

## 核 DNA マーカーによるミナミメダカ沖縄諸島タイプの 確率的判定と低い遺伝的多様性

畑中ひらり<sup>1,2</sup>・今井秀行<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>〒 903-0213 沖縄県西原町千原1 国立大学法人琉球大学理学部海洋自然科学科生物系  
<sup>2</sup> (現所属) 〒 901-0225 沖縄県豊見城市3-59 株式会社 FROGS

### Conservation implications of low genetic diversity of the unique Okinawa Islands subpopulation of *Oryzias latipes* based on nuclear DNA markers

Hirari Hatanaka<sup>1,2</sup>, Hideyuki Imai<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology and Marine Science, Faculty of Science, University of the Ryukyus,  
1 Senbaru, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan

<sup>2</sup> (Present address) FROGS Co. Ltd., Toyopla 307, 3-59 Tomigusuku, Okinawa 901-0225, Japan

**Abstract.** This study included 508 individuals of *Oryzias latipes* from 15 sites in mainland Japan and 10 sites in the Ryukyu Archipelago and Taiwan used in Imai *et al.* (2017), and new samples from four sites in the Ryukyu Archipelago, four sites in China and South Korea, and one from hi-medaka. We developed four new PCR-RFLP nuclear DNA markers (*Orla16-185-MboI*, *Orla1-29-BstUI*, *Orla1-51-AluI*, and *P0Ex-HinfI*) based on three universal microsatellite primer sets and an exon-primed intron-crossing (EPIC) primer set for fish. STRUCTURE analysis indicated that Amami-oshima, Iheya, Izena, Ginama, Ogimi, and Bios no Oka formed a cluster, while specimens from Fukuchi, the former Kadena Ammunition Storage area, Zamani, and other Okinawa Islands formed a different cluster. The genetic diversity of subpopulations from Fukuchi, the former Kadena Ammunition Storage area, and Zamani was higher than those from other Okinawa Islands. The individual exclusion test (>90% condition) was applied to the Okinawa Islands subpopulation using GeneClass2. It will be important to apply these genetic markers for periodical genetic monitoring of this subpopulation.

#### (要約)

分析に供したサンプルとして今井ほか (2017) で用いた本州 15 地域, 琉球列島 10 地域, 台湾 1 地域に加えて新たに琉球列島 4 地域, ヒメダカ, 中国大陸と朝鮮半島 4 地域を含む合計 508 個体を使用した。3 つの魚類汎用マイクロサテライトプライマーと 1 つのイントロン領域用プライマーにおいて多型が得られた 4 つの遺伝子座 (*P0Ex-Hinf I* : 7 種類, *Orla1-51-Alu I* : 8 種類, *Orla16-185-Mbo I* : 5 種類, *Orla1-29-BstU I* : 3 種類) を解析に用いた。STRUCTURE 解析によって奄美大島, 伊平屋島, 伊是名島, 宜名真, 大宜味, ビオスの丘は同じ祖先クラスターに属していることを示した。琉球型の中でも福地ダム, 旧東恩納弾薬庫地区, 座間味

\*連絡先 (corresponding author) : imai@sci.u-ryukyu.ac.jp

は異なったパターンを示し、これらの平均ヘテロ接合率をみると、他の琉球型個体群よりも遺伝的多様性保有量が大きかった。GeneClass2による個体レベルでの沖縄諸島タイプへの確率的判定は、90%以上の判定率で活用可能と考えられた。本研究で示した核 DNA マーカーによる個体レベルの琉球諸島型の判別手法、遺伝的多様性保有量および移入とそれに伴う遺伝子汚染の現状について示した。今後、沖縄諸島タイプの系統保存やモニタリング調査にこの研究成果の活用が期待される。

## はじめに

メダカ類は日本ではミナミメダカ *Oryzias latipes* (Temminck and Schlegel, 1846) とキタノメダカ *Oryzias sakaizumii* Asai, Senou and Hosoya, 2012 の 2 種類が生息しており (瀬能, 2013), 朝鮮半島西側や中国および台湾ではチュウゴクメダカ *Oryzias sinensis* Chen, Uwa and Chu, 1989 が生息している (Tzeng *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2011)。沖縄島の河川では外来種であるカダヤシ *Gambusia affinis* やグッピー *Poecilia reticulata* およびティラピア類 *Tilapia spp.* の定着, 土地開発などの影響によって, ミナミメダカの生息域は減少している (石川ほか, 2013; 吉郷, 2014)。環境省によってミナミメダカは絶滅危惧Ⅱ類 (細谷, 2015) に, 沖縄県によって絶滅危惧Ⅰ A 類 (遠藤, 2017) に指定されており, 保護の対象となっている。

ミナミメダカはアロザイム分析によって東日本型, 山陰型, 東瀬戸内型, 西瀬戸内型, 大隅型, 北部九州型, 有明型, 薩摩型, 琉球型に分かれている (酒泉, 1990)。Sakaizumi *et al.* (1983) は, アロザイム 21 遺伝子座によって琉球型と瀬戸内型の間に遺伝距離  $D = 0.16$  (約 80 万年前分岐) を示した。Matsuda *et al.* (1997) と Takehana *et al.* (2003) は琉球型のミトコンドリア DNA (全領域とチトクローム b 領域) の制限酵素切断型多型 (RFLP) 分析が有明型と薩摩型と同じマイトタイプを示すため区別できないことを示した。Setiamarga *et al.* (2009) はミトコンドリア DNA 全領域の分子系統解析によって沖縄島のミナミメダカが本州地域と約 1,000 万年前に分岐したことを示した。今井ほか (2017) はミトコンドリア ND1 領域の PCR-RFLP 分析に

