

研究論文

宝塚市西谷地区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

中 嶋 綾 香^{*1} 奥 田 薫 子^{*2} 横 田 弘 文^{*3}

Genotype Distribution in Wild Populations of Medaka Inhabiting the Nishitani District of Takarazuka City
and the Actual State of Genetic Introgression from Domesticated Orange-red Fish (Hi-medaka)

NAKAJIMA Ayaka^{*1} OKUDA Kaoruko^{*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 卒業生

^{*2} 神戸女学院大学大学院 人間科学研究科 環境科学専攻 博士前期課程修了生

^{*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 教授

連絡先：横田弘文 h-yokota@mail.kobe-c.ac.jp

要 旨

環境省レッドリストで絶滅危惧Ⅱ類に指定されているメダカは、生息地域ごとに異なる遺伝子型を有しており、他地域のメダカを放流すると在来集団と交配し遺伝的攪乱が生じることが懸念されている。こうした背景を踏まえて、現在各地で野生メダカの遺伝子型解析が行われている。著者らの先行研究では、武庫川下流域において非在来の遺伝子型やヒメダカとの交雑が確認され、遺伝的攪乱が起きていることが示された。そこで本研究では、武庫川中流域にあたる宝塚市西谷地区に生息する野生メダカを対象に遺伝子型解析及びヒメダカ遺伝子の移入調査を実施した。9 地点より計76尾のメダカを採取し解析した結果、66尾が遺伝子型 B1a、5 尾が B39、5 尾が遺伝子型不明と判定された。B1a は全 9 地点で検出されたことから、先行研究の結果を合わせて考えると、武庫川の中・下流域は B1a が優占集団であることが示唆された。非在来の遺伝子型は検出されなかったことから、他地域のメダカの移入による遺伝的攪乱は確認されなかった。しかし、2 地点でヒメダカ遺伝子を保有した個体が検出されたことから、局所的ではあるがヒメダカとの交雑が生じていることが示唆された。

キーワード： ミナミメダカ、PCR-RFLP、国内外来種、遺伝子汚染

Abstract

Medaka, classified as endangered in the Red List of the Ministry of the Environment, exhibits distinct genotypes within different habitats zones. The potential for genetic disruption arising from interbreeding with non-native populations upon their introduction has prompted ongoing genotype assessments of wild medaka across multiple locations. Prior research revealed non-native genotypes and hybridization with domesticated orange-red fish (hi-medaka) in the downstream area of the Muko River, thereby suggesting the occurrence of genetic disturbance. Therefore, in this study, genotype analysis was conducted, and the introduction of hi-medaka genes among wild medaka populations in the Nishitani area of Takarazuka City, situated in the mid-Muko River region, was assessed. In total, 76 medaka individuals from 9 sites were collected and examined. The results revealed that 66 individuals exhibited the B1a genotype, 5 exhibited the B39 genotype, and 5 exhibited an unknown genotype. The presents of B1a across all nine sites and our previous findings indicated that B1a is the dominant population in the middle and downstream areas of the Muko River. The absence of non-native genotypes confirmed that no genetic disruption had occurred due to the introduction of medaka from other regions. Nevertheless, two sites harbored individuals bearing the hi-medaka gene, implying localized hi-medaka hybridization.

Keywords: minami-medaka, PCR-RFLP, domestic invasive species, genetic contamination

1 はじめに

一般に“メダカ”と呼ばれる小型淡水魚は、ダツ目メダカ科に分類され、日本、韓国、中国など東アジアに広く分布している¹⁾。我が国における野生のメダカ集団は、流れの緩やかな川やため池、灌漑用水路などに生息しているが、近年の都市開発や河川改修などにより生息地が消失し、それに伴い生息数も減少している。そのため、環境省が発表しているレッドリストでは絶滅危惧Ⅱ類（VU）に指定されている²⁾。

日本に生息するメダカは遺伝的な系統解析により、北日本に生息する北日本集団と南日本に生息する南日本集団に大きく分類され、現在ではそれぞれキタノメダカ（*Oryzias sakaizumii*）とミナミメダカ（*O. latipes*）の別種となっている³⁾。この別種分類に伴い、従来の“メダカ”の分類上の混乱が生じているため、それを整理するために酒泉はキタノメダカ（*O. sakaizumii*）とミナミメダカ（*O. latipes*）、そして中国・西韓集団であるチュウゴクメダカ（*O. sinensis*）と東韓集団であるコウライメダカ（*O. koreana*）の4グループをまとめて「メダカ種群 *O. latipes* (species) complex」と命名することを提案している⁴⁾。なお、本論文におけるメダカとはこのメダカ種群 *O. latipes* (species) complex を指す。

