

長野県内の野外メダカ集団に確認された非在来型遺伝子

北野 聡¹

長野県内に生息する絶滅危惧種メダカの遺伝的健全性を把握する目的で、野外集団およびペットショップのメダカのミトコンドリア DNA 遺伝子型（マイトタイプ）を判別した。千曲川、犀川、天竜川の各水系から得られた計 98 個体のマイトタイプを判別したところ 19 個体（19%）から非在来と考えられるマイトタイプが検出された。

キーワード：メダカ，ミトコンドリア DNA，PCR-RFLP，マイトタイプ，遺伝的攪乱

1. はじめに

メダカは北海道を除く日本各地に広く分布する小型淡水魚である^{1),2)}。近年生息環境の悪化などにより生息地が減少し、2013 年の環境省レッドリスト³⁾では絶滅危惧 II 類、2004 年の長野県レッドリスト⁴⁾でも絶滅危惧 IB 類とされ、絶滅の危険性が高い状態にある。本種は種内の遺伝的分化が著しい魚種として知られており、現在ではキタノメダカ (*Oryzias sakaizumii*) およびミナミメダカ (*Oryzias latipes*) の 2 種に区別されるようになっている⁵⁾。

これまでの研究によると長野県内の在来メダカはミナミメダカにあたり、遺伝的には紀伊半島から東北地方の太平洋側に分布する東日本型グループに区分される遺伝子型を保有している^{6),7)}。

一方、本種は実験動物や小学校の学習教材として多用され、また飼育繁殖が容易な愛玩動物としても流通販売されている。そのため種や系統の違いに関係なく野外に放流される傾向があり^{2),8)}、県外の他系統メダカの混入やそれらとの交雑による地域固有性の喪失が危惧されている。

そこで、この研究では、長野県内のメダカの遺伝的健全性を把握する目的で、各地のメダカ集団を採集し遺伝的な解析を実施した。

2. 材料および方法

材料としたメダカは 2003 年～2012 年に県内の千

曲川、犀川、天竜川の各水系の 37 地点から採集されたものである（附表）。採集したメダカは 99% エタノールで固定して研究室に持ち帰った。また、野外集団に加えて、県内 6 店舗のペットショップ等で販売されているメダカ 19 個体についても同様の解析を実施した。

遺伝分析については Takehana *et al.*⁷⁾ に従い、ミトコンドリア DNA の Cytochrome *b* 領域の塩基配列を分析対象とした。DNA 抽出には Qiagen 社の DNeasy Tissue Kit を用い、Takehana *et al.*⁷⁾ のプライマーセットでミトコンドリア DNA の Cytochrome *b* 領域 1241bp を PCR 増幅した後、4 種類の制限酵素 (*HaeIII*, *MboI*, *MspI*, *RsaI*) で切断した。切断断片は 6% アクリルアミドゲルを使用した電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド染色の後に UV 光下で RFLP パターンの確認を行った（図 1）。Takehana *et al.*⁷⁾ によれば、各酵素による切断パターンには 8～25 通り (A, B, C…Z 等) が予想され、これら 4 酵素 (*HaeIII*, *MboI*, *MspI*, *RsaI*) の切断パターンの組み合わせにより AAAA ならば A1, AAAB ならば A2, JFEE ならば B1 のようにミトコンドリア遺伝子型（以後、mytotype: マイトタイプと呼ぶ）を決定した。なおマイトタイプ B1 を示した個体についてのみ制限酵素 *TaqI* 処理を追加し、B1a～B1d までのマイトタイプに細分した。

この方法を用いた研究⁷⁾により、日本全国の約 300 の野生集団から 67 種類のマイトタイプが識別されている。このうち長野県内の飯山市、旧豊田村、

1 長野県環境保全研究所 自然環境部 〒381-0075 長野市北郷 2054-120

中野市, 小布施町, 旧東部町, 大町市, 諏訪市, 飯田市の 11 地点 45 個体からはマイトタイプ B11 (10 地点, 42 個体) および B27 (1 地点, 3 個体) のみが特定されていること, 山梨県を含め本州中部内陸部では他のマイトタイプが確認されないことから, 本研究ではこれら 2 つのマイトタイプを在来型, その他を非在来型とみなした。

