

奈良県大和川水系のメダカ集団から確認されたヒメダカ由来のミトコンドリアDNA

誌名	魚類学雑誌
ISSN	00215090
著者名	小山,直人 北川,忠生
発行元	日本魚学振興會
巻/号	56巻2号
掲載ページ	p. 153-157
発行年月	2009年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



奈良県大和川水系のメダカ集団から確認された
ヒメダカ由来のミトコンドリアDNA

小山直人・北川忠生

〒631-8505 奈良市中町3327-204 近畿大学大学院農学研究科

(2008年12月17日受付; 2009年7月30日改訂; 2009年7月31日受理)

キーワード: ヒメダカ, mtDNA, 遺伝子移入, PCR-RFLP, Hd-rR系統, 大和川水系

魚類学雑誌
Japanese Journal of
Ichthyology

© The Ichthyological Society of Japan 2009

Naoto Koyama and Tadao Kitagawa*. 2009. Mitochondrial DNA originating from the orange-red type commercial strains of *Oryzias latipes* (himedaka) detected in wild populations inhabiting the Yamato River system, Nara Prefecture, Japan. *J. Ichthyol.* 56(2): 153-157.

Abstract In order to examine genetic introgression from the orange-red type commercial strain of *Oryzias latipes* (himedaka) to wild medaka populations, a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of the mitochondrial cytochrome *b* gene was conducted for 45 populations from the Yamato River system, Nara Prefecture and two fish farm populations from special product grounds of himedaka (Yamatokoriyama and Yatomi Cities). Orange-red type fish only were collected from three sites, and a mixture of wild and orange-red types from sympatric populations at four other sites in the Yamato R. system. Most orange-red type specimens had the B27 mitotype, being identical with that of the typical orange-red type Hd-rR strain. Although most of the wild type fish individuals had mitotype B1a, inferred as one of the native mitotypes in the Yamato R., four from three sites had mitotype B27, implying genetic introgression from himedaka to wild medaka populations.

*Corresponding author: Graduate School of Agriculture, Kinki University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan (e-mail: tkitagaw@nara.kindai.ac.jp)

メダカ *Oryzias latipes* は、本来北海道を除く日本各地に生息しているメダカ科の淡水魚で、かつては水田の用水路などに多く生息していたが、近年では都市化やオオクチバスなどの外来魚の影響により分布域が縮小し続けている (林, 2003)。そのため現在では、環境省 RL (環境省, 2007) において絶滅危惧II類に指定されている。また本種の国内集団は、大きく遺伝的に異なる北日本集団と南日本集団、さらに南日本集団は様々な地方型に分けられる (竹花, 2002; Takehana et al., 2003)。しかし、自然環境の保護活動や環境教育等を理由として、このような地理的分化を無視した人為的放流が日本各地で行われ、異なる地域集団からの遺伝子移入が問題となっている (瀬能,

2000; 竹花, 2002)。特に、メダカの黄色変異系統で、観賞用や熱帯魚の餌用として大量に流通しているヒメダカの放流が問題視されており、野外におけるヒメダカが目撃情報も多い (瀬能, 2000)。しかし、自然下においてヒメダカが野生メダカと交雑し遺伝子移入を引き起こしている実態については確認されていない。

奈良県の大和川水系では、一部のため池や用水路に生息場所が限定されているものの、メダカにとって比較的多くの生息環境が残されていることが明らかとなっている (久米, 2006)。しかし、近年の移殖放流の実態を考慮すると、これらすべてが大和川水系本来の遺伝子組成をもったメダカであるかは不明である。また、大和川水系の一部が

