

論文 Article

鳥取県東部のナガレホトケドジョウ集団におけるミトコンドリア DNA D-loop 領域の多型解析

林 耕介¹・小林朋道²

Analysis of polymorphisms at mtDNA D-loop region for Fluvial Eight-barbel Loach, *Lefua* sp., in eastern Tottori Prefecture, Honshu, Japan

Kosuke HAYASHI¹ and Tomomichi KOBAYASHI²

要旨: 鳥取県内2カ所から採集されたナガレホトケドジョウ計6個体について、ミトコンドリア DNA の D-loop 領域の塩基配列を決定した。既知のデータを含めて塩基配列のアライメントを行い、新たに2つのハプロタイプを確認した。また、これらをもとに解析を行った結果、鳥取・岡山集団は遺伝的に他地域とは異なる独立した集団であると考えられた。鳥取県内の集団と岡山県内の集団の比較では、鳥取県内の集団は遺伝的な分化傾向が低く、一斉放散型のパターンを示したのに対し、岡山県内集団は、連続的なハプロタイプ分布がほとんど見られず、各地域で分化が進んでいる可能性が示唆された。

キーワード: ナガレホトケドジョウ, ミトコンドリア DNA, 絶滅危惧種

Summary: Six individuals of Fluvial Eight-barbel Loach, *Lefua* sp., collected from two populations in Tottori Prefecture, were genetically examined and the DNA sequences of mitochondrial DNA D-loop region were obtained. Two haplotypes were newly recognized after the alignment with the data reported in previous studies. The result suggested that the Tottori and Okayama populations of *L.sp* were endemic and genetically different from conspecific populations from other areas.

The genetic differentiations of the Tottori populations were considered to be low and the diffusional pattern was indicated, while haplotypes found in Okayama were discontinuous one another, suggesting longer period of isolation between populations.

Keywords: Fluvial Eight-barbel Loach, mitochondrial DNA, endangered species

ナガレホトケドジョウ (*Lefua* sp.) は、和歌山県から岡山県および徳島県から愛媛県にかけての瀬戸内海に流入する河川、福井県から鳥取県にかけての日本海に流入する河川、愛知県および静岡県の太平洋に流入する河川に分布している(細谷 2003, 原 2003, 小林 2008, 林 2008)。本種は、環境省レッドリスト(2007)では絶滅危惧 IB 類(EN)に、それぞれの生息地における府県版レッドリストでは準絶滅危惧種または絶滅危惧種に指定される希少種である。

本種の集団遺伝学的な研究は、Sakai *et al.*(2003), Mihara *et al.*(2005), Miyazaki *et al.* (2007) 等により報告

されており、本種には山陽-近畿地方集団、紀伊-四国地方集団、そして遺伝的に大きく異なる東海集団の3つのグループが存在していることが明らかにされている。

鳥取県の集団は日本海側における分布の最西端にあたり、本種の分布特性を考える上で非常に重要である。本調査では、鳥取県内に生息する集団の遺伝的特性を把握するため、今回新たに採集された個体についてミトコンドリア DNA の D-loop 領域の塩基配列を決定し、既存データとの比較を行った。

¹ 鳥取県立青谷高等学校 〒689-0595 鳥取市青谷町青谷 2912
Aoya High School, Aoya 2912, Aoya-cho, Tottori, 689-0595 Japan
E-mail: hayashi_ku@mailk.torikyo.ed.jp

² 鳥取環境大学環境情報学部環境マネジメント学科 〒689-1111 鳥取市若葉台北 1-1-1

Department of Environmental Management, Faculty of Environment and Information, Tottori University of Environmental Studies, Wakabadai-Kita 1-1-1, Tottori, 689-1111 Japan
E-mail: t-kobaya@kankyo-u.ac.jp

[受領 Received 30 November 2011 / 受理 Accepted 9 January 2012]