3. 結果及び考察

長野県内 37 地点 98 個体を対象とした DNA 解析で確認された断片化パターンは表 1 の通りである。これらの RFLP パターンにより特定されたマイトタイプは, 在来型のマイトタイプ B11 が 73 個体 (74%) と最も多く, 次いで B27 が 6 個体 (6%) であった。

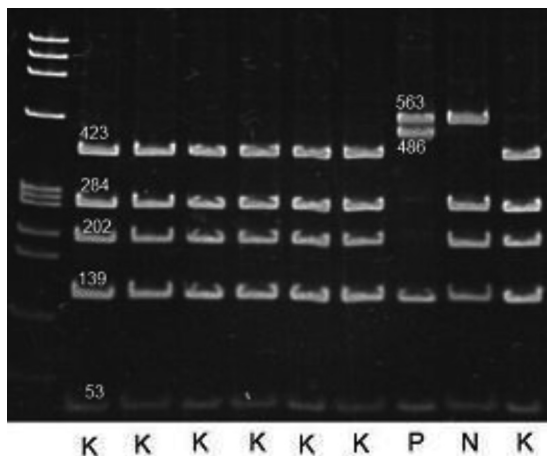


図 1 制限酵素 *Hae*III による切断断片の電気泳動像の例
6%アクリルアミドゲルを使用。左レーンよりレーン 1: 分子量マーカー ϕ X174 *Hae* III digest (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72bp), レーン 2~7&10: 切断パターン K, レーン 8: 切断パターン P, レーン 9: 切断パターン N。

一方, 非在来型と考えられるその他のマイトタイプは 37 地点中 10 地点 (27%) に出現し, 個体数でも 19 個体 (19%) を占めた (附表)。非在来型には A1 及び A19 のようにキタノメダカ (メダカ北日本集団) にしか出現しないマイトタイプ ⁷⁾ も認められ, これらは明らかに県外からの移入系統のものと考えられる。

水系別に見ると, 非在来型の個体数構成比は犀川水系で 60% (15 個体中 9 個体) と高く, 千曲川水系と天竜川水系ではそれぞれ 11% (63 個体中 7 個体) および 15% (20 個体中 3 個体) だった。長野県版レッドデータブック ⁴⁾ によると犀川水系ではもとのメダカ生息地が他の 2 水系に比べ少なく, 水系外のメダカに頼った放流増殖が行われやすかった可能性がある。

非在来型マイトタイプが確認された調査地点には, 自然河川 5 地点の他, 人為管理下のため池 2 地点とビオトープ 2 地点が含まれた。一般にビオトープは希少生物の保全を目的に設置されることが多いが, 非在来系統を放流増殖した場合には逆に地域集団の遺伝的組成を攪乱する要因になる。水生生物の導入を計画する場合には, 周辺の野生集団の生息状況を十分調査した上でできるだけ近隣の在来系統を利用することが望まれる。

野外集団には緋色系統のメダカ (いわゆるヒメダカ: orange-red types of *O. latipes*) も 4 個体が含まれたが, これらのうち 2 個体は在来のマイトタイプ B27 を, 残り 2 個体が非在来のマイトタイプ B1a を示した。ヒメダカは黒色素胞の黒色を作り出す遺伝子に変異のある個体であり, 全国的に流通しているヒメダカの遺伝子調査 ⁹⁾ によるとマイトタイプ B27 と B1a から構成されることが明らかとなっている。B27 が長野県の在来マイトタイプと重複するため, 遺伝子型のみから断定はできないが,

表 1 本研究で確認された Cytochrome *b* 領域 (1241bp) の各制限酵素による断片化パターン

制限酵素 パターン名 ^{*1}	<i>Hae</i> III								<i>Mbo</i> I			<i>Msp</i> I		<i>Rsa</i> I		<i>Taq</i> I		
	A	H	J	K	M	N	P	W	A	F	J	A	E	A	E ^{*2}	A	B	
断片サイズ (bp)	563	563	563	423	563	563	563	284	659	531	531	542	542	1241	574	592	895	472
	284	284	284	284	486	284	486	248	348	362	348	318	389		356	356	237	423
	202	202	202	202	192	202	139	202	163	348	282	259	259		293	293	61	237
	173	192	139	140		120	53	175	71		80	98	27		18		44	61
	19		53	139		53		140				13	13				4	44
				53		19		1389				11	11					4
								53										

