

平成17年度  
**自然公園等施設整備委託**  
溪流魚遺伝子分析調査報告書

平成18年 2月

日本大学生物資源科学部

## 目 次

1 . 目的と実施内容	.....	1
2 . 方法	.....	1
3 . 結果	.....	2
4 . 考察	.....	3
5 . 引用文献	.....	4

## 目 次

1 . 目的と実施内容	.....	1
2 . 方法	.....	1
3 . 結果	.....	2
4 . 考察	.....	3
5 . 引用文献	.....	4

## 1 渓流魚遺伝子分析調査

### 1. 目的と実施内容

#### (1) 目的

近年、生物多様性維持の必要性が提唱されるようになり、地域独自の遺伝集団、すなわち在来個体群の維持の重要性が認識されつつある。これまでの河川整備や現在の河川環境を考えると、多くの生物がその遺伝的多様性を失いつつあることが示唆される。特に魚類においては、その生活環により河川環境の変化を直接的に受け、さらに資源利用や遊魚などの観点から人為的な移入が多々行われてきている。このような背景の下、在来個体群の保護は急を要する事項であり、神奈川県丹沢についてもその例に漏れない。そこで本調査では、頻繁に移入が行われているイワナやヤマメの丹沢個体群について集団遺伝学的手法により、丹沢個体群のハプロタイプを把握するとともに丹沢独自の個体群の検出を目指す。また、産業的に重要視されておらず、人為的な移入が行われていないことが期待されるカジカについても同様な手法で丹沢個体群の特徴を把握することを目的とする。

#### (2) 調査項目

養殖イワナおよび丹沢産イワナのハプロタイプの検出および集団遺伝学的解析  
養殖ヤマメ（アマゴ）および丹沢産ヤマメ（アマゴ）のハプロタイプの検出  
丹沢産カジカのハプロタイプの検出および集団遺伝学的解析

### 2. 方法

#### (1) 調査地

イワナについては、八丁ヤマメセンターの養殖試料 5 個体、玄倉川支流試料 9 個体、大又沢支流試料 8 個体および中津川支流試料 3 個体の計 24 個体を分析した。ヤマメは、河内川試料 10 個体、大又沢支流試料 5 個体、河内川支流試料 5 個体および八丁ヤマメセンターの養殖試料 13 個体の計 33 個体を分析した。カジカは丹沢湖西側大又沢水系における 3 地点からそれぞれ 36 個体、26 個体および 14 個体、および丹沢湖北側の河内川支流から 21 個体の計 97 個体を採取して分析した。

#### (2) 調査方法

各調査地点で採取されたイワナ、ヤマメおよびカジカ試料より全 DNA を抽出した。イワナについては既報のプライマーセット H15915 (Aoyama *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2004) および L15285 (Inoue *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2004)、ヤマメはイワナと同一のプライマーセットおよび部分 D-loop 領域を増幅するプライマーセット fDloop\_R (Itoi *et al.*, *in press*) および ftRPhe\_R (Itoi *et al.*, *submitted*)、カジカについては部分 D-loop 領域を増幅するプライマーセットを用いて PCR 増幅した (図 1)。得られた PCR 産物はダイレクトシーケンスに供して塩基配列を決定するとともに、一部試料は TA クローニング後、塩基配列の決定を行った。決定された DNA 塩基配列をデータベース検索し、既報の配列と比較することで丹沢個体の遺伝的位置付けの推定を試みた。

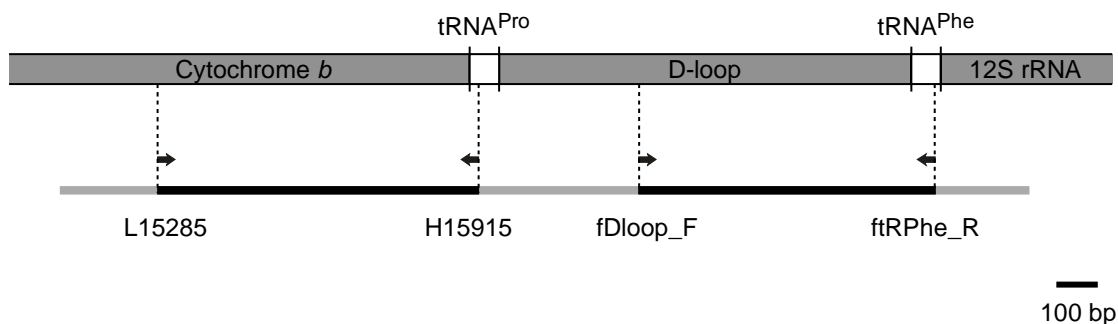


図 1 . 部分 mtDNA 塩基配列分析に用いたプライマーセット . 矢印はプライマーの位置および向きを示す .

