

特集：スクミリンゴガイ研究の進展状況と防除技術の展望

リンゴガイ類の分類方法と侵入地への侵入状況

農研機構 九州沖縄農業研究センター ^{まつ}松 ^{くら}倉 ^{けい}啓 ^{いち}一 ^{ろう}郎

はじめに

1980年代にスクミリンゴガイ *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) が世界的な侵入害虫および侵略的外来種として問題化して以来、スクミリンゴガイとその近縁種の分類の不備が指摘されてきた。スクミリンゴガイが属するリンゴガイ属 (*Pomacea*) の分類は18世紀後半からはじまり、一時は100種類以上の種が存在するとされていたが、その多くは同一の種が別種として誤って記載されたものであり、現在は50種程度にまで整理されている (COWIE et al., 2006)。ただし、この種数は今後の検討によりさらに減少する可能性がある。これは、リンゴガイ属の分類の基準となる形態形質 (貝殻や軟体部の大きさや色、形) が生息場所の環境やエサ条件等の違いによって著しく変化するためである。このような分類上の不備のため、リンゴガイ属がアジアに侵入した当初はその同定をめぐって混乱が生じた。過去の記録では *P. gigas* や *P. lineata* もアジアへの侵入種とされていたが、これらは誤りであると言われている。また、我が国においても、リンゴガイが侵入した1980年代当初は、それらのリンゴガイはすべてラプラタリンゴガイ *P. maculata* という別の種であると考えられていたが、その後その大半はスクミリンゴガイであることが確認されている。

近年の分子生物学的手法の発達により、生物の分類にDNAの塩基配列情報を用いることが可能となった。この技術の登場により、形態のみによる識別が困難であったリンゴガイ属の分類は飛躍的に改善され、主要な種の系統関係が明らかにされるとともに、侵入地で問題となっているリンゴガイの種を識別することも可能となった。本稿では近年確立されたリンゴガイ属の分類方法を紹介するとともに、東南アジア・東アジアに侵入したリンゴガイ属各種の現在の分布状況を述べる。

I リンゴガイの分類方法

生物の分類は基本的には形態形質に基づいて行われるが、上述のようにリンゴガイ属においては形態による分類には困難な点があることから、現在ではDNAの塩基配列情報による分類が重用されている。本項では近年整理が進められているリンゴガイ属全体の分類の現状、およびアジアに侵入した主要なリンゴガイ2種の識別方法を紹介する。

1 DNAの塩基配列情報によるリンゴガイ属の分類

DNAの塩基配列情報を用いたリンゴガイ属の分類研究は2007年にはじめて報告された (RAWLINGS et al., 2007)。この報告ではミトコンドリアDNAの12S rRNA ~ 16S rRNA 領域とシトクロームcオキシダーゼサブユニットI (*COI*) 領域の塩基配列が解析され、主要な侵入害虫であるスクミリンゴガイとラプラタリンゴガイを含む計6種の系統関係が明らかにされた。その後、さらに詳細な解析が進められ、現在では16種について、上記ミトコンドリアDNAのほか、核DNAの18 SrDNA, H3 histone subunit, elongation factor 1 α (EF1 α) の各塩基配列情報に基づく詳細な系統関係が明らかにされている (HAYES et al., 2009)。それによると、リンゴガイ属は *Pomacea* クレード、*Effusa* クレード、*Flagellata* クレードの三つに大別でき、最も多くの種が含まれる *Pomacea* クレードはさらに *P. canaliculata* グループと *P. bridgesii* グループに分けられる。アジアへの侵入が確認されているのはすべて *Pomacea* クレードに属する種であり、特に侵入個体の大部分を占めるスクミリンゴガイとラプラタリンゴガイはいずれも *P. canaliculata* グループに属している。

2 スクミリンゴガイとラプラタリンゴガイの識別

スクミリンゴガイとラプラタリンゴガイはいずれも重要な侵入害虫であるが、外観から、これら2種を識別することは極めて困難である。そのため、これら2種を識別するための比較研究が進められてきた。

