

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)—

Genetic Analysis of Japanese Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (5)

—Genetic Monitoring of Some East Kagawa Populations (2)—

吉田 美紀 池田 滋*
Miki YOSHIDA Shigeru IKEDA

要旨

東讃地域は、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。9か所のため池についてミトコンドリア DNA の nested PCR-RFLP 分析を行い、ニッポンバラタナゴが生息していることを確認した。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 PCR-RFLP 分析 遺伝子モニタリング

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。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¹⁾されている。香川県の東讃地域はニッポンバラタナゴの重要な生息地である。

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¹⁾²⁾である。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³⁾⁴⁾⁵⁾。

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年に行った mtDNA の PCR-RFLP 分析による遺伝子モニタリングの結果は既に報告している⁵⁾⁶⁾。2010年に、それまでに遺伝子モニタリングを行ったことのない8か所のため池を中心に採取されたサンプル個体について、nested PCR を利用した遺伝子モニタリングを行ったので報告する。

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 検体の採取

2010年8月から9月にかけてモンドリを用いて採取した。検体は、その場にて氷で凍らせ、DNA の抽出まで冷凍保存(-20℃)した。

表1に調査地点の概要を示す。1調査地点あたり10個体を分析に供した。なお、ニッポンバラタナゴ保護の観点から、調査ため池の詳細は明らかにできない。比較のために、大阪府のため池のニッポンバラタナゴと霞ヶ浦のタイリクバラタナゴを各1個体ずつ供した。

表1 調査ため池の概要

所在地	調査ため池数	サンプル数
春日川以西2	1	10
新川2	1	10
鴨部川1	4	40
鴨部川2	3	30
合計	9	90

2 PCR-RFLP 分析

(1) 核酸の抽出

凍結保存したニッポンバラタナゴ個体より、DNeasy Tissue Kit(QIAGEN)を用いて、核酸を抽出した。抽出した核酸溶液は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

(2) D-loop 領域およびND1 領域のPCR増幅

0.2U の Taq DNA Polymerase (Takara), 1×Takara PCRBuffer (Mg²⁺ free), 2mM MgCl₂, 各 200 μM の dNTPs, 各 0.4 μM のプライマー (表 2), および鋳型 DNA (<50ng) を含む PCR 反応液 (全量 10 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, 50°C-1 分, 72°C-2 分) の後, 最終加熱 (72°C-7 分) を行った。

(3) Nested PCR

ニッポンバラタナゴ香川個体群には, mtDNA の D-loop 領域を *Msp* I または *Scr* FI で切断した場合と ND1 領域を *Hae* III または *Mbo* I で切断した場合に PCR-RFLP が検出される。また mtDNA の D-loop 領域を *Eco* RI で切断した場合, ニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴの間に PCR-RFLP が存在する。それらの多型をもたらす制限酵素切断部位を, ニッポンバラタナゴの mtDNA 塩基配列 (GenBank, AB070205.1) に基づき特定し, 特定された制限酵素切断部位を挟む 4 種類の nested PCR プライマーセットを Primer 3 を利用して設計した (表 2)。

D-loop 領域および ND1 領域の PCR 増幅産物の各 1/100 を鋳型として, PCR 反応液 (0.2U の Taq DNA Polymerase (GeneScript), 1×PCR Buffer (GeneScript), 各 200 μM の dNTPs, 各 0.4 μM のプライマー) に加え, 全量 6 μl とした。各 2 種類の nested PCR を行い (95°C-5 分, 30 サイクル[94°C-15 秒, 56°C-15 秒, 72°C-30 秒], 72°C-7 分), 合計 4 種類 (Dloop-E, Dloop-MS, ND1-M, および ND1-H) の nested PCR 産物を得た。

(4) 制限酵素処理

Dloop-E を *Eco* RI で, Dloop-MS を *Msp* I または *Scr* FI で, ND1-M を *Mbo* I で, および ND1-H 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) に 1U/反応となるよう制限酵素を加えた反応液 4 μl に nested PCR 産物 6 μl を加え, 37°C で 1 時間反応させた。ローディングバッファーを加えた後, 4% ポリアクリルアミドゲル (0.01% Gel Green と 0.45M Glycerol を含む) で電気泳動し, 蛍光 (励起波長 490nm, 検出波長 520nm) 検出し, 分子量マーカールと比較して制限酵素断片長を求めた。

III 結果および考察

調査した 9ヶ所のため池の mtDNA の nested PCR-RFLP 分析結果を表 3 に示す。なお, 同一ため池の 10 サンプル個体の間に多型は認められなかった。

Kawamura ら⁴⁾によれば, D-loop 領域の PCR 産物を *Eco* RI 切断して得られる PCR-RFLP パターンは, 中華人民共和国および大韓民国で採取されたタイリクバラタナゴと日本国内で採取されたニッポンバラタナゴで異なる。Nested PCR 産物 Dloop-E の *Eco* RI 切断パターンは, 表 3 のように, 香川県内 9ヶ所のため池のサンプル個体と大阪のニッポンバラタナゴは一致し, いずれもタイリクバラタナゴとは異なった。したがって, 香川県 9ヶ所のため池からの 90 個体のサンプルの mtDNA ハプロタイプはすべてタイリクバラタナゴ型ではないと考えられる。

