

ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* の遺伝子解析(9)

## —ニッポンバラタナゴ香川個体群の遺伝子モニタリング(5)—

Genetic Analysis of Japanese Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (9)

## —Genetic Monitoring of East Kagawa Population (5)—

平田 由香里  
Yukari HIRATA

池田 滋\*  
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 13ヶ所のため池から 2016 年と 2017 年に採捕された個体についてミトコンドリア DNA の CAPS マーカー分析を行ったところ 1ヶ所のため池でタイリクバラタナゴ型ミトコンドリア DNA ハプロタイプをもつ個体が検出された。マイクロサテライト分析の結果、それらはタイリクバラタナゴとニッポンバラタナゴの雑種個体とニッポンバラタナゴとの間の雑種であると推察された。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

The Japanese rose bitterling (*Rhodeus ocellatus kurumeus*) is a critically endangered freshwater fish, for which East Kagawa is a rare habitat. We analysed the mitochondrial DNA of the samples obtained 2016 and 2017 using CAPS markers, and detected individuals with the mitochondrial DNA haplotype specific to Chinese rose bitterling (*R. o. ocellatus*) in one of these ponds. The microsatellite analysis suggested that the fish with the *R. o. ocellatus* type mitochondrial DNA resulted from the female intra specific (female *R. o. ocellatus* X male *R. o. kurumeus*) hybrid mating with male *R. o. kurumeus*. Periodical genetic monitoring of the East Kagawa population is crucial to protecting *R. o. kurumeus* from its 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<sup>1)</sup>。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<sup>3)4)5)</sup>。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<sup>1)2)</sup>。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、mtDNA の PCR-RFLP 分析による遺伝子モニタリングを行い、バラタナゴの生息状況を監視している。2012 年以前の遺伝子モニタリング結果は既に報告している<sup>5)6)7)8)9)10)11)12)</sup>。

本報では、東讃地域の 5 つの河川の流域にある 13 か所のため池から 2016、2017 年に採捕された個体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。

\*香川大学総合生命科学研究センター

## II 方法

### 1 バラタナゴの採捕

バラタナゴは、2016年11月と2017年10月に13ヶ所のため池で、モンドリを用いて採捕された。その場で氷冷して実験室に運搬し冷凍保存(-20°C)した。1調査ため池あたりの分析個体数は2個体から14個体である。なお、ニッポンバラタナゴ保護の観点から、調査ため池は明らかにできない。

### 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<sup>5)</sup>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×Robust Buffer、各 2.5mM の dNTP、各 100 μM のプライマー (表 1)、および鋳型 DNA (<50ng) を含む PCR 反応液 (全量 10 μl) を調製し、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用い、95°C-5 分の加熱、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) を行い CAPS マーカーを増幅した。

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 (制限酵素に添付の Buffer を希釈) に 3U/反応となるよう制限酵素を加えた反応液 5 μl に、PCR 産物 5 μl を加え 37°C で 2 時間反応させた。

制限酵素反応液を、2%アガロースゲル及び 5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し Gel Red™ (Biotium) による蛍光色素染色または銀染色を行い、PCR 産物のバンドを撮影した。

ニッポンバラタナゴハプロタイプのスランダーには既知の香川産のニッポンバラタナゴを、タイリクバラタナゴのスランダーには霞ヶ浦産のタイリクバラタナゴを用いた。

#### (3) マイクロサテライトマーカー分析

染色体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<sup>10)</sup>。RC236 用のプライマー<sup>10)</sup>を加えた上述同様の PCR 反応液を用い、30 サイクルの PCR 反応 (94°C-15 秒、56°C-30 秒、72°C-20 秒) を行った後、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (トリスグリシン緩衝液) を行い、ゲルを Gel Green™ (Biotium) で蛍光染色しマーカーバンドを撮影した。

表 1 CAPS プライマーの配列と増幅産物

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	ACGAGTTTACCGCCCTAT	442bp
ND1-M	CCTAGTACGAAAGGATCGGAAA	TGCTAAATGTTTGCAGGGTGTA	712bp
ND1-H	GGCTGAGCATCTAACTCGAAAT	ATATTTGCGTATTCGGCTAGGA	335bp

