

兵庫県武庫川水系のドジョウにおける外来 *rag1* アリルの検出

木村 亮太^{1,2)}・高橋 鉄美^{1)*}

Detection of a non-native *rag1* allele of *Misgurnus anguillicaudatus* in Muko River System, Hyogo

Ryota KIMURA^{1,2)} and Tetsumi TAKAHASHI^{1)*}

要旨

ドジョウはアジア東部に分布する淡水魚である。日本には本種の在来系統が生息するが、大陸から導入された外来系統による遺伝的搅乱が広まっている。また、大陸原産のカラドジョウや、日本北部に分布するキタドジョウも全国に導入されている可能性がある。しかし、外来の種や系統の分布、および交雑に関する知見は不足している。このため本研究では、これまでそれらの情報がなかった兵庫県の武庫川からドジョウ類を採集し、核DNAの*rag1*の塩基配列を使って、その遺伝的組成を調べた。その結果、ドジョウの両系統のホモ個体の他に、ヘテロ個体も見つかった。外来系統のアリル頻度は10.9±0.2%だった。カラドジョウとキタドジョウのアリルは見つからなかった。遺伝子型頻度がハーディー・ワインベルグ平衡から有意に逸脱したことから、系統間で自由交配をある程度妨げる機構が存在するか、外来系統の導入がごく最近で、まだ交配があまり進んでいない可能性が考えられる。

キーワード: 外来系統、在来系統、淡水魚、保全、*Misgurnus anguillicaudatus*、recombination activating 1 遺伝子

(2025年10月7日受付、2025年10月31日受理、2026年1月31日発行)

はじめに

ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor, 1842) は小型の淡水魚で、日本を含むアジア東部に広く分布し、水田や池沼などの止水域、および河川の中・下流域にある緩流域を中心に生息する(中島・内山, 2017)。本種は一般に2倍体で有性生殖するが、広島県東広島市など3倍体の個体が存在する個体群もまれにある(Arai, 2003)。ドジョウの種内系統は、ミトコンドリアDNA(mtDNA)および核DNA(nDNA)の塩基配列を用いて推定されており、少なくとも日本固有の系統[在来系統; Morishima et al. (2008)の subclade B-1]とアジア大陸原産の系統(外来系統; 同 subclade B-2)に分けられる(Morishima et al., 2008; 小出水ほか, 2009; 清水・高木, 2010; 向井ほか, 2011;

Yamada et al., 2015)。以前は、日本列島北部に分布する系統も本種に含まれていたが(同 clade A)、最近では別種のキタドジョウ *Misgurnus* sp.として扱うことが提唱されており(中島・内山, 2017)、本研究もこの見解に従う。

日本におけるドジョウの自然分布は、いくつかの人為的な要因によって影響を受けている。ドジョウの外来系統は、本来は日本に分布しないが、飼育魚の餌や釣りの活き餌、および食用として輸入され、放流などを通じて日本各地に定着している(小出水ほか, 2009; 清水・高木, 2010; 向井ほか, 2011; 松井・中島, 2020; 熊川ほか, 2025)。この系統の個体は、在来系統の個体と交雑することが可能であり(Fujimoto et al., 2017; 熊川ほか, 2025)、在来系統に対する遺伝的搅乱が懸念されている。実際、各地で在来・外来系統の交雑に起因すると考えられる個体が

¹⁾ 兵庫県立大学大学院環境人間学研究科共生博物部門 〒669-1546 兵庫県三田市弥生が丘6丁目

²⁾ 北海道大学大学院環境科学院生物圏科学専攻水圏生物学コース 〒060-080 北海道札幌市北区北8条西5丁目

* Corresponding author. E-mail: tetsumi@hitohaku.jp

© 2026 兵庫県立人と自然の博物館。

オープン・アクセス。注があるものを除いて、この記事の内容物はクリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際ライセンスの下に提供されています (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja>)。

