

2015年に伊豆沼・内沼とその集水域で採捕された ゼニタナゴの遺伝子型

斎藤憲治^{1*}・藤本泰文²・森 晃^{2†}

¹ 国立研究開発法人水産研究・教育機構中央水産研究所 〒236-8648 横浜市金沢区福浦 2-12-4

E-mail ksaitoh@affrc.go.jp

² 公益財団法人宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団 〒989-5504 宮城県栗原市若柳字上畠岡敷味
17-2

*責任著者

キーワード:コイ科 内水面漁業 オオクチバスの食害 自然再生 淡水魚

2016年5月13日受付 2016年6月8日受理

要旨 2015年7月から12月にかけて、伊豆沼・内沼とその集水域において採捕されたゼニタナゴ32個体のミトコンドリアDNAの配列を解析した。伊豆沼・内沼では少なくとも2000年以降に本種の記録はなかった。解析した個体は伊豆沼・内沼周辺に特有の遺伝子型のみを持ち、東北地方に広くみられる遺伝子型を持たないという特徴を示した。このような遺伝的特徴を持つ集団は伊豆沼・内沼周辺にはみられないで、その由来が人為的なものでなければ、Hap2とHap3を持ち、Hap1などが稀か全くみられないような、伊豆沼・内沼周辺水域に特徴的で、なおかつハプロタイプ構成が未調査の集水域集団が流下したものであろう。

はじめに

捕食的な外来生物の侵入によっていったん壊滅した在来生物群集は、原因となった外来生物が駆除などにより減少すると、回復するだろうか。回復するとすれば、どのような経過をたどるだろうか。わが国では、特定外来生物であるオオクチバス *Micropterus salmoides* は小型の淡水魚類とくにタナゴ類に壊滅的影響を及ぼしている(中井 2004, 琢磨ほか 2004, 藤本ほか 2009)。オオクチバスは外来生物法(通称)にもとづく特定外来生物に指定されて以来、駆除の対象となった(中井 2006)。しかし、いったん壊滅した希少淡水魚類が、オオクチバスの駆除につれ回復した例については、琵琶湖におけるシロヒレタビラ(川瀬・藤田 2009)を除き、日本ではほとんど報告がない。

伊豆沼・内沼ではオオクチバスの食害により、かつて多産したゼニタナゴ *Acheilognathus typus* が

† 現所属:小山市役所 〒323-8686 栃木県小山市中央町 1-1-1

2000 年までに絶滅したとみられていた(高橋ほか 2001)。2000 年以前では、1999 年 11 月 27 日の漁獲が伊豆沼・内沼における最後の記録である(萩原 2009)。その後 2004 年より「バス・バスターズ」などの駆除活動が開始され、オオクチバスの食害により激減していたコイ科魚類などの個体数が回復する兆しがみられる(上田ほか 2013)。しかし上田ほか(2013)の報告の時点でも、ゼニタナゴは 10 年以上にわたって湖内では全く採捕されたことはなかった。一方、伊豆沼・内沼の集水域では、流入河川やため池から本種が採捕され(川岸ほか 2007, 藤本ほか 2009, 藤本 2013)，水系全体としては絶滅したわけではなかった。また、保全を目的に、集水域の 1 つのため池に、近隣の水域から本種が放流され定着している(鹿野 2013)。

2015 年 7 月 31 日の 1 個体を皮切りに、12 月 10 日までに合計 32 個体のゼニタナゴが内水面漁業による漁獲物の中や、集水域の河川や池から見つかった。ここでは、そのミトコンドリア DNA の遺伝子型(ハプロタイプ)を報告し、既報(Saitoh et al. 2016)と比較し、その由来について考察する。

