

## RF-075 国内移入魚による生態系攪乱メカニズム究明とその監視手法の構築

## (3) 国内移入魚による遺伝的多様性攪乱メカニズムの究明とモニタリング手法の構築に関する研究

岐阜大学地域科学部

向井 貴彦

< 研究協力者 > 岐阜大学地域科学部 早川 明里  
 岐阜大学大学院地域科学研究科 武内 陽佑

平成19～20年度 合計予算額 5,806千円  
 (うち、平成20年度予算額 2,770千円)  
 ※上記の合計予算額は、間接経費1,339千円を含む

[要旨] 九州北部における国内移入魚の侵入と定着について、侵入種の分布拡大過程の追跡をおこなうとともに、在来個体群の遺伝的攪乱の検出を目的として遺伝子解析をおこなった。九州北部で採集した淡水魚に加えて全国のサンプルを採集し、DNA抽出とmtDNAの塩基配列決定をおこなった。九州における国内外来種のアサギについてmtDNAの系統と遺伝的多様性を調査した結果、複数の地域に個別に侵入した後、さらに九州内での分布拡大が生じたことが示された。琵琶湖と九州に同種が生息するコイ科魚類のゼゼラ、オイカワ、モツゴについても様々な産地から得た多数個体のmtDNAの比較をおこなったところ、九州のゼゼラは琵琶湖から侵入したmtDNAの頻度が高いことが示された。オイカワは琵琶湖から侵入したmtDNAの出現地点が限定的であり、侵入者に対する在来個体群の集団サイズが大きいことが、侵入率を低く抑えている可能性が考えられた。モツゴは、琵琶湖産アユではなく、フナやコイの移殖に混入すると考えられているが、九州には大陸から移殖された系統と関東・東海地方の系統が侵入しており、近畿地方のフナやコイに混入したと考えられるものは分布しなかった。

遺伝的攪乱のモニタリング手法として、他地域からの侵入状況の把握に対してmtDNAの部分塩基配列の解析が有効であることが示されたため、簡便法としてのPCR-RFLPとマルチプレックスPCRによる在来・非在来mtDNAの判別をオイカワとモツゴに対しておこなった。その結果、PCR-RFLPが有効であることが確認された。初期投資費用の概算を行ったところ、PCR-RFLPに必要な設備を買いそろえるには約60万円の予算で可能であり、各地域の生物相調査への貢献の大きいアマチュア研究者や高校での設備導入も促進可能な金額であると考えられる。

[キーワード] 国内移入、mtDNA、集団遺伝学、コイ科魚類、遺伝的攪乱

## 1. はじめに

日本列島は複雑な地史を経て形成されたことから、比較的小さな地理スケールの中にも多様な生物相が生じている。特に、淡水魚は水系ごとに隔離される傾向にあるため、地域ごとに異なる種が分布し、あるいは同種であっても地域固有の遺伝的特徴を持つ個体群に分化している（渡辺ほか，2006）。しかし、国内での人為的な移殖によって、その地域に分布していなかった淡水魚の侵入・定着や、同種の地域個体群間の遺伝的攪乱を引き起こしている。この問題は「日本産」淡水魚の移殖であるために、生態系に影響を及ぼす重要な外来種問題であることが認識されており、さらには遺伝的攪乱については現状の把握さえほとんどなされていない。そこで、豊富な淡水魚が分布し、希少魚種なども多く残っている九州北部において国内移入魚の影響の実態を解明し、モニタリング手法の開発や啓発活動をおこなうことは非常に重要である。

## 2. 研究目的

本サブテーマでは、国内移入魚の定着時の遺伝的多様性の変化と定着可能性（サブテーマ2と関連）について明らかにする。また、九州北部を中心に国内移入魚による遺伝的攪乱の現状を解明し、遺伝的攪乱のモニタリングシステムの構築をおこなうことを目的とする。

## 3. 研究方法

九州産の標本は、サブテーマ1の調査時に採集された標本を99.5%エタノールで保存し、岐阜大学まで移送した。琵琶湖産の標本は、滋賀県内で、たも網・投網等を用いて複数回の採集をおこなった。その他の地域の標本も比較のために同様の手法で採集して解析に用いた。

