

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580270

研究課題名(和文) 水田生態系保全に向けての国内外産ドジョウのDNA判別手法の開発

研究課題名(英文) Development of discrimination method between Dojou and Kara-dojou loaches using DNA markers for conservation of rice paddy ecosystem

研究代表者

小出水 規行 (KOIZUMI NORIYUKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究所・農村環境部・生態工学研究室・主任研究員

研究者番号：60301222

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアと核DNAを利用して、水田水域のドジョウとカラドジョウを判別できることを明示した。ミトコンドリアDNAにより、ドジョウはヨーロッパ系、中国系、韓国系、在来系、カラドジョウは単一のカラドジョウ系に分けられた。核DNAにより、ドジョウとカラドジョウの交雑個体は確認されなかった。髭長と体高による種判別式を利用すれば、DNA分析に用いる検体数を減らせることを指摘した。

研究成果の概要(英文)：Two loaches, the Dojou *Misgurnus anguillicaudatus* and Kara-dojou *Paramisgurnus dabryanus* inhabiting in rice paddies may be discriminated each other using mitochondrial and nuclear DNA markers in this study. Applying mitochondrial DNA analysis, the Dojou was separated into four genetic clades, Europe, China, Korea and Japan types. The Kara-dojou formed a single clade, Kara-dojou type. Results of nuclear DNA analysis showed the possibility of no hybridizing individual of them. To use a species discrimination equation with valuables of barbell length and body height could be available to decrease in a number of specimens used in the DNA analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：水田生態工学

科研費の分科・細目：農業工学・農業土木学・農村計画学

キーワード：ドジョウ、カラドジョウ、ミトコンドリアDNA、核DNA、判別式、生きもの調査

1. 研究開始当初の背景

水田生態系の解明研究が進展する中、一方では農村環境整備事業や地元住民を主体とする水田水域の生きもの調査がイベント的に実施されている。これらの生きもの調査は通常、生息種の確認程度でとどまるが、1部の結果においては生態系保全に向けての新たな課題を提示する場合がある。

その1つとして、近年、調査されたいくつかの地域では、本来の形態とは異なるドジョウが確認されている。ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* は水田水域の象徴的種として広く認識されているが、このようなドジョウの変異個体の確認は、水田生態系を保全する上で放置できない問題である。

ドジョウの変異個体は朝鮮半島や中国等に由来する国外産ドジョウ(カラドジョウ

Paramisgurnus dabryanus) と推察される。しかし、カラドジョウについては、種としての学名の混乱や種同定に用いる形態的基準、繁殖、移動、ドジョウとの交雑について不明な点が多い。生息分布情報を活用し、少なくとも変異個体の属性や由来についての学術的解明が強く求められている。

2. 研究の目的

本課題では、このようなカラドジョウの定着は、ドジョウをはじめ今後の水田生態系を脅かす一要因になり兼ねないと判断した。形態的基準さえも明確でないカラドジョウについて、ドジョウとの判別についてはDNA分析に委ねることが1つの有用法と考えている。

本課題の目的は、DNA マーカーを利用してドジョウとカラドジョウの判別を試み、その結果から推測される遺伝的特徴や生息分布の実態を解明することである。具体的な内容として、DNA マーカーにはミトコンドリア遺伝子と核遺伝子を適用し、分析手法としての有用性を検討する。DNA 分析結果と魚体に見られる形態的特徴との関連性についても解析し、全国及び栃木県から集められたサンプル個体を分析する。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア DNA 分析

種判別や進化系統解析等で汎用されている cytochrome *b* 遺伝子 (以下、「Cyt*b*」) の塩基配列を分析した。DNA 実験では、サンプル個体の Cyt*b* 領域を Polymerase Chain Reaction (以下、「PCR」) 増幅し、得られた PCR 産物を精製後、サイクルシーケンスした。シーケンス産物を精製し、シーケンサーで産物の塩基配列を解析することによって、各個体の塩基配列データを得た。

塩基配列データ解析では、各個体のデータをアライメントし、遺伝子型に相当するハプロタイプを特定した。ハプロタイプの塩基配列、既存のカラドジョウやホトケドジョウ *Lefua echigonia* 等の近縁のドジョウ類の Cyt*b* 配列を用いて、最節約法に基づく系統樹を構築し、樹形構造から推測される遺伝的クレード (分岐群, 系) を確認した。クレードの存在や地理的分布の比較から、Cyt*b* による判別の有効性を検討した。