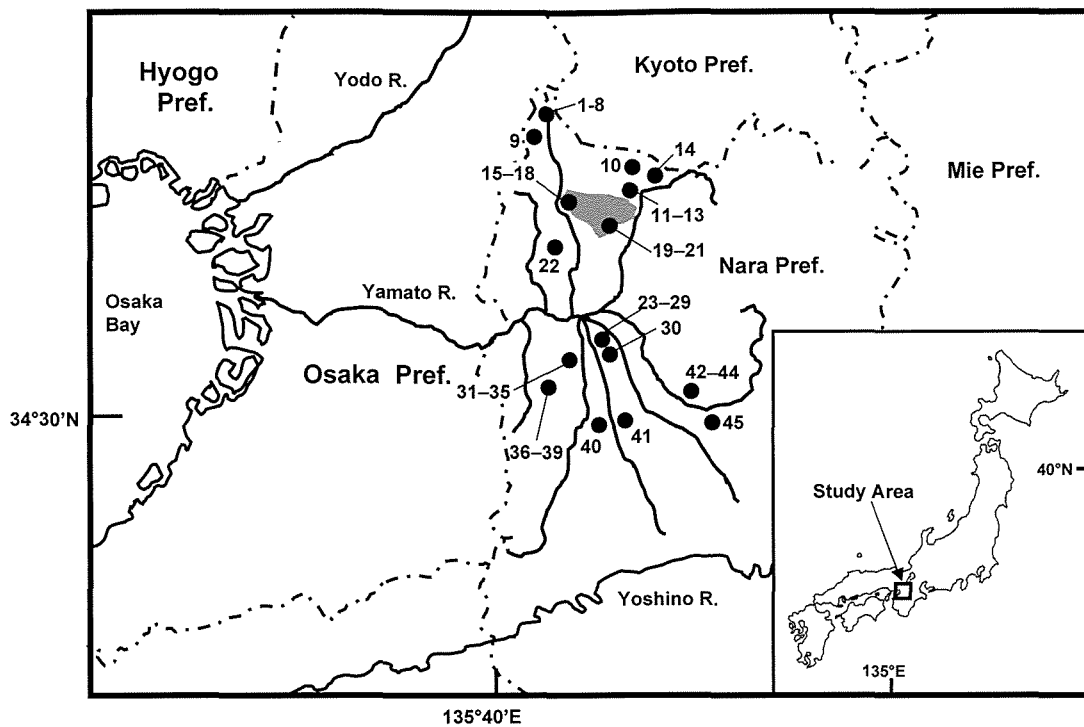


Fig. 1. Collection sites of *Oryzias latipes*. Numbers refer to locations listed in Table 1. Shaded area indicates Yamatokoriyama City.

流れる大和郡山市は全国的に有名なヒメダカの産地で、市内には多くの大規模な養殖池が存在している。これらの養殖池は、平地に掘られた浅い人工池が多く、水路により大和川の支流とつながっているため、大雨などの影響でヒメダカが容易に逸出する状態になっている。そのため、大和川水系ではこのような逸出したヒメダカによる遺伝子汚染が生じる可能性が高いと考えられる。

そこで本研究では、奈良県大和川水系におけるヒメダカからの遺伝子移入の実態の解明を目的とし、奈良県大和川水系に生息するメダカ集団についてmtDNAチトクローム**b**領域を対象とした遺伝子解析を行ったので報告する。なお、本報告でのヒメダカとは流通している黄色型個体のみを指し、自然界で生じた黄色型個体を含む可能性がある野外での採集個体については黄色型メダカと表現するにとどめた。

材料と方法

奈良県大和川水系におけるメダカの採集は、奈良県大和川水系全体において2006年3月から2008年11月にそれぞれタモ網採集によって行った (Fig 1)。また採集の際、体色により野生型メダカと黄

色型メダカを区別し、黄色型メダカが野生型メダカと同所的に確認された場合は、その個体を含むようにした。メダカの採集にあたっては、日本魚類学会の「研究材料として魚類を使用する際のガイドライン」に基づき、メダカ集団に与える影響を抑えるため、1集団あたり最大5個体までの採集とした。なお本報告では、希少種保護の観点から採集場所の詳細な情報は省いた。大和川水系の45地点 (Stns. 1-45) で採集した183個体に、比較対象として大和郡山市の養魚場 (Stn. 46) および同じくヒメダカの養殖が盛んである愛知県弥富市の養魚場 (Stn. 47) から購入したヒメダカ各10個体を加えた計203個体を遺伝子解析用のサンプルとした。これらの標本は70%エタノールに固定され、近畿大学農学部において登録・保管されている (KUNP 040652-040854)。

各標本からフェノール・クロロホルム法 (Asahida et al., 1996) に従い全DNAを抽出し、これらの全DNAを鋳型にして、Takehana et al. (2003) に基づいてmtDNAチトクローム**b**遺伝子領域を含む約1.2 kbのDNA断片を、プライマーセット (L鎖側 5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC-3', H鎖側 5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA

