

日本産ドンコにおけるミトコンドリアDNAの系統と関東地方への人為移植の分子的証拠

向井貴彦^{1,2}・西田 瞳¹

¹〒164-8639 東京都中野区南台1-15-1 東京大学海洋研究所分子海洋科学分野

²現住所 〒277-8572 千葉県柏市柏の葉5-1-5 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻
動物生殖システム分野

(2002年11月25日受付；2003年2月4日改訂；2003年2月18日受理)

キーワード：ドンコ，ミトコンドリアDNA，地理的変異，人為的移植

Takahiko Mukai* and Mutsumi Nishida. 2003. Mitochondrial DNA phylogeny of Japanese freshwater goby, *Odontobutis obscura*, and an evidence for artificial transplantation to Kanto District, Japan. J. Ichthyol., 50(1): 71–76.

Abstract Phylogenetic relationships among 4 major geographic population groups (San-in-Biwa-Ise, East Seto, West Seto and West Kyushu) of Japanese freshwater goby *Odontobutis obscura* (Perciformes: Gobioidei: Odontobutidae) and related species *O. hikimius* were inferred from partial nucleotide sequences of the mitochondrial 12S and 16S rRNA genes. The resultant mitochondrial DNA (mtDNA) phylogeny was consistent with that based on the previous allozyme analysis. This phylogeny showed that specimens from the Sagami River system in Kanagawa Prefecture, Kanto District, were extremely close to fish from the West Seto group, suggesting the formers to have been descended from individuals artificially introduced from the range of the latter. Judging from the fact that about 40 individuals of the goby were easily collected by a person in 2 hrs, the Kanto population did not seem to be small, and thus might be disturbing the native fauna in the river system.

*Corresponding author: Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan
(e-mail: mukai@k.u-tokyo.ac.jp)

ドンコ (*Odontobutis obscura*) は西日本に分布する純淡水性のハゼ亜目魚類であり、著しい地理的分化を遂げていることが明らかにされている (Sakai et al., 1998). Sakai et al. (1998) によるアロザイム分析の結果は、ドンコが5つの地域集団（山陰・琵琶・伊勢グループ、東瀬戸グループ、西瀬戸グループ、西九州グループ、匹見グループ）に大別されることを明瞭に示し、その中でも特に遺伝的に大きく分化していた匹見グループは、イシドンコ (*O. hikimius*) として新種記載された (Iwata and Sakai, 2002). こうした顕著な地理的分化は、日本列島の淡水魚類相の成立を推定する上で興味深いが、アロザイム分析にもとづくドンコ

の地域集団間の系統関係は、樹形の推定方法によって結果が異なるため、検討の余地が残されている。

また、近年、多くの動植物が国内外を問わず商業取引などを通じて持ち運ばれており、その中には重大な生態学的破壊を導くものも含まれている (川道ほか, 2001; 日本魚類学会自然保護委員会, 2002; 日本生態学会, 2002). 群集構造を破壊し、在来生物の絶滅を引き起こす外来種の導入もさることながら、国内および近隣国からの‘同種’個体を別産地へと持ち込み、放流することも本来の生物多様性を著しく損なうことが知られている (長田, 1997; 竹花・酒泉, 2002). ドンコの場合

も、‘同種’とされていながら著しい地理的・遺伝的分化を遂げているために、異なる地域集団由來の個体を放流することは、地域的な遺伝的多様性を損なうことになる。さらに、ドンコは日本産淡水魚としては大型の肉食魚であり、生きた動物を専食する（岩田、2001）ため、ドンコが自然分布していなかった関東以北の地域への導入は、河川群集へ重篤な影響をもたらしかねない。

本研究では、これまでドンコが確認されなかつた神奈川県相模川水系においてドンコが発見された（白川、2002）ことから、その生息状況を予備的に調査した。その上で、相模川水系産と5つの地理的グループ（イシドンコを含む）に含まれるドンコのミトコンドリア12Sおよび16S rRNA遺伝子の部分塩基配列を決定し、地域集団間の遺伝的分化と系統関係および、相模川水系産ドンコの由来について調査したのでここに報告する。

