

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR-88-2009

侵入生物・組換え生物による 遺伝的多様性影響評価に関する研究 (特別研究)

Studies on effects of invasive species and genetically modified organisms (GMO)
on the genetic biodiversity

平成18～20年度

FY 2006～2008

NIES



独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/>

侵入生物・組換え生物による 遺伝的多様性影響評価に関する研究

(特別研究)

Studies on effects of invasive species and genetically modified organisms (GMO)
on the genetic biodiversity

平成18～20年度

FY 2006～2008

特別研究「侵入生物・組換え生物による遺伝的多様性影響評価に関する研究」

(期 間 平成18～20年度)

特 別 研 究 責 任 者：中嶋信美

特 別 研 究 幹 事：中嶋信美

特別研究報告書編集担当：中嶋信美

序

本報告書は、平成18～20年度の3年間にわたって実施した特別研究「侵入生物・組換え生物による遺伝的多様性影響評価に関する研究」の成果をまとめたものです。

地球上の生態系は、地域ごとに固有な遺伝子組成を持った多様な生物から構成されています。これらは、長い時間をかけた進化の過程で形成されたものであり、個々の種や個体群が進化の歴史を背負った「文化財」といえます。そして、それぞれの生物種がその生息場所において一定の役割を担うことで、生態系の機能が保たれています。したがって、生物多様性の急激な低下は、文化財としての種の喪失をもたらすだけでなく、生態系の持つ機能が著しく損なわれるため、場合によっては人に対しても悪影響をもたらします。それ故、我々人類が生態系を持続的に利用するためには、生態系にふくまれる様々な生物種の地域集団の遺伝的多様性を維持しながら保全する必要があります。そのためには生物種地域集団の遺伝的多様性を十分に把握した上で、さまざまな生態系改変要因が地域集団の遺伝的多様性へ与える影響を最小限に減じる必要があります。

新しく侵入する生物の種類数は社会情勢の影響を強く受け、貿易量に対応して増加しています。1990年代以降は世界的に自由貿易がひろがり、新しい外来生物の侵入も増えていることから、今後日本においては外来生物の侵入が加速度的に増加することが予想されています。

このような背景をふまえて、特別研究「侵入生物・組換え生物による遺伝的多様性影響評価に関する研究」では、遺伝子の多様性（遺伝的多様性）を脅かす人為的要因として「遺伝子組み換え生物の拡散」と「人為的な生物の移送」に焦点をあて、こうした行為が在来種にどのような影響を与えているかを解明しました。本報告書の中で示された知見が今後さらに充実し、侵入生物防除対策へ生かされることを期待しています。

平成21年9月

独立行政法人 国立環境研究所

理事長 大垣 眞一郎

目次

1	研究の背景, 経緯, 目的	1
1.1	研究の目的	1
1.2	研究の構成	1
1.2.1	全体計画	1
1.2.2	サブテーマ1 遺伝子組換え (GM) 植物が在来植物へ与える影響に関する研究	1
1.2.3	サブテーマ2 導入昆虫類がもたらす遺伝的攪乱に関する研究	1
1.2.4	サブテーマ3 淡水魚の地域集団外からの移植に関する研究	2
2	研究の成果	3
2.1	遺伝子組換え (GM) 植物が在来植物へ与える影響に関する研究 (サブテーマ1)	3
2.1.1	国道沿いに生育するGMセイヨウアブラナの分布調査 (サブサブテーマ1-1)	3
2.1.2	野外環境中におけるアブラナ類の種間交雑に関する予備的研究 (サブサブテーマ1-2)	7
2.1.3	アブラナ類の浸透性交雑解析に適した種特異的分子マーカーの開発 (サブサブテーマ1-3)	10
2.1.4	遺伝子組換えセイヨウアブラナの挙動調査用組換え体の開発 (サブサブテーマ1-4)	13
2.2	導入昆虫類がもたらす遺伝的攪乱に関する研究 (サブテーマ2)	18
2.2.1	研究の目的	18
2.2.2	研究の方法	20
2.2.3	結果および考察	22
2.2.4	引用文献	25
2.3	淡水魚の地域集団外からの移植に関する研究 (サブテーマ3)	26
2.3.1	はじめに	26
2.3.2	方法	28
2.3.3	結果	30
2.3.4	考察	32
2.3.5	まとめ	35
[資料]		
I	研究の組織と研究課題の構成	37
1	研究の組織	37
2	研究課題と担当者	37
II	研究成果発表一覧	38
1	誌上発表	38
2	口頭発表	39

1 研究の背景, 経緯, 目的

1.1 研究の目的

地球上の生態系は、地域ごとに固有な遺伝子組成を持った多様な生物から構成されている。遺伝的多様性を低下させる大きな要因の一つとして生物学的侵入（侵入生物）がある。特に注目されるのは、侵入生物と在来生物との交雑による雑種形成や侵入生物自体が優占種となることで、在来生物集団の遺伝的多様性に対して影響を与える場合である。実際に人為的な移動により、セイヨウオオマルハナバチやタイリクバラタナゴなどの外来生物が導入された結果、在来生物と交雑し、在来生物の固有性を脅かしていることが問題となっている。また、輸入された遺伝子組換え植物が野外で生育を始めており、除草剤耐性遺伝子が近縁種集団へ移行することが懸念されている。このように侵入生物及び組換え生物が遺伝的多様性に与える影響は、学術的にも社会的にも関心を集めているが、これらの生物の交雑実態や遺伝的多様性への影響はまだ十分に明らかとなっていない。一方、我が国は生物多様性条約を批准しており、生物多様性の保全に努めることは国際的な責務である。条約履行を裏付け、生物の輸出入等による生物多様性への悪影響を防止するために「カルタヘナ法」や「外来生物法」がすでに施行されており、侵入生物に関する研究や情報収集が急務とされる。本研究では侵入生物及び組換え生物が在来生物の遺伝的多様性へ与える影響を評価するために、(1) 侵入生物や遺伝子組換え生物の遺伝子が在来生物集団へ浸透するプロセスを明らかにする。(2) 在来生物の遺伝的多様性を減少させている、あるいはその可能性のある侵入生物の遺伝的特性を把握する。(3) 外来生物法の対象外である同種個体の地域集団外からの移殖実態について調査を進め、その多様性影響を評価する。(4) これらの成果にもとづいて遺伝的多様性保全のための指針を策定する。ことを目的として研究をおこなった。

1.2 研究の構成

1.2.1 全体計画

本研究では「カルタヘナ法」や「外来生物法」の規制対象外であるが、今後在来生物の遺伝的多様性に影響を与える可能性がある生物として、輸入昆虫や寄生ダニ類、遺伝子組換え農作物及び移殖淡水魚について、その遺伝的特性と在来生物との遺伝的相互作用の実態把握を

おこなうことにした。これら生物に由来する外来遺伝子が在来生物集団へ浸透するプロセスを明らかにすることにより、それらの遺伝的多様性への影響を評価することを目標とした。

1.2.2 サブテーマ 1 遺伝子組換え (GM) 植物が在来植物へ与える影響に関する研究

遺伝子組換え (Genetically Modified = GM) 作物のうちナタネ (和名: セイヨウアブラナ) は自然増殖が極めて容易で、在来種とも交雑しやすいため、GM セイヨウアブラナが環境中に放出されると、カラシナなどの野生種と交雑して、除草剤耐性遺伝子が野生種へ移行する可能性がある。これまでの調査により国内の主な輸入港やその周辺道路において、GM セイヨウアブラナの生育が確認された。本サブテーマでは、GM セイヨウアブラナの一般環境中における定着及び分布拡大についてモニタリングを実行するとともにアブラナ科植物の近縁種集団との交雑実態や雑種の生態学的特性について調査を行った。また、開放系において GM セイヨウアブラナと近縁種の交雑実験をおこなう条件整備を進めた。

1.2.3 サブテーマ 2 導入昆虫類がもたらす遺伝的攪乱に関する研究

我が国には農業用生物資材やペット用昆虫など様々な外来昆虫が意図的に導入されている。また農作物や物資などに紛れて多くの昆虫類が非意図的にも侵入している。本サブテーマでは外来生物法において議論を呼んでいるマルハナバチ類やクワガタムシ類、および植物防疫法で昨年度検疫対象から外されてしまった有害生物を対象として、日本列島およびアジア全域における遺伝子系統解析を行ない、生物系統地理情報データベースを作製した。これに基づき地域個体群の保全ユニット (進化的重要単位 Evolutionarily Significant Unit = ESU) を明らかにして、遺伝的固有性の保全策立案における基礎情報とした。また、交雑実験により地域個体群・系統間の交雑和合性リスクを評価するとともに、野外における交雑および遺伝的攪乱の実態を明らかにすることを目的とした。

1.2.4 サブテーマ3 淡水魚の地域集団外からの移殖に関する研究

近年、水産面・観光面などの多様な社会的要求の増進にともなって、様々な淡水魚種が種間・種内を問わず、異なる地域集団の間で移殖される機会が増えている。それに伴い、移殖に由来する外来遺伝子が地域固有の淡水魚集団に浸透していくリスクが高まっている。同時に、本来の地域集団が保有している地域固有の遺伝的構造を把握する必要性が高まっている。

本サブテーマでは、国内での地域外移殖が問題となっ

ている淡水魚オイカワ・モツゴなど数種について関東平野を中心に主としてミトコンドリア DNA の配列情報をもとに外来遺伝子の浸透実態を調査した。また、基礎情報として地域集団本来の遺伝的構造を調査して、ESUを推定した。さらに、オイカワを事例として、琵琶湖地域集団に由来する遺伝子の関東地方水系への浸透実態を精査した。その上で、外来遺伝子の浸透率が高い地域を抽出して、環境条件および有用魚放流頻度との関連を解析した。

2 研究の成果

2.1 遺伝子組換え (GM) 植物が在来植物へ与える影響に関する研究 (サブテーマ 1)

2.1.1 国道沿いに生育する GM セイヨウアブラナの分布調査 (サブサブテーマ 1-1)

2.1.1.1 はじめに

遺伝子組換え (GM) 作物は2007年現在、23カ国で栽培されており、その栽培面積は2007年において1億2000万haに達し¹⁾、これはさらに年々拡大する傾向にある。しかしながら、どの国においても組換え遺伝子の拡散について十分な実態調査が行われておらず、組換え遺伝子が在来種へ移行することにより、何らかの影響が生じることが懸念されている。また、遺伝子組換え作物は輸出入を通じて全世界へ移動していることから、世界規模での組換え遺伝子の拡散が起こる可能性がある。日本は食料輸入大国であり遺伝子組換え体への転換が盛んに行われているトウモロコシ、ダイズ、セイヨウアブラナ、ワタが2007年現在2,305万トン以上輸入されている²⁾。これらのうち、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) は自家不和合性が強く、自殖性植物に比べて近縁種と交雑しやすい。日本におけるナタネ (セイヨウアブラナの種子) の輸入量は2008年の統計では231万トンで²⁾、輸出国側の遺伝子組換え体の栽培面積から考えて、輸入されているセイヨウアブラナの半分以上に組換え体が混入していると予想される。従って国内に輸入されたセイヨウアブラナの種子が輸送中にこぼれ落ちるなどした場合、その中に含まれる GM セイヨウアブラナが一般環境中に放出されることになり、これが野外に生育しているアブラナ科植物と交雑し、組換え遺伝子が一般環境中に拡散した結果、何らかの影響が生ずる可能性が懸念されている。

以上のように、組換え体の輸出入にともなう生物多様性への影響が懸念されているが、これを防止するための国際的な取り決めとして「カルタヘナ議定書」があり、我が国も締結国となっている。さらにカルタヘナ議定書に対応した国内法である「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」が施行され、この中で「国による遺伝子組換え生物の使用等により生ずる生物多様性影響に関する科学的知見の充実を図る」ことが位置づけられていることから、現在使用されている遺伝子組換え生物が一般環境中に存在しているのか、存在している場合にはどのような状況でどの程度

存在しているのかに関してのデータ収集を継続的に行っていくことが必要とされている。本研究では国内で使用 (加工用に輸入) されている遺伝子組換え生物のうち、野外で生育する可能性の高いセイヨウアブラナについて、一般環境中における GM セイヨウアブラナの生育の現状、導入遺伝子の拡散状況等の研究・調査を行った。

2.1.1.2 研究方法

(1) 試料の採取

一般環境中に生育するセイヨウアブラナの個体数調査と生育個体の試料をサンプリングする目的で、2004～2008年の4月～5月にかけて国道51号線の香取～成田間20kmで調査を行った (2004年度は予備調査)。鹿島港から成田市街に向かう車線に面した道路端を対象とし、徒歩での目視によりセイヨウアブラナを確認し、生育していた全個体を記録した。確認した個体の位置は、国土交通省によって設置された1kmごとの距離表示標識からの距離をペドメーターによって測定し記録した。さらに、個体サイズの指標として主茎の根元直径を測定し、組換えタンパク質の検出およびDNA解析用として葉を一枚採取した。

(2) 除草剤耐性タンパク質の検出

現地では採取した葉サンプルは実験室に持ち帰り、凍結乾燥後常温で保存した。各個体サンプルから10mgの葉片を切り取ってマイクロチューブに入れ、0.5mLの水を加えすりつぶした。上清にReveal試験紙 (NEOGEN) またはTrait LL 試験紙 (Strategic diagnostics Inc.) を浸し10分後に除草剤耐性タンパク質による陽性反応の有無を確認した。

(3) DNAの抽出

除草剤耐性タンパク質の存在が陽性を示した個体については、乾燥葉試料から0.1gの葉片を切り取り SDS-phenol法³⁾にて核酸を抽出し、イソプロパノールを加えてDNAとRNAを沈殿させ、70%エタノールで洗浄した。沈殿を乾燥させ100μLのRNaseTE (10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA pH8.0, 10μg/ml RNase A) に溶解して、RNAを分解したものをDNA標品として使用した。そのうち10μLをアガロース電気泳動で分析することにより純度を検定

した。残りは-20℃に保管した。

(4) 除草剤耐性遺伝子の検出

日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録されているグリホサート耐性遺伝子 (CP4-Enolpyruvyl shikimate phosphate synthase: CP4-EPSPS), グルホシネート耐性遺伝子 (phosphinothricine acetyltransferase: PAT) および雄性不稔遺伝子 (Barstar) の塩基配列から共通性の高い部分を選び PCR プライマーを設計した。これらのプライマー (塩基配列) を用いて抽出した DNA をテンプレートにして PCR をおこなった。PCR の反応条件は以下のとおりである。

1) CP4-EPSPS 遺伝子を検出する場合

10×反応液 2μL, 2mM dNTP 2μL, 25mM MgCl₂ 2μL, テンプレート DNA 1μL (0.1μg), Primer1 (EPSPS7) 0.2μL (20pmol), Primer2 (EPSPS8) 0.2μL (20pmol), rTaq polymerase 0.3μL (1.5U), 滅菌水 12.3μL を混合し, 変性温度 94℃ 1 分, アニール温度 65℃ 2 分, 伸長反応温度 72℃ 3 分で 30 サイクル PCR を行った。

2) PAT 遺伝子を検出する場合

10×反応液 2μL, 2mM dNTP 2μL, 25mM MgCl₂ 2μL, テンプレート DNA 1μL (0.1μg), Primer1 (Bar7) 0.2μL (20pmol), Primer2 (Bar8) 0.2μL (20pmol), rTaq polymerase 0.3μL (1.5U), 滅菌水 12.3μL を混合し, 変性温度 94℃ 1 分, アニール温度 55℃ 2 分, 伸長反応温度 72℃ 3 分で 30 サイクル PCR を行った。

3) Barstar 遺伝子を検出する場合

10×反応液 2μL, 2mM dNTP 2μL, 25mM MgCl₂ 2μL, テンプレート DNA 1μL (0.1μg), Primer1 (barstar1) 0.2μL (20pmol), Primer2 (barstar2) 0.2μL (20pmol), rTaq polymerase 0.3μL (1.5U), 滅菌水 12.3μL を混合し, 変性温度 94℃ 1 分, アニール温度 65℃ 2 分, 伸長反応温度 72℃ 3 分で 35 サイクル PCR を行った。

以上の反応により増幅された DNA をアガロース電気泳動で分離し, 目的の長さの DNA バンドをゲルから切り出し回収した。回収した DNA はそのまま塩基配列の解析に使用した。塩基配列の解析はアプライドバイオシステ

ム DNA アナライザー 3730 を用いておこなった。

表1-1-1 本研究に使用したプライマーの名称とその塩基配列。括弧で囲んだ塩基は 2 つの塩基の mixture であることを示す。

プライマーの名称	塩基配列
EPSPS7	5'-AAGAACTCCGTGTTAAGGAAAGCGA-3'
EPSPS8	5'-AGCCTTAGTGTCCGAGAGTTCGAT-3'
Bar7	5'-ACAAGCACGGTCAACTTCCGTAC-3'
Bar8	5'-GAGCGCCTCGTGCATGCGCACG-3'
barstar1	5'-AG(TC)ATCAGCGACCTCCACCAGA-3'
barstar2	5'-ATGATGGTGATGTCGCAGCC(CT)T-3'

2.1.1.3 結果と考察

1) セイヨウアブラナの個体数と年変化

国道 51 号線沿いのセイヨウアブラナが生育していた地点数は 2005 年が 1147 地点, 2006 年は 1336 地点であった。2007 年には 256 地点に減少し, 2008 年は 371 地点へとやや回復した。基本的に 1 地点 1 個体としてカウントしたが, 排水溝などに高密度で生育している場所があり, このような場所はまとめて 1 カ所とカウントし, 別に個体数を記録した。個体数で見ると 2005 年が 2162 個体, 2006 年が 4066 個体, 2007 年が 278 個体, 2008 年は 390 個体であった (図 1-1-1)。ほとんどの個体は歩道のアスファルトと車道側の縁石との隙間に生育していた。2006 年に個体数が倍増しているのは, スタートから 15km 地点の排水溝の中に多数の個体がまとまって生育していたためである。セイヨウアブラナが密生してした排水溝は全長で 150m あり, すべての個体数を数えることが難しかったの

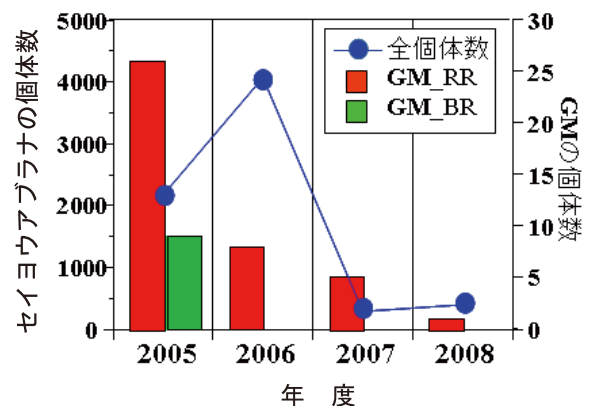


図1-1-1 国道 51 号線におけるセイヨウアブラナの個体数の経年変化。

GM_RR: グリホサート耐性 GM セイヨウアブラナ, GM_BR: グルホシネート耐性 GM セイヨウアブラナ

で、4 mごとの小区画に区切り、各区分あたり 1 m長の側溝内に生育していた個体数を数えることによって小区画内の個体数を推定し、この地点に生育していた全個体数を推定した。

国道51号線の周辺には畑地があるが、国道と畑地の境界の植生は主にセイタカアワダチソウ (*Solidago altissima* L.)、クズ (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi)、ヨモギ (*Artemisia princeps* Pamp.) であり、セイヨウアブラナは見つからなかった。スタートから15km付近の排水溝に生育していた個体の起源は、おそらく道路にこぼれた種子が雨水で流されて集まり、発芽したものと思われる。この側溝内に形成されていた集団は2007年には50分の1に減少していたことから、排水溝内で発芽した個体はほとんど定着できないと推定された (図1-1-2)。

一般的に、日本ではアブラナ科の作物は秋に発芽してロゼットで越冬し、春に開花し夏にかけて種子が成熟する。長角果 (果実) が成熟すると裂開し、種子が散布される。秋までに散布され道路端や排水溝に蓄積した種子は秋の長雨で流されてしまうので、2006年の春に形成されていた排水溝の集団はおそらく、秋の長雨以降に輸送中のトラックからこぼれた種子が蓄積したことに由来するものと思われる。

このようにセイヨウアブラナが高密度に生育している場所は、2006年度の15km地点以外にも、2005年度に5 km (259個体) 地点と12km (252個体) 地点でも見つかった。しかしこれらの地点では、2006年にはそれぞれ2個体および61個体に激減していた。2005年度に認められた高密度地点では、セイヨウアブラナは排水溝ではなく道路と縁石の境目にある隙間に生育していたことから、排水溝がなくても高密度の群落を形成することがあるといえる。また、以上の調査結果からセイヨウアブラナは種子の生育が可能な環境が提供されれば、発芽して成長し、場合によっては群落を形成できると考えられ

る。本研究において調査を行った期間中には、国道51号線沿いではセイヨウアブラナの大規模な分布拡大や長期間にわたる個体群の定着は確認されなかった。しかしながら、沿道に生育していた個体数は年ごとに大きく変動した。調査期間中、千葉県側では道路の改修工事が度々おこなわれていた。2006年には7 km地点と8 km地点で舗道の補修工事がおこなわれているのに遭遇した。2007年にこの地点の個体数を調べたところ、前年の30%以下に減少していた。このように道路の改修工事がセイヨウアブラナの生育に大きな影響を与えていることは明らかである。実際、改修工事によって路面と縁石の隙間が埋められた結果、ほとんどのセイヨウアブラナが生育できなくなっていた (図1-1-2)。

2) 除草剤耐性セイヨウアブラナの検出と遷移

遺伝子組換えセイヨウアブラナ (GM セイヨウアブラナ) は調査した4年間のすべての年で見つかったが、その数は毎年減少した。グリホサート耐性個体は毎年見つかっており、2005年が26個体、2006年が8個体、2007年が5個体、2008年は1個体であった。グルホシネート耐性個体は2005年に9個体見つかったが、その後は検出されていない (図1-1-1)。

