

平成 22 年度

神奈川県に生息する

メダカ *Oryzias latipes* の分子系統解析

日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科

魚医学研究室

09-407701

成島 弘国

指導教員 間野 伸宏

目次

	頁
第1章 序論	1
第2章 材料および方法	4
1. 地点の詳細	
2. 分子系統解析	
1) DNA 抽出	
2) PCR(Polymerase Chain Reaction)増幅	
3) PCR 産物の精製	
4) DNA シーケンス解析	
5) 塩基配列の決定	
6) データ解析	
第3章 結果	12
第4章 考察	17

謝辞

要旨

引用文献

図表

付録

第 1 章 序論

これまでの著しい人口増加と科学技術の発展に伴う人間活動の直接的・間接的影響による自然環境への影響は極めて大きいものとなっており、多くの種が絶滅し、他の多くも集団サイズを危機的な状況にまで減らしている(WCMC, 1992)。絶滅が危惧される動植物は国際自然保護連合(IUCN, 1996)のレッドデータブックによって絶滅危惧種 I A 類、絶滅危惧種 I B 類、そして絶滅危惧 II 類というカテゴリーに分けられているが、脊椎動物の各綱のそれぞれにおいて 50%以上の種がこれらいずれかのカテゴリーに分類されており、深刻な問題となっている。日本産汽水・淡水魚においても生息環境の悪化に伴い多くの種が危機的な状況にあり、環境省のレッドリストによると、日本に分布する約 400 種の汽水・淡水魚類のうち過去 100 年間に 4 種が絶滅し、144 種が絶滅の恐れがある種(I A 類、絶滅危惧種 I B 類、および絶滅危惧 II 類)に指定されている。また 26 種が準絶滅危惧種、39 種が情報不足、17 の地域個体群が絶滅の恐れがある個体群として挙げられており(環境省, 2007)、人間活動に隣接した里地・里山地域の水田周辺水域に生息する魚類の多くが絶滅危惧種に指定されている(水谷・森, 2009; 高橋, 2009)。このような水系に生息している魚類の 1 種に、近年絶滅が危惧されているメダカがいる。

メダカ *Oryzias latipes* はダツ目メダカ科に属する小型の淡水魚である。国内では青森県を北限とする本州から沖縄県を南限とする琉球列島まで広い自然分布域をもち、国外では朝鮮半島、中国大陸、台湾島にも分布する(佐原, 1989)。水田や沼等の止水・半流水域が主な生息場所であるが、近年、圃場整備といった生息環境の悪化・消失等により急速に数を減らしており(細谷, 2000)、現在では環境省レッドデータブック(環境省, 2007)において「絶滅危惧 II 類」に指定されている。

メダカは地方個体群の遺伝的差異が最も研究されている淡水魚の一つであり、酵素タンパク多型(アイソザイム)の解析では、日本のメダカは遺伝的に大きくかけ離れた北日

本集団と南日本集団の 2 つの主要なグループから成ることが明らかにされた (Sakaizumi *et al.*, 1983; Sakaizumi, 1986)。近年では進化速度の速いミトコンドリア DNA の塩基配列情報を使用した地域変異の研究が進められている (竹花・酒泉, 2002; Takehana *et al.*, 2003)。ミトコンドリア DNA の Cytchrome *b* 領域 (1141bp) を対象とした塩基配列の解析結果では A 群、B 群および C 群の 3 つの大きなグループに分けられた。集団間での隔離が長い時間維持された結果、このような独自の遺伝的特性をもつ集団が形成されたと考えられている (Takehana *et al.*, 2003)。

しかし近年、異なる地域集団からの遺伝子移入が問題となっている。例を挙げると、関東近郊や新潟の自然公園で採集されたメダカの中に明らかに近隣地域で検出されるはずのない遺伝子型が検出され、人為的な放流が疑われている (竹花・酒泉, 2002 年; Takehana *et al.*, 2003)。野外におけるメダカの黄色変異系統であるヒメダカの見撃情報も多く (瀬能, 2000)、奈良県の水系ではヒメダカ由来のミトコンドリア DNA が確認されており、自然下においてもヒメダカと野生メダカの交雑による遺伝子移入が確認されている (小山・北川, 2009)。地域間や河川間の無分別なメダカの移植は、先住魚と放流魚との交雑を引き起こし、地方個体群としての特性を失わせる (酒泉, 1997)。また地域に適応的でない遺伝子の混入により、集団全体の繁殖力や環境変化に対する回復力を低下させる可能性も指摘されており (日本生態系協会, 1998)、メダカの放流の問題に警鐘が鳴らされている (清水孝昭, 2000; 竹花・酒泉, 2002 年)。

神奈川県内のメダカは平野部の小川や水田周辺の用水路などで最も普通にみられる淡水魚であったが、1960 年代から県東部・中部の水田は減少し、現在では神奈川県版レッドデータブックでは絶滅危惧 I A 類の希少淡水魚に位置づけられている (勝呂・瀬能, 2006)。現在も相模川等の多くの水域で記録されているが、一時期は完全に姿を消した水域とされている。すなわち、現在認められているものは放流による二次的分布であると推定されており、在来の個体群と特定されている生息地は三浦半島の北川と酒匂川の

農業用水路だけとなっている(勝呂・瀬能, 2006)。

本種は神奈川県水産技術センター内水面試験場や県教育センター等の公的機関で系統別の継代飼育が行われている(勝呂・瀬能, 2006)他、「藤沢メダカの学校をつくる会」等の市民団体によって保護活動が行われている(渡部, 2005)。しかし、一方で由来のはっきりとしていないメダカが神奈川県内の自然・人工水域に数多く存在しており(勝呂・瀬能, 2006)、絶滅危惧種である一方で国内外来種という難しい問題を抱えている。

メダカはミトコンドリア DNA の Cytochrome *b* 領域(1141bp)の解析により全国の集団構造が研究されており(Takehana et al., 2003)、遺伝子データベース(DDBJ等)に登録されている情報量が多く利用可能である。そこで本研究では、神奈川県内に生息あるいは飼育保存されている在来・非在来の明らかでないメダカを供試魚としてミトコンドリア DNA の Cytochrome *b* 領域(1141bp)の塩基配列を決定し、遺伝子データベース(DDBJ等)に登録されている既知の塩基配列と比較することで、神奈川県内の在来の系統かどうかを推定することを試みた。

第2章 材料および方法

1. 供試魚

供試魚には、2010年7月に神奈川県内の水域でタモ網(目幅約3mm, 松田漁具店)を用いて採捕した3地点(地点番号3酒匂川B,4尾;地点番号9秦野,10尾;地点番号13生田緑地,10尾)24個体、および神奈川県水産技術センター内水面試験場主任研究員勝呂尚之氏、中山和也氏(酒匂川水系の環境を考える会)より供試された11地点65個体(地点番号1箱根,3尾;地点番号2酒匂川A,3尾;地点番号4藤沢,3尾;地点番号5逗子,3尾、地点番号6三浦A,4尾;地点番号7川崎,3尾;地点番号8大井町,8尾;地点番号10平塚,10尾;地点番号11大磯,9尾;地点番号12三浦B,9尾;地点番号14多摩川,10尾)、の計14地点89個体を用いた(Fig. 1, Table 1)。得られた個体は100%エタノールで固定した後、使用時まで遮光室温で保存した。なお、各地点およびこれまでに報告されている供試魚の詳細は下記の通りである。詳細については神奈川県水産技術センター内水面試験場主任研究員勝呂尚之氏から提供された情報を基に記した。また、地点番号1-7は酒泉満教授(新潟大学)により過去に遺伝子解析が実施され、在来の可能性が高いと推定されている。

地点番号1: 箱根

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。早川水系風祭周辺で1950~60年頃、箱根宮の下の旅館「奈良屋」の職員の子供によって採捕され、同旅館の池に放流以後飼育管理されていた個体を、試験場に移収された。

地点番号2: 酒匂川A(旧小田原)

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。野生メダカの生息地である小田原市酒匂川水系の桑原鬼柳用水路で1992年、加藤孝三氏が採捕し、県教育センターを経て試験場で飼育管理されていた。

地点番号3: 酒匂川B(旧小田原)

神奈川県野生メダカの生息地である小田原市酒匂川水系の桑原鬼柳用水路において、2010年7月に神奈川県内水面試験場主任研究員勝呂尚之氏と共に著者自身が採捕したものである。

地点番号4: 藤沢

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。藤沢市境川水系鶴沼藤が谷の蓮池において1957年、池田正博氏が採捕して庭池で飼育していたものを前水産総合研究所内水面試験場長の城条義興氏が確認、以後飼育管理されていた。

