

# 枝幸町内における淡水二枚貝 コガタカワシンジュガイ (*Margaritifera togakushiensis*) の生息情報

三浦 一輝<sup>1,2</sup>, 川尻 啓太<sup>2</sup>, 臼井 平<sup>3,4</sup>, 石山 信雄<sup>2</sup>  
秋山 吉寛<sup>4,5</sup>, 渥美 圭佑<sup>1</sup>, 根岸 淳二郎<sup>6</sup>, 中村 太士<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 北海道大学大学院環境科学院, <sup>2</sup> 北海道大学大学院農学研究院, <sup>3</sup> オホーツクミュージアムえさし  
<sup>4</sup> オホーツク魚類研究会, <sup>5</sup> 国土交通省国土技術政策総合研究所, <sup>6</sup> 北海道大学大学院地球環境科学研究院

Kazuki MIURA<sup>1,2</sup>, Keita KAWAJIRI<sup>2</sup>, Taira USUI<sup>3,4</sup>,  
Nobuo ISHIYAMA<sup>2</sup>, Yoshihiro B. AKIYAMA<sup>4,5</sup>, Keisuke ATSUMI<sup>1</sup>  
Junjiro N. NEGISHI<sup>6</sup>, Futoshi NAKAMURA<sup>2</sup>

## A new record of distributions of *Margaritifera togakushiensis* in Esashi Town, Hokkaido, northern Japan

**Abstract:** We investigated the distributions of endangered freshwater pearl mussel species (*Margaritifera togakushiensis* Kondo & Kobayashi, 2005) in Esashi Town, Hokkaido, northern Japan. Mussels were collected from three study sites including two streams and one artificial pond in June 2017. Collected mussels were identified using DNA-based identification techniques, and *M. togakushiensis* was found in all sites. This study would promote a better understanding of fragmentarily known distribution of the species in this region and Hokkaido. However, *M. togakushiensis* typically inhabits lotic systems and presence of this species in the artificial pond raises some questions regarding its origin; thus, further investigations are needed to determine the origin of these individuals.

<sup>1</sup>Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University, <sup>2</sup>Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, <sup>3</sup>Okhotsk Museum Esashi, <sup>4</sup>Okhotsk Fish Conservation Society, <sup>5</sup>National Institute for Land and Infrastructure Management, Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism, <sup>6</sup>Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University

**キーワード:** 池、河川、カワシンジュガイ属、絶滅危惧種、DNA

**Keyword:** DNA, Endangered species, *Margaritifera* spp., Pond, Rivers

### はじめに

コガタカワシンジュガイ *Margaritifera togakushiensis* Kondo & Kobayashi, 2005 は、イシガ

イ目カワシンジュガイ科 (order Unionoida, family Margaritiferidae) に属する淡水二枚貝である (Kondo 2008)。極東ロシアおよび日本の冷涼な河川に生

息し、国内では本州（長野県、岩手県、青森県）と北海道において生息が確認されている（Kondo 2008; Akiyama et al. 2013; 環境省 2014）。本種は、これまでに確認されている生息地が少ないこと、また、ダム建設などによる河川の分断化や河川改修、周辺の土地開発などによってその数を減らしていることから、近年、環境省が作成するレッドリストにおいて絶滅の危険性が最も高い絶滅危惧Ⅰ類（CR+EN）に選定されている（環境省 2014）。

コガタカワシンジュガイと同じカワシンジュガイ属二枚貝として、国内にはカワシンジュガイ *Margaritifera laevis* (Haas, 1910) が山口県以东の本州から北海道にかけて生息している（Kondo 2008）。カワシンジュガイはコガタカワシンジュガイと同様に、環境省のレッドリストに掲載され、絶滅危惧Ⅱ類に選定されている（環境省 2014）。コガタカワシンジュガイは、2005年まで、このカワシンジュガイと同種と思われていたが、Kondo & Kobayashi (2005) により新種として記載され、その存在が知られるようになった。

