原著論文 Original Paper

核 DNA マーカーを用いたチチブとヌマチチブの種判別

谷 良夫¹・林 亮太朗¹・高田一翔¹・大路紘裕¹・入江祐樹¹・今村拓未¹・ 早川 祐¹・向井貴彦²

¹ 〒 660-0802 兵庫県尼崎市長洲中通 2 丁目 17-46 兵庫県立尼崎小田高等学校 ² 〒 501-1193 岐阜市柳戸 1-1 岐阜大学地域科学部

(2018年1月17日受付; 2019年1月28日改訂; 2019年1月28日受理; 2019年3月29日J-STAGE早期公開)

キーワード:チチブ属,遺伝子浸透,核 DNA,種判別, PCR-RFLP

魚類学雜誌 Japanese Journal of Ichthyology © The Ichthyological Society of Japan 2019 Yoshio Tani, Ryotaro Hayashi, Kazuto Takada, Kousuke Oji, Yuki Irie, Takumi Imamura, Yu Hayakawa and Takahiko Mukai*. 2019. Molecular identification of the closely related gobies *Tridentiger brevispinis* and *T. obscurus* using nuclear DNA markers. Japan. J. Ichthyol., 66(1): 43–52. DOI: 10.11369/jji.18-002.

Abstract Nuclear DNA (nDNA) markers were developed to distinguish between the closely related brackish water gobies Tridentiger brevispinis and T. obscurus. Although genetic differentiation of the two species has already been demonstrated by allozyme analysis in previous studies, the nucleotide sequences of mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes were similar and often shared by introgressive hybridization, obscuring the identification of the two species by mtDNA markers. In this study, one mtDNA gene [cytochrome b (cytb)] and four nuclear DNA gene regions [G protein-coupled receptor 85 (gpr85), ryanodine receptor 3 (ryr3), recombination activating protein 1 (rag1) and zic family member 1 (zic1)] were sequenced in 11 to 17 individuals, respectively, of T. brevispinis and T. obscurus, collected from the Mukogawa River, Hyogo Prefecture, Japan. The results for the mtDNA *cytb* region matched those of previous studies, the nucleotide sequences being very similar, with haplotypes shared among species. On the other hand, two (gpr85 and ryr3) of the four nDNA regions clearly differed between the two species, PCR-RFLP conducted on the former also showing specifically-different electrophoretic patterns. In order to confirm that nDNA PCR-RFLP could distinguish between the two species in other populations, additional samples of both from the Shonai River, Aichi Prefecture were subjected to and identified by the above method. In addition, eight individuals of putative F₁ hybrid identified by allozyme analysis (three diagnostic loci) were also investigated. Although six of the eight putative hybrids included heterozygotes at both of the two nDNA PCR-RFLP loci, two individuals were characterized by a heterozygotic pattern at one locus, homozygotic at the other, both individuals possibly being F_2 or backcross progeny, although initially misidentified as F_1 . The results indicated that nDNA markers may be helpful in distinguishing closely related Tridentiger species, which cannot be identified by mtDNA markers.

*Corresponding author: Faculty of Regional Studies, Gifu University, 1–1 Yanagido, Gifu 501–1193, Japan (e-mail: tmukai@gifu-u.ac.jp)

と科のチチブ属 Tridentiger は、内湾や河口の うればから河川・湖沼の淡水域に生息し、日本国内には7種が分布している(明仁ほか、 2013). その中のチチブ Tridentiger obscurus、ヌマ チチブ T. brevispinis、ナガノゴリ T. kuroiwaeの3

種は形態的に類似しており,チチブ類としてまと められるが,生息環境や体の色斑の相違などで区 別することができる(明仁親王,1987;明仁, 2018).また,これら3種が遺伝的に大きく分化 していることはアロザイム分析によって明らかに されている(Mukai et al., 1996). しかし, チチブ とヌマチチブの2種のミトコンドリアDNA (mtDNA)の系統関係は,種間の相違よりも両種 を含めた地理的な構造を反映しており,交雑によ る遺伝子浸透が広く生じた結果だと考えられてい る(Mukai et al., 1997;向井, 1999;向井・高橋, 2010). 実際に,両種の雑種は茨城県の涸沼など で確認されており,両種の間で遺伝子浸透が生じ ていることが示されている(向井, 1999; Mukai et al., 2000).

