

# 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

石 黒 直 哉

## Genetic variation of *Cottus kazika* in Fukui Prefecture based on mitochondrial ND4 gene sequences

Naoya ISHIGURO

Abstract: The mitochondrial DNA sequence for the ND4-tRNA<sup>Leu</sup> region was determined for 57 *Cottus kazika* individuals collected at two sample localities. Only four haplotypes, including four polymorphic sites without insertion and deletion, were detected, of which most dominant haplotype were shared between two localities. The nucleotide and haplotype diversities at Kuzuryu River and Mimi River were 0.0009 and 0.0001, 0.437 and 0.077, respectively. No significant population subdivision was detected among the sample localities based on the  $\Phi_{ST}$  value and the analysis of the molecular variance model (AMOVA). These results indicate that there is no genetic differentiation between two rivers and low genetic variations. Furthermore, the fact that there is a little genetic exchange because this species is direct developmental type, supports slow rate of evolution.

### 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。本州太平洋側では神奈川県相模川以南、日本海側では秋田県雄物川以南、四国、九州の河川に生息している<sup>1)</sup>。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けることが多く、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<sup>2)</sup>。

福井県九頭竜川のアラレガコは、他地域と比較して極めて大きく成長する。このため、産卵のために降河する11月から1月に「網戸漁」や「エバ漁」といった伝統的漁法で漁獲され、この地域の特産魚であった<sup>3)</sup>。1935年には大野市阪谷橋から福井市中角橋の間の生息域が天然記念物に指定され保護が図られてきたが、近年、九頭竜川における生息数は激減し絶滅が危惧される状況にある。漁獲量の

\* 環境・生命未来工学科

推移をみると、昭和 30 年前後には年間 7000 匹以上獲れていたものが、近年は年間 100 匹以下と大幅に減少している<sup>2)</sup>。この漁獲量減少の原因の 1 つとして、九頭竜川の鳴鹿堰堤の魚道の問題が挙げられている。これは、アラレガコ泳力がアユなどのように優れているわけでもなく、ハゼ類のように吸盤状になった胸鰭を持っているわけでもないため一般の魚の遡上を考慮して作られた段階式魚道といった段差ですら遡上を阻害されてしまい、生息域が狭まり、成長や繁殖の妨げになったのではないかと考えられているからである。また、他の原因として、戦後、急激な河川改修工事を行ったため、生息する環境に急激な変化が与えられ、生活する場を失ってしまったことや、アラレガコの漁獲量を増やすために「網戸漁」の箇所を増やして行ったため、個体数が減ってしまったなどが考えられている。しかし、このような問題は現在では解消されているにもかかわらず、未だに九頭竜川のアラレガコの生息数が増えているという報告はされていない。

アラレガコは、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。このような個体数の減少した集団は遺伝的多様性のレベルが低下していることが多いため環境の変化に対応する能力が低下し、集団が存続できなくなる危険性を高めることになる。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<sup>4)</sup>、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<sup>5)</sup>。

そこで、本研究では、福井県産アラレガコの遺伝的多様性と集団構造の現状を把握することを目的とした。集団構造解析には、ミトコンドリアゲノムの非コード領域である調節領域が用いられることが多い。しかしながら、調節領域は場合によっては特異な変異パターンをもつことがあり、集団間ならびに近縁種間の遺伝的差異の程度を必ずしも正確に反映しないことが知られているため<sup>6)7)</sup>、本研究では調節領域よりもやや変異性が低いことが知られているコード領域の NADH 脱水素酵素サブユニット 4(ND4)遺伝子領域後半から tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子までの領域を分析対象とした。

## 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、2006 年に福井県嶺北の九頭竜川 (n=31)、嶺南の耳川 (n=26) で採集されたものである (Fig. 1)。採集された個体は、背鰭の一部を切除後、最放流された。鰭組織片は、直ちに 100%エタノール中にて固定された。DNA の抽出は、Aqua Pure Genomic DNA Isolation kit (BIO-RAD)を用いて行われた。

