

ミトコンドリア DNA マーカーを用いた河川底生動物の 遺伝的多様性および遺伝系統の評価

東北大学 ○鈴木祥一
東北大学 正会員 渡辺幸三
東北大学 学生会員 八重樫咲子
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、重要な課題となっている。遺伝的多様性に富んだ集団は、環境変化に適応できる可能性が高い¹⁾。生物は遺伝子の突然変異によって引き継がれる性質を変化させていく。突然変異遺伝子の頻度が集団中で増加すれば、その突然変異は進化として伝えられ、新たな遺伝系統として種に存続する。周辺からの個体の移入（遺伝子流動）が強い地域では、種内系統間の存続競争が激しくなり、突然変異遺伝子が次世代に残される確率は小さくなる。逆に、遺伝子流動が小さい地域では、新たに生まれた系統が存続しやすく、地域固有の遺伝系統が残残りやすい。また、世代当たりの突然変異率が系統間で等しいと仮定すると、古くから存在する系統は、最近系統分化した若い系統に比べ、新しい系統が生まれやすい。遺伝系統はその生物の進化の歴史であり、古くから存在する系統を残すことで、将来、種内の一部の系統が消滅した場合に失われる遺伝的多様性を補うポテンシャルを高める。

渡辺ら²⁾は、AFLP (Amplified Fragments Lengths Polymorphism) マーカーを用いて、宮城県内4流域内のヒゲナガカワトビケラ (*Stenopsyche marmorata*) の移動分散パターンを評価し、河道の上下流間で遺伝子流動が起こりやすいことや、源流域が遺伝的に孤立傾向にあることを発見した。しかし、その移動分散パターンを、種内の遺伝的多様性や遺伝的な地域固有性の保全に繋げるための道筋は明らかにされていない。例えば、mtDNA(ミトコンドリア DNA)マーカーで種内の進化系統を調べることで、AFLP マーカーで明らかにされた孤立地域に古い系統が残されていることが明らかになれば、遺伝子流動による他系統の進入を防ぐことが

遺伝的多様性の保全に繋がると考えることができる。

AFLP マーカーは、遺伝子流動の主要因である流域内の生物の移動分散³⁾を評価するのに適しているが、ランダムに選択した多数の遺伝子座を解析するため、系統進化の過程が見えにくい。また、高い塩基置換速度を有する非コード領域の同一塩基において複数回の塩基置換が起こり、ハプロタイプ間の進化時間を過小評価する可能性がある。一方、コード領域を対象とする mtDNA マーカーは、AFLP マーカーに比べて得られる塩基置換速度が低く、進化時間の過小評価の可能性は小さいため、系統進化過程を調べるのに適している。

上記背景のもと、本研究は、宮城県中南部に生息分布するヒゲナガカワトビケラを対象に mtDNA の COI (cytochrome oxidase subunit 1) 領域のシークエンシング解析を行い、AFLP マーカーによる解析結果と融合して以下2つの目的を達成することとする。

- 1) 遺伝的多様性の保全のために重要な遺伝系統とそれら系統が分布する地域を明らかにする。
- 2) AFLP マーカーで明らかになった流域内の遺伝子流動と、地域集団の mtDNA マーカーが明らかにする遺伝系統構造や遺伝的固有性の関係を明らかにする。

2. 方法

2.1 調査地点

宮城県中南部地域においてヒゲナガカワトビケラの幼虫の生息が確認された4水系の30地点を対象に行った(図1)。また、宮城県中南部の地域集団を構成する遺伝系統の起源を広域スケールでの系統地理学的観点から推定するために、日本各地のヒゲナガカワトビケラも使用した(図2)。宮城南部地域30地点については

Key words : mtDNA, 遺伝的多様性, 遺伝系統, ヒゲナガカワトビケラ

連絡先: 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06, TEL: 022-795-7483, E-mail: shoichi@water.civil.tohoku.ac.jp

AFLPマーカーによる評価がなされている。

2.2 対象種

ヒゲナガカワトビケラの幼虫は日本の河川の石礫底に広く分布し、しばしば瀬における優占種となる。礫間に分泌絹糸で作った巣網を張って営巣し、巣網にかかるセストンを摂食する。交尾後、水面を遡上飛行して上流で産卵する。成虫の遡上飛行によって幼虫の流下が補われ、一定の分布域が保たれる。

