

河川水生昆虫ヒゲナガカワトビケラ(*Stenopsyche marmorata*)のマイクロサテライトマーカーの開発と遺伝的多様性の評価

東北大学大学院 学生会員 ○八重樫咲子
 東北大学大学院 正会員 渡辺 幸三
 東北大学大学院 正会員 大村 達夫

1. はじめに

近年、遺伝的多様性の保全は生物多様性保全の観点から重要な課題となっている。しかし、水生昆虫の生物多様性は種多様性の評価にとどまり、遺伝的多様性はあまり評価されていない。個体の人為的移入による地域個体群の遺伝的攪乱、生息地間を繋ぐコリドーの人為的分断等は、集団の遺伝構造を変化させて、生息種の変化や個体数の減少等の生態系の変質を引き起こす可能性がある。したがって、遺伝的多様性、遺伝子流動、遺伝的分化等の遺伝構造の監視が必要と考えられる。そのためには、適切な遺伝マーカーが必要となる。

遺伝マーカーの中で、マイクロサテライトマーカーは超多型 DNA マーカーの一つとして知られる。マイクロサテライト領域は DNA の中で 2~5 塩基の塩基配列が反復して繰り返されている領域である。全ゲノムの中で、(AC)_n や (AG)_n 等の 2 塩基単位の繰り返し配列は 0.5% を占める。これらのマイクロサテライト領域は DNA 複製の際に複製ミスが起きやすいため、領域内の繰り返し回数に変異が起きやすい。したがって、同じ種内の個体間でも反復回数が大きく変化しやすい。マイクロサテライト領域を増幅するプライマーを設計して PCR を行うことで、PCR 産物の断片長の違いから、多くのハプロタイプを検出することができる。このため、マイクロサテライトマーカーは超多型 DNA マーカーとして、様々な生物の遺伝研究に活用されている。また、他マーカー（シーケンシング、AFLP 等）と比較して、分析コストが安く、情報量の多い共有性マーカーである点もマイクロサテライトマーカーの長所である。さらに、同じマイクロサテライトマーカーを近縁種へ適用できる場合もある。しかし、これまでに河川生物に対して開発されたマイクロサテライトマーカーは魚類に対するマイクロサテライトマーカーが多数を占める。水生昆虫は河川生態系の指標生物となっているにも関わらず、現在までに水生昆虫でマイクロサテライトマーカーが開発されている種はヨーロッパ産の 3 種に止まり¹⁾²⁾³⁾、日本国内の水生昆虫ではまだない。

以上の背景から、本研究は河川水生昆虫ヒゲナガカ

ワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) のマイクロサテライトマーカーを開発することを目的として行った。ヒゲナガカワトビケラは沖縄を除く日本に広く分布し、一般的に生息密度も高い。また、造網型トビケラであるため、河床の安定した河川では河川生態系内の優先種とされることが多い。さらに成虫の飛翔行動や生存日数など生態の解明が比較的進んでいる種である。したがって、開発されたマーカーを広範囲の調査地点で応用でき、生態学的知見との関連を考察しやすい種である。

2. 方法

宮城県広瀬川牛越橋付近で採取したヒゲナガカワトビケラの幼虫サンプル (n=20) から DNA をフェノール抽出し、エタノール沈殿することにより、個体ごとの DNA を得た。それぞれの個体から 10ng ずつ DNA を回収し、制限酵素 (Sau3AI) 処理することで多数の DNA 断片を得た。アガロースゲル電気泳動をして 300~750bp のサイズの DNA 断片を切り出した。その後、DNA 断片に SAULA プライマー、SAULB プライマーによるアダプターをライゲーションした後、アダプターと相補的な塩基配列を有するプライマーを用いて PCR 増幅をした。次に、Hamond ら⁴⁾の方法に従い、増幅した PCR 産物を用いて、5'-(AC)₁₀-biotin プローブと 5'-(AG)₁₀-biotin プローブを用いたハイブリダイゼーションを行った後、Biotin-Avidin 結合を活用して、TG 配列と TC 配列が繰り返されたマイクロサテライト領域を含む DNA 断片を精製した。精製後、回収された産物を PCR 増幅した。精製した PCR 産物を Vector にライゲーションし、大腸菌を形質転換させることでクローニングした。形成されたコロニーの中から精製した PCR 産物が DNA に組み込まれていると考えられる白色のコロニーから、コロニー同士が結合していないと考えられ、単独でピックアップができる大きなコロニーすべてを選択し、ピックアップした。その後、5'-(AC)₁₀-Digoxigenin (DIG) プローブ、5'-(AG)₁₀-Digoxigenin (DIG) プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションをそれぞれ行い、酵素免疫アッセイおよび酵素により触媒される発色反応による DIG ラベルされた核酸の検出を行った。

Key Words; Microsatellite, ヒゲナガカワトビケラ(*Stenopsyche marmorata*), 遺伝的多様性

連絡先 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 Tel: 022-795-7482 Fax: 022-795-7482

これらの反応を用いて、形成されたコロニーの中から、TG 配列、TC 配列が繰り返されたマイクロサテライト領域を、インサート DNA に含むコロニーを複数スクリーニングした。

