

DNA によるニッポンバラタナゴと タイリクバラタナゴの識別

大井 和之*

1. はじめに

ニッポンバラタナゴ (*Rhodeus ocellatus kurumeus*) は近畿、四国、九州地方の限られた場所に生息している絶滅危惧種である。一方、1940年代に利根川で初めて確認された外来種のタイリクバラタナゴ (*Rhodeus ocellatus ocellatus*) は、観賞用に流通していることもあり、各地で野生化している。この2つは亜種の関係で容易に交雑するため、在来種の保全の観点から問題となっている。

ニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴは、本来、側線有孔鱗数や腹鰭前縁の白条で形態的に識別できる。しかし、タイリクバラタナゴが侵入した河川では交雑により中間的な個体も出現し、形態による識別が困難になっている。このように形態での区別が難しい生物の分類同定に、最近では DNA の分析による種の判定が行われるようになった。

バラタナゴ類の DNA 分析は 10 年以上前に方法が確立された。河村ら^{1), 2)} は各地のバラタナゴ類について、PCR 法で増やしたミトコンドリア DNA の一部領域を制限酵素で処理し、電気泳動のバンドパターンを比較 (PCR-RFLP) することにより、ニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴを判別した。また、Miyake ら³⁾ は、同じミトコンドリア DNA の別の領域の塩基配列を決定し、配列間の相違 (塩基置換) の数によって類縁関係を推定する分子系統解析により、両亜種を判別した。

DNA 分析を用いたニッポンバラタナゴ生息地の調査も行われている。北部九州では、三宅ら⁴⁾ が 46 地点から採集した 696 個体について形態と PCR-

RFLP により両亜種を判別し、福岡県東部や長崎県などではタイリクバラタナゴが定着しているのに対し、福岡県筑後地方、佐賀県ではニッポンバラタナゴの純系が多く残っていることを報告している。

福岡県や佐賀県を調査地とする水路改修時の環境保全対策検討のような業務において、対象地に生息するバラタナゴ類が貴重な在来種であるかどうかを判定した上で保全対策を検討することが求められている。当協会でも、DNA 分析を実施してニッポンバラタナゴの生息地にタイリクバラタナゴが侵入しているかどうか判定している。また、PCR-RFLP と分



図1 ニッポンバラタナゴ(上)とタイリクバラタナゴ(下)

* (財)九州環境管理協会 環境部 環境技術課 研究員

表 1 PCR の条件 (制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析)

領域名	プライマー	温度条件	備考
Dloop	DloopFv2 (CACATTAAGCCAGAATGATATTT)	94°C5分+	ミトコンドリア DNA 上の <i>cyt b</i> 遺伝子・12S
	DloopR (TAATCCCAGTTTGTTCCTTAGC)	(94°C30 秒-49°C30 秒- 72°C2分) × 30 回+	rRNA 遺伝子間の変異の多い領域、2.05kb
		72°C7分	プライマーDloopFv2 は白井ら ⁴⁾ を改変
ND1	ND1F (ACCCCGCCTGTTTACCAAAAACAT)	95°C5分+	ミトコンドリア DNA 上の 16S rRNA 遺伝
	ND1R (GGTATGAGCCCGATAGCTTA)	(95°C30 秒-50°C1 分- 72°C2分) × 40 回+	子・tRNA-Met 遺伝子間の NADH1 遺伝子
		72°C7分	を含む領域、2.03kb プライマーは白井ら ⁵⁾ による

子系統解析により、人為的な移入を検出するための地域型の判定に取り組んでいる。

2. 材料と方法

2.1 DNA 抽出

標本は形態の計測を行ったのち、DNA 抽出を確実にを行うために凍結または 99% エタノールで固定して保存した。標本の右側体側の背びれの下部分の筋肉を 1 ~ 10mg 切り取り、QIAGEN 社の DNeasy Blood & Tissue kit を用いて、1 個体ごとに DNA を抽出した。DNA 抽出の過程の概略は以下の通りである。

