

論文内容の要旨

氏名	鈴木 誉士
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農第81号
学位授与の日付	平成17年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	琵琶湖産フナ属魚類の初期生活期における分子生態学的研究
論文審査委員(主査)	教授 上野 紘一
(副主査)	教授 細谷 和海
(副主査)	教授 櫻谷 保之

琵琶湖には固有種を含む多種多様な魚類が生息しており、その多くは周辺地域の水産資源として古くから利用されている。なかでも、フナ類は琵琶湖の主要な漁獲物として重要な位置を占めている。琵琶湖のフナ類にはニゴロブナ、ゲンゴロウブナおよびギンブナが知られている。これらは当地域の重要な水産資源として、古来より漁業が盛んに行われてきた。しかしながら、近年その漁獲量は著しく減少しており、現在の漁獲量は最盛期のおよそ5分の1以下に低下している。フナ資源の回復やその管理を適切に図るためには、生活史全般の知識を得ることが不可欠である。なかでも、体制が整わず、遊泳力に乏しい仔稚魚期は初期減耗が著しく、資源量に大きな影響をおよぼすことから、この時期の生活史に関する知見は資源確保の上からきわめて重要なものとなる。

琵琶湖沿岸に広がるヨシ帯などの水生植物帯や琵琶湖周辺の水田・用水路は、フナ類が産卵や初期生活の場所として利用する重要な水域である。このような水域の管理・保全が、資源確保のための課題の1つであるが、そのためにはそこを利用するフナ各種・亜種の初期生態に関する知見が不可欠である。しかしながら、フナ属魚類の仔稚魚は、形態的特徴からの種・亜種判別が難しいため、これまでのフナ仔稚魚を対象とした調査・研究では、単にフナ類やコイ・フナとしてまとめられることが多く、フナ各種・亜種の初期生態に関する知見はほとんどみられていない。

形態から種・亜種を判別することが困難である場合には、遺伝学的手法を用いることが有効であり、近年さまざまな魚種の種判別法が開発され、成果をあげている。特にPCRを用いた手法は微量の試料で分析が可能であることから、仔稚魚のような小型の個体の分析に適しているものと考えられる。

本研究では、1) 琵琶湖産フナ仔稚魚の種・亜種判別に有効なDNAマーカーを明らかにし、2) DNAマーカーによる種・亜種判別に基づいて各フナの初期生態に関する知見を集積することを目的とした。以下に本研究内容の要約を記した。

琵琶湖産フナ仔稚魚の種・亜種判別に有効なDNAマーカーの検討

種・亜種判別法として、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)分析を採用し、フナ仔稚魚の種・亜種判別に有効なRAPDマーカーを検討した。OPA1から20のプライマーの内、OPA3, 13, 16, 17を除くプライマーに増幅断片がえられ、OPA1, 2, 8, 15, 19には比較的明瞭なバンドがえられた。OPA1のバンドパターンはフナ3種・亜種およびコイの各間でそれぞれ異なっていた。ニゴロブナとギンブナのそれはよく似ていたが、ニゴロブナにおよそ1300bp、ギンブナにおよそ440bpにバンドが現れることで区別できた。ゲンゴロウブナのそれは他の2種とは大きく異なり、特に、およそ1800, 1700および1000bpのバンドが本種に特異的であった。コイは300bp付近に種に特異的なバンドが観察された。OPA2ではおよそ2000から400bp付近にバンドが出現した。ゲンゴロウブナは1700bp付近に種に特異的なバンドがみられ、コイは600bp付近に種に特異的なバンドが現れた。OPA15はギンブナに特異的な断片がおよそ2500bpに認められ、コイでは1000bp付近にみられた。OPA8は個体間の変異が著しく、種・亜種に特異的な

バンドはみられなかったが、OPA19 ではゲンゴロウブナに特異的な断片がおよそ 3000bp 付近に認められた。

DNA マーカーを用いた初期生態の解析

明らかになった RAPD マーカーを用いて、水生植物帯に出現するフナ仔稚魚の種組成とその季節変動を調査した。調査地は内湖の沿岸に広がるヨシ帯と農業用水路の 2 地点で行った。

1) ヨシ帯に出現するフナ仔稚魚の種組成とその季節変動

ヨシ帯内に岸から沖にむけて 4 区設け、各区内で仔稚魚を採集した。計 9 回の調査(4月～7月)で合計 973 個体の仔稚魚が採集された。フナ仔稚魚を RAPD マーカーによって種・亜種レベルで明確に判別することができた。1 回目の調査では 868 個体の主に上屈前期仔魚が採集され、ゲンゴロウブナおよびギンブナはヨシ帯一面に、ニゴロブナは中央部から岸近くに出現した。それ以降の調査では、個体数は激減し、岸近くに分布していた。その発育段階は上屈期および上屈後期仔魚であったことから、1 回目から 2 回目の調査以降、新たな仔稚魚の加入はないものと考えられた。また、1 回目から 2 回目の採集にかけて、ゲンゴロウブナとギンブナが激減し、ニゴロブナの割合が増加していたことから、ニゴロブナは他のフナよりも長い期間ヨシ帯内に留まっているものと考えられた。