(2) 核 DNA 分析

Cyt*b* は母系遺伝のため、交雑個体までは特定できない。両性遺伝の核遺伝子の中から、protein kinase C substrate 80K-H, 40S ribosomal protein S23, ribosomal protein

S2 (以下、それぞれ「80K-H」, 「S23」, 「S2」) による制限酵素断片長多型解析を実施した。DNA 実験では、サンプル個体の各遺伝子領域を PCR 増幅し、所定の制限酵素 (北川ら, 未発表) を用いて、得られた PCR 産物を断片化した。アガロース電気泳動による断片化産物のバンドパターンを解析し、各個体の断片長多型データを取得した。

断片長多型データ解析では、各遺伝子における多型パターンを特定した。特定されたパターンと Cyt*b* による遺伝的クレードを比較し、交雑状況を含めた核 DNA 分析の有効性について検討した。

(3) 形態分析

サンプル個体の標準体長、頭長、体高、尾柄高、尾柄長、髭最大長を計測した。計測データと DNA 分析による判別結果を用いて、分散分析、相関分析、多変量解析を適用しながら、形態的特徴と DNA 判別との関連性について検討した。

(4) 分析サンプル

①全国サンプル

農林水産省・環境省による「田んぼの生きもの調査 2006」において 40 道府県 123 市町村で採捕され、100%エタノールで固定された 444 個体 (各市町村 1~14 個体) を用いた。目視確認の結果、全国サンプルは全てドジョウとなり、各個体の標準体長 mm は平均 67±標準偏差 23, 最小 19~最大 145 であった。

全国サンプルについては、ミトコンドリア DNA 分析で使用した。

②栃木県サンプル

栃木県の渡良瀬川、鬼怒川、那珂川水系を中心に、「メダカリ親の会」会員によって採捕され、100%エタノールで固定された 45 地点、384 個体を対象とした。目視確認の結果、栃木県サンプルにはドジョウの他に、カラドジョウの特徴 (ドジョウと比べて体高が大きく、尾柄部が短い) をもつ個体が 20%弱含まれていた。全個体の標準体長 mm は平均 61±標準偏差 19, 最小 24~最大 140 であった。

栃木県サンプルについては、全ての分析で使用した。

③DNA 抽出

サンプル個体からの DNA 抽出には約 2mm 四方の尾鰭切片を用いた。抽出には改良 phenol-chloroform 法を適用し、抽出後の DNA については -30°C で保管した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア DNA 分析

①全国サンプル

Cyt*b* の全塩基配列のうち、99%に相当する

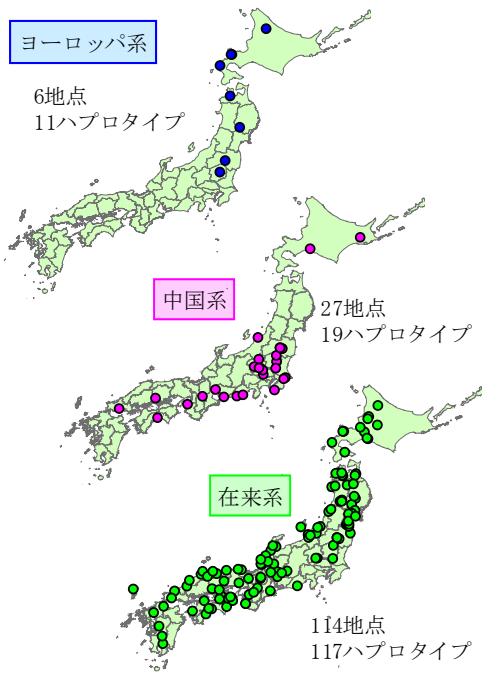


図1 全国サンプルの遺伝的クレードの地理分布

1,131塩基の配列データを全サンプル個体について得た。各個体の配列には塩基の欠失や挿入はなく、154ハプロタイプが出現した。ハプロタイプ多様度は平均0.9731±標準偏差0.0033、塩基多様度は平均0.0435±標準偏差0.0208と推定され、新潟県新潟市で最多となる8ハプロタイプが出現し、合計22市町村の48個体によるハプロタイプが最大となった。

特定された154ハプロタイプについて、最節約法による近隣結合法の系統樹を構築した。系統樹における分岐確率や近縁種との関係から、3遺伝的クレードが確認され、各クレードは関東北部から北に点在するヨーロッパ系、東北南部から西に分布する中国系、地域的または全国的に分布する在来系と推定された(図1)。また、これらのクレードと既存のカラドジョウ配列の間には170塩基(全配列の約15%)程度の違いも確認された。