調査方法

本報で用いたゼニタナゴは 2015 年 7 月 31 日から 11 月 20 日にかけて、伊豆沼・内沼に設置された小型定置網 4 箇統で漁獲されたもの 21 個体と、伊豆沼・内沼の集水域の川で 2015 年 12 月 1 日に採捕した 1 個体、およびその集水域の川と水路系で連絡のある池(Y091)で 2015 年 12 月 1 日から 12 月 10 日にかけて採捕した 10 個体である。ヒレの一部を切除し、エタノール中に保存したものから、QuickGene DNA Tissue kit と QuickGene-810(クラボウ)を用いて DNA を抽出した。PCR ダイレクトシーケンシングにより、ゼニタナゴのミトコンドリア DNA 完全长配列(AB239602) (Saitoh et al. 2006) の 15640-16142 番目の塩基に相当する領域を、既報(Saitoh et al. 2016)と比較した。PCR に用いたプライマーは L-鎖上の L16019(GCTACCAAAGGCCAGAATTCTAA) (Saitoh et al. 2004) と H-鎖上の CrpH301D(GTTWARGTCCCTGATTCTATCAT) (Saitoh et al. 2016) である。これらのプライマーにより、tRNA(Pro)遺伝子の開始から 16 塩基と、調節領域前半の、合計 505 塩基が増幅される。PCR 反応液は 12.5 μ L で、抽出された DNA を 1 μ L、dNTP ミックス(宝酒造)を 0.96 μ L(各 2.5 nmol)、10 \times ExTaq バッファを 1.2 μ L、ExTaq(宝酒造)を 0.06 μ L(0.3 U)、プライマーを各 1 μ L(5 pmol)を含み、超純水を 7.28 μ L 加えたものである。PCR 反応はタッチダウン PCR で(Don et al. 1991)、94°C 3 分間の変性ののち、94°C 30 秒、59°C(サイクルごとに 1°C ずつ低下させる)30 秒、72°C 2 分間のサイクルを 7 回、次いで 94°C 30 秒、55°C(一定)30 秒、72°C 2 分間のサイクルを 28 回反復し、最後に 72°C で 5 分間伸長させるものである。PCR 反応産物のシーケンシングには PCR 反応と同じプライマーを用い、BigDye terminator v.3.1 キットと ABI3730 型シーケンサー(ABI, Foster City CA, USA)によりデータを得た。本報で取得した DNA 配列の DDBJ/GenBank エントリーは LC158077-LC158108 である。

結果および考察

今回分析したゼニタナゴ 32 個体からは 2 種類のハプロタイプが検出された。既報(Saitoh et al.

2016)と比較すると、それぞれ Hap2 と Hap3 と同一であった(表 1)。伊豆沼・内沼周辺には現時点で 8 箇所の生息地が知られている。そのうち池#90, #91, #125, #127, H004, および水路のものについてはミトコンドリア DNA のハプロタイプ構成を報告した(Saitoh et al. 2016)。これら 6 箇所のほかに、2012 年に小規模な池(Y057)において本種の生息が判明し、さらに保全のため、Y057 がある沢とは別の沢をせき止めてできた池(#88)に採捕個体が放流された。これら 2 箇所の池のある沢は、2015 年に 1 個体が採集された川と 10 個体が採集された池の上流にある。

伊豆沼・内沼周辺の生息地のうち池#90, #91, #125, #127, Y057, #88 の 6 箇所は伊豆沼・内沼の集水域にある。また、#91 は近隣の水域からの移植による分布である。今回の分析個体からは、集水域にある生息地のうち、池#90 と移植分布である池#91 のいずれとも共通のハプロタイプは検出されなかった。

移植分布以外の、伊豆沼・内沼周辺の生息地を概観すると、この地域におけるゼニタナゴは Hap1, Hap2, Hap3 の混在という遺伝的特徴を示す。Hap1 は東北地方一円にみられ、Hap2 と Hap3 は伊豆沼・内沼周辺に特有である(Saitoh et al. 2016)。今回の分析個体には伊豆沼・内沼周辺に特有のハプロタイプを持つもののみがみられ、東北地方に広くみられるハプロタイプはみられない。

