

宮城県で確認されたドジョウ(クレード A)(コイ目ドジョウ科) 雄個体の遺伝的・形態的特徴

旗 薫^{1*}・小池花苗¹・丹野夕輝¹・中島 淳²

¹ 株式会社エコリス 〒981-1248 宮城県仙台市太白区中田 5-3-21

² 福岡県保健環境研究所 〒818-0135 福岡県太宰府市向佐野 39

* 責任著者 E-mail hata@ecoris.co.jp

キーワード: キタドジョウ, 骨質盤, クレード B, 保全

2019 年 8 月 1 日受付 2019 年 9 月 17 日受理

要旨 宮城県で採集されたクレード A に属すると思われるドジョウについて, ミトコンドリア DNA 調節領域による遺伝的特徴と, 体型や骨質盤による形態的特徴を調査した. 宮城県産クレード A はキタドジョウと同定された下北半島産クレード A と同じ遺伝的集団内の異なる分集団に属すること, 眼径や第 2 口髭長の体長比は下北半島産クレード A が示す値に近いが, 骨質盤の形態は明瞭に異なることなどが明らかとなった. このことから, 宮城県産クレード A はキタドジョウとは形態的に区別できる未知の在来集団, もしくは人為的に導入されたドジョウとの交雑集団である可能性が考えられた.

はじめに

日本国内に生息するドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* は長く 1 種と考えられていたが, 近年の遺伝学的・形態学的研究により複数種・集団を内包することが明らかにされた (Morishima et al. 2008, 小出水ほか 2009, 清水ほか 2011, Kitagawa et al. 2011, Okada et al. 2017). これらの結果を受けて中島・内山 (2017) は日本産の在来ドジョウ属をドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus*, キタドジョウ *Misgurnus* sp. (clade A), ヒョウモンドジョウ *Misgurnus* sp. OK, シノビドジョウ *Misgurnus* sp. IR の 4 種として仮に整理した. しかし, ドジョウとされるものも日本列島産と中国大陸産では遺伝的に区別され (Morishima et al. 2008, 小出水ほか 2009), 形態的にも区別が可能であると推測されること (吉郷 2011, 中島・内山 2017), また, キタドジョウ, ヒョウモンドジョウ, シノビドジョウの 3 種については学名未決定のままであることなど, 分類学的な課題は多く残されている.

このうちキタドジョウは「魚類の新標準和名候補名の公表前流布行為の抑制に関する提言」(日本魚類

学会 2011)に従い,九州大学総合研究博物館登録標本 KYUM-PI 4527(北海道網走市濤沸湖産)に基づいて和名が提唱された学名未決定種である(中島・内山 2017). 本種はミトコンドリア DNA の部分塩基配列の特徴がクレード A(Morishima et al. 2008, 小出水ほか 2009)に含まれること, ドジョウと比較して口髭が長く眼が小さいこと, 雄の胸鰭基部にある骨質盤の形状がシャモジ状であることなどから定義されている(中島・内山 2017). しかしながら形態的特徴については北海道の 3 水系および青森県下北半島産の標本から得られた情報に基づくものであり, それ以外の地域に分布する「クレード A」の形態的特徴については調査がなされていない. 中島・内山 (2017)はキタドジョウの分布域を示しているが, これは遺伝的に「クレード A」に含まれるものが確認された地域を示したもので, 「キタドジョウ」が本当にこれらの地域に分布するかについては明らかではなく不十分である. そのため, その生息状況についても不明な点が多く, 最新の環境省レッドリスト(環境省 2019)では情報不足として掲載されている.

そこで本研究では, 宮城県内におけるクレード A の生息状況および形態的特徴の把握を目的として, 既往調査(Morishima et al. 2008)によってクレード A 系統が確認されている県内地域において採集された, ドジョウ属魚類のミトコンドリア DNA 調節領域の塩基配列を用いた系統解析を実施するとともにその形態的特徴を整理し, 骨質盤の形態的特徴からキタドジョウと同定された, 青森県下北半島産クレード A との比較を行ったので報告する.

方法

既往調査(Morishima et al. 2008)によってクレード A 系統が確認されている宮城県大崎市鳴子温泉(旧玉造郡鳴子町)の山間部に位置する 2 ヶ所の溜め池(地点 A, B)を採集地として選定した. また, 比較対象とする青森県下北半島産クレード A は青森県むつ市内の湿地(地点 C)において採集したものである(図 1).

地点 A は 2 段で構成される溜め池の下段側に位置し, 堤体幅 100m, 奥行き 100m, 水深数 m, 砂礫

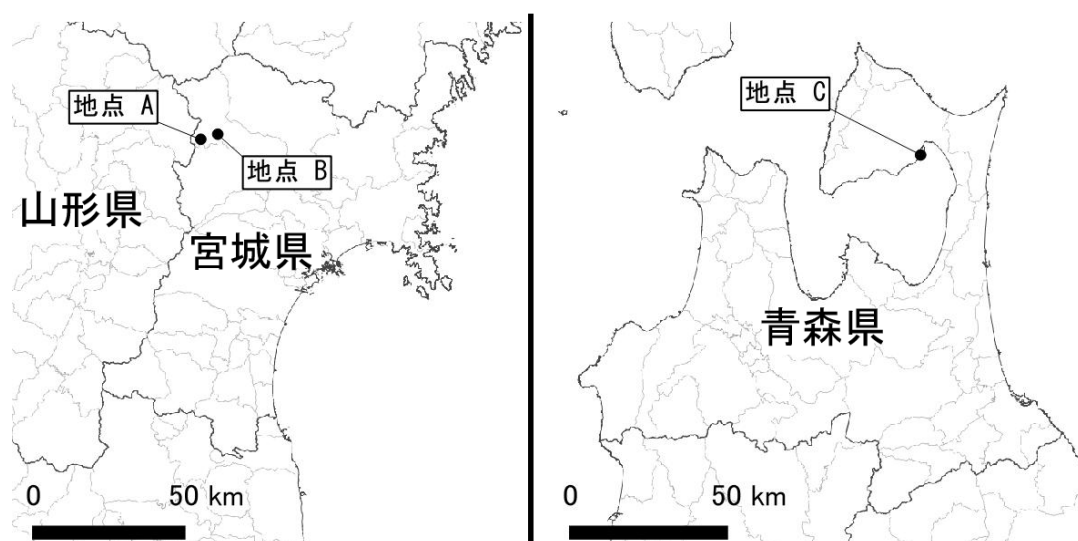


図 1. 採集地点位置.

底の急深な谷池で、水際には広葉樹林、ヤナギ属 *Salix* spp. の低木やヨシ *Phragmites australis* 等の抽水植物が見られる。2006 年には岩堂沢ダムの付帯工事として拡張されており、上手側の溜め池は遷移が進行し湿地となっている。表層水温は、2018 年 7 月 7 日計測時は 19.8℃、2019 年 5 月 2 日計測時は 12.6℃で、ドジョウ類の他、アブラハヤ *Rhynchocypris lagowskii steindachneri*、スナヤツメ類 *Lethenteron* sp. が生息している。また、地点 A から流出する土水路にもドジョウ類が生息しており、この土水路も採集地点に含めた(図 2A1, 2A2)。地点 B は長さ 300m、幅 100m、水深 50cm 程度の皿池で、泥底には落葉が堆積し、ヨシ、フトイ *Schoenoplectus tabernaemontani*、ミクリ属 *Sparganium* spp. 等の抽水植物や、浮葉植物のヒルムシロ属 *Potamogeton* spp. が繁茂する。表層水温は、2018 年 7 月 7 日計測時は 20.2℃、2019 年 5 月 2 日計測時は 14.0℃で、ドジョウ類の他にフナ属 *Carassius* sp. やモツゴ *Pseudorasbora parva* が生息している。(図 2B)。地点 C は平野部の湿地内に点在する小規模な池沼のうちの一つで、直径 5m、水深 1m 程度、泥底上に落葉の堆積が著しい。周囲は広葉樹に囲まれ、水際にはヨシが見られる。表層水温は、2019 年 5 月 19 日計測時は 19.6℃、2019 年 7 月 7 日計測時は 18.3℃で、クレード A のほか、エゾホトケドジョウ *Lefua nikkonis* も生息している(図 2C)。

