



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

岐阜県産シロヒレタビラにおける外来ミトコンドリアDNAの分布

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-07-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 梅村, 啓太郎, 二村, 凌, 高木, 雅紀, 池谷, 幸樹, 向井, 貴彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56038

岐阜県産シロヒレタビラにおける外来ミトコンドリア DNA の分布

梅村 啓太郎¹・二村 凌¹・高木 雅紀¹・池谷 幸樹²・向井 貴彦^{3*}

¹ 〒 500-8889 岐阜市大縄場 3-1 岐阜県立岐阜高等学校

² 〒 501-6021 岐阜県各務原市川島笠田町 1453 世界淡水魚園水族館 アクア・トト ぎふ

³ 〒 501-1193 岐阜市柳戸 1-1 岐阜大学地域科学部

Distribution of non-indigenous mitochondrial DNA lineage in the local populations of an endangered bitterling, *Acheilognathus tabira tabira*, in the Gifu Prefecture, Japan

Keitaro Umemura¹, Ryo Futamura¹, Masaki Takagi¹,
Koki Ikeya² Takahiko Mukai^{3*}

¹ Gifu Prefectural Gifu High School, 3-1 Onawaba, Gifu 500-8889, Japan

² Gifu World Fresh Water Aquarium, 1453 Kawashimakasada, Kakamigahara, Gifu 501-6021, Japan

³ Faculty of Regional Studies, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

Abstract. Artificial introduction of non-indigenous individuals into populations of indigenous endangered animals is a major problem for conservationists because it causes genetic disturbances in the population. The bitterling, *Acheilognathus tabira tabira*, is an endangered fish in Japan, and the local population of the fish in the Tokai district (Gifu, Aichi, and Mie Prefectures) is fragmented and declining. In this study, we aimed to ascertain whether species from other biogeographic regions have been introduced in the Gifu Prefecture, Japan. For this, we analyzed the mitochondrial DNA (mtDNA) of the bitterlings collected from 2 sampling sites in the Gifu Prefecture—a dam lake of the Kiso River system and a small stream of the Nagara River system. Phylogenetic analysis was performed using the cytochrome *b* gene sequences (1123 bp), and on the basis of the results, we identified 3 haplotype groups: a non-indigenous group, Kinki-Sanyo, and 2 putative indigenous groups, Nobi-Plain groups I and II. Samples from both sampling sites showed the presence of the mtDNA of the Kinki-Sanyo haplotype group. The Kinki-Sanyo group has been known to be naturally distributed in the Lake Biwa-Yodo River system (Kinki district) and the Sanyo district, indicating that this group may have been artificially transplanted to the Gifu Prefecture. These results suggest that the local populations of *Acheilognathus tabira tabira* in the Gifu Prefecture have already been disturbed by artificial transplantation of non-indigenous individuals.

Key words: endangered species, bitterling, mitochondrial DNA, phylogeography, artificial introduction, genetic disturbance.

(要約)

絶滅危惧種のタナゴ亜科魚類であるシロヒレタビラの生息地に、他地域産の国内移入が生じている可能性を検証するため、岐阜県の本曾川水系のダム湖と長良川水系の小河川で採集したシロヒレタビラのミトコ

*連絡先 (Corresponding author): tmukai@gifu-u.ac.jp

ンドリア DNA の解析をおこなった。Cytochrome *b* 遺伝子の塩基配列 (1123 塩基対) を決定し、系統解析をおこなった結果、岐阜県産シロヒレタビラのミトコンドリア DNA は3つの系統 (近畿山陽系統, 濃尾平野系統 I, II) に分けられ, そのうちの近畿山陽系統は, 琵琶湖-淀川水系以西から人為的に導入された外来系統と考えられた。木曾川水系と長良川水系の両方に近畿山陽系統は分布しており, 国内移殖が生じていることが明らかになった。

