

香川県まんのう公園で採集されたオヤニラミの由来

氏 部 崇 之¹・山 田 裕 貴²・川 田 正 明³・高 木 基 裕⁴

¹〒761-1703 香川県高松市香川町浅野1188番地 高松市立香川第一中学校

²〒790-8566 愛媛県松山市樽味3-5-7 愛媛大学大学院連合農学研究科

³〒761-8076 香川県高松市多肥上町1250 香川県立高松桜井高等学校

⁴〒798-4292 愛媛県南宇和郡愛南町船越1289-1 愛媛大学南予水産研究センター

連絡先：愛媛大学南予水産研究センター Tel: 0895-82-1028 Fax: 0895-82-1026

E-mail: takagi.motohiro.mc@ehime-u.ac.jp

Origin of *Coreoperca kawamebari* collected at Sanukimannopark in Kagawa Prefecture

Takayuki Ujibe¹, Yuuki Yamada², Masaaki Kawada³ and Motohiro Takagi⁴

¹Kagawadaiichi Junior High School, 1188 Kagawa-cho Asano, Takamatsu, Kagawa, 761-1703, Japan

²The United Graduate School of Agriculture Sciences, Ehime University, 3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566, Japan

³Takamatsusakurai High School, 1250 Tahikamimachi, Takamatsu, Kagawa 761-8076, Japan

⁴South Ehime Fisheries Research Center, Ehime University, 1289-1 Funakoshi, Ainan, Ehime 798-4292, Japan

Correspondence: South Ehime Fisheries Research Center, Ehime University Tel: 0895-82-1028

はじめに

オヤニラミ *Coreoperca kawamebari*は淀川・由良川以西の本州，四国北部および九州に生息しており，水質が良く，流れが緩やかな水域に生息する純淡水魚である（藤田，2015）。近年，河川改修等の影響により個体数が減少し，環境省のレッドリストでは絶滅危惧 I B 類に指定されるなど，全国的に数を減らしている（環境省，2020）。一方，無秩序な放流により，オヤニラミが本来生息していない水域での定着が確認され（向井ほか，2013），また，在来のオヤニラミの生息地への由来不明の個体の導入により生じる遺伝的攪乱も懸念されている（清水ほか，2019；山田ほか，2020）。

香川県においてオヤニラミは，土器川・金倉川水系に以前より生息していると考えられている（大高・土居，2006）。しかし，現在では，河川や水路の改修・護岸工事，農業使用や家庭排水の流入による水質悪化，ブルーギルやオオクチバスなど魚食性外来魚の定着などにより個体数を減らしており，香川県では絶滅危惧 I 類に指定され，絶滅が危惧されている（香川県希少野生生物保護対策検討会，2004）。また，香川県では過去の生息状況の記録が乏しく，オヤニラミが生息していた事実が知られぬまま生息水域から姿を消していることが懸念される。

今回，国営讃岐まんのう公園・自然生態園内の逆様池にて，オヤニラミの生息が確認された。逆様池は湧水を水源として水路により

土器川と接続するため池で、人の往来が管理されている環境にある。本研究では、遺伝的多様性と分化の把握に有用なマイクロサテライトDNAマーカーを用い、土器川、金倉川および近隣県の生息河川の個体群を対照として逆様池に生息するオヤニラミの由来を明らかにすることを目的とした。

方 法

供試魚

香川県のオヤニラミ供試魚は2020年に逆様池、金倉川および土器川で採集し、DNA抽出のために尾鰭を一部切り取り、個体は採集水域に戻した(図1)。対照標本は清水ほか(2019)および山田ほか(2020)で用いられた徳島県の桑野川水系の本流および県外からの移入個体が生息しているとみられる桑野川の支流の南川、福井川、椿川、岡山県の梅木川、広島県の長田川の計134個体を用いた。(表1, 図1)

マイクロサテライト多型解析

供試魚からDNA抽出を行い、オヤニラミのマイクロサテライト領域を増幅する7マーカー座(*Corpe-10*, *-11*, *-14*, *-15*, *-18*, *-20*, *-57*) (山田ほか, 2020)を用いてPCRを行った。PCR産物はDNAシーケンサーを用いて各個体の増幅断片長多型(アレル型)を決定した。

