

遺伝子分析の水産研究への応用

原 素 之¹⁾

(日本海区水産研究所)

遺伝子分析法の水産研究への応用として、アイソザイム、ミトコンドリアDNA及びゲノムDNAを用いた主な解析法についてその概要と応用例について紹介する。

1 アイソザイム遺伝子分析

アイソザイム分析法は3つの分析法のなかでは一番早くから研究され、多くの魚介類で手法のマニュアル化が進んでいる。各魚介類における分析の詳しい原理や方法については、海洋生物集団の識別等に関する先導的評価手法の開発事業報告書(資源保護協会 1989)によくまとめられている。ここでは、その一例として筆者らの行ったアワビのアイソザイム分析を紹介する。

筆者らはアワビの筋肉及び消化盲囊のドリップ(粗酵素液)を用いてデンブゲル電気泳動法により、12酵素15遺伝子座のアイソザイム分析を行った。各遺伝子座の遺伝子頻度を基に、エゾアワビ、クロアワビ、マダカ、メガイ、及びトコブシ間の遺伝的距離から遺伝的類縁関係を調べた(原・菊地 1991; 原・藤尾 1991)。その結果を図1に示した。これによると、クロアワビとマダカ間が遺伝的に

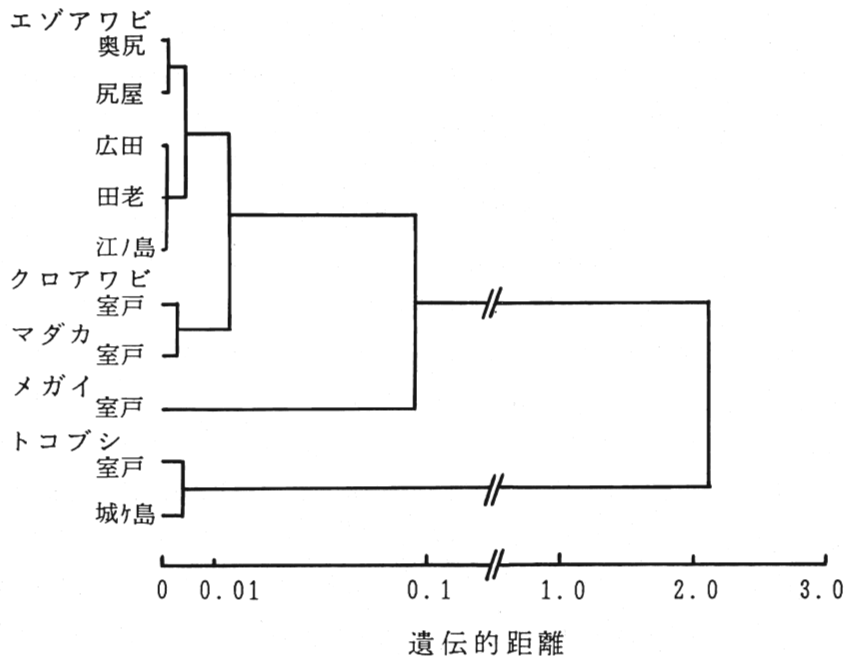


図1 エゾアワビ、クロアワビ、マダカ、メガイ、トコブシの遺伝的類縁関係を示す枝分れ図。

1) 現国際農林水産業研究センター

最も近く、次いでエゾアワビ、メガイの順で遠くなり、トコブシが最も遠い関係となっていることがわかる。そして、エゾアワビ地域集団では非常に近い関係であることがわかる。ここで用いたNeiの遺伝的距離は多くの生物で調べられており、ほぼ地方品種レベルで「0.01」、亜種レベルで「0.1」、種間レベルで「1」になると報告されている (Nei 1972,1975)。これらの基準からみるとアワビ類5種の遺伝的分化はエゾアワビ、クロアワビ、マダカが地方品種レベル、これら3種とメガイが亜種レベル、トコブシと4種が属間レベルと考えられる。そして、エゾアワビ地域集団間では地方品種レベルに達していない小さな分化レベルであることがわかる。このことから、遺伝的観点からみたこれらアワビ類5種の遺伝的類縁関係は、トコブシを除いて今まで形態的特徴から分類されていた関係よりもかなり近い関係であることが明らかとなった。

アイソザイム分析法は、凍結融解時のドリップ液を用いて電気泳動法で分離し染色するという簡単な実験操作で生物集団に存在する遺伝的変異を容易に調べられる。そして、アイソザイムは地方品種以上の割と大きな遺伝的分化の判別には有効な遺伝的マーカーである。しかし、魚介類の種内分化は小さい種が多く、種内の系統群や地方品種以下のレベルの分化を調査するには、アイソザイム分析法よりも遺伝的分化に対して感度の良い分析法が期待されている。次にミトコンドリアDNA分析法について、既報告を引用しながら紹介する。

