

長良川流域におけるホトケドジョウ個体群の遺伝的特性に関する考察

(独法)国立高専機構 岐阜工業高等専門学校 学生会員 ○藤井 貴洋・豊田 真理奈
 同上 正会員 和田 清・水圏域環境研究会 寺町 茂
 (独法)農研機構 農村工学研究所 正会員 小出水 規行

1. はじめに

ホトケドジョウは日本固有亜種で湧水性のある淡水魚であり、近年、数を減らし環境省絶滅危惧 IB 類や岐阜県絶滅危惧 II 類に指定されている。そのため岐阜県においては本種の保全を目的とした生息環境特性や、移動経路等の調査が行われてきた。一方、このような生息環境場の調査・研究に対して、DNA 等の遺伝的特性の解明については取り組まれていないのが現状である。このことは、希少性の高いホトケドジョウにとって、生息量の減少に伴った近親交配の増加や移動経路の阻害による遺伝的ネットワークの分断化が進む可能性があり、将来的な存続が懸念される。

以上のような背景を踏まえて、本研究ではマイクロサテライト DNA を用いて世代を越えた移動の過去の履歴からホトケドジョウの遺伝的分化状況を把握し、DNA 情報を活用して、生物集団における遺伝的多様性の動向についてシミュレーションを行い、世代間の存続可能性を検討するものである。

2. 現地調査および分析・解析方法

(1) 現地調査(サンプリング)

2009年5月～7月に岐阜市内の長良川流域において、過去の調査でホトケドジョウの生息が確認された15地点を対象に、同一地点複数個体を基本としてタモ網を用いたホトケドジョウ採捕を行った。採取したサンプルはその場で95%以上のエタノールで固定し冷蔵保存した。採取地点数は13、総個体数は162である。各個体の体長は平均5.2±標準偏差2.6cmであった。

(2) 分析方法(PCR処理と電気泳動)

DNA抽出には市販キット(QIAGEN製)を用いた。ホトケドジョウのマイクロサテライト遺伝子座については19遺伝子座が開発されており、予備的解析結果をもとに4遺伝子座を選定し、蛍光プライマー(遺伝子の特定配列を増幅させるための合成DNA)を利用した。プライマーごとに各サンプルをPCR処理した後、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(Gen Mapper)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)

標本内の遺伝的多様性については、各遺伝子座における対立遺伝子数およびヘテロ接合度の観察値と期待値を推定する。ヘテロ接合度は遺伝子座におけるヘテロ接合型の遺伝子頻度に相当し、遺伝子多様度のひとつとして、ハプロタイプ多様度と同様、0～1の値をとり、1に近いほど多様度が高いことを示している。

複数の集団間の遺伝的違い(分化)については、各集団にHardy Weinberg平衡を仮定した上で、遺伝的分化尺度 F_{ST} を算出し、その値を用いてクラスター分析を行う。 F_{ST} の評価基準については、0～0.05で分化なし、0.05～0.15で中度、0.15～0.25で高度、0.25以上できわめて高度に分化しているとみなす。なお、解析結果の詳細については発表時に述べる。

3. 世代間の遺伝的多様性予測

個体数や対立遺伝子数の初期条件が世代交代を経てどのようにヘテロ接合度が変化するかを明らかにするために、世代ごとに対立遺伝子の任意抽出を組み込んだ遺伝的多様性の簡易的な予測シミュレーションを行った。予測モデルの作業手順についてのフローチャートおよび集団の対立遺伝子組成を図-1、表-1に示す。なお、表中P、Nの後の数が対立遺伝子数、個体数を表している。集団P4N20、P4N30、P4N40は個体数だけが異なり、4個の対立遺伝子(A1～A4)のコピー頻度は同じである。集団P6N30は6個の対立遺伝子(A1～A6)をもつが、そのうち4個は先の集団と同じである。

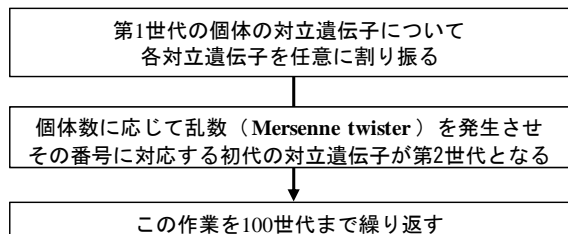


図-1 予測モデルのフローチャート

表-1 集団の対立遺伝子組成

| 対立遺伝子 | 集団名 | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| | P4N20 | P4N40 | P4N30 | P6N30 |
| A1 | 10 | 20 | 15 | 10 |
| A2 | 10 | 20 | 15 | 10 |
| A3 | 10 | 20 | 15 | 10 |
| A4 | 10 | 20 | 15 | 10 |
| A5 | | | | 10 |
| A6 | | | | 10 |
| 計 | 40 | 80 | 60 | 60 |
| 個体数 | 20 | 40 | 30 | 30 |