(1) 形態による識別

2種を形態で識別するための基準として、古くは貝殻の色や色帯 (貝殻の螺旋に沿って描かれている帯状の線) の有無が用いられていたが、この基準ではかならずしも

Identification and Current Distribution of the Apple Snails in Invaded Area. By Keiichiro MATSUKURA

(キーワード: スクミリンゴガイ, ラプラタリンゴガイ, 分子系統解析, 種間交雑)

2種を正確に識別することはできない (MATSUKURA et al., 2008)。近年の詳細な研究により、2種の間には、ふ化貝の貝殻の形態や産卵される卵の数と大きさ、成貝の貝殻の開口部の色、さらには腎臓や雄の生殖器の形態等に違いがあることが明らかとなった (HAYES et al., 2012) (表-1)。ただし、これら形態的特徴に基づく識別は、観察に専門的な技術が必要なことや、2種の間で明確に違いを見いだせない場合があること、さらには2種の交雑個体に関する検討がされていないことなど、正確性や簡便性のうえでの課題が残っている。そのため、現状では、以下に述べる分子生物学的手法による識別が最も実用性の高い識別手段であると考えられる。

(2) 分子生物学的手法による識別

1) ミトコンドリア DNA, COI 領域による識別

2種間の塩基配列の違いは様々な領域で確認され、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されている。そのいずれかの領域の塩基配列を解析し、DDBJ の塩基配列データと照合することにより、2種を識別することができる。しかし、塩基配列を決定するためには、サンプル個体の対象遺伝子領域の DNA を PCR 反応で増幅した後、サンプルの精製やシーケンス反応等複数の解析手順を要するため、労力や費用の点で問題が生じる場合がある。この問題を解決するため、2種にそれぞれ特異的なプライマーを用いたマルチプレックス PCR による識別方法が開発された (MATSUKURA et al., 2008)。この方法では、種によって異なるサイズ (塩基配列の長さ) の PCR 増幅産物が得られるため、それらを電気泳動することで種を識別することが可能である。

具体的には、表-2にある3種類のプライマーを混ぜて PCR 反応を行う。PCR の反応条件は 94°C 2分間の初期変性の後、94°C 30秒間、55°C 30秒間、72°C 1分間の増幅反応を 35 サイクル、最後に 72°C 5分間の伸長反応が推奨される。この反応により、スクミリングガイでは

666 bp の、ラプラタリングガイでは 390 bp の増幅産物がそれぞれ得られる。

2) 核 DNA, EF1 α 領域による識別

ミトコンドリア DNA の COI 領域による識別は、塩基配列の違いをもとに2種を明確に区別できる手法であり、侵入地の個体の種を識別するための手法としてよく用いられてきた (HAYES et al., 2008; MATSUKURA et al., 2008; Lv et al., 2013)。しかし近年、スクミリングガイとラプラタリングガイは交雑可能であり、原産地の南米と侵入先であるアジアのいずれにおいても交雑個体が生息していることが明らかとなった (MATSUKURA et al., 2013; YOSHIDA et al., 2013)。交雑個体の核 DNA にはスクミリングガイとラプラタリングガイ両方の DNA が含まれているが、母系遺伝するミトコンドリア DNA は母親の種のもののみとなる。そのため、例えば、スクミリングガイの雌とラプラタリングガイの雄が交雑して産まれた交雑個体を上記の識別方法で調査しても、「スクミリングガイ」と判定されてしまい、交雑個体を検出することはできない。したがって、交雑の有無を含めたより正確な識別には核 DNA の解析が必要である。ミトコンドリア DNA と同様、核 DNA の各領域にも2種の間で明確な塩基配列の違いがあるため、その違いを利用した識別方法が開発された (MATSUKURA et al., 2013)。

