

マイクロサテライトDNAを用いた揖斐川流域の農業用水におけるドジョウ個体群の遺伝的特性

和田 清¹・小出水 規行²・藤井 貴洋³・寺町 茂⁴

¹正会員 (独法) 国立高専機構 岐阜工業高等専門学校 教授 (〒501-0495 岐阜県本巣市上真桑2236-2)

E-mail:wada@gifu-nct.ac.jp

²正会員 (独法) 農研機構 農村工学研究所農村環境部生態工学研究室 (〒305-8609 つくば市観音台2-1-6)

E-mail:koizumin@affrc.go.jp

³学生会員 (独法) 国立高専機構 岐阜工業高等専門学校 専攻科 (〒501-0495 岐阜県本巣市上真桑2236-2)

E-mail:2009k06@edu.gifu-nct.ac.jp

⁴非会員 水圏域環境研究会 (〒501-0417 岐阜県本巣市屋井936-1)

本研究は、マイクロサテライトDNAを用いて、魚道や環境配慮型水路等のネットワーク工法などが魚類に与える影響を、世代を越えた移動の過去の履歴から魚類の遺伝的劣化、分化状況の観点から把握し、水路改修などによる生息場の連続性を検討したものである。得られた結論は以下のようである。対象流域の農業水路の複数地点において、塩基長ごとのアリル頻度に偏りが生じ、他の区域に比べて平均値のヘテロ接合度が低い傾向にあることから、遺伝的劣化が生じていることが明らかにされた。その要因として、本川と支川を結ぶ農業用水路内に設置された階段式魚道の総落差が大きいこと、農業用水路の上流部において落差工が数段設置されており、一方向的な遺伝的な供給源として独立している状態にあることなどが指摘された。

Key Words : micro satellite DNA, Loach(*Misgurnus anguillicaudatus*), habitat continuity, genetic diversity

1. はじめに

マイクロサテライトとは生物細胞核上に存在する数塩基 (CA/GT など) の単位配列の繰り返しからなるものである。この繰り返し領域は遺伝子座と呼ばれ DNA 上に多数存在し、個体によって反復回数が異なることから多型を生じている。このマイクロサテライト多型は種内の系統関係や個体群間の血縁関係を調べる上で、分子生態学など様々な研究分野に幅広く利用されている¹⁾。また、ミトコンドリア DNA 解析と比較して、日本の淡水魚類におけるマイクロサテライト DNA 解析の研究事例は少ない傾向にある。その一つの理由が、マイクロサテライト DNA のプライマーが一般に種特異的なためである²⁾。しかしながら、淡水魚類で開発されたマイクロサテライト DNA (遺伝子座) のプライマーについては、ウナギ、シロザケ、アユ等が挙げられ、最近ではドジョウ、ホトケドジョウ、貴重種トミヨ属雄物型等の水田水域の魚類についても開発が進んでいる。また、集団保全の観点から取り組んだ研究については、溪流魚イワナや

ドジョウの事例³⁾⁴⁾がある。

一方、水田水域における魚類生息場の実態解明に向けた主な調査方法は、水路に設けた定点における魚類採捕、水深・流速などの環境因子計測、標識放流による魚類の追跡調査などである。これらの手法に DNA から得られる遺伝的情報を加味することによって、対象生物の個体群の遺伝的多様性の評価、将来的な存続性までも予測可能であり、保全型工法を導入する際の生態学的な保全目標をより明確に設定することが可能になる。

以上のような背景を踏まえて、本研究では、魚道や環境配慮型水路等のネットワーク工法や、落差工などが魚類に与える影響について、世代を越えた移動の過去の履歴から魚類の遺伝的劣化、分化状況を把握できるマイクロサテライト DNA を用いる。その目的は、河川改修や構造物による生息場の分断化、遺伝的多様性の損失を明確にし、個体群ネットワークを視野に入れた改善策を検討しようとするものである。具体的には、マイクロサテライト DNA が一部解読されており産卵・生育のために河川、農業用水路網、水田などを往来するドジョウを対

