

ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* の遺伝子解析(2)

- マイクロサテライトマーカーによる亜種判別の可能性 -

Genetic Analysis of Japanese Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (2)

- Possibility of Subspecies Discriminant by Microsatellite Markers -

白井 康子 池田 滋*
Yasuko SHIRAI Shigeru IKEDA

要 旨

ニッポンバラタナゴは環境省レッドデータブックで絶滅危惧 A 類に指定される希少淡水魚で、香川県は重要な生息地のひとつである。本種を保護するためには、交雑の恐れのある亜種タイリクバラタナゴとの正確な判別が不可欠であり、環境保健研究センターでは、香川大学の協力を得て、香川県に生息するニッポンバラタナゴの遺伝的特徴を明らかにする研究を進めている。本報はこの研究の一部である。

これまで精密で簡便な判別方法の確立をめざして、亜種判別用のマイクロサテライトマーカーの開発に取り組んでおり、本法の有用性が明らかとなった。さらに開発の過程で香川県のタイリクバラタナゴについて、いくつかの知見が得られているので報告する。

キーワード：ニッポンバラタナゴ マイクロサテライト 亜種判別

はじめに

ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* (図 1) は、コイ科タナゴ亜科に属する日本固有の小型淡水魚で、かつては西日本の淡水域に広く分布していたと考えられている^{1) 2) 3)} が、亜種タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* との交雑などにより生息数を減少させている^{3) 4) 5) 6)}。現在、遺伝的に純粋なニッポンバラタナゴは、香川県の東讃地区や大阪府の一部などで確認されるのみで、環境省のレッドデータブックでも絶滅危惧 IA 類(CR)に指定⁵⁾ されており、香川県はニッポンバラタナゴの貴重な生息地である。

一方、タイリクバラタナゴは 1940 年代に中国大陸からソウギョ等の種苗に混じって偶発的に移入された外来種⁷⁾ で、現在では日本全国に分布している⁸⁾。香川県における最も古いタイリクバラタナゴの文献記載は 1982 年財田川本流において採集されたものについて⁹⁾ であり、最近では、ニッポンバラタナゴの分布地域を流れる新川でもタイリクバラタナゴが確認されている¹⁰⁾。

図 2 に香川県におけるニッポンバラタナゴの分布地域を示す。



図 1 ニッポンバラタナゴ()

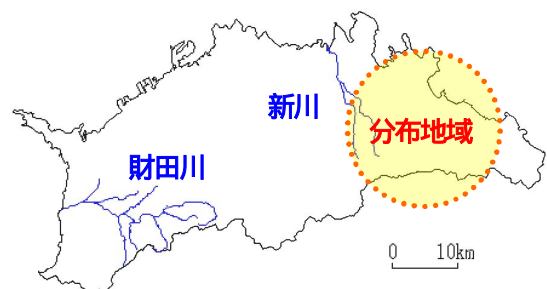


図 2 ニッポンバラタナゴの分布地域

*香川大学総合生命科学研究センター

ニッポンバラタナゴ保護のためには、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、両亜種は外見での判別が困難⁵⁾で、精密で簡便な判別方法の確立が望まれる¹¹⁾。マイクロサテライト多型では電気泳動のみで多型を検出でき迅速な判別が期待されるため、亜種判別用のマイクロサテライトマーカーの開発に取り組んできた。

本報告では、ニッポンバラタナゴの保護対策を実施するうえでのマイクロサテライトマーカーの有用性を明らかにするとともに、開発の過程で得られた香川県のタイリクバラタナゴの特徴についての知見を報告する。

方法

1 検体の採取

サンプルは、モンドリまたは玉網を用い採取し、バケツで持ち帰るか、あるいは現場において氷で絞め、DNAの抽出まで冷凍保存(-40℃)した。表1にサンプルの概要を示す。なお、ニッポンバラタナゴ保護の観点から、調査地点の詳細は明らかにできない。

2 DNA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¹¹⁾で genome DNA を抽出し、吸光度計で濃度を測定、併せて純度を確認した。

3 マイクロサテライトマーカーによる PCR

開発済みのマイクロサテライトプライマー RK236 (5'-GCTCTCTCTCTCTCTCACTCC-3', 5'-TTTCAGTCCATTACGG CATTCC-3')を用い、PCR を行った。0.2m PCR 用サンプルチューブに、PCR 反応液 10μ あたり、1μ テンプレート