## 2-2 PCR による目的領域の増幅

ミトコンドリアゲノムの ND4 遺伝子領域から tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子領域の約 550-bp を増幅するため、重鎖 (H 鎖) 側のプライマーとして ND4 遺伝子領域の中央部に位置する L11778m (5'-AAC TAC GAA CGT ATT CAC AGY CG-3')<sup>6)</sup> と、軽鎖 (L 鎖) 側のプライマーとして tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子領域上に位置する H12315 (5'-CTT TTA CTT GGA GTT GCA CC-3')<sup>8)</sup> を用いた。PCR 反応は MyCycler サーマルサイクラー

(BIO-RAD) を用いて行った。反応溶液は、10xPCR Buffer 1  $\mu$ l、dNTP0.8  $\mu$ l、

2 つのプライマーを各 0.5  $\mu$ l、EX-*Taq* polymerase (TaKaRa) 0.05  $\mu$ l、鋳型 DNA 1  $\mu$ l に滅菌蒸留水を加え全量を 10  $\mu$ l にした。プレヒートを 95°C で 2 分間した後、熱変性 94°C 20 秒、アニーリング 55°C~57°C 20 秒、伸長反応 72°C 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°C 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。

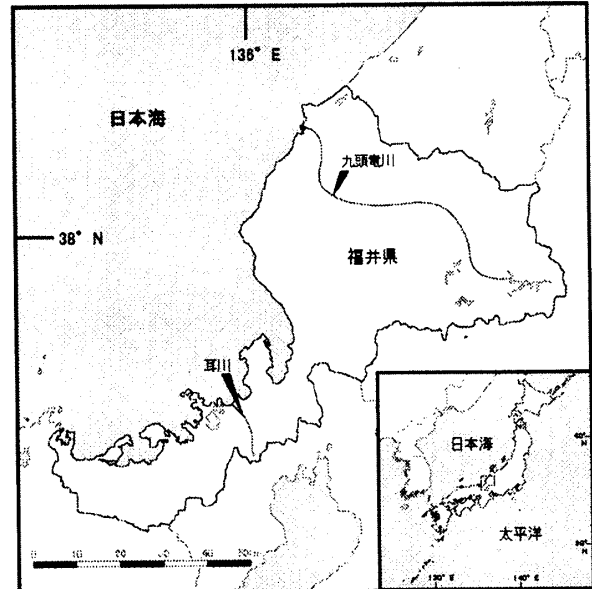


Fig. 1. Sampling localities of the fourspine sculpin, *Cottus kazika*.

## 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 産物を 1~2  $\mu$ l、プライマーを 0.7  $\mu$ l、Premix を 0.7  $\mu$ l、滅菌蒸留水を 1.6~2.6  $\mu$ l 加えて全量を 5  $\mu$ l とした。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

採集地点内の遺伝的変異性の指標として、ハプロタイプ多様度 ( $h$ ) ならびに塩基多様度 ( $\pi$ )<sup>9)</sup> を求めた。最節約ネットワーク構築には TCS ver. 1.21<sup>10)</sup> を使用した。採集地点間の遺伝的分化の程度を推定するために、コンピュータソフト Arlequin ver. 2.0<sup>11)</sup> を用いて、階層的分子分散分析 (Analysis of molecular

variance; AMOVA)<sup>12)</sup>を行なった。さらに、採集地点間の  $\Phi_{st}$  値<sup>12)</sup>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)。