伊豆沼・内沼集水域にある河川にはその上流にある池などから魚類が流下している(藤本ほか 2007, 川岸ほか 2007, 2008)。集水域の河川に流下した魚類の一部はさらに、伊豆沼・内沼へ流下するであろう。伊豆沼・内沼においていったん絶滅したゼニタナゴのような魚種でも、集水域に生息地があれば、絶滅要因となった環境条件が解消されれば、いずれ集水域からの流入個体が定着して回復すると期待される。

2015 年にゼニタナゴが採捕された伊豆沼・内沼集水域の川と池 Y091 では、これまで本種が採集されたことはない。とくに Y091 では 2011 年 11 月 3 日から 4 日にかけて池干しによる魚類全個体の採捕が行なわれたが、本種はみられなかった。したがって、2015 年に採捕された個体は集水域にある池などか

表 1. 伊豆沼・内沼および集水域で 2015 年に採捕されたゼニタナゴの遺伝子型(ハプロタイプ)の、周辺水域における既報(Saitoh et al. 2016)との比較。変異サイトの位置は本種ミトコンドリア DNA 完全長配列(AB239602)(Saitoh et al. 2006)に対応。

Table 1. Haplotypes detected from *Acheilognathus typus* collected in Lake Izunuma-Uchinuma and its catchment in 2015 in comparison with habitats around the lake (Saitoh et al. 2016). Variable sites correspond with positions of *A. typus* complete mitochondrial sequence (AB239602) (Saitoh et al. 2006).

遺伝子型 Haplotype	変異サイト variable sites	2015			2001-2011					水路 creek
		伊豆沼・内沼 lake	流入河川 stream	池 pond Y091	池 pond #90	#91*	#125	#127	H004*	
	1 1 1									
	5 5 6									
	7 9 0									
	9 0 8									
	6 7 2									
Hap1	G G T	0	0	0	6	23	12	6	29	22
Hap2	G G C	15	1	9	0	0	33	12	0	7
Hap3	A G T	6	0	1	0	0	4	0	0	10
Hap4	G A T	0	0	0	0	25	0	0	21	0

* 移植。

* Introduced stocks.

らあらたに流下したものに由来すると思われる。しかし、集水域の既知の生息地のうち、ハプロタイプ構成を調べたところとはその構成が異なっていた。

今回の分析個体のすべての由来が同一で、比較的近いハプロタイプ構成を持つ池#125 であり、さらにこの池の母集団のハプロタイプ構成が既報(Saitoh et al. 2016)のとおりであると仮定すると、分析した32 個体中に Hap1 が含まれない確率は、任意の 1 個体のハプロタイプが Hap1 でない確率 $(33 + 4)/(12 + 33 + 4)$ の 32 乗($= 1.25 \times 10^{-4}$)と低い。また、表 1 の水路は伊豆沼流出河川荒川に連絡するが、このハプロタイプ構成は、池#125 よりもさらに異なっており、Hap2 と Hap3 の割合が逆転する確率も考慮しなければならなくなるので、伊豆沼下流域由来とも考えられない。ハプロタイプ構成の報告のある他の生息地が由来である可能性はさらに低い。

したがって、2015 年に伊豆沼・内沼にみられたゼニタナゴは、その由来が人為的なものでなければ、Hap2 と Hap3 を持ち、Hap1 などが稀か全くみられないような、伊豆沼・内沼周辺水域に特徴的で、なおかつハプロタイプ構成が未知の集水域集団が流下したものであろう。池 Y057 およびそこに由来する池 #88 の集団はその候補であり、これらの池のハプロタイプ構成を調べることが必要である。ただし、上記の池だけが候補ではなく、未発見の生息地がないとも限らないので、伊豆沼・内沼周辺水域における本種の生息地のさらなる探索も必要である。また、本種がこれを機会に伊豆沼・内沼に定着するのか、一時的な出現なのか明らかにするためにも、沼の魚類のモニタリングの継続が重要である。これらの地道な調査研究活動により、伊豆沼・内沼における本種復活の将来像を、遺伝的側面を含め描くことができる。