輸入されているナタネの量および輸入相手国における組換え体の作付け面積から推定すると、国内で流通しているセイヨウアブラナ種子の半分以上が除草剤耐性セイヨウアブラナであると考えられるにもかかわらず、国道51号線沿いに生育していたセイヨウアブラナに占めるGMセイヨウアブラナの割合はきわめて低かった。環境省^{4),5)} や我々による調査では四日市港周辺に生育しているセイヨウアブラナに占めるGMセイヨウアブラナの割合は50%程度であり、輸入量から推定した値と良く一致していた。国道51号線を使って運搬しているナタネ (セイヨウアブラナの種子) は鹿島港で陸揚げされたものである可能性が高いことから、鹿島港から内陸へ輸送されている種子が非GMに変わったか、鹿島港から内陸へ輸送されている種子が非GMに変わった可能性がある。

我々の調査では成田市に近づくにつれてグリホサート耐性セイヨウアブラナが増加する傾向があった。おもしろいことに、2006年に見られた15km地点の大きな群落にはGMセイヨウアブラナは含まれていなかった。スタートから1 kmごとに区切った各区分ごとにGMの出現率を算出すると、GMセイヨウアブラナの比率は0.2%以下で

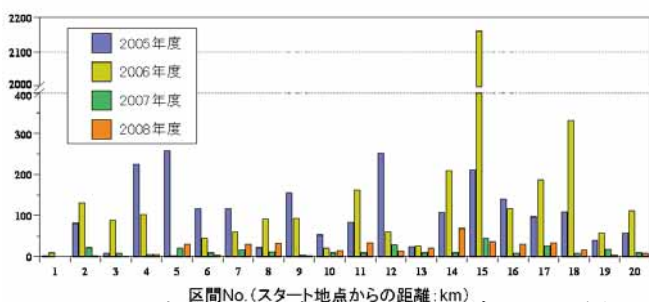


図1-1-2 調査区分 1 kmごとのセイヨウアブラナの分布個体数

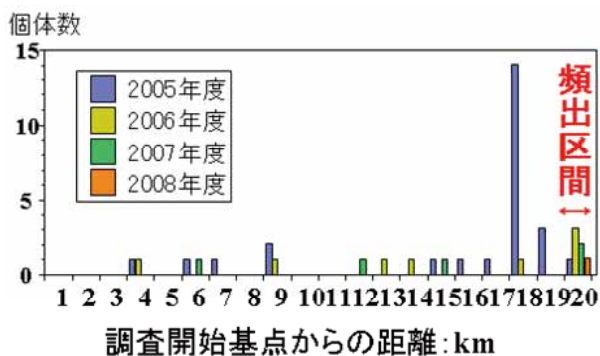


図1-1-3 調査区間 1 km ごとのGMセイヨウアブラナの分布数

あったが、18kmと20km付近ではグリホサート耐性個体が高い頻度で出現する傾向があった。これらの地点でなぜGMセイヨウアブラナの出現頻度が高いのかは不明である（図1-1-3）。セイヨウアブラナを含むアブラナ科植物の多くは自家不和合性を持つが、GMセイヨウアブラナの中には自家受粉が可能な品種があることから、これらの地点では世代交代して定着しているのかもしれない。我々の調査では道路の舗装面から1～3mの幅を調査対象とした。その範囲では、縁石にたまった土砂および縁石と舗装面の境界にほとんどのセイヨウアブラナが生育していたが、この部分は道路清掃車による定期的な清掃で除去されている。毎年多くの個体が出る20km地点のような場所を除けば、GMセイヨウアブラナの出現場所は大きく変動している。以上のことから考えて、GMセイヨウアブラナの種子は輸送トラックから毎年偶然にこぼれ落ちて発芽し、道路清掃によって除去されている可能性が高いと思われる。

我々の調査では2005年を除いてグリホシネート耐性セイヨウアブラナは検出されなかった。この系統がほとんど検出されていない理由を述べるだけの十分な調査情報がないが、可能性として述べるなら、この系統には雄性不稔の遺伝子が導入されているので、自殖率が低いためかもしれない。しかしながら、四日市港付近ではグリホシネート耐性セイヨウアブラナが高い頻度で検出されるので、運搬している種子の系統がグリホシネート耐性からグリホサート耐性へ変わったためかもしれない。

国道51号線周辺へのGMセイヨウアブラナの影響が懸念されている。今回の調査でわかったことは、セイヨウアブラナのほとんどは縁石にたまった土砂や花壇、路面との境界に生育していたということである。国内の自然群落を構成するアブラナ類はカラシナ (*B. juncea*) と在

来アブラナ (*B. rapa*) である。調査を行った国道51号線が位置している地域におけるセイヨウアブラナの分布は、花壇や観光農園、休耕田など、栽培地に限られていた。河川敷におけるセイヨウアブラナの分布は関西地方で報告されているものの、国道51号線周辺では、野生化したセイヨウアブラナの自然群落は2004年の予備調査の際に利根川の河川敷に小さな群落が見られたのみである。従って現状では、国道51号線に面した地域や調査スタート地点の北側（輸送ルートの上流）には、国道51号線沿いに種子を供給している個体群は確認されなかった。

我々の調査ではセイヨウアブラナの生育は成田方面に向かう車線側で多く見られ、反対車線側はほとんど見られないことがわかった。このことはCrawley and Brown⁶⁾ や von der Lippe and Kowarik⁷⁾ が示したように、運搬途中にこぼれた種子由来の植物の分布に見られる特徴である。従って、GMセイヨウアブラナも含めて国道51号線に生育しているセイヨウアブラナは鹿島港からの運搬途中で偶然こぼれた種子に由来すると言える。

15km地点に多数の個体が2006年にだけ出現したことや、GMの出現頻度がとても低いことがうまく説明できない。また、少なくとも調査期間中にはGMセイヨウアブラナが周辺に拡大していなかった。これとよく似た現象がオーストラリアでのGMワタの種子運搬に関する調査でも示されている⁸⁾。オーストラリアでは商業栽培されているワタの90%がGMである。輸送道路周辺に生育しているワタを3年間調べたところ22個体のうちわずか1個体だけがGMであったという報告がある。このことからGMワタが輸送道路沿いに繁茂し2次的に繁殖規模を拡大する可能性は無視できるほど少ないと結論されている。一方国道51号線に関して見ると、周辺ではアブラナ科の野菜を栽培しており、一部では収穫が放棄され開花している光景がしばしば見られる。従って、セイヨウアブラナとの交雑が起こる可能性は否定できない。一般的に*B. napus*と*B. rapa*の雑種は生き残りにくいとされているため、短期的には国道51号線周辺におけるセイヨウアブラナ逸出の影響は無視できるが、今後アジア周辺国からのアブラナ科野菜の輸入圧が高まってくると、その影響評価はケースバイケースで考える必要があろう。

2.1.1.4 結論

本研究では予備調査も含め5年間にわたり、GMセイヨウアブラナの分布調査をおこなった。その結果、日本において一定程度のセイヨウアブラナ種子のこぼれ落ちは不可避であると思われた。しかし、2008年の春までの調査では定着し安定した大規模なセイヨウアブラナの群落は見つかっておらず、GMの優位性も見られなかった。さらに、調査区間においてはセイヨウアブラナの大規模な商業栽培が行われていないことから、少なくともこの調査区間周辺においてはGMセイヨウアブラナと非GMセイヨウアブラナが同時に存在するという懸念はない。セイヨウアブラナによる輸送種子のこぼれ落ちに起因した包括的なリスク影響評価を行うためには、GM個体の定着および分布拡大、近縁野生種や栽培種への遺伝子流動などの重要性に取り組む必要がある。国道51号線の現状を見る限り除草剤耐性遺伝子の影響は無視できるが、グリホサート耐性個体は出現頻度が前年より上昇しているという事実もある。従って、GMセイヨウアブラナの逸出による在来のアブラナ科植物への影響を評価するには、複数のモニタリングサイトにおいて、長期的なモニタリングをおこなう必要がある。

2.1.1.5 引用文献

- (1) The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) home page <http://www.isaaa.org/>
- (2) 財務省 日本貿易統計
- (3) Nakajima et al. (1988) *Plant Cell Physiol.* 29, 989-998.
- (4) Aono et al. (2006) *Environ. Biosafety Res.*, 5(2), 77-87.
- (5) JBCH2006
- (6) Crawley and Brown (2004) *proc. Roy. Soc. London B* 271; 1909-1916
- (7) von der Lippe and Kowarik (2007) *Conseru. Biol.* 21, 986-996
- (8) Addison et al., *Weed Res.* 47, 192-201

2.1.2 野外環境中におけるアブラナ類の種間交雑に関する予備的研究 (サブサブテーマ1-2)

2.1.2.1 はじめに

日本では古くからアブラナ科の作物の利用が盛んであり、日本各地において様々なアブラナ科作物が栽培されている。さらに搾油用や家畜の飼料用としても、主にカ

ナダから年間200万トン以上のナタネ(セイヨウアブラナの種子)を輸入している。これらのアブラナ科作物の一部は、長らく利用される中で一般環境中に逸出し、大規模な群落を形成している。現在、日本国内の一般環境中において、大規模な自然群落を形成しているアブラナ科植物は、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*, $n=19$ 以下 n は基本染色体数)、在来アブラナ (*B. rapa*, $n=10$)、カラシナ (*B. juncea*, $n=18$) の3種である(本稿ではこれらをまとめてアブラナ類と呼ぶ)。春先になると、河川敷等が一面黄色の花に覆われる「菜の花」の景色は、これらの植物の個体群である。

一般的に、アブラナ科の作物間では、種間交雑が可能であることが知られており、数多くの研究例がある。国内の「菜の花」群落を構成する種間でも、セイヨウアブラナは種子の越冬性に優れ、近縁種である在来アブラナやカラシナと交雑が可能であり、低い頻度ではあるが自然条件下において稔性のある雑種を形成することが海外の事例では知られている。しかしながら、交雑親和性は存在するものの、実際の交雑の程度(e.g. 交雑頻度)は、実験条件や交雑に供与する種間および品種間等で大きく異なり、文献によって様々であるというのが実情である。

日本国内においては、2004年より施行された「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」に基づいて、現在までに10系統の遺伝子組換え(GM)セイヨウアブラナの使用が認可されている。この国内における組換え体使用の安全性審査において、「除草剤耐性セイヨウアブラナの利用に伴う生物多様性への影響はない」と結論された重要な根拠の一つは「一般に染色体数の異なる種間雑種は稔性が低く、子孫を残しにくい交雑崩壊が起こる」という実験結果である。しかしながら、これまでに公表されているアブラナ類に関する交雑率や雑種の稔性に関するデータはすべて人工交配実験や2、3年程度の短期の圃場栽培試験の結果に基づいたものであり、実際の野外環境下における種間交雑の実態や雑種の生存率などについては未解明の状態である。

そこで本研究では、日本国内の一般環境条件下におけるアブラナ類の交雑実態を明らかにするために、アブラナ類の植物が2種以上同所的に生育している群落を対象に、次章(サブサブテーマ1-3)において述べるような分子マーカーの開発後に種間頻度解析を行うことが出来る

野外調査系の確立を目的とした。

2.1.2.2 実施内容

本特別研究開始前の平成 17 年度までに行われた予備的な野外調査結果に基づいて、(1) 鬼怒川左岸堤防法面 (鬼怒川集団) : 茨城県常総市中妻付近、(2) 糸繰川左岸河川敷 (糸繰川集団) : 茨城県下妻市堀籠付近、(3) 利根川右岸堤防法面 (木下集団) : 千葉県印西市木下付近、の 3 箇所の群落に調査方形区を設置した。それぞれの群落に永久方形区を設定し、方形区内に出現する全開花個体を識別し、外部形態に基づく種の同定、個体サイズの指標として根元直径と主軸の植物高を現地で記録した。また、各個体からは DNA 抽出のための試料として生葉を採取した。採取した生葉は採取後数日以内もしくは

凍結乾燥後、PBS バッファー (137 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 中で破碎処理後、DNA 精製用の濾紙キット FTA マイクロカード (Whatman, Maidstone, Kent, UK) に懸濁液を添付し、遺伝解析用の DNA サンプルとした。夏期の果実成熟後に、各個体から果実の採取を行った。果実は実験室において風乾した後、種子を取り出し、プラスチックチューブに入れて乾燥状態で保管した。同一の永久方形区で 3 年間にわたって継続調査し、種組成の変化を追跡した。各集団の概況及び結果は以下の通りである。

(1) の鬼怒川集団は、カラシナと在来アブラナが同所的に生育している集団である (図 1-2-1)。

本研究に先立ち、常総市中妻付近の左岸堤防法面の群落内に 5 × 12m の永久方形区を設置した (図 1-2-2)。

本研究の実施期間中、2006 年度は 729 個体 (在来アブラナ 369 個体、カラシナ 360 個体)、2007 年度は 235 個体 (在来アブラナ 129 個体、カラシナ 106 個体)、2008 年度は 46 個体 (在来アブラナ 18 個体、カラシナ 28 個体) が確認された。2006 年度には 177 個体から成熟した果実の採取を行うことができたが、次年度以降は国土交通省による法面の草刈りが果実の成熟前に行われたことにより、果実の採集を行うことができなかった。さらにこれらの刈り取りの効果によるものなのか原因は不明であるが、群落を構成する個体数は年々減少しており、方形区内の個体も 3 年間減少を続けた。したがってこの集団では、当初、次段階の解析計画とした「種子の遺伝子型を分析することによる雑種性の解析」を断念し、繁殖個体の遺伝的組成を複数年にわたって追跡する「遺伝子型の空間分布の時間的推移の解析」へと方針を変更した。したがって、2007 年度および 2008 年度は春期の調査のみで、方形区内の個体分布と種組成、個体サイズ、遺伝解析用試料の採取を行った。

(2) の糸繰川集団もカラシナと在来アブラナが同所的に生育している集団である。本研究に先立ち、下妻市堀籠付近の左岸河川敷の群落内に 4 × 4.5m の永久方形区を設置した (図 1-2-3)。

本研究の実施期間中、2006 年度は 199 個体 (在来アブラナ 104 個体、カラシナ 95 個体)、2007 年度は 133 個体 (在来アブラナ 47 個体、カラシナ 86 個体)、2008 年度は 102 個体 (在来アブラナ 57 個体、カラシナ 45 個体) が確認された。2008 年度には方形区内のアブラナ類の個体数が大きく減少したことから、前年度までの方形区を包含する形

鬼怒川堤防法面の概要 (常総市中妻付近)

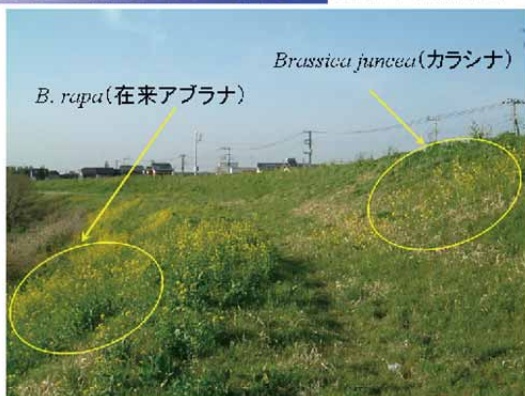


図 1-2-1 鬼怒川堤防の法面に広がるアブラナ類の群落

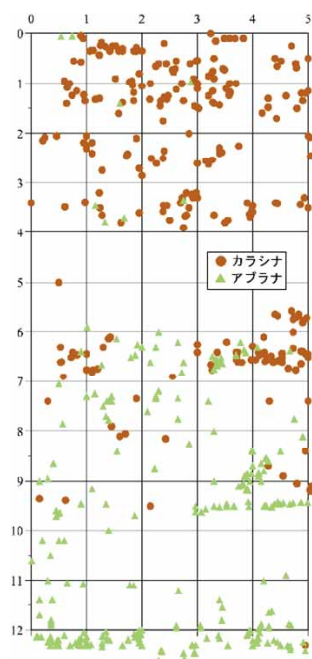


図 1-2-2 鬼怒川堤防の個体群に設置した 5 × 12m の調査方形区に生育するアブラナ類の空間分布 (2006 年度の分布)。この地点では在来アブラナ (*Brassica rapa*) とカラシナ (*B. juncea*) が同所的に生育している。

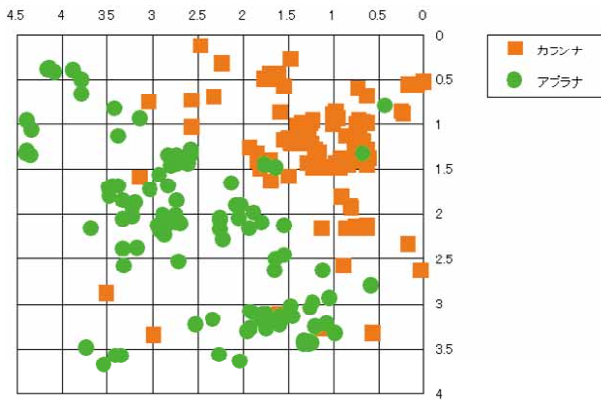


図1-2-3 糸線川河川敷の群落に設置した4×4.5mの調査方形区に生育するアブラナ類の空間分布
この地点では在来アブラナ (*Brassica rapa*) とカラシナ (*B. juncea*) が同所的に生育している (2006年度の分布)

で方形区を10×7.5mに拡張した。2008年度には、群落内に多数のオオオナモミ (*Xanthium canadense*) が侵入しており、前年度までとは異なる植生が観察された。しかし、オオオナモミの侵入がアブラナ類の個体数減少と関連があるのかは不明である。この集団では2008年度に、フローサイトメトリーを用いた核DNA量の定量による個体の核相分析も実施した。DNA精製用に加えて、フローサイトメトリー用にも生葉を採取した。採取した生葉の半分は、PBSバッファー (137 mM NaCl, 8.10 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 中で破碎処理後、DNA精製用の濾紙キットFTAマイクロカード (Whatman, Maidstone, Kent, UK) に懸濁液を添付し、遺伝解析用のDNAサンプルとした。残りの半分は採取後数日以内にフローサイトメトリーによる解析に供与した。核相の解析は、約5mm四方の生葉片を蛍光染色バッファー (1% Triton X-100, 140 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM Na₂SO₃, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 25 µg/mL PI, 40 mg/mL PUP-40, 0.1 mg/mL RNase) 中でカミソリを用いて破碎し、Becton Dickinson社製フローサイトメーターFACSCalibur4Aによって核DNA量を定量した。図1-2-4に核DNA量の定量結果の一部を示す。

個体 #254-*r* は外部形態が在来アブラナ型を示し、核DNA量を示すピークの位置もアブラナ標準品種のそれとほぼ同じ位置に出ている。これに対して、#39-*r* や #232-*j* は中間的な位置にDNA量ピークが現れた例である。ここで興味深いのは、個体番号の後の「*r*」は外部形態が在来アブラナ型であることを、「*j*」はカラシナ型であることを示している。仮に、中間的なピークを示す

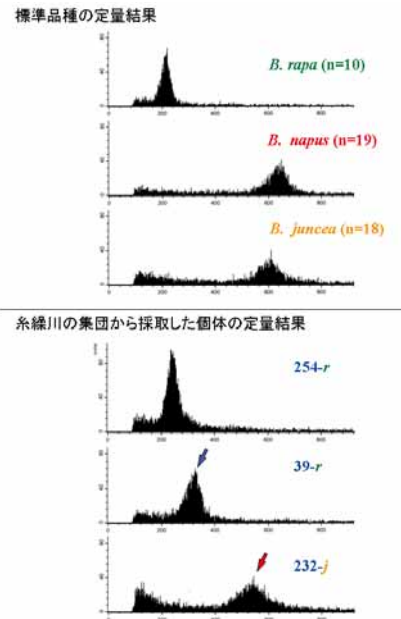


図1-2-4 糸線川集団から採取した試料の核DNA量の定量結果の例

#39-*r*や#232-*j*が交雑起源の個体である場合、両親種の遺伝子流動の方向 (どちらの種が花粉親 (オス) で、どちらが花粉受容親 (メス) であるのか) によって雑種個体の染色体構成が異なる事を示しているのかもしれない。または、既に何世代にもわたって交雑が繰り返され、遺伝子浸透が起こっている事を示している可能性もある。したがって、仮に交雑が起こった場合に、雑種個体が何世代にわたって自然集団で維持されるのか、集団中に残りやすい特定の染色体部位があるのか、などの情報は、除草剤耐性遺伝子などの組換え遺伝子が一般環境中に拡散した場合を想定した場合、非常に重要な知見となる。今後は、次章 (サブサブテーマ1-3) で述べるような種特異的な分子マーカーを用いて、実際の野外集団における自然交雑率を解析すると共に、マーカーに連鎖した領域が自然集団中で何世代にわたって維持されるのか、特定の遺伝子型の個体が集団中には残りやすいのか、など集団遺伝学的研究をさらに進めていく必要性が明らかになった。

(3) の木下集団は、除草剤耐性形質を保有した遺伝子組換え体を含むセイヨウアブラナとカラシナが隣接して生育していた集団である (図1-2-5)。

本研究の実施に先だって2005年度から方形区 (7×100m) を設置して個体追跡を開始した。鹿島港から京葉地域へと通じる主要国道の一つである、国道356号線沿いに面した堤防法面にカラシナが大群落を形成しており

