

# 九州に分布するイタボガキ科カキ類の DNA 鑑定

飯塚祐輔<sup>1,2</sup>・荒西太士<sup>1</sup>

## DNA fingerprinting for Ostreidae oysters in Kyushu

Yusuke Iidzuka<sup>1,2</sup>, Futoshi Aranishi<sup>1</sup>

**Abstract:** Among several genera of the family Ostreidae, *Ostrea*, *Crassostrea* and *Saccostrea* play a central role in the near shore brackish ecosystem worldwide. Although 9 species of oysters belonging to these 3 genera had been found in Kyushu, Japan, oysters are highly variable in form with ecomorphological variations, and molecular methods can usefully complement morphological in determining the status of oyster taxa. In this study, a simple DNA fingerprinting analysis of the mitochondrial DNA segment encoding the 16S ribosomal RNA gene was developed for differentiation of 3 genera oysters. Of 2 *Ostrea*, 4 *Crassostrea*, and 2 *Saccostrea* species distributed in Kyushu, Japan, nucleotide sequences of the mitochondrial DNA 16S ribosomal RNA gene were aligned to detect unique sites of restriction enzymes for genus and species identifications by means of PCR-RFLP analysis. PCR amplification of an apparent 530 bp fragment of the partial 16S ribosomal RNA gene was successfully performed on all specimens collected. Direct double digestion of the PCR products using *Eco*130I and *Hind*III enzymes enabled to discriminate *Ostrea*, *Crassostrea*, and *Saccostrea* genera. In addition, double and single digestions of the PCR products using *Dde*I and *Alu*I enzymes and *Alu*I enzyme alone enabled to identify 4 *Crassostrea* species and 3 *Saccostrea* species, respectively.

**Key word:** Ostreidae oyster, PCR-RFLP, mitochondrial 16S ribosomal RNA gene

### はじめに

イタボガキ科カキ類は、極圏を除く世界中に分布する代表的な二枚貝類であり (Matthiessen, 2000), 河口を含む沿岸域などに生息している (Hedgecock, 1995). イタボガキ科カキ類が、沿岸汽水域に形成するカキ礁は、他の生物が生息場所や産卵場所として利用しており、沿岸汽水環境を物理的かつ生態的に保持している (田北, 2000). 世界各地に 60 種以上現生すると推測されているイタボガキ科カキ類のうち、分布域が比較的広く、水産重要種を含む 43 種以上がイタボガキ属 *Ostrea*, マガキ属 *Crassostrea*

およびオハグロガキ属 *Saccostrea* の 3 属に分類され (稲葉・鳥越, 2004), かつて日本には 12 種が分布していた (Torigoe, 1981; Hedgecock *et al.*, 1999). 特にマガキ属のカキ類は日本人に馴染みが深く、養殖生産技術が既に確立しているマガキ *C. gigas* は、「カキえもん (北海道)」、「的矢かき (三重県)」、「かき小町 (広島県)」など、1994 年に島根県隠岐地域において養殖生産技術が確立したイワガキ *C. nippona* は「隠岐のいわがき」としてブランド化が進んでいる (勢村ら, 2001). 一方、イタボガキ属のイタボガキ *O. denselamellosa* は、かつて食用として採集されたが、近年は分布全域で生息数が激減し、愛知県

<sup>1</sup> 島根大学汽水域研究センター Coastal Lagoon Research Center, Shimane University, 1060 Nishikawatsu, Matsue 690-8504, Japan.

<sup>2</sup> 宮崎大学大学院農学研究科 Graduate School of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki 889-2192, Japan.

や千葉県などでは絶滅危惧種に指定されている(愛知県, 2002; 千葉県, 2006)。また, 日本ではほとんど食用とされていないオハグログガキ属のクロヘリガキ *S. echinata* は, タイ王国やオーストラリアなどの東南アジアやオセアニアで食用を目的として養殖生産されている(Southgate and Lee, 1998)。