よって琉球型の中でも沖縄諸島域だけ区別できることを示して沖縄諸島タイプを提唱した。さらに, 与論島において他地域型の移入と沖縄島南部における遺伝子汚染を報告した (今井ほか, 2017)。この遺伝子汚染の証明は共優性マーカーであるアロザイム分析によってアスパラギン酸アミノ転移酵素 (aspartate aminotransferase, 以下 Aat とする) を検出するために新鮮な筋肉片を用いなければならない。近年では絶滅危惧種の個体の遺伝学的分析は, 生存に影響を与えない鱗サンプルを用いた DNA 分析が活用されている (大仲ほか, 1999; 富田ほか, 2016)。そこで本研究では, 新規に開発した核 DNA マーカーによって GeneClass2 を用いた沖縄諸島タイプの判別と遺伝的多様性保有量について検討した。

## 材料と方法

今井ほか (2017) で用いられた 2003 年から 2018 年に採集された新潟県長岡市 (n=10), 福島県猪苗代湖 (n=10), 埼玉県さいたま市岩槻 (n=10), 千葉県江戸川下流 (n=10), 静岡県雄踏町 (n=10), 愛知県春日井市 (n=20), 岡山県旭川水系 (n=10), 対馬 (n=6), 福岡県津屋崎町 (n=10), 佐賀県唐津市 (n=10), 長崎県諫早市 (n=7), 大分県 (n=15), 鹿児島県大隅半島肝属川水系 (n=18), 鹿児島市永田川水系 (n=36), 鹿児島県上甕島嶺崎池 (n=19), 鹿児島県奄美大島龍郷町 (n=19), 鹿児島県与論島 (n=15), 沖縄県伊平屋島 (n=15), 沖縄県伊是名島 (n=20), 沖縄県宜名真ダム (n=15), 沖縄県大宜味村 (n=15), 沖縄県福地ダム (n=11), 沖縄県漢那ダム (n=13), 沖縄県沖縄市内の嘉

手納弾薬庫（旧東恩納弾薬庫地区，米軍泡瀬ゴルフ場移設先）（ $n=19$ ），中国上海市（ $n=6$ ），中国杭州（ $n=10$ ），中国伊宁市（ $n=10$ ），朝鮮半島東岸（ $n=8$ ），台湾（ $n=5$ ）および遺伝子汚染が検出されている沖縄県南城市知念（ $n=50$ ）に加えて沖縄県座間味島（ $n=20$ ）と沖縄県うるま市ビオスの丘（ $n=25$ ），沖縄県立総合教育センター（渡嘉敷島系統）（ $n=20$ ），沖縄県金武ダム（ $n=5$ ），市販のヒメダカ（ $n=6$ ）の合計 34 個体群 508 個体を用いた．DNA 抽出は Imai *et al.* (2004) に従った．

多型が得られた遺伝子座の増幅は，Gotoh *et al.* (2013) による魚類の汎用マイクロサテライト DNA プライマーの Orla1-29-f と Orla1-29-r，Orla1-51-f と Orla1-51-r，Orla16-185-f と Orla16-185-r および Chow and Yanagimoto (2016) によるイントロン領域の増幅用プライマーの P0ExAF と P0ExBR であった (Table 1)．PCR 酵素は EmeraldAmp<sup>TM</sup> PCR Master Mix (Takara Bio) を用いた．PCR 反応 Orla1-29，Orla1-51，Orla16-185 では 94℃ 5 分間の変性後，94℃ 45 秒の変性，59℃ 30 秒のアニーリング反応，72℃ 20 秒の伸長反応を 30 サイクル行い，最後に 72℃ 7 分間伸長反応を行った．P0Ex の PCR 反応では 94℃ 4 分間熱変性後，94℃ 30 秒変性，56℃ 30 秒アニーリング反応，72℃ 50 秒伸長反応を 35 サイクル行い，最後に 72℃ で 7 分間伸長反応を行った．その後 1% アガロース S (ニッポンジーン) を用いて電気泳動し，臭化エチジウム (バイオラッド) または UltraPower<sup>TM</sup>

DNA/RNA セーフダイ (ジェレックス) 染色後にトランスイルミネーター (Advance) で増幅を確認した．塩基配列分析はマクロジェン・ジャパンへ外注した．得られた塩基配列は MEGA 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016) を用いてアライメントして決定した．多型が得られる制限酵素の選択は GENETYX-MAC version8.0 (ソフトウェア開発) を用いた．多型が見られた制限酵素は，Orla1-29 では *Bst*U I (New England BioLabs)，Orla1-51 では *Alu* I (Takara Bio)，Orla16-185 では *Mbo* I (Takara Bio)，P0Ex では *Hinf* I (Takara Bio) の計 4 酵素であった．それぞれの PCR 産物を制限酵素によって 37℃ で 2 時間消化後，アクリルアミドゲル 10% e-PAGEL (ATTO) を用い，200V，20mA で約 1.5 時間泳動した．本研究ではじめて分析する個体群については，今井ほか (2017) のミトコンドリア DNA の ND1 領域の PCR-RFLP による沖縄諸島タイプの是非について確認した．RFLP の検出は，PCR 産物の確認と同様に行い，デジタルカメラで電気泳動像を記録した．RFLP (切断片) の各塩基対数 (bp) は KiloACE2.0 (<http://www0.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/kiloace.pl>) によって推定した．

## データ解析

推定した各塩基対数を遺伝子型として Excel Microsatellite toolkit へ入力し，解析を行った．FSTAT ver 2.9.3 (Goudet, 2001) を用い，近交係

Table 1. PCR primers used in the present study for amplification for medaka, *Oryzias* spp. nuclear DNA and mtDNA.