チチブとヌマチチブの不完全な生殖隔離は、魚 類の種分化のプロセスやメカニズムを研究する上 で好適な材料となりうるが(向井, 2001), 形態 的に類似した両種の判別に有効な DNA マーカー は得られていなかった. DNA マーカーによる魚 類の種判別は、一般的に mtDNA の塩基配列の違 いを用いた PCR-RFLP(制限酵素切断片長多型) やマルチプレックス PCR が用いられることが多 いが (Yamazaki et al., 2003; 馬渕 · 西田, 2006; Teletchea, 2009;山野上ほか, 2010), チチブとヌ マチチブは遺伝子浸透によって mtDNA の差異が 無いため、mtDNA を用いた種判別ができなかった. そのため、これまでは生鮮なサンプルを用いたア ロザイム分析による同定や雑種の判定が行われて きたが [溝口・岩田, 1987; Mukai et al., 1996; Mukai et al., 2000; 向井・西田, 2005; 林・久保 (溝 口)、2017, 両種を判別するためのアロザイム分 析には、眼球や肝臓等の酵素活性が強い生鮮な組 織を用いる必要があった.そのため、分析用試料 の長期的な保管・管理には超低温冷凍庫などが必 要で, DNA 解析用の試料保存(鰭等の一部のエ タノール保存)に比べて特別な設備やコストを要 することや、個体を生かした状態で種判別(ある いは雑種の判定)を行うことができないために生 態学的あるいは行動学的研究への応用が困難とい う問題があった.

そこで、本研究ではチチブとヌマチチブの、複数の核 DNA 領域の塩基配列を決定し、その上で PCR-RFLP による両種の核 DNA による判別方法 を開発したので、ここに報告する.

材料と方法

材料 核 DNA の塩基配列の決定に用いたチチ ブ類は,2016年10月18日から11月20日にかけ て兵庫県尼崎市の武庫川下流(河口から約4km 地点,34.719444N,135.383703E)と河口域(河口 から約2km, 34.698580N, 135.375801E)の2地 点で餌釣りによって採集した.合計17個体のチ チブ類を採集し, DNA解析用に左体側筋の一部 を100%エタノール中に保存した.標本は70%エ タノール水溶液中で保存し,明仁ほか(2013)に したがって形態的特徴に基づいて同定したが,エ タノール固定後に色斑等が不明瞭となって同定で きなかった個体は未同定とした.DNA抽出は, 体側筋の一部からキアゲン社のDNeasy Blood & Tissue Kit を用いて行った.

他地域産個体の PCR-RFLP による種判別の検証 は、2018年5月1日に愛知県名古屋市の庄内川下流 (河口から約17km地点, 35.211257N, 136.889905E) で採集したヌマチチブ8個体と河口干潟(35.078444N, 136.848960E) で採集したチチブ 12 個体から尾鰭の 一部を採取して行った. 尾鰭の一部は 99.5% エタ ノールで保存し、これらの個体は写真撮影後に採 集した場所に放流した.同定は現地で明仁ほか (2013) に従って行った. さらに, 雑種個体の PCR-RFLPによる判別の可能性についても検討す るため、Mukai et al. (2000) において乳酸脱水素 酵素 (LDH), オクタノール脱水素酵素 (ODH), スー パーオキシドディスムターゼ (SOD) の3つの酵 素のアロザイム電気泳動像からFi雑種と判定され た茨城県涸沼産の8個体について PCR-RFLP によ る遺伝子型の判別を行った. F₁ 雑種のサンプルは, 1996年から1997年に採集された個体の肝臓の一 部を 1.5 ml のマイクロチューブ中で 99.5% エタノー ルに浸漬し、-20℃から-30℃で保存していたも のである. これらの庄内川産チチブ類の鰭および 涸沼産雑種の肝臓から、倉敷紡績株式会社 (KURABO)のQuickGene-Mini80のDNA 組織キッ ト (DT-S) を用いて DNA を抽出した.

塩基配列の決定 DNA 増幅用プライマーの設計 は、Primer3 v. 0.4.0 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) (Untergasser et al., 2012)を用いて行った.国際塩基 配列データベース (INSDC) に登録されているチチ ブの cytochrome b (cytb) 遺伝子 (AB021255: Akihito et al., 2000),シマフリシマハゼ Tridentiger bifasciatus の G protein-coupled receptor 85 (gpr85) 遺伝子 (KF 416303: Agorreta et al., 2013), recombination activating protein 1 (rag1) 遺伝子 (KF 235440: Tornabene et al., 2013), zic family member 1 (zic1) 遺伝子 (KF416089: Agorreta et al., 2013), ryanodine receptor 3 (ryr3) 遺伝子 (KF642920: Gu and Chen, unpublished)の塩基配列を 用いて、それぞれの遺伝子領域の約 700-800 塩基 対 (bp)を増幅するプライマーセットを設計した.