得られた各個体のアレル型をもとに、コンピュータソフトウェアGenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2006, 2012)を用いて、遺伝的多様度を示す平均アレル数 (Number of allele: N_a)、ヘテロ接合度の観察値 (Observed heterozygosity: H_o) および期待値 (Estimated heterozygosity: H_e) を算出した。また、FSTAT v.2.9.4 (Goudet, 2003)を用いて各標本間のサンプル数の違いを補正した有効アレル数を示すアレリックリッチネス (Allelic richness; El Mousudik & Petit, 1996) および近親交配の程度を示す固定指数 F_{IS} (Weir &

Cockerham, 1984) を算出した。また、POPTREE 2 (Takezaki et al., 2010)を用いてNei et al. (1983)の遺伝的距離を求め、NJ法 (Saitou et al., 1987)による標本個体群間の樹形図を作成した。なお、各標本個体群の結びつきの確からしさについては1000回の任意抽出によるブートストラップ確率 (Bp) (Felsenstein, 1985)により評価した。マーカーの多型性の影響を受けない F_{ST} の補正值 F'_{ST} (Hedrick, 2005; Meirmans & Hedrick, 2011)をGenAlEx 6.5により算出し、 P 値に対してボンフェローニ補正 (Rice, 1989)を行った。個体のアレル型に基づく集団分けは、STRUCTURE ver.2.3.4 (Pritchard et al., 2000)を用いて行った。なお、至的な集団数 K はSTRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2012)を用いて ΔK (Evanno et al., 2005)および尤度LnP (D)を算出した。

結 果

オヤニラミ10標本群において遺伝的多様性の程度を示す平均アレル数は1.29~3.00を示し、有効アレル数は1.28~2.43を示した(表2)。また、ヘテロ接合度の期待値 (H_e)は0.103~0.427を示し、固定指数は-0.263~0.727を示した。

類縁関係を示す樹形図において、香川県の逆様池3月、逆様池8月、土器川の3標本群は遺伝的距離が近い1つの枝にまとまり、同じ香川県の金倉川は徳島県の南川と同様に単独で枝を形成した(図2)。一方、徳島県の桑野川、福井川、椿川の3標本群が1つの枝にまとまり、岡山県梅木川および広島県長田川は1つの枝に配置されたが、その遺伝的距離は離れていた。

遺伝的異質性の有無を示すペアワイズ F'_{ST} において、香川県の4標本群は他県の6標本群との間で有意差が示された(表3, F'_{ST} 値0.5332~0.9850, $P < 0.05$)。一方、香川県の4標本群内では有意差が示されなかった。ま

表1. オヤニラミの採集標本データ

県	採集地	採集日	全長 (mm)	サンプル数
香川県	逆様池 3月	2020.3.15	45-75	5
	逆様池 8月	2020.8.30	45-80	5
	金倉川	2020.3.22	45-75	4
	土器川	2020.8.30	30-35	4
徳島県	桑野川	2014.8.3	-	32
	南川	2017.11.19	-	30
	福井川	2012	-	13
	椿川	1999	-	11
岡山県	梅木川	-	-	12
広島県	長田川	-	-	18

