

シトクロム b 領域を指標とした恵那地区に生息するメダカの遺伝子の解析の研究

3533 古井千景 3602 安藤早耶 3612 木村瑠実 3639 森川奏美 3640 吉村和貴

要旨

日本に生息する野生メダカの遺伝子タイプはミトコンドリア DNA(mtDNA)のシトクロム b 領域を解析した研究によると、北日本集団(CladeA)、南日本集団(CladeB)、関東固有集団(CladeC)の 3 Clade に分類される。さらに、北日本集団は Subclade A-I ~A-III の 3 個の型、南日本集団は Subclade B-I ~B-XI の 11 個の型に分類されている。(右図)

そこで恵那地区(恵那市・中津川市)に野生メダカは生息しているのか、もし生息しているのならば、そのメダカはどの地域のメダカに分類されるのかを研究することにした。

まず最初に東山動植物園メダカ館を訪ね、学芸員の方からメダカの生息環境や特徴を教えていただいた。

次に、恵那地区の全小中学校にアンケート調査を行い、その結果をもとにメダカの生息調査を行った。

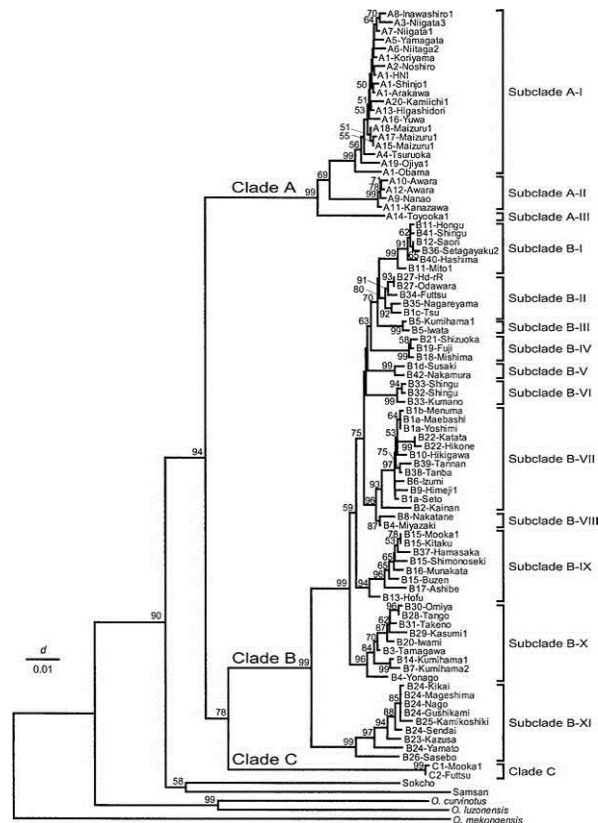
アンケートの結果から株式会社 NSP の貯水池、中津川めだか保存会の増殖池(以後増殖池とする)の下流(詳しくは後述)、中津川市坂本の個人宅、恵那市三郷町佐々良木の寺でメダカを採集することができた。

株式会社 NSP でメダカを採集した際、教えていただいた中津川めだか保存会(以後めだか保存会とする)の方に増殖池に関するお話をうかがった。

採集したメダカの遺伝子解析を行った結果、株式会社 NSP の貯水池と増殖池の下流で採集したメダカと中津川市千旦林個人宅で採集したメダカは CladeB に分類されると考えられる。恵那市三郷町佐々良木の寺で採集したメダカは論文のデータと一致しなかったことから恵那地区のメダカには、いくつかの型が混在することがわかった。

1.目的

これまでの研究により、恵那地区には在来型のメダカが生息していないといわれているが、本当に在来型のメダカが生息していないのか気になる、この調査を始めることにした。また、生息していた場合



シトクロム b 領域の近隣結合系統樹
Neighbor-joining tree of the entire cytochrome b gene
(Takehana et al.,2003)¹⁾