象に、揖斐川・根尾川水系の小河川および農業用水路ネットワークの連続性を考察する。

2. 現地調査および分析・解析方法

(1) 現地調査

図-1 に示したように、2007 年 8 月に根尾川水系内の管瀬川農業用水路網 K (揖斐川町谷汲：15 地点、196 個体) と揖斐川水系内の揖斐川農業用水路網 I (揖斐川町周辺：4 地点、22 個体) を対象に、同一地点複数個体を基本としてタモ網を用いたドジョウ採捕と環境因子調査 (水温、水位、植生など)、水理構造物の特性 (落差、流速など) などを把握した。なお、水位計測には圧力センサーとデータロガーを組み合わせた圧力式水位計、水温計測には水中用データロガーを数カ所現地に設置した。

対象地点は、落差工や堰などが設置され圃場整備改修が現在までに完了している水路網を選定した。また、ドジョウの標準体長は、管瀬川農業用水路網 K において $5.4 \pm 1.7 \text{ cm}$ (平均 $\pm$ 標準偏差)、揖斐川農業用水路網 I では $9.8 \pm 2.7 \text{ cm}$ である。採取したサンプルは、その場で 95% 以上のエタノールで固定し冷蔵保管した。

(2) 分析方法

本解析では、サンプル個体からの DNA 抽出に 3~5 mm 四方の尾ヒレ切片を用いた。DNA 抽出には市販キット (QIAGEN 製) を利用して、1 個体あたり 2~5 μg の DNA を抽出した。ドジョウサンプルによる日本データバンクにて検索したドジョウのマイクロサテライト領域を含む塩基配列をもとに 4 種類の遺伝子座を選定し、設計された蛍光プライマー (遺伝子の特定配列を増幅させるための合成 DNA) を利用した。PCR 増幅ではプライマーである 20~30 塩基の 2 種類の 1 本鎖 DNA、dNTP、DNA ポリメラーゼ (酵素)、基 (鋳型) になるサンプル個体の DNA、反応を促進させるバッファーを用い、1 個体あたりの試薬組成を 10 μl 系とした。増幅反応はサーマルサイクラー機器を用い、本解析では反応条件として、初期熱変性後 (94°C : 2 分)、3 段階のサイクル 50 回後、最終伸張 (72°C : 30 分) を適用した。一連の PCR 増幅反応は約 2~3 時間で終了する。生成された増幅副産物は、配列の塩基を読み取るための PCR 試薬に反応させ、反応後の産物をさらに精製する。

一般にマイクロサテライト遺伝子座の塩基配列は繰り返し部分が異なるだけで、それ以外の塩基に個体差はないとされている⁹⁾。このことから、生成された PCR 増幅産物については塩基数の計測 (フラグメント解析) だけでよく、ミトコンドリア DNA 解析のように一つ一つの塩基を読み取る必要はない。



図-1 揖斐川流域における分析サンプルの採捕地点

増幅産物の塩基数の計測は、オートシーケンサー (遺伝子を長さ別に分離し測定する機器) によって電気泳動した。副産物に塩基数がわかっているサイズスタンダードと呼ばれる計測試薬を加えて、熱変性したものを試料とする。増幅産物には蛍光色素が付いているために、色の異なる産物を一纏めにして複数産物の同時計測が可能である。一方、シーケンサーからの出力データは蛍光色素のシグナル強度 (増幅産物量に相当) を読み取った波形グラフである。塩基数の決定には、フラグメント解析ソフトを用いて塩基長 (部分的に増やした指標となる遺伝子断片の長さであり、これを用いて反復回数の多型を推定する) を用いた。それによって得られた塩基数が解析個体の対立遺伝子となる。ここで、1 個体について 2 つの塩基数が決定された遺伝子型はヘテロ接合、1 つの場合はホモ接合となる。なお、オートシーケンサー以降の分析は農村工学研究所において実施した。

(3) 解析方法

a) ヘテロ接合度

本研究では、簡便かつ汎用性の高いヘテロ接合度について、各農業用水路の値を蛍光プライマー別に算出した。ヘテロ接合は核 DNA における同一遺伝子座の対立遺伝子 (塩基数や配列) が異なっている状態、ホモ接合は対立遺伝子が同じ状態を示す。一般に、健全な遺伝的特性を示す生物集団ではヘテロ接合となる確率が、遺伝的多様性が失われた集団では、ホモ接合の生じる確率が高くなることが知られている⁷⁾。

