

マイクロサテライトDNA多型解析によるアユ人工種苗の遺伝的多様性の比較 - I

藤井久之

一般に、継代を繰り返した人工種苗は再生産に関わった親魚数が天然種苗に比べて少なくなるため、遺伝的多様性が低くなり、元の天然集団とは異なった遺伝子構成になることや近交退化が懸念される。^{1) 2)}マイクロサテライトDNA多型解析は核DNAの非遺伝的領域(イントロン)の2~5 bpの短い塩基配列数の違いを検出する方法であり、この領域は個体変異が多量に蓄積されており、高感度DNAマーカーとして注目されている。そこで、このように遺伝的差異を高感度で検出できるマイクロサテライトDNA多型解析を用いて当所で継代しているアユ人工種苗と本県地先海面で採捕された海産種苗の遺伝的多様性の比較を行ったのでその結果を報告する。

材料および方法

供試魚 分析に用いた供試魚は当所で選抜育種した5代目大方向群、5代目無選抜群、及び平成14年に本県地先海面で採捕された海産の3系統である。5代目大方向群は平成9年に本県地先海面で採捕された海産アユを養成し、体重による上位20%の切断型選抜により親魚を選抜し、人工授精により次世代を作出し、毎年同様の切断型選抜で5代継代したものである。5代目無選抜群は同様の海産アユを切断型選抜を行わず無作為に親魚を選抜し、人工授精により次世代を作出し、5代継代したものである。これら、5代目大方向群、5代目無選抜群、海産の3群より無作為にサンプルを抽出し、尾びれの一部を切り取り、DNA抽出まで100%エタノールで保存した。

マイクロサテライトDNA多型解析 全体の手順を図1に示した。DNAの抽出・精製はエタノールで保存した供試魚の尾びれを試料とし、フェノール・クロロホルム法で行った。DNA抽出、精製の方法は図2に示した。抽出したDNAは表1に示した高木ら³⁾により開発

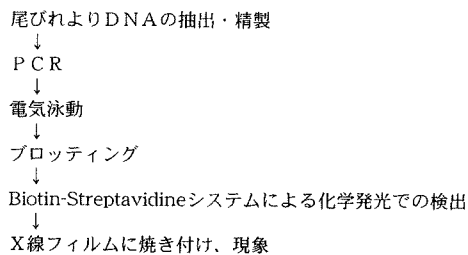


図1 マイクロサテライトDNA多型解析手順

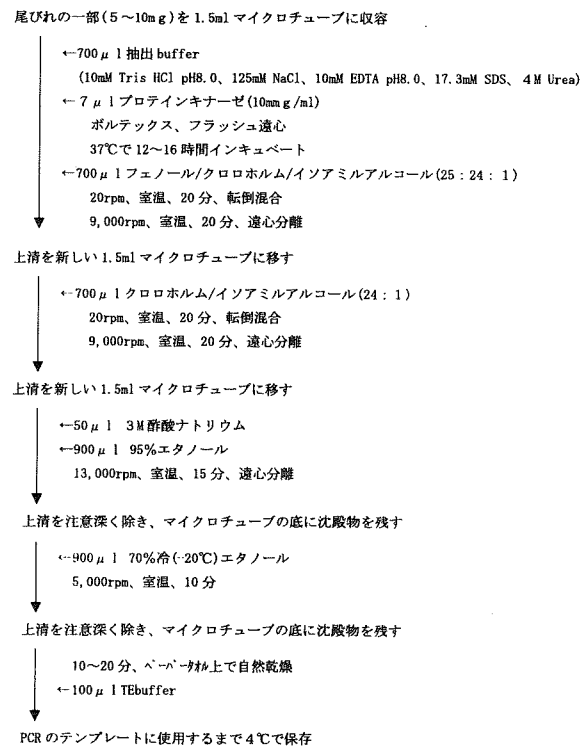


図2 DNAの抽出・精製の方法

表3 PCRの条件

	プレート	1st cycle			2nd cycle		
		7cycle			33cycle		
温度(°C)	95	94	52	72	90	52	72
時間	10min	1min	30sec	30sec	30sec	30sec	30sec