- (1) 筋肉細胞を界面活性剤とタンパク質分解酵素によって溶かし、DNA を含む溶液とした。
- (2) この溶液にアルコールなどを混ぜてシリカメンブレンフィルターに通し、DNA をフィルターに捕捉して、ほかの不純物を除去した。
- (3) シリカメンブレンフィルターに吸着した DNA は、洗浄したのち、アルコールを含まない水で溶かしだして、DNA 溶液とした。

2.2 PCR-RFLP

河村ら^{1), 2)} は DLoop 領域と ND1 領域について多くの制限酵素でバンドパターンのバリエーションを調査している。その中から、三宅ら⁴⁾ はタイリクバラタナゴ型とニッポンバラタナゴ型を識別する方法として、ミトコンドリアの DLoop 領域を *EcoRI* という制限酵素で切断し、アガロースゲルで電気泳動して断片長を分析する方法を採用している。また、白井ら⁵⁾ はニッポンバラタナゴ型の中でもいくつ

表 2 制限酵素処理

領域名	制限酵素	認識配列	処理条件
Dloop	<i>EcoRI</i>	5'...GAATTC...3' 3'...CTTAAG...5'	37°C60分
	<i>ScrFI</i>	5'...CCN [↓] GG...3' 3'...GGN [↓] CC...5'	37°C60分
ND1	<i>DdeI</i>	5'...CTNAG...3' 3'...GANTC...5'	37°C60分
	<i>ScrFI</i>	5'...CCN [↓] GG...3' 3'...GGN [↓] CC...5'	37°C60分
	<i>HaeIII</i>	5'...GG [↓] CC...3' 3'...CCG [↓] G...5'	37°C60分

かのタイプに分けることができるものの 1 つとして ND1 領域を *HaeIII* という制限酵素で切断する方法を用いている。白井ら⁵⁾ の報告によれば、ND1 領域を *HaeIII* で切断した場合のタイリクバラタナゴ型のバンドパターンはニッポンバラタナゴ型とは異なり、両亜種の識別が可能である。

ニッポンバラタナゴは、北部九州の他に四国、近畿地方にも分布しているが、これらの地域型については、河村ら²⁾ で DLoop 領域を *ScrFI* という制限酵素で切断したもの、ND1 領域を *DdeI*, *ScrFI* などで切断したもののバンドパターンにより識別可能であることを示している。

当協会では、DLoop 領域の PCR 産物を *EcoRI* と *ScrFI*, ND1 領域を *DdeI*, *ScrFI*, *HaeIII* で切断する制限酵素断片長多型分析 (PCR-RFLP) を実施した。分析手順は以下の通りである。

- (1) 抽出した DNA を鋳型として表 1 の通り、PCR 法による DNA 増幅を行った。
- (2) PCR 増幅した DNA 断片を表 2 の通り、制限

酵素により処理した。反応液は各制限酵素に添付のバッファーで調製し、PCR産物を約200ngになるよう混合して10 μ lとした。

- (3) 制限酵素処理を行った反応液を、0.5 \times TBEバッファー・4% NuSieve 3:1 アガロースゲルまたは2% Takara LO3 アガロースゲルを用い、Mupid-exU 電気泳動装置で100Vの電圧で泳動した。泳動時間は想定される断片の長さにより40～80分間に設定した。
- (4) 電気泳動後のアガロースゲルはエチジウムブロマイドで染色し、紫外線を照射して写真撮影した。

2.3 DNA配列分析

PCR-RFLPでは限られた塩基配列の違いのみを検出しているため、塩基配列の相違の数から系統関係を推定することはできない。分子系統解析を行うために、Miyakeら⁵⁾の方法に従い、ミトコンドリアDNA上のシトクロムb遺伝子の一部領域の塩基配列を決定した。分析手順は以下の通りである。