恵那地区固有のメダカかどうかを遺伝子解析によって特定することにした。

日本古来のメダカはクロメダカであるため、クロメダカの研究を行った。

2. 仮説

一般的には恵那地区において在来型のメダカは生息していないといわれているため、私たちも在来型のメダカは生息していないと考えた。

3. 研究方法

- ① 東山動植物園メダカ館で研修を行う
- ② 恵那地区の小中学校にアンケート調査を行い、回答結果より現地調査を実施する
- ③ 中津川めだか保存会の方から話を聞く
- ④ 採集したメダカの遺伝子解析を行う

4. 東山動植物園メダカ館研修

東山動植物園メダカ館を訪ねメダカの生息環境や特徴について伺い、世界中のメダカや飼育の仕方を見せていただいた。以下、教えていただいたことを簡潔に記す。

(a) メダカの特徴

メダカの正式名称はキタノメダカ、ミナミメダカの2種あり、特徴として突然変異を起こしやすいということが挙げられる。そのため確認されているだけで120種いることが分かっている。

例) ヒメダカ (黒い色素が作れないので体が黄色に見える。)

メダカの仲間は主に熱帯地方に生息している。最も北に生息するニホンメダカは、氷がはるほどの冷たい水温から30℃を超える水温まで耐えることができる。

淡水から海水に急に移すと死んでしまうが、徐々に慣らせば海水でも生きることができる。ウナギやハゼなども同じ体の仕組みを持っている。

メダカの寿命は野生の厳しい環境では1年半といわれている。飼育下では2年以上生きることもある。これまでの最高寿命は約5年という記録がある。

(b) メダカの種類

メダカには卵生、卵胎生、胎生の種類があり卵胎生、メダカのほとんどが絶滅危惧種で一度に10～15匹産む。

* 卵胎生 お腹の中で卵を孵化させる

* 胎生 へその緒がある

(c) メダカの生息環境

メダカは冬になると冬眠するため、暖かい時期に生息している場所とは別に冬でも水が枯れることなく、ほとんど水の流れがない場所が必要。また、普段生息している場所は、水温が20℃～25℃で流れの速さは10 cm/秒ぐらいの場所。

5. 恵那地区の小中学校（理科担当の先生）にアンケート調査を行った。調査項目と結果は以下の通り。
依頼数は 54、回答数は 40。

① 授業でメダカを使用したことがありますか。

はい 37 いいえ 3

② 質問 1 で「はい」を選択した方。そのメダカは学校付近もしくは恵那地区内で捕まえたか。

はい 9 いいえ 28 不明 3

③ 質問②で「はい」を選択した方。どこで捕まえたか。

回答のあった場所

- ・ 中津川市茄子川 胞山工業付近の小川
- ・ 坂下外（そで）地内で飼育している人から譲ってもらった
- ・ 苗木浄水公園内の池
- ・ 株式会社 NSP 前の池（めだか保存会が管理している池）
- ・ 中津川市立南小学校内ビオトープ「ひょうたん池」
- ・ 恵那市立吉田小学校内の池 どのメダカかは不明
- ・ 恵那市上矢作町島地区の民家

④ 恵那地区でメダカを見たことがあるか。

はい 21 いいえ 15 無回答 4

⑤ 質問④で「はい」を選択した方。どこで見たか。場所

- ・ 中津川市阿木川、加子母川付近
- ・ 中津川市阿木、西山、苗木、馬籠、神坂、茄子川東三地域
- ・ 中津川市根ノ上湖、保古の湖
- ・ 中津川市茄子川二軒屋浄化センター付近
- ・ 中津川市浄水公園内の池
- ・ 恵那市上矢作町コテージかわせみの河川公園
- ・ 恵那市三郷町野井付近
- ・ 恵那市岡瀬沢にごり川付近
- ・ 恵那市大井町北関戸防火水槽の中
- ・ 恵那市飯地地区沢尻川
- ・ 恵那市上矢作町島地区の民家の池