最初に、2種に共通な EF1 α 領域用のプライマー (表-2) を用いた PCR 反応により、解析の対象となる DNA を増幅させる。PCR の反応条件は、94°C 2分間の初期変性の後、94°C 30秒間、50°C 30秒間、72°C 2分間の増幅反応を 35 サイクル、最後に 72°C 5分間の伸長反応が推奨される。得られた PCR 増幅産物 (約 520 bp) に対し、制限酵素 *Apa*LI, NEBuffer 4, BSA を増幅産物の反応液 10 μ l 当たりそれぞれ 2U, 1 μ l, 0.1 μ l ずつ加えた後、37°C で 1 時間保温する。制限酵素 *Apa*LI は塩基配列「GTGCAC」の部分で認識し切断する酵素であり、

表-1 スクミリングガイとラプラタリングガイの主な形態的特徴の違い

形質 ^{a)}	スクミリングガイ	ラプラタリングガイ
ふ化直後の稚貝の貝殻	高さ：約 2.8 mm 最初の 1 巻きの直径：約 2.4 mm	高さ：約 1.2 mm 最初の 1 巻きの直径：約 0.8 mm
1 卵塊当たりの卵数	数十～1,000 (平均 260 以下)	数百～4,500 以上 (平均 1,500)
卵のサイズ	約 3 mm	1.2～2.5 mm (平均 1.9 mm)
開口部の内側の色彩	着色なし	黄～赤色に着色している場合あり
腎臓前葉の形状	細い	幅がある
雄性生殖器の形状	陰茎鞘の中間部に腺あり	陰茎鞘の基部に腺あり

^{a)} 2種の形態を比較した図は HAYES et al. (2012) で参照可能。

表-2 スクミリンゴガイとラプラタリンゴガイを識別するためのプライマー

増幅領域・プライマー名	配列 (5'-3')
ミトコンドリア DNA COI	
PcanCOI	TGG GGT ATG ATC AGG CC
PinsCOI	ATC TGC TGC TGT TGA AAG C
HCO2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA
核 DNA EF1	
F7	TGT GAA TAA GAT GGA CAG CA
5R	AAT CCT AAC CTC CAA TTT TGT

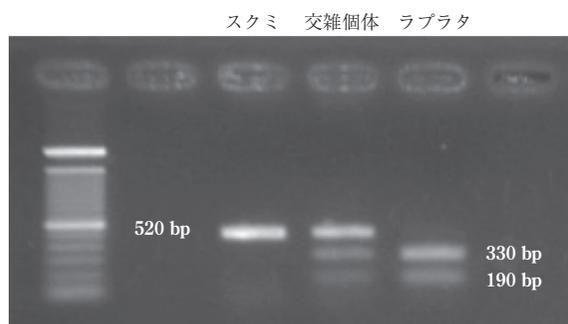


図-1 核 DNA の Elongation factor 1 α 領域の塩基配列に基づくスクミリンゴガイとラプラタリンゴガイの識別
制限酵素 (ApaI) 処理後のバンドパターンにより、2種と交雑個体をそれぞれ識別できる。

この塩基配列を含んでいるラプラタリンゴガイの増幅産物のみが二つに分断される。したがって、制限酵素での処理終了後、電気泳動により増幅産物のサイズを確認し、520 bp のバンド 1 本であればスクミリンゴガイ、330 bp と 190 bp のバンド 2 本であればラプラタリンゴガイ、上記 3 本のバンドすべてがあれば交雑個体と判定することができる (図-1)。

上記方法により 2 種リンゴガイならびにそれらの交雑個体を容易に識別可能であるが、理論上、交雑個体であっても複数回の交配を経るとスクミリンゴガイあるいはラプラタリンゴガイどちらか一方の遺伝子型しか有していない場合もある。したがって、この方法により交雑個体と判定された個体は 100% 交雑個体であるが、スクミリンゴガイあるいはラプラタリンゴガイと判定された個体が交雑個体ではないと断定することはできない。本手法による識別を行う際にはこの点に注意が必要である。

