

3. ミトコンドリア DNA 塩基配列からみた丹沢地域におけるガガンボカゲロウの遺伝的多様性

東城幸治¹⁾・石綿進一²⁾

Genetic Diversity in Dopteromimid Mayfly (Ephemeroptera: Dipteromimidae) of the Tanzawa Population, Based on Mitochondrial 16S rRNA Gene Sequences

Koji Tojo & Shin-ichi Ishiwata

要 約

丹沢地域を分布の東限とする日本固有のカゲロウ、ガガンボカゲロウを対象に、ミトコンドリア遺伝子 (16S rRNA) を用い、地域個体群レベルでの遺伝的多様性の評価を行った。その結果、丹沢地域には固有のハプロタイプが認められ、また、他の地域個体群においても地域固有のハプロタイプが多数認められた。生息環境が、河川源流域の細流といったような特化した環境であり、個体群間での遺伝的交流が困難なためと思われる。

(1) 研究の目的

ガガンボカゲロウ類は日本固有のカゲロウ類であり、1 科 1 属 2 種のみからなる。このうち、近年に記載されたキログガンボカゲロウ *Dipteromimus flavipterus* は、現在のところ岩手県大船渡市内の 2 生息地が知られるのみであるのに対し (Tojo & Matsukawa, 2003)、ガガンボカゲロウ *D. tipuliformis* は本州、四国、九州 (奄美大島が分布の南西限) に生息する。丹沢およびその周辺では、玄倉川、早戸川、道志川の各水系に流入する支川で記録されており、早戸川水系大平が分布の東限と考えられる (石綿, 2006)。ガガンボカゲロウ類は、河川源流域における極めて小さな枝沢・細流、かつ、流れの緩やかなハビタットに生息し、上記以外のような環境に生息することは稀である。飛翔可能な成虫期間においても強い定着性をもつため、水系間の移動・分散はもちろん、近隣の支流間での遺伝的交流さえも起こりにくいものと考えられている (東城, 2005)。これらのことから、神奈川県レッドデータの注目種に位置づけられている (石綿, 2006)。

ガガンボカゲロウ類が生息する源流域は林道整備や砂防堤設置の対象となりやすい環境であり、多くは規模の小さな工事となるために、十分な事前調査も実施されずに生息域の環境が改変されてしまうことが多い。一方で、上述のように個体群間の遺伝的交流の機会が少ないカゲロウ類であるために、各地域個体群が固有の遺伝的特性を有することも十分に考えられる。

以上のようなガガンボカゲロウ類の生態的特性、ハビタット特性を踏まえ、特に、分布東限として重要な地域となる

丹沢地域におけるガガンボカゲロウの遺伝的多様性を評価・検討し、今後の保全の基礎的資料とする。

(2) 調査地と方法

丹沢地域におけるガガンボカゲロウ個体群において、ミトコンドリア遺伝子のコントロール領域 (16S rRNA 領域) 塩基配列を対象に遺伝的多様性を評価・検討した。大室山系の 2 つの個体群 (山梨県都留市): 大沢川支流の細流と戸沢川支流の細流から計 8 個体を解析対象とした。いずれも相模川水系道志川に流入する支川の源流域にあたる。また、これら丹沢地域におけるガガンボカゲロウの遺伝的多様性を相対評価する上で、他の地域 (本州の他地域、および四国、九州) 産のガガンボカゲロウ (12 個体群から 24 個体を解析)、および、参考までに同属のキログガンボカゲロウ (1 個体群から 4 個体を解析) も含め比較・検討を行った。

また、ガガンボカゲロウ類の遺伝的多様性を相対的に評価するため、研究対象とする遺伝子領域のデータが比較的蓄積されてきたモンカゲロウ類 (一部未発表データ含む) の国内外のデータ、および外群としてシミ類のセスジシミのデータを用いた。

いずれも 80-100 % エタノールで固定された標本の胸部筋肉から DNA を抽出し、2 種類のプライマー 5'-TTACGCTGTTATCCCTAA-3' と 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' を用いて、PCR 増幅の上、精製した。DNA の抽出、精製には、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) および Microcon Kit (MILLIPORE) を用いた。精製した DNA

表 1. ガガンボカゲロウ類のハプロタイプ多様度 (h) と塩基多様度 (π)

	解析サンプル数(個体群数)	h	π
ガガンボカゲロウ <i>Dipteromimus tipuliformis</i>			
種レベル	32 (14)	0.96	1.58
丹沢地域個体群	8 (2)	0.46	0.00090
ガガンボカゲロウ科 <i>Dipteromimidae</i>			
科レベル (含: キログガンボカゲロウ <i>D. flavipterus</i>)	36 (15)	0.96	2.19