このように生態学的かつ食資源学的にも重要な3属のカキ類は, 生息環境により貝殻などの形態的特徴が変化しやすいため, 分類が混乱していることが多い。例えば, 形態的特徴の類似によりマガキの地方集団であると考えられていたシカメガキ *C. sikamea* (Imai and Sakai, 1961), ボンベイガキ *S. cucullata* の亜種であると考えられていたオーストラリアガキ *S. commercialis* とオハグログガキ *S. mordax* の2種(Stenzel, 1971)などがある。前者のマガキとシカメガキは, ミトコンドリアDNAの16SリボソームRNA遺伝子解析(Banks *et al.*, 1993)および相互交配実験(Banks *et al.*, 1994)により別種であるとされている。後者のオハグログガキ属3種は, まずオハグログガキは侵蝕されていない個体の貝殻形態観察(稲葉・鳥越, 2004), オーストラリアガキは集団遺伝学的解析(Buroker *et al.*, 1979)によって, それぞれボンベイガキとは別種であるとされている。また, 天然海域では, 同属のみならず, 異属の異種間の形態分類も困難な場合がある。例えば, マガキ属のイワガキは老成したコケゴロモガキ *O. circumpicta* であると考えられていた(Wakiya, 1929; Hirase, 1930)。これらの形態的特徴の多様性による分類学上の混乱は, カキ類の天然海域における精確な生態調査を著しく困難としている。

このような状況の下, 近年では, DNAを指標とした分子生物学的手法によるイタボガキ属, マガキ属およびオハグログガキ属の天然カキの分類が最も信頼性が高いとされている。特に, 細胞内のコピー数が多く解析が容易なミトコンドリアDNAの遺伝子がDNAマーカーとして精力的に開発されている。例えば, チトクロームc酸化還元酵素サブユニットI遺伝子を基にポルトガルガキ *C. angulata* を中心としたマガキ属6種を比較した報告(O'Foighil *et al.*, 1998), 同遺伝子を基に中国の香港周辺に分布するマガキ属を中心とした9種を比較した報告(Lam and Morton, 2004), 同遺伝子を基に中国で分類が混乱しているマガキ属2種を比較した報告(Wang *et al.*, 2004)などの報告例がある。また別の遺伝子では, 16SリボソームRNA遺伝子を基に北米とアジアに分布するマガキ属3種を比較した報告(O'Foighil *et*

*al.*, 1995), 同遺伝子を基に世界各地に分布するイタボガキ属7種を比較した報告(Jozefowicz and O'Foighil, 1998), 同遺伝子を基に九州の有明海に分布するマガキ属3種を比較した報告(Hedgecock *et al.*, 1999), 同遺伝子を基に南大西洋両岸に分布するマガキ属2種を比較した報告(Lapegue *et al.*, 2002), 同遺伝子を基にインド太平洋に広く分布するオハグログガキ属4種を比較した報告(Lam and Morton, 2006)等の多数の報告例がある。しかし, これらの報告例の多くは特殊な設備や多大な費用が必要な塩基配列を解読する手法であり, 多検体を同定する生態調査への適用は困難である。一方, 迅速性および簡易性からPCR-RFLP(制限酵素断片長多型)解析法は多検体解析に優れた手法であり(谷口・高木, 1997), その生態調査への適用が期待されている。

そこで, 本研究では, 日本に分布するイタボガキ属, マガキ属およびオハグログガキ属の3属12種にカキ類のうち, 九州沿岸の汽水性潮間帯から潮下帯に分布するイタボガキ *O. denselamellosa*, コケゴロモガキ *O. circumpicta*, マガキ *C. gigas*, スミノエガキ *C. ariakensis*, イワガキ *C. nippona*, シカメガキ *C. sikamea*, オハグログガキ *S. mordax*, ケガキ *S. kegaki* およびクロヘリガキ *S. echinata* の3属9種を対象として, PCR-RFLP解析による属および種分類技術を開発した。なお, GenBank国際データベースに登録されているイタボガキ科カキ類の種数が多くミトコンドリアDNAの16SリボソームRNA遺伝子の部分領域を指標とした。

## 試料と方法

### 試料

イタボガキ属, マガキ属およびオハグログガキ属の3属7種のミトコンドリアDNAの16SリボソームRNA遺伝子の部分塩基配列は, GenBank国際データベースから取得した(表1)。また, 当該データベースに未登録のコケゴロモガキおよびケガキの2属2種のミトコンドリアDNA16SリボソームRNA遺伝子の部分塩基配列は, 本研究で解読した。

なお, 部分塩基配列の解読したコケゴロモガキは山形県, ケガキは宮崎県でそれぞれ採集された試料を使用し, 形態的に種を同定した後, 閉殻筋を分離して分析に供するまで $-20^{\circ}\text{C}$ に冷凍保存した。

### DNA調製

尿素-SDS-Proteinase K法に従い, 凍結した閉

表 1. イタボガキ科カキ類 9 種の日本における分布記録および GenBank 国際データベース登録番号  
**Table 1.** Recorded distribution of 9 Ostreidae oyster species in Japan and GenBank accession number

