

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710288

研究課題名(和文)日本在来ナマズ属の地域集団と保全対象水域の特定および遺伝的モニタリングの実践

研究課題名(英文) Identifying the evolutionary significant units of Japanese Siluridae: towards implementation of genetic monitoring

研究代表者

松崎 慎一郎 (MATSUZAKI, Shin-ichiro)

独立行政法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・研究員

研究者番号：40548773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：在来ナマズ属3種の地域集団および遺伝的構造を明らかにするために、日本全国およびアジア諸国からナマズ類を採集し、ミトコンドリアDNA調節領域の塩基配列に基づく系統地理解析を行った。ビワコオオナマズでは1集団(琵琶湖)、イワトコナマズでは2集団、ナマズでは3つの大きく分化した地域集団が国内に存在することが明らかとなった。イワトコナマズについては、これまで琵琶湖固有種とされてきたが、近畿・中部地方に別の地域集団が存在することが分かった。また、次世代シーケンサーを用いてマイクロサテライトマーカーを開発し、遺伝的多様性の評価が可能となった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the genetic population structure of three native Siluridae in Japan, we collected specimens from Japan, Korea, China and Vietnam, and sequenced the mitochondrial DNA control region. Phylogenetic analyses revealed one, two and three distinct genetic lineages for *Silurus biwaensis*, *Silurus lithophilus* and *Silurus asotus*, respectively. Although *Silurus lithophilus* is well-known as one of the endemic species of Lake Biwa, we found that other lineages are naturally distributed in the Kinki and Chubu regions. We also demonstrated that *Silurus asotus* in eastern Japan may be translocated intentionally from the native regions such as Kinki and Chugoku regions. Toward a genetic monitoring, we developed microsatellite markers using next-generation sequencing.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：淡水魚 進化的重要単位 地域固有性 マイクロサテライトマーカー 系統地理 遺伝的多様性 国内移入 放流

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝的多様性は、種の存続と進化的ポテンシャルを支える生物多様性の要である。しかし、COP10（生物多様性第10回締約国会議）でも指摘されているように、遺伝的多様性の実態把握やそれを保全する行動計画が進んでいない。遺伝的多様性の保全にむけて、地域固有性の評価、地域集団を考慮した保護区デザインの検討、遺伝的モニタリングの実践にむけた手法の開発等が必要である。

淡水魚は、移動分散が淡水系に限られることから、地理的に隔離しやすく、地域ごと異なる淘汰圧を受けやすいため、（種分化までは至らなくても）地域集団ごとに分化していることが多く地域固有性が高い。このことから、多くの淡水魚において、進化的に重要な単位（ESU）が種より下のレベルにある。ESUの異なる集団の保全は、遺伝的多様性の保全上、重要である。

現在、日本の淡水生態系は、富栄養化、生息場所の破壊、分断化、外来種の侵入など人為的な影響によって、地域固有の遺伝的多様性は急速に失われてしまう可能性がある。さらに、淡水魚の場合、近縁種や同種他集団の人為的な移植放流（国内移入）がしばしば行われるため、交雑による遺伝子汚染を引き起こすことが指摘されている。

ナマズは、水田・河川・湖沼などに生息し、生態系の中で高次捕食者として重要な役割を担っている。日本には、ナマズ（*Silurus asotus*）、イワトコナマズ（*Silurus lithophilus*）、ビワコオオナマズ（*Silurus biwaensis*）の3種が確認されている。ナマズは全国に分布しており、イワトコナマズとビワコオオナマズについては琵琶湖水系固有とされている。現在、イワトコナマズは準絶滅危惧種に指定され、ビワコオオナマズやナマズについても県版レッドリストに記載されるほど個体群縮小が懸念されている。ナマズは、産卵場所と生息場所など異なる生態系間を行き来するため、水系ネットワークの不健全化に極めて脆弱である。生態系の不健全化が急速に進む今日、普通種であるナマズも、絶滅の危機に瀕する可能性もある。ナマズは、希少性、生態学的重要性、象徴性、進化的独自性という点から保全の対象としてふさわしく、緊急性が高い。一方で、水産放流も盛んに広域で行われてきたため、国内移入にともなう遺伝的攪乱も懸念される。こうした状況であるにも関わらず、ナマズ属については、分子遺伝学的な情報はこれまで皆無であった。遺伝的な基盤情報を整備し、在来ナマズ属の保全に取り組む必要がある。