材 料 と 方 法

神奈川県相模川水系におけるドンコ *Odontobutis obscura* (ハゼ亜目ドンコ科) の生息調査は、相模原市の相模川支流において2001年10月7日、2002年2月16日、2002年4月6日にそれぞれ約20分、60分、120分のタモ網採集によっておこなわれた。採集は同一人物がおこない、ドンコの最大個体と最小個体の全長を記録した。また、2002年2月16日と4月6日は、同時に採集された魚種も記録した。

DNA解析用のドンコの供試魚は、滋賀県蒲生郡蒲生町の農業用水路産4個体（山陰・琵琶・伊勢グループ）、福井県三方湖産1個体（東瀬戸グループ）、兵庫県加古川水系産5個体（東瀬戸グループ）、愛媛県重信川産1個体（西瀬戸グループ）、鹿児島県甲突川産3個体（西九州グループ）、および相模川水系産3個体の合計17個体を用いた。それぞれの地域グループは、採集地点がSakai et al. (1998) におけるどの地域グループの分布域に含まれるかによって判断した。基本的に各水系1地点から採集したが、加古川水系は4個体が川西市産、1個体が氷上町産である。また、島根県高津川水系産のイシドンコ *Odontobutis hikimius* 1個体も用い、操作上の外群として愛知県豊橋市に移入している外来魚のヨコシマドンコ *Micropercops swinhonis* (ハゼ亜目ドンコ科) を用いた。

DNAの抽出は、氷上で麻酔した供試魚から切り出した体側筋を99%エタノールで保存した後、キアゲン社のDNeasy Tissue Kitを用いておこなった。

PCR増幅 (Saiki et al., 1988) には宝酒造のEx Taq DNAポリメラーゼを用いて、95°C 30秒、55°C 30秒、70°C 1分の温度サイクルを30回繰り返した。12Sと16S rRNA遺伝子の部分領域それぞれ約710塩基対と570塩基対の増幅には、次の2組のプライマーセットを用いた。12S: OMT16SF (5'-TGC CAG CCA CCG CGG TTA TAC G-3') と tRNA02 (5'-GGA TGT CTT CTC GGT GTA AG-3') (向井ほか, 2000, ただしOMT16SFについては3'末端の塩基を修正), 16S: L2510 (5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3') と H3080 (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3') (Palumbi et al., 1991)。PCR産物はアマシャムファルマシア社のExo-SAP Kitを用いて処理し、アプライドバイオシステムズ社のBigDye Terminator Kit ver. 2を用いてサイクルシーケンス反応をおこなった。塩基配列の決定にはABI PRISM 3100 Genetic Analyzerを用いた。得られた塩基配列はDDBJ/EMBL/GENBANKに登録した（アクセションナンバー AB095517–AB095531）。

塩基配列の多重アライメントにはCLUSTAL X (Thompson et al., 1997) を用いた。塩基置換の計数と塩基置換率 (*p*-distance) の推定は、PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) によって行った。系統解析にはPHYLIP ver. 3.6 プログラムパッケージ (Felsenstein, 2002) と PAUP* 4.0b10を用いた。遺伝距離はPHYLIPを用いて木村の2変数モデル (Kimura, 1980) によって計算し、それに基づいて近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) による系統樹の推定を行った。解析に用いたハプロタイプ間のTi/Tv比（結果と考察参照）から、遺伝距離の計算におけるTi/Tv比は2と10の二通りで計算した。最節約樹の探索はPAUP*のBranch-and-bound searchによって行った。系統樹の各枝における信頼性は、疑似データセットを1000回作出すことによるブーツストラップ確率として計算した。

結 果 と 考 察

本研究の予備的調査において相模川支流で採集されたドンコは、2001年10月7日に約20分間で2個体（全長3cmと5cm）、2002年2月16日に約60分間で5個体（全長3–5cm）、2002年4月6日に約120分間で40個体（全長3–12cm）が採集された。幼魚から成魚までが同一産地で見られたため、水産有用魚種の種苗に混入して放流されたものや、投棄された個体が偶然採集されたものではないと考えられる。この調査地点では、他にコイ科のアブラハヤ (*Phoxinus lagowskii steindachneri*)、オイ

