

ミトコンドリアゲノム調節領域における 高知県産アラレガコの新種の遺伝的多様性

石黒 直哉・奥村祐理哉・水野 剛志

Genetic variation of the fourspine sculpin, *Cottus kazika* in Kochi Prefecture based on mitochondrial control region sequences

Naoya ISHIGURO・Yuriya OKUMURA・Tsuyoshi MIZUNO

Abstract: The mitochondrial DNA sequence for the control region was determined for 49 *Cottus kazika* individuals collected at two rivers in Kochi Prefecture. Only two haplotypes, including one polymorphic site without insertion and deletion, were detected in Monobe River population. The haplotype and nucleotide diversities in Monobe River were 0.389 and 0.0006, respectively. In contrast, no sequence variations were found in Aki River population. No significant population subdivision was detected among the sample locations based on the Φ_{ST} value. These results indicate that there is no genetic differentiation between two rivers and low genetic variations.

Keywords: genetic variation, fourspine sculpin, *Cottus kazika*, mitochondria, control region

1. 序論

アラレガコとは福井県特有の呼び名であり、学名を *Cottus kazika*、標準和名をカマキリという。カサゴ目カジカ科カジカ属に分類され、普段は淡水で過ごしているが、産卵期に河口まで下って卵を産む降河回遊型の生活史をもつ日本固有種である。本州は太平洋側の神奈川県相模川以南および日本海側の秋田県雄物川以南、四国は太平洋側、九州は宮崎県および佐賀県の河川に生息している¹⁾。11月頃から河口付近へ降河し始め、1月から3月の間に産卵をする。産卵した卵は粘着卵であり、海底の転石に付着した状態でみつかることが多く、雄が卵を管理している光景がみられる。また、4月から6月になると、孵化し成長した稚魚はこの親と共に川を遡上していく²⁾。

近年、アラレガコは、その個体数の減少などから、福井県や全国各地で「県域絶滅危惧種Ⅱ類(VU)」に選定されている。また、2007年の8月には環境省のレッドリストにおける「絶滅危惧種Ⅱ類(VU)」とされた³⁾。このような個体数が減少した集団は遺伝的多様性が低下していることが多い。環境変動などにより個体数がある程度減少し、生息地の消失や環境汚染、外来種などに

* 環境生命化学科 ** 環境・生命未来工学科元学生 *** 応用理化学専攻学生

よって集団が孤立することにより、近親交配や遺伝的多様性が消失してしまう。近親交配が進むと、繁殖能力や生存率の低下がみられる。また、遺伝的多様性が低下すると、環境変化に対する適応力が低下し、生存能力の安定性を失ってしまう。これにより、さらに個体数が減少するという絶滅の渦と呼ばれる悪循環が生じる⁴⁾。遺伝的多様性は、集団内の個体変異と集団間の遺伝的分化の 2 つの側面を含んでおり、長期および短期の変異を遂げている。遺伝的多様性の保全は、現存する遺伝資源を利用し保全するということにとどまらず、現存する集団が将来さらに進化、発展してゆく可能性をも含んでいるという点で重要な基盤となっているといえる⁵⁾。このような希少魚の保護・管理には、自然の生息地の保全と復元とともに、実施単位とすべき遺伝的に独立した個体群を識別し、個体群の絶滅確率を左右する遺伝的多様性を把握しておくことが必要であるため⁶⁾、対象となる個体群の内部や個体群間の遺伝的差異の理解が不可欠である⁷⁾。

本研究室では、福井県産のアラレガコの遺伝的多様性の現状を把握することを目的とした研究を進めている。昨年、本研究室において、福井県内の九頭竜川と耳川のアラレガコを対象とし、ミトコンドリアゲノム NADH 脱水素酵素サブユニット 4 (ND4) 遺伝子領域後半から tRNA^{Leu} 遺伝子までの領域の塩基配列を用いて遺伝的調査を行った結果、両河川とも遺伝的多様性の低いことが示唆された⁸⁾。アラレガコには、降河回遊型で産卵場所が河口付近であること、卵が粘着卵で岩に付着するため浮遊しないということ、さらには直達発生であるという特性がある。これらの要因により、アラレガコは、仔稚魚期において海流に影響されにくく、河口部の離れた別の河川を遡上する可能性が極めて低いと考えられる。よって、両河川間との間に遺伝的交流があるとは考えにくい。よって、進化速度がきわめて遅いことが示唆され、ミトコンドリアゲノムの中で最も進化速度が早いとされる調節領域での解析をする必要性がでてきた。

