

VII-45 河川生態系保全を目的とした底生動物相のDNA多型解析

東北大学 学生員 小川原享志, 渡辺幸三
東北大学 正会員 大村達夫

1. はじめに

DNA多型とは遺伝子レベルでの個体間差異であり、このDNA多型から遺伝子多様性を評価することができる。本研究では、名取川水系において河川底生動物のDNA多型を調査、解析することにより、その空間分布を明らかにした。その目的は、地域ごとの底生動物の遺伝子多様性や地域間交流を推定し、広域的な視点から河川生態系の評価を行うことである。

2. 実験方法

2-1. サンプルング方法

底生動物のサンプルングは名取川水系の2つの河川（広瀬川、名取川）を対象に行われた。サンプルング地点は図1に示すように広瀬川、名取川でそれぞれ5地点ずつ、計10地点である。DNA多型解析は、ほとんどの地点において多数の個体がサンプルングされた、ウルマシマトビケラを対象に行われた。

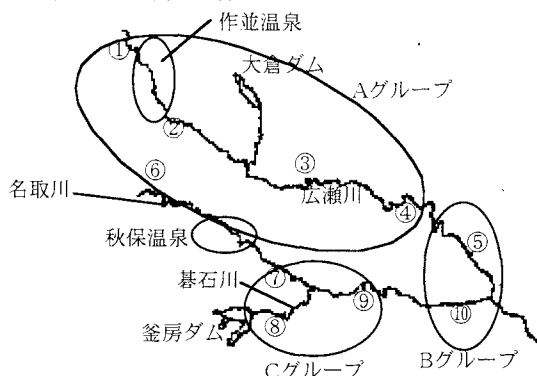


図1 サンプルング地点の概略図(図中の数字は表1中のサンプルング地点に対応している。)

2-2. DNA抽出

エタノール中に保存されたサンプルを取り出し、保存液を十分に切った上で、0.5mlのHMWバッファース中で、そのサンプルをよくすり潰した。その後、10% SDS, 10mg/mlプロテイナーゼK溶液をそれぞれ5μlずつ入れ、タンパク質の分解を行い、その後DNAのフェノール抽出を行った。遠心分離(10,000×g, 10min, 20℃)後、水層のみをピペットで回収し、DNAのエタノール沈澱を行った。その後、-80℃で15分間冷却することでDNAの析出能を高め、遠心分離(10,000×g, 10min, 20℃)を行うことにより、DNAのペレットを得た。残存フェノールや余分な低分子成分などを取り除くために、このペレットを70%エタノールでリンスし、リンス後はペレットを乾燥させた。乾燥させたペレットはTEでDNAを溶解することによ

りサンプルDNAとし、以後の実験に用いた。

2-3. PCR法による抽出DNAの増幅

サンプルDNAに対して特異性が低く短いプライマーを用いてPCR法を行うと、長さの異なる複数のDNA断片が得られる。ここで増幅されたDNA断片の長さの分布は個体ごとに異なるため、このことを利用して、個体群のDNA多型を評価することができる。この方法はRAPD法¹⁾と呼ばれている。本研究はオベロン社のRAPD用Kits A, A-11(10塩基)をプライマーとして用いた。

2-4. 電気泳動法による増幅DNAの分離

PCR法により増幅されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動法を用いて断片の長さごとに分離した。分離ゲル濃度は1.5%とし、染色にはエチジウムブロマイドを使用した。分離後のDNA増幅断片は紫外線を照射することによって検出した。

3. 実験結果

実験結果の一部を図2に示す。ここで、(a)は分子量マーカー、(b)~(h)は図1中の③地点で採取されたウルマシマトビケラ1個体ごとのDNA増幅断片である。

(h) (g) (f) (e) (d) (c) (b) (a)



図2 DNA増幅断片の電気泳動の結果(図1中の③地点)

4. DNA多型解析手法

DNA多型解析を行うために、電気泳動の結果を集団内類似度²⁾、集団間類似度³⁾という指標により定量化した。

4-1. 集団内類似度(S)

まず、個体群内の遺伝子がどの程度類似しているかを表す個体間類似度(S_{xy})を式(1)により算出する。

$$S_{xy} = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y} \quad (1)$$

ここで、 n_{xy} は個体x、yが共有している断片の数を表し、 n_x 、 n_y は各々の個体x、yにおいて数えられる断片の数を表す。この個体間類似度(S_{xy})を同一のサンプルング地点で採取された個体群のうち、すべての2個体間について計算する。集団内類似度(S)は、これらの個体間類似度の平均値として算出され、この値により一つのサンプルング地点に

おける個体群内の遺伝子の類似性を評価できる。

4-2. 集団間類似度(S_{ij})

