

日本における特定外来生物チャネルキャットフィッシュのミトコンドリアDNAハプロタイプの分布

誌名	魚類学雑誌
ISSN	00215090
著者	向井, 貴彦 Padhi, A. 臼杵, 崇広 山本, 大輔 加納, 光樹 萩原, 富司 榎本, 昌宏 松崎, 慎一郎
巻/号	63巻2号
掲載ページ	p. 81-87
発行年月	2016年11月

日本における特定外来生物チャネルキャットフィッシュの ミトコンドリアDNAハプロタイプの分布

向井貴彦¹・Abinash Padhi^{2,9}・臼杵崇広³・山本大輔⁴・加納光樹⁵・
萩原富司⁶・榎本昌宏⁷・松崎慎一郎⁸

¹ 〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 岐阜大学地域科学部

² Department of Biological Sciences, University of Tulsa, 800 S. Tucker Dr. OK-74104, USA

³ 〒522-0057 滋賀県彦根市八坂町2138-3 滋賀県水産試験場

⁴ 〒471-0025 愛知県豊田市西町2-19 豊田市職員会館1階 豊田市矢作川研究所

⁵ 〒311-2402 茨城県潮来市大生1375 茨城大学広域水圏環境科学教育研究センター

⁶ 〒111-0051 東京都台東区蔵前3-17-3 蔵前インテリジェントビル8階
一般財団法人地球・人間環境フォーラム

⁷ 〒970-0316 福島県いわき市下神白字松下13-2 福島県水産試験場

⁸ 〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2 国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター

⁹ 現所属：Department of Animal and Avian Sciences, University of Maryland, College Park, MD-20742, USA

(2016年4月5日受付；2016年7月4日改訂；2016年7月5日受理)

キーワード：特定外来生物，導入起源，分布拡大，mtDNA

魚類学雑誌
Japanese Journal of
Ichthyology

© The Ichthyological Society of Japan 2016

Takahiko Mukai*, Abinash Padhi, Takahiro Usuki, Daisuke Yamamoto, Kouki Kanou, Tomiji Hagiwara, Masahiro Enomoto and Shin-ichiro S. Matsuzaki. 2016. Distribution of mitochondrial DNA haplotypes of invasive channel catfish in Japan. Japan. J. Ichthyol., 63(2): 81-87.

Abstract The North American channel catfish *Ictalurus punctatus*, an invasive freshwater fish introduced to Japan for aquaculture in the 1970s, has become established in several rivers and lakes, with subsequent detrimental effects on local fisheries and other freshwater fauna. The origin and invasive distribution of channel catfish in Japan was assessed from the geographical distribution of mtDNA haplotypes of channel catfish populations, utilizing partial (412 bp) nucleotide sequences of the mtDNA control region from 174 individuals collected from 7 localities. A total of 12 haplotypes (J01-J12) were found in Japanese freshwater systems. Populations in eastern Japan (Fukushima and Ibaraki Prefectures) and a fishing pond in Aichi Prefecture were characterized by many haplotypes, shared among those localities. However, the haplotype compositions of populations in western Japan (Yahagi River, Aichi Prefecture and Lake Biwa water system, Shiga Prefecture) differed from the former and also from each other. A phylogenetic analysis using Japanese (non-indigenous), Chinese (non-indigenous) and United States (indigenous) haplotypes indicated that all of the Asian haplotypes were included in "Lineage VI," distributed over a wide area of the United States, confirming that lineage as the primary source of introduced Asian populations. However, the introduction of channel catfish into Japan occurred on at least three occasions (in eastern Japan, Yahagi River and Lake Biwa water system).

*Corresponding author: Faculty of Regional Studies, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan (e-mail: tmukai@gifu-u.ac.jp)

