

小田原産野生メダカの遺伝的モニタリング

酒泉 満・永井 尚子・中村 友香

Mitsuru Sakaizumi, Naoko Nagai and Yuka Nakamura:
Genetic Monitoring of the Wild Population of Medaka from Odawara

はじめに

メダカ (*Oryzias latipes*) は、アジア固有の淡水魚で日本在来の止水・半流水域に生息する小魚である。近年、生息地の環境悪化あるいは生息地そのものの減少によって急速に個体数を減らしている。この傾向は、特に都市近郊や圃場整備の進んだ農村地域で著しい。神奈川県でも小田原市桑原が、自然分布としてはほとんど唯一の野生メダカの生息地となってしまう（勝呂ほか，1998）。

酵素遺伝子の遺伝的な変異（アイソザイム多型）を調べることによって、野生メダカには地域特有の変異が存在することが明らかになってきた。日本産の野生メダカが「北日本集団」と「南日本集団」に大別される他、南日本集団内にも「東日本型」、「山陰型」などいくつかの「地域型」が認められる（酒泉，1997）。アイソザイム変異に加え、細胞質の遺伝因子であるミトコンドリアDNAを解析することにより精度の高い地域差の検出も可能になった（Matsuda *et al.*, 1997）。さらに、試験管内でDNAを増やす方法（PCR法）によってより簡便に個体差や地域差を検出することが可能になってきた。

1998年3月、「酒匂川水系魚類調査会」から小田原産野生メダカの遺伝的モニタリングを依頼された。筆者らは、神奈川県内では数少ない野生メダカの生息地である小田原市桑原の個体群を過去2回調査した経緯もあり、過去のデータとの照合も可能であること、野生メダカ地域個体群の保全の重要性などの理由からこの依頼を引き受けることにした。ここにその結果について報告する。

材料と方法

1. 材料

今回のサンプルは、酒匂川水系魚類調査会が1998年3月採集した小田原市桑原の2地点のもので

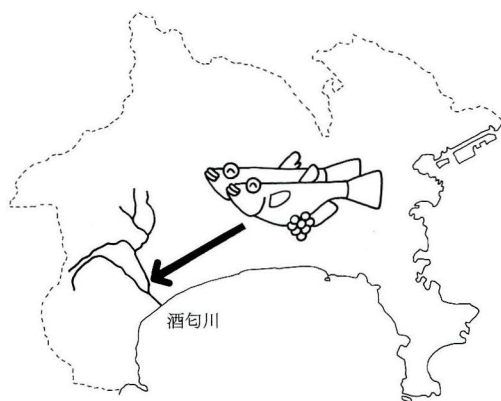


図1. 小田原市桑原の位置。

ある（図1）。各地点5尾，合計10尾について分析した。この付近で1979年と1991年の2度採集，調査したことがある。

2. 方法

分析項目は以下の通りである。

(1) 核の遺伝子のアイソザイム分析

ADH, IDDH, PGM, SOD, AMY, 骨格筋LDH, ACP, 肝臓ESTの8種類の酵素についてポリアクリルアミドおよびアガロースゲル電気泳動法により分析を行った（酒泉，1985）。

(2) 細胞質の遺伝因子、ミトコンドリアDNAのチトクローム *b* (Cyt. *b*) 遺伝子の分析

PCR法でチトクローム *b* 遺伝子領域（1234塩基対）を増幅した。制限酵素 *HaeIII* で切断したのち6%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。エチジウムブロマイドで染色し、そのパターンから遺伝子型を決定した（図2）。使用したプライマーとプログラムを以下に示す。

プライマー：

Cyt-*b*, Fa: 5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC-3'

Cyt-*b*, RVa: 5'-T(TC)C GAC (TC)(TC)C CG(AG)(TA)TT ACA AGA CCG-3'

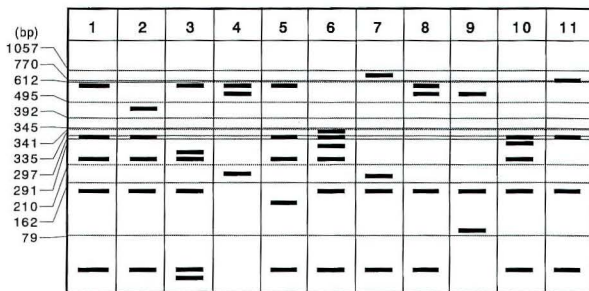


図2. チトクローム *b* 遺伝子の型を示す電気泳動パターン. 南日本集団で一般的な11種類の型が示してある. 左側の数字は分子の大きさ (塩基対数) を示す.

表1. アイソザイム遺伝子の頻度. 今回の日本新薬前と太平洋段ボール前との間に大きな差異は認められないことから両者を混ぜて示してある.

