

## 研究題目 宍道湖ヤマトシジミの遺伝的多様性の解析

島根大学生物資源科学部生命科学科水圏多様性コース 山根杏里・広橋教貴

### 目的

マイクロサテライトマーカーを用いて宍道湖ヤマトシジミの遺伝的多様性の現状を把握する。今後毎年調査を実施し、その経年変化を観測し、またもし斃死が起きたら、その前後で集団の遺伝的多様性に変化が生じたか調べる。宍道湖の各生息地点の多様性の程度も測定し、偏りや遺伝子流動の有無を調べる。このようなことから生態リスクを評価し、将来の水産資源の管理維持の施策に役立てる。

### 背景

一般に、遺伝的多様性が喪失すると、環境変動に対し適応能力が低くなり、その種の絶滅に直結する危険な状態となる。例えば絶滅危惧種は、例えば人の手によって個体数が回復しても、一旦失われた遺伝的多様性は容易に回復せず、常に絶滅リスクを抱えている。また、家禽、農作物などは、人が積極的に選抜し、遺伝的に均一な系統を維持してきたため、ウイルスや病気で一気に全滅に追い込まれることがしばしばある。すなわち、種の絶滅においては、個体数の減少より遺伝的多様性の減少の方が大きな懸念材料といえるが、あまり認識されていない。何故なら、個体の増減は漁業の現場で確認できるが、遺伝的多様性は目で見ることが出来ないためである。

遺伝的多様性を把握する為の有効な手段として、最近では個体識別のための DNA 鑑定などにも使われているマイクロサテライト (SSR) 解析が用いられる。ヤマトシジミについても SSR マーカーが開発されており (Plankton Benthos Res 7(3): 151–157, 2012)、これを用いて日本各地のヤマトシジミの遺伝的多様性が調べられている。2009~2011 年の調査では網走、生花苗、小河原及び宍道湖の 4 箇所において、各地およそ 40 個体前後の試料を用いて SSR 解析を行った。その結果、対立遺伝子数 (AR) は、宍道湖が最も低く、また各集団の遺伝的距離は他の 3 つから宍道湖のみ遠位にあった。これは、他の 3 箇所がいずれも北方湖水域であるのに対し、宍道のみ南方であったことから、地理的隔離と暖水温への適応がなされた集団であったためだと推測される。今後、さらに地球レベルの温暖化が加速し、集中豪雨、海洋酸性化など起これば、水陸双方からの変動に最も影響を受けやすい汽水生態系が、被害を被るのは必至であろう。このような地球規模の問題について解決策を講じるのは無理だろうが、比較的規模の小さな環境変動に対してヤマトシジミの耐性や適応能力を集団遺伝学の観点からデータととりまとめ、理解しておくことは、将来の内水面漁業の継続、資源管理の観点から重要であろうと考える。

### 結果

#### メタ解析に向けた簡便・迅速なゲノム DNA 抽出方法の確立

本研究を本格的に開始するにあたり、大規模な数の試料・検体を迅速に且つ簡便に解析するフローチャートを確立することが大事であると考えて、従来の一連の流れを見直した。定番の手法として、①CTAB法による組織の可溶化、②フェノール・クロロホルム法によるゲノムDNAの抽出、③エタノール沈殿が使われているが、全ての作業でかかる時間は1日半程度であった。また、②の試薬は毒劇物であり、学生が作業をする際に特に注意が必要で有り、大量の廃液が出る問題もある。また、組織分解に用いるProteinase Kも高価な試薬で有り、

メタ解析を行うにはコスト面で負担がかかる。そこで、最近DNA抽出で使われ出したイオン液体を試した。イオン液体は、液体で存在する塩のことを示し、かつてはイオン性液体とか低融点溶融塩などとも呼ばれていた。イオン液体は最近20年間に実用化され、非常に多岐にわたって利用されてきた化学物質である。特異な性質の1つとして、高分子に結合し、よく溶かすことが出来る点である。ゲノムDNAの高分子鎖を抽出することも判明しており、これを用いることで、従来の①CTAB法による組織の可溶化、②フェノール・クロロフォルム法によるゲノムDNAの抽出を行わずに、室温で僅か15分間このイオン液体と混ぜるだけでゲノムDNAが抽出できるとされる。しかし、その報告例は決して多いわけではなく、2015年に発表された論文 (Fast and efficient extraction of DNA from meat and meat derived products using aqueous ionic liquid buffer systems. *New J. Chem.*, 2015, 39, 4994--5002) を含め僅か数報に過ぎない。また、この論文で用いられた食肉は、色素や多糖などの夾雑物質が少なく、ゲノムDNA抽出は比較的容易であることからすると、一般的には利用し難い試薬では無いかという疑問も生じていた。そこで、ヤマトシジミ外套膜を試料に上記論文のプロトコルに従ってゲノム抽出の収率及び、抽出されたDNAをテンプレートにPCRを行い、目的の産物が得られるかを調べた。

- 1) 100 mgのイオン液体 (酢酸コリン) を900 ul の50 mM HEPES (pH8.0)に溶かす。
  - 2) その後、200mgのみじん切りにした外套膜を入れ、室温で15分放置する。
  - 3) 95度、10分間処理し変性させ、遠心(14,000rpm, 10min)して上精を回収する。
- これを、ゲノムDNA粗抽出液とし、PCR反応ではこれを希釈して使用した。

抽出効率は従来のCTAB法+フェノールクロロフォルム法と比べ、同程度であった。次に開発されているヤマトシジミのSSRマーカー (Plankton Benthos Res 7(3): 151-157, 2012) を合成しPCRを行った。その結果、ゲノムDNA粗抽出液を純粋で5倍希釈したものをテンプレートに使用した時、良好なバンドが確認された。希釈しない抽出液では、夾雑物質の影響からか、バンドは認められなかった。

### 考察と今後の展望

以上の実験によって、迅速・簡便・安価にゲノム抽出を行う方法をヤマトシジミで確立した。さらに簡便化を目指し、ヤマトシジミの殻内に満たされたヘモリンパ液をツベルクリン注射針で採取し、そこに含まれるゲノムDNAを抽出する方法を試している。この方法はシジミ個体を殺さない点では優れているが、ツベルクリン注射筒の大量使用の無駄や再利用する場合、試料混入の懸念があり、実用化にはもう1つ工夫が要り、現在毛細型チップを検討中である。

SSRマーカーを用いて個体識別するためには、キャピラリーシークエンサーを用いたフラグメント解析が必要である。フラグメント解析を外注すると、1検体500円、1プレート(96検体)で約4万円弱かかる。宍道湖とその周辺の汽水湖の集団解析では、1解析に10プレート分は必要であり、これを季節毎や経年変化を調べるには、費用がかかり、従ってコストダウンする必要がある。そこで、フラグメント解析の全ての作業を島根大学遺伝子実験施設の共通機器を用いて行えるよう、試薬を買い揃え、実際に運用出来ることを確認した。また解析エンジンとして、GenAlexとOSIRISを用い、解析自体も研究室内で行えるようにした。

今後、これらの手法と技術を使って、島根県汽水湖のヤマトシジミの遺伝的生態調査を進めていく予定である。