

ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* の遺伝子解析(10)

—ニッポンバラタナゴ香川個体群の遺伝子モニタリング(6)—

Genetic Analysis of Japanese Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (10)

—Genetic Monitoring of East Kagawa Population (6)—

中務 まこ
Mako NAKATSUKASA

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 12ヶ所のため池から 2018 年と 2019 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。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

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、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。2017 年以前の遺伝子モニタリング結果は既に報告している⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。

本報では、東讃地域の 5 つの河川の流域にある 12ヶ所のため池から 2018、2019 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。

II 方法

1 バラタナゴの採捕

バラタナゴは、2018 年 10 月から 11 月と 2019 年 10 月に 12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 1 個体から 10 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、分光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

0.2U の Taq DNA polymerase (Bio academia)、10× Robust Buffer、終濃度 20 μM の各 dNTP、終濃度各 0.67 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 6 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、48°C-1 分、72°C-

*香川県広域水道企業団水質管理課

**元・香川大学総合生命科学研究センター

30秒)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 増幅産物を EcoR I で、Dloop-M 増幅産物を Msp I で、ND1-M 増幅産物を Mbo I で、および ND1-H 増幅産物を HaeIII 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%アガロースゲルで電気泳動し、Gel Red™ (Biotium)による蛍光色素染色を行い、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タンダード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ハプロタイプ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 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	CCCGTCACCAATTCTTATTT	ATTATATTGTTGCGCCTGCAC	956bp
Dloop-M	GTTAATCACCGGGCAATTT	ACGAGTTTTACCGGCCCTAT	442bp
ND1-M	CCTAGTACGAAAGGATCGGAAA	TGCTAAATGTTTGACGGGTGTA	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、12ヶ所のため池の157個体のmtDNAハプロタイプ(表2)を決定した。前報¹³⁾でタイリクバラタナゴの侵入が確認されたため池Kks3以外の11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。なお、Kks3の15個体中5個体のmtDNAハプロタイプがタイリクバラタナゴ型であった。

1995年の河村らの結果と2001~2017年のわれわれの結果、および本結果をあわせて表3に示す。

Kks3では2017年に続き2018年、2019年にもタイリクバラタナゴ型のmtDNAハプロタイプが認められた。

Ktd4では2018年はすべてのサンプルがmtDNAハプロタイプAであったが、2019年はmtDNAハプロタイプAとBのサンプルの混在が認められた。Ktd4ではそれ以前にもサンプルのmtDNAハプロタイプの多型が確認されている。mtDNAハプロタイプ多型が認められた調査年のmtDNAハプロタイプB個体の比率を見ると、2006年は個体数が不明であるが20%、2011年は10個体中1個体、2019年は10個体中1個体であった。このことから、Ktd4はmtDNAハプロタイプBのニッポンバラタナゴの生息密度がmtDNAハプロタイプAのそれよりも低いため池であると推察された。

表2 mtDNAのCAPS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	サンプル数
	EcoR I パターン	Msp I パターン	Mbo I パターン	Hae III パターン		
Kks2	956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	10
Kks3 春日川以西2	956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	10
	324bp, 632bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo	5
Kks4	956bp	420bp	643bp	245bp	B	6
Ksn3 新川2		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	15
Ksn6 新川3		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	15
Ksn7		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	15
Kkb9 鴨部川1		420bp	643bp	245bp	B	1
Kkb5 鴨部川3	956bp	420bp	643bp	245bp	B	15
Kkb6		420bp	643bp	245bp	B	15
Ktd4 津田川1		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	19
		420bp	643bp	245bp	B	1
Ktd8		420bp	643bp	245bp	B	10
Kbt2 弁天川		420bp	643bp	245bp	B	20
ニッポンバラタナゴA		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	84
ニッポンバラタナゴB	956bp	420bp	643bp	245bp	B	68
タイリクバラタナゴ	324bp, 632bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo	5

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 ³⁾	2001 ⁵⁾	2006 ⁶⁾	2010 ⁷⁾	2011 ⁸⁾	2012 ⁹⁾¹²⁾	2016 ¹³⁾	2017 ¹³⁾	2018	2019
Ktk1	春日川以西1	A	A	A							
Kks1		A	A	A				A	A		
Kks2	春日川以西2				A						
Kks3						A	A・B		A・Roo	A・Roo	A・Roo
Kks4						B	B		B	B	
Ksn1	新川1		A	A		A	A				
Ksn2			A		A						
Ksn3	新川2		A	A	A				A	A	A
Ksn4				採捕できず	A・Roo						
Ksn5	新川3	A	A	A							
Ksn6		A		A		A	A		A	A	A
Ksn7						A	A・B		A	A	A
Kkb1	鴨部川1		B								
Kkb2		B	B	B							
Kkb7					B	B	B・Roo				
Kkb8					B						
Kkb9					B					B	
Kkb10					B						
Kkb3			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	B	B
Kkb6	B			B				B	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	A	A	A・B	
Ktd6			A			A・B	A				
Ktd7			B						B		
Ktd8								B	B	B	
ktd5		津田川2	B	B	B						
Kbt1	弁天川							B	A		
Kbt2								B	B	B	B

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、2016年、2017年に引き続き、2018年10ヶ所、2019年10ヶ所のため池のサンプル157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。その結果、2017年にタイリクバラタナゴ型mtDNAハプロタイプをもつ個体が確認された春日川以西の1ヶ所のため池では引き続き同型mtDNAハプロタイプをもつ個体が認められたが、それ以外のため池へのタイリクバラタナゴの新たな侵入を示す結果は得られなかった。タイリク

バラタナゴ生息域の拡大の兆候は認められないと判断されるが、これからも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が欠かせない。

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
 (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) 平田由香里, 池田滋: ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* の遺伝子解析(9)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(5)ー, 香川県環境保健研究センター所報, 17, 39-43 (2018)