

ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* の遺伝子解析(11)

—ニッポンバラタナゴ香川個体群の遺伝子モニタリング(7)—

Genetic Analysis of Japanese Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (11)

—Genetic Monitoring of East Kagawa Population (7)—

高木 葵
Aoi TAKAGI

中務 まこ*
Mako NAKATSUKASA

要 旨

ニッポンバラタナゴは絶滅危惧 IA 類(環境省)に指定されており、東讃地域は重要な生息地となっている。2020 年から 2024 年にかけて 12ヶ所のため池から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、2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。

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 between 2020 and 2024 using CAPS markers, and detected individuals with the mitochondrial DNA haplotype specific to Chinese rose bitterling (*R. o. ocellatus*) in two of these ponds. 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。中国大陆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 IA 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 CAPS マーカー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 CAPS マーカー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。2019 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⁾¹⁴⁾。

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 2020 年から 2024 年にかけて採捕された個体についての分析結果を報告する。

II 方法

1 バラタナゴの採捕

バラタナゴは、2020 年から 2024 年の秋期に、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。

*香川県環境管理課

2 CAPS マーカー分析

(1) 核酸の抽出

凍結保存したバラタナゴ個体より、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN社) 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) PCR 増幅

反応液組成は、0.2U Taq DNA polymerase、1× Robust Buffer、20 μM(each) dNTPs (以上 Bio academia)、0.67 μM の各プライマー (表1)、および錆型DNA (<30ng) とし、滅菌蒸留水を加えて総量を 6 μL に調整した。サーマルサイクラーは Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いた。反応条件は、95°C 5 分を 1 サイクル、95°C 10 秒-48°C 1 分-72°C 30 秒を 30 サイクルの後、追加伸長 72°C 7 分とした。

表1 CAPS マーカーのプライマー塩基配列と増幅産物長

CAPS マーカー	塩基配列 (5'-3')		増幅産物長 (bp)
	フォワード	リバース	
Dloop-E	CCCGTCACCCAATTCTTATT	ATTATATTGTTGCGCCTGCAC	956
Dloop-M	GTTAATCACCGGGGCAATT	ACGAGTTTACCGGCCCTAT	442
ND1-M	CCTAGTACGAAAGGATCGGAAA	TGCTAAATGTTGCAGGGTGTA	712
ND1-H	GGCTGAGCATCTAACTCGAAAT	ATATTGCGTATTGGCTAGGA	335

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、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288個体のmtDNAハプロタイプ (表2) を決定した。前報¹³⁾¹⁴⁾でタイリクバラタナゴの侵入が確認されたため池Kks3以外に、Ksn3でも2022年にタイリクバラタナゴの侵入が確認された。この2ヶ所以外の10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、タイリクバラタナゴ型のハプロタイプが確認された個体数は、Kks3では2020年に採捕された10個体中6個体、Ksn3では2022年に採捕された10個体中2個体であった。

1995年年の河村らの結果と2001～2019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。

(3) 制限酵素処理と電気泳動

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 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%アガロースゲルで電気泳動し、Gel RedTM (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。

Kks3 では、2017年から2019年に続き2020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2020年、2021年はすべてのサンプルが mtDNA ハプロタイプ A であったが、2022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、その後2024年にはすべてのサンプルが mtDNA ハプロタイプ A であった。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、2022年は4個体中1個体であった。このことから、前報¹⁴⁾に引き続き、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。

Ktd8 では、2020年以前はすべてのサンプルが mtDNA ハプロタイプ B であったが、2021年に mtDNA ハプロタイプ A と B のサンプルの混在が認められた。