カワ (*Zacco platypus*), ムギツク (*Pungtungia herzi*), ギンブナ (*Carassius auratus langsdorffii*), メダカ科のメダカ (*Oryzias latipes*), ハゼ科のトウヨシノボリ (*Rhinogobius* sp. OR) が確認された。これら6魚種のうち、少なくともムギツクの自然分布域は福井・滋賀・三重以西であり（川那部ほか, 2001），人為移植によるものと考えられる。

DNA解析については、本研究で得られた12Sと16S rRNA遺伝子のギャップ挿入前の相同領域は、12SrRNAが688–690塩基対、16SrRNAが546–549塩基対であった。これらの塩基配列について、CLUSTAL Xによる多重アライメントをおこなった結果、693塩基対と551塩基対の配列（合計1244塩基対）として明瞭に整列することができた。

各種および地域集団間の塩基置換率 (*p*-distance)をTable 1に示した。外群であるヨコシマドンコの塩基配列は解析に用いたドンコ属から大きく異なっており、塩基置換率にして15.6–16.2%の違いがあった。イシドンコとドンコの各ハプロタイプ間では5.6–6.7%，ドンコの地域集団（山陰・琵琶・伊勢グループ、東瀬戸グループ、西瀬戸グループ、西九州グループ）間では1.8–7.1%の違いがあった。ただし、山陰・琵琶・伊勢グループのmtDNAは、イシドンコを含む他のドンコ地域集団と大きく異なっており、それらに対して6.6–7.1%の違いがあった。一方、イシドンコは東瀬戸、西瀬戸、西九州の3グループに対して5.6–6.0%の違いしかなく、山陰・琵琶・伊勢グループよりも他のドンコと類似していた。東瀬戸、西瀬戸、西九州グループのmtDNAは相互に類似しており、0.6–2.0%の違いがあった。

各地域集団内では、東瀬戸グループに加古川水系産と三方湖産が含まれるが、それらの間では2–5カ所のトランジション型塩基置換（塩基置換率0.2–0.4%）の違いしかなかった。同一水系内では、滋賀県産（4個体）、加古川水系産（5個体）、甲突川産（3個体）、相模川水系産（3個体）のそれぞれについて、0–3カ所のトランジション型塩基置換（塩基置換率0–0.2%）が見られた。加古川水系では、川西と氷上の二地点の標本を用いているが、川西の4個体中3個体と氷上の1個体は同じハプロタイプであった。相模川水系産の塩基配列は重信川産のそれと酷似しており、2カ所のトランジション型塩基置換 (Ti)と1カ所のトランスバージョン型塩基置換 (Tv)（塩基置換率0.2%）の違いしかなかった。

こうした塩基配列間の遺伝距離を、木村の2変

数モデル (Kimura, 1980) によって計算し、近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) による系統樹の推定をおこなった。解析に用いたハプロタイプ間のTi/Tv比は2.0–11.0（12Sは1.0–7.5, 16Sは2.0–4.8）だったが、Ti/Tv比が2と10のどちらで計算した場合でも同じ樹形が得られた (Fig. 1)。また、12Sと16Sの各領域のみでハプロタイプ間の遺伝距離を計算したところ、12Sのほうが16Sよりも0–2.1（平均1.4）倍の進化速度が観察されたものの、得られた樹形は両領域をあわせたものと同じであった。さらに、最節約樹をPAUP*によって探索したところ、1本の最節約樹 (CI=0.90, HI=0.10, RI=0.84) が得られ、近隣結合法による樹形と完全に一致した。

