

スイゲンゼニタナゴ *Rhodeus atremius suigenis* (Mori)

河村功一・三宅琢也

三重大学 大学院生物資源学研究所

(〒514-8507 三重県津市三重県津市栗真町屋町 1577, TEL 059-231-9549, e-mail: kawa-k@bio.mie-u.ac.jp)

緒言

スイゲンゼニタナゴ (*Rhodeus atremius suigenis*) は岡山平野を中心とする特定の水域にのみ限定的に生息するコイ目コイ科タナゴ亜科の一種である (河村, 2003)。本種は亜種であるカゼトゲタナゴ (*R. a. atremius*) と共に染色体数が $2n=46$ とタナゴ亜科において特異な核型を持つだけでなく (小島ほか, 1973)、系統発生的にも特化的な種である事が判っている (Okazaki et al., 2001)。この事からスイゲンゼニタナゴはタナゴ亜科の進化だけでなく、日本列島の成立を考える上でも貴重な種であると言える。しかしながら本種は近年の圃場整備、宅地開発等の影響により生息地、個体数共に著しく激減し、1999年には環境省により絶滅危惧 IA に、更に 2002年には国内希少野生動植物種に指定されている。こうした中で、スイゲンゼニタナゴの保護対策は急務の課題とされている (河村, 2003)。

昨年度は、長期の継代においてしばしば見られる骨格異常についてその出現様式を明らかにするため、継代個体と野外個体間での交配試験とマイクロサテライトマーカー (MS) を用いた集団解析を行った。その結果、1) 骨格異常の出現が必ずしも近交と関係したのではなく、小数の遺伝子座に支配されている可能性が高い、2) 正常個体との交配により改善可能である事を明らかとした。また、野外集団において最も遺伝的多様性が低い吉井川集団について、遺伝的多様性の改善に向けた対策の一步として、広範囲に渡る生息実態調査と集団解析を行った。その結果、遺伝的多様性の低さは局所的な現象ではなく、吉井川水域全体の特徴である可能性が高い事が示唆された。

本年度はこれまでに得られた知見を踏まえ、1) 既存飼育系統 (矢掛高校、総社東小学校) における遺伝的特性評価と遺伝的改善に向けた知見の収集、2) 遺伝的多様性の低い野外集団 (吉井川集団) における遺伝的改善に向けた知見の収集に加え、今年度新たに芦田川で発見された集団について、3) 野外集団の遺伝的特徴の解明を中心とする系統保存に向けた情報収集を行った。なお、本事業の実施に当たり、野外集団の採捕ならびに DNA 資料の採集については、事前に中国四国環境事務所の承諾を取ってある事を記しておく。

材料と方法

1) 既存飼育系統における遺伝的特性評価と遺伝的改善に向けた知見の収集

矢掛高校と総社東小学校ではそれぞれ高梁川と足守川の個体を用いて 2008 年から

系統保存を行っている（図1）。本課題では遺伝的劣化を生じない系統保存技術の確立に向けた知見の収集を目的として、両系統について遺伝的特性調査を行った。本年度は、矢掛高校においてこれまで追跡踏査を行ってきた1号池（分析個体数：11個体）に加え、平成22年に1号池の50個体を新たに移植する事により創設した2号池の個体（分析個体数：7個体）についても同様の調査分析を行った。また総社東小学校の保存系統については平成23年の親魚（分析個体数：9個体）と稚魚（分析個体数：17個体）について矢掛高校と同様の調査を行った。

分析方法としてはこれまで同様、MS7座とMHC class IIB遺伝子（Exon II領域）について平均ヘテロ接合度（ H_e :期待値； H_o :観察値）とアليلリッチネス（ A_r ）を求める事により行った（河村ら，2010）。これら遺伝的多様性のパラメーターの計算にはFSTAT 2.9.3.2（Goudet, 2001）を用いた。矢掛高校の系統についてはMSデータから血縁度（ r ）と有効集団サイズ（ N_e ）を推定した。血縁度はMicrosatellite Toolkit v3.1（Park, 2001）のallele sharing estimator（Blouin et al., 1996）により、有効集団サイズ（ N_e ）はNeEstimator v1.3（Peel et al., 2004）のTemporal法（Waples, 1989）によりそれぞれ推定した。