2 ミトコンドリアDNA

ミトコンドリアDNA (mt-DNA) は細胞組織であるミトコンドリア内に存在する核外DNAである。mt-DNAにおける塩基の変異速度はアイソザイムを支配するゲノムDNAより10倍程早いとされており、種内でも多くの変異が保有されていると考えられている。また、自己増殖することから組替えが起こらず、家系判別の有効な遺伝標識となる可能性がある。このようなことから、mt-DNAは集団研究の新しいマーカーとして期待されている。

現在魚貝類で用いられているミトコンドリアDNAの解析方法の主なものとして、制限酵素切断片多型 (RFLP) がある。RFLPとは、ある特定の塩基配列を認識しその部位を分解する制限酵素を用い、変異部位の存在による特異的切断部位の変化を電気泳動のバンドとして検出する方法である。例えば *PvuII* では CAG/CTG を認識し、斜線のところを特異的に切断する。もし、CAGCTG の塩基配列の1つでも別な塩基に置き換わると、*PvuII* では切断されなくなる。これをアガロースゲル等の電気泳動を行うとDNAの断片長の違いにより移動度とバンド数の違いにより、遺伝的変異として判別できるわけである。ここでは KIJIMA *et al.* (1992) の文献を引用し、この手法を紹介する。木島らはサクラマス4系統の肝臓から抽出したミトコンドリアDNAを *BamH I*、*Bgl II*、*EcoRV*、*Hinc II*、*Hind III*、*Xba I* の制限酵素で切断し、その切断片の長さの違いから、塩基配列の変異を推定している。例えば、*BamH I* では個体によって3本のバンド(切断片) A型と、2本のバンド(切断片) B型が見られる。A型は、B型に見られなかった15.6kbp (1kbp=1000塩基対数) の切断片がないかわりに、10.4kbpと5.2kbpの切断片が見られる。A型の2本の切断片10.4kbpと5.2kbpを合わせるとB型の15.6kbpと一致することから、塩基対の置換による *BamH I* の認識部位の変化が生じたと推察している(図2)。他の5つの制限酵素切断片でも同様の変異が認められ、*Bgl II*、*EcoRV*、*Hind III* では3型、*Hinc II*、

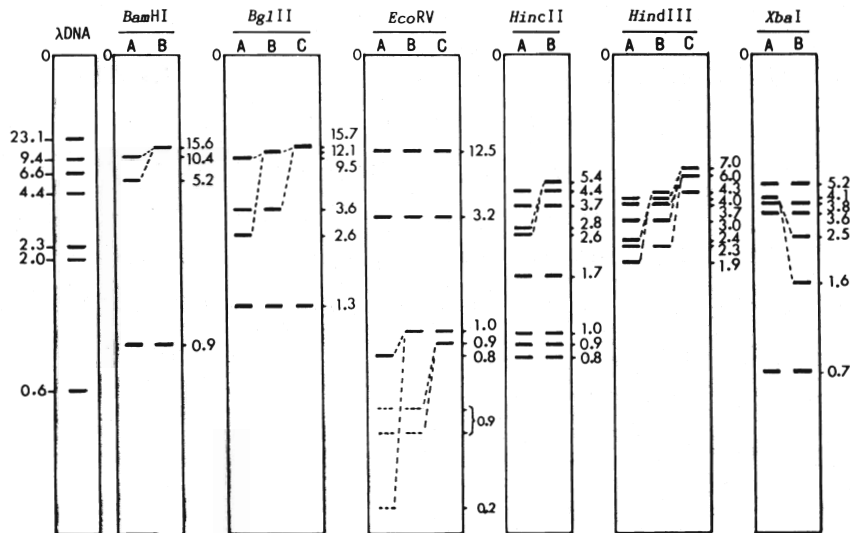


図2 各制限酵素で分解したDNA断片の電気泳動像模式図。

Xba Iでは2型が見られたとし、これらの型の組合せで遺伝的分化のレベルを調べ、分析したサクラマス4系統の分化レベルは低いと報告している。そのほか、ミトコンドリアDNAのRFLPの例としては、アメリカ五大湖のスズキ類でアイソザイムの結果より詳細な遺伝的分化が示せたと言う報告、アメリカ南部のカプトガニやバージニアガキのようにアイソザイムでは分化が認められなかった集団を明確な集団として分けることができたという報告もある。

このように、ミトコンドリアDNA分析は遺伝的分化を調べるのは感度が良さそうであり、遺伝的分化レベルの小さい生物集団には有効なようである。しかし、この方法は、ミトコンドリアDNAが凍結標本では壊れやすいなどの試料採集条件が厳しく実験操作が複雑なこと、また高額な制限酵素を使うなどアイソザイム分析法に比べると集団解析には不利な点が多く、手法については今後改良の余地が必要であろう。

