

大分県大分川水系から得られたシマドジョウと その生物地理学的起源

北川えみ¹・星野和夫²・岡崎登志夫³・北川忠生⁴

¹〒631-0061 奈良市三碓3-2 おさかな総合研究所

²〒870-0872 大分市高崎山下海岸 大分生態水族館

³〒236-8648 横浜市金沢区福浦2-12-4 中央水産研究所

⁴〒631-8505 奈良市中町3327-204 近畿大学農学部水産学科

(2004年1月22日受付；2004年4月15日改訂；2004年4月24日受理)

キーワード：シマドジョウ，4倍体，胸鰓基部骨質盤 (*lamina circularis*)，大分川水系，生物地理

魚類学雑誌
*Japanese Journal of
Ichthyology*

© The Ichthyological Society of Japan 2004

Emi Kitagawa, Kazuo Hoshino, Toshio Okazaki and Tadao Kitagawa*. 2004. *Cobitis biwae* from Oita River system in Oita Prefecture, Japan, and its biogeographic origin. *Japan. J. Ichthyol.*, 51(2): 117–122.

Abstract The distribution range of the Japanese spined loach *Cobitis biwae* is in the middle stretches of rivers in most of Honshu and Shikoku Islands. In Kyushu Island, its close relative, the *yamato* complex sensu Saitoh et al. (2000), is distributed, but *C. biwae* is thought to be absent there. Comparison of the morphological characters and erythrocytic size revealed that the specimens of *Cobitis* collected from the Oita River system in Kyushu Island are the tetraploid form of *C. biwae*. Subsequent mitochondrial DNA analyses also supported this finding. Taking the connection pattern of drainages during glacial periods into consideration, it is suggested that *C. biwae* from the Oita R. s. is native.

*Corresponding author: Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nara 631-8505, Japan (e-mail: tkitagaw@nara.kindai.ac.jp)

シマドジョウ *Cobitis biwae* はドジョウ科シマドジョウ亜科に属する日本固有種で、主に河川中流域の砂質底を好んで生息する純淡水魚である。本種は山口県西部などを除く本州全域と南西部を除く四国全域の広範囲にわたり分布している（細谷, 2000; 君塚, 2001）。これより西方、すなわち山口県の一部と九州全域には形態的に本種と酷似する同属のヤマトシマドジョウ種群 *yamato* complex sensu Saitoh et al. (2000) が分布しており、その日本海側の境界にあたる山口県の阿武川水系を除き両種の生息域は重なっていない（藤岡, 1978; 細谷, 2000）。これら2種は体側部中央に点列状の斑紋列をもつことから、西日本各地に分布し縦帯状の斑紋をもつ同属のスジシマドジョウ種群 *striata* complex sensu Saitoh et al. (2000) とは

基本的には区別可能であるが（細谷, 2000）、スジシマドジョウ種群の一部の地方種族には点列状の斑紋列をもつものがおり、斑紋による識別が困難な場合がある（相澤, 1981）。このような種間の形態的類似性に加え各種内におけるその地理的変異性も極めて高いため、シマドジョウ属の分布についてはこれまで混乱を極めていた。しかし、シマドジョウの成熟雄個体に限っては、胸鰓基部骨質盤 (*lamina circularis*) の形状がシマドジョウでは細長状、ヤマトシマドジョウ・スジシマドジョウ種群では円盤状であることから他種と識別することができる（池田, 1936; 池田, 1937a）。また未成熟個体や雌個体では有効な分類形質が乏しいが、腹椎・尾椎数の構成や背鰓の位置が分類に有効であることが報告されているため（相澤, 1981; 澤

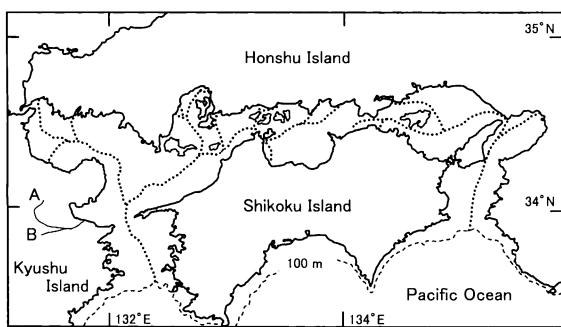


Fig. 1. Geographic locality of the Oita River system (A, Oita R.; B, Nanase R.). The connection pattern of drainages in the western Japan during the last glacial period (Kaizuka et al., 1995) (dotted lines) and the 100 m depth contour line (broken line) are also shown.