Primer	Gene	Sequence (5'-3')	Expected fragment size (bp)
TOCYTB447F	cytb	TGCAACAGTTATTACAAACCTCCTCTCAGC	728
TOCYTB1174R	cytb	AGCTACTACTGCAGGCACTTTCAAGGAGTT	
TBGPR8521F	gpr85	TAAATTGACCTCTCTGGGTTTCATCATT	791
TBGPR85811R	gpr85	TCCTACTAATCCTCTTCTCCGTTTTGAA	
TBRAGI210F	ragl	AGACAGTGAACTAGATGACAGTGTGTGC	713
TBRAGI922R	ragl	CCCCTATTTCATCCTGAAAGATTTTGTA	
TBZIC194F	zic l	AAAATCAACCACAGCTCACACGATCT	704
TBZIC1797R	zic l	ACTCGGATGTGATTGACCAGTTTGTATT	
TBRYR354F	ryr3	GGGCCTCATTTCAAAGAAAGAGTTTCAG	732
TBRYR3785R	ryr3	AAGCCAGAGATCACCTCTTTAATGCTCA	

 Table 1. Primers for amplification and sequencing

各プライマーの塩基配列と予想される PCR 産物の サイズは Table 1 に示した.プライマーの合成は北 海道システム・サイエンス社に委託した.

PCR は、東洋紡社の KOD FX Neo を用いて、東 洋紡社のプロトコルに従って1サンプルあたりバッ ファー (10 µl), 蒸留水 (3.5 µl), 2mM dNTP (2 μl), ポリメラーゼ (KOD FX Neo) (0.3 μl), 10µM プライマー(各0.5 µl), ゲノム DNA (1.2 μl)を混合して反応液を 20 μl として行った. ゲ ノム DNA は抽出キットによって抽出した溶液を そのまま用いた.温度サイクルは、94℃2分の変 成後,98°C10秒,65°C30秒,68°C45秒の3ステッ プサイクルを40回繰り返し,68℃7分の伸長反 応後に 10℃ で保存した.アニーリング温度は必 要に応じて60℃に下げて行った。増幅された PCR 産物は北海道システム・サイエンス社に委 託して Forward 側と Reverse 側の両方向から塩基 配列を決定した.得られた塩基配列は目視でアラ イメントし, MEGA7 (Kumar et al., 2016) で塩基 配列差異の計算や系統樹の推定を行った.同一塩 基座位における波形の重複からヘテロと考えられ る座位については、国際純正・応用化学連合 (IUPAC)の核酸コードに従って表記し、そのま ま解析に用いた.本研究において系統樹の樹形は 重要ではないため、塩基配列の差異をシンプルに 反映した Jukes-Cantor モデル (Jukes and Cantor, 1969)で遺伝距離を推定し、近隣結合法(Saitou and Nei, 1987) で系統樹を作成した. 操作上の外 群として, gpr85 は Papuligobius ocellatus (KF416255: Agorreta et al., 2013), raglはシモフリシマハゼ (KF235440: Tornabene et al., 2013), zicl lt P. ocellatus (KF416040: Agorreta et al., 2013), ryr3はシモフリシ マハゼ (KF642920: Gu and Chen, unpublished) とア カオビシマハゼ*T. trigonocephalus*(KF642920:Gu and Chen, unpublished)の塩基配列を使用した.

PCR-RFLP チチブとヌマチチブの種判別につ いては、両種で塩基配列が明瞭に異なっていた *gpr85*と*ryr3*(結果参照)の PCR-RFLP を検討した. 使用する制限酵素は NEBcutter (http://nc2.neb.com/ NEBcutter2/) (Vincze et al., 2003)を用いて制限部 位を検索して選択した.制限酵素はタカラバイオ 株式会社の*Mse I*(認識配列TTAA)とNew England Biolabs社の*Bmg* BI(認識配列GACCAC) を購入し、各酵素に付属のプロトコルに従って反 応を行った.制限酵素で切断したサンプルにはミ ドリグリーンダイレクト(日本ジェネティクス社) を混合し、TAE バッファーを用いた 2% アガロー ス(Agarose S, ニッポンジーン社)で135 ボルト 18分の電気泳動を行った.その後にトランスイ ルミネーターで電気泳動像を確認した.

庄内川産のチチブとヌマチチブ,涸沼産の雑種 については、タカラバイオ株式会社の EmeraldAmp® PCR Master Mixを用いてPCRを 行った.温度サイクルは95°C1分の変成後,95°C 1分,55°C1分,72°C2分の3ステップサイクル を30回繰り返した.1サンプル辺りの反応液を 10μとして、タカラバイオ株式会社のプロトコ ルに従って蒸留水(2.5 μl),Master Mix(5 μl), 10 μMプライマー(各0.25 μl),ゲノムDNA(2 μl)を混合して反応を行った.ゲノムDNA(2 μl)を混合して反応を行った.ゲノムDNAは抽 出キットによって抽出した溶液をそのまま用いた. 制限酵素反応と電気泳動は武庫川産と同様に行っ たが、雑種の電気泳動像を明瞭に得るために3% アガロースを用いて100ボルト20分の電気泳動 とした.

