

AFLP法を用いたウルマーシマトビケラ (*Hydrosyche orientalis*)

地域集団の遺伝的多様性の評価

東北大学 学生員 草野光 菊池佑二
東北大学 正会員 渡辺幸三 大村達夫

1. はじめに

現在、河川水生昆虫の遺伝的多様性はほとんど評価されていない。この理由の一つとして、DNA分析によって遺伝的多様性の指標を測定したとしても、その指標値から多様性が高いのか低いのかを判断するための数値的な評価基準が存在しないことが挙げられる。さらに、遺伝的多様性を高く保全するために必要な河川環境の特徴も把握されていない。本研究では、Amplified Fragments Lengths Polymorphism (AFLP) マーカーを用いて、宮城県の複数流域に分布する数多くのウルマーシマトビケラ地域集団の遺伝的多様性を調査し、その統計的分布に基づいて、遺伝的多様性を高さを評価する指標値の基準の設定を試みた。さらに、各地域集団の遺伝的多様性と河川環境の関係を調べ、遺伝的多様性を保全するために求められる河川環境特性を調査した。

2. 方法

2.1 調査地点

調査は、砂押川水系の4地点、七北田川水系の16地点、名取川水系の42地点、増田川水系の3地点、川内沢川水系の3地点、そして五間堀川水系の5地点の計73地点で行った(図1)。このうち、ウルマーシマトビケラは計58地点に生息していた。

2.2 調査方法

DNA多型の検出に十分な個体数(各地点20個体程度)を確保するため、キックネットサンプリング(メッシュサイズ:250 μ m)を繰り返し行った。また、コドラード付きサーバーネット(30cm \times 30cm,メッシュサイズ:250 μ m)を用いて、各地点の瀬において、ランダムに選んだ10ヵ所で定量サンプリングを行い、個体群密度を評価した。(総採集面積=0.9m²)。また、水生昆虫を採取した同じ日に表1に示した22の河川環境項目も調査した。

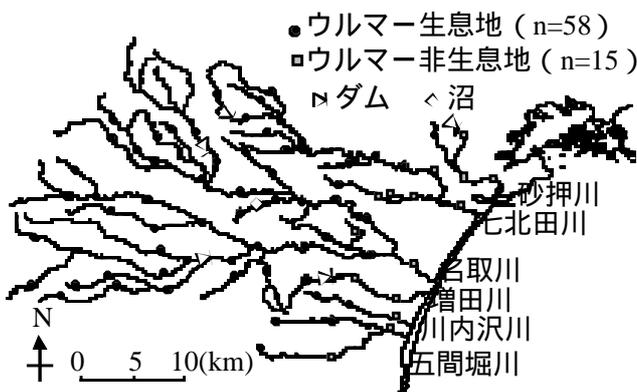


図1 宮城県中流部に分布する調査地点

2.3 DNA解析

渡辺&大村¹⁾の方法に従って、各幼虫個体からDNAをフェノール抽出した。その後、AFLP™ Plant Mapping Kit (アプライドバイオシステムズ)を用いてAFLP分析²⁾を行った。制限酵素はkitに対応するEcoRI及びMseI(第一化学薬品)、ライゲーション反応にはT4 DNA Ligase(第一化学薬品)を用いた。AFLP分析は、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増幅を行い、多型を検出する手法である。選択的PCR増幅は、ACA(EcoRI)-CAC(MseI), ACG(EcoRI)-CTT(MseI), AAC(EcoRI)-CAG(MseI)の3つのプライマーペアを用いて行った。PCR増幅されたDNA断片は、キャピラリー電気泳動により塩基長ごとに分離して解析を行った。キャピラリー電気泳動には、ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzerを用いた。また、フラグメント解析にはソフトウェアGeneScan®及びGeneMapper®(アプライドバイオシステムズ)を使用した。

2.4 データ解析

遺伝的多様性を評価するため、各地点の多型遺伝子座の割合(%P)、平均ヘテロ接合度(H_e)、塩基多様度()を算出した。 %Pは、全遺伝子座数に対する多型遺伝子座数の割合(%)である。 H_e は渡辺&大村¹⁾に従って算出した。 はInnanら³⁾が開発した方法に従い、開発者から提供して頂いたプログラムを用いて算出した。次に、遺伝的多様性(%P, H_e ,)の各累積頻度分布を作成した(図2)。そして各指標の累積割合に基づき、各地点の遺伝的多様性のレベルを5段階に分類した。累積割合が0-20%の範囲の地点の遺伝的多様性のレベルを「非常に低い」、20-40%を「低い」、40-60%を「中程度」、60-80%を「高い」、80-100%を「非常に高い」と分類した。また、遺伝的多様性に影響を与える河川環境因子を調べるために、各多様性指標(%P, H_e ,)と各環境変数との相関を、単相関分析で調べた。

3 結果および考察

多様性指標の累積頻度分布のうち、平均ヘテロ接合度(H_e)の結果を図2に示した。なお、3つの多様性指標の間にはそれぞれ強い相関があった。累積頻度分布から推定された遺伝的多様性が「非常に低い」と評価される各指標の基準は %P<28.1%, H_e <0.137, <0.0196であった。 H_e の地点ごとの違いを地図上に示した図3より、下流域では H_e が低い地点が多く、上流域では H_e が高い地点が多い傾向があることが明らかにされた。また H_e が「非常に低い」と評価される地点は、名取川水系に8地点、七北田