田・相澤, 1983), これらを精査することにより信頼性の高い同定が可能である。

今回, 著者らが九州大分県大分川水系より得たシマドジョウ属の標本について各種形質を精査した結果, これらがシマドジョウ4倍体であることを確認した。さらにミトコンドリアDNA(mtDNA)を対象とした制限断片長多型(RFLP)分析およびシークエンス分析もこの同定結果を支持した。これらの結果と氷期における河川の連結様式から, 大分川水系のシマドジョウ4倍体が自然分布である可能性について検討した。

材料と方法

標本採集と形態分析

1996年7月大分県大分川本流からタモ網により採集した神奈川県立生命の星・地球博物館所蔵の1個体(KPM-NI 009112, 性別不明), 1997年10月にその支流である大分県七瀬川から採集した同所蔵の6個体(KPM-NI 009106-009107-009111, ♂; KPM-NI 009108-009110, ♀)と2003年8月に同支流から採集した近畿大学農学部水産学科所蔵の5個体(FKUN 033204-033206, ♂; FKUN 033202-033203, ♀)を用いた(Fig. 1)。

採取した標本は倍数性確認のため生かしたまま実験室に持ち帰った。まず頸椎または鰓部分の切断により採血して血液塗抹標本を作製した。顕微鏡下にて1個体あたり赤血球20個の長径を計測し, Sezaki and Kobayashi (1978) の報告に基づき倍数性を決定した。続いて各標本を70%エタノール溶液で固定した後, 相澤(1981), 澤田・相澤(1983)が日本産シマドジョウ属の分類形質として

比較している体側部の斑紋, 雄の胸鰭基部骨質盤の形状, 腹椎・尾椎数の構成および背鰭の位置の4形質について精査した。なお, 腹椎・尾椎数の構成および背鰭の位置の計測には軟X線写真を用いた。

mtDNAのPCR-RFLP分析

決定的な分類形質をもたない未成熟個体や雌個体が胸鰭基部骨質盤の形態により種同定された成熟雄個体と同一種であるのかどうかを確かめるため, mtDNAを対象としたPCR-RFLP分析を行った。前述の標本, 計12個体から Asahida et al. (1996) に従い核DNAを含む全DNAを抽出後, Kitagawa et al. (2001) のイシドジョウの研究で用いられたプライマーセット (L鎖側 5'-GGC TCG CCT GTT TAC CAA AAA CAT-3', H鎖側 5'-GGT ATG GGC CCG AAA GCT TT-3') によりND1遺伝子を含む約2.0 kbpの領域をPCR法により増幅した。PCR反応条件は94°C-120秒に続いて, 94°C-60秒, 50°C-60秒, 72°C-120秒の3段階の温度サイクルを30回, 最後に72°C-300秒とした。引き続き行ったRFLP分析では4塩基認識型の3制限酵素(HaeIII, Hhal, HinfI)を用いて処理した。制限酵素反応は各試薬に添付されているプロトコールに従った。制限酵素処理後, 反応液を3%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い各DNA切断片を分離した。その後, 臭化エチジウム染色, 紫外線写真撮影を行いバンドパターンを検出し各個体間で比較した。比較のため福岡県筑後川水系産ヤマトシマドジョウ(KPM-NI 009170, ♂)1個体から抽出した全DNAについて同様の処理を行い, 同一ゲル上で電気泳動を行った。

mtDNAチトクロームb遺伝子領域のシークエンス分析

大分川水系集団の生物地理学的起源解明を目的としてシークエンス分析を行った。プライマーセット (L鎖側 5'-TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG-3', H鎖側 5'-RGC RAA KAR RAA RTA YCA TTC-3'; Palumbi et al., 1991) を用いて, 七瀬川から採集された1個体(KPM-NI 009106)からチトクロームb遺伝子領域の一部(約850 bp)をPCR法により増幅した。PCR反応条件は94°C-120秒に続いて, 94°C-60秒, 53°C-60秒, 72°C-120秒の3段階の温度サイクルを30回, 最後に72°C-300秒とした。PCR反応後, その産物をQIAquick PCR Purification Kit (Qiagen社製)を用いて精製し,

