

ミトコンドリア DNA の系統判別による岐阜県の 河川・ダム湖への琵琶湖産ウグイの侵入状況

井原彩笑¹・石崎大介²・向井貴彦¹

¹ 〒 501-1193 岐阜市柳戸 1-1 岐阜大学地域科学部

² 〒 514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577 三重大学大学院生物資源学研究科

(2019年5月9日受付；2020年5月25日改訂；2020年5月26日受理；2020年7月3日J-STAGE 早期公開)

キーワード：ウグイ, 国内移入, mtDNA, 系統判別, PCR-RFLP

魚類学雑誌
*Japanese Journal of
Ichthyology*

© The Ichthyological Society of Japan 2020

Sae Ihara, Daisuke Ishizaki and Takahiko Mukai*. 2020. Invasion of non-indigenous mtDNA haplotypes of Japanese dace *Tribolodon hakonensis* from the Lake Biwa water system to rivers and dam lakes in Gifu Prefecture, central Japan. *Japan. J. Ichthyol.*, 67(2): 159–170. DOI: 10.11369/jji.19-014.

Abstract Biological invasions by non-indigenous populations are one of the most serious problems for the conservation of genetic resources in natural environments, due to the likelihood of such populations becoming established and negatively impacting the genetic integrity of indigenous populations through hybridization and introgression. In central Japan, freshwater fish populations have been isolated by the Ibuki-Suzuka mountains between the Ise Bay basin (Gifu, Mie and Aichi prefectures on the eastern side of the mountains) and Lake Biwa water system (Shiga, Kyoto, Osaka and other prefectures on the western side), subsequently becoming genetically divergent. On the other hand, non-indigenous populations of freshwater fishes have been introduced to the rivers of the Ise Bay basin as a consequence of transplantation of commercially important Ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) being accompanied by other species from Lake Biwa. Because some serious genetic disturbance of some species has already been reported from the former system, it is necessary to clarify the magnitude of such invasions and introduce measures for the conservation of native populations. This study focused on Japanese dace, *Tribolodon hakonensis*, one of the most common local fishes, which exhibits genetic differentiation between the Ise Bay basin and Lake Biwa system populations. Due to the superficial similarity between Japanese dace and Ayu, a bycatch of the former has been transported with Ayu from Lake Biwa to the other areas. To understand the magnitude of invasions from Lake Biwa, the PCR-RFLP method was used to discriminate between indigenous and non-indigenous mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes of Japanese dace in Gifu Prefecture rivers of the Ise Bay basin. Non-indigenous mtDNA haplotypes (Lake Biwa types) were found to be highly abundant in dam reservoirs, while less so in rivers, suggesting that Lake Biwa dace more easily adapt to the lacustrine environment of dam reservoirs than to river environments.

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

外来種は、捕食や競争、病気の拡散などを通してその地域が本来持つ生物多様性や生態系に影響を及ぼす (Vitousek, 1990; Strayer et al., 2006; Lockwood et al., 2013). そのため、生物学的侵入は人間が引き起こす生態系に対する最も深

刻な脅威の一つであると考えられており、外来種の分布パターン、拡散の経路、遺伝的特徴などに関する多くの研究が行われている (Parker et al., 1999; 向井, 2007; Lockwood et al., 2013). しかし、その地域に本来分布しなかった外来種の侵入では

なく、他地域産の同種（亜種・地域個体群）の侵入は、遺伝的解析を行わなければ検出が難しく、現状についての解明が不十分である。外来の亜種や個体群の侵入は、導入先の地域で交雑による遺伝的攪乱を引き起こし、地域ごとに適合した対立遺伝子セットの喪失や適応度の低下といった悪影響を生じさせる可能性がある（Allendorf et al., 2001；Ryan et al., 2009；Schulte et al., 2012）。淡水魚の場合、それぞれの種や個体群は、地形、気候、そして歴史的過程の影響を強く受けた分布をしており、小さな地理的スケールの中でも遺伝的に分化している事例が知られている（渡辺ほか, 2006；渡辺・高橋, 2010；Ito et al., 2019）。そのため、淡水魚では人為的な移入による分布攪乱や遺伝的攪乱の影響が生じやすく、またその影響も他の動植物に比べて大きいと考えられる。

日本では、全国の内水面漁業や遊漁のために滋賀県琵琶湖産のアユ *Plecoglossus altivelis altivelis* の種苗が放流されており、そこに混入することで、さまざまな琵琶湖産淡水魚が分布を拡大している（川那部ほか, 2001；佐久間・宮本, 2005；松沢・瀬能, 2008；向井, 2018）。滋賀県に隣接する岐阜県においても、琵琶湖産アユの放流は長年にわたって行われており、ワタカ *Ischikauia steenackeri*, ハス *Opsariichthys uncirostris uncirostris*, カネヒラ *Acheilognathus rhombeus*, オオガタスジシマドジョウ *Cobitis magnostriata*, ギギ *Tachysurus nudiceps*, ビワヨシノボリ *Rhinodobius biwaensis* といった琵琶湖水系の魚種が外来種として侵入している（向井, 2019）。また、両県に分布する淡水魚の多くは約 100 万年前に隆起した伊吹一鈴鹿山地によって水系が隔てられることで遺伝的に分化しており、滋賀県（琵琶湖水系）産と岐阜県産の淡水魚は同種であっても遺伝的に識別可能なものが多い（Watanabe et al., 2017）。両県に共通して分布する在来淡水魚は 40 種以上に上るため（細谷, 2019；向井, 2019）、その多くで国内移入による遺伝的攪乱が生じていた場合、日本列島の生物多様性の保全において重大な問題であると同時に、はからずも同種の淡水魚の国内移入による影響を様々な魚種で比較検証できるモデル地域になっている。

これまで、琵琶湖水系から岐阜県側の水系に同種の淡水魚が移入していることは、ゼゼラ *Biwia zezera*（堀川・向井, 2007）、タモロコ属（タモロコ *Gnathopogon elongatus* とホンモロコ *G. caeruleus*）（Kakioka et al., 2013）、シロヒレタビラ *Acheilognathus tabira tabira*（梅村ほか, 2012）、イチモンジタナゴ *Acheilognathus cyanostigma*（Kitazima et al., 2015）、ヒ

ガイ属（カワヒガイ *Sarcocheilichthys variegatus variegatus* とビワヒガイ *S. v. microoculus*）（鈴木ほか, 2016）、オイカワ *Opsariichthys platypus*（Kitanishi et al., 2018）といった魚種でミトコンドリア DNA（mtDNA）をマーカーとして確認されてきた。これらの中で、シロヒレタビラとイチモンジタナゴは岐阜県内に数ヶ所しか生息地の残されていない希少タナゴ類であり、その数少ない生息地のすべてにおいて外来遺伝子の侵入が確認されている（梅村ほか, 2012；Kitazima et al., 2015）。すべての生息地が攪乱されている場合、外来個体群の定着要因等を比較検討するのは難しいが、他の魚種については外来遺伝子の侵入の程度が様々であり、外来遺伝子の定着と分布拡大の要因を地点間で比較検討できると考えられる。