シロヒレタビラ *Acheilognathus tabira tabira* はコイ科タナゴ亜科に属する純淡水魚であり, 濃尾平野, 琵琶湖-淀川水系, 高梁川以東の山陽地方の平野部の流れが緩やかな河川や農業用水路, 湖沼などに生息する (環境省, 2010)。しかし, 河川環境の改変や水質悪化, 外来魚 (オオクチバス・ブルーギル) による捕食といった要因によって生息環境が減少しているとして, 環境省レッドデータブックでは絶滅危惧 IB 類, 岐阜県レッドデータブックでは絶滅危惧 I 類に選定されている (岐阜県, 2010; 環境省, 2010)。また, 本種を含むタナゴ類はオスの婚姻色が非常に美しいことから, 飼育や釣りを目的とした愛好家が多く, 飼育・販売を目的とした乱獲, 愛好家による産地を無視した放流が行われている可能性も危惧される (赤井ほか, 2004, 2009)。また, 全国に放流される琵琶湖産アユ種苗への混入による移殖も生じている可能性がある。すでに, 国内外来種として7種のタナゴ類が本来の分布域以外で確認されており (松沢・瀬能, 2008), シロヒレタビラも青森県や東京都, 神奈川県, 鳥根県で移殖分布があったとされている。自然分布と考えられていた徳島県の分布も, 現在では人為的なものであると考えられている (松沢・瀬能, 2008; 環境省 2010)。岐阜県のシロヒレタビラは自然分布と考えられてきたが, さまざまな都県で移殖分布がみられることから, 他地域産の導入による遺伝的攪乱が生じている可能性も危惧される。岐阜県内では, すでにコイ科のゼゼラとオイカワの在来個体群に琵琶湖産の移入が生じていることがミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析によって示されており, 遺伝的攪乱が生じていると考えられている (堀川・向井, 2007; 向井,

2012)。そこで, 本研究では, 岐阜県産シロヒレタビラの mtDNA の解析を行い, 国内移入の有無を検討した。

材料と方法

採集は, 岐阜県内の木曾川水系のダム湖で 2009 年 8 月 16 日に, 長良川水系の小河川で 2006 年から 2012 年にかけて行い, 木曾川水系産シロヒレタビラ 11 個体と長良川水系産シロヒレタビラ 45 個体を解析に用いた。本種は希少種であり, 愛好家等による乱獲を避けるため, 採集地の詳細は非公表とする。これらの個体は, DNA 解析用に尾鰭の一部を 99.5% エタノールで保存し, 必要以上に魚体を傷つけないようにした。木曾川水系の個体は, DNA 解析用に鰭サンプルを採取した後で水族館での展示等に使用し, 長良川水系の個体は, 本体を薬浴させて採集した場所に放流した。

DNA の抽出は, エタノールで保存した鰭の一部からキアゲン社の DNeasy Blood & Tissue Kit を用いておこない, コイ科魚類用に早川明里氏 (岐阜大学地域科学部卒業生) が設計した L14690-Glu (5'-GGT CAT AAT TCT TGC TCG GA-3') と H15913-Thr (5'-CCG ATC TTC GGA TTA CAA GAC CG-3') を用いてミトコンドリア DNA の Cytochrome *b* 遺伝子の PCR 増幅と塩基配列の決定をおこなった。PCR にはニュウイングランドバイオラボ社の Crimson Taq PCR sampler のバッファーとタカラバイオ株式会社の Ex Taq DNA ポリメラーゼを使用した。PCR 産物は GE ヘルスケアジャパン社の ExoSAP-IT キットを用いて処理した後, アプライドバイオシステムズ社の BigDye Terminator Cycle

Sequencing Kit ver. 3.1 でシーケンス反応をおこない、Beckman Coulter (Agencourt) 社の磁気ビーズ Clean SEQ で精製、ABI 3100 Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。

決定した塩基配列は、Kitamura et al. (2011) のシロヒレタビラの塩基配列 [三重県祓川産 (DDBJ 登録番号 AB620141), 滋賀県琵琶湖産 (AB620138), 京都府木津川産 (AB620159), 岡山県瀬戸内市産 (AB620150)], および近縁なタビラ類の塩基配列 [アカヒレタビラ, 岩手県奥州市産 (AB620143); キタノアカヒレタビラ, 秋田県五城目町産 (AB620139); ミナミアカヒレタビラ, 富山県氷見市産 (AB620142), 島根県大田市産 (AB620149); セボシタビラ, 熊本県玉名市産 (AB620146)] と比較した。比較のための多重整列には Clustal X (Thompson et al., 1997) を用い、MEGA5 (Tamura et al., 2011) で近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) による系統関係の推定をおこなった。樹形の信頼性は 1000 回のブーツストラップ反復によって推定した。得られた樹形は最長経路の midpoint で折り返すことで他亜種を操作上の外群として表示した。遺伝距離の推定は木村の 2 変数モデル (Kimura, 1980) を用いておこなった。