以上の 3 地点においてタモ網、サデ網、小型定置網、カゴ網、どう等を用いて採集を行った。本研究ではオス骨質盤を含めた形態調査を目的としたことから、骨質盤が発達したオスの大型個体を選んで採集を行った。地点 A では 2018 年 7 月 7 日、11 月 17 日および 2019 年 5 月 3 日、地点 B では 2018 年 7 月 8 日、2019 年 5 月 3 日および 5 月 13 日、地点 C では 2018 年 6 月 24 日、9 月 23 日および 2019 年 5 月 19 日に採集を実施した。採集した個体を生かして持ち帰り、市販の魚類・甲殻類麻酔剤(FA100, DS ファーマアニマルヘルス株式会社)にて麻酔後、右側腹鰭を 99.5%エタノールで固定し、DNA 解析

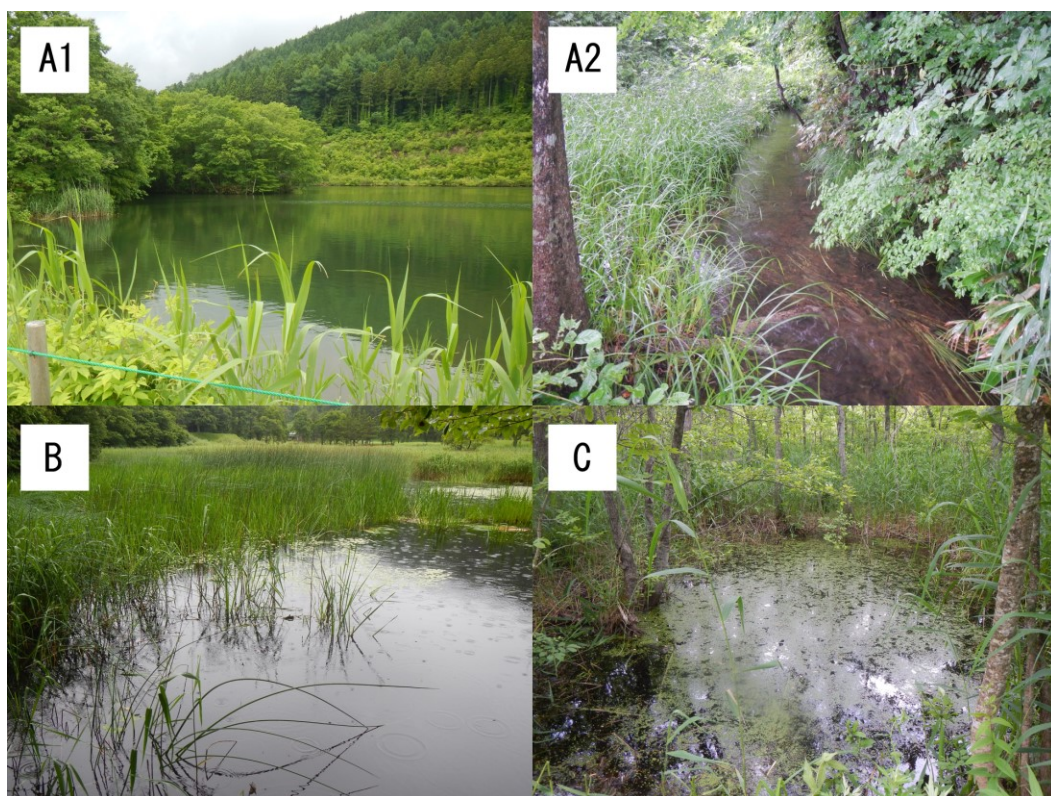


図 2. 採集地点の状況。(A1): 地点 A, (A2): 地点 A からの流出水路, (B): 地点 B, (C): 地点 C

用の標本とした。魚体については 10%中性ホルマリンで固定し、形態解析に用いた。

DNA 解析

採集されたサンプルのうち、No. 1 から No. 21 までをミトコンドリア DNA 調節領域の解析の対象とした (表 1)。以下に記述する遺伝子解析のうち、DNA の抽出および PCR を株式会社生物技研に、サンガーシーケンシングを株式会社マクロジェンジャパンに委託した。標本からの DNA の抽出においては、Lysis buffer for PCR (TaKaRa) を用いてサンプルを溶解し、AMPure XP (Beckman Coulter) を用いてサンプル溶解液から DNA を精製した。抽出・精製した全ゲノム DNA から、ミトコンドリア DNA 調節領域 (762 bp) の塩基配列を PCR 法により増幅した。PCR の酵素には Tks Gflex™ DNA Polymerase (TaKaRa) を用い、プライマーには Forward: 5'-TTGTAATCCGAAGATCGGAG-3' および Reverse: 5'-TTTGCGGAGACTTGCATG-3' (Morishima 2008) を用いた。PCR の条件は以下に列記する通りである。熱変性 (94°C, 1 分) を行った後、「熱変性 (98°C, 10 秒), アニーリング (55°C, 15 秒), 伸長反応 (68°C, 1 分)」を 35 サイクル行い、最後に 68°C で 5 分間の伸長反応を行った。PCR 産物の精製には、

表1. 本研究で用いたサンプルの採集地点、系統とGenBankのAccession No.

No.	採集日	採集地点	グループ名	系統	Accession No.
1	2018. 7. 7.	地点A	ドジョウ	B-2	LC494600
2	2018. 11. 17	地点A	宮城県産クレードA	A-3	LC494588
3	2018. 11. 17	地点A	宮城県産クレードA	A-3	LC494585
4	2019. 5. 3	地点A	ドジョウ	B-2	LC494594
5	2019. 5. 3	地点A	ドジョウ	B-2	LC494584
6	2019. 5. 3	地点A	ドジョウ	B-2	LC494583
7	2019. 5. 3	地点A	ドジョウ	B-2	LC494582
8	2018. 7. 8	地点B	宮城県産クレードA	A-3	LC494581
9	2019. 5. 3	地点B	ドジョウ	B-1	LC494580
10	2019. 5. 3	地点B	宮城県産クレードA	A-3	LC494596
11	2019. 5. 3	地点B	宮城県産クレードA	A-3	LC494599
12	2019. 5. 3	地点B	宮城県産クレードA	A-3	LC494598
13	2019. 5. 3	地点B	宮城県産クレードA	A-3	LC494597
14	2019. 5. 3	地点B	宮城県産クレードA	A-3	LC494595
15	2019. 5. 3	地点B	宮城県産クレードA	A-3	LC494593
16	2019. 5. 13	地点B	宮城県産クレードA	A-3	LC494592
17	2018. 9. 23	地点C	下北半島産クレードA	A-1	LC494591
18	2018. 9. 23	地点C	下北半島産クレードA	A-1	LC494590
19	2019. 5. 19	地点C	下北半島産クレードA	A-1	LC494589
20	2019. 5. 19	地点C	下北半島産クレードA	A-1	LC494587
21	2019. 5. 19	地点C	下北半島産クレードA	A-1	LC494586
A	2018. 6. 24	地点C	下北半島産クレードA	A-1	-
B	2018. 6. 24	地点C	下北半島産クレードA	A-1	-
C	2018. 6. 24	地点C	下北半島産クレードA	A-1	-
D	2019. 5. 19	地点C	下北半島産クレードA	A-1	-
E	2019. 5. 19	地点C	下北半島産クレードA	A-1	-

* No. A-Eのサンプルについては、ミトコンドリアDNA調節領域を用いた系統解析を行っていないものの、骨質盤などの特徴からクレードAと判断され、またこれらの採集地点と同地点で採集した遺伝解析対象個体は全てサブクレードA1に該当したため、仮にサブクレードA1のサンプルとして解析に含めた。

AMPure XP を使用した。これらの精製産物に対し、先の PCR 法でのプライマーセットを用いて BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) にて蛍光ラベリングし、3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems) にて塩基配列の解析を行い、塩基配列データを DDBJ に登録した。

系統解析には本研究で遺伝子配列を決定した 21 個体および GenBank に登録されている *M. anguillicaudatus*, *Misgurnus* sp. OK, *Misgurnus* sp. IR (Tang et al. 2006, Morishima et al.