⑥ その他の情報

- ・ 茄子川下洗井の在住の方 → 多治見、中津川のメダカについて詳しい。
- ・ 坂下方面で捕まえた人がある。野生メダカではない。
- ・ 中津川市苗木にある「美容室」の店長が知人から譲り受け飼育している。
- ・ 土岐市鶴里町の池でヒメダカを見た。
- ・ 多治見市の土岐川観察館では野生メダカを育てている。

6. メダカの入手

アンケート結果をもとにメダカが生息する場所の現地調査を行ったが、保古の湖、坂本の浄水場、茄

子川周辺、恵那市岩村町では、メダカを発見することはできなかった。根の上湖でメダカらしき小魚を発見したが、採集するには市役所の許可が必要だったため採集を断念した。メダカを採集した場所と、採集した個体数は以下の通り。

- ・株式会社 NSP の貯水池 45 匹
- ・増殖池の下流 1 匹
- ・中津川市坂本個人宅 10 匹
- ・恵那市三郷町佐々良木の寺 10 匹

株式会社 NSP でメダカを提供していただいた際、めだか保存会が株式会社 NSP の貯水池にメダカを放流したという話をしてくださったので、めだか保存会の方と連絡を取り話をうかがった。めだか保存会の方によると、もとは個人の土地にあった堤（農業用ため池）に昔からメダカが生息しているという話を聞き、実際に見に行ってみたところクロメダカが生息していることが確認できた。そこで、堤のすぐ近くに中津川めだか増殖池を作り、堤にいたメダカを増殖池に移して繁殖させたということだった。

7. 遺伝子解析を行う

各地で採集したメダカと以前頂いた養殖メダカを用いて遺伝子解析の実験を行った。

(1) 使用した器具及び試料

- ・サンプル（クロメダカ）
- ・メス
- ・ピンセット
- ・マイクロピペット
- ・ピペットチップ
- ・マイクロチューブ
- ・ビーカー
- ・メデューム瓶
- ・滅菌水
- ・蒸留水
- ・小型遠心機
- ・サーマルサイクラー
- ・ミニシェーカー
- ・チューブラック
- ・パラフィルム
- ・タッパー
- ・UV トランスイルミネーター
- ・電気泳動装置
- ・SYBRsafe
- ・食品用ラップ
- ・アルミホイル
- ・Collection Tube
- ・NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Columun
- ・NucleoSpin Tissue Column
- ・アガロースゲル
- ・50×TAE
- ・Primer1 (5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC-3')
- ・Primer2 (5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG-3')
- ・Wash Buffer NT3
- ・Buffre BW
- ・Buffer B5
- ・Buffer BE
- ・Buffer NE
- ・Buffer NT1
- ・Premix Ex Taq HS
- ・Loading Dye
- ・DNA ラダー
- ・M Buffer
- ・HaeIII
- ・Buffer T1
- ・Proteinase K
- ・Buffer B3
- ・96~100%エタノール

(2) 実験方法

この実験では mtDNA のシトクロム b 領域の解析実験を行った。(mtDNA の塩基置換は通常の DNA と比べると 5~10 倍早いとされている。そのため個体での違いが出やすい。また、mtDNA のシトクロム b 領域は実験方法が確立しており、論文のデータがあるため今回の実験で使用した。)

実験手順は以下の通り。

① 試薬調整

② メダカの DNA 抽出

1. メダカをパラフィルムの上に置き、メスで尾を切断し、マイクロチューブに入れて 25 mg 測った。
2. 尾びれの入ったマイクロチューブに、Buffer T1 を 180 μ L、Proteinase K を 25 μ L 加えてボルテ

