

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

2020 年度

修士論文

野生メダカ地域集団の塩分耐性に関する
比較生理学的研究

2021 年 1 月 18 日提出

指導教員 津田敦教授

清家嘉恵

目次

1. 序論	1
2. 材料と方法	3
2-1. 実験動物	3
2-2. 塩分耐性実験	3
2-3. 血漿 Na 濃度の測定	4
2-4. 統計処理	4
3. 結果	5
3-1. ヒメダカならびに近交系を用いた塩分耐性実験系の確立	5
3-2. 北日本集団・南日本集団の各系統の塩分耐性	5
3-3. 鶴岡系統と哲西系統の塩分耐性	6
4. 考察	7
<謝辞>	10
<文献>	11
<図表>	14

1. 序論

メダカ (*Oryzias latipes*) はダツ目に分類され、北海道を除く日本全土とアジア大陸東部の河川・池沼・水田などに生息し、成体でも体長約 3 cm~4 cm の小型淡水魚である。世代時間が短く雌雄判別が容易で、遺伝的に均一である近交系や突然変異個体などが多く開発されており、いち早くゲノム配列や染色体の構造が決定され、様々な研究に用いられてきた (宇和, 1990)。たとえば、**d-rR** 系統は性染色体に存在する体色の緋色を決める **r** 遺伝子座により、遺伝的な性別を体色で容易に判断できることから生殖研究に利用されてきた。この **d-rR** 系統から近交系化された **Hd-rR** がメダカゲノム解析に利用された。遺伝子導入やゲノム編集などの技術も確立され (Kimura et al., 2012)、分子生物学や遺伝学をはじめ、内分泌や生理学、発生学など様々な分野において、優れた実験動物として広く用いられている。

野生のメダカは前述したとおり北海道を除く日本全土に広く分布しているが、河川の水系ごとに異なる野生集団が存在することも知られている (Sakaizumi et al., 1983)。メダカの野生集団の分類に関しては、臀鰭軟条数の変異に関して 1950 年代に研究が進められ、日本海側に生息するメダカの方が太平洋側に生息するメダカに比べて軟条数が少ないという報告がされた (江尻, 1953; 江尻と吉野, 1958)。その後 1980 年代より遺伝的変異の網羅的な解析が進められ、全国 18 か所の野生メダカのアロザイム分析により、北方集団と南方集団との間には 5 種類の酵素において対立遺伝子の差が認められ (Sakaizumi et al., 1980)、次に全国 53 か所のメダカによる同様の分析から、その分布域が明瞭に分けられることが確認された (Sakaizumi et al., 1983)。その結果、それぞれ「北日本集団」と「南日本集団」と命名され区別されることとなった。さらに、丹後・但馬地方に南北集団のどちらも区別可能である「境界集団 (Hybrid)」が存在することが判明した (Sakaizumi, 1984; Takehana et al., 2016)。続いてアジア大陸に生息するメダカについても遺伝子の分析が進められた。中国由来のメダカと韓国由来のメダカは、日本由来の南北集団のどちらも異なる遺伝子型を持つことが確認された (Sakaizumi, 1986; Sakaizumi and Jeon, 1987; Takehana et al., 2004)。以上の結果より、現在メダカ (*O. latipes*) の野生集団は 4 つの遺伝的に区別されるグループに分けられている。すなわち、日本国内由来のものに 2 グループ存在し、青森県の東部から丹後半島の東側までの日本海側に生息する北日本集団と、北日本集団の生息域以外に生息する南日本集団である。さらに、朝鮮半島の東側由来の東韓集団と、朝鮮半島の西から中国大陆に由来する中国・西韓集団を加えた 4 つのグループである。前述した **Hd-rR** は南日本集団由来の近交系であり、北日本集団由来の近交系には **HNI** 系統などがある。

日本国内由来の北日本集団と南日本集団の間には、ゲノム解析によりアミノ酸コード領域で約 1%、アミノ酸非コード領域で約 3%の差が認められ、一塩基多型 (SNP) の数では約 1600 万個の違いが発見された (Kusahara et al., 2007)。この差はヒトとチンパンジーの差異として知られる 1.2%よりも大きく、この結果から両グループは約 400

万年以上前に分岐したと考えられている。ミトコンドリア DNA の全長配列データを元に分岐年代を推定した研究では、アジア大陸から日本列島の南北が分離し始めた約 1800 万年に北日本集団と南日本集団が分岐したとも考えられている (Setiamarga et al., 2009)。

北日本集団と南日本集団の間には遺伝子配列の違いだけでなく、形態や生理学的特徴にも違いがあることが報告されている。両集団を比較すると、北日本集団の方が体側の鱗に黒色素胞が密に存在し、体全体が黒っぽいこと (Asai et al., 2011)、低温環境下で誘発される mtDNA 制御領域の繰り返し配列の回数に差があり高温・低温耐性に差異があること (Hirayama et al., 2010)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) の mRNA 発現量と血中コルチゾール濃度の測定結果から南日本集団の雄は高いストレス感受性を有し、集団間および雌雄間ではストレス感受性が異なること (Furuno et al., 2014)、南日本集団は北日本集団よりも雌雄間競争時に高い攻撃性を示すこと (Kagawa, 2014)、生息環境の嗜好性の差による群れの形成力の違いが生じること (Uono et al., 2011)、といった様々な南北集団間の差が報告されている。その一方で、南日本集団と北日本集団は完全に交配可能であり、同一種内の遺伝的多様性として捉えられている (Oda, 2016)。

さらには、上述した様々な差に加え、北日本集団の大館という系統においては、塩分環境下において胚の発生が進行しないことが見出された (Oda, 未発表)。メダカは、通常は淡水に生息するが、海水あるいは汽水に生息していた祖先から進化したと考えられており、環境水の塩分を徐々に上げて順化させることで海水にも適応できることが知られている (菊池, 1973)。すなわちメダカは広塩性であり、幅広い塩分・浸透圧環境に適応することが可能である。このことが、海外でよく用いられるゼブラフィッシュとは異なり、環境適応メカニズムの研究モデル生物としても優れている理由である。しかし、大館系統における結果は、北日本集団と南日本集団の間、あるいは野生系統間には、塩分耐性に関しても違いがあることを示唆している。北日本集団と南日本集団における塩分耐性の差を検討し、メダカの野生集団がどのような浸透圧環境に適応する能力を持つのかを知ることは、メダカ野生集団が日本列島の多様な環境に対してどのように分布域を拡大していったのか、さらには種分化の初期過程を明らかにすることにもつながることが期待できる。

そこで本研究では、近交系・突然変異体 6 系統、野生メダカ 17 系統の合計 23 系統を用いて、生存率と血液中の Na イオン濃度を指標として、北日本集団と南日本集団間、ならびに各野生系統における塩分耐性の違いを明らかにすることを目的に研究を進めた。

2. 材料と方法

2-1. 実験動物

メダカ (*Oryzias latipes*) の野生集団・近交系・突然変異系統の計 23 系統を用いた。野生メダカ集団は 1970 年代から 1980 年代にかけて日本全国各地の生息地より採集され、東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻動物生殖システム分野で管理されている、柏キャンパス新領域屋外メダカ飼育場において継代飼育されているものを使用させていただいた。野生集団は、北日本集団より大館・鶴岡・山形・両津・新潟・小杉の 6 系統、南日本集団より三島・芦部・田辺・徳島・哲西・賀陽・岡山・山陽・玖珠・延岡・喜界の 11 系統の合計 17 系統用いた (図 1)。また、集団による塩分耐性の差をより詳しく確認するために、遺伝的に均一である近交系から北日本集団由来の HNI と Kaga、南日本集団由来の Hd-rR と H05、東韓集団由来 SOK の 5 系統、鱗が欠損している突然変異体である RS3 の 1 系統も使用した (表 1)。また、実験条件を決定するための予備実験には近隣のペットショップにて購入したヒメダカを用いた。

2-2. 塩分耐性実験

実験は温度・光条件が管理された東京大学大気海洋研究所の飼育実験施設において行った。新たな飼育環境によるストレスの影響を考慮し、野外飼育場から大気海洋研所内の飼育実験施設へ移動後、実験用小水槽で 78 時間 (約 3 日間) 飼育した後に実験を開始した。

A. 移行実験条件の設定-1: 移行後サンプリングまでの時間

移行条件の設定は、ヒメダカを使用して行った。淡水水槽と 50%海水水槽を用意し、淡水水槽で飼育していたヒメダカ 25 尾を網ですくって 50%海水水槽に直接移した。移行後 1, 3, 6, 12, 24 時間に 5 尾ずつ網ですくい、0.05%の 2-フェノキシエタノール (Fuji Film Wako, Osaka, Japan) をよく懸濁させた 50%海水で麻酔した。血液に海水が混入することを防ぐため、メダカ全身を蒸留水にくぐらせたのち、キムワイプで水分をよくふき取った。その後仰向けに保定し、胸部より心臓を露出させ、ヘパリン処理を施したヘマトクリット毛細管を使用して動脈球から採血を行った (図 2)。ヘマトクリット遠心機にて 5000 回転で 10 分遠心することで血漿を分離し、後述するとおり Na イオン濃度の測定を行った。

B. 移行実験条件の設定-2: 移行させる塩濃度

塩分耐性能力の違いを最も効果的に検出できるように、移行させる塩濃度を変化させ、その影響を調べた。淡水、50%海水、80%海水、100%海水の水槽を準備し、淡水水槽で飼育したヒメダカを 50%海水、80%海水、100%海水にそれぞれ 10 尾ずつ、淡水から淡水へのコントロール群は 6 尾を、それぞれの実験区水槽に網を使って直接移した。3 時間後に、A で記述したとおり麻酔、採血を行った。