図 3. 体側の色調, 斑紋のパターン. 体側の背面側が濃色で腹面側が淡色の個体 (a, b) は宮城県産クレード A およびドジョウ (中国系統) に, 背面側・腹面側がともに濃色な個体 (c, d) は下北半島産クレード A にそれぞれ多く見られた. また, 体側の斑紋が明瞭な個体 (a) はドジョウ (中国系統) に, やや不明瞭な個体 (c) は下北半島産クレード A に, 不明瞭な個体 (b, d) は宮城県産クレード A にそれぞれ多く見られた.

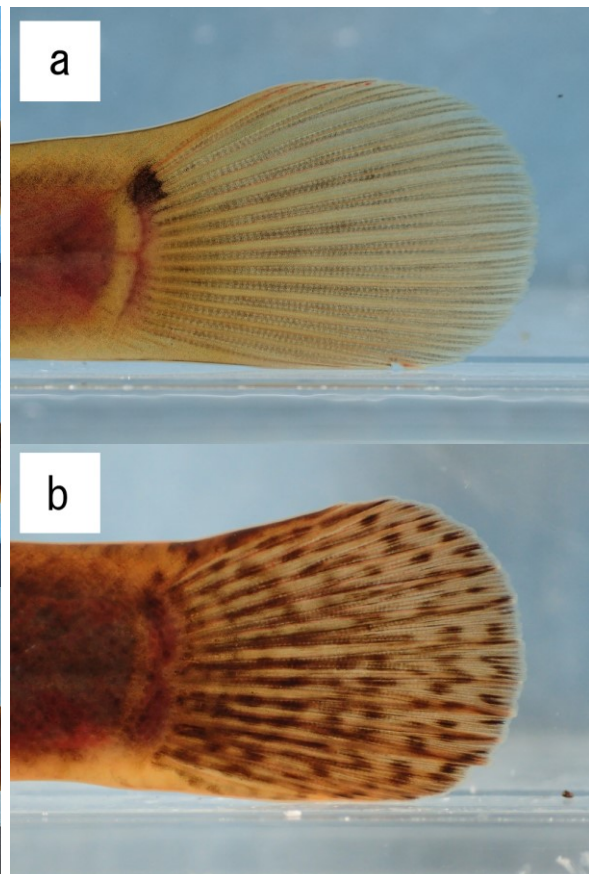


図 4. 尾鰭の暗色斑, 点列のパターン. 尾鰭付け根に暗色斑がある個体 (a) は下北半島産クレード A およびドジョウ (中国系統) に, ない個体 (b) は宮城県産クレード A にそれぞれ多く見られた. 尾鰭の点列が明瞭な個体 (b) は宮城県産クレード A およびドジョウ (中国系統) に, 不明瞭な個体 (a) は下北半島産クレード A にそれぞれ多く見られた.

2008, Kano et al. 2012, Jakovlić et al. 2013, Zhang et al. 2014, Miya et al. 2015, Hayashi & Ooi 2019, Bang & Lee unpubl., Belcik et al. unpubl., Hashiguchi & Nakajima unpubl., Huang & He unpubl., Huang & Tang unpubl., Wang et al. unpubl.), *Misgurnus mizolepis*(= *Misgurnus dabryanus*) (Morishima et al. 2008), *Misgurnus fossilis*(Jakovlić et al. 2013), *Cobitis granoei*(Song & You 2016), *Cobitis lutheri*(Cui et al. 2015), *Cobitis nalbanti*(Park et al. 2018)の配列を用いた. 系統解析には MEGA ver. 7(Kumar et al. 2016)を用いて, 最尤法(Maximum likelihood(ML)法, Felsenstein 1981)による系統樹を作成した. また, 系統樹における各ノードの信頼性を評価するため, 1,000 回のブートストラップ(BP)検定によって信頼確率(%)を計算し

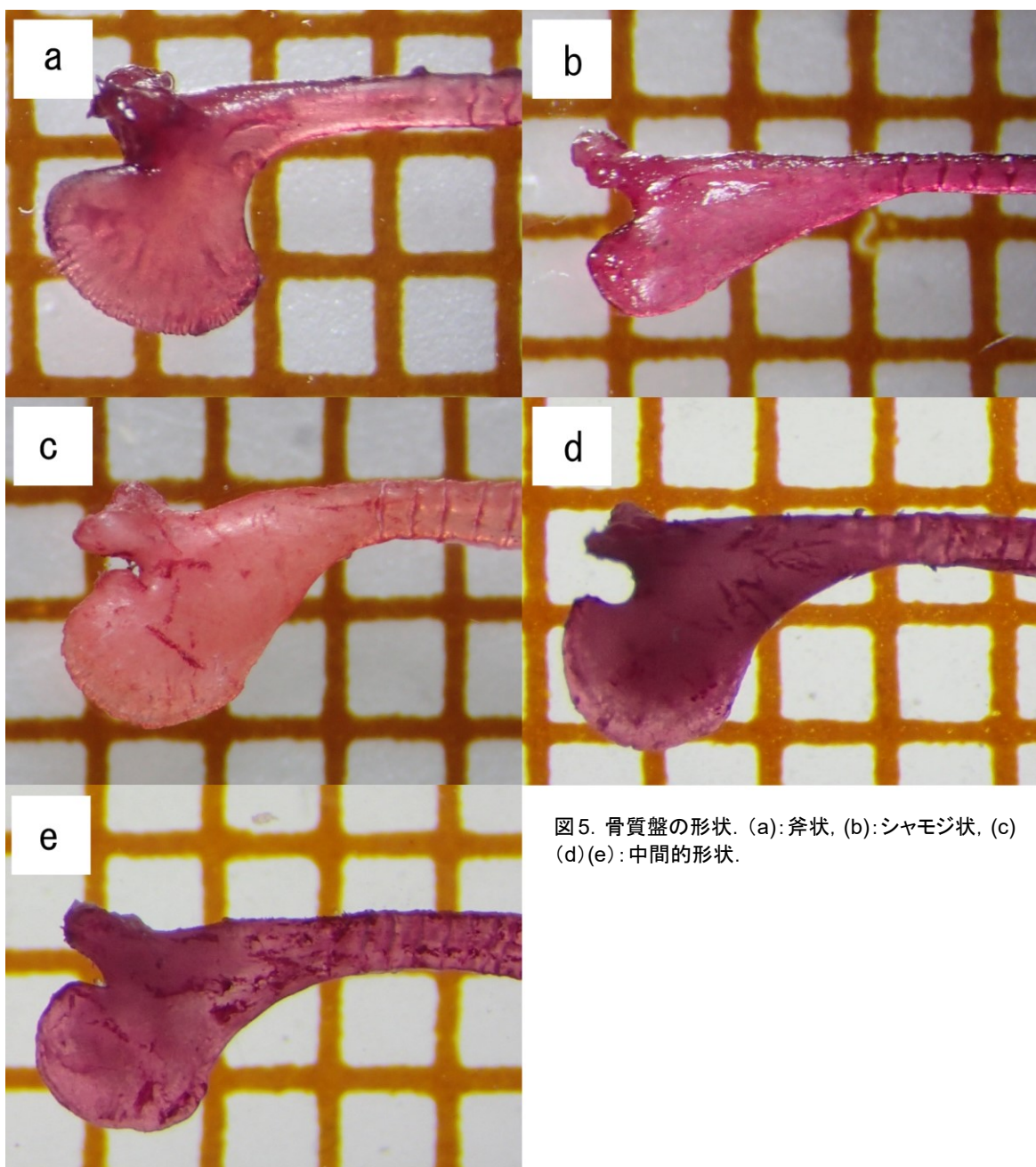


図5. 骨質盤の形状. (a): 斧状, (b): シャモジ状, (c) (d)(e): 中間的形状.