## 2. 研究の目的

日本全国から在来ナマズ属3種（ビワコオオナマズ・イワトコナマズ・ナマズ）ならび

にアジア諸国から同種あるいは近縁種を収集し、（1）ミトコンドリア DNA の Control 領域の部分塩基配列を決定し、地域集団の大系統の特定ならびに国内移入・国外移入の実態を明らかにする、（2）各大系統からいくつかの個体について、ミトコンドリア DNA の他領域の塩基配列を複数決定し、それら全ての配列情報から詳細な地域集団を特定する、（3）遺伝的多様性評価に有効なマイクロサテライトマーカーを開発する、ことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### （1）地域集団の特定

採集した試料から、市販のキットを用いて全 DNA を抽出した。全ての個体について、ミトコンドリア DNA の Control 領域の部分塩基配列（471bp）を決定した。得られた配列を用いて、最尤法による系統解析を行い、地域集団を特定した。また、詳細な地域集団を特定するため、一部の個体について、ミトコンドリア DNA の Cytochrome b（1138bp）・COI（606bp）・ND4（1381bp）の3つの領域についても部分塩基配列を決定した。

### （2）マイクロサテライトマーカーの開発

ナマズ属3種の試料についてマイクロサテライト部位を濃縮した DNA ライブラリーを作成し、それらをプールし、デスクトップ型次世代シーケンサーGS Junior（Roche）を用いて、マルチプレックス・シーケンスを行った。パイプラインソフトを使用して、シーケンス結果から得られた膨大な配列データから、マイクロサテライトを含む配列を抽出した。さらに、マイクロサテライト部位を増幅できるプライマーセットの作成を行った。それらの配列の内、ユニバーサル蛍光プライマーを用いたマルチプレックス PCR 法の条件（増幅断片のサイズの重複がないなど）にかなう高い Tm 値のプライマーを設計した。まずは、ナマズについて設計したプライマーセットを用いて、マルチプレックス PCR を行い、増幅の確認をおこなった。

## 4. 研究成果

### （1）地域集団の特定

合計765個体の試料を収集することができた。これらの Control 領域の配列データをもとに系統解析を行った結果（図1）、ビワコオオナマズでは1地域集団が確認され、すべて琵琶湖に分布していた。琵琶湖固有種であることを裏付ける結果となった。一方、イワトコナマズでは、2つの大きく分化した地域集団が確認された。一つは琵琶湖の集団であり、もう一つは近畿・中部地方からなる集団であった。これまで、イワトコナマズは琵琶湖固有種とされてきたが、本研究により琵琶湖以

外にも生息している可能性が示唆された。近畿・中部地方の集団の中でも地理的なクラインが確認されたこと、また予備的に核遺伝子であるロドプシン領域の塩基配列を決定したところ、ナマズとの交雑の可能性は考えられなかったことから、琵琶湖以外にも近畿・中部地方にも地域固有なイワトコナマズが存在する可能性が高いと考えられた。

ナマズには、日本国内に3つの大きく分化した地域集団が存在することが明らかとなった(図1)。一つ目は、中国・韓国・ベトナムに加えて国内では山口県・大分県・鳥取県に分布している集団で、二次的接触によって日本列島に入ってきた集団と考えられた。二つ目、九州地方ならびに鳥取県に広く分布する集団であった。三つ目は、中国・四国地方、近畿・中部地方、東日本地方で広く分布する集団であった。

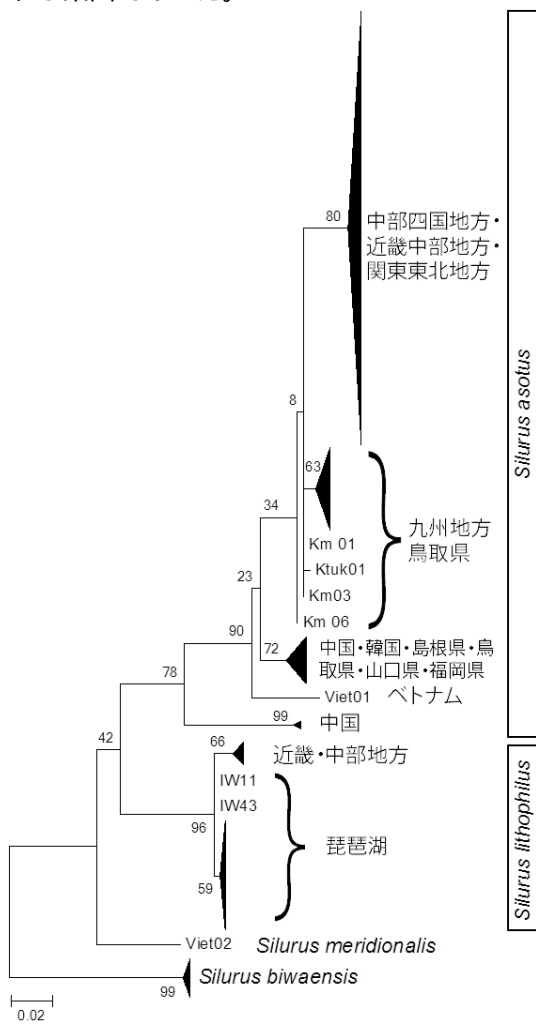


図1：在来ナマズ(Siluridae)属のControl領域の部分塩基配列に基づく、ミトコンドリアDNAハプロタイプ間の最尤系統樹。各分岐点の数値は、ブートストラップ確率(3000回反復)を示す。

