

明石川水系に生息するメダカの遺伝子型分布および遺伝的搅乱

江 口 さやか^{*1} 文 木 春 菜^{*2} 横 田 弘 文^{*3}

Genotype Distribution and Genetic Disturbance
in Wild Populations of Medaka Inhabiting the Akashi River System

EGUCHI Sayaka^{*1} FUMIKI Haruna^{*2} YOKOTA Hirofumi^{*3}

*1 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 嘱託教学職員

*2 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 卒業生

*3 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 准教授

連絡先：横田弘文 h-yokota@mail.kobe-c.ac.jp

要　　旨

明石川水系に生息するメダカについて、在来集団の遺伝子型分布および外来集団の移入による遺伝的搅乱の実態を明らかにするため、9地点より計65尾のメダカを捕獲し、ミトコンドリアDNAを用いた遺伝子型を解析すると共に、ヒメダカ体色原因遺伝子（*b*マーカー）を指標にしたヒメダカ遺伝子移入の有無を調査した。遺伝子型分布については、8地点で捕獲した62尾の遺伝子型がいずれもB1aであったことから、明石川水系の野生集団は瀬戸内沿岸在来の遺伝子型B1aのみで構成されていることが示唆された。しかしながら、中流域の2地点で各々捕獲した1尾、計2尾からは東日本在来の遺伝子型B27が検出され、さらに中流域の1地点で捕獲した1尾からはヒメダカ遺伝子の移入が確認された。以上の結果から、明石川水系のメダカは、全体を通してみた場合、単一の遺伝子型からなる在来集団であるが、中流域に生息する一部の在来集団に遺伝的搅乱が生じていることが示唆された。

キーワード：遺伝子型分析、遺伝子移入、国内外来種、チトクローム *b* 遺伝子、PCR-RFLP

Abstract

To characterize the genotype distribution of wild populations of medaka inhabiting the Akashi River system and to determine the actual state of genetic disturbance due to ingressions of adventive populations, we conducted a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the mitochondrial cytochrome *b* gene and PCR analysis of the causative gene for the orange-red strain (hi-medaka), respectively. In total, we collected 65 fishes from 9 sites, 62 of which from 8 sites had the B1a mitotype, which is a native genotype belonging to the Setouchi subgroup and is found at various locations within Hyogo Prefecture. This result suggests that the native populations of medaka in the Akashi River system comprise only a single genotype. However, 2 fishes from 2 sites in the middle basin had the B27 mitotype, which belongs to the Higashi-nihon II subgroup and, therefore, this fish did not originally inhabit the Akashi River system. Moreover, genetic introduction was confirmed in 1 fish from a site in the middle basin, as evidenced by its hi-medaka sequence. In summary, the Akashi River system comprises a local population of wild medaka that constitutes a single genotype. However, this study suggests that genetic disturbance has occurred in certain medaka populations in the middle basin.

Keywords: genotypic analyses, introgression, domestic alien species, cytochrome *b* gene, PCR-RFLP

1. 研究の背景と目的

メダカは日本列島において本州以南に広く生息する小型魚類であるが、生息環境の悪化や外来種との競合に伴って生息数が減少し、現在では絶滅危惧 II 類 (VU) に指定されている¹⁾。その上、国内に生息するメダカ同士の遺伝的搅乱も懸念されている。すなわち、現在国内に生息するメダカは、青森県の東部から日本海沿いに丹後半島の東側まで生息するキタノメダカ (*Oryzias saakaizumii*) と、それ以外の日本列島に生息するミナミメダカ (*Oryzias latipes*) の 2 種に分類されているが²⁾、本来の生息域を越えてその生息が確認されている³⁾。なお、本論文ではキタノメダカとミナミメダカとを合わせてメダカと表記することとする。また、淡水魚であるメダカは水系ごとに地理的に隔離されて生息しており、同一種であっても地域ごとに特有の遺伝的特性を有している。日本魚類学会では「生物多様性の保全をめざした魚類の放流ガイドライン」を策定し、遺伝的分化を遂げつつある進化的単位としての地域集団を保護する必要性を訴えているが⁴⁾、その重要性は一般的にあまり知られていない。そのため、メダカの絶滅危惧種指定に伴って、保護活動や環境教育として人為的な放流が盛んになったことが、他地域のメダカや野生メダカの黄色変異種であるヒメダカの移入を許し、遺伝的搅乱を助長させている⁵⁾。各地域のメダカが長い年月をかけて獲得した遺伝的特性を守るために、遺伝子型分布および遺伝的搅乱の実態を把握し、地域住民へ啓発することが不可欠である。