淡水魚であるメダカは水系ごとに、あるいは同一水系内であっても地理的に隔離されて生息しており、生息地域ごとに特有の遺伝的特性を有していることが知られている。Takehana ら⁵⁾は、国内に生息するメダカのミトコンドリア DNA 中のチトクローム b 遺伝子を対象に、PCR-RFLP（Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism）法を用いた解析を行い、67 種類の遺伝子型を同定している。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⁶⁾、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、その重要性は一般市民にはあまり知られていない。そのため、絶滅危惧種指定に伴い、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もたらし、その結果として遺伝的攪乱を引き起こしている⁷⁾。それぞれの生息地域のメダカが長い年月をかけて獲得した遺伝的形質を保持するためには、遺伝子型分布及び遺伝的攪乱の実態を把握し、地域住民へ啓発することが重要である。

著者らは、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調査を進めている。これまでに、武庫川水系⁸⁾及び明石川水系⁹⁾に生息するメダカを調査し、局所的ではあるが両水系の下流域において非在来の遺伝子型を持つメダカ、また、生息集団の中に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及び東播磨地域におけるメダカの遺伝的攪乱の実態を明らかにした。一方、阪神北地域にある宝塚市西谷地区は田園風景の残る自然豊かな里山地域であり、武庫川中流に注ぐ複数の支流が流れている（図1）。上述のように武庫川下流域ではメダカの遺伝的攪乱が生じていることから、西谷地区のある中流域にも影響が及んでいるのか否かを明らかにすることは、本水系における野生メダカの保全を図る上で重要で

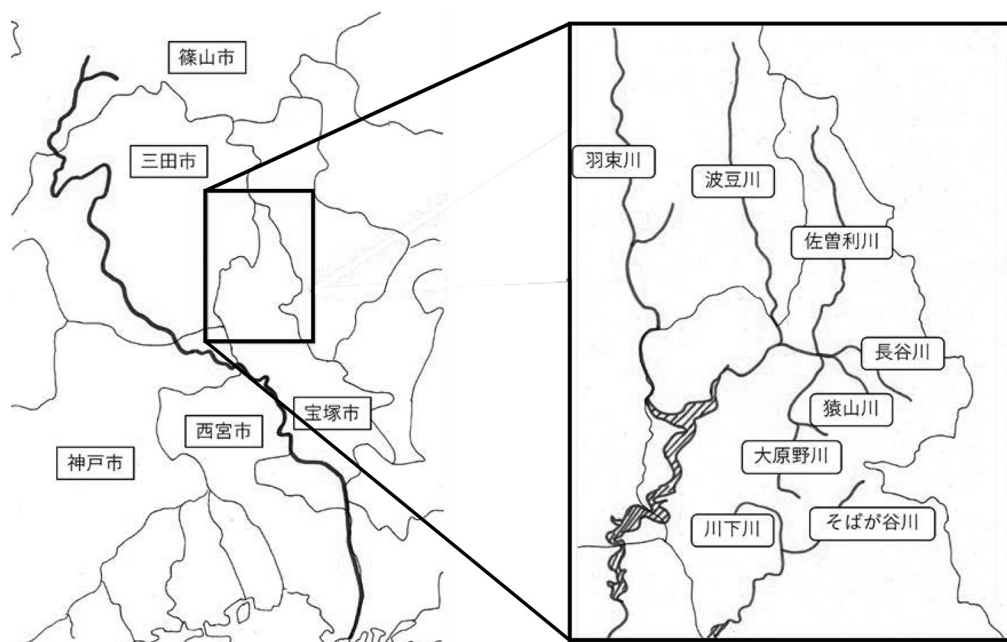


図1 武庫川本流及び宝塚市西谷地区を流れる主な支流

ある。さらに、武庫川上流で検出された遺伝子型である B39 は日本国内でも丹南地域でのみ検出される遺伝子型であり⁸⁾、この遺伝子型集団の生息域を詳しく知ることは本水系におけるメダカの遺伝的多様性を保つ上で不可欠である。そこで、本研究では武庫川中流に注ぐ支流に着目し、複数の支流が流れている宝塚市西谷地区周辺に生息するメダカの遺伝子型分布及びヒメダカ遺伝子の移入の実態を明らかにした。

2 材料及び方法

2-1 採取場所

メダカの採取は2019年7月25日、9月11日、10月31日に行った。採取に先立ち、地域住民への聞き込みや調査場所の下見を行い、集めた生息情報をもとに図2に示した計9カ所でメダカを採取した。具体的な採取場所は宝塚市上佐曾利山ノ神（図2a、図3a）、宝塚市上佐曾利谷口（図2b、図3b）、宝塚市上佐曾利藪ノ下（図2c、図3c）、宝塚市大原野大東（図2d、図3d）、宝塚市長谷サル山（図2e、図3e）、宝塚市大原野波坂（図2f、図3f）、宝塚市境野保与谷（図2g、図3g）、宝塚市玉瀬細尾（図2h、図3h）及び三田市上槻瀬（図2i、図3i）であった。