集団遺伝データは遺伝的多様性データベース GEDIMAP (Watanabe et al., 2010) に登録 (登録番号 P1673 と P1674) し、データベース上でハプロタイプ多様度を計算した。

結果と考察

ミトコンドリア DNA の塩基配列については、Kitamura et al. (2011) の Cytochrome *b* 遺伝子の塩基配列と相同な 1123 塩基対を比較した。塩基配列が決定できた木曾川水系および長良川水系のシロヒレタビラ 56 個体から 11 種類のハプロタイプが見出され、そのうちの 10 種類は本研究で初めて見つかったものであった。新たに見つかったハプロタイプは K2-K6, N1-N5 とし、日本 DNA データバンク (DDBJ) に塩基配列

を登録した (登録番号 AB759881-AB759890)。また、K1 は滋賀県琵琶湖産 (AB620138) と京都府木津川産 (AB620159) の塩基配列と一致した。

これらのハプロタイプと Kitamura et al. (2011) のハプロタイプの関係を近隣結合法による系統樹にもとづいて検討した結果、岐阜県のシロヒレタビラには 3 つの系統があることが明らかになった (Fig. 1)。それらは、滋賀県、京都府、岡山県の各産地の個体を含む系統 (近畿山陽系統) と、長良川水系産 1 個体のみが属する系統 (濃尾平野系統 I)、そして三重県産の個体と近縁な系統 (濃尾平野系統 II) に分けられた。木曾川水系の 11 個体は全て近畿山陽系統に属していたが、長良川水系では、15 個体が近畿山陽系統に、1 個体が濃尾平野系統 I に属し、29 個体が濃尾平野系統 II のものだった。また、木曾川水系の集団では特定のハプロタイプが優占せず、ハプロタイプ多様度が 0.85 と高かった。一方、長良川水系では 3 つの系統が分布するものの、N2 (近畿山陽系統) と N4 (濃尾平野系統 II) の 2 つのハプロタイプが優占し、ハプロタイプ多様度も 0.53 とやや低く、両水系で共通するハプロタイプは見られなかった。

これらが全て自然分布だったと仮定すると、木曾川水系は近畿山陽系統の多様なハプロタイプが維持される大きな個体群であり、琵琶湖-淀川水系と同じハプロタイプも保持していることから、琵琶湖水系から木曾川水系まで広く安定した個体群が、伊吹-鈴鹿山脈で分断されずに存続してきたことになる。しかし、濃尾平野などの伊勢湾周辺地域と琵琶湖-淀川水系の間では淡水魚類相が異なっており、同種でも遺伝的分化が見られることが多い (渡辺・高橋, 2010)。したがって、木曾川水系と琵琶湖-淀川水系の個体群が遺伝的に分化していないとは考えにくい。源流域に生息するアジメドジョウなどの淡水魚の場合、山間部の小河川の流路変更などで山脈を挟んだ両側の河川で遺伝的

