

マイクロサテライト DNA を用いたドジョウ個体群の遺伝的特性に関する研究

- 長良川・根尾川水系の小河川と農業用水路ネットワークを対象として -

(独)国立高専機構 岐阜工業高等専門学校 学生会員 ○高橋祐樹

同上 専攻科 学生会員 桑原 真吾・正会員 和田 清

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 農村工学研究所 正会員 小出水規行

水圏環境研究会 寺町 茂

1. はじめに

生物細胞の核DNAには遺伝的機能は不明であるが、CA,GTなどの2～4塩基が反復するマイクロサテライトと呼ばれる領域(遺伝子座)が存在する。この領域は、DNA上に多数存在するとともに個体によって反復回数が異なることから多型を生じている。マイクロサテライトDNA多型は、ヒトや樹木の親子鑑定や個体識別、魚類については集団解析に使用されており、最近では河川横断構造物による遺伝的多様性への影響評価などにも利用されつつある¹⁾。さらに、主要な河川と連結する小河川や農業用水路、水田・ため池などとの連続性を考慮した魚類保全には、世代を越えた移動の履歴が考察できる遺伝的多様性の観点から個体群ネットワークを評価する必要がある。

本研究では、長良川・根尾川流域の落差などにより分断されている小河川や農業用水路網において、一部のマイクロサテライト DNA が解読されているドジョウを対象にして、各水域におけるドジョウ個体群の多型を推定するとともにその遺伝的特性を把握して、小河川および農業用水路ネットワークとの関連性を比較検討しようとするものである。

2. 現地調査および分析・解析方法

(1) 現地調査(ドジョウ採捕と環境調査)

対象水域は、長良川と根尾川で挟まれた支川網および農業用水路網であり、濃尾淡水魚ネットワーク研究会の継続的な調査活動により、魚類・水生生物等の季節的な生息分布(種類や個体数、成長段階、体サイズなど)が概ね把握されている。2005年10～12月は長良川水系(岐阜市周辺、20地点40個体)、2006年9～10月には根尾川水系(本巣市周辺、53地点218個体)を対象として、複数個体を基本としてタモ網によるドジョウ採捕と環境調査を行った。採取個体については尾鰭の一部(5×5mm)を切除し、鰭をサンプルとしてエタノールで固定した。なお、ドジョウ個体のサイズは 8.7 ± 2.6 cm(全長の平均±標準偏差)である。

(2) 分析方法(プライマーごとの塩基長の決定)

鰭サンプルからのDNA抽出の前処理には市販キット(QIAGEN製)を用いた。鰭サイズにも依存するが、本キットを用いて得られたDNAは、概ね60～80ng程度である。日本データバンクにて検索したドジョウのマイクロサテライト領域を含む塩基配列をもとに、10種類の遺伝子座を選定し、プライマー(遺伝子の特定配列を増幅させるための合成DNA)を設計した。プライマーごとに各サンプルをPCR処理した後、得られたPCR産物をオートシーケンサー(遺伝子を長さ別に分離し測定する機器)を用いて電気泳動し、フラグメント解析ソフト GeneScan3.2(ABI)によって塩基長(部分的に増やした指標となる遺伝子断片の長さであり、これを用いて反復回数の多型を推定する)を決定した。

(3) 解析方法(ヘテロ接合度の計算)

本研究では簡便かつ汎用性の高いヘテロ接合度について、各小河川や農業用水路の値をプライマー別に計算する。なお、ヘテロ接合は核DNAにおける同一遺伝子座の対立遺伝子(塩基数や配列)が異なっている状態を、ホモ接合は対立遺伝子が同じ状態を示す。一般に、健全な遺伝的特性を示す生物集団ではヘテロ接合となる確率が、遺伝的多様性が失われた集団ではホモ接合の生じる確率が高くなることが知られている¹⁾。したがって、遺伝的多様性が低くなると、生息密度そのものに顕著な差がなくても近親交配が多発している可能性がある。ヘテロ接合の確率はヘテロ接合度Hとして式(1)で計算できる。

$$H = 1 - \sum_{i=1}^N p_i^2 \quad \cdots \cdots (1) \quad \text{ここで、} p_i \text{は各水域のサンプルに出現した対立遺伝子} i \text{の頻度を表す。}$$