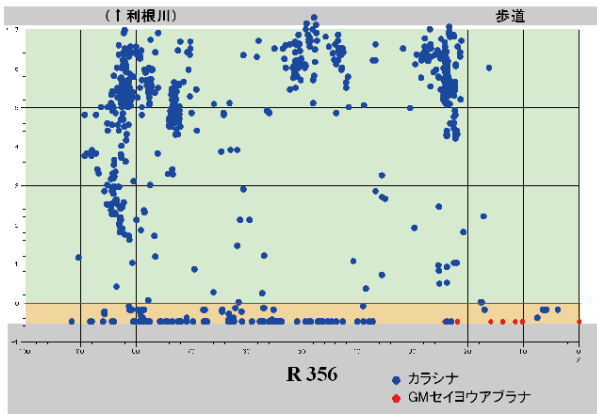


図1-2-5 利根川堤防の群落に設置した7×100mの調査方形区に生育するアブラナ類（2005年度の分布）

この地点ではカラシナ (*B. juncea*) とGMセイヨウアブラナ (*B. napus*) が隣接して生育していた

(2005年度は831個体)、その国道の道路沿いに9個体のセイヨウアブラナが生育していた。これらのセイヨウアブラナは全て除草剤グリホサート耐性の個体であり、これらの個体は、前述の国道51号線と同様に鹿島港で輸入された種子が陸上輸送中にこぼれ落ち、その種子が発芽した実生に由来すると考えられた。しかしこの集団は、ナタネ類の刈り取りが頻繁に行われたことにより、識別した個体の果実が全く採取出来なかったこと、2006年度を最後に道路沿いのGMセイヨウアブラナが、そして2007年以降には法面のカラシナも消滅してしまった。一般の自然環境条件下において、組換え体からの遺伝子流動の解析を実施できる期待があったが、個体群消滅により、残念ながら2007年度以降は個体追跡を中止した。

2.1.2.3 今後の課題

鬼怒川集団でも本研究を実施した3年間で個体数の著しい減少が起きている。海外における個体群動態の研究によると、裏作にセイヨウアブラナを栽培している耕作地や放棄農地などで雑草化しているセイヨウアブラナの個体数が大きく変動することが知られている。国内における逸出個体群の消長に関しては正確なデータがないというのが現状である。今後さらに長期的な計画で個体群の動態を追跡してゆくことも必要と考えられる。

木下集団は個体群が消滅したために個体追跡を中止したが、鬼怒川集団及び糸繰川集団の個体追跡は現在も継続中である。本特別研究の実施期間中は、個体の種同定は外部形態の形質に基づいて行った。しかしながら、2008年度に糸繰川集団で行った核相分析の結果、アブラ

ナ類の自然群落ではかなりの頻度で交雑あるいは遺伝子浸透が起こっている可能性が示唆された。したがって、今後はフローサイトメトリーによる核相分析を併せて実施する必要があると考えられる。一方で、フローサイトメトリーを用いて当代個体の核相分析を行うためには、新鮮な生葉が必要となる。温室等で種子から栽培した試料を利用する場合などとは異なり、当代個体の場合は3月下旬から4月中旬にかけて一斉に野外の個体群で開花が起こるために、春の一時に大量の試料を一度に解析しなければならないという技術的な問題が挙げられる。したがって、長期間安定な状態で保存が可能であるDNAベースでの種同定を可能にする、アブラナ属種特異的な分子マーカーの開発が望まれる。

2.1.3 アブラナ類の浸透性交雑解析に適した種特異的な分子マーカーの開発 (サブサブテーマ1-3)

2.1.3.1 はじめに

前述までのように、アブラナ類では種間交雑が起こることが知られており、遺伝子組換え植物による生物多様性影響を考える上では、それらの種間交雑ポテンシャルを「実際の自然環境条件下で」明らかにすることが重要である。近年、集団遺伝学をはじめ、分子生態学や分子系統地理学などの分野でも、超多型的な分子マーカーとしてマイクロサテライト (Simple Sequence Repeat: SSR) マーカーが盛んに利用されるようになった。SSRマーカーは超多型的であることから、個体識別や詳細な遺伝子流動パターンを解析できる利点がある一方で、大量の検体の遺伝子型解析を短期間で行う場合には、キャピラリー型シーケンサーなどの大型解析機器を必要とすることや、濃縮法などの開発によって従来よりは短縮されたとはいえ、マーカーの開発までにコストと時間がかかる点に難がある。幸い、アブラナ科作物は世界的に重要な農作物の一つであることから、大量のESTデータやSSRマーカーのプライマー配列が公開されている。そこで本研究では、既存のデータベースや文献から、国内の逸出集団を構成するアブラナ類を対象とした種間交雑研究や種同定に適用できるSSRマーカーの選抜を試みた。

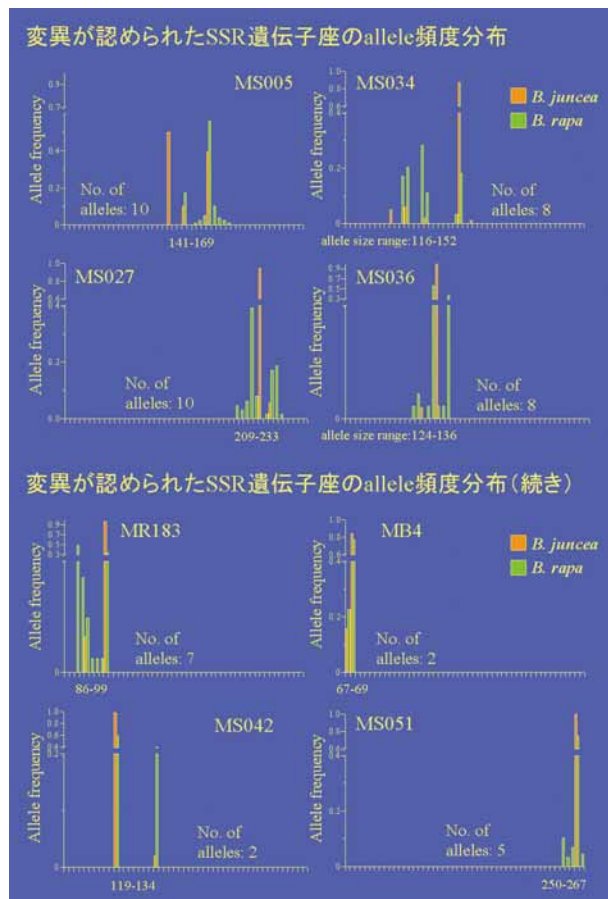
2.1.3.2 アブラナ属マイクロサテライトマーカーの選抜

公開されている *Brassica* SSR ライブラリーから78遺伝子座のプライマー対を選び、PCR増幅条件の検討を行っ

た。その結果、27遺伝子座 (36.4%) で良好なPCR増幅が認められた。これらの遺伝子座から16遺伝子座を選び、実際の鬼怒川集団から採取した個体を対象に遺伝子型の解析を行った。その結果、8遺伝子座 (10.3%) において多型が認められた (表1-3-1)。5遺伝子座では多型が無く、3遺伝子座はフラグメントの波形が複雑で (slipping) 遺伝子型の判読が困難であることから、解析

には不適當であった。多型が認められた8遺伝子座のSSRマーカーの中では、5遺伝子座では観察された対立遺伝子 (allele) 数が多く、比較的多型性が高いことから、集団解析に適していると考えられる (表1-3-1)。それぞれの遺伝子座で認められた対立遺伝子 (allele) の頻度を図1-3-1に示す。鬼怒川集団では、カラシナ (*B. juncea*) と在来アブラナ (*B. rapa*) が同所的に生育している。

図1-3-1 変異が認められたSSRマーカー8遺伝子座の対立遺伝子頻度分布



変異が認められたSSR、8遺伝子座の多型性

鬼怒川の集団から採取した、約90個体の遺伝子型解析の結果

Locus	N	No. of alleles	He
MS005	89	10	0.68
MS034	94	8	0.66
MS027	77	10	0.65
MS036	96	8	0.63
MR183	88	7	0.49
MS042	94	2	0.32
MB4	92	2	0.31
MS051	94	5	0.22
Average		6.5	0.50

観察された対立遺伝子 (allele) 数も多く、 H_e (ヘテロ接合体の期待頻度) の値も比較的高い

→ 集団解析向けのSSR遺伝子座

表1-3-1 変異が認められたSSRマーカー8遺伝子座の多型性

今回スクリーニングを行った8遺伝子座では、2種が共に対立遺伝子を共有して持っている場合が多く、種特異的な対立遺伝子が少なかった。さらに大半の遺伝子座 (MS005, MS036, MR183, MB4, MS042, MS051) では、ある特定の対立遺伝子頻度が大きく、2種共にその対立遺伝子に固定している傾向があった。したがって、今回スクリーニングを行った8遺伝子座のみでは、SSRマーカーによる種同定は困難である。また、野外集団における雑種性の解析には遺伝子座が不足していると考えられる。詳細な遺伝子流動解析や遺伝子型の経年変化を追跡するためには、日本の自然群落で適用可能な、さらに多くのマイクロサテライトマーカーを選抜する必要がある。

2.1.3.3 DNAアレイを用いたアブラナ属植物の種特異的マーカーの開発

1) はじめに

前述のように、既存の公開情報に基づいて、アブラナ類で利用可能なSSRマーカーの選抜を試みているが、種特異的な対立遺伝子を持つマーカーを効率よく捕捉できるまでには至っていない。公開されているSSRデータには、プライマー配列の他、PCR条件や若干の多型性の指標も示されているものの、実際に自分が立てた実験計画に適用できるかどうかは、プライマーを合成し、実際に自分の試料で試してみるまで分からず、試行錯誤的な要素がかなり強いのが現状である。遺伝子組換えセイヨウアブラナによる生物多様性影響を明らかにするためには、野外集団における交雑の実態を明らかにすることがまず重要であると考えられる。そこで、日本の逸出自然集団を構成するアブラナ類3種を対象に、種特異的な分子マーカーを、「大量にかつ迅速に開発する」という視点から、種間交雑解析を可能にする、アブラナ属3種の種特異的分子マーカーの開発を試みた。

アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナではcDNAアレイが既に製品化され、大量の遺伝子発現を一

度に解析できる環境が整っている。したがって、同じアブラナ科であるアブラナ属植物では、シロイヌナズナの研究で蓄積されている膨大な遺伝子情報を利用できる可能性が高いことから、シロイヌナズナのcDNAアレイを用いて、アブラナ属3種（アブラナ、セイヨウアブラナ、カラシナ）を対象とした種特異的な分子マーカーの開発を行った。本来、cDNAアレイ法は遺伝子の発現解析を目的に利用される方法である。したがって、従来までのSSRマーカーなどが一般的には中立遺伝子マーカーとされている一方で、本方法によって開発されるマーカーは、機能性遺伝子の変異を検出できるマーカーである可能性がある点が大きな特徴である。

2) 研究の実施内容

(1) cDNAアレイ法による発現遺伝子の解析

解析対象の3種からmRNAを抽出し、AFFYMETRIX社製 Arabidopsis ATH1 GeneChipの受託解析を利用して、それぞれの種において遺伝子の発現解析を行った。

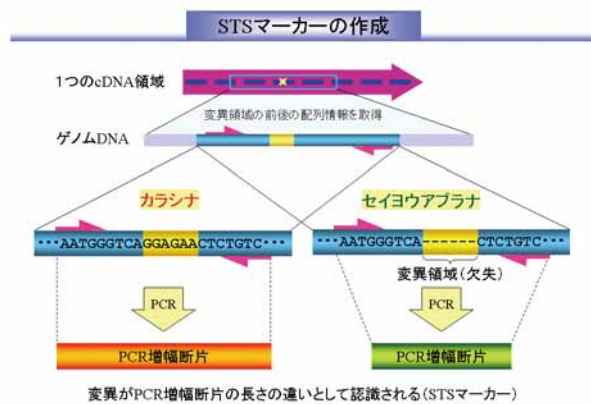


図1-3-2 STSマーカーの設計例

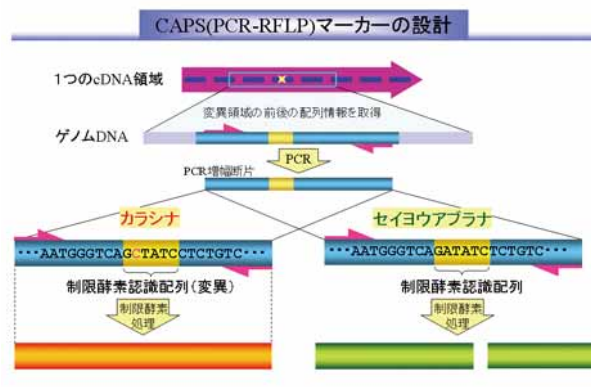


図1-3-3 CAPS (PCR-RFLP) マーカーの設計例

(2) 種間変異領域の探索

アレイ解析から得られた蛍光シグナル強度の分散を基に、ゲノム中の遺伝子領域に種間で変異が生じている可能性がある遺伝子の候補を抽出した。

(3) アブラナ属3種における塩基配列の決定：アレイ解析によって抽出した遺伝子領域を増幅するPCRプライマーを、シロイヌナズナの塩基配列を基に設計した。次に、予想される分子量で増幅が認められたPCR産物をクローニングし、種間で変異が生じていると予想される遺伝子領域の塩基配列を3種それぞれで決定した。

(4) 種特異的な分子マーカーの設計：決定した塩基配列を3種間で比較して種間変異を同定し、ゲノム中のその変異領域を増幅するPCRプライマーを設計した。さらに、種間変異を検出する手法として、PCR増幅断片の長さ(STSマーカー：図1-3-2)、制限酵素切断片長多型(CAPSマーカー：図1-3-3)の有効性を検証した。

3) 結果

在来アブラナ特異的なCAPSマーカー1遺伝子座、カラシナ特異的なCAPSマーカー1遺伝子座とSTSマーカー2遺伝子座の開発に成功した(図1-3-4、図1-3-5および図1-3-6)。アレイ解析の結果に基づいて、遺伝子領域に種間で変異が生じていると予想される領域を予めスクリーニングした上でマーカー化の検討を行ったことにより、高い確率で種間変異を同定することができ、マーカー開発における効率性に展望が開けた。今回は、マーカー化

CAPS (PCR-RFLPs) マーカーの期待パターン (L/247718int)

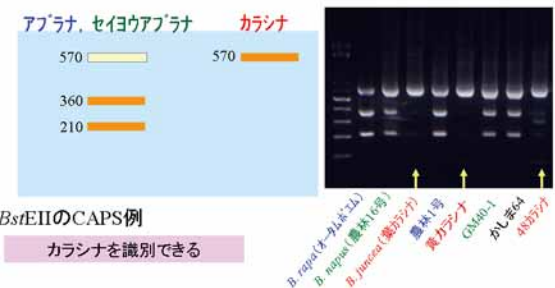


図1-3-4 カラシナ特異的なCAPSマーカーの例
カラシナでは制限酵素認識部位において変異が起きているため制限酵素認識部位を持たず、制限酵素によってPCR増幅フラグメントが切断されない

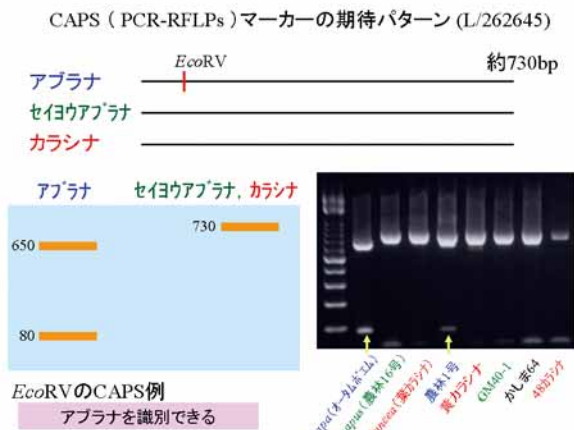


図1-3-5 在来アブラナ特異的CAPSマーカーの例
アブラナのみが制限酵素認識部位を持つため、制限酵素によってアブラナのPCR増幅フラグメントのみが切断される

STSマーカーの期待パターンとPCR泳動像 (L/247718)

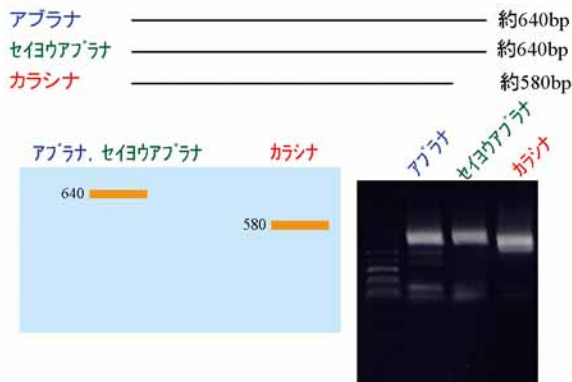


図1-3-6 カラシナ特異的STSマーカーの例
カラシナではプライマーに挟まれた領域に欠失が存在するために、PCR増幅フラグメントのサイズの違いとして種間変異を認識できる

を検討した9遺伝子座の約半分でマーカー化の目処が付いた。SSRマーカーでは、苦勞して開発した遺伝子座でも、実際に遺伝子型解析を行ってみると全く変異がない場合がある。したがって、マーカー化に先立って変異部位を同定する効果は大きかったと考えられる。今後検討すべき事項としては、今回開発したマーカーが対象としたアブラナ属3種以外のアブラナ科植物でどの程度の汎用性を持つのかを明らかにする。また、種間変異が生じていると考えられる遺伝子領域の候補を選抜する方法にも検討の余地があると考えている。今後は、両親種由来の対立遺伝子を雑種個体が安定してヘテロに持つマーカーを選抜する予定である。

4) 今後の展望

本研究によって開発した分子マーカーは、種間交雑ポテンシャルを明らかにする研究において、集団中の雑種形成率を直接推定でき、PCRベースの簡便な実験系で、野外から採取した多数の検体を効率的に処理できることが見込まれる。今後の展望として、適応度に関連した遺伝子(例えば、成長速度や種子生産量など)を指標としたマーカーを開発することで、適応性関連遺伝子に関する集団遺伝学的な研究へと発展が見込まれる。野外集団における適応性関連遺伝子の挙動に関する知見は、組換え体の拡散に伴う環境リスク評価においても重要な情報である(例えば、除草剤耐性遺伝子が適応性関連遺伝子の近傍に導入された場合には、集団中に残りやすい等)。したがって、適応性関連遺伝子に関する集団遺伝学的な研究(Genetic demography等)は、「遺伝子組換え体による生物多様性影響評価に関する研究」の次のステップとして、重要な課題になるものと考えられる。

2.1.4 遺伝子組換えセイヨウアブラナの挙動調査用組換え体の開発 (サブサブテーマ1-4)

2.1.4.1 はじめに

遺伝子組換え(GM)作物とは、商業的に栽培される植物(作物)に遺伝子操作を行い、外来の遺伝子を導入することにより、新たな形質を付与させた作物である。GM作物の商用栽培は1996年にアメリカでGMダイズの栽培が始められて以降、全世界的にその栽培面積を増やしている。2008年現在、全世界の作付け面積のうちダイズでは約70%、トウモロコシでは24%、ワタでは46%、セイヨウアブラナでは20%がGM作物である⁽¹⁾。我が国においてGM作物は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」により解放系における栽培が認可されている。今後この技術が進展し、いわゆる第三世代の遺伝子組換え植物(環境耐性・浄化能を付与した植物)が利用出来るようになると、耕作地以外の管理されていない場所でGM植物を利用される可能性がある。このような環境でGM植物を利用した場合には、組換え体そのものが持つリスクを評価するだけでは不十分であり、生態系におけるGM植物の挙動を調査する必要が生じる。

既に問題になっている例としては、GMセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)のこぼれ落ち問題がある。日本国内では、現在のところGMセイヨウアブラナの商業的な

栽培は行われておらず、国内需要の大部分は海外からの輸入に依存している。一方、輸入されたセイヨウアブラナの種子（ナタネ）が輸送中にこぼれ落ちて発芽し、道路沿いにセイヨウアブラナが生育している事例が報告されている。本特別研究（サブテーマ1）では、このような輸入種子のこぼれ落ちに起因して、GMセイヨウアブラナが一般環境中である道路沿いに生育していないかを明らかにする目的で、国道51号線沿いを対象にセイヨウアブラナの分布状況及びそこに含まれるGMセイヨウアブラナの有無を調査している。

このようにGM植物の環境中での挙動調査が行われているが、この研究を遂行する際の問題点として、採取した植物が遺伝子組換え体であることを判別するのに莫大な労力がかかることが挙げられる。一方でこのような労力を軽減するための研究も行われている。すなわち、遺伝子組換え植物を可視化して非遺伝子組換え植物との判別を容易にする方法である。本研究に先立ち我々のグループでは、1) 葉の形態異常を引き起こす遺伝子⁽²⁾、2) 体色変化を引き起こす遺伝子を、モデル植物であるシロイヌナズナに導入し、遺伝子組換え植物の判別のしやすさと、遺伝子導入による生育特性への影響を調べた。その結果、組み換え遺伝子の拡散を簡便に見るための新しいマーカー遺伝子としてはオワンクラゲ由来のGFP遺伝子が優れている事が明らかになった⁽³⁾。そこで本研究ではGFP遺伝子のマーカー遺伝子としての有用性を確かめる目的で、この遺伝子を実際にGM作物として栽培されているセイヨウアブラナに導入し、本遺伝子がセイヨウアブラナにおけるマーカー遺伝子としての使用が可能かどうか、また次世代に安定して遺伝するのかについて確認すると共に、野生型植物との交雑率についての検証を行った。

2.1.4.2 GFP遺伝子が導入されたセイヨウアブラナの作製

遺伝子導入用の植物材料としてセイヨウアブラナ (*Brassica napus*) 農林16号の種子を表面滅菌後、1/2MS培地において無菌状態で4日間栽培した。4日後、植物の胚軸を1cmに切り取り、MMS-A培地上で25℃、暗所で培養した。1日後、培養していた胚軸を培養したアグロバクテリア溶液に1時間浸した。1時間後、滅菌したキムタオル上に胚軸を移し、5～30分挟んで余分なアグロ液を除いた。胚軸を元の培地（MMS-A）に戻し、25℃、

