

# 宮城県内に生息するメダカのルーツを探る

## —高校生による高校生のための分子生物学特講—



実施担当者 宮城県仙台第一高等学校  
教諭 小松原 幸弘

### 1 はじめに

昨年度から継続して、宮城県内の3つの高校（宮城県岩ヶ崎高等学校、宮城県利府高等学校、仙台城南高等学校）の自然科学部と連携し、宮城県内各地に生息するメダカに関する共同研究を行った。生息地の環境の比較、形態的な特徴の比較、遺伝子解析の3つの観点に加え、今年度は新たに環境DNAの手法を取り入れた。共同研究の実施に先だって、環境DNAについて学ぶため神戸大学を、メダカの遺伝的多様性を学ぶため宇都宮大学を訪問した。その成果をもとに3回のミーティングを開催した。ミーティングでは、本校の生物部員が企画運営して、研究方法に関する探求の実験講座「高校生による高校生のための分子生物学特講」を実施した。昨年度の講座では、メダカの形態的特徴に関する特徴や、DNA抽出法、PCR法による遺伝子増幅、電気泳動法による遺伝子の確認、シーケンサーによる塩基配列の決定、MEGA6を用いたデータベースとの比較、分子系統樹の作成法など、様々な分子生物学的手法を学んだが、今年度はさらに、環境DNAについて原理を学び、採水から環境DNAの抽出、リアルタイムPCRによるメダカ特有の環境DNAの検出を実際に行った。各校で学校周辺から採水した環境水から、本校生物部がまとめて環境DNAを抽出した。この環境DNAから、メダカ特有の環境DNAの検出を試みた。研究成果はポスターにまとめ、宮城県理科研究発表会や日本分子生物学会・日本生物教育学会・日本生態学会・日本水産学会に参加し、高校生のポスター発表として発表した。

「高校生による高校生のための分子生物学特講」は、生物部の日頃の研究成果を還元するアウトリーチ活動の一環として、また意欲的な高校生の科学リテラシーを高めることを目的とし、平成25年度より3年間にわたって実施してきたものである。県内の高校から希望者を募り、生物部員がパワーポイントによるプレゼンテーションを作り、講義から実験指導までを自分たちの手で行い、「手動PCRによる遺伝子組換え作物の検出」を体験するものである。本事業では宮城県内に生息するメダカを題材として扱う。

共同研究の主題として扱うメダカは、生物部の研究として平成25年度より調査を進めてきたものである。宮城県の松島湾にある塩竈市浦戸諸島の一つである寒風沢島には、周囲が海に囲まれた島であるにもかかわらず、古くからメダカが生息していることが知られている。平成23年の東日本大震災で、寒風沢島は津波による大きな被害を受けた。津波の影響でメダカの絶滅が危惧されたが、平成25年からの本校生物部の調査では、毎年メダカの生息が確認されている。このメダカの起源を解明することを目的として、寒風沢島の3カ所から採集し、DNAを抽出、ミトコンドリアのシトクロームb遺伝子領域(1141bp)のDNA塩基配列の解析を行い、データベースと比較した。また、メダカの形態的な特徴についても観察を行った。その結果、遺伝的に2つの系統のミナミメ

ダカが生息していることがわかった。今回は宮城県内全域のメダカと比較することで、その起源を明らかにするものである。また、環境 DNA という新しい手法を用いて調査地点を増やし、より多くの情報を得ることを試みた。

## 2 大学との連携

### 2-1 神戸大学大学院人間発達環境学研究科准教授源利文先生

5月14日(日)・15(月)研究室を訪問し、環境 DNA の原理・抽出・検出について、源利文先生から直接指導して頂いた。

また、12月8日(金)日本分子生物学会に参するため再び神戸を訪れた際、研究室を訪問し、追加実験をさせて頂いた。さらに、研究室のみなさんに翌日行う口頭発表・ポスター発表を聞いて頂き、質疑応答やアドバイスを頂いた。



