

ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* の遺伝子解析 (8)

—ニッポンバラタナゴ香川個体群の遺伝子モニタリング(4)—

Genetic Analysis of Japanese Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (8)

—Genetic Monitoring of the East Kagawa Populations(4)—

多田 博幸 池田 滋*
Hiroyuki TADA Shigeru IKEDA

要 旨

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東讃地域の 8 か所のため池から 2012 年に採取されたサンプル個体のミトコンドリア DNA の CAPS マーカー分析を行い、全サンプルのミトコンドリア DNA ハプロタイプがニッポンバラタナゴ型であることを確認した。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。

Abstract

Japanese rosy bitterling (*Rhodeus ocellatus kurumeus*) is a critically endangered freshwater fish in Japan. One of its few known habitats is located in the East Kagawa area where the Kagawa Prefectural Government is implementing and promoting conservation action. We have genetically monitored the East Kagawa populations of *R. o. kurumeus* to evaluate the efficacy of the prefectural government's protection project. In 2012 we identified mitochondrial DNA haplotypes of 74 fish sampled from 8 ponds in the watersheds of the Kasuga River, the Shin River, the Kabe River, and the Tsuda River. The results showed no detection of the mitochondrial DNA haplotype of *R. o. ocellatus* in the samples. This suggested that the 8 ponds have not been invaded by *R. o. ocellatus* yet. Extensive and annual monitoring of the East Kagawa populations of *R. o. kurumeus* is indispensable for the protection of their habitats from invasive alien species.

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

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)に指定されている¹⁾。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³⁾⁴⁾⁵⁾。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である¹⁾²⁾。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。

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⁾。2012 年に採取した 9 か所のため池のうち、1 か所についてタイリクバラタナゴの侵入を示す結果が得られている⁹⁾。

本報では 2012 年に採取した残り 8 か所のため池についての分析結果を報告する。

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 7 月から 10 月にかけて、春日川流域

*香川大学総合生命科学研究センター

以西の2か所(表1、Kks3、Kks4)、新川流域の2か所(表1、Ksn6、Ksn7)、鴨部川流域の1か所(表1、Kkb14)、津田川流域の3か所(表1、Ktd2、Ktd4、Ktd6)、合計8か所のため池で、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(Kks3のみ4個体とした)。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の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。

表1 調査ため池の所在地とサンプル数

所在地	調査ため池数	サンプル数
春日川以西2	2	20
新川3	2	20
鴨部川2	1	10
津田川1	3	24
合計	8	74

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し併せて純度を確認した。

(2) CAPS マーカー分析

0.25U の Taq DNA polymerase (Bio academia)、10×

表2 CAPS プライマーの配列と増幅産物長

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	CCCGTCACCCAATTCTTATTT	ATTATATTGTTGCGCCTGCAC	956bp
Dloop-M	GTTAATCACCGGGCAATTT	ACGAGTTTTACCGCCCTAT	442bp
ND1-M	CCTAGTACGAAAGGATCGGAAA	TGCTAAATGTTTGACGGGTGTA	712bp
ND1-H	GGCTGAGCATCTAACTCGAAAT	ATATTTGCGTATTTCGGCTAGGA	335bp

表3 mtDNA の CAPS 分析結果

サンプル	ため池	所在地域	CAPS マーカー				mtDNA ハプロタイプ
			Dloop-E <i>EcoR</i> I	Dloop-M <i>Msp</i> I	ND1-M <i>Mbo</i> I	ND1-H <i>Hae</i> III	
Kks3	春日川以西2		956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A・B
Kks4				420bp	643bp	245bp	
Ksn6	新川3		956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A
Ksn7				283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A・B
Kkb7	鴨部川1		632bp, 324bp	420bp	643bp	245bp	B・Roo
				283bp, 137bp	613bp	245bp	
Kkb14	鴨部川2		956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A
Ktd2	津田川1		956bp	420bp	643bp	245bp	B
Ktd4				283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A
Ktd6				283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A
ニッポンバラタナゴA	ニッポンバラタナゴ		956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A
ニッポンバラタナゴB				420bp	643bp	245bp	B
タイリクバラタナゴ	タイリクバラタナゴ		632bp, 324bp	283bp, 137bp	613bp	245bp	Roo

