カワヒバリガイの遺伝子が語るもの— 遺伝子解析技術を用いたカワヒバリガイ浮遊期幼生の検出・定量

遠藤紀之・野方靖行・松木吏弓

財団法人 電力中央研究所 環境科学研究所 〒270-1194 千葉県我孫子市我孫子1646

Molecular based quantitative detection method of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei*

Noriyuki Endo, Yasuyuki Nogata, Rikyu Matsuki

Environmental Science Research Laboratory, Central Research Institute of Electric Power Industry, 1646 Abiko, Abiko, Chiba 270-1194, Japan

Tel: +81-4-7182-1181 Fax: +81-4-7182-7922

(Accepted February 5, 2010)

Abstract

The golden mussel *Limnoperna fortunei* is an invasive freshwater bivalve species. Recently, gregarious settlement of these mussels in the dam and aqueducts of hydroelectric power stations in Japan has been the cause of various problems. We developed a molecular based method for the quantitative detection of larvae of *L. fortunei* using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). Designed primers were able to specifically detect larvae of *L. fortunei* in freshwater planktonic samples. Real-time PCR was performed using fluorescent dye (SYBR[®] Green) detection. Threshold cycles correlated well with the number of larvae in logarithmic values, and the R-square value of the standard curve was 0.99. This molecular based method can be utilized not only for the identification of *L. fortunei* in a particular habitat, but also for the quantification of larvae of this species in natural environments.

Key words: golden mussel, larvae, *Limnoperna fortunei*, quantitative detection, real-time polymerase chain reaction

はじめに

カワヒバリガイ *Limnoperna fortunei* (Dunker) は中国および朝鮮半島が原産とされる淡水性二枚貝であり、水中の基質上に付着・群居する性質をもつ (Morton, 1973)。本種はアジア各国と南米に分布を拡大しており、各地で生態的、経済的被害をもたらしている (Darrigran *et al.*, 1998; Ricciardi, 1998; Penchaszadeh *et al.*, 2000; Magara *et al.*, 2001; Boltovskoy *et al.*, 2006; Pie *et al.*, 2006)。日本においては1990年に揖斐川で初めて存在が報告されて以来、現在までに琵琶湖、木曽川、矢作川、淀川、利根川の各水系での生息が確認されてい

る (中井, 2001; 伊藤, 2008)。ただし、最低水位以深の壁面や岩等に付着している個体や、比較的大規模な水域に低密度で生息している場合にこれらを発見することは容易ではなく、また確認されながらも公表されていない事例もあると推測されることから、実際の分布はさらに広範囲に及ぶものと考えられる (小林ら, 2009)。カワヒバリガイは地域の自然環境に大きな影響を与え、生物多様性を脅かす可能性から、侵略的外来種として2006年に特定外来生物に指定されている。本種は寄生性腹口吸虫の第一中間宿主であり、コイ科魚類への重篤感染による被害の一因とされている他 (浦部ら, 2001)、ダム

や導水路での大量斃死による急激な水質悪化、導水管内部への大量付着による水量の低下や閉塞など、様々な被害を引き起こしている（小島、1982；中西・向井、1997；向井ら、1997；澤野井、1998、後藤・北山、1999）。これらカワヒバリガイの付着に対して行われている主な対策は、付着した成貝をブラシやスクレーパーを用いて掻き落とす除貝であるが（濱田、2008）、繊維状の足糸により強固に固着した成体を完全に除去することは困難である。また、塩素等の薬剤処理（Morton *et al.*, 1976；小島、1982；中西・向井、1997；Cataldo *et al.*, 2003；Darrigran *et al.*, 2007）、乾燥による除去（小島、1982；中西・向井、1997）等の試みがなされているが、決定策とはなっていない。