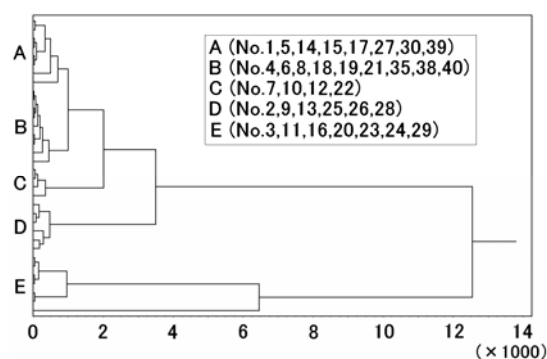


図 - 1 クラスタ分析(ウォード法)

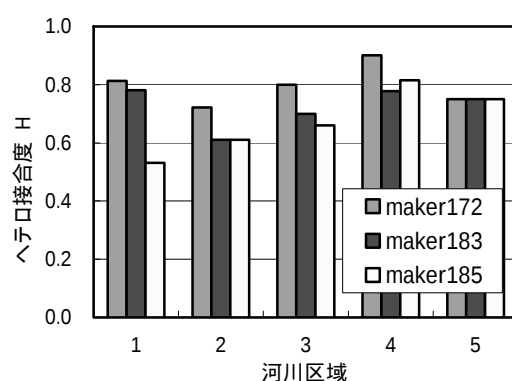


図 - 2 河川区域におけるヘテロ接合度

(多型: M172→20, M183→10, M185→9)

3. 結果および考察

(1) クラスタ分析による類型

以下では、2005年に採捕された長良川水系(20地点40個体)のドジョウ個体群の分析・解析結果について述べる。分析に用いられるマイクロサテライトの10遺伝子座のうち、千葉県下田川流域の農業排水路において適用された4種類のプライマーを選定した。ただし、マーカー182についてはほぼ全個体で確認されたため、これを除外してそれぞれの塩基長を変数(3種類)として解析を行った。図-1は、これらの変数をもとにウォード法によるクラスタ分析を行い樹形図で表示したものである。同図から、対象領域におけるドジョウの個体群は、概ね5つの類型(A~E)にグルーピングできることがわかる。詳細を見ると、同じ流域においても別のグループに分類される場合も散見され、上流に位置する水域から、近隣の水域や下流域へ洪水時に供給されていることなどが示唆される。なお、岐阜市街を流れる両満川で採捕されたドジョウ(4個体)については、オートシーケンサーによる電気泳動の結果、各マーカーにおける塩基長が検出できないことが確認されている。これは、外来種タイワンドジョウを含めた異なる種類のドジョウが混入した可能性を示唆しており、サンプリングの段階で種別を特定する必要がある。

(2) ドジョウ遺伝子のヘテロ接合度

多型の出現した遺伝子座では、それぞれの水域全体で3~20個の多型を確認できた。以下では、多型が比較的多い9~20個を対象とした。図-2は、長良川水系のドジョウ個体群のマイクロサテライトDNAについて、マーカーごとのヘテロ接合度を計算した結果である。なお、河川区域を5グループに大別して表示している。同図から、河川区域No.2は、他の区域に比べて全体的にヘテロ接合度が低い傾向にある。これは対象河川区域の中でもNo.2の遺伝的多様性が低い傾向にあり、種内の遺伝的多様性が低下し、近親交配が進んでいる可能性を示唆している。

4. おわりに

以上、予備的な調査事例として、長良川流域の落差などにより分断されている小河川や農業用水路網において、各水域におけるドジョウ個体群の多型を推定し、その空間分布と類型、ヘテロ接合度による遺伝的多様性について述べた。サンプル数はごく少数であるが、開発されたプライマーを利用して本対象領域においても各水域の多型を推定することができること、遺伝的な多様性の評価に結びつけることが確認された。今後は、サンプル数を増やして、水域間の遺伝的な関係を求め、外部標識放流(リボntagなど)による個体移動の検証的調査データと兼ね合わせれば、水位差や落差工が及ぼす生息場の分断化(ネットワーク)への影響などが世代間スケールを考慮して評価できる。この遺伝的な多様性の評価を通じて、主要な河川から小河川や農業用水路への連結部の改善、農業用水路自体の施工方法、改修工法の提案、水田・ため池との接続などの具体的な工学的手法を提示することができると考えられる。なお、本県市周辺の根尾川水系のドジョウ個体群の遺伝的特性については、前処理(DNAの抽出・PCR処理)がほぼ終了しているので、講演時にそれらの考察を含めて発表する予定である。

[参考文献]

- 1) 小出水規行・村岡敬子・竹村武士・奥島修二：マイクロサテライトDNAを用いた農業排水路におけるドジョウ個体群の遺伝的特性の予備的検討，農業土木学会論文集，No.233，pp.133～134，2004.