

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18780142
 研究課題名(和文) 琵琶湖産野生型コイの遺伝的簡易識別法の開発と交雑状況の把握
 研究課題名(英文) A simple genetic identification method for Lake Biwa wild strain of common carp: its development and application

研究代表者
 馬淵 浩司 (MABUCHI KOHJI)
 東京大学・海洋研究所・助教
 研究者番号：50401295

研究成果の概要：琵琶湖産野生型コイは、大陸のコイとは遺伝的に明瞭に異なる特異な系統である。ところが、琵琶湖には大陸に由来する飼育型コイが何度も放流されており、交雑による遺伝子汚染が懸念されている。そこで本研究では、野生型コイを遺伝的に識別する核 DNA マーカーを新たに複数個開発し、琵琶湖におけるコイの交雑状況を調べた。その結果、20m 以深の深層には、比較的純粋な野生型集団が残存していることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	270,000	3,970,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：遺伝・育種

1. 研究開始当初の背景

琵琶湖には、体高の高いコイから体高の低い(細長い)コイまで、様々な体型のコイが生息している。100年以上前から、体高の高いコイは放流魚かその子孫、細長いコイは琵琶湖在来の系統と考えられ、前者は「飼育型」、後者は「野生型」と呼ばれてきた。しかしその一方で、欧米の研究者の間では「日本のコイは疑いなく中国から移入されたものである」(Jordan and Fowler, 1903)と考えられていた。

欧米の研究者の見方に従うと、琵琶湖のコイは飼育型だけでなく野生型も中国から移入したものとなる。しかし、研究代表者らがミトコンドリア (mt) DNA を用いて分子系統学的解析を行ったところ、琵琶湖の野生型コイは中国やヨーロッパ大陸に生息するコイとは遺伝的に明瞭に異なっており、古くに大陸の系統と分岐した日本固有の系統であることが明らかとなった (Mabuchi *et al.* 2005)。一方、飼育型は、そのほとんどが大陸産のコイと同様の

mtDNAを持つことが、その後の研究により判明した(Mabuchi *et al.* 2008)。

研究代表者らによる以上の研究により、琵琶湖の野生型コイは、世界的にも貴重な系統であることが明らかになった。しかし、その一方で、近年の琵琶湖では飼育型コイの放流が盛んに行われ、細長い野生型コイは漁師や釣り人からもほとんど目撃されなくなり、代わりに、体高の高い典型的な飼育型個体や、それと野生型との中間的な体型を持つ個体が多く観察されるようになっていた。この状況から、琵琶湖の野生型コイは、飼育型コイと交雑し、純粋な野生型は非常に少なくなっている可能性が懸念された。ところが、交雑の状況を調査するための核DNAマーカーはまだ開発されておらず、遺伝的な調査は全く行われていなかった。

2. 研究の目的

世界的に貴重な系統である琵琶湖の野生型コイを適切な方法で保全するためには、まず、放流された飼育型コイからの遺伝的影響を詳しく把握することが第一に必要と考えられた。そこで本研究では、野生型と飼育型を区別し、両系統の交雑の程度を把握できる複数の核DNAマーカーを開発することを第一の目的とした。さらに、それらを用いて琵琶湖のコイの分布状況と交雑状況を明らかにし、野生型の保全に向けた基礎データを得ることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 基準となる個体の選定

野生型の形態的特徴は細長い体型にあるが、この特徴の変異は連続的であり、飼育型との境界は明瞭でない。従って、野生型の基準となる個体の選定は、体型には基づかず、より確実に判定できるmtDNAの型を基準にして行った。具体的には、まず、琵琶湖の全域から得た800以上の個体(コイヘルペスにより大量斃死した約100個体

を含む)についてmtDNAの型判別を行い、ほとんどの個体が野生型のmtDNAを持つ地域(あるいはサンプル群)を特定した。そして、その地域あるいはサンプル群に属する個体のうち、野生型のmtDNAをもつものを野生型の基準とした。一方、飼育型の基準としては、ヨーロッパと中国・台湾で採集された個体(合計30個体)を用いた。