AGA CCG-3') を用いて、PCR法により増幅した。PCRによって増幅されたDNA断片の切断には、各地域集団の識別に有効である5種類の制限酵素 (*Hae* III, *Msp* I, *Mbo* I, *Rsa* I, *Taq* I) を用いて処理し、3%アガロースゲルを用いた電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色およびUV写真撮影を行った。得られた泳動パターンを比較し、各個体もつmtDNAの遺伝子型(マイトタイプ)を判定した。各マイトタイプにおける各制限酵素の切断型については、Takehana et al. (2003) に従った。

さらに、詳細な遺伝子型を検討するため、一部の個体についてチトクローム*b*領域(1141 bp)の塩基配列決定を行った。PCR反応のプライマーおよび反応条件は、上記と同様のものを使用した。NucleSpin Extract (Takara Biosystems社製)によりPCR産物を精製した後、Big Dye Terminator Ver.1 (Applied Biosystems社製)によりシークエンス反応を行った。塩基配列決定はABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社製)により行った。

結果と考察

大和川水系の計45地点で採集を行った結果、Stns. 10, 14, 30, 41, 45では1個体、Stns. 19, 20では5個体の黄色型メダカが得られ、このうちStns. 14, 30, 41, 45では野生型メダカと黄色型メダカが同所的に得られた(Table 1)。黄色型メダカのみが得られたStn. 20は、ヒメダカの養殖池に隣接する水路であったため、これらの黄色型メダカが養殖池から逸出した個体の可能性が高い。これらの養殖池が存在する大和郡山市およびこれに隣接する奈良市においては、大和川水系内の他の地域と比較して黄色型メダカが多数確認されており、ヒメダカの放流または逸出の影響を強く受けていることが示唆された。また、採集地点付近に養殖場が存在しないStns. 30, 41, 45においては、環境教育や自然保護活動などによる人為的放流が行われた可能性もある。

愛知県弥富市および奈良県大和郡山市で購入したヒメダカのmtDNAのチトクローム*b*領域のPCR-RFLP分析を行った結果、東日本集団由来のマイトタイプB27(16個体)と東瀬戸内集団由来のマイトタイプB1a(4個体)が検出された(Table 1)。これは、大和郡山産と弥富産のヒメダカが変異に富み、東日本型や瀬戸内型の変異をもつことが示されたアロザイム分析の結果(Sakaizumi et al., 1983; 酒泉, 1990)と一致するものであった。

大和川水系内で採集されたメダカのmtDNAのチ

トクローム*b*領域のPCR-RFLP分析を行った結果、全45地点中38地点では、解析に用いたすべての個体において南日本集団東瀬戸内型に固有なマイトタイプB1aが検出された(Table 1)。Takehana et al. (2003)によると、大和川水系を含む紀伊半島の西側河川は東瀬戸内型のマイトタイプの分布域となっているため、これらは大和川水系本来のマイトタイプである可能性が高い。しかし、Stns. 9, 10, 14, 30(各1個体)、Stn. 21(2個体)、Stns. 19, 20(各5個体)の計7地点の計16個体において、これとは異なるマイトタイプB27が検出された。このマイトタイプB27は、確認された7地点のうち4地点(Stns. 10, 14, 19, 20)で黄色型メダカが保有していたこと、大和郡山市および弥富市の養殖場で購入したヒメダカ計20個体のうち16個体がこのマイトタイプを保有していたこと(Table 1)、さらに、代表的な黄色型系統で実験モデル生物として用いられているHd-rR系統(Hyodo-Taguchi and Sakaizumi, 1993)が保有しているマイトタイプであること(Takehana et al., 2003)から、ヒメダカを特徴づけるマイトタイプであると考えられる。大和川水系および養殖場から検出されたマイトタイプB27についてより詳細に調べるため、これらが検出された6地点(Stns. 9, 10, 14, 19, 20, 21)および養殖場2地点より各1個体を選びチトクローム*b*領域(1141 bp)の塩基配列決定を行った。その結果、すべての個体から得られた塩基配列はHd-rR系統のもの(DDBJ登録番号AB084753)と完全に一致し、これらが共通の母系集団に由来することが明らかとなった。現在では、ヒメダカの黄色変異の原因遺伝子(*b*遺伝子)や遺伝子上の変異が生じている位置が特定されている(Fukamachi et al., 2001; Fukamachi et al., 2008)。ヒメダカがHd-rRと同一起源に由来するものであれば、*b*遺伝子上の欠損部分もヒメダカとHd-rR系統で一致する可能性が高い。今後、Hd-rRで特定されている*b*遺伝子の欠損部位のDNA配列の変異をもとにマーカー化することにより、核DNA上のヒメダカの遺伝子をより直接的に検出できると考えられる。

