

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—

Genetic Analysis of Japanese Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (3)

—Genetic Analysis of Individuals from Eastern Kagawa—

白井 康子 伊藤 英夫 池田 滋*
Yasuko SHIRAI Hideo ITO Shigeru IKEDA

要 旨

環境保健研究センターでは、希少淡水魚ニッポンバラタナゴの保護対策に資するため、香川大学の協力を得て、遺伝子解析手法の開発等に取り組んでいる。2007 年度に、近年生息の確認されている既知生息地外で採捕されたバラタナゴについて遺伝子解析による亜種判別を試みた。新たに鴨部川流域にタイリクバラタナゴが侵入している実態が明らかになり、ニッポンバラタナゴの保護対策が急がれる。

キーワード：ニッポンバラタナゴ 遺伝子解析 亜種判別

I はじめに

ニッポンバラタナゴ *Rhodeus ocellatus kurumeus* は環境省レッドデータブックで絶滅危惧 IA 類に指定¹⁾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。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²⁾が制定され、ニッポンバラタナゴを含む 8 種の動植物が指定希少野生生物に定められた(平成 18 年 5 月)。

ニッポンバラタナゴの保護には、亜種タイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* との判別が不可欠であるが、両亜種の外見による区別は困難である。このため、環境保健研究センターでは、香川大学の協力を得て、遺伝子解析により両亜種を簡便に判別する方法の開発などに取り組んでおり、これまで得られた成果を所報^{3) 4)}等として取りまとめ報告している。

本報告では、2007 年度に行われた河川の魚類調査等の際に採捕されたバラタナゴ(亜種を区別しない場合「バラタナゴ」と表記する)について、遺伝子解析による亜種同定を行った結果を報告する。

II 方法

1 検体の採取

総数 38 個体のバラタナゴが採取された。バラタナゴは生かしたままバケツで持ち帰り、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、今回の採捕地はすべて、ニッポンバラタナゴの分布について未確認である。また、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。

表 1 サンプルの概要

採捕地		月日	個体数
新川流域	水路	8/17, 9/26	2
	ため池	9/4	15
鴨部川流域	支流 1	9/19	4
	支流 2	10/2	17

2 DNA の抽出

凍結保存したバラタナゴ個体より、組織をハサミで切り取り、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) で 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。

*香川大学総合生命科学センター

表2 プライマー塩基配列及びPCR条件

プライマー名称	塩基配列	温度条件	反応液組成	PCR装置
PCR-RFLP	D-loop F: CACATCCAGCCAGAAGATATTT R: TAATCCCAGTTTGTCTCTTAGC	95°C(5分) 95°C(30秒)→50°C(1分)→ 72°C(2分):40 サイクル	Takara Ex Taq 0.2U Ex Taq Buffer (Mg ²⁺ free)	Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
	ND1 F: ACCCCGCCTGTTACCAAAAACAT R: GGTATGAGCCCGATAGCTTA	72°C(7分)	MgCl ₂ 2mM dNTP Mixture 200 μM each	
Microsatellite	RC236 F: GCTCTCTCTCTCTCTCACTCC R: TTTCAGTCCATTACGGCATTCC	95°C(5分) 95°C(20秒)→56°C(1分)→ 72°C(20秒):40 サイクル	Templete 20ng F Primer 0.4 μM R Primer 0.4 μM	Total 10 μl
		72°C(7分)		

3 ミトコンドリア DNA (mtDNA) の PCR-RFLP 分析及びゲノム DNA のマイクロサテライト分析

mtDNA の PCR-RFLP 分析³⁾ 及び開発済みのマイクロサテライトマーカ-RC236 による分析⁴⁾ には、対照として、大阪産ニッポンバラタナゴ、栃木産タイリクバラタナゴ、香川産ニッポンバラタナゴの2つのハプロタイプ、各2個体の DNA を同時に分析に供した。各 PCR プライマーの塩基配列及び PCR 条件を表2に示す。