- (1) 試料から抽出したDNA (PCR-RFLPに使用したものと同じ) を鋳型として、表3の通り、PCR法によるDNA増幅を行った。
- (2) PCR産物はQIAGEN社のQIAquick PCR purification kitを用い、キットの説明書に従って精製した。
- (3) 精製PCR産物20ngを6.4pmolのプライマー(L14327v2またはH14780v2のいずれか)と混合して全量を14 μ lとした。
- (4) 蛍光標識ddNTPを含む反応液を添加してサイクルシーケンス反応を行い、ABI 3730シーケンサーで塩基配列を読んだ。
- (5) 配列データはBioEditソフトウェアを用いて、読み始めの不安定な部分やプライマー部分の配列を除いて、シトクロムb遺伝子の部分塩基配列を決定した。
- (6) NCBI Genbankからダウンロードしたバラタナゴ類 (*Rhodeus* 属) のシトクロムb遺伝子配列と分析対象の塩基配列を、BioEditの

Clustal Wソフトウェアにより整列 (アライメント) した。

- (7) 整列した配列はMEGAソフトウェアを用いて、最節約法により系統樹を作成した。

3. 結果

3.1 電気泳動パターンの解析

PCR-RFLPの電気泳動像を図1に示した。プライマー配列を1つ改変 (DloopFv2) した結果PCR増幅は良好で、いずれのサンプルでもはっきりとした泳動像を得ることができた (図2)。表4に示すように、分析した5つの組み合わせでは、どの領域と制限酵素の組み合わせにおいても、ニッポンバラタナゴ型 (Rok) とタイリクバラタナゴ型 (Roo) を識別することができた。

河村ら⁵⁾によると、北部九州のニッポンバラタナゴは本分析と同様のバンドパターンを示し、当協会で分析した福岡県及び長崎県の標本からは、近畿型、四国型ニッポンバラタナゴのバンドパターンは出現しなかった。

3.2 分子系統解析

標本のDNAから得られたシトクロムb遺伝子部分塩基配列と、DNA配列データベース (米国NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) からダウンロードした塩基配列とをあわせて、系統解析ソフトウェアMEGAを用いて分子系統解析を行った。分子系統解析の方法には、2つの配列間の塩基置換の数を距離とみなし、各配列間の距離行列からクラスター分析を行って樹形を得る距離法、ある系統関係を仮定したときに塩基置換数が最小となる樹形を探索する最節約法などがある。シトクロムb遺伝子によるバラタナゴ類の分子系統樹の例として、最節約法による系統樹を図3に示す。系統樹上では、ニッポンバラタナゴ型とタイリクバラタナゴ型が別のまとまり (クラスター) となる。標本のDNAから得られた塩基配列が分子系統解析の結果どちらのクラスターに属するかによって、ニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴを判別することができた。

表3 PCRの条件 (DNA 配列分析)

領域名	プライマー	温度条件	備考
cyt b	L14327v2	94°C1分+	ミトコンドリア DNA 上のシトクロム b 遺伝子の 425 塩基を含む領域。プライマーはミトコンドリアゲノム全配列 AB070205 をもとに設計。
	(AGACTAACGATTTGAAGAACCATCGTTG)	(94°C30秒-52°C45秒-	
	H14780v2	72°C45秒) × 30回+	
	(GCTCCTCAAAATGATATTTGTCCTCA)	72°C 2分30秒	