(2) 核DNAマーカーの探索

上述のように選定した基準個体を用いて、核ゲノム中の一塩基変異(SNP)を調べた。調べるゲノム領域としては特に、繰り返し配列に隣接する領域(マイクロサテライト部位隣接領域)に注目した。なぜなら、マイクロサテライト部位とその隣接領域を増幅するプライマーは、マイクロサテライト部位の多型を調べるための情報として既に多数報告されていたからである(なお、本研究において、マイクロサテライト部位の多型でなく、それに隣接する領域のSNPを調べた理由は、前者は後者よりホモブラシーが起き易いと報告されていたためである)。マイクロサテライト部位とその隣接領域を増やすプライマーとしては、既に報告されていたものに加えて独自に開発したものも用いた。これらによってPCR増幅したDNA断片について、その塩基配列をダイレクトシーケンス法によって調べ、野生型と飼育型の基準個体間で違いのある塩基座位を探索した。

(3) 簡易識別法の開発

野生型に特徴的なSNPが検出された座位については、一度のPCR反応でできるだけ多くの連鎖していない座位が調べられるよう、プライマーの組合せを探索し、最小回数のPCR反応で最大の解析座位数を稼げるような実験条件を探索した。

(4) 琵琶湖における交雑状況の把握

開発した核DNAマーカーを用いて、琵琶湖の各地から得た個体の交雑状況を解析し、場所によってどのような違いがあるのかを調査した。

4. 研究成果

(1) 基準となる個体の選定

琵琶湖の全域から得た800以上の個体についてmtDNAの型判別を行ったところ、野生型mtDNAの頻度は水深20mより深いところで80%以上と高く、それより浅い領域では50%以下と低いことが判明した。また、コイヘルペスで大量斃死した個体では90%以上と非常に高いことも判明した。以上の結果から、野生型の基準としては、コイヘルペスで斃死したものの中で野生型のmtDNAを持っていた個体を用いることとした。

(2) 核DNAマーカーの探索

野生型と飼育型を区別できる座位として、合計で5つの座位が得られた。

(3) 簡易識別法の開発

上で得られた5座位は全て、1本の反応液の中で同時にPCR増幅できた。また、これらの座位は全てダイレクトシーケンスにより調べることができた。従って、この5座位を調べる際には、1個体について1回のPCR反応を行えば、後のシーケンス反応に直接用いることができ、比較的少ない行程でSNPの判別ができた。

(4) 琵琶湖における交雑状況の把握

開発した核ゲノムマーカーを、琵琶湖各所から得た個体に適用したところ、大部分の個体は野生型・飼育型に特徴的なSNPを併せ持っていた。しかし、深度によって両型のSNPの比率は明瞭に異なり、20m以浅の浅場で採集された個体の多くでは、5つのマーカー座位の大部分が飼育型のSNPで占められていたのに対し、20m以深の深場の個体では、マーカー座位の大部分が野生型のSNPで占められていた。このような傾向は、上で述べたミトコンドリアDNAハプロタイプの出現傾向と非常に整合的であると評価できた。

以上の結果から、現在の琵琶湖におけるコイの交雑状況は以下のように推察された。琵琶湖内では野生型コイと飼育型コイの交雑が起きているが、交雑の程度は深

度によって異なり、20m以浅では飼育型の遺伝的影響が強いが、20m以深では飼育型の遺伝的影響は少なく、比較的純粋に近い野生型集団が残存している。

本研究により、琵琶湖の20m以深には、野生型コイの保全上非常に重要な個体群が存在することがわかった。野生型コイの種内における系統的な特異性を考えると、この琵琶湖の「深層部」は、世界的に貴重な生息地であるといえる。

本研究により、琵琶湖深層のコイ個体群の重要性が明らかになったが、その一方で新たな問題も提出された。すなわち、「なぜ20m以深に限って比較的純粋に近い野生型が残されているのか」という問題である。この問いは、野生型の適切な保全策を考える上でも重要だが、野生型と飼育型の生活史の違いなど、純粋に生物学的な観点から大変興味深い問題を含んでいる。今後の研究を進めて行く上で重要な問いになるだろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