カワシンジュガイ属2種の種同定の鍵となる形質には、最大殻長、殻の外形、殻の内側にある前閉殻筋痕の形がある（Kondo & Kobayashi 2005）。種同定はこれらの複数の形質に基づいて行われるが、本2種の外形は類似することから、外形からの種同定が難しい。前閉殻筋痕の形は、コガタカワシンジュガイでは尖った耳状、カワシンジュガイでは丸い耳状であり、2種の違いが比較的確認しやすいが、河川によって変異が大きく、種同定が困難な場合がある（栗倉ほか 2009）。また、前閉殻筋痕の形を確認するには生体を殺す必要がある。コガタカワシンジュガイおよびカワシンジュガイは絶滅危惧種であるため、種同定の際にはできる限り生体にダメージを与えないことが望ましい。

こうした種同定の問題を克服する手段として、遺伝的手法による種同定が挙げられる（e.g., Campbell et al. 2008）。Kurihara (2005) により、ミトコンドリア DNA の PCR 増幅断片長の違いにより、国内のカワシンジュガイ2種を判別する

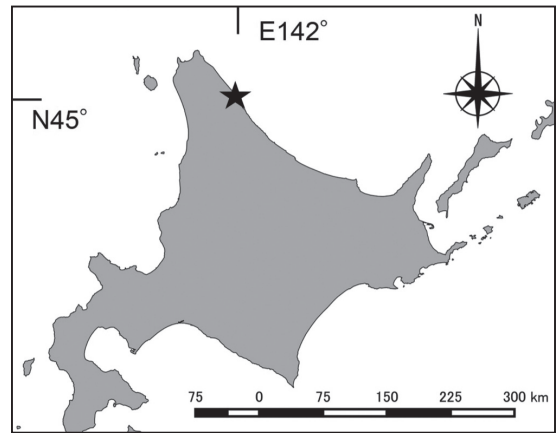


図1. 研究対象地である北海道枝幸町の地理的な位置 (★)

手法が開発された。本手法を用いることで、生体を殺すことなく、かつ、個体へのダメージを最小限に抑えながら正確な種同定が可能となり、精度の高いカワシンジュガイ属2種の分布情報の把握を行うことができると考えられる。

北海道枝幸町（44° 93'N, 142° 18'E, 図1）では、これまでにコガタカワシンジュガイの生息が1ないし2箇所を確認されている（秋山ほか 2014）。秋山ほか（2014）によると、枝幸町内のB川では、コガタカワシンジュガイの典型的な形態を持った個体が多数確認され、本種の新しい生息地として報告されている。また、町内の人工池（以後、人工池）に生息する個体については、外部形態から本種の可能性が高い個体を採捕したものの、この池における生息数が少なかったため、種同定のために内部形態を確認することはせずに、同地点に再放流したことが記述されている。

これまで、枝幸町を含む北海道宗谷地域におけるコガタカワシンジュガイの生息情報は少なく、正確な種同定を行った情報は本地域における本種の生息分布を知る上できわめて重要である。そこで本研究では、本種の分布情報を特に3地点（B川、人工池、および最近新たにカワシンジュガイ属の生息が確認されたA川）において、1）これまで外部形態に基づいて報告されている本種の分布情報を裏付けること、2）新しい生息地を特定することを目的とした。これらの目的を達成するために、各調査地における採集および、採取した

