

研究成果報告書（第27回学術研究助成）

2020年 3月 12日

公益財団法人 藤原ナチュラルヒストリー振興財団
理事長 野村茂樹 殿

所属機関名 九州大学生物資源環境科学府
職 名 博士課程 1年
氏 名 梅村啓太郎

1. 研究課題

希少なタナゴ類における雑種形成メカニズムの解明

2. 共同研究者

九州大学農学研究院 鬼倉徳雄 准教授
九州大学農学研究院 栗田喜久 助教授

3. 研究報告

I. 研究の目的

タナゴ類は、東アジアを中心に約 40 種が分布する小型の淡水魚である。このグループは、産卵の際に基質として淡水二枚貝を利用する点で、特徴的な繁殖生態を有している(川那部 1989)。タナゴ類は同じ小河川や農業用水路で同所的に最大 6 種が生息することが知られているが、生息環境や産卵基質・繁殖生態の相違による生殖隔離が存在するため、種間交雑が報告されることは稀である(Nagata et al. 1988)。ところが、九州の有明海流入河川(菊池川水系)の中流域の農業用水路において、希少タナゴ類の種間交雑個体が複数確認された。申請者は、産卵基質である二枚貝の個体数・種数減少によって、産卵基質が種間で重複し、種間交雑の原因の一つとなっていると考えた。この仮説を検証するためには、二枚貝内部のタナゴ類卵仔魚を確認することで、種間で基質が重複していないか確認することが求められる。これまで、開口器を用いて二枚貝内部を覗きこむことで、内部に産み付けられたタナゴ類卵仔魚の確認がなされてきた。しかしながら、技術的熟練を要する、種判別が困難、産み付けられた位置によっては確認できない、絶滅が危惧される二枚貝を傷つける可能性があるなど、問題点も多く存在した。そこで、二枚貝に産み付けられたタナゴ類卵仔魚の在・不在を非殺傷的に確認する手法を開発することを目指し、研究を行った。

II. 研究の方法

本研究では、二枚貝を開口せずに、内部の卵仔魚の在・不在を下記のように判別



図1. 個体識別されたマツカサガイ

した。二枚貝を水（約 100mL）に 30 分静置し、その水をシリンジフィルターで濾過した。次に、フィルターから DNA を抽出し、種特異的プライマーを用いた PCR により卵仔魚の DNA が増幅されるかどうかで判断した。

この手法を確立するため、下記の順で実験を行った。(1) 水中にタナゴ類卵仔魚が DNA を放出しているか調べるため、人工授精卵仔魚の飼育水を qPCR により分析し、飼育水中に卵仔魚が DNA を放出しているかどうか調べた。(2) ヤリタナゴの産卵期に産卵母貝であるマツカサガイ 27 個体を採集し、個体識別を行い、2 週間飼育した (図 A)。飼育下で仔魚の浮上を確認するとともに、3 日に一度、採水を行った。(3) その採水サンプルは種特異的プライマーを用いた PCR により分析を行い、分析結果と内部の卵仔魚数を比較した。(4) 環境水中のヤリタナゴの DNA が検出されないことを確認するために、ヤリタナゴの産卵期の終了後に、野外でマツカサガイを採集し、同様に分析を行った。