*1 パターン名は Takehana *et al* (2003) に準拠。

*2 断片サイズが類似しているため電気泳動では区別できない事例。

表2 県内のペットショップで販売されていたメダカのマイトタイプ

販売店	体色 (個体数)	マイトタイプ		
		B11	B27	その他 (個体数)
中野市A	黒(2)	0	2	—
長野市B	黒(2)	0	0	B1a(1), B1c(1)
:	緋(2)	0	2	—
松本市C	黒(3)	0	1	B1a(2)
諏訪市D	緋(2)	0	2	—
飯田市E	緋(2)	0	2	—
飯田市F	黒(2)	0	2	—
:	緋(2)	0	2	—
:	白(1)	0	0	B22(1)
:	青(1)	0	1	—

ヒメダカの出現頻度の高い集団については人為的移入を疑うべきであろう。

県内のペットショップ 6 店舗で入手した 19 個体のメダカからは、在来型と一致する B27 が 74% と最も多く、残りは非在来の遺伝子型であった(表2)。

本研究の結果から、長野県内には在来型とみて差し支えない集団が多く残っているものの、一部水域には非在来系統由来と見なされるメダカ集団も確認された。非在来の可能性が高い集団については、他の在来集団と交配が進まぬよう適切に管理してゆくことが必要である。

一方、ペットショップの販売個体に多く含まれるマイトタイプ B27 のように遺伝子判別では区別のできない放流事例も想定される。B27 が高頻度で見つかる集団については、飼育系統が放流されている可能性も残され、過去の分布情報とあわせて慎重に在来・非在来について検討することが必要であろう。

謝 辞

本研究を実施するにあたり多くの助言をいただいた長野県女子短期大学の上原武則名誉教授、標

本の採集と提供に協力していただいた逸見泰明氏、環境アセスメントセンター美馬純一氏、久保田憲昭氏、信州水生生物研究会の山形哲也氏、田崎伸一氏、柳生将之博士、小林尚氏、古賀和人氏、宮沢誠氏、小林建介氏、飯田市立美術館の山田拓氏、四方圭一郎氏、松代町の毛利宣熙氏の皆様に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) 岩松鷹司 (1997) メダカ学全書. 大学教育出版, 岡山.
- 2) 北野 聡 (2005) 水田地帯を代表する魚メダカ. 片野修・森誠一 (編) 希少淡水魚の現状と未来. pp206-216. 信山社, 東京.
- 3) 環境省 (2013) 環境省版改訂汽水淡水魚類第 4 次レッドリスト: <http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=16264> (2013 年 11 月確認)
- 4) 長野県 (2004) 長野県版レッドデータブック～長野県の絶滅のおそれのある野生生物～動物編. 長野県.
- 5) 中坊徹次 (編) (2013) 日本産魚類検索: 全種の同定, 第 3 版. 東海大学出版会, 東京.
- 6) 竹花佑介・酒泉 満 (2002) メダカの遺伝的多様性の危機. 遺伝, 56:66-71.
- 7) Takehana, Y., Nagai, N., Matsuda, M., Tsuchiya, K. and 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.
- 8) 竹花佑介・北川忠生 (2010) 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.
- 9) 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マイトコンドリア DNA 遺伝子構成. 魚類学雑誌, 58: 81-86.