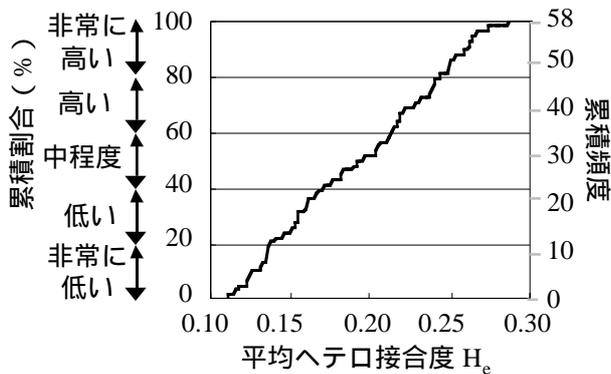


図2 平均ヘテロ接合度 H_e の累積頻度分布

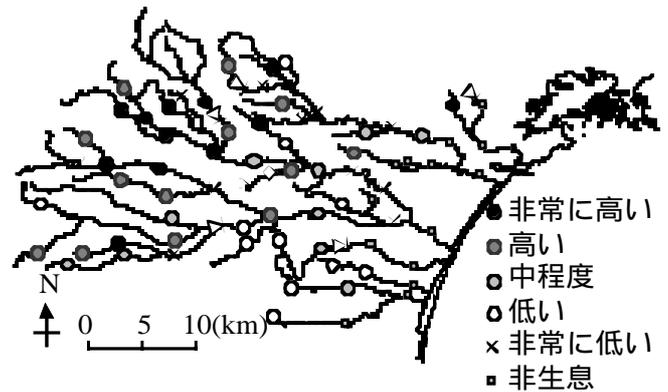


図3 平均ヘテロ接合度 H_e の地域分布

川水系に4地点存在した。これらの地点は、ある狭い地域に集中して分布するのではなく、上流から下流に広く分布していた。各多様性指標と各環境変数との相関係数を表1に示した。この結果より、石礫上の付着生物膜のクロロフィルa量、pH、SS、微細粒状性有機物量、クロロフィルa濃度、 NO_2-N がいくつかの多様性指標と有意な相関があり、遺伝的多様性が低下している地点に共通して見られる環境特性が存在することが示唆された。

4 終わりに

本研究は、ウルマーシマトピケラ地域集団の遺伝的多様性を調査し、各多様性指標の累積頻度分布に基づいて

各地点の相対的な遺伝的多様性の高さを5段階で評価する手法を提案した。さらに遺伝的多様性と河川環境の関係を調べて、地点ごとの遺伝的多様性の高さに影響している河川環境特性を明らかにした。今後は、解析を更に進め、遺伝的多様性を保全するために必要な河川環境基準の定める予定である。

5 参考文献

- 1) 渡辺ら (2006), 土木学会論文集, -38. 48-59
- 2) Vos, P., et al. (1995) Nucl acids. Res., 23, 4407-4414
- 3) Innan, H. et al. (1999) Genetics, 151, 1157-1164

表1 遺伝的多様性と環境変数の相関係数

環境変数	単位	範囲	%P	He	
平均水深	cm	10.1-47.6	0.001	0.006	-0.060
平均流速	m/s	0.03-1.29	0.173	0.172	0.153
石礫の平均粒径	cm	4.8-23.0	0.110	0.194	0.105
石礫の粒径の標準偏差	cm	2.5-36.4	0.143	0.245	0.142
標高	m	2-590	0.196	0.358	** 0.389 **
Stream order	-	1-5	-0.093	-0.104	-0.202
河口からの距離	km	8.0-51.7	0.278	* 0.390 **	0.416 **
石礫上の付着生物膜の強熱減量 (log)	g AFDM/cm ²	-3.82--2.03	-0.025	-0.031	-0.056
石礫上の付着生物膜のクロロフィルa量 (log)	Chla mg/cm ²	-4.84-1.88	-0.312	* -0.301 *	-0.246
微細粒状堆積有機物の強熱減量 (log)	g AFDM/cm ²	-3.35--2.15	-0.197	-0.232	-0.134
電気伝導度 (log)	μ s/m	0.52-1.45	-0.075	-0.144	-0.193
pH	-	6.70-8.11	-0.233	-0.419	** -0.402 **
BOD (log)	mg/L	-1.46-0.38	-0.149	-0.211	-0.236
SS (log)	mg/L	-0.50-1.26	-0.243	-0.265	* -0.247
微細粒状性有機物の強熱減量 (log)	mg AFDM/L	-0.07-1.37	-0.218	-0.311	* -0.288 *
微細粒状性有機物のクロロフィルa濃度 (log)	mg/L	-4.25--2.06	-0.241	-0.279	* -0.318 *
NO_x-N (log)	mg/L	-1.26-0.23	-0.126	-0.194	-0.218
NO_2-N (log)	mg/L	-3.00--1.64	-0.121	-0.180	-0.268 *
NH_4-N (log)	mg/L	-2.40--0.83	-0.144	-0.153	-0.154
PO_4-P (log)	mg/L	-3.00--1.11	-0.031	-0.203	-0.151
土砂の平均粒径 D_{50}	mm	0.5-19.0	0.177	0.216	0.212
土砂の均等係数 (log)	-	0.2-1.4	-0.054	-0.151	-0.128

* は $R \leq 0.05$, ** は $R < 0.01\%$ の有意確率で無相関の仮説が棄却