

# ミトコンドリア DNA を指標とした栃木県産野生メダカの遺伝的多様性の解析 Genetic diversity of mitochondrial DNA in Tochigi wild populations of Medaka, *Oryzias latipes*

○齋田圭太\*, 松田勝\*\*, 水谷正一\*\*

SAIDA Keita, MATSUDA Masaru, MIZUTANI Masakazu

## 1. はじめに

近年、メダカは都市化による水田の減少、小川（土水路）の消失などにより、その生息地が減少し、全国版レッドデータブックにおいて絶滅危惧Ⅱ類に登録された<sup>(1)</sup>。他方でメダカの増殖放流が行われており、遺伝子汚染が懸念されている。遺伝的地理変異を考慮した地域個体群の保護と生息環境の保全が急務となっている。

ミトコンドリア DNA (mtDNA) のチトクローム *b* 領域を解析した研究<sup>(2)</sup>によればメダカの遺伝子タイプは、北日本集団（クレード A）、南日本集団（クレード B）、関東固有集団（クレード C）の3クレードに分類され、さらに北日本集団は3の型（サブクレード A-I~A-III）、南日本集団は11の型（サブクレード B-I~B-XI）に分類されている（Fig.1）。

そこで、もし栃木県産野生メダカの mtDNA のチトクローム *b* 領域を調べれば、日本で見られる特異的な遺伝子型、栃木県内に見られる在来の遺伝子型、放流されたと考えられる遺伝子型などの情報から、メダカ個体群の保全策を検討できるかもしれない。

そこで本研究では、mtDNA 解析によって栃木県産野生メダカの遺伝的多様性を把握することを目的とした。また、これまでに1地点から多数のメダカの遺伝子解析を行った事例はほとんど報告されていないので、多検体のメダカを解析することにより、採集地点の遺伝子頻度も明らかにすることとした。

## 2. 研究の方法

解析手順は Table 1 の a~g の手順に従った。a ではメダカの生息している地点で 50 個体以上を目標に採集し、b~g の解析は DNA データの取得（b~e）と解析（f~g）を行った。

Table 1 研究の流れ及び内容  
Study flow and methodology

サンプリング	a) メダカの採集	<ul style="list-style-type: none"> <li>7地点で合計451個体のメダカを採集</li> <li>採集地点は Table 2、位置は Fig.2 に示す。</li> </ul>
DNA データの取得	b) ヒレから DNA 抽出	<ul style="list-style-type: none"> <li>メダカのヒレを 2~3mm カットし、溶解</li> <li>東洋紡社製 MagExtractor™-Genome を利用して DNA を抽出</li> </ul>
	c) PCR 反応	<ul style="list-style-type: none"> <li>mtDNA のチトクローム <i>b</i> 領域を増幅</li> <li>プライマーセットを用いて PCR ・プライマーは Cytb・Fa-RVd を使用</li> </ul>
	d) 制限酵素で消化	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCR 産物を制限酵素 <i>Hae</i>III で消化</li> </ul>
	e) 電気泳動	<ul style="list-style-type: none"> <li>2%アガロースゲルで電気泳動</li> </ul>
DNA データの解析	f) データ解析	<ul style="list-style-type: none"> <li>制限酵素 <i>Hae</i>III による断片パターンを決定</li> <li><i>Hae</i>III による断片パターンにより、クレード/サブクレードを決定</li> </ul>
	g) 分布図作成	<ul style="list-style-type: none"> <li>各地点において、クレード/サブクレードの出現頻度を示す (Table 2)。</li> <li>また、クレード/サブクレードの出現頻度割合を示す (Fig.3)。</li> </ul>



Fig.1 チトクローム *b* 領域の近隣結合系統樹  
Neighbor-joining tree of the entire cytochrome *b* gene  
(Takehana et al., 2003)

\*宇都宮大学農学系大学院(Graduate School of Agriculture Utsunomiya Univ.) \*\*宇都宮大学農学部(Utsunomiya Univ.)

