

マイクロサテライト DNA による栃木県小貝川上流域における ホトケドジョウ集団の遺伝構造解析

Genetic structure analysis of populations of the Japanese eight-barbel loach in the upper basin of Kokai River, Tochigi Prefecture by microsatellite DNA

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

1. はじめに

筆者らは遺伝情報を利用した魚類資源の保全に向けて、栃木県南東部地域におけるホトケドジョウ集団の遺伝解析を進めている。これまで当該地域の集団は国内に存在する6地域クレード(分岐群)のうち、北関東クレードに属することがミトコンドリア DNA によって明らかにされ(小出水ら, 2009), さらに河川水系の地理的配置に関連して集団には遺伝的差異が生じていることをマイクロサテライト DNA (以下, MsDNA) によって解明した(Koizumi et al., 2009)。本発表では当該地域の中から小貝川上流域に焦点をあて、同一流域内における集団の遺伝構造を解析する。MsDNA は核 DNA 上に散在する CA, CT 等の繰り返し塩基配列を指し, この配列をマーカーとして利用すると個体レベルの遺伝的差異を推定できる。MsDNA はヒトや樹木の親子鑑定や個体識別等に使用されている。

2. 材料と方法

1) 分析サンプル 小貝川上流域の地点 K1~K21, 近隣の桜川, 大川, 五行川, 荒川の各地点 S1, O1, G1, A1~A2 を対象とし(計 26 地点, 図 1), それぞれ 7~30 個体(計 580 個体)を 2007 年 8 月~2008 年 6 月に採捕した。現場では採捕個体の尾ヒレを数 mm 切除し, それを 100%エタノールで固定後, 再放流した。固定した尾ヒレ標本については-30°Cで保管した。

2) DNA データ 各個体の尾ヒレ標本から DNA を抽出し, 分析に使用するまで 4°Cで保管した。MsDNA マーカーとして 11 遺伝子座の塩基配列を特異的に PCR 増幅させ, 増幅方法については小出水ら(2008)等に準拠した。増幅された各遺伝子座の PCR 産物について, 個体ごとに 2 つの塩基配列長(それぞれの配列長は両親から遺伝し, 対立遺伝子として取り扱われる)を DNA シーケンサーで決定し, その配列長の組み合わせ(遺伝子型)を以下のデータ解析に使用した。

3) データ解析 11 遺伝子座の遺伝子型データから各地点サンプルの遺伝的多様性について対立遺伝子数, ヘテロ接合度の観察値と理論値を推定した。遺伝構造解析としてサンプル間の遺伝距離 D_A (Nei et al., 1983) を推定し, それに基づく近隣結合法 (Saitou and Nei,

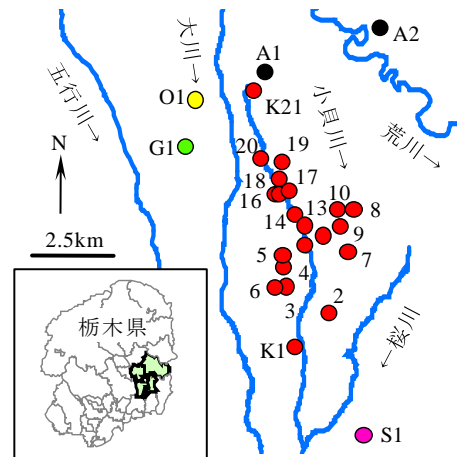


図 1 サンプル採捕地点
Sample collection sites

*農村工学研究所 (National Institute for Rural Engineering), **宇都宮大学農学部 (Faculty of Agriculture, Utsunomiya University)

キーワード: ホトケドジョウ, マイクロサテライト DNA, 栃木県小貝川上流域

1987) の系統樹を作成した. さらに *F* モデル (Falush et al., 2003) を利用して, サンプルの共通祖先から分化したクラスター (仮想) 集団を推定し, 各地点におけるクラスター組成の構造について検討した.