DNA 0.2units Taq DNA Polymerase (NEB) ,各 250 μM dNTP ,各 0.4 μM PCR プライマー , 20mM Tris-HCl (pH8.8) , 10mM (NH₄)₂SO₄ , 10mM KCl , 2mM MgSO₄ , 0.1% Triton X-100 を調製した。テンプレートには DNA 抽出液を 10 倍希釈したものをを用いた。

バンドの検出は 8%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動(LKB- MULTIPHOR)後、銀染色により行った。また、必要に応じ、DNA シークエンサー(島津製作所, DSQ- 1000)を用い、変性 6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、バンドを蛍光検出した。その際には、PCR 反応液に Fluorescein-12-dUTP(Roche)を dTTP の 1/250 相当量(mol)を添加した。

4 mtDNA の D-loop 領域の PCR-RFLP

mtDNA の D-loop 領域用プライマー (CB3R-L;5'-CAY ATYMARCCMGAAATGRTATTT-3' , 12SAR-H;5'-ATARTRGGGTATCTA ATCCYAGTT-3')^{12) 13)}をバラタナゴ用に一部塩基配列を変更したプライマー (5'-CACATCCAGCCAGAAGATATTT-3' , 5'-TAATCCCAGTTTGTTCCTTAGC-3')を用い、マイクロサテライトマーカーによる PCR 反応液と同様に反応液を調整し、PCR を行った。表3に PCR 条件を示す。8%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で増幅産物を確認し、制限酵素処理用の検体とした。

河村らは D-loop 領域について 15 種類の制限酵素で処理を行っているが、EcoRI のみが両亜種を明確に判別していることから¹³⁾、本研究では EcoRI (NEB)による制限酵素処理を行った。

表1 サンプルの概要

種名	水域別	箇所	個体数	採取地	サンプリング時期
ニッポンバラタナゴ	ため池	10	112	香川県東部	H13.6~H15.4
	ため池	2	20	大阪府八尾市	H17.4
タイリクバラタナゴ	ため池	1	20	香川県山本町(財田川流域)	H15.12
	河川	1	20	栃木県那珂川町	H17.10

表2 PCR条件

PCR 装置	Touchgene Gradient (TECHNE) Palm Cycler (CORBETT RESERCH)
温度条件	95 -3分 95 -20秒, 65 52 -1分, 72 -30秒, 8 サイクル(タッチダウン PCR) 95 -20秒, 52 -1分, 72 -2分, 40 サイクル 72 -7分

表3 PCR条件

PCR 装置	Touchgene Gradient (TECHNE) Palm Cycler (CORBETT RESERCH)
温度条件	95 -5分 98 -10秒, 50 -1分, 72 -2分, 30 サイクル 72 -7分

EcoRI の反応温度は 37 °C であるので 既報¹¹⁾のとおり、PCR による増幅産物を精製せずに制限酵素処理を行った。PCR によって得られた増幅産物を含む反応液 4μl に、反応液中の濃度が指定濃度となるよう *Taq* DNA Polymerase 用バッファーで希釈した制限酵素 1μl を加え、37 °C、2 時間反応させた後、制限酵素を不活化した。バンドの検出にはマイクロチップ電気泳動(日立 SV1210)を用いた。

5 塩基配列の決定

Ligation-Convenience Kit(日本ジーン)を用い、RK236 による PCR 産物を pGEM-T EASY ベクターに TA クローニングした。形質転換したコンピテントセル(DH5α)を LB プレート(IPTG なし)にまき 37 °C で一晩培養後インサートを確認し、アンピシリン(50μg/ml)を含む MMI 培地に移し培養を続けた。プラスミドの抽出には MagExtractor-Plasmid-(東洋紡)を用いた。

DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit(GEヘルスケアバイオサイエンス)を用いて、シーケンス反応を行ない、ABI PRISM 3100 Genetic Analyser を用いて塩基配列を解析した。

結果

1 マイクロサテライトマーカーRK236の適用

香川産のニッポンバラタナゴに RK236 を適用したところ、どのため池の個体からも同じ長さの増幅産物が検出された。112 個体すべてがホモ個体と推定され、個体間に鎖長変異は認められなかった。他方、大阪産のニッポンバラタナゴでは香川とは長さの異なる 2 本のバンドが確認され、20 個体のうち 11 個体はヘテロ個体であった。