著者らは、詳細な調査が行われていない兵庫県南部に生息するメダカについて、水系ごとの遺伝子型分布の解析および遺伝的搅乱の実態把握を進めている。これまでに武庫川水系に生息するメダカを調査し、下流域の生息集団の中に、本来東日本に生息する遺伝子型を持つメダカ、およびヒメダカ遺伝子の移入を確認し、市街地化が進んだ阪神南地域におけるメダカの遺伝子搅乱の実態を明らかにしてきた⁶⁻⁸⁾。兵庫県南部において、武庫川同様に流域の市街地化が進み、野性メダカの遺伝子搅乱が懸念される河川として明石川が挙げられる。明石川は神戸市北区北五葉付近を源に神戸市北区、西区を流れ、櫛谷川や伊川などの支川と合流した後、明石市を経て播磨灘に注ぐ、流域面積約 128.4 km^2 の二級河川である。面積の約 8 割が神戸市西区に属し、流域にはニュータウンも多い。平成21年の資料によれば、流域に占める土地利用の割合は、市街地約 23%、農地約 17%、山地・丘陵地約 60% となっている⁹⁾。そこで本研究では、兵庫県南部の野生メダカの遺伝子型分布および遺伝的搅乱の実態をより網羅的に解明することを目的に、明石川水系に生息するメダカの遺伝子型およびヒメダカ遺伝子の移入の有無を調査した。

2. 方 法

2.1 捕獲地点および捕獲数

捕獲地点は前述の 2 つの支川を含め、明石川水系をできるだけ網羅するよう設定した（図 1）。2016 年 7 月から 10 月にかけて、水系の本流である明石川では、上流域の神戸市北区山田