確認されている(Fujimoto et al., 2017; 松井・中島, 2020; 熊川ほか, 2025)。また、中国原産のカラドジョウ *Misgurnus dabryanus* (Dabry de Thiersant, 1872) もドジョウ外来系統とともに日本各地に導入され(Oliva and Hensel, 1961; 中島・内山, 2017), ドジョウ在来系統と生息場所や餌資源をめぐって競合する可能性が示唆されている(加納ほか, 2007)。さらに、北海道、新潟県、長野県および石川県では、ドジョウ在来系統とキタドジョウの交雑に起因すると考えられる個体が見つかっている(Yamada et al., 2015; Fujimoto et al., 2017; 熊川ほか, 2025)。これに加えて、近年の河川改修や圃場整備などによってドジョウの生息環境が変化し、全国的に個体数が減少している(中島・内山, 2017)。これらの要因から、日本におけるドジョウは環境省のレッドリストで準絶滅危惧種に選定されている(環境省, 2020)。しかし、外来の系統・種の導入や交雑に関する知見は全国的に不足している。ドジョウの在来系統と外来系統、およびキタドジョウは形態での判別が困難であり(吉郷, 2007; 松井・中島, 2020; 熊川ほか, 2025)、またカラドジョウは口髭が長く尾柄の膜鰭部が発達することで他と区別できるとされるが(中島・内山, 2017)、交雑個体の判別は困難であると考えられる。このため、種・系統の同定および交雑の有無の判定には、分子データの活用が必要である。

兵庫県は本州に位置し、日本海と瀬戸内海の両方に接している。本県におけるドジョウの遺伝的組成に関する研究は、日本海に注ぐ円山川水系を対象とした報告がある(景平ほか, 2009)。この研究によると、円山川水系では外来系統の mtDNA 配列は確認されなかつたが、国内の他個体群に由来すると考えられる mtDNA 配列が確認された。この水系では、希少鳥類であるコウノトリ *Ciconia boyciana* Swinhoe, 1873 の餌資源として国内各地で採集されたドジョウが放流された経緯があり、その影響で円山川水系に別個体群が出現したと考えられている(景平ほか, 2009)。一方、兵庫県の他の水系におけるドジョウの遺伝的組成は調べられていない。本研究では、瀬戸内海に注ぐ武庫川水系において、ドジョウ外来系統や他種の導入の有無、および在来系統との交雑の状況を遺伝学的に調査した。

材料と方法

標本

2024年5~8月に、丹波篠山市の油井(北緯35°0'1.3", 東経135°9'12.2")と南矢代(北緯35°2'14.5", 東経135°10'47.0")の武庫川水系からドジョウ類を32個体ずつ、計64個体採集した。これら2地点は河川距離で6kmほど離れており、間にはドジョウ類の回遊を妨げるような構造物は見当たらなかった。各標本は、右側の胸鰭、または胸鰭と筋肉組織を99%エタノールで固定し、分子実験に供した。魚体は10%ホルマリンで固定した後、70%エタノールに置換した。全てのエタノールおよびホルマリン固定標本は、兵庫県立人と自然の博物館に収蔵した

(MNHAH A1-111998, A1-112000, A1-112004~A1-112014, A1-112259)。

種・系統の判別

先行研究において、nDNAの recombination activating 1 遺伝子(*rag1*)の塩基配列がドジョウの在来系統と外来系統、キタドジョウ、およびカラドジョウで異なることが知られている(Fujimoto et al., 2017; Okada et al., 2020)。このため、先行研究を参考にドジョウ在来系統(GenBank accession number AB698049, AB698050, AB698057~AB698060; Yamada et al., 2015)、ドジョウ外来系統(AB698061~AB698064; Yamada et al., 2015)、キタドジョウ(AB698051~AB698056; Yamada et al., 2015)、およびカラドジョウ(EF508675, EF508676, GU583715~GU583725, GU583737, HQ454347, JN177188; Šlechtová et al., 2008; Liu et al., 2012; Jakovlić et al., 2013; Zangl et al., 2020)の *rag1* 配列を比較し、これら4種・系統を区別する8個の一塩基多型(single nucleotide polymorphisms, SNPs)を特定した(表1)。本研究では、武庫川のドジョウ類について *rag1* の部分配列を決定し、これらの SNPs の遺伝子型を特定することによって、種と系統の同定および交雑の状況を調べた。

