

メダカの判別における有効なマイクロサテライトマーカーの開発

【目的】生物の往来が自由であった農業用水路なども現在では圃場整備によって生物の移動が困難になっている。これは水路内の生物多様性に何らかの影響を与えていると考えられるが、影響の程度は見かけだけでは判断しがたいため、遺伝的観点から解析・評価がなされている。DNAのマイクロサテライト領域は変異性が高く個体識別や親子鑑定などで広く用いられており、遺伝的多様性の評価に適している。そこでゲノム（全遺伝情報）解析がなされているメダカを対象とし、マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的多様性の評価を試みる研究がなされている。メダカについては昨年までに5対のプライマーが開発されているが、移動の推定や遺伝的分化の解析を正確におこなうためには15対ほどのプライマーがあることが望ましい。本研究ではより細かく正確なメダカの移動の推定や遺伝的分化の程度の分析を可能とすることを目的とし、特異的なマイクロサテライト部分を増幅することのできるプライマーの更なる開発を目指した。

【方法】愛知県あま市二ツ寺西、大阪府茨木市玉島台、石川県河北郡津幡町の3集団のメダカを対象とし、それぞれ30個体、30個体、17個体の計77個体についてDNAを抽出した。作成したプログラムによってメダカの塩基配列データよりマイクロサテライト領域を抽出し、設計したプライマーを用いてPCRによって増幅させた。その後、アガロースゲルで電気泳動にかけ、DNA断片の増幅が見られたものに対しシーケンスをおこなった。目的とした塩基配列が増幅されているものをアクリルアミドゲルで電気泳動にかけ、泳動パターンを解析し遺伝的分化の評価をした。

【結果及び考察】設計した46対のプライマーのうち、9対のプライマーで目的配列の増幅が確認できた。そのうち、ハーディー・ワインベルグ平衡からの有意なずれ（ $p < 0.005$ ）が確認されたものは3対であった。ずれが確認されなかった6対のプライマーについては統計ソフト Arlequin ver.3.1 を用いて分子分散分析（AMOVA； Analysis of Molecular Variance）をおこない、遺伝的分化指数（ F_{ST} ）を算出した。 F_{ST} は値が大きいほど遺伝的分化の程度が大きいことを示す。計算の結果、愛知—大阪間、愛知—石川間、大阪—石川間の F_{ST} 値はそれぞれ0.044、0.263、0.177となり、全ての標本集団間の組み合わせにおいて0から有意に離れていたため（ $p < 0.0001$ ）、遺伝的に分化しているといえる。日本のメダカは遺伝的な違いにより大きく北日本集団と南日本集団の2つに分けられており、本研究で解析した3集団では愛知・大阪のメダカが南日本集団、石川のメダカが北日本集団に分類されている。愛知—石川間と大阪—石川間が愛知—大阪間の F_{ST} 値よりも大きくなったのは、両集団における分化の程度が大きいためであると考えられる。以上の結果より、これら6対のマイクロサテライトマーカーはメダカの判別と集団解析に有効である可能性があると考えられ、今後も継続して有効なマーカーを開発することで、遺伝的多様性のより詳細な評価が可能と思われる。