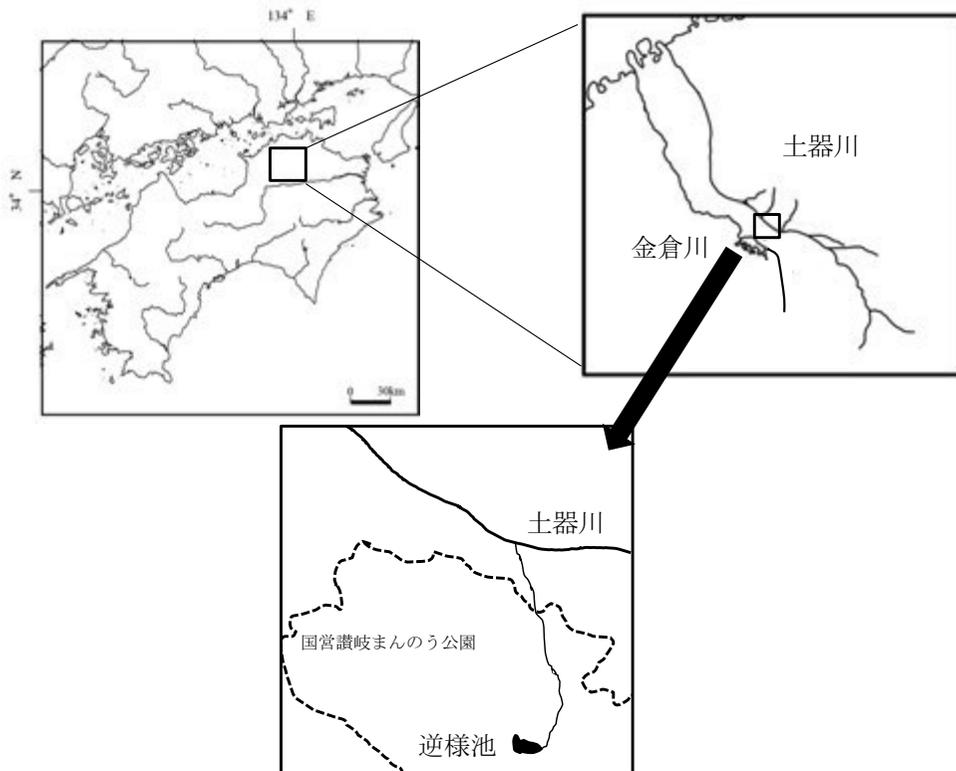


図1. オヤニラミのサンプリング地点.

た, 他県の6標本群は全ての組み合わせで有意差を示した (F'_{ST} 値0.2585~0.9583, $P < 0.05$).

アリアル型に基づく集団 (クラスター) 分けを行う集団構造解析において, 至適な集団数

(K) は ΔK においては2集団 ($K = 2$), 尤度においては6集団 ($K = 6$) が支持された。K = 2においては, 香川県の4標本群は南川, 梅木川および長田川の標本群と同じクラスター1への帰属が示された (図3a)。桑野

表2. マイクロサテライト領域を増幅する7マーカー座を用いたオヤニラミ10標本群の遺伝的多様度

	逆様池3月	逆様池8月	金倉川	土器川	桑野川	南川	福井川	椿川	梅木川	長田川
サンプル数	5	5	4	4	32	30	13	11	12	18
平均アレル数	1.57	1.43	1.29	1.57	1.29	2.14	1.43	1.43	3.00	1.71
有効アレル数*	1.57	1.40	1.29	1.57	1.28	1.89	1.42	1.33	2.43	1.45
Ho	0.314	0.114	0.036	0.286	0.156	0.362	0.198	0.156	0.512	0.143
He	0.277	0.166	0.103	0.205	0.138	0.326	0.192	0.133	0.472	0.144
固定指数	-0.023	0.407	0.727	-0.263	-0.114	-0.095	0.009	-0.121	-0.042	0.033

*: アレリックリッチネス (基準サンプル数 N = 4), Ho: ヘテロ接合度の観察値, He: ヘテロ接合度の期待値

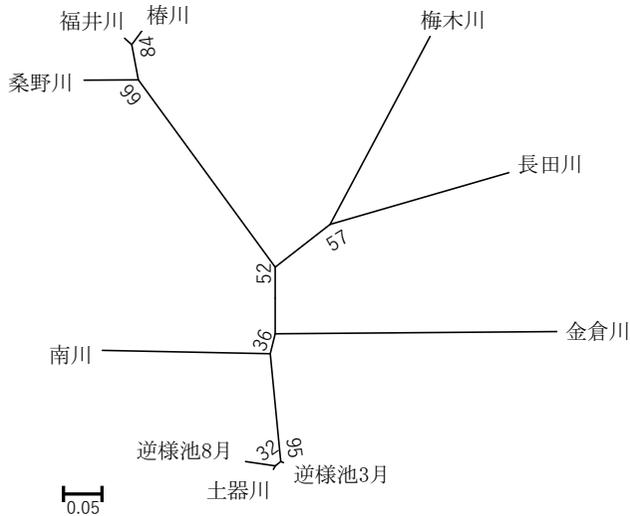


図2. オヤニラミ標本群のNJ法による遺伝的距離の樹形図。

川、福井川および椿川は異なるクラスター2への帰属が示された。K = 6において、香川県の逆様池3月、逆様池8月、土器川はクラスター1への帰属が示された(図3b)。金倉川はクラスター2への帰属が示されたが、クラスター1の組成が1割程度示された。桑野川はクラスター6への帰属が示され、福井川および椿川も同じクラスター6への帰属が示されたが、クラスター2の組成が1割程度示された。南川はクラスター3への帰属が示された。梅木川はクラスター5への帰属が示され、長田川はクラスター4への帰属が示された。