mtDNA の PCR-RFLP 分析では、D-loop 領域及び ND1 領域を対象とし、D-loop 増幅産物については *Eco*RI (NEB)、ND1 増幅産物については *Dde*I (NEB) または *Hae*III (NEB) で制限酵素処理を行った。制限酵素は河村の報告⁵⁾⁶⁾ を参考に選択した。mtDNA をニッポンバラタナゴ型かタイリクバラタナゴ型か判別するには、D-loop 増幅産物を *Eco*RI 処理するか、ND1 増幅産物を *Dde*I 処理すればよい。ニッポンバラタナゴ型 mtDNA を大阪型か香川型か判別するには ND1 増幅産物を *Dde*I 処理すればよい。ニッポンバラタナゴ香川型の mtDNA が A 型か B 型かを判別するには、ND1 増幅産物を *Hae*III 処理すればよい。制限酵素処理はいずれも、酵素に添付された Buffer に1反応あたり1U となるよう制限酵素を加えた反応液 9 μl に PCR 増幅産物 1 μl を精製しないまま加え、37°C、1時間、加温し行った。PCR-RFLP 分析に用いた制限酵素の種類と組合せ、処理後のパターンを表3に示す。

mtDNA は母系遺伝するため、系統解析には向いているが、雑種個体を検出できない。雑種個体の検出にはマイクロサテライトマーカ-のようなゲノム DNA の分子マーカ-が必要である。開発済みのマイクロサテライトマーカ-の中から RC236 を用いた。このマーカ-は、解析済みニッポンバラタナゴの全個体が栃木産タイリクバラタナゴと鎖長を異にするのみならず、香川産と大阪産のニッポンバラタナゴの間でも鎖長が異なるため、亜種の区

表3 制限酵素処理

領域	制限酵素	パターン	
D-loop	<i>Eco</i> RI	Rok	ニッポンバラタナゴ型
		Roo	タイリクバラタナゴ型
ND1	<i>Dde</i> I	B	ニッポンバラタナゴ香川型
		C	ニッポンバラタナゴ大阪型
		Roo1	タイリクバラタナゴ型
		Roo2	タイリクバラタナゴ型
	<i>Hae</i> III	A	ニッポンバラタナゴ型
		B	ニッポンバラタナゴ型
	C	ニッポンバラタナゴ型	
	Roo1	タイリクバラタナゴ型	
	Roo2	タイリクバラタナゴ型	

パターンの記号は Rok, Roo 以外は河村(2001b) Table3 の記号による

別のみならず、香川産ニッポンバラタナゴと大阪産ニッポンバラタナゴの区別にも便利である。

なお、PCR-RFLP 分析及びマイクロサテライト分析の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。

III 結果

PCR-RFLP 分析及びマイクロサテライト分析の電気泳動分析結果を図1、個体別分析結果を表4に示す。また、個体群別分析結果を表5、表6に示す。

1 PCR-RFLP 分析

(1) D-loop_ *Eco*RI 処理および ND1_ *Dde*I 処理

38 個体のうち、新川流域の水路で採捕された全2個体、鴨部川流域支流1で採捕された4個体中の3個体、計5個体がタイリクバラタナゴ型の mtDNA を持っていた。残り33個体の mtDNA はすべてニッポンバラタナゴ香川型であった。