表-3 アジアへのリンゴガイの侵入状況

種	侵入が確認されている国・地域
スクミリンゴガイ	インドネシア、韓国、タイ、中国、日本、フィリピン、ベトナム、マレーシア、ミャンマー、ラオス、台湾
ラプラタリンゴガイ	韓国、カンボジア、シンガポール、タイ、中国、日本、ベトナム、マレーシア、台湾
ハシゴリンゴガイ	台湾
<i>P. diffusa</i>	スリランカ (オーストラリア)

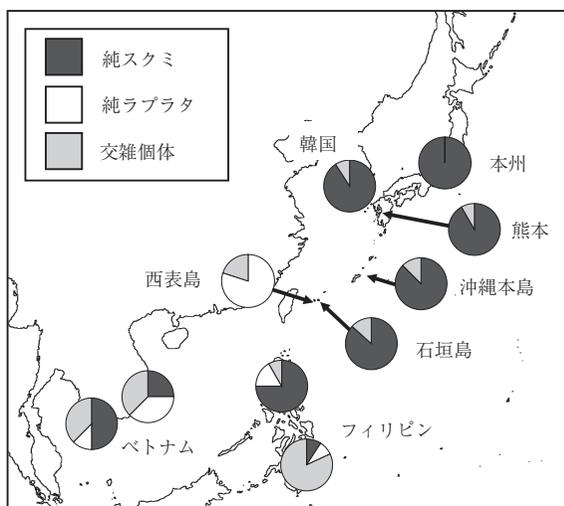


図-2 アジアにおけるスクミリンゴガイとラプラタリンゴガイおよびそれらの交雑個体の分布状況
核 DNA の Elongation factor 1 α 領域の塩基配列に基づく識別結果。

II アジアへのリンゴガイの侵入状況

1 東南アジア・東アジアへの侵入状況

上述のミトコンドリア DNA の塩基配列解析により、アジア各地に侵入したリンゴガイの種の識別が複数の研究グループによって進められ (HAYES et al., 2008; MATSUKURA et al., 2008; Lv et al., 2013), アジアに侵入したリンゴガイのほとんどはスクミリンゴガイとラプラタリンゴガイであることが確認されている (表-3)。特にスクミリンゴガイは最も広範囲への侵入が確認されており、東南アジアから東アジアに至る 11 の国と地域で生息が報告されている。一方、ラプラタリンゴガイもすでに八つの国や地域への侵入が確認されている。

ミトコンドリア DNA の解析結果だけを見ると、スクミリンゴガイとラプラタリンゴガイはどちらも東南アジ

ア～東アジアの広範囲にわたって生息しているように見えるが、核 DNA (EF1 α 領域) の詳細な解析により、2種および2種の交雑個体の生息地域に明確な違いがあることが明らかとなっている (図-2) (MATSUKURA et al., 2013)。ミトコンドリア DNA による解析結果との混乱を避けるため、以下では核 DNA にスクミリングガイ型の EF1 α 領域のみを持つ個体を「純スクミ」、ラプラタリングガイ型のもののみを持つ個体を「純ラプラタ」とそれぞれ記述する。純スクミはミトコンドリア DNA の解析結果と同様、東南アジアから東アジアの広い範囲に分布するのに対し、純ラプラタの生息地域は沖縄県の西表島 (八重山郡竹富町) を北限とする亜熱帯・熱帯地域に限定されている。交雑個体は亜熱帯・熱帯地域のほか、沖縄本島や熊本県、韓国の釜山等で確認されているが、沖縄本島以北での生息数は純スクミに比べると少ない。

なお、これら2種のほかにはハシゴリングガイ *P. scalaris* が台湾に、*P. diffusa* がスリランカ (とオーストラリア) に侵入していることが確認されているが (HAYES et al., 2008), これら2種の生息地域は限定的である。

