

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580340

研究課題名(和文) 農村生態系の遺伝的多様性をはかるDNAマーカー単離手法の開発

研究課題名(英文) Development of an isolation method of microsatellite DNA markers for evaluation of genetic diversity of organisms in rural areas

研究代表者

小出水 規行(Koizumi, Noriyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究所・資源循環工学研究領域・主任研究員

研究者番号：60301222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：農村地域に生息する生物の遺伝的多様性をはかるため、5つの工程からなるマイクロサテライトDNAマーカーの単離手法を開発した。魚類、トンボ類、アミ類の計7種に本手法を適用した結果、各種について19～40のマイクロサテライトDNAマーカーを開発することができた。さらに、開発したマーカーは遺伝的集団解析に利用できることを確認し、当単離手法を用いての更なるマーカー開発と解析事例の蓄積が期待された。

研究成果の概要(英文)：An isolation method of microsatellite DNA markers was developed for the evaluation of genetic diversity of organisms inhabiting rural areas. This method was composed of five processes such as DNA extraction, DNA fragmentation, screening of microsatellite regions, etc. Applying this method, nineteen to forty of novel microsatellite DNA markers were isolated and characterized for seven species of fish, dragonfly and mysid collected from agricultural canals. Furthermore, these markers were available for practical analysis of their genetic diversity and the structures of their populations. The development of the markers for other species based on this method and the investigation of genetic diversity using the developed markers are expected in the near future.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業土木学・農村計画学

キーワード：マイクロサテライトDNA 遺伝子多様性 農村生態系

1. 研究開始当初の背景

農村地域における生物多様性を理解するには、その構成要素の基幹となる遺伝子多様性 [ある生物種の個体間または個体の集まり (集団) 間にみられる遺伝子タイプ (型) の多様性] を調べる必要がある。ところが、これまでの農村生態系研究は、現地フィールドを対象とした生息種の確認、個体数分布の推定、季節や水路環境要因が生息場に及ぼす影響の解明、魚道開発等が中心となり、遺伝子多様性に着目した研究事例は数少ない。実際、ドジョウ等の普通種でさえ、遺伝子多様性の実態は断片的にしか知られていない。数多くの希少種が生息する農村地域において、どの種が遺伝子多様性を失っているのかをはかる技術開発やその結果に基づく保全対策の提案等に取り組まなければ、近い将来、多くの種を失ってしまう可能性がある。

2. 研究の目的

当研究課題では、遺伝的多様性をはかるために汎用されているマイクロサテライト DNA マーカーの単離手法の開発に焦点を当て、魚類や昆虫類等の様々な生物種に適用でき、効率よく数カ月程度で単離可能な手法を開発する。マイクロサテライト DNA とは、核 DNA 中に散在し、遺伝子としての機能はもたないが、CA、CT、GAA 等の数塩基配列が数回～数 10 回繰り返されている配列を指す。これまでマイクロサテライト DNA のマーカー開発には、約半年～1 年程度の時間とかなりの労力が必要とされ、開発の需要に追いつかないのが現状である。当研究課題においては次の 3 テーマについて取り組んだ。テーマ 1: これまでのマーカー開発 (単離) 手法の見直しによる単離工程の構築、テーマ 2: 構築した工程に基づくマイクロサテライト DNA マーカーの開発、テーマ 3: 開発したマーカーの遺伝的集団解析への適用、について実施した。

3. 研究の方法

(1) テーマ 1: 既存手法の整理と単離工程の構築

既存の単離手法を対象に、それぞれの長所や短所等の特徴を整理し、効率的な単離工程を構築した。特に、ここでは工程の簡略化を目指し、対象種から抽出した DNA の断片化処理、遺伝子組み換えとスクリーニング作業等について、近年の開発試薬の利用可能性を踏まえながら検討した。

(2) テーマ 2: 構築した工程に基づくマイクロサテライト DNA マーカーの開発

構築した工程は、概して供試サンプルからの DNA 抽出、抽出した DNA の断片化、遺伝子

組み換えとスクリーニング、スクリーニングされた大腸菌 DNA の塩基配列決定からなる。これら一連の工程に基づき、魚類、トンボ類、アミ類のマイクロサテライト DNA マーカーを開発した。開発においては、マーカーとすぐに利用できるような、Polymerase Chain Reaction (PCR) プライマーを設計後、供試個体を用いて PCR 増幅の成否を確認し、遺伝的パラメータ (対立遺伝子数、ヘテロ接合度等) を推定した。開発するマーカー数は対象種によって異なるが、その後の遺伝的集団解析への適用を考慮して、各種 10～20 マーカーを目標とした。

