

ミトコンドリア DNA による栃木県東部のホトケドジョウの系統分析 Phylogenetic analysis of the Japanese eight-barbel loach population in the eastern part of Tochigi Prefecture using mitochondrial DNA sequences

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

1. はじめに

農業生産性を向上させるための圃場整備は、水路の三面コンクリート化、農道舗装や落差工の設置などにより、魚類をはじめとする生物の生息環境の悪化を招いた。ホトケドジョウ *Lefua echigonia* はこのような影響を受けやすい種として、環境省のレッドデータブック・絶滅危惧IB類に指定されている（環境省，2003）。現在、ホトケドジョウの保全に向けて、生息環境要因、個体の移動、繁殖などの研究（例えば、満尾，2007；柿野，2006；守山，2005）が多く行われているが、遺伝的レベルの変異について研究した事例はまだ少ない。本発表では栃木県東部のホトケドジョウを対象とし、ミトコンドリアDNA上のD-loop塩基配列を用いた系統分析を行い、対象集団の遺伝的特性について明らかにする。

2. 材料と方法

1) 栃木県東部の小貝川 2 地点，大川 2 地点，谷川 1 地点において（図 1），各地点 4～11 個体（計 35 個体，標準体長 1.5～4.0cm）を採捕し，100%エタノールを用いて分析用の尾ヒレ固定標本（4mm 四方）を作成した。

2) 尾ヒレ標本の一部から各個体の DNA を抽出し，それを用いてミトコンドリア DNA 上の D-loop 塩基配列を特異的に PCR 増幅させた。増幅に必要なプライマー配列，試薬組成，反応条件等は Mihara et al. (2005) に準拠した。

なお，D-loop は調節領域と呼ばれる遺伝的機能をもたない 1,000 塩基程度の配列である。配列の時間的違いは 1 塩基あたり平均 50～100 万年とされ，種内における地域判別等の DNA マーカーとして利用されている。

3) PCR 増幅した産物を精製及びシーケンスし，個体ごとに決定された D-loop 配列データを用いて，次の系統分析を行った。まず，すべての配列データを整理・比較して，塩基置換（A→T, G→C への置換）によって生じた配列の種類「ハプロタイプ」を特定後，各地点におけるハプロタイプの出現状況を確認した。次に，これらのハプロタイプ配列と既存の全国配列（Mihara et al., 2005）を使用して，近隣結合法による系統樹から分析標本の地域集団属性について検討した。

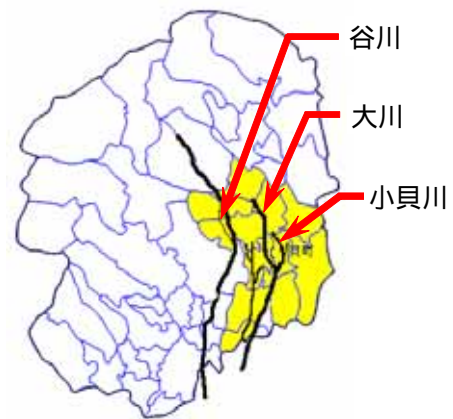


図 1 分析標本の採捕地点
Sampling sites for analyzed specimens

*宇都宮大学大学院（Graduate School of Utsunomiya University），**農村工学研究所（National Institute for Rural Engineering），***宇都宮大学（Utsunomiya University）

キーワード：ホトケドジョウ，ミトコンドリア DNA，栃木県東部，系統分析

表 1 分析標本から特定された D-loop 配列のハプロタイプとその塩基置換状況
Haplotypes of D-loop sequences specified from analyzed specimens and sequence substitutions among the haplotypes

