

ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* の遺伝子解析 (7)

— 鴨部川流域のため池のバラタナゴの遺伝子解析 —

Genetic Analysis of Japanese Rosy Bitterling *Rhodeus ocellatus kurumeus* (7)

— Genetic Monitoring of a Population in the Kabe River Watershed —

吉田 美紀* 池田 滋**
Miki YOSHIDA Shigeru IKEDA

要 旨

東讃地域は、絶滅危惧 I A 類(環境省)に指定されているニッポンバラタナゴの重要な生息地である。2012 年、鴨部川流域のため池から採取したサンプル個体について、ミトコンドリア DNA の CAPS マーカー分析とマイクロサテライトマーカー分析を行い、タイリクバラタナゴの侵入を示す結果を得た。ニッポンバラタナゴ保護のため、生息状況を把握する遺伝子モニタリングの継続は欠かせない。

キーワード：ニッポンバラタナゴ タイリクバラタナゴ CAPS マーカー マイクロサテライトマーカー

I はじめに

ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* は、コイ科タナゴ亜科に属する日本固有のバラタナゴである。中国大陸や朝鮮半島に広く分布するタイリクバラタナゴの偶発的導入の結果、雑種化が進行し、現在では環境省のレッドデータブックでも絶滅危惧 I A 類(CR)に指定¹⁾されている。香川県東讃地域はニッポンバラタナゴの重要な生息地の1つである。

ニッポンバラタナゴの保護には、交雑のおそれのあるタイリクバラタナゴとの正確な判別が不可欠であるが、両亜種は形態に差異が少なく、外見による判別が困難¹⁾²⁾である。そのため、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の PCR-RFLP 分析を用いた遺伝子解析が行われている³⁾⁴⁾⁵⁾。

われわれは香川県による東讃地域のニッポンバラタナゴ保護事業を評価するために、その生息状況のモニタリング調査を行っている。2011 年以前に採取したバラタナゴの mtDNA の PCR-RFLP 分析による遺伝子モニタリングの結果は既に報告している⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。その過程でニッポンバラタナゴの生息池へのタイリクバラタナゴの侵入を示す結果は一度も得られていない。2012 年に鴨部川流域のため池から採取したサンプル個体について、CAPS マーカーを用いた PCR-RFLP 分析および核 DNA のマイクロサテライトマーカー分析を行ったところ、タイリクバラタナゴの侵入を示す結果が得られたので報告する。

*香川県西讃保健福祉事務所

** 香川大学総合生命科学研究センター

なお、この研究は香川大学の指導、協力のもと同大学遺伝子実験施設において平成 13 年度より実施しているニッポンバラタナゴの遺伝子解析に関する研究の一部である。

II 方法

1 検体の採取

検体は、2012 年 8 月から 9 月にかけて、鴨部川流域にあるため池(表 2、Kkb7)で、モンドリを用いて採取した。その場にて氷で凍らせ、DNA の抽出まで冷凍保存(-20°C)した。1 調査地点あたり 10 個体を分析に供した。なお、ニッポンバラタナゴ保護の観点から、調査ため池の詳細は明らかにできない。ニッポンバラタナゴハプロタイプスタンダードには既知の香川県産のニッポンバラタナゴを、タイリクバラタナゴのスタンダードには霞ヶ浦産のタイリクバラタナゴを用いた。

2 PCR-RFLP 分析

(1) 核酸の抽出

凍結保存したニッポンバラタナゴ個体より、改変 SDS 法⁵⁾を用いて、核酸を抽出した。抽出した核酸溶液は吸光度計で濃度を測定、併せて純度を確認した。

(2) CAPS マーカー分析

0.3U の HybriPol DNA Polymerase (Bioline)、1× Reaction Buffer (Mg²⁺ free)、2 mM MgCl₂、各 200μM の dNTPs、各 0.4μM のプライマー(表 1)、および鋳型 DNA (<50ng)を含む PCR 反応液(全量 6μl)を調製し、