採取には小型魚類用のタモ網を使用した。採取したメダカは尾ヒレの先端の一部（約3mm片）を解剖ばさみで切除した後、生息場所へ放流した。切除した尾ヒレの一部は99.5%エタノールに入ったマイクロチューブに入れて研究室に持ち帰り、DNA抽出まで-20℃で保管した。



図2 本研究でのメダカの採取場所

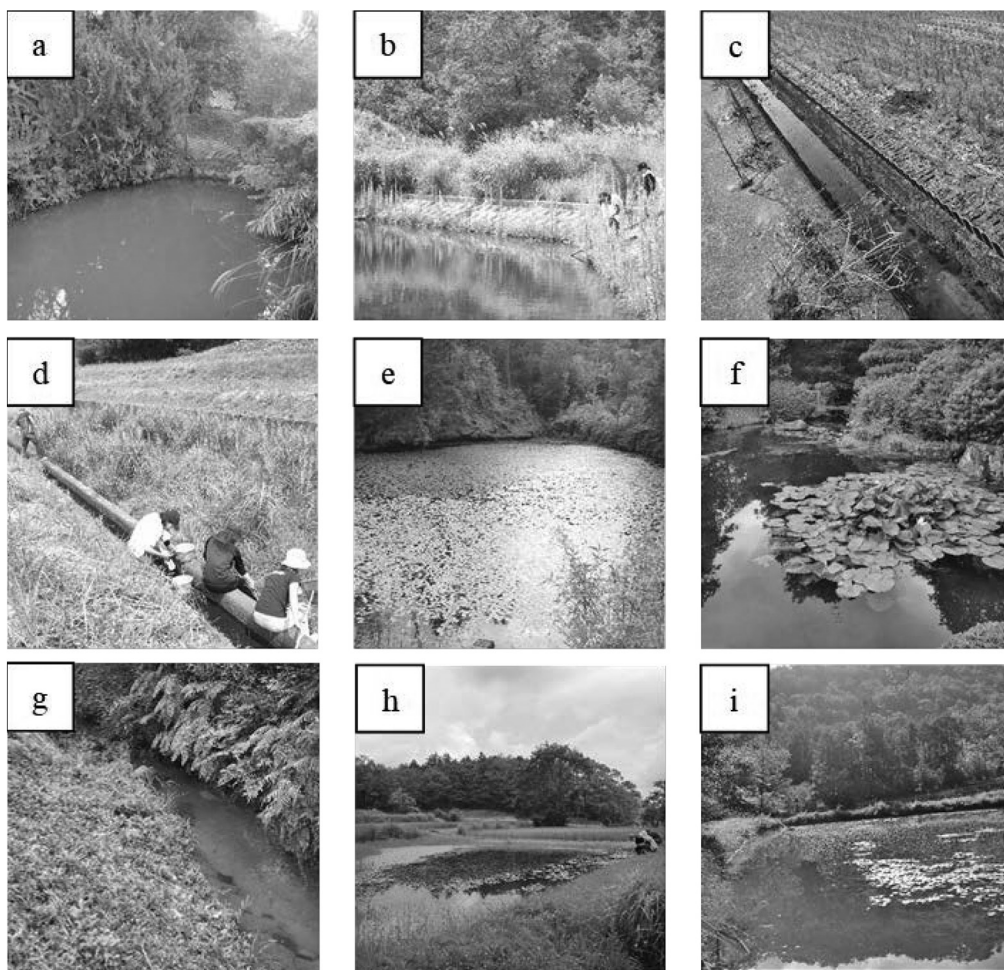


図3 本研究での各採取場所の風景

写真左上の記号は図2の記号と一致している。

2-2 尾ヒレからの DNA 抽出

尾ヒレからの 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⁵⁾の方法を一部改変して以下の通り実施した。

2-3-1 チトクローム b (Cytochrome b : cytb) 遺伝子の増幅

2-2 で抽出した DNA を鋳型として、PCR 法により cytb 遺伝子断片の増幅を行った。プライマーは、Cytb Fa (5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC-3') 及び Cytb Rva (5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG-3') を用いた。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 \times ExTaq バッファー 5 μ l、プライマー各 5 μ l (各 0.25 μ M)、超純水 25 μ l、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℃ 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 分の反応を 30 サイクル繰り返した。増幅産物は 2 本分をプールし、MiniElute PCR Purification Kit（キアゲン）を用いて Kit のプロトコールに従い精製した。

