

# 地域住民との保全活動を通じた イシガイ科淡水産二枚貝類の生理・生態調査

事業代表者 教育学部・教授・上田高嘉

構 成 員 農学部・教授・飯郷雅之, バイオサイエンス教育研究センター・教授・松田勝

## 1. 事業の目的・意義

栃木県には国の天然記念物に指定されているミヤコタナゴの生息地が複数存在する。環境省が生息地保護区を設定するなど保全の努力は行われているが、県内の生息数は減少の一途をたどり、ミヤコタナゴ生息環境の悪化が深刻な問題となっている。このような状況の下、我々は地域住民と一体となってミヤコタナゴ生息地の保全活動を行ってきた。ミヤコタナゴの保全というと魚自身に着目しがちであるが、二枚貝の安定的な生息も必要不可欠となる。しかしながら、イシガイ科二枚貝の生理・生態については、未だ不明な点が多いのが現状である。

そこで本研究では、稀少魚介類の生息環境の特徴および特に知見の少ない二枚貝の生理・生態を把握することを目的として、ミヤコタナゴとイシガイ科二枚貝が生息する栃木県下の農業用水路における生物相、イシガイ科二枚貝の生息数調査を地域住民と進めるとともに、次世代シーケンサーを活用して分子生物学的解析を試みた。

## 2. 研究方法又は事業内容

### (1) 羽田ミヤコタナゴ生息地保護区における取り組み

平成 27 年度羽田ミヤコタナゴ再導入検討協議会コアメンバーによる打合せを平成 27 年 9 月 25 日 (第 1 回) および平成 28 年 1 月 18 日 (第 2 回) に宇都宮大学教育学部を会場に行った (参画機関: 環境省関東地方環境事務所野生生物課, 栃木県, ながわ水遊園, 宇都宮大学, 環境クリエイト)。また、羽田ミヤコタナゴ再導入に向けた協議会を大田原市立羽田小学校において平成 27 年 10 月 2 日 (第 1 回) と平成 28 年 2 月 9 日 (第 2 回)

開催した (参画機関: 自治会, ミヤコタナゴ保存会, 羽田農地水羽田沼水利組合風致保存会長, 風致保存会, 前記コア会議メンバー)。これらの会議において、産官学+地域の連携によるミヤコタナゴ保全や放流に関する議論と検討が行われた。

### (2) 第 1 回ミヤコタナゴ研究会の開催

宇都宮大学が主幹となって、第 1 回ミヤコタナゴ研究会を平成 27 年 11 月 7-8 日に開催した。参加者は、博物館のミヤコタナゴ関係者 3 名、栃木県立高等学校教員 3 名、宇都宮大学教員 2 名、学生 1 名であった。日程は以下の通りである。

平成 27 年 11 月 7 日

10-12 時: 宇都宮大学で情報交換および今後の打ち合わせ。

昼食後に滝岡生息地に移動

15-16 時: 滝岡生息地の視察

17-18 時: 羽田生息地の視察

18-20 時: 那須塩原にて懇親会

平成 27 年 11 月 8 日

午前: 生息地を視察

### (3) 二枚貝のミトコンドリア DNA 塩基配列の次世代シーケンサーによる決定

栃木県内那珂川水系で平成 27 年 8 月 6 日に採集したマツカサガイ (1 個体) とシジミ (1 個体) ならびに茨城県霞ヶ浦水系で平成 27 年 11 月 3 日に採集したドブガイ (1 個体), イシガイ (1 個体), ヒレイケチョウガイ (1 個体) の筋肉または外套膜から DNA を抽出した。KAPA HyperPlus Library Preparation Kit を用いてゲノム DNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサー MiSeq により 301bp×2 のペアエンドシーケンスを行った。GenomicsWorkbench 8.5.1 を用いて、クオリティーチェックを行い、アダプター配列をトリミングし

た後、de novo アッセンブルを行った。アッセンブルされたコーティングをデータベース化し、既知の二枚貝ミトコンドリアの DNA 塩基配列を用いて BLAST 検索を行った。

#### (4) 高大連携事業の実施

日本学術振興会平成 27 年度ひらめき☆ときめきサイエンス「天然記念物ミヤコタナゴの生命を育む里地里山を旅しよう」を事業代表者が平成 27 年 9 月 19 日に開催した。

