

小貝川上流域におけるホトケドジョウの遺伝的構造の解明：
マイクロサテライト DNA マーカーを用いた予備解析
Genetic structure of the Japanese eight-barbel loach in the upper basin of
Kokai River: preliminary analysis using microsatellite DNA markers

○小出水規行*・渡部恵司*・高 振麗**・水谷正一***・竹村武士*・森 淳*
N. KOIZUMI, K. WATABE, Z. Gao, M. MIZUTANI, T. TAKEMURA and A. MORI

1. はじめに

水田生態系の魚類保全に向けて様々なフィールド研究が実施される中、著者らは環境整備事業等での保全対象種に指定されやすいホトケドジョウ *Lefua echigonia* について、その存続可能性評価を支援する遺伝特性の解明研究を展開している。本発表では、小貝川上流域内の集団構造はミトコンドリアDNAによって十分に把握できないことから(高ら, 2008), 核DNA上に点在するCA, CT等の繰り返し塩基配列(以下、「マイクロサテライト/MS」)をマーカーとする集団構造の予備的解析を行った。なお、MSマーカーは個体レベルの遺伝的変異を特定でき、実際、ヒトや樹木の親子鑑定や個体識別等にも利用されている。

2. 材料と方法

1) 分析標本 小貝川上流域の5地点及び近接(比較対照)の荒川上流域の1地点(図1のK1~K5及びA1)における採捕個体(各地点24~27個体; 2007年8月~9月に採捕)から、1地点につき無作為に選んだ8個体の尾ヒレ標本(3~5mm四方を100%エタノールで固定し、-30℃保管したもの; 標準体長1.6~5.2cm)を分析に使用した。

2) DNA分析 尾ヒレ標本の一部から各個体のDNAを抽出し、Koizumi et al. (2007) 等によるMSマーカー12個について、それぞれ塩基配列を特異的にPCR増幅させた。PCR増幅に必要なプライマー配列、試薬組成、反応条件等についてはすべてKoizumi et al. (2007) を参考にした。

3) 集団構造の遺伝解析 PCR増幅した産物については、その塩基配列長をシーケンサーによって計測し、得られた配列長(以下、「対立遺伝子」)のデータを遺伝解析の基礎データに用いた。解析では各採捕地点の標本8個体を1集団(計6集団)とみなして、集団内の遺伝的多様性及び集団間の遺伝的分化(差異)について検討した。

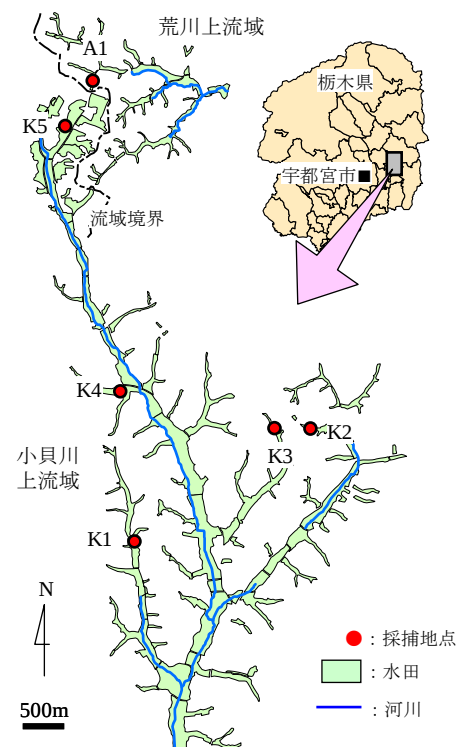


図1 分析標本の採捕地点
Collection sites for analyzed specimens

*農村工学研究所 (National Institute for Rural Engineering), **宇都宮大学大学院農学研究科 (Graduate School of Agriculture, Utsunomiya University), ***宇都宮大学 (Utsunomiya University)
キーワード: ホトケドジョウ, マイクロサテライト DNA, 小貝川上流域

3. 結果とまとめ

1) 標本集団内の遺伝的多様性 12 マーカーの対立遺伝子（配列長）データから推定した 1 マーカーあたり対立遺伝子数及びヘテロ接合度[1（多様）～0（単一）で標準化した多様性指標]の観測値と理論値の平均を図 2 に示す．各集団の対立遺伝子数は 4.4（集団 K5）～5.3（K3）の範囲にあり，どの集団もその数は同程度となった．ヘテロ接合度は観測値で 0.527（K2）～0.661（K1），理論値で 0.581（K2）～0.657（A1）となり，これらについても両者の値は集団間で類似した（図 2）．