## 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、B) の区別を行い、13ヶ所のため池の 122 個体の mtDNA ハプロタイプ (表 2) を決定した。ため池 Kks3 以外の 12ヶ所のため池のバラタナゴの 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。しかし、Kks3 の 10 個体中 6 個体の mtDNA ハプロタイプはタイリクバラタナゴ型であっ

た。

1995 年の河村らの結果と 2001~2012 年の我々の結果、および本結果をあわせて表 3 に示す。

春日川以西 1、新川 1~3、鴨部川 2 に所在するため池ではハプロタイプ A 型のニッポンバラタナゴが優占的で、鴨部川 1 と 3、志度、津田川 2 に所在するため池ではハプロタイプ B 型のニッポンバラタナゴが優先的である。春日川以西 2、津田川 1、弁天川に所在するため池では両方のハプロタイプのニッポンバラタナゴが共存する。このように、ニッポンバラタナゴの地理的

表2 mtDNAのCAPS分析結果

ため池 名前	所在地域	CAPSマーカー				香川個体群の mtDNAハプロタイプ	サンプル数
		Dloop-E EcoRIパターン	Dloop-M Msp Iパターン	ND1-M Mbo Iパターン	ND1-H Hae IIIパターン		
Kks 1		956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	6
Kks 3	春日川以西2	956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	4
Kks 4		324bp, 632bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo	6
Ksn 3	新川2	956bp	420bp	643bp	245bp	B	5
Ksn 6	新川3		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	10
Ksn 7							10
Kkb 5	鴨部川3		420bp	643bp	245bp	B	10
Kkb 6							10
Ktd 4	津田川1	956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	10
Ktd 7			420bp	643bp	245bp	B	10
Ktd 8							14
Kbt 1	弁天川		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	2
Kbt 2			420bp	643bp	245bp	B	3
				420bp	643bp	245bp	B
ニッポンバラタナゴA		956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	52
ニッポンバラタナゴB			420bp	643bp	245bp	B	64
タイリクバラタナゴ		324bp, 632bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo	6

表3 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	ハプロタイプ構成の経年変化							
		1995 <sup>3)</sup>	2001 <sup>5)</sup>	2006 <sup>6)</sup>	2010 <sup>7)</sup>	2011 <sup>8)</sup>	2012 <sup>9)12)</sup>	2016	2017
Ktk1	春日川以西1	A	A	A					
Kks1	春日川以西2	A	A	A				A	A
Kks2					A				
Kks3							A	A・B	A・Roo
Kks4							B	B	B
Ksn1	新川1		A	A		A	A		
Ksn2			A		埋立				
Ksn3				A	A	A			A
Ksn4	新川2		採捕できず	A・Roo					
Ksn5	新川3	A	A	A					
Ksn6			A	A		A	A	A	
Ksn7						A	A・B	A	
Kkb1				B					
Kkb2	鴨部川1	B	B	B					
Kkb7					B	B	B・Roo		
Kkb8					B				
Kkb9					B				
Kkb10					B				
Kkb3			A	A					
Kkb4	鴨部川2	A	A	A					
Kkb11					A				
Kkb12					A				
Kkb13					A				
Kkb14					A	A			
Kkb5	鴨部川3	B	B					B	
Kkb6				B				B	
Ksd1	志度	B	B	B					
Ktd1	津田川1		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	
Ktd7			B						
Ktd8								B	
ktd5		津田川2	B	B	B				
Kbt1	弁天川							B	
Kbt2								B	

分化の特徴が遺伝子モニタリングを継続することで明らかになった。

ため池 Kks3 では 2011 年以來初めてタイリクバラタナゴ型ハプロタイプが認められた。Kks3 は 2006 年の Ksn4、2012 年の Kkb7 に続く 3 か所目のタイリクバラタナゴ侵入ため池となった。

