

VII-43 AFLP 法によるヒゲナガカワトビケラの遺伝的多様性の評価

東北大学 学生員 菊池祐二

東北大学 正会員 ○渡辺幸三, 大村達夫

1 はじめに

近年、遺伝的多様性の保全は、生物多様性保全の観点から重要な課題となっている。また水生昆虫の個体数は、生物モニタリングにおいて重要な評価項目である。しかし、年変動が大きいので、1 年から数年の短期間の調査からでは、調査地点の環境を的確に反映した個体数を評価できない可能性がある。本研究では、水生昆虫の長期的な個体群密度データが蓄積されている東京都多摩川流域とともに、他の複数の流域に生息しているヒゲナガカワトビケラの DNA 多型を AFLP (Amplified Fragments Lengths Polymorphism) 分析により調査を行い、現在の個体数が低下しているヒゲナガカワトビケラ地域集団の遺伝的多様性が低下しているかを検証し、さらに現在の遺伝的多様性から過去の個体数の高さの傾向を読み取れるかについて検証した。これらにより、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。

2 方法

2.1 調査地点

東京都多摩川流域の 6 地点でヒゲナガカワトビケラを採取した (図-1)。表-1 に、多摩川流域内の調査地点における 1986 年から 2001 年までの 5 月期の個体群密度を示した。T-

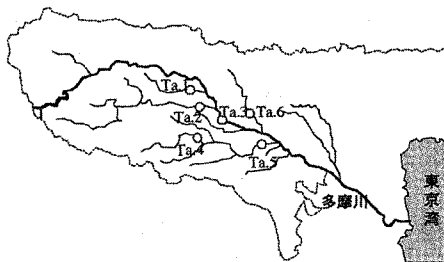


図-1 調査地点 (東京都多摩川流域)

1~T-3 は、過去から個体数が高い傾向にある地点である。T-4, T-6 ではヒゲナガカワトビケラの生息が確認された年がほとんどなく、T-5 では、過去ヒゲナガカワトビケラの生息は確認されていない。

2.2 対象種

ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) を対象種とした。ヒゲナガカワトビケラの幼虫は、日本の河川に広く分布しており、生息個体数も比較的多い。幼虫は川底の礫間に分泌した糸で小石や砂を合わせ、固定式の巣をつくる。巣の入口付近に上流に開口部を向けた箱形の網を張り、流れてくる小昆虫、藻類その他の有機物を摂食する。雌の成虫は交尾後、水面を遡上飛行して上流で産卵する。孵化した幼虫は河川を流下し、羽化後

表-1 調査地点におけるヒゲナガカワトビケラの個体群密度の経年データ

年	個体群密度 (ind./m ³)					
	Ta.1	Ta.2	Ta.3	Ta.4	Ta.5	Ta.6
1986	563	174	370	0	0	0
1987	1104	207	230	0	0	0
1988	537	315	374	0	0	0
1989	1663	374	1170	4	0	0
1990	1178	93	389	0	0	0
1991	4	141	870	0	0	4
1992	178	0	74	0	0	0
1993	704	111	711	0	0	0
1994	215	115	459	0	0	0
1995	156	19	59	7	0	0
1996	67	44	93	0	0	0
1997	2956	672	2617	0	0	0
1998	828	83	111	139	0	0
1999	72	6	28	0	0	6
2000	411	6	100	0	0	50
2001	61	6	78	0	0	872
2005	434	39	102	717	6	58

遡上することで一定の分布域が保持される。

2.3 サンプリング

サンプリングは 2005 年 5 月に行った。定量サンプリングは、コドラード付きサーバーネット (30cm×30cm, メッシュサイズ: 250 μ m) を用いて、各地点の瀬の中から 10 地点をランダムに選んで行った。また定量調査の他に、DNA 多型検出に十分な個体数 (各地点 30 個体) を確保するために、同一地点においてキックネット法 (メッシュサイズ: 250 μ m) による定性的なサンプリングを繰り返して行った。また各地点で川幅の測定を行った。兩岸の水際線の間の距離を川幅とし、流下方向に数十 m ごとに巻き尺で 10 回測定を行った。

2.4 AFLP 法

フェノール抽出-エタノール沈殿により得たサンプル DNA を用いて AFLPTM Plant Mapping Kit による AFLP 分析¹⁾を行った。サンプル DNA を制限酵素 EcoRI と MseI で切断し、T4 DNA Ligase を用いて切断面に 10 塩基の塩基配列を持つアダプターを取り付けた。アダプターにマッチする配列に加え、1 塩基長い配列を持つプライマーペアを使った PCR で DNA 断片を 1 次選択した後、更に 2 塩基長い 3 組のプライマーペア (表-2) を用いて 2 次選択を行った。2 次選択用のプライマーペアは 64 組の中から、DNA 断片の選択数が多く、多型解析に最適な 3 組を選択した。得られた PCR 産物を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いたキャピラリー電気泳動によ

表-2 選択されたAFLP二次選択用プライマーの塩基配列。アダプターと相補的な配列以外の 3塩基の配列を示した。青, 黄, 緑はキャピラリー電気泳動で検出する蛍光発色の色。

	プライマー塩基配列 (5'-3')	
	Eco RI 側	Mse I 側
ペア1 (青)	ACA	CAC
ペア2 (黄)	AAC	CAG
ペア3 (緑)	AAG	CAA

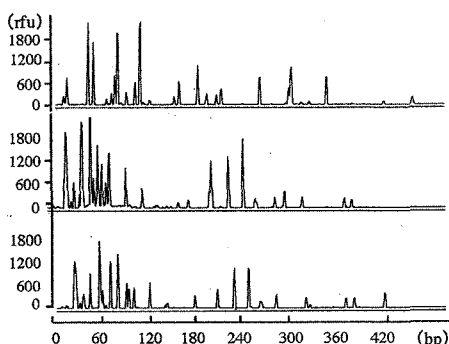


図-2 多摩川水系で採取された3個体で見られたAFLP波形パターン。縦軸: フラグメントの蛍光シグナル強度 (rfu), 横軸: フラグメントの分子量 (bp)。

り分子量分画し、波形パターン(図-2)を得た。

波形パターンのピークの有 (1)・無 (0) を 1-0 データに変換し、平均ヘテロ接合度 (H) 及び塩基多様度 (π) を算出した。そして、相対集団サイズ (個体群密度×川幅) の現在値および過去から現在までの時間平均値の相関関係を調べた。

3 終わりに

ヒゲナガカワトビケラの DNA 多型解析に最適な AFLP プライマーペアが検索された。これらのプライマーペアを使った AFLP 解析を行うことでヒゲナガカワトビケラの遺伝的多様性が明らかにされる。地域集団内そして地域集団間の遺伝的多様性の解析は現在行っている段階であるが、解析を進めることで様々な生態学的知見が得られることが期待される。

参考文献

- 1) Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijmans, M., van den Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucl acids. Res.*, **23**, 4407-4414