

メダカの判別における有効なマイクロサテライト DNA マーカーの開発

【目的】生物の移動を制限するような圃場整備は、農業用水路などの水路内における生物多様性に影響を及ぼしていると考えられる。魚道などの生態系に配慮した工法もあるが、これらの整備がどの程度有効であるかを見かけで判断することは難しい。特に個体群の多様性を評価するには遺伝的手法を用いる必要がある。DNA マイクロサテライト領域は、ゲノム中の他の中立的な領域と比べて変異性が高く、親子解析や集団遺伝学、連鎖地図の作成などにも用いられている。これまで、このマイクロサテライト多型を利用してメダカを判別し、その移動範囲の推定と地域の多様性を評価する試みがなされている。メダカは全塩基配列が解読されており実験動物としての歴史も古い。しかし、依然としてメダカのマイクロサテライト DNA マーカーは少なく、昨年までに開発されたプライマーは 11 対に限られている。本研究ではメダカのより正確な移動の推定や遺伝的分化の解析を行うために必要となるプライマーの更なる開発を目的とする。

【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 個体から DNA を抽出した。塩基配列の中から目的領域を抽出できるプログラムによってマイクロサテライト領域を抽出し、これを基に Primer3 (プライマー設計支援ソフトウェア) によって設計したプライマーを用いて PCR を行い DNA 断片を増幅させ、アガロースゲル電気泳動を行った。増幅が見られたプライマーに対してはアクリルアミド電気泳動を行い、得られた結果を解析して遺伝的分化を評価した。

【結果および考察】設計した 46 対のプライマーの内、8 対のプライマーで目的配列の増幅が確認できた。このうち、3 集団全てにおいて Hardy-Weinberg 平衡が成立する ($p < 0.05$) ものは 1 対であった。このプライマーについて統計ソフト Arlequin ver.3.1 を用いて AMOVA (分子分散分析) を行い、遺伝的分化指数 (F_{ST}) を算出した。この値が大きいほど分化の程度が大きいことを示す。プライマー 1 対ではデータが少なく正確に解析が行われないう可能性があるため、前年度開発した 6 対のプライマーと合わせて解析した。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 0.066、0.218、0.190 となり、全ての標本集団間で 0 から有意に離れていたため ($p < 0.0001$)、これら 3 集団は遺伝的に分化していると考えられる。日本のメダカは遺伝的な違いから、北日本集団と南日本集団に分かれており、今回の 3 集団では愛知、大阪が南日本集団、石川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、この 1 対のプライマーはメダカの判別と集団解析に有効であることが示唆された。今後も継続して更なるプライマーを開発することで、メダカ遺伝的多様性のより詳細な評価が可能になると思われる。