エタノール固定された組織標本から、全ゲノムを Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega社)を用いて製品のプロトコルに従って抽出した。ターゲット領域を増幅するためのPCR反応液は、Ex Taq(タカラバイオ株式会社; 5U/μl)を0.05μl、10×Ex Taq Bufferを1μl、dNTP Mixture(それぞれ2.5mM)を0.8μl、プライマーRAG1-M.aFとRAG1-M.aR(Fujimoto et al., 2017; 10μM)を0.5μlずつ、およびDNA抽出液(5ng/μl)を2μl混合し、滅菌精製水を加えて10μlとした。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によるDNA断片の増幅は94°Cで30秒のち、98°Cで10秒、60°Cで10秒、72°Cで30秒を30サイクル実施した。この反応液を AMPure XP(Beckman Coulter Life Sciences社)を用いて製品のプロトコルに従って精製し、滅菌精製水で100万倍に希釈したものを鋳型DNAとして、2回目のPCRを行った。プライマーは、既知の配列を参考に自ら設計したRAG1 F(5'-ATGTTCCAGCTCCTGGATG-3')とRAG1 R(5'-CTGTTCTTGGAAAGATCGTGATGG-3')を用いた。PCR反応液とPCRサイクルは、1回目のPCRと同条件で行った。PCR産物を AMPure XP を用いて精製し、Qubit 3.0 Fluorometer(Invitrogen社)を用いて濃度測定した。反応液を1.5ng/μlに調整し、ユーロフィングノミクス株式会社の受託サービスによってRAG1 Fから塩基配列を決定した。シーケンス結果の波形で、上述の SNPs においてピークが一つのみ見られた場合はホモ、二重のピークが見られた場合はヘテロと判断した。得られた塩基配列は、日本DNAデータバンク(DDBJ)に登録した(アクセス番号LC895631~LC895694)。

先行研究による *rag1* の8つの SNPs の遺伝子型と比較することによって(表1)、各個体の塩基配列がどの種・系統のホモ、もしくはヘテロであるかを判断した。その結果を用いて、油井と

表1 ドジョウの在来系統と外来系統、キタドジョウ、およびカラドジョウを識別する8個の一塩基多型(SNPs)と、武庫川から得られたドジョウ類の遺伝子型。各SNPの位置は、recombination activating 1遺伝子(*rag1*)の第3エクソンの5'端から当該SNPまでの塩基数(5'端とSNPの塩基も含む)で表した。

	329	359	374	378	398	476	506	528
レファレンス配列								
ドジョウ在来系統	A	G	A	C	C	T	C	A
ドジョウ外来系統	A	A	A	A	T	G	C	C
キタドジョウ	A	G	A	C	T	G	C	C
カラドジョウ	T	G	G	C	C	G	T	C
武庫川のサンプル								
油井	A	G	A	C	C	T	C	A
	A	A/G	A	A/C	C/T	G/T	C	A/C
南矢代	A	G	A	C	C	T	C	A
	A	A/G	A	A/C	C/T	G/T	C	A/C
	A	A	A	A	T	G	C	C

南矢代の間におけるアリル頻度の違いを、フィッシャーの正確確率検定法を用いて検定した。また、遺伝子型頻度がハーディー・ワインベルグ平衡に従うかを、 χ^2 検定で調べた。

結 果

遺伝子 *rag1* の塩基配列を調べた結果(表1)、油井で採集された32個体のうち28個体がドジョウ在来系統のホモ、4個体が在来系統と外来系統のヘテロだった。南矢代では、32個体のうち25個体が在来系統のホモ、4個体が在来系統と外来系統のヘテロ、および3個体が外来系統のホモだった。両地点において、キタドジョウおよびカラドジョウのアリルは検出されなかった。