チャンネルキャットフィッシュ *Ictalurus punctatus* は北米原産のアメリカナマズ科の淡水魚であり、原産地では1960年代から食用目的での商業養殖が急速に発展し、現在では中南米やロシア、中国などでも食用や釣りのために養殖されている (Stickney, 2004). 日本では1971年から1976年にカリフォルニア州, ジョージア州, アラバマ州の養魚場等から民間の食品会社の研究所や淡水区水産研究所などに発眼卵や稚魚が輸入された (丸山ほか, 1987). その後, 埼玉県水産試験場で養殖技術に関する研究がおこなわれるとともに, 茨城県の霞ヶ浦 (本報告での「霞ヶ浦」は, 広義の定義である「西浦・北浦・外浪逆浦・北利根川・鰯川・常陸川の各水域の総体」ではなく, 狭義の定義である「西浦」のみを示す) の網生け簀や埼玉県内の養魚池で養殖が始まった (萩原・熊谷, 2007). 1981年頃に養殖が開始された霞ヶ浦では生け簀からの逸出もしくは売れ行きが悪いことによる湖内への投棄が生じ (萩原・熊谷, 2007), 埼玉県内の養魚池では1982年の台風によって江戸川に流出したことで (芦原, 2001), 1980年代半ばから霞ヶ浦と江戸川のほかに利根川でも見つかるようになったとされている (半澤・荒山, 2007; 尾崎・宮部, 2007; 金澤, 2014). 霞ヶ浦では, 1990年代半ばまでは時折漁獲される程度であったが, 2000年頃に稚魚の大量発生が確認されてからは急増し, 2002年以降には近接する北浦でも増加傾向が認められている (半澤, 2004; 片野ほか, 2010). 現在, 霞ヶ浦・北浦を含む利根川水系では広く生息が確認されており (片野ほか, 2010), 水産有用種や絶滅危惧種への捕食影響が懸念されているほか (荒山, 2015; 遠藤ほか, 2015), 霞ヶ浦では在来の底生魚類の生息量に負の影響を与えている (Matsuzaki et al., 2011).

日本国内の他の水域では, 福島県阿武隈川, 岐阜県下小鳥ダム, 愛知県矢作川で繁殖していると考えられている (片野ほか, 2010). 滋賀県では2001年以降に琵琶湖や瀬田川で散発的に捕獲例があったが, 2013年から瀬田川での捕獲数が急増している (2013年7月3日付毎日新聞; 2015年2月17日付産経新聞). 瀬田川では, さまざまなサイズが捕獲されるようになったことから, すでに繁殖・定着していると考えられている (白杵, 未発表). これらのチャンネルキャットフィッシュの侵入について, 下小鳥ダムは湖内での養殖生簀からの逸出が原因と考えられているが, 阿武隈川,

矢作川, 琵琶湖水系は導入経路が不明である. ただし, 阿武隈川流域にはチャンネルキャットフィッシュを利用した釣堀が複数あったため, そこからの流出の可能性がある (片野ほか, 2010).

2005年に施行された「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」(外来生物法)において, チャンネルキャットフィッシュは特定外来生物として指定され, 輸入・飼育・生体の移送や販売などが規制されている. そのため, 今後のチャンネルキャットフィッシュの養殖の普及・拡大は考えられないが, これ以上の分布拡大を防ぐための対策を講じるにあたっては, 導入経路が不明な地域のチャンネルキャットフィッシュの由来を明らかにすることが重要である. そこで, 本研究では, 日本国内のチャンネルキャットフィッシュのミトコンドリアDNAの解析を行い, 各地域のチャンネルキャットフィッシュの導入起源を推定することを試みた.

材料と方法

2010年から2014年に, 片野ほか (2010) でチャンネルキャットフィッシュの侵入が確認されている主要水域のうちの4水系6地点と釣堀1地点 (Fig. 1) で, 174個体の鱭の一部もしくは体側筋の一部を採取し, 99.5%エタノールで保存した. 愛知県三河地方の釣堀のチャンネルキャットフィッシュは, 自然水域で捕獲されたものではなく, 釣り用に飼育されていた個体の鱭の一部を入手して用いた. 滋賀県の琵琶湖については, 2012年から

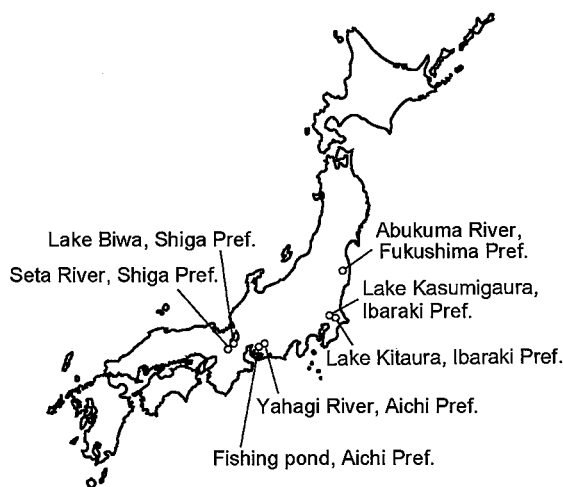


Fig. 1. Sampling localities of invasive channel catfish *Ictalurus punctatus* in Japan.