スクリーニングによりシグナルの出たコロニーの DNA をコロニーダイレクト PCR し、PCR 産物を鋳型として DNA 塩基配列をシーケンサーで解読した。解読された DNA 配列からマイクロサテライト領域の存在を確認した後、マイクロサテライト領域を PCR 増幅するためのプライマーを設計した。宮城県名取川水系で採取し、プライマー設計には使用されていないヒゲナガカワトビケラの幼虫サンプルの DNA を用いて、PCR が可能な条件を検索した。PCR の条件はアニーリング温度を 10 パターン(T_m (Melting Temperature) 値 -10°C から T_m 値 $+5^{\circ}\text{C}$ まで 5°C 刻み、 T_m 値 $+5^{\circ}\text{C}$ 以上は 1°C 刻み)、プライマー濃度を 5 パターン($0.1\mu\text{M}$ から $0.1\mu\text{M}$ 毎に $0.5\mu\text{M}$ まで)テンプレート DNA 量を 2 パターン(100ng , 200ng)に変動させ、PCR 行った。PCR 産物の電気泳動の結果、予想されるバンド長にバンドが 1 本または 2 本確認された PCR 条件を特異的な PCR が行われているとし、PCR が可能な条件を得た。その後、日本各地(岩手県北上川水系、宮城県名取川水系、群馬県利根川水系、富山県刀利川水系、東京都多摩川水系、京都府淀川水系)で採取したヒゲナガカワトビケラの幼虫サンプル 3 個体ずつ、計 18 個体を用いて PCR を行い、PCR されているかどうかを確認した。さらにこれらの個体を用いて、マイクロサテライト領域が多型を示すことを確認した。

3. 結果

DNA 配列の解析結果より、現在までにヒゲナガカワトビケラの DNA の中から、AC 配列が繰り返されたマイクロサテライト領域を 12 箇所分離することに成功した。表 1 に分離されたマイクロサテライト領域の一例を示した。また、12 箇所のマイクロサテライト領域のうち、3 箇所について PCR が可能な PCR プライマーを開発することに成功した。表 1 にこれまでに設計された PCR プライマーセットの例を示した。これらの PCR プライマーの最適 PCR 条件を得た後、設計したプライマーを用いて日本各地の個体の DNA を PCR 増幅し、PCR の可否を確認した。PCR 増幅されたマイクロサテライト領域の繰り返し数には個体間の変異が見られ、DNA 多型マーカーとしての有用性が高いことが示された。表 1 に今回得られた PCR プライマーの塩基配列を示した。今後、(TG) n 、(TC) n のマイクロサテライト領域を含む DNA 配列の解析を行い、マイクロサテライト領域を増幅するための PCR プライマーの設計し、PCR プライマーとマイクロサテライト領域の特性の解析されることが期待される。

表 1 分離されたマイクロサテライト領域の一例

```

1 C G A A A G C G T C C G A G G C G T T C
21 T G G A C A C T C A A G C G A G T C A A
41 C G G G T A G A A A C A T C C G G A G G
61 G T G A T A T T T T G A T A A A A G C G
81 A G A G A G C G G T G G A A T C G G T G
101 C T G T G G G T C A A A G T C T C G G A
121 G G A T G C G A C C T C G G G A A G A G
141 G A G A C G A G T T G G A C A G C A T
161 T T T T G C G G C G C G G C A G G C G A
181 T G T G T G T G T G T A G A G T A T
201 G C G T G T G T G C G G T G T G T G T G
221 T G T G T G T G T G T T G T G T T A T G
241 T G T A C G C G T G T G C G T G T G C G
261 G C C T A T G T T A G A T A T G G T C
281 A A C G A C A C T T T C G A C A T A G A
301 T G C A A T G C T G A A G G T

```

表 2 設計されたプライマーセットの一例

PCR primer	Pimer の塩基配列
No.	
AC1-1	F: C G A A T G C T G C G A C A G G T C A G T R: T C T A T G C G C T C C C G G A C G A A
AC2	F: C A T A G T A A T G C G G A A G T G C A A C G A R: C C G T C T C A T C C C A C A C C C T T
AC3-2	F: G C A A A T A C A T C G A G A G G G A T G A R: T G T T A T T G C G G T C C C A A C A C
AC3-3	F: A G G T C G G C A T A T C A G C T A C T R: T T A T T G C G G T C C C A A C A C T C
AC3-4	F: G C G A G G A C T T C A A T A G A A T T T A G T A C C R: T G T T A T T G C G G T C C C A A C A C

謝辞

本研究の一部に、国土交通省建設技術研究開発補助金（課題番号 27：流域エコロジカルネットワーク再生による健全な生態系の保全）および科学研究費補助金（特別研究員奨励費 18・4873）を使用した。

参考文献

- 1) Wilcock, H. R., Hildrew, A. G., Nichols, R. A., Bruford, M. W.: Microsatellites for the net-spinning caddisfly *Plectrocnemia conspersa* (Polycentropodidae), *Molecular Ecology Note*, **1**, pp.318-319, 2001
- 2) Williams, H. C., Wilcock, H. R. and Bruford, M. W.: Microsatellite loci for the mayfly *Baetis rhodani* (Baetidae, Ephemeroptera), *Molecular Ecology Note*, **2**, pp.411-412, 2002
- 3) Dawson, D. A. and Wilcock, H. R.: Isolation of polymorphic microsatellite loci in the net-spinning caddisfly, *Polycentropus flavomaculatus* (Polycentropodidae), *Molecular Ecology Note*, **2**, pp.514-517, 2002
- 4) Hammond, R.L., Saccheri, I.K., Ciofi, C., Coote, T., Funk, S.M., McMillan, W.O., Bayes, M.K., Taylor, E. and Bruford, M.W.: Isolation of microsatellite markers in animals, *Molecular Tools for Screening Biodiversity, Plants and Animals*, pp.281-287, Chapman & Hall, London, 1998