外来個体群の定着成功については、導入圧（導入の頻度と個体数）と導入先の環境要因が影響するが（Lockwood et al., 2013）、これまでに調べられた魚種については、それらの要因がどのように影響しているのか明らかにされていない。希少タナゴ類以外の上記の魚種の中では、オイカワにおける琵琶湖型 mtDNA の侵入が著しく進んでおり、木曾三川（木曾川・長良川・揖斐川）のほとんどの調査地点で琵琶湖型 mtDNA が確認されている（Kitanishi et al., 2018）。オイカワは琵琶湖内および流入河川に広く多数生息する遊泳魚であり、細長い体型と銀色の体色がアユの若魚と似ているため、琵琶湖産アユ種苗に混入しやすいと考えられるが、そのことが導入圧の高さとなって広い範囲の侵入に成功したのか、あるいは木曾三川が琵琶湖産オイカワにとって定着しやすい環境条件を備えていたのかは明らかではない。

そこで本研究では、オイカワと同様に若魚の体型・体色がアユと類似し、琵琶湖産アユ種苗への混入の可能性があると考えられるウグイ *Tribolodon hakonensis* を対象として、琵琶湖水系産ウグイの岐阜県主要河川への侵入の状況を調査した。ウグイは岐阜県の多くの河川において上流域から下流域まで分布する普通種であり、琵琶湖水系産ウグイの侵入率の高い環境を明らかにすることで、ウグイの外来遺伝子の侵入・定着に関する要因を考察できる。日本産ウグイの mtDNA は 6 系統（TH1-6）に分かれることが明らかにされており、岐阜県を含む伊勢湾周辺域は TH4 系統、伊吹一鈴鹿山地を隔てた琵琶湖水系以西は TH5 系統が分布するとされている（Watanabe et al., 2018）。両系統は約 100 万年前に分岐したと推定

されており、塩基配列の差異に基づいて在来および外来遺伝子の特定が可能である。そこで、本研究では、DNA シーケンサーを用いた塩基配列決定を行わなくても岐阜県と琵琶湖以西の mtDNA 系統を簡便に判別できる PCR-RFLP を新たに開発した。ただし、Watanabe et al. (2018) で公表されているウグイの塩基配列 (*cytb* 遺伝子後半 758 bp) には、今回用いた制限酵素 (*Hae* III および *Hha* I) によって岐阜県産と琵琶湖以西産を判別できる制限部位は含まれていなかったため、一部の個体においては *cytb* 遺伝子の全長を含む 1,246 bp を増幅し、塩基配列を決定することで、先行研究と比較

して総合的な考察を行った。

材料と方法

材料 2008 年から 2019 年にかけて岐阜県の本曾川、長良川、揖斐川、庄川、神通川の 5 水系 25 地点（揖斐川下流の 1 地点のみ三重県）と滋賀県の琵琶湖水系 6 地点から合計 520 個体のウグイを採集し、mtDNA の判別に用いた (Table 1)。ウグイの国内移入の要因として養殖魚等の放流も考えられたため（橘川, 2005）、2018 年 5 月に栃木県的那珂川水系箒川で採集された 5 個体と

Table 1. Collection localities and distribution of two mtDNA types of Japanese dace *Tribolodon hakonensis* in Gifu, Mie and Shiga Prefectures, central Japan

Loc.	River / Reservoir	River system	City	Prefecture	N	Gifu type		Lake Biwa type		
						A1C1	A2C1	B1D1	B1D2	B2D1
1	Kamata R.	Jinzu R.	Takayama	Gifu	14	14	-	-	-	-
2	Shimo-Odori Reserv.	Jinzu R.	Hida	Gifu	13	2	-	11	-	-
3	Miyagawa R.	Jinzu R.	Takayama	Gifu	2	2	-	-	-	-
4	Daihachiga R.	Jinzu R.	Takayama	Gifu	20	16	-	4	-	-
5	Miboro Reserv.	Shokawa R.	Takayama	Gifu	28	13	-	18	-	-
6	Akigami Reserv.	Kiso R.	Takayama	Gifu	27	7	4	16	-	-
7	Iwaya Reserv.	Kiso R.	Gero	Gifu	21	2	-	19	-	-
8	Wara R.	Kiso R.	Gujo	Gifu	30	20	10	-	-	-
9	Shirakawa R.	Kiso R.	Shirakawa	Gifu	44	26	18	-	-	-
10	Kurokawa R.	Kiso R.	Shirakawa	Gifu	7	5	2	-	-	-
11	Hida R.	Kiso R.	Hichiso	Gifu	30	18	8	4	-	-
12	Tsukechi R.	Kiso R.	Nakatsugawa	Gifu	6	6	-	-	-	-
13	Kiso R.	Kiso R.	Nakatsugawa	Gifu	8	7	1	-	-	-
14	Kiso R.	Kiso R.	Minokamo	Gifu	34	25	3	6	-	-
15	Yoshida R.	Nagara R.	Gujo	Gifu	13	8	5	-	-	-
16	Kibishima R.	Nagara R.	Gujo	Gifu	1	1	-	-	-	-
17	Itadori R.	Nagara R.	Seki	Gifu	10	6	4	-	-	-
18	Tsubogawa R.	Nagara R.	Seki	Gifu	34	24	2	8	-	-
19	Nagara R.	Nagara R.	Seki	Gifu	33	31	2	-	-	-
20	Nagara R.	Nagara R.	Gifu	Gifu	49	46	3	-	-	-
21	Neo-nishidani R.	Ibi R.	Motosu	Gifu	3	3	-	-	-	-
22	Neo R.	Ibi R.	Motosu	Gifu	12	10	2	-	-	-
23	Yokoyama Reserv.	Ibi R.	Ibigawa	Gifu	16	15	1	-	-	-
24	Kuze Reserv.	Ibi R.	Ibigawa	Gifu	1	1	-	-	-	-
25	Ibi R.	Ibi R.	Kuwana	Mie	2	2	-	-	-	-
26	Sugaura	Lake Biwa	Nagahama	Shiga	8	-	-	8	-	-
27	Ane R.	Lake Biwa	Nagahama	Shiga	4	-	-	4	-	-
28	Lake Biwa	Lake Biwa		Shiga	8	-	-	8	-	-
29	Inukami R.	Lake Biwa	Hikone	Shiga	6	-	-	5	1	-
30	Ishida R.	Lake Biwa	Takashima	Shiga	24	-	-	24	-	-
31	Harihata R.	Lake Biwa	Takashima	Shiga	12	-	-	11	-	1
Total					520	310	65	146	1	1

A1C1, A2C1, B1D1, B1D2 and B2D1 are PCR-RFLP haplotypes based on electrophoretic pattern (see Fig. 1)