暗所で2日間培養した。2日後、胚軸をシャーレに入れた20mlのMMS溶液 + 20 mg/L セフトキシムにいれ30～45分放置した。その後、滅菌したキムタオル上に胚軸を移し、5～30分挟んで余分なMMS溶液を除いた。胚軸をMMS-B培地上に移し、明所で11日間培養した。11日後、胚軸をMMS-C培地上に移し替え、胚軸からカルス誘導、シュート形成するまで培養を行った。その際に、3週間毎に胚軸を新しいMMS-C培地上に移し替えた。このような過程を経て約6ヶ月間培養を続けたが、カルスの誘導はされるもののシュート形成は見られなかった（図1-4-1）。

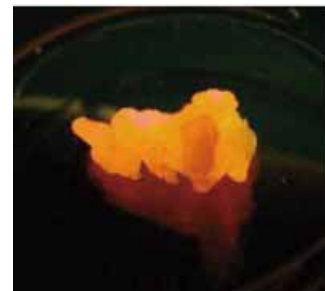


図1-4-1 6週間培養したカルスのGFP蛍光青色光の照射によりGFPの蛍光が見られた

しかしながら、経代培養した複数のカルスに青色光を照射したところ、GFPによる蛍光を観察することが出来た。また、これらのカルスから抽出したゲノムDNAを鋳型としてGFP遺伝子の導入を確認するためのPCRを行ったところ、導入遺伝子由来のPCR産物の増幅を確認することが出来た。以上のことから少なくともGFP遺伝子が導入されたセイヨウアブラナのカルスが得られていることがわかった。しかしながら、本研究の遂行のためにはGFP遺伝子が導入されたセイヨウアブラナの植物体が必要なため、米国テネシー大学のNeal Stewart教授の研究室で作製されたGFP遺伝子の導入されたセイヨウアブラナ（以下GFPセイヨウアブラナ）を入手した⁽⁴⁾。彼らの作製した遺伝子組換えセイヨウアブラナはWestarという品種が育種母体となっているが、この品種が手に入らなかったため、以下の実験では農林16号を非遺伝子組換えセイヨウアブラナとして用いる。

2.1.4.3 GFPセイヨウアブラナの花粉稔性

本研究の最終的な目的は野外で栽培した遺伝子組換え植物の環境影響評価手法の開発である。その際、問題となるのは組換え体の作り出す花粉を媒介とした野生の近

縁種への組換え遺伝子の拡散である。そこで入手した GFP セイヨウアブラナの花粉稔性を調べた。GFP セイヨウアブラナ及び農林 16 号各 5 個体を国立環境研究所の遺伝子組換え温室において花が咲くまでに約 3 ヶ月栽培した。これらの花から花粉を採取し、1%酢酸カーミンで1時間染色を行った。染色後、光学顕微鏡の視野下にある200~300個の花粉の観察を行った。その際に、酢酸カーミンで染色されているものを稔性があると判定し、全花粉に占める稔性花粉の割合を算出した。その結果、農林16号では92.6±1.2%の花粉が、GFPセイヨウアブラナでは92.9±1.4%の花粉が酢酸カーミンにより染色されていた。GFPセイヨウアブラナの花粉の稔性割合は農林16号との間に有為な違いが見出されなかったことから、GFP遺伝子の導入による花粉稔性への影響は無いと考えられた。以上のことから、本研究で用いるGFPセイヨウアブラナを用いて遺伝子組換えセイヨウアブラナの自然交雑割合の検証を行うことに支障がないことを示唆している。

2.1.4.4 GFP 遺伝子導入セイヨウアブラナと野生型との F1, F2 雑種の作製

GFP 遺伝子が次世代へ安定的に遺伝することが出来るかどうかを検証するために、GFP セイヨウアブラナと農林 16 号を人工的に掛け合わせて F1 雑種更に F2 雑種を作製し、雑種後代への GFP 遺伝子の遺伝様式を調べた。まず入手した GFP セイヨウアブラナにおいてきちんと GFP 遺伝子の発現が見られるのか、また GFP 蛍光が観察できるのかについて検証を行った。セイヨウアブラナの種子を水道水で洗浄後、濾紙上で発芽させ、播種後1週間後に土に移植した。移植後10日間栽培した植物の葉から全 RNA を抽出した。採取した植物試料 100 mg から RNeasy Plant mini kit (Qiagen) を用いて行った。こうして単離した RNA を用いて、GFP 遺伝子の発現の有無を RT-PCR により確認した。その結果、GFP セイヨウアブラナでは GFP 遺伝子の発現が確認できたが、野生型セイヨウアブラナ、カラシナ、アブラナではこの遺伝子の発現が確認できなかった (図1-4-2)。

GFP 蛍光の観察はシロイヌナズナでの研究結果から根において観察すると視認性がよいことが明らかになってきたため、根を用いて観察を行った。全 RNA を抽出した植物と同様にセイヨウアブラナの種子を水道水で洗浄後、濾紙上で発芽させ、そのまま濾紙上で10日間栽培し

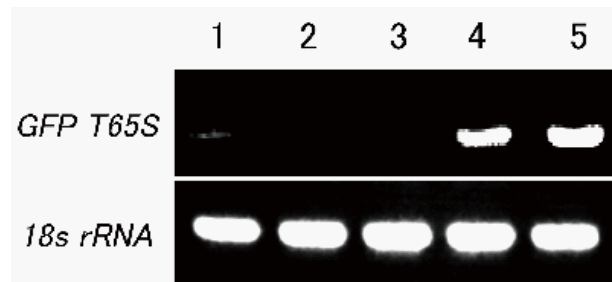


図1-4-2 GFP 遺伝子の発現

1. アブラナ, 2. カラシナ, 3. 野生型セイヨウアブラナ, 4. GFPセイヨウアブラナ1, 5. GFPセイヨウアブラナ2におけるGFP遺伝子の発現 (上) と 18S rRNA 遺伝子の発現。

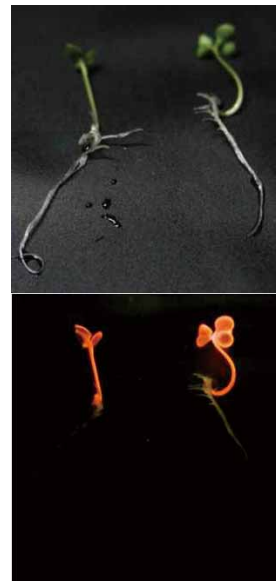


図1-4-3 GFP セイヨウアブラナ実生における GFP 蛍光白色光下 (写真上) 及び青色光下 (写真右) に置いた野生型セイヨウアブラナ (左) 及び GFP セイヨウアブラナ (右) GFP 蛍光が根でみられた。

たものを観察に用いた。その結果、青色光下では野生型セイヨウアブラナ及び GFP セイヨウアブラナの子葉において、葉緑体由来する赤色の蛍光が観察された。

一方、根においては GFP セイヨウアブラナでは GFP タンパク由来する緑色の蛍光が観察されたが、野生型セイヨウアブラナではそのような蛍光は観察できなかった (図1-4-3)。

以上のことから入手した GFP セイヨウアブラナでは GFP 遺伝子の発現が活発に起こっており、GFP タンパクの蓄積が見られることが明らかになった。

そこでこの GFP セイヨウアブラナを用いて野生型セイヨウアブラナ農林16号との掛け合わせ試験を行った。掛け合わせは農林16号を雌親、GFP セイヨウアブラナを雄親として人工交配により行った。その結果、全20回の掛け合わせのうち、独立した7つの花で鞘が形成された。これにより得られた種子を水道水で洗浄後、濾紙上で発芽させ、播種後1週間後に土に移植した。GFP セイヨウアブラナとの掛け合わせが成功しているかどうかについ

て検証を行うために F1 雑種における *GFP* 遺伝子の有無を PCR により確認した。ゲノム DNA は移植後 2 週間栽培した植物の葉 100mg から DNeasy Plant mini kit (Qiagen) を用いて抽出を行った。また対照区として 7 個体の農林 16 号からも同様な方法でゲノム DNA を単離した。さらに PCR 時にはプライマーがしっかりと機能していることを示すため、遺伝子導入に用いたコンストラクトも同時に PCR に供しポジティブコントロールとした。その結果、農林 16 号と GFP セイヨウアブラナとの間にできた F1 雑種では、導入に用いたプラスミドと同じ位置にバンドを確認することが出来た (図 1-4-4)。

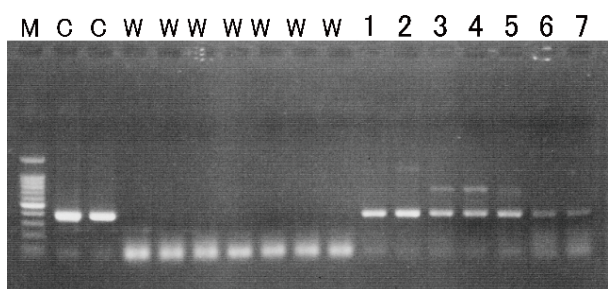


図1-4-4 F1 雑種における *GFP* 遺伝子の検出
M; 100 bp マーカー, C; 導入したプラスミド,
W; 野生型セイヨウアブラナ, 1-7; F1 雑種

更に得られたバンドを回収し塩基配列を決定したところ確かにこのバンドは *GFP* 遺伝子由来であることが確認できた。次にこの遺伝子が次世代に安定的に遺伝するかどうかについて検証を行うために、F2 世代における *GFP* 遺伝子の検出を試みた。F2 の種子は、図 1-4-4 で *GFP* 遺伝子の有無を調べた F1 雑種のうち No. 1 の自殖後代を使用した。F2 種子 24 個を F1 と同様に播種し、ゲノム DNA も同様に単離し、PCR により *GFP* 遺伝子の有無を確認した。その結果、解析を行った 24 個体のうち 18 個体で *GFP* 遺伝子由来するバンドの増幅を確認することが出来た (図 1-4-5)。人工的な掛け合わせにより作製された F2 雑種には *GFP* 遺伝子がメンデルの法則に従って遺伝



図1-4-5 F2 雑種における *GFP* 遺伝子の検出
図 1-4-4 の F1 雑種のうち 1 番の植物体から得られた自殖後代 24 個体を用いて *GFP* 遺伝子の検出を行い、電気泳動を行った。両端には λ /HindIII 分子量マーカーをアプライしている。

することが予測されることから、75%の F2 植物が *GFP* 遺伝子を持つことが予測される (25%が *GFP* 遺伝子をホモに、50%が *GFP* 遺伝子をヘテロに持つ)。従って、24 個体の F2 雑種のうち 18 個体が *GFP* 遺伝子を持つという結果はこの遺伝子がメンデルの法則に従って安定的に遺伝することを示している。また、PCR により *GFP* 遺伝子を持つ事が明らかになった個体では、図 1-4-3 で見られたような根における明確な *GFP* 蛍光を確認することが出来た。

2.1.4.5 GFP セイヨウアブラナを用いた交雑率の検証

上述したように本研究により GFP セイヨウアブラナは、セイヨウアブラナにおける GM 遺伝子の野生型セイヨウアブラナ拡散検定に用いることが出来ることが示唆された。そこで、密閉温室にて GFP セイヨウアブラナから野生型セイヨウアブラナへの交雑率を GFP 蛍光という形質により調べる事ができるかどうかについて検証を行った。検証に用いた植物は温室にて 1 ヶ月栽培したもののの中から生育の良いものを選抜し、1 個体ずつポットに移植した。ポットに移植後、交雑率の検証のために植物を図 1-4-6 で示すように配置した。中央に GFP セイヨウアブラナを 8 個体配置し、それから 8 方向に 0.5m 離れた場所に 8 個体の野生型セイヨウアブラナを配置した (同心円 1)。更に中心から 1 m 離れた場所 (同心円 2) と

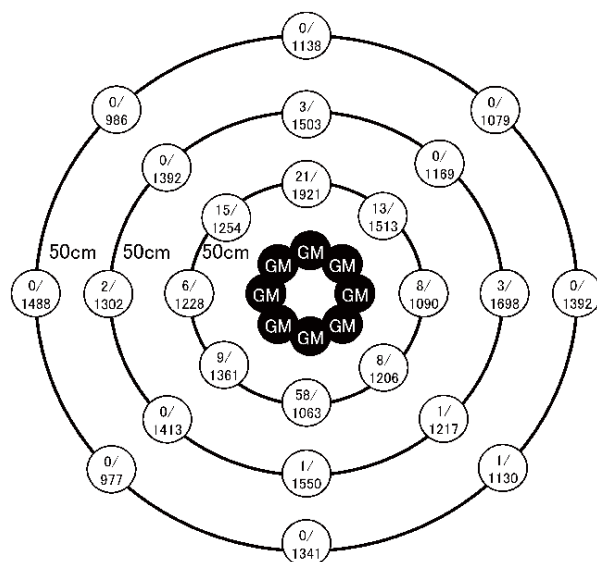


図1-4-6 GFP セイヨウアブラナを用いた交雑率の検証
GFP セイヨウアブラナ (白抜き丸) から 0.5m, 1 m, 1.5m 離して配置した野生型セイヨウアブラナ (白丸) への *GFP* 遺伝子の導入割合を調べた。白丸の中の数字は、分母が各個体で結実した全種指数、分母がそのうち *GFP* 形質を示した個体数を示す。

1.5m離れた場所（同心円3）に8個体ずつ野生型セイヨウアブラナを配置した。このように配置した後、すべての野生型セイヨウアブラナは結実が見られるまで栽培を行った。この際、GFPセイヨウアブラナはその開花時期が終わった後に処分した。尚、GFPセイヨウアブラナ及び野生型セイヨウアブラナの正確な開花時期は調べていないが、特に大きな差を見て取る事は出来なかった。このような条件で採取した野生型セイヨウアブラナ各個体に結実した全種子数を数え、更にそれらを全部播種し、図1-4-3で行った方法により根のGFP蛍光を発する実生数を同定した。その結果、同心円1上（GFPナタネから0.5m離れた場所）では6-58個体の、同心円2上（GFPナタネから1m離れた場所）では0-3個体の、同心円3上（GFPナタネから1.5m離れた場所）では0-1個体のGFPナタネを検出することが出来た（図1-4-6）。

これらの結果から算出された交雑率は、同心円1上では0.5-5.5%、同心円2上では0-0.2%、同心円3上では0-0.1%であった。さらに各同心円上における、平均GFP実生数・平均全個体数・平均交雑率を計算した結果、同心円1上ではそれぞれ17個体・1330個体・1.39%、同心円2上ではそれぞれ1.3個体・1406個体・0.08%、同心円3上ではそれぞれ0.1個体・1191個体・0.01%であった（表1-4-1）。

更にGFPセイヨウアブラナと野生型セイヨウアブラナとの距離と交雑率の数値を用いて、これらの関係性をグラフ化した。その結果、密閉温室におけるGFPセイヨウアブラナと野生型セイヨウアブラナとの交雑率はお互い

表1-4-1 GFPセイヨウアブラナと野生型セイヨウアブラナの交雑率

	平均GFP実生数	平均全個体数	平均交雑率(%)
同心円1 (0.5m)	17.3±17.17	1330.0±278.8	1.39±1.66
同心円2 (1m)	1.3±1.3	1405.5±176.6	0.08±0.08
同心円3 (1.5m)	0.1±0.35	1191.4±192.0	0.01±0.03

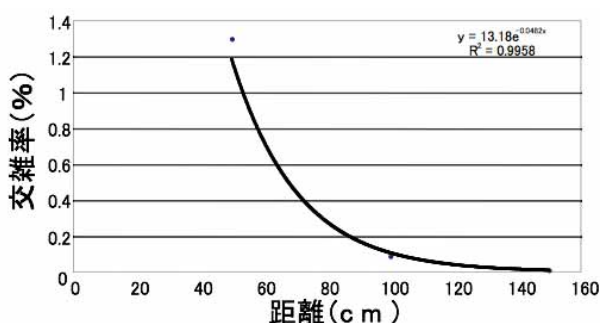


図1-4-7 密閉温室で栽培したセイヨウアブラナの交雑率と距離との関係

の距離が離れるに従って指数関数的に減少することが明らかになった（図1-4-7）。

2.1.4.6 まとめ

本研究ではGFP遺伝子を導入したセイヨウアブラナを用いて、GFP遺伝子及びそれに由来する形質の遺伝的安定性及び本形質を用いた組換え遺伝子の拡散について検証を行った。その結果、GFP遺伝子は安定的に次世代に受け継がれる事・その遺伝子に由来する形質は発芽実生で観察することが出来ることから、GMセイヨウアブラナに由来する導入遺伝子拡散の良いマーカー遺伝子となることが示唆された。同様な結果は既にシロイヌナズナで得られているが⁽³⁾、本研究の結果により、GFP遺伝子が実際に栽培されている作物で組換え遺伝子流動のマーカーとして使えることが明らかになったことの意義は大きいと考えられる。

GFP遺伝子の導入はシロイヌナズナでは植物の生育に大きな影響を与えることがないことは以前に報告しているが、セイヨウアブラナに導入した場合にその生育に影響があるかどうかについては調べていない。Harperらは、3つの異なるGFP遺伝子（*mGFP4*、*mGFP_{er}*及び*sGFP*）を導入したセイヨウアブラナを作製し、それらの示すGFP蛍光量とバイオマス・種子生産量に及ぼす影響について検証した⁽⁴⁾。その結果、*mGFP_{er}*遺伝子（V163AとS175Gの2つの変異を入れ、小胞体に輸送されるGFPをコードする遺伝子⁽⁵⁾）の導入では宿主のセイヨウアブラナの生育に有為な影響が見られなかったと報告している。本研究で導入されたGFP遺伝子は*sGFP*遺伝子であり、Harperら⁽⁴⁾によるとこの遺伝子を導入したセイヨウアブラナのうち、GFP蛍光の強い個体では有為なバイオマスの減少が見られるとの報告がある。したがって、本研究で用いたGFPセイヨウアブラナについて生育に対する影響を調べる必要があるかもしれない。

本研究開始にあたって農林16号を宿主として自前でGFPセイヨウアブラナの作製を目指したが、導入カルの作製まではこぎ着けたものの植物体への再生までには至らなかった。Stewart, Jr.らは、3種類のセイヨウアブラナ（Oscar, UGA 188-20B, Westar）にBt遺伝子の導入を試みた結果、セイヨウアブラナの品種間でカルスから植物体になるものの割合が極端に違う事を示した（Oscarでは25%のカルスが組換え植物となったが、UGA 188-20Bでは3.5%であった）⁽⁶⁾。今回我々の使用した農林16

号とOscar, UGA 188-20B, Westarとの近縁関係は不明であるが、もしかしたら農林16号はUGA 188-20Bと同様にGM セイヨウアブラナを作製するには不向きな品種であった可能性がある。

本研究ではGFPセイヨウアブラナを用いて密室温室における野生型セイヨウアブラナとの交雑率を検証することが出来た。更に本研究による結果から交雑率は植物間の距離の増加と共に指数関数的に減少することが明らかとなった。しかしながら、実際の野外においてセイヨウアブラナと他のアブラナ属の交雑は昆虫によって花粉媒介が行われているため、実際はもっと高い交雑率が出ると思われる。したがって本研究で得られた結果は、野外での交雑において、純粋に花粉媒介昆虫によって引き起こされる交雑を算出するためのバックグラウンドの情報を提供することが出来たと考える。

2.1.4.7 引用文献

- (1) ISAAA (International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications) (2008) ISAAA Report on Global Status of Biotech/GM Crops. <http://www.isaaa.org/>
- (2) Tamaoki, M., Toda, Y., Nakajima, N., Kubo, A., Aono, M. and Saji, H. (2003) Novel marker gene for assessment of behavior of transgenic plants in the field. *Plant Biotech.*, 20, 225-227.
- (3) Tamaoki, M., Imai, H., Takahashi, H., Toda, Y., Niwa, Y., Nakajima, N., Aono, M., Kubo, A. and Saji, H. (2006) Development of visible markers for transgenic plants and their availability for environmental risk assessment. *Z. Naturforsch.* 61c, 377-386.
- (4) Harper, B.K., Mabon, S.A., Leffel, S.M., Halfhill, M.D., Richards, H.A., Moyer, K.A. and Stewart, C.N., Jr. (1999) Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. *Nature Biotech.* 17, 1125-1129.
- (5) Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R. and Haseloff, J. (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6, 1653-1663.
- (6) Stewart, C.N., Jr., Adang, M.J., All, J.N., Raymer, P.L., Ramachandran, S. and Parrott, W.A. (1996) Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIIAc* gene. *Plant Physiol.* 112, 115-120.