た. ML 法を行う際の最適モデル選択には, MEGA ver. 7 を利用し, T92+GI (Tamura 1992) が選択された.

形態計測

生時に体側の色調および斑紋, 尾鰭付け根の暗色斑, 尾鰭の点列の特徴を記録した. 体側の色調については, 背面側が濃色で腹面側が淡色の場合 (図 3a, 3b) と, 背面側, 腹面側がともに濃色な場合 (図 3c, 3d) を区別した. 体側の斑紋については, 明瞭 (図 3a), やや不明瞭 (図 3c), 不明瞭 (図 3b, 3d) の 3 通りに区分した. 尾鰭付け根の暗色斑については有 (図 4a), 無 (図 4b), 尾鰭の点列については明瞭 (図 4b), 不明瞭 (図 4a) で区別した.

骨質盤をホルマリン固定後に右側の胸鰭から切り離し, 附着した組織をピンセットで除去後, 0.5% 水酸化カリウム溶液にアリザリンレッド S を少量加えたもので染色し, 形状を観察した. 骨質盤の形状については, 中島・内山 (2017) に従い, 幅が広く後縁が湾入するものを斧状 (図 5a), 幅が狭く後縁が直線的なものをシャモジ状 (図 5b) とし, またこれらの中間的な形状の場合は中間的形状 (図 5c, 5d, 5e) とした.

外部形態の計数・計測項目は各鰭条数, 体長, 頭長, 眼径, 第 2 口髭長で, 体長, 頭長, 眼径の計測および各鰭条数の計測については中坊編 (2013) に従った. 第 2 口髭長については第 2 口髭の後方基部より先端までとした. 計測には電子ノギスを用い, 0.1mm 単位で記録した.

計測結果のうち体長と, 頭長, 眼径, 第 2 口髭長との関係を, 一般化線形モデルを使用して解析した. ミトコンドリア DNA 調節領域を用いた系統解析の結果, 採集した個体は 4 つの系統 (クレード B-1, B-2, サブクレード A1, A3) に区分されたが, このうちクレード B-1 に区分された個体は 1 個体のみであったため, 解析から除外した. 説明変数は, 体長, 遺伝的系統および両者の交互作用とした. 遺伝的系統は, ミトコンドリア DNA 調節領域を用いた系統解析の結果に基づく区分であり, 3 水準の質的変数 (クレード B-2, サブクレード A1, A3) である. なお, No. A-E のサンプルについては, ミトコンドリア DNA 調節領域を用いた系統解析を行っていないものの, 骨質盤などの特徴からクレード A と判断され, またこれらの採集地点と同地点で採集した遺伝子解析対象個体は全てサブクレード A1 に該当したため, 仮にサブクレード A1 のサンプルとして解析に含めた. 頭長, 眼径, 第 2 口髭長を応答変数として, それぞれ解析を行った. 応答変数の分布にはいずれも正規分布を仮定した. 全ての説明変数の組み合わせでモデルを作成し, 最も AIC が小さかったモデルをベストモデルとした. なお, 補足的に, 頭長を説明変数, 眼径および第 2 口髭長を応答変数にした一般化線形モデルも作成した. さらに, 眼径を応答変数に第 2 口髭長を応答変数とした一般化線形モデルも作成した. モデルの作成とモデル選択は, 体長を説明変数としたモデルと同様に行った. これらの解析は R. 3.5.2 (R Core Team 2018) とそのパッケージ MuMIn (Bartoń 2019) で行った.

結果

遺伝的特徴

先行研究と同様に, ドジョウ類は, 遺伝的に異なる 3 系統を構成した (図 6). それぞれの系統は Morishima et al. (2008) に基づき, クレード A, クレード B-1 (ドジョウ (日本系統)), クレード B-2 (ドジョウ

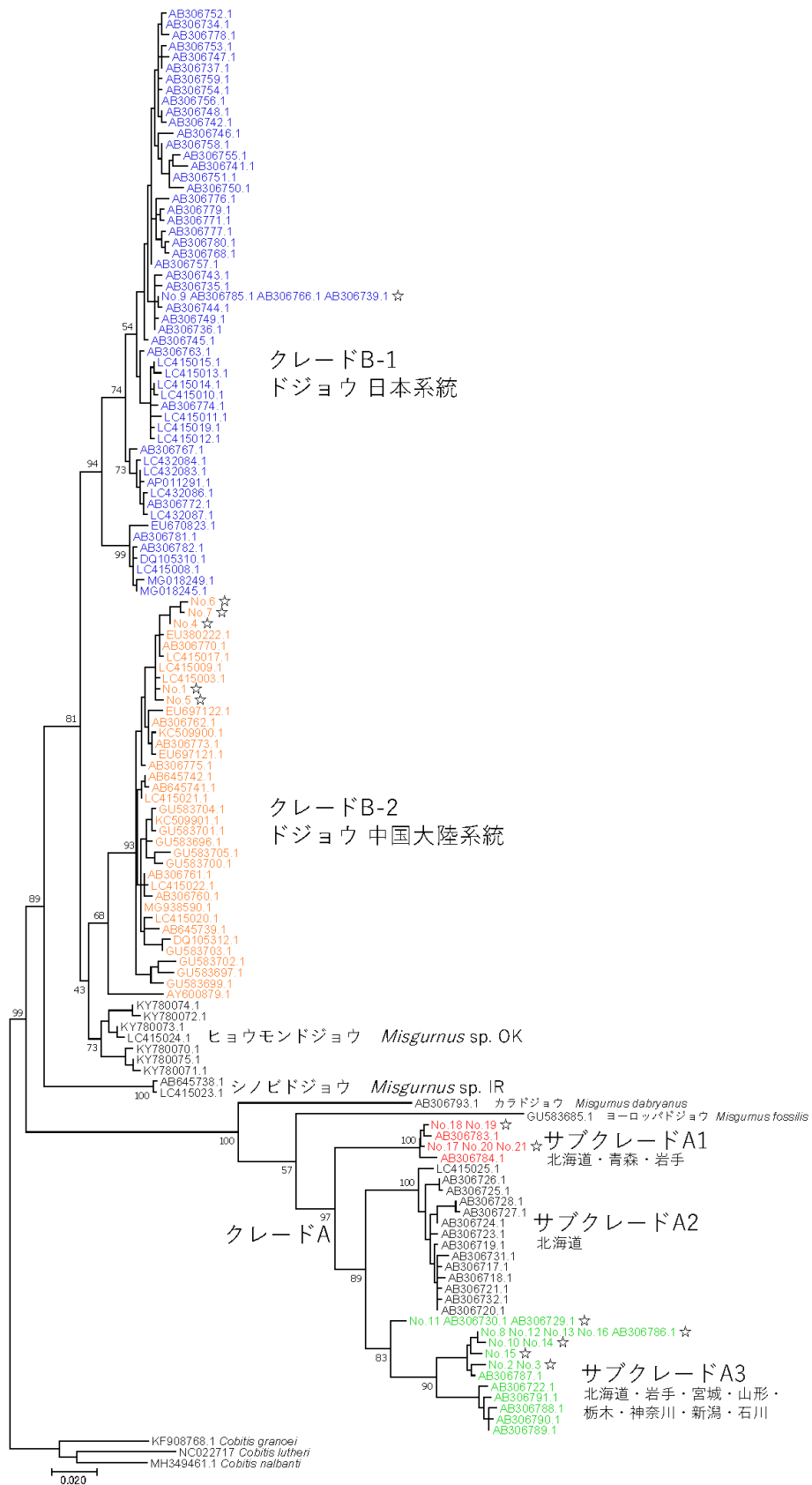


図6. ミトコンドリアDNA 調節領域(762bp)のデータセットを用いたML法による系統樹. 各ノードの数字はブートストラップの値(%)を示す. ☆は本研究で配列を決定したサンプルを示す.