地点番号5: 逗子

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。旧黒川氏の池(田越川水系)で2001年に採捕され、逗子メダカの会で保護されていた。

地点番号6: 三浦A

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。北川において1991年頃、辻功氏によって採捕され、上宮田小学校、県教育センターを経て飼育管理されていた。

地点番号7: 川崎

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。川崎市のため池(鶴見川水系)において1953年、川崎市麻生区在住の瀬戸口氏が採捕。採捕した池が埋め立てられたため、市民グループによって保護され、町田市金井の農家で飼育、その後、試験場へ移収され、飼育管理されていた。

地点番号 8: 大井町

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。神奈川県足柄上郡大井町の市役所付近の人工池(酒匂川水系)で2002年に採捕され以後、試験場で飼育管理されていた。人工池であるため放流起源なのは明らかである。

地点番号 9: 秦野

秦野市の高校の敷地内人工池(金目川水系)で2010年に神奈川県内水面試験場主任研究員勝呂尚之氏と共に著者自身で採捕したものである。いつ頃からメダカが生息していたかは不明である。

地点番号 10: 平塚

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。平塚市城島の三面コンクリートの農業用水路(金目川水系)で2006年に大磯町在住の中山和也氏によって採捕され、その後自宅で飼育管理されていた。

地点番号 11: 大磯

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。葛川本流・大磯ゴルフコース前で2009年に大磯町在住の中山和也氏によって採捕され、その後自宅で飼育管理されていた。

地点番号 12: 三浦B

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。北川水系で1970年頃、三浦市在住の柳井晋氏によって採捕され、その後自宅で飼育管理されていた。

地点番号 13: 生田緑地

川崎市多摩区に位置する生田緑地内の溜め池(多摩川水系)で 2010 年に著者自身で採捕したものである。人工池であるため放流起源であることは明らかで、黄色型のメダカ(ヒメダカ)も多数確認されている。

地点番号 14: 多摩川

神奈川県水産技術センター内水面試験場系統保存個体。世田谷区付近の多摩川で君塚芳輝氏によって採捕された。なお、採取された年は不明である。

2. 分子系統解析

島田(2006; 湿原の保全を中心とした地域環境の整備に関する総合的研究)の方法を一部改変して Cytochrome *b* 領域の塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。

1) DNA 抽出

DNA 抽出は、TNES-U buffer を用いたフェノールクロロホルム法 (Ashida *et al.*, 1996) を一部改変した方法を用いて行なった。1.5ml チューブ (WATTSON) に 100% エタノール中で室温保存していた供試魚の尾鱗の一部を解剖用ハサミにより 3 mm × 3 mm 程度に細切し、TNES-U buffer (10mM Tris-HCl buffer, pH 8.0; 10mM EDTA, pH 8.0; 125mM NaCl; 1% SDS; 8M Urea) 400ul, 5mg/ml Proteinase K 溶液 (100mg/ml Proteinase K (Wako) を滅菌 UPW で 4 倍希釈) 20ul を加え数回のボルテックスを挟みながら 37°C で一晩インキュベートした。これに 2.5M NaCl 100ul を加え、PCI (Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol=25: 24: 1) 550ul を加えて約 10 分間転倒混和した後、室温で 15,000rpm、5 分間遠心後、上清を新たな 1.5ml チューブに移した。次に、CIA (Choloroform: Isoamyl Alcohol=24: 1) 500ul を加え 10 分間転倒混和した後、室温で 20,627 × G、5 分間遠心後、上清を新たな 1.5ml チューブに移した。得られた上清に 3M

酢酸ナトリウム 40ul、100%エタノール 1000ul の順に加え、室温で 10 分間静置した。4℃で 20,627×G、15 分間遠心して上清を除去したものに 70%エタノール 500ul を加え、4℃で 20,627×G、5 分間遠心後、上清を除去した。最後に遠心乾燥機 (DNA mini, Here Lab. Equipment) を用いて 20 分間乾燥させた後、滅菌 UPW 60ul を加えて溶解したものを粗全 DNA とした。抽出粗全 DNA は使用時まで 4℃で保存した。抽出物は分光光度計 (GeneQuant, Amersham Biosciences) を用いて DNA 濃度を測定し、10ng/ul になるように希釈したものを PCR 増幅の鋳型として用いた。

2) PCR (Polymerase Chain Reaction) 増幅

PCR 増幅には、Miya *et al.* (2003) の報告を基に当研究室 (相木) が設定したミトコンドリア DNA (以後 mtDNA と略す) の Cytochrome *b* 領域を対象とした 5'側プライマー Cytb-1F (5'-GCCAGGGTTTAAACCAGGA-3') および 3 側プライマー Cytb-1R (5'-CGCTCGGCAGAGAAATAGTTT-3') (島田, 2006) を使用した (Fig. 2, Table 2)。

PCR 増幅は、0.2ml PCR チューブ (WATSON) に 25mM MgCl₂ 2ul、5×Colorful Buffer 4ul、dNTP2ul、5U/ul Taq DNA polymerase (Promega) 0.2ul、滅菌 UPW 8.8ul、5' 側および 3' 側プライマーを各 1ul、および鋳型 DNA 1ul を加え最終量を 20ul に調整したものを用いた。PCR 反応はサーマルサイクラー (My CyclerTM thermal cycler、Bio-RAD) を用いて 94℃で 1 分間加熱した後、94℃ 30 秒、57℃ 30 秒、72℃ 1 分 15 秒のサイクルを 30 サイクル行い、72℃で伸張反応を 2 分間行った。

PCR 増幅後、対象領域の増幅の有無を確認するために PCR 産物の電気泳動を行った。PCR 産物 2ul にローディングバッファー (TOYOBO) 2ul を加えて混合し、1.2% アガロースゲル (Agarose S, Nippongene) にローディングし、電気泳動槽 (Mupid-α) を用いて 100V、30 分間程度泳動した。電気泳動の際には、泳動マーカー (O'Gene RulerTM DNA Ladder Mix, Fermentas) を同時に流し目的とする領域の増幅の指標とした。泳動後、ゲルは 100ug/ml エチジウムブロマイド溶液 (Nippongene) 中に移し 2~5 分間染色し

た後、10 分間流水中で洗浄し、UV イルミネーター(コスモバイオ)を用いて観察した。1200bp 付近に PCR 産物を確認できたものについては、泳動写真撮影機 (Fluor-S Multi Imager, Bio-Rad)を用いて泳動像を記録した。

3) PCR 産物の精製

PCR 産物の精製は、ExoSAP-IT (GE Healthcare)を用いて行った。0.2ml PCR チューブに PCR 産物 9ul を移し、これに滅菌 UPW により 10 倍希釈した ExoSAP-IT 3ul を加え混合した後、サーマルサイクラー (My Cycler™ thermal cycler, Bio-RAD)を用いて 37°C で 30 分間、80°C で 15 分加熱したものを DNA シークエンス反応のための鋳型とした。

4) DNA シークエンス解析

DNA シークエンス解析は、Dye Terminator 法 (ABI)により行った。PCR 増幅に用いた 5'側プライマー Me-Cytb-1F および 3'側プライマー Me-Cytb-1R に加え、Takehana *et al.* (2003) が報告している 5'側プライマー CytbFb (5'-CAAATATCATTTTGAGGGGCCACTGT-3') および CytbFc (5'-CGACAAAGTATCCTTCCACCCTT-3')、CytbFd (5'-CCCTATTCTACACACCTCCCACCCTTACTT-3')、CytbFe (5'-CTCGTCAGTTGCACATCTGCCG-3')、3'側プライマー CytbRVb (5'-ACTGAAAATCCCCCTCAAATTCATTG-3') および CytbRVc (5'-CCTCCAAGTTTGTGGGAATTGATCGTAG-3')、CytbRVd (5'-GCATGTATATTCCTGGATTAAGTCAGCCGTA-3')の計 9 プライマーを用いた (Fig. 2, Table 2)。なお、その後 9 プライマー使用することなく全塩基配列を決定できることを確認できたため、93 個体中 53 個体については、高山ら (2006)を参考にし、1F、1R、Fb、Fd、RVb、RVc の計 6 プライマー、またはそれに Fc を加えた計 7 プライマーを使用して解析した。

シーケンス反応は、0.2ml PCR チューブに Ready Reaction Premix (Big Dye Terminator v1.1/3.1, ABI) 1ul、5×Sequencing Buffer (Big Dye Terminator v1.1/3.1, ABI) 1.5ul、10uM プライマー 0.5ul、滅菌 UPW 6ul および精製 PCR 産物 1ul を加え、最終量を 10ul となるように調整したものを用いた。シーケンス反応はサーマルサイクラー (My Cycler™ thermal cycler, Bio-RAD) を用いて、94℃で 2 分間加熱した後、96℃ 10 秒、57℃ 5 秒、60℃ 4 分のサイクルを 25 サイクルで行った。

