

# AFLP 手法を用いたモツゴ (*Pseudorasbora parva*) に対する 環境ストレス評価手法の開発

益永・中井&松田研究室 鍵谷澄絵

## 1. はじめに

現在、排出規制などによって局所的、急性毒性的な水環境汚染は減少したが、生態系が回復したという例は少ない。この原因として、未規制の化学物質による慢性毒性など複数の因子（以下ストレス）が考えられている。他方、遺伝的多様性により長期間受け続けたストレスの影響の評価が可能であるとされ、このようなストレスを評価する方法として注目されている。以上のことから、本研究では遺伝子解析手法の一つである Amplified Fragment Length Polymorphism（以下 AFLP 法）によって得られたモツゴ (*Pseudorasbora parva*) の個体群内の遺伝的多様性を比較することで、主要なストレスを評価する手法の開発を目的とした。

## 2. 実験方法

各調査地点とモツゴのサンプル数を表 1 に示した。採取したモツゴのヒレから DNA を抽出し、AFLP 法を用いて DNA 多型を検出した。また、それらの採取場所の河川水および底泥中の多環芳香族炭化水素（以下 PAHs）と重金属の濃度を分析した。

## 3. 結果と考察

### 3-1. 各採取場所による集団内類似度と水質および底泥との関係

AFLP 法により得られた DNA フラグメントの有無をバイナリーデータに変換し、Sokal ら<sup>1)</sup>による Simple matching coefficient を用いて個体間類似度を算出した。個体間類似度を集団内のすべての 2 個体間の組み合わせで計算し、それらの平均を取ることで集団内類似度を計算した。その結果、採取場所により集団内類似度は 0.905~0.945 まで値に違いがあることが確認された。次にモツゴの集団内類似度に影響を与えているストレスを特定するために、調査地点の PAHs 及び重金属濃度の分析結果と集団内類似度の相関関係を解析した。その結果、溶存態の Benzo[k]fluoranthene (B[k]F) ( $p=0.023$ )、懸濁態の Dibenzo[a, e]pyrene (DB[ae]P) ( $p=0.034$ )、懸濁態の Zn ( $p=0.002$ ) 等の 12 の物質と集団内類似度との間に有意な相関（有意水準 5%）が見られた。しかし、B[k]F 以外の物質は水中、溶存態、懸濁態、底泥中のいずれかの B[k]F 濃度と有意な相関があった（有意水準 5%）。さらに、Barron ら<sup>2)</sup>により、B[k]F

表 1 モツゴの採取場所とサンプル数

| 河川名       | 場所      | サンプル数 |
|-----------|---------|-------|
| 入江川       | 横浜市鶴見区  | 9     |
| 多摩川       | 東京都調布市  | 14    |
| 手賀沼       | 千葉県東葛飾郡 | 16    |
| 五丁台       | 埼玉県桶川市  | 18    |
| 赤堀川合流     | 埼玉県桶川市  | 11    |
| 綾瀬川       | 埼玉県草加市  | 1     |
| びん沼川      | 埼玉県富士見市 | 13    |
| 北川辺       | 埼玉県北埼玉郡 | 10    |
| 八鶴湖       | 千葉県東金市  | 17    |
| 鳩川        | 相模原市下溝  | 7     |
| 羽沢小前      | 東京都三鷹市  | 13    |
| 琥珀橋       | 東京都調布市  | 18    |
| 国領小前      | 東京都調布市  | 17    |
| 町田橋       | 東京都世田谷区 | 18    |
| 仙川合流後     | 東京都世田谷区 | 14    |
| スポーツセンター裏 | 東京都世田谷区 | 17    |
| 小合溜       | 埼玉県三郷市  | 12    |

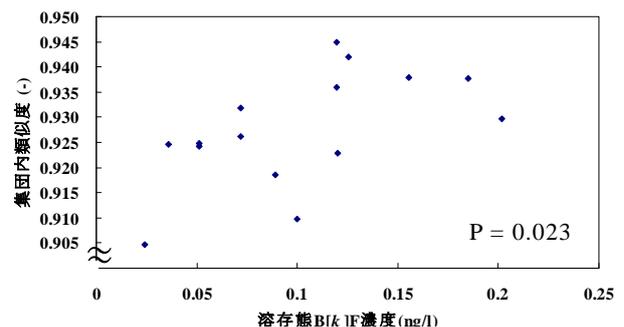


図 1 集団内類似度と溶存態 B[k]F の関係

が魚類に対して毒性の高い物質であることが報告されている。以上のことから B[k]F がモツゴの集団内類似度への主要なストレスの一つであることが推測された。図 1 に集団内類似度と溶存態 B[k]F の濃度との関係を示した。