遺伝子座	ADH	IDDH	PGM	SOD	AMY	LDH-A	ACP
対立遺伝子	a b	a b	a b	a b	a b	a c b c	
1998年 (10個体)	1.0.00	1.0.00	.001.0	.001.0	1.0.00	.60.40	.80.20
1991年 (5個体)	1.0.00	1.0.00	.001.0	.001.0	1.0.00	.70.30	.80.20
1979年 (5個体)	1.0.00	1.0.00	.001.0	.001.0	1.0.00	.40.60	.90.10

PCR プログラム:

94℃ 2分前処理のち 94℃ 1.5分, 55℃ 2分, 72℃ 2分を 30 サイクル.

結果と考察

今回のアイソザイム分析結果を過去の分析結果とともに表1に示す. 大要は以下の通りである.

- (1) すべての個体が *IDDH** は *aa* 型, *ADH** は *aa* 型, *SOD** は *bb* 型, *PGM** は *bb* 型であった. これは南日本集団の一員であることを示している. 表1には示していないが, 肝臓 EST も南日本集団型であった.
- (2) 山陰地方のメダカにみられる *AMY** の *b* 対立遺伝子はみられずすべての個体が *aa* 型であった.
- (3) 骨格筋で発現される *LDH-A** では *a* 対立遺伝子が 60%, *c* が 40% の頻度であった (図3). *a* は比較的まれな対立遺伝子であるが, 小田原では 1979 年に 40%, 1991 年では 70% の頻度で検出されている.
- (4) *ACP** は 1979 年に *b* が 90%, *c* が 10% で, 1991 年は *b* が 80%, *c* が 20%, 今回は *b* が 80%, *c* が 20% と似たような頻度で推移している.

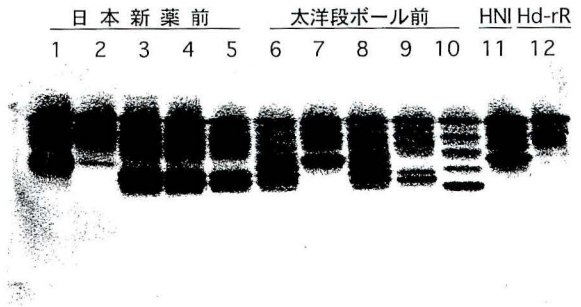


図3. 骨格筋 LDH の電気泳動パターン. 関東地方では 7 のパターン (遺伝子型 = *LDH-A*cc*) が一般的であるが, 小田原メダカには 10 (*aa*) や 8 (*ac*) などが高頻度にみられる. HNI: 新潟産メダカの近交系, Hd-rR: ヒメダカ由来の近交系.

Cyt. *b* 遺伝子は今回 2 型が 40%, 8 型が 60% であった. 1991 年の結果は 2 型が 20%, 8 型が 60%, 7 型が 20% で 7 型の有無以外大きな違いはない. Cyt. *b* の 1979 年の記録はない. 今回と 1991 年の記録を含めた, 関東地方の Cyt. *b* の遺伝子型の分布を図4に示す. なお 8 型は山陰地方に高頻度で分布するほか太平洋岸に沿って東海地方から東北地方まで点々と分布する型であり, 7 型は関東地方に特有な型, 2 型は関東から東北地方の太平洋側で最も一般的な型である.

関東地方のメダカは, 変異に富む一方アイソザイム変異では明確な地域差が少なく, 「東日本型」と判定する以上に細かい地域差を検出することは難しい. さいわい小田原産メダカは, 骨格筋の LDH をコードする *LDH-A** に特徴があった. すなわち全国的に比較的頻度の低い *a* 対立遺伝子が高頻度中存在することである. また, Cyt. *b* 遺伝子については, 東日本特有の 2 型や関東特有の 7 型が存在することなどの特徴がある. 今回の小田原産メダカでは Cyt. *b* の 7 型は検出されなかったが, これが関東のメダカの特徴を持ち, 過去 2 回の調査結果とも大きな違いはないと判断できる.

1997 年, 1991 年そして今回の分析個体数は決して充分とは言えない. しかし, この 3 回の調査結果から少なくとも以下のような結論を出すことは可能である. すなわち, この地域には関東地方の個体群の特徴をもったメダカが生息しており, 類似した遺伝子組成をもったメダカがこの 20 年間生き続けているということである.