(2) ND1_ *Hae*III 処理

D-loop_ *Eco*RI 処理および ND1_ *Dde*I 処理の結果ニッポンバラタナゴ型の mtDNA を持つと判断された33個体の

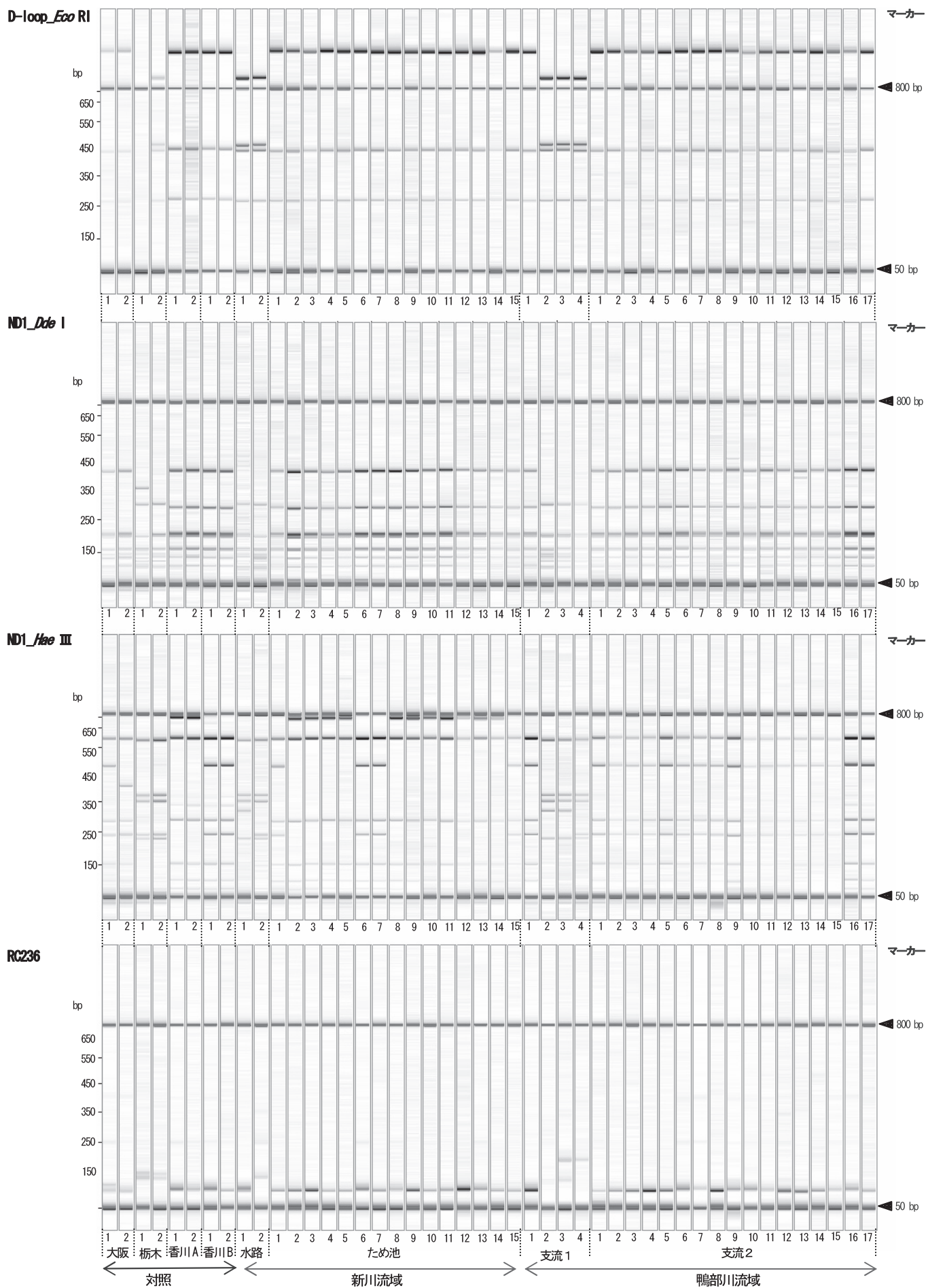


図1 PCR-RFLP分析及びマイクロサテライト分析の電気泳動結果

表4 個体別分析結果

サンプル名		性別	有孔鱗 (左/右)	D-loop	ND 1		Microsatellite	特記事項	
採捕地	番号			<i>Eco</i> RI	<i>Dde</i> I	<i>Hae</i> III	RC236		
新川流域	水路	1	♀	3/5	Roo	Roo2	Roo2	Rok/Roo (hetero)	雑種個体と推定
		2	♀	5/4	Roo	Roo2	Roo1	Roo (hetero)	
	ため池	1	♂	3/0	Rok	B	B	Rok (homo)	遺伝子はRok型だが有孔鱗あり 腹ビレ前縁白色部あり
		2	♂	0/0	Rok	B	A	Rok (homo)	
		3	♂	0/0	Rok	B	A	Rok (homo)	
		4	♀	0/0	Rok	B	A	Rok (homo)	
		5	♀	0/0	Rok	B	A	Rok (homo)	
		6	♀	4/?	Rok	B	B	Rok (homo)	遺伝子はRok型だが有孔鱗あり 腹ビレ前縁白色部なし
		7	♀	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		8	♀	?/0	Rok	B	A	Rok (homo)	
		9	♀	0/0	Rok	B	A	Rok (homo)	
		10	♀	1/0	Rok	B	A	Rok (homo)	
		11	♀	1/0	Rok	B	A	Rok (homo)	
		12	♀	0/0	Rok	B	A	Rok (homo)	
		13	♀	0/0	Rok	B	A	Rok (homo)	
14	—	0/0	Rok	B	A	Rok (homo)			
15	—	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)			
鴨部川流域	支流1	1	♀	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		2	♂	3/4	Roo	Roo2	Roo2	Roo (hetero)	
		3	♂	3/3	Roo	Roo2	Roo2	Roo (hetero)	
		4	♂	5/5	Roo	Roo2	Roo1	Roo (homo)	
	支流2	1	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		2	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		3	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		4	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		5	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		6	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		7	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		8	♀	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		9	♀	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		10	♀	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		11	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		12	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
