

河川底生動物の DNA 多型解析による地域間交流の推定

東北大学大学院 正会員○熊谷幸博, 大村達夫
東北大学大学院 学生員 小川原享志, 渡辺幸三

1. はじめに

DNA多型とは遺伝子レベルでの個体間差異であり, このDNA多型による地域間の類似性を調べることで, 生物群集の交流を推定できる. 本研究では, 底生動物の地域間交流の推定は広域的視点による河川生態系の保全に貢献すると考え, 宮城県の名取川水系に分布する底生動物の DNA 多型の調査, 解析を行った.

2. 実験方法

2-1. サンプルング方法

底生動物のサンプルングは名取川水系の2つの河川(広瀬川, 名取川)を対象に行われた. サンプルング地点は図1に示すように広瀬川で6地点, 名取川で5地点, 計11地点である. DNA多型解析は, ほとんどの地点において多数の個体がサンプルングされたウルマーシマトビケラ (*Hydropsyche ulmeri*) およびオオヤマカワゲラ (*Ovamia aibba* Klapálek)を対象に行われた.

2-2. DNA 抽出

エタノール中に保存されたサンプルを取り出し, 保存液を十分に切った上で, 0.5mlのHMWバッファー中で, そのサンプルをよくすり潰した. その後, 10%SDS, 10mg/mlプロテイナーゼK溶液をそれぞれ5 μ lずつ入れ, タンパク質の分解を行い, その後DNAのフェノール抽出を行った. 遠心分離 (10,000 $\times g$, 10min, 20 $^{\circ}$ C) 後, 水層のみをピペットで回収し, DNAのエタノール沈澱を行った. その後, -80 $^{\circ}$ Cで15分間冷却することでDNAの析出能を高め, 遠心分離 (10,000 $\times g$, 10min, 20 $^{\circ}$ C) を行い, DNAのペレットを得た. 残存フェノールや余分な低分子成分などを取り除くために, このペレットを70%エタノールでリンスし, 乾燥させた. 乾燥させたペレットはTEでDNAを溶解することによりサンプルDNAとし, 以後の実験に用いた.

2-3. PCR法による抽出DNAの増幅

サンプルDNA に対して特異性の低い塩基数の短いプライマーを用いたPCR法を行うと, 長さの異なる複数のDNA断片が得られる. この増幅断片のパターンは個体ごとに異なるため, この違いから個体群のDNA多型を評価することができる. この方法はRAPD法¹⁾と呼ばれている. 本研究はプライマーとしてオペロン社のRAPD用Kits A(10塩基)のうち, ウルマーシマトビケラにはA-11, オオヤマカワゲラにはA-13を用いた.

2-4. 電気泳動法による増幅DNAの分離

増幅されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動法を用いて断片の長さごとに分離した. 分離ゲル濃度は1.5%とし, 染色にはエチジウムブロマイドを使用した. 分離後のDNA増幅断片は紫外線を照射することによって検出した.

3. 実験結果

実験結果の一部を写真1, 写真2に示す. ここで, 写真1では, (a)は分子量マーカー, (b)~(h)は図1中のSt.3で採取されたウルマーシマトビケラ1個体ごとのDNA増幅断片である. また同様に, 写真2では, (A)は分子量マーカー, (B)~(H)は図1中のSt.5で採取されたオオヤマカワゲラ1個体ごとのDNA増幅断片である.

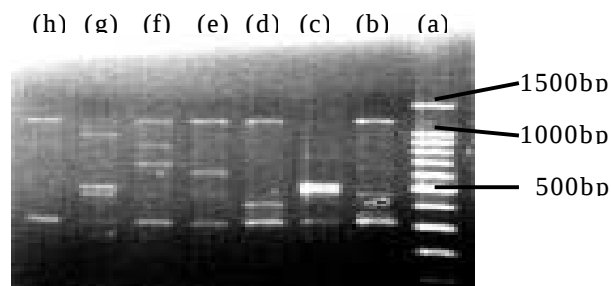


写真1 St.3で採取したウルマーシマトビケラのDNA多型結果

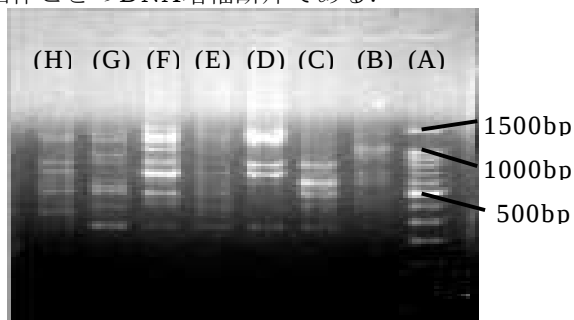


写真2 St.5で採取したオオヤマカワゲラのDNA多型結果

key words : DNA polymorphism, migration, between population similarity, cluster analysis

〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06 TEL022-217-7483 FAX022-217-7482

4. DNA 多型解析手法

2つのサンプリング地点に生息する個体群間の遺伝子類似度を表す集団間類似度(S_{ij})を以下の式によって算出する.