(3) テーマ 3: 開発したマーカーの遺伝的集団解析への適用

開発したマーカーの一部を用いて遺伝的集団解析を実施し、マーカーの実用性について確認した。解析内容として複数地点のサンプルを対象に、各地点 (集団内) の遺伝子多様性レベルを対立遺伝子数とヘテロ接合度の推定値により評価した。さらに地点間 (集団間) の遺伝構造を明らかにするために、集団間に潜在する遺伝的クラスターを特定し、集団におけるクラスター組成を推定した。

4. 研究成果

(1) テーマ 1: 既存手法の整理と単離工程の構築

既存手法の整理

一般的な従来法 (対象種の DNA 断片を大腸菌に組み込み、マイクロサテライト DNA が入ったコロニーをプローブ検出する方法) に加えて、主として 6 手法 (手法 1: PCR isolation of microsatellite arrays 法, 手法 2: Anchored primer PCR 法, 手法 3: Dual

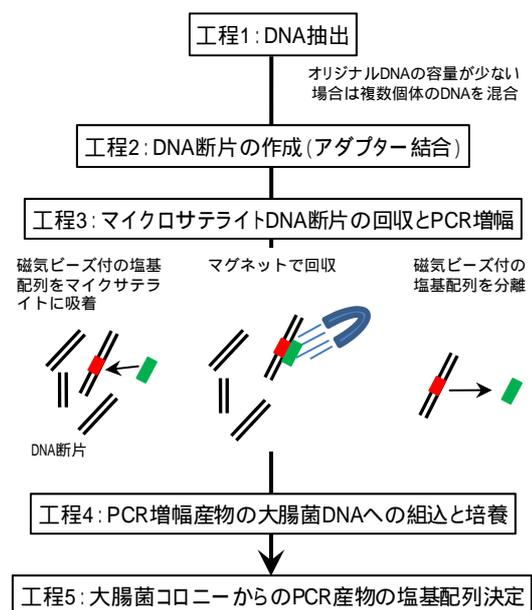


図1 構築した単離工程の概略

suppression PCR 法, 手法 4: Vectorette PCR-based 法, 手法 5: Primer extension 法, 手法 6: Selective hybridization 法) が考案されていた. 従来法と比較して, 手法 1~4 には対象種のオリジナル DNA を増幅させる処理, 手法 5, 6 には大腸菌に組み込むマイクロサテライト DNA 断片を濃縮させる処理が含まれている等の特徴を抽出した.

単離工程の構築

既存手法に鑑みながら, 次の 5 工程を構築した (図 1). 工程 1 は DNA 抽出, 工程 2 は DNA 断片の作成, 工程 3 はマイクロサテライト DNA 断片の回収とその PCR 増幅, 工程 4 は大腸菌 DNA への PCR 増幅産物 (マイクロサテライト DNA 断片) の組み込みと培養, 工程 5 は大腸菌コロニーからの PCR 増幅産物の塩基配列の決定, である. これらの工程の特徴として, 数個体の DNA の混合によって, 当初必要と思われたオリジナル DNA の増幅処理を省いたこと, 磁気ビーズ法の援用によって, 大腸菌 DNA への組み込みと培養作業を削除したこと, ダイレクトシーケンス法によって, 大腸菌からの DNA 抽出処理を必要としないこと等が挙げられる.

(2) テーマ 2: 構築した工程に基づくマイクロサテライト DNA マーカーの開発

開発対象種

構築した単離工程にしたがって (図 1), 魚類, トンボ類, アミ類の計 7 種のマイクロサテライト DNA マーカーを開発した. 対象種として, 魚類についてはコイ科のウグイ (*Tribolodon hakonensis*), エソムス (*Esomus metallicus*), ラズボラ (*Rasbora borapetensis*), タカサゴイシモチ科のバランバシス (*Parambassis siamensis*), ニシン科のクルベクチス (*Clupeichthys aesarnensis*), トンボ類についてはトンボ科のアキアカネ (*Sympetrum frequens*), アミ類についてはアミ科のテニユイペス (*Mesopodopsis tenuipes*) とした. これらの種はモンスーンアジア (日本, ラオス, マレーシア等) の農村地域に生息する代表的種と見なされている.