概して，どの標本集団も遺伝的多様性のレベルは同等であり，そのレベルはアフリカライオンやショウジョウバエ等の一般的な非絶滅危惧種と変わりなかった．

2) 標本集団間の遺伝的分化 各標本集団におけるヘテロ接合度の観測値と理論値（図 2）に有意差は認められなかった（ $p>0.05$ ）．このことは集団の交配は任意であり，すべての集団を遺伝的分化（差異）の解析に利用できることを意味している．標本集団間の遺伝的分化については，その相対的な尺度となる F_{ST} [1（完全分化）～0（非分化）で標準化した指標] を計算し，求めた値を表 1 に，近隣結合法により集団構造を可視化した F_{ST} の系統樹を図 3 に示す．

F_{ST} はどの値も 0 ではなく（ $p>0.05$ ），集団間には 0.043（集団間 K1–K3，K3–K4）～0.180（K4–A1）の範囲で分化が認められた（表 1）．K1～K5（小貝川上流域）–A1（荒川上流域）の F_{ST} は平均 0.147，K1～K5 内では平均 0.078 となり，遺伝的分化は流域間で大きくなる傾向が認められた（図 3）．ただし，分散分析 AMOVA により，流域がもたらす遺伝的分化への影響を

分析したところ，その影響は小さく（ $p>0.05$ ），割合にして全体の 7.7%に過ぎなかった．

3) まとめ 近接流域や流域内における集団構造の解析には MS マーカーが有効と推察される．当発表の解析では遺伝的分化の要因まで特定できなかったが，これについては地点数やサンプル数を増やすことにより，集団構造をより明確にできると考えられる．

4) 参考文献 高ら（2008）：平成 20 年度農業農村工学会大会講演要旨集，印刷中．

Koizumi et al. (2007): *Molecular Ecology Notes*, 7, 836-838.

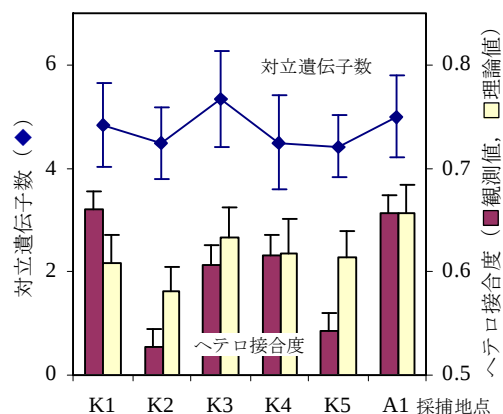


図 2 標本 6 集団における 1 マーカーあたり対立遺伝子数及びヘテロ接合度の観測値と理論値の平均（エラー・バーは標準誤差を示す）
Averages of number of alleles and observed and expected heterozygosity per marker for analyzed six populations (error bar means standard error)

表 1 標本 6 集団間の相対的な遺伝的分化尺度 F_{ST}
Pairwise comparison of F_{ST} values for genetic differentiation among analyzed six populations

集団	K1	K2	K3	K4	K5	A1
K1	0					
K2	0.056	0				
K3	0.043	0.059	0			
K4	0.103	0.136	0.043	0		
K5	0.102	0.093	0.054	0.094	0	
A1	0.142	0.156	0.137	0.180	0.121	0

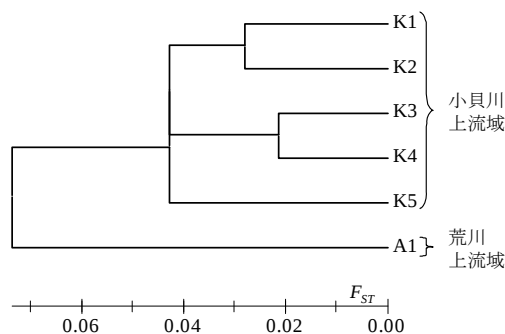


図 3 標本 6 集団の遺伝的分化の構造（近隣接合法による F_{ST} の系統樹）
Structure of genetic differentiation among analyzed populations (Neighbor-joining tree of F_{ST})