$$S_{ij} = 1 + S'_{ij} - \frac{S_i + S_j}{2}$$

S_i, S_j : 集団*i, j*の集団内類似度
 S'_{ij} : 集団*i, j*からランダムに10通り選択した個体間類似度の平均値

ここで、個体間類似度とは、個体群内の遺伝子がどの程度類似しているかを表し、その個体間類似度の平均値が集団内類似度である。ここで算出される集団間類似度とは、離れた場所に生息する個体群の交流の程度を推定するために有効な指標である。また、集団間類似度の値を利用して、近隣結合法によるクラスター分析を行い、サンプリング地点を分類し、底生動物の地域間交流を視覚的に捉えた。

5. 結果と考察

ウルマーシマトビケラの集団間類似度に基づくクラスター分析結果の地理的な関係を図2に示す。この結果から、Aグループ (St.1)、Bグループ (St.2,7,8,9)、Cグループ (St.4,5)、Dグループ (St.6,10,11) と4つのグループに分類されていることがわかる。AグループはSt.1のみで構成されているグループであり、St.1は他のサンプリング地点との交流が乏しいため、孤立したグループとなっている。Bグループは異なる2河川でのサンプリング地点がグループ化されており、2つの河川由来の遺伝子が混合していると推測される。また、底生動物は下流方向に流されやすいという性質から、上流域での遺伝子混合は、下流に多様な遺伝子を持った個体を供給することになるため、Bグループは名取川水系の遺伝子多様性を保つうえで重要なグループと判断される。また、Cグループは流下方向で類似した関係が見られ、Dグループ周辺は都市化が進んだ地域であるため、人間活動によるストレスに耐性のある遺伝子を持った個体が構成するグループであると推測される。

オオヤマカワゲラの集団間類似度に基づくクラスター分析結果の地理的な関係を図3に示す。この結果から、それぞれの河川ごとにグループ化されていることがわかる。底生動物の移動特性からカワゲラ目は、成虫後の飛翔力は劣ると言われており、異なる河川間での羽化後の陸上による交流よりも、同一河川の流下方向での水を介した交流が示されたこの結果は妥当であると言える。

以上の2つの結果を比較してみると、ウルマーシマトビケラの交流では、異なる河川間での交流が見られるため、2河川の間における交流を妨げてしまう人工構造物の建設、または人間活動による光、音等による影響に注意を払わなければならない。一方、オオヤマカワゲラの場合、同一河川の流下方向での交流が顕著であったため、これらの影響は、同一河川の上流から下流に渡って水辺環境が大きく改変されない限り、それほど大きくは表れないことが推測される。

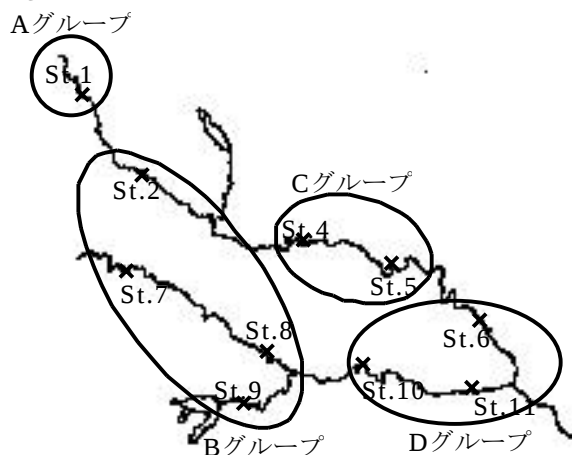


図2 ウルマーシマトビケラの地域間交流の様子

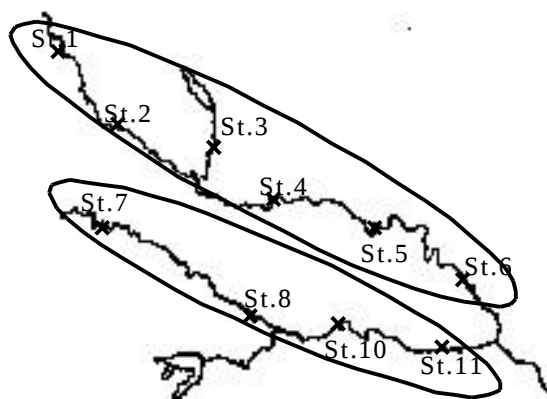


図3 オオヤマカワゲラの地域間交流の様子

6. おわりに

本研究では、生物群集の地域間交流の推定を行った。しかしながら、今回はウルマーシマトビケラおよびオオヤマカワゲラの地域間交流の様子を把握するにとどまった。今後、より良い評価を行っていくには、DNA多型解析の対象とする底生動物の種数の拡大と複数のプライマーの併用を検討していく必要がある。

7. 参考文献

- 1) H.Hadrys, M.Balick and B.Schierwater, Molecular Ecology, Vol.1, pp.55-63, 1992.
- 2) F.Bardakci and D.O.F.Skibinski, The Genetical Society of Great Britain, Vol.73, pp.117-123, 1994
- 3) 根井正利, 分子進化遺伝学, 培風館, pp.378, 1990.