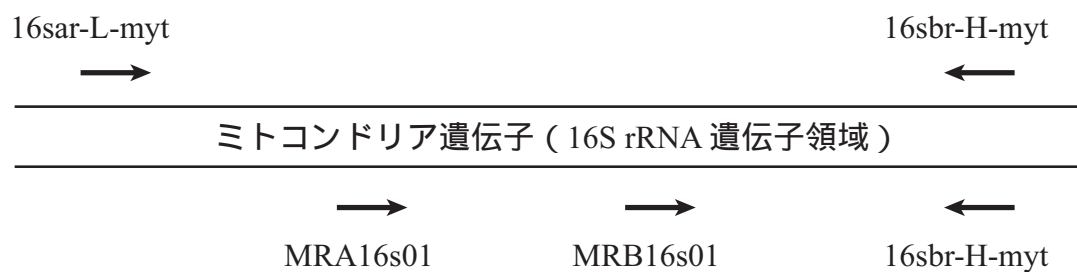


図2 . 種判別マーカを用いた2種の電気泳動パターン (No.1 : A種の成員、No.2 : B種の成員) と幼生の種判別結果の一例 (No.3 ~ 6 : ヤマメに寄生していた幼生、No.7 ~ 10 : アメマスに寄生していた幼生、No.11 ~ 16 : オシヨロコマに寄生していた幼生) .

予備資料 : 種判別に用いた種特異的プライマーの位置関係



2組のプライマー-MRA16s01と16sbr-H-mytはA種の遺伝子の特異的に増幅し、MRB16s01と16sbr-H-mytの組み合わせはB種の遺伝子の特異的に増幅する。2種ではそれぞれ異なる長さの断片が増幅され、電気泳動パターンにより2種が識別される。16sar-L-mytと16sbr-H-mytは両種のmtDNAを増幅するプライマー。

表 1 . 魚種別の寄生率および寄生期間

宿主魚類（調査河川）	調査日数	平均捕獲個体数	最大寄生率（％）	寄生時期
アメマス（標津川）	15	47.6	100.0	5月～8月
アメマス（春別川）	14	76.4	98.0	5月～8月
アメマス（別当賀川）	15	55.9	76.4	5月～8月
オシヨロコマ（標津川）	15	32.1	77.0	5月～8月
サクラマス（標津川）	15	56.1	65.0	8月～9月
サクラマス（春別川）	14	38.4	44.0	9月
サクラマス（別当賀川）	15	56.1	38.4	9月

表 2 . 各解析に用いた標本の採集地点および個体数

採集地点	1		2		
	A種	B種	A種	B種	
北海道地方					
BEK	別寒辺牛川（北海道）	11	29	10	10
MUS	標津川水系武佐川（北海道）	23	27	-	-
TOH	当幌川（北海道）	37	11	-	-
BET	別当賀川（北海道）	27	4	-	-
BIW	琵琶瀬川（北海道）	-	17	-	-
東北地方					
OMN	雄物川（秋田県）	26	-	-	-
AKK	安家川（岩手県）	27	-	-	-
OMT	小本川（岩手県）	26	-	-	-
信州地方					
NOU1	信濃川水系農具川（長野県）	30	-	-	-
NOU2	信濃川水系農具川（長野県）	30	-	-	-
NOU3	信濃川水系農具川（長野県）	30	-	10	-
SAK	信濃川水系逆さ川（長野県）	2	28	-	10

* 1 : アロザイム解析 2 : RAPD-PCR解析 & マイクロサテライト解析

表 3 . 各集団の遺伝的多様性 (N = mean sample size per locus, A = mean number of alleles
 AP = mean number of alleles per polymorphic locus, P_{95} = percentage of polymorphic loci 0.95
 H_o = observed heterozygosity, H_e = expected heterozygosity)

集団名	N	A	AP	P_{95}	H_o	H_e
A種						
BEK	11	1.3	2.0	18.8	0.034	0.060
MUS	23	1.5	3.9	25.0	0.103	0.092
TOH	37	1.5	2.1	31.3	0.093	0.097
BET	27	1.3	2.0	25.0	0.062	0.068
OMN	26	1.3	2.0	18.8	0.072	0.077
AKK	27	1.6	2.3	31.3	0.102	0.099
OMT	26	1.4	2.0	37.5	0.094	0.094
NOU1	30	1.2	2.0	18.8	0.056	0.071
MOU2	30	1.3	2.0	12.5	0.067	0.069
MOU3	30	1.3	2.0	25.0	0.079	0.095
SAK	2	1.1	2.0	12.5	0.094	0.073
B種						
BEKb	29	1.0	1.0	0.0	0.000	0.000
MUSb	27	1.0	1.0	0.0	0.000	0.000
TOHb	11	1.0	1.0	0.0	0.000	0.000
BETb	4	1.0	1.0	0.0	0.000	0.000
BIWb	17	1.0	1.0	0.0	0.000	0.000
SAKb	28	1.0	1.0	0.0	0.000	0.000