Species	Distribution in Japan	GenBank accession number
Itabogaki <i>Ostrea denselamellosa</i>	southward of Boso and Noto Peninsula	AF052067
Kokegoromogaki <i>Ostrea circumpicta</i>	Mutu Bay ~ Kyushu	no data
Magaki <i>Crassostrea gigas</i>	Hokkaido ~ Amami	AF177226
Suminoegaki <i>Crassostrea ariakensis</i>	Ariake Bay	AY632547
Iwagaki <i>Crassostrea nippona</i>	Mutu Bay ~ Kyushu	AY007426
Shikamegaki <i>Crassostrea sikamea</i>	Ariake and Yatsushiro Bay	AY632551
Ohagurogaki <i>Saccostrea mordax</i>	Kii Peninsula ~ Ryukyu	AF458912
Kegaki <i>Saccostrea kegaki</i>	Mutu Bay ~ Amami	no data
Kuroherigaki <i>Saccostrea echinata</i>	Kyushu ~ Ishigaki Island	AF463493

殻筋からゲノム DNA を調製した (Aranishi and Okimoto, 2004; 2005; Aranishi, 2006; Aranishi and Iidzuka, 2007). 閉殻筋約 20 mg を 200  $\mu$ l の TESU4 抽出溶液 (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS and 4 M urea, 25  $\mu$ g Proteinase K) に懸濁し, 55  $^{\circ}$ C にて 60 分間攪拌加熱した. 25  $\mu$ l の 5 M NaCl を添加し十分に混合した後, 定法に従いフェノール溶液 (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1) およびクロロホルム溶液 (chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1) を用いて精製し, 引き続きエタノールにより沈殿した. DNA 沈殿をエタノールで洗浄して十分に乾燥した後, 10T0.1E 溶液 (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA pH 8.0) に再溶解した.

なお, DNA 溶液の濃度および純度は, バイオフォトメーター (epENDORF 社製) により測定した.

#### PCR 増幅

約 530 bp のミトコンドリア DNA の 16S リボゾーム RNA 遺伝子部分領域を増幅するため 16Sar (5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3') および 16Sbr (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3') のプライマーセットを用いた (Kessing *et al.*, 1989). PCR 反応は, 5  $\mu$ l の GoTaq Green Master Mix (Promega 社製), 2  $\mu$ l の 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 各 1  $\mu$ l のプライマー (5 pmol/ $\mu$ l) および 1  $\mu$ l の 50 倍希釈した DNA テンプレートの合計 10  $\mu$ l で反応した. サーマルサイクラー

(TECHNE 社製 TC-312) を用いた PCR 反応条件は, 94  $^{\circ}$ C で 2 分間の初期変性後, 94  $^{\circ}$ C で 10 秒間の変性 / 54  $^{\circ}$ C で 20 秒間の会合 / 72  $^{\circ}$ C で 40 秒間の伸長を 35 回繰り返す, 72  $^{\circ}$ C で 5 分間の最終伸長により終了した.

#### 塩基配列解析

GenBank 国際データベースから取得 (表 1), または当研究室で解読した塩基配列長が種により異なっていたため, マガキの 16S リボゾーム RNA 遺伝子の第 203~733 塩基に相当する塩基配列長に予め調整した後, 解析に供した. 塩基配列の多重整列解析および制限酵素の認識部位探索には, ClustalW プログラム (Thompson *et al.*, 1994) と NEBcutter プログラム (Vincze *et al.*, 2003) をそれぞれ使用した.

#### RFLP 解析

イタボガキ属, マガキ属およびオハグログキ属の 3 属の分類 RFLP 解析は, 5  $\mu$ l の PCR 産物, 5 unit の Eco130I 制限酵素 (Fermentas 社製), 5 unit の HindIII 制限酵素 (Roche 社製) および終濃度  $\times$ 1 の制限酵素用 Tango buffer (Fermentas 社製) を含む 10  $\mu$ l の反応溶液により, 37  $^{\circ}$ C で 4 時間反応した.