平成27年度  
ひらめき☆ときめきサイエンスによる大学の研究室へ～KAKENHI  
(研究成果の社会還元)普及事業  
実施報告書

HT27056 天然記念物ミヤコタナゴの生命を育む里地里山を旅しよう	
	開催日: 平成27年9月19日(土) 実施機関: 宇都宮大学 (実施場所) (教育学部峰キャンパス) 実施代表者: 上田 高嘉 (所属・職名) (教育学部・教授) 受講生: 高校生40名 関連URL: <a href="http://ks002.edu.utsunomiya-u.ac.jp/">http://ks002.edu.utsunomiya-u.ac.jp/</a>
<p>本プログラムは、私たちの一日の講座を通して、ミヤコタナゴの生命を育んできた里地里山について理解し、人間と自然の共存の在り方について共に考えることを目的とした。講義Ⅰではタナゴ類の生活史、遺伝様式等の生物学的特徴について学習し、ミヤコタナゴがどこから来て、今どこにいて、そしてどこへ行くとしているのかに考えた。講義Ⅱでは人工授精法の説明や染色体標本の作製方法について概説を行った。実験・実習では人工授精、染色体標本の作製や顕微鏡観察を通して受精現象、細胞分裂、染色体および DNA の構造等の理解を図った。野外実習では羽田ミヤコタナゴ生息地の見学を通してタナゴ類の生息環境、生態系について考えるときに地元保存会の方々と交流会を実施した。</p> <p>【当日のスケジュール】 9:00～ 受付(峰キャンパス集合) 9:30～ 開講式(挨拶、オリエンテーション、科研費の説明) 9:45～10:30 講義Ⅰ タナゴ類の生活史、遺伝様式等の生物学的特徴(講師:上田 高嘉) 10:45～11:00 講義Ⅱ 人工授精法の説明や染色体標本の作製方法(講師:上田 高嘉) 11:15～12:30 人工授精の体験、染色体標本の作製、顕微鏡観察 12:30～13:30 懇談を兼ねた昼食会 13:30～15:00 借り上げバスにより、ミヤコタナゴ生息地へ 15:00～16:00 羽田ミヤコタナゴ生息地、滝岡ミヤコタナゴ保護池の見学および地元保存会の方との交流 16:00～16:30 終了式(受講生によるアンケート記入、未来博士号の授与) 16:30～18:00 借り上げバスにより、峰キャンパスへ 18:00 解散</p> <p>&lt;実施の様子&gt;</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">    </div> <p>染色体標本の観察      羽田ミヤコタナゴ生息地保護区      保存会の方々の交流会(滝岡保護池)</p>	
<p>&lt;工夫した点&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・本学部を卒業した高校教員と事前に行合せを行い、受講生に合わせた実施プログラムの設定や開催日程などについて検討した。</li> <li>・受講生に分かりやすい講義資料を作成することで、タナゴ類の遺伝様式を含めた生物学的特徴や人工授精法、染色体標本の作製方法についての理解を促した。</li> <li>・大学内での実験だけでなく、ミヤコタナゴの生息地(羽田ミヤコタナゴ生息地保護区)を訪ね、地元保存会の方々と交流会を実施した。</li> </ul> <p>・事務局との協力体制 財務部長理課が委託費の管理を行い、学術研究部研究協力・産学連携課が支出報告書の確認、振替金への連絡調整と提出書類の確認・修正などを行った。</p> <p>・広報活動 実施者、広報委員が分担し、県内の高等学校を訪問し、本事業について PR を行った。栃木県ミヤコタナゴ保全研究会が発行している「ミヤコタナゴ研究会だより」に募集案内の掲載を行った。本学を卒業した高校教員に周知を依頼した。</p> <p>・安全配慮 実験を行う際の安全確保のため、必要に応じて白衣を着用させた。野外観察を実施するため、受講生および実施協力者を保険に加入させた。プログラムの終了が 18 時であったことから、参加希望者にはあらかじめ保護者の同意を得た。実験および野外観察では受講生の安全確保のため、大学院生が TA を行った。</p> <p>・今後の発展性、課題 今回の講座に対して受講生および見学者に高い関心と興味をもっていただいたことから、このような講座を今後も可能な限り開催することが求められているように感じた。講座の中で実験・実習を組み合わせることは当研究室が行っている研究を理解してもらうためにも大変意味のあるものとなったように思う。生徒および見学者の要望等を充分に考慮して1回の講座の連日開催等も視野に入れて検討していく必要があるだろう。参加者のアンケートにもあったように夏休みや冬休みなどの開催も検討し、学校行事などを考慮した上で日程を決めることが必要であると考える。</p> <p>【実施担当者】 特になし。</p> <p>【実施協力者】 _____ 2 名 【事務担当者】 宗玄 力也 学術研究部研究協力・産学連携課 研究協力係長</p>	

