

原著論文

名古屋市隼人池に生息するメダカの遺伝的多様性

森山昭彦¹⁾, 野呂達哉²⁾, 鈴木美恵子³⁾¹⁾中部大学応用生物学部, ²⁾名古屋市環境局なごや生物多様性センター³⁾名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科

要 旨

名古屋市昭和区の隼人池で, 2009 年にかいぼりが行われ, 外来種の多くが駆除された. その後, メダカの集団が回復してきた. 遺伝的多様性を明らかにするために, 2011 年に採集されていた14 個体を中心に15 個体のCOI 遺伝子の部分配列を決定した. 657 塩基対中13 箇所突然変異があり, 7種のハプロタイプが見出された. これらの塩基配列は, 系統樹上は全てミナミメダカ(*Oryzias latipes*)のクレードに含まれており, ミナミメダカと判定された. このうち6つのハプロタイプは, 2 塩基以内の塩基置換の関係にあり1つのグループを形成していた. 別の一つのハプロタイプは他の6ハプロタイプとは8 塩基以上の置換関係にあり, 近郊系メダカ Hd-rR のCOI 遺伝子の塩基配列と完全に一致した.

キーワード: メダカ, COI 遺伝子, 遺伝子攪乱

1. はじめに

メダカは, ダツ目メダカ科メダカ属に属する体長4cm 程度の日本固有の小型淡水魚である. 英語でもrice fish と呼ばれるように日本の水田や用水路で極めて普通に見られていた. しかしながら, 近年の都市開発, 圃場整備などにより, 野生のメダカは分布域を急速に減少させており(Hosoya, 2000), 1999 年にはレッドリストに絶滅危惧 II 類(VU)として掲載された(環境庁, 2013). この頃から, 野生メダカの生息している地域では, 保全活動が盛んになり, 現在まで保全されている場所も少なくない. しかしながら, 野外におけるヒメダカの見撃情報も多く(瀬能, 2000), 観賞用や教育教材, 或いは他地域で捕獲された個体の野外での放流が懸念されている.

5種類の酵素のアロザイム分析(多型分析)により, 日本のメダカは, 北日本集団と南日本集団に分けられることが明らかにされ(Sakaizumi *et al.*, 1983), さらにミトコンドリアDNA の分析により, 各地方型内のさらなる分化や, 南北集団の中に新たに北方集団に近いが, 第3の系統の存在する事も明らかにされてきた(Takehana *et al.*, 2003). 2011 年には, 北日本集団

は新たに *Oryzias sakaizumii* (和名キタノメダカ)として新種記載された(Asai *et al.*, 2011). 南日本集団は, 元の学名 *Oryzias latipes* (和名ミナミメダカ)を引き継ぎ, 日本固有のメダカは正式に2種類となった. さらに南日本集団は, アロザイム分析から「東日本型」, 「東瀬戸内型」, 「西瀬戸内型」, 「山陰型」, 「北部九州型」, 「大隅型」, 「有明型」, 「薩摩型」, 「琉球型」の9種類の地域型に細分されることが知られていたが, ミトコンドリアDNA の解析からもこのような地域個体群に分けられる事が支持されている (Takehana *et al.*, 2003). これらの地域個体群の遺伝的特徴を研究する過程で, 他の地域から移植されたと思われる個体が野外で生息していることが明らかになり(瀬能, 2000; 竹花, 酒泉, 2002; 竹花, 北川, 2010)不適切な放流による遺伝的攪乱が懸念されている.

2010 年に第10回生物多様性条約締約国会議(COP10)が名古屋市で開催され, これを契機として全国的に生物多様性に対する関心が高まった. 名古屋市でも生物多様性に対する関心が高まり, 2009年10月31日には昭和区隼人池にて, 市民協働によるかいぼりが行われ, オオクチバス, ブルーギルなど多く

の外來魚が捕獲された(名古屋ため池生物多様性保全協議会事務局, 2010). アジア大陸原産のコイやカムルチーも捕獲されたが, メダカは1個体しか確認されなかった.