結 果

塩基配列の決定のために用いた武庫川下流およ び河口域のチチブ類を形態的に同定した結果,下 流の12個体は2個体がチチブ,6個体がヌマチ チブとして同定できたが、4個体はエタノール固 定後の特徴が不明瞭だったために未同定とした. 河口域の5個体は形態的特徴に基づいてすべてチ チブとして同定できた(Table 2). これらの個体 の mtDNA については, 17 個体すべてについて cytb の部分塩基配列が決定できたため、向井・西 田(2005)で用いられたチチブ類のハプロタイプ と比較した. 向井・西田 (2005) のハプロタイプ と相同な 322 bp の塩基配列を比較した結果,武 庫川のチチブ類 17 個体からは I-A1, II-1, III-A2, III-B1と、II-1と1塩基のみ異なるハプロタイプ の合計5種類が見つかった.新たに見つかったハ プロタイプは「II-4」として国際塩基配列データ ベース (INSDC) に登録した (登録番号 LC360588). 各個体のハプロタイプは Table 2 に示 した. チチブと同定された7個体からは5種類す べてのハプロタイプが得られた. ヌマチチブと同 定された6個体はI-A1とII-1の2種類のみが得 られ、下流域で採集された未同定の4個体は I-A1 が1個体, II-1が2個体, II-4が1個体だった.

核 DNA については、決定したすべての塩基配

列を INSDC に 登録 した(登録 番号 LC360589– LC360647).本研究で塩基配列を決定した個体間 の変異部位については Appendix 1 に示した.4つ の核遺伝子領域のそれぞれについて近隣結合樹を 推定した結果, gpr85 と ryr3 においてチチブとヌ マチチブの間で明確な分化が見られた(Fig.1).

gpr85 は 17 個体すべてについて 444 bp の塩基 配列を決定し,そのうちの 3 塩基座位でヘテロ接 合の個体が見られた.近隣結合樹では,主にヌマ チチブから成るグループAと主にチチブから成 るグループBに分かれており,両グループ間で 3 bp の塩基配列の差異が見られた.形態的に未同 定 だった4個体のうち,個体番号 160036, 160037,160041 はヌマチチブのグループA,個体 番号 160032 はチチブのグループB に含まれた. 操作上の外群である Papuligobius ocellatus との間 には 7–9 bp の違いがあった.

ryr3 は、個体番号 160047 のサンプルを除く 16 個体について 608 bp の塩基配列を決定し、その うちの 2 塩基座位でヘテロ接合が 1 個体ずつ見ら れた.近隣結合樹では、gpr85 と同様にヌマチチ ブのグループA とチチブのグループ B に明瞭に 分かれており、両グループ間で 5 bp の塩基配列 の差異が見られた.形態的に未同定だった 4 個体 のうち、個体番号 160036, 160037, 160041 はヌ マチチブのグループA、個体番号 160032 はチチ

ID No.	Locality	Morphology	mtDNA	gpr85	ryr3
160025	lower reach	T. brevispinis	II-1	А	А
160026	lower reach	T. obscurus	II-4	В	В
160027	lower reach	T. obscurus	III-A2	В	В
160032	lower reach	unidentified	II-4	В	В
160036	lower reach	unidentified	II-1	А	А
160037	lower reach	unidentified	II-1	А	А
160038	lower reach	T. brevispinis	I-A1	А	А
160039	lower reach	T. brevispinis	I-A1	А	А
160041	lower reach	unidentified	I-A1	А	А
160042	lower reach	T. brevispinis	I-A1	А	А
160043	lower reach	T. brevispinis	I-A1	А	А
160044	lower reach	T. brevispinis	I-A1	А	А
160047	river mouth	T. obscurus	II-1	В	B*
160048	river mouth	T. obscurus	I-A1	В	В
160049	river mouth	T. obscurus	II-4	В	В
160050	river mouth	T. obscurus	III-A2	В	В
160051	river mouth	T. obscurus	III-B1	В	В

Table 2. Collection localities and genotypes of two Tridentiger species from the Mukogawa River, Hyogo Prefecture, Japan

* identified only by PCR-RFLP.