同様の実験を北日本集団由来の近交系である HNI と南日本集団由来の近交系である

Hd-rR でも行った。淡水水槽で飼育した両系統を、50%海水水槽と 80%海水水槽に 25 尾ずつ網を使って移し、1, 3, 6, 12, 24 時間後に 5 尾ずつ採血した。なお、80%海水では 6 時間以内に全ての個体が死亡してしまったため、鰓蓋の動きが確認できなくなった時点で死亡と判断し、採血を行った。コントロールとして、淡水水槽から淡水水槽に移したものを使用した。

C. 野生系統ならびに近交系個体における塩分耐性実験

淡水水槽と 2/3 希釈海水 (67%SW) を準備し、淡水水槽から 67%海水水槽に 4~6 尾、網を用いて直接移し、3 時間後に麻酔と採血を行い、血液中の Na 濃度を調べた。コントロールには淡水水槽から淡水水槽に移したものを使用した。

D. 鶴岡系統ならびに哲西系統における塩分耐性実験

塩分耐性が高い哲西系統と、低い鶴岡系統の 2 系統に絞り、異なる塩分環境への適応能力を調べた。淡水、67%海水、80%海水、100%海水の各水槽を準備し、淡水水槽で飼育した各系統のメダカを67%海水、80%海水に7尾ずつ、100%海水の水槽に哲西系統は 6 尾、鶴岡系統は 7 尾を網を用いて直接移し、生存率を 24 時間調べた。

2-3. 血漿 Na 濃度の測定

前述の通り、動脈球から採血した血液から血漿を分離し、2 μ L の血漿を 2 mL のイオン交換水で希釈し、原子吸光光度計 (Z5300; Hitachi, Tokyo, Japan) にて測定した。100 mM と 200 mM の標準液を準備し、検量線をもとに試料中の Na 濃度を算出した。

2-4. 統計処理

平均値の血漿 Na 濃度は平均値 \pm 標準誤差で表した。血漿 Na 濃度の平均値の比較は、対応のある一元配置分散分析により有意性を確認した後、多重比較には Tukey 法を用いた。データの分析にはカイプロット 5.0 並びに Microsoft Excel 2016 を使用し、 $P<0.05$ を有意とした。

3. 結果

3-1. ヒメダカならびに近交系を用いた塩分耐性実験系の確立

多数の野生系統を用いる実験を行う前に、ヒメダカを用いて塩分耐性実験系を確立した。まず、海水移行後サンプリングするまでの時間を決定するため、移行後 24 時間までの変化を経時的に調べた。メダカは徐々に馴致すれば 100%海水にも順応できるが、直接移行は不可能であることが知られている。そこで、確実に生存する塩濃度として 50%希釈海水を用いた。その結果、移行後 3 時間までに血漿 Na 濃度は上昇し、その後やや減少した後、12 時間後に再び上昇するという、2 段階での影響が認められた (図 3a)。本研究では、急性の変化に対応できるかどうかという観点から、最初に影響が出る 3 時間に設定することとした。次に、どのような塩分環境に移行させることが適切かを判断するため、50%海水、80%海水、100%海水という 3 つの異なる濃度に直接移行させ、3 時間後の血漿 Na 濃度の変化を調べた。その結果、50%海水では血漿 Na 濃度に有意な変化は認められなかったのに対して、80%海水に移行した際には血漿 Na 濃度に統計的に有意な上昇が認められた (図 3b)。なお、100%海水への直接移行では血漿 Na 濃度に変化がないように見えるが、生存率はわずかに 30%であり、比較的耐性の高かった個体の結果を反映したものと考えられた。それに対して 50%海水ならびに 80%海水に移行させた場合には生存率 100%であったことから、80%海水への移行が実験系として最適であることが示された。

さらに、北日本集団と南日本集団の代表として、それぞれに由来する近交系である HNI 系統ならびに Hd-rR 系統を用い、50%海水ならびに 80%海水に移行する実験を行った。その結果、80%海水への移行では、両系統とも 6 時間以内に全ての個体が死亡してしまうことがわかった (図 4c, d)。死亡時の血漿 Na 濃度は 200 mM を超えており、両系統では 80%海水への直接移行は無理であることがわかった。一方で、50%海水では全個体が生存し、淡水から淡水に移したコントロール群では血漿 Na 濃度に変化は見られなかったのに対して、50%海水への移行により 3 時間後には 180 mM 程度にまで上昇することがわかった (図 4a, b)。特に、北日本集団由来の HNI 系統では、ヒメダカでの実験と同様、移行後 3 時間でいったん上昇し、その後やや減少した後 12 時間後に再度上昇するというパターンが確認された (図 4a)。以上の結果から、2/3 希釈海水である 67%海水に 3 時間直接移行させる、という条件で各系統を比較することとした (図 5)。

3-2. 北日本集団・南日本集団の各系統の塩分耐性

北日本集団の 6 系統、南日本集団の 11 系統、近交系の 5 系統、鱗が欠損している突然変異体の 1 系統について、3-1 で決定した 67%海水に 3 時間直接移行させるという条件で塩分耐性能力を比較した (図 6)。いずれの系統でも、淡水から 67%海水への移行により血漿中の Na 濃度に上昇がみられたが、系統ごとにより異なった。近交系と

突然変異体では、Kaga と H05、RS3 において 67%海水群に移行させた時の変化が小さかった。ただし、その 3 系統を比較すると、Kaga では淡水時の血漿 Na 濃度が他の近交系よりも高い傾向が認められた。

北日本集団と南日本集団にしぼって、各系統での血漿 Na 濃度の変化を表したものが図 7 である。ばらつきが大きい系統があったものの、南日本集団は系統間での差が小さく、北日本集団では系統間で比較的大きな差が見られる傾向にあった。そこで、北日本集団と南日本集団をそれぞれまとめて淡水時と 67%海水時の血漿 Na 濃度の値を比較したところ、67%海水移行時の両集団の血漿 Na 濃度の値には違いは認められなかった一方で、淡水時の値は北日本集団の方が南日本集団よりも有意に低い値を示した (図 8)。

3-3. 鶴岡系統と哲西系統の塩分耐性

以上の結果から、北日本集団と南日本集団の間には、塩分耐性においても違いがあることが示唆された。さらに、図 6 において、淡水環境と 67%海水環境の差が野生系統間で大きく異なることもわかった。そこで淡水環境と 67%海水環境での血漿 Na 濃度の差に着目し、差が大きいものは塩分耐性が低く、差が小さいものは塩分耐性が高いものと判断した。その結果、鶴岡系統が北日本集団、さらには全野生系統の中でも最も耐性が低い系統であることがわかった。一方、南日本集団の哲西がすべての野生系統の中で最も耐性が高い系統であることがわかった。また、今回の研究を行うきっかけとなった北日本集団の大館も、淡水環境時と海水環境時の間で大きな差が見られた (図 6)。

そこで鶴岡系統と哲西系統に注目し、淡水から 67%海水、80%海水、100%海水の 3 つの濃度に直接移行させ、24 時間の間の生存率を比較した結果、哲西系統では 67%海水環境では全個体が 24 時間生存し、80%海水では移行後 6 時間で半数が死亡したものの、6 時間までに生き残った個体は 24 時間後でもすべて生存が確認された (図 9)。100%海水では 3 時間後に半数が死亡し、さらに 12 時間で死亡率が 7 割に達したが、30%ほどの個体が 24 時間生存できることが明らかとなった。一方、鶴岡系統では 67%海水でも 12 時間後に 2 割の個体の死亡が確認された。80%海水では 1 時間後に 2 割が死亡し、6 時間後までに半数ほどが死亡、さらに 12 時間後までに死亡する個体が増え、24 時間後に生存できたのは 25%ほどだった。海水においては 4 時間以内に全個体が死亡した (図 9)。

4. 考察

水中に生きる魚類は、海水や淡水、汽水といった異なる環境に適応するために、様々な適応戦略、様々な器官による調節が行われている。真骨魚類は淡水環境でも海水環境でも、体液の塩濃度と浸透圧を海水の約 1/3 に調節するが、この調節は鰓や腎臓に代表される浸透圧調節器官において、塩と水が吸収あるいは排出されることによってなされている(金子, 2002)。たとえば海水中では、体内外のイオン濃度差により体表からイオンが体内に流入するとともに、浸透圧差により水が奪われて脱水される。そのため真骨魚類は海水を飲んで水を補給するが、その時に同時に NaCl を取り込んでしまうため体内の NaCl はより一層過剰となってしまう。この過剰な NaCl は鰓の塩類細胞から外界に排出している。一方、淡水においては塩類細胞で環境水中の塩類を吸収するとともに、体内に過剰となる水を腎臓から排出している。これまでウナギやサケ、ティラピアなどを代表とする、幅広い塩濃度に適応できる広塩性魚類や(金子, 2002)、塩分耐性が異なる様々な種が確認されているフグ科魚類(Ando, 2010)などを用いて、これらの浸透圧調節器官におけるイオン輸送モデルの解明や、イオン輸送を司るホルモンの働きから浸透圧調節機構の研究が行われてきた。メダカ(*O. latipes*)も幅広い塩濃度に適応できる広塩性種であり、遺伝子導入やゲノム編集など遺伝学の技術も利用できることから(Kimura et al., 2012)、今後ますます環境適応研究に利用されていくと期待される。本研究において、これまで研究に利用されてきた近交系だけでなく、野生集団である北日本集団と南日本集団の間、さらには野生系統間にも塩分耐性能力に違いがあることが明らかになった。