ヘテロ接合度は、遺伝子座におけるヘテロ接合型の遺伝子型頻度に相当し、遺伝子多様度のひとつとして利用され 0~1 の値をとる。ヘテロ接合度には観察値 H_0 と期待値 H_E の 2 種類がある。 H_0 はすべての個体数 N において、実際にヘテロ接合している個体数 n の割合を式 (1) で算出したものである。一方、 H_E は対立遺伝子 i の頻度 p_i を計算し、式 (2) によって得られる⁸⁾。

$$H_o = \frac{n}{N} \quad (1)$$

$$H_E = \frac{2N(1 - \sum p_i^2)}{2N - 1} \quad (2)$$

H_E はすべての個体の対立遺伝子 (2N 個) から、任意に 2 つを抽出した場合のヘテロ接合となる確率に等しい。この確率は集団における個体が偏りなく任意交配しているときの値となる。 H_o と H_E を比較して $H_o \approx H_E$ となる場合、その集団には「Hardy-Weinberg 平衡 (メンデル遺伝)」にしたがって任意交配が仮定される。 $H_o < H_E$ の場合は、集団に近親交配や分断化が生じていると想定される。 H_o と H_E の差が極端に大きい場合は近親交配による遺伝的多様性の損失として、集団の存続が懸念されるようになる。なお、 $H_o > H_E$ の場合の理論的見解はないようであり、解析における計測ミスの可能性が高くデータを再チェックする必要がある。

b) 遺伝的分化指数

対立遺伝子数やヘテロ接合度は 1 つの集団についてのパラメータである。複数の集団間の遺伝的違い (分化) については、各集団に Hardy-Weinberg 平衡を仮定した上で、遺伝的分化指数 F_{ST} を計算できる。 F_{ST} の値は、1 (完全分化) $\sim$ 0 (非分化/同一) の範囲である。 F_{ST} の計算式は式 (3) が適用される。

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_s}{H_T} \quad (3)$$

ここで、 H_s は各集団のヘテロ接合度の期待値の平均、 H_T は全集団のヘテロ接合度の期待値である。一般に、 F_{ST} は 0 $\sim$ 0.05 で分化なし、0.05 $\sim$ 0.15 で中程度、0.15 $\sim$ 0.25 で高度、0.25 以上できわめて高度に分化しているとみなされ⁹⁾、本研究においても概ねその判断基準を採用した。

3. 結果および考察

(1) 各地点におけるヘテロ接合度

対象とした農業用水 (管瀬川：水路網 K、揖斐川：水路網 I) におけるドジョウ個体群のヘテロ接合度 H_o (観察値) と H_E (期待値) を求めた。なお、水路網 K の 7 地点、水路網 I の 2 地点はサンプル数が 4 個体以下と極端に少ないため、解析対象からは除外し、両水路網において 8 個体以上採捕された地点のデータ (水路網 K：8 地点、水路網 I：2 地点) を使用した。

本解析では、対立遺伝子数、ヘテロ接合度の観察値 H_o と期待値 H_E を推定し、各採捕地点におけるサンプル内の遺伝的多様性について検討した。解析の結果、すべてのプライマーの遺伝子座において多型が出現し、対象

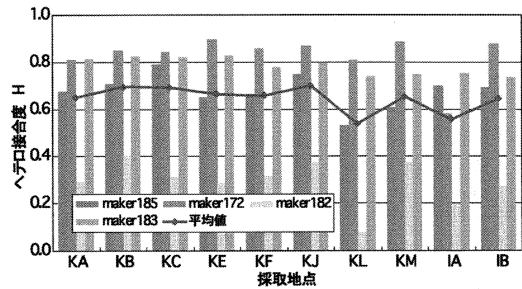


図-2 採捕地点におけるヘテロ接合度

地点全体で 4 $\sim$ 25 個の対立遺伝子数が確認された。水路網 K における対立遺伝子数が平均 6.47、 H_o が平均 0.68 (H_E ：平均 0.66)、水路網 I では 5.38、 H_o ：0.64 (H_E ：0.61) であった。また、Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱 (H_o と H_E の有意差検定) については、すべてのサンプルについて H_o と H_E の間に有意な差は見られなかった ($p > 0.05$)。このことから、どのサンプルにも交配の任意性が仮定され、引き続き遺伝的分化の解析にすべて利用できることが確認されている。遺伝子座から検出することはなかった。