ブのグループBに含まれた.操作上の外群であるアカオビシマハゼとシモフリシマハゼとの間には 8-13 bp の違いがあった.

rag1 は, 個体番号 160032 と 160047 を除く 15 個体について 598 bp の塩基配列を決定し, その うちの 2 塩基座位でヘテロ接合の個体が見られた. 近隣結合樹では明確な 2 系統に分かれなかったが, チチブ 6 個体は 1 種類の対立遺伝子のホモ接合の みで,他はヌマチチブ(もしくは未同定個体)だっ た.操作上の外群のシモフリシマハゼとは 8–10 bp の違いがあった.

zicl は個体番号 160032 と 160047–160051 を除く 11 個体について 616 bp の塩基配列を決定し,そ のうちの4 塩基座位でヘテロ接合の個体が見られ た.チチブとヌマチチブの種間で差は見られなかっ た.操作上の外群の*P. ocellatus* とは 6–7bp の違い があった.

チチブとヌマチチブの種間で塩基配列が異なっ ていた gpr85 と ryr3 について,両種を区別可能な 制限酵素として,gpr85 には Mse I (グループ A の対立遺伝子を 178bp と 613bp に切断),ryr3 に は Bmg BI (グループ A を 241bp と 491bp に切断, グループ B を 326bp と 406bp に切断)を選択した. 武庫川産のチチブ類 17 個体すべてについて,そ れぞれの遺伝子領域の PCR 産物を各制限酵素で 切断した結果,すべて予測通りの電気泳動像が確 認できた.ただし,ryr3 を Bmg BI で切断した場 合には切断されていない PCR 産物のバンドが現 れることがあった.

武庫川産以外のチチブとヌマチチブとして,名 古屋市の庄内川産チチブ12個体とヌマチチブ8 個体について尾鰭の一部からDNAを抽出し,



Fig. 1. Neighbor-joining tree using nucleotide sequences of the *gpr85* (444 bp), *ryr3* (608 bp), *rag1* (598 bp) and *zic1* (633 bp) gene regions of two gobiid fishes, *Tridentiger brevispinis* (open circles), *T. obscurus* (closed circles) and morphologically unidentifiable individuals (asterisks). Nucleotide sequences of operational outgroups (*Papuligobius ocellatus*, *T. bifasciatus* and *T. trigonocephalus*) were cited from Agorreta et al. (2013), Tornabene et al. (2013) and Gu and Chen (unpublished).

gpr85 と ryr3 の 2 つの核遺伝子領域の PCR を行った. すべての個体で明瞭な増幅が見られたことから, それぞれ *Mse* I と *Bmg* BI で切断した結果, ヌマチチブはすべて武庫川のグループA と同じ 切断パターンであり, チチブはすべて武庫川のグ ループ B と同じ切断パターンになることが確認 できた (Fig. 2).

涸沼産の F₁ 雑種と推定される 8 個体について も同様に, すべてのサンプルで gpr85 と ryr3 の PCR 増幅に成功したため, PCR-RFLP のパターン を比較した. その結果, 6 個体は両方の核遺伝子 領域においてグループ A とグループ B で生じる DNA のバンドをすべて示した (Fig. 2). しかし,

a



b



Fig. 2. Agarose gel electrophoresis patterns resulting from the PCR-RFLP analysis using (a) gpr85 and (b) ryr3 gene regions, digested by *Mse* I and *Bmg* BI, respectively, for identification of *Tridentiger brevispinis*, *T. obscurus*, and their hybrids. M, 100bp molecular marker. Although the reason was unclear, undigested bands of ryr3 gene (732 bp) often appeared. Samples collected from the Shonai River, Aichi Prefecture (*T. brevispinis* and *T. obscurus*) and Lake Hinuma, Ibaraki Prefecture (F₁ hybrid).

1 個体は gpr85 でグループ A とグループ B の両方 のバンドを示したが, ryr3 はグループ A の切断 パターンのみを示した. もう 1 個体は gpr85 でグ ループ A の切断パターンのみを示し, ryr3 でグ ループ A と B の両方のバンドを示した. 実験は サンプルの順序を変えるなどして 2 回繰り返した が,同じ結果が得られた.

考 察

本研究では、兵庫県武庫川で採集したチチブ類 を用いて mtDNA の解析と核 DNA による種判別 方法の開発を行った.固定後の標本を同定できな かった武庫川産の4個体については、gpr85 と ryr3の2つの遺伝子領域で1個体はチチブ,残り 3個体はヌマチチブと同じ塩基配列を示したこと から(Table 2)、それぞれチチブとヌマチチブだっ たと考えられる.したがって、以後はこれらの個 体もチチブおよびヌマチチブとして扱う.