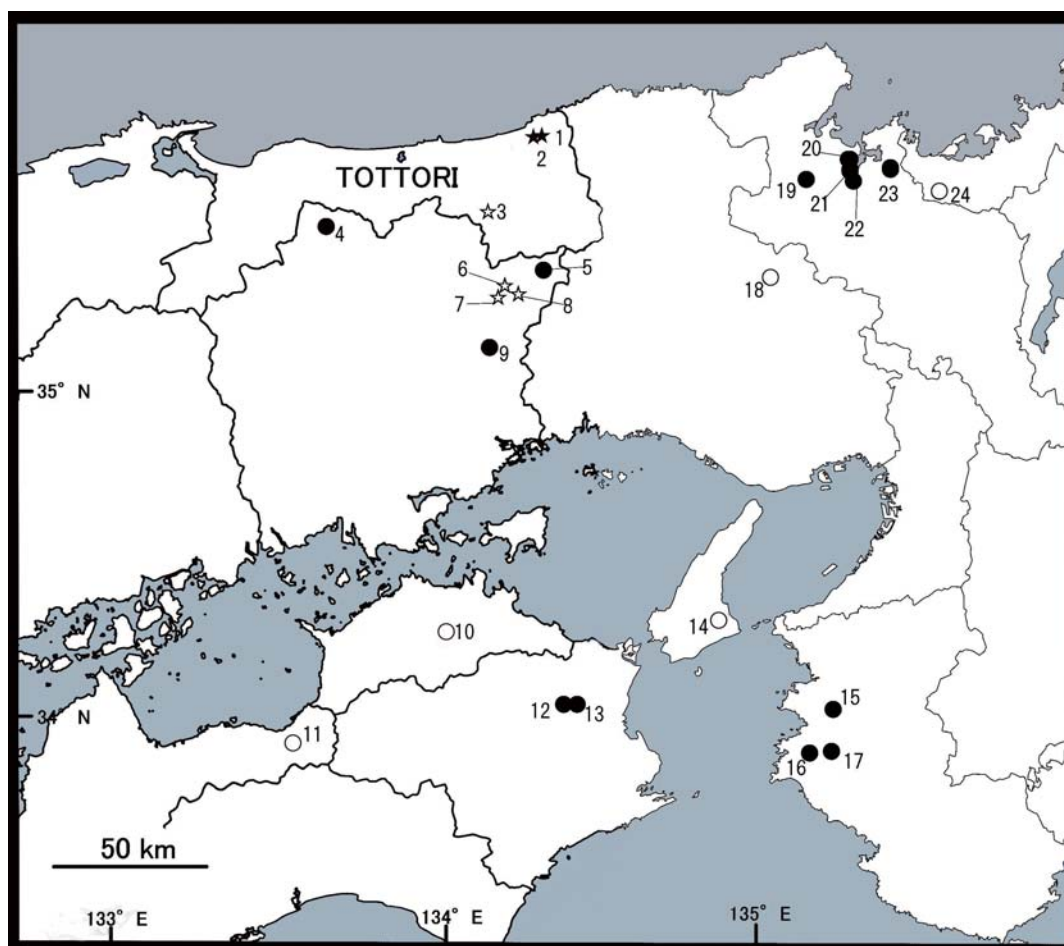


図1. 鳥取県とその周辺における各サンプルの採取地点（番号は表1と対応）。

表1. 解析に用いた試料の詳細リスト。

No.	記号	府県	地点名	水系	英字表記	個体数	Accession No.
1	★	鳥取	鳥取市覚寺	千代川水系摩尼川	MANIGAWA	3	登録予定
2	★	鳥取	鳥取市円護寺	千代川水系円護寺川	ENGOJI	3	登録予定
3	☆	鳥取	鳥取市用瀬町	千代川水系美成川	MOCHIGASE	6	AB468988-93
4	●	岡山	真庭市蒜山	旭川水系	HIRUZEN	1	AB177671
5	●	岡山	美作市江ノ原	吉井川水系吉野川	OHZORA	1	AB177669
6	☆	岡山	美作市右手	吉井川水系右手川	UTE-1	6	AB468994-99
7	☆	岡山	美作市右手	吉井川水系右手川	UTE-2	3	AB469000-02
8	☆	岡山	美作市東谷上	吉井川水系東谷川	HIGASHIDANI	2	AB469003-04
9	●	岡山	美作市大原	吉井川水系吉野川	OHARA	1	AB177670
10	○	香川	高松市塩江町	香東川水系	SHIONOE	1	AB177674
11	○	愛媛	伊予三島市	-	IYOMISHIMA	1	AB102820
12	●	徳島	-	-	MIYAME	1	AB177675
13	●	徳島	名東郡佐那河内村	吉野川水系園瀬川	SANAGOCHI	1	AB177676
14	○	兵庫	洲本市	洲本川水系	SUMOTO	1	AB102817
15	●	和歌山	有田郡有田川町	有田川水系	ARITA	1	AB177673
16	●	和歌山	日高郡日高町	-	HIDAKA	1	AB177672
17	●	和歌山	日高郡中津村	日高川水系日高川	NAKATSU	1	AB102819
18	○	兵庫	氷上郡春日町	-	KASUGA	1	AB102816
19	●	京都	福知山市大江町	由良川水系	OOE	1	AB177664
20	●	京都	舞鶴市青井	青井川水系青井川	AOI	1	AB177667
21	●	京都	-	-	KUMIDA	1	AB177666
22	●	京都	綾部市西方	由良川水系犀川	NISHIKATA	1	AB177668
23	●	京都	舞鶴市松尾	志楽川水系志楽川	MATSUO	1	AB177665
24	○	福井	遠敷郡名田庄村	南川水系南川	NATASHO	1	AB102818