当分析結果はメダカ *Oryzias latipes* とホトケドジョウに次いで、*Cytb*による日本の主要な水田魚類の遺伝構造を解明した成果に相当する。交雑個体が存在する場合は注意が必要であるが、現状では *Cytb* 配列の利用はドジョウとカラドジョウとの種判別だけでなく、形態からは区分できないドジョウの遺伝子型推定にも利用できることが明らかとなった。

② 栃木県サンプル

全国サンプルと同様に、全てのサンプル個体について1,131塩基の *Cytb* 配列データを得た。配列における塩基の欠失や挿入はなく、

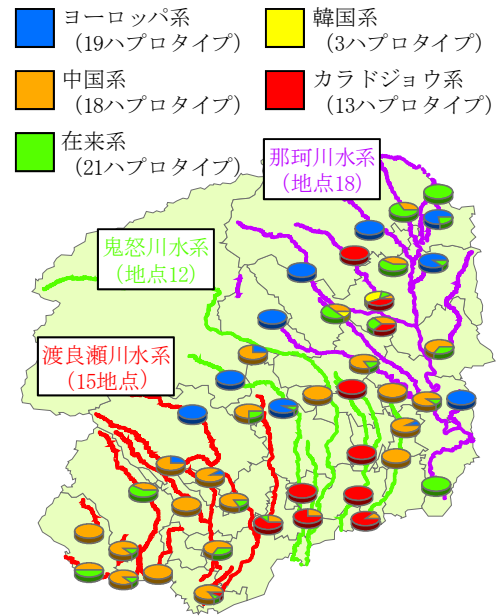


図2 栃木県サンプルの遺伝的クレードの地理分布

表1 核遺伝子の断片長多型パターンと *Cytb* の遺伝的クレードの関係 (1: 多型パターン1, 2: 多型パターン2)

Cytb クレード	核遺伝子		
	80K-H	S23	S2
ヨーロッパ系	1	2	1
中国系			
韓国系		1	
在来系			
カラドジョウ系	2	2	2

74ハプロタイプが特定され、そのうち19ハプロタイプが全国サンプルと一致し、55ハプロタイプが新たに出現した。

特定された74ハプロタイプを用いて、最節約法による近隣結合法の系統樹を作成した。系統樹にはヨーロッパ系、中国系、在来系に加えて、新たに韓国系とカラドジョウ系のクレードが出現した。渡良瀬川水系では中国系が主体となり、鬼怒川水系では1/3以上がカラドジョウ系、那珂川水系では全てのクレードが出現し(図2)、河川水系による遺伝特性の違いが明らかとなった。

当分析結果は、全国サンプルによる結果を追証したものと位置付けられ、さらに、韓国系とカラドジョウ系の存在を明らかにした。*Cytb* 配列を利用することにより、ドジョウとカラドジョウ、さらにドジョウはヨーロッパ系、中国系、韓国系、在来系に判別できることが確認された。

(2) 核DNA分析

栃木県サンプルを対象に、*Cytb* の遺伝的ク

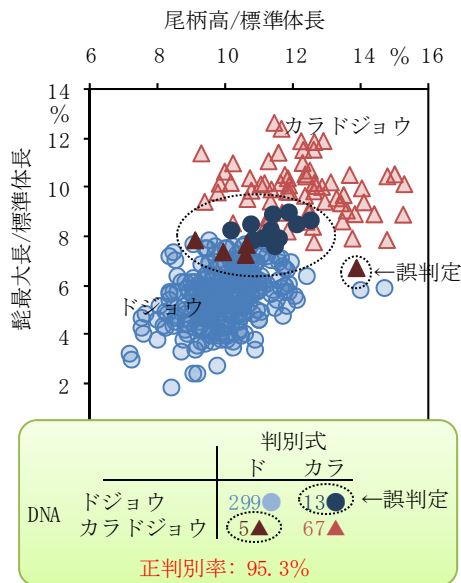


図3 髭最大長と尾柄高の相関図(上)及び判別率(下)

レード(系)に関連させて、3 遺伝子の断片長多型パターンを分析した。80K-Hでは2パターンが確認され、1つはドジョウの全4系、もう1つはカラドジョウ系に対応した(表1)。S23においても2パターンが確認され、1つはドジョウのヨーロッパ系を除く3系、1つはヨーロッパ系とカラドジョウ系となった。S2は80K-Hと同様の結果が得られた。3遺伝子ともに、交雑を反映する明確な多型パターンは確認されなかった。