### 3 . 結果

#### (1)イワナ

養殖試料 5 個体および天然試料 19 個体、計 24 個体から全 DNA を抽出し、養殖試料 5 個体の部分 cytochrome *b* 遺伝子領域の塩基配列を決定した。決定されたハプロタイプの塩基配列を Yamamoto *et al.* (2004)のデータと比較した結果、3 個体はアメマス型の東北地方固有のハプロタイプ、1 個体はアメマス型であれば北海道、ニッコウイワナ型であれば北陸から中国地方のハプロタイプ型と一致した。また、1 個体のみ、既報のハプロタイプとは一致せず、木曽川あるいは熊野川のヤマトイワナ型のみで観察されているハプロタイプと近いことが示された ( 図 2 )。表現型ではニッコウイワナ型と

Hap-29	CCTTCGTGTTCTACATGAGACCGGGTCCAATAACCCAGCAGGAATCAACTCAGACGCCGATAAAATTCATTCCACCCCTACTTCTCGTACAAAGATCTCCGGTTTCGTAGCCATATT	120
TANZAWA 5	.....	120
Hap-28	.....	120
Hap-1	.....A.....G.....C.....	120
TANZAWA 4	.....A.....G.....C.....	120
Hap-7	.....G.....C.....	120
TANZAWA 1-3	.....G.....C.....	120
Hap-29	ACTTGGCCTAACAGCCCTAGCTCTTTTCGCACCCAACTCCTGGGAGACCAGACAATTTACGCCAGCCCAACCCCTAGTCACCCACCACACATCAAGCCCGAATGGTACTTCTTATT	240
TANZAWA 5	.....T.....	240
Hap-28	.....T.....	240
Hap-1	.....T.....T.....	240
TANZAWA 4	.....T.....T.....	240
Hap-7	.....T.....T.....	240
TANZAWA 1-3	.....T.....T.....	240
Hap-29	CGCCTACGCAATTTACGATCTATCCCAATAAACTGGGAGGAGTACTCGCCCTTTATTTCTCAATCCCTGTCCCTCATAGTGTGCCAATCCTACACACCTCTAACAGCGCGGACTAAC	360
TANZAWA 5	.....	360
Hap-28	.....	360
Hap-1	.....C.....T.....A.....G.....	360
TANZAWA 4	.....C.....T.....A.....G.....	360
Hap-7	.....T.....A.....	360
TANZAWA 1-3	.....T.....A.....	360
Hap-29	CITTCGACCACTAACTCAATCTTATTCTGAGCCCTAGTAGCGGATATACTTATCCTCACCTGAATGGAGGCATGCCCGTGAACACCCATTATTATTATCGGCCAAGTGGCCTCTGT	480
TANZAWA 5	.....A.....	480
Hap-28	.....A.....	480
Hap-1	.....A.....C.....	480
TANZAWA 4	.....A.....C.....	480
Hap-7	.....A.....C.....	480
TANZAWA 1-3	.....A.....C.....	480
Hap-29	GATTTACTTCACCATCTTCCTAGTCTCGCCCTTAGCCGGTTGGCCGAAATAAAGCCCTCGAATGAGCCTGCC	557
TANZAWA 5	.....T.....	557
Hap-28	.....	557
Hap-1	.....	557
TANZAWA 4	.....	557
Hap-7	.....	557
TANZAWA 1-3	.....	557

図 2 . 八丁ヤマメセンターの養殖イワナ試料のハプロタイプの比較 . 緑、青および赤枠はヤマトイワナ型、アメマス ( 北海道 ) /ニッコウイワナ ( 北陸・中国地方 ) 型およびアメマス ( 東北地方 ) 型を示す . 同一塩基はドットで示した . Tanzawa 1-3 試料はアメマス ( 東北地方 ) 型、Tanzawa 4 試料はアメマス ( 北海道 ) /ニッコウイワナ ( 北陸・中国地方 ) 型と完全に一致した . Tanzawa 5 試料はヤマトイワナ型と高い相同性を示した .