表4 ニッポンバラタナゴ生息ため池毎のmtDNA ハプロタイプ判定

ため池	所在地域	ハプロタイプ					
		1995 ³⁾	2001 ⁵⁾	2006 ⁶⁾	2010 ⁷⁾	2011 ⁸⁾	2012
Ktk1	春日川以西1	A	A	A			
Kks1	春日川以西2	A	A	A			
Kks2					A		
Kks3						A	A/B
Kks4						B	B
Ksn1	新川1		A	A		A	
			A			埋立	
Ksn2		A		A			
Ksn3	新川2		A	A	A		
Ksn4					A/Roo		
Ksn5	新川3	A	A	A			
Ksn6		A		A		A	A
Ksn7						A	A/B
Kkb1	鴨部川1		B				
Kkbb2		B	B	B			
Kkb7					B	B	B/Roo
Kkb8					B		
Kkb9					B		
Kkb10					B		
	鴨部川2	A					
Kkb3		A	A				
Kkb4		A	A	A			
		A					
Kkb11					A		
Kkb12					A		
Kkb13					A		
Kkb14						A	A
Kkb5	鴨部川3	B	B				
Kkb6		B		B			
Ksd1	志度	B	B	B			
	津田川1	B					
Ktd1			A/B	A/B			
Ktd2			B	B		B	B
Ktd3		B	B	B			
Ktd4		A		A/B		A/B	A
Ktd6		A				A/B	A
Ktd5	津田川2	B	B	B			

Robust Buffer、各2.5mMのdNTP、各100 μ Mのプライマー(表2)、および鋳型DNA(<50ng)を含むPCR反応液(全量10 μ l)を調製し、Gene Amp PCR System 9700(Applied Biosystems)を用い、95 $^{\circ}$ C-5分の加熱、30サイクルの温度サイクル(95 $^{\circ}$ C-10秒、50 $^{\circ}$ C-1分、72 $^{\circ}$ C-2分)の後、最終加熱(72 $^{\circ}$ 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 \times 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5 μ lにPCR産物

5 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。

制限酵素反応液を5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、Gel redTM(Biotium)による蛍光色素染色または銀染色を行い、バンドを撮影した。

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 3 に示す。

8 か所のため池の 74 個体の mtDNA ハプロタイプはすべてニッポンバラタナゴ型であった。すなわち、前報⁹⁾でタイリクバラタナゴの侵入が確認された Kkb7 以外の 8 か所のため池ではタイリクバラタナゴの侵入の証拠は得られなかった。しかしタイリクバラタナゴ侵入域の拡大の有無を明確にするには Kkb7 近隣のため池の調査が必要である。

1995 年の河村らの結果と 2001～2011 年に採取されたサンプルについての mtDNA PCR-RFLP 分析結果、および本結果をあわせて表 4 に示す。

春日川および新川水系のため池 (Ktk, Kks, および Ksn) では、2010 年以前、すべてのサンプルがハプロタイプ A であった。しかし、2011 年、Kks4 でハプロタイプ B のサンプルが確認され、2012 年 (本報)、Ksn3 と Ksn7 でハプロタイプ A と B のサンプルの混在が認められた。一方、津田川水系の Ktd4 と Ktd6 では 1995 年にハプロタイプ B のサンプルは検出されなかったが、2006 と 2011 年の分析結果では、ハプロタイプ A、B のサンプルの混在が認められた。しかし、2012 年は再びハプロタイプ A のサンプルしか検出されなかった。

このような mtDNA ハプロタイプ判定結果の変動は、mtDNA ハプロタイプの異なる個体が共存していたため池で片方のハプロタイプの個体のみが絶滅するとは考えにくい。ため池に生息する個体の mtDNA ハプロタイプをより正確に把握するために、特にサンプリング地点数を増やすことによりサンプリング個体を増やす必要がある。

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。2001 年、2006 年、2010 年、2011 年に引き続き、2012 年 8 か所のため池のサンプル 74 個体について、mtDNA の CAPS マーカーを用いた PCR-RFLP 分析を行った。サンプルの mtDNA ハプロタイプはすべてニッポンバラタナゴ型で、タイリクバラタナゴの侵入を示す新たな証拠は得られなかった。調査ため池に生息する個体群の mtDNA ハプロタイプ推定精度上げるため、今後、サンプリング地点数やサンプリング個体数について見直す必要がある。

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 (accessed 20110901)
- 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)ー香川県のニッポンバラタナゴの mtDNA の PCR-RFLP 分析結果ー，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)ーニッポンバラタナゴ香川個体群の遺伝子モニタリングー，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)ー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)ー，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)ー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)ー，香川県環境保健研究センター所報，12, 38-42 (2013)
- 9) 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(7)ー鴨部川流域のため池のバラタナゴの遺伝子解析ー，香川県環境保健研究センター所報，13, 38-41 (2014)
- 10) 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)

- 11) 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)ー東
讃地域で採捕されたバラタナゴの遺伝子解析ー, 香
川県環境保健研究センター所報, 48-53(2008)