同じ *Oryzias* に属するグループでも、*O. marmoratus*, *O. latipes*, *O. dancena*, *O. javanicus*の間には塩分耐性に大きな違いがあることが知られている(Inoue and Takei, 2002)。インドネシアのスラウェシ島のトウティ湖に生息する *O. marmoratus* は海水で生存できないだけでなく、50%希釈海水でも 24 時間以内に全ての個体が死亡し、海水に対する耐性が低く淡水のみで生息が可能である。一方で、インドやパキスタンに生息する *O. dancena* は汽水と淡水の両環境を利用しているとされ、東南アジアに分布する *O. javanicus* は最も高い塩分耐性を有し、海水魚と同様に海水を利用できることが報告されている(Inoue and Takei, 2002)。今回の研究対象であるメダカ *O. latipes* も 50%海水では生存可能であり、*Oryzias* 属の中では中間的な性質を示すと考えられてきたが、本研究の結果から南北の野生集団間にも塩分耐性能力に違いがあり、広塩性能力には多様性が高いことがわかった。

通常は河川に生息するメダカにとって、汽水域あるいは海水を利用できることにはどのような意味があるのだろうか。海水や汽水域を利用できる利点として、汽水域や海水域を経由して周囲の水系に生息域を拡大できることが示唆されている(Inoue and Takei, 2002)。塩分耐性能力の違いは、南日本集団が北日本集団よりも広い分布域をもつ原因のひとつとなった可能性が考えられる(図 10)。メダカはその塩分耐性や、水田

などの人為的な環境にも適応してきたことから、他の淡水魚とは異なる分布拡大の歴史を有しており、それらを踏まえた系統地理的な検討が必要である（渡辺ら, 2005）。

系統間での塩分適応能力を、異なる塩分環境に移行させた時の生存率から調べた実験により、南北集団間、特に鶴岡系統と哲西系統の間には明確な塩分耐性の違いがあることが明らかとなった。鶴岡系統を含めて、塩分耐性能力の弱い系統においては、淡水環境時の血漿 Na 濃度が他の系統よりも低いという特徴が認められた。このことは、本研究のきっかけとなった大館系統でも同様であった（図 6, 図 7）。この鶴岡の母集団は山形県鶴岡市由来のものであるが、山形県内の野生メダカの分子遺伝子学的解析によると、鶴岡のみが県内の他の系統とは異なるクラスターに含まれると報告されている（高山-渡辺ら, 2006）。現時点では、なぜこれらの系統で淡水環境での血漿 Na 濃度が低いのかはわかっていないが、このことが南北集団間の塩分耐性の差の原因のひとつかもしれない。上述したとおり、淡水環境では鰓の塩類細胞において塩類を環境から吸収するとともに、腎臓においては原尿から塩類などを再吸収して過剰となる水を大量の希釈尿として排出している。淡水環境で血漿 Na 濃度が低いということは、鰓の塩類細胞あるいは腎機能が他の系統よりも弱いことを意味するのかもしれない。今後は、塩類細胞や腎臓といった浸透圧調節器官の機能を系統間で比較することにより、系統間の塩分耐性能力の違いの原因を明らかにする必要がある。

本研究では、移行後 3 時間に焦点をあてて解析を進めた。これは、当初ヒメダカを 50%海水に移行させた時に血漿 Na 濃度の変化を経時的に調べた結果、移行後 3 時間と 12 時間に血漿 Na 濃度の上昇が認められたためである。哲西系統と鶴岡系統を異なる塩分環境に移行させたときにも、80%ならびに 100%海水のような厳しい環境では、3 時間以内にまず死亡する個体が多く、その後 12 時間前後にさらに死亡することが多かったことから、ヒメダカでの結果ならびに 3 時間を実験条件として設定したことが支持された。浸透圧調節において、ホルモンが重要な働きを担っていることは前述したとおりであるが、その中でも、環境の変化に即座に対応する短期作用型と、タンパク質の合成などを促すことで適応できる体へと時間をかけて変化させる長期作用型のものがある。前者にはナトリウム利尿ペプチドのようなペプチドホルモンが知られており (Takei and Hirose, 2002)、後者は成長ホルモンやプロラクチン、コルチゾルなどが知られている。本研究は短期適応に焦点をあてたものであることから、ペプチドホルモンによる調節に系統間で違いがあるのかもしれない。一方で、12 時間後以降にみられた影響は長期作用型の調節に対する影響であることが考えられる。今後は、長期的な適応能力に対する影響についても検討していく必要がある。

以上、日本由来の野生メダカにおいて、北日本集団と南日本集団では、これまで知られていた形態学的な差や、温度耐性、ストレス感受性、雌雄間競争時の攻撃性、群れ形

成力といった差に加えて、塩分耐性にも差があることが明らかになった。また、集団内の系統間にも塩分耐性に違いがあり、その能力の違いが生息域の拡大に対して影響を与えてきた可能性が考えられる。今後はこの集団・系統間の塩分耐性の差がどのような原因によるのか、鰹の塩類細胞の能力の違いやホルモンによる調節能力など、浸透圧調節のメカニズムという観点からのアプローチが必要である。

<謝辞>

本論文の執筆にあたり、多くの方々にご支援いただきました。本研究へのご支援、ご協力と、多くのご助言をいただきました、指導教員である津田敦先生に心より感謝いたします。動物生殖システム分野の尾田正二先生には、メダカの供与をしていただいた上、飼育方法や実験系の確立に関して多くのご指導をいただきました。深く感謝いたします。東京大学大気海洋研究所の竹井祥郎名誉教授には研究の着想から実験まで、多くのご指導を頂きました。感謝申し上げます。東京大学大気海洋研究所生命科学部門生理学分野の兵藤晋先生には研究、実験のあり方や考察、論文執筆まで細部にわたるご指導を頂きました。深く感謝致します。最後に、東京大学大気海洋研究所生命科学部門生理学分野の皆さまには、多くのご協力、的確なご助言をいただきました。心より感謝の気持ちとお礼申し上げます。

<文献>

- Ando, H. Identification of Novel Halophilic gene in Pufferfish. ソルト・サイエンス研究財団助成研究報告集, 231-240, 2006.
- Arai, M. Studies on the Adaptability of Guppies to Sea Water. *Jap. J. Water Treat. Biol.*, 12, 9-13, 1976.
- Asai, T. Taxonomic revision of *Oryzias latipes* complex "Medaka" in far east Asia. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, 19,1-7, 2016.
- Asai, T., Senou, H., Hosoya, K. *Oryzias sakaizumii*, a new ricefish from northern Japan (*Teleostei: Adrianichthyidae*). *Ichthyol. Explor. Fresh Waters*, 22, 289-299, 2011.
- Furuno, M., Sugimoto, K., Komori, M., Kagawa, N. Comparison of stress response between two wild populations of Japanese medaka *Oryzias latipes* and *O. sakaizumii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 80, 379-381, 2014.
- Hirayama, M., Mukai, T., Miya, M., Murata, Y., Sekiya, Y., Yamashita, T., Nishida, M., Watabe, S., Oda, S., Mitani, H. Intraspecific variation in the mitochondrial genome among local populations of Medaka *Oryzias latipes*. *Gene*, 457, 13-25, 2010.
- Inoue, K., and Takei, Y., Diverse adaptability in *Oryzias* species to high environmental salinity. *Zool. Sci.*, 19, 727-734, 2002.
- Kagawa, N. Comparison of aggressive behaviors between two wild populations of Japanese medaka *Oryzias latipes* and *O. sakaizumii*. *Zool. Sci.*, 31, 116-121, 2014.
- Kimura, T., Kamei, Y., Takehana, Y., Sasado, T., Naruse, K. Medaka genomics and the methods and resources for decoding genomic functions. *Genome mapping and genomics in animals* (Denny P., Kole C., Eds.), Springer, pp159-182, 2012.
- Kusahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S., Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohnishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogotta, K., Morishita, T., Endo, T., Shin-I, T., Takeda, H., Morishita, S. and Kohara, Y. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 447, 714-719, 2007.
- Nakamura, M., Yasuki, S., Takahashi, F., Shinagawa, A., Nakao, S. Salinity tolerance of the brackish water bivalve, *Corbicula japonica* prime. *Suisanzoshoku*, 44, 31-35, 1996.
- Naruse, K. Classification and phylogeny of fishes of the genus *Oryzias* and its relatives. *Fish Biol. J. MEDAKA*, 8, 1-9, 1996.

