

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

- 管瀬川・揖斐川農業用水路の水系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 環境都市工学科 学生会員 ○早野 陽介

同上 正会員 和田 清 ・ 水圏環境研究会 寺町 茂

(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

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。本研究では生息環境の変化による魚類の遺伝的劣化、分化状況を調べるために、マイクロサテライト DNA を解析する。具体的にはマイクロサテライト DNA が一部解読されており産卵のために河川と水田を往来するドジョウを対象に、世代を越えた移動の過去の履歴を評価することによって根尾川・長良川・揖斐川水系の小河川および農業用水路ネットワークの連続性を考察する。

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)

2007 年 8 月に根尾川水系内の管瀬川農業用水路網(揖斐川町谷汲, 15 地点: 図 - 1 参照, 196 個体)と揖斐川水系内の揖斐川農業用水路網(揖斐川町周辺, 4 地点, 22 個体)を対象に、複数個体を基本としてタモ網を用いてドジョウ採捕と環境調査(水温, 水位, 植生など)を行った。ドジョウの全長は管瀬川農業用水路網で $7.1 \pm 1.7\text{cm}$ (全長の平均 $\pm$ 標準偏差)、揖斐川農業用水路網 $10.2 \pm 1.5\text{cm}$ である。対象地点は落差工や堰が建設されており、圃場整備改修がほぼ終了している水路網を選定した。なお、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、ドジョウ採捕と環境調査を行った。採取したドジョウはエタノールで固定し、冷蔵保存した。

(2) 分析方法(プライマーごとの塩基長の決定)

ドジョウサンプルからの DNA 抽出の前処理には市販キット(QIAGEN 製)を用いた。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、4 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)によって電気泳動し、フラグメント解析ソフトを用いて塩基長(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(ヘテロ接合度と遺伝的分化指数の算出)

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、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。ここで、 p_i は各水域のサンプルに出現した対立遺伝子 i の頻度を表す。また各個体群の遺伝的分化の状況を推定するために、各個体群間の遺伝的分化指数 F_{st} を算出した。各部分集団でのアリル頻度の平均値 h_s から算出した全集団におけるヘテロ接合度 h_t からのずれを式(2)で評価する。