ウ(中国大陸系統))とした。クレード A はさらに、単系統性が支持される 3 つのサブクレードから構成された(サブクレード A-1(BP 100), A-2(BP 100), A-3(BP 84))。クレード B-1 には地点 B の 1 個体(No. 9)が含まれ、クレード B-2 には地点 A の 5 個体(No. 1, 4-7)が含まれた。地点 A および地点 B のクレード A サンプルはすべてサブクレード A3 に含まれた(No. 2, 3, 8, 10-16)。地点 C のクレード A サンプルはすべてサブクレード A1 に含まれた(No.17-21)。以降、地点 A および B のクレード A サンプル(サブクレード A3 サンプル)を宮城県産クレード A、地点 C のクレード A サンプル(サブクレード A1 サンプル)を下北半島産クレード A と呼ぶ。

形態的特徴

下北半島産クレード A、宮城県産クレード A、ドジョウ(中国大陸系統)、ドジョウ(日本系統)から得られた形態的特徴を、表 2 に整理した。

表2. 各グループの形態的特徴.

採集地点	グループ	体側の色調		体側の斑紋			尾鰭付け根の暗色班		尾鰭の点列	
		背面側は濃色、腹面側は淡色	背面側、腹面側が共に濃色	明瞭	やや不明瞭	不明瞭	有	無	明瞭	不明瞭
地点C	下北半島産クレードA	-	10	1	8	1	10	-	1	9
地点A	宮城県産クレードA	2	-	-	-	2	-	2	2	-
地点B	宮城県産クレードA	7	1	2	3	3	2	6	7	1
地点B	ドジョウ(日本系統)	1	-	-	-	1	-	1	1	-
地点A	ドジョウ(中国大陸系統)	5	-	5	-	-	5	-	5	-

採集地点	グループ	骨質盤の形状			各鰭の条数				
		斧状	中間的形状	シャモジ状	背鰭	臀鰭	胸鰭	腹鰭	尾鰭
地点C	下北半島産クレードA	-	-	10	iii+6(10)	iii+5(10)	i+9(3) i+10(4) 不明(3)	ii+5(10)	8+8(10)
地点A	宮城県産クレードA	1	1	-	iii+6(2)	iii+5(2)	i+9(2)	ii+5(2)	8+8(2)
地点B	宮城県産クレードA	1	7	-	iii+6(8)	iii+5(8)	i+9(2) i+10(5) i+11(1)	ii+5(8)	8+8(8)
地点B	ドジョウ(日本系統)	-	1	-	iii+6(1)	iii+5(1)	i+10(1)	ii+5(1)	8+8(1)
地点A	ドジョウ(中国大陸系統)	4	1	-	iii+6(2) iii+7(3)	iii+5(4) iii+6(1)	i+9(4) i+10(1)	ii+5(3) ii+6t2)	8+8(5)

* 各鰭の数における()内の数値は個体数を示す。

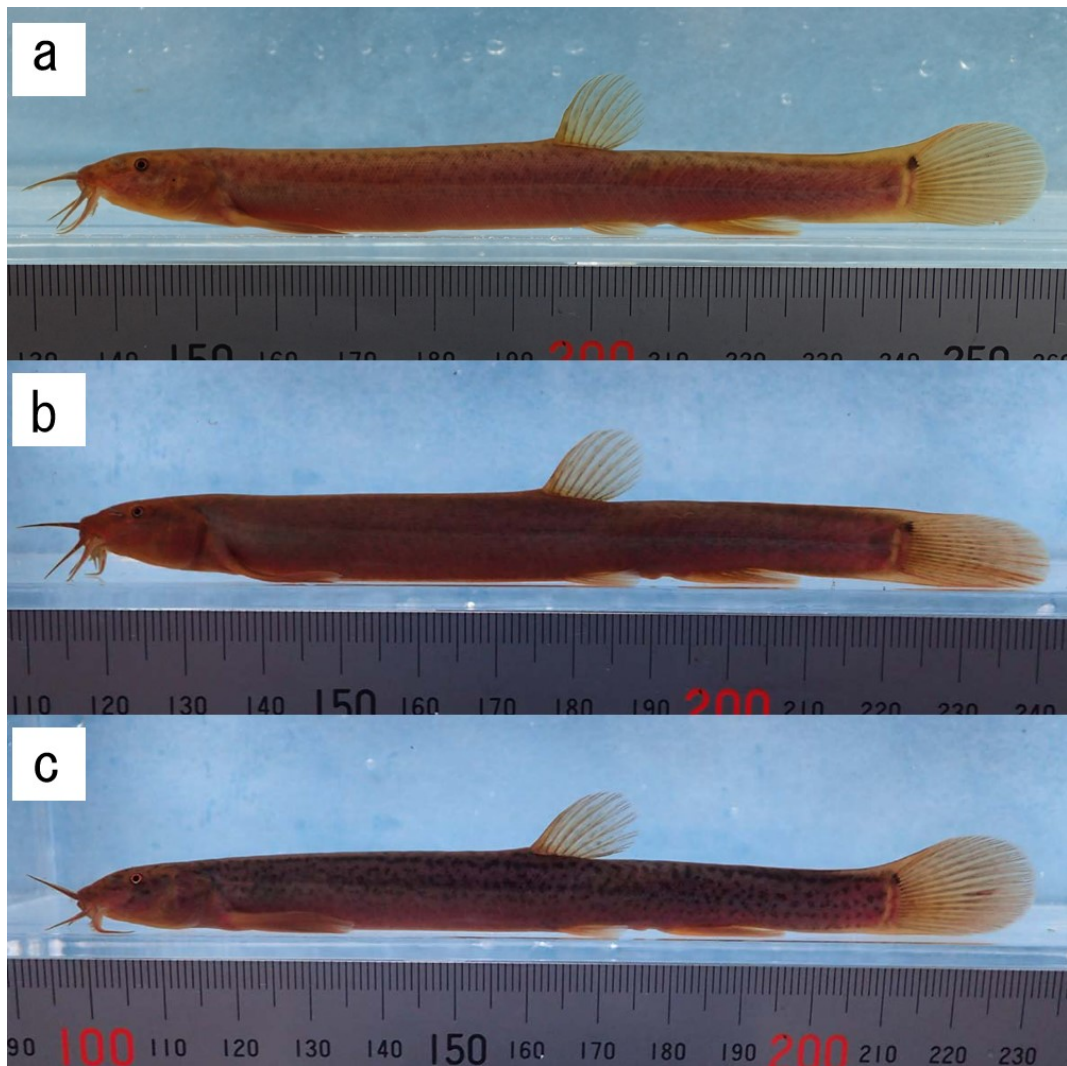


図 7. 下北半島産クレード A

下北半島産クレード A

体側の色調は背面側、腹面側がともに濃色で、尾鰭の付け根には暗色斑があり、尾鰭の点列は不明瞭、また多くの個体は体側の斑紋がやや不明瞭であったが(図 7a)、斑紋が不明瞭な個体(図 7b)、斑紋が明瞭な個体(図 7c)もそれぞれ 1 個体出現した。骨質盤の形状は 10 個体全てにおいてシャモジ状、各鰭の条数は背鰭 iii+6、臀鰭 iii+5、胸鰭 i+9-10、腹鰭 ii+5、尾鰭 8+8 であった。

宮城県産クレード A

地点 A で採集された 2 個体はいずれも、体側の色調は背面側が濃色、腹面側が淡色、体側の斑紋は不明瞭で、尾鰭付け根に暗色斑がなく、尾鰭の点列が明瞭であった(図 8a)。骨質盤の形状は 1 個体が斧状、1 個体が中間的形状で、各鰭の条数は背鰭 iii+6、臀鰭 iii+5、胸鰭 i+9-11、腹鰭 ii+5、尾鰭 8+8 であった。

地点 B で採集された個体の多くは、体側の色調は背面側が濃色、腹面側が淡色、体側の斑紋は不明瞭またはやや不明瞭で、尾鰭付け根に暗色斑がなく、尾鰭の点列が明瞭であったが(図 8b)、体側の斑