翌年の2010年には, メダカが確認されたが, 既にヒメダカの混入している事が観察されている(名古屋ため池生物多様性保全協議会事務局, 2011). 隼人池は, 犬山城主である成瀬正虎が, 1646年(正保3年)に灌漑を目的として造成したため池であり, 1976年に, 周囲を含めて公園として整備された, 名古屋市民には親しみの深い池である(名古屋市, 2020). 関心の高まった市民によりメダカが放流された可能性もありうる. 放流という観点からすると, 他地域に生息するメダカの放流の可能性も懸念されるが, 形態から確認することは困難である.

メダカの分子系統や遺伝的多型については, 上述の様にチトクローム b あるいはミトコンドリア全体の遺伝子をもちいた多くの研究があり, 地域個体群についても全国的に調査されている(Takehana *et al.*, 2003). しかし, 名古屋市内のメダカの遺伝的多型についてはよくわかっていない. 近年は, DNA バーコーディングと呼ばれるチトクロームオキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子の配列を利用した全生物種の同定システムの構築が進められているので, 本研究では, 隼人池におけるかいぼり後の生物多様性を評価する為の一指標として, メダカの COI 遺伝子の多型を分析することとした.

2. 材料と方法

2-1. 標本

本研究で DNA 分析に用いたメダカ15個体のうち14個体は, 2011年6月19日に採集, もう1個体は, 2014年6月24日に採集されたものである. メダカは採集後, 直ちに 99.5%エタノールに液浸, 4℃~24℃で保存されていた. 2011年に採集されたメダカの中には体色が黄~橙と判定されたメダカが3個体含まれていた.

2-2. DNA 抽出と塩基配列決定

アルコール固定されていたメダカの筋肉組織から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて全量 DNA の抽出を行い, ミトコンドリア DNA にコードされる COI 遺伝子の一部(約 660 塩基対)を PCR により増幅した. PCR プライマーには, ユニバーサルプライマーである LCO1490と HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994)を用い, SpeedSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ)を用いた標準的な反応液組成で, 98℃ 5 秒, 55℃ 15 秒, 72℃ 20 秒のサイクルを 30 回行った.

PCR には, GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)を使用し, 増幅した DNA はアガロースゲル電気泳動により確認し, ExoSAP-IT (Affymetrix)で処理した後, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies)を用いてシーケンシング反応を行い, Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer (Life Technologies, CA)により塩基配列を決定した. 両方向から読んだ塩基配列を Sequencher 4.8 (Gene Codes)を用いてアセンブルすることで, DNA バーコード領域の塩基配列をサンプルごとに確定した.

2-3. 系統解析

分子系統解析には, MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013)を用いて近隣接合法により作成した. 距離モデルには Kimura 2-parameter modelを用い, 1000回のリサンプリングによるブートストラップ解析を行い, 各結節点におけるブートストラップ確率を求めた.

3. 結果と考察

3-1. ハプロタイプの決定

2011年に隼人池で採集され, アルコール液浸標本として保存されていた個体を中心に, メダカ 15 個体の COI 遺伝子の塩基配列を決定した. 657 残基の塩基配列上の 13 箇所に変異が存在し, 合計で 7 種のハプロタイプがみいだされたので, ハプロタイプ N01~N07 と名付けた(表1).

COI ハプロタイプ N01 のメダカが5個体あり, 隼人池のメダカでは最も普通のハプロタイプと思われる. また, 有色(黄~橙)の3個体は, それぞれ異なるハプ

ロタイプを示したが、有色メダカに特有のハプロタイプは検出されなかった。これらのハプロタイプの系統関係を調べるために、配列既知の日本のメダカの COI 遺伝子の塩基配列とともに系統樹を作成した (図 1)。隼人池で採集されたメダカの COI 塩基配列は、松山、名護、網野などの地域集団のもつハプロタイプとともに全てミナミメダカのクレードに含まれていた。従って、隼人池には、少なくともキタノメダカの混入の可能性は少ない。