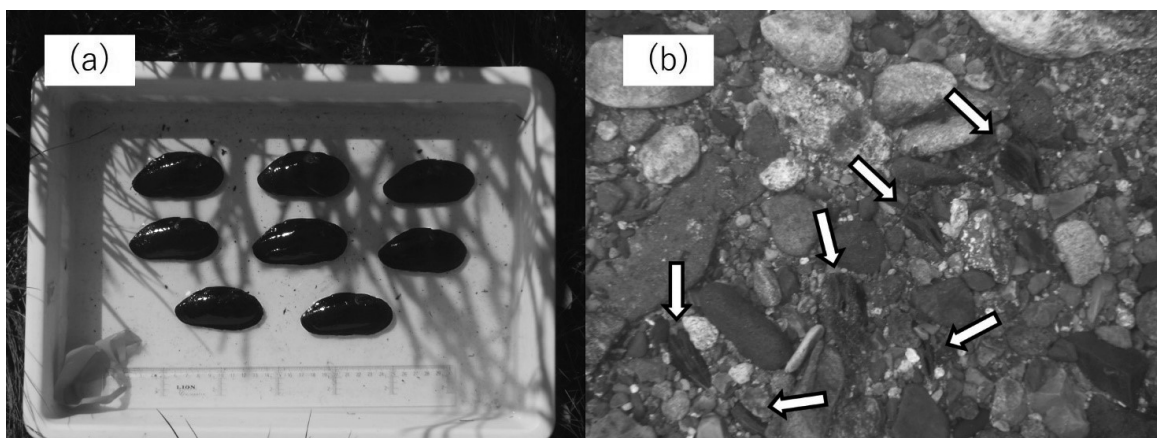


図 2. 採集されたカワシンジュガイ属 (a) と調査河川の川底の様子 (b). 白い矢印は、底質中に潜航しているカワシンジュガイ属を指している

サンプルの遺伝学的な手法に基づくカワシンジュガイ属 2 種の種同定を行った。

### 調査地および調査方法

調査は 2017 年 6 月 6 ~ 7 日に枝幸町内の 2 つの河川 (A 川・B 川) および人工池で行った。詳細な調査地点の情報やその様子は希少種保全の観点から明記しないこととする。B 川は、秋山ほか (2014) でコガタカワシンジュガイが確認された河川 B に該当する。A 川は、B 川と異なる水系に位置し、川幅およそ 10 m、優占する底質の粒径は 16 ~ 128 mm であった。本河川は、筆者の一人である白井がカワシンジュガイ属の生息を予め確認していた河川であるが、生息する個体の中にコガタカワシンジュガイが含まれているかは不明であった。B 川は、川幅がおよそ 2 ~ 3m と A 川に比べて小さく、優占する底質の粒径が 2 ~ 32 mm であった。人工池は、秋山ほか (2014) が調査した人工池と同じ池であり、カワシンジュガイ属が確認されている。本池は、平均水深 1 m、面積がおよそ 50 m<sup>2</sup> で池の岸部は両池とも石垣で護岸されていた。池の水は、上流にある幅 20 cm、水深 2 ~ 3 cm の水路から供給されており、1 年中枯れることがない (白井私信)。池底には粒径 5-50 mm 程度の礫が敷かれており、礫の上に 10-30 mm 程のシルト (粒径 < 0.063 mm) が堆積している状態だった。

各調査地点において、調査者 2 名が箱メガネ

を用い、目視で河床を観察することで二枚貝を探索した。見つけた個体は素手またはタモ網で採集し、18 ~ 36 個体の殻を開殻器でわずかに開け、外套膜小片を切り出し、99.5%エタノールに保存し研究室に持ち帰った。なお、外套膜小片を切り取る方法は、個体へのダメージが少ない方法として、希少淡水二枚貝の遺伝学的な研究に広く用いられている (e.g., Inoue et al. 2014)。外套膜の採取を終えた後、すべての個体を速やかに元の河川区間、池に放流した。研究室に持ち帰った外套膜片は分析まで冷凍庫にて保存した。

### PCR 増幅長の違いを利用した種判別

2 種の同定は、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域における PCR 増幅断片長に基づいて行った (Kurihara 2005)。ゲノム DNA は、Genra Puregene Tissue Kit (Qiagen 社製) を用いて抽出し、エタノール沈殿によって精製した。精製された DNA を 70  $\mu$ L の Milli-Q 水で溶出した。試薬の節約および実験の効率化のため、試薬量を標準プロトコルの 3 分の 1 に減らし、8 連チューブを用いて実験を行った。

PCR プライマーには、2 種に共通したプライマーである 16sar-L-myt (5'-CGACTGTTTAACAAAAACAT-3') と 16sbr-H-myt (5'-CCGTTCTGAACTCAGCTCATGT-3') (Lydeard et al. 1996) に加え、種特異的プライマーである MRA16s01 (5'-TGAATGGCAACACGGAAGAT-3')