表1 CAPS マーカー用プライマーセット

CAPSマーカー	フォワードプライマー	リバースプライマー	PCR産物のサイズ
Dloop-E	CCCCTCACCCAATTCTTATTT	ATTATATTGTTGCGCCTGCAC	956bp
Dloop-M	GTTAATCACCGGGGCAATTT	ACGAGTTTTACCGGCCCTAT	442bp
ND1-M	CCTAGTACGAAAGGATCGGAAA	TGCTAAATGTTTGCAGGGTGTA	712bp
ND1-H	GGCTGAGCATCTAACTCGAAAT	ATATTTGCGTATTCGGCTAGGA	335bp

Gene Amp PCR System 9700(Applied Biosystems)を用い、95°C-5分、30サイクルの温度サイクル(95°C-10秒、50°C-1分、72°C-2分)の後、最終加熱(72°C-7分)を行った。

Dloop-Eを*Eco*RIで、Dloop-Mを*Msp*Iで、ND1-Mを*Mbo*Iで、およびND1-Hを*Hae*IIIで切断した。制限酵素処理はいずれも、1×Buffer(制限酵素に添付)に3U/反応となるよう制限酵素を加えた反応液4μlにPCR産物6μlを加え、37°Cで2時間反応させた。

制限酵素反応液を4%または5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、銀染色を行い、バンドを撮影した。

(3) マイクロサテライトマーカー分析

核ゲノム上のマイクロサテライトマーカーRC236はニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴを判別できる⁹⁾。上述のPCR反応液に1.3μM FITC-12-dUTP(Roche Diagnostics)を添加し、30サイクルのPCR反応(94°C-15秒、56°C-30秒、72°C-20秒)を行った。PCR反応液に3容のホルムアミド色素溶液(95%ホルムアミド、10mM EDTA・Na₂、10mg/mL ブルーデキストラン)を加え、変性(94°C、3分)後、MapMarker(BioVenture)とともに5%PAGE-PLUS(Amresco)、7M尿素変性ポリアクリルアミドゲルにアプライし、DSQ-1000 Slab Gel DNA Sequencer(Shimadzu Biotech)で電気泳動を行い

蛍光画像を取得した。

III 結果および考察

2種類のCAPSマーカー(Dloop-E、ND1-M)でニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴの区別を、3種類のCAPSマーカー(Dloop-M、ND1-M、ND1-H)でニッポンバラタナゴの多型(ハプロタイプAおよびB)の区別を行った。mtDNAのCAPS分析結果を表2に示す。10個体のうち6個体がタイリクバラタナゴ型、4個体がニッポンバラタナゴハプロタイプBであった。

ゲノムDNAのマイクロサテライトマーカーの電気泳動結果を図1に示す。ニッポンバラタナゴのRC236アليلは110bp以下、タイリクバラタナゴのRC236アليلは138bp以上である。ニッポンバラタナゴ型は2個体(1、3)、タイリクバラタナゴ型は4個体(2、4、5、9)、雑種型も4個体(6、7、8、10)認められた。mtDNAと核DNAの分析結果から、Kkb7の10個体は、ニッポンバラタナゴ2個体(1、3)、タイリクバラタナゴ3個体(4、5、9)、雑種5個体(2、6、7、8、10)に分けられた。また雑種は、タイリクバラタナゴ♂とニッポンバラタナゴ♀の雑種(8)、逆交雑の雑種(6、7、10)、タイリクバラタナゴ♂とニッポンバラタナゴ♀の雑種の♀とタイリクバラタナゴ♂の戻し交雑雑種(2)に分けられた。