Primers	Sequences	Annealing temp.
Orla1-29-f*	5'-WGSCAAATGAGAAGCAGAGC-3'	59
Orla1-29-r*	5'-TCTGSTGGTGAAAGTGTGG-3'	
Orla1-51-f*	5'-TGGTTGATTTAGTTGACATC-3'	59
Orla1-51-r*	5'-TAATAAACCCGCCAGCGTAA-3'	
Orla16-185-f*	5'-CCCAGCAGGAGAAGATTGAC-3'	59
Orla16-185-r*	5'-AATAGGGACAAACGCTGTGG-3'	
BOExAF**	5'-ATGATGCGYAAARGCCATCCG-3'	56
BOExBR**	5'-GYAAGRTCCCTCTTGGTGAA-3'	
medaka-nd1-ff***	5'-TAAGGTGGCAGAGCCCGATATTGC-3'	65
medaka-nd1-rr***	5'-AGTCAGGTGGCTTCTTGTGCGGTGC-3'	

\*Goto *et al.* (2013), \*\*Chow & Yanagimoto (2016), \*\*\*Imai *et al.* (2017)

数  $F_{is}$ 、有効アリル数を算出した。ARLEQUIN ver 3.11 (Schneider *et al.*, 1997) を用いてアリル頻度、遺伝子多様度  $H$ 、平均ヘテロ接合度の期待値  $H_e$  と観測値  $H_o$  との比を算出した。10 個体以上の標本を用いた個体群について BOTTLENECK ver 2.02 (Piry *et al.*, 1999) を用い、Cornuet & Luikart (1996) の heterozygosity excess test を行った。進化モデルとして無限対立遺伝子モデル (IAM)、段階突然変異モデル (TPM) および混合モデル (SMM) について Wilcoxon 検定による最近のボトルネック効果の有無を検討した。また、祖先集団の推定のために STRUCTURE ver. 3.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000) を用い、クラスター数  $K$  を 1 から 12 まで設定してクラスタリング分析を行なった。その後、STRUCTURE Harvester (Earl and von Holdt, 2012) を用い最適  $K$  値を推定した。個体レベルの沖縄諸島タイプへの由来の確率的判定 (exclusion test) は、GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004) による Bayes 法を用いた個体の由来判定 (Rannala & Mountain, 1997) と Paetkau *et al.* (2004) に基づく 1000 回 (Type I=0.01) のシミュレーションを用いて検討した。

## 結 果

座間味島、ビオスの丘、金武ダムおよび市販のヒメダカについてミトコンドリア ND1 領域の PCR-RFLP 分析による沖縄諸島タイプの確認した結果、ヒメダカ以外では今井ほか (2017) が示したハプロタイプ AB が検出されて沖縄諸島タイプであった。核 DNA の PCR-RFLP の結果、*P0Ex-Hinf I* の切断片が 356/356 (bp), 261/356 (bp), 336/336 (bp), 261/336 (bp), 261/261 (bp), 205/261 (bp), 205/205 (bp) の 7 種類、*Orla1-51-Alu I* の切断片が 316/316 (bp), 278/316 (bp), 268/316 (bp), 259/316 (bp), 268/278 (bp), 268/268 (bp), 259/268 (bp), 259/259 (bp) の 8 種類、*Orla1-29-BstU I* の切断片が 602/602 (bp), 415/602 (bp), 559/559 (bp),

415/559 (bp), 415/415 (bp) の 5 種類、*Orla16-185-Mbo I* の切断片が 175/175 (bp), 150/175 (bp), 150/150 (bp) の 3 種類が検出された (Fig. 1)。これらの分子量を遺伝子型として扱い、4 遺伝子座におけるアリル頻度を Table 2 に示した。アリルリッチネス数 ( $A_n$ )、ヘテロ接合体率 ( $H_e$ )、近交係数 ( $F_{is}$ ) およびそれらの平均値を示した (Table 3)。各個体群の有効アリル数は最小値 1.000 (福島県、長崎県、伊平屋島、伊是名島、宜名真)、最大値 2.356 (鹿児島県大隅半島) であった。平均ヘテロ接合体率 ( $H_e$ ) は最小値 0.05 (ビオスの丘)、最大値 0.556 (台湾) を示した。近交係数 ( $F_{is}$ ) では最小値 -1.000 (台湾)、最大値 0.421 (座間味島) であった。ボトルネック解析の結果を Table 4 に示した。ボトルネック効果が認められたのは、新潟、福島、岡山、対馬、大分、大隅、知念、中国杭州、中国伊宁であった。STRUCTURE 分析の結果を Fig. 2 に示した。最適  $K$  値を推定した結果、最適クラスター数  $K$  は 7 となった。GeneClass2 による個体レベルにおける沖縄諸島タイプ (奄美大島を除く) の確率的判定は、本州および九州 (鹿児島永田川を除く) のすべての分析個体が判定率 0 ~ 32% と低く、鹿児島永田川では 36 個体のうち 8 個体 (22%) が判定率 90% および奄美大島では 19 個体のうち 9 個体 (47%) が判定率 50% を示した。一方、沖縄諸島タイプ 90% 以上の判定率を示した沖縄諸島タイプ (遺伝子汚染の知念を除く) の個体の頻度は、伊平屋島 100%、伊是名島 100%、宜名真ダム 100%、大宜味 93%、福地ダム 100%、漢那ダム 100%、旧東恩納弾薬庫 95%、ビオスの丘 96%、金武ダム 80% で高く、座間味島 65%、沖縄県立総合教育センター 15%、南城市知念 16% で低かった。