4) シーケンス反応産物の精製

得られたシーケンス反応産物はエタノール沈殿により精製した。0.2ml PCR チューブから 10ul シーケンス反応産物およびシーケンス反応産物を回収した滅菌 UPW 30ul を新しい 1.5ml チューブに移し、125mM EDTA・2NA 4ul、3M 酢酸ナトリウム 4ul、100% エタノール 100ul の順に加え、室温で 15 分間静置後、4℃で 20,627×G、20 分間遠心した後、上清を除去した。これに 70%エタノール 150ul を加え、4℃で 20,627×G、5 分間遠心した。上清を除去した後、遠心乾燥機を用いて 20 分間乾燥させた後、使用時まで -30℃で保存した。

5) 塩基配列の決定

得られた精製シーケンス反応産物は、オート DNA シーケンサー (ABI PRISM3100 もしくは 3130xl, Applied Biosystems) によりシーケンス解析を行った後、アラインメントソフト (DNASTAR SeqMan, Lasergene) を用いて、最終的には目視確認により塩基配列を決定した。

6) データ解析

得られた塩基配列は CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) を用いて mtDNA のハプロタイプの検出を行った。次に NCBI 等のデータバンクに登録されている塩基配列

情報 (Takehana *et al.*, 2003) と比較解析を行った。決定した塩基配列は、既報に報告されているハプロタイプ (Takehana *et al.*, 2003) も含め、CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997) を用いて多重アラインメントを行った後、MEGA (Kumar *et al.*, 2001) を用いて、Kimura's two parameter 法 (Kimura *et al.*, 1980) に基づく近隣結合法 (Neighbor-joining: NJ ; Saitou and Nei , 1987) により系統樹を作成し、属する Subclade を確認した。

第3章 結果

14 地点 89 尾を解析した結果、計 8 種類のハプロタイプが確認された。下記に地点別の結果を示す (Table 1)。

地点番号 1: 箱根

3 尾を解析した結果、全て同一の配列 (ハプロタイプ K1) であった。相同性検索を行った結果、K1 は神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731) および Hd-rR 系統 (DDBJ 登録番号 AB084753) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。

地点番号 2: 酒匂川 A (小田原)

3 尾を解析した結果、3 つのハプロタイプ K1、K3、および K4 が検出された。相同性検索を行った結果、K1 は神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731) および Hd-rR 系統 (DDBJ 登録番号 AB084753) の塩基配列と 1141bp と完全に一致した。K2 は岡山県岡山市東区瀬戸町 (旧赤磐郡瀬戸町) 産 (DDBJ 登録番号 AB084694) の塩基配列と 1141bp のうち 1138bp が一致した。K3 は岡山県岡山市東区瀬戸町 (旧赤磐郡瀬戸町) 産 (DDBJ 登録番号 AB084694) の塩基配列と 1141bp のうち 1139bp が一致した。
B-VII

地点番号 3: 酒匂川 B (小田原)

4 尾を解析した結果、全て同一の配列 (ハプロタイプ K1) であった。相同性検索を行った結果、K1 は神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731) および Hd-rR 系統 (DDBJ 登録番号 AB084753) の塩基配列と 1141bp のうち 1141bp が一致した。

地点番号 4: 藤沢

3 尾を解析した結果、全て同一の配列でハプロタイプ K1 が検出された。相同性検索

を行った結果、K1 は神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731) および Hd-rR 系統 (DDBJ 登録番号 AB084753) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。

地点番号 5: 逗子

3 尾を解析した結果、すべて同一の配列でハプロタイプ K2 が検出された。相同性検索を行った結果、K2 は茨城県水戸市産 (DDBJ 登録番号 AB084710) の塩基配列 1141bp と一致した。 B-A

地点番号 6: 三浦 A

4 尾を解析した結果、2 つのハプロタイプ K2、K5 が検出された。相同性検索を行った結果、K2 は茨城県水戸市産 (DDBJ 登録番号 AB084710) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。K5 は滋賀県大津市堅田産 (DDBJ 登録番号 AB084726) の塩基配列と 1141bp のうち 1140bp が一致した。 B-I
B-VII

地点番号 7: 川崎

3 尾を解析した結果全て同一の配列でハプロタイプ K2 が検出された。相同性検索を行った結果、K2 は茨城県水戸市産 (DDBJ 登録番号 AB084710) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。 B-I

地点番号 8: 大井町

8 尾を解析した結果、2 つのハプロタイプ K1、K6 が検出された。相同性検索を行った結果、K1 は神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731) および Hd-rR 系統 (DDBJ 登録番号 AB084753) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。K6 は岡山県岡山市東区瀬戸町 (旧赤磐郡瀬戸町) 産 (DDBJ 登録番号 AB084694) の塩基配列と最も高い相同性が認められ 1141bp のうち 1140bp が一致した。 B-I
B-VII

地点番号 9: 秦野

10 尾を解析した結果、すべて同一の配列でハプロタイプ K1 が検出された。相同性検索を行った結果、K1 は神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731) および Hd-rR 系統 (DDBJ 登録番号 AB084753) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。

B-II

地点番号 10: 大磯

9 尾を解析した結果、2 つのハプロタイプ K1、K6 が検出された。相同性検索を行った結果、K1 は神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731) および Hd-rR 系統 (DDBJ 登録番号 AB084753) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。K6 は岡山県岡山市東区瀬戸町 (旧赤磐郡瀬戸町) 産 (DDBJ 登録番号 AB084694) の塩基配列と最も高い相同性が認められ 1141bp のうち 1140bp が一致した。

B-II

B-VI

地点番号 11: 平塚

10 尾を解析した結果、2 つのハプロタイプ K1、K6 が検出された。ハプロタイプ K1 が検出された。相同性検索を行った結果、K1 は神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731) および Hd-rR 系統 (DDBJ 登録番号 AB084753) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。K6 は岡山県岡山市東区瀬戸町 (旧赤磐郡瀬戸町) 産 (DDBJ 登録番号 AB084694) の塩基配列と最も高い相同性が認められ 1141bp のうち 1140bp が一致した。

B-II B-VI

地点番号 12: 三浦 B

9 尾を解析した結果、2 つのハプロタイプ K2、K5 が検出された。相同性検索を行った結果、K2 は茨城県水戸市産 (DDBJ 登録番号 AB084710) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。K5 は滋賀県大津市堅田産 (DDBJ 登録番号 AB084726) の塩基配列と最も高い相同性が認められ 1141bp のうち 1140bp が一致した。

B-I B-VI

地点番号 13: 生田緑地

10尾を解析した結果、2つのハプロタイプ K1、K7 が検出された。相同性検索を行った結果、K1 は神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731) および Hd-rR 系統 (DDBJ 登録番号 AB084753) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。K7 は滋賀県大津市堅田産 (DDBJ 登録番号 AB084726) の塩基配列と最も高い相同性が認められ 1141bp のうち 1138bp が一致した

地点番号 14: 多摩川

10尾を解析した結果、2つのハプロタイプ K2、K8 が検出された。相同性検索を行った結果、K2 は茨城県水戸市産 (DDBJ 登録番号 AB084710) 1141bp と完全に一致した。K8 は群馬県前橋市産 (DDBJ 登録番号 AB084693) および埼玉県比企郡吉見町産 (DDBJ 登録番号 AB084695) の塩基配列 1141bp と完全に一致した。

上記に示した本研究で得られた全ハプロタイプ、および Takehana *et al.*, (2003) によって報告されている 1 Subclade につき 2 (ハプロタイプ) の Cytchrome *b* 領域の塩基配列 (DDBJ 登録番号 AB084675 [A3 新潟県新潟市], AB084681 [A9 石川県七尾市], AB084684 [A10 福井県あわら市 (旧坂井郡芦原町)], AB084686 [A14 兵庫県豊岡市], AB084694 [B1a 岡山県岡山市東区瀬戸町 (旧赤磐郡瀬戸町)], AB084698 [B1d 高知県須崎市], AB084701 [B4 宮崎県宮崎市], AB084702 [B4 鳥取県米子市], AB084703 [B5 静岡県磐田市], AB084704 [B5 京都府丹後市久美浜], AB084707 [B8 鹿児島県熊毛郡中種子町], AB084710 [B11 茨城県水戸市], AB084715 [B15 福岡県豊前市], AB084718 [B15 山口県下関市], AB084722 [B19 静岡県富士市], AB084724 [B21 静岡県静岡市], AB084726 [B22 滋賀県大津市堅田], AB084729 [B25 鹿児島県上甕島], AB084731 [B27 神奈川県小田原市], AB084731 [B27 HdR 系統], AB084732 [B28 京都府京丹後市丹後 (旧竹野郡丹後