次に、2つのサンプリング地点に生息する個体群間の遺伝子類似度を表す集団間類似度(S_{ij})を式(2)によって算出する。

$$S_{ij} = 1 + S'_{ij} - 0.5(S_i + S_j) \tag{2}$$

ここで、 S_i 、 S_j は集団*i*、*j*の集団内類似度を表し、 S'_{ij} は集団*i*、*j*からランダムに10通り選んだ個体間類似度の平均値である。この集団間類似度は、離れた場所に生息する個体群の交流の程度を推定するために有効な指標である。

5. 結果と考察

5-1. 集団内類似度(S_i)の結果

名取川水系で得られた集団内類似度を表1に示す。このうち、特に高い類似度を示した地点は名取川流域の碁石川、碁石川合流後、太白大橋の3地点であった。すなわち、これらの地点では集団内の遺伝子多様性が低かったと言える。また、碁石川合流後と太白大橋の2地点は名取川の下流に位置しており、この地域において遺伝子多様性が低くなる傾向が確認された。また、全般に名取川よりも広瀬川の方が集団内類似度が低いため、ウルマーシマトビケラの遺伝子多様性は広瀬川の方が高いと言える。

5-2. 集団内類似度と水質の関係

各サンプリング地点における集団内類似度と水質データを用いて単相関分析を行った。表2にそれらの相関係数を示す。このうち、水温、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ は集団内類似度と比較的高い相関を示した。特に水温、 $\text{NO}_3\text{-N}$ とは強い正の相関が認められ、これらの値が高いほど、集団内類似度が高く、遺伝子多様性は低くなる傾向にあることがわかる。 $\text{PO}_4\text{-P}$ については逆に、この値が高くなるほど遺伝子多様性は高くなる。

5-3. 集団間類似度(S_{ij})によるクラスター分析結果

集団間類似度は、作並温泉後と秋保温泉前の2地点間において1.35と最も高かった。この結果から、この2地点間でウルマーシマトビケラが最も活発に地域間交流をしていることが推測できる。この2地点は異なる河川に位置しているため、水中での移動は考えにくく、羽化をした後に陸上で交流をしている可能性が高い。

また、集団間類似度に基づくUPGMA³⁾によるクラスター分析結果を図3に示す。この図から類似度1.2程度での類似関係が認められる地域をそれぞれAグループ、Bグループ、Cグループと3つのグループに分類した。このグループの地理的な関係を図1に示した。この結果から、比較的地理的に近い地点では類似度が高く、同一のグループに分類されていることがわかる。

6. おわりに

本研究では、遺伝子レベルでの類似度を指標とした河川生態系の評価、および生物群集の地域間交流の推定を行った。しかし、今回の結果はウルマーシマトビケラ1種に対して、プライマー1種類を使用したDNA多型解析に基づ

く評価であった。今後、評価結果の精度を高めていくためには、DNA多型解析の対象とする底生動物の選定と複数のプライマーの併用を検討していく必要がある。

表1 集団内類似度(S_i)の算出結果

	地点	集団内類似度
広瀬川	①作並温泉前	0.55
	②作並温泉後	0.35
	③宮城広瀬	0.46
	④折立	0.35
	⑤広瀬橋	0.54
名取川	⑥秋保温泉前	0.43
	⑦秋保温泉後	0.48
	⑧碁石川	0.74
	⑨碁石川合流後	0.63
	⑩太白大橋	0.59

表2 集団内類似度と水質との相関係数

水質項目	相関係数
水温(℃)	0.69
pH	0.22
濁度	0.17
大腸菌	-0.51
一般細菌	-0.17
DO(mg/l)	-0.46
BOD(mg/l)	-0.21
SS(mg/l)	0.05
TOC(mg/l)	0.26
$\text{NO}_3\text{-N(ppm)}$	0.65
$\text{NO}_2\text{-N(ppm)}$	0.42
$\text{NH}_4\text{-N(ppm)}$	-0.22
$\text{PO}_4\text{-P(ppm)}$	-0.64

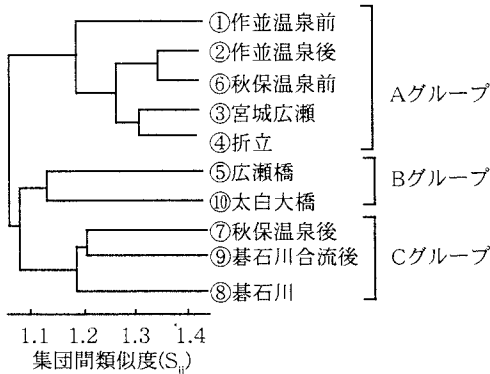


図3 集団間類似度(S_{ij})を用いたクラスター分析の結果

7. 参考文献

1) H.Hadrys, M.Balick and B.Schierwater, Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology, Molecular Ecology, pp.55-63, 1992
2) F.Bardakci and D.O.F.Skibinski, Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and sub-species identification, The Genetical Society of Great Britain, Vol.73, pp.117-123, 1994
3) 根井正利, 分子進化遺伝学, 培風館, pp.378, 1990