マガキ属マガキ, スミノエガキ, イワガキおよびシカメガキの 4 種の種分類 RFLP 解析は, 5  $\mu$ l の PCR 産物, 2.5 unit の AluI 制限酵素 (Fermentas 社製), 2.5 unit の DdeI 制限酵素 (Roche 社製) および終濃

度×1の制限酵素用 B buffer (Roche 社製) を含む 10  $\mu$ l の反応溶液により, 37°C で 2 時間反応した。

オハグログキ属オハグログキおよびケガキの 2 種の種判別 RFLP 解析は, 5  $\mu$ l の PCR 産物, 5 unit の *AluI* 制限酵素 (Fermentas 社製) および終濃度×1の制限酵素用 Tango buffer (Fermentas 社製) を含む 10  $\mu$ l の反応溶液により, 37°C で 2 時間反応した。

なお, PCR 産物および RFLP 産物は, 臭化エチジウムで染色した後, EDAS 290 Gel Documentation System (Invitrogen 社製) により紫外線下で観察した。

### 結果および考察

GenBank 国際データベースから取得した 3 属 7 種のミトコンドリア DNA の 16S リボゾーム RNA 遺伝子領域の部分塩基配列のうち, イワガキは, 277 bp の部分塩基配列しか登録されておらず, 制限酵素認識部位の探索には不足していた。そのため, 宮崎県産イワガキから当該領域の塩基配列を解読した。

ミトコンドリア DNA の 16S リボゾーム RNA 遺伝子部分領域約 530 bp を多重整列解析し, NEBcutter プログラムを用いて制限酵素認識部位を探索した。その結果, 3 属の属特異的な制限酵素認識部位および 2 属 6 種の種特異的な制限酵素認識部位を特定した。制限酵素 *Eco130I* および *HindIII* によって 3 属の属分類, 制限酵素 *AluI* および *DdeI* によってマガキ属 4 種の種分類, 制限酵素 *AluI* によってオハグログキ属 2 種の種分類が可能と推測された (図 1)。また, オハグログキ属は属分類 RFLP 反応によって, オハグログキとケガキの 2 種が含まれるハプロタイプと, クロヘリガキの 1 種のハプロタイプに別けられた。

属分類の場合, 制限酵素 *Eco130I* および *HindIII* によって, イタボガキ属は RFLP 反応後の鎖長が 468 bp および 59 bp に切断され, マガキ属は 530 bp で切断されず, オハグログキ属のオハグログキ, およびケガキの 2 種は 196 bp, 173 bp, 100 bp および 59 bp に切断され, クロヘリガキは 232 bp, 196 bp および 100 bp に切断された RFLP 産物が生成された (図 2)。マガキ属 4 種の種分類の場合, 制限酵素 *AluI* および *DdeI* によって, マガキは 357 bp, 100 bp および 73 bp に切断され, スミノエガキは 305 bp, 100 bp, 73 bp および 52 bp に切断され, イワガキは 199 bp, 171 bp, 125 bp および 35 bp に切断され, シカメガキは 216 bp, 141 bp, 100 bp およ

び 73 bp に切断された RFLP 産物が生成された (図 3)。オハグログキ属の場合, 種判別を行う制限酵素 *AluI* によって, オハグログキは 243 bp, 170 bp, 67 bp および 50 bp に切断され, ケガキは 170 bp, 160 bp, 83 bp, 53 bp, 50 bp および 14 bp に切断された RFLP 産物が生成された (図 4)。図 2, 図 3 および図 4 では, 40 bp 程度の切断片差を判別するのは難しく, また 100 bp 以下の切断片も同様に判別し難い。しかし, それぞれの属および種で特異的な電気泳動結果が得られたため, イタボガキ属, マガキ属およびオハグログキ属の 3 属の属分類と, マガキ属 4 種の種分類, オハグログキ属 3 種の種判別が可能となった。

イタボガキ科 3 属のカキ類は世界に広く分布しており, カキ殻構造物による魚礁効果や摂餌行動による水質浄化作用など, 沿岸汽水生態系の重要な役割を担っている。さらに, 沿岸の潮間帯から潮下帯に生息し, 採集が容易なため, 食用としての需要も高い。その一方で DNA 解析などの研究は増加傾向にあるものの, その知見は未だ十分とは言えない。カキ類は生息環境などによって形態的変異が起こりやすく, 従来の形態学的手法では貝殻や軟体部などの形態で判別するが, カキ類は生息環境によって貝殻や軟体部の色などの形態的特徴が変化しやすいため, カキ類を正確に分類することは困難である。近年, イタボガキ科カキ類については, バージニアガキ *C. virginica*・マガキ・スミノエガキの 3 種 (O'Foighil *et al.*, 1995), シカメガキ・マガキ・スミノエガキの 3 種 (Hedgecock *et al.*, 1999) などの限定されたカキ類を対象にミトコンドリア DNA の 16S リボゾーム RNA 遺伝子領域の PCR-RFLP 解析による分類法が開発されている。本研究では, ミトコンドリア DNA の 16S リボゾーム RNA 遺伝子領域の PCR-RFLP 解析により, 九州で採集されるイタボガキ科カキ類 3 属 9 種を網羅的に分類でき, かつ生態調査に応用できる技術の開発を目指した。制限酵素 *Eco130I* および *HindIII* によって 3 属の属分類, 制限酵素 *AluI* および *DdeI* によって *Crassostrea* 属 4 種の種分類, 制限酵素 *AluI* によって *Saccostrea* 属 3 種の種分類ができることが判明した。