これらの解析で得られた樹形では、ブーストラップ確率がやや低い(68%)ものの、山陰・琵琶・伊勢グループのドンコが最初に分岐し、次にイシドンコが分岐しており、「ドンコ」の単系統性が支持されなかった。Sakai et al. (1998) のアロザイム分析でも、近隣結合法による樹形は山陰・琵琶・伊勢グループが最初に分岐しており、本研究の結果とほぼ一致している。Sakai et al. (1998) およびSakai et al. (2002)において、アロザイム分析の結果として示されたUPGMA樹状図はイシドンコが最も遺伝的に異なることを示すが、島根県のごく一部にしか生息しないイシドンコは、過去にボトルネックを経ている可能性があり、アロザイム分析による遺伝距離が過大評価されているのかかもしれない。したがって、山陰・琵琶・伊勢グループがイシドンコと同等かそれ以上に他のドンコ地域集団から分化している可能性は充分にある。イシドンコは、ドンコ西瀬戸グループと同一水系内で共存しており、雑種由来の個体がごく少数しか見られないため（酒井ほか, 1999），生殖隔離機構が働いているものと推測されるが、山陰・琵琶・伊勢グループについても、他のドンコ地域集団との関係を検討する必要があるだろう。

今回採集された相模川水系のドンコは、西瀬戸グループに属する重信川産と塩基配列が酷似していた (Table 1, Fig. 1) ことから、九州北部から中国・四国地方西部に分布する西瀬戸グループの移入個体群であることが強く示唆される。関東地方におけるドンコの分布については、明仁親王 (1984) 以後、明仁ほか (2000) に至るまで「茨城県那珂湊市磯崎」が分布地としてあげられており、昭和初期の文献においても、ドンコの分布は「東京より長崎に至る地；琉球；支那」(田中, 1935)とされており、あるいは、青柳 (1957) において、

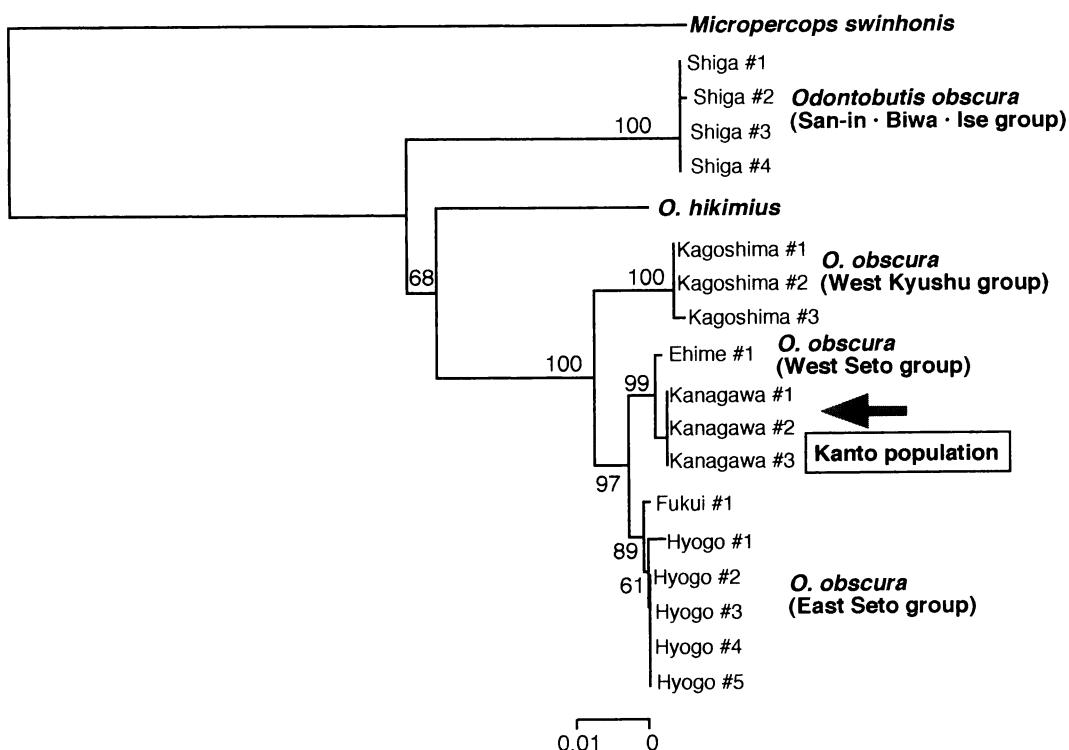


Fig. 1. A neighbor-joining tree based on the genetic distances estimated from the partial mitochondrial 12S and 16S rRNA gene sequences (total 1244bp) of 19 odontobutid gobies (17 *Odontobutis obscura*, 1 *O. hikimius* and 1 *Micropercops swinhonis*). The distances were estimated based on Kimura's two parameter model ($T_i/T_v=2.0$). Numbers beside internal branches indicate bootstrap probabilities based on 1,000 pseudoreplicates. Each operational taxonomic unit is named from sampling locality.