★は本研究、☆は Kobayashi(2008)、○は Sakai *et al.*(2003)、●は Mihara *et al.*(2005) による。各試料の地点名および水系は、それぞれの記述より推定した。- は不明地点を示す。

調査方法

分析サンプル

本調査では、鳥取県東部の千代川水系摩尼川上流で採集された3個体と、同じく千代川水系円護寺川で採集された3個体の計6個体の分析を行った。また、データ解析の際は、Kobayashi(2008)の調査で分析を行った4地点(図1の☆で示した地点)17個体と、Sakai *et al.*(2003)による5地点(図1の○で示した地点)5個体、およびMihara *et al.*(2005)による13地点(図1の●で示した地点)13個体のナガレホトケドジョウ塩基配列データを引用した。各サンプルの採集地点を図1に、詳細リストを表1に示した。

分析およびデータ解析

現地にて採集された個体から尾鰭を幅2 mmほど切り取り、分析サンプルとした。サンプルからのDNAの抽出は、QIAGEN社製DNeasy Tissue Kitを用いて行った。得られた全DNAを鋳型としたPCRにより、ミトコンドリアDNAのD-loop領域全体を増幅し、その増幅したPCR産物を直接鋳型とするダイレクトシーケンス法により塩基配列の決定を行った。PCRおよびシーケンス用のプライマーセットはSakai *et al.*(2003)

で報告されたものを使用した。得られた6個体の塩基配列データは、これまでに報告された22地点35個体分の塩基配列データと合わせて解析を行った。塩基配列データは、CLUSTAL W(DDBJ版)でアライメント後、MEGA Ver4.によりKimura's two-parameter法による遺伝距離を求め、近隣結合法により分子系統樹を作成した。系統樹作成時には、本種と同属のホトケドジョウ(*Lefua echigonia*)の塩基配列データを外群として用いた。

調査結果

鳥取県内から採集されたナガレホトケドジョウ計6個体について、ミトコンドリアDNAのD-loop領域の塩基配列を決定した。得られた塩基配列の長さは、いずれも909 bpであった。Kobayashi(2008)による17個体分のデータを含めて塩基配列のアライメントを行った結果、既知のLsp01～Lsp06の6つのハプロタイプ以外に、新たにLsp07とLsp08の2つのハプロタイプが確認された(表2)。

鳥取市覚寺の摩尼川集団では、Lsp07の他、同じ千代川水系の鳥取市用瀬町美成川で検出されたLsp01が

表2. 各ハプロタイプの塩基変異箇所.