だが、調節領域の解析を進めても、対象を福井県のアラレガコのみとしているかぎり、アラレガコ普遍の特性であるかどうかは断定できない。そこで、太平洋側の高知県のアラレガコの遺伝的調査を行うこととした。これにより、福井県のアラレガコの現状を知ることでもでき、遺伝的多様性の現状をより明確にできる。アラレガコの遺伝的調査は過去にあまり例がなく、高知県のアラレガコを対象としたアイソザイム分析だけである。高知県内の 5 河川の調査の結果、仁淀川と他の 4 河川間で遺伝的分化が確認された⁹⁾。仁淀川はここで調査された 5 河川の真ん中に位置し、この河川と東西に位置する河川の間で遺伝的分化がみられたことから、さらに詳細に調査することにより他の河川間でも分化がみられるのではないかとこの論文で述べられている。高知県のアラレガコのミトコンドリアゲノム調節領域を解析した結果、福井県のアラレガコではみられなかった河川間での分化がみられた場合、福井県のアラレガコが特異であるということになる。高知県のアラレガコでも同じように多様性が低く河川間での分化がみられないようであれば、アラレガコのミトコンドリアゲノムの極めて遅い進化速度が浮き彫りになる。このような理由から、高知県のアラレガコを研究対象とすることとした。また、過去のアイソザイム分析の結果と今回の研究結果を比較することで、高知県のアラレガコの現状を把握できるだけでなく、アラレガコの遺伝的多様性を調べるためのマーカーとしてミトコンドリアゲノムの調節領域が有効であるか

どうか検討することも可能である。

2. 材料と方法

2-1 サンプル

DNA 解析に用いたアラレガコは、2008 年に高知県の物部川 (n=28)、安芸川 (n=21) で採集されたものである (Fig. 1)。アラレガコは絶滅危惧種であるため個体数の減少などを考慮して、全ての魚体の第二背鰭後半部の一部を採取した後、川に再放流した。鰭組織片は、直ちに 100%エタノール中にて固定され、-20℃で保存した。DNA 抽出には Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega 社製) を使用した。

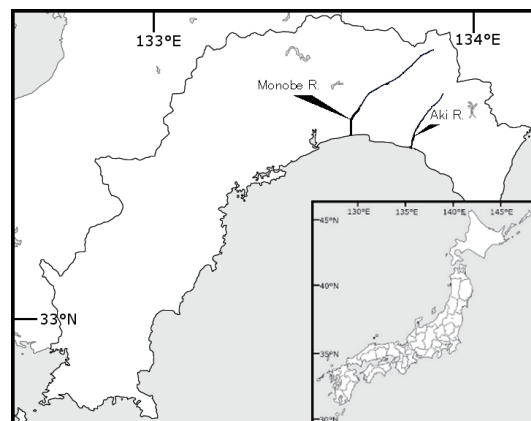


Fig. 1 Sampling location of the fourspine sculpin, *Cottus kazika*.

2-2 PCR による目的領域の増幅

アラレガコ特異的に作製したプライマー GacoCRL (5'-GGA GAT TCT AAC TCC TAC CC-3') と GacoCRH (5'-TAA GCT TCT CGA GGT TGT CC-3') を用いて、ミトコンドリアゲノムの調節領域の約 750-bp を増幅した。PCR 反応は MyCycler サーマルサイクラー (BIO-RAD)、PC-320 および PC-707 (ASTEC) を用いて行った。反応溶液は、10xPCR Buffer 1μl、dNTP0.8μl、2つのプライマーを各 0.5μl、EX-*Taq* polymerase (TaKaRa) 0.05μl、鋳型 DNA1μl に滅菌蒸留水を加え全量を 10μl にした。プレヒートを 95℃で 2 分間した後、熱変性 94℃ 20 秒、アニーリング 60℃ 20 秒、伸長反応 72℃ 50 秒を 1 サイクルとし 40 回繰り返し、最後に伸長反応を 72℃で 2 分間行った。2%アガロースゲルを用いて 100V 30 分間の電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線照射によって目的領域の増幅の確認をした。