## 考 察

核 DNA マーカーについて、琉球型のほとんどの個体の遺伝子型は、*P0Ex-Hinf I* が 205/205

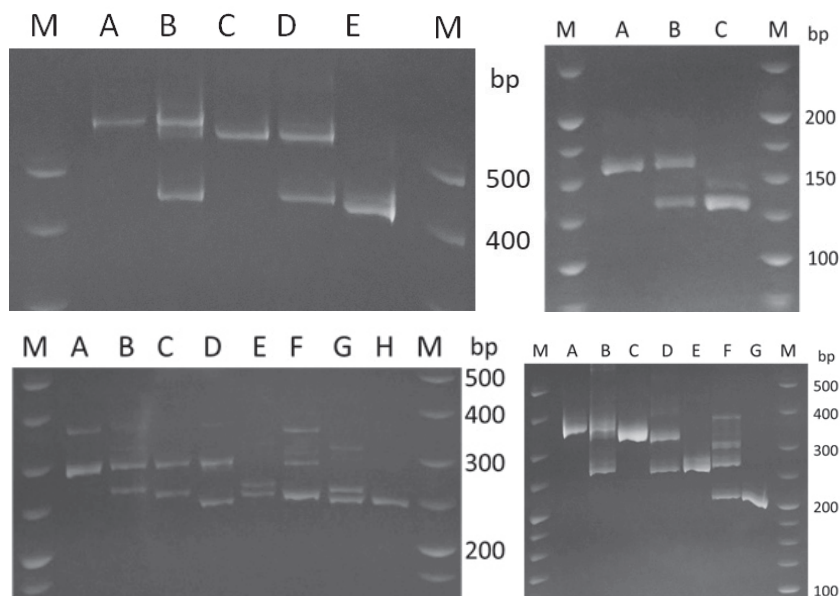


Fig. 1. Electrophoretic fragment pattern of four loci *Orla1-29-BstU I* (upper left), *Orla16-185-Mbo I* (upper right), *Orla1-51-Alu I* (lower left) and *POEx-Hinf I* (lower right) produced by digestion with four restriction endonucleases. Fragments sizes in base pair: *Orla1-29-BstU I* in lanes A: 602/602, B: 415/602, C: 559/559, D: 415/559 and E: 415/415, *Orla16-185-Mbo I* in lanes A: 175/175, B: 150/175 and C: 150/150, *Orla1-51-Alu I* in lanes A: 316/316, B: 278/316, C: 268/316, D: 259/316, E: 268/278, F: 268/268, G: 259/268 and H: 259/259, *POEx-Hinf I* in lanes A: 356/356, B: 261/356, C: 336/336, D: 261/336, E: 261/261, F: 205/261 and G: 205/205.

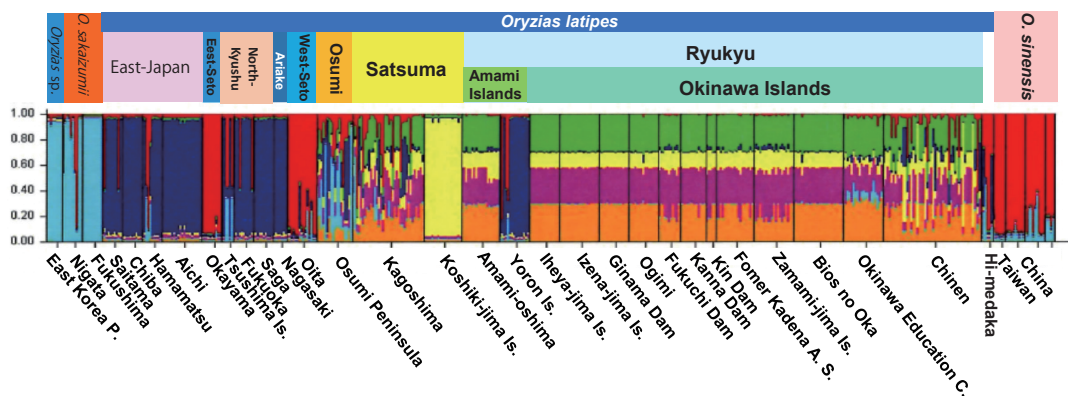


Fig. 2. STRUCTURE assignment test for  $K = 7$  of genotypes to clusters (each vertical bar represents an individual).

(bp), *Orla1-51-Alu I* が 316/316 (bp), *Orla1-29-BstU I* が 559/559 (bp), *Orla16-185-Mbo I* が 175/175 (bp) とホモ接合を示した。移入個体群の与論島と知念を除いた琉球型個体群において上記の遺伝子型を持つ割合は 77%であっ

た。琉球型の個体群と鹿児島県永田川水系、甕島鋤崎池の個体群の遺伝子型は似たようなものを示す個体があり、今回の核 DNA マーカーを個別使用して完全に琉球型を個体レベルで区別することは難しい。しかしながら、今井ほか



Table 2. Allele frequencies for medaka, *Oryzias* spp.samples

Loci	Allele	Korea	Niigata	Fukushima	Saitama	Chiba	Hamamatsu	Aichi	Okayama	Ishikawa	Fukuoka	Saga	Nagasaki	Oita	Osumi	Kagoshima	Koshikijima	Amami	Yoron
<i>Orla1-29-BstU I</i>	415	0.000	0.200	0.000	0.100	0.000	0.050	0.000	0.950	0.000	0.100	0.000	0.000	0.767	0.056	0.167	0.000	0.000	0.133
	559	0.000	0.000	0.000	0.900	1.000	0.800	1.000	0.000	0.500	0.900	1.000	1.000	0.033	0.500	0.792	1.000	1.000	0.833
	602	1.000	0.800	1.000	0.000	0.000	0.150	0.000	0.050	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.444	0.042	0.000	0.000	0.033
	259	0.000	0.800	1.000	0.000	0.000	0.150	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.333	0.111	0.000	0.000	0.000
<i>Orla1-51-Alu I</i>	268	0.563	0.200	0.000	0.850	0.700	0.600	0.625	0.950	1.000	0.800	0.650	0.857	0.767	0.389	0.264	0.000	0.000	0.633
	278	0.438	0.000	0.000	0.150	0.300	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.143	0.000	0.000	0.014	1.000	0.000	0.333
	316	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.375	0.050	0.000	0.100	0.350	0.000	0.233	0.278	0.611	0.000	1.000	0.033
	150	0.000	0.600	0.000	0.050	0.450	0.850	0.400	0.050	0.500	0.400	0.600	0.000	0.833	0.278	0.319	0.079	0.316	0.600
<i>Orla16-185-Mbo I</i>	175	1.000	0.400	1.000	0.950	0.550	0.150	0.600	0.950	0.500	0.600	0.400	1.000	0.167	0.722	0.681	0.921	0.684	0.400
	205	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.333	0.806	1.000	1.000	0.000
	261	0.000	0.350	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.667	0.194	0.000	0.000	1.000
	336	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>POEx-Hinf I</i>	356	0.000	0.650	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Continue