考 察

本研究において逆様池より全長の小さい個体が複数確認された。このことから、逆様池においてオヤニラミが再生産し、定着していることが示唆された。

有効アレル数において、梅木川を除くオヤニラミ9標本群は2.0未満の値を示し、解析に用いたオヤニラミ集団は単型に近く遺伝的多様度が低い集団であることが示唆された。また、固定指数において、逆様池8月、金倉川は高い正の値を示し、強い近親交配が懸念された。

香川県の逆様池3月、逆様池8月、土器川は遺伝的集団解析の結果から、他県の標本群

表3. オヤニラミにおけるペアワイズ F_{ST} 値のマトリックス

	逆様池3月	逆様池8月	金倉川	土器川	桑野川	南川	福井川	椿川	梅木川	長田川
逆様池3月		1.0000	0.3330	1.0000	0.0045	0.0045	0.0045	0.0135	0.0090	0.0045
逆様池8月	0.1053		0.3600	1.0000	0.0045	0.0045	0.0180	0.0090	0.0045	0.0045
金倉川	0.8688	0.9097		1.0000	0.0045	0.0090	0.0360	0.0360	0.0180	0.0270
土器川	0.0360	0.1009	0.8792		0.0045	0.0045	0.0270	0.0315	0.0090	0.0045
桑野川	0.8959	0.8990	0.9850	0.9101		0.0045	0.0045	0.0045	0.0045	0.0045
南川	0.5332	0.7142	0.9197	0.6730	0.9337		0.0045	0.0045	0.0045	0.0045
福井川	0.8691	0.8686	0.9807	0.8845	0.3484	0.9166		0.0090	0.0045	0.0045
椿川	0.8906	0.8944	0.9850	0.9063	0.6539	0.9292	0.2585		0.0045	0.0045
梅木川	0.8133	0.8560	0.9434	0.8402	0.8833	0.7879	0.8577	0.8763		0.0045
長田川	0.8717	0.8925	0.9809	0.8767	0.9583	0.9181	0.9446	0.9561	0.7829	

F_{ST} 値を下段に、P値を上段に表記。P値は9999回の順列に基づく。太字は $P < 0.05$ を示す。

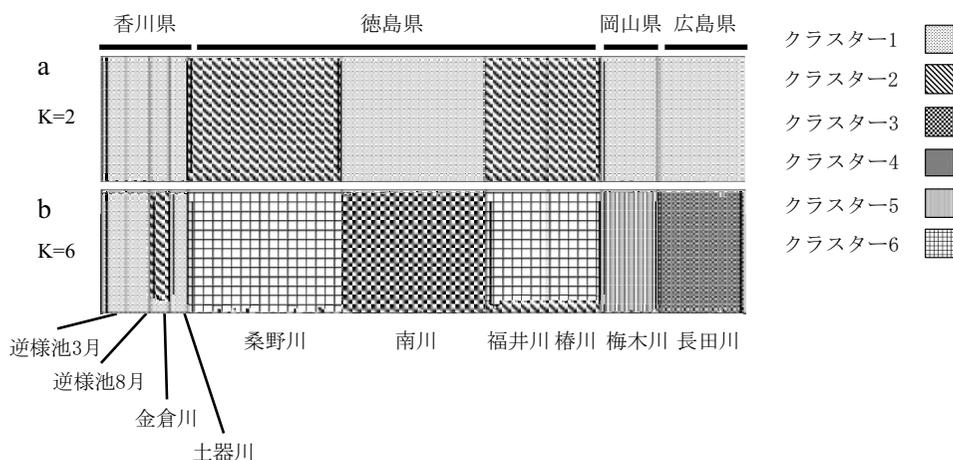


図3. STRUCTUREによるオヤニラミ個体および個体群の集団分け。a. K = 2, b. K = 6.