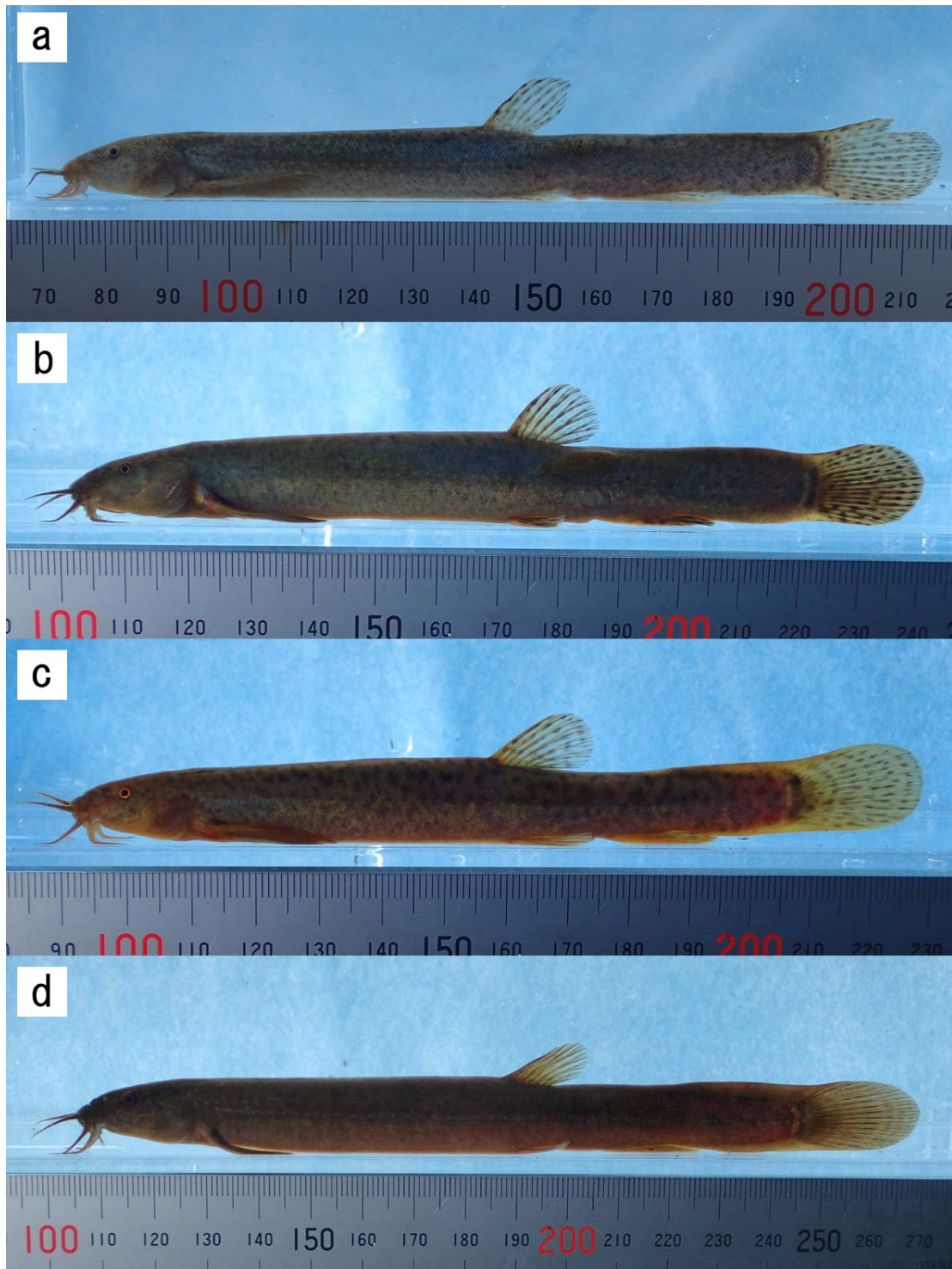


図 8. 宮城県産クレード A.

紋が明瞭かつ尾鰭付け根に暗色斑がある 2 個体(うち 1 個体, 図 8c)および体側の色調は背面側, 腹面側がともに濃色で尾鰭の点列が不明瞭な 1 個体(図 8d)も出現した. 骨質盤の形状は 8 個体のうち 1 個体が斧状, 7 個体が中間的形状で, 各鰭の条数は背鰭 iii+6, 臀鰭 iii+5, 胸鰭 i +9-11, 腹鰭 ii +5, 尾鰭 8+8 であった.



図 9. ドジョウ(日本系統).



図 10. ドジョウ(中国大陸系統).

ドジョウ(日本系統)

出現した 1 個体の体側の色調は背面側が濃色、腹面側が淡色で、体側の斑紋は不明瞭、尾鰭付け根に暗色斑がなく、尾鰭には明瞭な点列が見られた(図 9). 骨質盤の形状は中間の形状で、各鰭の条数は背鰭 iii+6, 臀鰭 iii+5, 胸鰭 i +10, 腹鰭 ii +5, 尾鰭 8+8 であった.

ドジョウ(中国大陸系統)

いずれの個体も体側の色調は背面側が濃色、腹面側が淡色で、体側の斑紋は明瞭、尾鰭付け根に暗色斑があり、尾鰭には明瞭な点列が見られた(図 10). 骨質盤の形状は 5 個体のうち 4 個体が斧状、1 個体が中間の形状で、各鰭の条数は背鰭 iii+6-7, 臀鰭 iii+5-6, 胸鰭 i +9-10, 腹鰭 ii +5-6, 尾鰭 8+8 であった.

いずれの遺伝的系統においても、頭長、眼径、第 2 口髭長は体長と正の関係にあった(図 11). 体長と頭長の比は、遺伝的系統に関わらずほぼ一定であった. 頭長を応答変数とした解析では、ベストモデルの説明変数は体長のみであった. 眼径は、下北半島産キタドジョウ、宮城県産クレード A はドジョウ(中国大陸系統)と比較して小さい傾向にあり、ベストモデルの説明変数は体長と遺伝的系統の主効果だった. 第 2 口髭長は下北半島産クレード A、宮城県産クレード A がドジョウ(中国大陸系統)より長い傾向にあり、ベストモデルの説明変数は体長および遺伝的系統の主効果であった.