地点間で、在来系統と外来系統のアリル頻度に有意な差は見られなかった(フィッシャーの正確確率検定:両側確率 $p > 0.05$)。このため、これら2地点のドジョウが同一個体群に含まれると仮定すると、中国アリルの割合は $10.9 \pm 0.2\%$ (二項分布: 平均 \pm 標準誤差)であった。遺伝子型頻度(観測個体数:在来系統ホモ53、ヘテロ8、外来系統ホモ3)はホモ個体が多く、ハーディー・ワインベルグ平衡(推定個体数:在来系統ホモ50.8、ヘテロ12.5、外来系統ホモ0.8)からの有意な逸脱が見られた[χ^2 検定: $\chi^2 = 8.22$ 、自由度 = 2、 $p < 0.05$; 外来系統ホモの推定個体数が5より小さかったのでこの検定は正確でないが(Sokal and Rohlf, 2012)、 χ^2 値が十分に大きいので有意差があると判断した]。

考 察

本研究では、武庫川水系の油井および南矢代から、ドジョウ在来系統のアリルに加え、外来系統のアリルが検出された。兵

庫県に接する大阪府では、釣具店で販売されていた外来系統の個体と野外採集個体のmtDNA配列が一致したことから、釣り餌として使用された外来ドジョウが放流された可能性が指摘されている(松井・中島, 2020)。兵庫県で確認された外来系統のアリルも同様に、釣具店やペットショップで販売されていた個体に由来する可能性が考えられる。また、遺伝子型頻度にハーディー・ワインベルグ平衡からの逸脱が見られた。その要因として、ホモ個体数(在来・外来系統を合わせて56個体)が、推定ホモ個体数(同51.5個体)より多かったことが挙げられる。ハーディー・ワインベルグ平衡は、自由交配が行われている集団で成立立つ(Crow and Kimura, 1970)。このため本研究で扱ったドジョウ集団では、外来系統の個体と在来系統の個体の間に自由交配をある程度妨げる機構が存在しているか、もしくは外来系統の導入がごく最近のため、まだ交配があまり進んでいなかった可能性が考えられる。

本研究で調べた集団では、外来系統のアリル頻度が全体の $10.9 \pm 0.2\%$ と少なかった。しかし、この集団が保全の対象となり得るのかは、慎重に検討する必要がある。ドジョウは底棲性の魚であり、同一水系内でもアリル頻度の異なる局所集団が存在することがある(景平ほか, 2009)。このため、武庫川水系のドジョウでも外来アリルの割合がさらに低い局所集団、すなわち純系により近い集団が存在する可能性がある。もしそのような集団が見つかれば、本研究で調べた集団よりも保全の対象として適している可能性がある。また、ドジョウ在来系統には、全国的に見ると水系ごとに遺伝的組成の異なる地域集団が存在する(景平ほか, 2009; Kitagawa et al., 2011)。しかし、本研究で用いた *rag1* の塩基配列では、それらの地域集団を区別することは難しい(Yamada et al., 2015)。このため本研究の結果からは、今回調べた地域に他の地域集団が導入されている可能性を否定することができない。実際、兵庫県円山川水系や愛媛県野村ダム湖において、国内他所の地域集団が導入されている例が知られている(景平ほか, 2009; 高木ほか, 2010)。以上より、

今回調べた個体群を保全の対象とするかどうかを判断するには、同水系内により純系に近い局所集団がないかを探索し、また当該地域に他の地域集団が導入されていないかを確認する必要がある。

日本においてドジョウは、食文化や神事を含む民俗と密接に関係する馴染み深い魚のひとつであり、商業的にも取引されている(中島・内山, 2017)。また全国的に、採集された場所とは異なる場所に意図的・非意図的に放流されている。実際、コウノトリやナベヅル *Grus monacha* Temminck, 1835 などの鳥類の餌資源を確保するため、国内外に由来する外来ドジョウやカラドジョウが意図的に放流された事例もある(吉郷, 2007; 景平ほか, 2009)。しかし、そのような行為は、在来の個体群に遺伝的搅乱をもたらすなど、その場で培われてきた生態系の歴史の痕跡を永久かつ不可逆的に改変する可能性がある。このような人為的改変を最小限に留め、生態系の歴史の痕跡を将来に継承する意味でも、ドジョウに限らずあらゆる生物において、遺伝的組成や生態系を無視した放流が行われないよう注意喚起する必要がある(日本魚類学会自然保護委員会, 2013; 中島・内山, 2017 など)。