ックスした。

3. チューブラックにマイクロチューブを入れ、56°Cの恒温水槽に浮かべ、1~3 時間ほど反応させた。
4. 反応させた後マイクロチューブを恒温水槽から取り出し、Buffer B3 を 200 μ L 加えてボルテックスし、70°Cの恒温水槽に 10 分間浮かべた。
5. Buffer BE をマイクロチューブに使用する分だけ分注し(100 μ L \times サンプル分)、70°Cの恒温水槽で温めておいた。
6. 10 分後軽くボルテックスし、99.5%エタノールを 210 μ L 加えてボルテックスした。
7. NucleoSpin Tissue Column を Collection Tube の上にセットし、その上から 6 のサンプルを、マイクロピペットを使って全量乗せた。
8. 11,000rpm で 1 分間遠心分離し、Collection Tube に回収された液を捨て、NucleoSpin Tissue Column を再び Collection Tube にセットした。
9. NucleoSpin Tissue Column に Buffer BW を 500 μ L 加え 1 分間遠心分離し、Collection Tube に回収された液を捨て、NucleoSpin Tissue Column を再び Collection Tube にセットした。
10. NucleoSpin Tissue Column に Buffer B5 を 600 μ L 加え 1 分間遠心分離し、Collection Tube に回収された液を捨て、NucleoSpin Tissue Column を再び Collection Tube にセットした。
11. メンブレンを乾燥させるために、さらに 1 分間遠心分離し、今度は NucleoSpin Tissue Column を新しいマイクロチューブにセットし、5 で温めておいた Buffer BE 100 μ L を NucleoSpin Tissue Column の中央に滴下し、室温で 1 分間放置する。
12. これを 1 分間遠心分離し、チューブに DNA 溶液を回収し、-20°Cで保存した。

③PCR 法

1. PCR チューブにラベルをしておく。ラベルをし終わったら氷上に置いた。
2. 200 μ L PCR チューブ 1 本あたり Premix Ex Taq HS 10 μ L、Primer1 (5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC-3') 1.0 μ L、Primer2 (5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG-3') 1.0 μ L、DNA 溶液 1.0 μ L を混合したのち、滅菌水を加え 20 μ L に調節した。これを必要な本数+1 本分作った。
3. 酵素を破壊しないように穏やかによく混合した。
4. 20 μ L ずつ 200 μ L PCR チューブに DNA 溶液を分注した。
5. 遠心分離機にかけ、3 秒間フラッシュした。
6. サーマルサイクラーにセットし、94°Cで 30 秒、55°Cで 30 秒、72°Cで 30 秒を 32 サイクル繰り返し、最後の 32 サイクル目は 72°Cで 80 秒として、PCR を行った。これらを 4°Cで保存した。
7. 反応が終わったら - 20°Cで保存した。

④Clean-up

1. PCR 溶液が少ないため、PCR 溶液 20 μ L に滅菌水 32 μ L 加え計 50 μ L にした後、Buffer NTI 100 μ L (溶液の 2 倍量) を添加し反応液の調節を行った。このとき液体が黄色のときは DNA がとれていると確認できるため実験を続行した。
2. NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column を Collection Tube にセットした。上記の溶液をカラムにセットし 60 秒遠心分離。ろ液を捨てたのち、同じ Collection Tube にセットした。

3. Wash Buffer NT3 700 μ L をカラムに添加し、30 秒遠心分離し、ろ液を捨てたのち、同じ Collection Tube にカラムをセットした。
4. 乾燥させるためカラムを 1 分間遠心分離した。
5. カラムをマイクロチューブにセットし、Buffer NE 30 μ L を加え、室温で 5 分間インキュベートした後、90 秒間遠心分離をした。マイクロチューブに回収された溶液を PCR 反応溶液とし、 -20°C で保存した。

⑤制限酵素処理

1. サンプル数に応じて共通の試薬を 1.5ml チューブにまとめて作製し、よく混合する。

	1 サンプルあたり
10×M Buffer	2 μ L
滅菌水	(17 - X) μ L
<i>Hae</i> III (最後に加える)	1 μ L
合計	(20 - X) μ L