科学技術振興機構「中高生の科学研究実践活動推進プログラム」(栃木県立宇都宮北高等学校, 宇都宮高等学校)の実施に分担者が協力した。バイオサイエンス教育研究センターにおいて、平成 28 年 1 月 24 日に高校生 8 名とともに県内各地で採集されたシジミ(6カ所×各5個体=30個体)の筋肉もしくは外套膜から DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA 上の Cytb, COI および COII の部分塩基配列を増幅するプライマーを用いて PCR をかけた。平成 28 年 2 月 27 日に電気泳動を行って目的のバンドが増幅されていることを確認した後、DNA 産物を精製し、Sanger 法によるシーケンスを行った。

### 3. 事業の進捗状況

#### (1) 羽田ミヤコタナゴ生息地保護区における取り組み

協議会の話し合いの結果、地元メンバーによる取水塔の改修が行われた。これにより羽田生息地保護区の水質が改善されることが期待できる。平成 28 年春にはミヤコタナゴの試験放流が行われる予定である。

#### (2) 第 1 回ミヤコタナゴ研究会の開催

現地視察では、水路の形状について多くの改善意見が出され、このままでは数年でミヤコタナゴが自然界から消えてしまうのではないかという危惧があるという見解が博物館関係者から伝えられて、これら水路の維持管理に関する課題を地域に伝え、より良いミヤコタナゴの生息環境を作る必要があることが確認された。

#### (3) 二枚貝のミトコンドリア DNA 塩基配列の次世代シーケンサーによる決定

マツカサガイ、ドブガイ、イシガイ、ヒレイケチョウガイ(2個体)、シジミ(2個体)について、それぞれ、約 74 万リード(約 173Mbp)、約 72 万リード(約 176Mbp)、約 38 万リード(約 78Mbp)、約 61 万リード(約 126Mbp)、約 59 万リード(約 122Mbp)、約 132 万リード(約 385Mbp)、約 114

万リード(約306Mbp)の塩基配列が決定された。De Novo アセンブルの結果、マツカサガイは13万3222コンティグ(約31Mbp)、ドブガイは13万3222コンティグ(約17Mbp)、イシガイは7万276コンティグ(約17Mbp)、ヒレイケチョウガイは12万214コンティグ(約25Mbp)と11万586コンティグ(約24Mbp)、シジミは4万4834コンティグ(約12Mbp)と9万3855コンティグ(約23Mbp)にアセンブルされた。これらをデータベース化し、既知の二枚貝のミトコンドリア DNA 全長の塩基配列を用いて BLAST 検索を行ったが、ミトコンドリア DNA 全長が同定される種はなかった。マツカサガイでは7つの DNA 断片(約11,000bp)、ドブガイでは7つの DNA 断片(約12,000bp)、シジミでは4つの DNA 断片(約10,000bp)のミトコンドリア DNA 部分塩基配列が決定されている。他の種については現在検討を進めている。今後はさらにシーケンスを追加して進め、ミトコンドリア DNA 全長の塩基配列を決定するとともに、さまざまな生息地の個体の遺伝子型を調べ、地域集団の遺伝的特性を解明する必要がある。

#### (4) 高大連携事業の実施

「ひらめき☆ときめきサイエンス」事業は羽田地区の地域住民の協力の下に行われており、今後も本事業を継続することにより、天然記念物ミヤコタナゴという絶滅危惧種に関する理解が深まることが期待される。また、「中高生の科学研究実践活動推進プログラム」は現在も進行中であり、今後の塩基配列解析により、栃木県内に生息するシジミの系統関係が高大連携により明らかにされることが期待される。本プログラムの成果は、平成28年3月28日に平成28年度日本水産学会大会の高校生による研究発表会で発表される予定である。

#### 4. 事業の成果

本事業では、天然記念物ミヤコタナゴとその産卵母貝となる二枚貝の保全活動を地域と協力して進めて行く方策をさまざまなステークホルダーと

議論を重ねて最善策を考えながら実施した。また、最先端の次世代シーケンサーを活用した遺伝子解析を行い、最先端の地域研究も進めた。多くの二枚貝のミトコンドリア DNA 部分塩基配列が決定され、今後のさらにシーケンスを追加することにより全長(約17,000bp)の塩基配列決定の目処が立った。

高大連携事業も実施し、次世代を担う高校生に生物多様性の重要性と研究の面白さを伝えることもできたと自負している。

#### 5. 今後の展望

本事業では、羽田ミヤコタナゴ再導入検討協議会における地域とのコミュニケーションを図り、ミヤコタナゴの保全のための地域の理解を進めるとともに、高大連携事業の実施により次世代の育成に努めた。これらの取り組みを今後も続け、地域住民、ならびに次世代を担う高校生の生物多様性に関する理解を進めていきたい。また、次世代シーケンサーを活用して進めたミトコンドリア DNA の塩基配列は、ある生息地の個体を別の生息地に移植してよいかどうかを考えるための重要な判断根拠となることが期待される。