

5. 溪流魚の DNA 解析調査

糸井史朗¹⁾・杉田治男¹⁾・勝呂尚之²⁾

Genetic Analysis of Freshwater Fishes in the Mountainous Region of Tanzawa

Shiro Itoi, Haruo Sugita & Naoyuki Suguro

要 約

丹沢に生息する溪流魚の代表種であるイワナ、ヤマメおよびカジカを対象に、丹沢個体群のハプロタイプを把握するとともに丹沢独自の個体群の検出を目的として、集団遺伝学的分析を実施した。その結果、人為的な放流が盛んなイワナにおいては、遺伝子攪乱が進行していたが、カジカでは、丹沢固有の個体群が存在する可能性が示唆された。

(1) はじめに

日本の高度経済成長に伴う河川の汚染により、様々な水生生物が姿を消し、生態系の破壊が顕著となった。その穴を埋めるべく、サケやアユなどの産業上有用魚種やイワナやヤマメなど遊漁の対象魚のようにシンボリックな魚の放流が盛んに行われてきた。ところが近年、生物多様性維持の必要性が提唱されるようになり、地域独自の遺伝集団、すなわち在来個体群の維持の重要性が認識されつつある。それと同時に、外来生物による生態系破壊の証明もなされつつあり、本来そこに存在した生態系の回復・維持に重点が置かれるようになった。これは、これまでの自然環境回復のためとして行われてきた無差別な放流行為を否定する考え方である。

神奈川県丹沢についても、上述のような生態系の破壊にさらされている状況の例に漏れない。そこで本調査では集団遺伝学的手法により、頻繁に移入が行われているイワナやヤマメの丹沢個体群を対象に解析し、丹沢個体群のハプロタイプを把握するとともに丹沢独自の個体群の検出を目的として行った。また、在来個体群の保護は急を要する事項であることから、産業的に重要視されておらず、人為的な移入が行われていないことが期待されるカジカについても同様な手法で丹沢個体群の特徴を把握することを目指した。

(2) 調査方法

A. 調査魚

イワナについては、山北町の養殖業者から養殖魚 5 個体、玄倉川支流 9 個体、大又沢支流 8 個体および中津川支流 3 個体の計 24 個体を分析した。ヤマメは、河内川 10 個体、大又沢支流 5 個体、河内川支流 5 個体および山北町の養殖魚 13 個体の計 33 個体を分析した。カジカは丹沢湖西側大又沢水系における 3 地点からそれぞれ 36 個体、26 個体および 14 個体、および丹沢湖南側の河内川支流から 21 個体の計 97 個体を採取して分析した。

B. 分析方法

各調査地点で採取されたイワナ、ヤマメおよびカジカより全 DNA を抽出した。イワナについては既報のプライ

マーセット H15915 (Aoyama *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2004) および L15285 (Inoue *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2004)、ヤマメはイワナと同一のプライマーセットおよび部分 D-loop 領域を増幅するプライマーセット fDloop_F (Itoi *et al.*, 2007b) および fIRPhe_R (Itoi *et al.*, 2007a)、カジカについては部分 D-loop 領域を増幅するプライマーセットを用いて PCR 増幅した (図 1)。得られた PCR 産物はダイレクトシーケンスに供して塩基配列を決定するとともに、一部試料は TA クローニング後、塩基配列を決定した。決定された DNA 塩基配列をデータベース検索し、既報の配列と比較することで丹沢個体の遺伝的位置付けの推定を試みた。

(3) 調査結果

A. イワナ

養殖試料 5 個体および天然試料 13 個体、計 18 個体から全 DNA を抽出し、養殖試料 5 個体の部分 cytochrome *b* 遺伝子領域の塩基配列を決定した。決定したハプロタイプの塩基配列を Yamamoto *et al.* (2004) のデータと比較した結果、養殖試料 5 個体から 3 種類のハプロタイプが検出された。すなわち、3 個体はアメマス型の東北地方固有のハプロタイプ、1 個体はアメマス型であれば北海道、ニッコウイワナ型であれば北陸から中国地方のハプロタイプ型と一致した。また、1 個体のみ、既報のハプロタイプとは一致せず、木曾川あるいは熊野川のヤマトイワナ型のみで観察されているハプロタイプと近いことが示された (図 2)。一方、表現型ではニッコウイワナ型とされる天然試料 13 個体分について解析を行った結果、最も多く検出されたハプロタイプは、ヤマトイワナ型で報告されているハプロタイプと一致した。また、養殖および天然個体間のハプロタイプの関係に着目すると、養殖個体で最も多く認められたハプロタイプ (Tanzawa 1-3) は新潟県早川の試料と同一、また Tanzawa 4 試料は北陸から中国地方の日本海側に分布する試料と同一のハプロタイプであった。

