

短 報

武庫川水系に生息する野生メダカの遺伝子型分布 及びヒメダカ遺伝子の移入実態

神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科 横 田 弘 文

神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科 桑 原 なつき

神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科 中 野 瑛 子

神戸女学院大学人間科学部環境・バイオサイエンス学科 江 口 さやか

Genotype distribution in wild populations of medaka inhabiting the Muko river system and the actual state of genetic introgression from the domesticated orange-red fish (hi-medaka). Hirofumi Yokota, Natsuki Kuwahara, Eiko Nakano and Sayaka Eguchi (*Department of Biosphere Sciences, Faculty of Human Sciences, Kobe College*)

要旨：武庫川水系に生息する野生メダカの遺伝子型の分布状況及び遺伝子汚染の実態を明らかにするため、上流及び下流の13の生息地点から計86尾を採取し、ミトコンドリアDNAを用いた遺伝子型及びヒメダカ体色原因遺伝子を指標にしたヒメダカ遺伝子の移入の有無を調査した。その結果、上流域に生息するメダカは丹南地域に固有の遺伝子型B39の単一集団であり、その生息南限は三田市の相野川支流付近であることが示唆された。また、上流域に生息する個体からはヒメダカ遺伝子の移入は確認されなかった。一方、下流域に生息するメダカ集団は遺伝子型B1aを主に、B9及びB22の3つの瀬戸内沿岸域に在来の遺伝子型で構成されていた。従って、武庫川の上流域と下流域に生息する集団は遺伝子型が異なるため、同一水系のメダカであっても相互に放流の対象にはならないことが明らかとなった。また、下流域の一部の生息地点の個体から東日本一帯に生息する遺伝子型B27が検出され、他地域からの人為的な移植集団が生息していることが示された。さらに、ヒメダカ遺伝子の移入状況を調査した結果、下流域の2地点で捕獲された2個体からヒメダカ遺伝子が検出され、特にその内の1個体は遺伝子型解析の結果では在来集団と判定されていた。従って、野生メダカの遺伝子汚染調査においては、遺伝子型解析と共にヒメダカ遺伝子の移入の有無を調べることによって、より精緻な評価が可能になるといえる。

キーワード：メダカ, PCR-RFLP, 国内外来魚, 遺伝子攪乱

はじめに

メダカは中国、韓国及び本州以南の日本列島に広く分布している小型淡水魚である。しかしながら、国内では水田や水路などの生息地の変貌に伴う生息環境の悪化や、近縁外来種による駆逐など

によりその生息数は年々減少し、現在では環境省レッドデータブックにおいて絶滅危惧Ⅱ類に分類されている（環境省、2014）。

国内に生息するメダカは全国スケールでの遺伝的構造が明らかにされている（Takehana et al., 2003）。すなわち、ミトコンドリアDNA (mt

DNA) のチトクロームb領域を用いた解析によって、国内の野生メダカは北日本集団、南日本集団、関東固有集団の三つに分類され、さらに北日本集団は3つの亜集団、南日本集団は11の亜集団に分かれるとされている。そして、最近の分類学的研究によって、北日本集団と南日本集団はそれぞれキタノメダカ (*Oryzias sakaizumii*) とミナミメダカ (*O. latipes*) の別種に分類された (Asai et al., 2011; 瀬能, 2013a)。なお、本論文における“メダカ”とは、2種に分類される以前の *O. latipes* を指す。

上述のようにメダカが地域ごとに独自の遺伝的特性を持った集団を形成していることは、一般的にはあまり知られていない。そのため、環境保全活動や教育活動による放流、養殖業者や販売店などからの逸出により、本来は他の水域に生息するメダカが在来集団と交雑し、各地で遺伝的攪乱が生じている。また、野生メダカの突然変異種であるヒメメダカは、ペットや熱帯魚の餌料として流通しており、その一部が環境中に流出することによる野生メダカとの交配も確認されている (小山・北川, 2009)。こうした人間活動による生息水域を越えた野生生物の混在状況は、「国内外来魚問題」として注目されている (瀬能, 2013b)。