- Oda, S. Counterargument to "*Oryzias sakaizumi*". *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, 19, 9-17, 2016.
- Ogoshi, M., Kato, K., Takahashi, H., Ikeuchi, T., Abe, T., Sakamoto, T. Growth, energetics and the cortisol-hepatic glucocorticoid receptor axis of medaka (*Oryzias latipes*) in various salinities. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 178, 175-179, 2012.
- Sakaizumi, M., Moriwaki, K., Egami, N. Allozymic variation and regional differentiation in wild population of the fish *Oryzias latipes*. *Copeia*, 6, 311-318, 1983.
- Sakaizumi, M. Genetic divergence in wild populations of medaka *Oryzias latipes* (Pisces: Oryziatidae) from Japan and China. *Genetica*, 69, 119-125, 1986.
- Sakaizumi, M. Phylogeny of the medaka. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, 19, 9-24, 2016.
- Sakaizumi, M. Rigid Isolation between the Northern population and the Southern population of the Medaka, *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, 1, 795-800, 1984.
- Sakaizumi, M., Egami, N., Moriwaki, K. Allozymic variation in wild population of the fish, *Oryzias latipes*. *Proc. Japan Acad.*, 56, 448-451, 1980.
- Sakaizumi, M., Jeon, S-R. Two divergent groups in the wild populations of medaka *Oryzias latipes* (Pisces: Oryziatidae) in Korea. *Korean J. Limnol.*, 20, 13-20, 1987.
- Setiamarga H.E.D., Miya, M., Inoue, J.G., Ishiguro, N., Mabuchi, K., Nishida, M. Divergence time of the two regional medaka populations in Japan as a new time scale for comparative genomics of vertebrates. *Biol. Lett.*, 5, 812-816, 2009.
- Takehana, Y., Jeon, S-R., Sakaizumi, M. Genetic structure of Korean wild populations of the medaka *Oryzias latipes* inferred from allozymic variation. *Zool. Sci.*, 21, 977-988, 2004.
- Takehana, Y., Nagai, N., Matsuda, M., Tsuchiya, K., Sakaizumi, M. Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, 20, 1279-1291, 2003.
- Takehana, Y., Sakai, M., Narita, T., Sato, T., Naruse, K., Sakaizumi, M. Origin of boundary populations in medaka (*Oryzias latipes* species complex). *Zool. Sci.*, 33, 125-131, 2016.
- Takei, Y., and Hirose, S. The natriuretic peptide system in eel: a key endocrine system for euryhalinity? *Am. J. Physiol.*, 282, R940-R951, 2002.
- Uono, T., Hamaguchi, T., Kume, K., Hosoya, K. Comparison of fish schooling behavior between the Southern and Northern populations of *Oryzias latipes* in the Yura river system, Kyoto Prefecture. *J. Japan Soc. Water Environ.*, 34, 109-114, 2011.
- Yamagami, K. Some enzymological properties of a hatching enzyme (chorionase) isolated from the fresh-water teleost, *Oryzias latipes*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 46, 603-616, 1973.

- Yanagishima, S. Studies on the variation and adaptation of fishes. I. Adaptation of killifish (*Oryzias latipes* T. & S.) to saline water. 2. preliminary report of an experimental study. *Jpn. J. Ecol.*, 7, 123–126. 1957.
- 岩松 鷹司. 新版 メダカ学全書.大阪教育出版, 2016.
- 宇和 紘. 核型と進化. メダカの生物学, 東京大学出版会(江上 信雄, 山上 健次郎, 嶋 昭紘 編), pp.163-182, 1990.
- 江尻 信雄. メダカ臀鰭軟条数の変異に関する研究 I 日本各地のメダカの軟条数の変異. 魚類学雑誌, 3, 33-35,1953.
- 江尻 信雄, 吉野 道仁. メダカ臀鰭軟条数の変異に関する研究III日本各地のメダカの軟条数の変異(資料の追加).魚類学雑誌, 7 ,83-87, 1958.
- 大橋 圭太. 局所照射および貧血処理を用いたメダカ造血組織における放射線影響の変化. 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻修士論文, 2018.
- 金子 豊二. 浸透圧調節・回遊. 魚類生理学の基礎 (会田勝美編) , 恒星社厚生閣, pp215-232, 2002.
- 菊池 伸雄. メダカの塩水適応. 研究集録. 理科研究(2) 新潟県立教育センター編, 6, 73-80, 1973.
- 酒泉 満. 遺伝学的に見たメダカの種と種内変異, メダカの生物学 (江上 信雄, 山上 健次郎, 嶋 昭紘 編) , 東京大学出版会, pp.143-161, 1990.
- 高山-渡辺 絵里子, 辻 徹, 佐藤 政則, 土井 寅治,八鍬 拓司, 佐々木 隆行, 渡辺明彦, 鬼武 一夫. 山形県内に生息する野生メダカにおける種内分化の分子遺伝学的解析.*Bull. of Yamagata Univ., Nat. Sci.*,6,55-69,2006.
- 室井 和也. メダカ活動に概日性リズムがみられる条件の検討-明暗と給餌周期に着目して-. 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻修士論文, 2018.
- 柳島 静江. 魚類の適応変異に関する研究 : I. メダカ(*Oryzias latipes* T.&S.)の塩水適応について. *The Ecological Society of Japan*, 7, 3, 1957.
- 渡辺 勝敏, 高橋 洋, 北村 晃寿, 横山 良太, 北側 忠生, 武島 弘彦, 佐藤 俊平, 山本 将一郎, 竹花 祐介, 向井 貴彦, 大原 健一, 井口 恵一郎. 日本産淡水魚類の分布域形成 : 系統地理的アプローチとその展望. 魚類学会誌, 53, 1-38, 2005.

表 1. 本研究で使用した近交系、突然変異体、北日本集団ならび南日本集団の特徴と母集団採取地。

系統名	系統由来	所属集団	母集団採取地
大館	野生由来	北日本集団	秋田県大館市
鶴岡	野生由来	北日本集団	山形県鶴岡市
山形	野生由来	北日本集団	山形県山形市
両津	野生由来	北日本集団	新潟県佐渡市
新潟	野生由来	北日本集団	新潟県新潟市
小杉	野生由来	北日本集団	富山県
三島	野生由来	南日本集団	静岡県三島市
芦部	野生由来	南日本集団	大阪府
田辺	野生由来	南日本集団	和歌山県田辺市
徳島	野生由来	南日本集団	徳島県徳島市
岡山	野生由来	南日本集団	岡山県岡山市
賀陽	野生由来	南日本集団	岡山県
哲西	野生由来	南日本集団	岡山県新見市
山陽	野生由来	南日本集団	山口県
玖珠	野生由来	南日本集団	大分県玖珠町
延岡	野生由来	南日本集団	宮崎県延岡市
喜界	野生由来	南日本集団	鹿児島県喜界町
HNI	近交系	北日本集団由来	
Kaga	近交系	北日本集団由来	石川県加賀市
Hd-rR	近交系	南日本集団由来	
H05	近交系	南日本集団由来	母集団はヒメダカ
SOK	近交系	東韓集団野生型	
RS3	自然突然変異体		※鱗欠損