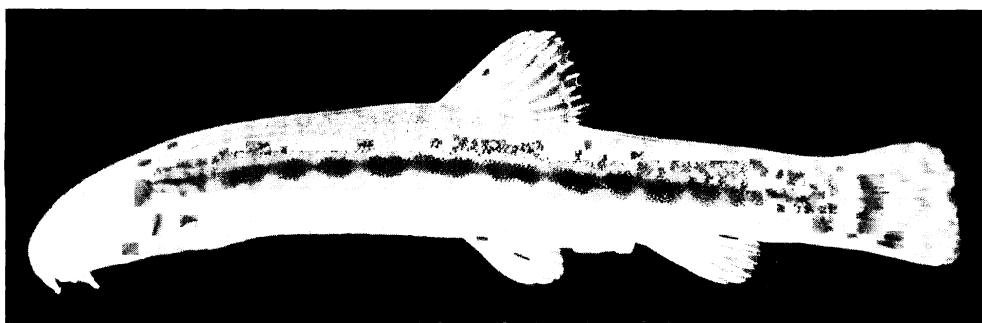


Fig. 2. *Cobitis biwae*, collected from the Nanase River. KPM-NI 009111, male, 70.4 mm SL.

シークエンス反応の鋳型として用いた。シークエンス反応は Big Dye Terminator Reaction Kit (Applied Biosystems社製) を用いて行い、このときの条件はキットに添付のプロトコールに従った。なお、シークエンス反応時のプライマーは PCR 反応時と同じものを用いた。DNA 塩基配列の読み取りには DNA シークエンサー ABI 377 (Applied Biosystems社製) を用い、このときの操作はプロトコールに従った。得られた塩基配列データは DDBJ/EMBL/GenBank に登録後（アセッションナンバー AB158348），Kitagawa et al. (2003) が報告した日本各地のシマドジョウ集団の塩基配列データと比較した（アセッションナンバー AB039344–AB039347, AB084388–AB084414）。操作上の外群として Perdices and Doadrio (2001) によって報告されたヨーロッパ産ドジョウ科3種 (*Sabanejewia balcanica*, *Misgurnus fossilis*, *Orthrias barbatulus*) を用いた（アセッションナンバー AF263095, AF263097, AF263098）。距離行列の算出には Kimura (1980) の2変数モデルを用い、樹形図の構築は近隣結合 (NJ) 法 (Saitou and Nei, 1987) により行った。樹形の信頼性の統計学的評価は 1000 回の繰り返しによるブーストランダム分析 (Felsenstein, 1985) により行った。上記の計算には系統解析ソフト MEGA ver. 2.0 (Kumar et al., 2001) を用いた。

結果

体側斑紋 大分川水系のシマドジョウ属標本 12 個体全ての体側部斑紋を観察した結果、全てが体側中央に 11–14 個の暗褐色斑をもつ点列型で、シマドジョウ、ヤマトシマドジョウの色斑型に該当した (Fig. 2)。

雄の胸鰓基部骨質盤の形状 全ての雄個体標本 ($n=6$) について池田 (1936, 1937a) に基づき胸鰓基

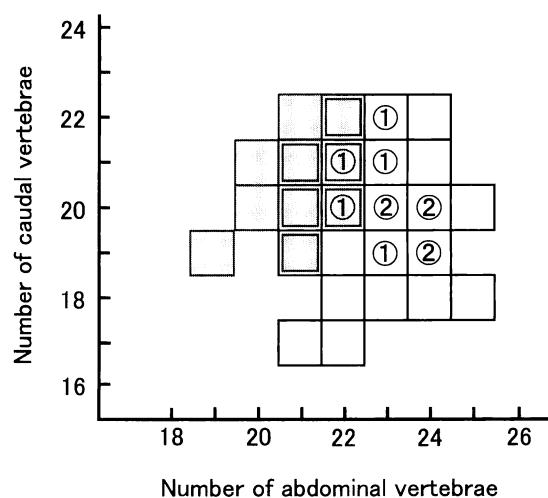


Fig. 3. Vertebral compositions of *Cobitis biwae*, collected from the Oita River system. Numbers of individuals are shown in circles. Open and shadow areas respectively indicate the ranges of *C. biwae* and the *yamato* complex sensu Saitoh et al. (2000) reported in Sawada and Aizawa (1983).

