関西自然保護機構会誌 28（2）：163－166, 2007

PCR-RFLP法による ビオトープ導入メダカ *Oryzias latipes* の系統解析

国際環境専門学校 浅川絵美・株根京子・瀬口結以・原 小百合・服部宣明・渡部 健

PCR-RFLP analysis of the cytochrom *b* gene in populations of Medaka, *Oryzias latipes,* in school biotopes. Emi Asakawa, Kyoko Kabune, Yui Seguchi, Sayuri Hara, Nobuaki Hattori and Takeshi Watanabe（*International College of Environment*）

はじめに

生態系および生物多様性の保全は，人類社会が取り組むべき最も重要な課題の一つとなっている（環境省，2002）。生物多様性は生態系レベル，種レベル，そして種内の遺伝的レベルという多面的な概念であるが，近年，野生生物の保全を具体的に試みる場合に重要な対象として注目されるのは，進化的に生じた生物多様性の構成単位である地域個体群である（Ryder，1986）。すなわち，種内にみられる地域固有の遺伝子型を保全することで，種内の多様性を維持することに重点が置かれるようになってきた。

地域個体群や生物多様性の保全を目的として日本魚類学会が策定した「生物多様性の保全をめざした魚類の放流ガイドライン」（放流ガイドライン2005）では，放流個体（特に希少種）の選定の指針を，「基本的に放流個体は，放流場所の集団に由来するか，少なくとも同じ水系の集団に由来し，もとの集団がもつさまざまな遺伝的・生態的特性を最大限に含むものとするべきである。」としている。

近年，日本在来の種としては最も小型の淡水魚であるクロメダカ *Oryzias latipes* について，その遺伝子レベルでの地理的変異の実態が調査された（Matsuda et al., 1997；Takehana et al., 2003）。

ミトコンドリアＤＮＡを対象とした分子系統解析の結果，日本に生息するクロメダカは北日本集団と南日本集団に大きく二分され，南日本集団は更に９つの地域型に細分されることが明らかになっている（酒泉，1997）。

クロメダカの野生個体群は，農薬の使用や生活排水などによる環境の悪化，外来種のカダヤシとの競合やブラックバスによる捕食圧，そして特に，護岸工事や水路の整備などによる生息場所の分断化などによって分布域や個体数が急速に減少し（細谷，2000），その結果，1999年には，環境省（当時の環境庁）の発表するレッドリストで，絶滅危惧種に指定されるに至っている（環境庁，1999）。一方，社会では自然再生の取り組みが本格化するなか，各地でビオトープの造成が盛んに行われるようになってきた。兵庫県では「兵庫ビオトーププラン」が策定され（兵庫県，1995），自治体・学校を中心としたビオトープ造成が盛んに行われてきた。その際に，絶滅危惧種指定という話題性と，狭い池でも比較的維持し易いなどの理由から，ビオトープの池へのクロメダカの導入が盛んに行なわれた。しかし，導入されたクロメダカの産地については明らかでない場合が多く，異なる地域の遺伝子型のクロメダカが導入される

関西自然保護機構業績 第398号 関西自然保護機構研究助成 No.72

ことによる遺伝子攪乱が生じている可能性が指摘されていた。

兵庫県では，これまでビオトープへ導入されたクロメダカにおける遺伝子攪乱が懸念されつつも，体系的な調査は行われていなかった。そこで我々は，尼崎市と周辺地域の学校につくられたビオトープの池，および周辺河川・水路に生息しているクロメダカを対象として，遺伝子攪乱の実態を把握することを目的とした調査を行った。

調査方法

2005年7月～11月に，尼崎市，伊丹市，西宮市のビオトープに造成されている池（合計16池），および武庫川，猪名川水系の6地点で，クロメダカ（各地点で1～6個体，合計68個体）を採集し，99%エタノールで固定した。

固定された標本個体から尾鰭を切り取り，プロティナーゼKによる組織溶解の後，フェノール－クロロホルム処理により全DNAを抽出した。

クロメダカの遺伝子型を分析するために，ミトコンドリアのシトクロムb遺伝子を完全に含む領域（1241bp）を用いて，PCR-RFLP法による分析を行なった。Takehana et al.（2003）の手法に従い，プライマー（5'-AGGACCTGTGGCTTGAAAAACCAC-3'および5'-TYCGACYYCCGRWTTACAAGACCG-3'）（シグマアルドリッチジャパン株式会社）を用いたPCR増幅を行なった。増幅試薬にはPremix Ex Taq（タカラバイオ株式会社）を用い，反応条件は変性温度94℃（1分間），アニーリング55℃（1分間），伸長反応72℃（1分間）とし，反応サイクルは30回とした。DNA増幅には，Mastercycler Gradient（Eppendorf社）を用いた。

増幅されたシトクロムb遺伝子試料について，5種類の制限酵素（*Hae*Ⅲ，*Mbo*Ⅰ，*Msp*Ⅰ，*Rsa*Ⅰ，*Taq*Ⅰ）を作用させ，断片長多型の分析を行なった。断片長パターンによる遺伝子型の判定および記号名称はTakehana et al.（2003）に従った。

結　果

今回調査した16カ所のビオトープ池および河川6カ所から採集された，のべ68個体のDNA試料からは7つの遺伝子型が確認された（表1）。調査した全てのビオトープ池から，瀬戸内型（B-Ⅶ）の遺伝子型（B1a，B9，B22，B39のいずれか）が確認された。また，5カ所のビオトープ池からは東日本型の個体が確認された。そのうちSubclade B-Ⅱ（東日本Ⅱ型）の遺伝子型（B27）が4カ所，Subclade B-Ⅰ（東日本Ⅰ型）の遺伝子型（B11）が1カ所から確認された。また，北日本集団（Subclade A-Ⅰ）の遺伝子型（A18）をもつ個体が2カ所のビオトープ池で確認された（ただし，同一の小学校敷地内の池である）。