### 3. 結果

#### 3-1 九頭竜川の ND4 遺伝子領域から tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子領域における変異性

ND4 遺伝子領域の一部(359bp)、そして tRNA<sup>His</sup>(68bp)と tRNA<sup>Ser</sup>(67bp)と tRNA<sup>Leu</sup>の一部(58bp)を含む 552bp の塩基配列を決定した。これら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。九頭竜川のアラレガコ 31 個体から 4 種類のハプロタイプが見出された。それらのハプロタイプは 3 ヶ所の塩基配列によって区別され (変異率 0.54%)、その全てがトランジション型塩基置換であった (Table 1)。ハプロタイプ間の塩基置換数は 1 つ (塩基置換差異 0.18%) であった。ND4 遺伝子領域の変異は、サードコドンポジションで 1 つ、ファーストコドンポジションで 1 つ確認された (Table 1)。このファーストコドンポジションの変異によってスレオニンからアラニンへのアミノ酸置換が起こっていた。tRNA<sup>Ser</sup> 遺伝子領域では、1 つの変異がみられた (Table 1)。ハプロタイプ多様度 ( $h$ ) は 0.437、塩基多様度 ( $\pi$ ) は 0.0009 であった。

#### 3-2 耳川の ND4 遺伝子領域から tRNA<sup>Leu</sup> における変異性

耳川においても九頭竜川と同塩基配列を決定した。九頭竜川と同様に挿入や欠失はなかった。耳川のアラレガコ 26 個体から 2 種類のハプロタイプが見出された。それらのハプロタイプは 1 ヶ所のトランジション型塩基置換によって区別された (変異率・塩基置換差異 : 0.18%) (Table 1)。この置換によりスレオニンからアラニンへのアミノ酸置換が起こっていた。ハプロタイプ多様度 ( $h$ ) は 0.077、塩基多様度 ( $\pi$ ) は 0.0001 であった。

Table 1. Nucleotide sequences and haplotype assignment of the ND4-tRNA<sup>Ser</sup> gene region.

		Nucleotide position <sup>a</sup>				
		ND4		tRNA <sup>Ser</sup>		
		*	*			
Codon position	3	1	1	-	Number of individuals in each locality	
Haplotype	22	128	260	442	Kuzuryu R.	Mimi R.
1	A	A	A	T	23	25
2	.	.	G	.	4	
3	G	.	.	.	3	
4	.	.	.	C	1	
5	.	G	.	.		1

<sup>a</sup>Listed are four variable sites numbered from the middle of the ND4 gene to the tRNA<sup>Ser</sup> gene through the tRNA<sup>His</sup> gene. Dots indicate identity to the first haplotype sequence. Asterisks denote non-synonymous substitution.

### 3-3 九頭竜川と耳川の塩基配列の比較

九頭竜川のアラレガコ 31 個体と耳川のアラレガコ 26 個体、計 57 個体の ND4 遺伝子領域から tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子領域の 552bp を比較した。57 個体に対して 5 つのハプロタイプが認められ、変異サイトは 552bp 中 4 箇所で見られた。57 個体中 48 個体（九頭竜川 23 個体、耳川 25 個体）が同一ハプロタイプであった。九頭竜川と耳川のハプロタイプ間の関係は Fig.2 にネットワークとして記した。ミトコンドリア DNA の AMOVA 分析の結果、両河川間の  $\Phi_{ST}$  値は 0.018 であり、有意差は認められなかった ( $P < 0.05$ )。

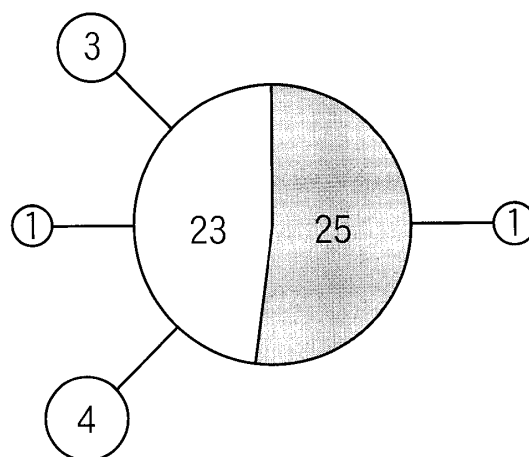


Fig. 2. Minimum spanning network based variation between ND4-tRNA<sup>Leu</sup> gene region on haplotype sequences of *Cottus kazika*. Numerals in circles denote number of individuals with the haplotypes. Gray and white sectors indicate individuals in Mimi and Kuzuryu River, respectively.