太平洋岸の分布北限地が利根川水系の「栃木県赤麻沼」で、「栃木高女蔵標本を筆者自身が確認した」とされている。しかし、古い文献についてはカワアナゴ類の誤同定の可能性も高く、茨城県産も「自然分布かどうか検討を要する」とされてい

る（岩田, 2001）。したがって、関東地方にはドンコは自然分布しておらず、これまでの分布記録も人為移植による可能性が示される。

近年、人為的な移植放流による遺伝的搅乱が問題視される種が増えており、その代表的な種とし

Table 1. Pairwise sequence differences (%: p -distance) of partial 12S and 16S rRNA genes among species and geographical groups of odontobutid gobies

Species/Group	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>M. swinhonis</i>	—						
2. <i>O. hikimius</i>	15.9	—					
3. SBI group	16.1–16.2	6.6–6.7	0–0.1				
4. ES group	16.0–16.1	5.6–5.7	6.6–6.8	0–0.4			
5. WS group	15.7	5.7	7.0–7.1	0.6–1.0	—		
6. WK group	16.0–16.2	6.0	7.0	1.8–2.0	2.0–2.1	0–0.2	
7. Kanto Population	15.6	5.7	7.1–7.2	0.8–1.1	0.2	2.1–2.3	0.0

SBI (San-in-Biwa-Ise), ES (East Seto), WS (West Seto) and WK (West Kyushu) are major geographical groups of *Odontobutis obscura*. 'Kanto Population' is a recently emerged population of *O. obscura* in Kanto District, Japan.

てメダカ (*Oryzias latipes*) が挙げられる。竹花・酒泉 (2002) では、mtDNA のシトクロム b 遺伝子の全塩基配列 (1141 塩基対) を全国各地から集めた多数のメダカについて決定し、メダカの地域的多様性を論じているが、関東地方の利根川・荒川水系のほとんどの個体群から、九州北部や瀬戸内地方に分布するハプロタイプが検出されるとしている。竹花・酒泉 (2002) の図 2 を参照すると、問題となるハプロタイプ群の分布は、Sakai et al. (1998) におけるドンコの東および西瀬戸グループの分布とほぼ一致しており、瀬戸内周辺地域の淡水魚が関東に持ちこまれ、放流されているというルートの存在が、これらの分子的証拠から示される。メダカ・ドンコともに水産的な利用はなされておらず、主に観賞魚としての流通に由来する個体の放逐がなされている可能性が高い。さらに、ドンコが定着している相模川水系では、その近傍にあった観賞魚店が倒産時に飼養していた魚類を投棄したという証言もある。

これまでの日本国内における淡水魚の意図的・非意図的移植放流としては、琵琶湖産アユの放流とそれに付随する琵琶湖淀川水系産魚類（カワムツ B 型、オイカワ、ハス、ゼゼラ、スゴモロコ、トウヨシノボリ）の分布拡大が指摘されてきたが（川那部ほか、2001），今後は、琵琶湖産アユへの混入以外の要因も考慮しなければならないだろう。こうした淡水魚の人為的移入ルートの特定には分子データが有効であり、淡水魚の地域的多様性を維持するためには、個々の魚種について地理的変異の概要を分子系統地理学的に記載し、遺伝的攪乱の要因となる移植ルートを特定することで、個々の分布攪乱要因への対策をとることが必要である。

