

AFLP 法を用いた造網型トビケラ 2 種の地域個体群の 遺伝的多様性の流域内分布に関する研究

東北大学大学院工学研究科 学生員 草野 光

東北大学大学院工学研究科 正会員 〇渡辺 幸三

東北大学大学院工学研究科 正会員 大村 達夫

1. はじめに

遺伝的多様性とは 1 種個体群内における個体間の遺伝的なバラエティーである。遺伝的多様性は生息環境や集団サイズなどに影響されて変化することが予想される。ある生物について遺伝的多様性の地理的分布を調べることににより、対象とした生物を遺伝的に良好に保つ生息環境を遺伝的に評価できる。

造網型トビケラは、標高、流速等の河川環境の違いにより、流域内で異なる個体群密度を形成する。本研究では、東京都多摩川において、AFLP (Amplified Length Polymorphism)法を用い、造網型トビケラのウルマーシマトビケラ、コガタシマトビケラの 2 種の地域個体群の遺伝的多様性の流域内分布を調べた。

2. 方法

2-1. サンプリング

調査は 2005 年 11 月に、多摩川本川の上流から下流にかけての 4 地点と支流である平井川と秋川の 2 地点で行った（図 1）。サンプリングは瀬の中からランダムに選んだ 5 ヶ所において、定量サンプリング (0.09m² サーバーサンプル) と DNA 多型解析に十分な量のサンプルを確保するため定性的なキックネットサンプリングを行った。

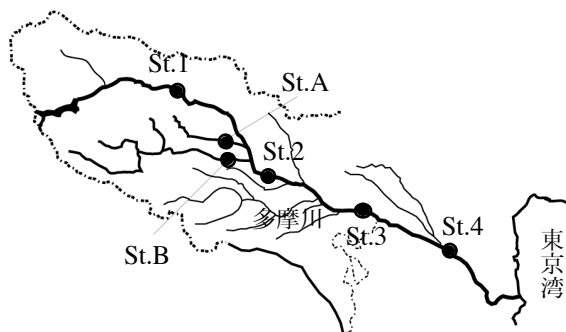


図 1 調査地点図。多摩川本川の上流から下流にかけて st.1 から st.4, 支流の平井川, 秋川をそれぞれ st.A, st.B とする。

2-2. AFLP による DNA 多型検出

AFLP 法は DNA を制限酵素で断片化し、その中から特定の断片を選択的に PCR 増幅して多型を検出する技術である¹⁾。フェノール抽出したサンプル DNA を制限酵素 EcoRI, MseI を用いて切断し, T4 DNA Ligase を用いて、切断面に 10 塩基の塩基配列を持つアダプターを取り付けた。そこで得られた DNA 断片を解析可能な数に絞り込むために、付加されたアダプターにマッチし、さらに 1 塩基付加した配列のプレセレクトティブプライマーを用いてプレセレクトティブ PCR 反応を行った。その後、プレセレクトティブプライマーに 2 塩基付加した配列のセレクトティブプライマーを用いてセレクトティブ PCR 反応を行い、さらに断片数を絞り込んだ。EcoRI 側, MseI 側のセレクトティブプライマーの組み合わせとして、AFLP™ Plant Mapping Kit の 64 通りのプライマーペアの中から、ランダムに選んだ数個体で実際に増幅し多型を多く検出した EcoRI (ACA) / Mse (CAC), EcoRI (ACG) / Mse (CTT), EcoRI (AAC) / Mse (CAG) の 3 組を選択した。このとき EcoRI 側のセレクトティブプライマーは蛍光標識された FAM [EcoRI (ACA)], JOE [EcoRI (ACG)], NED [EcoRI (AAC)] を用いた。これらの反応は AFLP™ Plant Mapping Kit を用いて行った。そして PCR 反応液を、キャピラリー電気泳動にかけて各断片の解析を行った。

2-3. データ解析

キャピラリー電気泳動で得られた波形パターンをピークの有無から 1-0 データに変換した。同じ分子量のピークを同じ遺伝子座と仮定し、劣性遺伝子頻度 $q_i^2 = n_i / N$ を地点ごとに計算した。ここで q_i はある遺伝子座 i における劣性遺伝子頻度である。 n_i はある地点において、遺伝子座 i でピークが検出されなかったサンプル数、 N はその地点の全サンプル数を表す。また優性遺伝子頻度 p_i は $p_i = 1 - q_i$ から求めた。そして、平均ヘテロ接合度 $H_i = 1 - (p_i^2 + q_i^2)$ を算出して、各地点の遺伝的多様性を評価した。