表 4 . A種個体群間の遺伝的差異および遺伝的分化

階層 (種・地域個体群)	Locus	H_T	H_S	G_{ST}	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
	<i>Ak</i> *	0.037	0.038	-0.017	-0.020	-0.021	-0.001
	<i>Gpi</i> *	0.425	0.388	0.087	0.040	0.133	0.097
	<i>Idhp</i> *	0.051	0.050	0.018	-0.064	-0.023	0.038
	<i>Ldh</i> *	0.486	0.440	0.096	0.124	0.206	0.094
	<i>Mdh</i> *	0.060	0.061	-0.008	-0.043	-0.036	0.007
	<i>Pgdh</i> *	0.235	0.230	0.021	0.082	0.119	0.040
	<i>Pgm</i> *	0.101	0.100	0.012	-0.016	0.021	0.037
種	Over all loci	0.087	0.082	0.064	0.060	0.127	0.072
北海道地方	Over all loci	0.080	0.080	0.000	0.043	0.041	-0.001
東北地方	Over all loci	0.089	0.090	-0.005	0.005	-0.002	-0.007
信州地方	Over all loci	0.075	0.077	-0.038	0.134	0.130	-0.004

注1) G_{ST} ・ F_{ST} 値が高いほど集団間の遺伝的差異・分化が大きいことを意味する

注2) B種は変異性が全く認められなかったので表記していない

「カワシンジュガイ科貝類とサケ科魚類の宿主-寄生関係と遺伝的多様性」

北海道大学水産科学研究科 栗原善宏

カワシンジュガイ *Margaritifera laevis* は冷水性淡水二枚貝であり、日本列島では北海道から本州に分布する。最近 50 60 年間では、本州南西部の多くの河川で本種の地域個体群が絶滅し、その他の地域でも生息地の縮小や個体群サイズの減少が急速に進行した。その結果、現在、カワシンジュガイは絶滅危惧 II 類（環境省レッドリスト）に選定され、遺伝学的・生態学的理論に基づいた保全施策の構築が急務となっている。近年、希少淡水魚類を対象とした保全生物学的研究は数多く行われているが、カワシンジュガイ科やイシガイ科などの希少淡水二枚貝に関するこの分野での研究は少なく、科学的で有効な保全施策の提唱には至っていない。本研究では、本科貝類の生物多様性の実態把握ならびに保全策構築の基盤となる 1) 日本産カワシンジュガイ 2 種とサケ科魚類の宿主-寄生関係とその種特異性を解明すること、2) 日本産カワシンジュガイ 2 種の遺伝的多様性の実態を把握することを目的とする 2 つの調査を実施した。

1. カワシンジュガイとサケ科魚類の宿主-寄生関係およびその種特異性

本種は幼生期に魚類に寄生する生態的特性を有し、魚類との間に密接な共生関係を保ちながら河川生態系を構成する生物群である。この宿主-寄生関係は稚貝のリクルートへ密接に関与する一方で、河川支流間の移動分散および局所個体群の形成に深く関与していると予測される。従って、この生物間相互作用の十分な理解と健全性の維持が本種の保全において極めて重要な課題といえる。これまで日本産カワシンジュガイ *Margaritifera laevis* は数種のサケ科魚類を宿主とすることが報告されているが、従来単一の種として扱われてきた *M. laevis* に 2 つの独立種（A 種と B 種）が含まれていることが明らかとなっており、現在、2 種の宿主-寄生関係は明らかでない。本研究では、日本産カワシンジュガイ 2 種の宿主-寄生関係およびその種特異性の解明を目的とする野外生態調査を実施した。

2. 日本産カワシンジュガイ 2 種の遺伝的多様性および集団構造

生物進化の基本的な過程は、遺伝子置換と集団内の遺伝子頻度の変化である (Nei, 1987)。従って、集団内の遺伝的変異が種間変異に変換されるプロセスおよび種内の遺伝的変異の維持機構を理解することは生物進化を考える上で最も基本的な課題の一つといえる。一方、生物多様性保全は進化の基本単位である種内変異を含めて維持することを目的としており、対象生物が保有する遺伝的多様性を正確に把握し、適切に保全することが、生物多様性保全における重要な優先事項の一つとして位置づけられている (McNeely et al. 1990)。しかしながら、本種を対象としたこの分野の研究は行われておらず、遺伝的多様性および遺伝的集団構造の実態は明らかでない。本研究では、アロザイム解析・RAPD-PCR 解析・マイクロサテライト解析により日本産カワシンジュガイ 2 種の遺伝的多様性を調査するとともに、個体群間の遺伝的分化および遺伝的集団構造を調査した。