これまでの研究により、カワヒバリガイは淡水性二枚貝の中でも水質の変化や汚染に対して高い抵抗を有し、また餌種への適応性も高いことが示されている（Ricciardi, 1998；Sylvester *et al.*, 2005；Karatayev, 2007）。カワヒバリガイ以外の侵略的淡水性二枚貝として、北米、カナダおよびヨーロッパ諸国等に広く侵入したカワホトトギスガイ *Dreissena polymorpha* (Pallas) が良く知られているが、カワヒバリガイの環境耐性はカワホトトギスガイよりも優れているとの報告もなされており、今後の分布拡大および被害の増大が懸念されている（Karatayev *et al.*, 2007）。カワヒバリガイは受精後、浮遊期幼生を経て2～3週間程度で付着期幼生へと成長し、付着生活を送る（Cataldo *et al.*, 2005）。本種の拡散を推測するにあたり、浮遊期幼生の発生動態に関する知見は極めて重要であるが、報告例は少なく、不明な点が多いのが現状である。本稿では、近年微生物の定量的検出法としての利用が盛んである遺伝子解析技術を用いたカワヒバリガイ浮遊期幼生の検出と定量技術を中心に紹介する。

カワヒバリガイ浮遊期幼生の同定検出

現在、カワヒバリガイの浮遊期幼生の検出は、主にプランクトンサンプルを顕微鏡下で観察することで行われている。しかしながらカワヒバリガイ幼生は比較的小型であり（Santos *et al.*, 2005）、多種のプランクトンが混在したサンプル中からの検出には時間と労力を要している。さらに、プランクトンサンプルの顕微鏡観察による形態法での種同定には、熟練した技術を必要とする。したがって、カワヒバリガイ幼生の迅速簡便な検出・定量技術の開発が望まれている。

イガイ類の浮遊期幼生を効率的に検出する方法の一つとして、抗原抗体反応を用いた免疫学的検出法が検討されている。Abalde *et al.* (2003) はムラサキイガイ *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck) のD型幼生に対するモノクローナル抗体を作成し、これを用いた免疫蛍光測定法によりプランクトンサンプル中のムラサキイガイ幼生を特異的に検出可能であることを示した。免疫学的検出法は簡便であり、比較的安価に行える等の利点がある。一方で、モノクローナル抗体の作成は容易ではなく、また抗原のエピトープ（抗体認識部位）によっては、例えば幼生の発育段階の違いにより反応性が異なる等の欠点が指摘される。

免疫学的手法以外の検出法としては、遺伝子解析技術を用いた手法が挙げられる。Boeger *et al.* (2007) はカワヒバリガイに特異的なプライマーを設計し、これを用いたPCRによるカワヒバリガイ成体由来DNAの増幅を試み、D型幼生1～5個体から抽出した量に相当するDNAの検出に成功している。PCRを用いた検出法は、使用する装置が比較的安価であることや、高精度の同定が可能であること、また、適量の鋳型DNAが得られさえすれば、対象生物の成長段階に左右されることなく検出が可能である等の利点がある。さらに近年では、リアルタイムPCRを用いた検出技術の検討が進められている。一般的

図1. カワヒバリガイ特異的プライマーを用いたPCR産物のアガロース電気泳動結果（Endo *et al.*, 2009を改変）。M, 50-2500 bp DNA marker; 1, カワヒバリガイ; 2, コウロエンカワヒバリガイ; 3, ムラサキイガイ; 4, キタノムラサキイガイ; 5, ミドリイガイ; 6, ホトトギスガイ; 7, タイワンシジミ; 8, ヤマトシジミ; 9, プランクトンサンプル+カワヒバリガイD型幼生50個体; 10, カワヒバリガイ幼生が含まれていないプランクトンサンプル。

図2. カワヒバリガイ特異的プライマーを用いたリアルタイムPCRによる幼生1~50個体の定量的解析により作成した検量線。

に、通常のPCRによる検出は、PCRを行った後にその増幅産物（DNA断片）をアガロースゲル電気泳動に供し解析するという手順で行われている。一方、リアルタイムPCRは、PCRによるDNA断片の増幅の際に蛍光標識された分子を結合させる等の方法により、その増幅を経時的に測定することでサンプル中に存在する鋳型DNAを検出・定量する手法である。リアルタイムPCRではアガロースゲル電気泳動が不要であるため、通常のPCRによる検出と比較し短時間での解析が可能である。さらに、通常のPCRを用いた検出法では定量的な分析を行うことは困難であるが、リアルタイムPCRでは定量的分析が可能であり、検出と定量を同時に行うことができる。リアルタイムPCRを用いた浮遊期幼生の検出・定量については、こ