武庫川は兵庫県東南部の篠山市、能勢町、三田市、神戸市北区、西宮市、宝塚市、伊丹市、尼崎市の7市1町を流域に持ち、県下有数の人口密集地を貫流する2級河川である (図1)。従って、上述のような善意の放流活動やペットとしての飼育魚の遺棄が起こりやすい状況下であり、先行研究においては、瀬戸内沿岸域には自然分布しない遺伝子型のメダカが武庫川下流域の用水路にて確認されている (浅川ほか, 2007; 江口ほか, 2012)。このように局所的には遺伝子汚染の現状が示されつつあるものの、武庫川水系全域にわたっての野生メダカの遺伝子型の分布や遺伝子汚染の実態は

明らかでない。そこで、本研究では武庫川の上流及び下流それぞれの水域に生息するメダカの遺伝子型解析を行い、武庫川水系における野生メダカ集団の縦断的な分布の特徴を明らかにした。さらに、捕獲した野生メダカにおけるヒメメダカ遺伝子の移入実態も調査したので合わせて報告する。

なお、メダカの捕獲に際し、ご協力及び情報提供をいただいた法西浩氏 (武庫川流域委員会)、田井彰人教諭 (篠山産業高等学校丹南校)、阪本義樹職員 (西宮市環境学習都市推進課)、高津一男職員 (伊丹市みどり公園課)、酒井崇明氏 (神戸市在住)、岡田憲昭氏 (大阪市在住)、中尾氏 (大阪市在住) 及び田井梨絵氏 (横浜国立大学大学院) に厚くお礼申し上げる。また、本稿の執筆にあたり、武庫川に関する資料を提供いただいた島田佳幸教諭 (尼崎市立上坂部小学校) 及び山本義和氏 (武庫川流域圏ネットワーク代表) にお礼申し上げる。本研究の一部は神戸女学院大学研究所からの研究助成金により行われた。

材料と方法

捕獲地点及び捕獲数

武庫川水系におけるメダカの捕獲は、2012年及び2013年の9月から11月にかけて、次のように水系を縦断的に行なった (図1)。上流部では篠山市篠山口 (注：厳密には加古川水系に属する。図1A) で5尾、南矢代の田松川 (図1B) で6尾、草野 (図1C) で1尾、三田市藍本日出坂 (図1D) で11尾、相野勝谷 (図1E) で6尾、下相野 (図1F) で7尾、広野 (図1G) で11尾、下流部では伊丹市天神川 (図1H) で10尾、西宮市仁川の上流と武庫川本流との合流部付近 (図1I及びJ) で6尾と7尾、大森町 (図1K) で5尾、尼崎市武庫之荘 (図1L) で1尾、そして武庫町 (図1M) で10尾の、計13地点から合計86尾を採取した。

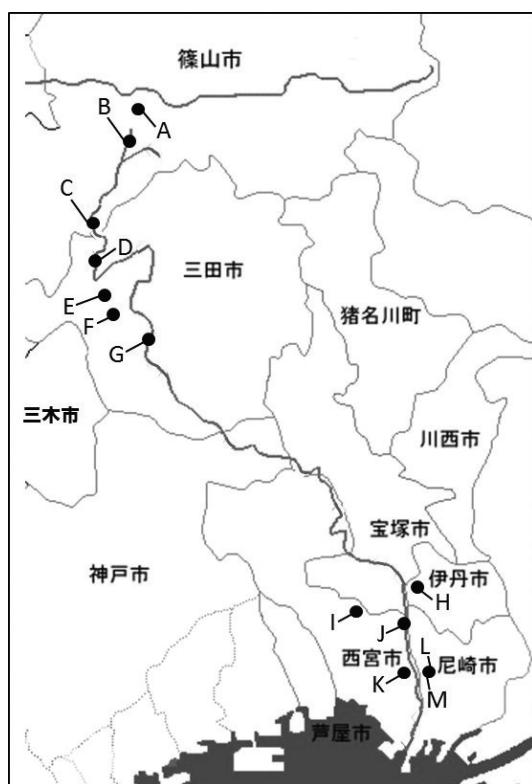


図1. 本研究におけるメダカの捕獲地点。A. 篠山口, B. 南矢代の田松川, C. 草野, D. 藍本日出坂, E. 相野勝谷, F. 下相野, G. 広野, H. 天神川, I, J. 仁川の上流と武庫川本流との合流部付近, K. 大森町, L. 武庫之荘, M. 武庫町。

