

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—

Genetic Analysis of Japanese Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (4)—Genetic Monitoring of *R. o. kurumeus* in Kagawa prefecture—

白井 康子*1 池田 滋*2
Yasuko SHIRAI Shigeru IKEDA

要 旨

東讃地域は、絶滅危惧 IA 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。ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 分析によりニッポンバラタナゴ香川個体群の遺伝子モニタリングを 2006 年に行った。その結果、1ヶ所のニッポンバラタナゴ生息地で新たにタイリクバラタナゴの生存が確認された。ニッポンバラタナゴ保護の観点から 5 年ごとのモニタリングは不十分である。

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小型淡水魚で、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貴重な生息地である。

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、外見では判別が困難^{1) 2)}である。そのため、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の PCR-RFLP 分析を用いた亜種判別が行われている^{3) 4) 5)}。

2001 年、2006 年に mtDNA の PCR-RFLP による遺伝子モニタリングを行ってきた。2001 年の結果については既に報告している⁵⁾。ここでは、2006 年の結果について報告する。

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。

池 17ヶ所(2001 年と重複しない 5ヶ所が含まれる)で 165 個体を、モンドリまたは玉網を用い採取した。検体はバケツで持ち帰るか、あるいは現場で氷で絞め、DNA の抽出まで冷凍保存(-40℃)した。

表 1 に調査地点の概要を示す。表では調査地点を水系内の地理的分布からグループに分けた。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。原則として 1 調査地点あたり 10 個体を目安に分析に供した。

表 1 調査ため池の概要

所在地域	グループ数	調査ため池数	分析個体数
春日川以西	2	2	20
新川流域	3	6	60
鴨部川流域	3	3	30
志度地区	1	1	10
津田川流域	2	5	45
	11	17	165

II 方法

1 検体の採取

2006 年 10 月に、香川県内のニッポンバラタナゴ分布

2 PCR-RFLP 分析

凍結保存したニッポンバラタナゴ個体より、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) で DNA を抽出した。抽出した DNA

*1 香川県小豆総合事務所環境森林課

*2 香川大学総合生命科学研究センター

溶液は吸光度計で濃度を測定, 併せて純度を確認した。

(1) ND1, D-loop 領域の PCR 増幅

mtDNA のND1 領域用プライマー(5'-ACCCCGGTTACCAAAA ACAT-3', 5'-GGYATGAGCCCGATAGCTTA-3')³⁾ 及び D-loop 領域用プライマー(5'-CACATCCAGCCAGAAGATATTT-3', 5'-TAATCCAGTTTGTCTTAGC-3')を⁷⁾用いて PCR を行った。0.2mℓ PCR 用サンプルチューブに, PCR 反応液 10 μℓ あたり, 10ng テンプレート DNA, 0.2units Taq DNA Polymerase (NEB), 各 250 μM dNTP, 各 0.4 μM PCR プライマー, 20mM Tris-HCl (pH8.8), 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100 を調製した。表2 に PCR 条件を示す。

表2 PCR条件

PCR 装置	Touchgene Gradient (TECHNE)
	Palm Cycler (CORBETT RESERCH)
温度条件	95°C-5分
	98°C-10秒, 50°C-1分, 72°C-2分, 30 サイクル
	72°C-7分

(2) 制限酵素処理

PCR 増幅産物 1 μℓ を 10/9 倍濃縮制限酵素反応液 9 μℓ に加え, 37°C で 1 時間反応させた。使用した制限酵素の種類等を表3に示す。mtDNA の D-loop 領域の増幅産物を Eco RI 処理することにより, 検体の mtDNA がタイリクバラタナゴ型かニッポンバラタナゴ型か半別できる⁴⁾。他の制限酵素 (*Dde*I, *Hae*III, *Msp*I) 処理によって香川県産ニッポンバラタナゴのハプロタイプが明らかになる³⁾。アガロースゲル電気泳動バンドの検出にはマイクロチップ電気泳動装置 (日立 SV1210) を用いた。

表3 香川個体群の PCR-RFLP バンドパターン

PCR 産物	制限酵素	認識配列	バンドパターン	フラグメント数
ND1	<i>Dde</i> I	C▼TNAG GANT▲C	a	7
		GG▼CC CC▲GG	a b	6 7
	<i>Eco</i> R I	G▼AATTC CTTAA▲G	a	3
D-loop	<i>Msp</i> I	C▼CGG GGC▲C	a b	6 5

III 結果及び考察

1 PCR-RFLP 多型について

表4に各池の個体の制限酵素分解パターン及び池ごとのハプロタイプ構成を示す。なお, 1995年のハプロタイプ構成については Kawamura ら³⁾の結果に基づいた。

2006年の遺伝子モニタリング結果はそれ以前の結果と Ktd4 を除き一致していた。Ktd4 では, 2001年はハプロタイプ A のみが検出されたが, 2006年はハプロタイプ B も検出された。サンプリング個体数が少ないためか, ハプロタイプ B 個体に移入したためかは不明である。また, Ksn4 では2個体からタイリクバラタナゴ型の mtDNA が検出された。2001年の遺伝子モニタリングの際に Ksn4 では個体を採捕できなかったことから, それ以前のため池改修工事によりいったん絶滅した後に, ニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴが導入された可能性が考えられる。