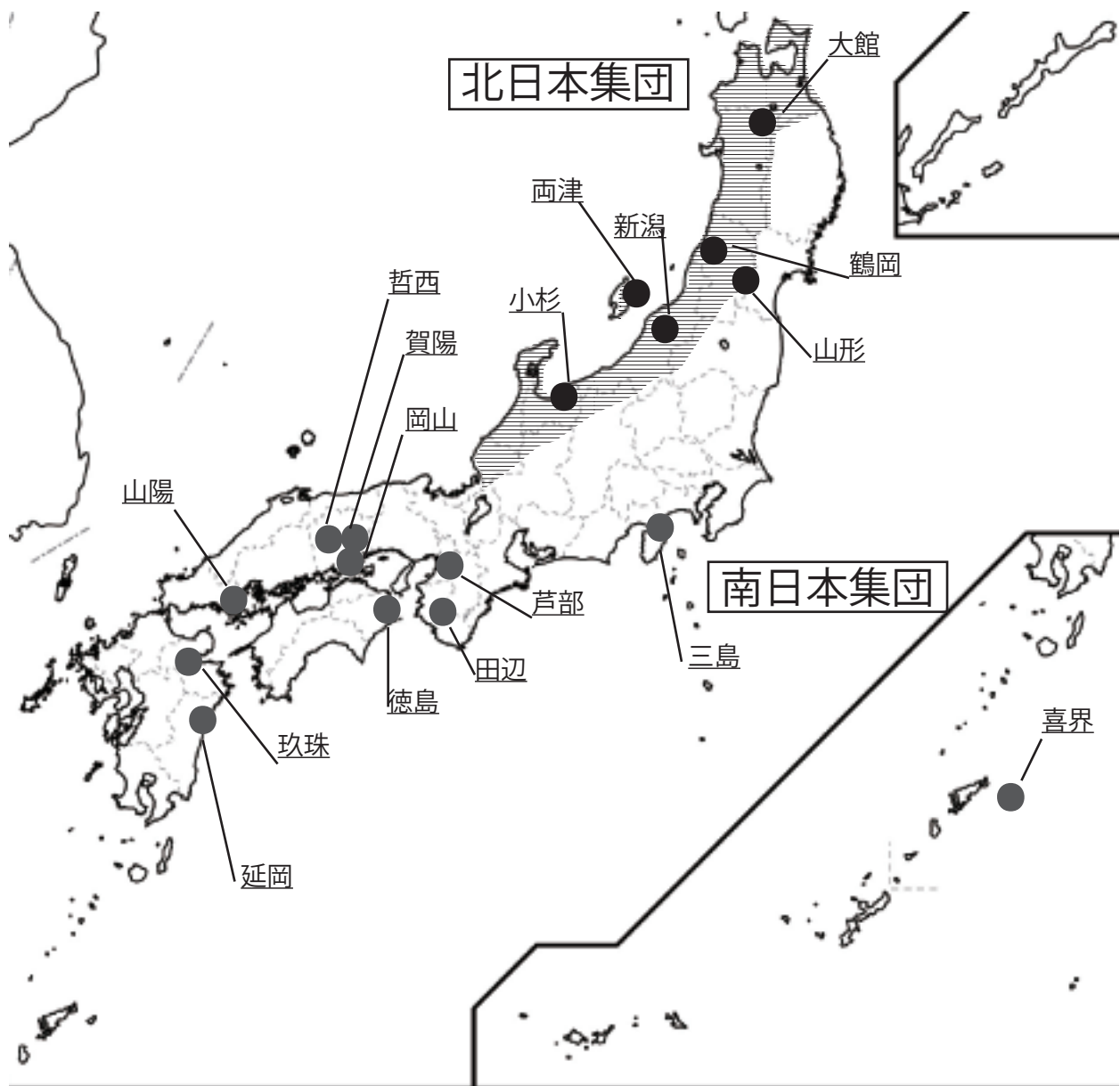


図1. 本研究で使した北日本集団と南日本集団の分布

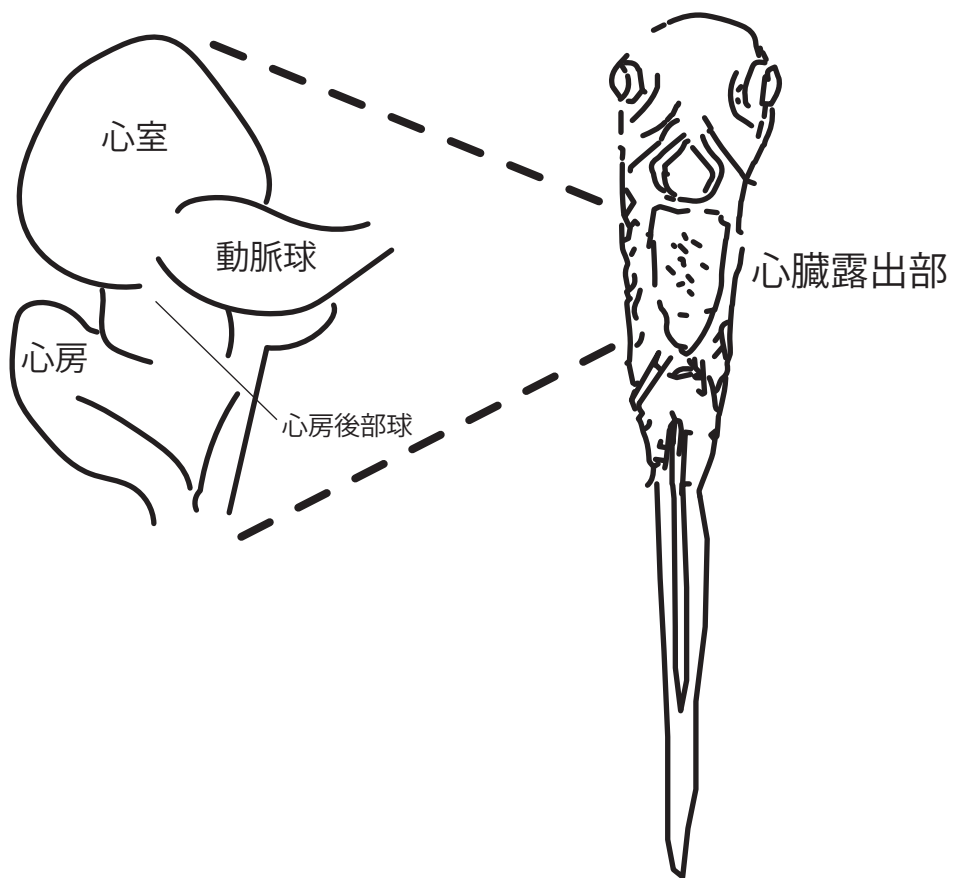


図 2. 腹側から見たメダカと心臓露出部

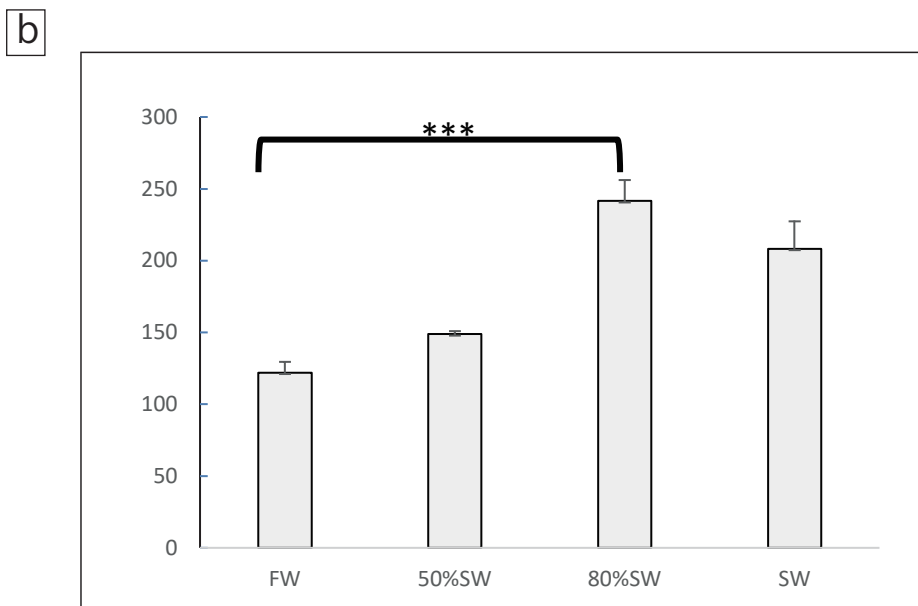
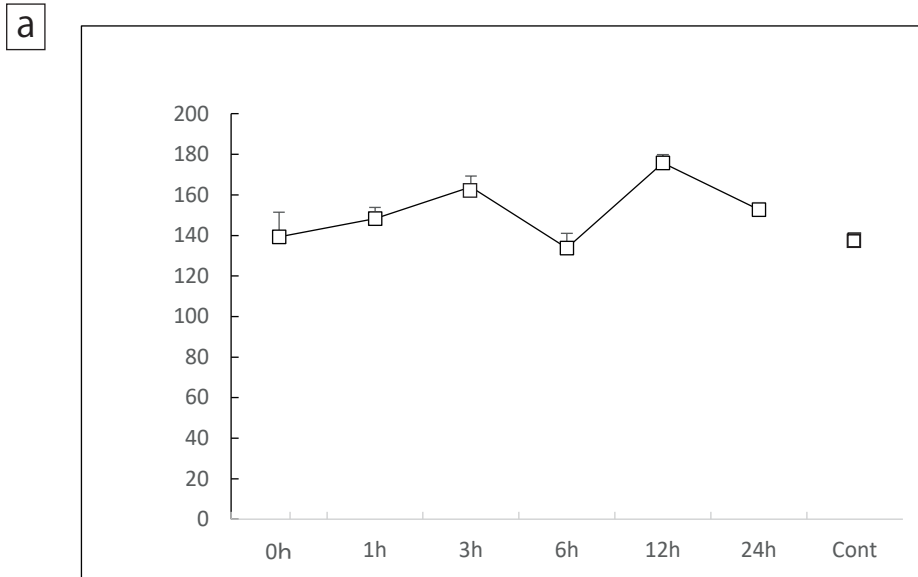


図3. ヒメダカを用いた直接移行の条件を設定するための実験結果。
 (a)、50%海水直接移行後に経時敵に採血を行なった結果。使用した個体は全群5尾ずつ。(b)、異なる濃度に移行させてから3時間後の血漿Na濃度。使用した個体数は以下の通り。淡水移行コントロール (n=6)、50%海水移行群 (n=10)、80%海水移行群 (n=10)、100%海水移行群 (n=10)。なお、100%海水に移行させた時には3時間以内に7尾が死亡した。***、 $P < 0.001$