### 3-2. クラスタ分析

B[k]F が主要なストレスであることを確認するために、モツゴ個体の遺伝子タイプ（以下ジェノタイプ）を検討した。ジェノタイプは AFLP 法によって得られた DNA フラグメントプロファイルをクラスタ分析により解析した（図 2）。その結果、結合距離 2.8 付近で、4 つのグループ（ジェノタイプ）に分類できた。G-1 と G-2 は水田用水路や著しい重金属汚染があった河川といった特殊な環境から採取した個体の

みで構成されていた。つまり、G-1 と G-2 の個体はその地点特有の強いストレスの影響を受けているジェノタイプと考えられる。一方、G-3 と G-4 は、様々な調査地点の個体から構成された。つまり、採取場所に関係のないストレスの影響に関係するジェノタイプと考えられる。そこで、G-1 と G-2 ジェノタイプで優先された採取場所を除く採取場所について、集団内類似度と統計的に有意な相関のあった B[k]F と、G-3 と G-4 ジェノタイプの各採

取場所における個体数割合（G-3 及び G-4 に分類されたサンプル数 / 各採取場所の全サンプル数）との関係を検討した（図 3）。その結果、G-3 ジェノタイプは B[k]F の濃度の増加とともに個体数割合が増加し、一方で G-4 ジェノタイプは G-3 とは逆に減少した。つまり、G-3 ジェノタイプは B[k]F の耐性の強い個体、G-4 は耐性の弱い個体のグループであると推測でき、B[k]F が遺伝的多様性へ影響を与えているストレスであることがジェノタイプの面からも推測された。

以上のことから、AFLP 法とクラスタ分析を用いた手法により、主要なストレスとして B[k]F 及び B[k]F 以外の地域特有なストレスの 2 種が抽出され、さらにモツゴ個体をストレスに対応した 4 つのジェノタイプに分類でき、本手法の有用性が示唆された。

【参考文献】 1) Sokal R. R., Michener C. D. (1958) *Universal of Kansas Scientific Bulletin*, 38, 1409-1438.

2) Barron M. G., Heintz R., Rice S. D. (2004) *Mar. Environ. Res.*, 58, 95-128.

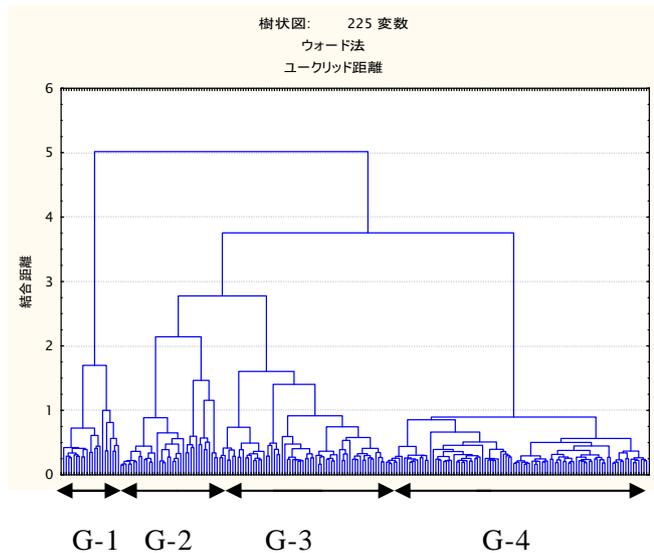


図 2 クラスタ分析

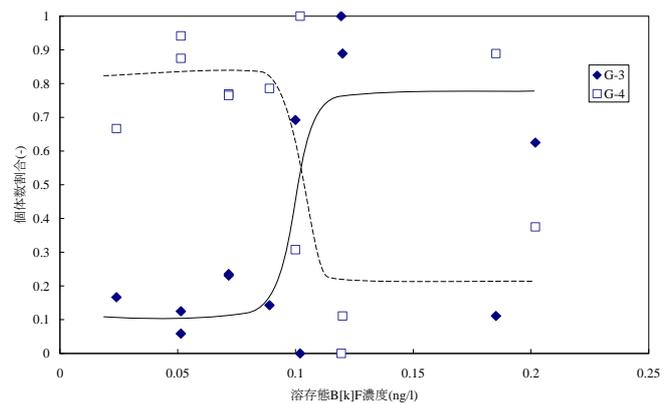


図 3 G-3 および G-4 のサンプル数と溶存態 B[k]F 濃度の関係