

VII - 4

ダムによる河川の不連続化がヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*)
地域個体群の遺伝的構造に及ぼす影響

東北大学 学生員 御簾納洋平, ○渡辺幸三
東北大学 正会員 熊谷幸博, 大村達夫

1 はじめに

生物多様性の階層の1つである遺伝的多様性の保全は、生態系管理における重要な課題である¹⁾。遺伝的多様性の低い集団では劣性遺伝子のホモ化により、近交弱勢の顕在化や、環境変化に適応するポテンシャルの低下などが起こり、局地的絶滅のリスクが大きくなる。河川において、ダムは流水性の大型無脊椎動物の生息地を分断化し、遺伝的分化を引き起こす可能性がある。そのため、生態系に配慮した河川管理には大型無脊椎動物の遺伝的多様性の保全が欠かせない。

本研究では、ダムにより生息地が分断化されたヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) の遺伝子構造を RAPD 解析によって明らかにし、以下の3つの仮説を実験的に検証した。(1) RAPD 法によりダム上下流間での遺伝的分化を検出できる。(2) ダム上下流における地域個体群の遺伝的多様性は低下する。(3) ダム湖の湛水面積或いはダム堤体の高さが大きいほど遺伝的分化は大きい。

2 方法

2.1 調査地点

ダムの堤高やダム湖の湛水面積などの規模の異なる6つのダムを調査対象として選定した。ダムの所在地を図1に、各調査地点の概要を表1に示した。調査は、ダム湖によって分断された河川の湖の上下流の流水域(対象河川)と、それに並行する分断されていない河川(コントロール河川)の上下流で行った。コントロール河川は対象河川と同規模のものとし、調査地点の標高、調査地点間の標高差及び河川距離を対象河川の状況に極力近付けた。いずれのダム湖も流入及び流出する河川は1本ずつであり、コントロール河川において調査地点間に流入する支流はない。

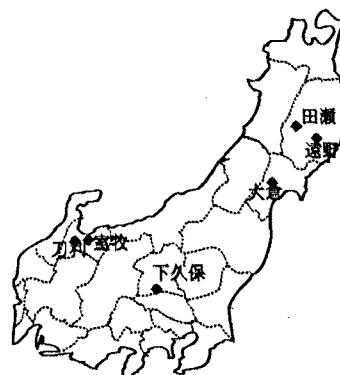


図1 調査ダムの位置

2.2 対象種

ヒゲナガカワトビケラ (*S. marmorata*) は日本の石礫底河川に広く分布し、瀬においてはしばしば優占種となる²⁾。幼虫は川の流れにより流下し、成虫は産卵のために遡上飛行をする。1世代での飛行距離は3km程度³⁾であり、東北地方では2化性の生活環が報告されている⁴⁾。

2.3 調査方法

平瀬で浮き石になっている場所において、RAPD 解析を行うのに十分な個体数(30 個体以上)を確保できるまで、キックネット法による幼虫の採集を繰り返し行った。採集した個体は、実験室に持ち帰った後70%エタノールで固定し、実体顕微鏡を用いて同定した。

2.4 実験方法

2.4.1 DNA 抽出

幼虫の細胞組織のみをピンセットを用いて取り出し、0.5ml の HMW バッファー中でよくすり潰した。その

表1 調査ダムの概要。地点間の標高差は対象河川とコントロール河川で一致する。

ダム	所在地	湛水面積 (km ²)	ダム堤高 (m)	竣工年	調査年月	地点間の 標高差(m)	地点間の河川距離(km)	
							対象河川	コントロール河川
田瀬	岩手県	6.00	81.5	1954	2003年10月	100	15.3	6.4
下久保	群馬県	3.27	129.0	1968	2003年11月	190	16.7	12.5
大倉	宮城県	1.60	82.0	1961	2002年10月	80	8.2	3.1
刀利	富山県	1.03	101.0	1966	2003年11月	175	6.5	2.0
室牧	富山県	0.71	80.5	1961	2003年11月	280	10.5	8.7
遠野	岩手県	0.12	26.5	1957	2003年10月	40	2.0	1.9