町)], AB084737[B33 三重県熊野市], AB084738[B33 和歌山県新宮市], AB084741[B36 東京都世田谷区], AB084747[B42 高知県四万十市(旧中村市)], AB084748[C1 栃木県真岡市], AB084749[C2 千葉県富津市], AB084750[大韓民国江原道束草市], AB084752[A1 HNI系統], AB094504[B24 沖縄県名護市])情報を含む、分子系統樹を作成した結果を Fig.3 に示す。ハプロタイプ K1 および K2 は紀伊半島以東の東日本地域に分布する Subclade B-II および B-I でそれぞれ同一のクラスターを形成した。ハプロタイプ K3、K4、K5、K6、K7、および K8 は、瀬戸内地方に分布する Subclade B-VII で同一のクラスターを形成した。

第 4 章 考察

mtDNA の Cytchrome *b* 領域の塩基配列を決定した結果、8 種類のハプロタイプが検出され、それらのハプロタイプは Subclade B- I、II、および VII に属した。竹花・酒泉 (2002) および Takehana *et al* (2003) によると、Subclade B- I および II は紀伊半島以東の東日本地域、Subclade B- VII は瀬戸内地方に分布すると推定されている。よって本研究では、ハプロタイプ K1 および K2 の個体は神奈川県在来、それ以外のハプロタイプ K3-8 は非在来の個体であると推定した。

地点別にみると、14 地点中 8 地点からは本来、神奈川県で確認されるはずのない、上述した瀬戸内地方に分布するハプロタイプ K3-K8 (Subclade B- VII) が検出された。このような Subclade B- VII に属する遺伝子をもつメダカは関東地方の各地で確認されており、それらは人為的な要因が疑われている (竹花・酒泉 2002)。竹花・酒泉 (2002) はこの人為的な要因については詳しく述べていないが、本研究の結果と合わせて考えてみると、現在、神奈川県内の水域で確認されている大部分のメダカは、放流あるいは放流個体が在来の個体が混在しているといえる。

向井 (2007) は、現在販売されている日本産淡水魚は瀬戸内地方から九州北部が商業的な供給源として大きな割合を占めている述べており、今回確認された Subclade B- VII に属するハプロタイプは観賞用あるいは肉食魚の餌用として販売されているメダカが放流されたものに由来するものと推察された。また、黄色型メダカ (ヒメダカ) として流通されている個体は、東瀬戸内地方または代表的な黄色型系統で実験モデル生物として用いられている系統である Hd-rR 系統 (Hyodo-Taguchi and Sakaizumi, 1993) 等に由来していると推定されている (小山・北川, 2009)。なお、Hd-rR 系統は神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731) の塩基配列と同一のハプロタイプであるため、本研究の結果のみでは、今回確認されたハプロタイプ K1 の個体 [神奈川県小田原市産 (DDBJ 登録番号 AB084731)] に黄色型メダカ (ヒメダカ: DDBJ 登録番号 AB084753) の系統が混在している可能性を否定できるものではない。しかし、地点番号 13 (生田緑地) のような放

流起源が明らかで黄色型メダカ(ヒメダカ)が確認されている水域で採捕されたK1の個体は、色型メダカ(ヒメダカ)に由来している可能性が高いと思われる。なお神奈川県内水面試験場で系統保存されている在来の可能性が高い地点でも、本来確認されるはずのない瀬戸内地方に分布する Subclade B-VII に属されるハプロタイプが検出された。飼育過程あるいは採捕された段階で放流された個体が混ざっていたと思われる。

一方で、本研究において地点番号 9(秦野)のように非在来と推定されるハプロタイプが検出されなかった地点も存在する。現在、神奈川県内で在来の可能性が高いと推定されている地点の多くが数十年前に採捕された個体が飼育管理されているものである。秦野は人工池であるため放流起源であることは明らかであるが、数十年前に採捕された近隣地域の在来のメダカが放流された可能性もある。解析尾数が 10 尾と少なく放流された時期が明確でないため、現時点では在来と特定することは難しいが、今後、解析尾数を増やすことで、在来の地点として扱うべき地点となるかもしれない。

いうまでもないが、非在来のメダカを自然水域に放流することは混乱を生じさせ、また遺伝子汚染の原因となる。本研究の結果が、地域系統を無視した飼育されているメダカの放流に警鐘を鳴らすものになることを期待する。

謝辞

本研究は日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科海洋生物機能化学研究室病理学グループにて行われたものである。

本研究を行うにあたり研究の進め方や考え方等の多大なるご指導とご鞭撻をいただいた日本大学生物資源科学部海洋生物機能化学研究室(病理学グループ)の間野伸宏専任講師に心から感謝を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導とご鞭撻を頂いた日本大学名誉教授廣瀬一美先生に心から感謝申し上げます。また、研究の進め方や考え方などのご指導、試料入手のご協力をして頂いた石川県水産総合センター相木寛史博士、神奈川県水産技術センター内水面試験場主任研究員勝呂尚之氏、日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科 OG 榎本亜矢氏、酒匂川水系の環境を考える会の中山和也氏および酒匂川水系のメダカと生息地を守る会の高橋由季氏に深く感謝の意を表します。

実験を遂行するにあたって、終始丁寧なご指導と多大なご助言を頂いた難波亜紀博士に心から感謝申し上げます。また、実験技術習得のご指導をしてくださった日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科 OB 大里和輝氏、神谷浩章氏、および同期として応援してくれた 2011 年学部卒業のみなさんに心から感謝いたします。

最後に本研究を遂行するにあたり、犠牲となった多くの生物に心から感謝します

要旨

メダカ *Oryzias latipes* はダツ目メダカ科に属する小型の淡水魚である。近年、本種は圃場整備等の環境の変化によって全国的に減少し絶滅の危機に瀕しており、神奈川県内では県版レッドデータブックによって絶滅危惧 I A に指定されている。県内の在来の個体群と特定できる生息地は 2 箇所のみとされており、藤沢等の在来の可能性が高い系統が神奈川県水産技術センター内水面試験場等で系統保存されている状況である。しかし、一方で県内の水域において野生絶滅したと思われる場所でメダカの生息が確認されており、これらのメダカは放流された個体であることが疑われているが、見た目からの判断は困難であった。そこで本研究では、ミトコンドリア DNA の Cytchrome *b* 領域の解析を行うことにより、神奈川県内の在来・非在来の不明なメダカの由来を推定することを試みた。

在来の可能性の高い 7 地点、在来・非在来の不明な 7 地点の計 14 地点 89 尾のメダカをサンプルとして、ミトコンドリア DNA の Cytchrome *b* 領域の塩基配列を決定した。次に多重整列を行い、ハプロタイプを検出した。そして、過去報告・登録されている塩基配列とともに分子系統樹を構築し、その由来について推定した。

在来の可能性が高い 7 地点からは 2 地点から、在来・非在来の不明な 7 地点中 6 地点から、本来、神奈川県で確認されるはずのない瀬戸内地方に分布する Subclade B-VII に属されるハプロタイプが検出された。これらの結果から、現在、神奈川県内の水域で確認されている大部分のメダカは、放流された個体あるいは放流された個体と在来の個体が混在している可能性が高いと推察された。

引用文献

細谷和海(2000): メダカの生息状況と保護. 水環境学会誌, **23**, 135-139.

Julie D. Thompson · Toby J. Gibson · Frédéric Plewniak · François Jeanmougin ·
Desmond G. Higgins (1997): The CLUSTAL_X windows interface: flexible
strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.
Nucleic Acids Research, **24**, 4876-4882.

環境省(2007): レッドリスト汽水・淡水魚類. 報道発表資料「哺乳類、汽水・淡水魚類、
昆虫類、貝類、植物 I 及び植物 II のレッドリストの見直しについて」. 自然環境研
究センター, 東京, 232.

小山直人・北川忠生(2009): 大和川水系で認められたヒメダカによる遺伝的攪乱, 日
本魚類学会年会口頭発表, 7.

小山直人・北川忠生(2009): 奈良県大和川水系のメダカ集団から確認されたヒメダカ
由来のミトコンドリア DNA. 魚類学雑誌 **56**(2), 153-157.

Meyer Axel(1994): Shortcomings of the cytochrome *b* gene as a molecular marker.
Trends Ecology and Evolution **9**, 8, 278-280.

Mitsuru Sakaizumi · Kazuo Moriaki and Nobuo Egami(1983): Allozymic variation
and regional differentiation in wild populations of fish *Oryzias latipes*. Copeia,
311-318.