謝辞

伊豆沼・内沼とその周辺水域における魚類調査にあたっては宮城県(平成 27 年度よみがえれ伊豆沼・内沼在来生物プロジェクト事業)による助成を受けた。また、一部は環境省モニタリングサイト 1000 陸水域調査(湖沼)淡水魚類調査として実施された。大塚高弘氏(中央水産研究所)はサンプル分析の一部を行なった。とくに記して謝意を表する。

引用文献

- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. & Mattick, J. S. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl. Acids Res.* 19: 4008.
- 藤本泰文・星 美幸・神宮宇寛. 2009. 侵入直後のオオクチバス *Micropterus salmoides* が短期間のうちに溜め池の生物群集に及ぼした影響. *伊豆沼研報* 3: 81-90.
- 藤本泰文・川岸基能・進東健太郎. 2007. 伊豆沼・内沼集水域内のため池で確認されたブルーギル *Lepomis macrochirus* とその流出. *伊豆沼研報* 1: 21-26.
- 藤本泰文・北島淳也・倉石 信・稻葉 修・進東健太郎・高橋清孝. 2009. ゼニタナゴの探索: 探索の努力が種の保全につながる. 高橋清孝(編). *田園の魚を取り戻せ!* pp. 38-45. 恒星社厚生閣, 東京.

- 藤本泰文. 2013. ため池の魚類相-現状から保全まで-. 藤本泰文・嶋田哲郎・高橋清孝・斎藤憲治(編). 湖沼復元を目指すための外来魚防除・魚類復元マニュアル ~ 伊豆沼・内沼の研究事例から~. pp. 111-119. (公財)宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団, 宮城.
- 萩原富司. 2009. 私のゼニタナゴ *Acheilognathus typus* 保護失敗記. 魚類自然史研究会会報「ボテジャコ」14: 13-18.
- 川岸基能・藤本泰文・進東健太郎. 2007. 宮城県伊豆沼・内沼集水域におけるゼニタナゴ *Acheilognathus typus* の再確認. 伊豆沼研報 1: 7-10.
- 川岸基能・藤本泰文・進東健太郎. 2008. 伊豆沼・内沼流入河川における魚類の分布様式. 伊豆沼研報 2: 63-74.
- 川瀬成吾・藤田朝彦. 2009. 琵琶湖におけるシロヒレタビラの生息確認. 伊豆沼研報 3: 19-24.
- 中井克樹. 2004. ブラックバス等の外来魚による生態的影響. 用水と排水 46: 48-56.
- 中井克樹. 2006. 外来生物法とオオクチバス-特定外来生物の指定をめぐって-. 細谷和海・高橋清孝(編). ブラックバスを退治する-シナイモツゴ郷の会からのメッセージ-. pp. 13-26. 恒星社厚生閣, 東京.
- Saitoh, K., Kim, I.-S. & Lee, E.-H. 2004. Mitochondrial gene introgression between spined loaches via hybridogenesis. Zool. Sci. 21: 795-798.
- Saitoh, K., Sado, T., Mayden, R.L., Hanzawa, N., Nakamura, K., Nishida, M. & Miya, M. 2006. Mitogenomic evolution and interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): The first evidence toward resolution of higher-level relationships of the world's largest freshwater fish clade based on 59 whole mitogenome sequences. J. Mol. Evol. 63: 826-841.
- Saitoh, K., Shindo, K., Fujimoto, Y., Takahashi, K. & Shimada, T. 2016. Mitochondrial genotyping of an endangered bitterling *Acheilognathus typus*. ZooKeys 623: 131-141.
- 鹿野秀一. 2013. 食物網解析. 藤本泰文・嶋田哲郎・高橋清孝・斎藤憲治(編). 湖沼復元を目指すための外来魚防除・魚類復元マニュアル~伊豆沼・内沼の研究事例から~. pp. 127-129. (公財)宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団, 宮城.
- 高橋清孝・小野寺 肇・熊谷 明. 2001. 伊豆沼・内沼におけるオオクチバスの出現と定置網魚種組成の変化. 宮城水産研報 1: 111-118.
- 琢磨千恵子・渡辺雄二・有山貞子・小川貞子・酒井宏光・武市博人・岸 基史・森本静子・藤田朝彦. 2004. 生駒市高山ため池群の魚類相について-サンフィッシュ科魚類の在来種に与える影響-. 関西自然保護機構会誌 26: 123-130.
- 上田賢一. 2013. 魚類相回復傾向のモニタリングとオオクチバスの個体数推定. 藤本泰文・嶋田哲郎・高橋清孝・斎藤憲治(編). 湖沼復元を目指すための外来魚防除・魚類復元マニュアル~伊豆沼・内沼の研究事例から~. pp. 83-85. (公財)宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団, 宮城.

