

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)—

Genetic Analysis of Japanese Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (6)

—Genetic Monitoring of Some East Kagawa Populations (3)—

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。2011 年に 10 ヶ所のため池から採取し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、ニッポンバラタナゴが生息していることを確認した。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。

キーワード：ニッポンバラタナゴ CAPS マーカー分析 遺伝子モニタリング

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。2010 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⁾。2011 年に 10 ヶ所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 分析を行ったので報告する。

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、2011 年 8 月から 9 月にかけて、春日川流域以西の 2 ヶ所、新川流域の 3 ヶ所、鴨部川流域の 2 ヶ所、津田川流域の 3 ヶ所、合計 10 ヶ所のため池で、モンドリを用いて採取した。その場にて氷で凍らせ、核酸の抽出まで冷凍保存(-20℃)した。検体採取したため池のうち、遺伝子モニタリングを行ったことのないため池は 5 ヶ所である。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。比較のために、霞ヶ浦のタイリクバラタナゴを 1 個体供した。

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 マーカーを用いた PCR 増幅

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 6 μl)を調製し、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)を用い、95℃-5 分の加熱、30 サイクルの温度サイクル(95℃-10 秒、50℃-1 分、72℃-2 分)の後、最終加熱(72℃-7 分)を行った。

* 香川大学総合生命科学研究センター

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	CCCGTCACCCAATTCTTATTT	ATTATATTGTTGCGCCTGCAC	956bp
Dloop-M	GTTAATCACCGGGGCAATTT	ACGAGTTTTACCGGCCCTAT	442bp
ND1-M	CCTAGTACGAAAGGATCGGAAA	TGCTAAATGTTTGCAGGGTGTA	712bp
ND1-H	GGCTGAGCATCTAACTCGAAAT	ATATTTGCGTATTTCGGCTAGGA	335bp

(3) 制限酵素処理と電気泳動

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℃で2時間反応させた。

ローディングバッファーを加えた後、Mupid-2 電気泳動装置で2%アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネーター上でバンドを撮影した。

III 結果および考察

ニッポンバラタナゴおよびタイリクバラタナゴのCAPS マーカーのアガロース電気泳動像を図1に示す。2種類のCAPS マーカー(Dloop-Eおよび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が可能であった。3種類のCAPS マーカー(Dloop-E、ND1-M、および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)が検出された。

分析したサンプルのCAPS 分析結果を表2に示す。10ヶ所のため池のサンプル個体のCAPS マーカーDloop-EおよびND1-Mの電気泳動パターンは、いずれもタイリクバラタナゴと異なった。10ヶ所のため池の100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、タイリクバラタナゴの侵入を示す結果は得られなかった。