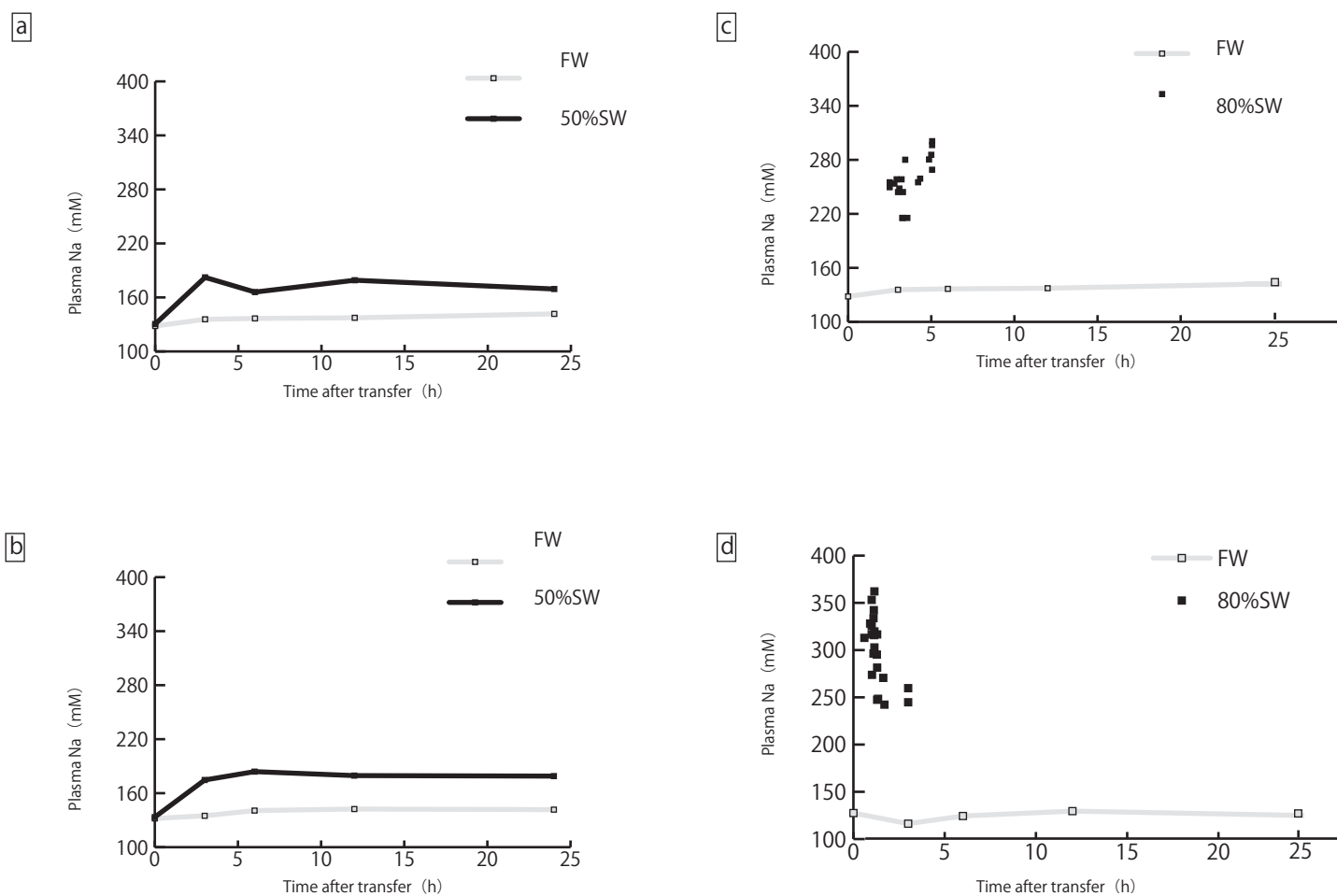


図4. 北日本集団由来の近交系 HNI と南日本集団由来の近交系 Hd-rR を 50%海水あるいは 80%海水に移行させた時の血漿 Na 濃度の経時変化。(a)、HNI 系統を 50%海水に移行させた時の結果。50%海水移行群は各時間 5 尾、淡水移行コントロール群は各時間 3 尾をサンプリングした。(b)、Hd-rR 系統を 50%海水に移行させた時の結果。50%海水移行群は各時間 5 尾、淡水移行コントロール群は各時間 3 尾をサンプリングした。(c)、HNI 系統を 80%海水に移行させた時の結果。淡水移行コントロール群は各時間 3 尾をサンプリングした。80%海水移行群は 25 尾を移したが、全ての個体が 6 時間までに死亡した。鰓蓋の動きが止まった時を死亡と考え、その時点で採血した結果を示す。(d)、Hd-rR 系統を 80%海水に移行させた時の結果。淡水移行コントロール群は各時間 3 尾をサンプリングした。80%海水移行群は 25 尾を移したが、全ての個体が 6 時間までに死亡した。鰓蓋の動きが止まった時を死亡と考え、その時点で採血した結果を示す。

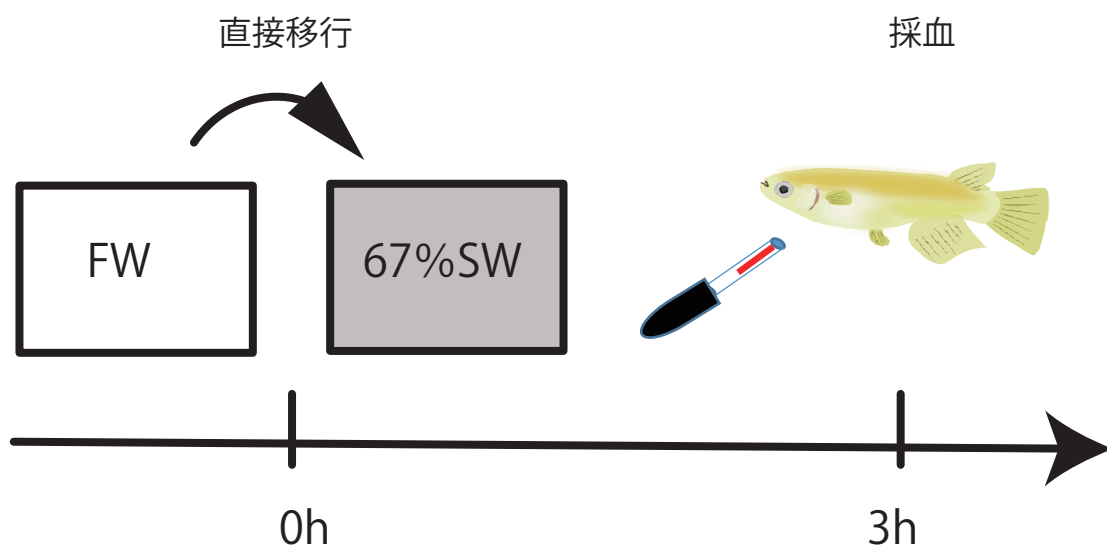


図5. 各系統を直接移行させるための実験方法。淡水から67%海水に直接移行させ、3時間後に血液のサンプリングを行うこととした。

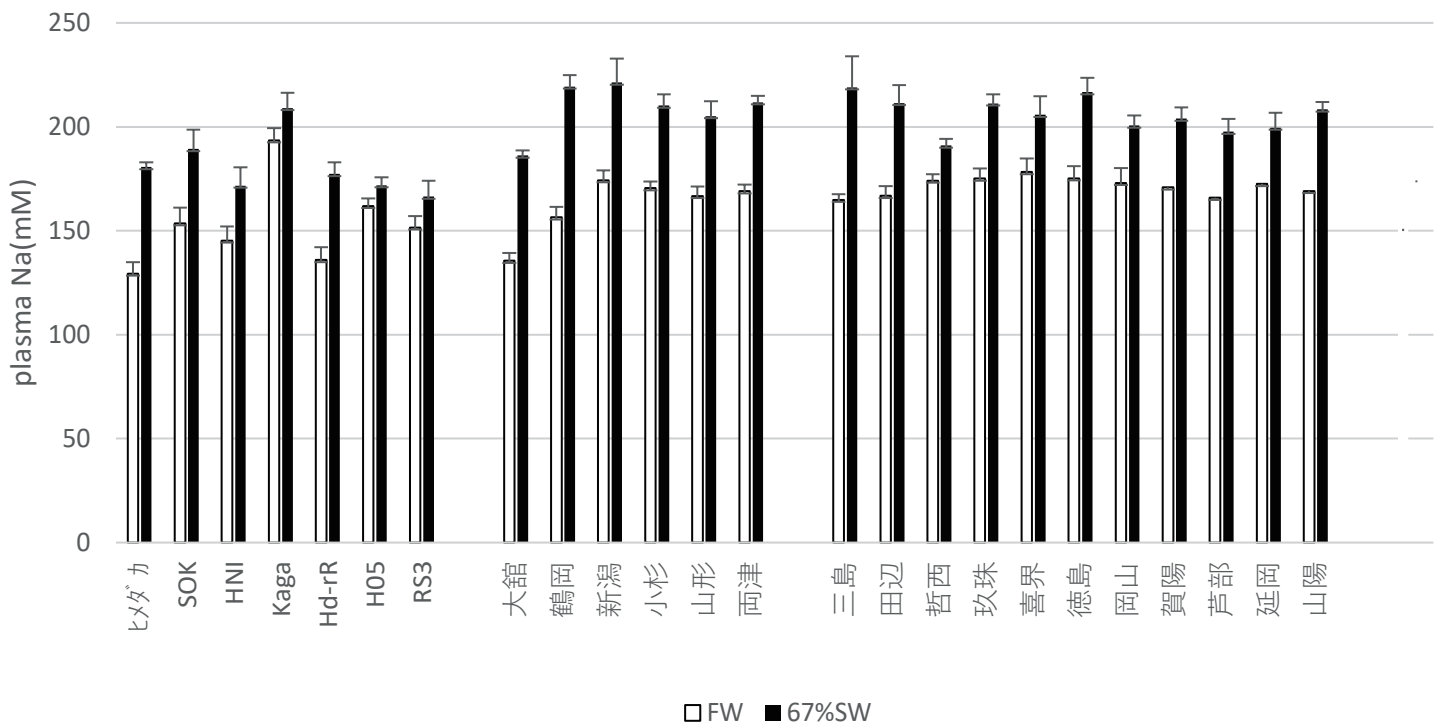
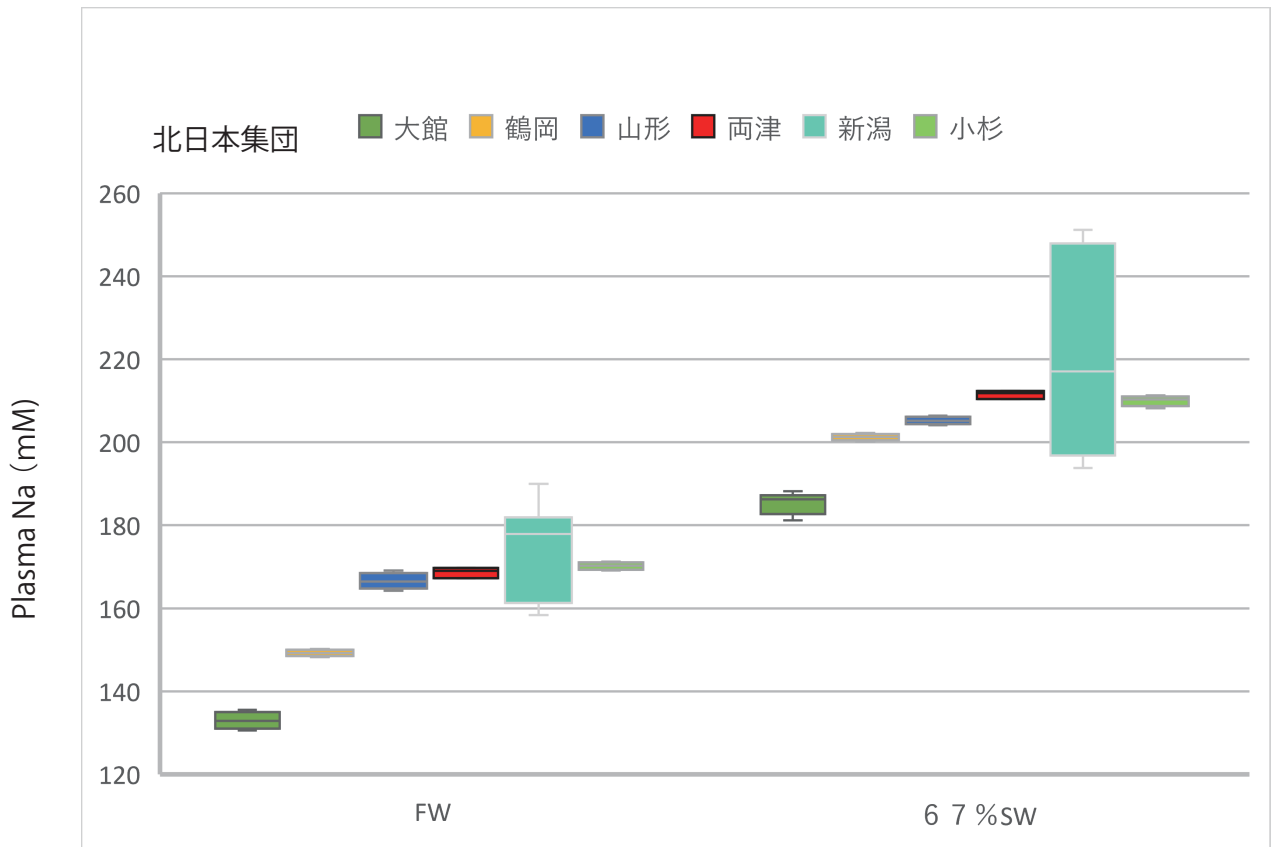