入手した標本について、九州産の標本の同定を行い、産地別に整理することで、九州北部における国内移入魚の影響を解析するのに十分な産地数・個体数が確保できる種類を選定し、ミトコンドリアDNA（mtDNA）の解析をおこなった。本研究課題では、コイ科魚類のハス*Opsariichthys uncirostris uncirostris*、ゼゼラ*Biwia zezera*、オイカワ*Zacco platypus*、モツゴ*Pseudorasbora parva*を主な対象とした。

DNAの抽出はキアゲン社のDNeasy Blood & Tissue Kitを使用し、Ex Taq DNA polymerase（タカラバイオ株式会社）でmtDNAのCytochrome b遺伝子（Cyt b）の全長（1141bp）を含む領域の増幅をおこなった。増幅と塩基配列の決定には既知のコイ科魚類のmtDNA全塩基配列をもとにして新たに設計したプライマーL14690-Cb-AH（5'-GGT CAT AAT TCT TGC TCG GA-3'）とH15913-Thr-AH（5'-CCG ATC TTC GGA TTA CAA GAC CG-3'）を用いた。PCR増幅には、Crimson Taq（New England Bio Labs社）を用いて95°C 1分、55°C 1分、72°C 2分の温度サイクルを30回繰り返すことでおこなった。PCRで増幅した産物はExo-SAP ITキット（GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社）で精製し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit ver. 3.1（アプライドバイオサイエンス株式会社）を用いてシーケンス反応をおこなった。反応産物はClean SEQ（株式会社バイオメディカルサイエンス）で精製した後、ABI3100 Genetic Analyzerを用いて塩基配列の決定をおこなった。得られた塩基配列はABI社のフリーソフトEdit Viewで波形確認と修正をおこなった後、PAUP\*4.0を用いて樹状図を作製した。

PCR-RFLPは、塩基配列の解析によって見出された地理的系統を区別できる切断型を示す制限酵素を、各制限酵素の認識配列をもとに探索した。オイカワはHinf I（認識配列GANTC、ロシュダイ

アグノスティクス社)、モツゴはHae III (認識配列GGCC、ロシュダイアグノスティクス社)を用いて、上記と同様にPCR増幅したCyt b遺伝子を、メーカーの説明書にしたがって37°Cで1時間処理することで切断した。マルチプレックスPCRは、モツゴの地理的4系統(結果参照)の塩基配列をもとに、それぞれの系統のCyt b遺伝子の断片が異なる長さで増幅されるように系統特異的プライマー設計した。マルチプレックスPCRの酵素と温度サイクルは、上記のPCRと同様におこなった。

#### 4. 結果・考察

##### (1) 標本収集と対象種選定

九州北部における国内移入魚の侵入プロセスと遺伝的多様性、および琵琶湖産の同種の移入による遺伝的攪乱の現状を明らかにするためには、解析可能な標本がじゅうぶんな個体数得られる必要がある。そのため、サブテーマ1と並行してDNA解析用の標本を収集した。その結果、28種類1063個体の標本を確保することができた。1種類あたりの採集地点数と個体数が多かったのは、オイカワ(18地点166個体)、ヤリタナゴ(12地点108個体)、モツゴ(13地点93個体)といったコイ科魚類であり、これらは琵琶湖などにも同種が生息するため、国内移入による遺伝的攪乱の影響を解明するために有効なモデルとして利用可能と考えられた。また、本課題に関連する申請者らの研究で、九州北部のゼゼラが琵琶湖産の国内移入の影響を著しく受けていることが示されている(堀川ほか, 2007)。本課題の標本収集でもゼゼラが採集されているため、既におこなった研究データをさらに精緻化することができると考えられた。

したがって、標本収集の結果に基づき、モデルケースとしてのゼゼラ、オイカワ、モツゴのDNA解析を優先的にこなうこととした。また、琵琶湖水系から移殖されたハスについても、サブテーマ1、2と関連させたリスク評価のために遺伝的多様性の解析をおこなった。ヤリタナゴは、九州北部において移殖の影響が顕著ではないことが既存の研究で示されているため(Hashiguchi et al., 2006)、解析の優先度は低いと判断し、今回は解析を行わなかった。