Mitsuru Sakaizumi(1986): Genetic divergence in wild populations of Medaka,
Oryzias latipes (Pisces: Oryziatidae) from Japan and China. Genetica, **69**,
119-125.

水谷正一・森淳(2009): 春の小川の淡水魚—その生息場と保全. 学報社, 東京.

Motoo Kimura(1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base
substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of
Molecular Evolution, **16**, 111-120.

- 向井貴彦(2007):DNA から見た外来種研究:どこまで“犯人”を追えるのか?.生物科学.58,192-201.
- 日本生態系協会(1998):川の自然を生かすアメリカのレクリエーション.(財)日本生態系協会.
- Naruya Saitou・Masatoshi Nei(1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 406-425.
- 佐原雄二(1989):メダカ.川那部浩哉・水野信彦(編),日本の淡水魚,山と溪谷社,426-429.
- 瀬能宏(2000):今、小田原のメダカが危ないー善意?の放流と遺伝子汚染.自然科学のとびら,6(2),14.
- 島田正文(2006):湿原および周辺域における水生生物の保全.湿原の保全を中心とした地域環境の整備に関する総合的研究,70-89.
- Sudhir Kumar・Koichiro Tamura・Ingrid B Jakobsen・Masatoshi Nei(2001): MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17, 1244-1245.
- 勝呂尚之・瀬能宏(2006):メダカ.汽水・淡水魚類,神奈川県レッドデータブック生物調査報告書2006,290.
- Takafumi Katsumura・Shoji Oda・Shuhei Mano・Naoyuki Suguro・Koji Watanabe・Hiroshi Mitani・Hiroki Oota・Shoji Kawamura(2009): Genetic differentiation among local populations of medaka fish (*Oryzias latipes*) evaluated through grid- and deme-based sampling. *Gene*, 443, 170-177.
- 高橋清孝(2009):田園の魚をとりもどせ.恒星社厚生閣,東京,137.
- Takashi Asahida, Tanori Kobayashi, Kenji Saitoh, and Ichiro Nakayama(1996): Tissue Preservation and Total DNA Extraction from Fish Stored at Ambient

Temperture Using Buffers Containing High Concentration of Urea. Fisheries science, **62**: 727-730.

高山-渡辺絵理子・辻徹・佐藤政則・土井寅治・八畝拓司・佐々木隆行・渡辺明彦・鬼武一夫(2006): 山形県に生息するメダカにおける種内分化の分子遺伝学的解析. 山形大学紀要, 自然科学, **16(2)**, 55-62.

竹花佑介・酒泉 満(2002): メダカの遺伝的多様性の危機. 遺伝, **56**, 66-71.

渡部かほり(2005): 藤沢メダカ復活作戦. 稀少淡水魚の現在と未来, 片野修・森誠一編, 信山社, 50-60.

Yasuko Hyodo-Taguchi, Sakaizumi Mitsuru(1993): List of inbred strains of the medaka, *Oryzias latipes*, maintained in the Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences. Fish Biology, J. Medaka, **5**, 29-30.

Yusuke Takehana, Naoko Nagai, Masaru Matsuda, Kimiyuki Tsuchiya and Mitsuru Sakaizumi(2003): Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome *b* Gene in Japanese Wild Populations of Medaka, *Oryzias latipes*. Zoological Science, **20**, 1279-1291.

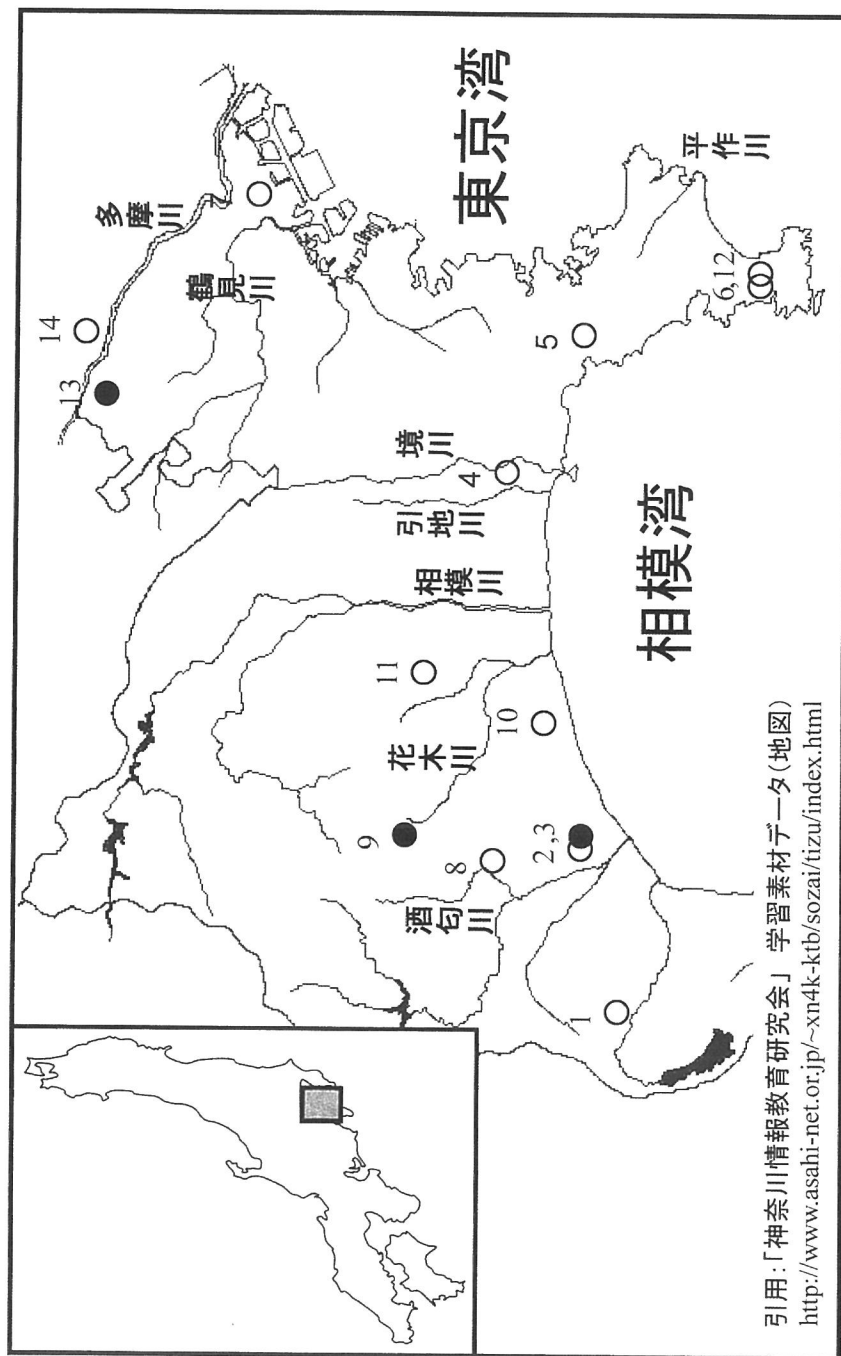


Fig. 1 本研究におけるメダカのサンプリング地点。
 ○: 神奈川県内水試飼育個体, ●: サンプリング個体。

Table 1 本実験で用いたメダカ *Oryzias latipes* のリスト

地点番号	地点名	水系	解析数(尾)	ハプロタイプ数	ハプロタイプ	属するサブクレード
1	箱根	早川	3	1	K1	B-II(3)
2	酒匂川A	酒匂川	3	3	K1, K3, K4	B-II(1), B-VIII(2)
3	酒匂川B	酒匂川	4	1	K1	B-II(4)
4	藤沢	境川	3	1	K1	B-II(3)
5	逗子	田越川	3	1	K2	B-I(3)
6	三浦A	北川	4	2	K2, K5	B-I(2), B-VIII(2)
7	川崎	鶴見川	3	1	K2	B-I(3)
8	大井町	酒匂川	8	2	K1, K6	B-II(2), B-VIII(6)
9	秦野	金目川	10	1	K1	B-II(10)
10	大磯	葛川	9	2	K1, K6	B-II(8), B-VIII(1)
11	平塚	金目川	10	1	K1	B-II(9), B-VIII(1)
12	三浦B	北川	9	2	K2, K5	B-I(7), B-VIII(2)
13	生田	多摩川	10	1	K7	B-II(1), B-VIII(9)
14	多摩川	多摩川	10	2	K2, K8	B-I(7), B-VIII(3)