タイリクバラタナゴでは香川産、栃木産とも複数のバンドが確認され、400bp を超える長さのバンドを含めると 3 本以上のバンドが認められる個体も含まれていた。また、香川産タイリクバラタナゴ 20 個体のうち少なくとも 2 個体が香川産のニッポンバラタナゴと同じ長さのバンド(111bp)を持っていた。

マイクロサテライトマーカーRK236 の泳動像(一部抜粋)を図 3 に示す。また、各個体群のフラグメント長及び特徴は表 4 のとおりである。

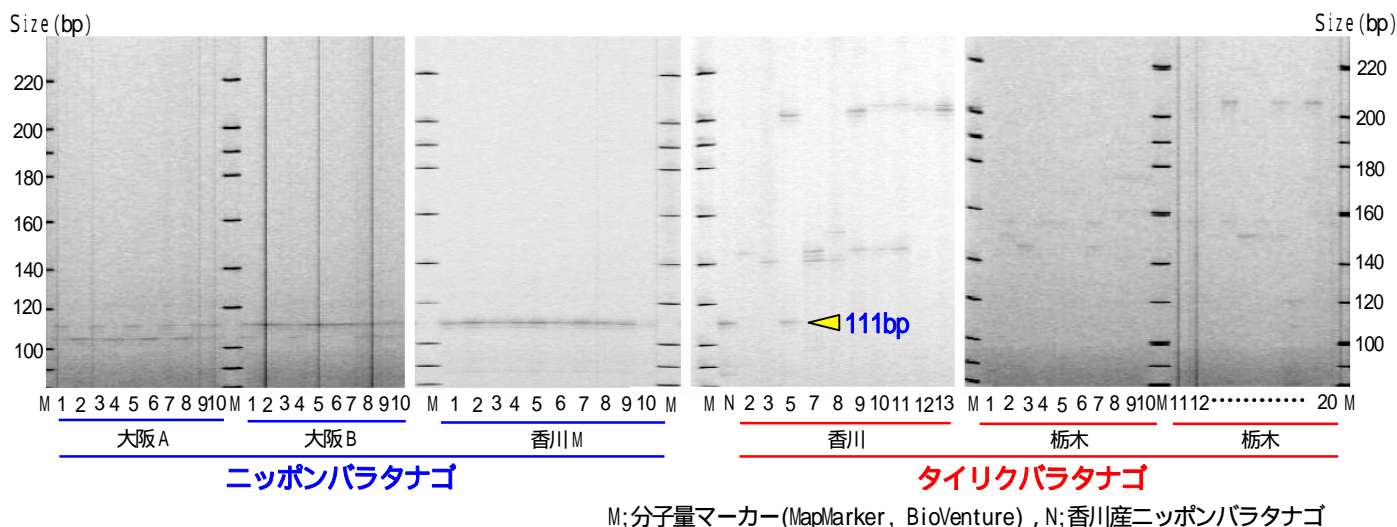


図 3 マイクロサテライトマーカーRK236の泳動像(変性6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

表 4 各個体群のフラグメント長と特徴

種名	採取地	フラグメント長 (bp)				個体群の特徴
		101	107	111	137<	
ニッポンバラタナゴ	香川					全て 111/111 のホモ個体
	大阪					101/101, 101/107, 107/107 のホモ, ヘテロ個体の混成
タイリクバラタナゴ	香川					多様なパターンを持つ。ニッポンバラタナゴと共通バンドあり。
	栃木					多様なパターンを持つ。ニッポンバラタナゴと共通バンドなし。