3 ゲノムDNA

ゲノムDNAを対象とした遺伝子分析は、始まったばかりで水産分野での報告は殆どないが、平成4年度より日本海区水産研究所で取組み始めたDNAフィンガープリント法を中心に紹介する。

最近、優良形質固定化技術の1つとしてクローン魚の利用が考えられており、いくつかの魚種でクローン魚の作出が試みられている。そこで、クローンとして作出された魚が本当に遺伝的に均一であるかの検討が必要となってくるわけである。クローンの検討には、組織移植による適合性やアイソザイム遺伝子のホモ化の検討が主な手法として用いられてきた。しかし、これらの方法は操作が複雑、検討に数ヶ月もの長い時間を要する、検出感度が低いなどの難点を持っている。そこで、より簡便にかつ短時間にクローンの検証を行うために、最近注目されている個体識別法、DNAフィンガープリントを魚類に応用できないかの検討を行った。

ゲノムDNAは、全ての塩基配列が遺伝情報を担っているわけではなく、むしろ形質に関与しない非遺伝子DNAが9割と殆どである。最近、この非遺伝子DNAの特定領域に、ミニサテライトと呼ばれる超可変的の反復配列が発見され、それがDNA多型を良く示す領域であることがわかってきた。この

ミニサテライトは数十の塩基配列が10から1000回反復したもので、染色体に散在し、メンデル遺伝を行うことがわかっている。この反復数の違いがRFLPとして検出することができるようになった。すなわち、ミニサテライトを含むDNA断片の長さが、同じ染色体の位置のものでも、個々の染色体により異なる頻度が高いため、多くの多型性を示し、個体識別に利用できるというわけである。

操作方法としては、血液からの核内DNAの抽出、制限酵素によるゲノムDNAの分解、アガロースゲル電気泳動によるDNA断片の分離、ゲル内でDNAの2本鎖から1本鎖への変性、ゲルからメンブランフィルターへのDNAの転写、パーオキシターゼコンプレクスで標識化したプローブとの相補的結合、そして検出となる（原ら 1993）。