Loci	Allele	Iheya	Izena	Ginama	Ogimi	Fukuchi	Kanna	Kin	Kadena	Zamami	Bios	Center	Chinen	Himedaka	Shanghai	Ghulja	Taiwan
<i>Orla1-29-BstU I</i>	415	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.140	0.500	1.000	0.714	0.500
	559	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.575	0.850	0.250	0.000	0.000	0.000
	602	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.425	0.010	0.250	0.000	0.286	0.500
	259	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.417	0.083	0.929	0.400
<i>Orla1-51-Alu I</i>	268	0.000	0.000	0.000	0.000	0.409	0.038	0.400	0.184	0.500	0.000	0.000	0.070	0.417	0.833	0.071	0.600
	278	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.080	0.000	0.083	0.000	0.000
	316	1.000	1.000	1.000	1.000	0.591	0.962	0.600	0.816	0.500	1.000	1.000	0.850	0.167	0.000	0.000	0.000
	150	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.160	1.000	0.167	0.357	0.000
<i>Orla16-185-Mbo I</i>	175	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.975	0.840	0.000	0.833	0.643	1.000
	205	1.000	1.000	1.000	0.967	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.980	0.750	0.730	0.000	0.000	0.000	0.000
	261	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.250	0.270	1.000	0.583	1.000	1.000
	336	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.417	0.000	0.000
<i>POEx-Hinf I</i>	356	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

(2017)のミトコンドリアND1のPCR-RFLPマーカーと核DNAマーカーのよる GeneClass2 を用いた確率的判定 (90%以上) を併用すれば沖縄諸島タイプを高い確率で個体レベルの区別が可能である。また今回の核DNAマーカーでは、琉球型の中でも特に奄美大島の個体群は他の沖縄諸島の個体群と異なった遺伝子型を示す個体が多かった。この例として Shibata *et al.* (2016) によると日本産ハブは 650 万年前に奄美と沖縄に分化したと報告している。このように他の陸上動物においても奄美大島と沖縄諸島で遺伝的分化が認められていることから、ミナミメダカ琉球型の中でも沖縄諸島タイプと奄美諸島タイプを区別して保全単位とするべきである。

STRUCTURE 解析の結果を見ると、琉球型の個体群 (移入の与論島と遺伝子汚染の知念を除く) と他地域の個体群では祖先クラスターが全く異なった。この研究で初めて分析したビオスの丘個体群は、STRUCTURE 解析とミトコンドリアDNA解析の結果および GeneClass2 の判定率が高い (96%) ことから沖縄諸島タ

イプと考えられた。また、沖縄県立総合教育センター (渡嘉敷島系統) 個体群は、林・今井 (2018) によるとアロザイム分析とミトコンドリアDNA分析によって琉球型と判定されたが、STRUCTURE 解析の結果を示す Fig.2 では沖縄諸島タイプ (知念を除く) の祖先クラスターにはない水色パターンを示しており、また GeneClass2 による沖縄諸島タイプ判定率が 15% と非常に低いことから遺伝子汚染の可能性を示している。つまりアロザイム 1 遺伝子座 (Aat) だけで琉球型の遺伝子汚染を検出することは十分でないことがわかる。沖縄県立総合教育センター個体群のミトコンドリアDNAが沖縄諸島タイプを示した理由として、県外由来のミトコンドリアDNAをもつ個体数が少ないために消失したか、分析個体数が少ないために検出できなかった可能性が考えられた。従って今後の沖縄諸島タイプの判定解析には今回開発した核DNAマーカーおよびミトコンドリアDNAマーカーと十分な個体数を用いる必要がある。また鱈サンプリングによって生存に影響を与えない

核 DNA マーカーによるミナミメダカ沖縄諸島タイプの確率的判定と低い遺伝的多様性

Table 3. Genetic diversities of four nuclear DNA loci surveyed for medaka, *Oryzias* spp. samples.