今後, 九州沿岸汽水域の調査で採集されるイタボガキ科カキ類 3 属 9 種の迅速かつ安価な同定が可能になり, 天然海域におけるカキ類の分布生態に関する情報が得られる事が期待される。一方, 九州以外の日本国内の海域では 3 属のカキ類は本研究で取り扱った 9 種以外にヒヅメガキ *S. malabonensis*,

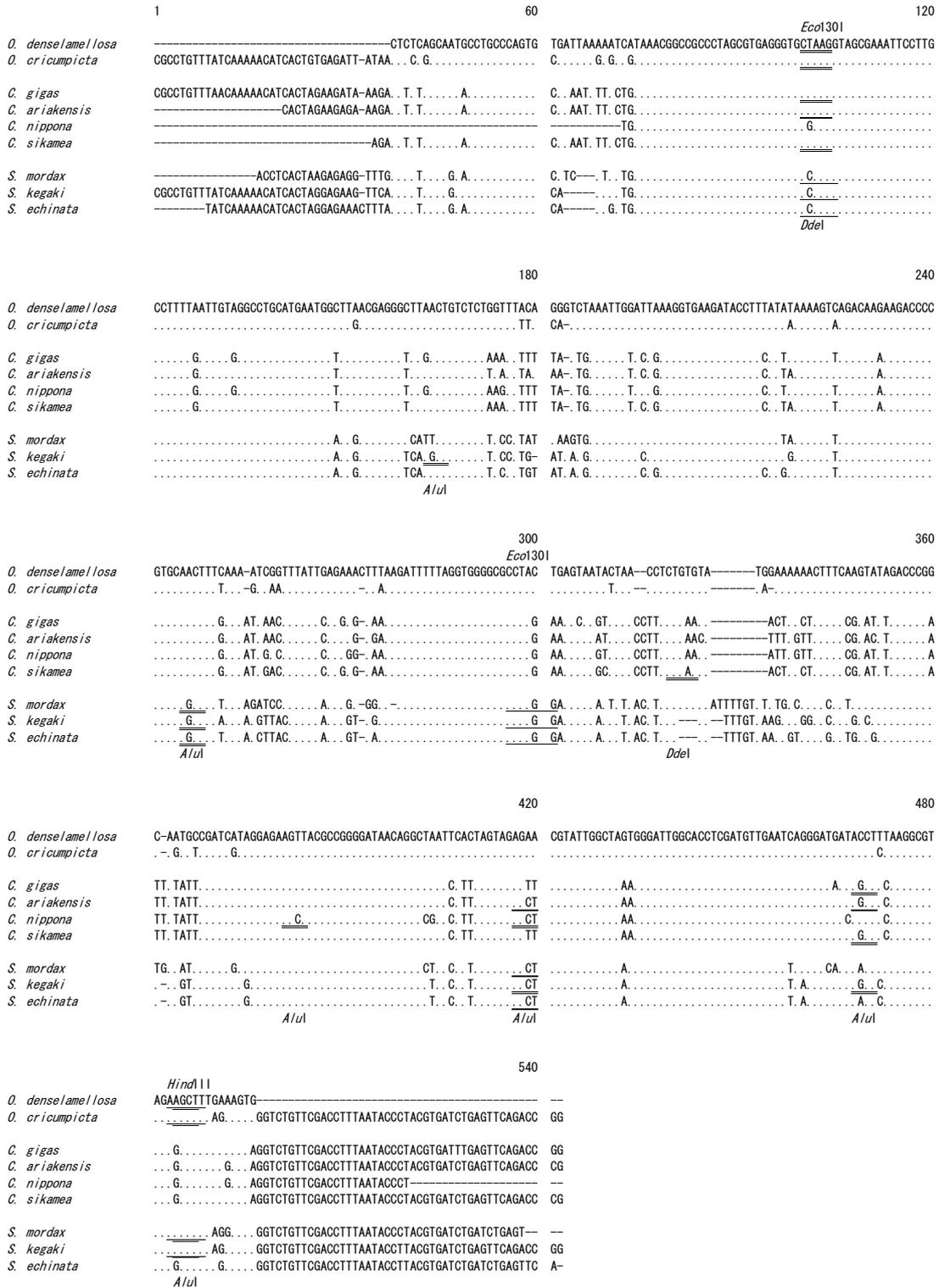


図 1. イタボガキ科 3 属 9 種のミトコンドリア DNA の 16S リボソーム RNA 遺伝子部分領域の相同性解析。下線の塩基配列は 3 属の属分類における制限酵素 *Eco130I* (5'-CCWWGG-3') および *HindIII* (5'-AAGCTT-3') の認識部位、二重下線の塩基配列はマガキ属 4 種およびオハダガキ属 2 種の種分類における制限酵素 *AluI* (5'-AGCT-3') および *DdeI* (5'-CTNAG-3') の認識部位をそれぞれ示す。

**Fig. 1.** Alignment of sequences of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene in 9 Ostreidae oyster species. Dots indicate sequence identity with *O. denselamellosa*. Numerous endonuclease restriction site differences are apparent among the 3 oyster genera and restriction sites for *Eco130I* (5'-CCWWGG-3') and for *HindIII* (5'-AAGCTT-3') which differentiate the 3 oyster genera, are underlined. Numerous endonuclease restriction site differences are apparent among