1) 信州大学理学部生物科学科: 信州大学山岳科学総合研究所 2) 神奈川県環境科学センター

試料をDYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences) にて蛍光ラベリングした後、ABI PRISM 377 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) を用いて塩基配列を決定した。アライメントは Clustal W により行い、得られた結果に基づき、ハプロタイプ分類を行い、ハプロタイプ多様度 (h)、塩基多様度 (π) を算出した。

(3) 結果

丹沢地域 (2 個体群 8 個体) 産ガガンボカゲロウ、近縁種キログガンボカゲロウ (1 個体群 4 個体) を含む、計 15 個体群 36 個体において、ミトコンドリア DNA 16S rRNA の塩基配列 (376 塩基) を決定した。このうち、全個体群 36 個体の配列において変異が認められたサイトは、わずか 27 箇所 (7.2%) のみであった。

また、ハプロタイプ分けの結果、全体で 22 のハプロタイプが認められ、塩基の変異率からみると比較的多数のハプロタイプが認められたと言える。

遺伝的多様性の指標として、ハプロタイプ多様度、ならびに塩基多様度を、ガガンボカゲロウの種レベル (14 個体群 32 個体)、このうち特にガガンボカゲロウの丹沢地域個体群 (2 個体群 8 個体)、および近縁種のキログガンボカゲロウ (1 個体群 4 個体) も含めたガガンボカゲロウ科

のレベルで算出し、表 1 にまとめた。

加えて、これらの配列データをもとに、各サンプル間の類縁性を分岐図にて示した (図 1: 一部、同一ハプロタイプの試料に関しては図 1 からは省略している)。

(4) 考察

ガガンボカゲロウの種レベルでのハプロタイプ多様度は 0.96 と非常に高い値であり、ミトコンドリア DNA のコントロール領域におけるこれまでに報告されてきた他の生物種と比較しても、高い多様性であることが示された。このうち、丹沢地域に限ったハプロタイプ多様度は 0.46 と、やや低めの値を示した。ハプロタイプ多様度は、それぞれの遺伝子型の頻度のみを評価の対象とするもので、遺伝子型間の遺伝距離の評価が含まれていないが、この点を考慮した塩基多様度 (原理としては各個体間の塩基置換頻度の平均値) においては、ガガンボカゲロウの種レベルで 1.58、特に丹沢地域個体群内では 0.00090 と極めて低い値となった。

このような結果となった背景には、解析した個体数の割には比較的多数のハプロタイプが認められたために、ハプロタイプ多様度に関しては比較的高めに評価されたものの、多くのハプロタイプは、わずかな塩基数の違いからなるものばかりであり、塩基レベルでみると多様度は低いと評価され