### 2-2 宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター教授松田勝先生

6月5日(月)研究室を訪問し、日本におけるメダカの遺伝的多様性についてお話を伺った。また、研究施設を見学させて頂いた。

12月17日(日)第3回ミーティングでは、松田先生をお招きし、日本のメダカの遺伝的多様性について講義を頂いた。その後各校の研究成果発表では、質問や助言を頂いた。



### 2-3 東北大学大学院生命科学研究所植物生殖遺伝分野教授渡辺正夫先生

7月から毎日のように放課後訪れ、リアルタイム PCR を行わせて頂いた。渡辺先生や技術職員の高田美信先生の指導のもと、本校実験室で抽出した環境 DNA からメダカ特有の環境 DNA の検出を試みた。

11月19日(日)第2回ミーティングでは研究室を訪問し、リアルタイム PCR を行った。また、渡辺先生の案内で研究施設の見学を行わせて頂いた。



## 3 分子生物学特講

### 3-1 第1回ミーティング

9月16日(日)本校生物室で実施した。本校と宮城県岩ヶ崎高等学校、宮城県利府高等学校、仙台城南高等学校で生徒10名、教員5名が参加した。本校生物部員が昨年度の研究成果を発表し、今年度の研究方針について説明した。また、自作のパワーポイントを用いて環境 DNA について講義を行い、くみ取った環境水から環境 DNA の抽出を体験した。



### 3-2 第2回ミーティング

11月19日(日)生徒9名、教員4名が参加して実施した。午前中は本校生物室で、ろ過ガラスフィルタから環境 DNA を抽



出した。午後は東北大学の渡辺研究室に移動し、抽出した環境 DNA を用いてメダカ特有の DNA の検出を体験した。また、渡辺先生の案内で研究室見学を行った。渡辺先生には、研究について様々な講話をして頂いた。

### 3-3 第3回ミーティング

12月17日(日)本校生物室で、生徒9名、教員5名が参加して実施した。宇都宮大学から松田先生をお招きし、午前中はメダカの分布や種の分化について、教科書レベルから専門的な深い内容まで学んだ。午後は、各校ポスターを用いて研究発表会を行った。松田先生からは鋭い質問や暖かい助言を頂いた。

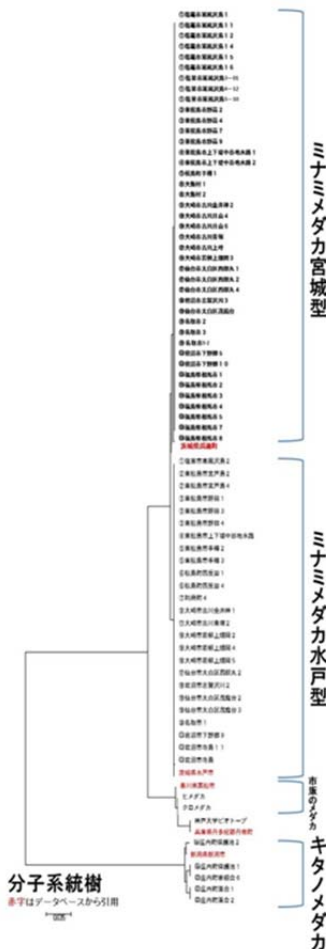


## 4 研究について

### 4-1 概要

宮城県内で採集した258個体、山形県内で採集した16個体、福島県で採集した8個体について形態観察を行った。また、その中から72個体についてミトコンドリアのシトクロームb遺伝子(1141bp)の遺伝子解析を行った。宮城県内44ヶ所、山形県内3ヶ所、福島県内9ヶ所で採水し、抽出した環境DNAについてメダカDNAの検出を試みた。

### 4-2 形態観察



体後部の網目模様、尾鰭基底の黒色斑紋、

背びれの切れ込み、銀色の鱗の枚数の4点に注目し、採集した各個体について形態を観察した。体後部の網目模様、尾鰭基底の黒色斑紋、背びれの切れ込みについては宮城県・福島県で採集した個体と山形県で採集した個体ではっきりした違いが見られ、宮城県・福島県はミナミメダカ、山形県はキタノメダカの特徴を持っていた。銀色鱗の枚数については、ミナミメダカは0~9枚、キタノメダカは10~23枚とされているが、はっきりした差は見られなかった。

