

# ヒメヒラタカゲロウDNAからのミニサテライト・ マイクロサテライト配列の収集と多型解析

四反田武志<sup>1</sup> 小堀峻吾<sup>2</sup> 竹門康弘<sup>3</sup> 谷田一三<sup>2</sup> 加藤幹男<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>大阪府立大学・総科・自然環境、<sup>2</sup>大阪府立大学・理・生物、<sup>3</sup>京都大学・防災研)

## 「緒言」

河川にすむ水生昆虫は、一般に幼虫時には水流によって河川を流下し、羽化後の成虫は飛行によって河川を遡上したり別の水域にまで移動することによって、その生息域を拡張あるいは維持している。これらの生物の生活史の研究や生息域の環境評価をするためには、集団の移動や集団間の遺伝的交流を調べるのが必須である。

個体や集団の識別には、DNA 配列に基づく分子マーカーが重要な役割をはたしている。例えば、マイクロサテライト鎖長多型や単一ヌクレオチド多型 (SNPs)、ミトコンドリア DNA 塩基置換ハプロタイプ多型等が、生態学、法医学、臨床遺伝学など広い分野において個体識別やさまざまな遺伝的関係の解明に利用されている。

本研究では、日本各地の河川上流域から中流域にかけて生息するヒメヒラタカゲロウ *Rhithrogena japonica* Ueno を材料として、DNA 配列に基づく分子マーカーを設定し、生息地の集団構成の年次変動や地域間の遺伝的関係を解析することによってヒメヒラタカゲロウ個体群を特徴づけること、および、自然の地形やダム等の人為工作物の環境影響をヒメヒラタカゲロウの移動障壁という視点から評価することを目標としている。そのために、まず、分子マーカーの確立を進めているので、その経過について報告する。

## 「方法」

和歌山県紀ノ川水系丹生川から採集したヒメヒラタカゲロウの雄成虫から貯精嚢を取り出し、これから高分子ゲノム DNA を抽出した。制限酵素 EcoRI で切断後、pUC19 ベクターに連結し、大腸菌の形質転換に用いた。クローン化 DNA に対して、標識されたヒメヒラタカゲロウ全ゲノム DNA をプローブとしたハイブリダイゼーション実験を行い、ハイブリダイゼーションシグナル強度の大きいものを選び出した。クローン化 DNA 断片を制限酵素 TaqI にて切断し、サブクローンを得て、塩基配列を決定した。

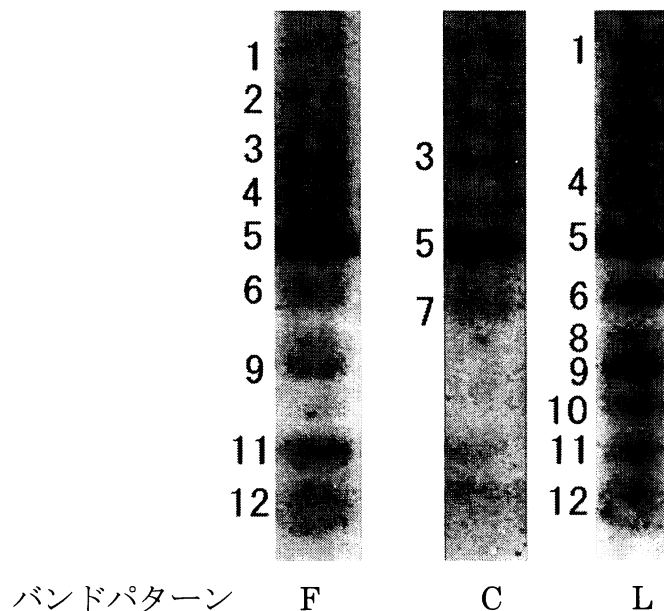
## 「結果」

最初に得たクローン化 DNA から、26 個の陽性クローンを同定した。さらにそのうちの 14 個が特に強いシグナルを示したため、これらから塩基配列解析に取り掛かった。配列解析が進んでいるものから、マイクロサテライト配列(CT/AG)<sub>n</sub> を持つクローン

を 2 個、および 107 塩基対を単位鎖長とするミニサテライト配列を持つクローンを 1 個見出した。そこで、2004 年に採集した 33 個体のゲノム DNA を鋳型にして PCR を行い、(CT/AG) $n$  の鎖長多型と、ミニサテライト座位間増幅可能領域 DNA の多型について解析した (図 1)。その結果、これらの座位は多型的であり、その対立遺伝子頻度 (マイクロサテライト) および電気泳動バンドパターン頻度 (ミニサテライト) を用いて集団を特徴付けることができた。丹生川の試料については、2004 年を含めて 3 年分の集団 (約 30 個体ずつ) を保管しているのので、年次ごとに比較するとともに、他の地域からの採集個体を集めて解析を進めていきたい。

謝辞：本研究は河川環境管理財団平成 19 年度河川整備基金の助成を受けた。

図 1 ミニサテライトマーカーによる反復間領域増幅 DNA 断片の電気泳動図の例



増幅される PCR 産物のサイズの大きい方から順に 1-12 と番号付けし、それぞれのバンドの有無によってバンドパターンを A-L まで分類した。