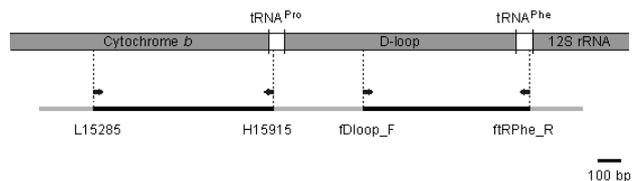


図 1. 部分 mtDNA 塩基配列分析に用いたプライマーセット。矢印はプライマーの位置および向きを示す。

1) 日本大学生物資源科学部 2) 神奈川県水産技術センター内水面試験場

Hap-29	CCTTCGTGTTCTACATGAGACCGGTCCAATAACCCAGCAGGAATCAACTCAGACGCCGATAAAATTCATCCACCCCTACTTCTCGTACAAAGATCTCTCGGTTTCGTAGCCATATT	120
TANZAWA 5	120
Hap-28	120
Hap-1	120
TANZAWA 4A.....G.....C.....	120
Hap-7G.....C.....	120
TANZAWA 1-3G.....C.....	120
Hap-29	ACTTGGCCCTAACAGCCCTAGTCTTTTCGCAACCAACCTCCTGGGAGACCCAGCAATTCACGCCAGCCAAACCCCTAGTACCCACCACACATCAAGCCGAATGGTACTTCTTATT	240
TANZAWA 5T.....	240
Hap-28T.....	240
Hap-1T.....T.....	240
TANZAWA 4T.....	240
Hap-7T.....	240
TANZAWA 1-3T.....	240
Hap-29	CGCCTACGCAATTTACGATCTATCCCAATAAACTGGGAGGAGTACTCGCCCTTTTATTCTCAATCCTTGTCCTCATAGTTGCCAATCCTACACACCTTAAACAGCGCGGACTAAC	360
TANZAWA 5	360
Hap-28	360
Hap-1C.....T.....A.....G.....	360
TANZAWA 4C.....T.....A.....G.....	360
Hap-7T.....A.....	360
TANZAWA 1-3T.....A.....	360
Hap-29	CTTTCGACCCTAACTCAATTTCTTATTCTGAGCCCTAGTAGCGGATATACTTATCCTCACCTGAATGGAGGCATGCCCGTTGAACCCCAATTTATTATTATCGGCCAAGTGGCCCTCTGT	480
TANZAWA 5A.....	480
Hap-28A.....	480
Hap-1A.....C.....	480
TANZAWA 4A.....C.....	480
Hap-7A.....C.....	480
TANZAWA 1-3A.....C.....	480
Hap-29	GATTTACTTCCACATCTCTCTAGTCTCGCCCTTAGCCGGTTGGCCGAAATAAAGCCCTCGAATGAGCCCTGCC	557
TANZAWA 5T.....	557
Hap-28	557
Hap-1	557
TANZAWA 4	557
Hap-7	557
TANZAWA 1-3	557

図 2. 山北町養殖業者のイワナ試料および既報のイワナ・ハプロタイプの比較。黒、灰および白色の背景はヤマトイワナ型、アメマス(北海道) / ニッコウイワナ(北陸・中国地方)型およびアメマス(東北地方)型を示す。同一塩基はドットで示した。Tanzawa 1-3 試料はアメマス(東北地方)型、Tanzawa 4 試料はアメマス(北海道) / ニッコウイワナ(北陸・中国地方)型と完全に一致した。Tanzawa 5 試料はヤマトイワナ型と高い相同性を示した。Hap-1, Hap-7, Hap-28 および Hap-29 は Yamamoto *et al.* (2004) より引用した。