謝 辞

本研究を行うにあたり、明尾匡樹氏、および兵庫県立大学大学院環境人間学研究科共生博物部門高橋研究室と兵庫県立人と自然の博物館地域連携グループひょうご北摂タナゴ研究会のメンバーから、ドジョウの分布について情報を提供していただいた。また中濱直之博士からは、保全についてのアドバイスをいただいた。ここに謝意を表する。本論文は、木村が高橋研究室の研究生だった際に行なった課題研究をもとに、作成した。

著者の役割

木村は野外での標本採集と分子実験を、高橋は研究立案、分子実験、およびデータ解析を行なった。全著者が原稿の執筆に関わり、最終稿の内容を確認した。

利益相反

本研究を実施するにあたり、特定企業との利害関係はない。

引用文献

Arai, K. 2003. Genetics of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: recent progress and perspective. *Folia Biologica (Kraków)*, 51, 107–117.

- Crow, J. F. and Kimura, M. 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. Scientific Publishers, India.
- Fujimoto, T., Yamada, A., Kodo, Y., Nakaya, K., Okubo-Murata, M., Saito, T., Ninomiya, K., Inaba, M., Kuroda, M., Arai, K. and Murakami, M. 2017. Development of nuclear DNA markers to characterize genetically diverse groups of *Misgurnus anguillicaudatus* and its closely related species. *Fisheries Science*, 83, 743–756.
- Jakovlić, I., Qu, Q.-J., Treer, T., Šprem, N. and Gui, J.-F. 2013. Introgression evidence and phylogenetic relationships among three (*Para*) *Misgurnus* species ad reviealed by mitochondrial and nuclear DNA markers. *Archives of Biological Sciences*, 65, 1463–1467.
- 景平真明・中村匡聰・土岐章夫. 2009. ミトコンドリア DNA 調節領域の塩基配列に基づく兵庫県円山川水系におけるドジョウを来集団由来の遺伝的組成. 大分県農林水産研究センター水産試験場調査研究報告, 2, 33–35.
- 環境省. 2020. 環境省レッドリスト 2020. 環境省, 東京.
- 加納光樹・斎藤秀生・渕上聰子・今村彰伸・今井 仁・多紀保彦. 2007. 渡良瀬川水系の農業水路におけるカラドジョウとドジョウの出現様式と食性. 水産増殖, 55, 109–114.
- Kitagawa, T., Fujii, Y. and Koizumi, N. 2011. Origin of the two major distinct mtDNA clades of the Japanese population of the oriental weather loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *Folia Zoologica*, 60, 343–349.
- 小出水規行・竹村武士・渡部恵司・森 淳. 2009. ミトコンドリア DNA によるドジョウの遺伝特性. 農業農村工学会論文集, 259, 7–16.
- 熊川真二・山下 誠・黒田真道・植木悠登・北野 聰. 2025. 千曲川水系および関川水系のドジョウ集団内における遺伝的搅乱の現状. 長野県水産試験場研究報告, 24, 5–17.
- Liu, S. Q., Mayden, R. L., Zhang, J. B., Yu, D., Tang, Q. Y., Deng, X. and Liu, H. Z. 2012. Phylogenetic relationships of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes) inferred from mitochondrial and nuclear genes with analyses of gene evolution. *Gene*, 508, 60–72.
- 松井彰子・中島 淳. 2020. 大阪府におけるドジョウの在来および外来系統の分布と形態的特徴にもとづく系統判別法の検討. 大阪市立自然史博物館研究報告, 74, 1–15.
- Morishima, K., Nakamura-Shiokawa, Y., Bando, E., Li, Y.-J., Boroń, A., Khan, M. M. R. and Arai, K. 2008. Cryptic clonal lineages and genetic diversity in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Genetica*, 132, 159–171.
- 向井貴彦・梅村啓太郎・高木雅紀. 2011. 岐阜県におけるカラドジョウの初記録と中国系ドジョウの侵入. 日本生物地理学会会報, 66, 85–91.
- 中島 淳・内山りゆう. 2017. 日本のドジョウ 形態・生態・文化と図鑑. 山と溪谷社, 東京.
- 日本魚類学会自然保護委員会(編). 2013. 見えない脅威“国内外来魚”どう守る地域の生物多様性. 東海大学出版会, 泉野.
- Okada, R., Shimizu, T. and Kitagawa, T. 2020. Evidence of a secondary interspecific mitochondrial DNA introgression in the pond loach *Misgurnus dabryanus* (Teleostei: Cobitidae) population introduced in