表2 ため池Kkb7のmtDNAのCAPS分析結果

サンプル	CAPSマーカー				mtDNA ハプロタイプ
	Dloop-E	Dloop-M	ND1-M	ND1-H	
	<i>Eco</i> RIパターン	<i>Msp</i> Iパターン	<i>Mbo</i> Iパターン	<i>Hae</i> IIIパターン	
1					
2	956bp	420bp	643bp	245bp	B
3					
4					
5	632bp, 324bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo
6					
7					
8	956bp	420bp	643bp	245bp	B
9	632bp, 324bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo
10					
ニッポンバラタナゴハプロタイプA		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A
ニッポンバラタナゴハプロタイプB	956bp	420bp	643bp	245bp	B
タイリクバラタナゴ	632bp, 324bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo

以上のように、Kkb7 ではニッポンバラタナゴと外部から侵入したタイリクバラタナゴの雑種が生まれ、さらにその雑種とタイリクバラタナゴの間の雑種まで存在することが推察された。既に2007年、鴨部川下流においてタイリクバラタナゴ侵入の実態が明らかになっていたが¹⁰⁾、今回、鴨部川流域のため池 Kkb7 でもタイリクバラタナゴの侵入が確認されたことになる。

鴨部川流域のため池に生息する香川個体群の mtDNA ハプロタイプを表3に示す。Kkb7 へのタイリクバラタナゴの侵入はいつ始まったのだろうか。2011年のモニタリング個体にはタイリクバラタナゴ型 mtDNA が認められなかったが、本分析結果(2012年秋のモニタリング個体)は2010年にタイリクバラタナゴとの雑種が生まれた可能性が高いことを示唆している。Kkb7の面積を考慮すると1ヶ所のもんどりで採捕されたモニタリング個体でため池全体の個体群構成を把握するのは困難なのではないだろうか。さらに、Kkb7、Kkb8、Kkb9、Kkb10の4ため池は半径300mの円内に収まる。タイリクバラタナゴの侵入を許す水路が存在する恐れもあり、Kkb8、Kkb9及びKkb10のモニタリング個体数を大幅に増やす必要がある。

IV まとめ

われわれは東讃地域のニッポンバラタナゴ保護事業を評価するために、その生息状況の継続的なモニタリング調査を行っている。2012年、鴨部川流域のため池から採

取したサンプル個体について、mtDNAのCAPSマーカーを用いたPCR-RFLP分析と核DNAのマイクロサテライトマーカー分析を行った。その結果、ニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴの種内雑種とそのタイリクバラタナゴとの戻し交雑個体の存在が推察された。

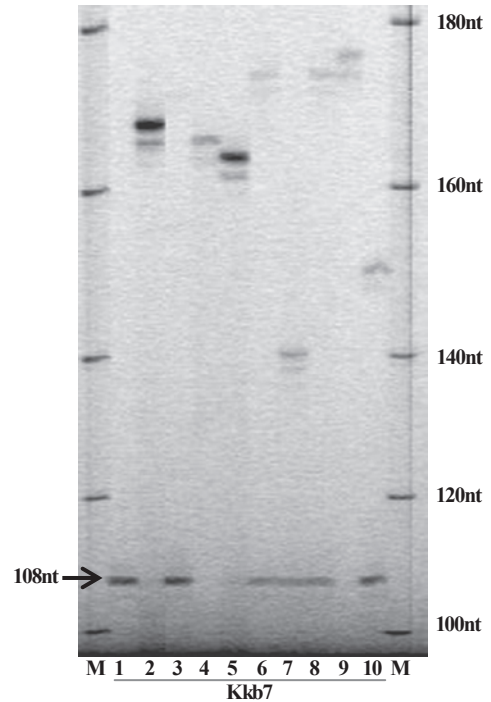


図1 マイクロサテライトマーカーRC236のポリアクリルアミドゲル電気泳動結果

表3 鴨部川流域の香川個体群の mtDNA ハプロタイプ

ため池	所在地域	ハプロタイプ構成の経年変化					
		1995 ³⁾	2001 ⁵⁾	2006 ⁶⁾	2010 ⁷⁾	2011 ⁸⁾	2012
Kkb1			B				
Kkb2		B	B	B			
Kkb7	鴨部川1				B	B	B・Roo
Kkb8					B		
Kkb9					B		
Kkb10					B		
			A				
Kkb3		A	A				
Kkb4		A	A	A			
	鴨部川2	A					
Kkb11					A		
Kkb12					A		
Kkb13					A		
Kkb14						A	
Kkb5	鴨部川3	B	B				
Kkb6		B		B			