される天然試料 19 個体分について解析を行なった結果、7 個体でハプロタイプが明らかとなり、2 個体が新潟県早川のハプロタイプと、1 個体が北陸から中国地方の日本海側に分布するハプロタイプと一致した。また 4 個体がこれまでにニッコウイワナ型では報告されていないハプロタイプで、このうち 3 個体がヤマトイワナ型、1 個体がアメマス型で報告されているハプロタイプと一致した。

養殖および天然イワナ間のハプロタイプの関係に着目すると、養殖個体で最も多く認められた個体 (Tanzawa 1-3) は新潟県早川の試料と同一のハプロタイプと、また Tanzawa 4 試料は北陸から中国地方の日本海側に分布する試料と同一のハプロタイプと一致した。

#### (2) ヤマメ

養殖試料および天然試料計 33 個体から全 DNA を抽出し、2 種類のプライマーセットを用いて PCR 増幅を試みたが、いずれのプライマーセットでも増幅産物は確認できなかった。

#### (3) カジカ

丹沢湖西側の大又沢水系の異なる 3 地点における試料 76 個体を分析し、PCR 増幅できた 72 個体の部分 D-loop 領域の塩基配列を比較した結果、2 種類のハプロタイプが検出された。ハプロタイプ 1 が 69 個体およびハプロタイプ 2 が 3 個体検出され、採取地点間によるハプロタイプの違いは認められなかった (図 3)。また、丹沢湖北側の河内川水系の試料 21 個対中、PCR 増幅できた 16 個体の当該領域の塩基配列を比較した結果、全てハプロタイプ 1 であることが明らかとなり、丹沢湖西側および丹沢湖北側試料間のハプロタイプの違いがないことが示された。

### 4. 考察

八丁ヤマメセンターの養殖イワナ 5 個体についてアライメントを行った結果、3 種類のハプロタイプが検出された (図 2)。このうち、アメマス型が 3 個体ないし 4 個体の可能性が明らかとなった (図 2)。表現型ではニッコウイワナ型とされる天然試料 7 個体のハプロタイプ分析結果では、最も多く検出されたハプロタイプはヤマトイワナ型で報告されているハプロタイプと一致した。この結果からはこの個体が丹沢固有のハプロタイプであるのか、ニッコウイワナ型とヤマトイワナ型の交雑個体であるかの判断はできないが、当該ハプロタイプがアメマス型、ニッコウイワナ型およびヤマトイワナ型で共通のハプロタイプと相同性が高いことから、ニッコウイワナ型の新しいハプロタイプである可能性がある。一方、イワナの人為的な交雑等を考えると、複数個所および複数型のハプロタイプの交雑が起こっている可能性は否定できない。

Tanzawa1	GGCCATTGATTGATGTTATTCCTCACACTTTCATCGACGCTGACATAAGTTAATGTTGAGGTACATCTCCGAGA-GACCCAGCATGCCGGGGCTTCACTC	99
Tanzawa2	.....T.....	99
Lake Biwa (AY116400)	.....A.....	99
Kinu River (AB188158)	.....C.....	99
Amanogawa River (AB188159)	.....G.....GA.....C.....T.....C.....T.....	100
Inabe River (AB188160)	.....G.....	99
Cottus nozawae (AB059339)	.....G.T.....G.....C.....T.....	100
Tanzawa1	CAGCGGCAAGGGTTCCTTTTTTTTTTTCCTTTCACCTGACATACAGAGCGCACCGGTATTAACAGACAAGGTATGAGCATTATCTCGCCCTTCG	199
Tanzawa2	.....	199
Lake Biwa (AY116400)	.....	199
Kinu River (AB188158)	.....T.....	199
Amanogawa River (AB188159)	.....	199
Inabe River (AB188160)	.....C.....TC.....	199
Cottus nozawae (AB059339)	.....A.....TC.....	200
Tanzawa1	GAGATATATTTGAGTGTGGATAGATATTTCAAAAAGAAATGCATTAAGGTATCTCAAGAGCATAAAGAGTGATTGTTCTCTCGAGACTTCC-TAAGAT	298
Tanzawa2	.....G.....	298
Lake Biwa (AY116400)	.....A.....A.....T.....GA.....	298
Kinu River (AB188158)	.....TA.....G.....	298
Amanogawa River (AB188159)	.....A.....T.....A.....GA.....C.....A	298
Inabe River (AB188160)	.....A.C.....A.GA.....C.....A	299
Cottus nozawae (AB059339)	.....A.CT.....C.A.....A.A...C...TC..	300
Tanzawa1	TCACCCCTGGTTCTTCGCGTTAAACCCCTACCCCTAACCTCCTGAGATGGCTATCACTCCTGTAACCCCTCGGAAACAGGCAACCTCTAGAAG	398
Tanzawa2	.....	398
Lake Biwa (AY116400)	.....T.....	398
Kinu River (AB188158)	.....	398
Amanogawa River (AB188159)	.....	398
Inabe River (AB188160)	.....CA..A.....	399
Cottus nozawae (AB059339)	.....C.....A.CT.....CA..AG.....C.....G.....	398
Tanzawa1	CTTACTGGGGGCGAAAAATGTGCTTATTACATTTAAAATAATGCATGT	449
Tanzawa2	.....	449
Lake Biwa (AY116400)	.....	449
Kinu River (AB188158)	.....	449
Amanogawa River (AB188159)	.....G.....	449
Inabe River (AB188160)	.....T.....	450
Cottus nozawae (AB059339)	.....A.T.....GC..	449