れまでにカムチャッカアワビ *Halotis kamtschatkana* (Jonas) (Vadopalas *et al.*, 2006) および各種フジツボ類 (松村ら, 2007; 野方, 2009; 遠藤・野方, 2009) 等への適用が報告されており、今後も検討が進められていくものと推測される。

遺伝子解析技術を用いたカワヒバリガイ浮遊期幼生の検出・定量

カワヒバリガイに特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCRを行うことで、プランクトンサンプルの顕微鏡観察を行うことなく浮遊期幼生の検出および定量的分析が可能になる。本手法は、特に多数のサンプルを処理する場合において極めて効果的であると考えられる。そこで我々は、カワヒバリガイ浮遊期幼生の検出・定量へのリアルタイムPCRの適用について検討を行った (Endo *et al.*, 2009)。以下に概要を紹介する。カワヒバリガイに特異的なプライマーは、表1に示す各種二枚貝類のミトコンドリアDNA上cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) 遺伝子領域の塩基配列を基に設計した (Limf-F: 5'-TCTCTTCATTTAGCTGGTGCCTC-3', Limf-R: 5'-CAAAACAGATGTAAGTCAAGAGAC-3')。各種二枚貝類、大塩湖（群馬県）より採取したカワヒバリガイ幼生が含まれていないプランクトンサンプルおよび同プランクトンサンプルにカワヒバリガイD型幼生を加えたものから抽出したDNAを鋳型とし、上記プライマーを用いたPCR産物のアガロースゲル電気泳動結果を図1に示した。カワヒバリガイ成体由来のDNA（図1の1）と、カワヒバリガイD型幼生を加えたプランクトンサンプルから抽出したDNAを鋳型とした場合（図1の9）においてのみ明確なシングルバンドが認められることから、Limf-FおよびLimf-Rはカワヒバリガイに特異的であることが示された。

表1. CO1遺伝子領域の塩基配列解析を行った二枚貝類 (Endo *et al.*, 2009を改変)

種	EMBL/Genbank/DDBJ accession number	採集地
カワヒバリガイ <i>Limnoperna fortunei</i> (Dunker)	AB498011	大塩湖（群馬県）
コウロエンカワヒバリガイ <i>Xenostrobus securis</i> (Lamarck)	AB498012	浜名湖（静岡県）
ヨーロッパイガイ <i>Mytilus edulis</i> (Linnaeus)	NC006161	-*
ムラサキイガイ <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck)	AB498013	台場（東京都）
キタノムラサキイガイ <i>Mytilus trossulus</i> (Gould)	AB498014	南茅部（北海道）
ミドリイガイ <i>Perna viridis</i> (Linnaeus)	AB498015	台場（東京都）
ホンビバリガイ <i>Modiolus modiolus</i> (Linnaeus)	DQ264392	-*
ホトトギスガイ <i>Musculista senhousia</i> (Benson)	AB498016	台場（東京都）
タイワンシジミ <i>Corbicula fluminea</i> (Müller)	AB498017	大塩湖（群馬県）
ヤマトシジミ <i>Corbicula japonica</i> (Prime)	AB498018	浜名湖（静岡県）
マガキ <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg)	AF177226	-*
イワガキ <i>Crassostrea nippona</i> (Seki)	AF300616	-*

* EMBL/Genbank/DDBJ国際塩基配列データベースに登録されている塩基配列を使用した

リアルタイムPCRにおける検出法には、SYBR[®]Greenを用いたインターカレーション法を用いた。インターカレーション法は、二本鎖DNAに結合する蛍光物質を利用したものであり、比較的安価で簡便に行うことができる手法である。カワヒバリガイD型幼生1~50個体から抽出したDNAを、Limf-FおよびLimf-Rを用いたリアルタイムPCRによる定量的解析に供し作成した検量線を図2に示した。検量線における相関係数は0.99以上であり、本手法が高精度でカワヒバリガイD型幼生を定量することが可能であることを示している。