部骨質盤の形状から種の同定を行った結果、全て細長い形状でありシマドジョウと同定された。

腹椎・尾椎数の構成および背鰓の位置 標本の保存状態の良好な 11 個体について軟 X 線写真撮影を行い腹椎・尾椎数の計測および背鰓の位置の確認を行った。脊椎骨数は尾部棒状骨を含めて計数し、腹椎・尾椎の区分は松原 (1955) に従った。ウェーベル器官に関与する 4 本の脊椎骨を含めた腹椎・尾椎数の構成を Fig. 3 に示した。今回の結果を澤田・相澤 (1983) のシマドジョウとヤマトシマドジョウの値と比較するとシマドジョウの値によく一致した。背鰓の位置は澤田・相澤 (1983) に基づき、背鰓の第 1 担鰓骨が挿入する脊椎骨よりも前にある脊椎骨数を計測した。大分川水系の 11

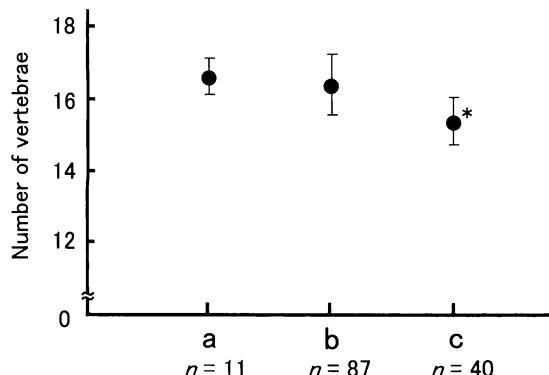


Fig. 4. Position of dorsal fin origin expressed as the number of vertebrae in front of the first proximal pterygiophore (mean±SD). The number of *Cobitis biwae*, collected from the Oita River system (a) are compared with those of *C. biwae* (b) and the *yamato* complex sensu Saitoh et al. (2000) (c) reported in Sawada and Aizawa (1983). Asterisk indicates significantly different from others ($P<0.01$, LSD test).

個体における計測値は 16.6 ± 0.5 (標準偏差) であった。この値は澤田・相澤 (1983) の報告したシマドジョウの値 (16.4 ± 0.8) に近似しており、ヤマトシマドジョウの値 (15.4 ± 0.7) との間に有意差が認められた ($P<0.01$, LSD 検定; Fig. 4)。

倍数性 全12個体について血液塗抹標本から赤血球長径を測定した結果、その範囲は $15.0\text{--}15.9\,\mu\text{m}$ であった。この値は Sezaki and Kobayashi (1978) の報告した2倍体集団の値 ($10.54\text{--}12.63\,\mu\text{m}$) ではなく、4倍体集団の値 ($14.84\text{--}16.03\,\mu\text{m}$) の範囲内にあり全て4倍体と判定された。

mtDNAのPCR-RFLP分析 全12個体について分析を行った結果、3種類の制限酵素において全て同一の切断型を示し、比較に用いたヤマトシマドジョウとは異なる切断型を示した (Fig. 5)。したがって、胸鰓基部骨質盤による種の同定が不可能であった未成熟個体 ($n=1$) と雌個体 ($n=4$) もシマドジョウと同定された雄個体と同じmtDNAをもつことが確認された。

mtDNAチトクロームb遺伝子領域のシークエンス分析 Kitagawa et al. (2003) は全国各地から採集したシマドジョウのmtDNAの塩基配列から樹形図を構築し、これらが東日本・西日本・高知の3地域間で著しく遺伝的分化を遂げていること、また本州および四国の瀬戸内海流入河川を中心に広く分布している4倍体集団が西日本のグループに