なお、メダカ保全の観点から捕獲場所に関する詳細な記述は控える。捕獲にはタモ網を用い、捕獲したメダカは眼科用ハサミを用いて尾ひれの末端から1 mm程度を切除した後、活魚のまま放流した。切除した尾ひれの断片は99.5%エタノールに浸漬させた後、研究室に持ち帰り、DNA抽出時まで-20℃で保存した。

遺伝子型解析

尾ひれ断片からのDNA抽出はDNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) を用い、プロトコール

に従って行なった。遺伝子型の解析はTakehana et al. (2003) の方法を一部改変して実施した。すなわち、抽出したDNAを鋳型として、PCR (polymerase chain reaction) 法によりチトクロームb遺伝子 (cytb) 断片を増幅させた。プライマーはCytb Fa (5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC-3') とCytb Rva (5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG-3') を用いた。PCR反応液は、dNTP 4 μ l (0.2 mM), DNA合成酵素ExTaq (Takara) 1 μ l (5 U), 10×ExTaq バッファー 5 μ l, プライマー各 5 μ l (各0.25 μ M), ミリQ水25 μ l, DNA溶液 5 μ lを混合して50 μ lとした。なお、1個体につき50 μ lのPCR反応液を2本調製した。調製した反応液は94℃で2分間の熱変性を行った後、94℃で1.5分、55℃で2分、72℃で2分のPCR反応を30サイクル行った。PCR増幅産物は2本分をプールしてMiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製した。手順はKitのプロトコールに従った。

次に、増幅したcytb遺伝子断片の多型をRFLP (restriction fragment length polymorphism) 法により解析した。増幅、精製したDNA断片を4種類もしくは5種類の制限酵素 (HaeⅢ, MboⅠ, MspⅠ及びRsaⅠの4種類、もしくはTaqⅠも加えた5種類、いずれもタカラバイオ) で切断した。酵素反応は製造元の奨励条件で実施した。それぞれの制限酵素によって切断されたDNA断片は、0.01%のエチジウムブロマイド (ナカライテスク) を含む3%アガロースゲル (ニッポンジーン) を用いた電気泳動により分離し、UV光の下で写真撮影した。TaqⅠ酵素による切断片の電気泳動には、3%NuSieve 3:1アガロースゲル (タカラバイオ) を用いた。制限酵素による切断片のパターンをTakehana et al. (2003) に記載されているパターンに照合させ、遺伝子型 (マイトタ

イブ) を決定した。

ヒメダカ遺伝子の移入実態調査

中井ほか (2011) の方法に従った。メダカ尾ひれより抽出したDNAを鋳型とし、PCR法によりヒメダカ体色原因遺伝子マーカーであるbマーカーを有しているか否かを調査した。プライマーはForward (5'-GGA GCA GCM TCT GTG AGA ACA-3') とReverse (5'-GGT CCT CTG ACA GCA GGG TC-3') を用いた。PCR反応液は、dNTP 0.4 μ l (0.05 mM), DNA合成酵素ExTaq (Takara) 0.4 μ l (2 U), 10 $\times$ ExTaq バッファー 2 μ l, プライマー各0.4 μ l (各0.5 μ M), ミリQ水15.4 μ l, DNA溶液 1 μ lを混合して20 μ lとした。調製した反応液は94 $^{\circ}$ Cで2分間の熱変性を行った後、94 $^{\circ}$ Cで0.5分、70 $^{\circ}$ Cで0.5分、72 $^{\circ}$ Cで1分のPCR反応を30サイクル行った。増幅産物は、0.01%のエチジウムブロマイド含有3%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、UV光の下で写真撮影した。正常な野生メダカにおいては約900bpの増幅産物のみ (B/B) が、ヒメダカでは約800bpの増幅産物のみ (b/b) が、野生メ

ダカとヒメダカとの交雑個体は約900 bpと約800 bpの増幅産物 (B/b) が検出される (中井ほか, 2011)。

結果及び考察

遺伝子型解析

捕獲したメダカの遺伝子型を表1に示した。上流域においては、まず篠山市の加古川水系との分水界付近 (図1 A及びB) に生息するメダカはいずれも遺伝子型B39であった。少し下流の篠山市草野、三田市藍本日出坂及び相野勝谷 (図1 C～E) で捕獲した個体もすべてB39であった。日本全土に生息するメダカの遺伝子型の分布を調査した先行研究では、B39は丹南地域にのみ出現する地域特異性の高い遺伝子型であることが示されている (Takehana et al., 2003)。従って、上記捕獲地点に生息するメダカは、単一の遺伝子型B39で構成された在来集団であることが示唆された。一方、武庫川の支流である相野川を挟んで、相野勝谷より約2 km南方に位置する下相野 (図1 F) で捕獲したメダカは、すべて遺伝子型B1aであっ