チチブとヌマチチブの mtDNA は種間交雑によ る遺伝子浸透によって系統的に分けられず、両種 が同じハプロタイプを共有することもある(Mukai et al., 1997; 向井・西田, 2005), 本研究でも, 武 庫川産のほとんどの個体が既報(向井・西田, 2005) と同じハプロタイプを持っており、さらに 両種が同じハプロタイプ(I-A1とII-1)を共有し ていた.これらのハプロタイプ間の塩基配列の差 異は小さく、本研究においてもチチブとヌマチチ ブをmtDNAで判別できないことが確認された. また,チチブとヌマチチブの mtDNA は本州太平 洋岸(サブグループI),西南日本(サブグルー プII),北日本(サブグループIII)の3つの地域 系統に分かれており、瀬戸内海はそれら3系統の 分布が重複する地域である(向井・西田, 2005). 本研究においても武庫川産の17個体から3つの 地域系統のハプロタイプ(各ハプロタイプ名のロー マ数字はサブグループを表す)が得られている. チチブとヌマチチブの mtDNA の地域系統が生じ た地史的要因は明らかではないが、武庫川を含む 瀬戸内海沿岸のチチブとヌマチチブの個体群は, 複数の地域からの自然移入によって成立したこと で様々な mtDNA を持つ遺伝的多様性の高い個体 群になっているものと考えられる.

核 DNA については,4つの遺伝子領域につい て武庫川産チチブとヌマチチブの塩基配列を決定 した.その結果,チチブとヌマチチブが明瞭に区 別できたのは,gpr85と ryr3の2つの遺伝子領域 のみであった. Mukai et al. (1996)のアロザイム 分析では,14 酵素遺伝子座についてチチブ属7 種を比較し、チチブとヌマチチブの間では4つの 遺伝子座で異なる対立遺伝子に固定していること を見出している.他の10遺伝子座で対立遺伝子 が共有されているのは、アロザイム電気泳動法の 対立遺伝子の識別能力の低さによる可能性も考え られるが、祖先多型の共有や遺伝子浸透、分子進 化速度の遅さ等によって対立遺伝子が共有されて いる遺伝子座もあると考えられる.したがって, 必ずしもすべての核遺伝子領域で2種が区別でき ることは想定されず、本研究で塩基配列を決定し た4領域のうちの gpr85 と ryr3 でのみ2種が区別 できたのは妥当な結果であると考えられる.

本研究で決定した武庫川産チチブとヌマチチブ の gpr85 と ryr3 の塩基配列は、両種の間で明瞭な 差異があったことから、PCR-RFLPによる種判別 を行った. 武庫川産のチチブとヌマチチブで塩基 配列を決定した個体については予想通りの明瞭な RFLP のパターンを得ることができた. さらに, 名古屋市の庄内川産のチチブとヌマチチブの判別 にも有効なことが確認できた. チチブとヌマチチ ブは汽水性もしくは両側回遊性の生活史を持ち (明仁, 2018), 仔魚期に沿岸海域を通じた分散が 可能であるため日本列島における地理的変異は少 ない (Mukai et al., 1996; 向井, 1999). また, チ チブとヌマチチブのmtDNAは3つの地域系統に 分けられるが、それぞれの地域系統の分布は重複 し、広範囲で同じハプロタイプが出現する(向井・ 西田, 2003). そのため, チチブ類の地理的変異 は小さく, 武庫川と庄内川以外の地域においても 核 DNA の PCR-RFLP が種判別に利用できると考 えられる.ただし、チチブとヌマチチブに地理的 変異が無いわけではなく、地域ごとに核遺伝子の 遺伝子浸透の程度にも差異がある可能性が考えら れるため、他の地域でもgpr85とryr3のPCR-RFLP のみで種判別が十分に可能かどうかは今後 の検討が必要である.

チチブとヌマチチブは低頻度ではあるが交雑し ていることが知られており(Mukai et al., 2000), 本研究における 2 つの核遺伝子領域の PCR-RFLP によって雑種の判定もできると考えられた.アロ ザイム分析によって F₁ 雑種と判定された関東地 方の茨城県涸沼産の個体を用いて検証した結果, 8 個体中の 6 個体が gpr85 と ryr3 の両遺伝子領域 でチチブとヌマチチブの RFLP パターンの両方を 同時に示し,これらの遺伝子領域で両種の対立遺