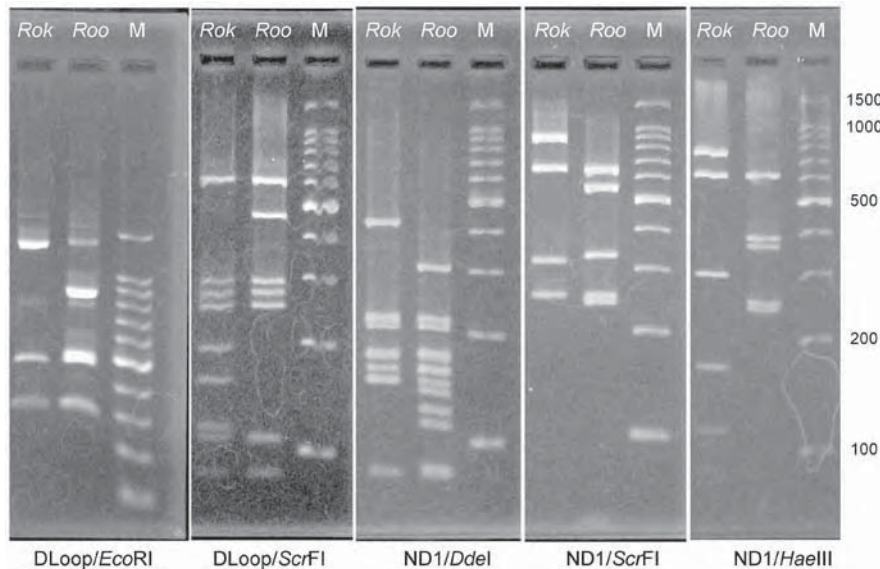


図2 PCR-RFLP 電気泳動像

Rok: ニッポンバラタナゴ, Roo: タイリクバラタナゴ, M: DNA 断片長マーカ (100bp ラダー)

表4 DNA 断片長パターン

Dloop/Eco RI		Dloop/Scr FI		ND1/Dde I		ND1/Scr FI		ND1/Hae III	
Rok	Roo	Rok	Roo	Rok	Roo	Rok	Roo	Rok	Roo
1310		600	600	440		850		750	
	830		460		310	620	620	610	610
	480	290	290	210	210		530		400
450	450	270	270	210	210		320		390
290	290	240	240	170	170	300		290	
		200		160	160	260	260		250
		150		140	140		250		250
		110			130				160
					110				
		100	100	80	80			100	
(1) A	(1) B	(1) B	(1) A	-	(5) Roo2	(2) A	(2) B	(2) A	(5) Roo1

数字はDNA断片の長さ(塩基対)。

パターン記号A,B,Roo1,Roo2は文献にあわせた。(1)河村ら(2001a),(2)河村ら(2001b),(5)白井ら(2008)。

Rok: *Rhodeus ocellatus kurumeus* ニッポンバラタナゴ, Roo: *Rhodeus ocellatus ocellatus* タイリクバラタナゴ

シトクロム b 遺伝子の解析では、ニッポンバラタナゴ型とタイリクバラタナゴ型の間では 10 ~ 13 個の塩基が置換しているのに対し、ニッポンバラタナゴ型の中では 0 ~ 5 塩基の置換しかない。このうちほかのニッポンバラタナゴ型の配列との置換が 4 ~ 5 個と多い、DNA データベース登録番号 AB033737 のものは赤坂御所で系統保存されている大阪府八尾市産とされており、近畿型のものと考えられ

る。バラタナゴ類のシトクロム b 遺伝子塩基配列は近畿型はこの 1 例しか報告されておらず、四国型の報告はないため、系統解析からは地域型の判別は難しい。ただし系統樹上で下線で示した当協会の福岡及び長崎産の分析配列は、佐賀県など北部九州産の個体の配列データにより近く、北部九州型と考えられる。