表4 変性ポリアクリルアミドゲルの組成

内容	容量
尿素	35.0 g
×10 TBE バッファー	9.5 ml
40%アクリルアミド溶液	14.4 ml
Tween20	35.0 μ l
TEMED	35.0 μ l
APS*	0.70 ml
滅菌超純水	33.4 ml

* 濃度は10%

されたPal 1, Pal 4の2プライマーセットを用いてPCRを行った。PCRは、表2の反応液を調整し、表3の条件でサーマルサイクラー(ependorf社, マスターサイクラー グラジェント)により行った。これにより得られたPCR産物は、マニュアルシーケンサー(アトー社, ジェノケンサー)を用い表4の組成の8%変性ポリアクリルアミドゲルにより、3~4時間の電気泳動(50W定電力)を行い分画した。これをナイロンメンブラン(Biodyne B, 孔径0.45 μ m)に一昼夜転写後、0.4N NaOH溶液でアルカリ変性させ、80°C15分のベーキングにより固定した。フラグメントの検出はBiotin-Streptavidinシステムによるケミルルネッセンス法¹⁾に準じて行った。手順は、ナイロンメンブランをハイブリパック中に封入し、表5に示したBlocking buffer, Streptavidin溶液, Wash buffer I, Biotin-Alkalinephosphatase溶液, Wash buffer I, Wash buffer II, Lumiphos530希釈溶液の順に各試薬を入れ替えて室温で緩やかに振とうして行った。Lumiphos530希釈溶液による処理が終了後、ハイブリパック中の溶液を完全に除去して封印し、約30分間、37°Cのインキュベーターに設置して化学発光を促進した。次に、ナイロンメンブランを入れたままのハイブリパックを市販のカセットにX線フィルムとともに入れ約60分間、37°Cのインキュベーターで感光させ、可視化した。得られたバンドはサンプルと同時に泳動したM13mp18ssDNAのシーケンスラダー(Sequencing high chemilumi, TOYOBO)との比較により分子量を決定し、遺伝的変異性を示す各指標を解析ソフトArlequin ver. 2000で解析した。

表5 プロットティング試薬の組成及び作成方法、処理方法、濃度

試薬	組成及び作成方法	処理方法	使用濃度 (ml/cm ²)
Blocking buffer	125mM NaCl, 17mM Na ₂ HPO ₄ , 8mM Na ₂ HPO ₄ , 173mM SDS	5min×1	0.11
Streptavidine溶液	Blocking bufferにStreptavidineを1 μg/mlの濃度に溶解	5min×1	0.03
Wash buffer I	" を10倍に希釈	5min×2	0.11
Biotine-Alkalinephosphatase溶液	" にBiotine-Alkalinephosphataseを0.5 μg/mlの濃度に溶解	5min×1	0.03
Wash buffer I	" を10倍に希釈	5min×2	0.11
Wash buffer II	10mM Tris-HCl pH9.5, 10mM NaCl, 1mM MgCl ₂	5min×2	0.11
Lumiphos530希釈溶液	Lumiphos530を75mM 2-Amino-2-Methyl-1-Propanolで20倍に希釈, pH9.6	5min×1	0.03

結果および考察

5代目大方向群, 5代目無選抜群, 海産の3系統のマイクロサテライトマーカー座における遺伝的多用度を表6に示した。各マーカー座における対立遺伝子数, ヘテロ接合体率(観察値)はPal1で14~27及び0.500~0.789, Pal4で16~32及び0.486~0.946であった。Pal1, Pal4とも, 5代目大方向群で対立遺伝子数は最も少なく, ヘテロ接合体率(観察値)は低く, 逆に海産で対立遺伝子数が最も多く, ヘテロ接合体率(観察値)は高かった。また, 系統別に10%未満の頻度の対立遺伝子をその他として対立遺伝子アリル頻度を図3に示した。5代目大方向群では特定のアリルが高頻度を占めるのに対し, 海産では逆に頻度の低いアリルが多い傾向がみられた。これより, 天然魚である海産は遺伝的多用度が高いのに対し, 特定の形質を持つ親魚だけを選抜し継代した5代目大方向群は遺伝的多用度が低く, また無作為に親魚を抽出して継代した5代目無選抜群はその中間の傾向であることが明らかになった。次に各群のPairwise Fstによる異質性検定の結果を表7に示した。各群に有意な遺伝的差異はみられなかったが, 5代目大方向群, 5代目無選抜群とも海産に比べ遺伝的多