後 10% SDS, プロテイナーゼ K 溶液をそれぞれ 5 μ l ずつ入れ, 55℃で 30 分間インキュベートした。その後 TE 飽和フェノール, TE 飽和フェノールと CIA の混合液で DNA を抽出し, エタノール沈殿により DNA のペレットを得た。このペレットを適量の TE に溶解させ, サンプル DNA とした。

2.4.2 RAPD 法及び電気泳動

表 2 に示す 5 種類のプライマーを使用し, RAPD 法により PCR 反応を行った。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により分離した。アガロース濃度は 1.5% とし, 染色にはエチジウムブロマイドを使用した。

表 2 実験に用いたプライマー

プライマー	配列(5' to 3')
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG

2.5 解析手法

2.5.1 バンドパターンの定量化

電気泳動法によって得られたバンドパターンを, 増幅断片が検出された場合を 1, 検出されなかった場合を 0 とすることにより, 1-0 データとして定量化した。

2.5.2 集団内類似度⁵⁾

個体群内の遺伝子がどのように類似しているかを表す指標として個体間類似度(S_{xy})を式(1)により算出した。

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

ここで, n_{xy} は個体 x, y が共有している断片の数を, n_x, n_y はそれぞれ, 個体 x, y の総断片数を表す。集団内類似度(S)は, その個体群内における遺伝子の類似性を表し, 集団内の 2 個体の組み合わせ全てで算出した個体間類似度の算術平均で与えられる。また, 本研究では遺伝子多様度(D)を式(2)で定義した。

$$D = 1 - S \quad (2)$$

2.5.3 集団間類似度⁵⁾と遺伝距離⁶⁾

集団間類似度 S_{ij} は, 異なる地域に生息する個体群間の遺伝的な類似性を表す指標であり, 集団 i と集団 j の個体の組み合わせ全てで算出した個体間類似度の算術平均で与えられる。遺伝距離 D_{ij} は, 集団 i と j の遺伝子構造がどの程度異なるかを表す尺度であり, 本研究では式(3)で定義した。

$$D_{ij} = 1 - S_{ij} \quad (3)$$

3 結果と考察

全調査地点において, RAPD 多型が検出された。ダムの上流と下流における, DNA 多型の違いを表すバンドパターンの一例を図 2 に示す。本研究で使用したプライマー全てにおいて, 非常に多くのバンド(遺伝子座)が検出され, それらの多くは多型遺伝子座であった。従って, ダムによる遺伝的分化の影響を示すために十分な実験データが得られたと言える。

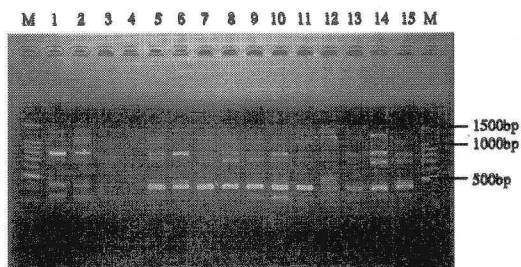
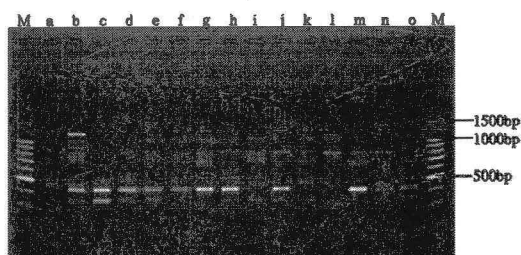


図 2 DNA 多型検出結果の一例。上図は大倉ダム上流, 下図は大倉ダム下流における結果であり, いずれも使用したプライマーは OPA-03 である。図中の M は遺伝子マーカーを表し, a~o 及び 1~15 は個体番号を表す。

4 参考文献

- 1) 鷲谷いづみ, 矢原徹一: 保全生態学入門, 文一総合出版, 2000
- 2) 水野信彦, 御勢久右衛門: 河川の生態学, 築地書院, 1973
- 3) 西村登: ニッポンヒゲナガカワトビケラの生態学的研究 5. 成虫の遡上飛行, 1981
- 4) 青谷晃吉, 横山宜雄: 東北地方におけるヒゲナガカワトビケラ属 2 種の生活環について, 1987
- 5) F.Bardakci and D.O.F.Skibinski: Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification, The Genetical Society of Great Britain Vol.73, 1994
- 6) 根井正利: 分子進化遺伝学, 培風館, 1990