謝 詞

本研究をおこなうにあたり、標本の採集と提供に御助力いただいた兵庫県立尼崎北高等学校の鈴木寿之氏と財団法人鹿児島県環境技術協会の米沢俊彦氏、採集に御協力いただいた北海道大学水産学部の篠崎敏彦氏と東京大学海洋研究所の神前悠治氏に厚く御礼申し上げる。また、相模川水系のドンコに関する採集調査の結果および標本を提供していただいた電気通信大学の白川晃氏に心より御礼申し上げる。

引 用 文 献

明仁親王. 1984. ドンコ. 益田 一・尼岡邦夫・荒賀

- 忠一・上野輝彌・吉野哲夫（編），p. 232. 日本産魚類大図鑑. 東海大学出版会，東京.
- 明 仁・坂本勝一・池田祐二・岩田明久. 2000. ハゼ亜目. 中坊徹次（編），pp. 1139–1310, 1606–1628. 日本産魚類検索：全種の同定. 第2版. 東海大学出版会，東京.
- 青柳兵司. 1957. 日本列島産淡水魚類総説. 大修館書店，東京，272 pp.
- Felsenstein, J. 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) ver. 3.6. University of Washington, Seattle.
- 川那部浩哉・水野信彦・細谷和海（編）. 2001. 日本の淡水魚, 改訂版. 山と渓谷社, 東京, 719 pp.
- 岩田明久. 2001. ドンコ. 川那部浩哉・水野信彦・細谷和海（編），pp. 558–560. 日本の淡水魚, 改訂版. 山と渓谷社, 東京.
- Iwata, A. and H. Sakai. 2002. *Odontobutis hikimius* n. sp.: A new freshwater goby from Japan, with a key to species of the genus. Copeia, 2002: 104–110.
- 川道美枝子・岩槻邦男・堂本暁子. 2001. 移入・外来・侵入種—生物多様性を脅かすもの. 築地書館, 東京. 321 pp.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16: 111–120.
- 向井貴彦・對比地孝亘・佐藤寅夫・森沢正昭. 2000. ミトコンドリア DNA によって識別される相模湾産タツノオトシゴの二型. 魚類学雑誌, 47: 139–143.
- 長田芳和. 1997. ニッポンバラタナゴ. 長田芳和・細谷和海（編），pp. 76–85. よみがえれ日本産淡水魚 日本の希少淡水魚の現状と系統保存. 緑書房, 東京.
- 日本魚類学会自然保護委員会（編）. 2002. 川と湖沼の侵略者ブラックバス—その生物学と生態系への影響. 恒星社厚生閣, 東京. 150 pp.
- 日本生態学会（編）. 2002. 外来種ハンドブック. 地人書館, 東京. 390 pp.
- Palumbi S. R., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillan, L. Stice and G. Grabowski. 1991. The simple fool's guide to PCR (ver. 2.0). University of Hawaii Press, Honolulu. 44 pp.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, R. Horn, K. B. Mullis and H. A. Frlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. Science, 239: 487–491.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol. Biol. Evol., 4: 406–425.
- Sakai, H., A. Iwata and H.-K. Byeon. 2002. Genetic relationships between Japanese and Korean *Odontobutis obscura* (Pisces, Odontobutidae). Biogeography, 4: 39–44.
- 酒井治己・田中善樹・辻井浩志・岩田明久・池田至. 1999. 遺伝的に著しく異なるドンコ2グループの高津川水系およびその近隣河川における分布. 魚類学雑誌, 46: 109–114.
- Sakai, H., C. Yamamoto and A. Iwata. 1998. Genetic divergence, variation and zoogeography of a freshwater goby *Odontobutis obscura*. Ichthyol. Res., 45: 363–376.
- 白川 晃. 2002. フィールドメモ, メモ6, 近郊の水辺,

- 移入魚巡りの冬. 都会の水辺：<http://homepage2.nifty.com/tokai-no-mizube/>.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (beta test version). Washington, Smithsonian Institute.
- 竹花佑介・酒泉 満. 2002. メダカの遺伝的多様性の危機. 遗伝, 56: 66–71.
- 田中茂穂. 1935. 改訂増補日本産魚類圖說. Vol. I–XV. 大地書院, 東京. 266 pp., 75 pls.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24: 4876–4882.