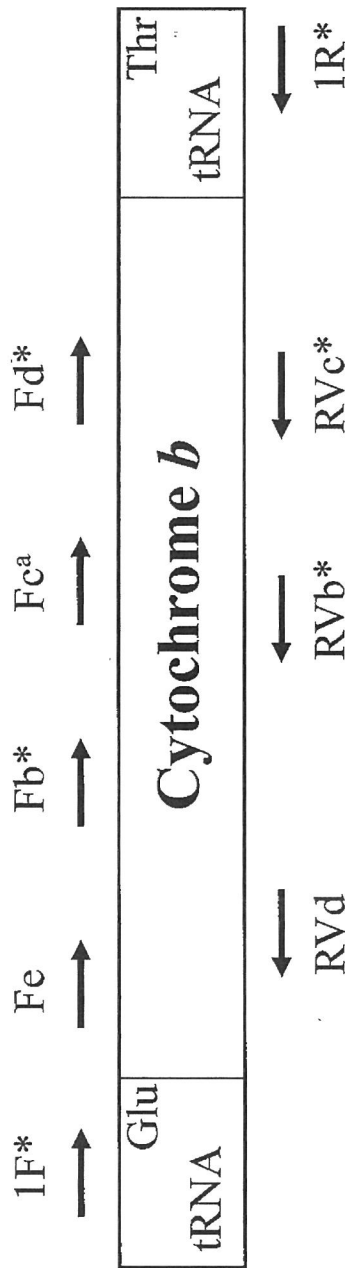


Fig. 2 メダカのマイトコンドリアDNA Cytochrome *b* 領域の DNAシーケンス解析に使用したプライマーの配置図。

- *: 6プライマーで解析に使用したプライマー。
- *, a: 7プライマーで解析に使用したプライマー。

Table 2 本実験で用いたプライマーリスト

Primer	Sequence	Reference
Me・Cytb 1F	5'-GCCAGGGTTTAAACCAGGA-3'	島田, 2006
Cytb Fb	5'-CAAATATCATTTTGAGGGGCCACTGT-3'	Takehana <i>et al.</i> , 2003
Cytb Fc	5'-CGACAAAAGTATCCTTCCACCCCTT-3'	Takehana <i>et al.</i> , 2003
Cytb Fd	5'-CCCTATTCTACACACCTCCCACCCCTTACTT-3'	Takehana <i>et al.</i> , 2003
Cytb Fe	5'-CTCGTCAGTTGCCACATCTGCCCG-3'	Takehana <i>et al.</i> , 2003
Me・Cytb 1R	5'-CGCTCGGCAGAGAAATAGTTT-3'	島田, 2006
Cytb RVb	5'-ACTGAAAATCCCCCTCAAATTCATTG-3'	Takehana <i>et al.</i> , 2003
Cytb RVc	5'-CCTCCAAGTTTGTGGAAATTGATCGTAG-3'	Takehana <i>et al.</i> , 2003
Cytb RVd	5'-GCATGTATATCCCCGGATTAGTCAGCCGTA-3'	Takehana <i>et al.</i> , 2003

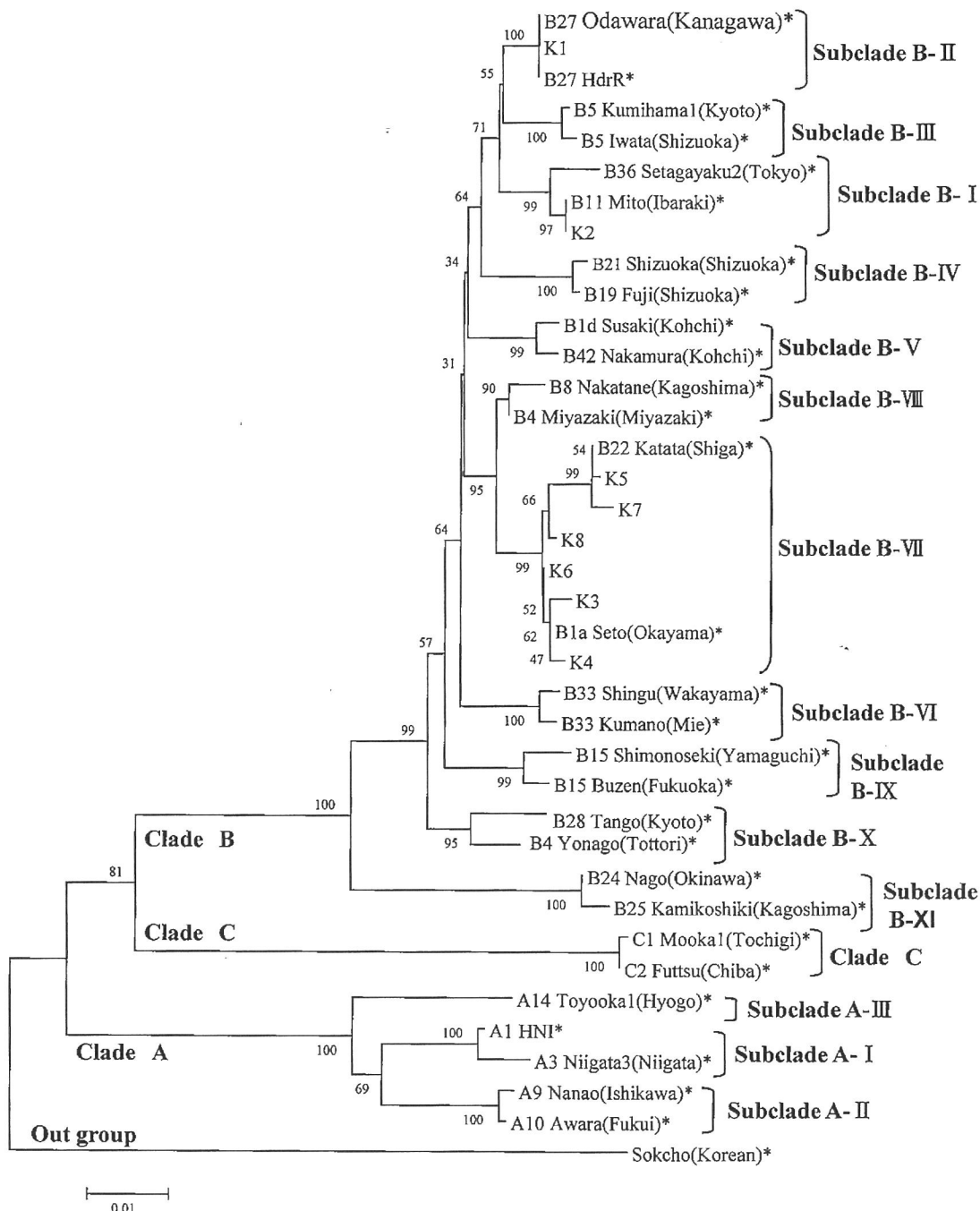


Fig. 3 近隣結合法により作成した系統樹。
 *印のついているものはTakehana *et al.*, (2003)で確認されたハプロタイプ。

付録 本実験で得られたハプロタイプ

>K1

ATGGCCAACCTTCGAAAAACCCACCCCCTGTAAAAATTGCAAACGATGCTCTA
GTTGACCTTCCAGCCCCTTCGAACATTTTCAGTTTGATGAACTTTGGTTCTCTTC
TCGGACTTTGTTTAGCCGCCCAAATCATCACGGGCCTTTTTCTTGCCATACATTAT
ACATCCGACATCGCCACAGCATTCTCATCAGTTGCACACATCTGCCGGGATGTTA
ACTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAACGGCGCTTCTTTTTCTTCAT
CTGCATTTACCTTCACATTGGGCGAGGCTTGTACTIONGATCCTACTTATACAAG
GAAACATGAAATGTCGGTGTAATTTCTTCTACTAGTAATAATAACGGCTTTCGT
AGGTTACGTTTTACCCTGAGGACAAATATCATTTTTGAGGAGCCACTGTAATCACC
AACCTCTTGTCTGCCGTCCCTTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGAG
GAGGATTTTCAGTAGATAACGCCACACTTACCCGATTCTTTGCCTTCCATTFCT
CCTCCCCTTCGTAATTGCCGCCGCAACAGTTGTTTCATCTAATTTTTCTTCACGAA
ACAGGTTCAAACAACCCAACCGGCCTCAATTCAGACCCCGACAAAGTCTCCTTC
CACCTTACTTTTTCTATAAAGACCTTTTAGGGTTTGCTGCCTTGCTAGTAGCCTT
AATTTCCCTGGCGCTTTTTCTCCCCAACCTGCTTGGAGACCCAGACAACCTTAC
CCCTGCCAACCCGCTAGTTACTCCCCCTCACATCAAGCCTGAATGATACTTCTTA
TTTGCCTACGCCATTCTACGATCAATTCCAAATAAACTTGGAGGGGTCCTAGCCC
TATTAGCCTCTATTCTAGTACTATTCTGGTCCCTATCCTACACACCTCTAAACAA
CGAAGCCTTACGTTTCGACCTTTACCCAATTCTTTTTCTGACTCCTAGTAGCAG
ACGTGATGGTTTTAACCTGAATTGGCGGAATGCCCGTAGAACACCCATTTATTAT
CATTGGTCAAATCGCATCTTTTCTTTATTTTTCCCTCTTCTTATTATAGCACCAGC
GGCGGGATGACTAGAAAATAAAGTCTTAAAATGACAAAT