また、遺伝的ボトルネックの有無を見るため、Bottleneck ver 1.2.02（Piry et al., 1999）のWilcoxon's testとMode shift testによる検定を行い、Wilcoxon's testにおいてはTPM model（SMM 90%；multiple mutations 10%；variance 10）（Garza and Williamson, 2001）を用いた。なお、継代に伴う遺



図1 調査地点（括弧は飼育系統）

伝的特徴の変化を見るため、全ての系統についてPCA-GEN ver1.2（Goudet, 1999）による主成分分析も併せて行った。

2) 遺伝的多様性の低い野外集団における遺伝的改善に向けた知見の収集

昨年度の調査において吉井川は水系全体として遺伝的多様性が低い集団であることが明らかとなり、現在、岡山理科大学において吉井川集団の遺伝的改善のための知見収集を目的として飼育実験を行っている（河村・三宅 2011）。吉井川集団は遺伝的多様性が低いことに加え、昨年度の調査においては骨格異常個体が確認されるなど、近親交配が集団の適応度に与える影響が危惧されている。こうした事から、本年度は骨格異常個体の出現率を推定するため飼育個体を用いた繁殖実験を岡山理科大学にて行った。また、継代に伴う遺伝的特徴の変化を見るため、実験に用いた親魚と繁殖個体について、1)と同じくMS7座について多型解析を行った。

3) 野外集団の遺伝的特徴の解明を中心とする系統保存に向けた情報収集

芦田川はスイゲンゼニタナゴの分布の西限であると共に、最も絶滅が危惧されている生息地でもある。本年度は平成 21 年秋に新たに見つかった集団 B (分析個体数：29 個体) について、保全に向けた知見の収集として mtDNA、MS、MHC の 3 分子マーカーを用いた遺伝的特性調査を行った。mtDNA については河村・三宅 (2010) の方法に従い ND1 領域 (975bp) の配列決定を行い、Miyake et al. (2010) により報告されている既知のハプロタイプとの比較を行った。MS と MHC については 1) と同様の解析を行い、遺伝的多様性の程度と集団 A との遺伝的關係について調べた。また、遺伝的ボトルネックの有無を見るため、1) と同様に、ボトルネックテストを行った。なお、芦田川の集団 A (盈進高校の保存系統の起源) については、調査において採集された個体が仔魚 4 個体であったことから、分析は行わなかった。

結果

1) 既存飼育系統における遺伝的特性評価と遺伝的改善に向けた知見の収集

遺伝的多様性について見ると、矢掛高校の1号池 (F4) はMHCでアレルD3が観察されなかったものの、MSとMHCの何れの遺伝的多様性においても前年度との間に殆ど差は見られなかった (図2-3)。2号池はMSの遺伝的多様性において1号池よりも若干、低かったが、MHCにおいては1号池よりも高い結果となった。血縁度について見ると1号池は前年度よりも低い値を示したのに対し、2号池は1号池よりも約10%高い値を示した (図4)。主成分分析において1号池、2号池は共に高梁川集団の近傍に位置し、対立遺伝子組成に殆ど変化が無いことが明らかとなった (図5)。また、1号池において有効集団サイズは過去3年間とほぼ同じく6個体であった (表1)。遺伝的ボトルネックの有無について見ると、2号池の集団ではMode shift testにおいてボトルネックの存在が示唆された。

