

会津メダカから見る遺伝的攪乱 2

～環境 DNA 解析による分布状況の確認～



実施担当者 福島県立葵高等学校
教諭 矢澤 敦

1 研究背景

今日「生態系の保全」は世界全体における僅々の課題である。学校の現場でも中学3年の理科、高等学校の生物基礎の最終章に多くのページを充てて、この内容を取り上げている。その中心に存在するのが「生物多様性」と「持続可能性（サステナビリティ）」である。我々人間のグローバル化した社会活動は、攪乱の大きな要因となっている。そしてそれは生物多様性を損なう原因となり、貴重な遺伝子資源が失われる状況が大きな問題となっているのである。そこで我々は、地元である福島県会津地域に生息するキタノメダカ（会津メダカ）を対象として、野生生物の遺伝的攪乱の実態を調査することを考えた。

キタノメダカ(*Oryzias Sakaizumii*)は、水田や溜め池を棲み処とする日本在来の淡水魚である。会津を含む東北から北陸の日本海側に生息する。日本には、本州の太平洋側と中国地方以西に生息するミナメダカ(*Oryzias Latipes*)の2種が生息しており、両者は形態的な分類が可能である。しかし、1950年代以降の農業近代化に伴い、水田の乾田化及び用水路整備に伴うため池の消失などにより生息環境を失った。さらに里山環境の崩壊に伴って1999年には両者共に環境省のレッドリストにおいて絶滅危惧II類に指定される程数を減らしている。加えて近年では、「**遺伝的攪乱の進行**」が新たな問題となっている。これは他地域のメダカが持ち込まれることにより、野生メダカとの交雑が進み、その地域固有の遺伝的純系が失われる現象のことである。(Fig.1)

本校科学部では、5年間にわたり、福島県会津地域におけるメダカ亜種の分布調査を通して、遺伝的攪乱の現状を確認する研究を行ってきた。初めの3年間は、この地域における詳細なメダカ分布状況を確認するため、個体を採取して尾の組織から得た細胞をもとにPCR-RFLP法による解析を実施した。一地域の分布状況を詳細に調査したこの取り組みは、全国初であり、この研究の新規性である。結果として、41カ所探索した中の17カ所でメダカを採取でき、その内1カ所から他地域由来のミナメダカ個体群を確認した。(Fig.2)

しかし、この調査法はメダカを採取するプロセスがあるため、天候や採取者の技量等の影響を受け易く、再現性と信頼性が担保できない問題点があった。そこで、昨年度からは「環境DNA解析法」を採用して、過去のメダカ分布調査結果の検証を目的とした研究を行った。



Fig.1 遺伝的攪乱



Fig.2 個体採取とPCR-RFLP解析法による調査結果

2 仮説及び検証

2-1 仮説

在来種であるキタノメダカは、その生息環境が保存されている山間部で生存していると考えられる。これに対し外来種であるミナミメダカは、侵入の原因となる人間の社会活動が盛んな市街地で放流されている可能性が高いと判断した。したがって我々は「キタノメダカは山間部に、ミナミメダカは市街地に多く生息する」と仮説を立て、その検証を実施した。

2-2 検証

(1) 検証方法：「環境 DNA 解析法」を採用して、キタノメダカ及びミナミメダカの各々を同定した。環境 DNA は、海や川・湖沼・土壌などの環境中に存在する DNA の総称である。この解析法により、そこに生息する生物種の同定や生物量の把握が可能となる。(Fig.3)

また、以前に個体を採取して亜種解析をした調査地において、今回の解析法によるキタノメダカ及びミナミメダカの検出結果の比較を実施して相違を確認した。同時に調査日ごとに精製水のみサンプルによる解析を行い、

(2) 調査地：福島県会津地域を対象に 92 か所で調査を実施した。このうち 16 か所は以前のメダカ捕獲地である。(Fig.4) キタノメダカとミナミメダカの探索は、仮説に基づき山間部に残る農業用ため池と市街地や公園の池を各々設定した。

(3) 環境 DNA 解析の信頼性評価：この検出法の信頼性を担保する目的で、コントロールを設定してこの解析法の信頼性評価を行った。ポジティブコントロールとして、既知のメダカ捕獲地で実施比較して一致率を確認した。また各調査日ごとに滅菌水によるサンプルを作成して擬陽性に対するネガティブコントロールとして、その陰性率を確認した。

(4) 環境 DNA 解析の感度調査：調査を実施する上でこの解析法の感度調査も併せて実施した。河川・小川・沼に試験区を設定して距離ごとの感度を確認した。

(5) 調査環境：試薬 DNA 採取: Sterivex-HV 0.45µm PVDF SVHV010RS(Millipore), DNA 抽出: DNeasy Blood&Tissue (QIAGEN), PCR Taq: Gene Expression Mix (TaqMan), Primer: ミトコンドリア DNA (Cyt-b 領域)
装置 サーマルサイクラー: GeneAtlas (ASTEC), 高速遠心機: MX-301 (TOMY), 電気泳動装置: Mupid-exU (ADVANCE), 撮影装置: BioDock It (UVP)
調査期間 2020年7月12日～2021年9月19日