開発結果

各種について, 主に CA, CT の 2 塩基を繰

表 1 構築した単離工程に基づき開発したマイクロサテライト DNA マーカーの対象種 (種名, マーカー数, GenBank 登録番号を順に示す)

種名 (学名)	数	登録番号
魚類		
<i>Tribolodon hakonensis</i>	21	AB592446 ~ AB592466
<i>Esomus metallicus</i>	29	AB720584 ~ AB720611
<i>Rasbora borapetensis</i>	24	AB774185 ~ AB774208
<i>Parambassis siamensis</i>	40	AB720612 ~ AB720649
<i>Clupeichthys aesarnensis</i>	19	AB774166 ~ AB774184
トンボ類		
<i>Sympetrum frequens</i>	23	AB627991 ~ AB628013
アミ類		
<i>Mesopodopsis tenuipes</i>	32	AB628022 ~ AB628053

り返し配列にもつマイクロサテライト DNA を単離し, 19 (クルベクチス) ~ 40 (バランバシス) の PCR プライマーを設計することができた. それぞれ 32 個体を供試して, 対立遺伝子数, ヘテロ接合度, ハーディ・ワインベルグ平衡, 連鎖不平衡等の遺伝的パラメータを推定した結果, どのマーカーにも遺伝的多型が認められ, 遺伝的集団解析に利用できることを確認した. 以上により, 構築した単離工程は様々な生物種に適用可能なことが例証された.

(3) テーマ 3: 開発したマーカーの遺伝的集団解析への適用

解析対象種と手順

エソムスとバランバシスを対象とし, ラオス・ピエンチャン地区の農業水路等 6 地点で両種を採捕した. エソムスは 5 地点, バランバシスは 2 地点に出現し, 各地点 32 個体を解析サンプルとして用いた. 解析では, エソ

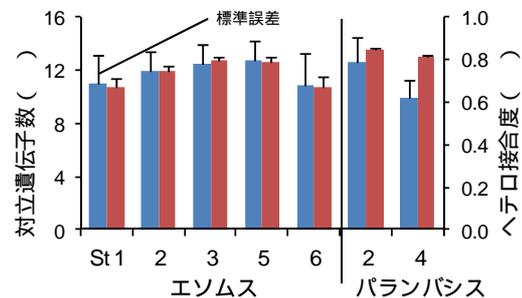


図 2 エソムス及びバランバシスの遺伝的多様性 (地点別マーカーあたりの対立遺伝子数とヘテロ接合度の期待値)

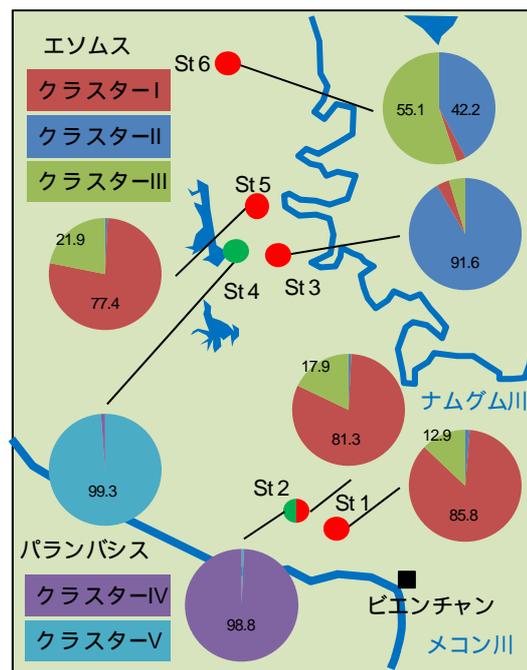


図 3 エソムス及びバランバシスの遺伝構造 (各地点における遺伝的クラスタの組成)

ムスについて7マーカー, パランバシスについて8マーカーを適用した. 各個体の尾鰭からDNAを抽出し, PCR増幅と増幅産物のシーケンスを通じて, マーカーごとに解析に用いる各個体の遺伝子型データを取得した.

解析結果

遺伝子多様性: 地点別の対立遺伝子数は, マーカーあたりエソムスで10.9~12.7, パランバシスで10.0~12.6と推定された(図2). ヘテロ接合度の期待値はエソムスで0.67~0.80, パランバシスで0.80~0.82となり, サンプルはハーディ・ワインベルグ平衡に従っていた. 既往知見との比較により, 遺伝子多様性レベルはどの地点も同程度に高く, 近親交配等に関連する遺伝的問題は生じていないことを確認した.

遺伝構造: エソムスには3つの遺伝的クラスターが推定された(図3). 各地点の地理的配置やクラスター組成から, クラスターIはメコン川流域, IIはナムグム川流域, IIIは両河川共通の遺伝特性を示すと推察された. パランバシスでは2つのクラスターが出現した. エソムスと同様に, クラスターIVはメコン川流域, Vはナムグム川流域の特性を示唆した. このような遺伝構造は河川流域等の地理的要因に支配されていると考えられ, 今後は各クラスター分布の詳細を解明し, 遺伝資源保全に向けての水域管理方策等について検討する必要があると示唆された.