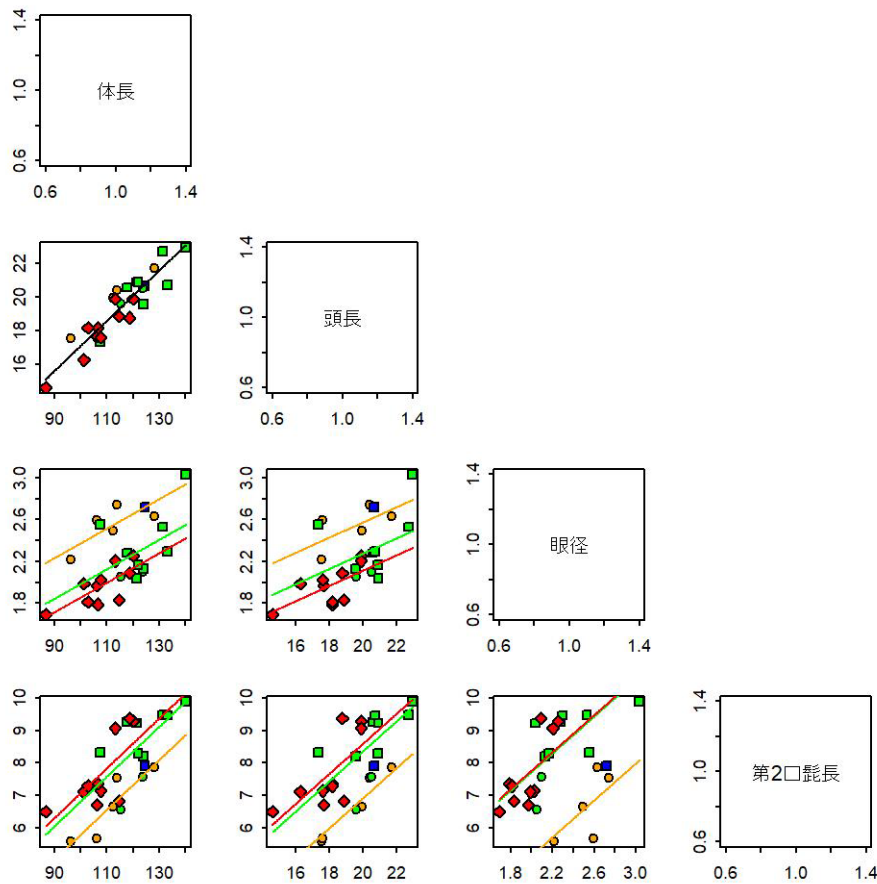


図 11. 体長、頭長、眼径および第 2 口髭長間の関係。シンボルの色は遺伝系統を反映しており、赤は下北半島産クレード A、緑は宮城県産クレード A、青はドジョウ(日本系統)、オレンジはドジョウ(中国大陸系統)を示す。シンボルの形は採集地を反映しており、○は地点 A、□は地点 B、◇は地点 C を示す。回帰直線は、ベストモデルとして選択された一般化線形モデルからの予測である。ベストモデルの説明変数に遺伝的系統が含まれている場合は、系統別の予測を示した。この場合、回帰直線の色はシンボルの色に対応する。ベストモデルに遺伝的系統が含まれなかった場合は、モデルからの予測を黒線で示した。なお、ドジョウ(日本系統)は 1 個体のみであったため、解析から除外した。

考察

宮城県産クレード A の特徴

本研究の結果、宮城県産クレード A はミトコンドリア DNA 調節領域の塩基配列の特徴から、クレード内において下北半島産クレード A (サブクレード A1) とは異なるサブクレード (サブクレード A3) に属することが明らかとなった。宮城県産クレード A の体長、頭長に対する眼径、第 2 口髭長の比率は多くの個体で下北半島産クレード A のそれと一致するものであり、同所で採集されたドジョウ(日本系統および中国大陸系統)と比較して、口髭が長く眼径が小さい傾向がみられた。ドジョウ属魚類の分類形質として重視されるオス胸鰭基部の骨質盤の形状は、下北半島産クレード A が中島・内山(2017)により示されたキタドジョウと同様のシャモジ状であったのに対して、宮城県産クレード A では斧状もしくは斧状とシャモジ状の中間的形状であり、中間的形状が全体に占める割合が高かった。また、本研究において宮城県産クレード

A と同所で採集されたドジョウ(中国大陸系統および日本系統)の骨質盤の形態も斧状もしくは中間的形狀で、斧状が全体に占める割合が高かった。

体側の斑紋や尾鰭付け根の暗色班の有無といった色彩的特徴による形質の組み合わせは、宮城県産クレード A、下北半島産クレード A、ドジョウ(中国大陸系統)のそれぞれで異なっていた(ただし、宮城県産クレード Aには下北半島産クレード A、ドジョウ(中国大陸系統)と同様の特徴を示す個体も少数含まれた)。また、1 個体のみが採集されたドジョウ(日本系統)は、宮城県産クレード Aと同様の色彩的特徴を備えるものであった。宮城県産クレード A と下北半島産クレード A 間に共通する色彩的特徴は見いだされなかったが、宮城県産クレード A とドジョウ(中国大陸系統)の間には、色彩的特徴に幾つかの共通点があった。これにより、ミトコンドリア DNA 調節領域の解析結果に基づく遺伝的系統を反映しない色彩的特徴があることが確認された。

以上の結果を整理すると、下北半島産クレード A は中島・内山(2017)が定義するキタドジョウに一致する。一方、宮城県産クレード A は下北半島産クレード A (= キタドジョウ)と同様の遺伝的集団に含まれるものの異なる分集団に属すること、眼径、第 2 口髭長の頭長・体長との比率は下北半島産クレード A(キタドジョウ)のそれに近い傾向がみられるが、骨質盤の形態は明瞭に異なることが明らかとなった。また宮城県産クレード A とドジョウ(中国大陸系統および日本系統)は同所的に生息する場合があります、それぞれの色彩的な特徴や骨質盤の形状は基本的に異なる傾向が認められた。

宮城県産クレード A の由来

宮城県産クレード A はその骨質盤の形態的特徴から中島・内山(2017)が定義するキタドジョウと一致しない集団であることが明らかである。この理由については以下の二つの可能性が考えられる。

ひとつは宮城県産クレード A が、キタドジョウとは形態的に区別できる特徴をもつ未知の在来集団である可能性である。図 6 に示したとおり、サブクレード A1 は北海道および東北地方の一部、サブクレード A2 は北海道、サブクレード A3 は北海道を含む東日本の広域において出現している。中島・内山(2017)は北海道および下北半島産のクレード A の形態的特徴に基づいてキタドジョウを定義しているが、ここで扱われた個体にはサブクレード A3 に属する個体が含まれていなかった可能性がある。この場合、キタドジョウとは形態が異なるサブクレード A3 集団が北海道を含む東日本の各地に分布し、宮城県産クレード A がそこに内包される可能性は十分に考えられる。

もうひとつは、本研究において確認された宮城県産クレード A が人為的に導入されたドジョウ(中国大陸系統もしくは日本系統)との交雑集団である可能性である。本研究では母系遺伝するミトコンドリア DNA 調節領域のみを解析対象としているため、これらの形態的特徴が宮城県産クレード A の本来の形質であるのか、ドジョウ(中国大陸系統および日本系統)との交雑によってもたらされたものであるかは判定できない。今回、宮城県産クレード A の採集地点において同所的に採集されたドジョウ(中国大陸系統および日本系統)の中には、斧状ではなく中間的形狀の骨質盤を持つ個体が含まれており、また 1 個体のみ確認されたドジョウ(日本系統)は、宮城県産クレード A と同様に尾鰭付け根に暗色班が見られなかったが、ドジョウ(日本系統)は通常、尾鰭付け根に暗色班を有することが知られている(中島・内山 2017)。このような、宮城県産クレード A と同所に生息するドジョウ(中国大陸系統および日本系統)間における形態的特徴の共通性・類似性は、両系統間の交雑によってもたらされたものである可能性も否定できない。

今後の展開

確認された宮城県産クレード A の形態形質が本来のものか、他系統との交雑によってもたらされたものか、また交雑が生じていた場合、それが比較的古い時代における自然交雑によるものか、近年の人為的な要因に由来するものか、現時点では判断材料に乏しい。これらを明確にするためには、雑種判別が可能な核 DNA の解析を実施することが望ましい。具体的な解析方法としては、比較的系統関係の近いコイ目魚類を対象とした研究で用いられている RAG1, RAG2, リボソーム S7 サブユニット領域の解析 (Miyazaki et al. 2011, Kim et al. 2013), RAG1 領域を対象とした PCR-RFLP 法による解析 (Fujimoto et al. 2007) などが考えられるだろう。

また、下北半島産クレード A (キタドジョウ) の採集地点と同様、クレード B (ドジョウ) が同所に生息しない宮城県産クレード A の単独生息域の確認に努め、そこで得られた個体の遺伝的系統、形態的特徴を、他系統との混生域におけるそれと比較することも必要であろう。同時にクレード A に含まれる各サブクレード間の形態的特徴についても知見の蓄積が急務である。

現在、キタドジョウは最新の環境省レッドリスト (環境省 2019) において情報不足とされている。仮に宮城県産クレード A の単独生息域にドジョウが人為的に移入されることで交雑が生じていた場合、それは宮城県産クレード A の存続にとって大きな脅威となる。先行研究で示された本州におけるクレード A 系統の出現状況 (Morishima et al. 2008, 小出水ほか 2009) からも、その分布はすでに局所的であることが示唆されている。今後は宮城県産クレード A の形態および生態に関する情報を収集すると同時に、国内外他地域からの移入系統ドジョウの、これ以上の分布拡大を阻止する必要がある。また、宮城県産クレード A は遺伝的にも形態的にも明らかに「ドジョウ」よりは「キタドジョウ」に近いことから、現状ではひとまず本集団も「キタドジョウ」に含めて扱うことが保全上の混乱を最小限にするものと考えられる。

