

氏 名 (本 国 籍)	MD. SHAHIN-AL-MAMUN (バングラデシュ人民共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 5 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 8 年 3 月 3 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Effects of the Correction of Irrigation Channels on the Paddy Field Ecosystem with Special Reference to the Freshwater Fish (用水路の改修が水田生態系,特に淡水魚に与える影 響)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教 授 岩澤 淳 副査 岐阜大学 教 授 西村 眞一 副査 静岡大学 教 授 土屋 智

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は、水田地帯に生息する淡水魚の代表としてメダカを調査対象に選び、用水路の改修が淡水魚に与える影響を明らかにし、その保全のための基礎的な知見を提供し、2001年に改正された土地改良法で求められている環境に配慮した土地改良に資することを目指として、岐阜県輪之内町において PCR-RFLP, RAPD, マイクロサテライト解析といった一連のメダカ DNA の解析調査をおこない、加えて、メダカに関する生物学的・遺伝学的研究、および淡水魚の遺伝的多様性に関する各種の研究手法について、先行研究のレビューをおこなったものである。

まず第 1 章では、学位論文全体の緒論として、魚類が脊椎動物の中では非常に多様性の高い分類群であり、それに対応して、形態、生態、生息地の適応などに大きな多様性があること、水田が水稻の生産だけではなく、多面的機能を有しており、とくに淡水魚のすみかとして重要であること、用水路の改修や圃場整備が水田をすみかとする淡水魚に与える影響については遺伝子解析をはじめとする定量的な調査が必要であることが述べられている。

続く第 2 章では、岐阜県輪之内町の水田に生息するメダカを対象に行ったマイクロサテライト解析についてまとめられている。輪之内町では農業の基盤整備として水田と水路の近代化が過去 25 年にわたっておこなわれているため、用水路の改修がメダカなどの

淡水魚の遺伝的多様性におよぼす影響を解明するのに適した調査地として本研究で選定された。この調査地においてメダカの遺伝的多様性解析を行うため、FORTRANを用いた自家製の簡易ソフトを作成して、インターネット上のデータベースに公開されているメダカゲノムの配列からマイクロサテライト部位を検出し、これらの部位を増幅する10セットのPCRプライマーを作成した。輪之内町内の用排兼用水路および圃場整備済み水田の排水路から6地点を選んで各地点11匹のメダカを採取し、尾鰭からDNAを抽出して、上記のプライマーを用いて分析した。マイクロサテライト解析の結果、すべての地点で、遺伝的多様性を表す $F_{IS}$ の値は0との有意差があったため、個々の個体群内での遺伝的多様性は比較的高いと考えられた。地点間での遺伝的な違いを表すpairwise  $F_{ST}$ の値は0.023~0.086と比較的小さかったが、有意なものが認められた。したがって、現在ではメダカ個体群間の完全に自由な行き来は妨げられており、6地点間の遺伝的な類似性は、地点間の地理的な距離だけでなく、行き来のしやすさ（連続性）によって説明できると考えられた。 $F_{ST}$ の値に基づく重みづけ近隣結合法によるクラスター解析では、6地点は地点1と2、3と4、5と6からなる3つのグループに分かれた。また、個々のメダカはSTRUCTURE解析によって4つの遺伝的クラスターに分けられ、各地点はどれか1つの主要なクラスターによって特徴づけられており、主要なクラスターは地点1と2、3と4、5と6の間では共通していた。地点1と2、3と4の間は、メダカの双方向の移動を制限する構造物は存在しない。地点5と6は5.0 km離れていて、地点5では約1 mの落差工があり、地点6では水門が通年ほぼ閉鎖されているため、メダカの相互の移動は困難と考えられるが、過去には移動できたのではないかと思われた。本調査地では、地点内の遺伝的多様性は比較的良好であるため、今後の用排水路の整備に際しては地点間のメダカの移動に配慮することが重要であると考えられた。なお、本調査は水田のメダカの局所個体群の研究にマイクロサテライト分析を適用した初めての報告となっている。

