

# 河川水生昆虫ヒゲナガカワトビケラ集団の遺伝的多様性評価に用いる マイクロサテライトマーカーの開発

東北大学 非会員 八重樫咲子

東北大学 正会員 ○渡辺幸三

東北大学 正会員 熊谷幸博

東北大学 正会員 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。1992年の国連環境開発会議(地球サミット)で調印された生物多様性条約では、生物多様性を「生態系」「種」「遺伝子」の3つのレベルで捉え、保全していくことが求められている。しかし、水生昆虫の生物多様性は種多様性の評価にとどまり、遺伝的多様性はあまり評価されていない。個体の人為的移入による地域個体群の遺伝的攪乱、生息地間を繋ぐコリドーの人為的分断等は、集団の遺伝構造を変化させて、生息種の変化や個体数の減少等の生態系の変質を引き起こす可能性がある。したがって、遺伝的多様性、遺伝子流動、遺伝的分化等の遺伝構造の監視が必要と考えられる。そのためには、適切な遺伝マーカーが必要になる。遺伝マーカーの中でもマイクロサテライトマーカーは超多型 DNA マーカーである。マイクロサテライトマーカーにより増幅されるマイクロサテライトは DNA の中で 2~5 塩基の塩基配列が反復して繰り返されている領域のことである。中でも(AC)<sub>n</sub> のような 2 塩基の繰り返し配列は全ゲノムの 0.5%を占める<sup>1)</sup>。マイクロサテライト領域は DNA 複製の際にずれが起きやすいため、領域内の繰り返し回数に変異が起きやすい。このため反復回数が種内でも大きく変化しやすく、マイクロサテライトマーカーを用いて反復配列を含む領域を PCR すると、個体ごとに違った断片が得られる。したがってマイクロサテライトマーカーは超多型 DNA マーカーとして、様々な生物の遺伝研究に活用されている。また、他マーカーと比較して、分析コストが安く、情報量の多い共有性マーカーである点もマイクロサテライトマーカーの長所である<sup>2)</sup>。さらに同じマイクロサテライトマーカーを近縁種へ適用することが可能な場合もある。しかし、これまで河川生態系生物に対して開

発されたマイクロサテライトマーカーは魚類に対するマイクロサテライトマーカーが多い<sup>3)</sup>。水生昆虫は河川生態系の指標生物となっているにも関わらず、現在までに水生昆虫でマイクロサテライトマーカーが開発されている種はヨーロッパ産の2種に止まり、日本国内の水生昆虫ではまだない<sup>4)5)</sup>。以上の背景から、本研究は河川水生昆虫ヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) のマイクロサテライトマーカーを開発することを目的として行った。ヒゲナガカワトビケラは沖縄を除く日本に広く分布し、一般的に生息密度も高い。また、造網型トビケラであるため、河床の安定した河川では河川生態系内の優先種とされることが多い。さらに成虫の飛翔行動や生存日数など生態の解明が比較的進んでいる種である。したがって、開発されたマーカーを広範囲の調査地点で応用でき、生態学的知見との関連を考察しやすい種である。

## 2. 方法

宮城県広瀬川牛越橋付近で採取したヒゲナガカワトビケラの幼虫サンプル (n=20) から DNA をフェノール抽出し、エタノール沈殿することにより、個体ごとの DNA を得た。それぞれの個体から 10ng ずつ DNA を回収し、制限酵素 (Sau3AI) 処理することで多数の DNA 断片を得た。アガロースゲル電気泳動をして 300~750bp のサイズの DNA 断片を切り出した。その後、DNA 断片に SAULA プライマー、SAULB プライマーによるアダプターをライゲーションした後、アダプターと相補的な塩基配列を有するプライマーを用いて PCR 増幅をした。Hamond らの方法に従い、この PCR 産物を用いて、5' - (AC)<sub>10</sub>-biotin プローブを用いたハイブリダイゼーションを行った後、Biotin-Avidin 結合を活用して、GT 配列が繰り返されたマイクロサテライト領域を含む