2018年7月に長野県佐久市の養魚場で購入した7個体も比較に用いた。栃木県と長野県では昔からウグイを食用にしており、養殖や種苗生産も盛んであるため(川尻, 1956; 斎藤, 1979; 信州魚貝類研究会・行田, 1980; 中村, 1999), ウグイの国内移入の原因となる可能性がある地域として選定した。野外での採集は, 当該河川の漁業協同組合員による採集, 釣り券の購入による釣獲, 特別採捕許可による採集等によって, 各自治体の内水面漁業調整規則等を遵守して行った。採集した個体は約-20°Cで冷凍保存, もしくは, 現地で右腹鰭の一部を99.5%エタノール中に保存し, 捕獲した魚は採集した場所に放流した。

PCR-RFLP 本研究では, *cytb* 遺伝子の全長を含む mtDNA の1,246 bpを増幅するプライマーとして L14690-Cb-AH (5'-GGT CAT AAT TCT TGC TCG GA-3') および H15913-Thr-AH (5'-CCG ATC TTC GGA TTA CAA GAC CG-3') (梅村ほか, 2012) を使用して, PCR-RFLP による岐阜在来系統と琵琶湖系統の mtDNA の判別を行った。予備実験として岐阜県, 三重県, 滋賀県のウグイ 15 個体について当該領域の塩基配列を決定し, 琵琶湖産と岐阜県産で切断部位の異なる *Hae* III (認識配列 GGCC) および *Hha* I (認識配列 GCGC) の2種類の制限酵素を選択した。

ゲノム DNA の抽出は, キレックス®100 樹脂 (バイオ・ラッド社) による全ゲノム DNA の簡易抽出法 (Walsh et al., 1991), もしくは倉敷紡績株式会社 (KURABO) の QuickGene-Mini80 の DNA 組織キット (DT-S) によって行った。PCR は, 上述のプライマーを用いてタカラバイオ株式会社の EmeraldAmp® PCR Master Mix によって行った。温度サイクルは 95°C 1 分の変成後, 95°C 1 分, 55°C 1 分, 72°C 2 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 20 µl 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 (7 µl), Master Mix (10 µl), 10 µM プライマー (各 0.5 µl), ゲノム DNA (2 µl) を混合して反応を行った。ゲノム DNA は抽出した溶液をそのまま用いた。PCR 増幅後, 反応液を 10 µl ずつに分け, それぞれに *Hae* III (タカラバイオ株式会社) と *Hha* I (ニューイングランドバイオラボ社) を各メーカー付属のプロトコルに従って酵素に付属のバッファーとともに加え, 37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後の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 3% アガロース (Agarose S, ニッポンジーン社) で 100 ボルト 20 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, デジタルカメラで撮影した。得られた電気泳動像に基づいて, PCR-RFLP によるハプロタイプ (RFLP 型) を判別した。

系統解析 PCR-RFLP によって判別された各 RFLP 型の属する系統を確認するため, 岐阜県の 6 地点 35 個体, 三重県の 1 地点 2 個体, 滋賀県の 3 地点 6 個体, 長野県佐久市の養魚場産 7 個体, 栃木県の箒川産 5 個体の合計 55 個体 (予備実験で用いた 15 個体を含む) について塩基配列を決定した。塩基配列の決定は Kitanishi et al. (2016) に従って PCR-RFLP と同じプライマーセットを用いて行った。得られた塩基配列は, Clustal W (Larkin et al., 2007) でアライメントし, MEGA7 (Kumar et al., 2016) で塩基配列差異の計算を行うことでハプロタイプ (塩基配列型) を判別した。各塩基配列は国際塩基配列データベース (INSDC) に登録した (登録番号 LC474930-474955)。得られた塩基配列は, エゾウグイ *Tribolodon sachalinensis* (INSDC 登録番号 AB626856: Imoto et al., 2013) を操作上の外群として, Watanabe et al. (2018) におけるウグイのハプロタイプ h01-h68 [ffish.asia (<https://ffish.asia/>) から fasta 形式データを取得] とともにアライメントし, 相同領域のみを用いて近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) による系統樹の推定を行った。遺伝距離の推定は木村の2変数モデル (Kimura, 1980) を用いて行った。樹形の信頼性は 1,000 回のブーツストラップ反復によって推定した。

結 果

岐阜県, 三重県, 滋賀県の 520 個体のウグイについて, *Hae* III と *Hha* I の2種類の制限酵素で PCR-RFLP を行った結果, *Hae* III で 4 種類 (A1, A2, B1, B2), *Hha* I で 3 種類 (C1, D1, D2) の切断パターンが得られた (Fig. 1)。それぞれの切断パターンの組み合わせから, RFLP 型として 5 種類 (A1C1, A2C1, B1D1, B1D2, B2D1) が判別された。各 RFLP 型の塩基配列を 1-20 個体について決定した結果 (詳細は後述), 電気泳動像から予想されるサイズの DNA 断片を生じる位置に制限部位があることが確認できた (Fig. 2)。

RFLP 型 A1C1 と A2C1 は岐阜県と三重県のウグイのみから得られたため岐阜在来型と考えられた。A1C1 は県内すべての地点で見られたが,

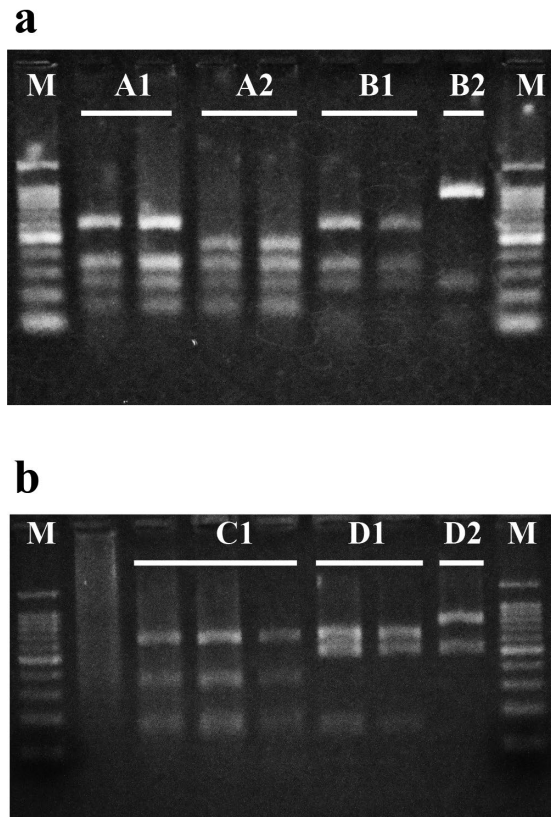


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns of PCR-RFLP method using tRNA-Glu to tRNA-Thr gene regions (1246 bp) including complete *cytb* gene sequence, digested by (a) *Hae* III and (b) *Hha* I for identification of indigenous and non-indigenous mtDNA types of *Tribolodon hakonensis* in Gifu Prefecture, Japan. M, 100-bp molecular marker.