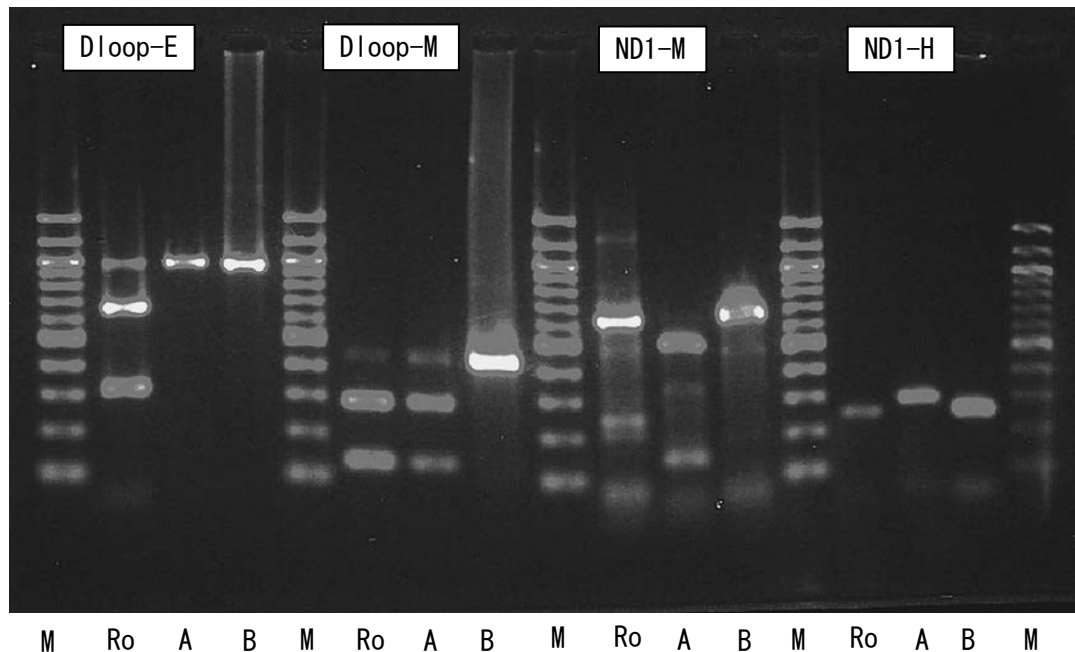


図1 CAPS マーカーのアガロースゲル電気泳動

M: 100 bp DNA ladder marker

Ro: タイリクバラタナゴ

A: ニッポンバラタナゴハプロタイプA

B: ニッポンバラタナゴハプロタイプB

表2 2011年に採取された香川個体群の分析結果

ため池 名前	所在地	CAPSマーカー				香川個体群の mtDNAハプロ タイプ
		Dloop-E <i>EcoRI</i> パターン	Dloop-M <i>Msp I</i> パターン	ND1-M <i>Mbo I</i> パターン	ND1-H <i>Hae III</i> パターン	
Kks 3	春日川以西2		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A
Kks 4			420bp	643bp	245bp	B
Ksn 7	新川1					
Ksn 6	新川3		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A
Ksn 8						
Kkb 7	鴨部川1	956bp	420bp	643bp	245bp	B
Kkb14	鴨部川2		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A
Ktd 2			420bp	643bp	245bp	B
Ktd 4	津田川1		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A・B
			420bp	643bp	245bp	
Ktd 6			283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A・B
			420bp	643bp	245bp	
タイリクバラタナゴ		324bp, 632bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	

表3 香川県個体群のmtDNAハプロタイプ

ため池	所在地	ハプロタイプ構成の経年変化					
		1995 ³⁾	2001 ⁵⁾	2006 ⁶⁾	2010 ⁷⁾	2011	
Ktk1	春日川以西1	A	A	A			
Kks1		A	A	A			
Kks2	春日川以西2				A		
Kks3						A	
Kks4						B	
Ksn1	新川1		A	A		A	
			A		埋立		
Ksn2		A		A			
Ksn3	新川2		A	A	A		
Ksn4				採捕できず	A・Roo		
Ksn5	新川3		A	A			
Ksn6				A		A	
Ksn7						A	
Kkb1	鴨部川1		B				
Kkb2			B	B	B		
Kkb7						B	B
Kkb8						B	
Kkb9						B	
Kkb10						B	
			A				
Kkb3	鴨部川2	A	A				
Kkb4		A	A	A			
		A					
Kkb11					A		
Kkb12				A			
Kkb13				A			
Kkb14					A		
Kkb5	鴨部川3	B	B				
Kkb6		B		B			
Ksd1	志度	B	B	B			
		B					
Ktd1	津田川1		A・B	A・B			
Ktd2			B	B		B	
Ktd3			B	B	B		
Ktd4			A		A・B		A・B
Ktd6			A				A・B
ktd5	津田川2	B	B	B			

1995～2010年に行ったmtDNAのPCR-RFLP分析結果、および本結果をあわせて表3に示す。今回のKks4サンプルは10個体すべてがmtDNAハプロタイプBであった。春日川および新川水系のため池のサンプルは、2006年以前はすべてmtDNAハプロタイプAであった。同様に、Ktd6では、1995年にはmtDNAハプロタイプAのみが検出されていたが、今回はmtDNAハプロタイプBも検出された。Kks4とKtd6はいずれも数100m²のため池であり、10個体程度のサンプルによるモニタリングでは、ため池に生息する個体全体のmtDNAハプロタイプを把握することが難しいと考えられる。そのため、ニッポンバラタナゴのmtDNA多型は、個々のため池よりもため池群のレベルで捉える方がよいだろう。

そこで、東讃地域に分布するニッポンバラタナゴのmtDNAハプロタイプを眺めると、ため池所在地と生息個体のmtDNAハプロタイプとの間には密接な関係が推察される。新川以西の水系のため池では、すべてmtDNAハプロタイプAが優占的である。東讃地域の中央に位置する鴨部川水系のため池については、鴨部川2のため池ではmtDNAハプロタイプAが、鴨部川1および3のため池ではmtDNAハプロタイプBが優占的である。東讃地域の東側に位置する津田川水系のため池については、津田川1では両方のハプロタイプが、津田川2ではmtDNAハプロタイプBのみが検出されている。

遺伝子モニタリングの継続は、タイリクバラタナゴの侵入の早期検出のみならず、ニッポンバラタナゴの保全の基礎的知見である遺伝的多型を把握するうえでも重要であり、今後も継続する必要がある。

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年に引続き、2011年それまでに遺伝子モニタリングを行ったことのない5ヶ所のため池を含む10ヶ所のサンプル個体について、CAPSマーカーを用いたPCRを利用した遺伝子モニタリングを行った。

10ヶ所のため池からの100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、タイリクバラタナゴのmtDNAハプロタイプは全く検出されなかった。2006～2010年までの遺伝子モニタリング結果は、ため池所在地と生息個体のmtDNA多型の間には密接な関係があることを示した。

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, Nagata, Ohtaka, Kanoh, Kitamura: Genetic diversity in the Japanese rosy bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (Cyprinidae), *IchthyolRes*, **48**, 369-378, (2001)
- 4) Kawamura, Ueda, Arai, Nagata, Ohtaka, Kanoh: 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)

Abstract

Japanese rose bitterling (*Rhodeus ocellatus kurumeus*) is a critically endangered freshwater fish in Japan. One of its rare habitats is East Kagawa area where Kagawa Prefectural Government promotes and implements the protection of this fish. We identified mitochondrial DNA haplotypes of fish samples from ten ponds in East Kagawa using CAPS marker analysis to evaluate the Prefectural Government's protection. The results showed that all fish samples have mitochondrial haplotypes of *R. o. kurumeus* and supported that the protection is effective. Periodically monitoring the East Kagawa populations of *R. o. kurumeus* is indispensable for the protection of their habitats.