2) 農業用水路に出現するフナ仔稚魚の種組成とその季節変動

RAPD マーカーによる種・亜種判別に基づいて、農業用水路に出現する仔稚魚の種組成とその季節変化を明らかにした。調査は 4 月から 7 月まで、彦根市内の農業用水路側面に広がるヨシ・マコモ帯で行った。採集した仔稚魚は発育段階を記録した後、分析に供した。計 14 回の調査で、1589 個体の仔稚魚が採集され、そのうち 1488 個体がコイまたはフナ類の仔稚魚(コイ・フナ)であった。RAPD マーカーによる判別の結果、これらはニゴロブナ(198 個体)、ギンブナ(756 個体)およびコイ(534 個体)であった。内湖沿岸のヨシ帯と異なり、ゲンゴロウブナはまったく確認されなかった。コイ・フナ以外の仔稚魚は、メダカ(73 個体)とドンコ(28 個体)がみられた。コイ・フナは 4 月から 5 月下旬にかけて大量に出現した。6 月以降はコイ・フナが大幅に減少して、メダカおよびドンコの仔稚魚が新たに認められた。調査期間中、ギンブナとコイは卵黄囊期仔魚・上屈前期仔魚の個体が複数回出現しており、これら 2 魚種は頻りに産卵していることが推察された。

琵琶湖数地域に出現するニゴロブナ仔稚魚の遺伝的変異

琵琶湖 4 地域(草津、西の湖、彦根、びわ町)に出現するニゴロブナ仔稚魚の遺伝的関係を明らかにするために、地域間の遺伝的分化程度を調査した。OPA2, 8, 10, 12, 18 および 20 の 6 種類を用い、各プライマーでえられたバンドを個体間および集団間で比較した。バンドの有無を 1, 0 データに置き換えて、個体

間の遺伝的類似度を算出した。集団内および集団間の平均遺伝的類似度をもとに、集団間の遺伝的類似度 (S_{ij})、遺伝距離 (D'_{ij}) を算出した。 D'_{ij} の値をもとに UPGMA 法および近隣結合 (NJ) 法によりデンドログラムを作成した。また、集団内のバンド出現頻度をもとに主成分分析を行った。集団内の平均遺伝的類似度は草津、西の湖、彦根およびびわ町でそれぞれ 0.725, 0.759, 0.760 および 0.734 の値を示した。集団間の遺伝的類似度 (S_{ij}) は 0.930 から 0.976 となり、草津と彦根がもっとも高い値を示した。 D'_{ij} は 0.033 から 0.098 の値を示し、地理的にもっとも遠い草津・びわ町間がもっとも高い値を示した。 D'_{ij} の値をもとに、UPGMA および NJ 法によりデンドログラムを作成した結果、樹形は一致し草津と彦根集団が遺伝的に近縁であることが示唆された。地理的に草津と彦根の中間地点である西の湖はその外側に位置した。主成分分析を行った結果、第 2 主成分まで、およそ 70% の寄与率を示した。各集団の主成分スコアを散布図上にプロットした結果、草津と彦根が近い位置にまとまり、西の湖とびわ町がそれぞれ異なる座標軸にプロットされ、デンドログラムと同様な傾向が認められた。

西の湖に生息するニゴロブナの形態的特徴

西の湖に出現するニゴロブナ仔稚魚は地理的に近隣の草津と彦根とは大きく遺伝的に分化しており、遺伝的に異質な集団であることが示唆された。この西の湖のニゴロブナは地元の漁師によってイオと呼ばれ、琵琶湖のニゴロブナと形態的差異が指摘されている。このフナと琵琶湖のニゴロブナとの形態的差異を明らかにするために両者間で比較した。その結果、イオ集団は琵琶湖産ニゴロブナよりも頭部が小さく(頭高 1, 頭高 2, 頬高, $p < 0.01$)、鰓耙数は明らかに少なかった ($p < 0.01$)。顕著な差異は気道弁の構造に見られ、ニゴロブナのその外観は丸みを帯び、内部がよく発達した筋層で成り立っているのに対し、イオのそれは細長く、未発達な筋層であった。この気道弁の 2 つのタイプは、両者が異なる水域を生息場所として利用していることをうかがわせた。

本研究では、琵琶湖フナ属魚類の仔稚魚の種・亜種判別に有効な DNA マーカーを検討し、それを用いた種・亜種判別に基づいて、琵琶湖産フナの初期生活期に関するいくつかの新たな知見を得ることができた。これらの知見は琵琶湖産フナ属魚類の資源回復・管理に役立つものと思われる。