表1. 武庫川水系に生息する野生メダカの遺伝子型及びbマーカーを用いたヒメダカ遺伝子の検出。

図1	捕獲地点			捕獲 尾数	遺伝子型(マイトタイプ)						bマーカー			
					B-VII亜群				B-II亜群		不明	B/B	B/b	b/b
					(丹南在来)	(瀬戸内沿岸在来)			(東日本在来)					
						B39	B1a	B22	B9	B27				
A	加古川水系	篠山市	篠山口	5	5							5		
B	武庫川上流	篠山市	南矢代	6	6							6		
C			草野	1	1						1			
D		三田市	藍本日出坂	11	11						11			
E			相野勝谷	6	6					6				
F			下相野	7		7				7				
G			広野	11	2	8				1	11			
H	武庫川下流	西宮市	仁川上流	6		5		1			6			
I			仁川下流	7		6	1			7				
J		伊丹市	天神川	10		5	5			10				
K			西宮市	大森町	5		5			4	1			
L		尼崎市	武庫之荘	1					1		1			
M			武庫町	10		10				10				

た。B1aは瀬戸内沿岸域に広範囲に出現する遺伝子型であり (Takehana et al., 2003), 先行研究においても尼崎市及び西宮市内に生息する野生メダカ集団の中に見出されている (浅川ほか, 2007; 江口ほか, 2012)。さらに, 武庫川と相野川との合流付近の広野 (図 1 G) では, 11尾中 2 尾が B39, 8 尾が B1a と判定され, 1 尾はいずれにも該当しない不明型であった。遺伝子型 B39 はこの地点を超えて下流域では確認されなかった。以上の結果から, 武庫川の上流域には丹南地域に固有の遺伝子型である B39 の野生メダカが単一集団として生息しているが, 武庫川水系における生息南限は相野川付近であることが示唆された。

水域の連続性や分断が淡水魚類の集団構成や遺伝的多様性に影響を及ぼすことが知られている。遺伝子型 B39 の生息域の推定境界である相野川の北部には, 武庫川本流の大屈曲部 (通称「曲がり」) が存在し, この「曲がり」で低位段丘を縁取るようにして U 字型に流れる (図 1 D の下流付近)。武庫川本流は段丘形成後ある時期まで, 現在の流路ではなく相野川に沿って流れていた可能性も指摘されていることから (小林, 2002), 現在の流路が形成される過程で個体群の分断が生じたのかもしれない。すなわち, 移動性が低いメダカにおける遺伝子型 B39 と B1a との生息境界には武庫川の地理的地史的条件が関係する可能性が推察される。これを検証するには, この流域付近に生息するメダカ集団の詳細な遺伝子型解析と共に, 異なる魚種を対象にした解析や地形及び地史との関係性のさらなる考察が必要である。

武庫川下流域における 2 つの支流の仁川及び天神川 (図 1 H~J) では, 3 種類の遺伝子型 (B1a, B22 及び B9) が検出されたが, これらは出現頻度の差異はあるが, いずれも瀬戸内沿岸域で広く検出される遺伝子型であり (Takehana et al., 2003), 尼崎市及び西宮市内の小学校のビオ

トープ池や用水路に生息するメダカからも検出されている (浅川ほか, 2007; 江口ほか, 2012)。また, 西宮市大森町 (図 1 K) 及び尼崎市武庫町 (図 1 M) で捕獲した個体はすべて B1a であった。一方, 尼崎市武庫之荘 (図 1 L) の 1 尾は東日本一帯に生息する B-II 亜群に属する遺伝子型 B27 と判定された。遺伝子型 B27 のメダカも, 先行研究において尼崎市及び西宮市内の用水路から見出されている (浅川ほか, 2007; 江口ほか, 2012)。以上の結果から, 武庫川下流域に生息する野生メダカは少なくとも 3 つの遺伝子型集団 (B1a, B22 及び B9) で構成されており, 中でも遺伝子型 B1a が主要な在来集団である可能性が示唆された。さらに, 武庫川下流域の野生メダカの生息場所の多くは在来集団のみで構成されているが, 一部は他地域からの人為的な移植集団が生息していることがあらためて示された。また, 武庫川水系全域を通して見た場合, 上流域と下流域に生息する集団は遺伝子型が異なるため, 同一水系のメダカであっても相互に放流の対象にはならないことが明らかとなった。