2014 年にかけて草津市および大津市で散発的に採集されたサンプルを集めて解析した。

各供試魚の DNA 抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン社) もしくは QuickGene DNA tissue kit S (クラボウ社) を用いて行った。ミトコンドリア DNA 調節領域の部分塩基配列 (約 400 bp) を対象とした PCR 増幅と塩基配列の決定には、CR-F (5'-AAC TCT CAC CCC TAG CTC CCA AAG-3') と CR-R (5'-CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG-3') (Kocher et al., 1989; Meyer et al., 1990) のプライマー対を用いた。PCR には Crimson Taq PCR sampler (ニューイングランドバイオラボ社) のバッファーと Ex Taq DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ株式会社) を使用し、常法に従ってサーマルサイクラーで 95°C1 分, 55°C1 分, 72°C2 分の温度サイクルを 30 回繰り返して増幅を行った。PCR 産物は ExoSAP-IT キット (GE ヘルスケアジャパン社) を用いて処理した後、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 (アプライドバイオシステムズ社) でシークエンス反応をおこない、Clean SEQ (ベックマン・コールター社) で精製、ABI 3100 Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。

また、Padhi (2013) において北米の 56 地点 584 個体から得られた 105 種類のハプロタイプ (C01-C105, 国際塩基配列データベース登録番号

KC684587-KC684872) と、中国産のチャネルキャットフィッシュの塩基配列データ 11 件 (登録番号 JN872357-JN872359, Sui, unpublished; EF139157-EF139164, He et al., unpublished) を比較に用いた。比較のための多重整列には Clustal X (Thompson et al., 1997) を用い、MEGA6 (Tamura et al., 2013) で近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) による系統樹の推定を行った。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。日本に導入されたハプロタイプと北米および中国のハプロタイプとの異同を確認するため、遺伝距離は *p*-distance を用いて、内群のみの無根系統樹として推定した。遺伝距離を算出する時のギャップの扱いは pairwise deletion とした。日本国内の集団間の遺伝的分化は、Arlequin ver 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) を用いてペアワイズ F_{ST} を計算し、1000 回の permutation test によって検定した。

結 果

日本国内で採集された 174 個体のチャネルキャットフィッシュから得られたミトコンドリア DNA 調節領域の部分塩基配列について、Padhi (2013) の 105 種類の塩基配列および中国産の 11

Table 1. Distribution of mtDNA haplotypes of non-indigenous channel catfish in Japan

Locality	<i>n</i>	Haplotype											
		J01	J02	J03	J04	J05	J06	J07	J08	J09	J10	J11	J12
Abukuma R., Fukushima	30	16		2	1	8	2	1					
L. Kasumigaura, Ibaraki	35	1	4	13	4	4		3	4	1	1		
L. Kitaura, Ibaraki	23	4	1	12		4	1					1	
Fishing pond, Aichi	7	2	1	1		1			2				
Yahagi River, Aichi	12											12	
Lake Biwa, Shiga	7	3											4
Seta River, Shiga	60	24											36

Table 2. Pairwise F_{ST} among non-indigenous populations of channel catfish in Japan

	1	2	3	4	5	6	7
1. Abukuma R.		**	**	-	**	**	**
2. L. Kasumigaura	0.17055		**	-	**	**	**
3. L. Kitaura	0.13686	0.11891		-	**	**	**
4. Fishing pond, Aichi	-0.01690	0.03621	0.07352		**	-	**
5. Yahagi R.	0.60627	0.65037	0.38665	0.74507		**	**
6. L. Biwa	0.30682	0.33934	0.22364	0.24963	0.68889		-
7. Seta R.	0.33685	0.34694	0.26730	0.31177	0.52444	-0.08473	

