

RAPD 分析によるアブラハヤ、タカハヤおよび交雑個体の判別方法の開発 Development of identification method between *Rhynchocypris lagoskii*, *R. oxycephalus* and hybrid using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

○西田一也^{*}、^{**}・小出水規行^{*}・皆川明子^{***}・渡部恵司^{*}・森 淳^{*}・竹村武士^{*}
Nishida, K., Koizumi, N., Minagawa A., Watabe, K., Mori, A. and Takemura, T.

1. はじめに

タカハヤは西日本に分布する淡水魚であるが、近年、自然分布域外である関東地方の河川や水田地帯において本種が確認されており（樋口・渡辺，2005；大塚ら，2006；西田，2010），侵入実態を把握する必要がある。しかし、東日本の河川では近縁種のアブラハヤが自然分布しており、タカハヤとの判別が難しい場合がある。また、両種の間には交雑が生じる場合があるが、従来のミトコンドリア DNA (mtDNA) の分析や分類形質から交雑個体を判別することは難しい場合がある。そこで本研究では両種および交雑個体の判別に有効かつ簡便な方法を開発するため、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 分析による判別を試みた。

2. 研究方法

(1) サンプリングおよび従来法による種判別 国内の 7 地点において採集した個体のうち、各地点 8 個体の計 56 個体を分析に供した（表 1）。計数可能な大きさの個体について、側線上方横列鱗数 (TRa) を計数した。多くの場合 TRa は、タカハヤでは 18 以下、アブラハヤでは 20 以上とされる（細谷，2000）。次に、各個体の腹鰭の一部から DNA を抽出し、mtDNA D-loop の解析によって、各個体のハプロタイプ（遺伝子の種類）を把握した。以上の 2 つの方法により両種を判別した。

(2) RAPD 分析 各個体の DNA について、オペロン社製 RAPD10mer kit の A1~20 をプライマーとしてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR 産物を 2% TBE アガロースゲルで 50 分、135V で電気泳動して両種の判別に利用可能なプライマーを探索した。利用可能なプライマーによる PCR 産物の電気泳動のバンドパターンを比較することで、両種および交雑個体に特徴的なバンドを把握した。

表 1 サンプリング地点とサンプルの特徴

3. 結果と考察

(1) TRa と mtDNA のハプロタイプ 1 個体を除けば、TRa とハプロタイプによる判別結果は一致した。地点 FM で採集された 1 個体 (FM2) は、TRa ではタカハヤ (TRa =17)、ハ

Table 1 Sampling locations and characteristic of specimens

地点	地名・水系	アブラハヤ	タカハヤ	Hybrid
IY	岩手県奥州市・北上川	✓(8)		
Y	東京都国立市・多摩川	✓(5)	✓(3)※移殖	
TC	東京都国立市・多摩川	✓(8)		
SR	静岡県浜松市・天竜川	✓(4)	✓(4)	
FM	福井県南越前町・九頭竜川	✓(4)	✓(3)	✓(1)
HA	広島県広島市・瀬野川		✓(8)	
SD	佐賀県吉野ヶ里町・筑後川		✓(8)	

*農研機構 農村工学研究所 (Institute for Rural Engineering, NARO), **日本学術振興会 (Japanese Society for Promotion of Science) ***滋賀県立大学 (University of Shiga Prefecture)

キーワード：タカハヤ、アブラハヤ、RAPD 分析、交雑、近縁種、保全遺伝

プロタイプではアブラハヤと判別されたことから、交雑個体と判断された。

(2) RAPD プライマーの探索
 プライマー A1, 4~8, 10~12, 14~20 では一部または全てのサンプルにおいてバンドは得られなかった。プライマー A2, 3, 9 では全てのサンプルにおいてバンドが得られたが、そのバンドパターンから両種を判別することはできなかった。プライマー A13 では両種の間で異なるバンドパターンが得られた。

(3) バンドパターンの比較
 アブラハヤでは 350bp 付近にバンドが得られたのに対して、タカハヤでは得られなかった (図 1)。アブラハヤ単独分布域、または両種の共存域では、それぞれの種でバンドパターンが類