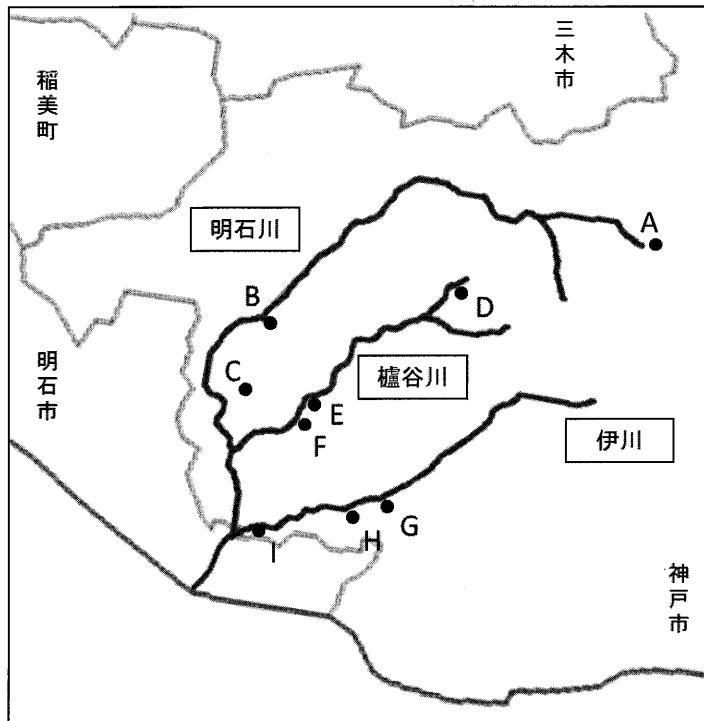


図1 明石川水系の主な河川とメダカの捕獲地点

町小河（A 地点）で10尾、中流域の同市西区平野町宮前（B 地点）で4尾と同町田中川（C 地点）で10尾、支流の櫛谷川では、上流域の神戸市西区櫛谷町寺谷（D 地点）で10尾、中流域の同区玉津町松本（E 地点）で1尾と同町二ツ屋（F 地点）で10尾、同じく支流の伊川では中流域の神戸市西区伊川谷町上脇（G 地点）で5尾と同区北別府（H 地点）で5尾、下流域の同区玉津町上池（I 地点）で10尾、計9地点より合計65尾のメダカを捕獲した。

捕獲したメダカは尾ひれを末端から1 mm 程度すばやく切り取り、活魚の状態で再びもとの場所に放流した。切り取った尾ひれは99.5%エタノールに浸漬して研究室に持ち帰り、分析に供するまで-20°Cで保存した。

2.2 尾ひれからのDNA抽出

尾ひれからのDNA抽出は DNeasy Blood and Tissue Kit（キアゲン）を用いた。DNA抽出手順は Kit のプロトコールに従った。

2.3 遺伝子型解析

Takehana ら¹⁰⁾の方法を一部改変して実施した。

2.3.1 チトクローム b 遺伝子の増幅

2.2で抽出したDNAを錆型として、PCR（polymerase chain reaction）法によりチトクローム b (cytb) 遺伝子断片の増幅を行った。PCRを行う際のプライマーとして、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 (タカラバイオ) 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、各メダカの DNA 溶液 5 μ l を混合して 50 μ l とし、1 尾あたり 2 本調製した。調製した反応液は 94°C で 2 分間の熱変性を行った後、94°C で 1.5 分、55°C で 2 分、72°C で 2 分の反応を 30 サイクル繰り返した。增幅産物は 2 本分をプールして MinElute PCR Purification Kit (キアゲン) を用いて精製した。手順は Kit のプロトコールに従った。

2.3.2 RFLP 法による *cytb* 遺伝子の多型分析

2.3.1 で増幅、精製した DNA 断片を、5 種類の制限酵素 (*Hae* III, *Mbo* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Taq* I、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% のエチジウムプロマイド (ナカラライテスク) 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。*Taq* I 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。5 種類の制限酵素による切断片のパターンを Takehana ら¹⁰⁾ によって報告されているパターンと照合し、マイトイタイプを決定した。

2.4 ヒメダカ遺伝子移入実態の解析

中井ら¹¹⁾の方法に従って行った。2.2 で抽出した DNA を鋳型として、PCR 法により体表面の黒色色素の発現に関与する *slc45a2* 遺伝子のプロモーター領域を増幅した。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 (タカラバイオ) 0.4 μ l (2 U)、10×ExTaq バッファー 2 μ l、プライマー各 0.4 μ l (各 0.25 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°C で 2 分間の熱変性を行った後、94°C で 0.5 分、70°C で 0.5 分、72°C で 1 分の反応を 30 サイクル繰り返した。増幅産物は 0.01% のエチジウムプロマイドを含む 1.2% 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。正常な野生型のメダカからは約 900 bp の増幅産物 (B/B) が、ヒメダカからは約 800 bp の増幅産物 (b/b) が、野生メダカとヒメダカとの交雑個体からは約 900 bp と約 800 bp の増幅産物両方 (B/b) が検出される¹¹⁾。

3. 結果および考察

3.1 明石川水系に生息するメダカの遺伝子型分布

明石川水系で捕獲したメダカの遺伝子型分布を表 1 に示した。今回調査対象とした A から I 地点で捕獲した 65 尾のうち、櫛谷川中流域の E 地点を除く 8 地点の 62 尾が、瀬戸内沿岸在来のメダカの遺伝子型 B 1 a であった。その他の遺伝子型に関しては 3.2 で後述する。先行研究において、瀬戸内沿岸域に生息する在来集団の遺伝子型は 9 種報告されている¹⁰⁾が、今回 B 1 a 以外の遺伝子型は確認されなかったことから、明石川水系のメダカの在来集団は単一の遺伝子型 B 1 a で構成されていることが示唆された。