A2C1 は太平洋側の水系（木曾川水系，長良川水系，揖斐川水系）のみに分布し，日本海側の水系（地点 1–5：神通川水系と庄川水系）には分布しなかった。一方，滋賀県産ウグイで見られた RFLP 型のほとんどは B1D1 であり，B1D2 と B2D1 はそれぞれ滋賀県の犬上川と針畑川で各 1 個体見られたのみだった。

A1C1 と A2C1 を岐阜在来型，B1D1，B1D2，B2D1 を琵琶湖型と仮定した場合，岐阜県 25 地点（三重県の揖斐川 1 地点含む）の中で，琵琶湖型 mtDNA は 8 地点から見つかった（Table 1, Fig. 3）。そのうち 4 地点は飛騨地方のダム湖であり，琵琶湖型の頻度が 59.3–90.5% と多く，残り 4 地点の河川では琵琶湖型の頻度が 13.3–23.5% とダム湖に比べて有意に少なかった（Wilcoxon の順位和検定 $P < 0.05$ ）。

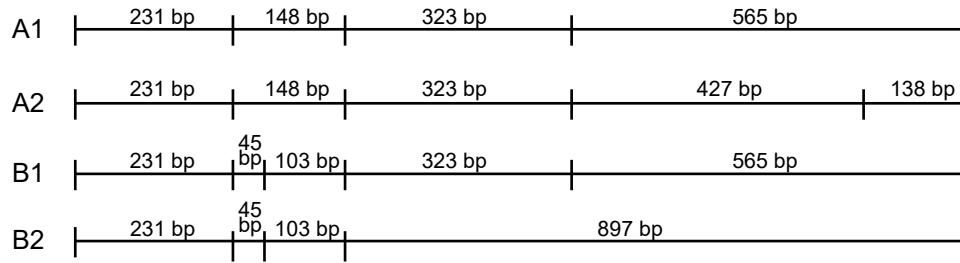
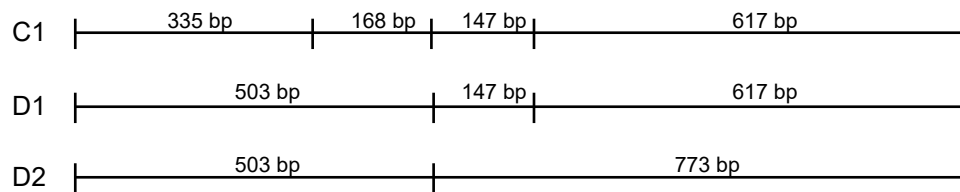
次に，各 RFLP 型について，A1C1 から 20 個体，A2C1 から 3 個体，B1D1 から 18 個体，B1D2 と

B2D1 から各 1 個体の塩基配列を決定した。また，長野県佐久市の養魚場産 7 個体と栃木県箒川産 5 個体についても塩基配列を決定し，これら 55 個体の相同な塩基配列 1019 bp を比較した結果，26 種類のハプロタイプが得られた（Table 2）。岐阜在来型とした RFLP 型のうち，A1C1 からは 7 種類の塩基配列によるハプロタイプ（g01–07），A2C1 からは 1 種類のハプロタイプ（g08），B1D1 からは 8 種類のハプロタイプ（g09–12, b01–4），B1D2 と B2D1 からはそれぞれハプロタイプ b05 と b06 が得られた。岐阜県で見つかった琵琶湖型の B1D1 から得られた 7 種類のハプロタイプのうち 3 種類は琵琶湖産と同じであった。長野県の養魚場からは 6 種類のハプロタイプ（n01–05, t01），栃木県箒川からは 4 種類のハプロタイプ（n02, t01–03）が得られ，ハプロタイプ n02 と t01 は長野県と栃木県の両方で見られた。

これらのハプロタイプが，ウグイのどの地域系統に属するかを判定するために，Watanabe et al. (2018) のハプロタイプ h01–h68 とともに系統解析を行った。本研究の 26 種類のハプロタイプと Watanabe et al. (2018) の 68 種類のハプロタイプで相同な 715 bp の塩基配列を用いて近隣結合樹を推定した結果（Fig. 4），本研究で見出した 26 種類のハプロタイプのうち 14 種類は，Watanabe et al. (2018) のハプロタイプと一致した。岐阜在来型とした RFLP 型 A1C1 から得られたハプロタイプは TH3 と TH4 の 2 系統を含んでいた。A2C1 のハプロタイプは TH4 系統であった（Table 2）。また，琵琶湖型とした RFLP 型 B1D1，B1D2，B2D1 のハプロタイプはすべて TH5 系統に含まれた（Table 2）。長野県の養魚場産と栃木県箒川産のウグイのハプロタイプには TH2 と TH3 の 2 つの系統があり，それぞれの塩基配列から推定される RFLP 型は TH3 系統が A1C1，TH2 系統が B1D1 だった（Table 2）。

考 察

PCR-RFLP による系統判別 本研究では，2 種類の制限酵素（*Hae* III と *Hha* I）を用いて岐阜県と滋賀県のウグイの PCR-RFLP を比較した。両県の水系は約 100 万年前に隆起した伊吹—鈴鹿山地によって隔てられており，そのため両県は地理的に隣接するにも関わらず，その地域間でさまざまな淡水魚の遺伝的分化が生じている（Watanabe et al., 2017）。ウグイの場合も，両地域間で異なる

Hae III**Hha I**

Reference sequence (758 bp) from Watanabe et al. (2018)

Fig. 2. PCR-RFLP maps of each digestion pattern in Fig. 1. Cleavage positions and DNA fragment lengths estimated from nucleotide sequences determined in this study (Table 2).

mtDNA 系統が分布することが知られており (Watanabe et al., 2018), 本研究でも岐阜県側の多くの個体の RFLP 型 (A1C1 と A2C1) は, 滋賀県側では全く見つからなかった. この RFLP 型を岐阜県由来型と仮定し, その中の 23 個体について塩基配列を決定した結果, Watanabe et al. (2018) において岐阜県 (および紀伊半島南部) 以東に分布するとされた TH3 と TH4 の 2 系統であることが確認できた (Table 2, Fig. 4).

一方, 滋賀県側のほとんどの個体が示した RFLP 型 B1D1 は, 岐阜県側の 8 地点 86 個体からも見つかった. B1D1 の 20 個体の塩基配列を同様に決定した結果, いずれも Watanabe et al. (2018) において滋賀県以西に分布するとされた TH5 系統であることが確認できた. 岐阜県内で見つかった B1D1 の塩基配列には滋賀県の琵琶湖水系産と同一のハプロタイプも複数見られたことから (Table 2), 岐阜県側に分布する RFLP 型 B1D1 は, 琵琶湖水系からの人為的な移入に由来するものと考えられた.

ただし, 長野県産および栃木県産ウグイの塩基配列を決定し, 制限酵素の認識部位を比較した結

果, *Hae III* と *Hha I* を用いた PCR-RFLP は, 岐阜県以外の地域における国内移入の判定には有効でないことが示された. 少なくとも, 本研究で塩基配列を決定した長野県と栃木県の TH2 系統のハプロタイプの多くは PCR-RFLP で B1D1 となるため, 琵琶湖水系産と区別することはできない. TH2 系統は関東地方から東北地方太平洋岸に分布するとされる地域系統であり (Watanabe et al., 2018), その地域において琵琶湖水系産ウグイの人為的移入を調査する場合は, その地域の在来系統と琵琶湖系統を判別可能な別の制限酵素を検討するか, あるいは調査対象とする個体の塩基配列を決定して系統判別を行う必要があると考えられる.