表6 各系統のマイクロサテライトマーカー座における遺伝的多様度の比較

遺伝子座 (ローカス)	項目	5代目大方向群	無選抜群	海産
P a l 1	サンプル数	34	26	38
	対立遺伝子(アリル)数	14	17	27
	範囲(bp)	102-131	100-128	99-132
	ヘテロ接合体率(観察値)	0.500	0.769	0.789
	ヘテロ接合体率(期待値)	0.914	0.934	0.957
	観察値/期待値	0.547	0.823	0.825
	P a l 4	サンプル数	37	22
対立遺伝子(アリル)数		16	17	32
範囲(bp)		135-154	131-159	124-189
ヘテロ接合体率(観察値)		0.486	0.667	0.946
ヘテロ接合体率(期待値)		0.901	0.930	0.954
観察値/期待値		0.540	0.717	0.991

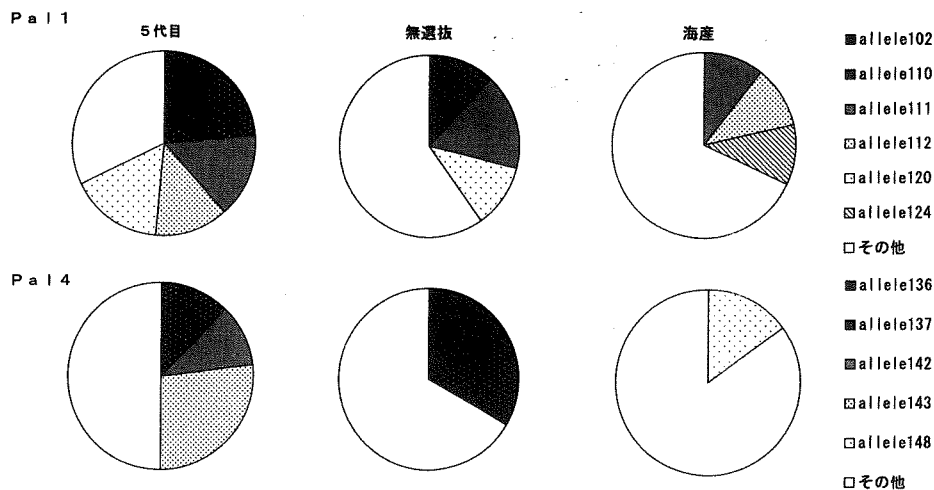


図3 5代目、無選抜、海産のP a l 1、P a l 4における対立遺伝子(アレル)頻度
(頻度が10%以下のアレルはその他とした)

表7 各系統間の分化指数(F s t 指数)

	5代目大方向群	5代目無選抜群	海産
5代目大方向群			
5代目無選抜群	0.0000 ns		
海産	0.0000 ns	0.0000 ns	

ns=not significant

様性が低下しているため、再生産する可能性のある河川への放流は避けるべきである。今後は、切断型選抜による継代を重ねた場合、さらに遺伝的多用度が低下するのか、またその場合に海産と遺伝的差異がみられるようになるのか等について検討する必要がある。

文 献

- 1) Iguchi K, Tanimura Y, Nishida M : Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and landlocked forms of ayu, Fisheries Science, 63 901-905 (1997).
- 2) 谷口順彦 : 魚類の遺伝的多様性とDNAマーカー, 「次世代の水産バイオテクノロジー(隆島史大編), 成山堂書店, (2000), 18-41.
- 3) Motohiro Takagi, Eijiro shoji and Nobuhiko Taniguchi: Microsatellite DNA Polymorphism to Reveal Genetic Divergence in Ayu, Plecoglossus altivelis, Fisheries Science, 65, 507-512 (1999).
- 4) Perez-Enriquez, Ricardo, 竹村昌樹, 谷口順彦 : マダイにおけるケミルルミネッセンスを用いたマイクロサテライトDNAの検出 : 実践マニュアル, 水産育種, 26 73-79 (1998).