Loci	Korea	Niigata	Fukushima	Saitama	Chiba	Hamamatsu	Aichi	Okayama	Tsushima	Fukuoka	Saga	Nagasaki	Oita	Osumi	Kagoshima	Koshikijima	Amami	Yoron
<i>Orla1-29-BstU1</i>																		
Na	1	2	1	2	1	3	1	2	2	2	1	1	3	3	3	1	1	3
Ar	1.0	2.0	1.0	1.8	1.0	2.4	1.0	1.5	2.0	1.8	1.0	1.0	2.3	2.5	2.2	1.0	1.0	2.2
He	0.000	0.337	0.000	0.190	0.000	0.353	0.000	0.100	0.546	0.190	0.000	0.000	0.384	0.565	0.349	0.000	0.000	0.297
Ho/He	0.000	1.187	0.000	1.053	0.000	0.283	0.000	0.000	0.000	1.053	0.000	0.000	0.521	0.000	0.637	0.000	0.000	0.000
<i>Orla1-51-Alu1</i>																		
Na	2	2	1	2	2	3	2	2	1	3	2	2	2	3	4	1	1	3
Ar	2.0	2.0	1.0	1.9	2.0	2.9	2.0	1.5	1.0	2.5	2.0	1.9	2.0	3.0	2.8	1.0	1.0	2.3
He	0.525	0.337	0.000	0.268	0.442	0.584	0.481	0.100	0.000	0.358	0.479	0.264	0.370	0.679	0.552	0.000	0.000	0.503
Ho/He	1.667	1.187	0.000	1.119	1.358	1.027	1.559	1.000	0.000	1.117	1.461	1.082	1.261	1.146	1.007	0.000	0.000	1.458
<i>Orla16-185-Mbo1</i>																		
Na	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
Ar	1.0	2.0	1.0	1.5	2.0	1.9	2.0	1.5	2.0	2.0	2.0	1.0	1.9	2.0	2.0	1.6	2.0	2.0
He	0.000	0.505	0.000	0.100	0.521	0.268	0.492	0.100	0.546	0.505	0.505	0.000	0.287	0.413	0.441	0.149	0.444	0.497
Ho/He	0.000	1.187	0.000	1.000	1.727	1.119	1.626	1.000	1.832	1.584	1.584	0.000	1.161	1.345	1.071	1.060	0.711	0.805
<i>POEx-Hinf1</i>																		
Na	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1
Ar	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.9	1.0	1.0	1.0
He	0.000	0.479	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.457	0.318	0.000	0.000	0.000
Ho/He	0.000	1.044	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.972	1.223	0.000	0.000	0.000
Mean																		
Na	1.3	1.6	1.0	1.4	1.5	1.8	1.5	1.4	1.5	1.6	1.5	1.0	2.0	2.0	2.8	1.0	1.3	1.8
Ar	1.3	2.0	1.0	1.5	1.5	2.0	1.5	1.4	1.5	1.8	1.5	1.2	1.8	2.4	2.2	1.2	1.2	1.9
He	0.131	0.415	0.000	0.140	0.241	0.301	0.243	0.075	0.273	0.263	0.246	0.066	0.260	0.529	0.415	0.037	0.111	0.324
Ho/He	0.417	1.151	0.000	0.793	0.771	0.608	0.796	0.500	0.458	0.938	0.761	0.271	0.736	0.866	0.984	0.265	0.178	0.754
FIS	-0.750	-0.027	NA	-0.080	-0.607	0.178	-0.618	0.000	0.091	-0.355	-0.570	-0.091	0.041	0.163	0.012	-0.059	0.294	0.024
Continue																		
Loci	Iheya	Izena	Ginam	Ogimi	Fukuchi	Kanna	Kin	Kadena	Zamami	Bios	Center	Chinen	Himedaka	Shanghai	Ghulja	Taiwan		
<i>Orla1-29-BstU1</i>																		
Na	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	1	2	2		
Ar	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.9	3.0	1.0	2.0	2.0		
He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.501	0.260	0.682	0.000	0.440	0.556		
Ho/He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.297	0.923	0.244	0.000	1.299	1.799		
<i>Orla1-51-Alu1</i>																		
Na	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	3	3	3	2	2		
Ar	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.4	2.0	1.9	2.0	1.0	1.0	2.1	3.0	2.7	1.7	2.0		
He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.507	0.077	0.533	0.309	0.513	0.000	0.000	0.269	0.682	0.318	0.143	0.143		
Ho/He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.896	0.999	0.750	0.852	0.585	0.000	0.000	1.115	0.733	1.048	0.999	5.594		
<i>Orla16-185-Mbo1</i>																		
Na	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	1		
Ar	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1.9	1.0	2.0	2.0	1.0		
He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.272	0.000	0.303	0.495	0.495		
Ho/He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.176	0.000	1.100	1.443	0.000		
<i>POEx-Hinf1</i>																		
Na	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1		
Ar	1.0	1.0	1.0	1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.2	2.0	2.0	1.0	2.0	1.0	1.0		
He	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040	0.385	0.398	0.000	0.530	0.000	0.000		
Ho/He	0.000	0.000	0.000	0.996	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.299	0.955	0.000	1.572	0.000	0.000		
Mean																		
Na	1.0	1.0	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.8	2.5	2.0	2.0	1.8	1.5		
Ar	1.0	1.0	1.0	1.1	1.3	1.1	1.3	1.2	1.3	1.1	1.7	2.0	2.0	1.9	1.7	1.5		
He	0.000	0.000	0.000	0.017	0.127	0.019	0.133	0.077	0.128	0.010	0.234	0.300	0.341	0.288	0.269	0.269		
Ho/He	0.000	0.000	0.000	0.199	0.179	0.200	0.150	0.170	0.117	0.200	0.719	0.834	0.196	0.744	0.748	1.479		
FIS	NA	NA	NA	0.000	0.107	0.000	0.273	0.151	0.421	0.000	-0.292	-0.035	0.535	-0.343	-0.364	-0.800		

Na: number of allele, Ar: allelic richness, He: heterozygosity estimated, Ho: heterozygosity observed

点も大きな利点として挙げられる。与論島個体群は明らかに琉球型の祖先クラスターとは異なることから、今井ほか（2017）の結果と同様に他地域からの移入であることを明確に示した。また、沖縄島知念個体群でも鹿児島県永田川水系の祖先クラスターに酷似していたことから、薩摩型からの移入による遺伝子流動を示し、