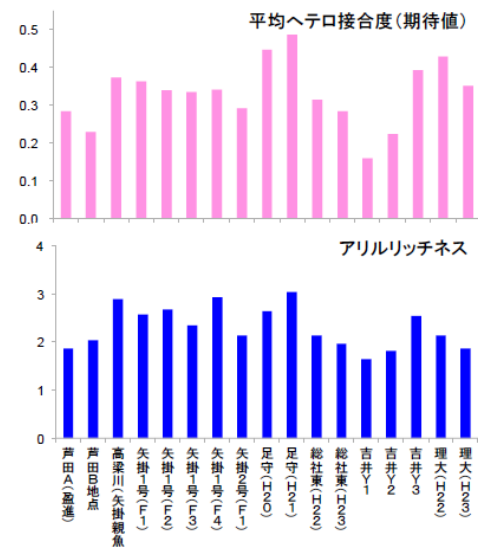


図2 MSから見たスイゲンゼニタナゴの遺伝的多様性

表1 矢掛高校の保存系統における有効集団サイズの変化

	N_e	信頼範囲
Founder (梁川) - 1号池 (F1)	6.2	1.8-39.0
1号池 (F1) - 1号池 (F2)	6.8	1.5-∞
1号池 (F2) - 1号池 (F3)	6.0	1.6-53.6
1号池 (F3) - 1号池 (F4)	7.2	1.9-119.1
1号池 (F3) - 2号池 (F1)	6.7	1.3-∞

Temporal法による推定 (aples, 09)

総社東小学校の保存系統について見ると、親魚 (H22) と稚魚 (H23) のMSの遺伝的多様性は共に足守川集団よりも約30%低い値を示したのに対し (図2)、MHCにおいては、ヘテロ接合度の何れにおいても足守川集団よりも高い値を示した。血縁度は親子共に足守川集団よりも約30%高い値を示し (図6)、主成分分析においては足守川集団との

間に顕著な遺伝的差異が認められた (図6)。なお、遺伝的ボトルネックの有無についてみると、親子共にMode shift testにおいて、ボトルネックの存在が示唆された。

2) 遺伝的多様性の低い野外集団における遺伝的改善に向けた知見の収集

繁殖試験において4個

体の稚魚が得られたが、いずれの個体においても骨格異常は認められなかった。MSの遺伝的多様性についてみると親集団 (H22) と子集団

(H23) は何れも母集団である吉井川 (Y3) に近い特徴を示し、遺伝的多様性の低下は見られなかった (図2)。また、主成分分析において何れの集団も吉井川集団の近傍に位置し、遺伝的特徴がほとんど変化していないことが判った。

3) 野外集団の遺伝的特徴の解明を中心とする系統保存に向けた情報収集

mtDNAの分析において、集団Bにおいては2つのハプロタイプ (S13, S14) が観察された (図7)。S1Sはスイゲンゼニタナゴにおいて広く見られるハプロタイプであったのに対し、S14は集団B固有であることがわかった (図78)。MSのアリル組成について見ると、ほぼ全ての座において集団Aに近い組成を示し、遺伝的多