とは異なる集団であることが示唆される一方、同じ香川県の金倉川においては、香川県の3標本群および他県の標本群と異なる遺伝的集団構造を有する集団であることが示された。清水ほか（2019）は金倉川と土器川のオヤニラミについてミトコンドリアDNA調節領域の塩基配列解析を行い、異なる2クレードに含まれた3ハプロタイプを検出し、香川県のオヤニラミでは集団の一部に非在来の遺伝子をもつ個体が侵入していることを示した。本研究において同一水系である逆様池2標本群と土器川は遺伝的にきわめて近く、金倉川が離れていた結果は、前者の標本群が香

川県の在来オヤニラミ集団、金倉川の標本が非在来のオヤニラミ集団である可能性が高いと考えられる。他県の標本群と香川県の標本群の類縁関係が示されなかったことは、絶滅危惧種であるオヤニラミ集団が個体数を減らす過程で生じる遺伝的多様性の減退により、それぞれの個体群間の遺伝的差異が際立つことになったためと考えられる。一方、他県の標本群との類縁関係が示されなかったことは、香川県で示された2つのクラスタのどちらも侵入集団である可能性も考えられる。今後、京都府や福岡県といった他県のオヤニラミ標本群をさらに対照として用い、香川県

のオヤニラミにおける在来・非在来をより明確にすることが求められる。

おわりに

逆様池2標本群と土器川は遺伝的にきわめて近く、金倉川の標本群は遺伝的に離れていたことから、現時点では香川県のオヤニラミについては土器川およびまんのう公園逆様池の個体を一つの保全単位、金倉川の個体を別の保全単位として維持・管理すべきであろう。今後、逆様池におけるオヤニラミ生息についての情報収集や逆様池と土器川との接続水路について調査・保全する必要がある。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、サンプルの採集ならびに情報提供に協力頂いた香川淡水魚研究会および国営讃岐まんのう公園に厚く御礼申し上げます。

引用文献

Earl, D. A. and B. M. VonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361.

El Mousadik, A. and R. J. Petit. 1996. High level of genetic differentiation for 146 allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 832-839.

Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.

Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An approach using the

bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

藤田朝彦. 2015. オヤニラミ. 細谷和海(編). 山溪ハンディ図鑑15 日本の淡水魚初版, 322-323. 山と溪谷社. 東京

Goudet, J. 2003. Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> Updated from Goudet [1995].

Hedrick, P. W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59: 1633-1638.

香川県希少野生生物保護対策検討会. 2004. 香川県レッドデータブック. 香川県環境森林部環境・水政策課. 高松.

環境省. 2020. 環境省レッドリスト 2020. <http://www.env.go.jp/press/files/jp/114457.pdf>. (2020年12月閲覧)

Meirmans, P. G. and P. W. Hedrick. 2011. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11: 5-18.

向井貴彦・鬼倉徳雄・瀬能 宏. 2013. 国内外来魚となった絶滅危惧種. 日本魚類学会自然保護委員会(編), 見えない脅威“国内外来魚” どう守る地域の生物多様性, 19-21. 東海大学出版会. 秦野.

Nei M., F. Tajima and Y. Tateno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.*, 19: 153-170.

大高裕幸・土居敏幸. 2006. 香川県土器川で採集されたオヤニラミ. 香川県自然科学館研究報告, 28: 11-13.

Peakall, R. and P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.

Peakall, R. and P. E. Smouse. 2012.

- GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539.
- Pritchard, J. K., M. Stephens and P. Donnell. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Rice, W. R. 1989 Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- 清水孝昭・佐藤陽一・高木基裕. 2019. 徳島県におけるオヤニラミの遺伝的集団構造と攪乱. *魚類学雑誌*, 66 : 195-203.
- Takezaki, N., M. Nei and K. Tamura. 2010. POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with windows interface. *Mol. Biol. Evol.*, 27: 747-752.
- 山田裕貴・氏部崇之・清水孝昭・佐藤陽一・田代優秋・佐藤仁泉・池田 実・高木基裕. 2020. 徳島県で見出された国内外来由来のオヤニラミ個体群と遺伝的攪乱の懸念. *保全生態学研究*, 25 : 9-23.
- Weir, B. S. and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.