ヒメダカ遺伝子の移入実態

武庫川上流域の図 1 A~G において捕獲したメダカからは b マーカーは検出されず, すべて野生型 (B/B) であった (表 1)。また, 下流域の図 1 H~J 及び M におけるメダカからも b マーカーは検出されなかった (表 1)。従って, これら生息地点の野生集団にはヒメダカ遺伝子の移入は起こっていないことが示唆された。一方, 尼崎市武庫之荘 (図 1 L) の 1 尾は遺伝子型 B27 であることから, 人為的な移植個体と判定されたが, 加えて b マーカーも検出された (B/b, 表 1)。B27 はヒメダカ由来の遺伝子型 (ミイトタイプ) であり, 野生メダカにおける遺伝子型 B27 と b マーカーの検出とは高い共通性が認められている (中井ほか,

2011)。さらに、西宮市大森町（図1K）においても、5尾中1尾のメダカからbマーカーが検出された（表1）。この生息地の個体はすべて遺伝子型B1aであり、在来の遺伝子型集団と判定されたが、ヒメダカ遺伝子の移入が認められた。捕獲時には多数の野生（クロ）メダカの群泳は観察されたが、ヒメダカは確認できなかったことから、過去にこの生息場所にヒメダカが放流され、そのヒメダカとの交雑個体の子孫を捕獲したものと推察される。中井ほか（2011）が指摘しているように、こうしたmtDNAの遺伝子型解析では在来集団と判定されるような個体であっても、bマーカーを用いた解析を行なうことによって、より精緻に他集団との交雑の推定が可能となるため、野生メダカの集団構造解析においては両方の解析手法を組み合わせることが重要であるといえる。

引用文献

- Asai, T., H. Senou & K. Hosoya. 2011. *Oryzias sakaizumii*, a new rice fish from northern Japan (Teleostei: Adrianichthyidae). Ichthyol. Explor. Freshwaters, 22: 289-299.
- 浅川絵美・株根京子・瀬口結以・原小百合・服部宣明・渡部 健. 2007. PCR-RFLP法によるビオトープ導入メダカ *Oryzias latipes* の系統解析. 関西自然保護機構会誌, 28: 163-166.
- 江口さやか・石田紗也・養田 唯・浦部文香・山本義和・横田弘文. 2012. 神戸女学院および西宮市内に生息する野生メダカ (*Oryzias latipes*) の遺伝子型分析. 神戸女学院大学論集, 59: 11-20.
- 環境省自然環境局野生生物課（編）. 2014. 第4次レッドリスト（汽水・淡水魚類）別添資料7, 4 pp. 環境省自然環境局野生生物課, 東京.
- 小林文夫. 2002. 三田盆地西部の谷中分水界 兵庫県三田盆地西部における武庫川水系と加古川水系の谷中分水界. 人と自然, 13: 29-35.
- 小山直人・北川忠生. 2009. 奈良県大和川水系のメダカ集団から確認されたヒメダカ由来のミトコンドリアDNA. 魚類学雑誌, 56: 153-157.
- 中井宏施・中尾遼平・深町昌司・小山直人・北川忠生. 2011. ヒメダカ体色原因遺伝子マーカーによる奈良県大和川水系のメダカ集団の解析. 魚類学雑誌, 58: 189-193.
- 瀬能 宏. 2013a. メダカ科. 「日本産魚類検索全種の同定 第三版」（中坊徹次編）, pp. 649, 1923. 東海大学出版会, 神奈川.
- . 2013b. 見えない脅威“国内外来魚”どう守る地域の生物多様性. 「国内外来魚問題」（日本魚類学会自然保護委員会編）, pp. 3-18. 東海大学出版会, 神奈川.
- Takehana, Y., N. Nagai, M. Matsuda, K. Tsuchiya & M. Sakaizumi. 2003. Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of Medaka, *Oryzias latipes*. Zoological Science, 20: 1279-1291.