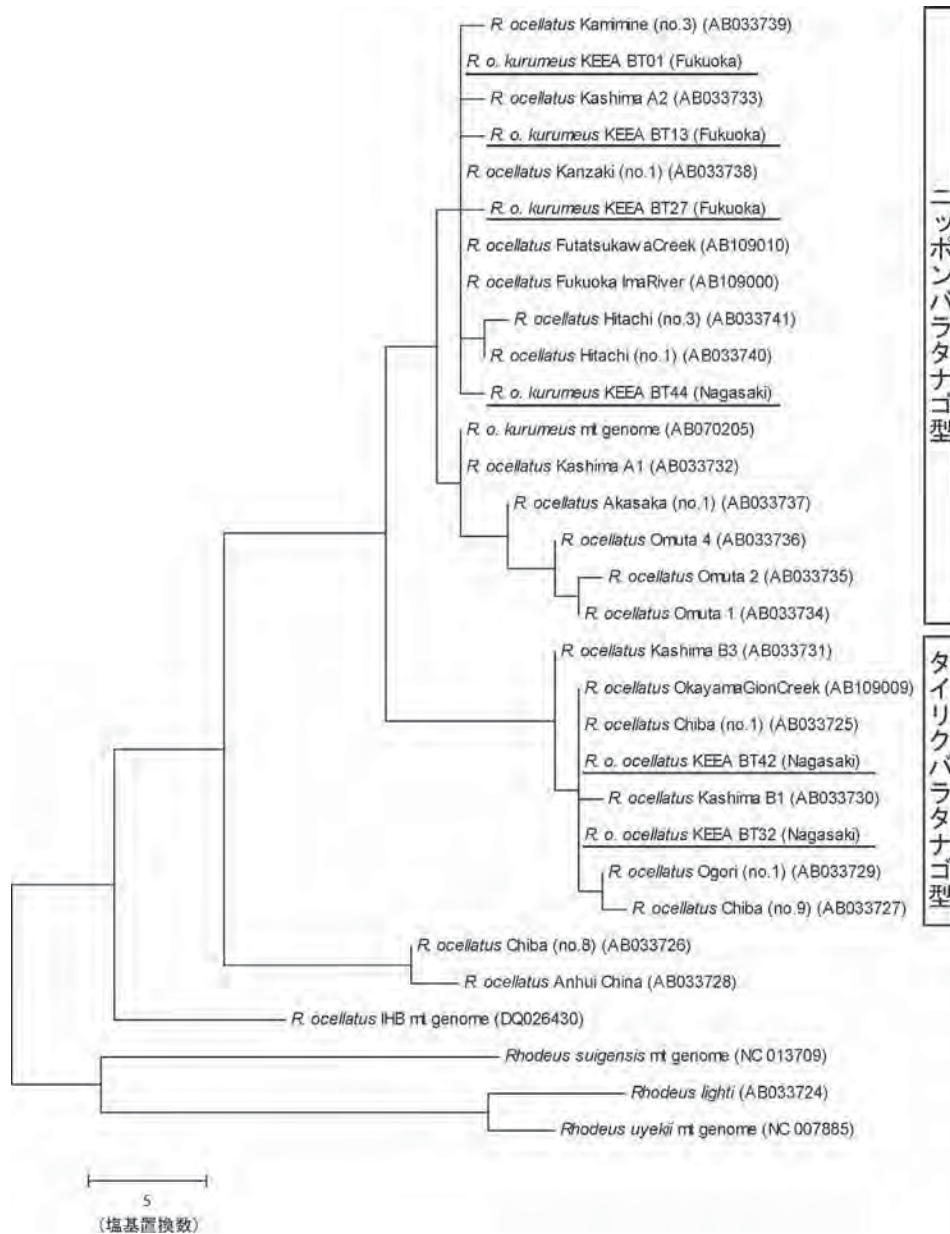


図3 巴拉タナゴ類のシトクロム b 遺伝子配列による分子系統樹

4. 考察

ニッポンバラタナゴの生息地では、タイリクバラタナゴとの交雑が問題となっており、各地域で DNA の分析がなされている (近畿:河村⁶⁾, 三宅ら⁷⁾, 四国:白井ら^{5),8),9),10)}, 九州:三宅ら⁴⁾)。これらの調査では、ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP が、細胞核の遺伝子に比べて分析が容易であるため広く利用されている。ミトコンドリア DNA は母親由来の遺伝子であるため個体レベルでは交雑を検出できないが、複数個体を調べることにより調査地のバラタナゴ集団が交雑しているかどうかを判断できる。ミトコンドリアは母親から子どもへ伝わるが、ニッポンバラタ