the 4 *Crassostrea* species and the 2 *Saccostrea* species restriction sites for *AluI* (5'-AGCT-3') and for *DdeI* (5'-CTNAG-3') which differentiate the 4 *Crassostrea* species and the 2 *Saccostrea* species, are double-underlined.

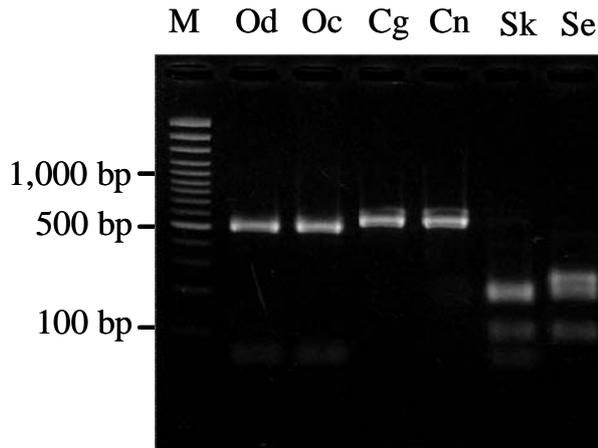


図2. イタボガキ(Od), コケゴロモガキ(Oc), マガキ(Cg), イワガキ(Cn), ケガキ(Sk) およびクロヘリガキ(Se)のミトコンドリアDNAの16SリボソームRNA遺伝子部分領域の制限酵素 *Eco130I* および *HindIII* を用いたPCR-RFLP解析. Mは100 bp DNA マーカーを示す.

**Fig. 2.** PCR-RFLP analysis of the partial 16S ribosomal RNA gene using *Eco130I* and *HindIII* restriction enzymes for standard oyster specimens of *O. denselamellosa* (Od), *O. circumpecta* (Oc), *C. gigas* (Cg), *C. nippona* (Cn), *S. kegaki* (Sk) and *S. echinata* (Se). Lane M, 100 bp DNA ladders.

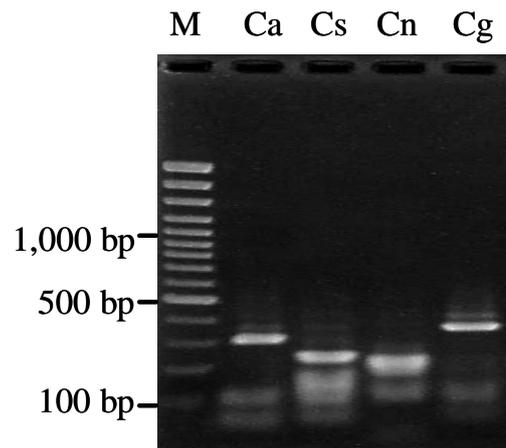


図3. マガキ(Cg), スミノエガキ(Ca), イワガキ(Cn) およびシカメガキ(Cs)のミトコンドリアDNAの16SリボソームRNA遺伝子部分領域の制限酵素 *AluI* および *DdeI* を用いたPCR-RFLP解析. Mは100 bp DNA マーカーを示す.