琵琶湖水系産ウグイの人為的移入 本研究では, 岐阜県内の 25 地点 (隣接する三重県桑名市の揖斐川下流 1 地点を含む) で採集したウグイを調査し, ダム湖 4 地点と河川 4 地点の計 8 地点で琵琶湖型 mtDNA を確認した. これまでに同地域で琵琶湖水系からの外来 mtDNA の侵入が確認されている魚種として, ゼゼラ (堀川・向井, 2007), タモロコ属 (Kakioka et al., 2013), シロヒレタビ

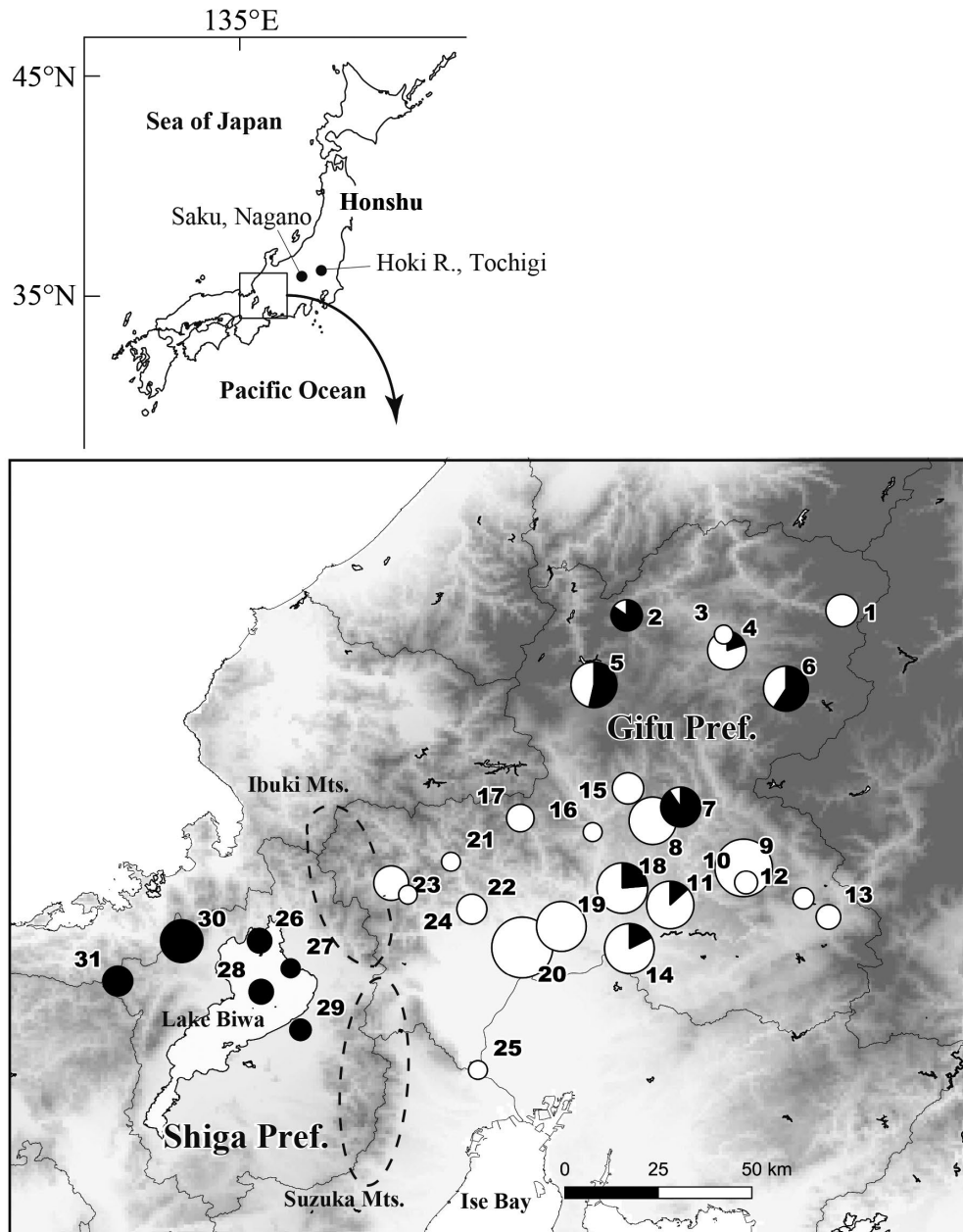


Fig. 3. Geographical distribution of mtDNA types of *Tribolodon hakonensis* in Gifu, Mie and Shiga Prefectures. Black portion of graph indicates Lake Biwa type (putative non-indigenous type in Gifu); white portion indicates Gifu type. Locality numbers and sample sizes in Table 1.

ラ (梅村ほか, 2012), イチモンジタナゴ (Kitazima et al., 2015), ヒガイ属 (鈴木ほか, 2016), オイカワ (Kitanishi et al., 2018) が挙げられる。これらの魚種と比較した場合、岐阜県における琵琶湖水系産ウグイの侵入地点は必ずしも多くはなかった。これまでに岐阜県内で琵琶湖水系からの外来 mtDNA の侵入が広く調べられているのは、オイカワ、ゼゼラ、ヒガイ属の3分類群であり、オイ

カワの場合、木曾川流域 (長良川・揖斐川を含む) の36地点中33地点 (調査地点の91.7%) で琵琶湖型 mtDNA が確認されている (Kitanishi et al., 2018)。一方、ゼゼラの場合は岐阜県美濃地方から三重県桑名市までの9地点中3地点 (調査地点の33.3%) で琵琶湖型 mtDNA が確認されており (堀川・向井, 2007), ヒガイ属については木曾川流域の21地点中5地点 (調査地点の23.8%) で琵琶