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、4 種類の制限酵素 (*Hae* III、*Mbo* I、*Msp* I、*Afa* I)、もしくは *Taq* I も含めた 5 種の制限酵素 (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 光を照射して DNA の蛍光を写真撮影した。*Taq* I による切断片の電気泳動には 5% アガロースゲルを用いた。制限酵素処理による切断片のパターンを Takehana ら⁵⁾によって報告されているパターンと照合し、遺伝子型を判定した。

2-4 ヒメダカ遺伝子移入の解析

中井ら¹⁰⁾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 (通称 b マーカー) を増幅した。プライマーは Forward (5'-GGA GCA GCM TCT GTG AGA ACA-3') 及び Reverse (5'-GGT CCT CTG ACA GCA GGG TC-3') を用いた。反応液は、dNTP 0.4 μ l (0.05 mM)、DNA 合成酵素 ExTaq 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 0.25 μ M)、超純水 15.4 μ l、DNA 溶液 1 μ l を混合して 20 μ l とした。反応液は 94℃ で 2 分間の熱変性を行った後、94℃ で 0.5 分、70℃ で 0.5 分、72℃ で 1 分の反応を 30 サイクル繰り返した。増幅産物は 0.01% のエチジウムブロマイドを含む 1.2% アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、UV 照射下で写真撮影した。

2-5 遺伝子型不明個体の cytb 遺伝子の塩基配列の解析

三田市上槻瀬（図 3 i）で採取し、遺伝子型不明と判定された 5 尾のうち 2 尾を任意に選定した後、以下の方法に従い DNA シーケンスによる cytb 遺伝子の塩基配列の解析を行った。

2-3-1 で増幅、精製した cytb 遺伝子断片の PCR 産物は Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer（Thermo Fisher Scientific）を用いたダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。塩基配列の解析は外部機関（マクロジェンジャパン）に委託し、プライマーは Cyt b Rva 及び Cyt b RVb（5'-ACT GAA AAT CCC CCT CAA ATT CAT TG-3'）（Takehana ら⁵⁾）を用いた。

3 結果及び考察

3-1 宝塚市西谷地区に生息するメダカの遺伝子型分布

宝塚市西谷地区で採取したメダカの遺伝子型を表 1 に示した。採取した 76 尾について遺伝子型を判定した結果、66 尾が遺伝子型 B1a（図 4 A 及び B）、5 尾が B39（図 4 C）であった。これらの結果から、西谷地区では全採取地点 9 カ所で遺伝子型 B1a の集団が確認された。Takehana ら⁵⁾によると、遺伝子型 B1a は兵庫県内の姫路市、淡路島の旧東浦町及び旧西淡町で検出されており、瀬戸内海沿岸域に広く生息している遺伝子型であると報告されている。また、武庫川水系の下流域のメダカを調査した先行研究においても、3 つの遺伝子型集団（B1a、B22 及び B9）の生息が確認されているが、中でも B1a が主要な在来集団であることが示唆されている⁸⁾。従って、武庫川中流域にあたる西谷地区においても在来の遺伝子型集団として B1a が広く検出されたことは妥当な結果であるといえる。本研究結果及び先行研究⁸⁾より、武庫川水系の中・下流域においては遺伝子型 B1a が主要な在来集団であることが示された。

上佐曾利谷口（図 2 b）及び上佐曾利藪ノ下（図 2 c）の 2 地点では遺伝子型 B39 も検出された。Takehana ら⁵⁾によると、B39 は兵庫県の丹南地域にのみ確認される地域特異性が高い遺伝子型であると報告されている。先行研究においても、武庫川水系の上流域では主に B39 が

表 1 本研究で採取したメダカの遺伝子型及びヒメダカ遺伝子（b マーカー）の移入の有無

	採取場所	採取尾数	遺伝子型			b マーカー	
			B1a	B39	不明	B/B	B/b
a*	上佐曾利山ノ神	10	10			10	
b	上佐曾利谷口	6	3	3		6	
c	上佐曾利藪ノ下	10	8	2		10	
d	大原野大東	5	5			4	1
e	長谷サル山	5	5			5	
f	大原野波坂	10	10			10	
g	境野保与谷	10	10			7	3
h	玉瀬細尾	10	10			10	
i	三田市上槻瀬	10	5		5	10	
	合計	76	66	5	5	72	4

* 図 2 及び 3 の記号と対応している。

検出されている⁸⁾。本研究で B39 が検出された地点は先行研究において推定された B39 の生息南限とほぼ同緯度（北緯 35 度付近）に位置しており、在来集団として生息している可能性が示唆された。しかしながら、この 2 地点より上流の上佐曾利山ノ神（図 2 a）では B39 は検出されなかったことから、この 2 地点の B39 集団は武庫川上流域の他の生息場所から移入された可能性も否定できない。同様の非連続的な生息分布が武庫川下流域の B 9 及び B22 でも確認されている⁸⁾。従って、上佐曾利谷口及び上佐曾利藪ノ下で検出された遺伝子型 B39 のメダカが在来集団か、同一水系内の移入集団かはさらなる調査が必要である。