表1 明石川水系に生息するメダカの遺伝子型及び b マーカー(ヒメダカ遺伝子)の移入状況

捕獲地点	捕獲尾数 (尾)	遺伝子型		b マーカー		
		B-VII 亜群		B-II 亜群		B/B
		瀬戸内沿岸 在来	東日本在来	不明	B/b	b/b
			B1a	B27		
A 明石川 上流域	神戸市北区	山田町小河	10	10		10
B 中流域	神戸市西区	平野町宮前	4	4		4
C		平野町田中川	10	10		9 1
D 横谷川 上流域		横谷町寺谷	10	10		10
E 中流域		玉津町松本	1		1	1
F		玉津町二ツ屋	10	10		10
G 伊川 中流域		伊川谷町上脇	5	5		5
H		北別府	5	4	1	5
I 下流域		玉津町上池	10	9	1	10

地点A~Iは図1の捕獲地点を示す。

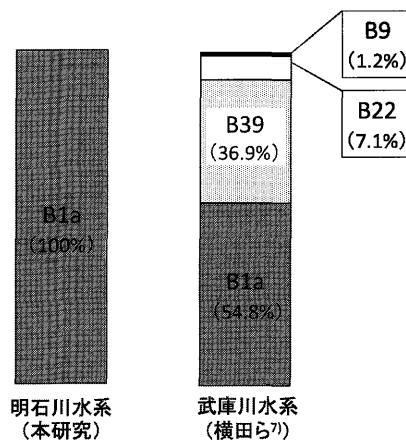


図2 明石川水系および武庫川水系で捕獲した瀬戸内沿岸在来メダカの遺伝子型の内訳

本研究における明石川水系での調査結果および先行研究における武庫川水系での調査結果⁶⁻⁸⁾のうち、瀬戸内沿岸域の在来集団とされる遺伝子型の内訳を図2に示す。武庫川水系のメダカはB1aが54.8%、B39が36.9%と、この2つの遺伝子型が優占し、その他B22が7.1%、B9が1.2%の全4種類の遺伝子型から構成されていた。これに対し、上述の通り明石川水系に生息する野生メダカの在来集団は、B1aが100%であり、武庫川水系の集団と比較して遺伝的多様性に乏しいことが示された。

上述の遺伝子型を持つメダカの捕獲場所を地図上に示した(図3)。B1aとB39に着目すると、六甲山地以南にある明石川水系全域と武庫川下流域には主としてB1aが、六甲山地以北の武庫川上流域には主としてB39が分布しており、六甲山地を境に遺伝子型分布が異なっていた。武庫川は、比較的勾配が緩やかな上流域の三田盆地から、勾配が急な武庫川峡谷を通り、再び勾配が緩やかな武庫平野に至る¹²⁾。上流域よりも中流域の流れの方が急になっている武庫川の河床勾配は、100万年前頃から始まったとされる六甲山地の隆起¹³⁾によるものであり、下