2-3 塩基配列の決定

PCR 反応後、ExoSAP-IT® (USB) を用いて反応液から余剰の dNTP およびプライマーを除去した後、Big Dye Terminator v3.1 cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて Dye terminator 法を行った。反応液は、PCR 産物 1~2μl、プライマー0.7μl、Premix0.7μl に滅菌蒸留水を加え全量を 5μl にした。反応条件はプロトコルに従った。エタノール沈殿法により精製後、反応産物を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) あるいは ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて泳動し、塩基配列の決定を行った。Edit View ver.1.0.1 (Applied Biosystems) と Auto Assembler ver. 2.1 (Applied Biosystems) および DNASIS ver 3.7 (Hitachi Software Engineering) を用いて、得られた塩基配列の編集と解析を行った。

2-4 集団遺伝学的解析

コンピュータソフト Arlequin ver. 3.01¹⁰⁾を用いて、採集地点内の遺伝的変異性の指標であるハプロタイプ多様度 (h) ならびに塩基多様度 (π)¹¹⁾、採集地点間の遺伝的分化の程度を推定するために Φ_{st} 値¹²⁾を算出し、有意性の検定を行った(10000回の繰り返しによる無作為化検定)。最節約ネットワーク樹の構築には、NETWORK ver. 4.5 (Fluxus Technology Ltd, 2005) を使用した。

3. 結果

物部川で採集されたアラレガコ 28 個体のミトコンドリアゲノム調節領域 740-bp の塩基配列を決定したところ、この領域において挿入または欠失による塩基配列長の多型はなかった。変異サイトは 1 か所確認され、これによって 28 個体は 2 つのハプロタイプに分けられた (Table 1)。ハプロタイプ多様度は 0.389、塩基多様度は 0.0006 であった。

安芸川で採集されたアラレガコ 21 個体のミトコンドリアゲノム調節領域 740-bp の塩基配列を決定したところ、この領域において挿入・欠失を含め変異サイトは確認されなかった (Table 1)。安芸川のアラレガコから得られたハプロタイプは、物部川の 21 個体から得られたハプロタイプと同一であった (Fig. 2; Table 1)。

両河川集団間の遺伝的分化の程度を検定するために固定指数を算出した結果、 $F_{ST}=0.0145$ となり、有意差は認められなかった。これにより、物部川と安芸川の間に遺伝的分化がみられないという結果が得られた。

4. 考察

物部川と安芸川のそれぞれ 21 個体、合計 42 個体は同一のハプロタイプであった。また、そのハプロタイプは、福井県のアラレガコで最も多く観察されたものと同一だった (石黒; 未発表)。そこで同じ領域を解析した両側回遊魚であるアユ (*Plecoglossus altivelis*) の遺伝的多様性と比較した。アユのハプロタイプ多様度は 0.991~1.000、塩基多様度が 0.0259~0.0327 と高い数値を示している¹³⁾。アユの結果と比較すると両河川のアラレガコの遺伝的多様性の低さが明らかとなった。

Table 1 Nucleotide sequences and haplotype assignment of the mitochondrial control region.

Haplo-type	Variable Site	Sampling site		
	702	Monobe R.	Aki R.	Total
1	T	21	21	42
2	C	7		7
Total		28	21	49

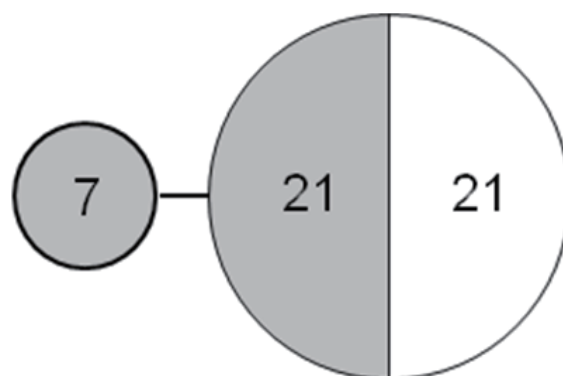


Fig. 2 Minimum spanning network based variation between mitochondrial control region on haplotype sequences of *Cottus kazika*. Numerals in circles denote number of individuals with the haplotypes. Gray and white sectors indicate individuals in Monobe and Aki River, respectively.