以上の解析結果により, 開発されたマーカーは遺伝的集団解析に適用できる等, 実用的な側面も兼ねていることが明らかとなった. 今後は当研究課題で開発した単離手法の普及に向けて, より多くの生物種への適用と解析事例の蓄積が期待された.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計19件)

Koizumi, N., Morioka, S., Mori, A. (他5名): Characterization of twenty-four polymorphic microsatellite loci of *Rasbora borapetensis*. *Conservation Genetics Resources*, **5**, 711-71, 2013. (査読有)

DOI: 10.1007/s12686-013-9888-6

Koizumi, N., Morioka, S., Mori, A. (他5名): Development of nineteen novel polymorphic microsatellite loci of *Clupeichthys aesarnensis*. *Conservation Genetics Resources*, **5**, 707-709, 2013. (査読有)

DOI: 10.1007/s12686-013-9887-7

Koizumi, N., Morioka, S., Quinn, T. W. (他5名): Isolation and characterization of 40 polymorphic microsatellite markers from *Parambassis siamensis*. *Conservation Genetics Resources*, **4**, 1031-1035, 2012. (査読有)

DOI: 10.1007/s12686-012-9700-z

Koizumi, N., Morioka, S., Quinn, T. W. (他5名): Development and characterization of 29 polymorphic microsatellite loci for *Esomus metallicus*. *Conservation Genetics Resources*, **4**, 1027-1030, 2012. (査読有)

DOI: 10.1007/s12686-012-9699-1

小出水 規行・西田 一也・水谷 正一: 農業水路における魚類とその保全・管理に関する研究の現状と課題. *応用生態工学*, **15**, 281-216, 2012. (査読有)

<http://dx.doi.org/10.3825/ece.15.281>

Koizumi, N., Quinn, T. W., Jinguji, H. (他4名): Development and characterization of 23 polymorphic microsatellite markers for *Sympetrum frequens*. *Conservation Genetics Resources*, **4**, 67-70, 2012. (査読有)

DOI: 10.1007/s12686-011-9476-6

Koizumi, N., Hanamura, Y., Quinn, T. W. (他5名): Thirty-two polymorphic microsatellite loci of the mysid crustacean *Mesopodopsis tenuipes*. *Conservation Genetics Resources*, **4**, 55-58, 2012. (査読有)

DOI: 10.1007/s12686-011-9470-z

小出水 規行・森 淳・水谷 正一(他3名): 農村生態系保全に向けてのドジョウとカラドジョウの簡易な種判別式. *農村工学研究所技報*, **212**, 167-175, 2012. (査読有)

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/212_1-10.pdf

Koizumi, N., Quinn, T. W., Park, M. (他5名): Isolation and characterization of 21 polymorphic microsatellite loci in the Japanese dace (*Tribolodon hakonensis*). *Conservation Genetics Resources*, **3**, 565-567, 2011. (査読有)

DOI: 10.1007/s12686-011-9405-8

Kitagawa, T., Fujii, Y. and Koizumi, N.: Origin of the two major distinct mtDNA clades of the Japanese population of the oriental weather loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *Folia Zoologica*, **60**, 343-349, 2011. (査読有)

http://www.ivb.cz/folia/60/4/11_114-2010.pdf

[学会発表](計14件)

Koizumi, N., Nishida, K., Mori, A. (他2名): Development of a simple method of discrimination between the Dojo and Kara-dojo loaches for the conservation of Japan's rural ecosystem. *Proceedings of PAWEES 2013 (12th) International Conference*, 59-66, 30th October 2013,

Cheongju, South Korea.

Koizumi, N., Morioka, S., Mori, A. (他4名) : Investigation of population genetic diversity of common small fish in the Mekong River Basin, Vientiane, Lao PDR, for conserving native fishes. *Abstract book of 26th International Congress for Conservation Biology*, 111-112, 22nd July 2013, Baltimore, Maryland, USA.

Koizumi, N., Morioka, S., Mori, A. (他4名) : Genetic diversity and population structure of small freshwater fish in Mekong River Basin. *Proceedings of PAWEES 2012 International Conference*, 013K01, 28th November 2012, Nonthaburi, Thailand.

[図書](計1件)

Koizumi, N., Mizutani, M., Watabe, K (他3名) : Genetic diversity and population structure of the Hotoke loach, *Lefua echigonia*, a Japanese endangered loach. Ed by Baptista, G. R., *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications*, InTech, 349-374, 2013.

DOI: 10.5772/53022

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小出水 規行 (KOIZUMI, Noriyuki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・農村工学研究所・資源循環工学研究領域・主任研究員

研究者番号：6 0 3 0 1 2 2 2