Mitochondrial haplotypes of *Acheilognathus typus* collected in
Lake Izunuma-Uchinuma and its catchment in 2015

Kenji Saitoh^{1*}, Yasufumi Fujimoto² & Akira Mori^{2†}

¹ National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research & Education Agency.
Fukuura 2-12-4, Kanazawa, Yokohama 236-8648, Japan
E-mail ksaitoh@affrc.go.jp

² The Miyagi Prefectural Izunuma-Uchinuma Environmental Foundation. 17-2 Shikimi, Kamihataoka,
Wakayanagi, Kurihara, Miyagi 989-5504, Japan
*Corresponding author

Abstract We sequenced mitochondrial control region from 32 individuals of an endangered bitterling *Acheilognathus typus* captured from July through December, 2015 in Lake Izunuma-Uchinuma and its catchment. There had been no record of *A. typus* since at least 2000 in Lake Izunuma-Uchinuma as it was nearly driven to extinction by predation of introduced largemouth bass *Micropterus salmoides* in 1990s. Specimens examined were characteristic in that they do not have widely distributed haplotype but that they have haplotypes characteristic to waters in and around Lake Izunuma-Uchinuma. There is no stock with this particular haplotype composition in other known habitats in the Izunuma-Uchinuma area. Individuals examined in this study would be derived from Izunuma-Uchinuma catchment with this characteristic haplotype composition. The largemouth bass eradication efforts by people nearby reduced the bass stock in the lake and cyprinid fishes are now recovering. Our report gives useful information for the prospective restoration process of the endangered bitterling in Lake Izunuma-Uchinuma from a genetic perspective. DDBJ/GenBank entries of sequences given in this report are LC158077-LC158108.

Keywords: Cyprinidae, freshwater fish, inland fishery, largemouth bass predation, restoration

Received: May 13, 2016/ Accepted: June 8, 2016

† Present address: Oyama City Office. Chuo 1-1-1, Oyama, Tochigi 323-8686, Japan

付属資料 1. 本報で比較した DNA 配列のアライメント. 塩基の位置はゼニタナゴのミトコンドリア DNA 完全長配列(AB239602) (Saitoh et al. 2006)に準拠. AB239602 と同一の塩基についてはドットで表す.

Appendix1. Alignment and position of DNA sequences used in this study. Nucleotide positioning corresponds with that of complete mitochondrial sequence of *Acheilognathus typus* (AB239602) (Saitoh et al. 2006). Dots in dicate identical nucleotides with AB239602.