今井ほか（2017）の結果を裏付けていた。さらに朝鮮半島東岸個体群（東韓集団）は、キタノメダカの分布域である新潟県と福島県と似たパターンになっていることから、チュウゴクメダカとミナミメダカよりもキタノメダカに遺伝的に近縁と考えられた。またキタノメダカの新潟個体群の祖先クラスターにミナミメダカ由来の

遺伝子流動を示していたことから遺伝子汚染が考えられた。

沖縄諸島タイプの中でも福地ダム、嘉手納、座間味島個体群は他の個体群とは異なるパターンを示した (Fig. 2)。個体群内の分析個体数が少ないために参考程度になるが、各個体群の遺伝的多様性の保有量を示す平均ヘテロ接合体率 (He) は、それぞれ 0.127, 0.077, 0.128 であった (Table 3)。同じ沖縄諸島タイプである伊平屋島、伊是名島、宜名真ダム、大宜味、漢那ダムにおいて、特に大宜味 0.017、漢那ダム 0.019 と He 値が小さく、さらに一部はヘテロ接合体が全くない単型のために He 値を算出することができなかった。このことから福地ダム、嘉手納、座間味島個体群は他の沖縄諸島タイプの個体群より遺伝的多様性が高いことを示している。とくに、福地ダムと嘉手納サンプルの採集地点は米軍基地内にあり、簡単には立ち入ることができないため他の地域型の放流の影響とは考えにくい。一方、遺伝的多様性が低かった伊平屋島、伊是名島、宜名真ダム、大宜味、漢那ダムでは外来魚の影響や水田からサトウキビ畑への転換などによって生息環境が悪化し、個体群の縮小に伴って遺伝的多様性が失われたと考えられる (現在ではダム以外は絶滅状態)。ボトルネック効果が認められた個体群は、新潟、福島、岡山、対馬、大分、大隅、知念、杭州、伊宇であった。しかし、浜松以外の個体群の確率 (P 値) は、0.0625 であり有意水準である危険率 0.05 に近いことからボトルネック効果に近い影響を受けている可能性が考えられた。

県外ではヒメダカの養殖産地で有名な奈良県大和郡山市の河川で採集されたミナミメダカがヒメダカと同じマイトタイプ (ミトコンドリア DNA 型) を持っていた事例 (小山・北川, 2009)、また東京都野川のミナミメダカにおいても外来遺伝子による遺伝的攪乱が報告されており (中尾ほか, 2017)、全国的に遺伝子汚染が広がっている。品種改良した観賞用のメダカを自然に放流することはもちろんのこと、今回

の結果のように同じ地域型内でも個体群によって遺伝子組成に違いがあるため、安易な放流は避けるべきである。また、座間味島の個体群について、同じ離島である伊是名島、伊平屋島と同じ祖先クラスターにはならなかった。また、嶋津 (2014) によると聞き込み調査で座間味島のミナミメダカは大宜味村から移植されたと述べているが、どのような経緯でいつ移植されたのか、具体的なことが示されていない。しかし STRUCTURE 解析ではこの研究で用いた大宜味個体群は座間味と異なっているため、本研究のサンプリングが移植前の可能性があるが、渇水のため野生絶滅した可能性が高く系統保存の論議はできない。このように由来の不明確な個体群や野生絶滅した個体群、移入個体群による在来個体群の遺伝子汚染が広がっているため、沖縄諸島タイプの系統

Table 4. Probability of bottleneck estimated using BOTTLENECK under infinite alleles model (IAM), two-phase model (TPM) and stepwise mutation model (SMM) with Wilcoxon's signed-rank test. Bold numerical significance ( $P < 0.05$ ).

	IAM	TPM	SMM
Niigata	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>
Fukushima	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>
Saitama	0.0625	0.0938	0.4375
Chiba	0.0625	0.0625	0.0625
Hamamatsu	0.4375	0.4375	0.4375
Aichi	0.0625	0.0625	0.0625
Okayama	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>
Tsushima	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>
Fukuoka	0.0625	0.0938	0.4375
Saga	0.0625	0.0625	0.0625
Nagasaki	0.0625	0.0625	0.0625
Oita	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>	0.0625
Osumi	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>	0.1563
Kagoshima	0.0625	0.0625	0.4375
Koshikijima	0.0625	0.0625	0.0625
Amami	0.0625	0.0625	0.0625
Yoron	0.0625	0.0625	0.0938
Iheyu	0.0625	0.0625	0.0625
Izena	0.0625	0.0625	0.0625
Ginama	0.0625	0.0625	0.0625
Ogimi	0.0625	0.0625	0.0625
Fukuchi	0.0625	0.0625	0.0625
Kanna	0.0625	0.1250	0.1250
Kadena	0.0625	0.0625	0.0625
Zamami	0.0625	0.0625	0.0625
Bios	0.0625	0.0625	0.0625
Chinen	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>	0.0625
Koshu	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>
Gurugla	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>	<b>0.0313</b>



保存の方策が喫緊に求められている。

## 謝 辞

上海水産大学外事オフィス副主任の鐘俊生教授とソウル国立大学獣医学部の呉大鉉研究員にはサンプルをご提供していただきました。有限会社らんの里沖縄の観光部の安慶名勉運営課長と比嘉博経営企画室長にはピオスの丘のサンプル採集にご協力いただきました。また、沖縄県立総合教育センターの渡嘉敷島系統サンプルをご提供していただいた理科教育班の林尚美研究主事、そして沖縄島のサンプルをご提供いただきました那覇市立大名小学校の後藤岳二校長に感謝申し上げます。本研究は琉球大学の高度統合型熱帯海洋科学技術イノベーション創出研究拠点形成事業から支援を受けました。