**Significant differences from 0 ($P < 0.01$).

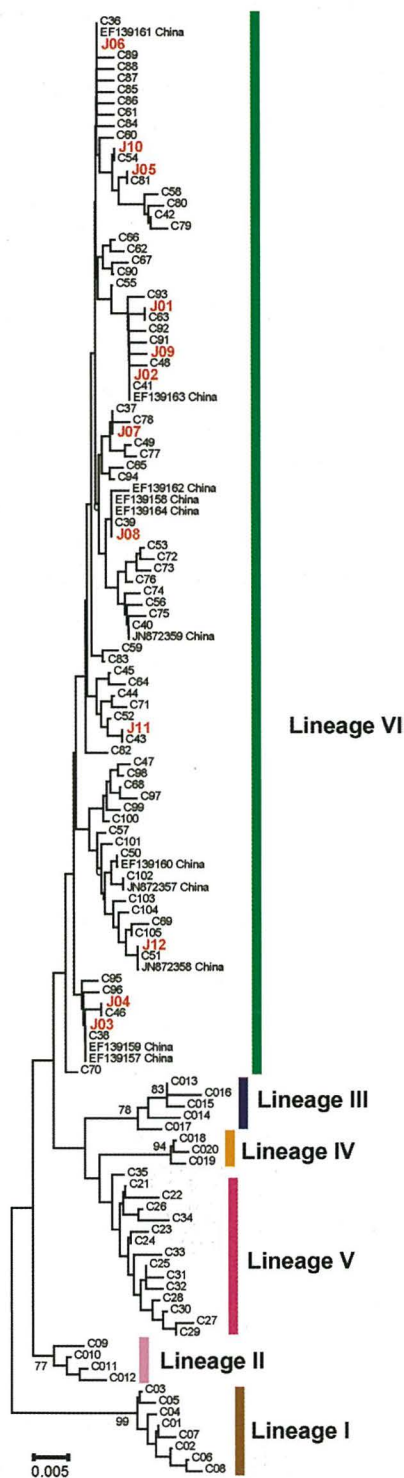


Fig. 2. Unrooted neighbor-joining (NJ) tree based on genetic distances estimated from mitochondrial control region sequences (412 bp including indels) of the channel catfish. Distances are based on uncorrected p -distance and calculated using MEGA6 (Tamura et al., 2013). Gaps/missing data treatment option was 'pairwise deletion.' Numbers adjacent to internal branches indicate bootstrap probabilities ($> 70\%$) based on 1,000 pseudoreplicates. Scale bar indicates the genetic distance. Haplotypes included: J01-J12 [Japan (Accession Nos. LC144621-LC144632) (this study)] and C01-C105 [USA (Accession Nos. KC684587-KC684872) (Padhi, 2013)]. Accession Nos. JN872357-JN872359 and EF139157-EF139164 were from non-indigenous channel catfish in China (Sui unpublished and He et al. unpublished). Lineages I-VI are identical to the haplotype groups in Padhi (2013) (I-V, endemic southeastern USA; VI, widely distributed in North America).

件の登録データと多重整列を行い、相同な 412 塩基対（ギャップ含む）を比較に用いた。なお、中国産チャンネルキャットフィッシュのデータは、塩基配列の先頭が 2 塩基少なかったため、それらの塩基配列の先頭 2 塩基はギャップ（missing data）として扱った。この 412 塩基対において、日本産チャンネルキャットフィッシュからは 12 種類のハプロタイプ（J01-J12）が得られた。これらのハプロタイプの塩基配列は、国際塩基配列データベースに登録した（登録番号 LC144621-LC144632）。

もっとも多くのハプロタイプが見つかったのは霞ヶ浦で、35 個体から 9 種類のハプロタイプが得られた（Table 1）。阿武隈川、北浦、愛知県の釣堀では 5~6 種類のハプロタイプが見つかったが、それらのほとんどは霞ヶ浦で見出されているものであった。また、琵琶湖と瀬田川では J01 と J12 の 2 種類のみ、矢作川では J11 の 1 種類のハプロタイプのみが見つかった。集団間の遺伝的分化についてペアワイズ F_{ST} を計算した結果（Table 2）、ほとんどの集団間で遺伝的分化が有意であったが、愛知県の釣堀は、阿武隈川、霞ヶ浦、北浦、琵琶湖の集団との間で有意な遺伝的分化が見られなかった。また、琵琶湖と瀬田川の間にも遺伝的分化は見られなかった。

日本国内で得られた 12 種類のハプロタイプと、北米および中国産チャンネルキャットフィッシュの塩基配列で系統樹を推定した結果、ブーツストラップ確率は低いものの、Padhi (2013) で見いだされた 6 つの系統（Lineage I-VI）が再現され、日本で見つかった 12 種類のハプロタイプと、中国の 11 件の登録データは、すべて Lineage VI に含まれた（Fig. 2）。また、J09 以外はすべて既知のハプロタイプと一致し、日本で見つかった 12 種類のハプロタイプのうちの 5 種類（J02, J03, J06, J08, J12）は、中国のチャンネルキャットフィッシュと同じハプロタイプだった。