Matsuzaki, Shin-ichiro S., K. Mabuchi, N. Takamura, M. Nishida and I. Washitani. Behavioural and morphological differences between feral and domesticated strains of common carp. *Journal of Fish Biology*. (印刷中) (査読あり)

Mabuchi, K., 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. (査読あり)

Mabuchi, K., M. Miya, H. Senou, T. Suzuki and M. Nishida, 2006. Complete mitochondrial DNA sequence of the Lake Biwa wild strain of common carp (*Cyprinus carpio* L.): further evidence for an ancient origin. *Aquaculture*, 257: 68–77. (査読あり)

〔学会発表〕(計 9件)

馬淵浩司・瀬能 宏・武島弘彦・中井克

樹・西田 睦. 琵琶湖におけるコイの日本在来 mtDNA ハプロタイプの分布 (口頭発表). 日本魚類学会年会. 愛媛大学城北キャンパス. 2008 年 9 月 22 日.

松崎慎一郎・馬淵浩司・高村典子・西田睦・鷺谷いつみ. 新たにレッドリストに記載された在来型コイの生態と行動 (ポスター発表). 日本生態学会第 55 回大会. 福岡国際会議場. 2008 年 3 月 14 -17 日.

Matsuzaki, S. S., K. Mabuchi, N. Takamura, M. Nishida, B. Hicks, I. Washitani. Trophic segregation between native and introduced strains of the common carp (*Cyprinus carpio*) in Japan: insights from molecular and stable isotope analyses (Poster session). Special Symposium: Biology of Cypriniformes, Chiang Rai, Thailand. Nov. 2007.

馬淵浩司・瀬能 宏・西田 睦. 日本在来型コイの核ゲノムマーカーによる識別 (ポスター発表). 日本魚類学会年会. 北海道大学学術交流会館. 2007 年 10 月 7 日.

松崎慎一郎・馬淵浩司・高村典子・西田睦・Brendan Hicks・鷺谷いつみ. 霞ヶ浦のコイの役割 - 在来型コイと移入型コイ (口頭 招待講演). 日本陸水学会 2007 公開シンポジウム「健全な霞ヶ浦を取り戻せるか?」. 茨城大学. 2007 年 9 月 12 日.

松崎慎一郎・馬淵浩司・高村典子・西田睦・鷺谷いつみ. 安定同位体から探る在来型コイと移入型コイの食性と栄養段階 (ポスター発表). 日本生態学会第 54 回大会. 愛媛大学. 2007 年 3 月 19-23 日. 最優秀ポスター賞受賞

松崎慎一郎・馬淵浩司・高村典子・西田睦・鷺谷いつみ. 在来型コイと移入型コイの食性と栄養段階 安定同位体からのアプローチ (ポスター発表). 平成 19 年度日本水産学会春季大会. 東京海洋大学 品川キャンパス. 2007 年 3 月.

馬淵浩司. 野生型コイの遺伝的簡易識別法の開発 - 保全に向けて (口頭 招待講演). アクアゲノムシンポジウム in びわ湖. 長浜バイオ大学. 2006 年 10 月 26 日.

馬淵浩司・瀬能 宏・西田 睦. ミトコンドリア DNA 解析により明らかとなったコイの移入系統 (ポスター発表). 日本魚類学会年会. 静岡県コンベンションアーツセンター グランシップ. 2006 年 10 月 8 日.

ジョン・C・エイビス (著)/西田 睦・武藤文人 (監訳)・馬淵浩司・向井貴彦・野原正広 (訳). 2008. 「生物系統地理学 種の進化を探る」, 東京大学出版会, 東京, pp.303.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬淵 浩司 (MABUCHI KOHJI)
東京大学・海洋研究所・助教
研究者番号: 50401295

(2) 研究協力者

西田 睦 (NISHIDA MUTSUMI)
東京大学・海洋研究所・教授
研究者番号: 90136896

瀬能 宏 (SENOU HIROSHI)
神奈川県立生命の星・地球博物館・学芸部・主任研究員
研究者番号: 80202141

〔図書〕(計 1 件)