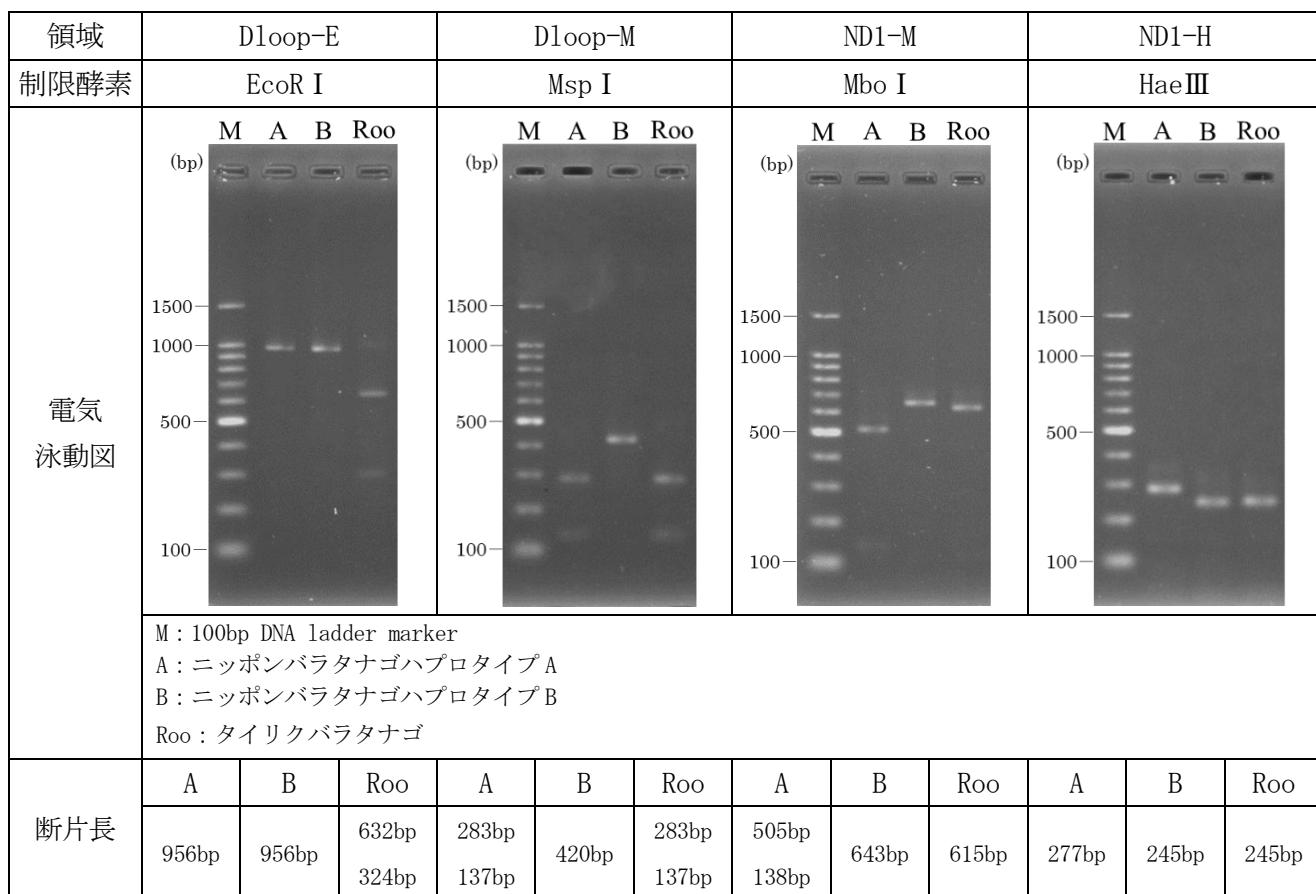


図1 CAPS マーカーのアガロースゲル電気泳動

表2 mtDNA の CAPS 分析結果 (2020年~2024年)

ため池	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 EcoR I 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			
Ktk1 春日川以西1	956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	20	
Kks3 春日川以西2	956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	4	
Kks4	632bp, 324bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo	6	
Ksn3 新川2	956bp	420bp	643bp	245bp	B	2	
Ksn3 新川2	956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	28	
Ksn6 新川3		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	50	
Ksn7					A	20	
Kkb9 鴨部川1						10	
Kkb5 鴨部川3		420bp	643bp	245bp	B	30	
Kkb6	956bp					20	
Ktd4		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	33	
津田川 1		420bp	643bp	245bp	B	1	
Ktd8		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	3	
Kbt2 弁天川		420bp	643bp	245bp	B	19	
ニッポンバラタナゴA	956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	158	
ニッポンバラタナゴB		420bp	643bp	245bp	B	122	
タイリクバラタナゴ	632bp, 324bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo	8	

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 ¹⁴⁾	2019 ¹⁴⁾	2020	2021	2022	2023
Ktk1	春日川以西1	A	A	A								A			
Kks1		A	A	A								A			
Kks2	春日川以西2			A								A			
Kks3															
Kks4															
Ksn1	新川11	A	A	A											
Ksn2	新川12	A	A	A											
Ksn3															
Ksn4															
Ksn5	新川13	A	A	A											
Ksn6															
Ksn7															
Kkb1															
Kkb2	鴨部 1	B	B	B											
Kkb7	鴨部 2														
Kkb8															
Kkb9															
Kkb10															
Kkb3	A	A	A												
Kkb4		A	A	A											
Kkb11	鴨部 2	A													
Kkb12															
Kkb13															
Kkb14															
Kkb5	鴨部 3	B	B												
Kkb6		B	B												
Ksd1	志度														
Ktd1															
Ktd2															
Ktd3															
Ktd4	津田 1	A	A	A											
Ktd6		A													
Ktd7		B													
Ktd8															
ktcd5	津田 2	B	B												
Kbt1	弁天														
Kbt2															

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、2018年、2019年に引き続き、2020年から2024年にかけて12ヶ所のため池のサンプル288個体について、mtDNAのCAPSマーカーを用いた分析を行った。その結果、2017年から2019年にかけて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。また、新たに新川の1ヶ所のため池でタイリクバラタナゴの侵入を示す結果が得られた。

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。

文献

- 環境省：生物多様性情報システム
<https://ikilog.biodic.go.jp/Rdb/booklist>
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- 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)
- 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, 12, 38-42 (2013)
- 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)－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)－, 香川県環境保健研究センター所報, 12, 38-42 (2013)
- 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)－鴨部川流域のため池のバラタナゴの遺伝子解析－, 香川県環境保健研究センター所報, 13, 38-41 (2014)
- 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)
- 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)－東讃地域で採捕されたバラタナゴの遺伝子解析－, 香川県環境保健研究センター所報, 48-53 (2008)
- 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)－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)－, 香川県環境保健研究センター所報, 14, 33-37 (2015)
- 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)－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)－, 香川県環境保健研究センター所報, 17, 39-43 (2018)
- 中務まこ, 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(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)－, 香川県環境保健研究センター所報, 20, 67-70 (2021)