2.2 導入昆虫類がもたらす遺伝的攪乱に関する研究 (サブテーマ2)

2.2.1 研究の目的

我が国には農業用生物資材やペット用昆虫など様々な外来昆虫が意図的に導入されている。また農作物や物資などに紛れて多くの昆虫類が非意図的にも侵入している。本研究では外来生物法において議論を呼んでいるマルハナバチ類やクワガタムシ類、および植物防疫法で昨年度検疫対象から外されてしまった有害生物を対象として、日本列島およびアジア全域における系統生物地理情報に基づき地域個体群の進化的重要単位 Evolutionarily Significant Unitを明らかにして、遺伝的固有性の保全策立案における基礎情報とする。

2.2.1.1 花粉媒介昆虫マルハナバチ類の遺伝的多様性および商品化による多様性攪乱リスクに関する研究 (サブサブテーマ2-1)

マルハナバチ類はユーラシアおよび北米に広く分布するハナバチで、全世界で約300種、日本においては6亜属15種が記載されている。マルハナバチ類は振動受粉することから、1980年代よりヨーロッパ産のセイヨウオオマルハナバチ *Bombus terrestris* (図2-1-1) が農業用花粉媒介昆虫として商品化されて世界中でハウス栽培作物の生産に利用されている。我が国にも1992年よりハウストマトの花粉媒介用に導入が開始され、現在では年間7万コロニーが使用されるに至っている。しかし、本種は競争力も強く、野生化による在来種駆逐などの生態影響が懸念されている。こうした背景から、2006年に本種は外来生物法の特定外来生物に指定された。そこで農林水産省はセイヨウオオマルハナバチの代替技術として在来マルハナバチ利用の推奨を始めている。在来種であれば外来生物法の規制対象外であり、万一、ハウスから逃亡した場合でも処罰を受けることはない。既に在来種のクロマルハナバチ *Bombus ignitus* (図2-1-2) が商品化されており、今後、多くの農家がクロマルハナバチ利用に移行する可能性は高い。しかし、クロマルハナバチの本来の生息域は日本国内でも限られており、特にマルハナトマトの一大生産地である北海道には生息しない。在来種といえども本来の生息域を越えた移送は、セイヨウオオマルハナバチと同じ外来種問題を引き起こす恐れがある。

さらに、近年では隣国の中国においても中国に生息するクロマルハナバチの商品化が進められており、商品コ

ロニーが将来日本にも導入されることが予測される。商品化の進行に伴い、日本列島およびアジア域におけるクロマルハナバチの地域個体群の遺伝子組成が攪乱されることが懸念される。

本研究ではアジア域（中国・韓国・日本）におけるマルハナバチの遺伝的多様性実態を把握するため、マルハナバチ各種の地域個体群サンプルを採集し、DNA分析を行い、得られた情報に基づき系統解析を行い、マルハナバチDNAデータマップを構築する。このデータマップに基づきマルハナバチ類地域個体群のESUを設定する。



図2-1-1 セイヨウオオマルハナバチ

2.2.1.2 アジア地域のクワガタムシの進化的重要単位 (サブサブテーマ2-2)

近年、我が国ではクワガタムシをペット昆虫として飼育することがブームとなっており、クワガタムシやその飼育関連商品の商取引は一大産業へと急成長を遂げた。特に、1999年11月の輸入規制緩和以降、大量の外国産クワガタムシが商品目的で輸入されるようになり、2008年6月時点での輸入許可種は720種類にものぼり、年間輸入個体数は2008年で申請分だけでも9,346,000匹にもなっ

た。しかも、これらの輸入個体のほとんどは「飼育」目的で販売されていることを考えると、日本国内に生存する外国産クワガタムシの総数はとてつもない数字になる。

このかつてない大規模な昆虫産業に対して、生態系攪乱の恐れがあるとこれまでも多くの生態学者や昆虫学者は警鐘を鳴らしてきた。輸入当初は一般の飼育者のみならず、多くの昆虫学者ですら、巨大な熱帯産のクワガタムシが日本のような寒冷地で野生化することは困難であろうと推測していたが、実際に熱帯・亜熱帯域に分布するクワガタムシでもその多くはかなり標高の高い地域に生息しており、そうした地域の気候は日本の温暖気候と大きくは変わらない。さらにクワガタムシは幼虫期を朽ち木や土壌の中など比較的安定した環境で過ごすという生活史を持つことから、外国産の種でも日本の野外で越冬することが可能であることが示唆されている。従って外国産の商品個体が野外に逃げ出し、定着・分布拡大の可能性は十分に高く、今後、どのような生態影響が生じるか、リスク評価を行っておく必要がある。

一番に懸念されるのは、生態ニッチェが類似した在来のクワガタムシ種への影響である。生息環境の悪化により日本の在来クワガタムシは既に危機的状況に近づいており、そこへ外国産種が侵入すれば、餌資源をめぐる競合や種間交雑による遺伝的浸食、外来寄生生物の持ち込みなどの生態影響によって在来種の衰退に一層の拍車がかかることは間違いないであろう。我々はこれらの生態影響の中で特に遺伝的浸食のリスクを評価するために、特に輸入量の多いヒラタクワガタ（図2-1-3）について日本産およびアジア産個体群の遺伝的固有性を明らかにするためにDNA変異を調べることにした。



図2-1-2 クロマルハナバチ



図2-1-3 ヒラタクワガタ *Dorcus titanus*

2.2.1.3 植物寄生性外来ダニの侵入実態および遺伝的攪乱に関する研究（サブサブテーマ2-3）

輸入大国である我が国は様々な農作物や商品花卉類を輸入しており、植物寄生性害虫類の侵入に対して植物防疫法により検疫が行われている。しかし、近年の国際貿易自由化の流れの中で、こうした植物検疫の規制緩和が進められている。植物寄生性ダニの1種ナミハダニ（図2-1-4）は世界的な重要害虫であり、我が国においても植物防疫法により厳しく輸入規制が行われてきたが、2005年WTOの裁定によりコスモポリタンである本種は日本にも生息する種であることから、外国産ナミハダニを植物防疫の検疫対象から外すことが決定された。外来生物法により生態影響をもたらすとされる外来種の規制が進められる一方で、害虫類が国際通商自由化の中で規制対象から外されるという矛盾を我が国は抱えている。本種については植物防疫で規制対象から外れた時点でその侵入問題は農林水産省の所轄を離れたこととなり、環境省・外来生物法による調査・再検討を行うしかない。

本研究ではナミハダニを対象として、害虫類にも遺伝的多様性が存在すること、移送によりこの多様性を攪乱することによるリスクを明らかにすることを旨とする。世界各地よりナミハダニ地域個体群を採集し、DNA分析を行い、生物系統地理情報を整備する。同時に各個体群の薬剤に対する感受性を調査し、地域別の抵抗性形質比較を行う。日本国内における遺伝的浸食状況を明らかにして、薬剤抵抗性発達状況と照らし合わせる。以上の調査により、ナミハダニの世界的ESUを明らかにするとともに、我が国における外国産ナミハダニの侵入および遺伝的浸食による抵抗性拡大リスクを評価する。



図2-1-4 ナミハダニ *Tetranychus urticae*

2.2.2 研究の方法

2.2.2.1 花粉媒介昆虫マルハナバチ類の遺伝的多様性および商品化による多様性攪乱リスクに関する研究（サブサブテーマ2-1）

1) 材料

本実験には韓国、中国および日本の各地で採集されたクロマルハナバチの雄、ワーカーおよび女王を用いた。日本におけるサンプルは20府県において、2005年、2006年および2007年に採集され、韓国（テグ市）および中国（長春市、北京市）におけるサンプルは2005年、2006年および2007年に採集されたものである。採集したマルハナバチは、遺伝子分析を行うまで-28℃で保管した。

2) DNA分析方法

以下の手順で、クロマルハナバチのミトコンドリアDNAにおけるCytchrome Oxidase Subunit I (CO I) の塩基配列の解析を行なった。

a. クロマルハナバチのDNA抽出

マルハナバチDNAはGoka et al. (2001) の方法に従って抽出した。1.5mlプラスチックチューブに切断したマルハナバチの脚を入れ、抽出バッファーを60μl加えてからペレットミキサーで潰した。抽出バッファーは Tris-HCl (0.1M) 1ml, EDTA (0.5M) 2ml, Nonidet P-40 50μl, NaCl (1M) 100μl, DW2 6.85mlを加えて10ml作製した。すり潰した検体は遠心分離機にかけ、上澄みを40μl回収し200μlチューブに移した。さらにその上澄みに、1% Protense Kを10μl加え、サーマルサイクラーを用いてLysis反応(50℃ 120分, 95℃ 20分)を行なった。Lysis反応終了後のサンプルから上澄み30μlを回収し、1.5mlチューブに移し、TE buffer (pH 8.0) を270μl加え10倍に希釈した。その後攪拌し、PCRのDNAテンプレートとした。

b. PCR増幅

抽出したDNAはPCRによって、mtDNAにおけるCytochrome Oxidase subunit I (CO I) 遺伝子領域の一部をSimon et al. (1994) が開発したUniversal Primerを用いて増幅した。反応終了後は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってPCR産物の増幅を確認した。

c. シークエンス

PCRによって得られたDNA断片の塩基配列はDye

terminator法によって解析した。まず電気泳動で増幅の確認をしたPCR産物を精製した。精製されたPCR産物は、PCRに用いたForwardおよびReverseプライマーを使用してサイクルシーケンス反応を行ない、両方向からのシーケンシングを試みた。塩基配列の決定には、ABI 3730 DNA Analyzer を使用した。シーケンス反応は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit および Big Dye Xterminator を用いて、各反応プロトコルに従った。得られたシーケンス結果は波形データと照らし合わせた上で、テキストデータとして編集し以降の解析に使用した。

d. データ解析

得られた塩基配列は、Clustal W (Thompson et al.,1994) を用いて多重配列を行なった。

COI ハプロタイプ系統樹は、近隣結合法 (Neighbor-Joining, 以下 NJ) および最節約法 (Maximum Parsimony, 以下MP) により作成した。この際、外群としてセイヨウオオマルハナバチの塩基配列情報 (Accession number AY181169) を使用した。また系統樹の信頼性を評価するため、1000回のブーツストラップ反復により各分岐のブーツストラップ値を算出した。

またCO I 領域において検出された、ハプロタイプの塩基配列情報と全体に対する各ハプロタイプの頻度を基に、ハプロタイプネットワーク樹を作成した。

e. 分岐年代の推定

日本列島における CO I ハプロタイプのステップ数から、日本列島と大陸のクロマルハナバチが分断化された時期を推定した。分岐年代の推定にはAndrew (1994) に示されている、カミキリ類 *Tetraopes* spp. (Coleoptera) の塩基置換率による年代推定値を使用した (CO I 領域: Sequence divergence 1.71%あたり, 100,000年)。

2.2.2.2 アジア地域のクワガタムシの進化的重要単位 (サブサブテーマ2-2)

1) 材料

日本列島のヒラタクワガタは、本州、四国、九州、伊豆諸島、五島列島、および南西諸島から合計141個体採集した。また、朝鮮半島、中国、インドシナ半島、スマトラ島、ジャワ島、ボルネオ島、スラウェシ島、フィリピン諸島などスンダランド列島から合計82個体採集した。

2) DNA分析法

a. DNA抽出

上記のクロマルハナバチの DNA 抽出法に準じて行った。

b. PCR増幅

抽出した DNA は PCR によって、mtDNA における Cytochrome Oxidase subunit I (CO I) 遺伝子から COII 遺伝子にかけての領域を Simon et al. (1994) が開発した Universal Primer を用いて増幅した。

c. シークエンス

上記のクロマルハナバチのシーケンス法に準じて行った。

d. データ解析

上記のクロマルハナバチのデータ解析法に準じて行った。ただし、DNA系統樹は、Bayse法によって構築した。

e. 分岐年代の推定

上記のクロマルハナバチの分岐年代の推定方法に準じて行った。

2.2.2.3 植物寄生性外来ダニの侵入実態および遺伝的攪乱に関する研究 (サブサブテーマ2-3)

1) 材料

ナミハダニ個体群は日本全国56地点、海外4地点 (オランダ、フランス、ケニア) より採集した。採集した個体群の寄主植物は木本作物から草本作物、花卉類にいたる様々な種類にわたった。

2) DNA分析法

a. DNA抽出

上記のクロマルハナバチのDNA抽出法に準じて行った。

b. PCR増幅

抽出した DNA は PCR によって、mtDNA における Cytochrome Oxidase subunit I (CO I) 遺伝子領域を Simon et al. (1994) が開発した Universal Primer を用いて増幅した。

c. シークエンス

上記のクロマルハナバチのシークエンス法に準じて行った。

d. データ解析

上記のクロマルハナバチのデータ解析法に準じて行った。

3) 薬剤感受性試験

インゲン葉の葉片を湿らせた脱脂綿に乗せたリーフディスクを準備し、そこにナミハダニ雌成虫を10個体接種した。24時間馴化させた後、リーフディスクを薬液に10秒間浸漬させて、乾燥させてから再び脱脂綿に乗せて、3日間飼育した後、死亡率を測定した。薬剤は新規殺ダニ剤fluacrypyrimの実用薬量150ppmを投与した。1個体群につき3反復の試験を行った。

2.2.3 結果および考察

2.2.3.1 花粉媒介昆虫マルハナバチ類の遺伝的多様性および商品化による多様性攪乱リスクに関する研究 (サブサブテーマ2-1)

クロマルハナバチの全てのサンプルで得られた塩基配列長は1055 bpで、全個体の配列間で挿入および欠失は見られなかった。全てのサンプルから検出されたCO I ハプロタイプの総数は15であり、そのうちハプロタイプF1～F6は韓国と中国においてのみ検出され、ハプロタイプJ1～J9は日本列島でのみ検出された。大陸と日本列島の間で、ハプロタイプのオーバーラップがないことか

ら、クロマルハナバチは、大陸産個体群と日本列島産個体群の間で遺伝的に分化していることが示された。また、日本列島内でも、ハプロタイプの分布には地理的パターンが認められ、地理的な分化が示唆された (図2-3-1)。

次に系統樹解析の結果から、日本列島の個体群は、大陸の個体群から派生していることが示唆された。ハプロタイプネットワーク系統樹においても、日本産個体群は、大陸から移入した個体群から派生して、大陸から分断された遺伝的組成を構成していることが示された (図2-3-2)。

さらにCO I ハプロタイプから算出される、大陸と日本列島間のクロマルハナバチ個体群分岐年代は、約17万年前と推定された。この時期は朝鮮海峽が陸化していた中期更新世中期から中期更新世後期 (~17万年) にあたり、日本における多くの哺乳類が大陸から渡来してきたとされる時期である (増田・阿部 2005)。クロマルハナバチについても、哺乳類や他の生物同様にこの時期に朝鮮海峽を渡来してきた可能性が高い。

以上のようにDNA解析結果は、日本列島におけるクロマルハナバチ個体群は大陸におけるクロマルハナバチ個体群から派生した後、独立した系統として進化してきた歴史が示された。また日本列島内においても、山岳等の地理的障壁によって、個体群の分化が生じていることが示された。これらのことから、クロマルハナバチ個体群にも、アジアレベルおよび日本国内レベルの両方において、遺伝的固有性に基づくESUの設定を検討する必要があると考えられる。

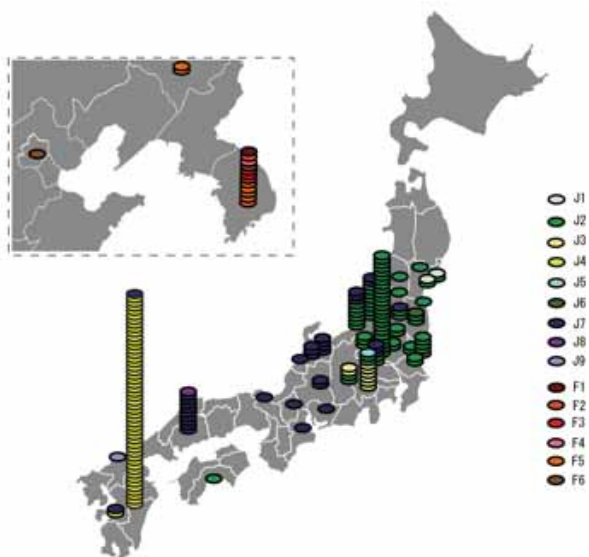


図2-3-1 日本国内におけるクロマルハナバチの mtDNA-CO1ハプロタイプの分布

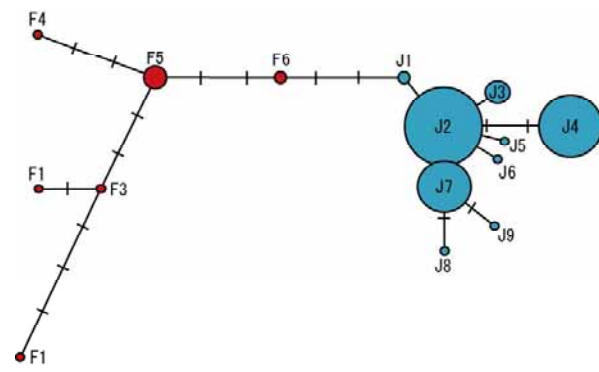


図2-3-2 クロマルハナバチの mtDNA-CO1 遺伝子ハプロタイプネットワーク系統樹 F1～F6が中国・韓国産個体で、J1～J9が日本列島産個体。日本産個体が大陸産個体から派生して分化していることがわかる。

2.2.3.2 アジア地域のクワガタムシの進化的重要単位 (サブサブテーマ2-2)

ヒラタクワガタ全サンプルについて、mtDNA-CO1-CO2領域2,000塩基の配列データが得られた。ハプロタイプ数は100以上にも登り、遺伝的多様性が非常に高いことが示された。まず、日本列島周辺の個体（日本列島、朝鮮半島および中国個体群）のmtDNA塩基配列データから系統樹を構築した結果（図2-3-3）、まず特徴的な点として、日本列島に生息するヒラタクワガタ種群の中では特に大東島にのみ生息するダイトウヒラタクワガタが他のヒラタクワガタと比較して最も古くに分化した系統と考えられた。このことは大東島が他の島よりも古くに孤立し、そこにたどり着いたヒラタクワガタ個体群も長らく隔離された環境で独自の進化を遂げたものと推測される。その他のヒラタクワガタDNA系統は、まず大まかにツシマヒラタクワガタ系統（以下ツシマ系統）とその他の系統に分化する。そして、この二つのグループを構成する、それぞれのクレードの根元に中国産個体が位置している。このことから、まず日本列島の系統の起源は中国にあることが示唆される。ここでツシマ系統と呼んでいる系統群の中にはツシマヒラタクワガタ（対馬に分布）、ゴトウヒラタクワガタ（五島に分布）およびイキヒラタクワガタ（壱岐に分布）という記載亜種の個体が

含まれると同時に朝鮮半島のヒラタクワガタも含まれており、さらに九州の北部や本州の山口県の個体もこの系統群に含まれている。これらツシマ系統群に含まれる地域個体群間の遺伝距離は極めて短いことから、この系統群は比較的最近に朝鮮半島から日本へ進出してきたと推測される。一方、その他の系統群についてもそれぞれ地域ごとにまとまっており、アマミヒラタクワガタ（奄美大島に分布）・タカラヒラタクワガタ（宝島に分布）の北琉球系統群、オキノエラブヒラタクワガタ（沖永良部島）・オキナワヒラタクワガタ（沖縄諸島）・トクノシマヒラタクワガタ（徳之島）の中琉球系統群が順次分化を果たし、続いてサキシマヒラタクワガタ（先島諸島）・台湾産ヒラタクワガタの南琉球系統群とホンドヒラタクワガタ（日本本土に広く分布）・ハチジョウヒラタクワガタ（八丈島）の本土系統群が分化している。

北琉球域から南琉球域にかけての南西諸島のヒラタクワガタにおける系統関係を見る限りでは、この地域にヒラタクワガタが進出してきたのは更新世初期頃（約150～200万年前）に南西諸島が陸橋として大陸とつながっていた時期で、その後の氷河期と間氷期のくり返しによって陸橋の水没・分断と再形成がくり返されるなかで、ヒラタクワガタの大陸からの進出と分断化が波状的に生じたという分化プロセスが類推される。つまり北琉球域、

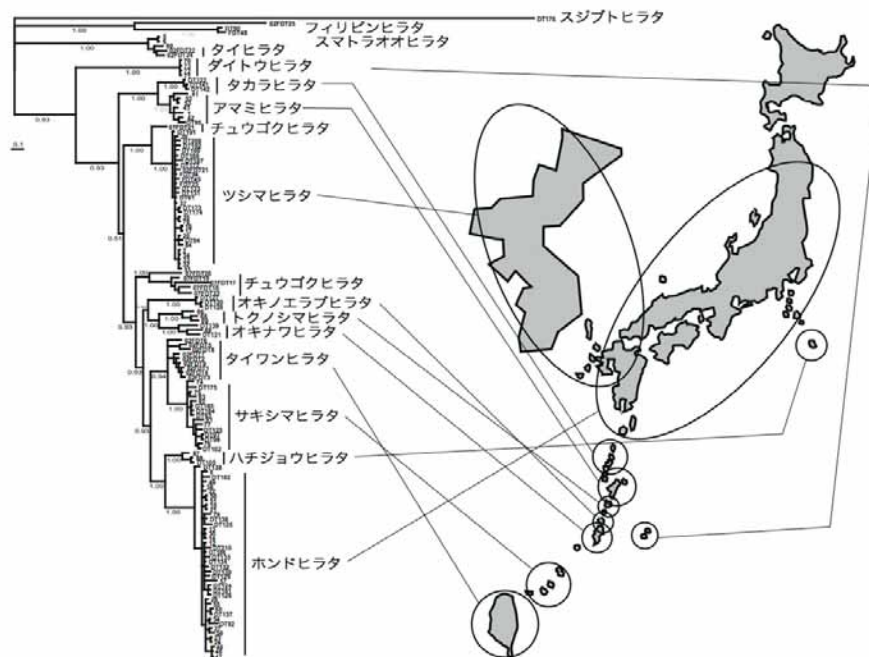


図2-3-3 日本列島および周辺地域に生息するヒラタクワガタ地域系統のmtDNA系統樹

中琉球域、そして南琉球域という順番で島の孤立が起こり、島嶼個体群の遺伝的分化も進んだと考えることができる。一方、本州から九州南部にかけて広く分布するホンドリタクワガタは南西諸島のヒラタクワガタ群の末裔と考えられるが、不思議なのは、地理的に近い北琉球域の系統群よりも南琉球域のサキシマヒラタクワガタ・台湾産ヒラタクワガタに遺伝的には近いということである。サキシマヒラタ・台湾産ヒラタが最後に大陸から分化したと考えた場合、その姉妹群と考えられるホンドリタクワはいったいどのようにして中・北琉球域を飛び越えて本土にたどり着いたのか？今のところ有効な地理学的説明は見つかっていない。このような本土および南西諸島域における個体群の地理的配置と個体群間の遺伝的関係の間にみられる矛盾（隣接個体群が遺伝的に近いという「前提」からのずれ）は他の生物種でも報告されており（太田，2002a），日本列島の陸生生物種の系統分化プロセスを推定する際には、南西諸島の陸橋化というルートのみならず流木などによる漂着や人為分散など様々な分布拡大ルートも考慮に入れると同時に、起源個体群の大陸での分化も検証する必要がある（太田，2002b）。ただ、現在までのデータから日本列島のヒラタクワガタは、中国大陸から朝鮮半島を経由した北方ルートと南西諸島を経由した南方ルートの2つのルートで進出してきたものと推定される。