ハプロタイプ	塩基位置 (bp)															
	68	91	109	132	134	137	164	178	207	226	365	373	542	791	848	879
Lsp01	T	C	A	T	T	G	G	G	-	A	T	A	T	A	A	G
Lsp02	C	.	.	A
Lsp03	C	.	.	A
Lsp04	.	T	T
Lsp05	.	.	G	C	A	.	A	.	T	.	C	G	C	G	G	A
Lsp06	.	.	G	C	C	T	.	.	T	.	C	.	C	G	G	.
Lsp07	C
Lsp08	G	A

置換型	S	S	S	S	T	V	S	S	D	S	S	S	S	S	S	S
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

表はハプロタイプLsp01の塩基配列を基準とした場合の各ハプロタイプの塩基変異を示す。「・」はLsp01と同じであることを、英字は対応する塩基への置換を、「-」は塩基の欠損/挿入を示す。置換型は、Sが転移型、Vが転換型、Tは両方混在型、Dは欠損/挿入型を示す。

表3. ハプロタイプの分布.

No.	記号	県	地点名	Lsp01	Lsp02	Lsp03	Lsp04	Lsp05	Lsp06	Lsp07	Lsp08	個体数
1	★	鳥取	鳥取市覚寺	2						1		3
2	★	鳥取	鳥取市円護寺								3	3
3	☆	鳥取	鳥取市用瀬町	2	3	1						6
6	☆	岡山	美作市右手						6			6
7	☆	岡山	美作市右手				1	2				3
8	☆	岡山	美作市東谷上							2		2
				4	3	1	1	8	2	1	3	23

地点番号と記号は図1と対応。表中の数字は個体数を示す。

データが充実することなどで、本種の西日本での分布形成に関する信頼性の高い情報が得られると考えられる。

鳥取県内の集団と岡山県内の集団を比較してみると、鳥取県内で見つかった5つのハプロタイプは互いに3塩基以内での置換であり、岡山県内でのハプロタイプの分散パターンに比べて遺伝的な分化傾向が低く、Lsp01を中心とした一斉放散型のパターンを示した。一方で岡山県内集団は、連続的なハプロタイプ分布がほとんど見られず、各地域での分化が進んでいる可能性が示唆された。

また、直線距離にして50 km以上離れている美成川集団と摩尼川集団で、共通のハプロタイプが認められたことや、Lsp01と1塩基置換で岡山県美作市のLsp04が見られることから、過去には支川間、または県境を超えた河川間で個体の交流があったことが予想される。

本調査が実施された摩尼川、円護寺川ともに調査地点のすぐ下流には砂防堤や砂防ダムができており、本種が支流間を行き来することはもはや不可能である。本種の生息地は河川上流部の非常に狭い範囲に限定されるため、その存在に気づかないまま絶滅してしまう集団は決して少なくないと考えられる。今後、本種の保全策を検討する際には、人為的な原因による集団の縮小化や孤立化を極力回避するための配慮がなされることが望まれる。

引用文献

- 原 竜也 (2003) 鳥取県におけるナガレホトケドジョウの初記録. 山陰自然史研究, 1: 10-12.
- 林 耕介 (2008) 鳥取県東部で新たに確認されたナガレホトケドジョウの生息地. 山陰自然史研究, 4: 9-11.
- 細谷和海 (2003) ナガレホトケドジョウ. pp.108-109. In: 環境省野生生物課 (編) 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 4. 汽水・淡水魚類. 自然環境研究センター, 230 pp.
- Kobayashi, T. (2008) Genetic characteristics of local populations of the fluvial eight-barbel loach, *Lefua* sp., in Tottori and Okayama prefectures. *Natural Environmental Science Research* 21:37-42.
- 小林朋道 (2008) 鳥取・岡山両県のナガレホトケドジョウにおける生息環境・餌・体長の状況. 山陰自然史研究, 4: 5-8.
- Mihara, M., Sakai, T., Nakao, K., Martins, L.O., Hosoya, K. and Miyazaki, J. (2005) Phylogeography of loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zoological Science* 22: 157-168.
- Miyazaki, J-I., Nakao, K., Mihara, M., Sakai, T., Gunji, Y., Tojo, K., Muraoka, K. and Hosoya, K. (2007) Incongruence between mtDNA phylogeny and morphological and ecological characters in loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes). *Zoological Science* 24(7):666-675.
- Sakai, T., Mihara, M., Shitara, H., Yonekawa, H., Hosoya, K. and Miyazaki, J. (2003) Phylogenetic relationships and intraspecific variations of loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes). *Zoological Science* 20: 501-514.