2 PCR-RFLP 多型について

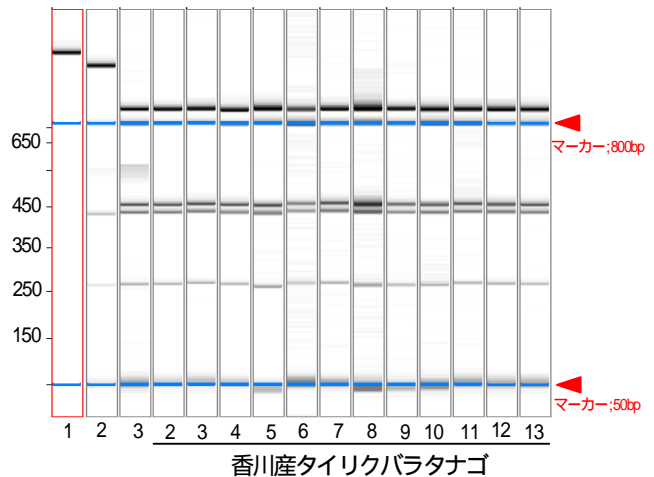
香川産タイリクバラタナゴの mtDNA の D-loop 領域の RCR-RFLP (*EcoRI*) では、分析個体の全てがタイリクバラタナゴのバンドパターンを示した。結果を図4に示す。

3 RK236 増幅産物の塩基配列の比較

RK236 増幅産物のうち、大阪産ニッポンバラタナゴの 101 および 107bp フラグメント、香川産ニッポンバラタナゴの 111bp フラグメント、ならびにタイリクバラタナゴの 111, 137, 197, 259, 261, および 287bp フラグメントの塩基配列を決定した。

香川産タイリクバラタナゴで認められた香川産ニッポンバラタナゴと同じ長さのバンドは、塩基配列も共通であった。

塩基配列のアラインメントの結果を表5, 6に示す。なお、表6は煩雑になるため、塩基配列を決定したタイリクバラタナゴのフラグメントのうち一部のみ記載した。



1; mtDNA の D-loop 領域全長(2,050bp),
2; ニッポンバラタナゴ(1,310・450・290bp)

図4 mtDNA の D-loop 領域の RCR-RFLP (*EcoRI*)
マイクロチップ電気泳動 (日立 SV1210)

表5 RK236 増幅産物のアラインメント(ニッポンバラタナゴ)

鎖長		1 21 41 61 81 101															
香川	111	GCTCTCTCTC TCTCTCTCAC TCC	CCATCCA	CCTCTCTCTC	TOGCTCT	CCA CTGG	TCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	ACTC	TGG	AATGCCG	TAATGGACTG	AAA
大阪	107	GCTCTCTCTC TCTCTCTCAC TCC	CCATCCA	CCTCTCTCTC	TOGCTCT	CCA CTGG	TCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	ACTC	CGG	AATGCCG	TAATGGACTG	AAA	
大阪	101	GCTCTCTCTC TCTCTCTCAC TCC	CCATCCA	CCTCTCTCTC	T-----	CCA CTGG	TCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	ACTC	TGG	AATGCCG	TAATGGACTG	AAA	
大阪	107	GCTCTCTCTC TCTCTCTCAC TCC	CCATCCA	CCTCTCTCTC	T-----	CCA CTGG	TCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	ACTC	TGG	AATGCCG	TAATGGACTG	AAA	

—, — : Primer 配列, 太字 : CT または TC リピート, □ : 回文配列, N : 置換塩基

表6 RK236 増幅産物のアラインメント(タイリクバラタナゴ)

鎖長		1 21 41 61 81 101														
香川	261	GCTCTCTCTC TCTCTCTCAC TCC	ATCCA	CCTCTCTCTC	ACTCTTTC	TCT	CCACTGG	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TC	ACTCCCTTTC	TCTCC	CCACT	GG	TCTCTCTC	GC
香川	197	GCTCTCTCTC TCTCTCTCAC TCC	ATCCA	CCTCTCTCTC	TCTCTCTTTC	TCT	CCACTGG	TCTCTCTCTC	-----	ACTCCCTT	-----	-----	-----	-----	-----	-----
栃木	137	GCTCTCTCTC TCTCTCTCAC TCC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
栃木	137	GCTCTCTCTC TCTCTCTCAC TCC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
香川*	111	GCTCTCTCTC TCTCTCTCAC TCC	CCATCCA	CCTCTCTCTC	TC-----	GC	TCT	CCACTGG	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	TCTCTCTCTC	ACTCT	-----	-----	-----	-----

—, — : Primer 配列, 太字 : CT または TC リピート, □ : 回文配列, N : 置換塩基

* : 香川産タイリクバラタナゴの塩基配列は香川産ニッポンバラタナゴの配列と同じ

香川産と大阪産のニッポンバラタナゴのフラグメント長の差はCGCTCTの6塩基の欠落(挿入)とCT繰返し回数の増減により生じていた(表5)。

タイリクバラタナゴでは、7塩基の回文配列CCACTGGが3~6個含まれていた(表6および未記載のフラグメント)。この配列はニッポンバラタナゴでは1個しか含まれていなかった(表5)。