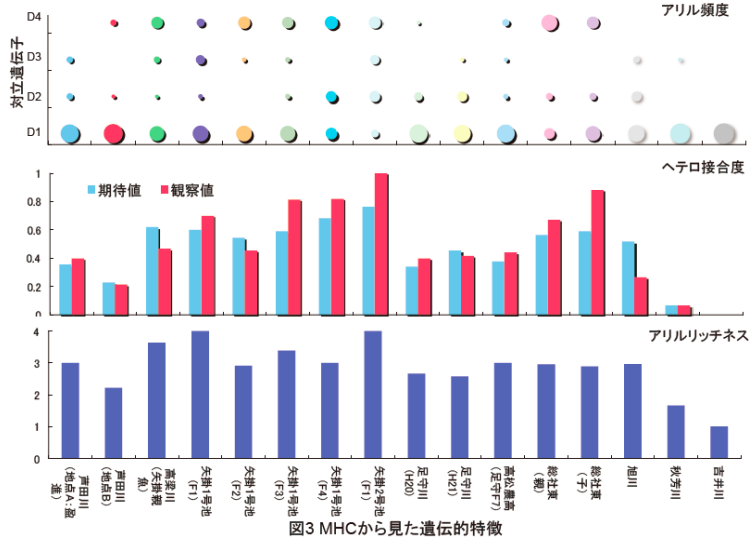


図3 MHCから見た遺伝的特徴

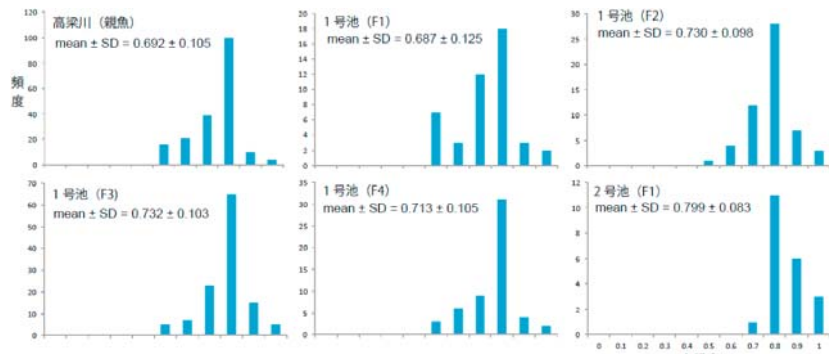


図4 矢掛高校飼育系統(高梁川産)における血縁度の変化

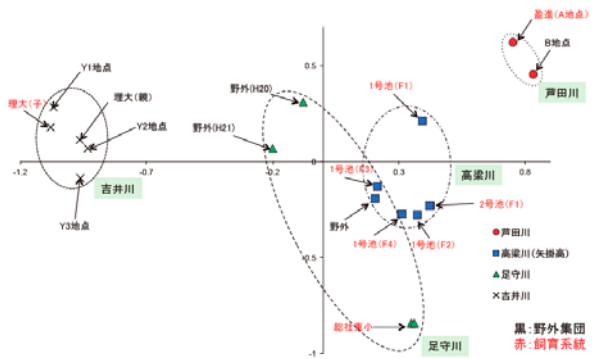


図5 MSデータを用いた主成分分析の結果(PCAGEN)

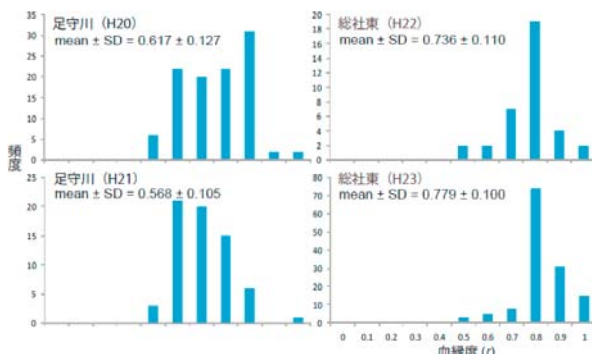


図6 総社東小学校の飼育系統(足守川水系)における血縁度

様性においても集団Aとほぼ同レベルであった（図2, 9）。MHCにおいてアレル組成は若干異なったが、遺伝的多様性においては集団Aとの間にほとんど違いは見られなかった（図3）。また、主成分分析においては、集団Aに遺伝的に最も近い事が明らかとなった（図6）。遺伝的ボトルネックの有無についてみるとMode shift testにおいてボトルネックの存在が示唆された。