非在来の遺伝子型を有するメダカの移入による遺伝的攪乱は、メダカが生息している多くの地域で生じている。例えば、Nakao ら¹¹⁾は日本全国の 105 カ所を調査し、50 カ所（48%）から非在来の遺伝子型が検出されたと報告している。武庫川下流域を調査した先行研究⁸⁾においても、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入集団が生息していることが示されている。一方、武庫川中流域に位置する西谷地区を調査した本研究では、瀬戸内亜群に属する在来の遺伝子型である B1a 及び B39 のみが検出され、非在来遺伝子型として国内に広く分布している B27 は確認されなかった。以上のことから、宝塚市西谷地区においては他地域からの移入集団による遺伝的攪乱は生じていないことが示唆された。

三田市上槻瀬（図 2 i）で採取した 10 尾のうち 5 尾に関しては、制限酵素 *Mbo* I、*Msp* I、*Afa* I 及び *Taq* I による切断パターンは B1a と一致したが、*Hae* III の切断パターンのみ Takehana ら⁵⁾に未記載のものであったことから、遺伝子型不明と判定した（図 4 D）。この遺伝子型不明個体の *cytb* PCR 産物に関して、*Hae* III による切断片の長さを合計すると、他の遺伝子型メダカの *cytb* 全長よりも明らかに長くなるため、*cytb* 以外の DNA（非特異的増幅産物）が混入した可能性が考えられたが、*cytb* 増幅を確認する電気泳動像では増幅産物の大きさに違いが見られなかった。また、遺伝子型不明 5 尾の *cytb* の *Hae* III 切断パターンはすべて同じパターンであったため、この生息地点に特異的な遺伝子型集団、もしくは遺伝子重複した集団の可能性が示唆された。そこで、この遺伝子型不明 5 尾の中から 2 尾を選定し、*cytb* 遺伝子のシーケンス解析を実施した。その結果、既報の遺伝子型 B1a の塩基配列と比較したところ 222.C>T、498.G>A 及び 798.C.T の 3 カ所で塩基置換が認められたが（図 5）、いずれも *Hae* III の認識配列（GGCC）ではなかった。また、予想された遺伝子重複も確認されなかった。以上、*cytb* 遺伝子のシーケンス解析からは遺伝子型不明と判定された原因を特定することはできなかった。