リアルタイムPCRを用いた定量は、解析で得られたDNA量を幼生数に換算することで行われる。幼生1個体に含まれるDNA量は細胞数、すなわち幼生の発生段階に影響される。カワヒバリガイ幼生の殻長は、発生段階により3~4倍程度異なることが報告されており (Santos *et al.*, 2005)、1個体に含まれるDNA量も異なると考えられる。本手法を用いて幼生の正確な定量を行うにあたっては、プランクトンサンプルのメッシュ処理等により幼生の発育段階(サイズ)を揃える等の検討が必要である。また、実用的な定量技術とするにあたっては、解析に用いるDNAの簡便迅速な調製法の開発も重要な検討項目となる。近年では多種のDNA抽出キットが市販されており、簡便にDNAの調整を行うことが可能となった。しかしながら、これらのキットを使用したとしても、プランクトンサンプルの質によっては、解析に適したDNAの調整が困難である場合も多い。これについては、DNA調整に最適なサンプルの採集法等も含め、現在検討を行っている最中である。

おわりに

リアルタイムPCRを用いた検出・定量法では、熟練した技術が必要とすることなく、高精度の解析を行うことができる。また、目的とする生物種に特異的なプライマーを設計することができれば、様々な種の浮遊期幼生の検出・定量への応用も容易である。本稿で紹介した手法は、原理的には卵の検出も可能であり、本種の生態に関する新たな知見の取得が可能かもしれない。また、通常の調査では発見が困難である湖底等のみ生息しているカワヒバリガイを、幼生の存在から検出する等の分布域調査への応用も期待される。

本稿は、2009年度日本付着生物学会 カワヒバリガイの侵入と対策に関するミニシンポジウムにおける講演内容の一部をまとめたものである。講演では、カワヒバリガイの移入と分散経路推定を目的とした侵入河川の個体群の系統解析についても報告したが、本稿では遺伝子解析技術を用いた同定と定量技術に内容を絞って紹介した。

謝 辞

本稿を執筆する機会をくださった日本付着生物学会に深く感謝の意を表す。本研究の遂行に大きく貢献していただいた(株)セレス 佐藤加奈氏に深く感謝の意を表す。本稿を執筆するにあたりご指導・ご助言を賜った(財)電力中央研究所 小林卓也博士、古田岳志博士、

中野大助博士に深謝する。

引用文献

- Abalde, S. L., J. Fuentes, Á. González-Fernández (2003). Identification of *Mytilus galloprovincialis* larvae from the Galician rías by mouse monoclonal antibodies. *Aquaculture*, 219, 545-559.
- Boeger, W. A., M. R. Pie, R. M. Falleiros, A. Ostrensky, G. Darrigran, M. C. D. Mansur, C. E. Belz (2007). Testing a molecular protocol to monitor the presence of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in plankton samples. *J. Plankton Res.* 29, 1015-1019.
- Boltovskoy, D., N. Correa, D. Cataldo, F. Sylvester (2006). Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata watershed and beyond. *Biol. Invasions*, 8, 947-963.
- Cataldo, D., D. Boltovskoy, M. Pose (2003). Toxicity of chlorine and three nonoxidizing molluscicides to the pest mussel *Limnoperna fortunei*. *J. - Am. Water Works Assoc.*, 95, 66-78.
- Cataldo, D., D. Boltovskoy, J. L. Hermosa, C. Canzi (2005). Temperature-dependent rates of larval development in *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae). *J. Mollus. Studies*, 71, 41-46.
- Darrigran, G., S. M. Martin, B. Gullo, L. Armendariz (1998). Macroinvertebrates associated with *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) in Río de la Plata, Argentina. *Hydrobiologia* 367, 223-230.
- Darrigran, G. A., D. C. Colautti, M. E. Maroñas (2007). A potential biocide for control of the golden mussel, *Limnoperna fortunei*. *Journal of Freshwater Ecology*, 22, 359-360.
- 遠藤紀之・野方靖行 (2009). 10種の汚損性フジツボ類幼生のリアルタイムPCRによる定量的検出. 電力中央研究所報告 V08012.
- Endo, N., K. Sato, Y. Nogata (2009). Molecular based method for the detection and quantification of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* using real-time PCR. *Plankton Benthos Res.*, 4, 125-128.
- 後藤良教・北山 稔 (1999). 水道施設におけるカワヒバリガイの動向 (II). 第50回全国水道研究発表会要旨集, 506-507.
- 濱田 稔 (2008). 矢作川水系に侵入したカワヒバリガイの生態. 中部電力技術開発ニュース, 130, 21-22.
- 伊藤健二 (2008). 利根川水系におけるカワヒバリガイ *Limnoperna fortunei* の分布状況. 日本ベントス学会誌, 63, 30-34.
- Karatayev, A. Y., D. Boltovskoy, D. K. Padilla, L. E. Burlakova (2007). The invasive bivalves *Dreissena polymorpha* and *Limnoperna fortunei*: parallels, contrasts, potential spread and invasion impacts. *J. Shellfish Res.*, 26, 205-213.
- 小林卓也・中野大助・坂口 勇 (2009). 飼育実験によるカワヒバリガイの生存可能水温の解明. 電力中央研究所報告 V08042.
- 小島貞男 (1982). 淡水イガイ (*Limnoperna fortunei*) による障害とその対策. 日本水処理生物学会誌, 18, 29-33.
- Magara, Y., Y. Matsui, Y. Goto, A. Yuasa (2001). Invasion of the non-indigenous nuisance mussel, *Limnoperna fortunei*, into water supply facilities in Japan. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 50, 113-124.
- 松村清隆・野方靖行・坂口 勇 (2007). リアルタイムPCRによる汚損性フジツボ幼生の定量的検出. 電力中央研究所報告 V06020.
- Morton, B. (1973). Some aspects of the biology and functional