##### (2) 九州における琵琶湖産ハスの侵入と分布拡大過程

ハスについては、九州の5県10地点から採集した35個体のmtDNA部分塩基配列を決定し、琵琶湖産(21個体)と比較した。その結果(Fig. 1)、琵琶湖では必ずしも出現頻度の高くないハプロタイプ#2、#7、#10の頻度が九州では高く、広域に分布していた。原産地での頻度が低いハプロタイプが様々な地点に個別に侵入して増加するとは考えにくいことから、それぞれ九州の異なる地域に侵入定着後に二次的拡散をした可能性がある。そうした広域分布ハプロタイプについて個別に見ていくと、#2は筑後川水系の鎮西湖と大分県の北川ダムに定着しており、#7は福岡県山田川・熊本県菊地川・鹿児島県鶴田ダムで見られた。#10は筑後平野から佐賀平野で見られた。#2と#7は遠

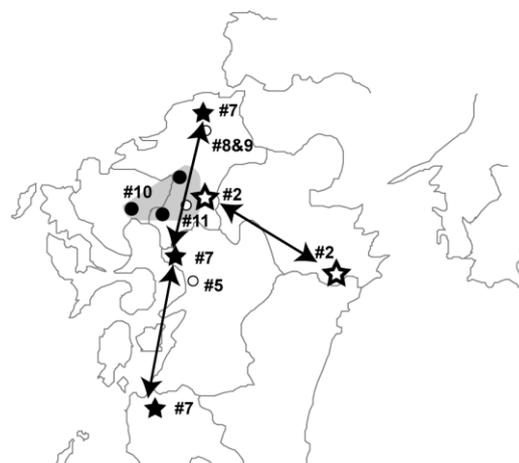


Fig.1 九州におけるハスのmtDNAハプロタイプの分布. ハプロタイプ#2、#7、#10は琵琶湖では頻度が少ないが、九州では頻度が高く、広域に分布する。

隔地に分布するが、#2の出現地は大分高速道路で結ばれており、#7の出現地は九州自動車道によって結ばれているため、人為的な輸送が容易な地域である。#10は、有明海沿岸クリークが縦横に走る地域であるため、水系伝いに分布を広げた可能性がある。

### (3) 九州北部のゼゼラにおける非在来mtDNAの侵入

対象種として選定したゼゼラについて、九州北部の7地点45個体のCyt bの塩基配列を決定し、堀川ほか(2007)で解析した九州産4地点65個体に加えて系統樹を推定、琵琶湖から移入したと思われる非在来mtDNAと九州在来mtDNAの分布を調査した。その結果、本研究で新たに採集した遠賀川水系3地点のゼゼラ(合計20個体)は全て琵琶湖型であることが確認された。また、遠賀川水系のゼゼラのハプロタイプは1種類だけであり、同じハプロタイプが今川・那賀川・筑後川・嘉瀬川にも出現していた。遠賀川以外の水系は複数の琵琶湖型ハプロタイプと、在来型ハプロタイプが分布しているため、琵琶湖由来の1種類のハプロタイプに固定している遠賀川水系のゼゼラは他の水系とは大きく異なっている。遠賀川は琵琶湖産魚種の侵入が非常に顕著であることから(北九州自然史友の会水生動物研究部会, 2003)、琵琶湖由来のゼゼラのmtDNAに完全に置き換わってしまった可能性がある。また、遠賀川産ゼゼラと同じハプロタイプが他の水系にも見られることについては、遠賀川に定着したゼゼラが二次的に運ばれた可能性も考えられる。琵琶湖に生息するゼゼラのハプロタイプは非常に多様であり、ほぼ個体ごとに異なるハプロタイプを持つことから(堀川ほか, 2007)、九州の河川ごとに移入が生じたならば、異なるハプロタイプが各河川に侵入すると考えられる。したがって、遠賀川の琵琶湖型ハプロタイプが他の河川でも見られるのは、九州の水系間での二次的拡散の可能性が高いと言える。

ゼゼラの非在来mtDNAの侵入頻度には、地理的な差異も見られた(Table 1)。侵入頻度は、概して九州北東部の福岡県において高く、北西部の佐賀県では低かった。佐賀県の有明海側河川である牛津川と金立町では今のところ琵琶湖から侵入したmtDNAは見つかっておらず、在来系統の保護をする場合に重要な地域と考えられる。