新川水系のため池のニッポンバラタナゴはすべてハプロタイプ A であった。また, 新川の西に位置する春日川以西の2つのため池の個体もすべてハプロタイプ A であった。しかし, 新川水系の東に位置する鴨部川水系ではハプロタイプ A の個体のみの池とハプロタイプ B の個体のみの池が混在していた。さらに鴨部川の東に位置する津田川水系では, 2001年に Ktd1 で, 2006年に Ktd1 と Ktd4 で2つのハプロタイプの個体の共存が確認された。1995年 (Kawamura ら³⁾) から2006年の結果をあわせて考えると, 津田川水系のため池グループ1 (Ktd1~4) では, ため池が近接しており, もともと異なるハプロタイプの個体が生存していたため池の間での人為的な移動に伴って, 2つのハプロタイプの個体が共存するため池が生じた可能性が考えられる。この点, 鴨部川水系のため池 (Kkb2, 4, 6) は離れており, 人為的な移動がないため, 2つのハプロタイプの個体が共存することがないと考えられる。

IV まとめ

1995, 2001, 2006年の3カ年のモニタリング結果を比較すると, ミトコンドリア DNA ハプロタイプで見たニッポンバラタナゴの分布に大きな変化は認められなかった。しかし2006年には2つのため池でそれまでとは異なる遺伝子モニタリング結果が認められた。ニッポンバラタナゴ保護の観点から5年ごとのモニタリングは不十分であることは確かである。すでに東讃地域河川へのタイリク

表4 香川個体群のPCR-RFLPパターンとハプロタイプ構成

所在地域	グループ*1	ため池	2006年の遺伝子モニタリング							ハプロタイプ*2構成の 経年変化		
			PCR-RFLPパターン				ハプロタイプ構成(%)			1995*3	2001	2006
			D-loop		ND1		Rok		Roo			
			<i>EcoRI</i> *2	<i>MspI</i>	<i>DdeI</i>	<i>HaeIII</i>	A	B				
春日川以西	1	Ktk1	Rok	a	a	a	100	—	—	A	A	A
	2	Kks1	Rok	a	a	a	100	—	—	A	A	A
新川流域	1	Ksn1	Rok	a	a	a	100	—	—		A	A
		—								A		
	2	Ksn2	Rok	a	a	a	100	—	—	A		A
		Ksn3	Rok	a	a	a	100	—	—		A	A
		Ksn4	Rok	a	a	a	80	—	20		採捕 できず	A・Roo
			Roo	—	—	—						
3	Ksn5	Rok	a	a	a	100		—	A	A	A	
	Ksn6	Rok	a	a	a	100	—	—	A		A	
鴨部川流域	1	Kkb1									B	
		Kkb2	Rok	b	a	b	—	100	—	B	B	B
	2	—								A		
		Kkb3								A	A	
		Kkb4	Rok	a	a	a	100	—	—	A	A	A
			—								A	
3	Kkb5								B	B		
	Kkb6	Rok	b	a	b	—	100	—	B		B	
志度地区	1	Ksd1	Rok	b	a	b	—	100	—	B	B	B
		—								B		
津田川流域	1	Ktd1	Rok	a	a	a	70	30	—		A・B	A・B
			Rok	b	a	b						
		Ktd2	Rok	b	a	b	—	100	—		B	B
		Ktd3	Rok	b	a	b	—	100	—	B	B	B
		Ktd4	Rok	a	a	a	80	20	—	A		A・B
			Rok	b	a	b						
—									A			
2	Ktd5	Rok	a	a	a	100	—	—	B	B	B	

*1 ; 水系内地理的分布によるグループ

*2 ; Rok=ニッポンバラタナゴ型, Roo=タイリクバラタナゴ型。また, ハプロタイプA及びBはKawamuraら³⁾のmt6及びmt7。*3 ; Kawamuraら³⁾

バラタナゴの侵入も確認されている⁸⁾。ニッポンバラタナゴが生息するため池へのタイリクバラタナゴの新たな侵入を捉えるには、モニタリング頻度を高め、サンプリング地点やサンプリング個体数を増やすことにより遺伝子モニタリングの精度を上げることがきわめて重要である。また、ため池の水管理の記録を完全に掌握することも重要である。

謝辞

これまでの研究は多くの方々の協力と支えによる成果である。関わってくださった方々に心より感謝申し上げる。これらの成果が今後のニッポンバラタナゴの保護に資することを願ってやまない。

文献

- 1) 生物多様性情報システム http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f3.html
- 2) 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) Hall, Nawrocki: A rapid method for detecting mitochondrial DNA variation in the brown trout, *Salmo trutta*. J Fish Biol, **46**, 360-364 (1995)
- 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)
- 8) 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, **7**, 48-53 (2008)

Abstract

East Kagawa area harbors important habitats of Japanese rose bitterling (*Rhodeus ocellatus kurumeus*), which is a critically endangered freshwater fish in Japan. In the standpoint of conservation of *R. o. kurumeus*, its Kagawa population was genetically monitored by PCR-RFLP of mitochondrial DNA in 2006. Two individuals of *R. o. ocellatus* were newly found to be present in a pond habitat of *R. o. kurumeus*. Genetic monitoring every 5 years is insufficient for the early detection of the introgression of *R. o. ocellatus*.