## 引用文献

- Chow, S., Yanagimoto, T., 2016. Universal PCR primers for ribosomal protein gene introns of fish. *International Aquatic Research*, **8**: 29-36.
- Cornuet, J. M., Luikart, G., 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**: 2001-2014.
- 遠藤(高田)未来美, 2017. ミナミメダカ. 改訂・沖縄県の絶滅のおそれのある野生生物 第3版(動物編). 239-240, 沖縄県, 那覇.
- Earl, D. A., von Holdt, B. M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, **4**: 359-361.
- Gotoh, R. O., Tamate, S., Yokoyama, J., Tamate, H. B., Hanzawa, N., 2013. Characterization of comparative genome-derived simple sequence repeats for acanthopterygian fishes. *Molecular Ecology Resources*, **13**: 461-472.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- 林尚美・今井秀行, 2018. 沖縄県立総合教育センターメダカについて—ミナミメダカ「琉球型」地域個体群と確認される—。沖縄生物教育研究会誌, (50): 21-26.
- 細谷和海, 2015. メダカ南日本集団「レッドデータブック 2014 - 日本の絶滅のおそれのある野生生物 - 4 汽水・淡水魚類」, 296-297, ぎょうせい, 東京.
- 石川哲郎・高田未来美・徳永圭史・立原一憲, 2013. 沖縄島に導入された外来純淡水魚類の定着状況および分布パターン. 保全生態学研究, **18**: 5-18.
- 今井秀行・米沢俊彦・立原一憲, 2017. ミナミメダカ琉球型個体群における他個体群の放流による遺伝的攪乱の初事例. 日本生物地理学会会報, **71**: 121-129.
- Imai, H., Cheng, J.H., Hamasaki, K., Numachi, K. 2004. Identification of four mud crab species (genus *Scylla*) using ITS-1 and 16S rDNA markers. *Aquatic Living Resources*, **17**: 31-34.
- 小山直人・北川忠生, 2009. 奈良県大和川水系のメダカ集団から確認されたヒメダカ由来のミトコンドリア DNA. 魚類学雑誌, **56**: 153-157.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**: 1870-1874.
- Matsuda, M., Yonekawa, H., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., 1997. Geographic variation and diversity in the mitochondrial DNA of the medaka, *Oryzias latipes*, as determined by restriction endonuclease analysis. *Zoological Science*, **14**: 517-526.
- 中尾遼平・入口友香・周翔瀛・上出櫻子・北川忠生・小林牧人, 2017. 東京都野川のミナミメダカにおける外来遺伝子の河川内分布現説.

- 魚類学雑誌, **64** : 131-138.
- 大仲知樹・佐々木裕之・長井健生・沼知健一, 1999. 絶滅危惧種ウシモツゴ集団に見られた mtDNA D ループ領域の著しい単型性. 日本水産学会誌, **65** : 1005-1009.
- Paetkau, D., Slade, R., Burden, M., Estoup, A., 2004. Direct real-time estimation of migration rate using assignment methods: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, **13**: 55-65.
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J. M., 1999. BOTTLENECK : a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90** : 502-503.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A., 2004. GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, **95**: 536-539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155** : 945-959.
- Rannala, B., Mountain, J. L., 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **94**: 9197-9221.
- 酒泉満, 1990. 遺伝学的にみたメダカの種と種内変異. 江上信男・山上健次郎・嶋昭紘 (編), メダカの生物学. 143-161. 東京大学出版会, 東京.
- Sakaizumi, M., Moriwaki, K., Egami, N., 1983. Allozymic variation and regional differentiation in wild population of the fish *Oryzias latipes*. *Copeia*, **1983**: 311-318.
- Schneider, S., Kueffer, J. M., Roessli, D., Excoffier, L., 1997. Arlequin ver. 1.1 : A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- 瀬能宏, 2013. ミナミメダカ. 中坊徹次 (編), 日本産魚類探索 : 全種の同定, 第三版. 649. 東海大学出版, 東京.
- Setiamarga, D. H. E., Miya, M., Yamanoue, Y., Azuma, Y., Inoue, J. G., Ishiguro, N. B., Mabuchi, K., Nishida, M., 2009. Divergence time of the two regional medaka populations in Japan as a new time scale for comparative genomics of vertebrates. *Biology Letters*, **5**: 812-816.
- Shibata, H., Chijiwa, T., Hattari, S., Terada, K., Ohno, M., Fukumaki, Y., 2016. The taxonomic position and the unexpected divergence of the Habu viper, *Protobothrops* among Japanese subtropical islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **101** : 91-100.
- 嶋津信彦, 2014. 2004 年夏に実施した調査による座間味島, 阿嘉島, 外地島からの陸水動物の分布記録. *Fauna Ryukyuana*, **15** : 1-4.
- Takehana, Y., Nagai N., Matsuda M., Tsuchiya K., Sakaizumi M., 2003. Geographic variation and diversity of the cytochrome *b* gene in wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Science*, **20** : 1279-1291.
- 富田峻平・松崎章平・岡慎一郎・戸田実・今井秀行, 2016. 絶滅危惧種タナゴモドキ集団の高い遺伝的多様性と遺伝的均一性. 魚類学雑誌, **63** : 27-32.
- Tzeng, C. S., Lin, Y. S., Lin, S. M., Wang, T. Y., Wang, F. Y., 2006. The phylogeography and population demographics of selected freshwater fishes in Taiwan. *Zoological Studies*, **45**: 285-297.
- Yoon, M., Kim, K., Bang, I., Yoon, K. N., Kim, D. S., 2011. Complete mitogenome sequence of the Chinese medaka *Oryzias sinensis* (Teleostei: Belontiiformes) and its phylogenetic analysis. *Genes & Genomics*, **33** : 307-312.
- 吉郷英範, 2014. 琉球列島産陸水性魚類相および文献目録. *Fauna Ryukyuana*, **9** : 1-153.

(2018 年 10 月 14 日受領, 2018 年 11 月 8 日受理)