

VII-21 DNA 多型解析による河川底生動物の遺伝的多様性の流程分布の解明

東北大学 学生員 草野光, ○渡辺幸三

東北大学 正会員 大村達夫

1. はじめに

河川底生動物は、種によっては流域全体を移動する魚類に比べて、行動範囲が限られているため、リーチレベルの空間スケールの水環境がその生息状態に反映される水生動物の一つである。造網型トビケラは上流から下流にかけて、流程ごとにすみわけをし、個体群密度の流程分布を形成している。本研究では、東京都多摩川において、造網型トビケラのウルマーシマトビケラ、コガタシマトビケラの2種について AFLP (Amplified Length Polymorphism)法による DNA 多型解析を行い、各地点での遺伝的多様性と個体群密度との関係を調べた。これにより遺伝的多様性の流程分布を解明し、これら2種の遺伝子レベルでの保全策について検討する。

2. 方法

2-1. サンプリング

底生動物のサンプリングは、東京都多摩川で行った。サンプリング地点は本川の上流から下流にかけての5地点と支流である平井川と秋川の2地点である（図1）。サンプリングはランダムに選ばれた瀬において、定量サンプリング（0.09m² サーバーサンプル×5回/地点）と DNA 多型解析に必要なサンプル数を確保するために、河床の至る所から底生動物を採取する定性サンプリングを行った。採取されたサンプルは時間をかけずに実験室に持ち帰り、エタノールで保存した。

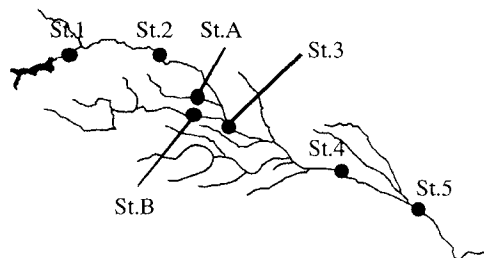


図1 東京都多摩川における調査地点

2-2. DNA 抽出

実験サンプルを 1.5ml マイクロチューブに 0.5ml HMW バッファー（10mM Tris-HCl（ph 8.0）, 150mM NaCl, 10mM EDTA NaOH（ph 8.0））と共に入れ、撹拌ペッスルでよくすり潰し、10% SDS (Sodium Dodecyl sulfate) 及び 10mg/ml Proteinase K 溶液をそれぞれ 5μl ずつ入れインキュベート（55℃, 30分）した。その後、TE（10mM Tris-HCl（ph 8.0）, 10mM EDTA-NaOH（ph 8.0））で飽和させておいたフェノールと CIA（クロロホルム、イソミルアルコール）の混合液で DNA を抽出し、エタノール沈殿によりベレットを得た。このベレットを 100μl の TE に溶解させてサンプル DNA とし、-20℃で保存した。

2-3. AFLP

AFLP 法は DNA を制限酵素で断片化し、その中から特定の断片を選択的に PCR 増幅して多型を検出する技術である¹⁾。サンプル DNA を制限酵素 EcoRI, MseI を用いて切断し、T4 DNA Ligase を用いて、切断面に 10塩基程の塩基配列を持つアダプターを取り付けた。その後、そこで得られた DNA 断片を解析可能な数に絞り込むために、付加されたアダプターにマッチし、かつ数塩基長い配列を持つプライマーを用いて PCR 反応を行った。これらの反応は AFLP™ Plant Mapping Kit を用いて行った。その後 PCR 反応液を、キャピラリー電気泳動にかけ各断片の解析を行った。

2-4. データ解析

キャピラリー電気泳動より各個体間で異なる波形パターンが得られた（図2）。この波形パターンをピークの有無から 1-0 データに変換した。同じ分子量のピークを同じ遺伝子座と仮定し、劣性遺伝子頻度 $q_i^2 = n_i/N$ を地点ごとに計算した。ここで q_i はある遺伝子座 i

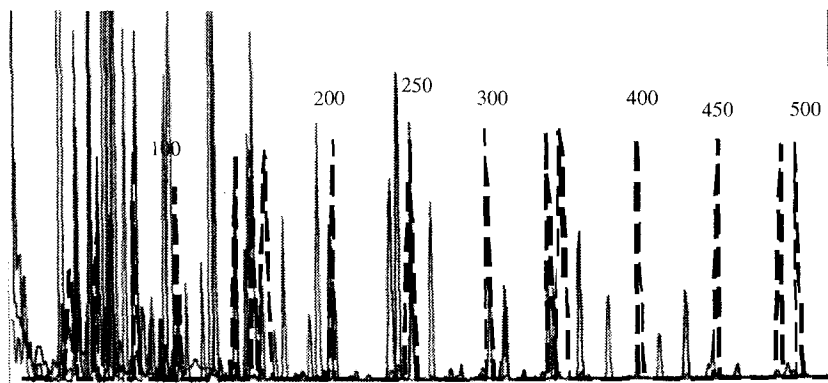


図 2 キャピラリー電気泳動より得られた AFLP 波形データ (実践)。点線は分子量マーカの波形、数字は分子量[bp]を表す。

における劣性遺伝子頻度である。 n_i はある地点において、遺伝子座 i でピークが検出されなかったサンプル数、 N はその地点の全サンプル数を表す。また優性遺伝子頻度 p_i は $p_i = 1 - q_i$ から求めた。その後、平均ヘテロ接合度 $H_i = 1 - (p_i^2 + q_i^2)$ を算出して、各地点の遺伝的多様性を評価した。

3. 結果

制限酵素 *EcoRI*, *MseI* により切断された DNA 断片が、多型の出やすいとされる 100～500bp 内に多く存在することを確認した。また複数のプライマーの中から、ピークをより多く検出できるプライマーペアを実際に各地点の数個体から得られたデータを基に 3 種に絞り込んだ。

4. 終わりに

選定されたプライマーを用いて各地点において DNA 解析を行い、遺伝的多様性の流程分布の解明を行う。現在の遺伝的多様性の流程分布が、現在の個体群密度流程分布よりも過去の平均個体群密度の流程分布との間に高い相関を持つのかを検証する予定である。

5. 参考文献

- 1) Vos, P. et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucl acids. Res.*, **23**, 4407-4414
- 2) 根井正利, 分子進化学, 培風館, pp.153-154, 1990
- 3) 水生生物調査報告書, 東京都環境局環境評価部, 東京都, 2000-2003

表 1 多摩川の調査地点におけるコガタシマトビケラとウルマーシマトビケラの個体群密度のデータ、および各地点の地理データ。個体群密度 (過去) は、東京都が 1998 年から 2001 年にかけて 11 月に行った生物調査で得られた個体群密度 [$/m^2$] の時間平均。個体群密度 (現在) は本調査で得られた 2004 年 11 月のデータ [$/m^2$]。nm は not measured.

	st.1	st.2	st.3	st.4	st.5	st.A	st.B
コガタシマトビケラ 個体群密度 (過去)	nm	1	78	32	9	132	29
コガタシマトビケラ 個体群密度 (現在)	2	3	5	6	0	43	3
コガタシマトビケラ 実験サンプル数	18	20	20	20	20	20	7
ウルマーシマトビケラ 個体群密度 (過去)	nm	13	108	1	0	104	19
ウルマーシマトビケラ 個体群密度 (現在)	3	13	7	4	1	16	12
ウルマーシマトビケラ 実験サンプル数	20	20	20	17	8	20	20
標高 (m)	360	190	90	30	10	110	100
河口からの距離(km)	84	66	48	29	19	53	52
川幅(m)	21	31	37	75	78	18	11