

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26250044

研究課題名(和文)国内および東アジアからの淡水魚の移入による影響実態と在来遺伝子資源の保全及び復元

研究課題名(英文)Present status of the genetic disturbances of Japanese freshwater fishes and development of conservation protocols of endemic genetic resources

研究代表者

向井 貴彦 (Mukai, Takahiko)

岐阜大学・地域科学部・准教授

研究者番号：80377697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,600,000円

研究成果の概要(和文)：国内および近隣国に分布する同種の地域個体群の移殖による遺伝的攪乱は、日本の生物の各地域在来の遺伝的特性を失わせ、形態的・生態的・生理的特性を広範囲で均質化させることで「遺伝子資源」を失わせる重篤な外来種問題である。そこで、本研究では日本産淡水魚の遺伝的攪乱の現状を解明し、在来系統保全のための地域的な調査と分布モデルの開発をおこなった。また、遺伝的に攪乱された個体からの在来系統の復元が将来的におこなえるように、琵琶湖産の、ほぼ在来系統と考えられるコイのゲノムを次世代シーケンサーによって解析した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the present status of genetic disturbances of all freshwater fish species in Japan. Using information from already published phylogeographic studies on Japanese freshwater fishes and our newly obtained mtDNA data from populations of several species, we found that artificial transplantation between areas occurred in 36 of the 123 taxa. These 36 taxa are at risk of homogenization with genetically different populations. Twelve of the 36 taxa are particularly endangered. We studied details of the invasion of non-indigenous haplotypes in an East Japanese population of the *Opsariichthys platypus* using the SNP genotyping method by realtime PCR. The results clearly showed that most of the population had already been invaded. The distribution model suggested that the probability of invasion was high in the dam lake. We determined whole genome sequences of the Japanese endemic population of *Cyprinus carpio* using NGS for their conservation.

研究分野：保全生態学

キーワード：遺伝的攪乱 系統地理 リアルタイムPCR 分布モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外における生物の移殖導入による在来生物相の攪乱は、外来種問題として一般的に広く認知されている。2005年には外来生物法が施行され、2010年の第10回生物多様性条約締結国会議で合意された「愛知ターゲット」でも侵略的外来種の導入と定着の防止が述べられた。その結果、アライグマやマングース類、オオクチバスといった生態的な影響が顕著な外国産動植物の法的規制や駆除が進むようになった。

一方、国内および近隣国に分布する同種の地域個体群の移殖による遺伝的攪乱は、日本の生物の各地域在来の遺伝的特性を失わせ、形態的・生態的・生理的特性を広い範囲で均質化させることで「遺伝子資源」を失わせる重篤な外来種問題である。しかし、その現状解明は遅れており、対策もほとんどとられていない。その理由として、野生生物のDNA解析技術が広く普及するまでは、客観的に実態を示すのが困難だったことが挙げられる。

(2) 個体の移動範囲が河川水系内に限定される純淡水魚の場合、遺伝的解析が進むまでは、外見で認識できる色彩の相違を持ったタイリクバラタナゴとニッポンバラタナゴの交雑だけが一般的に問題視されていた。タイリクバラタナゴは1920年代に中国大陸から関東地方に導入された食用魚の種苗に混入していたバラタナゴの大陸産亜種である。タイリクバラタナゴは、その後日本全国に分布を広げ、西日本在来のニッポンバラタナゴ(バラタナゴの日本産亜種)と交雑することで、本州・四国の純系ニッポンバラタナゴをわずかに数カ所の生息地を残して絶滅させることになった。

外見的相違が認識しにくい魚種の場合は、ニッポンバラタナゴ以上に問題が深刻化していることがある。日本のコイは、かつてその全てが大陸産の人為的導入によるものと考えられていたが、実際は日本在来の系統が存在していたことがmtDNAの分析によって明らかになっている。しかし、現在は全国の河川湖沼に放流された外国産の養殖ゴイが蔓延しており、琵琶湖の沖合深部にのみ在来コイの遺伝的比率の高い個体が残っている。しかし、琵琶湖のコイでさえすでに純系ではなく、あくまでも遺伝的に在来の要素が多いだけである。

(3) コイ以外にもフナ、メダカ、ドジョウのように、日本人に古くから親しまれてきた魚の場合、各地で放流が行われている。特に食用・養殖の流通量の多いドジョウは大陸由来の同種のドジョウが広域に広がっており、交雑の実態が不明ながら危機的状況にあることが推測されるため、2013年公表の環境省第4次レッドリストに情報不足(DD)として掲載された。他にも琵琶湖産アユの放流に混入した淡水魚による攪乱によって、コイ

