

## マイクロサテライトマーカーによるオイカワの生息域の解析

早稲田大学 学生会員 ○小坂 尚史  
 農村工学研究所 正会員 小出水 規行  
 早稲田大学 正会員 榊原 豊

### 1. 背景と目的

著者ら<sup>1)</sup>は先に河川生態系における種の多様性を向上させるために、ライフサイクルリスクアセスメント(LCRA)を提案した。LCRAでは魚類の生息可能性を8つのストレス因子で評価し、その予測精度は8割程度であった。評価精度を更に向上させるためには、魚類生息域の特定が重要な課題であると考えられる。本研究ではLCRA対象魚種のひとつであるオイカワについてDNA解析を行い、生息域の特定を試みた。

### 2. 調査及び解析方法

#### 2.1. 調査地点の選定とサンプル採取

調査河川及び調査地点を図1に示す。調査河川は埼玉県を流下する小山川(K)、元小山川(M)、女堀川(O)及び千葉県を流下する坂川(S)とした。元小山川と女堀川は小山川の支流である。調査は2009年8月から12月までの間に、延べ6日間実施した。採捕にはタモ網と投網を用いた。採捕個体の尾鰭を数mm四方切り取り、実験まで100%エタノールに浸して-30℃で保存した。

#### 2.2. DNAの抽出、PCR及びシーケンス

本研究では、調査河川の空間スケールを考慮して、個体レベルでの遺伝特性を解析できるマイクロサテライトマーカー法を適用した。既往研究<sup>2)</sup>によれば、オイカワのマーカーは8種類(Z128A, ZD181, ZD366, ZD992, ZD1021, ZD582, ZD331, 及びZD657)が開発されている。本研究ではそれらを用いた。

まず、尾鰭のサンプルからDNAを抽出した。この工程はDNA自動分離装置Gene Prep Star PI-80X(KURABO)のプロトコルに従った。得られたDNA濃度を分光光度計Infinite 200 NanoQuant (TECAN)で測定した。高濃度のサンプルを蒸留水で希釈し、すべてのサンプルが10-20ng/μlの範囲になるようにした。

次にPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を行い、8つのマイクロサテライト部位を増幅した。反応液(合計10μl)は次の組成とした。鋳型DNA 2.0μl, DNAポリメラーゼBIOTaq (BIOLINE) 0.1μl (0.5U), プライマーF, R混合溶液 0.5μl (溶液の濃度はFが0.5μM, Rが5μM), 蛍光プライマー(6-FAM, VIC, NED, PETのうちいずれか一種類) 0.5μl (最終濃度0.25μM), MgCl<sub>2</sub>溶液 0.5μl (同2.5mM), NH<sub>4</sub>バッファー1μl, dNTP混合液 1μl (同0.25mM), 水 4.4μl. PCRはThermal Cycler C1000 (Bio-Rad)を用いた。予備熱変性94℃2分の後、熱変性94℃2分、アニーリング56℃15秒、伸長反応72℃30秒を50サイクル行い、最終伸長72℃30分とした。

最後に、このPCR産物をシーケンサーにかけ、フラグメント(断片長)解析を行った。シーケンサーの反応液は次の手順で調製した。まずPCR産物を蒸留水で約50分の1に希釈した。シーケンサー用Hi-DiホルムアミドとサイズマーカーGeneScan 500 LIZ Size Standard(両者ともにABI)を90:1の比率で混合し、ストック溶液とした。希釈したPCR産物2μlとストック溶液10μlを混合し、これをシーケンサー反応液とした。反応液を94℃5分で熱変性し、シーケンサー3130xl Genetic Analyzer (ABI)に設置し、電気泳動を行った。シーケンサーによる波形データをGeneMapper 4.0 (ABI)で解析し、断片長を推定した。

#### 2.3. 解析

GeneMapperで得られたデータをGenAlEx 6.3<sup>3)</sup>に読み込ませ、アليل頻度、ヘテロ接合度の観察値Ho及び期待値He、遺伝子分化係数Fstを計算させた。ハーディ-ワインベルク平衡の逸脱検定はGenePop on the Web<sup>4)</sup>で行った。またMEGA 4<sup>5)</sup>を用いて、Fstから系統樹を作成した。

キーワード DNA解析、生息域、マイクロサテライト、PCR、ライフサイクルリスクアセスメント

連絡先 〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1 早稲田大学大学院創造理工学研究科建設工学専攻榊原研究室  
 sakaki@waseda.jp

### 3. 結果及び考察

8 遺伝子座のうち ZD582 と ZD657 を除く 6 遺伝子座で多様な断片を得られた。ヘテロ接合度の観察値  $H_o$  及び期待値  $H_e$  を表 1 に示す。全ての集団でハーディ-ワインベルク平衡からの逸脱は見られなかった。 $F_{st}$  を表 2 に示す。これを用いて系統樹を作成した (図 2)。