B. ヤマメ

養殖試料および天然試料計 33 個体から全 DNA を抽出し、2 種類のプライマーセットを用いて PCR 増幅を試みた。いずれのプライマーセットでも増幅産物は確認できなかった。現在、別の領域を指標として解析中である。

C. カジカ

丹沢湖西側の又沢水系の異なる 3 地点における試料 76 個体を分析し、PCR 増幅できた 72 個体の部分 D-loop 領域の塩基配列を比較した結果、2 種類のハプロタイプが検出された。Tanzawa 1 が 69 個体および Tanzawa 2 が 3 個体検出され、採取地点間によるハプロタイプの違いは認められなかった(図 3)。また、丹沢湖南側の河内川水系の試料 21 個体中、PCR 増幅できた 16 個体の当該領域の塩基配列を比較した結果、全て Tanzawa 1 であることが明らかとなり、丹沢湖西側および丹沢湖南側試料間のハプロタイプの違いがないことが示された。

(4) 考察

これまでに山北町の養殖場の養殖イワナ 5 個体について分析が終了し、アライメントを行った結果、3 種類のハプロタイプが検出された(図 2)。このうち、アメマス型が 3 個体ないし 4 個体である可能性が明らかとなった(図 2)。表現型ではニッコウイワナ型とされる天然試料についてのハプロタイプ分析結果では、最も多く検出されたハプロタイプはヤマトイワナ型で報告されているハプロタイプと一致した。この結果からはこの個体が丹沢固有のハプロタイプであるか、ニッコウイワナ型とヤマトイワナ型の交雑個体であるかの判断はできないが、当該ハプロタイプがアメマス型、ニッコウイワナ型およびヤマトイワナ型で共通のハプロタイプと相同性が高いことから、ニッコウイワナ型の新しいハプロタイプである可能性がある。一方、イワナの人為的な放流による幾

世代にも上る交雑等を考えると、複数個所および複数型のハプロタイプの交雑が起こっている可能性は否定できない。

ヤマメについては、本調査で用いたプライマーセットでは PCR 産物を得ることができなかった。そのため、核ゲノムコードである rRNA 遺伝子の ITS 領域やマイクロサテライト領域も対象にする可能性も視野に入れて、新たなプライマーを設計して分析する必要がある。

カジカの結果をまとめると、同一河川内の採取場所によるハプロタイプの違いは認められなかった。つまり、本研究に用いた分析領域では、支流間の差異や堰の影響等について評価することは困難であることが示され、より感度の高い領域を指標にすることが望まれる。また、丹沢湖西側および丹沢湖南側の試料間でもハプロタイプの違いは検出されず、2 種類のハプロタイプが認められた。この 2 種類のハプロタイプの組成比に着目すると、明らかに Tanzawa 1 のハプロタイプを持つ個体が多いことが明らかとなった。これは、カジカのハプロタイプが河川あるいは地域ごとに固有のハプロタイプを有していることを示唆している。事実、我々のこれまでの関東地方を中心に行った研究結果から、カジカは河川ごとに、少なくとも水系ごとに固有のハプロタイプを持つ可能性を見出し、本研究の結果はこれを支持する。また、本調査で得られたハプロタイプは、既存のデータベースのものと比較すると、琵琶湖や鬼怒川、天の川、員弁川などの他の地域のもの(Yokoyama and Goto, 2005)とは明らかにタイプが異なることが明らかとなった。つまり、本調査で得られたカジカ試料は丹沢あるいは神奈川県周辺に特異的なハプロタイプである可能性が示唆される。

以上、丹沢の魚類 3 種を対象とした DNA 分析結果から、人為的な放流が盛んな魚種、少なくともイワナにおいては、遺伝子攪乱が進行し、在来個体群の検出が難しくなっていることをうかがわせる。イワナと同程度、あるいはそれ以上