2 侵入源と侵入の経緯

原産地と侵入地の個体を対象とした大規模なミトコンドリア DNA の COI 領域の解析により、現在アジアに生息しているリングガイの侵入源および侵入の経緯がほぼ特定されている。原産地である南米のスクミリングガイとラプラタリングガイはそれぞれ COI 領域の塩基配列に多様な地理的変異があるが、アジア各地から採集した個体からも複数のタイプの塩基配列が確認された。このことから、アジアに侵入したリングガイは単一の侵入源からのものではなく、南米の複数の地域を起源としていると考えられる。南米とアジアの個体の塩基配列を比較した結果、スクミリングガイはアルゼンチン内の複数の地域から、ラプラタリングガイはブラジルとアルゼンチンから、それぞれ複数回に渡って導入されたと推定されている。

アジア各地へ導入されたリングガイの大部分は、一度南米から台湾を経由した後、アジア各国に広がっていったとされている (MOCHIDA, 1991)。このことは、ミトコンドリア DNA の塩基配列解析によっても裏付けられている (HAYES et al., 2008)。アジアに生息するスクミリングガイの COI 領域は大きく二つのタイプに分けられるが、そのいずれのタイプとも、日本や韓国、ベトナムや中国、台湾等、多くの国や地域で確認されている。ラプラタリングガイについても、タイ、ベトナム、マレーシアおよびカンボジアから採集した個体の COI 領域の塩基配列は完全に一致していた。南米からアジア各国にそ

れぞれ異なる経緯でリングガイが導入されていた場合、このように侵入先の複数の地域間で塩基配列パターンが一致する可能性は極めて低く、現在アジアに生息する個体の大半は台湾を経由して導入された個体が起源となっている可能性が極めて高い。

ハシゴリングガイと *P. diffusa* についてもそれぞれ侵入源と侵入の経緯が推定されており、台湾のハシゴリングガイはアルゼンチンから、スリランカの *P. diffusa* はブラジルをそれぞれ起源とし、いずれも熱帯魚水槽での観賞用に輸入されたものが野生化したと考えられている。

3 日本への侵入状況

日本にはスクミリングガイとラプラタリングガイの2種のみが生息している。図-2に示したように、九州以北に生息する個体の大半は純スクミであり、これらはミトコンドリア DNA の解析によってもスクミリングガイであることが確認されている。核 DNA の解析で熊本県において交雑個体の生息が確認されたほか (MATSUKURA et al., 2013), 静岡県と広島県からは、核 DNA は純スクミであるがミトコンドリア DNA はラプラタリングガイである個体が採集されており、一部の地域には交雑個体も生息していることが明らかとなっている。他方、沖縄県の西表島ではミトコンドリア、核いずれの塩基配列からもラプラタリングガイと識別された個体が優占している。また、石垣島では純ラプラタの生息は確認されないものの、交雑個体の割合も多く、ミトコンドリア DNA ではラプラタリングガイと識別される個体が多数生息しており (MATSUKURA et al., 2008), 沖縄県のこれら離島の種構成は九州以北のものとは異なっている。

III 今後の展開

1 スクミリングガイとラプラタリングガイの生態的違い

2種の生態的特性の違いは、これらによる水稻の被害発生量を決定する重要な要因である。2種とも他のリングガイ属の貝と比較するとエサの摂食量は多いが (MORRISON and HAY, 2011), これまでのところ植物の嗜好性に関する大きな違いは報告されておらず、どちらも水稻を食害する。成長速度については、25°C 条件下ではラプラタリングガイのほうがスクミリングガイよりも優れており (MORRISON and HAY, 2011), これは水田環境を再現した半野外試験によっても確認されている (松倉, 未発表)。また、上述のようにラプラタリングガイはスクミリングガイよりも小型の卵を多数産卵する特性があり、捕食性天敵の少ない水田環境などではラプラタリングガイのほうが高い増殖率を示す可能性がある。ただ

し、ラプラタリングガイは低温や乾燥に対する耐性が極めて低く、九州以北の水田では越冬することができない(YOSHIDA et al., 2013; MATSUKURA et al., 投稿中)。これまでの知見から、九州以北において、今後ラプラタリングガイの侵入が進んだ場合には水稲への被害がより深刻になる可能性はゼロではないが、それ以前の問題として、この地域にラプラタリングガイが定着する可能性は低いと考えられる。