**Fig. 3.** PCR-RFLP analysis of the partial 16S ribosomal RNA gene using *AluI* and *DdeI* restriction enzymes for standard oyster specimens of *C. gigas* (Cg), *C. ariakensis* (Ca), *C. nippona* (Cn) and *C. sikamea* (Cs). Lane M, 100 bp DNA ladders.

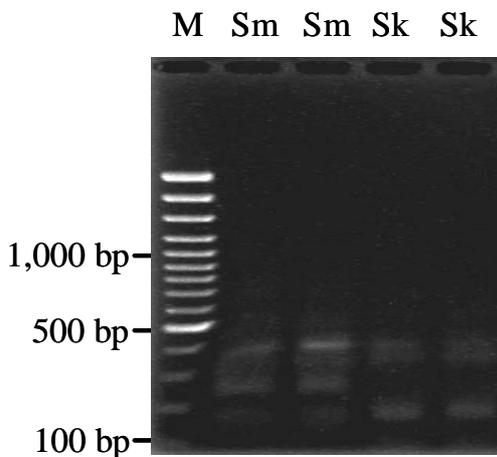


図4. オハグロガキ(Sm) およびケガキ(Sk)のミトコンドリアDNAの16SリボソームRNA遺伝子部分領域の制限酵素 *AluI* を用いたPCR-RFLP解析. Mは100 bp DNA マーカーを示す.

**Fig. 4.** PCR-RFLP analysis of the partial 16S ribosomal RNA gene using *AluI* restriction enzymes for standard oyster specimens of *S. mordax* (Sm) and *S. kegaki* (Sk). Lane M, 100 bp DNA ladders.

ニュージーランドガキ *S. glomerata* およびクロヒメガキ *O. futamiensis* の3種が生息するため(稲葉・鳥越, 2004), 他の海域に今回開発した分類技術を適用するにはこの3種についても検討する必要がある. 具体的には, まず, クロヒメガキの16Sリボソーム

RNA 遺伝子領域の塩基配列は未だ解読されていないため, この塩基配列を解読する必要がある. 次に, 本研究と同じ手順で特異的な制限酵素を特定することによって日本沿岸を対象とした3属12種の属および種判別技術の開発が可能であると考えられる. クロヘリガキ, ヒヅメガキおよびニュージーランドガキは主に熱帯地域に分布する南方系カキ種であり, 特にクロヘリガキについては近年の環境変動による分布域の北進が報告されている(荒西・飯塚, 2007). この南方系カキ種の北進を調査する上でも本研究の技術および更なる分子分類技術の深化が必要であると考えられる. また, イタボガキなど各県の絶滅危惧種に指定されているカキ種についての分布調査にも本研究は応用でき, イタボガキの種の保全についても貢献できると考えられる.

本研究の属および種判別法は, ほぼ実用化の段階に達したと考えられる. ただし, 本研究で用いた試料は国内の限られた地域から採集した試料であるため, 今後より多くの検体を解析し, 解析結果に影響を及ぼすような変異の有無を調べる必要がある.