Tanzawa1	GGCCATTGATGATGTTATTCCTCACACTTTCATCGACGCTGACATAAGTTAATGTTGAGGTACATCTCCGAGA-GACCCAGCATGCCGGGCTTCACTC	99
Tanzawa2T.....	99
Lake Biwa (AY116400)A.....	99
Kinu River (AB188158)T.....	99
Amanogawa River (AB188159)G.....GA.....C.....T.....C.....T.....	100
Inabe River (AB188160)G.....	99
Cottus nozawae (AB059339)G.T.....G.....C.....T.....	100
Tanzawa1	CAGCGGGCAAGGGTTCCTTTTTTTTTTTCCTTTCACCTTGACATAACAGAGCGCACACGGTATTACAGACAAGGTATGAGCATTATCTCGCCCTGC	199
Tanzawa2	199
Lake Biwa (AY116400)	199
Kinu River (AB188158)T.....	199
Amanogawa River (AB188159)	199
Inabe River (AB188160)C.....TC.....	199
Cottus nozawae (AB059339)A.....TC.....	200
Tanzawa1	GAGATATATTTTGGATGTTGGATAGATATTCATAAAGAATTGCATTAAGGTATCTCAAGAGCATAAAGAGTGATTGTTCTCGAGACTTC-TAAGAT	298
Tanzawa2G.....	298
Lake Biwa (AY116400)A.....A.....T.....GA.....	298
Kinu River (AB188158)TA.....G.....	298
Amanogawa River (AB188159)A.....T.....	298
Inabe River (AB188160)A.C.....A.GA.....C.....A	299
Cottus nozawae (AB059339)A.CT.....C.A.....A.A.....C..TC..	300
Tanzawa1	TCACCCCTGGTTCTTCGCGTTAAACCCCCCTACCCCTTAACCTCCTGAGATGGGTACTCTCTGTAACCCCCCGGAACAGGCAACCTCTAGAAG	398
Tanzawa2	398
Lake Biwa (AY116400)T.....	398
Kinu River (AB188158)	398
Amanogawa River (AB188159)	398
Inabe River (AB188160)CA..A.....	399
Cottus nozawae (AB059339)C.....A.CT.....CA..AG.....C.....G.....	398
Tanzawa1	CTTAGTGGGGCGAAAAATGTCCTTATTACATATATAAATAATGCATGT	449
Tanzawa2	449
Lake Biwa (AY116400)	449
Kinu River (AB188158)	449
Amanogawa River (AB188159)G.....	449
Inabe River (AB188160)T.....	450
Cottus nozawae (AB059339)A.T.....GC..	449

図 3. 丹沢産カジカおよび他河川カジカの部分 D-loop 領域の比較。琵琶湖、鬼怒川、天の川および員弁川産カジカ、およびハナカジカ *Cottus nozawae* の当該配列と比較した。本調査で明らかとなった配列は灰色の背景中、白字で示し、同一塩基はドットで示した。ハナカジカはアウトグループとして用いた。

に人為的放流が行われているヤマメについてもその遺伝的攪乱の状況は、想像するに難くない状況であると思われる。一方で、これまで産業あるいは遊漁の対象としては見向きもされてこなかったカジカでは、丹沢固有の個体群が存在する可能性が示唆され、これらの保護は一刻の猶予も許さない状況であると思われる。本研究の結果が、乱獲や安易な放流に対して警鐘を鳴らすものとなることを期待する。

文献

- Aoyama, J., S. Watanabe, S. Ishikawa, M. Nishida & K. Tsukamoto, 2000. Are morphological characters distinctive enough to discriminate between two species of freshwater eels, *Anguilla celebesensis* and *A. interioris*? *Ichthyol. Res.*, **47**: 157-161.
- Inoue, J. G., M. Miya, K. Tsukamoto & M. Nishida, 2000. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Fish. Sci.*, **66**: 924-932.
- Itoi, S., T. Saito, M. Shimojo, S. Washio & H. Sugita, 2007a. Identification of *Girella punctata* and *G. leonina* by PCR-RFLP analysis. *ICES J. Mar. Sci.*, **64**: 328-331.

- Itoi, S., T. Saito, S. Washio, M. Shimojo, N. Takai, K. Yoshihara & H. Sugita, 2007b. Speciation of two sympatric coastal fish species, *Girella punctata* and *Girella leonina* (Perciformes, Kyphosidae). *Org. Divers. Evol.*, **7**: 12-19
- Yamamoto, S., K. Morita, S. Kitano, K. Watanabe, I. Koizumi, K. Maekawa & K. Takamura 2004. Phylogeography of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zool. Sci.*, **21**: 229-240.
- Yokoyama, R. & A. Goto, 2005. Evolutionary history of freshwater sculpins, genus *Cottus* (Teleostei; Cottidae) and related taxa, as inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **36**: 654-668.