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \quad \cdots (1)$$

$$F_{st} = \frac{h_t - h_s}{h_t} \quad \cdots (2)$$

3. 結果および考察: ドジョウ遺伝子のヘテロ接合度と遺伝的分化状況

以下では、2007 年に管瀬川農業用水路網(揖斐川町谷汲, 15 地点, 196 個体)と揖斐川農業用水路網(揖斐川町

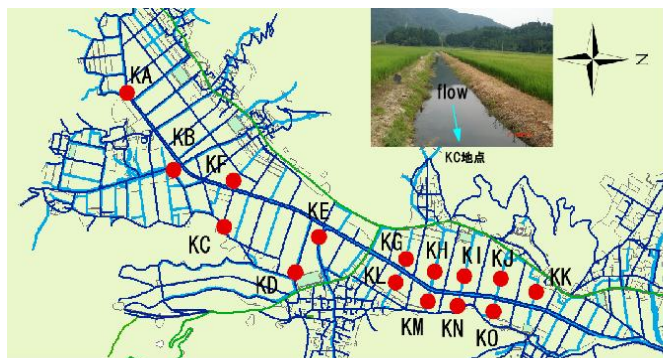


図 - 1 管瀬川ドジョウ採取地点

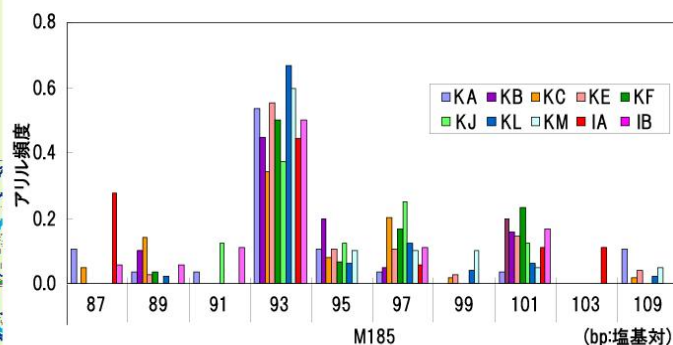


図 - 2 maker185 のアレル頻度

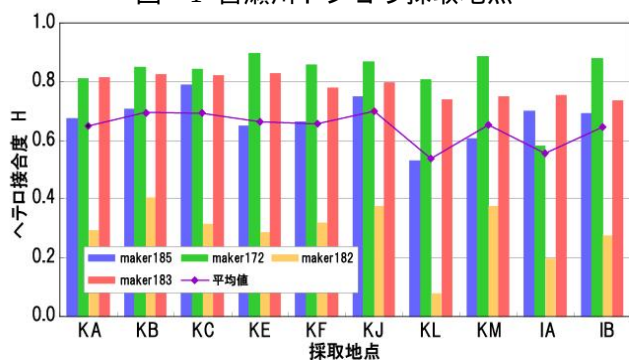


図 - 3 各採取地点におけるヘテロ接合度

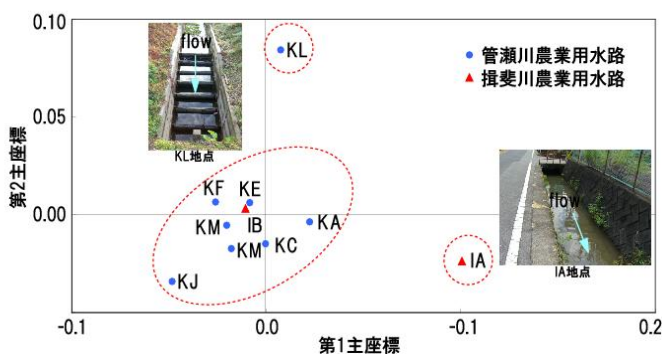


図 - 4 各採取地点における遺伝的分化状況

周辺, 4 地点, 22 個体) で採取したドジョウ個体群の分析・解析結果について述べる。データの信頼性を高めるため、採取地点において 8 個体以上採取できた地点のデータを用いてヘテロ接合度と遺伝的分化指数を算出した。多型の出現した遺伝子座は、それぞれ水域全体で 4 ~ 25 個の多型を確認できた。図 - 2 は、あるマーカー (maker185) での遺伝子座のアレル (対立遺伝子) 頻度をそれぞれ示したものである。同図から、管瀬川農業用水路の KL 地点と揖斐川農業用水路の IA 地点では特に 87, 93, 103bp において、塩基長ごとのアレル頻度に偏りがあるのが確認できる。図 - 3 は、各採取地点におけるヘテロ接合度を各マーカーとその平均値で示したものである。同図より、KL 地点と IA 地点は他の区域に比べて maker182, 185 および平均値のヘテロ接合度が低い傾向にあることがわかる。KL 地点では本川と支川を結ぶ農業用水路内に階段式魚道が設置されており、IA 地点は揖斐川農業用水路の上流部で独立している状態にある。このように、河川構造物による不連続性や生息域の独立によってドジョウ個体群の移動が制限されているために、この 2 地点はヘテロ接合度が低いものと考えられる。

管瀬川・揖斐川農業用水路について遺伝的距離を算出し、主座標分析を行った。図 - 4 は各地点ごとの遺伝的分化の分布を示したものである。同図より、管瀬川農業用水路内の遺伝的分化状況には若干の差異は認められるが、ほぼ同一であると考えられる。ただし、管瀬川農業用水路内に位置する KL 地点では、対象地点間の遺伝的分化が確認された。KL 地点では、階段式魚道が設置されておりドジョウに対する魚道の機能評価について検討の余地がある。IA 地点は揖斐川農業用水路であるため、管瀬川農業用水路の間に遺伝的分化が確認された。ただし、管瀬川農業用水路とは別水系である IB 地点では地域間の遺伝的差異の明確な傾向は認められなかった。これはサンプル数が 9 個体と少数であったことなどが原因であると考えられる。

4. おわりに

以上、管瀬川・揖斐川農業用水路の河川構造物などによる不連続的な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、ヘテロ接合度による遺伝的多様性、その空間分布について述べた。サンプル数は少数であるが、プライマーを利用して各水域の多型を推定することができ、同水域内においても遺伝的差異が表れ、遺伝的な多様性の評価に結びつけることが確認された。今後はプライマーをさらに 4 種類増やした遺伝的多様性の比較、検討と昨年度までの結果 (長良川, 根尾川水系) を含めて考察する予定である。

参考文献 1) 小出水規行他: 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.