- morphology of the organs of feeding and digestion of *Limnoperna fortunei* (Dunker) (Bivalvia: Mytilacea). *Malacologia*, 12, 265-281.
- Morton, B. S., C. S. Au, W. W. Lam (1976). Control of *Limnoperna fortunei*. *J. Inst. Water Eng. Sci.*, 30, 147-156.
- 向井聖二・清水 茂・中西正治・福井育男・築山俊彦 (1997). カワヒバリガイ障害事例. 第48回全国水道研究発表会要旨集, 544-545.
- 中井克樹 (2001). カワヒバリガイの日本への侵入. 「黒装束の侵入者－外来付着性二枚貝の最新学」(日本付着生物学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 71-85.
- 中西正治・向井聖二 (1997). 浄水施設におけるカワヒバリガイの駆除方法とその駆除事例. 用水と廃水, 39, 1017-1020.
- 野方靖行 (2009). 遺伝子情報を用いた汚損性フジツボ幼生の定量的検出方法の開発－サイクリンググローブによる簡易検出法の検討－. 電力中央研究所報告 V08010.
- Penchaszadeh, P. E., D. Darrigran, C. Angulo, A. Averbuj, M. Brögger, A. Dogliotti, N. Pérez (2000). Predation of the invasive freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) by the fish *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1846 (Anostomidae) in the Rio de la Plata, Argentina. *J. Shellfish Res.*, 19, 229-231.
- Pie, M. R., W. A. Boeger, L. Patella, R. M. Falleiros (2006). A fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples. *J. Molluscan Stud.*, 23, 218-219.
- Ricciardi, A. (1998). Global range expansion of the Asian mussel *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) : Another fouling threat to freshwater systems. *Biofouling*, 13, 97-106.
- Santos, C. P., N. L. Würdig, M. C. D. Mansur (2005). Larval stages of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker) (Bivalvia, Mytilidae) in Guaíba basin, Rio Grande do Sul State, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22, 702-708.
- 澤野井敦 (1998). 京都市の取水施設におけるカワヒバリガイの調査状況. 第49回全国水道研究発表会要旨集, 566-567.
- Sylvester, F., J. Dorado, D. Boltovskoy, Á. Juárez, D. Cataldo (2005). Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. *Hydrobiologia*, 534, 71-80.
- 浦部美佐子・小川和夫・中津川俊雄・今西裕一・近藤高貴・奥西智美・加地祐子・田中寛子 (2001). 宇治川で発見された腹口類(吸虫綱二生亜綱): その生活史と分布, 並びに淡水魚への被害について. 関西自然保護機構会誌, 23, 13-21.
- Vadopalas, B., J. V. Bouma, C. R. Jackels, C. S. Friedman (2006). Application of real-time PCR for simultaneous identification and quantification of larval abalone. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 334, 219-228.