似したが (図 2)、タカハヤ単独分布域ではバンドパターンがやや多様であった。

両種の交雑個体と判断された個体 FM2 では、全体的なバンドパターンは同じサンプリング地点のタカハヤと類似したが (図 2)、アブラハヤと同様、350bp 付近にバンドが得られた。なお、同地点においてアブラハヤのみに得られた 1600bp 付近のバンドも確認された。以上のことから、350bp 付近のバンドの有無および全体的なバンドパターンの比較によって両種および交雑個体を判別できると考えられた。

4. まとめ

本研究における RAPD 分析によるアブラハヤ・タカハヤの判別結果は、従来の mtDNA 分析および分類形質 (TRa) による判別結果と一致し、RAPD 分析によって両種および交雑個体を判別できることが示された。今後は、サンプルを増やすことや、他のプライマーを探索することなどにより、本方法の確度を高めていくことが課題としてあげられる。

【引用文献】 1) 樋口文夫, 渡辺勝敏 (2005), 魚類学雑誌, 52(1): 41-46. 2) 大塚ちかこ, 佐藤玄, 磯崎剛大, 杉松幹夫, 松田宗男 (2006), 杏林大学研究報告 教養部門, 23: 23-31. 3) 西田一也 (2010), とうきゅう環境浄化財団助成研究報告書, 39(288). 4) 細谷和海 (2000) 日本産魚類検索第 2 版, 東海大学出版会, 253-271.

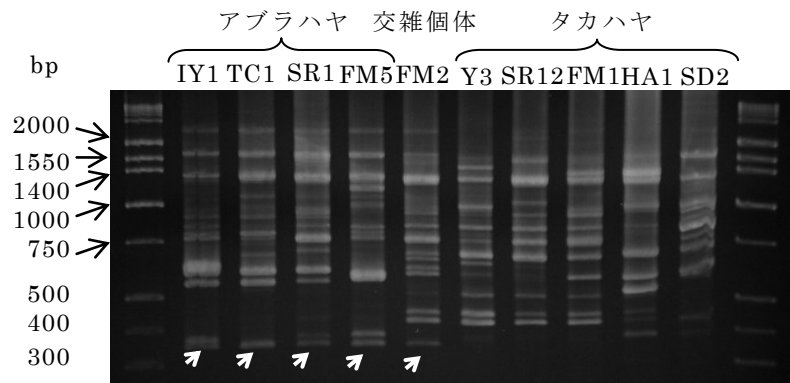


図 1 RAPD 分析によるアブラハヤ, タカハヤ, 交雑個体のバンドパターン

Fig.1 Electrophoretic patterns of RAPD in *R. lagoskii*, *R. oxycephalus* and hybrid

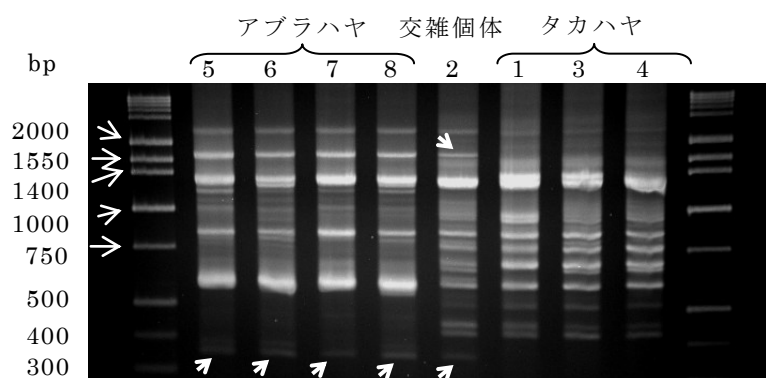


図 2 RAPD 分析による共存水域 (FM) のアブラハヤ (5-8), タカハヤ (1, 3, 4), 交雑個体 (2) のバンドパターン

Fig.2 Electrophoretic patterns of RAPD in *R. lagoskii*, *R. oxycephalus* and hybrid in coexistence water area