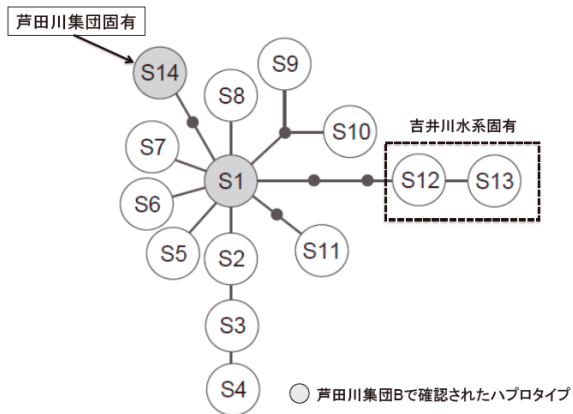


図7 mtDNA (ND1領域: 975bp) のハプロタイプネットワーク

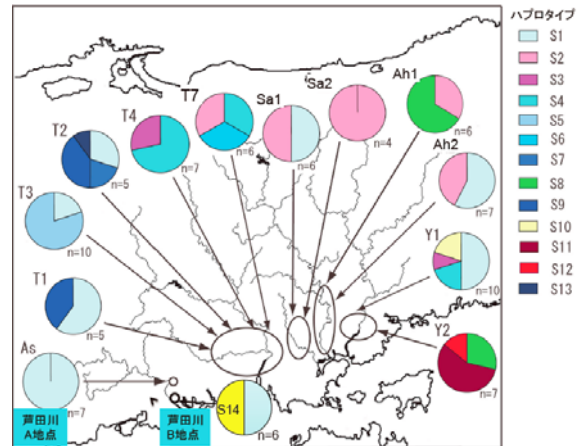


図8 mtDNAのハプロタイプ分布

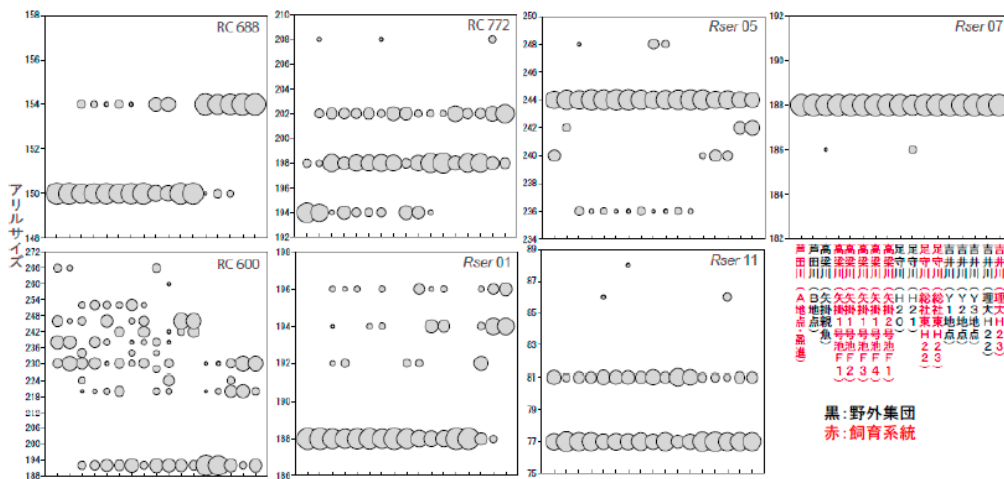


図9 マイクロサテライト7座におけるアレル組成(バブルチャート)

考察

1) 既存飼育系統における遺伝的特性評価と遺伝的改善に向けた知見の収集

矢掛高校の結果は、MS、MHC の何れにおいても遺伝的多様性だけでなく、rare allele もよく保持されている事を示している（図2, 3, 9）。また、主成分分析の結果から、遺伝子組成にほとんど変化が生じていないことも明らかとなった（図6）。矢掛高校の系統において遺伝的特徴がよく保持されている一番の理由として、保存池の状態を挙げる事ができる（図10）。当施設は設置面積が広いだけでなく（約2a）、環境の自然度が高く、水量、水質、水温も年間を通してほぼ安定している。実際、有効集団サイズが約6個体とほぼほぼ一定である事は、個体数がほぼ環境収容力に達し、安定している可能性を示している。生息個体数は約150個体と推定されており（平成23年11月推

定)、生息世代数が3世代であるとされる事から、年当たりの繁殖個体数は50個体以上と考えられる。スイゲンゼニタナゴの雌の1繁殖期における産卵数は100程度とされており(鈴木, 1995)、卵稚仔の死亡率などを考慮すると雌の有効集団サイズが約3個体というのは、比較的妥当な値であると考えられる。なお、2号池においてはMode shift testにおいて遺伝的ボトルネックの存在が示唆されたが、これについては遺伝的多様度に加え、生息個体数と有効集団サイズについて、次年度以降も継続してモニタリングを行う必要がある。