次にアジア地域全体のヒラタクワガタ地域系統の

DNA系統樹を構築した結果（図2-3-4），スジブトヒラタやヒペリオンヒラタクワガタを外群として、大まかにフィリピン諸島からスダラ列島にいたる南方の島々に分布する南方系統群（パラワン、セレベス、スマトラオオ、ミンダナオオオ、およびダイオウヒラタクワガタ）とアジア大陸に分布する北方系統群（タイ産、台湾産、朝鮮半島産、および日本列島産のヒラタクワガタ）に大別されることがわかった。また、南方の東南アジア地域産のヒラタクワガタ種群についても島ごとに固有の遺伝子組成をもつ集団に分化していることが示された。中国やネパールなどの大陸産個体のデータが不足しているため断定はできないが、世界のヒラタクワガタはかつての氷期にスダラランドと呼ばれる大陸で派生し、北と南の二方向に分布拡大し、南の個体群はその後の海進による島嶼の成立と共に分断され、分化を果たしたと推定される。一方、北の個体群は北進を続け、朝鮮半島経由および南西諸島経由で日本列島にたどり着いたと考えられる。いわば日本のヒラタクワガタは世界のヒラタクワガタの末裔ともいうべき位置にある。

以上の結果から、体サイズや大アゴの形状など地理的変異が豊富なヒラタクワガタ種群の多様性は他の生物種同様、地史的な背景をもって長い進化の時間をかけて形成されたものであることが示された。特に日本列島のヒラタクワガタ個体群は、南方の起源からの長い旅路の果てに完成したものであり、島国独特の固有の遺伝子組成

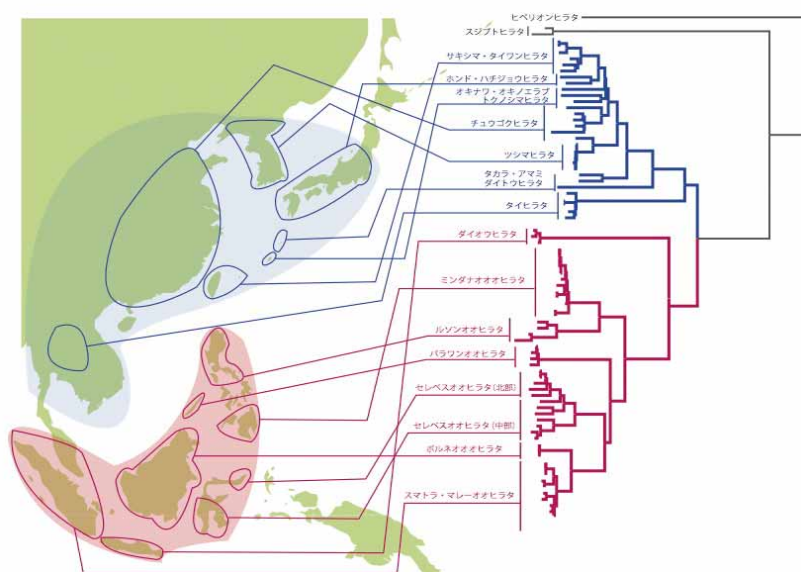


図2-3-4 アジア地域のヒラタクワガタmtDNA系統樹

を持つ貴重な進化の遺産である。この遺伝子の遺産は一度失われればもう二度と戻ることはない。遺伝子プール保全の観点からも商品化にはより慎重な管理が求められるべきであろう。

2.2.3.3 植物寄生性外来ダニの侵入実態および遺伝的攪乱に関する研究 (サブサブテーマ2-3)

DNA分析の結果、全てのナミハダニ個体について1,000塩基のmtDNA-CO1配列が得られた。ハプロタイプは21存在し、著しい地理的変異が認められた。特に本種には赤色型と黄緑型という体色の色彩二型が存在するが、得られたDNA配列に基づき系統樹を構築した結果、赤色型から黄緑型が派生したという系統関係が明らかとなった。黄緑型は日本列島内では個体群間でほとんど塩基置換がなく、オランダの個体ともほとんど塩基配列には差がなかった。黄緑型は、進化時間としては極めて短い時間に赤色型から派生した単系統が分布を拡大したものと考えられた。一方赤色型は、個体群間の遺伝的分化が深く、地理的にも分化が進んでいることから、相対的に古い系統であり、地域固有性が存在することが示唆された (図2-3-5)。

次に各個体群の薬剤感受性を調べた結果、黄緑型については全ての地域個体群で100%の死亡率を示した。つ

まり、極めて高い感受性を示した。一方赤色型個体群については、遺伝的系統によって感受性が異なっており、クレードR IIおよびR IIIの個体群については約80%の死亡率を示し、クレードR Iの個体群については、死亡率は50%以下で、ほとんど薬剤の効果がなかった。このことは、同じナミハダニでも、個体群によって薬剤感受性に関する遺伝子に変異が存在することを示している。すなわち、薬剤抵抗性という適応形質に著しい遺伝的多様性が、この種には内包されている。

ナミハダニという害虫種においても、遺伝的多様性と固有性が存在するという事は、植物防疫の観点からも重要な意味を持つ。現在の法体制の下では、WTOの採決に基づき、日本はナミハダニという生物種については産地を問わず、検疫を免除しなくてはならない。しかし、それは遺伝的に異なるナミハダニの侵入を許す恐れがあり、薬剤抵抗性の発達を招く原因にもなり得る。現状の検疫基準の見直しと、科学的データの国際的発信が求められる。

2.2.4 引用文献

Andrew, V, Z. Brower (1994) Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial

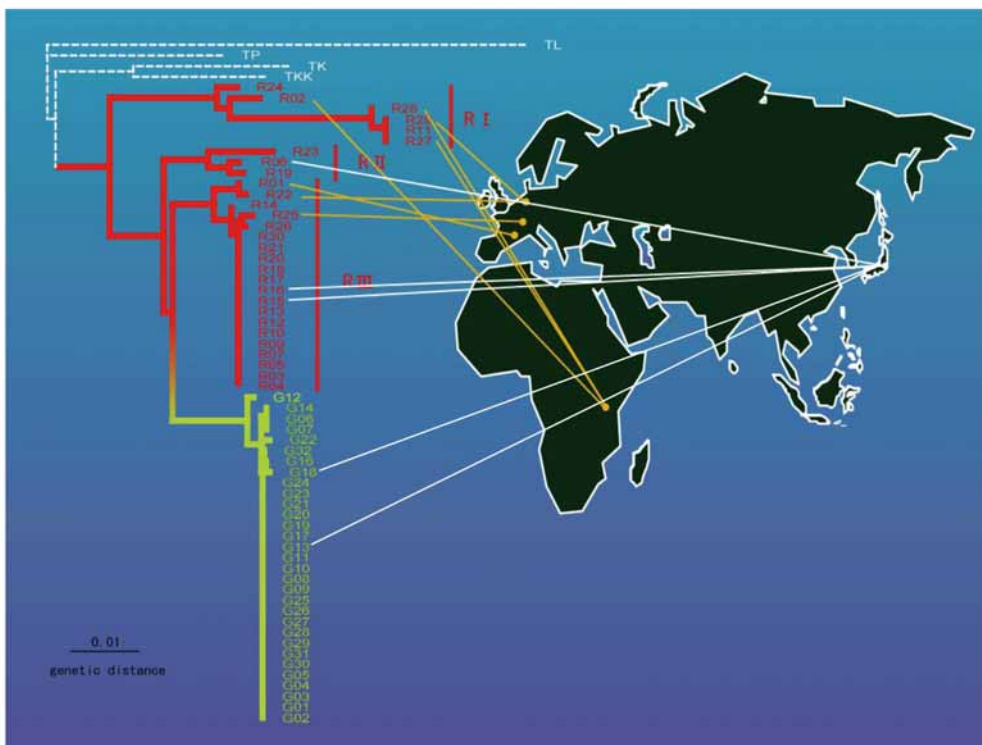


図2-3-5 ナミハダニ地域個体群のmtDNA系統樹

DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 6491-6495

Crandall, K., O. Bininda-Emonds, G. Mace, R. Wayne (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 290-295.

Goka, K., K. Okabe, M. Yoneda, S. Satomi (2001) Bumblebee commercialization will cause worldwide migration of parasitic mites. *Molecular Ecology*, 10: 2095-2099.

Goka, K., K. Okabe, M. Yoneda (2006) worldwide migration of parasitic mites as result of bumblebee commercialization. *Population Ecology*, 48: 285-291.

Simpson, G. (1961) *Principles of Animal Taxonomy*. Columbia University Press, New York.

増田隆一・阿部永 (2005) 動物地理の自然史. 北海道大学図書刊行会.

Simon, C. F. Frati, A. Bechenbach, B. Crespi, H. Liu, P. Flook (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701.

Tamura, K. (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content Biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 678-687.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumar (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.

Thompson, J., D. Higgins, T. Gibson (1994) CLUSTAL W: improving sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.

太田英利 (2002) 古地理の再構築への現生生物学にもとづくアプローチの強みと弱点：特に琉球の爬虫・両生類を例として. 琉球弧の成立と生物の渡来 (木村政昭編) 沖縄タイムス社 那覇

太田英利 (2002) 爬虫類・両生類・陸水魚類が語る琉球の古地理. *遺伝* 56: 35-41.

2.3 淡水魚の地域集団外からの移殖に関する研究 (サブテーマ3)

2.3.1 はじめに

侵入生物による遺伝的多様性影響は、河川・湖沼といった淡水域においても生じている。淡水域における侵入生物といえば、魚類では、オオクチバス・ブルーギルがよく知られている。これらの魚は、捕食・競争などの生物間相互作用を通じて、魚を含んだ他種の水生生物の減少・絶滅を招く恐れがあるとして、外来生物法で特定外来生物に指定され、駆除などの対策が取られている。ただし、元々日本国内に生息せず、また近縁の分類群の魚種が国内に存在しないことから、交雑などを通じた遺伝的な影響は考えられない。

遺伝的多様性への影響が想定されるのは、同種あるいは近縁種の個体が地域外から導入されることによって、交雑あるいは自然選択を通じて、在来の地域集団の遺伝的組成を変化、ないしは崩壊させる場合である。導入される個体が在来の地域集団と同じ種に属する場合は、導入の計画・実行時に遺伝的組成の差異が考慮されないことが多い為、影響が生じたとしてもそれが感知されえない可能性が高い。また、導入個体に混入して他種の個体が随伴して導入されることもあり、この場合には、導入自体がそもそも認識、あるいは記録されないことがある。淡水魚の場合は、導入個体と同じ蓄養池、あるいは採集地に他の魚種の個体が混在している場合には、このような随伴侵入が生じやすい。

導入個体が遺伝的ないし生態的に異なる属性を備える、系統地理的に分化した同種あるいは同亜種の他地域集団から由来する同種内外来の場合には、導入先の地域集団に遺伝的ないしは生態的影響を与えて集団の属性を変化させることがある。ただし、形態的に導入個体ないしはその子孫個体が在来の個体と識別しにくい為、遺伝的分析を用いなければ、導入の事実、あるいは定着の有無さえ、容易には確認できない恐れがある。したがって、その影響評価には、遺伝的分析を利用して導入定着の確認をした上で、交雑の有無の確認、あるいは遺伝的屬性と生態的影響との照合を行なうことが必要である。

本研究では、日本国内で生じている淡水魚の同種内外来について、典型的な例を取り上げて、遺伝的解析を行ない、その遺伝的多様性影響を把握すると共に、生態的影響を解明しようとした。淡水魚における同種内外来は、内水面漁業における養殖あるいは移殖放流、公園などへ

の鑑賞魚放流、また水槽用観賞魚流通などに伴って生じていると考えられる。中でも、広範囲に、かつ好んで行われてきたのは、釣りなどの遊漁のための移殖放流であり、その典型的な事例が琵琶湖産アユの国内河川への放流である。

琵琶湖の生物相は琵琶湖・淀川水系あるいは琵琶湖そのものにしか生息しない固有種を多く含んでいる。淡水魚にも固有の種ないし亜種が多くみられ、一般に知られたものだけでもアユ・ビワマス・ワタカ・ホンモロコ・ニゴロブナ・ゲンゴロウブナ・ビワコオオナマズ・イワトコナマズがある。これらの魚種に加え、近年の酵素多型・ミトコンドリア DNA 酵素断片多型・塩基配列変異の分析による分子系統学的研究や、種間・種内の比較形態学・生態学的研究により、琵琶湖に特徴的な集団の存在がわかってきた。例えば、イトヨ・ビワヒガイ・アブラヒガイ・スゴモロコ・スジシマドジョウ大型種・スジシマドジョウ小型種・ビワヨシノボリである¹⁾。これらの魚種は歴史・進化の産物であり、その希少性が広く認められている。それだけではなく、これらの魚種には、食用・遊漁・観賞に利用され、また商品としても流通されるために水産的価値の高いものが多く含まれている。なかでも利用・流通の規模が大きかったのが、アユである。

琵琶湖産アユは、石川千代松博士による1912年の多摩川放流試験を皮切りに、他の河川への放流が始まった。琵琶湖産アユはなわばりを持つ性質が強い為、回アユを攻撃してくるアユを引っかけ釣り友釣りが主体のアユ釣りの放流用として好まれる。その放流量は全国的には1950~70年代を通じて飛躍的に増加した。例えば、利根川水系鬼怒川の湖産アユ放流尾数は1950年代後半には年1万尾弱であったのに対して、1970年代後半には年100万尾を超えていた^{2), 3)}。この中にアユ以外の魚種がどれだけ含まれていたかについては、出荷時の定量的資料はないようであるが、日本産淡水魚とその分布変化に関する報告では混入が頻繁に指摘されてきた。混入に伴い琵琶湖・淀川水系外に導入されたと推測されている魚種には、オイカワ・カワムツ・スゴモロコ・ゼゼラがある。

淡水魚オイカワ *Zacco platypus* は、本州の利根川・信濃川以西、あるいは太平洋岸では関東以西に自然分布していたと言われている。現在では、琵琶湖産アユの放流に伴い、それに随伴して東北地方にまで分布拡大している。琵琶湖産アユの放流はオイカワの自然分布の有無に関わりなく実施されてきたため、オイカワ自然分布域では琵

琶湖産オイカワが在来のオイカワと混在したことになる。

湖産アユ放流による分布拡大後のオイカワについては、由来の異なる個体群の間で形態比較が行われている^{4), 5)}。その結果によると、自然分布であるか否かにかかわらず、琵琶湖とその周辺水系由来オイカワの分布域とその他の水系由来オイカワの分布域（それぞれオイカワ域・ハエ域と総称する）の間では、成魚脊椎骨数と仔魚発生期の温度との関係に明瞭な違いが認められる。すなわち、水域毎の平均脊椎骨数は40.63~42.33の範囲で変異し、発生期気温21℃以上では温度上昇に伴い減少する。そして、同じ温度条件ではオイカワ域はハエ域よりもおよそ0.42個多い。つまり、脊椎骨数自体は温度条件により変異するが、同一温度に対する脊椎骨数は由来により異なっており、それは遺伝的に決定されている可能性が高いと考えられた。

琵琶湖は湖として形成されてからの歴史が長く、水系として隔離の程度が強かったため、そこに生息する魚は、他の水系に生息する同種個体とも形態的に明確な違いがあると考えることが合理的である。実際に、琵琶湖由来オイカワの形態的特異性は放流後も維持されていることが確認されている⁴⁾。しかし、先述したようにオイカワの自然分布域内では琵琶湖由来と在来のオイカワとの混在が想定されるが、そのような水系も先行研究^{4), 5)}ではハエ域として分類されていた。それは琵琶湖由来のオイカワの形態的特徴が混在の生じた地域では見出されなかったことを意味する。つまり、由来の異なるオイカワの間の形態的差異が遺伝的差異に裏打ちされているならば、想定混在域では琵琶湖由来の遺伝子が定着していない可能性もある。そこで、本研究では、現時点でそのような水系に琵琶湖由来の遺伝子が存在するかどうか、つまりオイカワ自然分布域に琵琶湖由来遺伝子が定着しているかどうかを明らかにすることを目的として、分子系統解析を行ない、さらに、その系統判別結果をもとに系統出現頻度と系統間の生態的差異の解析を行なった。また、オイカワと同様に関東地方河川・琵琶湖の両地域に自然分布しているウグイ *Tribolodon hakonensis* についても、琵琶湖由来遺伝子の関東地方河川への定着がオイカワ以外の他種でも生じているかどうかを確認するために解析を行なった。

2.3.2 方法

2.3.2.1 調査場所・材料

調査対象としたオイカワは、関東地方の7河川17地点で採集した(図3-1-1)。採集河川は南から相模川(相模原市高田橋)・多摩川(昭島市くじら運動公園)・思川(利根川水系;小山市思川緑地公園)・鬼怒川(利根川水系;地点1~6:小山市中島橋・真岡市砂ヶ原橋・宇都宮市喜楽橋・宇都宮市柳田大橋・さくら市勝山・塩谷町上平橋)・那珂川(地点1~6:茂木町テイテイ淵・那須烏山市下野大橋・那須烏山市富谷橋・那珂川町新那珂川橋・大田原市水遊園大橋・大田原市高岩)・久慈川(常陸大宮市辰ノ口橋)・花貫川(高萩市島名)であった。これらの河川で4月から11月までの期間、特に5・6月に釣り、あるいは投網によって標準体長約60~120mmの成魚を採集した。採集した魚は氷冷して研究所に持ち帰り、-20℃で冷凍保存した。なお、琵琶湖由来の遺伝子塩基配列を知るために琵琶湖流入の安曇川で採集されたオイカワも入手した。ウグイについても、関東地方河川ではオイカワ採集時に同時に採集し、また琵琶湖についてはやはり安曇川で採集された個体を入手した。

成魚とは別に標準体長10mm前後の仔魚も採集した。採集地点は鬼怒川喜楽橋と那珂川下野大橋とし、網目1mm弱の金魚網で川岸沿い植生の陰の緩流部を遊泳している仔魚を掬い取った。採集は5月上旬から9月上旬

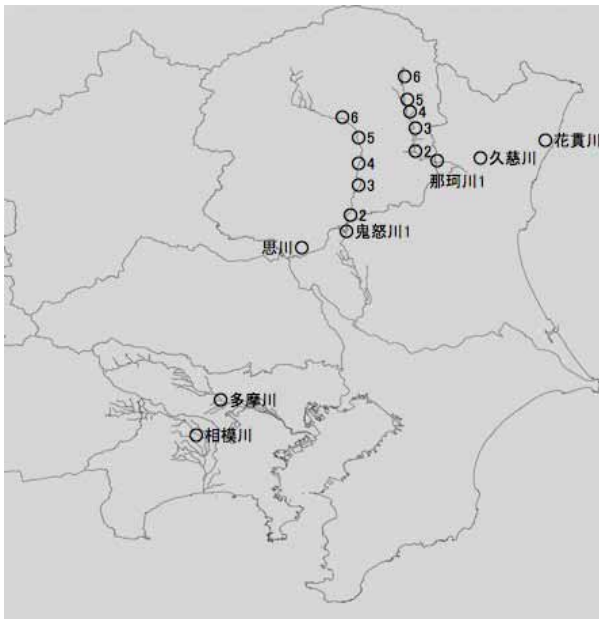


図3-1-1 関東地方河川における調査地点

○印にて位置を表示。相模川・多摩川・鬼怒川・那珂川は部分的に流路を表示。その他の線は都府県境界。

までに2週間間隔で9回、各地点各回最低40個体を目標に行なったが、繁殖盛期からずれているために採集数が目標に満たない時もあった。採集仔魚は氷冷して研究所に持ち帰り、一旦-20℃で冷凍保存した。

成魚の冷凍保存標本は流水中で解凍後、まず全長・標準体長・湿重を測定した後、背ビレ基部近くの筋肉を遺伝子分析用に飯粒大、安定同位体分析用に大豆粒大を採取し、1.5ml容量の遠心チューブと5ml容量のねじロビンにそれぞれ保存した。仔魚はそのまま遺伝子分析に供した。

2.3.2.2 遺伝子分析

採集標本のうち、総計405個体の成魚を遺伝子分析に供した。1.5ml遠心チューブに保存した筋肉標本は、QIAGEN製DNeasy Blood & Tissue Kitを用いて製品に添付された使用方法に基づきDNAを抽出した。抽出したDNAは50 ng/μl濃度で純水あるいはTEに溶解したDNA標本液に調整して冷蔵保存し、遺伝子分析に供した。

分子系統解析を行なうためにミトコンドリアDNA cytochrome b 遺伝子の塩基配列を各標本について決定した。DNA標本液から、既知の2種類のプライマー、LCB1 (5'-AATGACTTGAAGAACCACCGT-3')・HA (5'-CAACGATCTCCGGTTTACAAGAC-3')を用いて遺伝子当該領域をPCR増幅した。そのPCR増幅液の1部をアガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下で増幅産物のバンドを確認した。バンドの検出された標本については、残りのPCR増幅液をエタノール沈殿で精製した後、それをひな形としてABI製BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いてプライマー毎に標識増幅した。標識増幅液はABI製3730 DNA Analyzerを用いて、塩基配列を読み取った。2種類のプライマーを用いて標本毎に読み取った塩基配列1組はゼネティクス製ATGCソフトウェアを用いて整理し、妥当と見られる塩基配列を決定した。

ただし、上記の手順だけでは、プライマー近傍の数十塩基の配列が不明瞭な為、2種類のプライマーを用いて決定した配列を参考にして、当該領域の内側から外側に向けてPCR増幅するためのプライマー1組を考案した。HAの上流側にLCB2 (5'-CCCTCGTGGCAGACATAGTT-3', LCB1の5'末端から1020-1040番目の塩基)、LCB1の下流側にHCB2 (5'-GAAGAATGATGCTCCGTTGG-3', LCB1の5'末端から290-310番目の塩基)を設定し、前記プライマー