考 察

日本に導入されたチャンネルキャットフィッシュの各集団におけるミトコンドリア DNA ハプロタイプを比較した結果、霞ヶ浦と類似したハプロタイプ組成を持つ集団（阿武隈川・北浦・愛知県の釣堀）と、それらの集団には無い（もしくは稀な）ハプロタイプが優占する集団（矢作川・琵琶湖・瀬田川）に分けられた。

前者の集団間では、サンプル数の少ない愛知県

の釣堀を除いて、有意な遺伝的分化（ハプロタイプ頻度の違い）が見られたが、各集団に存在するハプロタイプの多くは共通していた。霞ヶ浦に隣接する北浦は、霞ヶ浦からの河川・水路を通じた分散による定着と考えられるが、分散過程におけるボトルネックによってハプロタイプ頻度に違いが生じた可能性がある。福島県の阿武隈川では、外来生物法施行前にチャンネルキャットフィッシュを利用していた釣堀が流域に複数あったため（片野ほか、2010）、釣堀で利用していたチャンネルキャットフィッシュが霞ヶ浦産だった場合、そこからの流出が侵入起源だと考えられる。片野ほか（2010）は、岐阜県飛騨市におけるチャンネルキャットフィッシュ養殖は霞ヶ浦で買い付けた成魚を育てているとしており、本研究でも、愛知県の釣堀のチャンネルキャットフィッシュは霞ヶ浦産と遺伝的に有意な差が見られなかったため、外来生物法施行前には霞ヶ浦産のチャンネルキャットフィッシュが各地の養殖や釣堀用に流通していたものと考えられる。また、外来生物法施行後も「生業の維持」として許可を得ている場合は、現在でも流通している可能性がある。

一方、矢作川はハプロタイプ J11 のみが見つかっており、愛知県三河地方の釣堀のチャンネルキャットフィッシュのハプロタイプとは異なっていた。ハプロタイプ J11 は、矢作川以外では、北浦のみ 1 個体見つかっており、国内の他の集団では稀なハプロタイプであった。矢作川へのチャンネルキャットフィッシュの導入起源は不明だが、少なくとも今回サンプルを入手した釣堀からの流出とは考えられない。また、霞ヶ浦や北浦からたまたま稀なハプロタイプの個体が導入されて増加したこともありえるが、別ルートで海外から輸入された個体が起源となったと考えるほうが自然である。

琵琶湖と瀬田川についても、ハプロタイプ J01 と J12 が見つかっているが、出現頻度の高いハプロタイプ J12 は、他地域では見つかっていない。したがって、琵琶湖と瀬田川についても、他地域とは別に輸入された個体が起源となった可能性がある。また、琵琶湖と瀬田川のチャンネルキャットフィッシュのハプロタイプ頻度には全く差が無いため、これらの両集団間で個体の移動があることが示唆される。

日本のチャンネルキャットフィッシュのハプロタイプ組成の地域差から、複数の導入起源が示唆されるが、系統的にはすべて北米の Lineage VI に含まれた。Lineage I-V は、アメリカ合衆国のフロ

リダ半島周辺に分布する地域固有系統であり、Lineage VIはミシシッピ川流域に広く分布する系統と考えられている (Padhi, 2013)。Lineage VIは養殖用に北米各地に導入されており、中国に導入されたチャンネルキャットフィッシュも Lineage VIであることが系統解析によって示された (Fig. 2)。本研究で日本国内から見つかった12種類のハプロタイプのうち、5種類は中国産と同じであり、北米から海外に輸出されている一般的な種苗であると考えられる。中国経由での日本への導入も考えられるが、少なくともデータベースに登録されている中国産のハプロタイプに見られないものが7種類も見ついているため、北米からの直接的な輸入の可能性が高いと考えられる。