図-2 は、4 種類のマーカーごとに各採捕地点のヘテロ接合度とその平均値で示したものである。同図から、水路網 K においては KL 地点、水路網 I では IA 地点の値が他に比べてヘテロ接合度が低い傾向にあることがわかる。KL 地点では管瀬川と農業用水路の接合部に階段式魚道 (合計 7 段、各平均落差 0.10m) が設置されている。管瀬川の河床と魚道天端の標高差が約 1.3m であること、調査期間およびその前後において管瀬川本川が湛水時でも魚道部は水に浸かることがほとんどないことなどから、ドジョウ個体群は管瀬川から農業用水路には階段式魚道の落差のために遡上が阻害されていることが考えられる。一方、IA 地点は水路網 I の上流域であり、同地点に流入している水路網はなく、水路内には標高差 0.3m の落差工が 2 箇所連続して設置されている。したがって、下流から上流への遡上はきわめて困難であり、上流から下流への一方向的な供給が想定される。このように、魚道や落差工などの構造物による機能低下や不連続性によってドジョウ個体群の移動が制限されているために、この 2 地点ではヘテロ接合度が低いものと考えられる。

(2) 主座標分析による遺伝的分化

表-1 は、水路網 K および水路網 I (10 地点、計 169 個体) における各地点個体群間の遺伝的分化指数 F_{ST} と遺伝的分化状況 (+：分化、-：同一) の算出結果を示したものである。なお、一般に、 F_{ST} は 0 $\sim$ 0.05 で分化なしと判定されるが、表中には 0.022 (上限値の約 50%) 以上の値を + で表示している。同表から、対象区域内の個体群間の遺伝的分化に差異が認められる。すなわち、水路網 K

においてはKL地点、水路網IではIA地点が、特に分化（+）が大きい。KL地点では、 F_{ST} が0.022～0.056であり、複数の集団間の遺伝的違い（分化）はまだ軽微である。一方、IA地点の F_{ST} は0.026～0.109となり、KL地点に比べて分化が中程度に進行しつつあると推定される。

この各個体群間の遺伝的分化を類似度行列として、水路網間の遺伝的分化を主座標分析により可視化したものが図-3である。同図より、管瀬川農業用水路（水路網K）内の遺伝的分化状況には若干の遺伝的差異は認められるものの、ほぼ同一であると考えられる。ただし、KL地点では、第2主座標軸に関して、他の地点と明らかに異なった分布をしており、対象地点間の遺伝的分化の進行始まっている可能性が考えられる。前述したように、KL地点のみ階段式魚道が設置されており、この機能低下によってドジョウ個体群の生息域の遺伝的交流が中断していると推定される。一方、水路網IのIA地点は、管瀬川農業用水路（水路網K）とは距離的に近接しているが別水系の揖斐川農業用水路であり、第1主座標軸に関して水路網Kとは遺伝的に異なる個体群であることがわかる。IA地点内の連続した落差工によって上流から下流への一方向的な供給となり、遺伝的な交流が劣化していることが示唆される。

4. おわりに

以上のように、マイクロサテライトDNAを用いて、魚道や環境配慮型水路等のネットワーク工法などが魚類に与える影響を世代を越えた移動の過去の履歴から魚類の遺伝的劣化、分化状況の観点から把握し、水路改修などによる生息場の連続性を検討した。限られたサンプル数であるが、本研究で得られた結果は以下のようである。

1) 管瀬川農業用水路網のKL地点と、揖斐川農業用水路網のIA地点では、塩基長ごとの対立遺伝子数に偏りが生じ、他の区域に比べて平均値のヘテロ接合度が低い傾向にあることから、遺伝的劣化が生じていることが明らかにされた。その要因として、KL地点では、本川と支川を結ぶ農業用水路内に設置された階段式魚道の総落差が大きいこと、IA地点は、揖斐川農業用水路の上流部において落差工が複数段設置されており、一方向的な遺伝的な供給源として独立している状態にある。

2) 管瀬川および揖斐川農業用水路網について遺伝的距離を算出し、主座標分析を行った結果、管瀬川農業用水路と揖斐川農業用水路の第一主座標において、遺伝的分化が確認され独立した水系ごとに異なる遺伝的特徴をもつことが示された。

ネットワーク工法の支援は遺伝的多様性の維持に貢献し、その効果目標値としてパラメータを設定できるので、本研究のようなアプローチは、集団の持続可能性を診断する有効なツールとして利用可能である一端が示された。

