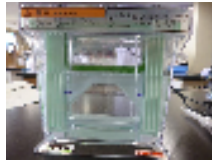


琵琶湖淀川水系のヌマチチブは国内外来種か？

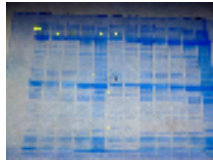
京都府立嵯峨野高校 3年 井上和樹, 田中佑季, 鎌田知希



チブ? (久美浜湾)



SDSアクリルアミド電気泳動



CBB染色



ヌマチチブ(宇治川)



mtDNAシーケンス

研究動機

2012年(1年次)京都府久美浜湾でチブとヌマチチブの両方の特徴を持つものを採集した。アクリルアミドゲルによるタンパク質の電気泳動により、雑種かどうかを判定しようとしたが、明瞭な結果は得られなかった。そこで、他の方法でチブ類について研究ができるかどうかを検討してみたところ、ミトコンドリアDNA(mtDNA)を調べた研究(向井・西田, 2005)を知った。

近隣の琵琶湖と下流の淀川水系に多くのヌマチチブが生息することがわかった。文献より、琵琶湖では生息が確認されていなかったヌマチチブが1989年に発見された(高橋, 1990)。一方、琵琶湖の下流の淀川水系では、1989年以前から「チブ」が確認されたという記録がある(琵琶湖・淀川水質保全機構, 1999など)。なお、当時は近縁種であるチブとヌマチチブは同種とされていたので、過去の淀川水系の「チブ」の記録はヌマチチブである可能性が考えられた。

近隣の研究機関である京都工芸繊維大学の高野教授の指導によりmtDNAを調べることができたこととなった。mtDNAでは雑種の判定ができないので、**現在、淀川水系で見られるヌマチチブが、在来種か、国内外来種かを調べた。**

向井・西田(2005)の研究

向井・西田は全国168個体のチブとヌマチチブをmtDNAのmtDNAのチトクロームb領域のシーケンスを行った。これは1個体群あたり数匹である。

琵琶湖は日本海とつながっていないにもかかわらず、mtDNAタイプは日本海のタイプ(アクセッションNo.D89586: III-B1タイプ)であり、

向井・西田(2005)は琵琶湖のヌマチチブ(III-B1タイプ)は国内外来種とした。

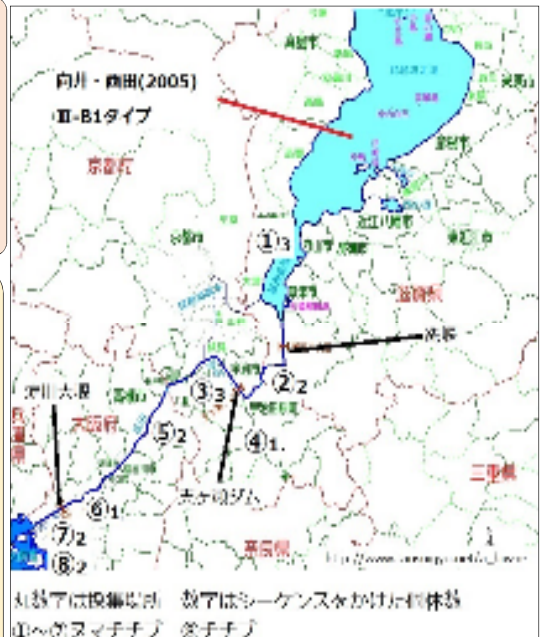
実験方法 向井・西田(2005)方法に従い mtDNAのシーケンスを実施

- 抽出キット SIGMA-ALDRICH社 GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit
- DNAポリメラーゼ Perkin Elmer社 AmpliTaq Gold
- PCR プライマー (Mukai et al., 2000, 向井・西田, 2005)
mtDNAのチトクロームB遺伝子の部分配列456塩基対を増幅
増幅回数 (94°C:30秒 → 60°C:1分) × 40回
- アナライザー Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer
- 塩基対の比較 **フォワードとリバースから、塩基配列を決定**
日本DNAバンク (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) で比較
3 6 5 塩基対以上を相同領域を比較