キーワード 遺伝的多様性, DNA 多型解析, AFLP 法, 流域内分布, 河川底生動物, 造網型トビケラ

連絡先 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06, TEL022-795-7483

3. 結果

AFLP 法によって DNA 断片を増幅したところ、多型の出やすいとされる 0 から 500bp の短い断片において、各地点間に AFLP 波形パターンの違いが見られた（表 1, 図 2）。次に多摩川本川 5 地点、支流 2 地点で平均ヘテロ接合度を算出した（表 2）。ここでウルマーシマトビケラ、コガタシマトビケラ共に多摩川最下流の st.4 において最も低い値を示した。またいずれも上流であるほどヘテロ接合度が高い傾向を示した。支流では、特にコガタシマトビケラの st.B におけるヘテロ接合度が低かった。また現在の相対集団サイズ（現在の個体群密度×川幅）と平均ヘテロ接合度の相関を調べたが 2 種共に有意な相関はなかった。

4. 参考文献

- 1) Vos, P. et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucl acids. Res.*, **23**, 4407-4414
- 2) 根井正利, 分子進化学, 培風閣, pp.153-154, 1990

3) 水生生物調査報告書, 東京都環境局環境評価部, 東京都, 2000-2003

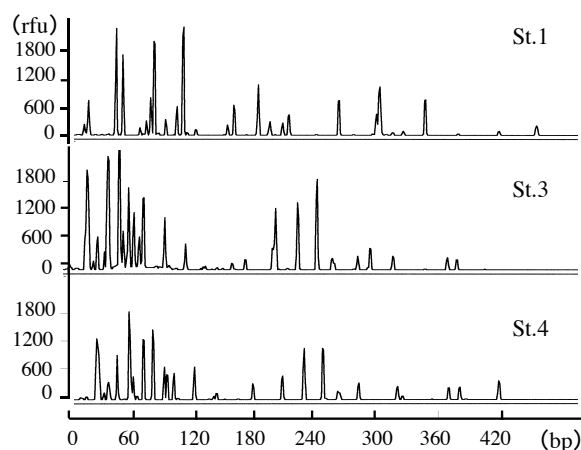


図 2 st.1, st.3, st.4 における AFLP 波形パターン。
縦軸は電気泳動時に検出されるフラグメントの蛍光シグナル強度 (rfu), 横軸はフラグメントの分子量 (bp) を表す。

表 1 全フラグメント数と多型フラグメント数. 全フラグメント数は AFLP 波形データにおいて検出された全フラグメント数. 多型フラグメントは全個体に対するフラグメントが検出された個体数の割合が 5%以上 95%以下のフラグメント。

	プライマー	全フラグメント数	多型フラグメント数	割合 (%)
コガタシマトビケラ	EcoRI(ACA)/MseI(CAC)	300	133	44.3
	EcoRI(ACG)/MseI(CTT)	274	141	51.5
	EcoRI(AAC)/MseI(CAG)	324	160	49.4
ウルマーシマトビケラ	EcoRI(ACA)/MseI(CAC)	309	159	51.5
	EcoRI(ACG)/MseI(CTT)	317	155	48.9
	EcoRI(AAC)/MseI(CAG)	299	157	52.5

表 2 サンプルング地点のデータ. 過去の個体群密度は, 東京都によって調査された個体群密度データを参考に, 本調査と同じ 11 月のデータの平均値とした. st.1, st.2 は 1998 年から 2001 年までと本調査の個体群密度の平均値. st.3, st.4 は 1986 年から 2001 年までと本調査の個体群密度の平均値, st.A. st.B は 1986 年から 1997 年までと本調査の個体群密度の平均値とした。

		単位	st.1	st.2	st.3	st.4	st.A	st.B
コガタシマトビケラ	平均ヘテロ接合度		0.166	0.149	0.155	0.117	0.163	0.110
	個体群密度 (現在)	ind./m ²	6.7	11.1	13.3	0	95.6	6.7
	個体群密度 (過去)	ind./m ²	13.6	812.0	339.2	77.8	1355.8	299.1
	実験サンプル数		16	20	20	10	19	7
ウルマーシマトビケラ	平均ヘテロ接合度		0.198	0.167	0.129	0.117	0.135	0.139
	個体群密度 (現在)	ind./m ²	28.9	15.6	8.9	2.2	35.6	26.7
	個体群密度 (過去)	ind./m ²	118.0	1127.3	8.8	2.7	1064.4	195.1
	実験サンプル数		20	20	17	3	20	20
	標高	m	190	90	30	10	110	100
	河口からの距離	km	66	48	29	19	53	52
	川幅	m	31	37	75	78	18	11
	FPOM	mg/l	0.67	1.51	3.07	2.97	3.62	0.94