ナゴとタイリクバラタナゴは特に雌雄の別なく交雑すると考えられており、交雑が起きている集団ではタイリクバラタナゴ型のミトコンドリアを持つ個体が出現する。一方、父親と母親から 1 組ずつ子どもに伝わる細胞核の DNA は、交雑 1 世代目は必ずニッポンバラタナゴ型とタイリクバラタナゴ型の遺伝子を両方もつ (ヘテロ) になるが、交雑 2 世代目以降は片親の型の遺伝子だけをもつ (ホモ) 確率が半分ある。核遺伝子を分析してヘテロでなかったからといって交雑を否定することはできない。ミトコンドリア遺伝子でも核遺伝子でも複数個体の遺伝子を分析し、タイリクバラタナゴ型が出現するかどうか

侵入の判定基準になる。

また、近畿の集団を調査した三宅ら⁷⁾では核遺伝子の分析も行われているが、ミトコンドリア DNA でタイリクバラタナゴ型が出現していない集団で核 DNA でタイリクバラタナゴ型が出現したという例はなく、ミトコンドリア DNA の分析で十分タイリクバラタナゴの侵入が検出できている。

1つの地域集団の調査に際しては、純系のニッポンバラタナゴが生息している地域では20個体を目安にDNA分析を実施している。交雑が起こっている集団では10個体の分析でもタイリクバラタナゴ型のDNAをもつ個体が出現しており、20個体という数はタイリクバラタナゴの分布拡大を監視するのに十分な個体数と考えられる。分析コストを低減しつつ、タイリクバラタナゴの侵入をいち早く発見し、ニッポンバラタナゴ純系の系統保存などの保全対策に結びつけていきたいと考えている。

5. おわりに

これまで形態では識別が困難であったニッポンバラタナゴとタイリクバラタナゴの交雑状況について、DNA分析により識別できるようになった。国内移入も含めて移入種の問題は形態では識別できない場合も多く、DNA分析が有力な手法となっている。当協会でも様々な生物を対象にDNA分析を実施していくことにしている。

引用文献

- 1) K. Kawamura, et al. Genetic Introgression by the Rose Bitterling, *Rhodeus ocellatus ocellatus*, into the Japanese Rose Bitterling, *R. o. kurumeus* (Teleostei: Cyprinidae) Zoological Science 18: 1027–1039 (2001a)
- 2) K. Kawamura, et al. Genetic diversity in the Japanese rosy bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (Cyprinidae) Ichthyol Res 48: 369–378 (2001b)
- 3) K. Miyake, et al. Genetic variation of the cytochrome b gene in the rosy bitterling,

Rhodeus ocellatus (Cyprinidae) in Japan Ichthyol Res 48: 105–110 (2001)

- 4) 三宅琢也, 中島淳, 鬼倉徳雄, 古丸明, 河村功一 — ミトコンドリア DNAと形態から見た九州地方におけるニッポンバラタナゴの分布の現状 日本水産学会誌 74: 1060-1067 (2008)
- 5) 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)
- 6) Kouichi Kawamura — Low genetic variation and inbreeding depression in small isolated populations of Japanese rosy bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* Zoological Science 22: 517-524 (2005)
- 7) 三宅琢也, 河村功一, 細谷和海, 岡崎登志夫, 北川忠生 — 奈良県内で確認されたニッポンバラタナゴ 魚類学雑誌 54: 139-148
- 8) 白井康子, 藤野恵美, 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)
- 9) 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)
- 10) 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: 33–36 (2009)

ソフトウェア

BioEdit <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>
MEGA <http://www.megasoftware.net/>