III. 研究結果

ヤリタナゴ特異的なプライマーセットおよびプローブを用いた qPCR により、目的の領域が増幅され、Ct 値が算出された。Ct 値は発生段階でばらつきがみられた。

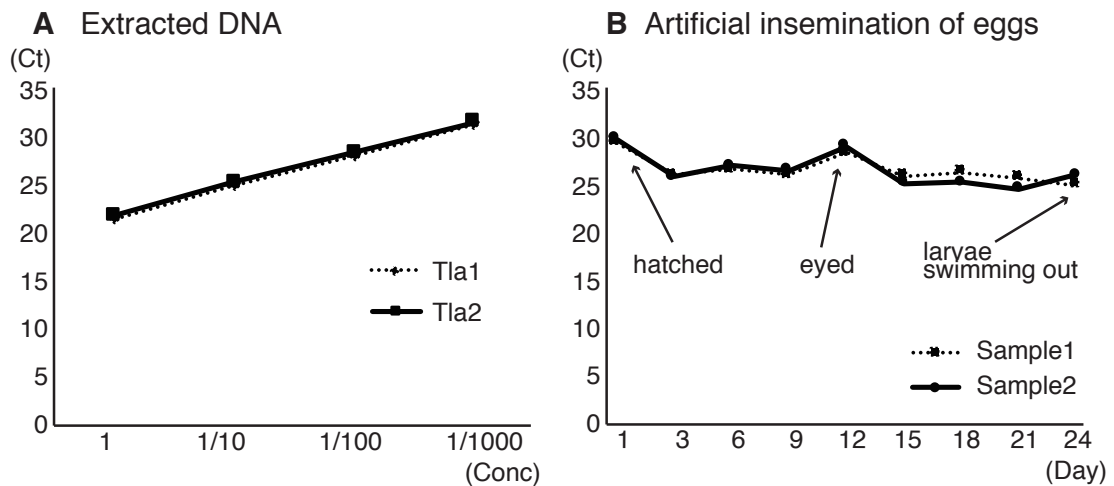


図2. 人工受精卵のqPCR結果

ヤリタナゴ特異的プライマーを用いた PCR により、ヤリタナゴの卵仔魚が入ったマツカサガイから標的の特異的断片が増幅された。全 134 回の試行について、内部の卵仔魚の在・不在と PCR による増幅の有無を比較した結果、正答率は 86.4%であった。

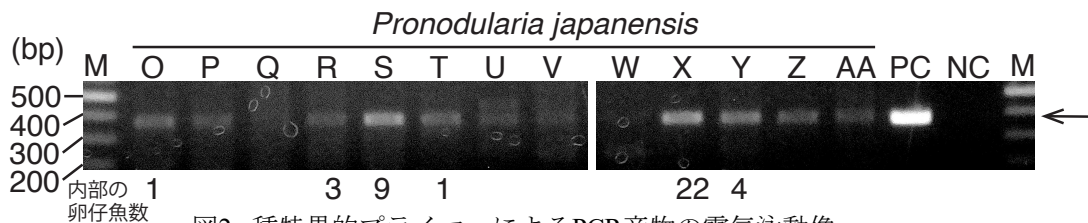


図2. 種特異的プライマーによるPCR産物の電気泳動像

ヤリタナゴの産卵期の終了後に採集したマツカサガイを同様に分析したところ、ヤリタナゴの DNA は検出されなかった。

IV. 考察

飼育水の DNA 分析から、人工授精卵および孵化仔魚が DNA を放出していることが確認された。卵仔魚などが水中に放出する DNA 量に関する報告は Takeuchi et al., 2018 を除いてほとんどなく、本研究は貴重な事例となった。通常、卵の状態では DNA を水中に大量に放出し

ていることは考えづらく、精子のコンタミネーションが生じていた可能性が高い。また、採水時期によって放出された DNA 量にバラツキが存在したのは、発生段階での放出 DNA 量の違いが影響している可能性がある。

内部に卵仔魚が存在しなくても、ヤリタナゴ DNA が検出されている少ないケースがあったものの、高い確率でマツカサガイ内部の卵仔魚を検出することができた。産卵期終了後のマツカサガイの分析からは、ヤリタナゴ DNA は検出されず、農業用水路内の環境水におけるヤリタナゴ環境 DNA は影響していないことが確認できた。内部に卵仔魚が存在しなくても、ヤリタナゴ DNA が検出されたケースは、実験上のコンタミネーションが生じた可能性、もしくは、野外で採集する直前に仔魚が浮出し、DNA が殻内に残存していた可能性が考えられた。一方で、内部に卵仔魚がいたにもかかわらず、ヤリタナゴ DNA が検出されなかったケースもいくつかあった。いずれも、分析用の汲み置き水に 30 分程度静置したが、その静置時間が短く、卵仔魚 DNA の量が不十分であり、検出できなかった可能性がある。静置時間を長くすることで、検出感度を上昇させることが可能になるかもしれない。

V. 成果発表

梅村啓太郎・栗田喜久・鬼倉徳雄、タナゴ類の二枚貝における産卵状況確認手法の開発、日本魚類学会年会、高知大学朝倉キャンパス、9 月、2019 年

梅村啓太郎・栗田喜久・鬼倉徳雄、二枚貝中に産卵されたタナゴ類卵仔魚の非殺傷的な確認、日本生態学会大会、名城大学天白キャンパス、2020 年 3 月 7 日

VI. 今後の課題

考察において述べたとおり、本手法は、少ないながらも誤判別が確認されており、DNA 検出感度を上昇させるための方法や、誤検出を防ぐための方法は、今後、さらに詳細な検証が必要である。

これまで、タナゴ類の種間交雑が確認された菊池川水系や筑後川水系などにおいても同様に二枚貝を採集し、現場で採水を行っており、今後、これらの野外サンプルの分析を進めていく予定である。他のタナゴ類にも応用できるよう種ごとに特異的プライマーを設計しつつ、現場での実証実験を行っていくことが求められる。本手法は、タナゴ類の保全の現場や生態調査を推進することとなるだろう。