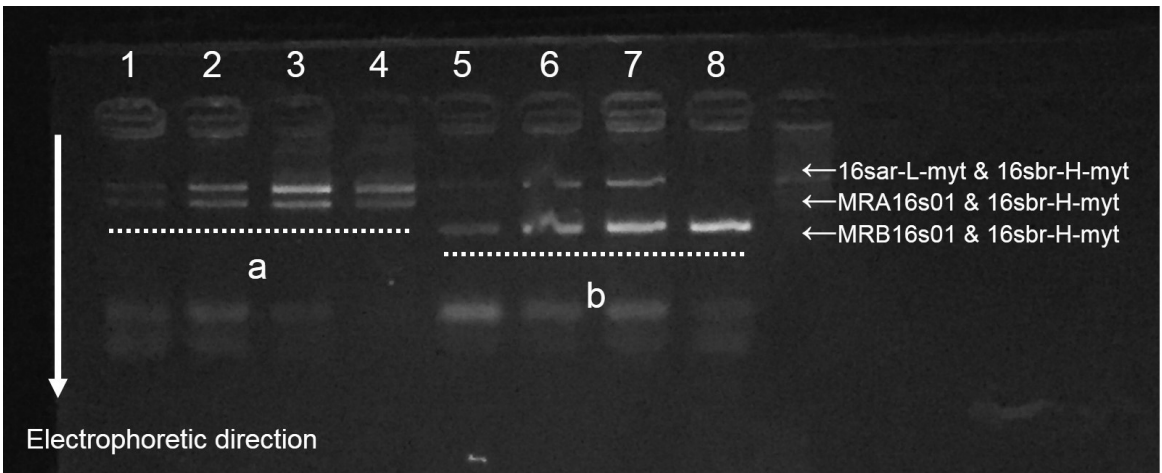


図3. カワシングガイ (a) およびコガタカワシングガイ (b) におけるミトコンドリア DNA の 16SrRNA 領域における PCR 増幅長の違いを観察した電気泳動バンドパターンの例. 各バンドは右記のプライマーと対応し、矢印は DNA が流れる方向を示している

と MRB16s01 (5'-GGGGCAACCCTGGAACCGTT-3') (Kurihara 2005) の計 4 つのプライマーを同時に用いた. 両種ともに 16sar-L-myt と 16sbr-H-myt による増幅産物が 550bp 付近に得られるため, PCR 反応の成否が確かめられる. さらに, カワシングガイでは 350bp 付近に MRA16s01 と 16sbr-H-myt による増幅産物が得られる一方, コガタカワシングガイでは 300bp 未満の増幅産物が MRB16s01 と 16sbr-H-myt から得られる. これにより, 電気泳動で観察されるバンドパターンによって両種を識別できる (Kurihara 2005).

PCR 反応は, 3  $\mu$ L の Go Taq Colorless Master Mix (Promega 社製), 0.9  $\mu$ L の 16sbr-H-myt プライマー (5 pmol/ $\mu$ L) および 0.3  $\mu$ L の他の各プライマー (5 pmol/ $\mu$ L), 0.2  $\mu$ L の Milli-Q 水, 1  $\mu$ L の DNA テンプレートの合計 6  $\mu$ L で行った. 反応条件は Kurihara (2005) および使用酵素の標準プロトコルを参考にし, 95 $^{\circ}$ C で 2 分間の初期変性の後, 95 $^{\circ}$ C で 45 秒間の熱変性, 55 $^{\circ}$ C で 1 分間のプライマーとの結合, 72 $^{\circ}$ C で 30 秒間の DNA 伸長反応を 25 回繰り返し, 72 $^{\circ}$ C で 5 分間の最終伸長反応を行った. 得られた PCR 産物を Midori Green DNA Stain (日本ジェネティクス社製) により染色し, TAE 緩衝液で作成した 1.5% のアガロースゲルで電気泳動し, バンドパターンを観察した (図 3).

### 結果

計 146 個体 (A 川: 63 個体, B 川: 65 個体, 人工池: 18 個体) のカワシングガイ属を採集した. そのうち, 計 78 個体 (A 川: 24 個体, B 川: 36 個体, 人工池: 18 個体) から DNA 分析用に組織片を採集し, 分析に用いた. 3 地点全てで, コガタカワシングガイと同定される個体が確認された (表 1). B 川と人工池では, DNA 分析をした全個体がコガタカワシングガイと同定された. 一方, A 川でもコガタカワシングガイと同定された個体が確認されたが, その個体の割合は, DNA 分析した全個体数の 13% (21 個体中 3 個体) であり, カワシングガイと同定された個体と比べて低かった.

