

ダムによる河川分断化に伴う遺伝的分化の影響評価を目的としたヒゲナガカワトビケラ地域個体群のRAPD解析

東北大学大学院工学研究科 学生員 ○渡辺幸三, 山本直樹, 御簾納洋平
東北大学大学院工学研究科 正会員 大村達夫

1 はじめに

遺伝子流動（地域間の遺伝子の移動）は地域個体群の遺伝的多様性を維持するために重要な役割を果たしている¹⁾。生息地が分断された地域間では遺伝子流動が低下し、遺伝的分化が起きる可能性がある。生息地分断化と遺伝的分化の関係を明らかにする必要がある。本研究では、ダムにより生息地が分断されたヒゲナガカワトビケラ(*Stenopsyche marmorata*)の遺伝子構造をRAPD解析によって調査し、以下の3つの仮説を実験的に検証することを目的とした。

仮説1 ダム上下流の地域個体群間で遺伝的分化が起きている。

仮説2 ダム湖の湛水面積が大きいほど遺伝的分化の程度は大きい

仮説3 ダム上下流の地域個体群の遺伝的多様性は低下している。

2 方法

2.1 調査地点

湛水面積が大きく異なる6つのダム湖を調査対象として選定した（図1a, 図1b）。それぞれのダムにおいて、調査はダム湖の上下流地点とそれに並行する分断されていない河川(コントロール河川)の上下流の計4地点で行った（図1c）。コントロール河川は対象河川と同規模の河川を選び、調査地点の標高、調査地点間の標高差及び河川距離を対象河川の状態に極力近付けた。いずれのダム湖も流入及び流出する河川は1本ずつであり、コントロール河川において調査地点間に流入する支流はない。

2.2 対象種

ヒゲナガカワトビケラ(*S. marmorata*)の幼虫は川の流れにより流下し、成虫は産卵のために遡上飛行をする。1世代での飛行距離は3km程度²⁾であり、東北地方では2化性の生活環が報告されている。

2.3 調査方法

平瀬で浮き石になっている場所において、RAPD解析を行うのに十分な個体数(30個体以上)を確保できるまで、キックネット法による幼虫の採集を繰り返し行った。採集した個体は、実験室に持ち帰った後70%エタノールで固定し、実体顕微鏡を用いて同定した。

2.4 実験方法

2.4.1 DNA抽出

幼虫の細胞組織のみをピンセットを用いて取り出し、0.5mlのHMWバッファー中でよくすり潰した。その後10%SDS、プロテイナーゼK溶液をそれぞれ5 μ lずつ入れ、55°Cで30分間インキュベートした。その後

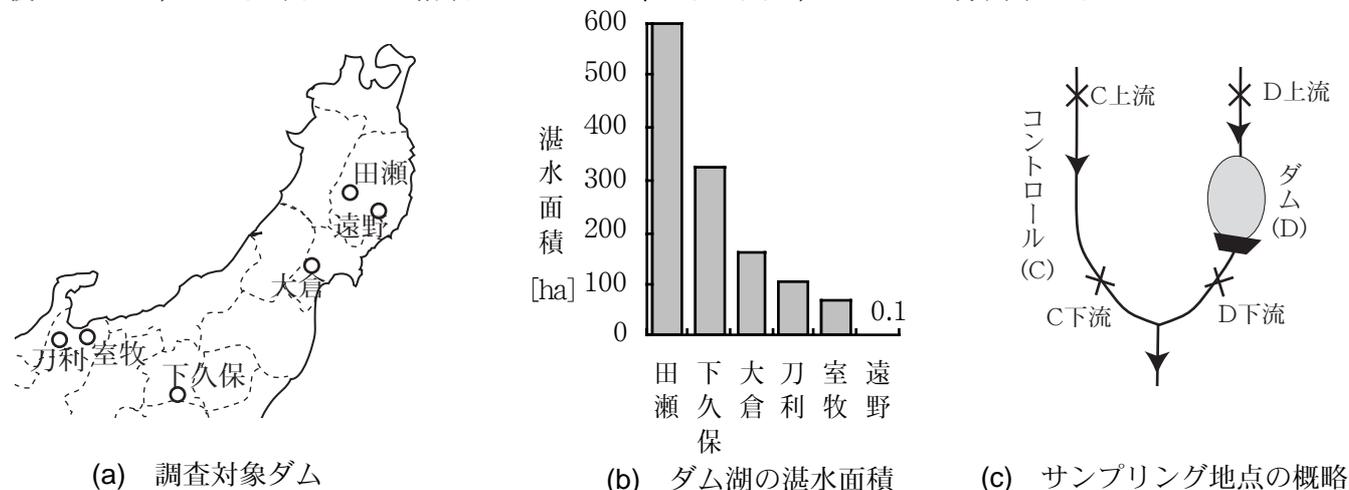


図1 調査地点の概要

Key words：底生動物 生息地分断化，RAPD，DNA多型，遺伝距離，遺伝的多様性

〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉06 TEL 022-217-7483 FAX 022-217-7482