## 謝 辞

カキ試料を提供して下さった瀬戸内海区水産研究

所の浜口昌巳博士にお礼申し上げる。また、カキ類のDNAを提供して下さった Rutgers University の沖本宜音博士にお礼申し上げる。

## 引用文献

- 愛知県 (2002) 愛知県の絶滅のおそれのある野生動物レッドデータブックあいち-動物編-。愛知県, 名古屋, 438 pp.
- Aranishi, F. (2006) A novel mitochondrial intergenic spacer reflecting population structure of Pacific oyster. *J. Appl. Genet.*, 47: 119–123.
- 荒西太士・飯塚祐輔 (2007) 九州南東岸における南方種ニセマガキの出現記録。自然環境復元研究, 3: 21–25.
- Aranishi, F. and Iidzuka, Y. (2007) Multiplex PCR diagnosis for *Crassostrea* oyster discrimination of *C. sikamea* and *C. gigas*. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 2: 173–177.
- Aranishi, F. and Okimoto, T. (2004) Genetic relationship between cultured populations of Pacific oyster revealed by RAPD analysis. *J. Appl. Genet.*, 45: 435–443.
- Aranishi, F. and Okimoto, T. (2005) Sequence polymorphism in a novel noncoding region of Pacific oyster mitochondrial DNA. *J. Appl. Genet.*, 46: 201–206.
- Banks, M. A., Hedgecock, D., and Water, C. (1993) Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 2: 279–291.
- Banks, M. A., McGoldrick, D. J., Borgeson, W., and Hedgecock, D. (1994) Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. *Mar. Biol.*, 121: 127–135.
- Buroker, N. E., Hershberger, W. K. and Chew, K. K. (1979) Population genetic of the family Ostreidae. II. Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Mar. Biol.*, 54: 171–184.
- 千葉県 (2006) 千葉県の保護上重要な野生生物-千葉県レッドデータブック-動物編 (2006年改訂版)。千葉県, 千葉, 23 pp.
- Hedgecock, D., Li, G., Banks, M. A. and Kain, Z. (1999) Occurrence of Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in the Ariake Sea, Japan. *Mar. Biol.*, 133: 65–68.
- Hirase, S. (1930) On the classification of Japanese oysters. *Jap. J. Zool.*, 3: 1–65.
- Imai, T. and Sakai, S. (1961) Study of breeding of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku J. Agr. Res.*, 12: 125–171.
- 稲葉明彦・鳥越兼治 (2004) 西宮市貝類館研究報告第3号。西宮市貝類館, 兵庫, pp. 10–44
- Jozefowicz, C. J. and O'Foighil, D. (1998) Phylogenetic analysis of southern hemisphere flat oysters based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 10: 426–435.
- Kessing, B., Croom, H., Martin, A., McIntosh, C., McMillan, W. O. and Palumbi, S. P. (1989) The simple fool's guide to PCR. University of Hawaii, Honolulu, USA.
- 松井正文・小池裕子 (2003) 第2章生物進化と保全遺伝学。保全遺伝学 (小池裕子・松井正文編) pp. 19–39, 東京大学出版会, 東京。
- Lam, K. and Morton, B. (2004) The oysters of Hong Kong (*Bivalvia: Ostreidae* and *Gryphaeidae*). *Raffles. Bull. Zool.*, 52: 11–28.
- Lam, K. and Morton, B. (2006) Morphological and mitochondrial-DNA analysis of the Indo-West Pacific rock oysters (*Ostreidae: Saccostrea* species). *J. Mollus. Stud.*, 72: 235–245.
- Lapegue, S., Boutet, I., Leitao, A., Heurtebise, S., Garcia, P., Thiriot-Quievreux, C. and Boudry, P. (2002) Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. *Biol. Bull.*, 202: 232–242.
- Matthiessen, G. C. (2000) Oyster Culture. Fishing News Books Series, Blackwell Publishing Professional, Ames. 176 pp.
- O'Foighil, D., Gaffney, P. M. and Hilbish T. J. (1995) Difference in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American [*Crassostrea virginica* (Gmelin)] and Asian [*C. gigas* (Thunberg), *C. ariakensis* Wakiya] oyster species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 192: 211–220.
- O'Foighil, D., Gaffney, P. M., Wilbur, A. E. and Hilbish, T. J. (1998) Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Mar. Biol.*, 131: 497–503.
- 勢村均・石田健次・中上光・林育夫 (2001) 島根県隠岐島島前湾における垂下養殖イワガキの成長。 *Venus*, 60: 93–102.
- Southgate, P. C. and Lee, P. S. (1998) Hatchery rearing of the tropical blacklip oyster *Saccostrea echinata* (Quoy and Gaimard). *Aquaculture*, 169: 275–281.

- Stenzel, H. B. (1971) Oysters. In: Treatise on invertebrate paleontology, Mollusca 6, Bivalvia, vol. 3, (eds.) Moore, R. C. and Teichert, C. pp. N953–N1224. Colorado and the University of Kansas, Lawrence.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid. Res.*, 22: 4673–4680.
- 田北徹 (2000) 魚類. 「有明海の生きものたち - 干潟・河口域の生物多様性 -」 (佐藤正典編) pp. 224–225. 海游舎, 東京.
- 谷口順彦・高木基裕 (1997) DNA 多型と魚類集団の多様性解析. 「魚類の DNA 分子生物学的アプローチ」 (青木宙・隆島忠夫・平野哲也編) pp. 117–137. 恒星社厚生閣, 東京.
- Torigoe, K. (1981) Oysters in Japan. *J. Sci. Hiroshima Univ.*, (B1 Zool.), 29: 291–419.
- Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R. J. (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acid. Res.*, 31: 3688–3691.
- Wakiya, Y. (1929) Japanese food oysters. *Jap. J. Zool.*, 2: 359–367.
- Wang, H., Guo, X., Zhang, G. and Zhang, F. (2004) Classification of jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis. *Aquaculture*, 242: 137–155.