### 考察

本調査により, DNA 分析による種同定を行うことで, これまで明らかにされていなかったコガタカワシングガイの生息地を枝幸町内で新しく確認できた. それに加え, 過去に発見された本種の生息を改めて裏付けると共に, 過去に外部形態による種同定が困難だった生息地において本種を確認することができた. これまで, コガタカワシングガイの生息地は, 主に道東地域を中心に報告がされてきた (Kurihara 2005; Kondo 2008; 秋山・白井 2014). 道北地域の特にオホーツク

表 1. 枝幸町内の各地点におけるカワシンジュガイ属 2 種の採集・分析個体数およびコガタカワシンジュガイの割合「コガタ」はコガタカワシンジュガイ、「カワ」はカワシンジュガイを示す。

調査場所	採集個体数	分析個体数	コガタ	カワ	コガタの割合
A 川	63	24	3	21	13%
B 川	65	36	36	0	100%
人工池	18	18	18	0	100%

海沿岸の地域における本種の記録は極めて少なく、生息状況については不明な点が多い。このため、本結果は、コガタカワシンジュガイの地理的な分布や本地域における本種の生息状況を知る上で極めて重要だと考えられる。

DNA 分析による種同定の結果では、B 川より採集し分析した個体の全てがコガタカワシンジュガイと同定され、秋山ほか (2014) と結果が一致していた。本河川に生息するコガタカワシンジュガイは、典型的な形態の特徴を持っていたことから、秋山ほか (2014) は外部形態による精度の高い種同定が可能だったと考えられる。一方、人工池に生息していたコガタカワシンジュガイは、カワシンジュガイと中間的な形態を持っていたことから、外部形態からの種同定が困難であったと報告されている (秋山ほか 2014)。本調査では、DNA 分析による種同定を行うことで、本池に生息する数少ない個体を殺すことなく、ダメージも最小限に抑えながら、コガタカワシンジュガイを検出することができた。

カワシンジュガイ属を含む、イシガイ目二枚貝は、その幼生期に他の魚類に寄生する特殊な生態を持つ (Strayer 2008)。中でも、カワシンジュガイ属二枚貝は主にサケ科魚類を宿主とすることが知られ、国内に生息する本属についても、コガタカワシンジュガイはアメマス *Salvelinus leucomaenis leucomaenis* (Pallas, 1814) を、カワシンジュガイは、サクラマス *Oncorhynchus masou masou* (Brevoort, 1856) (西日本ではサツキマス *Oncorhynchus masou ishikawae* Jordan & McGregor, 1925) を、それぞれ宿主として利用することが知られて

いる (Kondo & Kobayashi 2008)。したがって、その分布は寄生相手となる宿主魚の存在によって規定され得る (Vaughn & Taylor 2000)。今回、分析を行った個体のうち、A 川はコガタカワシンジュガイの割合が 13% と低くカワシンジュガイが優占していた。その一方、B 川はコガタカワシンジュガイの割合が 100% と本種のみが生息、あるいは本種が優占する河川であった。両河川に生息する魚類についても、A 川ではサクラマスが多くアメマスが少ない一方で、B 川ではサクラマスがほとんど見られず、アメマスの生息が多く確認されている (白井私信)。魚類の定量調査は行っていないためさらなる検証は必要であるものの、上記の情報を整理すると、アメマスがより優占する河川で見つかったカワシンジュガイ属には、コガタカワシンジュガイが含まれている可能性が高いと予想できる。この点は、今後もコガタカワシンジュガイの新しい生息地の見当をつける上で、有用な指標の一つとなり得るだろう。

コガタカワシンジュガイは通常、底質が礫～砂である流水環境で生息することが知られる (Kondo 2008)。しかし、本調査でコガタカワシンジュガイが見つかった人工池は、池底にシルトが堆積する止水環境であり、底質や流速といった物理環境の特性は一般的な本種の生息環境と大きく異なっていた。また、上流部には本種が定着できるような規模の流路は存在せず、池内の個体が上流部から流されてきたものとは考えにくい。このため、池内にコガタカワシンジュガイが生息する理由として①流出する水路の下流部から、寄生されたアメマスが侵入することで生息している、