<< tRNA (Pro) ----- ----- Control Region >>	

	15650
AB239602 (Hap1)	T AAACTATTT CTGGTGGTAA CCATTTGGTG TTAGACAAAA
Hap2
Hap3
Hap4

	15700
AB239602	TATGTACGAT TAAATATT ATTGTCTATGT ATTATCACCA TGCAATTATT
Hap2
Hap3
Hap4

	15750
AB239602	TTAACCTAAA AGCAGGTATT AAAATTCTT AAGTACATAG ACTAAATTT
Hap2
Hap3
Hap4

	15800
AB239602	CAGAAATCAA CTAAAGTGAT TTTAAATTAT TATGTAATAT TTCTCCCCCT
Hap2
Hap3 A ..
Hap4

	15850
AB239602	ACACTCTGTA ATAATGCTAT AATTTAATA TAACATTACA TAATGAAAAC
Hap2
Hap3
Hap4

	15900
AB239602	ATAAAATGTT CAATAAAATA TGAATGGAAT ATAAAACATA TCTATGTATT
Hap2
Hap3
Hap4 A ..

	15950
AB239602	ATCACCATAAC ATTATTTTA ACCTAAAAGC AAGTACTAAT ATATTAAAGA
Hap2
Hap3
Hap4

	16000
AB239602	TCAAAAACTA AATTGTAAAA TTTAATTAAA TTTTATTAA AACTTGGATA
Hap2
Hap3
Hap4

	16050
AB239602	TTATATTCCC TTAATAATGG ATAAGAGATG TAAGATATAG AATTACTCCA
Hap2
Hap3
Hap4

	16100
AB239602	CTAATCTTA AATAAAGGCA TATGAGAGAC CACCTACGGG AATAATGTAA
Hap2	.C.....
Hap3
Hap4

	16140
AB239602	GGCATATCAG GC
Hap2
Hap3
Hap4

付属資料 2. 本報で報告したゼニタナゴ採集個体のデータ.

Appendix 2. Material fish used in this report.

番号 ID	標準体長 SL (mm)	採集地 Locality	採集日 Date	ハプロタイプ Haplotype	エントリー ¹ Accession	
15Zeni01	33.7	Y091池	pond	2015/12/01	Hap2	LC158077
15Zeni02	33.5	Y091池	pond	2015/12/01	Hap3	LC158078
15Zeni03	30.2	Y091池	pond	2015/12/01	Hap2	LC158079
15Zeni04	33.6	Y091池	pond	2015/12/01	Hap2	LC158080
15Zeni05	34.6	Y091池	pond	2015/12/01	Hap2	LC158081
15Zeni06	29.0	Y091池	pond	2015/12/01	Hap2	LC158082
15Zeni07	30.5	流入河川	stream	2015/12/01	Hap2	LC158083
15Zeni08	32.8	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/20	Hap2	LC158084
15Zeni09	32.4	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/20	Hap2	LC158085
15Zeni10	35.6	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/20	Hap2	LC158086
15Zeni11	31.5	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/20	Hap3	LC158087
15Zeni12	29.2	Y091池	pond	2015/12/10	Hap2	LC158088
15Zeni13	32.7	Y091池	pond	2015/12/10	Hap2	LC158089
15Zeni14	31.6	Y091池	pond	2015/12/10	Hap2	LC158090
15Zeni15	32.7	Y091池	pond	2015/12/10	Hap2	LC158091
15Zeni16	36.1	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/20	Hap3	LC158092
15Zeni17	36.5	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/20	Hap2	LC158093
15Zeni18	34.9	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/20	Hap2	LC158094
15Zeni19	34.2	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/20	Hap2	LC158095
15Zeni20	32.2	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/20	Hap3	LC158096
15Zeni21	28.6	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/20	Hap2	LC158097
15Zeni22	33.1	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/23	Hap3	LC158098
15Zeni23	34.7	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/17	Hap2	LC158099
15Zeni24	35.8	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/17	Hap3	LC158100
15Zeni25	33.1	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/17	Hap2	LC158101
15Zeni26	32.0	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/17	Hap3	LC158102
15Zeni27	34.9	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/17	Hap2	LC158103
15Zeni28	37.3	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/17	Hap2	LC158104
15Zeni29	33.2	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/17	Hap2	LC158105
15Zeni30	34.6	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/17	Hap2	LC158106
15Zeni31	35.9	伊豆沼・内沼	lake	2015/11/17	Hap2	LC158107
15Zeni32	46.5	伊豆沼・内沼	lake	2015/07/31	Hap2	LC158108