科のオイカワは関東地方の全ての水系で琵琶湖系統が侵入・交雑しており、希少淡水魚のシロヒレタビラの濃尾平野個体群も全ての生息地で琵琶湖系統の侵入が見られる。

こうしたことから、日本の在来淡水魚は、非常に多くの種で国内外の地域個体群もしくは近縁種の移入による遺伝的攪乱を受けており、早急に全種についての実態把握と、地域在来系統の保全対策を提示しなければ、著しい遺伝子資源の損失が進行していくと考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、純淡水魚を対象として約60種(日本産の全純淡水魚のうち、琵琶湖固有や琉球列島固有などを除いたもの)の系統地理的解析をおこない、日本産純淡水魚全種の遺伝的攪乱の概要を把握することを目指した。その上で、遺伝的攪乱の程度に応じて危機的状況をランク分け(攪乱度I, II, IIIなど)することで、緊急的な保全対策の優先度を明らかにすることを目的とした。

(2) まだ遺伝的に攪乱されていない在来個体群が残存する種については、「遺伝的攪乱侵攻予測モデル」を用いて今後の攪乱の可能性を予測し、必要に応じて事前に系統保存を図れるようにすることを目的とした。

(3) すでに全個体群が攪乱されている種として、日本在来コイなどが知られているが、こうした在来系統については次世代シーケンサーを用いた全ゲノムを網羅するSNPsマーカーのマッピングを行うことで、遺伝的に攪乱された個体の染色体上の「在来遺伝子」と「外来遺伝子」の分布が明らかになると考えられるため、将来的に在来系統の要素の濃い個体を用いた交配による「遺伝的復元」のための基礎データを得る。

3. 研究の方法

(1) 日本産純淡水魚の遺伝的攪乱の全体像の把握。

日本産の純淡水魚(海に下ることなく、一生を淡水域で過ごす魚類)は約80種が知られているが、その中の琵琶湖固有種や琉球列島固有種は1つもしくは少数の水系にのみ生息するため、同種の他地域からの移殖は生じない。そこで、それらを除いた約60種を対象に、日本国内で遺伝的に分化した個体群間の移殖や大陸産の同種もしくは近縁種の導入による攪乱の程度を明らかにする。

具体的には、ミトコンドリアDNA(mtDNA)をマーカーとして地域間移殖の概況を明らかにする。すでに分布域全体の概況が明らかでないメダカ、ドジョウ、ゼゼラ、ニッポンバラタナゴなどは既報を参考にし、状況が不明な種については各種10から100地点(分布域の広さに応じて地点数を増やす)でサンプリ

ングして調査する。

(2) 遺伝的攪乱の危機的状況のランク分け。

地域間移殖による遺伝的攪乱は、程度の差こそあれ多くの種で進行していると予想される。現状ではその全体像が把握されておらず、保全のための努力を優先的に投入すべき対象も明らかになっていない。そこで、上記の遺伝的攪乱の状況把握と並行して、優先順位を検討する。

(3) 攪乱度の高い魚種における在来個体群の特定。

他地域由来の外来 mtDNA が分布域全体で広く見られる魚種については、在来の純系個体群が残っているかどうかを確認し、保全を図る必要がある。MtDNA による多数地点のスクリーニングをおこない、外来 mtDNA の侵入が見られない地域を探索する。詳細なサンプリングに伴う多数の個体の mtDNA の系統判別はリアルタイム PCR を用いて効率的におこなう。

(4) 遺伝的攪乱侵攻予測モデルの開発。

遺伝的攪乱が生じている魚種については、残された在来個体群の保全をおこなう必要がある。その際に、現在残されている在来純系個体群に攪乱が生じる可能性を検討し、効果的な保全対象の選定をおこなう。環境要因から遺伝的攪乱の侵攻を予測する数理モデルについて、分布モデルを用いて構築し、GIS により可視化する。

(5) すでに攪乱されてしまった種のゲノム解析

現時点ですでに全個体群が遺伝的に攪乱されている魚種として、日本在来のコイが挙げられる。すでに純系が失われたとはいえ、攪乱された個体群のゲノムには在来遺伝子も残されており、将来的には選択的交配によって、限りなく在来個体群に近いものが復元できる可能性も残っている。そのための基礎として、本研究ではコイをモデルケースとしたゲノム中の在来遺伝子と外来遺伝子のマッピング技術の開発を行う。