を用いたPCR増幅産物をひな形として標識増幅し、塩基配列を読み取った。

なお、仔魚標本は採集頻度・個体数共に多かった為、多数の標本を処理する目的でプライマー4種類を開発した。これらのプライマーは琵琶湖由来の系統と関東在来の系統とを区別する為の簡易プライマーで、塩基配列決定は行わず、アガロースゲル上での増幅産物バンドの有無をもとに系統の判別を可能とするものである。増幅対象は、決定された塩基配列から比較的塩基置換頻度が高い領域を探し、LCB1の5'末端から930~1140番目の塩基配列とした。琵琶湖系統用のプライマーがBL1 (5'-ATTTTCCATTTTAGTACTGATAGTC-3'), BH1 (5'-GTGGGGTTAGAATCAGGAATAG-3'), 関東在来系統用のプライマーがKL1 (5'-ATTTTCCATTTTAGTACTAATAGTT-3'), KH1 (5'-GCGGGGTTAGAATCAGGAATAA-3')であった。塩基配列が決定済みの成魚DNA標本液から、これらのプライマーによってcytochrome b遺伝子の部分増幅を行ない、塩基配列のハプロタイプ通りに判別できるかどうかを確かめた。48個体について確認した結果、既知のハプロタイプ通りの増幅結果が得られた(図3-1-2)。また、オイカワ仔魚と混獲されやすいウグイおよびカワムツ(*Zacco temmincki*)について、これらのプライマーでバン

ドが出現しないことを確認した。

ウグイのcytochrome b遺伝子塩基配列決定は、この領域を挟み込むプライマー2種類LCB1・HAはオイカワと同じものを適用し、また内側から増幅するためのプライマーのうちHCB2は適用できたものの、LCB2については増幅が成功しなかったため、仮に決定した配列を参考に新たにLCB2t (5'-AGGAGGGGTCCTTGCACTAT-3')を作成し、適用した。

2.3.2.3 系統分析

遺伝子分析により得られた塩基配列情報は、まず日本ジーンデータバンク (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) においてソフトウェアClustalWを用いて整理した。整理と同時に、Kimuraの塩基置換数推定法を用いた近隣結合法による系統樹作成も行なった。系統樹の信頼度はブートストラップ法により1,000回試行で求めた。系統樹はソフトウェアMr. Bayesを用いてベイズ法によっても作成した。この場合、burnin=1,000, ngen=100,000と設定した。

2.3.2.4 安定同位体による栄養的地位分析

系統の違いによる生態的差異を調べる為、炭素・窒素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$ ・ $\delta^{15}\text{N}$) 分析によって個体毎の栄養的地位を鬼怒川・那珂川のオイカワについて推定した。魚は体が大型になるにつれて大きな餌を、つまり栄養的地位が高いと想定される生物を摂ると考えられるので、その影響を軽減させる為、栄養的地位分析には標準体長80 mm以上の比較的大型の60個体を供した。2.3.2.1で述べたようにねじロビンに入れて冷凍保存した筋肉標本をこの分析に用いた。凍結した筋肉標本を真空凍結乾燥機に入れて乾燥させた後、乳鉢を用いて粉碎した。体組織中の脂肪は窒素安定同位体の含量が低く、同位体比測定に誤差を生じさせるため、粉碎した標本にメタノール・クロロホルム混合液(容積比1:2)を適量加えて、60°Cで15分間湯煎することによって、脱脂処理をした。湯煎後は吸引濾過にて標本をワットマンGF/Fガラスファイバーフィルター上に捕集し、有機溶媒を飛散させた上で、ねじロビンに封入し、同位体比分析まで乾燥保存した。

オイカワが餌としている水生昆虫・付着藻も採集し安定同位体比分析に供した。水生昆虫は、付着藻を主な餌とするヒラタカゲロウ科ヒラタカゲロウ属・タニガワカゲロウ属の幼虫をサーバーネットにて河床から採集して実験室に冷蔵搬送し、地点毎に羽化前の大型個体5個体

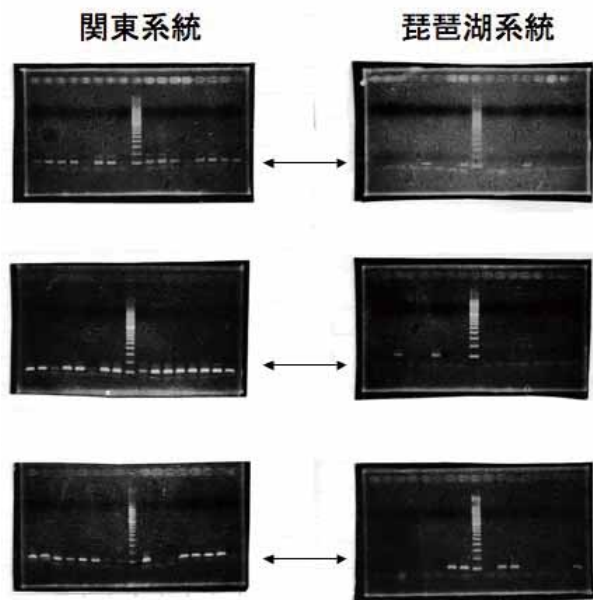


図3-1-2 オイカワ系統判別用マーカにより増幅したPCR産物の電気泳動ゲル像

同一仔魚標本に対する、異なるマーカの増幅結果を左右一対に配置。1ゲル毎に18個体のPCR産物を泳動。各ゲル中央のバンドは200bpラダーDNAサイザー。

を選んで、凍結乾燥後乳鉢にて粉碎した。付着藻は、各地点において10 cm 径以上の底石 3 個からそれぞれ 6 cm 四方の表面に付着する藻類を歯ブラシを用いてはぎ取った。これを実験室に冷蔵搬送し、一部をワットマン GF/F グラスファイバフィルター上に捕集して、45℃にて恒温器中で乾燥させた。

$\delta^{13}\text{C} \cdot \delta^{15}\text{N}$ の測定は、同位体比質量分析計 (Thermo Fisher Scientific 製 Thermo Finnigan Delta) にて測定誤差 0.15% 以下で行なった。測定の際に用いた標準物質は、炭素用の Pee Dee Belemnite 石灰石と大気中窒素であった。同位体比は $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N} = \{ (\text{標本同位体含有率}) / (\text{標準物質同位体含有率}) - 1 \} \times 1000$ として求めた。

炭素・窒素安定同位体比による栄養的地位推定は、これらの安定同位体が生態系中の食物連鎖を通じて濃縮される性質を利用している。濃縮の程度は、食物連鎖の1段階、例えば植食者から捕食者の間で標準的な値が調べられており、その値は窒素の方が炭素よりも顕著に高い。したがって、栄養的地位推定には窒素安定同位体比が一般的に利用され、炭素安定同位体は1次生産を行なう植物の性質により大きく変動する為、その判別に用いられる。本報告で用いた標準的な $\delta^{15}\text{N}$ 濃縮率は 3.8% である⁶⁾。近年になって、より低い標準的濃縮率が報告されているが、これを採用しても栄養的地位の絶対値が変動するだけで、推定値間の相対的な順位は変わらない。

栄養的地位の算出は、付着藻を基礎生産者 (光合成による1次生産者) として扱い、栄養的地位 = 1 と定めた。原理的には、オイカワと付着藻の $\delta^{15}\text{N}$ の差を標準的濃縮率 3.8% で割った商を 1 (付着藻の栄養的地位) に加えれば、オイカワの栄養的地位が求められる。しかし、付着藻の安定同位体比は時間的・空間的に大きく変動することが知られているため、付着藻を主食とするヒラタカゲロウ類の水生昆虫を基準 (栄養的地位 = 2) にして [オイカワの栄養的地位] = $2 + \{ ([\text{オイカワ} \delta^{15}\text{N}] - [\text{ヒラタカゲロウ} \delta^{15}\text{N}]) / 3.8 \}$ として求めた。

2.3.3 結果

2.3.3.1 オイカワ琵琶湖・関東系統の判別

関東地方河川から採集した 405 個体について決定したミトコンドリア cytochrome b 遺伝子塩基配列を整理し比較したところ、64 ハプロタイプが認められた。これらのハプロタイプと琵琶湖採集標本 4 個体から見出されたハプロタイプとを併せて系統樹を作成したところ、大きく

2 群に区分された (図 3-1-3)。両群の間の塩基置換率は 1.18% であり、ヨーロッパ産ウグイ亜科の cytochrome b 遺伝子について報告された分子時計値 (ペアサイズで 1.52%) を適用すると、およそ 80 万年前という分化年代が推定される。つまり、この 2 群は歴史的に明確に分化した地域集団であることがわかる。また、そのうちの 1 群は、琵琶湖産標本から読み取られたハプロタイプを全て含んでいた。これらの結果から、この 2 群は琵琶湖系統と関東系統と見なされた。

すなわち、関東地方河川に琵琶湖系統の遺伝子が定着していることがわかった。それぞれの系統の中には、琵琶湖系統に 58 ハプロタイプが、関東系統には 6 ハプロタイプが含まれており、琵琶湖系統が極めて多型に富んでいることが特徴的であった。それに比べて関東系統は変異に乏しかった。それぞれの系統の中には顕著な集団分化が認められなかった。

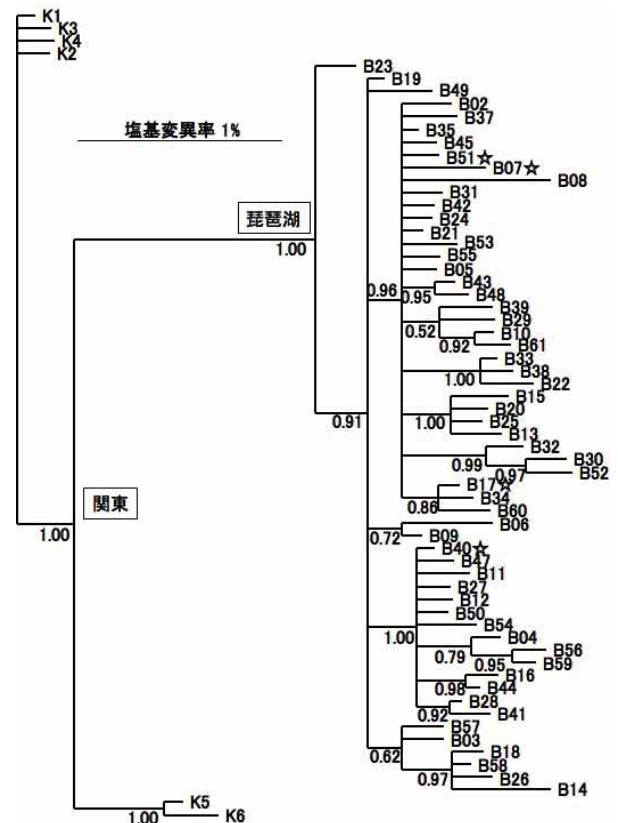


図3-1-3 関東地方河川採集オイカワの cytochrome b 遺伝子ハプロタイプの系統樹
ベイズ法により作成。近隣結合法作成の系統樹でも基本的構造は同じ。B, Kで始まる記号はハプロタイプ名。1 以下の数字は各枝の信頼度を表わす。☆印のついたハプロタイプは琵琶湖産標本より読み取られた。

2.3.3.2 オイカワ成魚における系統出現頻度－河川間変化

琵琶湖・関東両系統のオイカワ成魚における出現頻度は、関東地方河川採集標本405個体中、それぞれ153・252個体であった。この個体数構成は、先述のハプロタイプ数と比べると対照的で、琵琶湖系統は標本数が関東系統の2分の1近いのに対して、ハプロタイプ数は10倍近く多かった。つまり、ハプロタイプ多様度は琵琶湖系統個体ではるかに高かった。

両系統の構成比を河川別に見ると、河川による違いが認められた（表3-3-1）。すなわち、多くの河川では両系統が混在し、それらの河川のうち、相模川・多摩川・思川・鬼怒川1～6の各地点では関東系統と琵琶湖系統の比率がほぼ同じか、琵琶湖系統が多いのに対して、那珂川1～6では関東系統が多かった。一方、久慈川・花貫川では琵琶湖系統しか見つからなかった。つまり、南北に見ていくと、那珂川と久慈川とを境に関東系統の分布が途切れることがわかった。

両系統が混在する河川の間で関東系統と琵琶湖系統の

どちらが多いかに違いがあったが、1河川内で6地点を調査している鬼怒川・那珂川の間で統計的に比較した。Wilcoxon 2 標本検定を行なった結果、統計値 $W = 4.5$, $p = 0.037$ となり、両河川の間有意な違いが認められた。

2.3.3.3 オイカワ仔魚における系統出現頻度－季節変化

成魚においては、多くの河川で両系統の混在が認められたが、元々異なる地理的環境下で進化した系統の間には物理化学的あるいは生物的環境要因に対する選好性の違いがあってもおかしくない。例えば、繁殖場所や時期の違いが系統間に存在するかもしれない。そこで、仔魚における系統出現頻度を通常想定される繁殖期間の全期にわたって調査し、系統間に季節的繁殖頻度変化の違いがないかを確かめた。計9回の採集のうち、初回の5月上旬にはオイカワ仔魚が採集されず、ウグイ仔魚のみが採集された。他の8回については両系統のオイカワ仔魚が採集された（図3-1-4）。採集された期間を通じて、那珂川よりも鬼怒川で琵琶湖系統の出現頻度が高かった

表3-3-1 調査河川におけるオイカワ関東・琵琶湖系統出現頻度

	関東系統 (個体数)	琵琶湖系統 (個体数)	ハプロタイプ数	遺伝子多様度 ¹
相模川	8	9	-	-
多摩川	20	12	-	-
思川	10	11	6	.83
鬼怒川1	16	11	10	.65
鬼怒川2	17	13	13	.75
鬼怒川3	16	14	12	.71
鬼怒川4	18	12	12	.65
鬼怒川5	20	10	12	.72
鬼怒川6	3	2	3	.70
那珂川1	25	4	6	.32
那珂川2	23	8	8	.45
那珂川3	17	4	4	.35
那珂川4	13	9	11	.71
那珂川5	20	10	11	.56
那珂川6	26	4	5	.25
久慈川	0	13	10	.95
花貫川	0	7	5	.86

1: 集団内で随意に2個体を選んだ時に同じハプロタイプが揃う確率

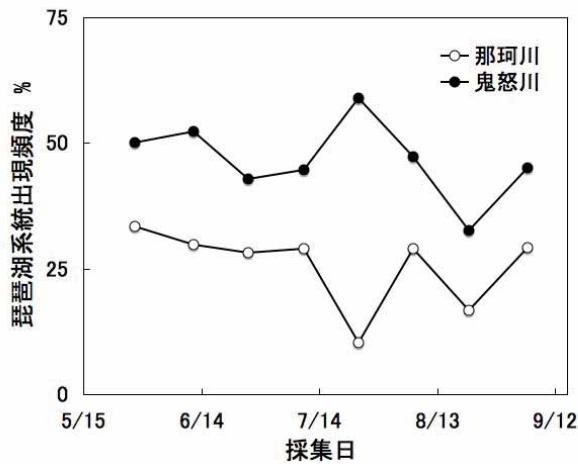


図3-1-4 オイカワ仔魚における関東・琵琶湖系統の出現頻度季節変化
5月上旬の採集1回目にはオイカワ仔魚は採集されなかった。

(Wilcoxon 符号順位検定法, $V = 0, p = 0.014$)。しかし、季節的な変化はいずれの河川においても認められなかった。

2.3.3.4 オイカワ系統による栄養的地位の変異

オイカワの栄養的地位は成長に伴う食性変化によって変動すると考えられるので、その影響を分離するために、標準体長と系統の2つの独立変数を用いて2元分散分析を行なった。その結果、体長の効果は $F_{1,56} = 7.14, P = 0.0098$ と有意に認められたが、系統の効果は $F_{1,56} = 3.16, P = 0.081$ と有意には認められなかった(図3-1-5)。

2.3.3.5 ウグイ琵琶湖系統の関東定着の有無

ウグイは北海道・本州・四国・九州の湖沼・河川に自然分布する。オイカワ同様、関東地方河川にも琵琶湖にも生息しており、琵琶湖産アユの関東地方放流によって侵入・定着している可能性がある。cytochrome b 遺伝子塩基配列から、関東地方河川と琵琶湖での採集個体の系統樹を作成したところ、関東地方河川と琵琶湖という採集地で明確に2分された(図3-1-6)。つまり、遺伝的に明らかに異なる系統がそれぞれの地域に分布していることがわかった。しかし、一方では、関東地方河川への琵琶湖産ウグイの定着は確認されなかったことになり、オイカワのように琵琶湖系統が定着していないことが示唆された。

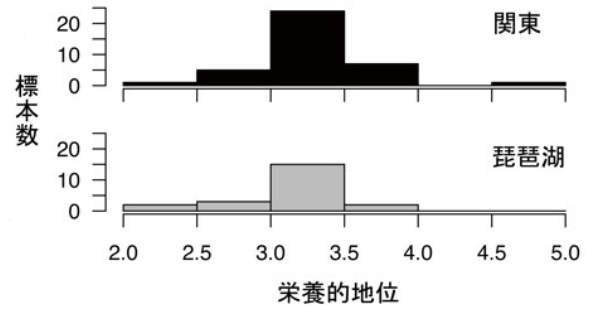


図3-1-5 オイカワ成魚の栄養的地位の系統間比較

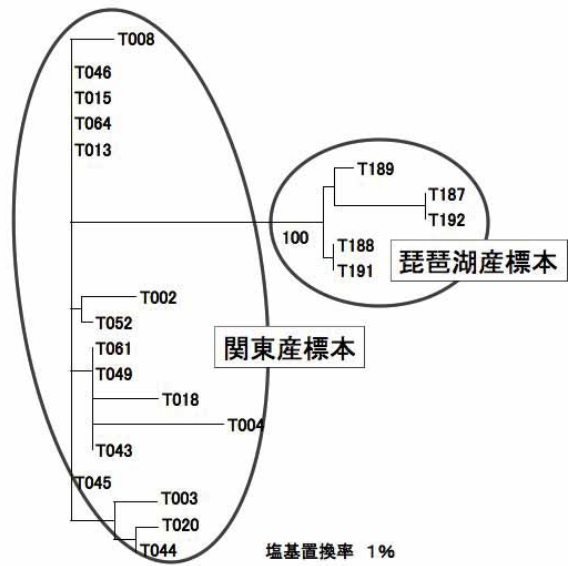


図3-1-6 ウグイの関東地方河川・琵琶湖産標本による系統樹
近隣結合法により作成した。Tで始まる記号は標本名、数字は枝の信頼率をブートストラップ法により求めた。

2.3.4 考察

2.3.4.1 オイカワ琵琶湖系統の関東地方河川への定着

本研究の結果により、従来形態面では確認されていなかった琵琶湖由来オイカワの他水系への侵入・定着が遺伝学的に初めて確認された。一般的に、生物種同種内、あるいは近縁種間での侵入・定着は形態の色・形・大きさ・数などによって確認されてきた。しかし、地域集団間で生物種個体を判別するために使われるこれらの形質は、定義が明確ではなかったり、また集団間で変異が重なることもあるので、混生後には個体単位の区別が容易ではないことも多い。例えば、オイカワの場合は脊椎骨数・鱗数によって琵琶湖由来の個体群が全国的に区別されていた⁴⁾が、ここでは、今回の研究によって実際には琵琶湖由来個体の定着が確認された関東地域が自然分布の在来の個体が生息する地域として扱われていた。した

がって、個体単位で系統を判別して由来を明らかにするためには、遺伝子分析がどうしても必要であるし、本研究のオイカワの場合にはそれによって琵琶湖由来遺伝子の定着が定量的に明らかとなった。

ただし、外来遺伝子の定着が必ずしも表現型としての形質の変化をもたらすとは限らないことも念頭に入れておく必要がある。それはどういうことかという、先行研究では、琵琶湖とその周辺の自然分布域および琵琶湖由来オイカワによるオイカワ分布拡大域とそれ以外の自然分布域ならびにそこからの分布拡大域の間では、脊椎骨数と発生時気温との関係に明らかな違いのあることが示されていた⁴⁾。つまり、遺伝子組成からみれば混在が確認される関東地方河川のような地域でも、形質的には元々の在来集団の特徴を保持しているとも考えられる。つまり、遺伝子浸透により、異なる地域集団の遺伝子が混入していても、形態は遺伝子浸透の影響を受けていない可能性も考えられる。今回遺伝子分析を行なったミトコンドリア cytochrome b 遺伝子の塩基配列は中立的と考えられている。したがって、中立的遺伝子は選択圧をあまり受けずに、外来遺伝子が在来遺伝子と混在、つまり遺伝子浸透が起きたが、形態を左右するような適応的遺伝子は浸透の程度が低く、外来遺伝子が在来遺伝子と置換わっていないとも考えられるのである。

一般に、集団間の交雑が想定されている場合でも、ミトコンドリア遺伝子では遺伝子浸透が確認されても、適応形質に関与している可能性の高いタンパク質のアロザイム多型などは元々の集団間差異が維持される場合がありうると考えられている。したがって、ミトコンドリア遺伝子によって確認された遺伝子浸透が、関東地方オイカワの形態あるいは生態に影響を及ぼしているかどうかは、核ゲノム遺伝子の塩基配列決定による系統解析を踏まえた上で議論される必要がある。そのような解析には2つの意味がある。ひとつは、核ゲノムの中立的遺伝子を用いて、琵琶湖由来個体と関東地方在来個体との間で交雑が起きているかどうかを確認することができる。もう一つは、核ゲノムの適応的遺伝子を用いて、実際に在来の適応的形質が保持されているかどうかを確認することができる。

このうち前者の核ゲノム中立的遺伝子の分析は、ITS1 遺伝子・マイクロサテライト遺伝子周縁領域・マイクロサテライト鎖長多型を用いて本研究でも取り組んだ。しかし、試みた限りでは、オイカワの関東系統と琵琶湖系