**Detection of nonnative mytotypes
in the wild Medaka populations in Nagano Prefecture**

Satoshi KITANO¹

*1 Nagano Environmental Conservation Research Institute, Natural Environment Division,
2054-120 Kitago, Nagano 381-0075, Japan*

附表 PCR-RFLP 法による長野県内に生息する野生メダカの mtDNA 分析結果

地点	市町村	地名/河川名	生息環境	採集年	体色 (N)	制限酵素による切断パターン*					マイト タイプ*
						HaeIII	MboI	MspI	RsaI	TaqI	
千曲川水系											
1	飯山市	木島	水路	2006	黒(3)	K	F	E	E	—	B11
2	:	有尾	水路	2006	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
2	:	有尾	水路	2006	黒(1)	P	F	E	E	—	B27
3	:	樽川合流	河川	2012	黒(3)	K	F	E	E	—	B11
4	中野市	田上	水路	2003	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
5	:	上今井	水路	2006	黒(3)	K	F	E	E	—	B11
6	須坂市	相之島	河川	2006	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
	:	相之島	河川	2006	黒(1)	J	F	E	E	A	B1a
7	:	八木沢川	河川	2006	黒(1)	H	A	A	A	—	A19
	:	八木沢川	河川	2006	黒(1)	K	F	E	E	—	B11
8	:	須坂井上	ビオトープ	2006	黒(1)	A	A	A	A	—	A1
	:	須坂井上	ビオトープ	2006	黒(1)	H	A	A	A	—	A19
9	長野市	豊野/浅川	河川	2003	緋(1)	J	F	E	E	A	B1a
	:	豊野/浅川	河川	2003	黒(1)	K	F	E	E	—	B11
10	:	綿内	水路	2006	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
11	:	赤野田川	河川	2006	黒(3)	K	F	E	E	—	B11
12	:	八幡原	人工池	2011	黒(1)	P	F	E	E	—	B27
13	:	松代大室	水路	2006	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
14	:	松代温泉団地	水路	2012	黒(5)	K	F	E	E	—	B11
15	:	松代大村	ため池	2012	黒(5)	K	F	E	E	—	B11
16	:	松代清野	ため池	2012	黒(5)	K	F	E	E	—	B11
17	:	松代/蛭川	河川	2003	黒(1)	K	F	E	E	—	B11
	:	松代/蛭川	河川	2003	緋(1)	K	F	E	E	—	B11
18	:	松代/神田川	河川	2004	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
19	:	松代東条	水路	2006	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
	:	松代東条	水路	2012	黒(5)	K	F	E	E	—	B11
20	:	千曲川杵淵	河川	2012	黒(1)	K	F	E	E	—	B11
21	:	篠ノ井/岡田川	河川	2006	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
	:	篠ノ井/岡田川	河川	2006	黒(1)	P	F	E	E	—	B27
22	上田市	浦野川	河川	2006	黒(2)	N	F	E	E	—	B22
犀川水系											
23	長野市	安茂里/犀川	河川	2012	黒(1)	P	F	E	E	—	B27
24	安曇野市	高瀬川合流	河川	2012	黒(3)	K	F	E	E	—	B11
	:	高瀬川合流	河川	2012	黒(3)	A	A	A	A	—	A1
	:	高瀬川合流	河川	2012	黒(1)	J	F	E	E	B	B1b
25	松本市	河川敷/梓川	ビオトープ	2006	黒(1)	W	F	E	E	—	B40
26	塩尻市	白板/田川	河川	2006	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
27	:	大沢川/田川	河川	2006	黒(1)	J	F	E	E	A	B1a
28	:	蝦の子池	ため池	2004	黒(2)	M	F	E	E	—	B18
	:	蝦の子池	ため池	2004	黒(1)	W	F	E	E	—	B40
天竜川水系											
29	諏訪市	文出	水路	2007	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
30	:	小川	水路	2006	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
31	:	宮川	河川	2006	黒(3)	K	F	E	E	—	B11
32	中川村	牛落池	ため池	2007	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
33	豊丘村	笹久保	ため池	2004	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
34	:	柿外土	河川	2006	黒(1)	P	F	E	E	—	B27
35	喬木村	富田	ため池	2004	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
36	飯田市	上久堅A	ため池	2006	黒(2)	K	F	E	E	—	B11
37	:	上久堅B	ため池	2006	緋(1)	P	F	E	E	—	B27
	:	上久堅B	ため池	2006	緋(1)	J	F	E	E	A	B1a
	:	上久堅B	ため池	2006	黒(2)	K	J	E	E	—	B12

* Takehana *et al* (2003) によるパターン名を示す。太字のマイトタイプは非在来と考えられるもの。