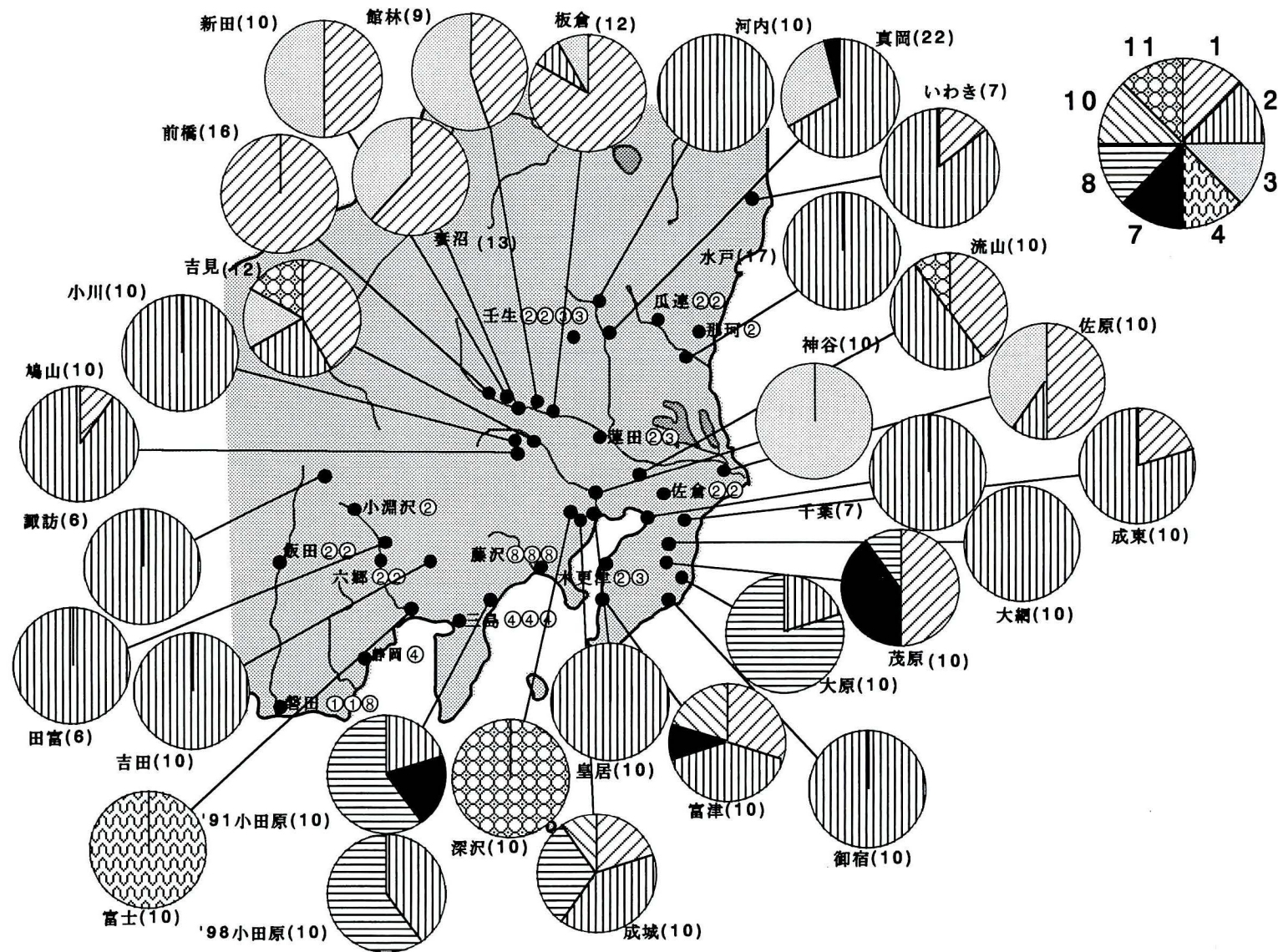


図4. 関東地方におけるチトクローム *b* 遺伝子型の頻度分布. () 内の数字は観察個体数. 観察個体数が少数の地点は, 各個体の型が個体数分示してある.

おわりに

本地域の用水路は、現在まで適切に管理され、水量は豊かで、メダカにとって居心地の良さそうな岸辺の構造が保持されている。このような状況が今後も維持されるならば土着と思われるメダカの保全は十分可能である。「メダカの学校」の歌の土地である小田原のメダカが末永く生き続けられることを願いたい。

引用文献

Matsuda, M., H. Yonekawa, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi, 1997.
Geographic variation and diversity in the mitochondrial

DNA of the medaka, *Oryzias latipes*, as determined by restriction endonuclease analysis. *Zool. Sci.*, 14 (3):517-526.

酒泉 満, 1985. 教材としてのメダカ—飼育と遺伝を中心に—. 生物教育, 26(3):164-174.

酒泉 満, 1997. 淡水魚地方個体群の遺伝的特性と系統保存. 日本の希少淡水魚の現状と系統保存—よみがえれ日本産淡水魚—. 長田芳和・細谷和海編, pp. 218-227, 緑書房, 東京.

勝呂尚之・安藤 隆, 戸田久仁雄, 1998. 神奈川県希少淡水魚生息状況-I (平成 6-8 年度). 神奈川県水産総合研究所研究報告第 3 号, 51-61.

(新潟大学理学部)