		13	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)	
14	♀	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)			
15	♂	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)			
16	♀	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)			
17	♀	0/0	Rok	B	B	Rok (homo)			
対照	大阪	1	—	—	Rok	C	B	Rok/Rok (hetero)	ニッポンバラタナゴ (対照)
		2	—	—	Rok	C	C	Rok (homo)	ニッポンバラタナゴ (対照)
	栃木	1	—	—	Roo	Roo1	Roo1	Roo (hetero)	タイリクバラタナゴ (対照)
		2	—	—	Roo	Roo2	Roo1	Roo (hetero)	タイリクバラタナゴ (対照)
	香川 A	1	—	—	Rok	B	A	Rok (homo)	ニッポンバラタナゴ (香川A型)
		2	—	—	Rok	B	A	Rok (homo)	ニッポンバラタナゴ (香川A型)
	香川 B	3	—	—	Rok	B	B	Rok (homo)	ニッポンバラタナゴ (香川B型)
		4	—	—	Rok	B	B	Rok (homo)	ニッポンバラタナゴ (香川B型)

表5 個体群別 PCR-RFLP 分析結果

数字は個体数

採捕地	分析 個体数	有効鱗 確認数	D-loop		ND1									
			<i>Eco</i> RI		<i>Dde</i> I				<i>Hae</i> III					
			Rok	Roo	B	C	Roo1	Roo2	A	B	C	Roo1	Roo2	
新川流域	水路	2	2	0	2	0	0	0	2	0	0	0	1	1
	ため池	15	4	15	0	15	0	0	0	11	4	0	0	0
鴨部川流域	支流1	4	3	1	3	1	0	0	3	0	1	0	1	2
	支流2	17	0	17	0	17	0	0	0	0	17	0	0	0
対照	大阪	2	—	2	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0
	栃木	2	—	0	2	0	0	1	1	0	0	0	2	0
	香川(A)	2	—	2	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0
	香川(B)	2	—	2	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0

表6 個体群別マイクロサテライト (RC236) 分析結果

数字は個体数

採捕地	分析 個体数	Rok		Rok/Roo	Roo		
		Kagawa (homo)	Osaka (homo)	(Hybrid)	(homo)	(hetero)	
			(hetero)				
新川流域	水路	2	0	0	1	0	1
	ため池	15	15	0	0	0	0
鴨部川流域	支流1	4	1	0	0	1	2
	支流2	17	17	0	0	0	0
対照	大阪	2	0	1	1	0	0
	栃木	2	0	0	0	0	2
	香川(A)	2	2	0	0	0	0
	香川(B)	2	2	0	0	0	0

うち、11 個体は A 型ハプロタイプ、22 個体が B 型ハプロタイプを示した。新川流域のため池では 11 個体が A 型ハプロタイプを、4 個体が B 型ハプロタイプを示し、両方のハプロタイプ個体が混在していた。