図6. 近交系ならびに野生集団を67%海水に移行させて3時間後の血漿Na濃度の変化(黒いバー)。白抜きバーは、淡水から淡水に移行させたコントロール群を示す。使用した個体は以下の通り。(淡水移行、67%海水ともに同数)。【ヒメダカ・近交系・突然変異】ヒメダカ(n=6)、SOK(n=5)、HNI(n=5)、Kaga(n=5)、Hd-rR(n=5)、RS3(n=5)。【北日本集団】鶴岡(n=5)、大館(n=6)、新潟(n=5)、両津(n=5)、小杉(n=4)、山形(n=5)。【南日本集団】三島(n=5)、田辺(n=5)、徳島(n=5)、山陽(n=5)、玖珠(n=4)、賀陽(n=5)、芦部(n=5)、岡山(n=4)、喜界(n=5)、延岡(n=5)、哲西(n=5)。

a



b

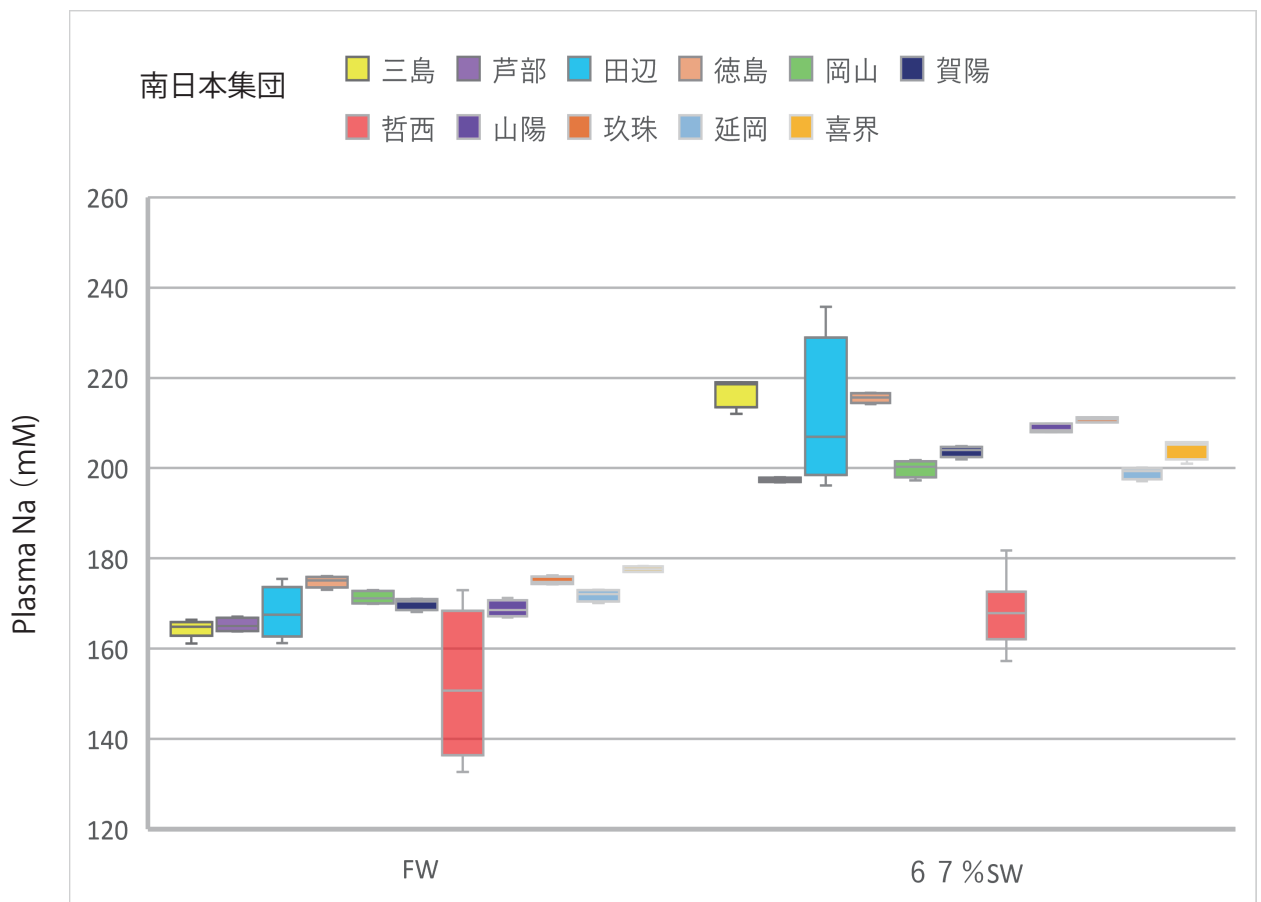


図7. 北日本集団ならびに南日本集団の各系統を淡水あるいは海水に移行させた時の血漿 Na 濃度。(a)、北日本集団各系統の結果。(b)、南日本集団各系統の結果。

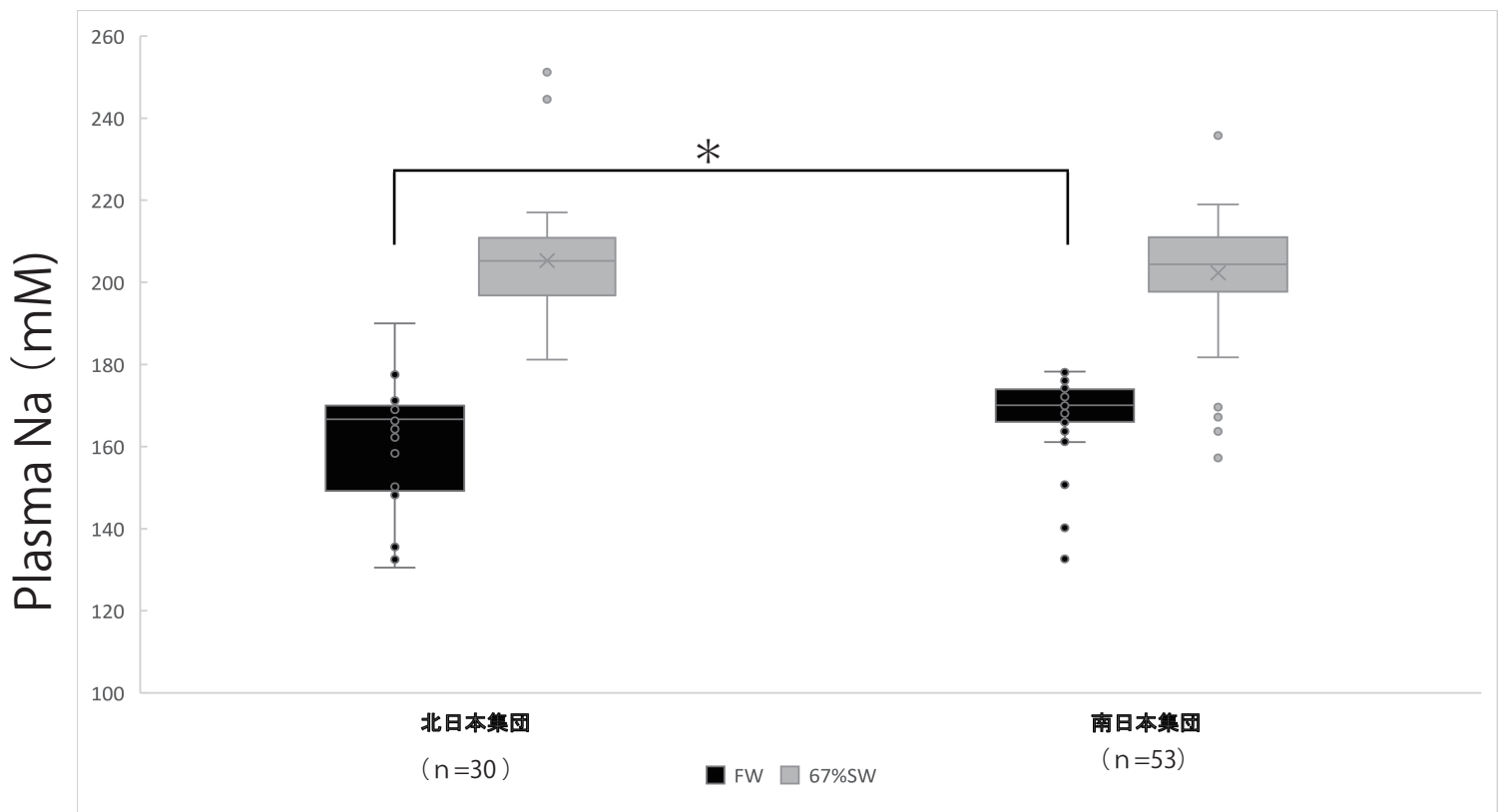