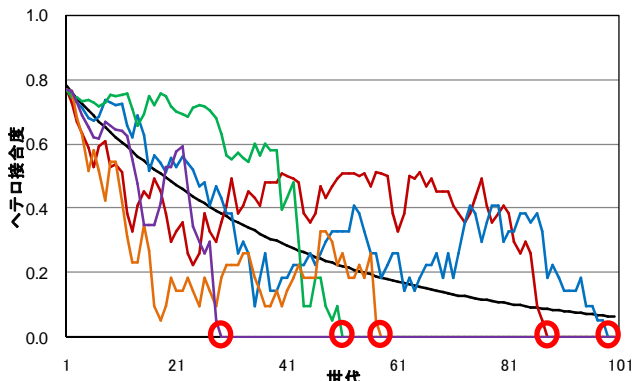


図-2 世代間のヘテロ接合度 (P4N20)

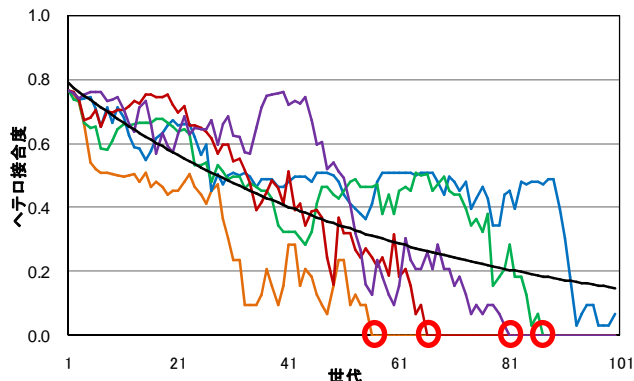


図-4 世代間のヘテロ接合度 (P4N30)

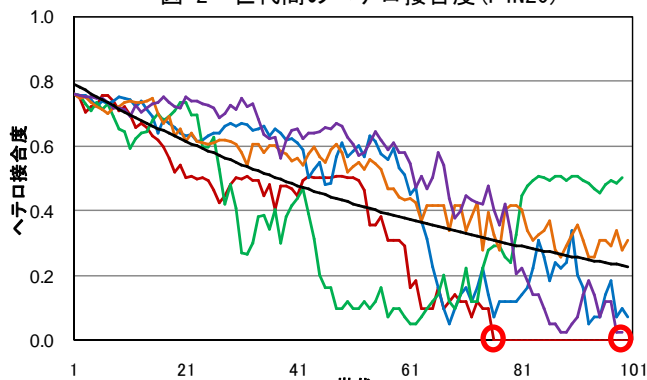


図-3 世代間のヘテロ接合度 (P4N40)

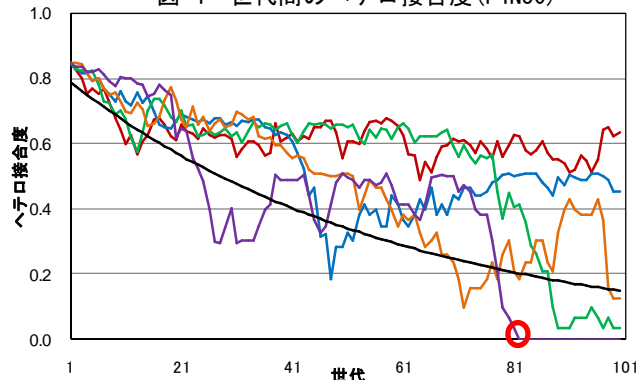


図-5 世代間のヘテロ接合度 (P6N30)

4. 結果および考察 (世代間の遺伝的多様性予測)

図-2, 3は, 対立遺伝子が4種類, 個体数が2倍に変化した場合 (P4N20, P4N40) における100世代間のヘテロ接合度の予測を5回繰り返した結果である. なお, 各図の黒い太線は個体数が一定, かつ個体数の移動のない理想集団におけるヘテロ接合度を示しており, 理想集団においても, ヘテロ接合度は世代と共に減少することがわかる. 図中の丸印は, ヘテロ接合度の値がほぼ0に達したことを示し, これは遺伝的多様性が失われ, すべての個体が遺伝的に単一 (同化) になることを意味している. 同図からわかるように, 個体数が少ないP4N20の方がP4N40よりも早期にヘテロ接合度が0に達する同化傾向が見られる. したがって, 遺伝的多様性の低減を遅延するには, 一集団における個体数を多くすることが必要であることを示している.

図-4, 5は, 個体数は同じで対立遺伝子の種類を変化させた場合 (P4N30, P6N30) の100世代間の予測結果である. 同図から, 対立遺伝子の種類が少ないP4N30の方が早期にヘテロ接合が0に達する同化傾向が見られる. すなわち, 遺伝的多様性の低減を遅延するには, 対立遺伝子数が大きく寄与していると考えられる.

5. おわりに

以上, ホトケドジョウの世代間の遺伝的多様性を把握するための手法とその簡易的な予測モデルについて述べた. 初期の個体数, 対立遺伝子数によって遺伝的多様性の劣化速度への影響が顕著に表れた. 今後は, マイクロサテライト分析およびヘテロ接合度の解析結果とともに, 個体群の遺伝的多様性の高い場所の保全策や低い場所の回復策などについて検討する.

参考文献 1) 小出水規行他: マイクロサテライト DNA を用いた栃木県小貝川上流域のホトケドジョウ集団の予備遺伝解析, 農業農村工学会論文集, pp.55-61, 2008.