伝子を持つヘテロ接合であることが確認できた (Fig. 2). しかし、涸沼産の雑種のうち2個体は、 それぞれ gpr85 と ryr3 のいずれか一方のみがヘテ ロ接合であり、もう一方はヌマチチブの RFLP パ ターンであった.本研究で用いた涸沼産の雑種は, アロザイム分析によってチチブとヌマチチブの間 で対立遺伝子の置換が生じていることが示された 4つの遺伝子座のうち、明瞭な電気泳動像が得や すい LDH, ODH, SOD の3つの酵素の遺伝子座 で遺伝子型がヘテロ接合であることを確認した個 体である (Mukai et al., 2000). ただし, F₁ 雑種が 親種と戻し交雑した場合と F₁ 雑種同士の交配に よる F₂のいずれの場合においても、そこで生ま れる子供の1/8は3つの遺伝子座についてF1雑種 と同様のヘテロ接合となる. そのため, Mukai et al. (2000) においても F₁ 雑種と判定していた中 に戻し交雑の子孫(および F₂)が含まれること は想定されていた.ただし、F₁雑種の頻度が低 い(約2%)ためにF₂が生じることは非常に稀と 考えられる.本研究では涸沼産の雑種8個体につ いて、アロザイムの3遺伝子座に加えて gpr85 と ryr3の2遺伝子領域についても遺伝子型を判別し たため、合計5つの遺伝子座で遺伝子型の判定が 行われたことになる. そのため, 戻し交雑の子孫 (もしくは可能性は少ないが F₂)が、より正確に 判別できたものと考えられる.

これまでの研究では、遺伝的マーカーを用いた チチブとヌマチチブの種判別や雑種判定には生鮮 な個体や冷凍サンプルを必要とするアロザイム分 析が使われていたが、本研究によって核 DNA の PCR-RFLP を用いた種判別および、ある程度の雑 種判定が可能であることが示された. 雑種判定に おいては、2遺伝子領域のみではF1雑種と戻し 交雑などの判別に不十分だが、チチブとヌマチチ ブの交雑が生じている地域は限られており、戻し 交雑の頻度も高くないため(向井, 1999;Mukai et al., 2000), 簡易な種判別とF₁雑種(の可能性 の高い個体)の検出においては有用であると考え られる. さらに, 鰭の一部を用いるなど個体のダ メージを最小限に抑えた低侵襲的な DNA 解析に よる種判別は、両種の生殖隔離に関する生態や行 動などの研究に有用である.また,卵や仔稚魚の 識別については, mtDNA マーカーによって同属 のシマハゼ類や他のハゼ科魚類と識別した上で, 本研究で用いた核 DNAの PCR-RFLP などを組み 合わせることで判別が可能になるため、 今後は様々 な応用が可能であると考えられる.

謝 辞

本研究は主に文部科学省スーパーサイエンスハ イスクール(SSH)指定校として兵庫県立尼崎小 田高校で高校生(第2著者から第7著者)によっ て行われたものである.研究にあたって兵庫教育 大学教科教育実践開発専攻・理数系教育コースの 笠原 恵教授には多くのご助言をいただいた.庄 内川のチチブ類の採集にあたっては、矢田・庄内 川をきれいにする会の間野静雄氏,鵜飼 晋氏, 岐阜大学地域科学部の井原彩笑氏,安江一真氏に ご協力いただいた.また研究を進めるに当たって 多くの方々にお世話になった.ここに深く感謝する.

引用文献

- Agorreta, A., D. San Mauro, U. Schliewen, J. L. Van Tassell, M. Kovacic, R. Zardoya and L. Ruber. 2013. Molecular phylogenetics of Gobioidei and phylogenetic placement of European gobies. Mol. Phylogenet. Evol., 69: 619–633.
- 明仁. 2018. チチブ類. 中坊徹次(編・監修), pp. 408-409. 小学館の図鑑 Z 日本魚類館. 小学館, 東京.
- 明仁親王. 1987. チチブ類. 水野信彦・後藤 晃 (編), pp. 167–178. 日本の淡水魚類 その分布, 変異,種分化をめぐって. 東海大学出版会,東京.
- Akihito, A. Iwata, T. Kobayashi, K. Ikeo, T. Imanishi, H. Ono, Y. Umehara, C. Hamamatsu, K. Sugiyama, Y. Ikeda, K. Sakamoto, A. Fumihito, S. Ohno and T. Gojobori. 2000. Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b genes. Gene, 259: 5–15.
- 明仁・坂本勝一・池田祐二・藍澤正宏. 2013. ハ ゼ亜目. 中坊徹次(編), pp. 1347–1608, 2109– 2211. 日本産魚類検索 全種の同定 第三版. 東 海大学出版会, 秦野.
- 林 博之・久保(溝口)和子. 2017. 近畿地方に おけるチチブとヌマチチブのLdhタイプ. 南紀 生物, 59:192–195.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. Pages 21–132 in H. N. Munro, ed. Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol., 33: 1870–1874.
- 馬渕浩司・西田 睦. 2006. PCR 法を用いた琵琶 湖産野生型コイのミトコンドリア DNA の簡易識 別法.水産育種, 35: 19–23.
- 溝口和子・岩田勝哉. 1987. 和歌山県の周参見川 と富田川に生息する2型のチチブについて. そ

の背鰭棘長の周年変化と LDH 電気泳動像の比較. 和歌山大学教育学部紀要自然科学,36:49-61.