Table 1 九州北部におけるゼゼラの在来・非在来mtDNAの分布

	福岡					佐賀			
	今川	遠賀川水系	那賀川	筑後川	矢部川	松浦川	嘉瀬川	金立	牛津
非在来	3	20	4	9	2	1	2	0	0
在来	2	0	29	2	0	4	9	9	9
侵入率(%)	60	100	12	82	100	20	18	0	0

### (4) 九州のオイカワにおける非在来mtDNAの侵入

対象種のオイカワについては、秋田県から鹿児島県までの約100地点で採集した約600個体について塩基配列の決定と系統解析をおこなった。その結果、日本産オイカワのmtDNAは東日本・西日本・九州の3系統に分けられることが明らかとなった(Fig. 2)。九州では、北部の日本海側に西日本系統の在来型ハプロタイプ、有明海周辺に九州系統のハプロタイプが分布しており、大分県や鹿児島県に琵琶湖から侵入したと考えられるハプロタイプが分布していた。九州におけるオイカワの在来分布域では、福岡県と熊本県でわずかに琵琶湖由来と思われるハプロタイプが見出されたが、ほとんどは九州在来と考えられるハプロタイプのみであった。

オイカワは琵琶湖からの移殖によって関東以北などに分布を広げているとされるが（川那部，2001）、明らかに琵琶湖からの人為移殖と考えられるハプロタイプが在来分布域で発見されないのは、九州の在来個体群の集団サイズが巨大なために、侵入個体のmtDNAの頻度が小さいことが考えられる。

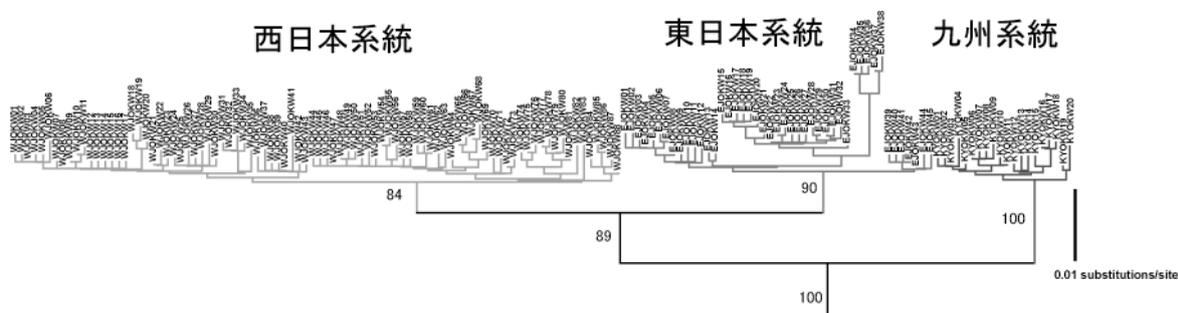


Fig. 2. 日本産オイカワのmtDNAハプロタイプの系統樹.

#### (5) 九州北部のモツゴにおける非在来mtDNAの侵入

対象種のモツゴは、琵琶湖産アユ種苗ではなく、コイやフナの放流に伴って全国に分布を広げたと考えられている止水性の淡水魚である。関東から九州の9県で採集した186個体についてmtDNAの塩基配列を決定し、DNAデータベースから取得した大陸産モツゴ3個体の塩基配列と共に解析した結果、日本産モツゴは大陸系統、関東・東海系統、近畿・四国系統、九州系統の4系統に分けられることが明らかになった（Fig. 3）。