### 3. 結果

栃木県内で5種のクレード/サブクレードに分類されるミトタイプを確認した (Table 2)。1地点当り1~4種のクレード/サブクレードに分類されるミトタイプで構成され、その割合が地点によって異なっていた。採集地点 No.7 においてはクレードに分類されるミトタイプが1種のみであった。また、栃木県内では、サブクレード B-IX に分類されるミトタイプが多く認められた。

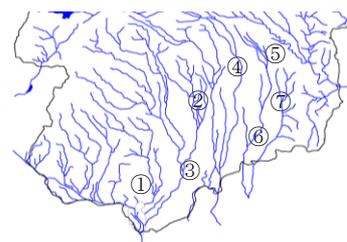


Fig.2 栃木県メダカ採集地点  
Collection site of *Oryzias latipes* in Tochigi

### 4. 考察

今回の解析から、既往の研究<sup>(2)</sup>により確認されている5種のクレード/サブクレードに分類されるミトタイプを栃木県内で確認した。

栃木県内では、サブクレード B-IX に分類されるミトタイプが優占していた。既往の研究<sup>(2)</sup>からこのミトタイプの集団の多くは、九州地方北部と中国地方西部に存在している。

したがって、栃木県内で確認されたサブクレード B-IX の集団は、人為的に持ち込まれたのか、栃木県在来のものかのどちらかが考えられ、このことを明らかにするためには、栃木県内の他の水系の集団の遺伝子を解析する必要がある。

採集地点 No.7 においては、クレード C に分類されるミトタイプのみと特異的であった。関東では1地点当り多数の遺伝子型が存在する<sup>(2)</sup>が、採集地点 No.7 では遺伝的に単一の集団であり、他の集団と混ざることがなかったと考えられ、現在の生息場を保全する必要性が高い。また、小貝川・五行川水系には採集地点 No.5 のようにクレード C に分類されるミトタイプの集団が存在する可能性があり、この水系の他地点で調査が必要である。

既往の研究<sup>(2)</sup>より、クレード A、B、C 間の遺伝距離は 400~470 万年、サブクレード B-I~B-XI 間の遺伝距離は 50~230 万年とされている。関東固有集団のクレード C は数百万年前に分化し、サブクレード B-I~B-XI はそれ以後に分化したことから、クレード C はこの地域に残存する集団<sup>(2)</sup>と考えられている。

採集地点 No.1~6 においてクレード/サブクレードに分類されるミトタイプが多数存在するのは、地理的な変異 (海進・海退に伴う水系の結合分離、河川の争奪など) または放流などの遺伝的攪乱が過去に生じたことを示唆している。

### 5. 今後の課題

栃木県内でメダカの生息している地点は他にも多数あるので、採集地点をさらに増やし栃木県産野生メダカの遺伝的多様性を把握する。また、核 DNA などを解析することにより、生息地点での遺伝的多様性などの新たな知見を得ることができると考えられる。

【引用文献】(1)環境省自然環境局野生生物課(2003):改正・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-4 汽水・淡水魚類 pp162-163 (2)Y.Takehana, N.Nagai, M.Matsuda, K.Tsuchiya, and M.Sakaizumi (2003): Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome b Gene in Japanese Wild Populations of Medaka, *Oryzias latipes*. Zool.Sci., 20; 1279-1291.

Table 2 栃木県内の採集地点及びクレード/サブクレードの分類結果  
Collection site of *Oryzias latipes* in Tochigi and the result of classified clade/subclade

No.	水系	サンプル数	Clade/Subclade				
			B-I	B-II	B-VII	B-IX	C
1	永野川	20	4		11	5	
2	思川	50		1	11	38	
3	思川	55	9			46	
4	鬼怒川	137	11	26		99	1
5	五行川	50				43	7
6	五行川	85	3	40	1	41	
7	小貝川	54					54
合計		451	27	67	23	272	62

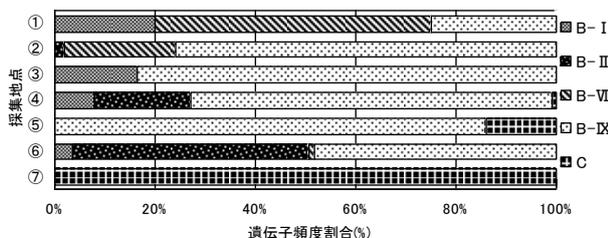


Fig.3 クレード/サブクレードに分類されるミトタイプの割合  
Percentage of mitotype based on clade/subclade in each populations