ため池 Kks3 のサンプルについて、マイクロサテライト RC236 の検出を行った (図 1)。

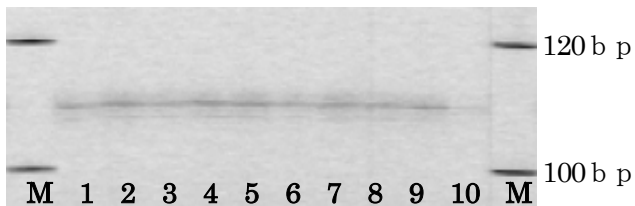


図 1. ため池 Kkb3 の 10 個体のマイクロサテライト RC236 マーカーのポリアクリルアミドゲル電気泳動 (M はサイズマーカー)

タイリクバラタナゴの場合に検出される 130bp 以上のバンドは検出されず、ニッポンバラタナゴ香川個体群に特徴的な約 110bp のバンドしか検出されなかった。これは、タイリクバラタナゴ型 mtDNA をもつ 6 個体のマイクロサテライト RC236 はニッポンバラタナゴ型アレルのホモ接合であることを意味する。これら 6 個体については母親がニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴの雑種で、父親がニッポンバラタナゴである可能性が高い。

タイリクバラタナゴのため池への侵入のきっかけとしては、少数個体の放流が最も可能性が高い。例えば 1 匹の若いタイリクバラタナゴの♀が夏場に放流されたとする。2 シーズン、各シーズン 20 匹 (性比 1:1) が孵化し、♂はニッポンバラタナゴの♂と同等の影響しかもたないと仮定する<sup>13)</sup>。1 シーズン目、タイリクバラタナゴ型 mtDNA 個体は 21 個体になる。性比が変わらないとすれば、2 シーズン目では 241 匹、3 シーズン目では 2440 匹、4 シーズン目では 26400 匹になる。放流前のニッポンバラタナゴ生息数にもよるが、放流後 3 年目 (4 シーズン目) には相当な割合がタイリクバラタナゴとの雑種に占められ、我々の遺伝子モニタリングでタイリクバラタナゴ型 mtDNA 個体として検出される可能性が高くなるだろう。したがって、本研究の遺伝子モニタリングによりタイリクバラタナゴ型個体が検出された場合は、すでに最初のタイリクバラタナゴが侵入してから数シーズンが経過し

ており、雑種の駆除が不可能なことを意味する。

もし同じ条件で、マイクロサテライトによる遺伝子モニタリングを行った場合、1 匹の♂が 10 匹の仔に遺伝子を伝達すると仮定しても、1 シーズン目は 21 匹、2 シーズン目は 331 匹、3 シーズン目は 3520 匹、4 シーズン目は 37200 匹になり、mtDNA による遺伝子モニタリングよりも検出時期が早くなる可能性が高い。

さらに、もし 1 匹のタイリクバラタナゴの♂が放流された場合は、タイリクバラタナゴのゲノム DNA が♀の場合と同様に蔓延するが、mtDNA ハプロタイプはニッポンバラタナゴ型のまままったく変わらないため、マイクロサテライトマーカーによる遺伝子モニタリングを行わない限りタイリクバラタナゴの侵入を検出できない。

#### 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、2012 年に引き続き、2016 年 4 ヶ所、2017 年 13 ヶ所のため池のサンプル 122 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。春日川以西の 1 ヶ所のため池から、タイリクバラタナゴ型 mtDNA をもつ個体が検出され、マイクロサテライトマーカーの分析から、それら個体はタイリクバラタナゴとニッポンバラタナゴの雑種個体とニッポンバラタナゴとの間の雑種であると考えられた。

ニッポンバラタナゴ保護のために、その生息状況を把握する遺伝子モニタリングは欠かせない。

#### 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](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, 12, 38-42 (2013)
  - 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)
  - 12) 多田博幸, 池田滋: ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* の遺伝子解析(8)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(4)ー, 香川県環境保健研究センター所報, 14, 33-37 (2015)
  - 13) Kanoh Y: Reproductive success associated with territoriality, sneaking, and grouping in male rose bitterlings, *Rhodeus ocellatus* (Pisces: Cyprinidae), *Environmental Biology of Fishes* 57: 143-154, (2000)