ハプロタイプ	採捕地点の標本個体数						塩基置換の生じた配列部位 (番号)																					
	小貝川 a	小貝川 b	大川 a	大川 b	谷川	計	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
1	1					1	T	C	G	A	T	A	A	G	T	T	C	G	T	A	A	T	C	G	A	A	T	A
2	1					1	.	A	.	.	C	G	.	A	.	.	.	A	.	T	.	C	
3	1					1	C	.	A	.	C	G	T	T	
4	1					1	.	.	A	.	C	G	T	.	T	.	.	T	.	T	
5	3					3	C	.	A	.	C	G	T	T	.	T	
6		1				1	C	G	T	
7		1				1	C	G	T	.	T	.	.	.	A	.	
8		1				1	.	A	.	.	C	G	.	A	.	.	.	A	.	C	T	.	.	C	.	.	T	
9		1	7	3		11	C	G	T	
10			1	1		2	C	G	.	.	.	C	T	
11			2	1		3	C	G	T	.	T	
12			1			1	G	T	.	T	
13				1		1	C	G	T	.	T	.	T	T	.	T	
14				3		3	C	G	T	
15					1	1	.	.	A	.	C	G	.	.	C	
16					1	1	.	.	A	.	C	G	T	A	.	.	T	
17					2	2	.	.	A	.	C	G	
計	7	4	11	9	4	35																						

3. 結果と考察

1) 分析標本 35 個体の D-loop 配列 (904 ~ 905 塩基) から計 17 ハプロタイプが特定され, ハプロタイプ間の 1 塩基あたり塩基置換率は 2% (=22/905) にとどまった (表 1). 採捕地点別にみたハプロタイプは 1~8 番目が小貝川, 10~14 番目が大川, 15~17 番目が谷川に対応し, 9 番目のみ小貝川と大川の両方に出現した. 塩基置換はわずかであるが, 特定されたハプロタイプには水系による違いが反映されているように思われた.

2) 分析標本及び全国域の計 44 ハプロタイプ配列を用いた近隣結合法による系統樹を図 2 に示す. 分析標本のハプロタイプはすべて北関東集団に属し, 中でも栃木県今市の配列と類似していた. しかし, 標本間の分岐は浅く, 採捕地点に関連する地域的集団までは形成されなかった.

このことは隣接流域や流域内等の空間スケールにおいて, より詳細な分析を行うためには, マイクロサテライト等の個体識別可能な DNA マーカーが必要なことを示唆している. 参考文献 Mihara et al (2005) *Zoological Science* 22, 157-168.

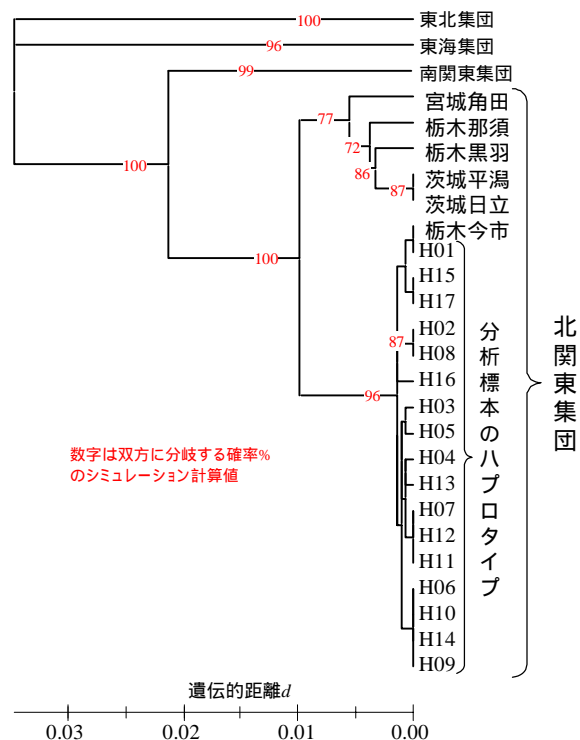


図 2 分析標本及び全国域 (Mihara et al., 2005) のハプロタイプを用いた近隣結合法による系統樹
Neighbor-Joining tree of haplotypes sequences among analyzed specimens and all Japan areas from Mihara et al. (2005)