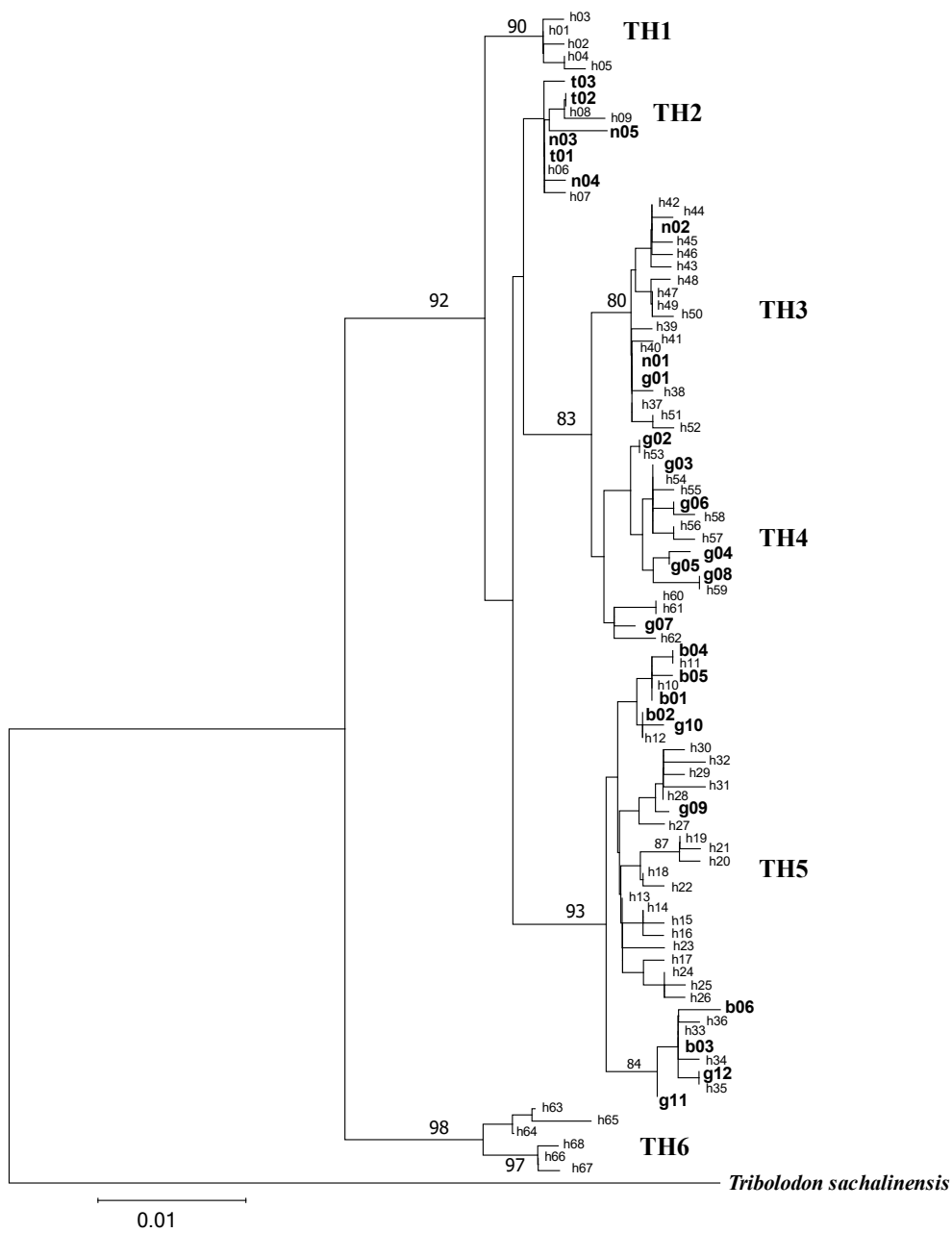


Fig. 4. Neighbor-joining tree based on nucleotide sequences of *cytb* gene regions of *Tribolodon hakonensis*. Twenty-six haplotypes (g01–12, n01–05, t01–03 and b01–06; INSDC Accession Nos. LC474930–474955) sequenced in this study; 68 haplotypes (h01–68) taken from Watanabe et al. (2018). To estimate the tree, 715 bp homologous nucleotide positions between the two studies were used. Distances were based on Kimura's two parameter distance and calculated using MEGA7 (Kumar et al., 2016). Numbers adjacent to internal branches indicate bootstrap probabilities (> 80%) based on 1,000 pseudoreplicates. Scale bar indicates genetic distance. Nucleotide sequence of operational outgroup (*T. sachalinensis*) cited from Imoto et al. (2013). Lineages TH1–6 were identical to haplotype groups in Watanabe et al. (2018).

Table 2. PCR-RFLP and nucleotide sequence haplotypes of *Tribolodon hakonensis* in central Japan

Loc.	River / Reservoir	Pref.	RFLP												BID2	B2D1													
			TH3			TH4			TH2			TH5																	
			g01	n01	n02	g02	g03	b06	g04	g05	g06	g07	g08	n03	n04	n05	t01	t02	t03	g09	g10	g11	g12	b01	b02	b03	b04	b05	b06
2	Shimo-odori Reserv.	Gifu	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	1	1	2	4	-	-	-
4	Dathachiga R.	Gifu	4	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Iwaya Reserv.	Gifu	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
9	Tsukechi R.	Gifu	6	-	-	-	-	-	1	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Nagara R.	Gifu	8	-	-	-	3	-	-	1	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Kuze Reserv.	Gifu	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Ibi R.	Mie	2	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Ane R.	Shiga	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-
26	Inukami R.	Shiga	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
28	Harihata R.	Shiga	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
-	Fish farm, Saku city	Nagano	7	-	1	2	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	Hoki R.	Tochigi	5	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	1*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total			55	4	1	3	1	5	1	1	4	4	1	3	1	1	3	1	1	1	2	1	1	2	3	7	1	1	1

Lineage names from Watanabe et al. (2018). Nucleotide sequence haplotypes (g01–12, n01–05, t01–03 and b01–06) determined from 1019 bp of *cytb* gene and deposited in INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration) (accession numbers: LC474930–474955). *, nucleotide sequence of t03 haplotype had an additive restriction site on BID1

琵琶湖型 mtDNA が確認されている（鈴木ほか、2016）。本研究のウグイの場合、琵琶湖型 mtDNA の侵入地点数は 25 地点中 8 地点（32.0%）であり、オイカワの琵琶湖型 mtDNA の侵入地点に比べて少なく、ゼゼラやヒガイ属と同程度であった。琵琶湖産アユ種苗への混入に由来すると考えられる他の外来魚種として、ワタカ、カネヒラ、ハス、ギギ、オオガタスジシマドジョウ、ビワヨシノボリが岐阜県内に侵入していることが知られており、いずれも県内のさまざまな河川やダム湖で分布が確認されている（向井、2019）。そのため、岐阜県では琵琶湖産のさまざまな魚種の侵入が広く生じており、特にオイカワやウグイのように体型・体色がアユの若魚に類似した魚種は、放流用のアユ種苗に混入して広く侵入していると考えられる。それにも関わらず、オイカワに比べてウグイの琵琶湖型 mtDNA の分布が限定されていることは、それぞれの種の外来遺伝子の定着が、導入圧の違いよりも導入先の環境要因によって影響を受けている可能性を示している。

琵琶湖産淡水魚の侵入と定着に関する環境要因としては、ダム湖の有無が影響していることが考えられる。オイカワの場合、一般化線形モデルによって琵琶湖型 mtDNA の頻度と相関する環境要因を選択した結果、ダム湖の存在が琵琶湖型 mtDNA の頻度と正の相関を持つことが示された（Kitanishi et al., 2018）。ゼゼラとヒガイ属においても、ダム湖が多い木曾川水系には琵琶湖型 mtDNA が多い傾向にあった（堀川・向井、2007；鈴木ほか、2016）。本研究においても、4 地点のダム湖〔下小鳥ダム湖（地点番号 2）、御母衣ダム湖（地点番号 5）、秋神ダム湖（地点番号 6）、岩屋ダム湖（地点番号 7）〕におけるウグイの琵琶湖型 mtDNA の頻度が著しく高かった（59.3–90.5%）。また、河川で琵琶湖型 mtDNA が見られた 4 地点のうち 2 地点〔飛騨川（地点番号 11）、木曾川（地点番号 14）〕は、秋神ダムや岩屋ダム（いずれも木曾川支流の飛騨川水系）の下流にあたる地点であり、また飛騨川水系には発電用のダム（堰）が 18 基（本川だけで 13 基）あるため、琵琶湖型 mtDNA を持つ個体が定着しやすい可能性がある。

