

7P114

AFLP 手法による *Pseudorasbora parva* へのストレス評価亀田豊¹⁾、鍵谷澄絵²⁾、益永茂樹¹⁾(¹⁾横浜国大院環境情報研究院、²⁾横浜国大院環境情報学府)

【はじめに】

実験室内で特定の生物個体に化学物質を暴露させ、用量反応関係を明らかにする環境毒性学は、化学物質の環境中濃度の規制に多大な貢献をしてきた。しかし、ここ数年は従来の環境毒性学的考えでは生態系を回復することに限界があることが国際学会等で指摘され、stress ecologyや landscape ecotoxicology といった新しい環境毒性学の必要性が唱えられている^{1, 2)}。つまり、河川や湖沼等の水域では、これまでの化学物質の環境中濃度の規制により水質自体は以前に比べ改善していることが報告されているが、水圏生態系が水質ほど回復しているといった報告例は少ない。この原因の一部として、国内における生態系の保護を目的とした水質基準の策定の遅れのほかに、実験室内の結果を実環境へ外挿する際の不確実性(環境の不均一性やマトリックス成分等)の影響、特定化学物質以外のストレスラーの評価方法の未発達、急性毒性濃度に比べると極微量濃度ではあるが数年レベルの慢性的暴露により初めて確認されるような影響の評価方法の未確立といった、従来の環境毒性学ではこれまで扱えなかった影響があると考えられている。

このような問題を解決する方法として、生態系の保護を個体群レベルで考える個体群生態学や、不均一な環境間に生息する個体群の移入頻度も考慮できる景観生態学等の解析技術と環境毒性学とを融合した方法がヨーロッパやアメリカを中心に提案されつつある。

本研究では、解決への第一歩として、移入の影響が小さいケースを考慮する。河川に生息する魚類は、移入頻度が非常に小さい生物個体群であるため、急性毒性未満のストレスであっても数年あるいは数十年レベルの慢性的暴露の結果、種内の遺伝的多様性が低下し、ストレスに対する脆弱性が高くなり、最終的には大量の斃死等の局所的な個体群の絶滅が生じる可能性(絶滅リスク)が予想される。そこで、本発表ではAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) という集団遺伝学では一般的な分子生物学的手法を応用して、実環境中に生息する魚類が、慢性・急性のさまざまなストレスラーにより遺伝的多様性が低下しているかを確認するとともに主要なストレスラーを解析する方法を提案する。

【サンプリング及び分析項目】

サンプリング

2003年に手賀沼(千葉県)、びん沼川(埼玉県)、綾瀬川(埼玉県)、小合溜(埼玉県)、多摩川(東京都)、入江川(神奈川県)からクチボソ(別名;モツゴ、*Pseudorasbora parva*)を採捕した。同時に底泥、河川水をサンプリングした。

分析項目

河川水: TOC、DOC、E₂₆₀、EC、SS、pH、多環芳香族炭化水素(PAHs; 12物質、溶存態及び懸濁態個別分析)、重金属8物質(溶存態及び懸濁態個別分析、recoverable fractionとして測定)

底泥: 多環芳香族炭化水素(PAHs; 12物質)、重金属8物質(recoverable fractionとして測定)

クチボソ: 全長、筋肉中PAHs濃度(12物質)、筋肉中重金属濃度(8物質)

AFLP: クチボソの尾ヒレの一部からDNAを抽出し2種類の制限酵素(EcoR、Mse)により消化後、特定のプライマー対(EcoR-AG/Mse-CTT, EcoR-AC/Mse-CTT, EcoR-AC/Mse-CTG)を使ってPCRにより増幅し、増幅したフラグメントをGenetic Analyzerにて検出した。増幅したフラグメントの長さが増幅量(バンドの蛍光強度)はGene Scanにて解析した。

A novel approach to identify multiple stressors to *Pseudorasbora parva* by AFLP analysis

Yutaka Kameda¹⁾, Sumie Kagiya¹⁾, Shigeki Masunaga¹⁾: ¹⁾ Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University, 79-7 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama, 240-8501, Tel 045-339-4352, Fax 045-339-4373.