- 向井貴彦. 1999. チチブ属魚類の隔離と交雑によ る進化:「同種」と「別種」の間で. 松浦啓一・ 宮 正樹(編), pp.147–160. 魚の自然史 水中 の進化学. 北海道大学図書刊行会, 札幌.
- 向井貴彦. 2001. 魚類の種分化プロセスにおける 交雑と遺伝子浸透. 魚類学雑誌, 48:1–18.
- Mukai, T., K. Naruse, T. Sato, A. Shima and M. Morisawa. 1997. Multiregional introgressions inferred from the mitochondrial DNA phylogeny of a hybridizing species complex of gobiid fishes, genus *Tridentiger*. Mol. Biol. Evol., 14: 1258–1265.
- 向井貴彦・西田 睦. 2005. ヌマチチブ非在来個 体群におけるミトコンドリア DNA の地理的変異. 魚類学雑誌, 52:133–140.
- Mukai, T., T. Sato and M. Morisawa. 2000. Natural hybridization and gene flow between two *Tridentiger* gobies in Lake Hinuma (Ibaraki Prefecture, Japan). Ichthyol. Res., 47: 175–181.
- Mukai, T., T. Sato, K. Naruse, K. Inaba, A. Shima and M. Morisawa. 1996. Genetic relationships of the genus *Tridentiger* (Pisces, Gobiidae) based on allozyme polymorphism. Zool. Sci., 13: 175–183.
- 向井貴彦・高橋 洋. 2010. 種間交雑をともなう 系統地理:種の実態と分布域形成. 渡辺勝敏・ 高橋 洋(編), pp.137–152. 淡水魚類地理の自 然史 多様性と分化をめぐって. 北海道大学出 版会, 札幌.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406–425.
- Teletchea, F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. Rev. Fish Biol. Fisheries, 19: 265–293.
- Tornabene, L., Y. Chen and F. Pezold. 2013. Gobies are deeply divided: phylogenetic evidence from nuclear DNA (Teleostei: Gobioidei: Gobiidae). System. Biodivers., 11: 345–361.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm and S. G. Rozen. 2012. Primer3 new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res., 40: e115.
- Vincze, T., J. Posfai and R. J. Roberts. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res., 31: 3688–3691.
- 山野上祐介・馬渕浩司・澤井悦郎・坂井陽一・橋 本博明・西田 睦. 2010. マルチプレックス PCR 法を用いた日本産マンボウ属 2 種のミトコ ンドリア DNA の簡易識別法. 魚類学雑誌, 57: 27–34.
- Yamazaki, Y., A. Goto and M. Nishida. 2003. Mitochondrial DNA sequence divergence between two cryptic species of *Lethenteron*, with reference to an improved identification technique. J. Fish Biol., 62: 591–609.

ID No.	43	145	148	172	220	301
160036	т	D	C	р	C	C
160037	1	K	C	K	U	C
160038	T	D		А	G	С
160041	1	ĸ	C			
160039	Т	G	Y	R	G	С
160025	Т	C	C	D	C	C
160042		U	C	K	U	C
160043	Т			C	C	C
160044		1	G	C	G	G
160026						
160027						
160032	С					
160047		C	C	C		т
160048		G	C	G	A	
160049						
160050						
160051						

Appendix 1. Variable nucleotide positions of 4 nuclear gene regions of *Tridentiger brevispinis* and *T. obscurus*. Individual numbers same as in Table 2

gpr85

*** * **	
rvr	
	~

ID No.	8	33	192	210	288	300	357	450
160037 160038	Т	G	С	Т	С	С	Т	Т
160043	Т	G	С	Т	С	Y	Т	С
160044	Т	G	C	Т	C	Т	Т	C
160025 160036 160039 160041 160042	Т	G	С	Т	С	С	Т	С
160026 160027 160032 160048 160050 160051	С	Т	Т	С	С	С	С	Т
160049	C	Т	Т	С	Y	С	C	Т

Appendix (continued)

rag.	1
	-

-					
ID No.	317	431	440	470	
160036	V	C	т	т	
160043	Y		1	1	
160041	Y	C	Т	C	
160044	Y	C	Т	Y	
160037	С	С	Т	С	
160025	Т	C	т	C	
160038					
160039			1	C	
160042					
160026					
160027			С		
160048	C	G		C	
160049	C				
160050					
160051					

zic1

ID No.	57	276	423	609	610
160036	V	р	V	C	•
160038	I	ĸ	I	C	A
160039	Y	А	С	С	Α
160041	Y	R	Y	С	А
160042	V	D	C	C	
160044	Y	ĸ	C	C	A
160026	С	А	С	Y	G
160025					
160027	C	٨	C	C	
160037	C	A	U	C	A
160043					