ミトコンドリアゲノムの結果とアイソザイム分析の結果を比較した。今回の結果の両河川間の遺伝的分化が確認できなかったという結果は、アイソザイム分析の結果と一致するものだった。しかし、アイソザイム分析の結果では物部川、安芸川の両河川とも集団内に遺伝的変異が確認されていたが、ミトコンドリアゲノム調節領域で遺伝的変異が確認できたのは物部川だけであった。また、高知県のアイソザイム分析の結果では、高知県5河川のうち仁淀川と他の河川間の遺伝的分化が確認されている。仁淀川と物部川の河口間の距離は約12km離れている。物部川と安芸川では約20kmも離れているが、今回の結果からは、両河川間の遺伝的分化は確認できなかった。これらのことから、ミトコンドリアゲノム調節領域の解像度が低いことが示唆される。しかしながら、調節領域はミトコンドリアゲノムの中で最も進化速度の早い領域とされているため、核ゲノムのマイクロサテライト遺伝子座の解析を行う必要があると考えられる。アラレガコの海での移動距離は当初考えられていたよりも大きく、河口域から5km程度は移動することがわかってきたが^{16) 17)}、今回解析に用いた河川間の距離はこれよりも大きく、より高感度のマーカーであるマイクロサテライト遺伝子座を用いることにより両河川間の遺伝的分化を検出できる可能性がある。今後は、仁淀川のアラレガコを入手し、解析を行う必要がある。

6. 引用文献

- 1) 環境庁. 1988. 第3回自然環境保全基礎調査, 動植物分布調査報告書, 淡水魚類. 1-280.
- 2) 武田英夫. 2006. アラレガコの生息について. 平成18年度近畿地方整備局研究発表会論文集
- 3) 環境省自然環境局野生生物課. 2007. 汽水・淡水魚類のレッドリスト. 環境省.
- 4) Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2007. 保全遺伝学入門. 文一総合出版. 東京.
- 5) 谷口順彦. 2007. 魚類集団の遺伝的多様性の保全と利用に関する研究. 日本水産学会誌, 73: 408-420.
- 6) 鷺谷いづみ・矢原徹一. 1996. 保全生態学入門, 遺伝子から景観まで. 文一総合出版, 東京. 270pp.
- 7) Ward, R. D. 2002. Genetics of fish population. pp. 200-224. in P. J. B. Hart and J. D. Reynolds, eds. *Hardbook of fish biology and fisheries*, Vol. 1. Blackwell, Oxford.
- 8) 石黒直哉. 2008. ミトコンドリアゲノム ND4 遺伝子領域における福井県産アラレガコの遺伝的多様性. 福井工業大学研究紀要, 38: 263-268.
- 9) 上野幸徳, 西山 勝, 佐伯 昭. アユカケ増養殖技術開発試験. 高知県内水面漁業センター平成8年度事業報告書, 高知. 1988 ; 74-93.
- 10) Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider, 2005. ARLEQUIN ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- 11) Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- 12) Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- 13) 武島弘彦・石黒直哉・中谷将典・佐藤行人・宮崎亜紀子・西田 睦. 2005. 遺伝的分析による主要水産生物

の集団遺伝構造解析：ミトコンドリア DNA 分析によるムシガレイ (*Eopsetta grigorjewi*) の集団構造解析. 平成 16 年度国際資源調査等推進対策事業日本近海シェアードストック管理調査委託事業報告書, pp. 64-78, 水産庁.

- 14) Kumazawa, Y. and M. Nishida. 1993. Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes and deep-branch animal phylogenetics. *J. Mol. Evol.*, 37: 380-398.
- 15) Takeshima, H., K. Iguchi., M. Nishida. 2005. Unexpected Ceiling of Genetic Differentiation in the Control Region of the Mitochondrial DNA between Different subspecies of Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Zool. Sci.*, 22: 401-410.
- 16) 原田慈雄・木下 泉・大美博昭・田中 克. 1999. 由良川河口域周辺におけるカマキリ *Cottus kazika* 仔稚魚の分布および移動. 魚類学雑誌, 46: 91-99.
- 17) 三輪一翔・原田慈雄・中山耕至. 2008. 和歌山県古座川河口域周辺におけるカマキリ及びウツセミカジカ (カジカ小卵型) 仔稚魚の分布. 日本魚類学会年会講演要旨. 36

(平成 22 年 3 月 31 日受理)