(6) 操作手順：a 環境 DNA 採取：各調査地において、水が他へ排水される場所から試料として水 500mL を採取した。その後 Sterivex-HV 0.45µm によるろ過を行い、DNA を採取した。また DW で同様の操作を行い、ネガティブコントロールを実施した。

b 環境 DNA の抽出・精製：遠心機を使用してサンプルの水抜き後、DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を使用して、サンプルから DNA の抽出・精製を行った。(Fig.5)

c PCR・電気泳動法解析：PCR 法により、サンプルのミトコンドリア DNA の Osa16S 領域と OlaND5 領域の各々を増幅するプライマーを添加して、キタノメダカとミナミメダカを同定した。

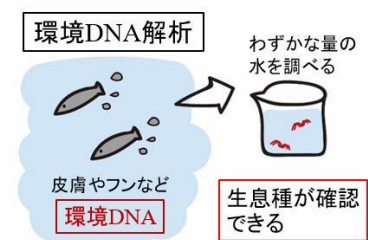


Fig.3 環境 DNA 解析

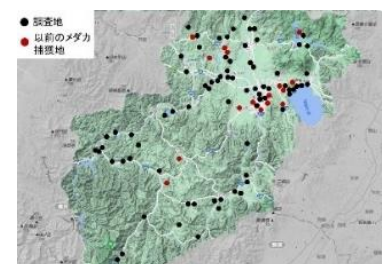


Fig.4 調査地



Fig.5 環境 DNA の抽出・精製

Taq には Gene Expression Mix(TaqMan)を使用。この操作の後、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動法で処理し、得られたバンドパターンにより同定した。

2-3 結果

(1) 試料解析結果

- ① 185 のサンプルを解析して泳動結果が得られた。(Fig.6) その結果、92 カ所の調査地中 33 カ所でメダカの生息が確認された。(Table1)
- ② キタノメダカは 31 カ所、ミナミメダカは 6 カ所で検出された。両種共に確認できたのは、その中の 4 カ所であった。
- ③ 過去にメダカを採取して同定を行った調査地の全てにおいて、今回の手法でも同様の種確認ができた。(Table1 白地に+で表記)
- ④ 今回の調査法により新たにメダカ生息が発見された調査地は、キタノメダカ 16 カ所・ミナミメダカ 5 カ所であった。(Table1 に赤色で表記)



Fig.5 電気泳動結果 (一部)

Table1 各調査地における試料解析結果

調査地	キタノメダカ	ミナミメダカ	調査地	キタノメダカ	ミナミメダカ	調査地	キタノメダカ	ミナミメダカ	調査地	キタノメダカ	ミナミメダカ
1	++	++	21	++	--	41	++	--	61	--	--
2	++	++	22	--	--	42	--	--	62	--	--
3	++	--	23	++	--	43	--	--	63	--	--
4	++	--	24	--	--	44	--	--	64	--	--
5	++	++	25	--	++	45	++	--	65	--	++
6	++	--	26	--	--	46	--	--	66	--	--
7	++	++	27	++	--	47	++	--	67	++	--
8	++	++	28	--	--	48	--	--	68	--	--
9	--	--	29	++	--	49	--	--	69	--	--
10	--	--	30	++	--	50	--	--	70	++	--
11	--	--	31	++	--	51	--	--	71	++	--
12	--	--	32	++	--	52	--	--	72	--	--
13	--	--	33	++	--	53	--	--	73	--	--
14	--	--	34	++	--	54	--	--	74	--	--
15	--	--	35	++	--	55	--	--	75	--	--
16	--	--	36	--	--	56	--	--	76	++	++
17	--	--	37	++	--	57	--	--	77	--	--
18	--	--	38	++	--	58	++	--	78	--	--
19	--	--	39	++	--	59	--	--	79	--	--
20	++	++	40	--	--	60	--	--	80	--	--



Fig.6 メダカ分布状況

(2) 環境 DNA 解析の感度調査結果

検証(4)の感度調査結果より、各々の調査地で得られた DNA サンプルは、その地点にのみ存在することが明らかになった。

(3) 会津地域におけるメダカ分布状況

- ① 会津地域におけるメダカ生息地は、北部に偏って分布している。その全てが池や沼であり、河川における生息は確認できなかった。(Fig.6)
- ② 各調査地におけるサンプル採取と共に行った聞き取り等により、会津若松市を中心とする平地のキタノメダカのほとんどが地元のメダカ保存会の放流によるものであることが明らかとなった。また会津南部の生息地の全ても放流あるいは移植によるものであった。