図 2 より、対象河川の元小山川(M)、女堀川(O)及び小山川(Ku と Kd)の各河川間において遺伝的分化がみられた。このことから河川ごとに生息域が異なると推察される。これを図 1 に点線で示す。

小山川の上流(Ku)と下流(Kd)の集団が類似しているのは、大出水時に上流の個体が下流に流されることによると考えられる。

また、小山川(Ku と Kd)—元小山川(M)で分化が大きくなった要因として、近年 (2006 年)、御陣場川から元小山川に環境用水の導水が始まったことが挙げられる。これにより個体が流下するようになったと推察される。これについては更に調査が必要である。

本研究から生息域の決定に DNA 解析が有用なツールとなり得ることが示唆された。今後は、本結果の妥当性を検証するため、魚類にタグを取り付けて実際の行動範囲を明らかにするような、比較調査が必要である。

表 1 ヘテロ接合度の観察値と期待値

	Ku	Kd	M	O	S
$H_o$	0.516	0.600	0.667	0.534	0.621
$H_e$	0.489	0.514	0.534	0.524	0.610

表 2 遺伝子分化係数  $F_{st}$

	Ku	Kd	M	O	S
Ku	0				
Kd	0.025	0			
M	0.035	0.045	0		
O	0.017	0.021	0.025	0	
S	0.039	0.041	0.024	0.023	0

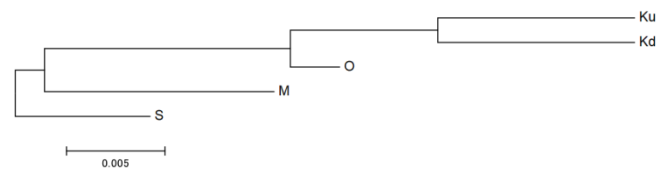


図 2  $F_{st}$  から作成した系統樹

### 参考文献

- 1) Sakakibara, Y., Nakada, A. (2008) Assessing crucial stress on life cycle of fish in suburban streams. *Water Science & Technology* **58**(3), 705-711.
- 2) Huang, MT., Tsao, E. HS., Yu, A. HT. (2003) Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci in the freshwater minnow *Zacco pachycephalus* (Teleostei: Cyprinidae) for diversity and conservation genetic analysis. *Molecular Ecology Notes* **3**, 567-569.
- 3) Peakall, R., Smouse, PE. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.
- 4) Rousset, F. (2008) GENEPOP\*007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- 5) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 1596-1599.

### 謝辞

サンプル採取にあたっては榊原研究室坂東佑亮氏、大山廣貴氏、早稲田大学本庄高等学院、及び NPO 法人川・まち・人プロデューサーズにご協力いただいた。記して感謝申し上げます。

本稿は早稲田大学特定課題研究助成費 (課題番号 2009B-120) による研究成果の一部である。

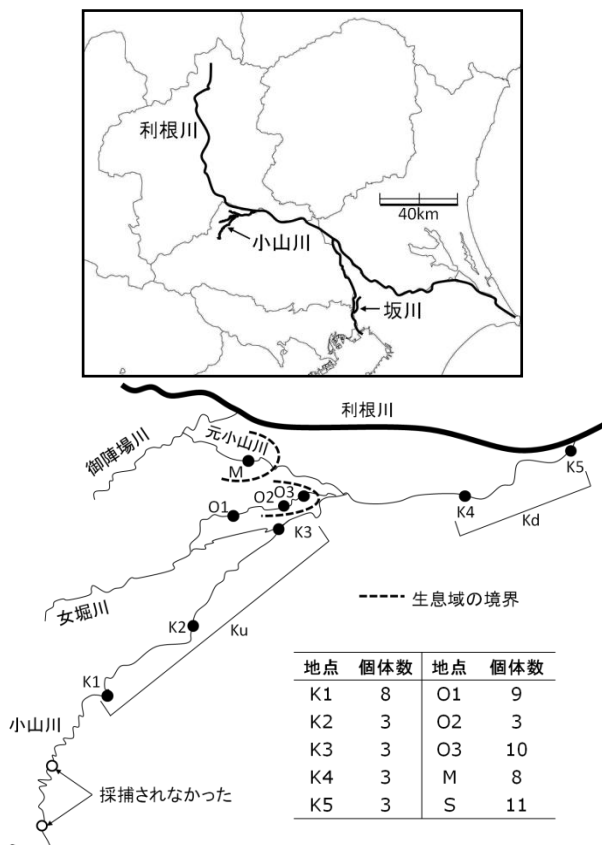


図 1 調査地点