3. 結果とまとめ

1) 遺伝的多様性 各地点サンプルの 1 遺伝子座あたり対立遺伝子数は平均 4.45~8.00, ヘテロ接合度の観察値は平均 0.42~0.67, 期待値は 0.51~0.67 となった (図 2). これらの値は世界的に知られている絶滅危惧種よりも高く (例えば, クバリーガラスの対立遺伝子数は 1.80, ヘテロ接合度は 0.16 しかない; Frankham, 2000), 各サンプルに遺伝的多様性の劣化は認められなかった. また, ヘテロ接合度の観察値と期待値に大きな差はなく, すべてのサンプルにハーディ・ワインベルグ平衡が仮定された.

2) 系統樹の構造 遺伝距離 D_A による近隣結合法の系統樹を図 3 に示す. 小貝川の各地点サンプルは K8 を除いて 1 つのクレードに集約され, 他の河川とは遺伝的に異なることが 90% のブートストラップ確率で支持された. クレード内にはさらに上・中・下流に相当するサブクレードの存在が推察されるが (図 3), どれも分岐は浅いことから, 流域内での遺伝的分化はあまり進んでいないと思われる.

3) クラスター組成の構造 小貝川のすべての地点サンプルが共通祖先をもつと仮定した場合, 現在までに受けたサンプルの遺伝的分化には 5 つのクラスター集団が関与していると推定された. サンプルに占める各クラスターの割合から (図 4), クラスター I は下流, クラスター II と III は中流, クラスター IV と V は上流に関連するものと考えられ, 小貝川については河川流が集団の遺伝構造を支配する要因になり得る可能性が示唆された. 今後はこのような小貝川集団の遺伝的特徴が地域または種特異的なものなのか, 事例蓄積を踏まえた比較評価が期待される.

4) 参考文献 Falush et al. (2003): *Genetics*, **164**, 1567-1687. Frankham (2000): Springer-Verlag, 259-273. 小出水ら (2008): 農業農村工学会論文集, **256**, 55-61. 小出水ら (2009): 農業農村工学会論文集 (投稿中). Koizumi et al. (2009): *Proc. 33th IAHR Congress* (in submission). Nei et al. (1983): *J. Mol. Evol.*, **19**, 153-170. Saitou and Nei (1987): *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.

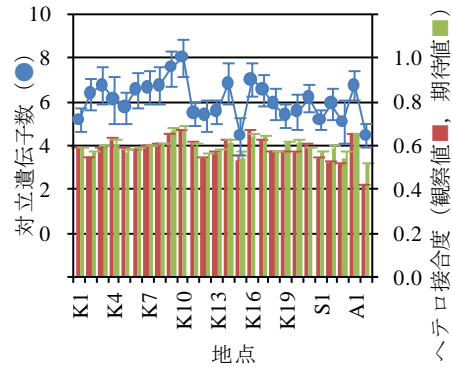


図 2 対立遺伝子数とヘテロ接合度
Number of alleles and heterozygosities

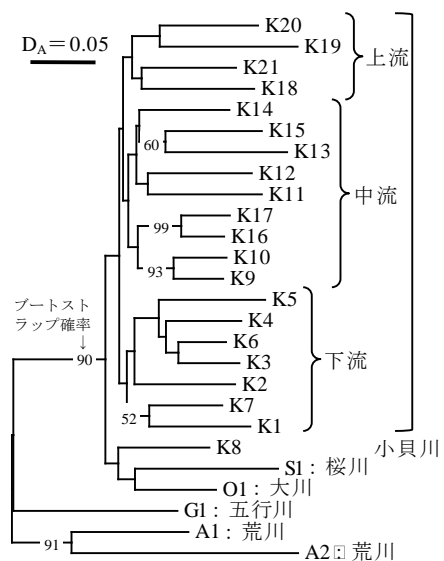


図 3 D_A による近隣結合法の系統樹
Neighbor-joining tree using D_A

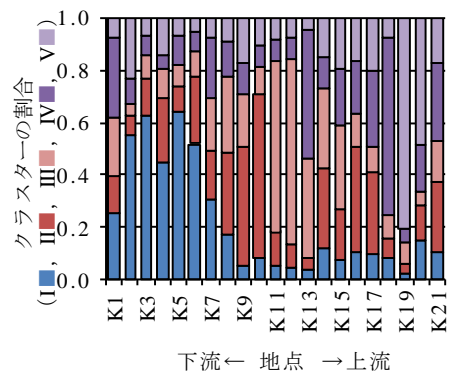


図 4 各サンプルのクラスター組成
Cluster compositions of each sample