あるいは②人為的に成貝が池に投げ込まれたこと  
によって個体が残存しているという2つの可能性が考えられる。もし前者であれば、池内とその下流部が枝幸町における本種の重要な生息地の一つとして考えられる。一方、もし後者であれば、本池は本種の本来の生息地ではないと考えられる。今後、本池に生息するコガタカワシンジュガイの侵入経路や下流部における本種の生息状況を把握することで、本池のコガタカワシンジュガイが他の2つの河川同様、本種の重要な生息地であるかどうかを判断できると考えられる。

### 謝辞

本報告をまとめるにあたり、北海道大学大学院地球環境科学研究院小泉逸郎准教授には、室内実験を行うための設備を提供していただいた。また同大学大学院環境科学院、泉北斗氏、安居院愛子氏には室内実験にご協力いただいた。本研究の一部は、環境省「環境研究総合推進費」(課題番号S15)による支援を受けて行った。ここに心よりお礼を申し上げる。

### 引用文献

- 秋山吉寛・白井平. 2014. 斜里川流域で採集したコガタカワシンジュガイ. 知床博物館研究報告 36: 5-8.
- 秋山吉寛・白井平・町田善康・村山裕. 2014. 枝幸町におけるカワシンジュガイ科貝類の分布状況. 枝幸研究 5: 37-41.
- Akiyama Y. B., Kimura R., Nomoto K., Usui T., & Machida Y. 2013. New record of the freshwater pearl mussel *Margaritifera togakushiensis* from northern Sakhalin, the Russian Far East. *Venus*, 71: 191-198.
- 粟倉輝彦・佐々木優一・秋山吉寛. 2009. 淡水貝類研究会第14回研究集会報告—(6) 釧路川水系のカワシンジュガイとコガタカワシンジュガイ. ちりぼたん 39: 132.
- Campbell D. C., Johnson P. D., Williams J. D., Rindsberg A. K., Serb J. M., Small K. K., & Lydeard C. 2008. Identification of 'extinct' freshwater mussel species using DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 8: 711-724.

- Inoue K., McQueen A. L., Harris J. L., & Berg D. J. 2014. Molecular phylogenetics and morphological variation reveal recent speciation in freshwater mussels of the genera *Arcidens* and *Arkansia* (Bivalvia: Unionidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 112: 535-545.
- 環境省. 2014. レッドデータブック 2014—日本の絶滅のおそれのある野生生物—6 貝類. p. 360, 株式会社ぎょうせい, 東京.
- Kondo T. 2008. Monograph of Unionoida in Japan (Mollusca: Bivalvia). *Malacological Society of Japan*, 3: 23-25.
- Kondo T. & Kobayashi O. 2005. Revision of the genus *Margaritifera* (Bivalvia: Margaritiferidae) of Japan, with description of a new species. *Venus*, 64: 135-140.
- Kurihara Y. 2005. Genetic, Morphological and ecological divergence in the freshwater pearl mussel, *Margaritifera laevis* (Bivalvia: Margaritiferidae), with reference to the extinction of two distinct species. Hokkaido university, master's thesis.
- Lydeard C., Mulvey M., & Davis G. M. 1996. Molecular systematics and evolution of reproductive traits of North American freshwater unionacean mussels (Mollusca: Bivalvia) as inferred from 16S rRNA gene sequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 351: 1593-1603.
- Strayer D. L. 2008. *Freshwater Mussel Ecology: A Multifactor Approach to Distribution and Abundance*. University of California Press, Berkeley.
- Vaughn C. C. & Taylor C. M. 2000. Macroecology of a host-parasite relationship. *Ecography*, 23: 11-20.

### 要約

北海道枝幸町において、絶滅危惧淡水二枚貝コガタカワシンジュガイ *Margaritifera togakushiensis* Kondo & Kobayashi, 2005 の生息地をより詳しく明らかにすることを目的に、町内の3つの生息地(河川2つおよび人工池)でカワシンジュガイ属を採集し、遺伝学的な手法による種同定を行った。結果、全ての調査地からコガタカワシンジュガイが確認された。本調査地域周辺でのコガタカワシンジュガイの既存の分布情報は極めて少なく、本

研究は北海道における本種の分布を把握する上で重要な知見となり得る。しかし、人工池に生息する個体についてはその起源が不明なことから、この個体群が本来この周辺に生息していたものかどうか、今後精査が必要である。