論文審査結果の要旨

琵琶湖に生息するフナ属魚類（ゲンゴロウブナ、ニゴロブナ、ギンブナ）は、当地域の重要な食料資源として利用されてきたが、近年その漁獲量が大幅に減少し、資源回復のための対策が急がれている。フナ属魚類の生活史、とりわけ初期減耗が著しい仔稚魚期の生態について明らかにすることは、資源確保の上から極めて重要である。しかしながら、フナ類 3 種の仔稚魚は形態的に種を判別することが難しく、これまでに初期生活史に関する知見はほとんど得られてない。本研究は、琵琶湖産フナ類の仔稚魚期における種判別法を確立すると共に、初期生態調査への応用的研究を目指したもので、その内容は以下の通りである。

初めに、生物の系統や系群の解析等に活用されている Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 分析を用いて、琵琶湖産フナの種判別を試み、数種のランダムプライマー（OPA1、2、15、19、OPERON 社）から得られる特異的バンドを相互に比較することによって、フナ 3 種・亜種の識別が容易に行えることを見いだした。また、琵琶湖数地域から得られたフナ 3 種について RAPD 分析を行い、詳細な比較分析によりこの手法が種判別に普遍的に利用できることを明らかにしている。この点は、フナの初期生態の解明を可能にするものとして極めて意義深い。

続いて、上記の分析法を実際に応用して、琵琶湖の水生植物帯（ヨシ帯、農業用水路）に出現するフナ仔稚魚の種組成、分布および季節変動が調査されている。ヨシ帯の調査は、2002 年 4 月から 7 月にかけて行われ、採集標本の抽出 DNA の RAPD 分析から、ヨシ帯に生活する仔稚魚はゲンゴロウブナ、ギンブナおよびニゴロブナであり、前 2 者がヨシ帯全域に広く分布するのに対して、ニゴロブナはヨシ帯中央から岸近くに分布することを明らかにしている。また、4 月から 7 月に至る各発育段階（卵黄囊仔魚、上屈前仔魚、上屈仔魚、上屈後仔魚、稚魚）の個体の出現状況と種組成から、ニゴロブナはゲンゴロウブナ、ギンブナよりも長期間ヨシ帯に留まる傾向にあることを見いだしている。

農業用水路の調査は、2004 年 4 月から 7 月にかけて繰り返し水路側面のヨシ・マコモ帯で、仔稚魚の採集が行われた。採集個体の大部分が、コイまたはフナ類の仔稚魚（コイ・フナ）であった。RAPD マーカーによる判別の結果、コイ・フナ類の割合は、ニゴロブナ（12.4%）、ギンブナ（47.5%）およびコイ（33.6%）であった。内湖沿岸のヨシ帯と異なり、ゲンゴロウブナは全く確認されず、本種は用水路を産卵場所や仔稚魚の生息場所としてほとんど利用しないものと推察された。コイ・フナは 4 月から 5 月下旬にかけて大量に出現した。6 月以降はコイ・フナが大幅に減少して、メダカおよびドンコの仔稚魚が新たに認められ、用水路の仔稚魚相は季節によって大きく変動することが明らかにされた。また、調査期間中、ギンブナとコイは卵黄囊期仔魚・上屈前期仔魚の個体が複数回出現しており、これら 2 魚種は頻繁に産卵していることが推察された。また、ニゴロブナは、各発育段階個体の出現の季節変化から、ヨシ帯の調査と同様に、他の魚種よりも長い期間ヨシ・マコモ帯内に留まる傾向が見いだされた。

これらの結果は、水生植物帯におけるフナ仔稚魚の動態を初めて詳細に明らかにしたもので、その分析法は今後の調査研究に活用され、フナ類の資源維持・管理に大いに役立てられて行くものと考えられる。

琵琶湖の各地域に出現する仔稚魚間の遺伝的関係を把握することは、遺伝的多様性を考慮した産卵場や成育場の造成・管理を図る上で有益な情報となる。そこで琵琶湖内で遺伝的に分化した集団の存在が示唆されているニゴロブナを対象にして、琵琶湖 4 地域（草津、西の

湖、彦根、びわ町）に出現する仔稚魚間の遺伝的分化程度を調査した。集団間の遺伝的距離をもとに作成した dendrogram と、集団内のバンドの出現頻度をもとに行った主成分分析の結果から、びわ町集団は他の 3 集団と比較して遺伝的隔たりが大きく、また、西の湖集団は地理的に彦根集団と草津集団の中間地点に位置しているにも関わらず、この 2 集団とは大きく分化していることが明らかにされた。この結果から、地域によって遺伝的に異なる集団が産卵に訪れていることを示し、本亜種の遺伝的保全のためには、広範囲にわたる水生植物帯の管理が必要であることを示唆している。さらに、遺伝的な分化が認められた西の湖のニゴロブナは、成魚においても他の水域のニゴロブナとは異なる形態的特徴を有していることを見いだしている。すなわち、琵琶湖産ニゴロブナとの形態比較の結果、西の湖産ニゴロブナは頭部が小さく、鰓耙数も少ないこと、さらに気道弁が未発達で、内部構造も単純であるとしている。この結果は、ニゴロブナの地域集団の存在を強く示唆するものであり、今後、本亜種の資源管理を考慮する上で役立つ貴重な知見をもたらしたといえる。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成 17 年 2 月 22 日の農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。