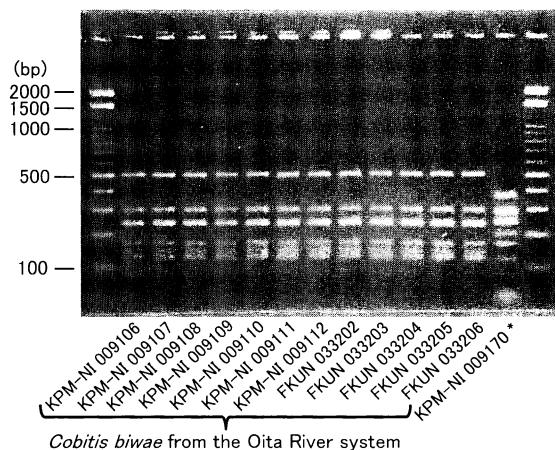


Fig. 5. Electrophoretic patterns of mtDNA ND1 region of *Cobitis biwae*, collected from the Oita River system, digested with HaeIII. Asterisk indicates the *yamato* complex sensu Saitoh et al. (2000) from the Chikugo River system, Fukuoka Prefecture. Both sides in this gel are DNA size markers (100 bp ladders).

含まれる遺伝的分化程度の低い単系統群であることを示した。本研究により得られた大分川水系産シマドジョウ4倍体の塩基配列データを Kitagawa et al. (2003) のデータセットに加え樹形図を再構築した結果、大分川水系産シマドジョウ4倍体は他の4倍体集団から成る単系統群に含まれた (Fig. 6)。

考 察

今回得られた大分川水系のシマドジョウ属の個体のうち、雄個体については胸鰓基部骨質盤の形状からシマドジョウ *C. biwae* であると同定できた。また、形態からは確実な種同定が困難である未成熟個体や雌個体においても、腹椎・尾椎数の構成および背鰓の位置を精査した結果と mtDNA の PCR-RFLP 分析結果から雄個体と同様にシマドジョウであると推定された。また血球サイズ計測や mtDNA のシークエンス分析の結果から、大分川水系から得られた個体が本州および四国の瀬戸内海沿岸地域に広く分布しているシマドジョウ4倍体集団と同質のものであることが示唆された。

「レッドデータブックおおいた」(大分県生活環境部生活環境課, 2001) では、本研究で精査した大分川水系にはヤマトシマドジョウが分布していると報告されている。しかし、本研究の結果は本水系のシマドジョウがヤマトシマドジョウとして誤同定されている可能性を示している。九州におけ