本研究の結果においてもっとも注目すべきことは、大和川水系の3地点(Stns. 9, 21, 30)の計4個体の野生型メダカから、ヒメダカを特徴づけるマイトタイプ27が検出されたことである(Table 1)。このことは、ヒメダカから野生メダカ集団の雑種化やそれに伴う遺伝子移入があったことを示唆している。今後、雑種化していると考えられた集団については、分析個体数を増やし、どの程度交雑が

Table 1. Collection sites, sample size (*n*) and observed mitotypes of *Oryzias latipes*

Stn. No.	Collection site	W	OR	Mitotype	
				W	OR
1	Ikoma 1	1	0	B1a (1)	0
2	Ikoma 2	3	0	B1a (3)	0
3	Ikoma 3	3	0	B1a (3)	0
4	Ikoma 4	3	0	B1a (3)	0
5	Ikoma 5	4	0	B1a (4)	0
6	Ikoma 6	5	0	B1a (5)	0
7	Ikoma 7	5	0	B1a (5)	0
8	Ikoma 8	5	0	B1a (5)	0
9	Ikoma 9	5	0	B1a (4), B27* (1)	0
10	Nara 1	0	1	0	B27* (1)
11	Nara 2	1	0	B1a (1)	0
12	Nara 3	2	0	B1a (2)	0
13	Nara 4	5	0	B1a (5)	0
14	Nara 5	4	1	B1a (4)	B27* (1)
15	Yamatokoriyama 1	1	0	B1a (1)	0
16	Yamatokoriyama 2	5	0	B1a (5)	0
17	Yamatokoriyama 3	5	0	B1a (5)	0
18	Yamatokoriyama 4	5	0	B1a (5)	0
19	Yamatokoriyama 5	0	5	0	B27* (5)
20	Yamatokoriyama 6	0	5	0	B27* (5)
21	Yamatokoriyama 7	4	0	B1a (2), B27* (2)	0
22	Heguri	4	0	B1a (4)	0
23	Kawai	3	0	B1a (3)	0
24	Kawanishi 1	3	0	B1a (3)	0
25	Kawanishi 2	3	0	B1a (3)	0
26	Kawanishi 3	4	0	B1a (4)	0
27	Kawanishi 4	5	0	B1a (5)	0
28	Kawanishi 5	5	0	B1a (5)	0
29	Miyake 1	5	0	B1a (5)	0
30	Miyake 2	4	1	B1a (3), B27 (1)	B1a (1)
31	Koryo 1	5	0	B1a (5)	0
32	Koryo 2	5	0	B1a (5)	0
33	Koryo 3	3	0	B1a (3)	0
34	Koryo 4	4	0	B1a (4)	0
35	Koryo 5	5	0	B1a (5)	0
36	Kanmaki 1	3	0	B1a (3)	0
37	Kanmaki 2	5	0	B1a (5)	0
38	Kashiba	5	0	B1a (5)	0
39	Yamatotakada	5	0	B1a (5)	0
40	Kashihara 1	3	0	B1a (3)	0
41	Kashihara 2	4	1	B1a (4)	B1a (1)
42	Tawaramoto	5	0	B1a (5)	0
43	Sakurai 1	5	0	B1a (5)	0
44	Sakurai 2	5	0	B1a (5)	0
45	Sakurai 3	4	1	B1a (4)	B1a (1)
46	Fish farm in Yamatokoriyama	0	10	0	B1a (3), B27* (7)
47	Fish farm in Yatomi	0	10	0	B1a (1), B27* (9)

W, Wild type fish; OR, Orange-red type fish. Asterisks (*) indicate samples sequenced. Numbers in parentheses indicate number of individuals.