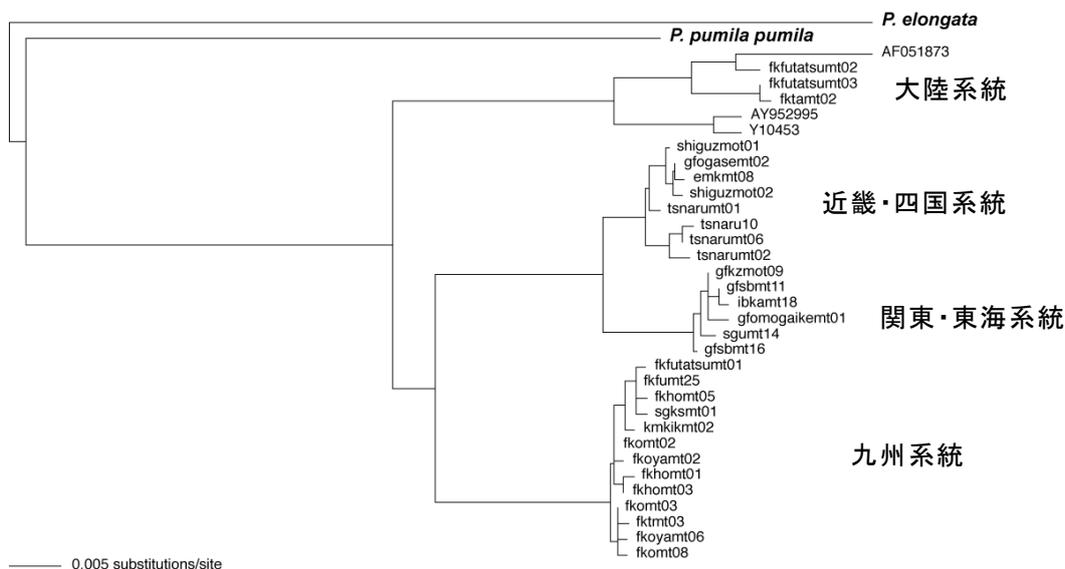


Fig.3. モツゴのmtDNAハプロタイプの系統樹.

九州には、これらの系統の内、大陸系統、関東・東海系統、九州系統が分布しており、近畿・四国系統は見出せなかった。また、それらの系統の分布は地域ごとに異なっており、九州北東部

には大陸系統、有明海沿岸地域には関東・東海系統の侵入が見られた（Table 2）。

Table 2 九州北部におけるモツゴのmtDNA系統の分布

	福岡							熊本	佐賀		
	二ツ川	遠賀川	穂波川	山田川	水崎川	太刀洗川	釣川	長野川	菊池川	牛津川	北茂安
大陸系統	13	4	1	3	2	2					
関東東海系統								1	7	12	
九州系統	9	7	3	3	3	4	1		6	3	1

モツゴの移入要因として放流用コイとフナへの混入が想定されてきたが（川那部，2001）、釣魚として近畿地方で盛んに養殖されるヘラブナへの混入であった場合に想定される近畿・四国系統の九州への侵入は見られなかった。その一方で、関東の霞ヶ浦では盛んにコイが養殖・出荷されてきたことから、関東・東海系統のモツゴの侵入はコイへの混入による可能性がある。大陸系統の侵入原因は不明である。

#### （6）在来・非在来mtDNAの簡易判別法

遺伝的モニタリング技術普及のために、簡便法としてのマルチプレックスPCRとPCR-RFLPによる在来・非在来mtDNAの判別をモツゴとオイカワに対しておこなった。マルチプレックスPCRとは、複数のプライマー対を同時に使用して、一度のPCRで複数のDNA断片を増幅する方法である。すでにスナヤツメ北方種と南方種（Yamazaki et al., 2003）、日本在来コイと大陸系コイ（馬淵・西田，2006）、シイラとエビスシイラ（Rocha-Olivares and Chavez-Gonzalez, 2008）といった形態での判別が困難な種のmtDNAを簡易判別する手法として報告されている。そこで、本研究では、モツゴの4系統のそれぞれに特異的なForward方向のプライマー4類を設計し、各プライマーは別の系統の塩基配列とは2〜3箇所以上の違いがあるようにした。それらをReverse方向の1種類のプライマーと混合してPCRすることで、判別したい個体のmtDNA系統ごとに異なるサイズのDNA断片が増幅されるように試みた。しかし、結果的に大陸系統と日本産3系統の間での判別はできたが、日本産3系統はいずれも「近畿・四国特異的プライマー」による増幅が優占し、判別できなかった。前述の既報も2種類の判別しかおこなわれておらず、3種類以上の地理的系統を同時に識別する手法としてのマルチプレックスPCRはプライマー設計と条件検討の難しさのために簡便ではないことが確認された。