表1 RAPDに用いたプライマーの塩基配列

プライマー	配列(5' to 3')
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG

TE 飽和フェノール，TE 飽和フェノールと CIA の混合液で DNA を抽出し，エタノール沈殿により DNA のペレットを得た．このペレットを適量の TE に溶解させ，サンプル DNA とした．

2.4.2 RAPD 法及び電気泳動

表2に示す5種類のプライマーを使用し，RAPD法によりPCR反応を行った．PCRで増幅されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により分離した．アガロース濃度は1.5%とし，染色にはエチジウムブロマイドを使用した．電気泳動の結果の例を写真1に示す．

2.5 解析

2.5.1 バンドパターンの定量化

電気泳動法によって得られたバンドパターンを，増幅断片が検出された場合を1，検出されなかった場合を0とすることにより，1-0 データとして定量化した．

2.5.2 個体間類似度(S_{xy})

任意の二個体間(個体xと個体y)の遺伝的な類似性を表す指標である個体間類似度(S_{xy})を計算した．この計算式は $S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$ で与えられる．ここで， n_{xy} は個体x，yが共有している断片の数， n_x ， n_y は個体x，yの総断片数をそれぞれ表す．

2.5.3 集団間類似度 S_{ij}

集団間類似度 S_{ij} は，異なる地域に生息する集団iと集団jと間の遺伝的類似性を表す指標である．集団iと集団jの個体の組み合わせ全てで算出された個体間類似度の算術平均で与えられる．遺伝距離 $D_{ij} = 1 - S_{ij}$ は，集団iとjの遺伝子構造の違いを表す指標である．

2.5.4 集団内類似度

集団内類似度(S_i)は個体群内における遺伝子の類似性を表す．集団i内の2個体の組み合わせ全てで算出した個体間類似度の算術平均で与えられる．遺伝子多様度 $D_i = 1 - S_i$ で定義される．

3 結果

全調査地点において，RAPD多型が検出された．ダムの上流と下流における，電気泳動法によって得られたバンドパターンの一例を図2に示す．本研究で使用した5つのプライマー全てにおいて，非常に多くのバンド(遺伝子座)が検出され，それらの多くは多型遺伝子座であった．従って，ダムによる遺伝的分化の影響を示すために十分な実験データが得られたと言える．

4 参考文献

- 1) 鷺谷いづみ，矢原徹一：保全生態学入門，文一総合出版，2000
- 2) 水野信彦，御勢久右衛門：河川の生態学，築地書院，1973
- 3) 西村登：ニッポンヒゲナガカワトビケラの生態学的研究 5. 成虫の遡上飛行，1981
- 4) 青谷晃吉，横山宣雄：東北地方におけるヒゲナガカワトビケラ属2種の生活環について，1987
- 5) F.Bardacki and D.O.F.Skibinski：Application of the RAPD technique in tilapia fish:species and subspecies identification, The Genetical Society of Great Britain Vol.73, 1994
- 6) 根井正利：分子進化遺伝学，培風館，1990

M (a) (b)(c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) (k) (l) (m)(n)(o) M

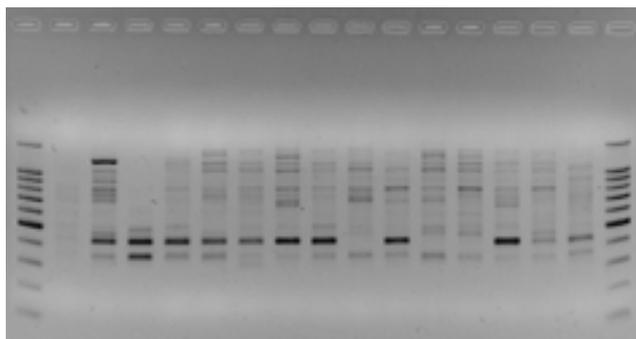


写真1 RAPD法で検出されたDNA多型の例．両端Mは分子量マーカー。(a)～(o)は大倉ダムの15個体のDNA増幅断片(プライマー：OPA-01)。