進行しているのかを調査する必要がある。従来、ヒメダカが野生メダカと交雑し遺伝子移入等の遺伝的影響を与える可能性が示唆されてきたが（瀬能，2000），実際に遺伝的に確認された報告はなかった。今回の結果は，その可能性を裏付けるものとして重要である。今後，雑種化や遺伝子移入の原因となるヒメダカの放流は，在来生物の遺伝的攪乱をもたらす行為として認識されるべきであり，ヒメダカの養殖場等においても逸出を防止する措置をとるべきであると考えられる。

また，野生型メダカと黄色型メダカが混獲された Stns. 30, 41, 45 において，黄色型メダカから大和川水系本来の遺伝子型と考えられるミトタイプ B1a が検出された。このことから，遺伝子移入が野生型メダカとヒメダカの間で双方向的に生じている可能性も示唆される。しかし，大和郡山市および弥富市の養殖場のヒメダカ4個体からもミトタイプ B1a が検出されたことから，Stns. 30, 41, 45 の黄色型個体は，自然下に放たれる前にミトタイプ B1a を獲得したヒメダカである可能性もある。さらにこのことは，大和川水系の野生型メダカがもつミトタイプ B1a についても，ヒメダカ由来のものが混入している可能性があることを意味している。今後，大和川水系のミトタイプ B1a についてもより詳細な塩基配列の決定を行い，流通しているヒメダカのものとの比較を行っていく必要がある。

謝 辞

本研究は，平成18年度近畿大学学内助成（課題番号 GS06）および文部科学省現代 GP 近畿大学農学部「里山の修復活動を通じた環境教育の実践」予算に基づいて行われた。また，本論文作成にあたり多くの助言をしていただいた近畿大学農学部水圏生態学研究室の細谷和海教授，久米幸毅氏，伊藤毅彦氏，分析に協力していただいた同森幹大氏，標本の採集と提供に協力していただいた同上村英男氏，澤井悦郎氏をはじめとする同研究室の方々，オートシーケンサーを使用させていただいた同学部生物制御化学研究室内の松田一彦教

授をはじめとする同研究室の方々，改訂にあたって有益なご助言をいただいた2名の校閲者のみなさまに心より御礼申し上げます。

引用文献

- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.*, 62: 727-730.
- Fukamachi, S., A. Shimada and A. Shima. 2001. Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. *Nat. Genet.*, 28: 381-385.
- Fukamachi, S., M. Kinoshita, T. Tsujimura, A. Shimada, S. Oda, A. Shima, A. Meyer, S. Kawamura and H. Mitani. 2008. Rescue from oculocutaneous albinism type 4 using medaka *slc45a2* cDNA driven by its own promoter. *Genetics*, 178: 761-769.
- 林 公義. 2003. メダカ. 環境局野生生物課 (編), pp. 162-163. 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—汽水・淡水魚類. 自然環境研究センター, 東京.
- Hyodo-Taguchi, Y. and M. Sakaizumi. 1993. List of inbred strains of the medaka, *Oryzias latipes*, maintained in the Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences. *Fish Biol. J. Medaka*, 5: 29-30.
- 環境省. 2007. レッドリスト, 汽水・淡水魚. 環境省ホームページ: http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html (参照2008-12-16)
- 久米幸毅. 2006. メダカ. 奈良県レッドデータブック策定委員会 (編), p. 131. 大切にしたい奈良県版の野生動物—奈良県版レッドデータブック—脊椎動物編. 奈良県農林部森林保全課, 奈良.
- 酒泉 満. 1990. 遺伝学的にみたメダカの種と種内変異. 江上信雄・山上健次郎・嶋 昭絃 (編). pp. 143-161. メダカの生物学. 東京大学出版会, 東京.
- Sakaizumi, M., K. Moriwaki and N. Egami. 1983. Allozymic variation and regional differentiation in wild population of the fish *Oryzias latipes*. *Copeia*, 1983: 311-318.
- 瀬能 宏. 2000. 今, 小田原のメダカが危ない—善意? の放流と遺伝子汚染. *自然科学のとびら*, 6(2): 14.
- Takehana, Y., N. Nagai, M. Matsuda, K. Tsuchiya and M. Sakaizumi. 2003. Geographic variation and diversity of cytochrome *b* gene in Japanese wild population of medaka, *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, 20: 1279-1291.
- 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.