4. 研究成果

(1) 日本産純淡水魚の遺伝的攪乱の全体像の把握。

日本産淡水魚の遺伝的攪乱の全体像を明らかにするためには、各魚種の遺伝的解析による系統地理が明らかになっている必要がある。本研究課題では、既存の報告の無い種を中心に日本列島における各魚種の系統地理解析を行い、オイカワ、カマツカ、カワバタモロコ、イチモンジタナゴ、ヒガイ属、ア

カザについて論文として公表した。その他、約 10 種についてデータは得られたが未公表（学会発表のみを含む）に留まっている。

こうしたデータを用いて、日本産淡水魚の分布攪乱状況の全体像を把握するために、Watanabe (2012)における日本列島の淡水魚類の分布地域区分に基づいて、各地域における在来/外来分布の状況を既存文献および研究代表者・分担者の研究結果を参考に整理した。

分布状況は、次の 4 カテゴリーで表した。

- 0: 分布せず
- 1: 自然分布
- 2: 自然分布だが他地域からの移入あり
- 3: 移入分布

カテゴリー 2 については、同種もしくは交雑可能な近縁種が人為的に移入していることが知られている地域とした。



図1 Watanabe (2012)の地域区分図。

情報を整理した対象種は、琉球列島産を除く 123 分類群の淡水魚とした。各分類群は、分類学的に種として記載されているものだけでなく、「同種」とされていても遺伝的に大きく分化した地域系統が存在する場合は、それらを分類群として扱った。

情報を整理した結果、123 分類群中の 36 分類群で、在来分布域の地域間での移殖や、交雑可能な近縁種の移入が生じていることが明らかになった。なお、Watanabe (2012)の地域区分内での移殖については情報が不足しているために、現段階では検討していない。

こうした分布攪乱の生じている 36 分類群の中でも、Watanabe 2012 の「地域」内に、一つでも移入事例があるものを、その地域で移入が生じているとした場合、その分類群の自然分布域全てに移入が生じているものが 12 分類群（ニッポンバラタナゴ、スイゲンゼ

ニタナゴ, コイ, オイカワ EJ, オイカワ KY, モツゴ, シナイモツゴ, ゼゼラ濃尾平野, ゼゼラ九州, カマツカ C, ハリヨ, トウカイヨシノボリ) 確認できた。これらの分類群は、その全体が遺伝的に攪乱されるリスクにさらされている。

(2) 遺伝的攪乱の危機的状況のランク分け。

分布する全ての「地域」で同種・近縁種の移入が生じているものを「遺伝的絶滅危惧種」とした場合、その「地域」内での純系個体群の置かれている状況によって、さらに危機的状況のランクを分けることができると考えられた。

本研究課題以前の既報告において、すでにコイ (Mabuchi et al. 2008) とゼゼラの濃尾平野個体群及び九州個体群 (堀川ほか 2007; 堀川・向井 2007) は、ほぼすべての個体群が外来個体群の移殖によって攪乱されていることが示されていた。このように純系が残っていないと考えられるものは、「遺伝的絶滅」と考えることができる。

オイカワ EJ 系統 (東日本系統) は、関東地方から伊勢湾周辺地域に在来の地域系統だが、ほぼすべての生息地に琵琶湖産アユ種苗に混入したオイカワ WJ 系統 (西日本系統) の侵入が生じており、ごくわずかな生息地にしか在来の純系個体群は残されていないと考えられた (詳細は後述)。このような分類群は、「遺伝的絶滅危惧 I 類」と仮にカテゴライズできる。

残りの危機的状況の 8 分類群については、地域的には移入が生じているものの、在来個体群と考えられるものも、ある程度残されているため、「遺伝的絶滅危惧 II 類」と仮にカテゴライズできる。

現状では、日本産淡水魚の遺伝的攪乱の現状の大まかな全体像を把握し、遺伝的攪乱の危機的状況をレッドリストを参考にした形でカテゴライズできた。しかし、各魚種の詳細な現状については不明な点も多く、追加データが必要とされる。