2.3 DNA 分析

各地点で採取した幼虫サンプル（20個体/地点）から QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kits を用いて DNA を抽出した。得られた DNA の mtDNA の CO1 領域を、ユニバーサルプライマーを用いて PCR 法により増幅した。mtDNA は、核 DNA に比べて塩基置換の起こる速度が 5～10 倍速い。また、mtDNA は母性遺伝をするため、系統関係を復元するのに適している。シーケンシング解析は、ABI 3730xl DNA Analyzer で、Forward 側および Reverse 側双方向から塩基配列を解読し、CodonCode Aligner 2.0.6 (CodonCode Corporation) で塩基配列のアライメント（塩基配列の整列、挿入・欠損の調整）を行った（図3）。

2.4 データ解析

進化速度を連関測度とする UPGMA クラスタリングを PHYLIP 3.6 で行い、ヒゲナガカワトビケラの遺伝系統樹を作成する。AFLP データの割当検定により算出した移入個体の割合と、各系統に分岐してからの進化時間の相関を調べる。また、流域から任意の生息地点が消滅した場合、その生息地点にだけ存在するハプロタイプが流域から消滅することを想定し、系統樹を再作成する。系統学的多様度（系統樹の枝長の和）を再評価し、系統学的多様度の低下率が大きい生息地点ほど、系統進化ポテンシャルへの貢献度が高いと言える。

3. おわりに

ヒゲナガカワトビケラの mtDNA CO1 領域の塩基配列は解読された。これらを用いたヒゲナガカワトビケラの遺伝的多様性・遺伝系統構造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知見が得られることが期待される。

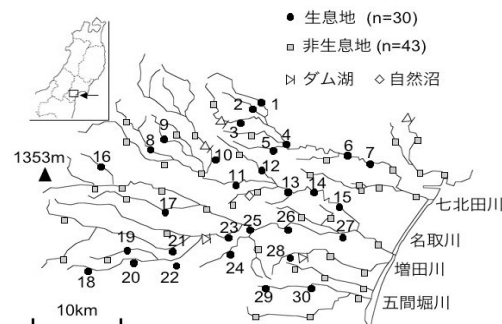


図1 宮城中南部地域の調査地点



図2 日本各地の調査地点

```
1 CAACGATTGGTTGTGGAGAAGAGTCTGATACTCCACCACC
41 ACGACACAGGTCAAAGAATAGAGGTGTTTATATTACGATAC
81 TGTTAATAGTATTGTAATAGCTCCAGCTAAGACTGGCAGGG
121 ATAATAATAATAAAATGGCTGTAATTTTTACTGATCATACAA
161 ATAATGGAATTTGTTCAAGAGTTATTGATGATGGTCGTATAT
201 TTATGATTGTGGTAATAAAATTAATGGCCCTAAATAGACG
241 AAATTCCTGCTAGGTGCAGTGAGAAAATTTGTAATATCAACA
281 GCTTTTCCTCTATGTGAAATGTTTGACAGATAGCGGGGGATA
321 GACTGTTTCATCCTGTTCTGCTCCATTGCTATAAAATTGA
361 AGAAGTTAGGAAGATTAAGAAGGGGGGAGTAATCAAAAT
401 CTTATATTATTTATTCGGGGAAAGGCTATATCTGGGGCTCC
441 TAATATTAGGGGAACATAATCAGTTTCCAAACCTCCAATTAT
481 AATGGGTATAACCATAAAGAAAATTTATGACGAACGCGTGGG
521 CTGTTACAATTGAATTATAAATTTGATCGTTGCCGATAAATG
561 TTCCTGTGGTCTTAGTTCTAAGCGAATAATTATTCTTAGGG
581 AGGTTCTACCATACCTGATCAAATTCGAAAATAAAATATA
621 GTGTACCAATATCTTTATGATTTGTTGACCA
```

図3 ヒゲナガカワトビケラの mtDNA CO1 領域のシーケンス解析結果の例

参考文献

- 1) Allendorf, F. and Leary, R. F. (1986) Heterozygosity and fitness in natural populations of animals, in "The Science of Scarcity and Diversity", Sinauer Associates, Massachusetts, 57-76.
- 2) 渡辺幸三, 八重樫咲子, 菊池裕二, 竹門康弘, 風間聡, 大村達夫: DNA 多型マーカーによるヒゲナガカワトビケラの流域内移動分散パターンの評価, 水環境学会誌, 投稿中
- 3) Hughes, J. (2007) Constraints on recovery: using molecular methods to study connectivity of aquatic biota in rivers and streams, Freshwater Biology 52, 616-631.