当分析結果は、野外フィールドでの個体に関して、ドジョウとカラドジョウの交雑は生じていないことを示唆する。3 遺伝子による分析はドジョウとカラドジョウの判別はできるが、ドジョウの遺伝的クレードまでは推定できないことが明らかとなった。

(3) 外部形態計測による分析

栃木県サンプルの形態を計測し、標準体長で除した(標準化した)データを分析に用いた。DNA分析結果に基づいて、ドジョウとカラドジョウに分けてグループ間で比較した結果、分散分析と相関分析により、髭最大長と体高でグループ間の差が有意に認められた。また、ドジョウにおける遺伝的クレード間では形態に有意な差は確認されなかった。

ドジョウとカラドジョウを外的基準、それに該当する個体の形態項目を説明変数とし、マハラノビスの距離による判別式を構築した。得られた式は統計的に意味があり、髭最大長と尾柄高によって95.3%の確率でドジョウとカラドジョウを判別できることが明らかとなった(図3)。

当分析結果は、野外フィールドでも形態計測によって、ある程度の確率でドジョウとカ

ラドジョウを判別できる可能性を提示している。ただし、魚体が小さい個体や判別値が曖昧な場合は、DNA分析が必要なことも示している。

(4) 課題のまとめ

以上、当課題における分析結果をまとめると、ドジョウとカラドジョウは遺伝的に異なり、それらはミトコンドリアDNAのCytb、核DNAの80K-H、S2で判別できる。特に、Cytbの利用は、形態では特定できないドジョウの4遺伝的クレードまで推定できる。野外フィールドの個体については、交雑の可能性は少なく、形態計測による判別式もある程度は利用することが可能である。

ドジョウとカラドジョウの判別は、野外フィールドで判別式による予備検討を行い、その結果、不明な個体についてはCytb等によるDNA解析を行うことが、調査コスト等を削減する上で妥当であると推察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

- ①小出水規行, 渡部恵司, 高振 麗(他3名), 栃木県南東部におけるホトケドジョウのミトコンドリアDNAハプロタイプ, 農業農村工学会論文集, 査読有, 265, 61-62, 2010
- ②小出水規行, 竹村武士, 森淳(他1名), 谷津田域におけるドジョウ集団の遺伝構造の解明—マイクロサテライトDNAを利用した千葉県下田川流域の事例—, 農業農村工学会論文集, 査読有, 261, 21-29, 2009
- ③小出水規行, 竹村武士, 渡部恵司(他1名), ミトコンドリアDNAによるドジョウの遺伝特性—チトクロームb遺伝子の塩基配列による系統解析—, 農業農村工学会論文集, 査読有, 259, 7-16, 2009
- ④Koizumi, N., Watabe, K., Mori, A. (他1名), Isolation and characterization of 19 polymorphic microsatellite DNA markers in the Japanese brown frog (*Rana japonica*), *Molecular Ecology Resources*, 査読有, 9, 248-250, 2009
- ⑤小出水規行, 渡部恵司, 高振 麗(他3名), マイクロサテライトDNAを用いた栃木県小貝川上流域のホトケドジョウ集団の予備遺伝解析, 農業農村工学会論文集, 査読有, 256, 55-61, 2008

[学会発表] (計21件)

- ①小出水規行, 森 淳, 中茎元一(他5名), 栃木県におけるドジョウの遺伝的クレードの解明, 平成22年度農業農村工学会大会講演会, 2010年9月2日, 神戸大学
- ②Koizumi, N., Watabe, K., Mizutani, M. (他

2名), Genetic structure analysis of populations of freshwater fish around paddy fields in Japan using microsatellite DNA: case study of Japanese endangered species, the Japanese eight-barbel loach, *Lefua echigonia*, 33rd IAHR Congress, 2009年8月13日, Vancouver

- ③小出水規行, 渡部恵司, 水谷正一(他2名), マイクロサテライトDNAによる栃木県小貝川上流域におけるホトケドジョウ集団の遺伝構造解析, 平成21年度農業農村工学会大会講演会, 2009年8月6日, 筑波大学
- ④小出水規行, 渡部恵司, 竹村武士(他3名), 小貝川上流域におけるホトケドジョウの遺伝的構造の解明: マイクロサテライトDNAマーカーを用いた予備解析, 平成20年度農業農村工学会大会講演会, 2008年8月28日, 秋田県立大学

[図書] (計2件)

- ①小出水規行, 学報社, 春の小川の淡水魚—その生息場と保全—, 2009, 121-148

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出水 規行 (KOIZUMI NORIYUKI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・主任研究員
研究者番号: 60301222