矢掛高校とは対称的に総社東小学校の保存系統においては顕著な遺伝的多様性の低下だけでなく(図2)、母集団である足守川集団との間で顕著な遺伝的差異が認められた(図6)。この理由として、総社東小学校では1tタンクを2台繋ぎ合わせた環境で系統保存を行っている事から、環境収容力の低さが予想される。タナゴ類は繁殖時に雄がイシガイ科の二枚貝を中心とする縄張りを形成することから、その環境における繁殖個体数は形成可能な縄張りの数に大きく左右されることが知られている(Przybylski et al., 2007)。したがって、系統の作出に用いた親魚の数(40個体を使用)が十分であっても、実際に繁殖を行っている個体数は極めて少ないと考えられる。この系統の今後の継代に当たっては、野外個体ないしは同一水系の他の系統保存個体の導入による遺伝的改善と飼育環境のスペースの拡大が検討課題であると考えられる。



図10 スイゲンゼニタナゴの保存池(矢掛高校) A. 1号池, B. 2号池

2) 遺伝的多様性の低い野外集団における遺伝的改善に向けた知見の収集

吉井川集団はスイゲンゼニタナゴの野外集団の中では最も遺伝的多様性が低く(河村ら, 2010)、MHCにおいては対立遺伝子が単型的であることが判っている(河村・三宅, 2011)。また、当水系においては骨格異常個体の出現頻度が高いとされ、昨年度の調査においても実際に確認されている。これらの事から吉井川集団においては遺伝的多様性の低下と近親交配により遺伝的劣化が生じている可能性が考えられる(Höglund, 2009)。今回、この事を確かめるため、昨年度、吉井川Y3地点において採集した個体を用い、自然繁殖による交配試験を行ったが、骨格異常個体は確認されなかった。昨年度、高松農業高校の飼育系統において生じた骨格異常個体を用いた交配試験においても今回と同様の結果が得られている(河村・三宅, 2011)。これらの結果から、骨格

異常の要因として遺伝的要因だけでなく環境要因の存在も否定できないと思われる。吉井川集団の保護における課題は、遺伝的多様性の低さが適応度の及ぼす影響であり、これについては野外調査による個体群動態の追跡ならびに遺伝的多様性の高い他水系の集団との間で適応度についての比較が必要と思われる。もし、こうした調査において明らかに適応度の低下が見られる場合は、近隣の旭川などから個体導入による遺伝的改善が必要と考えられる。

3) 野外集団の遺伝的特徴の解明を中心とする系統保存に向けた情報収集

スイゲンゼニタナゴの野外集団の中で芦田川集団は現在、最も厳しい生息状況に置かれているとされている（河村，未発表）。今回、平成 21 年秋に発見された集団 B について遺伝的特性調査を行った所、当集団は遺伝的には同一水系内の集団 A に近く（図 6）、遺伝的多様性においてもほぼ同水準であることが明らかとなった（図 2, 3）。しかしながら mtDNA においては他の集団では見られないハプロタイプが確認されるなど、僅かではあるものの集団 A との遺伝的相違も確認された（図 7）。現在、集団 A は絶滅寸前（H23 の調査での採集個体数は稚魚 4 匹）であるのに対し、集団 B の個体数は比較的多いと考えられている。この事から、絶滅寸前である集団 A の保全に向けた選択肢として、1) 集団 B からの個体の移植ないしは 2) 盈進高校の系統保存個体の移植があげられる。しかしながら、集団 A における個体数の著しい減少は生息環境の生息環境の悪化が主要因であることから、当集団における保全策は環境の改善が最優先課題であり、その次に個体移植による繁殖のサポートが必要であると考えられる。

謝辞

野外調査ならびに飼育実験においては、青江 洋氏（倉敷水辺の環境を考える会）、室貴由輝氏（岡山県立矢掛高校）、古本哲史（盈進学園高校）、小林秀司氏（岡山理科大学動物学科）、最上祥成氏（中国四国地方環境事務所）、吉郷英範氏（中外テクノス）に大変お世話になった。これらの方々にこの場を借りて厚く御礼申し上げる。