ただし、揖斐川上流の横山ダム湖（地点番号 23）と、その直下の久瀬ダム湖（地点番号 24）では琵琶湖型 mtDNA は見られなかった。横山ダム湖については、琵琶湖固有種のビワヨシノボリが侵入して定着しており（向井ほか、2015）、オ

イカワは琵琶湖と同じ西日本系統の mtDNA のみが分布しているため（Kitanishi et al., 2018）、琵琶湖産淡水魚の侵入が生じているのは明らかである。それにもかかわらず、横山ダム湖でウグイの琵琶湖型 mtDNA が確認できなかったのは、ダム湖においても琵琶湖産ウグイの定着（もしくは琵琶湖型 mtDNA の増加）が起きにくい場合があることが示唆される。

また、ダム湖とダム湖下流以外では、ほとんどの地点でウグイの琵琶湖型 mtDNA は見られなかった。琵琶湖型 mtDNA の頻度が高い岩屋ダム湖（地点番号 7）と地理的に近く、ダム湖下流の馬瀬川に合流する和良川（地点番号 8）においても、合流点から約 7 km 上流で採集された 30 個体の中に琵琶湖型 mtDNA は見られなかった。和良川漁協からの聞き取りでは、和良川においても琵琶湖産アユの放流は毎年行われており、アユ以外の魚種がしばしば混入しているという（ウグイの混入が確認されているわけではない）。したがって、和良川においても琵琶湖産ウグイの侵入の可能性はあるが、琵琶湖型 mtDNA は見つからなかったことから、琵琶湖産ウグイの定着が生じにくい要因があるものと考えられる。

他地域に放流されても定着しない琵琶湖産魚種の例としてアユが知られている。琵琶湖産アユは産卵期が他地域のアユよりも早いために、放流先の個体群との交雑が生じにくく、また孵化仔魚が海域に流下したときの海水温が高いことで、仔魚が生き残らないことが知られている（東、1980）。琵琶湖産ウグイと岐阜県の河川産ウグイには吻部の形状や上顎と下顎の形態に違いがあるとされており（川尻、1956；中村、1969）、選好する生息環境や食性などの生態的特性が異なることは十分に考えられる。そのため、今後は琵琶湖型 mtDNA の侵入率の高い地点と侵入の見られない地点の物理・化学的な環境特性とウグイの地域系統間での生態的特性の比較を行うことで、琵琶湖産ウグイの移入先での侵入成功に関する要因を明らかにできる可能性がある。

他の地域間的人為的移入 ウグイは岐阜県内の多くの河川で第五種共同漁業権魚種となっており、少なくとも県の水産統計上は 2002 年まで放流が行われていたことが確認できる（岐阜県農政部里川振興課、2017）。ピーク時の 1982 年には 1,750 kg の放流が行われており、琵琶湖産アユへの混入だけでなく種苗放流によって他地域産のウグイが侵入した可能性も考えられる。飛騨市神岡町の

高原川では1960年から1981年までの間に10回、総量で3,770 kgのウグイが放流されているが、それらの放流種苗は揖斐川下流部の漁業協同組合から購入したものとされている(徳田, 2007)。したがって、琵琶湖型 mtDNA が確認されなかった河川においても、県内の河川間での移入が生じている可能性がある。本研究においても、塩基配列を決定した個体について見る限りでは日本海側の水系(地点番号2と4)の在来型 mtDNA の多くは TH3 系統であり、太平洋側の水系(地点番号5, 9, 17, 21, 22)はすべて TH4 系統であった(Table 2)。そのため、本来ならば日本海側と太平洋側の水系に TH3 系統と TH4 系統が異所的に分布していた可能性がある。しかし、日本海側の大八賀川(地点番号4)において TH4 系統のハプロタイプ g07 が見ついている。上流域の河川争奪によって太平洋側のウグイ個体群の自然移入が生じた可能性もあるが、上述のように飛騨市で揖斐川産のウグイが放流された記録もあるため、県内における人為的な放流による可能性も考えられる。

また、他県から購入したウグイの種苗が放流された可能性も考えられる。ウグイの養殖や放流種苗の生産は、伝統的にウグイの漁獲が盛んで、食用とされてきた長野県(川尻, 1956; 信州魚貝類研究会・行田, 1980; 中村, 1999)や栃木県(斎藤, 1979)で行われており、神奈川県芦ノ湖では1981年から毎年10万尾の栃木県産ウグイが放流されていたことが知られている(橘川, 2005)。しかし、本研究で比較に用いた長野県と栃木県のウグイは TH2 系統の mtDNA の頻度が高く、少なくとも岐阜県内で TH2 系統は見つからないため(Table 2)、仮にこうした地域からの移殖があったとしても、その影響は小さかったものと考えられる。ただし、長野県佐久市の養魚場と栃木県箒川のウグイの間で同じハプロタイプ(n02とt01)が共有されており、両地域の間での人為的な移入が行われた可能性がある。そのため、各地域のウグイ個体群において、琵琶湖水系からの非意図的な侵入だけでなく、特にウグイの水産利用の盛んな地域では、意図的な移入による分布攪乱も生じていることが危惧される。

謝 辞

ウグイの採集にあたっては、和良川漁業協同組合の大澤克幸氏、和良おこし協議会の加藤真司氏、NPO 法人ふるさと自然再生研究会の皆様、日本

大学の石川孝典氏、栃木県那珂川町の林家川魚店、長野県在住の濱野陽氏、岐阜大学地域科学部の安江一真、萩原健登、橋本昌尚氏にご協力いただいた。DNA 解析は、岐阜大学地域科学部向井研究室の吉田のぞみ氏と岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム分野にご協力いただいた。ここに深く感謝する。