統を判別するだけの変異情報が得られなかった。したがって、これらの作業は今後の課題として残されている。

また、野外調査においては、関東地方で琵琶湖由来のオイカワが侵入・定着していない河川と定着している河川との間でオイカワの生態・形態などを比較すれば、侵入・定着の影響を評価することができるであろう。しかし、在来のオイカワだけが分布する河川は本調査では関東地方で見つからず、おそらくは存在しない可能性が高いため、関東地方でのこのような調査の実行可能性は乏しい。オイカワが広範囲に自然分布していた中部から西日本地方においては可能性がまだあると推察される。

2.3.4.2 オイカワ琵琶湖系統の定着を左右する要因ーアユ放流量ー

本研究では、関東地方の多くの河川でオイカワ琵琶湖系統が定着し、関東系統と混在していることがわかった。しかし、河川によって、系統出現頻度は異なっており、琵琶湖系統しか出現しない久慈川・花貫川を除けば、那珂川では関東系統が多く、それ以外の川では琵琶湖系統の頻度が半分かそれ以上になっていた。このような河川による差が何に起因するかが問題であるが、侵入生物の場合、侵入過程と定着過程にわけて定着成功率を解析することで理解がしやすくなる。

本研究では、オイカワ侵入の経路である琵琶湖産アユ放流の量と定着先である関東地方河川的环境条件に注目した。

まず、侵入過程に関わる琵琶湖産アユの放流量であるが、調査を詳細に行なった鬼怒川と那珂川については両河川の流れる栃木県内の資料が利用可能であったので、その経年変化を図3-1-7に整理した^{2), 3)}。両河川ともに、1950年代には琵琶湖産と河川・海産の放流量に大きな差がなかった。しかし、1960年代に入ると、琵琶湖産アユの放流量が増加し、河川・海産は減少して、1970年代には後者がほぼ放流されなくなった。一方で、琵琶湖産アユ放流量は増加の一途を辿った。1980年以降の詳細な放流量は入手できなかったが、この後も少なくとも1980年代は琵琶湖産アユの放流が続いた。しかし、1990年代に入ると、アユ冷水病の流行が生じ、琵琶湖産アユ放流がそれを媒介している可能性もあったので、急激にその放流量は減少した。現在、これらの河川では人工産と呼ばれる栃木県内で養殖されたアユ種苗が放流に使われている。

以上のように、多少の量的違いはあるものの経年的に

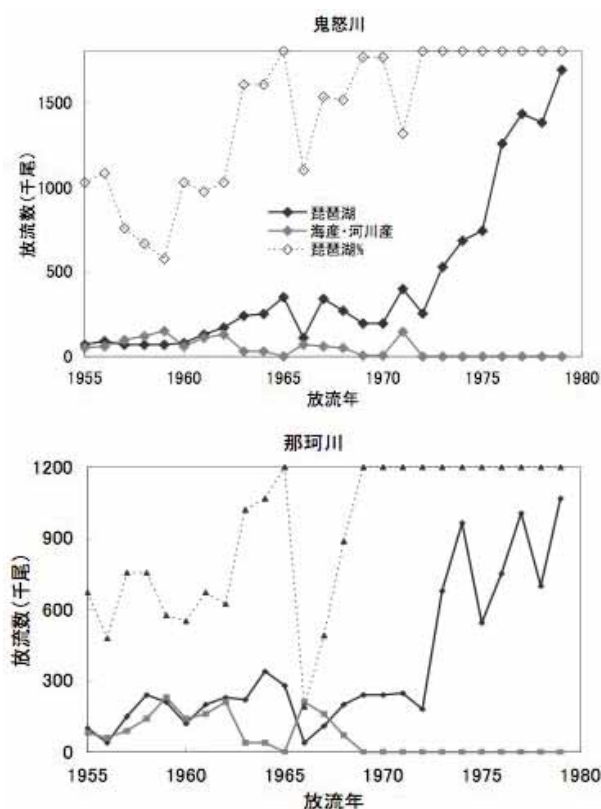


図3-1-7 鬼怒川・那珂川における琵琶湖産アユ放流量

は鬼怒川・那珂川ともにアユ放流量は同じような変化を辿っていた。図3-1-7に表わした期間の放流量は、鬼怒川で1,105万尾（1尾4gとして約44t）、那珂川で910万尾（1尾4gとして約36t）と集計される。この限りでは、両河川の放流量のちがいは大きくなく、琵琶湖系統の出現頻度が高い鬼怒川で多い傾向はあるものの、河川間の出現頻度の有意な差を説明できるほど大きくはないと考えられる。

2.3.4.3 オイカワ琵琶湖系統の定着を左右する要因－河川環境－

それぞれ6地点を設けて調査を行なった鬼怒川・那珂川では、これらの区間の河川勾配・水温には大きなちがいが認められなかった⁷⁾。オイカワは河川中流域に優占する魚種であるが、どちらの河川も調査域周辺では市街地と農地が混在する景観が広がる中を比較的緩やかに流下しており、オイカワが好む環境と考えられる。ただし、オイカワは河川改修によって河床が浅く平坦にならされ、緩流部が増えると生息数が増えると言われており、そのような環境の違いに注目する必要がある。

農業用水取水のために建設された頭首工の数が鬼怒川は那珂川よりも多く、調査区間内では鬼怒川に流路全体

を遮る形で2ヶ所あるのに対して、那珂川では流路全体を遮る形でのものは存在しない。オイカワは稚魚期に流下するため、その流下を抑制するダムなどがあれば、それより上流には生息しやすくなる。一方、琵琶湖のオイカワは河川だけでなく湖沼にも生息して生活史を送っているため、そのような環境に適応しているとすれば、関東地方河川在来のオイカワよりも流下に対する抵抗性が小さい可能性がある。そうであれば、鬼怒川において頭首工による堰き止め効果が著しいために、それが琵琶湖系統の定着を促進していると考えられる。

2.3.4.4 ウグイ琵琶湖系統の関東への未侵入

関東地方河川産と琵琶湖産のウグイを系統解析した結果、両群は系統樹上で明確に区別され、混合はしていなかった。つまり、オイカワと同じく関東地方河川と琵琶湖の間ではウグイの系統が地理的に分化している事が示されたが、オイカワとは異なり、ウグイ琵琶湖系統の関東への侵入・定着は生じていないか、あるいは極めて低い頻度に留まっているとみなされた。

この結果から、ウグイ琵琶湖系統が琵琶湖産アユ放流に伴い侵入・定着しなかったとすると、その原因も侵入過程と定着過程とに分けて考える必要がある。侵入過程において、放流用琵琶湖産アユにウグイがどの程度混入していたかが問題となる。琵琶湖での放流用アユ捕獲は、遡上期前の湖岸でのエリ・追い叉手網漁と河川遡上時の四手網・ヤナ漁によって行われてきた。これまでの報告によると、オイカワは湖内で沿岸帯に多いのに対して、ウグイは開けた水域を好むと言われている。それに従うならば、沿岸で行われることの多い放流用アユ捕獲にウグイが混獲されにくいとしても不思議ではない。

一方、定着過程に原因を求めるとすると、琵琶湖に流入する河川と異なり、関東地方の調査河川では流程中に広い止水水域が存在しない。そのことと、先述したように湖ではウグイが開けた水域を好む性質とが関連している可能性はある。ただし、ウグイの生活史についてはあまり知見がなく、系統地理とともに生態についての情報の充実が望まれる。

2.3.4.5 オイカワ琵琶湖系統定着の生態的影響

本研究により関東地方河川では広範囲にオイカワ琵琶湖系統の定着が確認されたが、混在河川で両系統の生態がどのように違うかは、オイカワが河川中流域の優占種

であるだけに、生態系管理の面でも関心が持たれる。ミトコンドリア遺伝子による系統判別を基準にした系統間の栄養的地位の比較からは、系統間の違いは認められなかった。当然のことではあるが、ミトコンドリア遺伝子は母系に由来する遺伝子であるため、標本個体が異なる系統の交雑に由来するかどうかの判別はできない。したがって、この分析についても、核ゲノムの中立的遺伝子による系統判別の結果を踏まえた解析が必要である。

2.3.5 まとめ

本研究では、遺伝子分析の活用により、オイカワ・ウグイといった普通種の淡水魚において琵琶湖アユ放流に伴う関東地方河川への侵入・定着が生じているかどうかที่明らかとなった。同種内あるいは近縁種間の生物導入により侵入が生じているかどうかは、遺伝子分析が欠かせず、それを進めることによって定量的な侵入実態が把握される。同種あるいは近縁種の人為的な生物導入においては、それらの生物に特徴的な形態を基準に個体が選ばれ導入されるだけで、遺伝的および生態的特徴などは考慮されないことが多かった。その結果、生態的には異質な個体が導入されて在来の個体群の特性が失われてしまうことになる。このことは、すでにホタルやメダカに移殖において問題点の指摘されてきたことではあるが、移殖導入される生物が普通種で、導入される地域環境で優占する場合には、生態系への影響は無視し得ないものとなると考えられる。本研究では、そのような生態系影響にまで踏み込むことはできなかったが、そのような研究は今後の侵入生物影響評価とその抑制において大きな

課題である。

2.3.6 謝辞

琵琶湖産オイカワ標本は京都大学小野田幸生氏、ウグイ標本は龍谷大学遊磨正秀氏に提供頂いた。栃木県アユ放流量の資料は栃木県水産試験場の阿久津正浩氏にご教示頂いた。ここに記して感謝します。

2.3.7 引用文献

- 1) 高村健二 (2009) 固有種に富む琵琶湖からの侵入種－関東の陸水からの視点－. 陸水学雑誌 印刷中.
- 2) 栃木県水産指導所 (1956-1964) 栃木県水産指導所事業報告第1-9号. 栃木県, 宇都宮.
- 3) 栃木県水産試験場 (1965-1982) 栃木県水産試験場事業報告第10-26号. 栃木県, 宇都宮.
- 4) 水口憲哉 (1970) オイカワ (*Zacco platypus* (T. & S.)) の繁殖生態と分布域の拡大にともなう二, 三の形質の変異. 東京大学大学院博士 (農学) 論文甲02306.
- 5) 水口憲哉 (1990) オイカワの日本における分布域の拡大. 東京水産大学論集, 25: 149-169.
- 6) Post, D. M. (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83: 703-718.
- 7) Takamura (2009) Population structuring by weirs and the effect on trophic position of a freshwater fish *Zacco platypus* in the middle reaches of Japanese rivers. *Fundamental and Applied Limnology* 173, in press.

[資 料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織

[A 研究担当者]

生物圏環境研究領域

生態遺伝研究室

室 長

主任研究員

中嶋信美

玉置雅紀

西沢 徹

渡邊日出子

中嶋桃子

中崎理香子

大塚裕希

橋本はるよ

個体群生態研究室

室 長

高村健二

中原真裕子

環境リスク研究センター

主席研究員

五箇公一

鈴木一隆

米田昌浩

所 諭史

2 研究課題と担当者（*客員研究員）

サブテーマ1：遺伝子組換え（GM）植物が在来植物へ与える影響に関する研究

中嶋信美・玉置雅紀・西沢 徹・渡邊日出子・中嶋桃子・中崎理香子・大塚裕希・橋本はるよ

サブテーマ2：導入昆虫類がもたらす遺伝的攪乱に関する研究

五箇公一・鈴木一隆・米田昌浩・所 諭史

サブテーマ3：淡水魚の地域集団外からの移殖に関する研究

高村健二・中原真裕子

II 研究成果発表一覧

1 誌上发表

原著論文

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

Aono M., Wakiyama S., Nagatsu M., Nakajima N., Tamaoki M., Kubo A., Saji H. (2006) Detection of feral transgenic oilseed rape with double-herbicide resistance in Japan, *Environ. Biosafety Res.*, 5 (2), 77-87.

Amanuma K., Nakajima N., Hashimoto A., Aoki Y. (2008) Genetically Modified, Red Fluorescent Zebrafish: Detection, Crossing, inheritance of Red Fluorescence, and Tolerance to Low Temperatures, *J. Environ Biotech* 8: 105-110.

Kokubo N., Toquenaga Y., Goka K. (2007) A simple visualization method to reconstruct nest-mate patterns among bumble bees using genetic data, *Applied Entomology and Zoology* 42:137-141.

Nishizawa T., Nakajima N., Aono M., Tamaoki M., Kubo A., Saji H. (2009) Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations, *Environ. Biosafety Res.*, 8, 33-44.

Saji H., Nakajima N., Aono M., Tamaoki M., Kubo A., Wakiyama S., Hatase Y., Nagatsu M. (2006) Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides, *Environ. Biosafety Res.*, 4, 217-222.

Tamaoki M., Imai H., Toda Y., Niwa Y., Nakajima N., Kubo A., Aono M, Saji H. (2006) Development of visual markers for transgenic plants and their availability for environmental risk assessment, *Z. Naturforsch.*, 61c, 377-386.

Takamura K. (2007) Performance as a fish predator of largemouth bass invading Japanese freshwaters: a review, *Ecological Research* 22, 940-946

Tokoro S., Yoneda M., Kunitake Y., Goka K. (2009) Geographic variation of mitochondrial DNA in *Bombus ignites*, *Applied Entomology and Zoology (in Press)*

Takamura K. (2009) Population structuring by weirs and the effect on trophic position of a freshwater fish *Zacco platypus* in the middle reaches of Japanese rivers, *Fundamental and Applied Limnology* (in press)

高村健二 (2009) 固有種に富む琵琶湖からの侵入種－関東の陸水からの視点－, 陸水学雑誌, (印刷中)

米田昌浩, 横山 潤, 土田浩治, 大崎哲也, 糸屋新一郎, 五箇公一 (2007) 北海道平取町におけるネット展帳を用いたセイヨウオオマルハナバチ *Bombus terrestris* の逃亡防止策の検討, 日本応用動物昆虫学会誌, 51, 39-44

米田昌浩, 土田浩治, 五箇公一 (2008) 商品マルハナバチの生態リスクと特定外来生物法, 応用動物昆虫学会誌, 52, 39-44

総説 (査読なし)

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

五箇公一 (2006) セイヨウオオマルハナバチと外来生物法, 昆虫と自然, 41(13)

五箇公一 (2006) 法律による外来生物の取締について, STAFF news letter, 農林水産先端技術産業振興センター, 17(4)

五箇公一 (2006) 昆虫輸入に見る日本の外来生物問題, 関西自然保護機構会誌, 28(1)

五箇公一 (2007) セイヨウオオマルハナバチの侵入種問題, 生活と環境, 52(1)

五箇公一 (2008) 輸入昆虫のリスク評価とリスク管理－特定外来生物セイヨウオオマルハナバチのリスク管理－シリーズ21世紀の農学.外来生物のリスク管理と有効利用, 日本農学会編, 養賢堂, 東京, 187-203

五箇公一 (2008) クワガタムシ好きの日本人がクワガタムシを減ぼす, Imidas SPECIAL, イミダス編集部編, 集英社, 東京, 142-143

国武陽子, 五箇公一 (2006) 花粉媒介昆虫クロマルハナバチの利用とその問題点ー外来生物法と国内外来種問題, 昆虫と自然, 41(5)

国武陽子, 五箇公一 (2006) 農業用導入昆虫の生態リスク管理と将来展望ーセイヨウオオマルハナバチの特定外来種指定ー, 植物防疫, 60(4)

中嶋信美 (2006) 遺伝子組換えセイヨウアブラナの野外での生育調査, 月刊「環境」12月号, 26-27

2 口頭発表

青野光子, 脇山成二, 永津雅人, 中嶋信美, 玉置雅紀, 久保明弘, 佐治 光 (2007) 除草剤耐性遺伝子組換えセイヨウナタネの一般環境中における生育, 日本植物生理学会2007年度年会

五箇公一, 米田昌浩, 今藤夏子, 国武陽子, 岡部貴美子 (2007) 昆虫類の侵入と進化的重要単位, 第54回日本生態学会大会

五箇公一, 岡部貴美子, 横山 潤, 小島啓史 (2008) ヒラタクワガタがきた道, ダニが付いてきた道 (最終回?), 第52回日本応用動物昆虫学会大会

五箇公一, 岡部貴美子, 横山 潤, 小島啓史 (2008) クワガタが来た道, ダニが来た道, 第63回日本生物地理学会年次大会

五箇公一, 岡部貴美子, 横山 潤, 小島啓史 (2008) ヒラタクワガタおよびその寄生ダニの進化的重要単位, 日本昆虫学会第68回大会

早川明里, 高村健二, 中島 淳, 河口洋一, 鬼倉徳雄, 向井貴彦 (2009) 日本列島におけるオイカワの系統地理と国内移殖の実態, 第56回日本生態学会大会

久保明弘, 青野光子, 中嶋信美, 玉置雅紀, 佐治 光 (2007) 遺伝子組換えダイズの生態系影響評価に関する研究ー野生種ツルマメとの雑種について, 日本植物学会第71回大会

中嶋信美, 西沢 徹, 玉置雅紀, 青野光子, 久保明弘, 佐治 光 (2006) 関東地方における除草剤耐性遺伝子組換えセイヨウアブラナの分布調査, 日本植物生理学会2006年度年会

中嶋信美 (2006) 一般環境中における遺伝子組換えナタネの生育状況, 日本植物学会第70回大会

西沢 徹, 中嶋信美, 玉置雅紀, 青野光子, 久保明弘, 佐治 光 (2007) 関東地方における遺伝子組換えナタネの逸出状況ー2006年度の調査結果報告ー, 日本生態学会第54回大会

西沢 徹, 中嶋信美, 玉置雅紀, 青野光子, 久保明弘, 佐治 光 (2007) DNAアレイを用いたアブラナ属3種の種特異的分子マーカーの開発, 日本植物学会第71大会

西沢 徹, 中嶋信美, 玉置雅紀, 青野光子, 久保明弘, 佐治 光 (2008) 関東地方の道路沿いにおける遺伝子組換えセイヨウアブラナの生育状況, 日本生態学会第55回大会

西沢 徹, 中嶋信美, 玉置雅紀, 青野光子, 久保明弘, 佐治 光 (2009) 国道51号線沿いにおける遺伝子組換えセイヨウアブラナの逸出状況ー2008年度までの調査結果報告ー, 日本生態学会第56回大会

高村健二 (2006) 淡水魚オイカワの関東地方河川における遺伝子浸透, 2006年度日本魚類学会年会

高村健二, 高村典子, 中川 恵, 田中哲夫, 三橋弘宗, 村上俊明 (2007) ため池に分布する淡水魚モツゴの種内外来状況を探る, 日本生態学会第54回大会

高村健二, 中原真裕子 (2007) 淡水産オイカワ地理系統の関東地方河川における混生実態, 2007年度日本魚類学会年会

所 諭, 五箇公一, 米田昌宏, 国武陽子, 山根爽一 (2008) mtDNAからみたクロマルハナバチ *Bombus ignitus* 商品化による問題, 日本昆虫学会第68回大会

立田春樹, 五箇公一 (2008) 交雑で生じる形態変異ーアジア産ヒラタクワガタ種群を例にー日本昆虫学会第68回大会

高村健二, 中原真裕子 (2008) 同一河川に混在する淡水魚オイカワ地理系統の繁殖状況, 日本生態学会第55回大会

高村健二, 中原真裕子 (2008) 関東河川へのオイカワ琵琶湖系統の侵入と関東系統との交雑, 2008年度日本魚類学会年会

高村健二 (2008) 生物多様性ホットスポット琵琶湖からの侵入種ー関東の陸水からの視点ー日本陸水学会第73回大会

高村健二, 中原真裕子 (2009) 琵琶湖からの導入による関東河川における淡水魚地理系統の混在? オイカワとウグイの比較ー, 第56回日本生態学会大会 (ESJ 56)

米田昌浩, 古田春樹, 土田浩治, 岡部貴美子, 五箇公一 (2007) 体内寄生性マルハナバチポリプダニの生態と潜在的感染力, 第54回日本生態学会大会

国際学会発表

五箇公一, 米田昌浩 (2006) Ecological risks caused by introduced insects-The case of European bumblebee and exotic stag beetles, 第七届全国生物多様性保護与持続利用検討会

五箇公一, 米田昌浩 (2006) Ecological risks caused by introduced insects-The case of European bumblebee and exotic stag beetles, 中国昆虫学会2006年学術年会)

Goka K. (2007) Biological invasion caused by commercialization of stag beetles in Japan, Eco Summit 2007

Goka K. (2008) Bio-economic risks of invasive alien arthropods, 4th Pan Pacific Conference on Pesticide Science

Goka K. (2009) Exotic Pet Animals Influencing Biodiversity in the World, 11th Pacific Science Inter-Congress

米田昌浩, 五箇公一 (2006) Present situations of bumblebee pollination in tomato greenhouse in Japan, 第七届全国生物多様性保護与持続利用検討会

米田昌浩, 五箇公一 (2006) Present situations of bumblebee pollination in tomato greenhouse in Japan, 中国昆虫学会2006年学術年会

Nishizawa T., Nakajima N., Aono M., Tamaoki M., Kubo A., Saji H. Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations. Plant Biology 2009 in Hawaii

Nishizawa T., Nakajima N., Tamaoki M., Aono M., Kubo A., Saji H. Development of effective species-specific DNA markers using DNA arrays. Plant Biology 2009 in Hawaii

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告
SR-88-2009

平成 21 年 9 月 30 日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会

発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川16番2
電話 029-850-2343 (ダイヤルイン)

印 刷 株式会社コームラ

〒501-2517 岐阜市三輪ぷりんとびあ3

Published by the National Institute for Environmental Studies
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan
September 2009

無断転載を禁じます

リサイクル適性の表示：紙へリサイクル可

本冊子は、グリーン購入法に基づく基本方針における「印刷」に係る判断の基準にしたがい、印刷用の紙へのリサイクルに適した材料「Aランク」のみを用いて作製しています。