Nested PCR 産物 ND1-M の *Mbo* I 切断パターンは, Nested PCR 産物 Dloop-E の *Eco* RI 切断パターンと同様に, ニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴで異なり, 亜種判別の mtDNA マーカーとして利用できることが明らかになった。

ため池 Ksn3 のニッポンバラタナゴサンプルは, 2001 年, 2006 年に引続き, mtDNA ハプロタイプ A であった。

表 2 PCR プライマーセット

プライマーセット	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
D-loop 領域用プライマーセット ⁷⁾	CACATCCAGCCAGAAGATATTT	TAATCCCAGTTTGTTCCTTAGC	2003bp
ND1 領域用プライマーセット	ACCCCGGTTTACCAAAAACAT	GGTATGAGCCCGATAGCTTA	2011bp
Dloop-E 用プライマーセット	CCCGTCACCCAATTCTTATTT	ATTATATTGTTGCGCCTGCAC	956bp
Dloop-MS 用プライマーセット	GTTAATCACCGGGCAATTT	ACGAGTTTTACCGGCCCTAT	442bp
ND1-M 用プライマーセット	CCTAGTACGAAAGGATCGGAAA	TGCTAAATGTTTGCAGGGTGTA	712bp
ND1-H 用プライマーセット	GGCTGAGCATCTAACTGAAAT	ATATTTGCGTATTCGGCTAGGA	335bp

表3 2010年に採取された香川個体群の分析結果

ため池		Nested PCR 産物					香川個体群の mtDNA ハプロタイプ ⁵⁾
名前	所在地	Dloop-E <i>EcoRI</i> パターン	Dloop-MS <i>MspI</i> パターン <i>ScrFI</i> パターン		ND1-M <i>MboI</i> パターン	ND1-H <i>HaeIII</i> パターン	
Kks2	春日川以西 2		283bp, 137bp	293bp, 150bp	505bp, 138bp, 53bp, 16bp	277bp, 39bp	A
Ksn3	新川 2						
Kkb7							
Kkb8	鴨部川 1	956bp	420bp	443bp	643bp, 53bp, 16bp	245bp, 39bp, 32bp	B
Kkb9							
Kkb10							
Kkb11							
Kkb12	鴨部川 2		283bp, 137bp	293bp, 150bp	505bp, 138bp, 53bp, 16bp	277bp, 39bp	A
Kkb13							
ニッポンバラタナゴ (大阪府)		956bp	283bp, 137bp	293bp, 150bp	505bp, 138bp, 53bp, 16bp	277bp, 39bp	
タイリクバラタナゴ (霞ヶ浦)		324bp, 632bp	283bp, 137bp	293bp, 150bp	615bp, 53bp, 28bp, 16bp	245bp, 39bp, 32bp	

2006年には新川流域のため池でタイリクバラタナゴが初めて確認されたので、2006年以前にmtDNAハプロタイプを調べたKsn3以外のため池についても、mtDNAハプロタイプの異なる個体の混入がないか、定期的にモニターすることが重要である。

Ksn3を除く8ヶ所のため池は2010年に初めてサンプリングが行われた。mtDNAハプロタイプとため池所在地との関連を見ると、鴨部川よりも西にある春日川西2のため池および鴨部川2の3ヶ所のため池のサンプルはすべてmtDNAハプロタイプA、一方、鴨部川1の4ヶ所のため池のサンプルはすべてmtDNAハプロタイプBであった。東讃地域に分布するニッポンバラタナゴのmtDNAハプロタイプの全体像を見るために、Kawamuraらによる1995年のmtDNAのPCR-RFLP分析結果、2001年と2006年に行ったmtDNAのPCR-RFLP分析結果、および本結果をあわせて表4に示した。新川以西および鴨部川2のため池のニッポンバラタナゴはmtDNAハプロタイプA、鴨部川1のため池のニッポンバラタナゴはmtDNAハプロタイプBと、mtDNAハプロタイプとため池所在地の間には密接な関係があると考えられる。

これまでKawamuraらのPCR-RFLP法を用いて、ニッポンバラタナゴ香川個体群のmtDNA遺伝子モニタリングを行ってきた。しかし、KawamuraらのPCR-RFLP法の場合、

得られるバンド数が多く、ミニアガロースゲルやマイクロチップ電気泳動装置を利用した電気泳動では必ずしも良好な結果が得られない。本報告のnested PCR法の場合、表5のように、得られる制限酵素断片が少なく、断片鎖長の差が大きいため、分解能の低いバンド検出法を用いても香川個体群のmtDNAハプロタイプを明確に区別できると期待される。もちろん、未知のハプロタイプの検出能を犠牲にすることにはなるが、簡便法として有用である。