業績

河村功一・三宅琢也・山田充哉（三重大院生資）・池本茂豊（岡山県）・室貴由輝（矢掛高校）・青江 洋（倉敷市）・小林秀司（岡山理大） スイゲンゼニタナゴの保全に向けた遺伝情報の収集．平成 23 年度日本水産学会秋期大会口頭発表（於長崎大学）．

引用文献

Blouin, M. S., M. Parsons, V. Lacaille and S. Lotz. 1996. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Mol. Ecol.*, 5: 393-401.

- Garza, J. C. and E. G. Williamson. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol. Ecol.*, 10: 305-318.
- Goudet, J. 1999. *PCAGEN* Version 1.2. Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm>.
- Goudet, J. 2001. *FSTAT, Version 2.9.3: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices*. Available at <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Höglund, J. 2009. *Evolutionary conservation genetics*. Oxford University Press, Oxford 189 pp.
- Miyake, T., J. Nakajima, N. Onikura, S. Ikemoto, K. Iguchi, A. Komaru and K. Kawamura. 2010. The genetic status of two subspecies of *Rhodeus atremius*, an endangered bitterling in Japan. *Conserv. Genet.*: 1-18.
- Okazaki, M., K. Naruse, A. Shima and R. Arai. 2001. Phylogenetic relationships of bitterlings based on mitochondrial 12S ribosomal DNA sequences. *J. Fish Biol.*, 58: 89-106.
- Park, S. D. E. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Ph.D. thesis, University of Dublin. Available at <http://www.animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>
- Peel, D., J. R. Ovenden and S. L. Peel. 2004. NeEstimator: software for estimating effective population size, Version 1.3. Brisbane, Queensland. Available at http://www.dpi.qld.gov.au/28_6908.htm.
- Piry, S., G. Luikart and J.-M. Cornuet. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *J. Hered.*, 90: 502-503.
- Przybylski, M., M. Reichard, R. Spence and C. Smith. 2007. Spatial distribution of oviposition sites determines variance in the reproductive rate of European bitterling (*Rhodeus amarus*). *Behaviour*, 144: 1403-1417.
- Waples, R. 1989. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, 121: 379.
- 河村功一. 2003. スイゲンゼニタナゴ. 環境省自然環境局野生生物課 (編), pp. 46-47. 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック— 4 汽水・淡水魚類. 自然環境研究センター, 東京.
- 河村功一・三宅琢也. 2010. スイゲンゼニタナゴの保全技術の開発 —保全単位の推定と遺伝的多様性保全技術の開発—. pp. 39-53. 漁場環境・生物多様性保全総合対策事業 (希少水生生物保全事業) 平成 20 年度報告書. 独立行政法人水産総合研究センター, 上田.
- 河村功一・三宅琢也. 2011. スイゲンゼニタナゴの保全技術の開発 —保全単位の推定と遺伝的多様性保全技術の開発—. pp. 28-35. 漁場環境・生物多様性保全総合対策事業 (希少水生生物保全事業) 平成 22 年度報告書. 独立行政法人水産総合研究セン

ター, 上田.

河村功一・三宅琢也・山田充哉. 2010. スイゲンゼニタナゴの保全技術の開発 ―保全単位の推定と遺伝的多様性保全技術の開発―. pp. 31-42. 漁場環境・生物多様性保全総合対策事業（希少水生生物保全事業）平成 21 年度報告書. 独立行政法人水産総合研究センター, 上田.

小島吉雄・上野紘一・林 真. 1973. 日本産タナゴ亜科魚類の核型と系統的類縁との関係. 動物学雑誌, 82: 171-177.

鈴木伸洋. 1995. スイゲンゼニタナゴ. 水産庁（編）, pp. 308-313. 日本の希少な野生水生生物に関する基礎資料（□）. 社団法人日本水産資源保護協会, 東京.