*X は Clean-up した PCR 反応溶液の量

*サンプルの本数 + 1 本分を目安に多めに作っておく

**Hae*III は重要な酵素且つ、室温に置いておくと失活しやすいので、使用後は冷凍庫にすぐに戻す。

2. 200 μ L マイクロチューブに共通試薬を分注し、そこへ各 Clean-up 済みの PCR 反応液を X μ L 加えてよく混合する。(X : PCR 反応液中の DNA 量に応じて変化させる。通常は 2~5 μ L。)
3. サーマルサイクラーにチューブをセットする。各制限酵素に合う温度で 1~3 時間反応させた。反応後は 70°C で 15 分間処理し、酵素を失活させた。

⑥電気泳動

1. 4% Nusieve GTG Agarose ゲルを作製する。

50mL 作製する場合

1. 100mL ビーカーで、冷却した 1×TAE 50mL をスターラーで攪拌しながら、Nusieve GTG Agarose 粉末を 2g 少量ずつ加える。
2. 完全に分散し、塊が認められなくなったことを確かめてから加熱スイッチを入れ、 $60\sim 70^{\circ}\text{C}$ に保ち、スターラーで攪拌する。(ラップをしておくとうい。)
3. 溶かしたアガロースを型に流し込み、冷やして固める。

2. Mupid-2plus に冷えた Nusieve GTG Agarose をセットし 1×TAE をアガロースが浸るまで加えた。
3. パラフィルムを机の上に置いて、10×Loading-Dye を 2 μ L と DNA サンプル 2 μ L をパラフィルムの上で混ぜた。
4. アガロースのウェル(溝)に上記の DNA 溶液を入れ、さらに、100bp DNA Ladder (Dye 入りタイプ) を 4 μ L もウェルに加えた。
5. 50V で 120 分 Mupid-2plus にかけた。(電気泳動) (図 1 参照)



図 1

～アガロースゲル電気泳動の原理～

DNA はマイナスに帯電している。そのため、電圧を加えるとマイナス極からプラス極に DNA が引き寄せられる。分子量の大きいものほど移動速度が小さく、小さいものほど移動速度が大きい。そのため、分子量ごとに分離することができる。

6. SYBRsafe をアガロースゲルが浸るくらいまで入れて遮光した状態で 600rpm で 30 分間ミニシェーカーにかけ、その後タッパーからアガロースゲルを別のタッパーに移し、蒸留水をゲルが浸るくらいまでいれ同じく遮光し、600rpm で 15 分間ミニシェーカーにかけた。15 分たったら再びゲルを最初のタッパーに戻して遮光し、30 分間ミニシェーカーにかけた。その後、トランスイルミネーター (302nm) で観察をした。

8.結果

写真 1 において

- ①増殖池の下流で採集したメダカ
(在来型のメダカと考えられる)
- ②養殖メダカ
- ③株式会社 NSP の貯水池で採集したメダカ
(在来型のメダカと考えられる。)
- ④中津川市坂本の個人宅で採集したメダカ
- ⑤恵那市三郷町佐々良木の寺で採集したメダカ

* 100 bp DNA Ladder

を示す。

① ② * ③ ④ ⑤

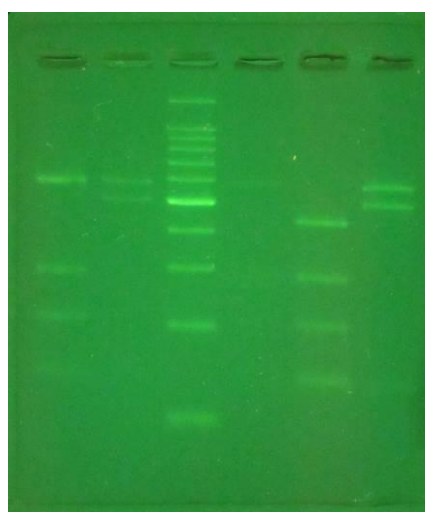


写真 1

①	②	③	④	⑤
563	563	563	423	530
284	510	284	284	486
202		202	202	139
139		139	140	

表 1

(bp)