なお、大阪産ニッポンバラタナゴの107bpフラグメントと栃木産タイリクバラタナゴ137bpフラグメントでは、長さが同じで配列の異なるサイズホモプラスリーが認められた。

考察

1 マイクロサテライトマーカー適用の可能性

マイクロサテライトマーカー(RK236)の結果より、香川県産ニッポンバラタナゴは全個体が同一のバンドパターンを示すことから、極めて均一な集団であることがわかった。これまでに複数のマイクロサテライトマーカーを開発しているが、いずれもニッポンバラタナゴでは単調なバンドパターンを示している(白井ほか、未発表)。皮肉なことにニッポンバラタナゴの遺伝的多様性が著しく損なわれている¹⁴⁾ために、マイクロサテライトマーカーによる亜種の判別及び雑種個体の検出は可能と思われる。すなわち、ニッポンバラタナゴ特有のバンド以外のバンドを有する個体はタイリクバラタナゴまたは雑種個体であると推定できる。

一方、PCR-RFLP分析では香川県のニッポンバラタナゴに2つのハプロタイプが存在することが指摘されている¹⁵⁾が、現在のところ、これを区別するマイクロサテライトプライマーは開発されていない。

マイクロサテライトマーカー法は、より少ないDNAで分析可能であること、PCR産物を電気泳動するのみで判別可能であること、PCR-RFLP法に比べ簡便で多数の検体を迅速に処理することができると考えられる。このため、希少種保護事業実施の際の判別に有望な手法と思われる。実際、今回開発したマイクロサテライトプライマー-RK236を用いて、生きた個体の尾びれからproteinaseK処理で抽出したgenome DNAを鋳型にPCRを行ったところ、アクリルアミドゲル電気泳動で目的のバンドを確認することができた。これにより、希少種であるニッポンバラタナゴを生かしたままで判定が可能となる。

また、マイクロサテライトマーカーによるPCR増幅産

物について、マイクロチップ電気泳動(日立SV1210)を行ったところ、判別に十分な感度が得られることが分かった。マイクロチップ電気泳動では、PCR増幅産物をマイクロチップにアプライし結果が得られるまで30分程度しか要さず、今回開発したプライマーと組み合わせることにより、従来行われてきたPCR-RFLP法等に比べ、迅速な判別が可能となる。

今後は、使用できるマイクロサテライトマーカーの数を増やし、より広い地域の、より多くの個体数のタイリクバラタナゴの分析を行い、マイクロサテライト分析の精度を高めていくこと、また採集地のため池を識別できるようなマイクロサテライトマーカーの検索を行うことが重要である。使用可能なマイクロサテライトを増やし、これらを組合わせて使用することで、検体数が増えた場合でも精度よく判別できると考えられる。

2 香川県のタイリクバラタナゴとニッポンバラタナゴ

香川県産のタイリクバラタナゴにニッポンバラタナゴと共通のバンド(RK236, 111bp)を持つ個体が見つかった。この個体はタイリクバラタナゴ型のmtDNAを持つ一方で、香川産ニッポンバラタナゴに固有の塩基配列を持つマイクロサテライトマーカーを保有していた。このことから、本個体は亜種間の雑種と考えられ、雑種化は香川県下で起こったものと推定される。雑種化の過程には次の2つの可能性が考えられる。ひとつは、文献的記載は無いものの香川県西讃地域にもかつて香川型genome DNAを持つニッポンバラタナゴが生息していて、ここにタイリクバラタナゴが侵入し雑種化が起きた可能性。もうひとつは、西讃地域にタイリクバラタナゴが侵入した後、東讃地域に生息するニッポンバラタナゴが持ち込まれ雑種化した可能性、である。雑種個体群は形態的、遺伝的にも亜種判別をより困難にすることは疑いなく、雑種個体群を拡げることに繋がる恐れがある安易な移植・放流は慎むべきである。