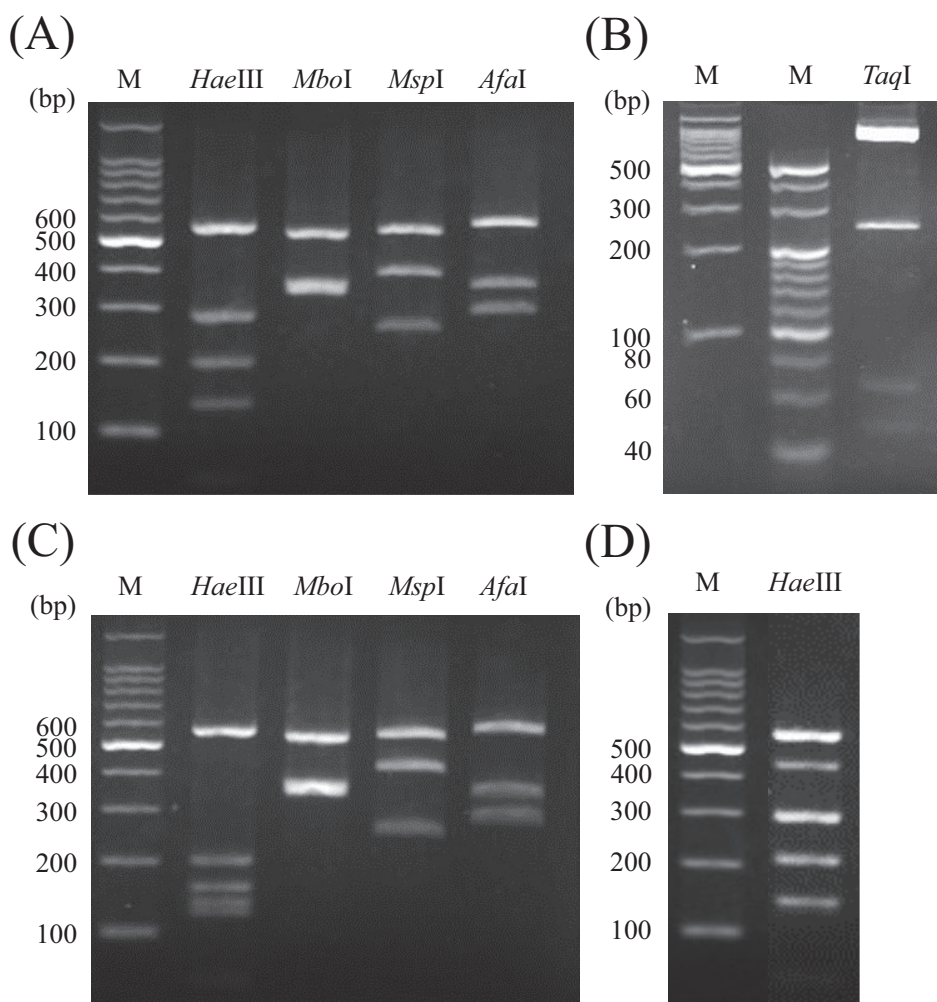


図4 遺伝子型 B1a (A 及び B)、遺伝子型 B39 (C) 及び遺伝子型不明 (D) の *cytb* 遺伝子の制限酵素処理パターン

M は分子量マーカーを示す。遺伝子型不明 (D) の *Hae* III の切断パターンには、遺伝子型 B1a (A) にはみられない約 450 bp の切断産物が認められる。