ただし、北海道・青森・山形・福島・宮城・茨城・埼玉など東日本で採集されたナマズに

ついては、中国・四国地方、近畿・中部地方と全く同じハプロタイプで占められ、変異の多様性が見られなかったことから、国内移入の可能性が高いと推察された。これまでの遺跡の動物遺存体調査などから、東日本のナマズについては移入の可能性が指摘されていたが、本結果はそれを支持する結果となった。一方、国外移入については確認されなかった。

さらにナマズについては、詳細な地域集団(小集団)を明らかにするために、Control領域の塩基配列をもとに作成した系統樹の代表的なクレードおよび地域集団と思われる24個体を選定し、それらに対し、ミトコンドリアDNAのCytochrome b、ND4およびCOI領域の部分塩基配列を決定し、Control領域も合わせた4領域すべての配列データ(計3594bp)をもとに、最尤法による系統解析を行った。その結果、3つの大系統の中にも、高いブートストラップ値で支持される小系統が複数含まれていることが明らかとなった。このことから、配列の情報が増やすことで、高精度の地域集団特定が可能になることが明らかになるとともに、小スケールでも、各地域あるいは流域には各々固有の地域集団が存在することが明らかとなった。

## (2) マイクロサテライトマーカーの開発

次世代シーケンサーによるシーケンスの結果、ナマズについて13615リード、イワトコナマズについては14346リード、ピワコオオナマズについては15107リードの塩基配列が得られた。これらのデータは、遺伝的モニタリングの実践にむけた重要な基盤となる。ナマズについて、56のプライマーセットの候補を作成し、マルチプレックスPCRを行った結果、少なくとも42遺伝子座で明瞭な増幅が確認できた。今後は、3種のナマズが同所的に生息する琵琶湖個体群を対象に、多型の確認を進める予定である。

最後に、本研究を実施するにあたり、数多くの方に、ナマズの検体をご提供いただいた。記して感謝の意を表します。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Matsuzaki SS, Sasaki T & Akasaka M (2013) Consequences of the introduction of exotic and translocated species and future extirpations on the functional diversity of freshwater fish assemblages. *Global Ecology and Biogeography* 22: 1071-1082. 査読有り

荒山和則、松崎慎一郎、増子勝男、萩原富司、諸澤崇裕、加納光樹、渡辺勝敏(2012) "霞ヶ浦における外来種コウライギギ(ナマズ目ギギ科)の採集記録と定着のおそれ" - *魚類学雑誌* 59(2): 141-146. 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

三品達平、松崎慎一郎、武島弘彦、荒山和則、諸澤崇裕、西田睦、渡辺勝敏：霞ヶ浦周辺域における在来および外来フナ類の現状と課題 2014年3月日本生態学会第61回全国大会(広島)

武島弘彦、松崎慎一郎、高田未来美、児玉晃治、前田英章、西田睦：福井県三方湖周辺水域におけるフナの遺伝的個体群構造 2012年3月 第59回日本生態学会(滋賀)

武島弘彦、松崎慎一郎、児玉晃治、前田英章、西田睦：福井県三方湖周辺水域におけるフナ地域個体群の種内系統構成 2011年9月日本魚類学会年会(弘前)

〔図書〕(計2件)

松崎慎一郎(2013):湖沼におけるコイの水質や生物群集に与える生態的影響(日本魚類学会自然保護委員会編(向井貴彦・鬼倉徳雄・淀太我・瀬能宏)「見えない脅威"国内外来魚"-どう守る地域の生物多様性」,分担執筆),東海大学出版会

武島弘彦、松崎慎一郎(2013)DNA分析からみえてきた三方湖フナの固有性-ナチュラリスト23(2):4

〔その他〕

ホームページ等

NHKサイエンスZERO「絶滅の危機!日本のコイ」,2013年6月2日(日)夜23:30-24:00

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎 慎一郎 (MATSUZAKI Shin-ichiro)  
独立行政法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・研究員  
研究者番号：40548773