河川から採集されたクロメダカについては，瀬戸内型（Subclade B-Ⅶ）が調査した全ての地点から確認された。そのうち尼崎市内の用水路（西立花）からはSubclade B-Ⅱ（東日本Ⅱ型）の遺伝子型（B27）が，武庫川（西宮市側）からはSubclade B-Ⅰ（東日本Ⅰ型）の遺伝子型（B11）が確認された。

考　察

今回調査した阪神地域に自然分布すると考えられるクロメダカの遺伝子型は，瀬戸内型である（Takehana et al., 2003）。分析の結果，調査したビオトープの全てで，瀬戸内型に属する遺伝子型の個体が確認されたが，一方で，43.8%（16カ所中の7カ所）という高い割合で，自然分布の集

調査地		Subclade	B-VII				B-I	B-II	A-I	不明
		Mitotype	B1a	B9	B22	B39	B11	B27	A18	
尼崎市	尼崎スカイビオトープ（3）	ビオトープ	1	1						1
	市立西小学校（3）	ビオトープ	1		2					
	市立成文小学校　ひょうたん池（2）	ビオトープ	2							
	市立成文小学校　観察池（4）	ビオトープ	2					2		
	市立若葉小学校（3）	ビオトープ	3							
	市立成徳小学校（4）	ビオトープ	1			3				
	市立立花西小学校 とんぼ池（3）	ビオトープ			1				1	1
	市立立花西小学校 水生動植物観察池（3）	ビオトープ	2						1	
	市立園田小学校（3）	ビオトープ			2			1		
	市立塚口小学校（3）	ビオトープ	2					1		
	武庫川（尼崎市側）（3）	河川	3							
	猪名川（園田橋）（3）	河川	2							1
	用水路（西立花）　（3）	河川	2					1		
西宮市	市立鳴尾東小学校（3）	ビオトープ						3		
	市立広田小学校（3）	ビオトープ	2	1						
	市立段上小学校（1）	ビオトープ	1							
	武庫川（西宮市側）（6）	河川	3				1			2
伊丹市	伊丹市昆虫館ビオトープ（3）	ビオトープ	3							
	昆陽里小学校（3）	ビオトープ	3							
	昆陽里南公園ビオトープ（3）	ビオトープ	1				2			
	天王寺川(下流)（3）	河川	3							
	天王寺川(上流)（3）	河川	1		1					1

表1． ビオトープおよび河川で採集されたクロメダカの遺伝子型（Mitotype）．（ ）内の数字は分析個体数．遺伝子型および遺伝子型集団（Subclade）の略記号は Takehana et al.,（2003）に従う．

団とは異なる地域型のメダカの存在が確認された。メダカは移動能力が低い小型の淡水魚であり，自力で遠く隔てられた水系へ移動することは考えにくい。また，先行研究においても，瀬戸内型と隣接する地域型ではあるが，北日本集団（A18）や，東日本型（B11，B27）の遺伝子型をもつ野生メダカ個体は，関西の瀬戸内側では確認されておらず（Takehana et al., 2003），これらの遺伝子型を持つ個体は，人為的に持ち込まれた可能性が強い。今回の調査結果により，ビオトープにおける遺伝子攪乱が，現実に大規模に生じている事が明らかになった。

さらに，調査した河川6カ所のうち2カ所で，瀬戸内型ではないクロメダカ（東日本型）が確認された。このことは，自然分布とは異なる遺伝子型をもつクロメダカが阪神地域の自然水系へ拡散しつつあることを示唆する。今回の調査では，各調査地あたり調べた個体数は1から6個体（平均3.1個体）と少数であるため，実際にはさらに多くの場所に移入型（自然分布の集団とは異なる遺伝子型）のメダカが存在すると推測される。遺伝子攪乱の実態をより正確に把握するためには，調査地点を増やし，各地点で調査する個体数を増やす必要がある。特に，管理の困難な開放水系である河川での遺伝子攪乱の実態調査をすることは緊急の課題である。

引用文献

細谷和海．2000．メダカの生息状況と保護．水環境学会誌，23：135－139.

兵庫県．1995．兵庫ビオトーププラン．117pp. ㈶ひょうご環境創造協会，兵庫.

環境庁．1999．汽水・淡水魚類のレッドリストの見直しについて，1－6．環境庁自然保護局野生生物課編，東京.

環境省. 2002. 新・生物多様性国家戦略. 環境省編. 315pp. ㈱ぎょうせい, 東京.

Matsuda, M., Yonekawa, H., Hamaguchi, S. & Sakaizumi, M. 1997. Geographic variation and diversity in the mitochondrial DNA of the medaka, *Oryzias latipes*, as determined by restriction endonuclease analysis. Zoological Science, 14：517－526.

Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics：the dilemma of subspecies. Trends in Ecology and Evolution, 1：9-10.

酒泉満. 1997. 淡水魚地方個体群の遺伝特性と系統保存.「日本の淡水魚の現状と系統保存」(長田芳和, 細谷和海編), 218－227. 緑書房, 東京.

Takehana, Y., Nagai N., Matsuda M., Tsuchiya K., and Sakaizumi M. 2003. Geographic variation and diversity of the cytochrome *b* gene inJapanese wild populations of Medaka, *Oryzias latipes*. Zoological Science, 20：1279-1291.