第3章では、第2章と同じ調査地のメダカを用いたミトコンドリアDNAのPCR-RFLP法による解析によって3種類のDNA型が確認された。これらはいずれも、濃尾平野のメダカの型として報告されているものと一致した。我が国では各地で市販メダカの放流が問題になっているが、本調査地ではこれを示唆する結果は得られなかった。また、同じ調査地のメダカを用いてゲノムDNAのRAPD法による解析をおこなったところ、4種類の多型が検出され、個々のメダカは4種類のいずれか1つに分類された。メダカを採取した6地点のいずれでも複数(3~4種類)のRAPD型が検出された。RAPD法については、多くの先行研究で再現性の低さが指摘されている。本調査においては複数のプライマーを用いて検討し、再現性の高かった結果に基づいた分類が示されている。また、本章では、メダカ研究の歴史およびメダカの遺伝的多様性に関する先行研究、淡水魚の遺伝的多様性の評価方法とメダカ以外の淡水魚における実施例、水田の多面的機能という観点からみたメダカ保全の重要性についても議論されており、本章はメダカの生物学と保全に関するレビューともなっている。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、メダカを対象として、用水路の改修が淡水魚に与える影響を明らかにし、その保全のための基礎的な知見を提供し、2001年に改正された土地改良法で求められている環境に配慮した土地改良に資することを目的として、岐阜県輪之内町においてPCR-RFLP、RAPD、マイクロサテライト解析といった一連の調査を行ったものである。

まず第1章では、冒頭に魚類が脊椎動物の中では非常に多様性の高い分類群であり、それに対応して、形態、生態、生息地の適応などに大きな多様性があること、水田が水稻の生産だけではなく、多面的機能を有しており、とくに淡水魚のすみかとして重要であること、用水路の改修や圃場整備が水田をすみかとする淡水魚に与える影響については定量的な調査が必要であることが述べられており、本研究の緒論として適切であると考えられた。

続く第2章では、岐阜県輪之内町の水田に生息するメダカを対象に行ったマイクロサテライト解析についてまとめられている。輪之内町では農業の基盤整備として水田と水路の近代化が過去25年にわたっておこなわれているため、これがメダカなどの淡水魚の遺伝的多様性におよぼす影響を解明するのに適した調査地として本研究で選定された。この調査地においてメダカの遺伝的多様性解析を行うため、FORTRANを用いた簡易ソフトを作成して、インターネットに公開されているメダカゲノムの配列からマイクロサテライト部位を検出し、これらの部位を増幅する10セットのPCRプライマーを作成した。輪之内町内の用排兼用水路および圃場整備済み水田の排水路から6地点を選んでメダカを採取し、尾鰭からDNAを抽出して、上記のプライマーを用いて分析した。マイクロサテライト解析の結果、すべての地点で、遺伝的多様性を表す $F_{IS}$ の値は0との有意差があったため、個々の個体群内での遺伝的多様性は比較的高いと考察されている。地点間での遺伝的な違いを表すpairwise  $F_{ST}$ の値は0.023~0.086と比較的小さかったが、有意なものが認められた。したがって、現在ではメダカ個体群間の完全に自由な行き来は妨げられており、6地点間の遺伝的な類似性は、地点間の地理的な距離だけでなく、行き来のしやすさ（連続性）によって説明できると論じている。また、本調査地では、地点内の遺伝的多様性は比較的良好であるため、今後の用排水路の整備に際しては地点間のメダカの移動に配慮することが重要であると論じている。第2章の調査結果に基づいて以上の考察は適切におこなわれ、結論は妥当なものと考えられた。なお、本章は水田のメダカの局所個体群の研究にマイクロサテライト分析を適用した初めての報告となっている。

第3章では、第2章と同じ調査地のメダカを用いたミトコンドリアDNAのPCR-RFLP法による解析によって3種類のDNA型が確認され、これらは濃尾平野のメダカの型として報告されているものと一致したこと、ゲノムDNAのRAPD法による解析では4種類の多型が検出され、個々のメダカは4種類のいずれか1つに分類されたことが報告されている。RAPD法については、多くのプライマーを用いて検討した結果、再現性の高かった結果のみが示されている。これらの調査結果は、と

くに RAPD 法の技術的な制約から第 2 章と比較すると得られた情報量が少なかったが、調査に用いた個体数は第 2 章よりも多く、結論は妥当なものと考えられた。また、本章では、メダカ研究の歴史およびメダカの遺伝的多様性に関する先行研究、淡水魚の遺伝的多様性の評価方法とメダカ以外の淡水魚における実施例、水田の多面的機能という観点からみたメダカ保全の重要性についても議論されており、メダカの生物学と保全に関する興味深いレビューともなっている。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

<基礎となる学術論文>

- 1) Mamun MSA. , Sato S, Yoshiyama K, Tsuchida K, Iwasawa A, Hiramatsu K, Nishimura S (2015) Genetic diversity of medaka (*Oryzias latipes*) in paddy field water channels - A case study using microsatellite markers in Wanouchi Town, Gifu Prefecture - JSIDRE 83(3) 99-106.
- 2) Mamun MSA, Tsuchida K, Onishi T, Hiramatsu K, Iwasawa A, Nishimura S (2016) Medaka in Japanese agricultural water channels: Genetic diversity and conservation. Reviews in Agricultural Science