2 マイクロサテライト (RC236) 分析

D-loop_ *Eco* RI 処理および ND1_ *Dde* I 処理の結果ニッポンバラタナゴ型の mtDNA を持つと判断された 33 個体はすべて、解析済み香川産ニッポンバラタナゴと同一の鎖長のアレルをもつホモ個体であった。

一方、D-loop_ *Eco* RI 処理の結果タイリクバラタナゴ型の mtDNA を持つと判断された 5 個体については、4 個体が非ニッポンバラタナゴ型アレルをヘテロ或いはホモで持っていた。しかしながら、新川流域水路で採捕された 1 個体は、非ニッポンバラタナゴ型アレルとニッポンバラタナゴ香川型アレルをもつヘテロ個体であり、両亜種の雑種個体であると推定された。

IV 考察

1 東讃地域へのタイリクバラタナゴ侵入

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、その後、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た¹⁰⁾。本報告でも、新川流域の水路で採捕された 2 個体のうちの 1 個体は雑種個体と推定された。また、同時に当該区域で採取した 1 個体のドブガイ (バラタナゴの産卵基質) を実験室内で飼育したところ、2 個体の稚魚が浮上したことから、この区域でバラタナゴが繁殖していることが確認され、雑種化の進行が懸念される。

今回の分析結果では、タイリクバラタナゴ型の DNA をもつ個体が鴨部川の支流でも見つかると、タイリクバラタナゴの西からの侵入は鴨部川まで及んでいることが明らかとなった。鴨部川支流 1 では、タイリクバラタナゴ型の DNA をもつ個体とニッポンバラタナゴ型の DNA をもつ個体が共存しており、新川流域同様に、この水域でバラタナゴの繁殖が可能であれば、今後、雑種化が進むものと思われる。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、これらの個体群の動向への注意が必要である。

2 ニッポンバラタナゴのハプロタイプ

今回の遺伝子解析結果では、新川流域の個体群及び鴨部川流域の個体群はニッポンバラタナゴの可能性が高いと推定される。特に、鴨部川流域の支流2の個体群については、香川県東讃地域におけるハプロタイプの分布と齟齬がないこと、有効鱗が認められないこと、上流にニッポンバラタナゴの分布池が存在することなどから、ニッポンバラタナゴと推定することに躊躇を感じない。

しかしながら、新川流域のため池の個体群については、これまでの調査結果で新川流域ではすべての分布池のハプロタイプがA型ハプロタイプであったことと矛盾すること、有孔鱗を持つ個体が確認されたこと、さらに有孔鱗の数の多い2個体がB型ハプロタイプのmtDNAを持つこと、うち1個体は腹ビレ前縁に白色部がみられたこと、当該ため池ではフナの養殖が行われていることなどから、B型ハプロタイプのmtDNAを持つ雑種個体が侵入した可能性が疑われる。これを明らかにするには、使用できるマイクロサテライトマーカーの数を増やし、また、多くの個体群に適用し情報を収集することで分析の確度を上げることが必要となる。

V 今後の課題

上述の結果から、タイリクバラタナゴ(雑種個体を含む)は香川県のニッポンバラタナゴ分布の主要地域へ侵入しつつあるように見える。更なる分布拡大と、それに伴う雑種化の進行が懸念されるため、定期的な遺伝子モニタリングによって各個体群の動向に注意を払い、ニッポンバラタナゴの生息地の保全を図らなければならない。

今後は、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なければならないが、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。

遺伝子解析については、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ニッポンバラタナゴ、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確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分子マーカーの広範な検索を行うことが重要である。

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。

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。

また、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、この場でお願ひしたい。

文献

- 1) 生物多様性情報システム http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f3.html
- 2) 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/hogo_jyore/hogo_jyore.htm
- 3) 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)
- 4) 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(2)ーマイクロサテライトマーカーによる亜種判別の可能性ー, 香川県環境保健研究センター所報, 6, 23-28 (2006)
- 5) 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 (2001a)
- 6) Kawamura, Nagata, Ohtaka, Kanoh, Kitamura: Genetic diversity in the Japanese rosy bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (Cyprinidae). *Ichthyol Res*, 48, 369-378 (2001b)
- 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)