

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

## 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 (7)ー

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

## ーGenetic Monitoring of East Kagawa Population (7)ー

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 I A 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 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<sup>5)6)7)8)9)10)11)12)13)14)</sup>。

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℃)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)、および鋳型 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℃ 5分を1サイクル、95℃ 10秒-48℃ 1分-72℃ 30秒を30サイクルの後、追加伸長 72℃ 7分とした。

### (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℃ 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 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	CCCGTCACCCAATTCTTATTT	ATTATATTGTTGCGCCTGCAC	956
Dloop-M	GTTAATCACCGGGGCAATTT	ACGAGTTTACCGGCCCTAT	442
ND1-M	CCTAGTACGAAAGGATCGGAAA	TGCTAAATGTTTGCAGGGTGTA	712
ND1-H	GGCTGAGCATCTAACTCGAAAT	ATATTTGCGTATTCGGCTAGGA	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<sup>13)14)</sup>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。

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<sup>14)</sup>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。

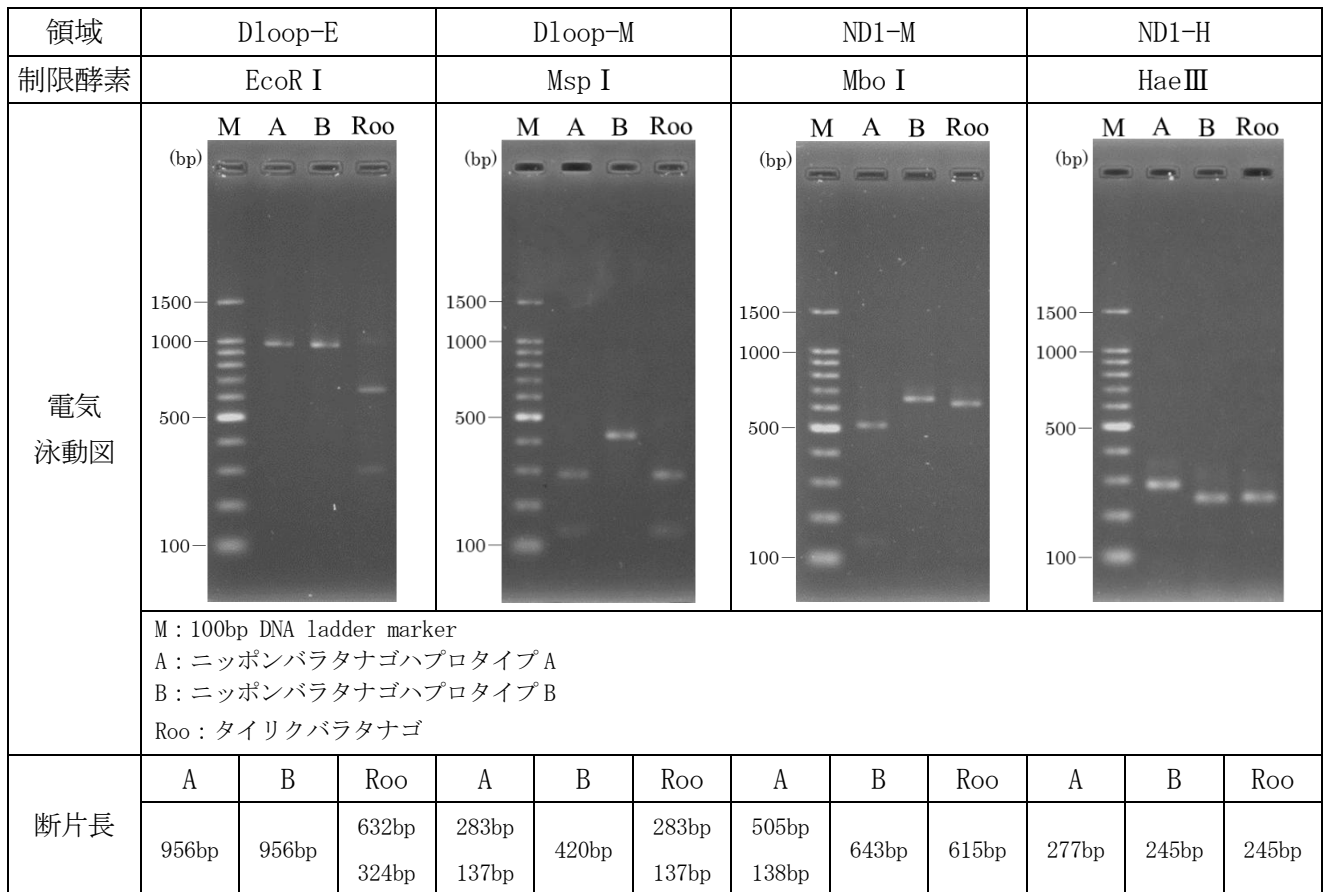


図1 CAPS マーカーのアガロースゲル電気泳動

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	Dloop-M	ND1-M	ND1-H		
名前	所在地域	EcoR I パターン	Msp I パターン	Mbo I パターン	HaeIII 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
Ksn6		632bp, 324bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo	2
Ksn7	新川3		283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	50
Kkb9							20
Kkb5	鴨部川3		420bp	643bp	245bp	B	10
Kkb6							30
Ktd4	津田川 1	956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	20
Ktd8			420bp	643bp	245bp	B	33
Kbt2			283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	1