(3) 攪乱度の高い魚種における在来個体群の特定。

日本列島全体でのおおまかな状況は既存の情報からでも把握できたが、各地域内における外来遺伝子の分布の詳細を明らかにするためには、相当な調査努力を必要とする。

そこで、環境 DNA 等の検出にも応用可能なリアルタイム PCR を用いた SNP ジェノタイピングを、ドジョウと外来種のカラドジョウの識別、およびオイカワ EJ 系統と WJ 系統の識別と定量的のために開発した、いずれの場合も、ミトコンドリア DNA の部分塩基配列をターゲットとした。その結果、どちらも個体から抽出した DNA のジェノタイピングには成功したが、環境水や複数個体のサンプルを混ぜ合わ

せた DNA 溶液中に含まれる複数系統の定量化は出来なかった。オイカワについては、EJ と WJ の塩基配列の差がやや小さく、琵琶湖産の WJ ハプロタイプの塩基配列が非常に多様だったため、ジェノタイピングのためのプライマーの設計が難しいという問題があった。

個体の採集や DNA 抽出の省力化は今後の課題だが、キレックスなどを用いた簡易抽出 DNA を用いて、濃尾平野におけるオイカワの外来遺伝子の検出を SNP ジェノタイピングによっておこなった。濃尾平野の木曾三川 (36 地点) および庄内川水系 (7 地点) の 1318 個体について解析した結果、木曾三川で外来遺伝子が見られなかったのは 3 地点のみであり、ほぼすべての場所で外来遺伝子が見られることがわかった。庄内川水系は 7 地点中 3 地点でしか外来遺伝子が見つからなかったことから、在来個体群が残っている可能性が高いことが明らかになった。

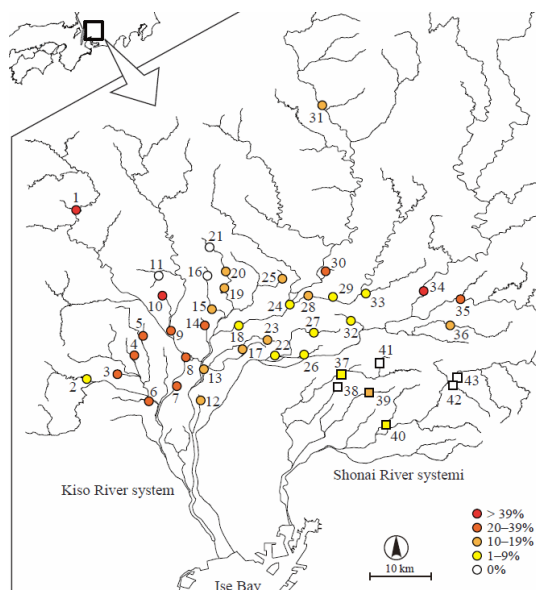


図 2 濃尾平野におけるオイカワの外来遺伝子の侵入率 (Kitanishi et al. 未発表)。丸は木曾三川、四角は庄内川水系。白抜きは外来遺伝子が出されなかった地点で、外来遺伝子の頻度が高いほど赤に近い色で示している。

オイカワ以外の魚種については、通常の塩基配列決定法によって濃尾平野産のカワヒガイ、アブラボテ、タモロコ属、トウカイヨシノボリについて外来の mtDNA の分布を調査し、複数地点での外来遺伝子の侵入を確認したが、在来 mtDNA のみの地点が多数残っていた。しかし、三重県多気町内のトウカイヨシノボリについて PCR-RFLP によって 4 地点のため池から採集した 96 個体の mtDNA を調べたが、3 地点は他のヨシノボリ類の mtDNA を持つ個体が分布していた。

関東地方のモツゴについても、20 地点 200 個体の mtDNA を PCR-RFLP によって判別したが、東日本在来系統の mtDNA のみの場所は 3

地点だけであった。

(4) 遺伝的攪乱侵攻予測モデルの開発。

外来種の侵入の予測モデルおよび、在来種の保全地域選定のために、外来種の影響を検討した。その応用として上記のオイカワの外来遺伝子侵入に関連する環境要因を予測した。その結果、水系による違いが大きく影響しており、木曾三川と庄内川で外来オイカワの侵入圧が異なることが示された。それ以外の要因として、外来遺伝子の頻度はダムがあることによって高まること示唆された。

(5) すでに攪乱されてしまった種のゲノム解析

コイをモデルにしてゲノム全体での在来遺伝子と外来遺伝子の判別をおこなうためのマーカーの取得をおこなった。公表されているコイのゲノムシーケンスを基礎として、琵琶湖産のほぼ日本在来系統と考えられるコイ4個体について次世代シーケンサを用いてゲノムのリシーケンスを行った。琵琶湖産コイのゲノム中に浸透した外来遺伝子の分布と、選択的交配によって外来遺伝子を除去できるかどうかについては、今後の研究課題となる。

<引用文献>

堀川まりな・向井貴彦 (2007) 濃尾平野におけるゼゼラのミトコンドリア DNA 二型の分布。日本生物地理学会会報, 62: 29-34.