- Japan. *Journal of Applied Ichthyology*, 36, 655–667.
- Oliva, O. and Hensel, K. 1961. Some remarks on Eastern Asiatic loaches of the genus *Misgurnus* (Cobitidae). *Japanese Journal of Ichthyology*, 8, 86–91.
- 清水孝昭・高木基裕. 2010. ミトコンドリア DNA による愛媛県を中心としたドジョウの遺伝的集団構造と搅乱. *魚類学雑誌*, 57, 13–26.
- Šlechtová, V., Bohlen J. and Perdices, A. 2008. Molecular phylogeny of the freshwater fish family Cobitidae (Cypriniformes: Teleostei): Delimitation of genera, mitochondrial introgression and evolution of sexual dimorphism. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47, 812–831.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 2012. *Biometry Fourth Edition*. W.H. Freeman and Company, New York.
- 高木基裕・大山昭代・清水孝昭. 2010. 愛媛県におけるドジョウの遺伝的多様性と搅乱. *水産増殖*, 58, 113–120.
- Yamada, A., Kodo, Y., Murakami, M., Kuroda, M., Aoki, T., Fujimoto, T. and Arai, K. 2015. Hybrid origin of gynogenetic clones and the introgression of their mitochondrial genome into sexual diploids through meiotic hybridogenesis in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 323, 593–606.
- 吉郷英範. 2007. 山口県東部で採集された外来の可能性があるドジョウ属(コイ目ドジョウ科). *比婆科学*, 223, 7–20.
- Zangl, L., Jung, M., Gessl, W., Koblmüller, S. and Ratschan, C. 2020. Oriental or not: First record of an alien weatherfish (*Misgurnus*) species in Austria verified by molecular data. *Bioinvasions Records*, 9, 375–383.

Abstract

The dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus* is a freshwater fish widely distributed throughout East Asia. In Japan, individuals of the native Japanese clade inhabit many regions; however, genetic pollution from the non-native Chinese clade is spreading. In addition, karadojo *Misgurnus dabryanus* from continental Asia and kitadojo *Misgurnus* sp. from northern Japan may have been introduced into various areas of the country. However, the distribution of these non-native clade and species, as well as the occurrence of hybridization, remains poorly understood. In this study, we collected loach specimens from the Muko River in Hyogo prefecture, an area that had not been previously examined, and analyzed their genetic composition using nuclear DNA sequences of the *rag1* gene. As a result, individuals homozygous for each dojo clade, as well as heterozygotes, were detected. The frequency of the non-native allele was $10.9 \pm 0.2\%$. No alleles from karadojo or kitadojo were detected. The significant deviation of genotype frequencies from the Hardy-Weinberg equilibrium suggests a mechanism hindering random mating between the native and non-native clades, or that the introduction of the non-native clade is relatively recent and interbreeding has not yet progressed extensively.

Key words: conservation, freshwater fish, *Misgurnus anguillicaudatus*, native clade, non-native clade, recombination activating 1 gene