現在は、外来生物法によって海外からのチャンネルキャットフィッシュの輸入は規制されているが、密輸入された個体が新たに導入され定着する可能性が皆無とはいえない。また、外来生物法施行以前に特定外来生物の魚類を飼養していた業者は、生業の維持として特別に飼養の許可を得て養殖や釣堀での利用を継続しているため (加納ほか, 2009)、それらの施設からの逸出のリスクは本種についても依然として存在する。さらに、定着水域からの生体の持ち出しや他水域への放流行為は法令違反で厳罰に処されるものの、釣り行為自体は規制されていないため、法律の内容を十分に理解していない一般漁業者の持ち出しや違法放流による国内での二次的分布拡大も危惧される。しかし、日本に定着しているチャンネルキャットフィッシュのハプロタイプ組成は、主な一次導入地域と推測される霞ヶ浦 (利根川水系)、矢作川、琵琶湖の間で異なっており、こうした遺伝情報を用いることで海外からの密輸入等や国内の二次的分布拡大の有無を推定することが可能になると考えられる。したがって、今後は、新たなチャンネルキャットフィッシュの侵入地が見つかった場合、それが近隣水域からの移動分散なのか、あるいは密輸入や違法放流等によるものなのかを推定し、必要に応じて法的規制の強化などの対策を提案する必要があるだろう。

謝 辞

標本の採集は、伊藤 玄氏 (岐阜大学大学院連合農学研究科)、赤塚詠司氏 (岐阜大学地域科学部)、上野欣一氏 (湖南漁業協同組合) および琵琶湖、瀬田川の関係漁業協同組合の皆様、茨城大

学広域水圏環境科学教育研究センターの皆様、阿武隈川漁業協同組合の皆様、DNA解析は、岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム分野にご協力いただいた。厚く御礼申し上げる。

引用文献

- 荒山和則. 2015. 霞ヶ浦における近年の外来魚問題—チャンネルキャットフィッシュの現状—. 水環境学会誌, 38(A): 56–60.
- 芦原修二. 2001. 川魚図志<増補改訂新版>. 崙書房, 流山市. 404 pp.
- 遠藤友樹・金子誠也・猪狩健太・加納光樹・中里亮治・亀井涼平・碓井星二・百成 涉. 2015. 茨城県北浦の沿岸帯におけるチャンネルキャットフィッシュの摂餌特性. 水産増殖, 63: 49–58.
- Excoffier, L. and H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Res., 10: 564–567.
- 萩原富司・熊谷正裕. 2007. 平成調査 新・霞ヶ浦の魚たち. (社)霞ヶ浦市民協会, 土浦. 158 pp.
- 半澤浩美. 2004. 霞ヶ浦におけるチャンネルキャットフィッシュ (*Ictalurus punctatus*) の食性. 茨城県内水面水産試験場調査研究報告, 39: 52–58.
- 半澤浩美・荒山和則. 2007. 霞ヶ浦における外来魚チャンネルキャットフィッシュの季節的分布様式. 水産増殖, 55: 515–520.
- 金澤 光. 2014. 埼玉県に生息する魚類の生息状況について. 埼玉県環境科学国際センター報, 14: 95–106.
- 加納光樹・久保田正秀・荒山和則. 2009. オオクチバスの耳石と鱗へのアリザリン・コンプレキソンによる染色. 水産技術, 1: 71–75.
- 片野 修・佐久間 徹・岩崎 順・喜多 明・尾崎真澄・坂本 浩・山崎裕治・阿部夏丸・新見克也・上垣雅史. 2010. 日本におけるチャンネルキャットフィッシュの現状. 保全生態学研究, 15: 147–152.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca and A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86: 6196–6200.
- 丸山為蔵・藤井一則・木島利通・前田弘也. 1987. 外国産新魚種の導入経過. 水産庁研究部資源課・水産庁養殖研究所, 東京. 157 pp.
- Matsuzaki, S. S., N. Takamura, K. Arayama, A. Tominaga, J. Iwasaki and I. Washitani. 2011. Potential impacts of non-native channel catfish on commercially important species in a Japanese lake, as inferred from long-term monitoring data. Aquatic Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst., 21: 348–358.

- Meyer, A., T. D. Kocher, P. Basasibwaki and A. C. Wilson. 1990. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347: 550–553.
- 尾崎真澄・宮部多寿. 2007. 利根川下流域におけるチャネルキャットフィッシュの漁獲実態. 千葉県水産総合研究センター研究報告, 2: 33–41.
- Padhi, A. 2013. Genetic evidence of multiple matrilineal lineages of the channel catfish, *Ictalurus punctatus* in North America. *Conserv. Genet.*, 14: 907–912.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406–425.
- Stickney, R. R. 2004. *Ictalurus punctatus*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Online in FAO Fisheries and Aquaculture Department: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ictalurus_punctatus/en. (cited on March 16, 2016).
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. *Mol. Biol. Evol.*, 30: 2725–2729.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acids Res.*, 25: 4876–4882.