文献

- 1) 環境省：生物多様性情報システム,
http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f3.html (access
ed20110901)
- 2) 長田芳和：日本の希少淡水魚の現状と系統保存, 76
-85, 緑書房 (1997)
- 3) Kawamura K, Nagata Y, Ohtaka H, Kanoh Y, and
Kitamura J: Genetic diversity in the Japanese
rosy bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus*
(Cyprinidae). Ichthyol Res, **48**, 369-378 (2001)
- 4) Kawamura K, Ueda T, Arai R, Nagata Y, Ohtaka H,
Kanoh Y: Genetic Introgression by the Rose
Bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*, into
the Japanese Rose Bitterling, *R. o. kurumeus*
(Teleostei: Cyprinidae). Zool Sci, **18**, 1027-1039
(2001)
- 5) 白井康子, 池田滋：ニッポンバラタナゴ *Rhodeus*
ocellatus kurumeus の遺伝子解析(1) -香川県のニ
ッポンバラタナゴの mtDNA の PCR-RFLP 分析結果-,
香川県環境保健研究センター所報, **5**, 39-46 (2006)
- 6) 白井康子, 池田滋：ニッポンバラタナゴ *Rhodeus*
ocellatus kurumeus の遺伝子解析(4) -ニッポンバ
ラタナゴ香川個体群の遺伝子モニタリング-, 香川
県環境保健研究センター所報, **8**, 33-37 (2009)
- 7) 吉田美紀, 池田滋：ニッポンバラタナゴ *Rhodeus*
ocellatus kurumeus の遺伝子解析(5) -ニッポンバラ
タナゴ香川個体群の遺伝子モニタリング(2)-, 香川
県環境保健研究センター所報, **11**, 35-39 (2012)
- 8) 吉田美紀, 池田滋：ニッポンバラタナゴ *Rhodeus*
ocellatus kurumeus の遺伝子解析(6) -ニッポンバラ
タナゴ香川個体群の遺伝子モニタリング(3)-, 香川
県環境保健研究センター所報, **12**, 38-42 (2013)
- 9) Shirai Y, Ikeda S, Tajima S: Isolation and
characterization of new microsatellite markers for
rose bitterlings, *Rhodeus ocellatus*, Mol Ecol
Resour, **9**, 1031-1033 (2009)
- 10) 白井康子, 伊藤英夫, 池田滋：ニッポンバラタナゴ
Rhodeus ocellatus kurumeus の遺伝子解析(3) -東讃
地域で採捕されたバラタナゴの遺伝子解析-, 香川県
環境保健研究センター所報, **7**, 48-53 (2008)

Abstract

Japanese rosy bitterling (*Rhodeus ocellatus kurumeus*) is a critically endangered freshwater fish in Japan. One of its rare habitats is the eastern Kagawa area where Kagawa Prefectural Government promotes and implements the protection of this fish. We have genetically monitored the eastern Kagawa populations of *R. o. kurumeus* to evaluate the Prefectural Government's protection project. Individuals of Chinese rosy bitterling (*R. o. ocellatus*) were observed at the lower reaches of the Kabe River in eastern Kagawa in 2007. We identified mitochondrial DNA haplotypes and microsatellite alleles of fish samples from a pond in the Kabe River watershed. In spite of the fact that no hybridization events were observed in the previous genetic monitorings of the population, the results suggested that the intra-specific hybridization between *R. o. kurumeus* and *R. o. ocellatus* and natural backcrossing of the hybrid with *R. o. ocellatus* had already been occurring. Extensive and annual monitoring of the eastern Kagawa populations of *R. o. kurumeus* is indispensable for the protection of their habitats from the invasive alien species.