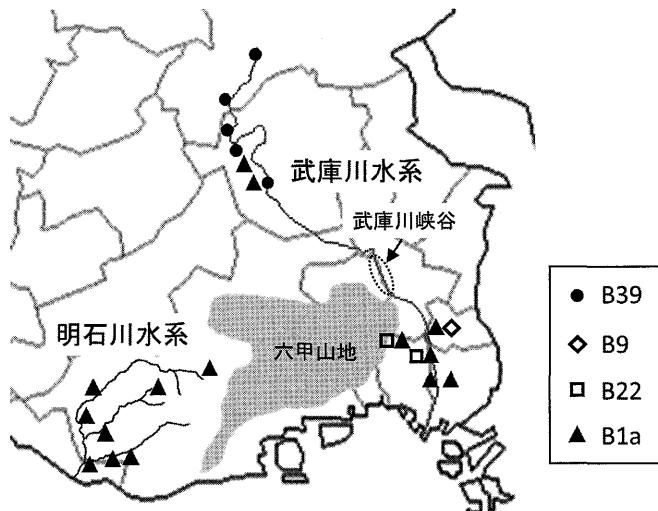


図3 明石川水系（本研究）および武庫川水系（横田ら⁷⁾）で捕獲した瀬戸内沿岸在来メダカの遺伝子型の地理的分布

流に行くにしたがって緩やかになる日本の一般的な河川とは大きく異なっている。この六甲山地の隆起が始まった時期は、Takehana ら¹⁰⁾の報告にあるメダカ（ミナミメダカ）の遺伝子型の分岐時期、50から230万年前とおおむね一致する。のことから、六甲山地の形成によりメダカ生息域が分断され、その後長年にわたって適応と進化が起こり、異なる遺伝子型の集団が形成された可能性が考えられる。また、武庫川水系は明石川水系に比べて流域面積が約4倍、幹川流路延長は約3倍^{9,12)}であり、水系の規模の違いが遺伝子型の多様性に違いをもたらしていることも考えられる。これらの仮説を検証するため、六甲山地の北側、明石川水系と武庫川水系との間を流域圈に持つ加古川水系など、兵庫県南部の他の水系について更なる調査を進めることとする予定である。

3.2 明石川水系に生息するメダカの遺伝的搅乱

本研究においては、瀬戸内沿岸在来の遺伝子型ではないメダカも確認された（表1）。すなわち、明石川の支流である櫛谷川中流域のE地点から1尾、同じく支流の伊川中流域のH地点から1尾の計2尾に東日本在来の遺伝子型B27が検出された。櫛谷川中流域のE地点は市民による放流活動が行われていたとの報告があり、捕獲したメダカは在来集団ではない可能性が示唆される。ただし、E地点では今回1尾しか捕獲できなかつたため、遺伝子型B27のメダカが集団として継続的に生息しているか否かは不明であり、今後の調査が必要である。他方、伊川中流域のH地点では、遺伝子型B27の個体と同時に在来集団の遺伝子型B1aの個体も確認された（表1）。このことは、H地点において、これら2つの遺伝子型の個体が交雑する可能性を示しており、在来集団の遺伝的搅乱が懸念される。武庫川水系を対象にした著者らの先行研究⁷⁾においても、下流域に生息するメダカからB27の遺伝子型が検出されている。従って、流域の市街地化が進んでいる阪神地区の河川においては、水系ごとの汚染範囲の差はあるもの

の、野性メダカ集団における遺伝的搅乱がおしなべて起こっているものと思われる。

本研究では、ヒメダカ遺伝子の移入についても分析した。その結果、明石川中流域のC地点から1尾、野生メダカとヒメダカとの交雑個体 (B/b) が検出された（表1）。C地点の残りの9尾並びに他の8地点で捕獲したメダカは全て、野生型 (B/B) だった。小山ら¹⁴⁾は市販のヒメダカおよびクロメダカの遺伝子型について調査し、流通しているヒメダカの遺伝子型はB27もしくはB1aであることを明らかにしている。更に、ヒメダカ交雑育種の際に生じた「野生型体色のヒメダカ」がクロメダカとして販売されているため、市販のクロメダカにはB27とB1aの遺伝子型が多く、本来の分布域以外からB27あるいはB1aの遺伝子型を有するクロメダカが捕獲された場合、市販のクロメダカの放流個体あるいはその子孫である可能性が高いことを指摘している。明石川中流域のC地点の1尾が、瀬戸内沿岸在来の遺伝子型B1aを有し、かつ (B/b) であったことは、この指摘を支持するものであり、C地点においては過去にヒメダカあるいはヒメダカとの交雑クロメダカが人為的に放流された可能性が推察される。このようなクロメダカとヒメダカとの交雑個体は、体色からはクロメダカと判別できない。また今回のように、在来集団がヒメダカと同じ遺伝子型B27もしくはB1aを有する場合、捕獲したメダカが地域在来のクロメダカなのか、ヒメダカとの交雑履歴がある個体なのかは、遺伝子型からは判定が困難である。そのため、ヒメダカ遺伝子 (b マーカー遺伝子) の移入の有無も合わせて調査し、これらの判定を精緻に実施していくことが重要である。