堀川まりな・中島 淳・向井貴彦 (2007) 九州北部のゼゼラにおける在来および非在来ミトコンドリア DNA ハプロタイプの分布。魚類学雑誌, 54: 149-159.

K Mabuchi, H Senou and M Nishida. 2008. Mitochondrial DNA analysis reveals cryptic large-scale invasion of non-native genotypes of common carp (*Cyprinus carpio*) in Japan. Molecular Ecology, 17: 796-809.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 28 件中)

鈴木美優、北西滋、淀太我、向井貴彦、東海地方におけるヒガイ属魚類の遺伝的集団構造と攪乱、魚類学雑誌、査読有、63 巻、2016、107-118
<http://www.fish-isj.jp/publication/journal6302.html>

Kitanishi S, A Hayakawa, K Takamura, J Nakajima, Y Kawaguchi, N Onikura and I Mukai. Phylogeography of *Opsariichthys*

platypus in Japan based on mitochondrial DNA sequences. Ichthyological Research, 査読有, 63 巻, 2016, 506-518.
DOI: 10.1007/s10228-016-0522-y

Nakagawa H, S Seki, T Ishikawa and K Watanabe. Genetic population structure of the Japanese torrent catfish *Liobagrus reinii* (Amblycipitidae) inferred from mitochondrial cytochrome b variations. Ichthyological Research, 査読有, 63 巻, 2016, 333-346.
DOI: 10.1007/s10228-015-0503-6

Tominaga K, J Nakajima and K Watanabe. Cryptic divergence and phylogeography of the pike gudgeon *Pseudogobio esocinus* (Teleostei: Cyprinidae): a comprehensive case of freshwater phylogeography in Japan. Ichthyological Research, 査読有, 63 巻, 2016, 79-93.
DOI: 10.1007/s10228-015-0478-3

[学会発表](計 27 件中)

北西滋、鬼倉徳雄、向井貴彦、東海地方におけるオイカワの外来遺伝子の著しい侵入、第 64 回日本生態学会大会、2017 年 3 月 16 日、早稲田大学(東京)

向井貴彦、加藤千尋、清水孝昭、カワヨシノボリにおける遺伝的集団構造と mtDNA の系統地理、第 64 回日本生態学会大会、2017 年 3 月 16 日、早稲田大学(東京)

馬淵浩司、Japanese native strain of common carp (*Cyprinus carpio*) and Lake Biwa as a refuge from biological invasion of introduced "Eurasian" strains、International Sancheoneo Symposium in Hwacheon、2015 年 1 月 18 日、Hwacheon (韓国)

[図書](計 4 件)

向井貴彦、岐阜新聞社、岐阜県の魚類、2017 年、208 (予定)

Watanabe K、K Tominaga、J Nakajima、R Kakioka、R Tabata、Springer、Species Diversity of Animals in Japan、2017 年、183-227

日本魚類学会自然保護委員会編(渡辺勝敏・森 誠一 責任編集)、東海大学出版部、淡水魚保全の挑戦 水辺のにぎわいを取り戻す理念と実践、2016 年、327

岐阜の自然考出版委員会(向井貴彦ほか 12 名)編、垂井日之出印刷、岐阜の自然考 ふるさと ぎふの多様な生きものたち、2015 年、192

〔その他〕
ホームページ等

ぎふ生物多様性情報収集ネットワーク
<http://www1.gifu-u.ac.jp/~cbnedis/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井 貴彦 (MUKAI, Takahiko)
岐阜大学・地域科学部・准教授
研究者番号：80377697

(2) 研究分担者

渡辺 勝敏 (WATANABE, Katsutoshi)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：00324955

馬淵 浩司 (MABUCHI, Koji)
東京大学・大気海洋研究所・助教
研究者番号：50401295

鬼倉 徳雄 (ONIKURA, Norio)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：50403936

福田 信二 (FUKUDA, Shinji)
東京農工大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：70437771

清水 孝昭 (SHIMIZU, Takaaki)
愛媛県農林水産研究所・水産研究センター・主任研究員
研究者番号：90503996

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

北西 滋 (KITANISHI, Shigeru)
岐阜大学・地域科学部・特定研究補佐員
研究者番号：90552456