PCR-RFLPは、PCR増幅後に制限酵素でDNA断片を切断することで、異なる塩基配列の断片を区別する手法である。マルチプレックスPCRに比べて、PCR後に制限酵素を添加してインキュベートする手間が必要であるが、複数の系統を同時に判別できる場合も多いという利点がある。そこで、モツゴとオイカワについて試行したところ、明瞭に地理的系統の判別をすることができた。

mtDNAの部分塩基配列の決定には、1個体あたりDNA抽出から塩基配列を得るまでの間に600円程度必要だが、PCR-RFLPの場合は100円程度のコストである。必要な機材についても、もっとも高額な機器としてサーマルサイクラー（約30万円）が入手できれば、それ以外の機器をゼロから揃えたとしても20万円強であることから、合計60万円程度で遺伝子解析の基本的な設備を立ち上げ可能である。したがって、必要な背景情報（淡水魚のmtDNAの地域ごとの塩基配列データ）が蓄積されれば、その情報を利用したPCR-RFLPによるmtDNAの地理的系統の判別は予算の少ない

施設やアマチュア研究者にも可能になると考えられる。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

魚類の国内移殖による分布拡大の実態について、mtDNA解析によって多くの情報を得ることが明らかに出来た。特に、mtDNAの多様性を原産地と移入先で比較し、個々のハプロタイプの分布と各地域における多様性を調査することによって、国内移入種の分布拡大パターンを解明できることが明らかになった。また、ゼゼラ、オイカワ、モツゴの3種の日本産淡水魚について、多くのサンプルに基づく系統地理を明らかにした。この知見は、日本列島形成の過程で淡水魚が地理的に分化してきたことを示すとともに、mtDNA解析によって各地の淡水魚が国内移入の影響を受けているのか否かを推定可能であることを証明した。mtDNAの解析は技術的には比較的容易な手法であり、その技術のみで国内移入魚の侵入・分布拡大について多くの情報が得られることを示せたのは、今後の自然環境の攪乱をモニタリングする手法としての有用性を示すものであり、簡便化して普及させるための重要な知見となる。

また、本課題研究で得られた大量の淡水魚の遺伝子情報は、日本列島の自然の成り立ちを明らかにする生物地理学的研究に有用であるのみならず、データベース化によって自然環境の現状を把握し、将来的に自然環境が変容した場合の比較検証のための情報として貢献できるものである。

### (2) 地球環境政策への貢献

国内学会等での発表を通じて、本研究で明らかとなった国内移入魚類の分布の現状や遺伝的攪乱の現状等を提示し、成果の普及に努めた。遺伝的攪乱の解析結果は、各地方におけるレッドリストの検討や保全対策に有用であるため、英語論文だけでなく和文の雑誌記事などを通じて普及啓発をはかる。さらに今後、国際学会等を含めて海外へも成果の広報、普及を行う。

## 6. 引用文献

- 渡辺勝敏・高橋 洋・北村晃寿・横山良太・北川忠生・武島弘彦・佐藤俊平・山本祥一郎・竹花 佑介・向井貴彦・大原健一・井口恵一朗 (2006) 日本産淡水魚類の分布域形成史：系統地理的アプローチとその展望. 魚類学雑誌, 53 : 1-38.
- 堀川まりな・中島 淳・向井貴彦 (2007) 九州北部のゼゼラにおける在来および非在来ミトコンドリアDNAハプロタイプの分布. 魚類学雑誌, 54 : 149-159.
- Y Hashiguchi, T Kado, S Kimura, H Tachida (2006) Comparative phylogeography of two bitterlings, *Tanakia lanceolata* and *T. limbata* (Teleostei, Cyprinidae) in Kyushu and adjacent districts of western Japan, based on mitochondrial DNA analysis. *Zoological Science* 23: 309-322.
- 北九州自然史友の会水生動物研究部会 (2003) 北九州の淡水魚 エビ・カニ 第2版. 北九州市立自然・歴史博物館.
- 川那部浩哉・水野信彦・細谷和海 (2001) 山溪カラー名鑑 日本の淡水魚 改訂版. 山と溪谷社.
- Y Yamazaki, A Goto, M Nishida (2003) Mitochondrial DNA sequence divergence between two cryptic species of *Lethenteron*, with reference to an improved identification technique. *Journal of Fish Biology* 62: 591-609.