図 3. 丹沢産カジカおよび他河川カジカの部分 D-loop 領域の比較。琵琶湖、鬼怒川、天の川および員弁川産カジカ、およびハナカジカ *Cottus nozawae* の当該配列と比較した。本調査で明らかとなった配列は灰色の背景中、白字で示し、同一塩基はドットで示した。ハナカジカはアウトグループとして用いた。

ヤマメについては、本調査で用いたプライマーセットでは PCR 産物を得ることができなかった。そのため、核ゲノムコードである rRNA 遺伝子の ITS 領域やマイクロサテライト領域も対象にする可能性も視野に入れて、新たなプライマーを設計して分析する必要がある。

カジカの分析結果をまとめると、同一河川内の採取場所によるハプロタイプの違いは認められなかった。また、丹沢湖西側および丹沢湖北側の試料間でもハプロタイプの違いは検出されず、2 種類のハプロタイプが認められた。しかしながら、本調査で得られたハプロタイプは、既存のデータベースのものと比較すると、琵琶湖や鬼怒川、天の川、員弁川などの他の地域のもの (Yokoyama and Goto, 2005) とは明らかにタイプが異なることが明らかとなった。つまり、本調査で得られたカジカ試料は丹沢あるいは神奈川県周辺に特異的なハプロタイプである可能性が示唆される。ただし、鬼怒川の試料は大卵型、天の川の試料は中卵型、そして員弁川の試料は小卵型と分類されており、分類体系が混乱しているようである (Yokoyama and Goto, 2005)。今後、多少距離の離れた水系 (たとえば、多摩川や相模川) の個体を用いて確認する必要があると考えられる。

## 5. 引用文献

Aoyama, J., Watanabe, S., Ishikawa, S., Nishida, M. and Tsukamoto, K. (2000) Are morphological characters distinctive enough to discriminate between two species of freshwater eels, *Anguilla celebesensis* and *A. interioris*? Ichthyol. Res. 47: 157-161

- Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K. and Nishida, M. (2000) Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Fish. Sci.* 66: 924-932
- Itoi, S., Saito, T., Washio, S., Shimojo, M., Takai, N., Yoshihara, K. and Sugita, H. (*In press*) Speciation of two sympatric coastal fish species, *Girella punctata* and *G. leonina*. *Org. Divers. Evol.*
- Itoi, S., Saito, T., Shimojo, M., Washio, S. and Sugita, H. (*Submitted*) Identification of *Girella punctata* and *Girella leonina* by PCR-RFLP analysis. *ICES J. Mar. Sci.*
- Yamamoto, S., Morita, K., Kitano, S., Watanabe, K., Koizumi, I., Maekawa, K. and Takamura, K. (2004) Phylogeography of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Zoological Science*, 21: 229-240
- Yokoyama, R. and Goto, A. (2005) Evolutionary history of freshwater sculpins, genus *Cottus* (Teleostei; Cottidae) and related taxa, as inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36: 654-668