2 侵入後のリングガイの移動経緯の解明

国内におけるスクミリングガイの発生面積は現在も増加している。現状では一度侵入したリングガイを根絶することは不可能であるため、今後の被害拡大を防ぐためには、これ以上の分布拡大を阻止することが肝要であるが、リングガイが実際にどのような経緯で分布を拡大しているのかは詳らかでない。現在、マイクロサテライト

解析などのより詳細な塩基配列情報解析が進められており、これにより国内に侵入後のリングガイの移動経緯が解明されれば、今後の分布拡大を阻止するための対策を立てることができるようになると思われる。

引用文献

- 1) COWIE, R. H. et al. (2006): Global Advances in Ecology and Management of Golden Apple Snails, Philippine Rice Research Institute, the Philippines, p. 3 ~ 23.
- 2) HAYES, K. A. et al. (2008): Diversity Distrib. 14: 701 ~ 712.
- 3) ———— et al. (2009): Biol. J. Linn. Soc. 98: 61 ~ 76.
- 4) ———— et al. (2012): Zool. J. Linn. Soc. 166: 723 ~ 753.
- 5) Lv, S. et al. (2013): Diversity Distrib. 19: 147 ~ 156.
- 6) MATSUKURA, K. et al. (2008): Appl. Entomol. Zool. 43: 535 ~ 540.
- 7) ———— et al. (2013): Biol. Inv. 15: 2039 ~ 2048.
- 8) MOCHIDA, O. (1991): Micronesica Suppl. 3: 51 ~ 62.
- 9) MORRISON, W. E. and M. E. HAY (2011): Biol. Inv. 13: 945 ~ 955.
- 10) RAWLINGS, T. A. et al. (2007): BMC Evol. Biol. 7: 97.
- 11) YOSHIDA, K. et al. (2013): J. Moll. Stud. 80: 62 ~ 66.

(新しく登録された農薬 18 ページからの続き)

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, セリ (北海道, 東北を除く), エゾノサヤヌカグサ (北海道), オモダカ, クログワイ (北海道を除く), コウキヤガラ (関東・東山・東海, 近畿・中国・四国, 九州), シズイ (東北): 移植直後~ノビエ3葉期ただし, 移植後30日まで (湛水散布, 東北, 北陸, 関東・東山・東海の普通期および早期栽培地帯)

●イマゾスルフロン・シハロホップブチル・ジメタメトリン・プレチラクロール粒剤

23613: OAT シェリフ 1 キロ粒剤 (OAT アグリオ) 15/1/21
 イマゾスルフロン: 0.90%
 シハロホップブチル: 1.8%
 ジメタメトリン: 0.60%
 プレチラクロール: 4.5%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ, ヘラオモダカ, オモダカ (北海道, 関東・東山・東海, 近畿・中国・四国), ヒルムシロ, セリ, クログワイ (北海道, 北陸を除く), エゾノサヤヌカグサ (北海道), アオミドロ・藻類による表層はく離: 移植後5日

~ノビエ3葉期 ただし, 移植後30日まで (湛水散布)

●フェントラザミド・ベンゾピシクロン・ベンゾフェナップ水和剤

23614: OAT スマートフロアブル (OAT アグリオ) 15/1/21
 フェントラザミド: 3.7%
 ベンゾピシクロン: 3.7%
 ベンゾフェナップ: 14.7%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北, 九州), オモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ (北海道, 東北, 北陸, 九州), シズイ (東北), エゾノサヤヌカグサ (北海道): 移植時 (田植同時散布機で施用), 移植直後~ノビエ2.5葉期 ただし, 移植後30日まで (原液湛水散布, 水口施用または無人ヘリコプターによる滴下)

直播水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ, ヒルムシロ: 稲1葉期~ノビエ2葉期 ただし, 収穫90日前まで (北海道)

直播水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ, ヒルムシロ: 稲1葉期~ノビエ2.5葉期 ただし, 収穫90日前まで (全域 (北海道を除く))