材料と結果

採集場所	種	個体数	アクセッションNo	向井・西田分類
① 琵琶湖湖所なぎき公園	ヌマチチブ	3個体	D 8 9 5 8 6	III-B1, 国内外来種
② 瀬田川大石川河口	ヌマチチブ	2個体	D 8 9 5 8 6	III-B1
③ 宇治川ダム下流白川河口	ヌマチチブ	3個体	D 8 9 5 8 6	III-B1
④ 木津川流れ橋	ヌマチチブ	1個体	D 8 9 5 8 6	III-B1
⑤ 淀川牧方パーク周辺	ヌマチチブ	2個体	D 8 9 5 8 6	III-B1
⑥ 淀川大堰上流右岸	ヌマチチブ	1個体	D 8 9 5 8 6	III-B1
⑦ 淀川大堰下流右岸	ヌマチチブ	2個体	D 8 9 5 8 6	III-B1
⑧ 比較 淀川大堰下流右岸	チブ	1個体	D 8 9 5 8 2と1塩基相違	II-1と1塩基相違
比較 鎌倉 清川	ヌマチチブ	1個体	D 8 9 5 7 4	I-A1 太平洋タイプ
比較 久美谷川久美浜駅	ヌマチチブ	1個体	D 8 9 5 8 6と2塩基相違	III-B1と2塩基相違
比較 久美谷川久美浜駅	ヌマチチブ	1個体	D 8 9 5 8 6	III-B1 日本海タイプ
比較 久美浜清見山公園	中間タイプ	2個体	D 8 9 5 8 6と1塩基相違	III-B1と1塩基相違
比較 久美浜清見山公園	チブ	1個体	D 8 9 5 8 6	III-B1
比較 久美浜清見山公園	チブ	1個体	D 8 9 5 8 6と1塩基相違	III-B1と1塩基相違

すべての個体は2013年に採集した。ヌマチチブ17個体からは3種類(III-B1, I-A1, III-B1と2塩基相違のタイプ)のハプロタイプが確認された。比較に用いた神奈川県滑川1個体, 京都府久美浜湾2個体からは、それぞれの地域で確認されているタイプ(太平洋側タイプと日本海側タイプ)のmtDNAが確認された。しかし、**琵琶湖で採集された3個体も淀川水系で採集された11個体も、すべてIII-B1タイプであった。**



III-B1タイプの塩基配列
TACTCTCTTACAAGAGCTGCTTGGATTGGCTTTAATGCTCCTTGACCTACATCCCTTGGCTTATTCTCCCCCACTACCTA
GGGACCCAGATAACTTACCCCTGCAAAACCCCTTGTGACCCGCGCACATCAAGCCAGATGATCTCCTGTTTGGCTAC
GCAATCTTGGATCTATTCTAACAACTAGGAGGGGCTTGGACCTCTTGCATCTATCTTGTATTAAATGCTTGTACCCTC
CTGCACCCCTGATAAGAGGAGGCTAACTTCTCCGCGCTCTTCCCAATCTCTTGCACCCCTTGTACAGATGATCACTA
CTTCATGAATCGGAGGATACCACTA

追加実験

個体数が少なかったため、2014年に木津川(④)付近と淀川(⑤, ⑥)で採集した計10個体をバイオマトリクス研究所に依頼し、mtDNAのチトクロームBを調べてもらった。この結果、これらもすべてIII-B1タイプであった。すなわち、**琵琶湖の下流の淀川で採集した22個体はすべてIII-B1タイプであった。**

結論 現在、琵琶湖淀川水系で見られるヌマチチブ(もしくはその多く)は国内外来種である。

謝辞 指導していただいた京都工芸繊維大学高野教授に感謝します

2014/03 作製・生体学会 出版
2014/06 追加(伊奈, 近藤高に出展)