9.考察

実験の結果と新潟大学酒泉満先生にいただいた論文(図 2)を比較したところ、①・③は J、Subclade B - II、B - III、B - V、B - VII、B - VIII、B - X のいずれかに分類され、④は K、Subclade B - I、に分類され南日本集団と考えられる。このことから恵那地区には、南日本集団に属するメダカが生息していると考えられる。さらに詳しい分類で考えると、①・③は東日本型、山陰型、瀬戸内型、大隈型のいずれか、④は東日本型になると考えられる。めだか保存会の方の話から①と③は古くから生息している可能性があり在来型のメダカだと考えられる。②と⑤は論文のデータと一致しなかった。

①と③は同じ結果が得られたことから、増殖池に生息しているメダカが雨などで池の水量が増えた際

に逃げ出し、増殖池の下流に生息していたと考えられ、この池の下流でメダカが生息していた場合は増殖池のメダカが下流に流されたためだと考えられる。

今回恵那地区内で採集したメダカの遺伝子解析の結果は様々であり、論文のデータと一致しないものもあった。一方、古くからいると言われてメダか保存会が保護しているメダカは、南日本集団に分類されることがわかった。また、根ノ上湖のような人工湖にもメダカがいることを考えると、異なる場所から持ち込まれたメダカが各地に放流されたり、ホームセンターなどでも簡単に入手できるため、ペットとして飼われていたメダカが逃げ出したりしたことが原因でいくつかの型が混在しているのではないかと考えられる。

Endonuclease Fragment pattern	HaeIII																									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Z	
Molecular size (bp)	563	312*	306*	480	284	765	1049	765	563	563	563	423	563	563	306	563	486	284	765	625	282	563	284	423	734	
	284	284	284	284	251	284	173	284	284	486	284	284	236	486	284	284	486	480	282	284	284	281	202	248	423	175
	202	251*	257*	202	229	173	19	120	202	173	202	202	202	192	202	257	139	139	281	139	140	236	159	202	202	140
	173	202	202	173	202	19		53	192	19	139	140	139		120	202	53	83	202	53	139	202	139	175	140	139
	19	173	173	83	173			19			53	139			53	139		53	139		53	139	125	140	53	53
		19	19	19	83						53				19	53		53			53	53	139			
					19																48		53			

図2 (Takehana et al.,2003¹)から引用)

10.今後の研究目標

今回の実験では、制限酵素 *HaeIII* しか使用していないため恵那地区に生息するメダカがどこの由来のメダカなのかははっきり特定することはできなかった。今後、後輩にこの研究を引き継いで、他の制限酵素を使って実験を行い正確な由来を特定したい。

まだまだサンプル数が少ないためアンケート結果をもとに現地調査を行いサンプル数を増やしたい。

11.謝辞

メダカについて説明をいただいた東山動植物園メダカ館 水野展敏さん、アンケートに協力していただいた恵那地区の小中学校の先生方、メダカを提供していただいた株式会社 NSP 他の皆さん、実験に関するアドバイスを下さった新潟大学 酒泉満先生、実験操作など遺伝子解析に協力いただいた岐阜県立中津商業高等学校 出原由季先生 に感謝申し上げます。

12.参考文献

- 1) Yusuke Takehana , Naoko Nagai , Masaru Matsuda , Kimiyuki Tsuchiya and Mitsuru Sakaizumi
Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome *b* Gene in Japanese of Medaka, *Oryzias latipes*
- 2) 斎田圭太 , 松田勝 , 水谷正一
ミトコンドリア DNA を指標とした栃木県産野生メダカの遺伝的多様性の解析
<http://soil.en.a.u-tokyo.ac.jp/jsidre/search/PDFs/09/09P08-14.pdf>
- 3) 中津川めだか保存会の冊子
中津川めだかとそのあゆみ 2002年9月
中津川めだかとそのあゆみ 2005年10月