3-2. ハプロタイプネットワーク

ハプロタイプ N01 から N06 は、それだけで一つのクレードを形成していたが、N07 を含めると、N01～

N06 のグループと N07 の間に松山のメダカの COI の塩基配列が含まれ、ハプロタイプ N07 の由来は、N01～N06 のグループとは異なる可能性が考えられた。そこで、隼人池のメダカで見つかったハプロタイプ N01～N07 の配列を用いてハプロタイプネットワーク (図2)を作成したところ、N02～N05 は、ハプロタイプ N01 と1塩基置換の関係にあり、N06 はN02 からさらに1塩基置換の関係にあり、ひとつのグループを形成することが明らかとなった。このことは、N01 をプロトタイプとする集団の中に突然変異によりN02～N06 の多型が生じた可能性を示唆している。したがって、ハプロタイプ N01～N06 を持つメダカが隼人池の元々の地域個体群である可能性が考えられる。しかし、こ

表 1 隼人池のメダカのミトコンドリア COI ハプロタイプと可変部位の塩基

ハプロタイプ	塩基配列上の位置													標本数
	7	43	85	211	217	247	310	352	364	430	535	568	625	
N01	A	T	C	G	A	C	G	A	A	G	A	T	G	5
N02	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	2(1)
N03	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	2(1)
N04	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1
N05	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	•	2(1)
N06	•	•	•	•	G	T	•	•	•	•	•	•	•	1
N07	•	C	T	A	•	•	A	G	G	A	•	C	•	2*