引用文献

- Allendorf, F. W., R. F. Leary, P. Spruell and J. K. Wenburg. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.*, 16: 613–622.
- 東 幹夫. 1980. コアユー—一代限りの侵略者? 川合禎次・川那部浩哉・水野信彦(編), pp. 154–161. 日本の淡水生物—侵略と攪乱の生態学. 東海大学出版会, 東京.
- 岐阜県農政部里川振興課. 2017. 岐阜県の水産業. 岐阜県農政部里川振興課水産振興室, 岐阜県. 47 pp.
- 堀川まりな・向井貴彦. 2007. 濃尾平野におけるゼゼラのミトコンドリア DNA 二型の分布. *日本生物地理学会会報*, 62: 27–32.
- 細谷和海. 2019. 山溪ハンディ図鑑 増補改訂 日本の淡水魚. 山と溪谷社, 東京. 560 pp.
- Imoto, J. M., K. Saitoh, T. Sasaki, T. Yonezawa, J. Adachi, Y. P. Kartavtsev, M. Miya, M. Nishida and N. Hanzawa. 2013. Phylogeny and biogeography of highly diverged freshwater fish species (Leuciscinae, Cyprinidae, Teleostei) inferred from mitochondrial genome analysis. *Gene*, 514: 112–124.
- Ito, G., Y. Koya, S. Kitanishi, T. Horiike and T. Mukai. 2019. Genetic population structure of the eight-barbel loach *Lefua echigonia* in the Ise Bay region, a single paleo-river basin in central Honshu, Japan. *Ichthyol. Res.*, 66: 411–416.
- Kakioka, R., T. Kokita, R. Tabata, S. Mori and K. Watanabe. 2013. The origins of limnetic forms and cryptic divergence in *Gnathopogon* fishes (Cyprinidae) in Japan. *Environ. Biol. Fish.*, 96: 631–644.
- 川尻 稔. 1956. 千曲川におけるウグイ漁業特にツケバ漁業とウグイの増殖について. *淡水区水産研究所業績*, 24: 1–41.
- 川那部浩哉・水野信彦・細谷和海. 2001. 山溪カラー名鑑 日本の淡水魚 3版. 山と溪谷社, 東京. 719 pp.
- 橘川宗彦. 2005. 水産資源の持続的管理—ケーススタディ・芦ノ湖. 日本水産学会水産増殖懇話会(編), pp. 109–132. 遊漁問題を問う. 恒星社厚生閣, 東京.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol.*

- Evol., 16: 111–120.
- Kitanishi, S., A. Hayakawa, K. Takamura, J. Nakajima, Y. Kawaguchi, N. Onikura and T. Mukai. 2016. Phylogeography of *Opsariichthys platypus* in Japan based on mitochondrial DNA sequences. *Ichthyol. Res.*, 63: 506–518.
- Kitanishi, S., N. Onikura and T. Mukai. 2018. A simple SNP genotyping method reveals extreme invasions of non-native haplotypes in pale chub *Opsariichthys platypus*, a common cyprinid fish in Japan. *PLoS ONE*, 13: e0191731 (DOI 10.1371/journal.pone.0191731).
- Kitazima, J., M. Matsuda, S. Mori, T. Kokita and K. Watanabe. 2015. Population structure and cryptic replacement of local populations in the endangered bitterling *Acheilognathus cyanostigma*. *Ichthyol. Res.*, 62: 122–130.
- 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.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947–2948.
- Lockwood, J. L., M. F. Hoopes and M. P. Marchetti. 2013. *Invasion Ecology*, 2nd edition. Wiley-Blackwell, Chichester, UK. 444 pp.
- 松沢陽士・瀬能 宏. 2008. 日本の外来魚ガイド. 文一総合出版, 東京. 157 pp.
- 向井貴彦. 2007. DNA から見た外来種研究: どこまで“犯人”を追えるのか? *生物科学*, 58: 192–201.
- 向井貴彦. 2018. 国内外来魚. 日本魚類学会 (編), pp. 524–525. *魚類学の百科事典*. 丸善出版, 東京.
- 向井貴彦. 2019. 岐阜県の魚類 第二版. 岐阜新聞社, 岐阜市. 224 pp.
- 向井貴彦・北原佳郎・森口宏明・酒井博嗣・浅香智也・地村佳純. 2015. 西日本におけるビワヨシノボリ外来個体群の分布. *日本生物地理学会会報*, 70: 173–180.
- 中村浩志. 1999. 千曲川の自然. 信濃毎日新聞社, 長野市. 215 pp.
- 中村守純. 1969. 日本のコイ科魚類. 資源科学研究所, 東京. 455 pp.
- Parker, I. M., D. Simberloff, W. M. Lonsdale, K. Goodell, M. Wonham, P. M. Kareiva, M. H. Williamson, B. Von Holle, P. B. Moyle, J. E. Byers and L. Golgwasser. 1999. Impact: toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. *Biol. Invasions*, 1: 3–19.
- Ryan, M. E., J. R. Johnson and B. M. Fitzpatrick. 2009. Invasive hybrids tiger salamander genotypes impact native amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 106: 11166–11171.
- 斎藤 辯. 1979. 栃木の魚. 栃の葉書房, 鹿沼市. 175 pp.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406–425.
- 佐久間 功・宮本拓海. 2005. 外来水生生物事典. 柏書房, 東京. 206 pp.
- Schulte, U., M. Veith and A. Hochkirch. 2012. Rapid genetic assimilation of native wall lizard populations (*Podarcis muralis*) through extensive hybridization with introduced lineages. *Mol. Ecol.*, 21: 4323–4326.
- 信州魚貝類研究会・行田哲夫. 1980. 長野県魚貝図鑑. 信濃毎日新聞社, 長野市. 285 pp.
- Strayer, D. L., V. T. Eviner, J. M. Jeschke and M. L. Pace. 2006. Understanding the long-term effects of species invasions. *Trends Ecol. Evol.*, 21: 645–651.
- 鈴木美優・北西 滋・淀 太我・向井貴彦. 2016. 東海地方におけるヒガイ属魚類の遺伝的集団構造と攪乱. *魚類学雑誌*, 63: 107–118.
- 徳田幸憲. 2007. 高原川の淡水魚類. 飛騨市教育委員会 (編), pp. 221–238. *神岡町史 自然編*. 飛騨市教育委員会, 飛騨市.
- 梅村啓太郎・二村 凌・高木雅紀・池谷幸樹・向井貴彦. 2012. 岐阜県産シロヒレタビラにおける外来ミトコンドリア DNA の分布. *日本生物地理学会会報*, 67: 169–174.
- Vitousek, P. M. 1990. Biological invasions and ecosystem processes: towards an integration of population biology and ecosystem studies. *Oikos*, 57: 7–13.
- Walsh, P. S., D. A. Metzger and R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10: 506–513.
- Watanabe, K., H. Sakai, T. Sanada and M. Nishida. 2018. Comparative phylogeography of diadromous and freshwater daces of the genus *Tribolodon* (Cyprinidae). *Ichthyol. Res.*, 65: 383–397.
- 渡辺勝敏・高橋 洋. 2010. 日本の淡水魚類相とその成立過程のより深い理解に向けて. 渡辺勝敏・高橋洋 (編), pp. 217–238. *淡水魚類地理の自然史—多様性と分化をめぐる—*. 北海道大学出版会, 札幌.
- 渡辺勝敏・高橋 洋・北村晃寿・横山良太・北川忠生・武島弘彦・佐藤俊平・山本祥一郎・竹花佑介・向井貴彦・大原健一・井口恵一朗. 2006. 日本産淡水魚類の分布域形成史: 系統地理的アプローチとその展望. *魚類学雑誌*, 53: 1–38.
- Watanabe, K., K. Tominaga, J. Nakajima, R. Kakioka and R. Tabata. 2017. Japanese freshwater fishes; biogeography and cryptic diversity. Pages 183–227 in M. Motokawa and H. Kajihara, eds. *Species diversity of animals in Japan*. Springer Japan, Tokyo.