明石川水系は幸いなことに治水や利水を目的とした床固工や取水堰が数多く設置されている上、水量が少なく夏季には瀬切れを起こすなど、水系内のメダカの移動や集団の交流が起こりにくい状況にある^{15,16)}。そのため、今回中流域で確認されたメダカの在来集団における遺伝子搅乱が水系全体に広がる可能性は小さいといえる。しかしながら、昭和50年頃はほとんど水田だった明石川水系の中下流域周辺には、現在住宅地が多く広がっており、新たな遺伝子搅乱が起こる可能性も考えられる。周辺住民に対する国内外来種問題の周知と、遺伝子搅乱の定期的な実態調査が今後も必要である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、神戸カワバタモロコ保全推進協議会の大嶋範行氏、神戸女学院大学卒業生の北井秀美氏、玉一アクリウムの代表小田隆司氏および所属する小学生の皆さんにご協力いただきましたので、ここに記し、お礼を申し上げます。

参考文献

- 1) 環境省自然環境局野生生物課, 2003. 改正・日本の絶滅のおそれのある野生生物レッドデータブック—4 汽水・淡水魚類. pp. 162–163.
- 2) Asai, T., Senou, H., Hosoya, K., 2011. *Oryzias sakaizumii*, a new ricefish from northern Japan (Teleostei: Adrianichthyidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters 22(4), 289–299.
- 3) 山形県みどり自然課, 2018. 山形県レッドリスト（淡水魚類）改訂案について.
- 4) 森誠一, 2005. 生物多様性の保全をめざした魚類の放流ガイドライン. 応用生態工学 8(1), 107–110.

- 5) 竹花佑介, 北川忠生, 2010. シリーズ 日本の希少魚類の現状と課題 メダカ：人為的な放流による遺伝的攪乱. 魚類学雑誌 57(1), 76-79.
- 6) 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(1), 11-20.
- 7) 横田弘文, 桑原なつき, 中野瑛子, 江口さやか, 2014. 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. 地域自然史と保全 36(1), 53-58.
- 8) 桑原なつき, 2013. 武庫川及び猪名川水系に生息する野生メダカにおけるヒメダカ遺伝子の移入実態. 神戸女学院大学人間科学部卒業論文.
- 9) 兵庫県土整備部土木局総合治水課, 2009. 明石川水系河川整備基本方針.
- 10) Takehana, Y., Nagai, N., Matsuda, M., Tsuchiya, K., Sakaizumi, M., 2003. Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome *b* Gene in Japanese Wild Populations of Medaka, *Oryzias latipes*. Zoological Science 20(10), 1279-1291.
- 11) 中井宏施, 中尾遼平, 深町昌司, 小山直人, 北川忠生, 2009. 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. 魚類学会誌 58(2), 189-193.
- 12) 兵庫県土整備部土木局総合治水課, 2009. 武庫川水系河川整備基本方針.
- 13) 神戸市教育委員会, 2003. 兵庫県南部地震データ集6. 100万年前から隆起してきた六甲山.
<http://www2.kobe-c.ed.jp/shizen/strata/equake/mtrokko/index2.html> (2018年8月時点).
- 14) 小山直人, 森幹大, 中井宏施, 北川忠生, 2011. 市販されているメダカのミトコンドリアDNA遺伝子構成. 魚類学雑誌 58(1), 81-86.
- 15) 兵庫県土整備部土木局総合治水課, 2009. ひょうごの川・自然環境アトラスWeb版 健康診断図明石川水系. <https://web.pref.hyogo.lg.jp/ks13/documents/akashi-ken.pdf> (2018年8月時点).
- 16) 渡部守義, 神田佳一, 2006. 明石川の魚類生息環境評価に関する研究. 明石工業高等専門学校研究紀要 49, 88-94.

(原稿受理日 2018年9月14日)