			420bp	643bp	245bp	B	3
ニッポンバラタナゴA		956bp	283bp, 137bp	505bp, 138bp	277bp	A	19
ニッポンバラタナゴB			420bp	643bp	245bp	B	40
タイリクバラタナゴ		632bp, 324bp	283bp, 137bp	615bp	245bp	Roo	158

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	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 <sup>13)</sup>	2017 <sup>13)</sup>	2018 <sup>14)</sup>	2019 <sup>14)</sup>	2020	2021	2022	2023	2024
ハプロタイプ構成の経年変化																
Ktk1	春日川以西1	A	A	A								A				
Kks1		A	A	A				A	A							
Kks2	春日川以西2				A						A					
Kks3						A	A・B	A・B	A・Roo	A・Roo	A・Roo	A・Roo				
Kks4						B	B	B	B	B	B	B	B			
Ksn1			A	A		A	A									
	新川1				埋立											
Ksn2		A		A												
Ksn3	新川2		A	A	A			A	A	A	A	A	A	A・Roo		
Ksn4			採捕できず*	A・Roo												
Ksn5		A	A	A												
Ksn6	新川3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Ksn7						A	A・B	A	A	A	A	A				
Kkb1			B													
Kkb2		B	B	B												
Kkb7					B	B	B・Roo									
Kkb8	鴨部川1				B											
Kkb9					B					B			B			
Kkb10					B											
		A														
Kkb3		A	A													
Kkb4		A	A	A												
		A														
Kkb11	鴨部川2				A											
Kkb12					A											
Kkb13					A											
Kkb14						A	A									
Kkb5	鴨部川3	B	B					B	B	B	B	B	B	B		
Kkb6		B		B				B	B	B	B	B	B			
Ksd1	志度	B	B	B												
Ktd1			A・B	A・B												
Ktd2			B	B		B	B									
Ktd3		B	B	B												
Ktd4	津田川1	A		A・B	A	A・B	A	A	A	A・B	A	A	A	A・B		A
Ktd6		A				A・B	A									
Ktd7		B						B								
Ktd8								B	B	B	B	B	A・B		B	
Ktd5	津田川2	B	B	B												
Kbt1	弁天川							B	A							
Kbt2								B	B	B	B	B	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、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

- 1) 環境省：生物多様性情報システム  
<https://ikilog.biodic.go.jp/Rdb/booklist>
- 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）
- 14) 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)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(6)ー，香川県環境保健研究センター所報，20，67-70（2021）