3-2 宝塚市西谷地区に生息するメダカにおけるヒメダカ遺伝子の移入

採取した計 76 尾について、ヒメダカ遺伝子の移入の有無を調べた結果、大原野大東（図 2 d）で採取した 1 尾、境野保与谷（図 2 g）の 3 尾の計 4 尾からヒメダカ遺伝子が検出された（表 1）。境野保与谷の採取地点は県立の自然公園内の水路であるが、園内のメダカに遺伝的攪乱が生じていることは既に把握されており、園内で採取した“外来の”メダカを自然環境中に流出、遺棄させないような啓発活動が行われている¹²⁾。一方、大原野大東の採取場所は水田の灌漑用水路であり、いわゆる野生のメダカの生息環境である。5 尾中 1 尾（20%）の割合であったがヒメダカとの交雑履歴を持つ個体が検出されたことは、過去にこの場所でヒメダカの偶発的または意図的な移入があったと推察される。Nakao ら¹¹⁾の全国的な調査においても、105 カ所中 48 カ所（46%）からヒメダカの遺伝子型が検出されており、ヒメダカの移入が野生メダカ集団における遺伝的攪乱の主な原因である可能性が指摘されている。著者らの先行研究でも武庫川下流域でヒメダカとの交雑個体が検出されており⁸⁾、本研究結果と合わせて考察すると、武庫川中・下流域では局所的ではあるがヒメダカの移入による遺伝的攪乱が生じていることが示唆された。ヒメダカはペットや熱帯魚の餌料として全国的に流通しているだけでなく、小学校理科の教科書でも広く取り上げられているが、近年国内外来種の視点から理科教材としての問題が指摘されている¹³⁾。今回、大原野大東で確認されたヒメダカとの交雑個体に関しては、生息場所が灌漑用水路であることから生息域が拡大していく可能性があるため、これ以上広がらないような啓発活動を行っていく必要がある。

```

1>ATGGCCAACTTCGAAAAACCCACCCCTGTTAAAAATTGCAAAACGATGCTCTGGTCGACCTCCAGCCCTTCAAAACATTCAGTTTGATGAACTTTG>100
1>ATGGCCAACTTCGAAAAACCCACCCCTGTTAAAAATTGCAAAACGATGCTCTGGTCGACCTCCAGCCCTTCAAAACATTCAGTTTGATGAACTTTG>100
1>ATGGCCAACTTCGAAAAACCCACCCCTGTTAAAAATTGCAAAACGATGCTCTGGTCGACCTCCAGCCCTTCAAAACATTCAGTTTGATGAACTTTG>100

101>GTTCTCTTCTCGGACTTTGTTAGCGCGCCAAATCATCAGGGGCTTTTCTTGCCATACATTATACATCCGACATCGCCACAGCATTCGTCAGTTGC>200
101>GTTCTCTTCTCGGACTTTGTTAGCGCGCCAAATCATCAGGGGCTTTTCTTGCCATACATTATACATCCGACATCGCCACAGCATTCGTCAGTTGC>200
101>GTTCTCTTCTCGGACTTTGTTAGCGCGCCAAATCATCAGGGGCTTTTCTTGCCATACATTATACATCCGACATCGCCACAGCATTCGTCAGTTGC>200

201>ACACATCTGCCGGGATGTTAACTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAAACGGCGCTTCTTTTCTTCATCTGCATTACCTTCACATTGGACGA>300
201>ACACATCTGCCGGGATGTTAACTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAAACGGCGCTTCTTTTCTTCATCTGCATTACCTTCACATTGGACGA>300
201>ACACATCTGCCGGGATGTTAACTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAAACGGCGCTTCTTTTCTTCATCTGCATTACCTTCACATTGGACGA>300

301>GGCTTGTAATCAGGATCTTCTGTACAAAGAAACATGAAATGTCGGTGTAATCTTCTTCTACTAGTAATAAAGCGCTTCGTAAGTTACGTTTAC>400
301>GGCTTGTAATCAGGATCTTCTGTACAAAGAAACATGAAATGTCGGTGTAATCTTCTTCTACTAGTAATAAAGCGCTTCGTAAGTTACGTTTAC>400
301>GGCTTGTAATCAGGATCTTCTGTACAAAGAAACATGAAATGTCGGTGTAATCTTCTTCTACTAGTAATAAAGCGCTTCGTAAGTTACGTTTAC>400

401>CCTGAGGCGAAATATCATTTTGGAGGGGCACTGTAATCACCACCTCTTGTCTGCCGTCCTTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGAGGGG>500
401>CCTGAGGCGAAATATCATTTTGGAGGGGCACTGTAATCACCACCTCTTGTCTGCCGTCCTTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGAGGGG>500
401>CCTGAGGCGAAATATCATTTTGGAGGGGCACTGTAATCACCACCTCTTGTCTGCCGTCCTTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGAGGGG>500

501>ATTTTCAGTTGATAACGCCACACTTACCGGATCTTTGCTTCCATTTCTCCCTCCCTTCGTAATGGCGCGCAACAGTTGTTCACTAATTTTCTT>600
501>ATTTTCAGTTGATAACGCCACACTTACCGGATCTTTGCTTCCATTTCTCCCTCCCTTCGTAATGGCGCGCAACAGTTGTTCACTAATTTTCTT>600
501>ATTTTCAGTTGATAACGCCACACTTACCGGATCTTTGCTTCCATTTCTCCCTCCCTTCGTAATGGCGCGCAACAGTTGTTCACTAATTTTCTT>600

601>CAGCAAAACGGGTTCAAAACAAACCAACGGGCTCAATTACAGATCCGACAAAGTATCCTTCCACCTTACTTTTCTATAAAGACCTTTAGGGGTTTGTG>700
601>CAGCAAAACGGGTTCAAAACAAACCAACGGGCTCAATTACAGATCCGACAAAGTATCCTTCCACCTTACTTTTCTATAAAGACCTTTAGGGGTTTGTG>700
601>CAGCAAAACGGGTTCAAAACAAACCAACGGGCTCAATTACAGATCCGACAAAGTATCCTTCCACCTTACTTTTCTATAAAGACCTTTAGGGGTTTGTG>700

701>CCTTGCTAGTAGCCTTAATTTCCCTAGCGCTTTTCTCCCCAACCTGCTTGGGGACCCAGACAACTTCACCCCTGCCAACCCGCTAGTTACTCCCCCA>800
701>CCTTGCTAGTAGCCTTAATTTCCCTAGCGCTTTTCTCCCCAACCTGCTTGGGGACCCAGACAACTTCACCCCTGCCAACCCGCTAGTTACTCCCCCA>800
701>CCTTGCTAGTAGCCTTAATTTCCCTAGCGCTTTTCTCCCCAACCTGCTTGGGGACCCAGACAACTTCACCCCTGCCAACCCGCTAGTTACTCCCCCA>800

801>CATCAAGCCTGAATGATCTTCTATTTGCTACGCCATTCTACGATCAATTCAAATAAACTTGGAGGGGCTCCTAGCCCTATTAGCCTTATTCTAGTA>900
801>CATCAAGCCTGAATGATCTTCTATTTGCTACGCCATTCTACGATCAATTCAAATAAACTTGGAGGGGCTCCTAGCCCTATTAGCCTTATTCTAGTA>900
801>CATCAAGCCTGAATGATCTTCTATTTGCTACGCCATTCTACGATCAATTCAAATAAACTTGGAGGGGCTCCTAGCCCTATTAGCCTTATTCTAGTA>900

901>CTATTCTGGTCCCTATCTACACACCTCTAAACACGAAGCCTTACATTTGACCTTTACCCCAATTCTTTTCTGACTCCTAGTAGCAGACGTAATGG>1000
901>CTATTCTGGTCCCTATCTACACACCTCTAAACACGAAGCCTTACATTTGACCTTTACCCCAATTCTTTTCTGACTCCTAGTAGCAGACGTAATGG>1000
901>CTATTCTGGTCCCTATCTACACACCTCTAAACACGAAGCCTTACATTTGACCTTTACCCCAATTCTTTTCTGACTCCTAGTAGCAGACGTAATGG>1000

1001>TTTTAACCTGAATGGTGGGATGCCGTAGAACACCCATTATTATCATTTGGTCAAAATCGCATCTTTCTTTATTTTCCCTCTTTCTATTATAGCACC>1100
1001>TTTTAACCTGAATGGTGGGATGCCGTAGAACACCCATTATTATCATTTGGTCAAAATCGCATCTTTCTTTATTTTCCCTCTTTCTATTATAGCACC>1100
1001>TTTTAACCTGAATGGTGGGATGCCGTAGAACACCCATTATTATCATTTGGTCAAAATCGCATCTTTCTTTATTTTCCCTCTTTCTATTATAGCACC>1100

1101>AGCGGCGGGATGACTAGAAAAATAAGTCTTAAAGTGACAAT>1141
1101>AGCGGCGGGATGACTAGAAAAATAAGTCTTAAAGTGACAAT>1141
1101>AGCGGCGGGATGACTAGAAAAATAAGTCTTAAAGTGACAAT>1141