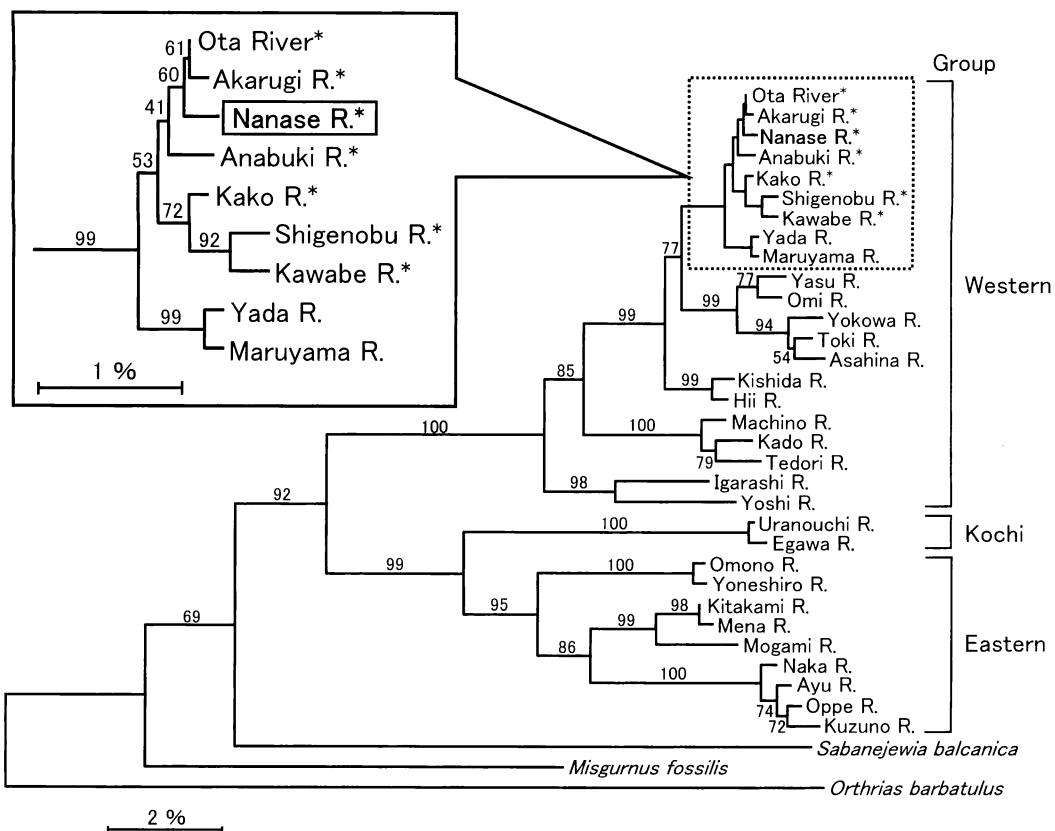


Fig. 6. Interspecific relationships of *Cobitis biwae* based on the cytochrome *b* sequence (748 bp). Neighbor-joining (NJ) tree was constructed based on sequence divergence by Kimura (1980). OUT of the Nanase R. enclosed by square is analyzed in this study. Asterisks indicate individuals from the tetraploid populations. Bootstrap probabilities (%) with 1000 replications are shown for each cluster. Locality and group names correspond to those in Kitagawa et al. (2003).

るシマドジョウの分布については過去に池田 (1937b) および Okada and Ikeda (1939) が胸鰓基部骨質盤の形状に基づいて大分川水系におけるシマドジョウの分布を報告していた。しかし、Kimizuka and Kobayasi (1983) が大分川水系から得た標本を胸鰓基部骨質盤の形状と体側斑紋に基づいて再検証しヤマトシマドジョウと同定して以来、九州にはシマドジョウが分布していないとの見解が現在も広く受け入れられている (細谷, 2000; 君塚, 2001)。本研究の結果は池田 (1937b) の報告を支持し、Kimizuka and Kobayasi (1983) の誤同定を示唆するものである。

いくつかの淡水魚では、アユ種苗の放流に伴った混合放流によりその本来の分布域の搅乱が知られている。しかし、大分川水系ではアユ種苗の放流を実施している漁協の設立 (1952年) 以前の大分川水系に既に池田がシマドジョウの生息を報告していることや、漁協の設立以降のアユ種苗採集地

が大分県内河川・海域、宮崎県延岡市河川、鹿児島県内河川、琵琶湖 (大分川漁協、私信) といずれもシマドジョウ4倍体の分布域に該当しないことから、大分川水系のシマドジョウはアユ種苗の放流に伴った他産地からの移入ではないと考えられる。

シマドジョウ4倍体は本州および四国の瀬戸内海流入河川を中心に広く分布していることが報告されている。これは瀬戸内地域において誕生したシマドジョウ4倍体が、瀬戸内地域にかつて存在した大淡水域を経てその分布域を広げた結果であると説明されている (Kimizuka and Kobayasi, 1983)。また Kitagawa et al. (2003) のmtDNAデータは、これらシマドジョウ4倍体が比較的最近 (第4紀以降に) 誕生し現在の分布域に広がったこと示している。これらのことより、第4紀の氷期の海退による河川の連結がシマドジョウ4倍体の分布域拡大に大きく貢献した可能性が示唆される。貝

塚ほか(1995)は最終氷期における瀬戸内地方の河川の連結様式を推測し、現在九州北東部を流れる河川もその大水系に含まれていたと報告している(Fig. 1)。このような河川の連結様式を考慮すると、本州・四国の瀬戸内海流入河川に生息しているシマドジョウ4倍体が大分川水系に自然分布していくてもおかしくない。これらが自然分布であれば、この地域における魚類相の成立と大きく関連した貴重な資料に成りうる。今後、大分川近隣河川についても詳細な調査を行う必要がある。

謝 辞

軟X線写真の撮影には独立行政法人水産総合研究センターの河村功一博士(現・三重大生物資源学部)、近畿大学農学部の久保喜計氏、前田貴志氏にご協力頂いた。近畿大学大学院農学研究科の久米幸毅氏、森宗智彦氏には標本採集においてご協力頂いた。神奈川県立生命の星・地球博物館の瀬能 宏博士には標本の登録・保管においてご協力頂いた。愛媛県中予水産試験場の清水孝明氏、愛媛大学名誉教授の水野信彦博士、近畿大学農学部の細谷和海博士には文献収集においてお世話になった。大分川漁協の方々には過去の種苗放流に関する情報提供をして頂いた。また、2名の匿名査読者には原稿の改訂にあたり有益なご助言を頂いた。ここに記して厚く御礼申し上げる。