表-1 遺伝的分化指数 F_{ST} と遺伝的分化状況

	KA	KB	KC	KE	KF	KJ	KL	KM	IA	IB
KA	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
KB	0.005	-	-	-	-	-	+	-	+	-
KC	0.012	0.003	-	-	-	-	+	-	+	-
KE	0.009	-0.014	0.012	-	-	-	+	-	+	-
KF	0.022	-0.005	0.015	0.002	-	-	+	-	+	-
KJ	0.016	-0.012	-0.002	0.001	-0.009	-	+	-	+	-
KL	0.033	0.043	0.043	0.022	0.022	0.056	-	+	+	+
KM	0.010	-0.008	0.005	-0.010	0.012	-0.009	0.025	-	+	-
IA	0.026	0.058	0.046	0.059	0.083	0.092	0.109	0.062	-	+
IB	0.004	0.002	0.009	-0.001	0.004	-0.016	0.026	-0.014	0.059	-

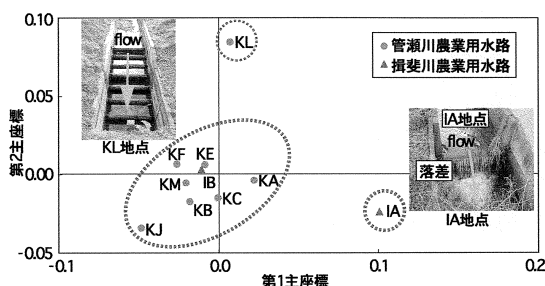


図-3 主座標分析による遺伝的分化

今後は、DNA 解析による生物集団の遺伝的特性を解明するとともに、このような遺伝的分化が将来的な集団の存続にどのように関わってくるのか、それを予測可能とするシミュレーション解析等を進める予定である。

謝辞：現地調査の遂行に際しては、水圏域環境研究会の会員各位（本田 浩昭氏、西村 美信氏、長橋 宏信氏）に多大な協力をいただいた。最後に記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 楠田尚史，小野山敬一，紺野康夫：応用個体群生態学，263p.，文一総合出版，2002。
- 2) 種植物学会編：森の分子生態学，pp.110-119，文一総合出版，2001。
- 3) 青木 宙，隆島史生，平野哲也：魚類の DNA，3p.，恒星社厚生閣，1997。
- 4) 小出水規行，村岡敬子，竹村武士，奥島修二：マイクロサテライト DNA を用いた農業排水路におけるドジョウ個体群の遺伝的特性の予備的検討，pp.133-134，農業土木学会論文集，No.233，2004。
- 5) 小出水規行，渡部恵司，高振麗，水谷正一，森 淳，竹村武士：マイクロサテライト DNA を用いた栃木県小貝川上流域のホトケドジョウ集団の予備遺伝解析，pp.724-725，農業農村工学会講演要旨集，2008。
- 6) 向井輝美，石和貞夫：集団遺伝学入門，254p.，培風館，1987。
- 7) 根井正利，S.クマー：分子進化と分子系統学，246p.，培風館，2006。
- 8) 水谷正一，森 淳編著：春の小川の淡水魚-その生息場と保全-，DNA 解析からみた淡水魚とその保全（分担執筆），pp.121-148，学報社，2009。

GENETIC PROPERTY OF LOACH POPULATION USING MICRO SATELLITE DNA - IN THE CASE OF IBI AGRICULTURAL IRRIGATION SYSTEM-

Kiyoshi WADA, Noriyuki KOIZUMI, Takahiro FUJII and Shigeru TEREMACHI

In this research, micro satellite DNA has analyzed in order to investigate the influence for habitat continuity of agricultural irrigation system in Ibi river basin. Micro satellite DNA was applied to the fish population analysis in the irrigation network, the technique has evaluated the past record of movement before several times generation. Based on calculating results, the differentiation of each regional population statistically, genetic splintering had been occurred inside the same irrigation system that exist discontinuity occurrence such as ground sill and fish passage. In addition, according to the coordinates analysis result between two agricultural irrigation systems, genetic differences had been recognized. It was verified that each irrigation system has different genetic characteristics. The applied technique has effective to assume the polymorphic micro satellite in agricultural irrigation system.