香川産、栃木産、いずれのタイリクバラタナゴにも3個以上含まれていた7塩基配列の回文配列は、ステムを形成することで複製のエラーを起りやすくと考えられ、タイリクバラタナゴのRK236アレル多様性の原因となっていると思われる。一方、ニッポンバラタナゴにはアレル多様化の原動力となりうる同回文配列が1個しか存在せず、干ばつによるボトルネック効果で失われた多様性が回復するにはとりわけ長い時間が必要となることが危惧される。この点を明らかにするには、この他の

マイクロサテライトでも同様の現象が生じているかどうか調べる必要がある。

まとめ

香川県では、平成 17 年 7 月、香川県希少野生生物の保護に関する条例¹⁶⁾を制定し、条例で指定する指定希少野生生物としてニッポンバラタナゴを含む 8 種の動植物を指定(平成 18 年 5 月)、生きている個体の捕獲等が原則禁止された。条例の施行により保護すべき個体群を明らかにする必要が生じているが、マイクロサテライトマーカーは利用可能なツールのひとつと考えられる。使用できるマイクロサテライトマーカーの数を増やし精度を上げることで、これまで困難であったニッポンバラタナゴの個体群あるいは個体の識別が可能になるものと思われる。

今後は、生息地、生息個体の保護とあわせて、既に低下しているニッポンバラタナゴの種内の遺伝的多様性の維持も考えていかなければならない。しかしながら、現状では、このような基礎的な情報が不足しており、ニッポンバラタナゴの保護を科学的(保全生物学的)に行うことは難しい。ニッポンバラタナゴの生息地の保存や生息個体の保護のほか、基礎的知見を得る努力が必要である。

謝辞

大阪産ニッポンバラタナゴは加納義彦氏(清風高等学校)、栃木産タイリクバラタナゴは久保田仁志氏(栃木県水産試験場)に提供していただいた。両氏はそれぞれ、ニッポンバラタナゴ、ミヤコタナゴの保護に取り組んでおられる。香川県においても、ニッポンバラタナゴの保護に多くの人が関心を持ち、さまざまな活動を展開している。これらの方々にはまず御礼を申し上げたい。そして、本報告に関する御意見等は些細なことでもお知らせいただけるよう、この場でお願いしたい。

また、本研究は香川大学の指導・協力のもと進められている。研究への理解を示していただいた香川大学田島茂行農学部長に改めて謝意を表す。

本報告の一部は、平成 17 年 3 月 27 日~30 日に大阪府で開催された第 52 回日本生態学会大会において発表したものである。(講演要旨集 p132)

文献

- 1) 中村守純：日本のコイ科魚類，資源科学シリーズ 4，資源科学研究所(1969)
- 2) 植松辰美，安芸昌彦：香川県におけるバラタナゴ(別称ニッポンバラタナゴ)の分布，香川生物，12，7-14(1984)
- 3) 香川県レッドデータブック，p264(2004)
- 4) 長田芳和：タイリクバラタナゴ - 純潔の危機 - ，日本の淡水生物，147-153，東海大学出版会(1980)
- 5) 生物多様性情報システム http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f3.html
- 6) 外来種ハンドブック，日本生態学会編，110&362-363(2002)
- 7) 中村守純：関東平野に繁殖した移植魚，日本生物地理学会会報，16/19，333-337(1955)
- 8) 侵入生物データベース，タイリクバラタナゴ，独立行政法人国立環境研究所，<http://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/detail/50080.html>
- 9) 植松辰美：財田川(香川県)で採集されたタイリクバラタナゴ，香川生物，11，7-8(1983)
- 10) 安芸昌彦：外部形態からみたバラタナゴ 2 亜種の香川県内での分布，香川生物，21，15-21(1994)
- 11) 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)
- 12) Palumbi, Martin, Remano, Mcmillan, Stice, Grabowski: The simple fool's guide to PCR, ver 2.0. Zoology Department, University of Hawaii, Honolulu(1991)
- 13) 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)
- 14) Kawamura: Low genetic variation and inbreeding depression in small isolated populations of the Japanese Rosy Bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus*. Zool Sci 22, 517-524(2005)
- 15) Kawamura, Nagata, Ohtaka, Kanoh, Kitamura: Genetic diversity in the Japanese rosy bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (Cyprinidae). Ichthyol Res, 48, 369-378(2001)
- 16) 香川県希少野生生物の保護に関する条例，http://www.pref.kagawa.jp/kankyo/shizen/hog_o_jyore/hogo_jyore.htm