ところで、nested PCR産物Dloop-MSの*MspI*切断パターンと*ScrFI*切断パターンが2ハプロタイプ間で異なるのは、ともに160番目付近(GenBank, AB070205.1)の塩基配列の違いによると考えられるので、どちらか一方の制限酵素切断を行えばハプロタイプAかBの決定は可能である。

なお、nested PCRプライマーセットを最初から使ってPCR反応を行っても、本結果と同様の制限酵素切断パターンが得られた。しかし、D-loopまたはND1領域の増幅後にnested PCRを行う方が非特異的増幅産物が少なくなるばかりでなく、長期保存による劣化の進んだDNAを鋳型にしても良好な制限酵素切断パターンが得られた。

表4 香川個体群のハプロタイプ構成

ため池	所在地	ハプロタイプ構成の経年変化			
		1995*	2001	2006	2010
Ktk1	春日川以西1	A	A	A	
Kks1	春日川以西2	A	A	A	
Kks2					A
Ksn1	新川1		A	A	
—		A			埋立
Ksn2		A		A	
Ksn3	新川2		A	A	A
Ksn4			採捕できず	A・Roo	
Ksn5	新川3	A	A	A	
Ksn6		A		A	
Kkb1	鴨部川1		B		
Kkb2		B	B	B	
Kkb7					B
Kkb8					B
Kkb9					B
Kkb10					B
—		A			
Kkb3		A	A		
Kkb4		A	A	A	
—		A			
Kkb11	鴨部川2				A
Kkb12					A
Kkb13					A
Kkb5		鴨部川3	B	B	
Kkb6			B		B
Ksd1	志度	B	B	B	
—		B			
Ktd1	津田川1		A・B	A・B	
Ktd2			B	B	
Ktd3		B	B	B	
Ktd4		A		A・B	
—		A			
Ktd5	津田川2	B	B	B	

*Kawamura ら³⁾

表5 Nested PCR-RFLP および PCR-RFLP 法の比較

PCR 産物	制限酵素	ニッポンバラタナゴ香川個体群の mtDNA ハプロタイプ		タイリクバラタナゴ	
		A	B		
Nested PCR-RFLP	D1oop-E	<i>Eco</i> RI	956bp	632bp, 324bp	
	D1oop-MS	<i>Msp</i> I	283bp, 137bp	283bp, 137bp	
		<i>Sca</i> FI	283bp, 149bp, 11bp	432bp, 11bp	283bp, 149bp, 11bp
	ND1-H	<i>Hae</i> III	277bp, 39bp	245bp, 39bp, 32bp	245bp, 39bp, 32bp
	ND1-M	<i>Mbo</i> I	505bp, 138bp, 53bp, 16bp	643bp, 53bp, 16bp	615bp, 53bp, 28bp, 16bp
D-loop 領域	<i>Eco</i> RI	1310bp, 450bp, 290bp		830bp, 480bp, 450bp, 290bp	
	<i>Msp</i> I	1000bp, 350bp, 280bp, 140bp,	1000bp, 420bp, 350bp, 100bp, 60bp	1000bp, 350bp, 280bp, 140bp,	
		100bp, 60bp		100bp, 60bp	
PCR-RFLP*	<i>Hae</i> III	750bp, 610bp, 290bp, 160bp, 110bp,	610bp, 500bp, 290bp, 250bp, 160bp,	データなし	
		100bp	110bp, 100bp		
	ND1 領域	<i>Mbo</i> I	650bp, 510bp, 240bp, 200bp, 120bp,	データなし	
		80bp	100bp, 80bp		

* 制限断片サイズは Kawamura らによる。80bp 未満のフラグメントは省略。

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年に引き続き、2010年、それまでに遺伝子モニタリングを行ったことのない8ヶ所のため池を中心に採取されたサンプル個体について、nested PCR を利用した遺伝子モニタリングを行った。サンプル個体の 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。ニッポンバラタナゴの mtDNA ハプロタイプの結果は、2006年までの遺伝子モニタリング結果と考え合わせると、東讃地域のニッポンバラタナゴの mtDNA ハプロタイプと生息ため池所在地との間に密接な関係があることを示した。

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, Nagata, Ohtaka, Kanoh, Kitamura: Genetic

diversity in the Japanese rosy bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus*

(Cyprinidae). Ichthyol Res, **48**, 369-378 (2001)

- 4) 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)
- 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) - 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)
- 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) - 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)
- 7) 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) - マイクロサテライトマーカーによる亜種判別の可能性 -, 香川県環境保健研究センター所報, **6**, 23-28 (2007)

Abstract

East Kagawa area provides rare habitats for Japanese rose bitterling (*Rhodeus ocellatus kurumeus*), which is a critically endangered freshwater fish in Japan. We performed nested PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA to identify haplotypes in fish samples from nine ponds in East Kagawa. The results showed that all fish samples have mitochondrial haplotypes of *R. o. kurumeus*. A periodic genetic monitoring of East Kagawa populations of *R. o. kurumeus* is indispensable for protection of their habitats.