>K2

ATGGCCAACCTTCGAAAAACCCACCCCCTGTAAAAATTGCAAACGATGCTCTA
GTTGACCTTCCAGCCCCTTCAAACATTTGATGAAACTTTGGTTCTCTTC
TCGGACTTTGTTTAGCCGCCAAATCATCACGGGCCTTTTTCTTGCCATACATTAT
ACATCCGACATCGCCACAGCATTCTCATCAGTTGCACACATCTGCCGGGATGTTA
ACTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAACGGCGCTTCTTTTTCTTCAT
CTGCATTTACCTTACATTGGGCGGGGCTTGACTACGGATCCTACTTATAACAAG
GAAACATGAAATGTCGGTGTAATTCTTCTCCTACTAGTAATAATAACGGCTTTCG
TAGGTTACGTTTTACCCTGAGGACAAATATCATTTTGAGGGGCCACTGTAATCAC
CAACCTTTTGTCTGCCGTCCCTTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGA
GGGGGATTTTCAGTAGATAACGCCACACTTACCCGATTCTTTGCCTTCCATTTC
TCCTCCCCTTCGTAATTGCCGCCGCAACAGTTGTTTCATCTAATTTTTCTTCACGA
AACAGGTTCAAACAACCCAACCGGCCTCAATTCAGACTCCGACAAAGTCTFCCTT
CCACCCTTACTTTTCCATATAAAGACCTTTTAGGGTTTGCTGCCTTGCTAGTAGCCT
TAATTTCCCTAGCGCTTTTCTCCCCAACCTGCTTGGAGACCCAGACAACCTTAC
CCCTGCCAACCCGCTAATTAATCCTCCCTCACATCAAGCCTGAATGATACTTCTTA
TTTGCCTACGCCATTCTACGATCAATTCCAAATAAACTTGGAGGAGTCCTAGCCC
TATTAGCCTCTATTCTAGTACTATTCTTGGTCCCCATCCTACACACCTCTAAACAA
CGAAGCCTTACGTTTCGACCTTTCACCCAATTCCTTTTCTGACTCCTAGTAGCAG
ACGTAATGGTTTTAACCTGAATTGGCGGAATGCCCGTAGAACCCATTTATTAT
TATTGGCCAAATCGCATCTTTTCTTTATTTTTCCCTCTTTCTTATTATATCACCAGC
GGCGGGATGACTAGAAAATAAAGTCTTAAAATGACAAT

>K3

ATGGCCAACCTTCGAAAAACCCACCCCCTGTAAAAATTGCAAACGATGCTCTG

GTCGACCTTCCAGCCCCTTCAAACATTTTCAGTTTGATGAAACTTTGGTTCTCTTC
TCGGACTTTGTTTAGCCGCCCAAATCATCACGGGCCTTTTTCTTGCCATACATTAT
ACATCCGACATCGCCACAGCATTCTCGTCAGTTGCACACATCTGCCGGGATGTTA
ACTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAACGGCGCTTCTTTTTCTTCAT
CTGCATTTACCTTACATTGGACGAGGCTTGACTACGGATCCTACTTGTACAAG
GAAACATGAAATGTCGGTGTAATTCTTCTTCTACTAGTAATAATAACGGCTTTCGT
AGGTTACGTTCTACCCTGAGGGCAAATATCATTTTGAGGGGCCACTGTAATCACC
AACCTCTTGTCGGCGTCCCCTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGAG
GGGGATTTTCAGTTGATAACGCCACACTTACCCGATTCTTTGCCTTCCATTTTCTC
CTCCCCTCGTAATTGCCGCCGCAACAGTTGTTTCATCTAATTTTTCTTCACGAAA
CGGGTTCAAACAACCCAACCGGCCTCAATTCAGACTCCGACAAAGTATCCTTCC
ACCCTTACTTTTCTATAAAGACCTTTTAGGGTTTGCTGCCTTGCTAGTAGCCTTA
ATTTCCCTAGCGCTTTTCTCCCCAACCTGCTTGGGGACCCAGACAACCTCACCC
CTGCCAACCCGCTAGTTACTCCCCCCACATCAAGCCTGAATGATACTTCTTATT
TGCTACGCCATTCTACGATCAATTCCAAATAAACTTGGAGGGGTCCTAGCCCTA
TTAGCCTCTATTCTAGTACTATTCTGGTCCCTATCCTACACACCTCTAAACAACG
AAGCCTTACATTTTCGACCTTTCACCCAATTCCTTTTCTGACTCCTAGTAGCAGAC
GTAATGGTTTTAACCTGAATTGGCGGGATGCCCGTAGAACACCCATTTATTATCA
TTGGTCAAATCGCATCTTTTCTTTATTTTTCCCTCTTTCTTATTATAGCACCAGCG
GCGGGATGACTAGAAAATAAAGTCTTAAAGTGACAAT

>K4

ATGGCCAACCTTCGAAAAACCCACCCCCTGTAAAAATTGCAAACGATGCTCTG
GTCGACCTTCCAGCCCCTTCAAACATTTTCAGTTTGATGAAACTTTGGTTCTCTTC
TCGGACTTTGTTTAGCCGCCCAAATCATCACGGGCCTTTTTCTTGCCATACATTAT

ACATCCGACATCGCCACAGCATTCTCGTCAGTTGCACACATCTGCCGGGATGTTA
ACTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAACGGCGCTTCTTTTTTCTTCAT
CTGCATTTACCTTCACATTGGACGAGGCTTGTACTIONGATCTACTTGTACAAG
GAAACATGAAATGTCGGTGTAATTCTTCTTCTACTAGTAATAATAACGGCTTTCGT
AGGTTACGTTTTACCCTGAGGGCAAATATCATTTTTGAGGGGCCACTGAAATCACC
AACCTCTTGTCTGCCGTCCCCTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGAG
GGGGGTTTTAGTTGATAACGCCACACTTACCCGATTCTTTGCCTTCCATTTTCT
CCTCCCCTTCGTAATTGCCGCCGCAACAGTTGTTTCATCTAATTTTTCTTCACGAA
ACGGGTTCAAACAACCCAACCGCCTCAATTCAGACTCCGACAAAGTATCCTTC
CACCTTACTTTTCTATAAAGACCTTTTAGGGTTTGCTGCCTTGCTAGTAGCCTT
AATTTCCCTAGCGCTTTTCTCCCCAACCTGCTTGGGGACCCAGACAACCTTCACC
CCTGCCAACCCGCTAGTTACTCCCCCCACATCAAGCCTGAATGATACTTCCTAT
TTGCCTACGCCATTCTACGATCAATTCCAATAAACTTGGAGGGGTCTAGCCCT
ATTAGCCTCTATTCTAGTACTATTCTGGTCCCTATCCTACACACCTCTAAACAAC
GAAgCCTTACATTTGACCTTTCACCCAATTCCTTTTCTGACTCCTAGTAGCAGA
CGTAATGGTTTTAACCTGAATTGGTGGGATGCCCGTAGAACACCCATTTATTATC
ATTGGTCAAATCGCATCTTTTCTTTATTTTTCCCTCTTTCTTATTATAGCACCAGCG
GCGGGATGACTAGAAAATAAAGTCTTAAAGTGACAAT>OdawaraA1

>K5

ATGGCCAACCTTCGA/AAAACCCAACCCCTGTTAAAATTGCAAACGATGCTCTG
GTGACCTTCCAGCCCCTTCAAACATTTGAGTTTGATGAACTTTGGTTCTCTTC
TCGGACTTTGTTGGCCGCCCAAATCATCAGGGCCTTTTTCTTGCCATACATTAT
ACATCCGACATCGCCACAGCATTCTCGTCAGTTGCACACATCTGCCGGGATGTTA
ACTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAACGGCGCTTCTTTTTTCTTCAT