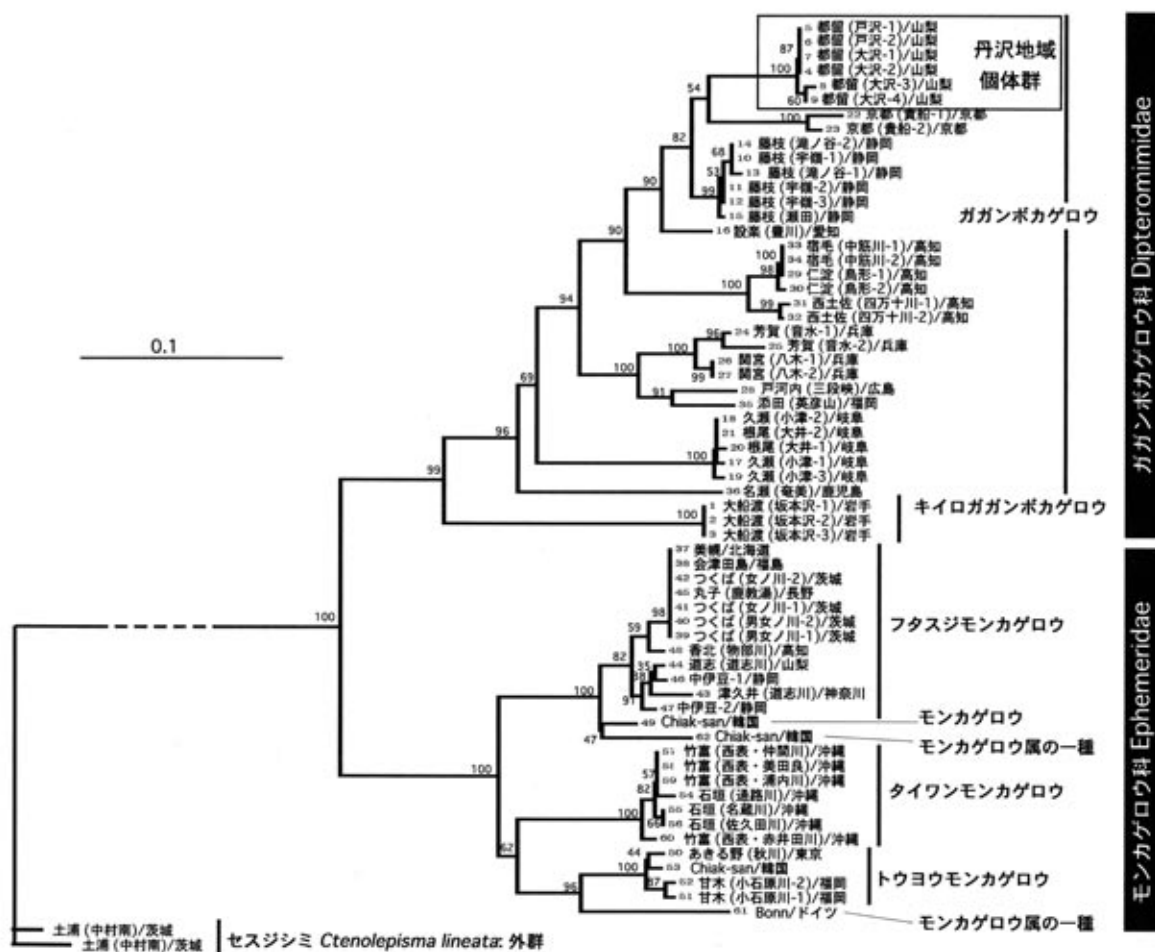


図 1. ガガンボカゲロウ類地域個体群における遺伝的にみた類縁関係

参考までに、モンカゲロウ類個体群データも併せて示している。相対的に、ガガンボカゲロウ類内では地域個体群レベルでの遺伝的孤立化傾向が強いことが窺える。

たことが考えられる。

また、以上のような地域個体群内での遺伝的多様性の低さや、個体群間でのハプロタイプの孤立化は図 1 から明らかである。このような結果となった背景には、ガガンボカゲロウの生息環境そのものが局所的な分布となる河川源流域であることに加え、極めて低い移動・分散力が、各地域個体群間の遺伝的な交流を妨げ、遺伝的にも孤立した個体群が維持されてきたものと考えられる。しかしながら、依然として解析に用いた個体群数、およびサンプル数は少なく、今後、解析サンプル数を増やした上で、掘り下げた検討を行いたい。

一般に、希少生物の保全策に関しては、種のレベルで検討されることが多い。しかし、遺伝的な多様性を保全するために、限られた源流部にのみ適応し、局所的に生息するガガンボカゲロウのような、地域個体群レベルでの保全対策は、今後、必要であろう (Waples, 1995)。この他の水生昆虫のなかで、細流、岩清水（薄い水の層が流下する垂直な岩盤）など、ごく狭い範囲に生息域をもつ昆虫類は、カワゲラ、トビケラをはじめとする多くの水生昆虫類において確認されており (三枝・倉西, 2005)、丹沢固有の個体群の存在も指摘されている (石綿ほか, 1997)。また、ヒダサンショウウオにおける今回の調査結果のように、丹沢固有の地域個体群の可能性も明らかになり、今後の保全対策などの施策が期待されるであろう。サケ科魚類のイワナなどのように、既に個体群レベルでの保全策が図られている生物もあるが、水生昆虫類に関しては、個体群レベルでの遺伝的多様性に関する研究はもとより、今後の調査で、高い種多様性が予想される上記水域を対象とする調査研究は少ない。水生の無脊椎動物の生息場所は、脊椎動物の進入を許さない広範な水域に及んでおり、丹沢地域における今後の研究は、河川や森林の管理、生物相の維持・保全策を検討する上で重要な一歩であると考えられる。

文 献

- 石綿進一, 2006. 水生昆虫類 (カゲロウ目, カワゲラ目, トビケラ目). 高桑正敏・勝山輝男・木場英久 (編), 神奈川県レッドデータ生物調査報告書, pp.307-309. 神奈川県立生命の星・地球博物館.
- 石綿進一・野崎隆夫・清水高男, 1997. IV. 水生昆虫からみた丹沢の沢. 神奈川県公園協会・丹沢大山自然環境総合調査団企画委員会 (編), 丹沢大山自然環境総合報告書, pp.530-538. 神奈川県環境部.
- 三枝豊平・倉西良一, 2005. 岩清水と昆虫. 昆虫と自然, 40 (10): 2-4.
- 東城幸治, 2005. 河川源流域に棲息する水生昆虫類の遺伝的特性ーガガンボカゲロウ (昆虫綱・カゲロウ目) におけるミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子配列の変異を例にー. 応用生態工学, 7: 119-127.
- Tojo, K. & K. Matsukawa, 2003. A description of the second species of the family Dipteromimidae (Insecta, Ephemeroptera), and genetic relationship of two dipteromimid mayflies inferred from mitochondrial 16S rRNA gene sequences. *Zoological Science*, 20: 1249-1259.
- Waples, R. S., 1995. Evolutionary significant units and the conservation of biological diversity under the endangered species act. Nielsen, J. (ed.), *Evolution and the aquatic ecosystem: defining unique units in population conservation*, pp.8-27. American Fisheries Society, California.