引 用 文 献

- 相澤裕幸. 1981. 東海地方から得られた *Cobitis taenia*. 魚類学雑誌, 28: 187-192.
- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. Fish. Sci., 62: 727-730.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783-791.
- 細谷和海. 2000. ドジョウ科. 中坊徹次(編), pp. 272-277. 日本産魚類検索—全種の同定, 第2版. 東海大学出版会, 東京.
- 藤岡 豊. 1978. 山口県におけるシマドジョウ属について. 淡水魚, 4: 110-114.
- 池田兵司. 1936. 日本産ドヂヤウ科魚類の雌雄性徵と其分類に就て I. ドヂヤウ *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor) とシマドヂヤウ2種 *Cobitis biwae* Jordan and Snyder, *Cobitis taenia striata*, subsp. nov. 動物学雑誌, 48: 983-994.
- 池田兵司. 1937a. 日本産ドヂヤウ科 Cobitidae 魚類の性徵とその分類の考察 (II). *Cobitis taenia japonica* Schlegelに就て. 動物学雑誌, 49: 4-8.
- 池田兵司. 1937b. 築後川水域(福岡県)の淡水魚相に見られる大陸系魚類の浸潤に就て. 博物学雑誌, 35 (60): 108-118.
- 貝塚爽平・成瀬 洋・太田陽子・小池一之. 1995. 日本の平野と海岸. 日本の自然4, 岩波書店, 東京. 248 pp.
- Kimizuka, Y. and H. Kobayashi. 1983. Geographic distributions of karyological races of *Cobitis biwae* (Cobitidae). Japan. J. Ichthyol., 30: 308-312.
- 君塚芳輝. 2001. シマドジョウ. 川那部浩哉・水野信彦・細谷和海(編), pp. 392-393. 日本の淡水魚, 第3版. 山と渓谷社, 東京.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol., 16: 111-120.
- Kitagawa, T., M. Watanabe, T. Kobayashi, M. Yoshioka, M. Kashiwagi and T. Okazaki. 2001. Two genetically divergent groups in the Japanese spined loach, *Cobitis takatsuisensis*, and their phylogenetic relationships among Japanese *Cobitis* inferred from mitochondrial DNA analyses. Zool. Sci., 18: 249-259.
- Kitagawa, T., M. Watanabe, E. Kitagawa, M. Yoshioka, M. Kashiwagi and T. Okazaki. 2003. Phylogeography and the maternal origin of the tetraploid form of the Japanese spined loach, *Cobitis biwae*, revealed by mitochondrial DNA analysis. Ichthyol. Res., 50: 318-325.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics, 17: 1244-1245.
- 松原喜代松. 1955. 魚類の形態と検索I. 石崎書店, 東京. 789 pp.
- Okada, Y. and H. Ikeda. 1939. A revision of the Japanese striped loaches, referred to the genus *Cobitis*. Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku, Sec. B, 4 (69): 89-104.
- 大分県生活環境部生活環境課. 2001. レッドデータブックおおいた—大分県の絶滅のおそれのある野生生物—. 大分県自然環境学術調査会野生生物専門部会, 大分県. 507 pp.
- Palumbi, S. R., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillan, L. Stice and G. Grabowski. 1991. The simple fool's guide to PCR, ver. 2. University of Hawaii, Honolulu. 45 pp.
- Perdices, A. and I. Doadrio. 2001. The molecular systematics and biogeography of the European cobitids based on mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 19: 468-478.
- Saitoh, K., T. Kobayashi, R. Ueshima and K. Numachi. 2000. Analyses of mitochondrial and satellite DNAs on spined loaches of the genus *Cobitis* from Japan have revealed relationships among populations of three diploid-tetraploid complexes. Folia Zool., 49(Suppl. 1): 9-16.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406-425.
- 澤田幸雄・相澤裕幸. 1983. シマドジョウの学名について. 魚類学雑誌, 30: 318-323.
- Sezaki, K. and H. Kobayashi. 1978. Comparison of erythrocytic size between diploid and tetraploid in spinous loach, *Cobitis biwae*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 44: 851-854.