## 4. 考察

本研究で解析対象とした ND4 遺伝子領域後半から tRNA<sup>Leu</sup> 遺伝子までの領域において、九頭竜川と耳川の両河川のアラレガコの遺伝的多様性は極めて小さいことが明らかとなった (Table 1)。本研究と同じ遺伝子領域を解析した他魚種の遺伝的多様性と比較した。アラレガコと同じく通し回遊魚であるアユ（アユは両側回遊魚）では、3 河川の両側回遊型アユを 11~13 個体調べてそれぞれ 7 つのハプロタイプが検出されている<sup>6)</sup>。海産魚であるムシガレイでは、5 つの海域の集団で 30~50 個体程度調べ、11~18 のハプロタイプが検出されている<sup>7)</sup>。これらの結果と比較してもアラレガコの遺伝的多様性の低下が示唆され、「絶滅危惧種 II 類 (VU)」に指定された個体数の減少に伴う結果であると考えられる。また、九頭竜川と耳川のアラレガコの本遺伝子領域に遺伝的分化がみられなかった。アラレガコは河口付近に産卵するが、その卵は粘着卵であるため浮遊しない。また、直達発生であるため浮遊期を持たない。個体の移動に制限があるため、遺伝子流動は大きくないと考えられる。実際、高知県のアラレガコのアロザイム分析で各河川間に遺伝的分化が確認されている<sup>13)</sup>。これらのことから、アラレガコの本遺伝子領域の進化速度が遅いことが示唆された。

本研究では、福井県内の 2 河川のアラレガコの遺伝的多様性の現状を調べた。今後は、嶺南の北川や南川といった他の河川についても調べる予定である。また、様々な地理的距離に生息する集団と比較するために、同じ日本海側の島根県の集団や、和歌山や高知県といった太平洋側の集団を解析していく必要があると考えられる。また、より変異性が高く、高感度で検出できる核ゲノムにおけるマイクロサテライト遺伝子座の解析をしていく必要があると考えられる。

## 5. 謝辞

九頭竜川のアラレガコの新採集に関しては北陸環境科学研究所の岡智章研究員、水産大学校の竹下直彦准教授にご尽力賜りました。耳川のアラレガコに関しては福井県内水面総合センターの岩谷芳自博士に便宜を図っていただき、福井県立大学の田原大輔助教にご協力いただきました。実験の一部は東京大学海洋研究所の施設をお借りいたしました。西田睦所長に深く感謝いたします。

## 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) 田原大輔・岩谷芳自. 2007. カマキリ *Cottus kazika* 養成親魚の卵質評価指標と異常採卵の特徴. 73: 718-725.
- 4) 鷲谷いづみ・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.
- 5) Ward, R. D. 2002. Genetics of fish population. pp. 200-224. in P. J. B. Hart and J. D. Reynolds, eds. Handbook of fish biology and fisheries, Vol. 1. Blackwell, Oxford.
- 6) Takeshima, H., K. Iguchi, and M. Nishida. 2005. Unexpected ceiling of genetic differentiation in the control region of the mitochondrial DNA between different subspecies of the ayu *Plecoglossus altivelis*. Zool. Sci., 22: 401-410.
- 7) 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ドストック管理調査委託事業報告書, pp. 64-78, 水産庁.
- 8) Kumazawa, Y. and M. Nishida. 1993. Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes and deep-branch animal phylogenetics. J. Mol. Evol., 37: 380-398.
- 9) Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- 10) Clement, M., D. Posada and K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol. Ecol., 9: 1657-1660.
- 11) Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab., Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- 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) 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.

(平成 20 年 3 月 31 日受理)