馬淵浩司・西田 睦. (2006). PCR 法を用いた琵琶湖産野生型コイのミトコンドリア DNA の簡易識別法. 水産育種, 35: 19-23.

A Rocha-Olivares, JP Chavez-Gonzalez (2008) Molecular identification of dolphinfish species (genus *Coryphaena* ) using multiplex haplotype-specific PCR of mitochondrial DNA. *Ichthyological Research* 55: 389-393.

## 7. 国際共同研究等の状況

該当無し。

## 8. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文 (査読あり) >

- 1) 鬼倉徳雄, 中島淳, 江口勝久, 三宅琢也, 河村功一, 栗田喜久, 西田高志, 乾隆帝, 向井貴彦, 河口洋一: 水環境学会誌, 31, 395-401 (2008) “九州北西部, 有明海・八代海沿岸域のクリークにおける移入魚類の分布の現状”
- 2) 中島淳, 鬼倉徳雄, 兼頭淳, 乾隆帝, 栗田喜久, 中谷祐也, 向井貴彦, 河口洋一: 日本生物地理学会報, 63, 177-188 (2008) “九州北部における外来魚類の分布状況”

<その他誌上発表 (査読なし) >

該当無し。

### (2) 口頭発表 (学会)

- 1) 鬼倉徳雄・中島 淳・江口勝久・三宅琢也・河村功一・向井貴彦・河口洋一・西田高志・乾隆帝・栗田喜久: 第40回日本魚類学会年会 (2007) 「九州北西部、有明海沿岸域のクリーク網における移入魚類の分布パターン」
- 2) 中島 淳・鬼倉徳雄・栗田喜久・向井貴彦・河口洋一: 第40回日本魚類学会年会 (2007) 「九州北部における移入淡水魚類の分布と現状」
- 3) 向井貴彦・早川明里・堀川まりな・中島 淳・鬼倉徳雄: 第55回日本生態学会大会 (2008) 「遺伝子解析による琵琶湖産淡水魚の人為的拡大パターンの推定」
- 4) Y. Kurita, N. Onikura, J. Nakajima, T. Mukai, Y. Kawaguchi: 5th World Fisheries Congress (2008) 「Negative effect of the exotic species, *Opsariichthys uncirostris uncirostris* on indigenous species-Report on the feeding habits of an exotic fish introduced by seed release the interior of Japan」
- 5) 栗田喜久・中島 淳・兼頭 淳・乾隆帝・向井貴彦・河口洋一・鬼倉徳雄: 第41回日本魚類学会年会 (2008) 「九州の細流に見られるハスの年齢・成長と成熟」
- 6) 早川明里・中島 淳・河口洋一・鬼倉徳雄・向井貴彦: 第41回日本魚類学会年会 (2008) 「日本産オイカワ属におけるmtDNAの系統と国内移殖の影響」
- 7) 早川明里・中島 淳・河口洋一・鬼倉徳雄・向井貴彦: 第41回日本魚類学会年会 (2008) 「ハスのmtDNA多型のもとづく人為的分布拡散過程の解析」

- 8) 鬼倉徳雄・中島淳・向井貴彦・河口洋一：平成20年度日本水環境学会九州支部研究発表会 (2009) 「新たな外来魚問題：九州における国内外来魚の分布の現状」
- 9) 早川明里、高村健二、中島淳、河口洋一、鬼倉徳雄、向井貴彦：第56回日本生態学会大会 (2009) 「日本列島におけるオイカワの系統地理と国内移殖の実態」
- 10) 佐藤真弓・河口洋一・中島 淳・向井貴彦・鬼倉徳雄：第56回日本生態学会盛岡大会 (2009) 「九州における国内移入魚ハス (*Opsariichthys uncirostris uncirostris*) の定着メカニズムの解明」

(3) 出願特許

該当無し。

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

該当無し。

(5) マスコミ等への公表・報道等

該当無し。

(6) その他

該当無し。