	尾鰭基底の黒色斑紋		体後部の網目模様		背びれの切れ込み		銀色鱗	
	弓状	ゼリービーンズ状	有り	無し	浅い	深い	10~	0~9
宮城県	0	258	34	215	0	82	76	165
福島県	0	8	0	8	0	0	1	4
山形県	16	0	16	0	7	0	11	5

### 4-3 遺伝子解析

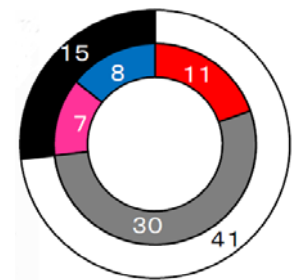
尾ひれの断片からDNAを抽出、DNA量を測定したのち、PCR法・電気泳動法によりミトコンドリアのシトクロームb遺伝子領域を含む約1.2kbのDNA断片を増幅し、外注によりその塩基配列を得た。遺伝子解析ソフトMEGA6を用いてデータベース上の日本各地のメダカから得られた塩基配列と比較検討した。宮城県・福島県で採集した個体はすべてミナミメダカ、山形県で採集した個体はすべてキタノメダカに属した。さらに宮城県内には、茨城県瓜連町に近い塩基配列を持つものと、茨城県水戸市と完全に一致する塩基配列を持つものの2種類のメダカが混在していることがわかった。福島県で採集したメダカはすべて茨城県瓜連町に近い塩基配列を持っていた。

## 4-4 環境 DNA

目視では生息を確認できなかった場所でもメダカに特異的な環境 DNA は検出された。一方、採集によってメダカの生息を確認したいくつかの地域において、メダカに特異的な環境 DNA が検出されないこともあった。

### 結果・考察

瓜連町に近い塩基配列の個体は、データベース上に一致するものがないこと、内陸部や寒風沢島に多く見られることから、宮城県・福島県固有である可能性が高い。水戸市と同じ塩基配列の個体は、平野部に多く見られることから、南から宮城県内に生息域を広げてきたと考えられる。実験系の再検討は必要であるが、環境 DNA による解析が有効であることが示唆された。結果が一致しなかった地点で再調査を行う必要がある。



□ 確認と検出結果が一致  
■ 再検討が必要  
■ メダカ確認&PCR検出  
■ メダカ未確認&検出なし  
■ PCR検出のみ  
■ メダカ確認のみ

## 5 学会参加

### 日本分子生物学会（高校生ポスター発表・口頭発表）

12月9日（土）「宮城県内のメダカのルーツを探る-環境 DNA を用いたメダカ調査法の確立-」

### 日本生物教育学会（高校生ポスター発表）

1月7日（土）「宮城県内のメダカのルーツを探る-環境 DNA を用いたメダカ調査法の確立-」

### 日本生態学会（高校生ポスター発表）

3月17日（土）「宮城県に生息するメダカのルーツを探る」  
「環境 DNA を用いて宮城県のメダカの生息状況を探る」

### 日本水産学会（高校生ポスター発表）

3月28日（水）「宮城県内に生息するメダカのルーツを探る  
-環境 DNA を用いたメダカの調査法の確立-」  
奨励賞を頂いたことは、今後の研究の大きな励みとなった。

## 謝 辞

ご指導・ご助言頂いた多くの皆様に感謝申し上げます。また、本事業実施に当たって公益財団法人中谷医工計測技術振興財団から多大な御支援を頂きましたこと厚く感謝申し上げます。

## 参考文献

Takehana, Y., N. Nagai, M. Matsuda, K. Tsuchiya & M. Sakaizumi (2003) Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Science*, 20: 1279-1291

Toshinobu Asai, Hiroshi Senou and Kazumi Hosoya (2011) *Oryzias sakaizumii*, a new ricefish from northern Japan (Teleostei: Adrianichthyidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, Vol. 22, No. 4, pp. 289-299

高原輝彦・山中裕樹・源利文・土居秀幸・内井喜美子(2016)「環境 DNA 分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心にして～」

以上