謝辞

下北半島産キタドジョウ採集の際にご協力いただいた大八木 昭氏 (下北自然学巢) に、この場を借りて厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Bartoń, K. 2019. MuMIn: Multi-model inference. R Package Version 1.43.6. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn> (on line, viewed 15-6-2019).
- Cui, J., Xu, J., Li, Q., Wang, K., Xu, P. & Sun, X. W. 2015. The complete mitochondrial genome of *Cobitis lutheri* (Cypriniformes: Cobitidae: *Cobitis*). *Mitochondrial DNA* 26: 875–876. DOI: 10.3109/19401736.2013.861438
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368–376. DOI: 10.1007/BF01734359

- Fujimoto, T. Yamada, A., Kodo, Y., Nakaya, K., Okubo-Murata, M., Saito, T., Ninomiya, K., Inaba, M., Kuroda, M., Arai, K. & Murakami, M. 2007. Development of nuclear DNA markers to characterize genetically diverse groups of *Misgurnus anguillicaudatus* and its closely related species. *Fish. Sci.* 83: 743–756. DOI: 10.1007/s12562-017-1108-y
- Hayashi, M. & Ooi, K. 2019. Molecular study on *Misgurnus anguillicaudatus* in Shimane Prefecture, Japan: Notes on haplotype diversity of mtDNA. *Bull. Hoshizaki Green Found* 22: 241–244.
- Jakovlić, I., Wu, Q. J., Treer, T., Šprem, N. & Gui, J. F. 2013. Introgression evidence and phylogenetic relationships among three (*Para*) *Misgurnus* species as revealed by mitochondrial and nuclear DNA markers. *Arch. Biol. Sci. Belgrade* 65: 1463–1467. DOI: 10.2298/ABS1304463J
- 環境省. 2019. 【汽水・淡水魚類】環境省レッドリスト 2019. <https://www.env.go.jp/press/files/jp/110615.pdf> (オンライン, 参照 1-7-2019).
- Kano, Y., Nakajima, J., Mizutani, H., Nakazato, Y., Nakazato, N., Kaji, Y., Hunag, L., Nishida, S. & Hashiguchi, Y. 2012. Critical status of the genetically-distinct, oriental weather loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) population on Iriomote Island, Japan. *Jpn. J. Ichthyol.* 59: 37–43. DOI: 10.11369/jji.59.37
- Kim, K.-Y., Ko, M.-H., Liu, H., Tang, Q., Chen, X., Miyazaki, J.-I. & Bang, I.-C. 2013. Phylogenetic relationships of *Pseudorasbora*, *Pseudopungtungia*, and *Pungtungia* (Teleostei: Cypriniformes: Gobioninae) inferred from multiple nuclear gene sequences. *BioMed Res. Intl.* 1: 347242. DOI: 10.1155/2013/347242
- Kitagawa, T., Fujii, Y. & Koizumi, N. 2011. Origin of the two major distinct mtDNA clades of the Japanese population of the oriental weather loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *Folia Zool.* 60: 343–349. DOI: 10.25225/fozo.v60.i4.a12.2011
- 小出水規行・竹村武士・渡辺恵司・森 淳. 2009. ミトコンドリア DNA によるドジョウの遺伝特性. *農工論集* 259: 7–16. DOI: 10.11408/jsidre.77.7
- Kumar, S. Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M. & Iwasaki, W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.* 2: 150088. DOI: 10.1098/rsos.150088
- Miyazaki, J.-I., Dobashi, M., Tamura, T., Beppu, S., Sakai, T., Mihara, M. & Hosoya, K. 2011. Parallel evolution in eight-barbel loaches of the genus *Lefua* (Balitoridae, Cypriniformes) revealed by mitochondrial and nuclear DNA phylogenies. *Mol. Phylogen. Evol.* 60: 416–427.

DOI: 10.1016/j.ympcv.2011.05.005

- Morishima, K., Nakamura-Shiokawa, Y., Bando, E., Li, Y. J., Borón, A., Khan, M. M. R. & Arai, K. 2008. Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Genetica* 132: 159–171. DOI: 10.1007/s10709-007-9158-1
- 中坊徹次 (編). 2013. 日本産魚類検索 全種の同定 第三版. 東海大学出版会, 秦野.
- 中島 淳・内山りゅう. 2017. 日本のドジョウ 形態・生態・文化と図鑑. 山と溪谷社, 東京.
- 日本魚類学会. 2011. 魚類の新標準和名候補名の公表前流布行為の抑制に関する提言. <http://www.fish-isj.jp/iin/standname/teigen/index.html> (オンライン, 参照 1-7-2019).
- Okada, R., Inui, T., Iguchi, Y., Kitagawa, T., Tanaka, K. & Kitagawa, T. 2017. Molecular and morphological analyses revealed a cryptic species of dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Cypriniformes: Cobitidae) in Japan. *J. Fish Biol.* 91: 989–996. DOI: 10.1111/jfb.13393
- Park, H. K. Kim, K.-S. Kim, K.-Y. & Bang, I.-C. 2018. The full-length mitochondrial genome of *Cobitis nalbanti* (Teleostei: Cypriniformes: Cobitidae). *Mitochondrial DNA B Resour.* 3: 870–871. DOI: 10.1080/23802359.2018.1495127
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> (on line, viewed 17-6-2019).
- 清水孝昭・鈴木寿之・高木基裕・大迫尚晴. 2011. 沖縄島と西表島より得られたドジョウの形態的・遺伝的特徴. *日生地学報* 66: 141–153.
- Song, J. R., & You, P. 2016. The complete mitochondrial genome of *Cobitis granoiei* (Cypriniformes: Cobitidae). *Mitochondrial DNA* 27: 60–61. DOI: 10.3109/19401736.2013.873899
- Tamura, K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9: 678–687. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752
- Tang, Q., Liu, H., Mayden, R. & Xiong, B. 2006. Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39: 347–357. DOI: 10.1016/j.ympcv.2005.08.007
- 吉郷英範. 2011. 広島県瀬野川水域で採集されたカワリヌマエビ属の形態と釣餌用エビ類に混入していた魚類. *比婆科学* 239: 9–29.
- Zhang, X., Wang, W., Huang, S., Chen, G., Bai, X. & Cao, X. 2014. The complete mitochondrial genomes of natural diploid and tetraploid loaches *Misgurnus anguillicaudatus* (Cypriniformes: Cobitidae). *Mitochondrial DNA* 25: 196–197. DOI: 10.3109/19401736.2013.796460

(担当編集委員: 斉藤憲治)

Genetic and morphological features of *Misgurnus* sp. (clade A) (Cypriniformes, Cobitidae) collected from Miyagi Prefecture, eastern Honshu, Japan

Kaoru Hata ^{1*}, Kanae Koike ¹, Yuhki Tanno ¹ & Jun Nakajima ²

¹ Ecoris Inc., Nakata 5-3-21, Taihaku, Sendai, Miyagi 981-1248, Japan

² Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan

* Corresponding author E-mail: hata@ecoris.co.jp

Abstract The genetic characteristics of the mitochondrial DNA control region, the morphological features of lamina circularis and body shape were investigated for loach that seemed to belong to *Misgurnus* sp. (clade A) (sensu Nakajima & Uchiyama 2017) collected from Miyagi Prefecture, eastern Honshu, Japan. The “clade A” of Miyagi Prefecture belonged to a different sub-clade within the same genetic clade as “Kitadojo” from Shimokita Peninsula. The eye diameter and the length of maxillary barbels were close to the “Kitadojo”, however, the shape of lamina circularis was different. This clade A population may be an unknown native population distinguished from “Kitadojyo”, or a hybrid population with *Misgurnus anguillicaudatus* derived from artificial release.

Keywords: clade B, conservation, Dojo loach, lamina circularis

Received: August 1, 2019/ Accepted: September 17, 2019

Corresponding Editor: Kenji Saitoh