2011年に採集された標本（一部例外）を分析に用いた。

*, 1 個体は2014に採集された。

カッコ内の数字は体色が橙色～黄色の個体数を示す。

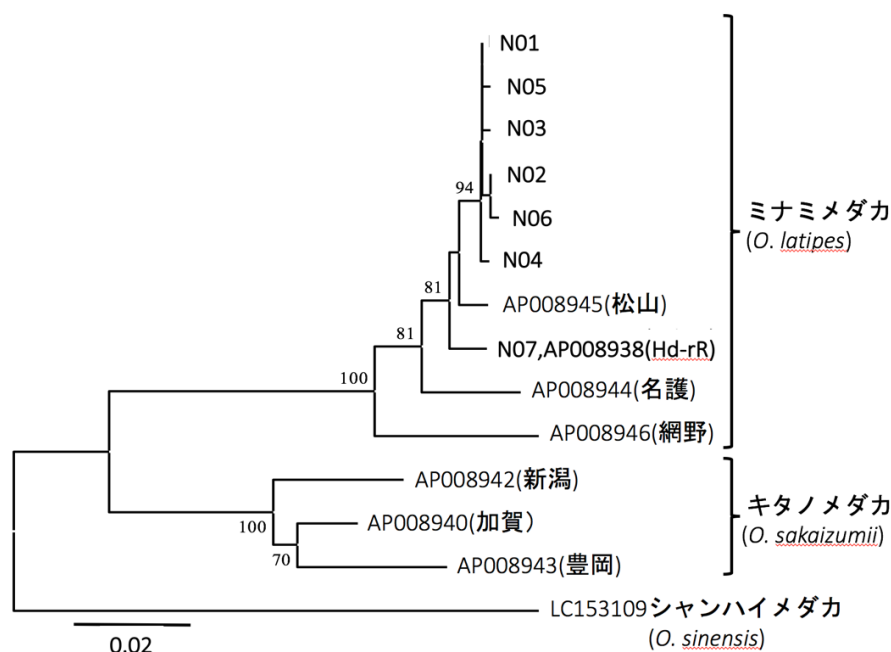


図 1 近隣結合法によるメダカ COI 遺伝子 (457bp) の分子系統樹

枝の分岐に示した数字は 1000 回の試行によるブートストラップ値 (%) を示す

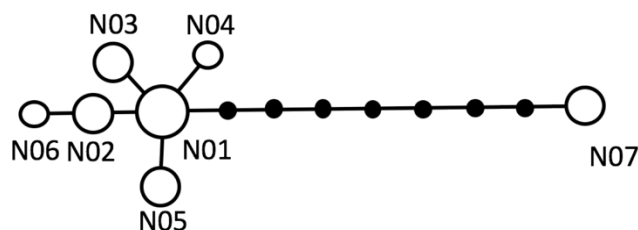


図2 隼人池のミナミメダカ COI 遺伝子のハプロタイプネットワーク

れを確かめるには、さらに周辺に生息するメダカの COI ハプロタイプ と比較検討する必要がある。

3-3. N07 は系統 Hd-rR 個体の移入種？

N07 は、N01～N06 のグループとは、遺伝的に明らかに離れていたことに加えて、系統 Hd-rR の COI 遺伝子の塩基配列 (AP008938) と完全に一致した。系統 Hd-rR は、遺伝子型としては東日本型であるが、山本 (1953) が実験モデル生物として開発した系統 d-rR を元に、田口により近交系化されたものであり、黄色型系統である (Hyodo-Taguchi, 1990)。さらに、市販されているヒメダカは Hd-rR と同じ配列の Cytb 遺伝子を持つメダカが少なからず含まれている (小山直人等 2011)。さらに、ヒメダカ養殖の過程で生じた野生型体色 (黒色) のメダカがクロメダカとして広く販売されている (小山直人等 2011)。従って、野生で見つかったメダカが系統 Hd-rR と同一塩基配列を持つ場合は、体色に関わりなく養殖メダカに由来する可能性が高い。ハプロタイプ N07 のメダカが遺伝的に多様化する際に最初に生じるであろう 1～2 塩基置換のハプロタイプを持つ個体が隼人池では全く見つからなかったことも、この個体が移入個体であるとする考えを支持している。また、体色にかかわる遺伝子が核遺伝子にコードされているのに対し、地域集団を特徴づけるマーカーとして用いられる Cytb や COI の遺伝子はミトコンドリア遺伝子にコードされており、母系遺伝する。したがって、交雑が進めば、体色とこれらのマーカー遺伝子は関連しなくなる。体色が黄～橙色のメダカが N01～06 グループの COI ハプロタイプを持っていたことは、放流された養殖メダカと野生メダカの交雑が既に進んでいることを示唆しているよう

に思われる。実際、ヒメダカの主産地である愛知県弥富市や奈良県大和郡山市では、養殖池からの逸出とヒメダカと野生メダカの交雑が報告されている (小山直人等 2011)。

4. おわりに

本研究では、名古屋市の市街地にある隼人池に生息するメダカの COI 遺伝子の塩基配列を決定し、7ハプロタイプを見出した。このうち6ハプロタイプは1つのグループを形成し、隼人池の地域個体群のハプロタイプの可能性が示された。これらのメダカが地域個体群であるか否かを明らかにするには、今後、名古屋市内各地のメダカについても COI 遺伝子のハプロタイプを明らかにする必要がある。残る1個体は、黄色型近郊系 Hd-rR と塩基配列が完全一致したことから、隼人池では、かいぼり 2 年後にすでに飼育メダカの放流が行われている可能性が示唆された。

遺伝的攪乱は、長期的には種や集団の存続に対して重大な影響を与える事が知られているが (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf *et al.*, 2013)、関東の都市部においても、遺伝的攪乱は既に高い割合で生じている (Nakao *et al.*, 2017)。さらに、隼人池では、近年、メダカが減少し、カダヤシやグッピーの魚影が確認されている (鶴飼 私信 2020)。メダカの地域個体群を保全していくためには、国内外移入種問題の啓発の重要性を認識し、積極的に取り組んでいく必要がある。

5. 謝辞

本研究では、資料の収集、提供について、名古屋市環境局なごや生物多様性センター並びに名古屋生物多

様性保全協議会に多大なるご協力をいただいたことに
深謝いたします。

名古屋ため池生物多様性保全協議会事務局，
名古屋

引用文献

Allendorf, F. W., Luikart, G. H. and Aitken, S. N. 2013.
Conservation and the genetics of populations,
Wiley-Blackwell, New Jersey, US. 624 pp.

Asai, T., Senou, H., and Hosoya, K. 2011. *Oryzias
sakaizumii*, a new ricefish from northern Japan
(Teleostei: Adrianichthyidae). *Ichthyol. Explor.
Freshwaters*, 22, 289–299.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek,
R. 1994. DNA primers for amplification of
mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from
diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol
Biotechnol.* 3 :294-299.

Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2002.
Introduction to conservation genetics . Cambridge
University Press, Cambridge, UK. XXI 618 pp

Hosoya, K. 2000. The circumstances and protection in
Japanese ricefish, “Medaka”. *J Jpn Soc Water Envir*
23: 135–139 (in Japanese)

Hyodo-Taguchi, Y. 1990. Inbred strains of the medaka,
Oryzias latipes. *Fish Biol. J. Medaka* 8: 11-14

名古屋ため池生物多様性保全協議会事務局. 2010,
2009 年度なごやため池生きもの生き生き事業報
告書. 名古屋ため池生物多様性保全協議会事
務局, 名古屋

名古屋ため池生物多様性保全協議会事務局. 2011,
平成 22 年度 生物多様性保全推進支援事業
名古屋ため池生き物いきいき計画事業報告書.

環境省 2013. レッドリスト, 汽水・淡水魚. 環境省ホーム
ページ [https://www.env.go.jp/press/files/jp/21437.
pdf](https://www.env.go.jp/press/files/jp/21437.pdf)

小山直人, 北川忠生 2009. 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. *魚類学雑誌*, 56: 153–157.

小山直人, 森 幹大, 中井宏施, 北川忠生 2011. 市販さ
れているメダカのミトコンドリア DNA 遺伝子構成. *魚
類学雑誌* 58, 81- 86

Nakao, R., Iguchi, Y., Koyama, N., Nakai, K. and Kitagawa,
T. 2017. Current status of genetic disturbances in wild
medaka populations (*Oryzias latipes* species complex)
in Japan. *Ichthyol. Res.*, 64: 116–119.

松沢 陽志, 瀬能 宏 2008. 日本の外来
ガイド. 文一総合出版, 東京

名古屋市 2020 昭和区の隼人池公園の紹介ページ
[http://www.city.nagoya.jp/showa/page/0000001353.ht
ml](http://www.city.nagoya.jp/showa/page/0000001353.html)

Sakaizumi, M., Moriwaki, K., and Egami, N. 1983.
Allozymic variation and regional differentiation in
wild populations of the fish *Oryzias latipes*.
*Copeia*1983: 311-318.

瀬能 宏 2000. 小田原のメダカが危ない善意? の放流
と遺伝子汚染. *自然科学のとりら*. 6(2), 14

田口泰子 1990. 近交系とその特性, メダカの生物学(江
上信雄他編, 東京大学出版会, 東京)pp.129-142

Takehana, Y., Nagai, N., Matsuda, M., Tsuchiya, K., and Sakaizumi, M. 2003. Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome b Gene in Japanese Wild Populations of Medaka, *Oryzias latipes*. Zoological Science, 20 (10):1279-1291.

竹花佑介, 北川忠生 2000. 自然のとびら. 6(2), 14

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.

竹花佑介, 北川忠生 2010. メダカ:人為的な放流による遺伝的攪乱. 魚類学雑誌. 57(1), 76-79.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30(12). 2725–2729.

Yamamoto, T. 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). J. Exp. Zool, 123: 571-594.

Title : The genetic diversity of Japanese rice fish found in the Hayato Pond in Nagoya.

Authors : Akihiko Moriyama¹⁾, Tatsuya Noro²⁾, Mieko Suzuki³⁾

Addresses : ¹⁾ College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University. ²⁾ Nagoya Biodiversity Center Kankyo-Kyoku, Nagoya City Office.

³⁾ Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University.

Keywords : medaka, COI, genetic diversity

Summary

The genetic diversity of Japanese medaka fishes living in the Hayato Pond in Nagoya.

Akihiko Moriyama¹⁾, Tatsuya Noro²⁾, Mieko Suzuki³⁾

1) College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

2) Nagoya Biodiversity Center Kankyo-Kyoku, Nagoya City Office.

3) Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University.

The Hayato Pond in Showa-ku, Nagoya City, was drained and many invasive alien species were exterminated in 2009. After that, the population of medaka has recovered. To clarify the genetic diversity of the medaka in Hayato Pond, the partial sequences of the COI gene of 15 individuals, 14 of which were collected in 2011 and another was in 2014, were determined. Thirteen sites were found to be variable in the 657-bp sequences, which generated seven haplotypes. The phylogenetic tree indicates that these haplotypes were all belong to southern medaka (*Oryzias latipes*). Six haplotypes had a substitution within 2 bases among them and formed one group. Another haplotype had a substitution of 8 bases or more with the other 6 haplotypes, and completely matched the nucleotide sequence of the Hd-rR COI gene.