DNA 断片を濃縮した (Enrichment). その後, Enrichment 産物を PCR 増幅した. Enrichment と Enrichment 後の PCR を 3 回行った後, Vector に DNA フラグメントをライゲーションし, 大腸菌を形質転換させることでクローニングした. 形成されたコロニーの中から Enrichment 産物が DNA に組み込まれていると考えられる白色のコロニーで, コロニー同士が結合していないと考えられ, 単独でピックアップができる大きなコロニーすべてをピックアップした. その後, 5' -(AC)<sub>10</sub>-Digoxigenin(DIG)プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションを行い, 酵素免疫アッセイおよび酵素により触媒される発色反応による DIG ラベルされた核酸の検出を行った. これらの反応を用いて, 形成されたコロニーの中から, GT 配列が繰り返されたマイクロサテライト領域をインサート DNA に含むコロニーを複数スクリーニングした. その後, スクリーニングによりシグナルの出たコロニーの DNA をコロニーダイレクト PCR し, PCR 産物を鋳型として DNA 塩基配列をシーケンサーで解読した. 解読された DNA 配列からマイクロサテライト領域の存在を確認した後, マイクロサテライト領域を PCR 増幅するためのプライマーを設計した.

### 3. 結果

コロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングされた DNA 断片の塩基配列を解読した結果, GT 配列が繰り返されたマイクロサテライト領域が複数確認された(図 1). その後, マイクロサテライト領域の両側の配列から, マイクロサテライト領域を増幅するプライマーペアの設計を行った. 今後, このプライマーペアの T<sub>m</sub> 値やマイクロサテライト領域の反復回数の解析を行い, 多くの対立遺伝子座を検出できるマーカーの開発が期待される.

```

1 C G A A A G C G T C C G A G G C G T T C
21 T G G A C A C T C A A G C G A G T C A A
41 C G G G T A G A A A C A T C C G G A G G
61 G T G A T A T T T T G A T A A A A G C G
81 A G A G A G C G G T G G A A T C G G T G
101 C T G T G G G T C A A A G T C T C G G A
121 G G A T G C G A C C T C G G G A A G A G
141 G A G G A C G A G T G G G A C A G C A T
161 T T T T G C G G C G C G G C A G G C G A
181 T G T G T G T G T G T G T A G A G T A T
201 G C G T G T G T G C G G T G T G T G T G
221 T G T G T G T G T G T T G T G T T A T G
241 T G T A C G C G T G T G C G T G T G C G
261 C G C C T A T G T T A G A T A T G G T C
281 A A C G A C A C T T T C G A C A T A G A
301 T G C A A T G C T G A A G G T

```

```

1 G G A G G A T G G C G C G A A T C T A T
21 T A A G G T A T G T A A A A C T A T T A
41 G G T T C T C G A A C T C T C G A A A A
61 A A T C G A A T G C T C G C T T T G C A
81 C A T C T C G C T A T T T A A G A T T C
101 A G A G A C G G C C G A T A C G A G C T
121 C G A C G A G G A A G C T T T C A T C T
141 C G A G C A G A G G C T C G T C G A T G
161 A A A G C G T T C C T G A A A A A A T
181 G C T A T C G C T C C G A A T G C T G C
201 G A C A G G T C A G T G T T T A T A T T
221 A T C T A T T A T G T C G A T A A C G
241 T A C A C A C A C A C A C A C A C A
261 C A C A C A C A A A T A T A T G T A C T
281 T T T A A T T T T C A G T T C G T C C G
301 G A G C G C A T A C A C T C G G A C G
321 A G A

```

図 1 ヒゲナガカワトビケラの DNA から発見されたマイクロサテライト領域の一例. (GT)<sub>6</sub>, (GT)<sub>10</sub> の 2 つのマイクロサテライト領域を持つインサート DNA と (AC)<sub>14</sub> を持つインサート DNA が確認された.

### 参考文献

- 1) P.C.Winter, G.I. Hickey, H.L. Fletcher, ゲノム, 遺伝学キーノート, 2003, pp69-128
- 2) R. Frankham, J.D. Ballou, D.A. Briscoe, Genetic diversity, Introduction to Conservation Genetics, pp45-71
- 3) 谷口順彦, 高木基裕, DNA 多型と魚類集団の多様性解析, 魚類の DNA, 1997, pp117-137
- 4) H.R.Willcock, A.G.Hildrew, R.A.Nichols, M.W.Bruford, Microsatellites for net-spinning caddisfly *Plectrocnemia conspersa* (Polycentropodidae), *Molecular Ecology Notes*, 2001, **1**, pp318-319
- 5) D.A.Dawson, H.R.Willcock, Isolation of polymorphic microsatellite loci in the net-spinning caddisfly, *Polycentropus flavomaculatus* (Polycentropodidae), *Molecular Ecology Notes*, 2002, **2**, pp514-517