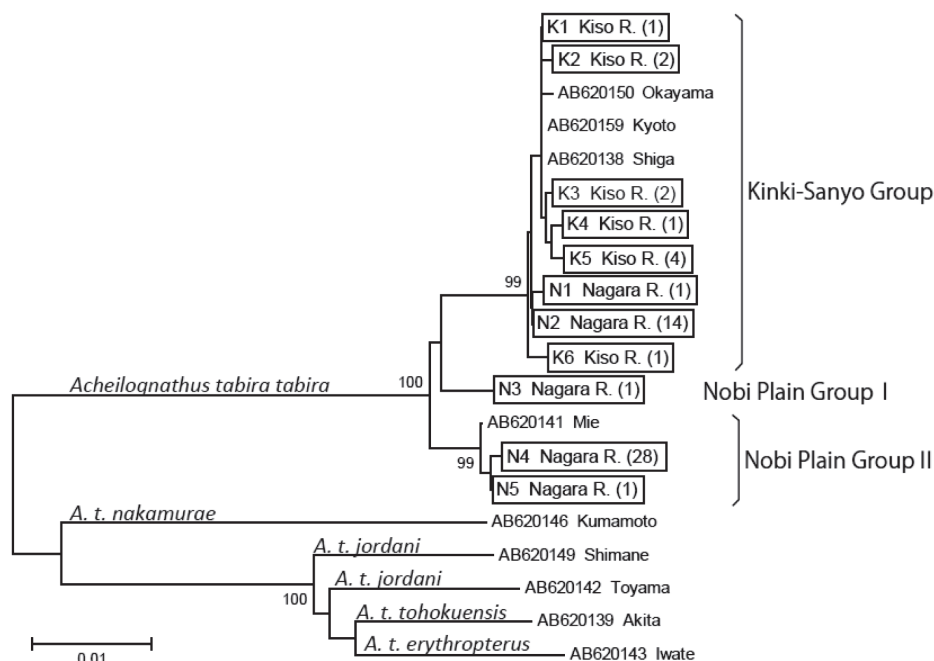


Fig. 1. Unrooted neighbour-joining tree based on genetic distances estimated from mitochondrial cytochrome b gene sequences (1,123 bp) in *Acheilognathus tabira tabira*, collected from the Gifu Prefecture, Japan, and related species. Distances are based on Kimura's two-parameter model and calculated using MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Numbers adjacent to internal branches indicate bootstrap probabilities (>90%) based on 1,000 pseudoreplicates. Haplotypes K2-K6 and N1-N5 are newly found in this study (DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. AB759881-AB759890). Nucleotide sequences of AB620138, AB620139, AB620141-AB620143, AB620146, AB620149, AB620150, AB620159 are cited from Kitamura *et al.* (2011). K1, AB620138 and AB620159 are the same haplotype. Numbers of individuals are indicated in parentheses. Specimens which were collected in this study are shown by open boxes.

に類似していることもあるが (Kitagawa *et al.*, 2001), シロヒレタビラは平野部の淡水魚であり, 山脈は地理的隔離要因になりうると想定できる。

また, 木曾川, 長良川, 揖斐川の木曾三川下流部は近世まで流路が交錯しており, 江戸時代から明治時代の三川分流工事 (木曾三川下流域の網目状の流路を堤防で三川に分ける工事) までは平野部の淡水魚の個体群が各水系間で交流しやすい状況にあった。それにも関わらず, 木曾川水系と長良川水系でハプロタイプが共有されておらず, 長良川水系に存在する濃尾平野系統 I と II が木曾川水系には見られない。

広い範囲で遺伝的に交流のあった集団が断片化した場合, ボトルネック効果によって集団ごとに異なるハプロタイプが固定することは想定

できる。しかし, 前述のように木曾川水系の集団のハプロタイプ多様度は高く, 長良川水系の集団も遺伝的に異なる3つの系統のハプロタイプが残っている。こうした遺伝的多様性の高さは, 木曾三川分流工事後にボトルネック効果が生じて木曾川水系と長良川水系の各集団に異なるハプロタイプが各々固定したことを否定する根拠になると考えられる。したがって, 木曾川水系に多様な近畿山陽系統のミトコンドリア DNA が分布し, 長良川水系の集団と遺伝的に異なることは非常に不自然であり, 少なくとも本研究で用いた木曾川水系のシロヒレタビラは, 琵琶湖-淀川水系以西からの人為的導入に由来すると考えられる。また, 本研究における木曾川水系のシロヒレタビラの生息環境はダム湖であり, 在来のシロヒレタビラが分布しな

かった場所に導入されて定着した外来個体群の可能性もある。

一方、本研究における長良川水系の採集地点は平野部の小河川であり、在来のシロヒレタビラが生息していた環境と考えられる。しかし、長良川水系の個体群にも近畿山陽系統のミトコンドリア DNA が見られたことから、近畿地方以西からシロヒレタビラが導入された可能性がある。長良川水系に見られたミトコンドリア DNA は他にも 2 系統が存在していたが、そのうちの一つ（濃尾平野系統 II）は伊勢湾周辺の三重県産シロヒレタビラと近縁であり、在来系統と考えられる。長良川水系の 1 個体から得られた濃尾平野系統 I については、これまでにサンプリングされていない地域からの移殖の可能性も考えられるが、断片的とはいえ Kitamura et al. (2011) がシロヒレタビラの分布域の主要な地域からサンプリングした中に該当する系統が無い場合、これも濃尾平野在来の系統の可能性もある。この系統の由来を明らかにするためにはシロヒレタビラの分布域を網羅した詳細な解析が必要である。