3 考察及び結論

3-1 考察

- (1) 今回の結果の信頼性について:ポジティブコントロールの一致率、ネガティブコントロールの陰性率が各々 100%となった。このことより、採取から分析までの一連の操作の信頼性が確認できた。
- (2) 環境 DNA 解析の感度評価について:今回メダカの存在が確認された調査地は、以前のメダカ採取により判明した場所を全て含む。さらに 20 カ所の新たな生息地を発見した、再現性の高い優れた調査法だといえる。
- (3) キタノメダカ分布について:仮説に基づく調査地 23 カ所中 18 カ所で生息を確認できた。よって、山間部の調査地における発見率は 78.2% と高い値が得られた。このことより、野生のキタノメダカは生息環境が保存された山間部に生存しているといえる。(Fig.7)

(4) ミナミメダカ分布について:ミナミメダカ生息地の内4カ所は市街地の池であり,残り1カ所は漁協のいけすだった。野生のキタノメダカが生息する山間部では一切発見されることはなかった。したがって,これらは人間の社会活動に伴って侵入していると考えられる。(Fig.7)

(5) 両種の混在について:両種が混在した調査地は全て市街地であり,人間の活動がその原因である。交雑が懸念される。(Fig.7の調査地1,2,5,7,6)

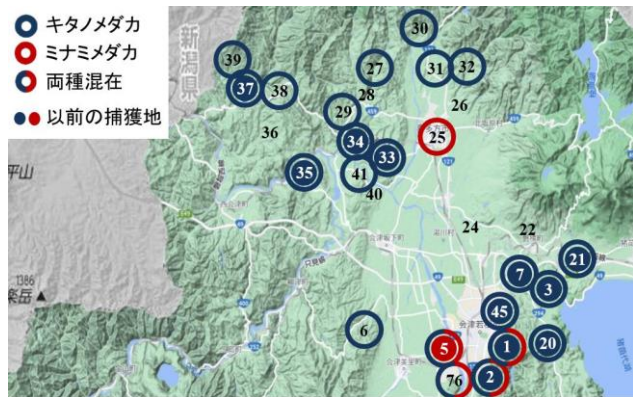


Fig.7 メダカ分布状況

3-2 結論

以上のことから,我々は「キタノメダカは生息環境が保存されている山間部に生息し,ミナミメダカは人間の社会活動が盛んな市街地に進出している」と結論付けた。

3-3 今後の展望

今回の調査法により新たに生息が確認された調査地について,メダカを採取して遺伝子解析(PCR-RFLP法)により亜種同定を実施する。またその結果を論文で発表するとともに,会津地域の各関係部署に情報提供してキタノメダカの保護に活かしたい。

参考文献

- 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*. *Zoolog Sci* 20 : 1279-1291.
- Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of multiple species from environmental DNA: an application on two Japanese medaka species Sakai Tsuji, Yuka Iguchi, Naoki Shibata, Iori Teramura, Tadao Kitagawa & Hiroki Yamanaka
- 高山 渡部絵里子,辻徹,佐藤正則,土井寅治,八鍬拓司,佐々木隆行,渡部明彦,鬼武和夫(2006)山形県内に生息する野生メダカにおける種内分化の分子遺伝学的解析 *Bull of Yamagata Univ., Nat. Sci* 16 : 55-69.

謝辞

本研究を行うにあたり以下の方々にご指導,ご協力受け賜りました。この場をお借りして御礼申し上げます。

- メダカの生態・及び分布に関する教授 新潟大学理学部名誉教授 酒泉 満 様
- 環境DNA解析の実験手法の教授 東北大学大学院生命科学研究科助教 田邊 晶史 様
- 環境DNA解析によるキタノメダカ・ミナミメダカの同定法に関する情報提供
山口大学環境DNA研究センター学術研究院 辻 冴月 様
- 研究助成 中谷医工計測技術振興財団 様

4 連携事業

4-1 小学生のための「会津メダカ」学習会

4-2 中学生のための「会津メダカ」学習会

4-3 小学生のための「DNA抽出実験講座」

4-4 中学生のための「遺伝子診断実験講座」

本校科学部は福島県会津地域の小学校及び中学校と連携して「会津メダカからみる遺伝的攪乱の研究」をテーマにした研究活動に取り組んでいる。その活動の一環として8月上旬に本校生物実験室において「メダカ学習会」を12月上旬にはそれぞれ「実験講座」企画していた。今年度は連携校を各々4校に増やして開催する段取りを組んでいた。しかし,新型コロナウイルス感染者増加に伴う措置により8月開催は見送りとなり,12月の開催も連携先と相談の上開催中止となった。試薬は確保してあるので,来年度開催する段取りを進めている。