CTGCATTTACCTTCACATTGGACGAGGCTTGACTACGGATCCTACTTGTACAAG
GAAACATGAAATGTCGGTGTAATTCTTCTTCTACTAGTGATAATAACGGCTTTCG
TAGGTTACGTTTTACCCTGAGGGCAAATATCATTTTGAGGGGCCACTGTAATCAC
CAACCTCTTGCTGCGCTCCCCTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGA
GGAGGATTTTCAGTTGATAACGCCACACTTACCCGATTCTTTGCCTTCCATTTTC
TCCTCCCCTTCGTAATTGCCGCCGAACAGTTGTCCATCTAATTTTCTTCACGA
AACGGGTTCAAACAACCCAACCGGCCTCAATTCAGACTCCGACAAAGTATCCTT
CCACCCCTTACTTTTCCCTATAAAGACCTTTTAGGGTTTGCTGCCTTGCTAGTAGCCT
TAATTTCCCTAACGCTTTTCTCCCCTAACCTGCTTGGGGACCCAGACAACCTTAC
CCCTGCTAACCCGCTAGTTACTCCCCTCACATCAAGCCTGAATGATACTTCCCTA
TTTGCCTACGCCATTCTACGATCAATTCCAAATAAACTTGGAGGGGTCCTAGCCC
TATTAGCCTCTATTCTAGTACTATTCCCTGGTCCCTATCCTACACACCTCTAAACAA
CGAAGCCTTACATTTTCGACCTTTCACCCAATTCCTTTTCTGACTCCTAGTAGCAG
ACGTAATGGTTTTAACCTGAATTGGTGGGATGCCCGTAGAACCCATTTATTAT
CATTGGTCAAATCGCATCTTTTCTTTATTTTTCCCTCTTCTTATCATAGCACCAG
CGGCGGGATGACTAGAAAATAAAGTCTTAAAGTGACAAT

>K6

ATGGCCAACCTTCGAAAAACCCACCCCTGTAAAAATTGCAAACGATGCTCTG
GTCGACCTTCCAGCCCCTTCAAACATTTCAAGTTGATGAAACTTTGGTTCTCTTC
TCGGACTTTGTTTAGCCGCCCAAATCATCACGGGCCTTTTTCTTGCCATACATTAT
ACATCCGACATCGCCACAGCATTCTCGTCAGTTGCACACATCTGCCGGGATGTTA
ACTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAACGGCGCTTCTTTTTCTTCAT
CTGCATTTACCTTCACATTGGACGAGGCTTGACTACGGATCCTACTTGTACAAG
GAAACATGAAATGTCGGTGTAATTCTTCTTCTACTAGTAATAATAACGGCTTTCG

AGGTTACGTTTTACCCTGAGGGCAAATATCATTTTTGAGGGGCCACTGTAATCACC
AACCTCTTGTCTGCCGTCCCCTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGAG
GGGGATTTTCAGTTGATAACGCCACACTTACCCGATTCTTTGCCTTCCATTTTCTC
CTCCCCTTCGTAATTGCCGCCGCAACAGTTGTTTCATCTAATTTTTCTTCACGAAA
CGGGTTCAAACAACCCAACCGGCCTCAATTCAGACTCCGACAAAGTATCCTTCC
ACCCTTACTTTTCTATAAAGACCTTTTAGGGTTTGCTGCCTTGCTAGTAGCCTTA
ATTTCCCTAGCGCTTTTCTCCCCAACCTGCTTGGGGACCCAGACAACCTTCACCC
CTGCCAACCCGCTAGTTACTCCCCTCACATCAAGCCTGAATGATACTTCCTATT
TGCTACGCCATTCTACGATCAATTCCAAATAAACTTGGAGGGGTCTAGCCCTA
TTAGCCTCTATTCTAGTACTATTCTGGTCCCTATCTACACACCTCTAAACAAG
AAGCCTTACATTTGACCTTTCACCCAATTCCTTTTCTGACTCCTAGTAGCAGAC
GTAATGGTTTTAACCTGAATTGGTGGGATGCCCGTAGAACACCCATTTATTATCAT
TGGTCAAATCGCATCTTTCTTTATTTTTCCCTCTTTCTTATTATAGCACCAGCGG
CGGGATGACTAGAAAATAAAGTCTTAAAGTGACAAT

>K7

ATGGCCAACCTTCGAAAACCCACCCCCTGTTAAAAATTGCAAACGATGCTCTG
GTCGACCTTCCAGCCCCTTCAAACATTTCAAGTTTGATGAAACTTTGGTTCTCTTC
TCGGACTTTGTTTGGCCGCCCAAATCATCAGGGCCTTTTCTTGCCATACATTAT
ACATCCGACATCGCCACAGCATTCTCGTCAGTTGCACACATCTGCCGGGATGTTA
ACTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAACGGCGCTTCTTTTTCTTCAT
CTGCATTTACCTTCAATGAGCGAGGCTTATACTACGGATCCTACTTGACAAG
GAAACATGAAATGTCGGTGTAATTCTTCTTCTACTAGTGATAATAACGGCTTTCG
TAGGTTACGTTTTACCCTGGGGGCAAATATCATTTTTGAGGGGCCACTGTAATCAC
CAACCTCTTGTCTGCCGTCCCCTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGA

GGAGGATTTTCAGTTGATAACGCCACACTTACCCGATTCTTTGCCTTCCATTTTC
TCCTCCCCTTCGTAATTGCCGCCGCAACAGTTGTCCATCTAATTTTCTTACGA
AACGGGTTCAAACAACCCAACCGGCCTCAATTCAGACTCCGACAAAGTATCCTT
CCACCCTTACTTTTCTATAAAGACCTTTTAGGGTTTGCTGCCTTGCTAGTAGCCT
TAATTTCCCTAGCGCTTTTCTCCCCTAACCTGCTTGGGGACCCAGACAACCTTAC
CCCTGCTAACCCGCTAGTTACTCCCCCTCACATCAAGCCTGAATGATACTTCTTA
TTTGCTACGCCATTCTACGATCAATTCCAAATAAACTTGGAGGGGTCTAGCCC
TATTAGCCTCTATTCTAGTACTATTCCCTGGTCCCTATCCTACACACCTCTAAACAA
CGAAGCCTTACATTTTCGACCTTTCACCCAATTCCTTTTCTGACTCCTAGTAGCAG
ACGTAATGGTTTTAACCTGAATTGGTGGGATGCCCGTAGAACACCCATTTATTAT
CATTGGTCAAATCGCATCTTTTCTTTATTTTCCCTCTTTCTTATCATAGCACCAA
CGGCGGGATGACTAGAAAATAAAGTCTTAAAGTGACAAT

>K8

ATGGCCaACCTTCGAAAAACCCACCCCCTGTAAAAATTGCAAACGATGCTCTG
GTCGACCTTCCAGCCCCTTCAAACATTTCAAGTTTGATGAACTTTGGTTCTCTTC
TCGGACTTTGTTTAGCCGCCAAATCATCACGGGCCTTTTTCTTGCCATACATTAT
ACATCCGACATCGCCACAGCATTCTCGTCAGTTGCACACATCTGCCGGGATGTTA
ATTACGGCTGACTAATCCGGAATATACATGCAAACGGCGCTTCTTTTTTCTTCATC
TGCATTTACCTTACATTGGACGAGGCTTGTACTACGGATCCTACTTGTACAAGG
AAACATGAAATGTCGGTGTAAATTCTTCTTCTACTAGTAATAATAACGGCTTTCGTA
GGTTACGTTTTACCCTGAGGGCAAATATCATTTTGAGGGGCCACTGTAATCACCA
ACCTCTTGTCTGCCGTCCCCTACGTTGGCAACGCCCTCGTCCAATGAATTTGAGG
AGGATTTTCAGTTGATAACGCCACACTTACCCGATTCTTTGCCTTCCATTTTCTCC
TCCCCTTCGTAATTGCCGCCGCAACAGTTGTTTCATCTAATTTTCTTACGAAAC

GGGTTCAAACAACCCAACCGGCCTCAATTCAGACTCCGACAAAGTATCCTTCCA
CCCTTACTTTTTCTATAAAGACCTTTTAGGGTTTGCTGCCTTGCTAGTAGCCTTAA
TTCCCTAGCGCTTTTCTCCCCAACCTGCTTGGGGACCCAGACAACCTTCACCC
CTGCCAACCCGCTAGTTACTCCCCCTCACATCAAGCCTGAATGATACTtCCTATTT
GCCTACGCCATTCTACGATCAATTCCAATAAACTTGGAGGGGTCCCTAGCCCTAT
TAGCCTCTATTCTAGTACTATTCTGGTCCCTATCCTACACACCTCTAAACAACGA
AGCCTTACATTCGACCTTTCACCCAATTCCTTTTCTGACTCCTAGTAGCAGACG
TAATGGTTTTAACCTGAATTGGTGGGATGCCCGTAGAACACCCATTTATTATCATT
GGTCAAATCGCATCTTTTCTTTATTTTTCCCTCTTTCTTATTATAGCACCAGCGGC
GGGATGACTAGAAAATAAAGTCTTAAAGTGACAAT