岐阜県のシロヒレタビラに見られた近畿山陽系統のミトコンドリア DNA が外来系統であるとした場合、その侵入の理由については、琵琶湖産アユ種苗への混入、愛好家による産地を無視した意図的放流、観賞用に購入した魚の遺棄などが考えられる。コイ科のゼゼラとオイカワでは、琵琶湖産アユ種苗への混入と考えられる外来ミトコンドリア DNA の侵入が木曾川、長良川ともに確認されており、いずれも木曾川において侵入の割合が高い（堀川・向井, 2007; 向井, 2012）。シロヒレタビラも木曾川水系での外来ミトコンドリア DNA の比率が高く、他のコイ科と同様に琵琶湖産アユ種苗に混入することによる非意図的導入の可能性があるだろう。木曾川水系のダム湖におけるハプロタイプ多様度の高さは、導入された個体数が非常に多いことを示唆しており、個人が少数個体を導入したと考えるよりも、長年行われている水産放

流によって継続的に導入が続いてきたことが原因とする方が考えやすい。長良川水系の場合はアユの放流が行われている本流から離れた支流に注ぐ小河川であるため、長良川本流に侵入した琵琶湖産シロヒレタビラの一部が生息適地に到達する過程でボトルネックを経たか、あるいは愛好家の導入した少数個体に由来することで、特定のハプロタイプが優占していると考えられる。

謝 辞

シロヒレタビラの採集に協力していただいた世界淡水魚園水族館の嶋津雄一郎氏、岐阜市役所の山内貴司氏、滋賀県水産試験場の石崎大介氏、サンプル整理を手伝っていただいた岐阜県立岐阜高等学校自然科学部生物班の米川加奈子氏と宇野真氏、DNA 解析に協力していただいた岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム分野の皆様、英文のチェックをしていただいた岐阜県立岐阜高等学校の植田美智留氏に深く感謝する。本研究の一部は JSPS 科研費 21370035, 23510292 と環境省地球環境研究総合推進費 RF-0910 を使用した。また、本研究の一部は岐阜市自然環境基礎調査としておこなった。

引用文献

- 赤井 裕・秋山信彦・上野輝彌・葛島一美・鈴木信洋・増田 修・藪本美孝, 2009. タナゴ大全: 生態・釣り・飼育・繁殖のすべてがわかる. マリン企画, 東京.
- 赤井 裕・秋山信彦・鈴木信洋・増田 修, 2004. タナゴのすべて: 釣り・飼育・繁殖完全ガイド. マリン企画, 東京.
- 岐阜県. 2010. 岐阜県レッドデータブック (改訂版). <http://www.pref.gifu.lg.jp/kankyo/shizen/red-data-dobutsu/> (2012.5.5 閲覧)
- 堀川まりな・向井貴彦, 2007. 濃尾平野におけ

- るゼゼラのミトコンドリア DNA 二型の分布. 日本生物地理学会会報, 62: 29-34.
- 環境省, 2010. 改訂レッドリスト付属説明資料 汽水・淡水魚類. 環境省自然環境局野生生物課, 東京.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J.Mol.Evol.*, **16**: 111-120.
- Kitagawa, T., Okazaki, T., Kashiwagi, M. and Yoshioka, M., 2001. Population structure and local differentiation in the delicate loach (*Niwaella delicata*) as revealed by mitochondrial DNA polymorphism. *Ichthyol. Res.*, **48**: 127-135.
- Kitamura, J., Nagata, N., Nakajima, J. and Sota, T., 2011. Divergence of ovipositor length and egg shape in a brood parasitic bitterling fish through the use of different mussel hosts. *J. Evol. Biol.*, **10**: 1420-9101.
- 松沢陽士・瀬能 宏, 2008. 日本の外来魚ガイド. 文一総合出版, 東京.
- 向井貴彦, 2012. 長良川の魚たちは今? : 河川における生物多様性の現状. 小見山章・荒井聡・加藤正吾 (編), 岐阜から生物多様性を考える : 42-57. 岐阜新聞社, 岐阜.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.*, **4**: 406-425.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, **28**: 2731-2739.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G., 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acids Res.*, **25**: 4876-4882.
- Watanabe, K., Kano, Y., Takahashi, H., Mukai, T., Kakioka, R. and Tominaga, K., 2010. GEDIMAP: a database of genetic diversity for Japanese freshwater fishes. *Ichthyol. Res.*, **57**: 107-109.
- 渡辺勝敏・高橋 洋, 2010. 日本の淡水魚類相とその成立過程のより深い理解に向けて. 渡辺勝敏・高橋 洋 (編著), 淡水魚類地理の自然史—多様性と分化をめぐって—: 217-238. 北海道大学出版会, 札幌.

(2012年10月30日 受領, 2012年11月22日受理)