【結果及び考察】

各河川における AFLP による DNA 多型を利用した遺伝的多様度 (Table 1)

Table 1 に各水域の水質 (PAHs、重金属除く) と捕獲したモツゴ個体数及び遺伝的多様度を示す。ここでの遺伝的多様度は AFLP により求められたバンドプロファイルをバイナリーデータに変換して計算した simple matching coefficient (SM)³⁾ で示している。各水域間に下水処理水の混入率がほぼ 100% である入江川や高い混入率が報告されている手賀沼や多摩川では混入率が低い水域よりも SM 値が高く、遺伝的多様度が低下していることが明らかとなった。

各 STRESSOR と遺伝的多様度の相関 (Table 2)

遺伝的多様度に影響を与えていると疑わしい Stressor について、遺伝的多様度との相関を解析したところ、PAHs については有意な相関 ($p < 0.05$) のある物質はなかった。しかし、溶存態の B[k]F が $p = 0.06$ であった。一方、重金属においては溶存態の鉛、マンガ、底泥中の亜鉛とニッケルにおいて有意な相関が見られた。B[k]F については Trout において最も EROD 誘導活性が強いことが報告されていることが報告されている⁴⁾。一方、これら重金属は、生体内で重金属毒性軽減作用を持つメタロチオネインを誘導することが報告されている。つまり、今回の結果からこれらの stressor が selection に影響し、これらの汚染に耐性の強い個体が増加していることが考えられる。今後、生理学的な確認試験や移入による影響評価も行うことで stressor の同定の確実性を高める予定である。

蛍光強度 AFLP データを用いた多次元尺度法 (MDS) による selection の方向解析 (Fig. 1)

遺伝的多様度の減少は一定の方向性をもって多様性が収束している、つまり、選択有利性が生じていることが考えられる。そこで AFLP で得られるバンドの増幅量 (蛍光強度) の profile をデータとして MDS による解析をおこなった。その結果、下水混入率の高い水域に生息する個体群とそれ以外の個体群にグループ分けすることができた (図見表示)。さらに、混入率の高い水域に生息する個体群のみで MDS を行ったところ、手賀沼、多摩川、入江川の混入率の高い個体群と水田用水が多量に混入するびん沼川の個体群に分類することができた。びん沼川にはカルベンダジウムなどの農薬が多量に検出されている。以上のことから、MDS により DNA の多型パターンから下水処理水に適応した個体、農薬に適応した個体、農薬や下水処理水の影響を受けていない個体の判別の可能性が示唆された。

謝辞

本研究は文部科学省 21 世紀 COE プログラムの支援を受けて行われました。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) Van Straalen, N. M. (2003) Environ. Sci. Technol. 37(17), 324A-336A
- 2) D. J. Barid (2004) in plenary keynote presentation in SETAC EUROPE 14th ANNUAL MEETING
- 3) Sokal, R. R. et al. (1958) University of Kansas Scientific Bulletin 38, 1409-1438
- 4) Bols, N. C. et al. (1999) Ecotoxicol. Environ. Saf., 44, 118-128

Table 1 Water qualities and simple matching coefficient in each sampling site

	TOC [ppm]	DOC [ppm]	E260 [-]	EC [mS/cm]	SS [ppm]	pH [-]	n	SM [-]
Irie river	4.9	4.9	0.033	0.638	1.5	6.9	9	0.923
Teganuma lake	5.9	5.5	0.093	0.493	8.6	7.8	16	0.935
Binnuma river	4.2	3.9	0.060	0.347	11.7	7.6	13	0.909
Ayase river	4.6	4.4	0.073	0.456	15.3	7.0	1	-----
Tama river	3.5	3.2	0.041	0.260	5.0	6.9	14	0.923
Koaidame	5.1	4.7	0.054	0.268	11.0	7.7	12	0.905

Table 2 Significant relationship between SM and various stressors (p value)

SM	dissolved substances			In sediment	
	B[k]F	Lead	Manganese	Zinc	Nickel
	0.06	0.03*	0.04*	0.1	0.01*

* Statistically significant ($p < 0.05$)

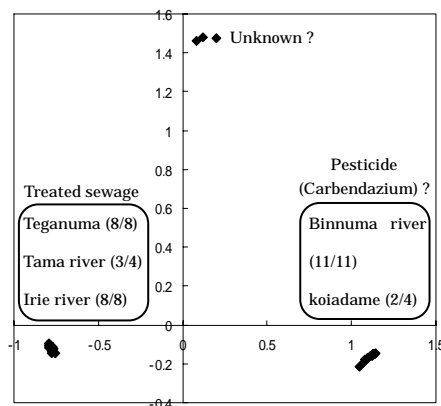


Fig. 1 Identification of multiple stressors by MDS analysis of fluorescence-based AFLP data