図8. 北日本集団ならびに南日本集団の血漿 Na の変化。黒いバーはコントロール群、グレーのバーは67%海水に移行させた群を示す。*、 $P < 0.05$ 。

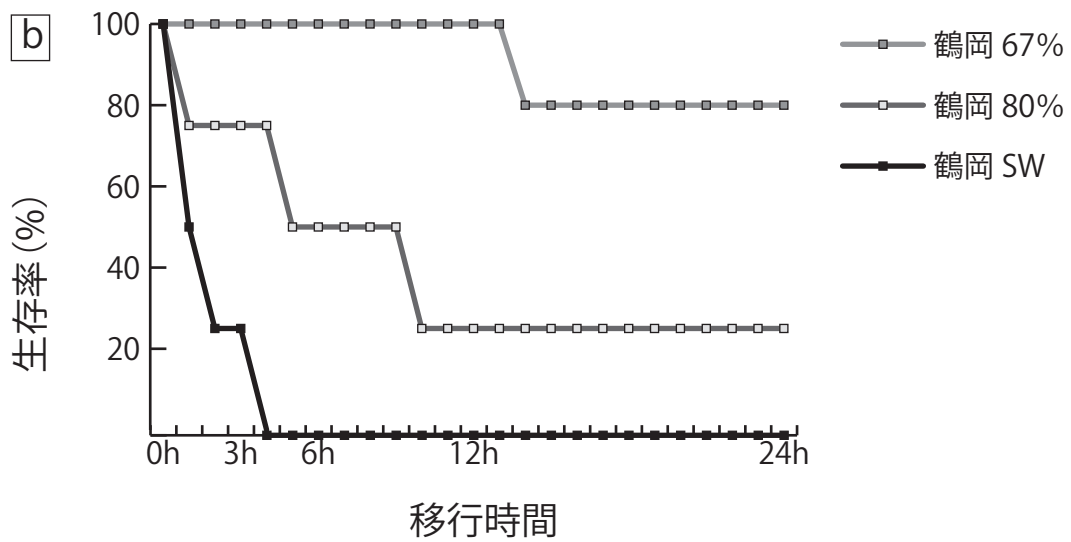
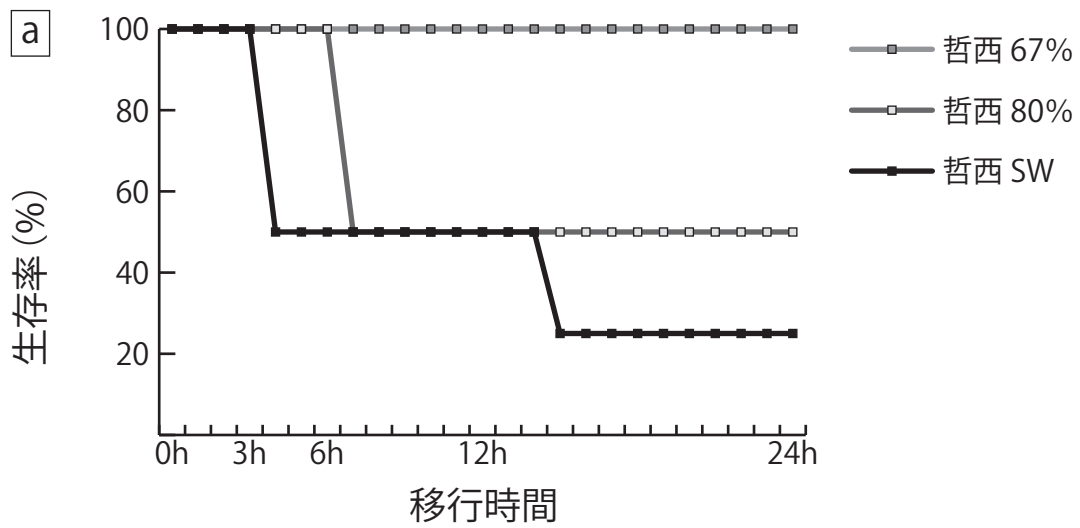


図9. 南日本集団の哲西系統ならびに北日本集団の鶴岡系統を 67%海水、80%海水、100%海水に直接移行させた時の生存率。(a) 哲西系統。使用した個体数は、67%海水への移行 (n=7)、80%海水への移行 (n=7)、100%海水への移行 (n=6)。(b) 鶴岡系統。使用した個体数は全群 n=7。

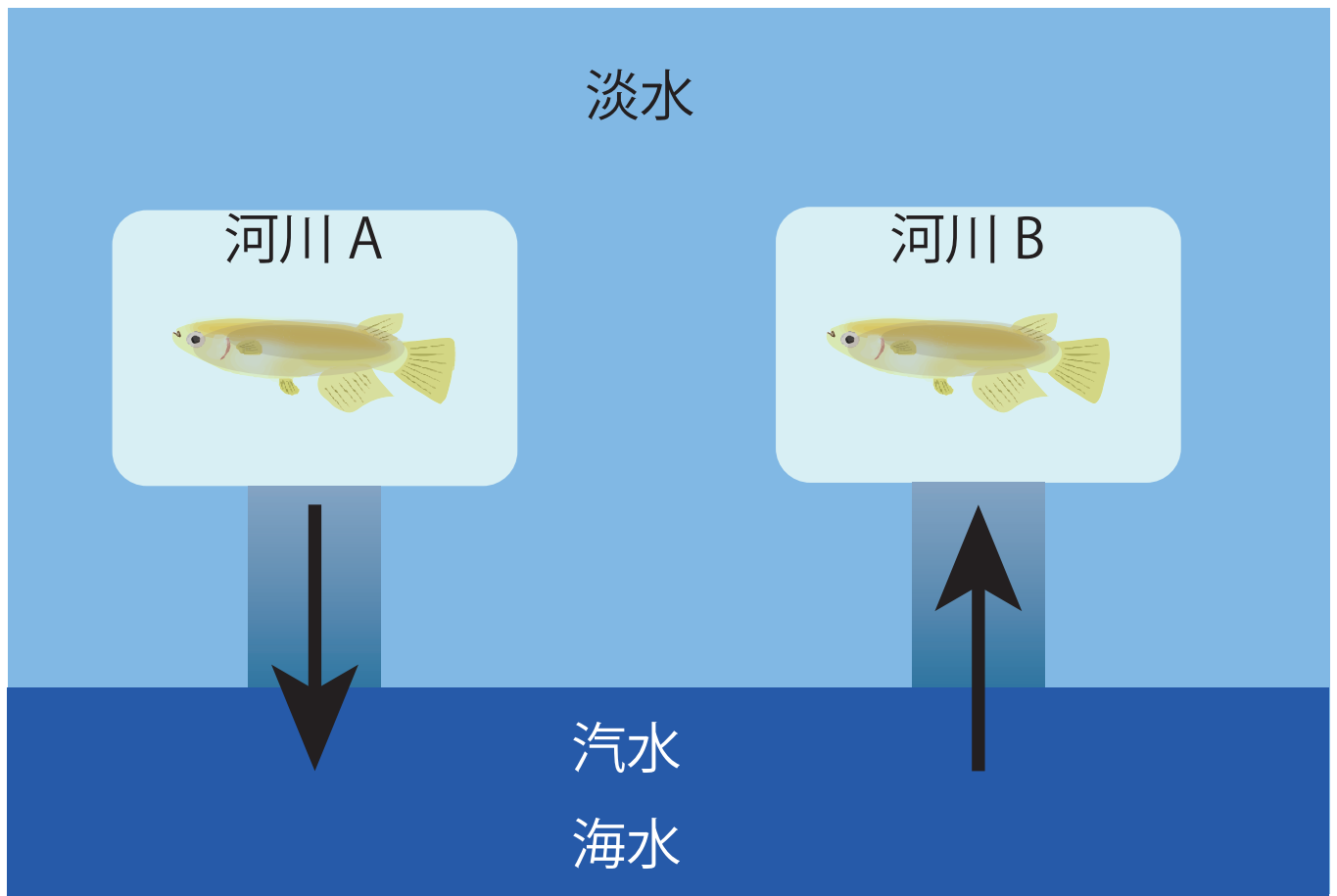


図 10 メダカの海水適応能と生息域拡大のモデル (Inoue and Takei, 2002 を改変して使用)。河川 A に生息するメダカが汽水あるいは海水域を経由して近隣の河川 B へと生息域を拡げることができる。もし適応能力を持たない場合、汽水あるいは海水で死亡してしまい、生息域を拡大できない。