```

図5 遺伝子型 B1a の cytb 遺伝子の塩基配列（上段；GenBank ID: AB084694）及び三田市上槻瀬で採取し、遺伝子型不明と判定された2個体の cytb 遺伝子の塩基配列（中段及び下段）

222.C>T、498.G>A及び798.C.Tの3カ所（網掛け部）で塩基置換が認められる。

4 まとめ

本研究により、宝塚市西谷地区に生息するメダカは在来の遺伝子型集団が保存されていることが明らかになった。しかし一方で、一部の生息地ではヒメダカ遺伝子の移入が確認され、ヒメダカの放流が示唆された。我が国におけるメダカの遺伝的攪乱の主要因は、ヒメダカの放流であることが明らかとなっていることから¹⁴⁾、ヒメダカのさらなる移入を防止できれば西谷地区におけるメダカの遺伝的攪乱の進行を抑えることが可能になると思われる。今後、宝塚市西谷地区におけるメダカの遺伝的多様性を維持し、これ以上の遺伝的攪乱を進行させないためには、地域住民に対してヒメダカの放流による遺伝的攪乱のリスクについて啓発すると共に、地域住民と協働した保全活動並びに定期的な遺伝子モニタリングが推奨される。

謝 辞

西谷地区のメダカの生息情報を提供して頂いた丸山湿原群保全の会代表の今住悦昌様、西谷の森公園の職員の皆様、西谷地区在住の坂田様、瀧見様、中村様、東中様、福本様に厚くお礼申し上げる。また、メダカの採取及び実験に際し、ご協力いただいた元嘱託教学職員の江口さやか氏、卒業生の荒山祥紀氏、森美紗樹氏、大堀舞衣氏、山仲奈実氏、島田愛希氏にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 岩松鷹司 (2006) 新版メダカ学全書, pp. 29-30, 大学教育出版, 岡山.
- 2) 環境省 (2020) 「環境省レッドリスト 2020 の公表について」, <https://www.env.go.jp/press/107905.html> (閲覧日 2023/8/17)
- 3) Asai, T., Senou, H., Hosoya, K. (2011) *Oryzias sakaizumii*, a new rice fish from northern Japan (Teleostei: Adrianichthyidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, **22**, 289-299.
- 4) 酒泉満 (2016) メダカの系統. 環境毒性学会誌, **19**, 19-24.
- 5) Takehana, Y., Nagai, M., Matsuda, M., Tsuchiya, K., Sakaizumi, M. (2003) Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, **20**, 1279-1291.
- 6) 日本魚類学会 (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」, <https://www.fish-isj.jp/info/050406.html> (閲覧日 2023/8/17)
- 7) 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**, 76-79.
- 8) 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**, 53-58.
- 9) 江口さやか, 文木春菜, 横田弘文 (2018) 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攪乱. 神戸女学院大学論集, **65**, 1-9.
- 10) 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.
- 11) Nakao, R., Iguchi, Y., Koyama, N., Nakai, K., Kitagawa, T. (2017) Current status of genetic disturbances in wild medaka populations (*Oryzias latipes* species complex) in Japan. *Ichthyol. Res.*, **64**, 116-119.
- 12) 兵庫県立宝塚西谷の森公園. <https://nishitaninomori.jp/2022/08/10/post-5294/> (閲覧日 2023/8/17)

- 13) 棗田孝晴 (2018) 小学校理科教材「メダカ」の扱いにおける問題提起—国内外来種の視点から—, 茨城大学教育学部紀要 (自然科学), **67**, 7-16.
- 14) 北川忠生 (2017) 見えてきた, 全国の野生メダカにおける遺伝的攪乱の実態. 地域自然史と保全, **39**, 7-12.

(原稿受理日 2023 年 9 月 13 日)