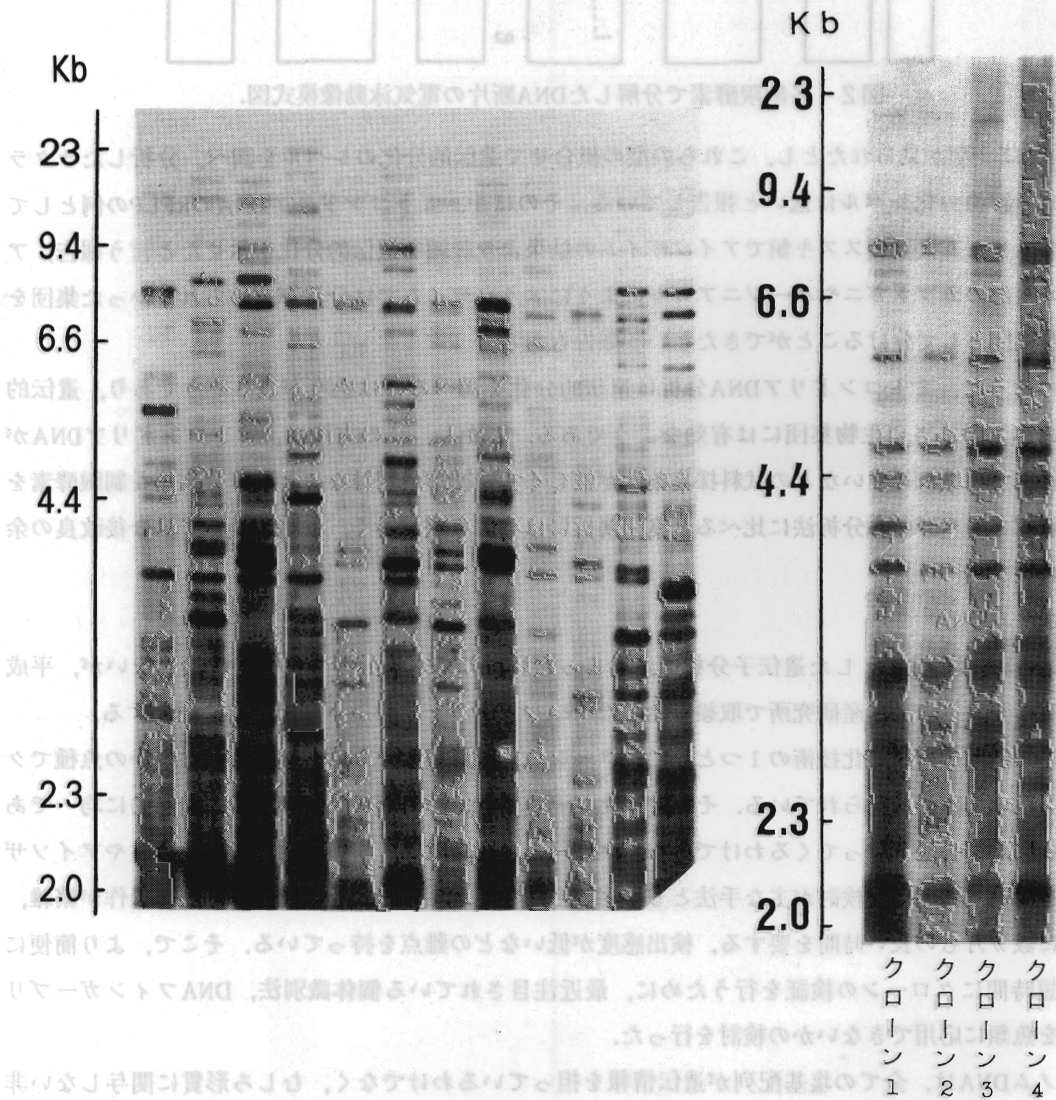


図3 人工種苗ヒラメのDNAフィンガープリント。

図4 クローンヒラメのDNAフィンガープリント。

表1 アイソザイム，ミトコンドリアとゲノムDNA分析法の特徴

| | アイソザイム | ミトコンドリアDNA | ゲノムDNA |
|--------|------------|---------------|-------------|
| 実験操作 | 簡単 | 繁雑 | 繁雑 |
| 試料状態 | 冷凍可 | 生体／新鮮 | 生体／新鮮 |
| 実験方法 | 確立 | 要改良 | 要改良 |
| 変異検出感度 | 並 | 高 | ? |
| 分化レベル | 地方品種 ～属 | 繁殖集団 ～種～? | ?～属 ～亜目～ |
| 実験コスト | 並 | 高 | 高 |
| 分析試料 | g-mg | g-mg (?) | mg-ng(PCR) |
| 応用分野 | 集団構造 | 遺伝的分化 家系判別 | 個体識別 |

注) ?はデータが殆どないため不明.

図3は、myoプローブを用いた人工種苗ヒラメのDNAフィンガープリントである。15本から20本のバンドがみえ、各個体間でいくつかの共通のバンドが見える。しかし、12個体の全の組合せにおいて同一のパターンがないことから、DNAフィンガープリントによって個体識別ができることがわかる。図4は、クローンヒラメのDNAフィンガープリントである。天然ヒラメのDNAフィンガープリント(図4)と比べると明らかなように電気泳動パターンが完全に一致していることがわかる。すなわち、非常に高い確率でDNAの塩基配列が一致していることを意味している。つまり、DNAフィンガープリント法はクローンの遺伝的解析に有効であることがわかる。最近、ヒラメに限らず、ギンザケ、サクラマス、ニジマス、アユ、コイ等でクローン魚の作出が試みられていることから、この方法はこれらの魚のクローン解析に有効と考えられる。

以上、アイソザイム、ミトコンドリアとゲノムDNAの分析例を紹介した。これらの方法は実験操作のしやすさ、ランニングコスト、変異の検出感度等の点でそれぞれ長短あり(表1)、その時々の研究目的に合った分析法を選ばなければならないのは言うまでもない。アイソザイム分析についてはかなり多くの水産生物で検討されており、個々の研究についてはそれらが参考になると思う。DNA分析法については実験法もまだまだ未完成な部分もあり、実験をしながら方法の改良もというのが現状であろう。しかし最近、DNA分析分野においてPCR法と言う画期的な方法の導入により、DNAの変異を極微量な試料から直接的に観察できる実験が非常に簡便に行えるようになってきている。水産でもこのPCR法を用いたDNA分析法は卵稚仔の種判別法や性判別法への応用が考えられ、急速に取入れられてゆくであろう。

文 献

- 原 素之・菊地省吾 (1992) 天然エゾアワビの遺伝的変異性と集団構造. 東北研報, (54), 107-114.
- 原 素之・藤尾芳久 (1992) 天然アワビにおけるアイソザイム遺伝子の地理的分布. 東北研報, (54), 115-124.
- 原 素之・出羽厚二・内藤笑美子・山内春夫 (1993) 非放射性プローブを用いたヒラメDNAフィンガープリント. 日水研報, (43), 117-123.
- KUJIMA, A. and MATSUNAMI, D. (1992) Haplotypic differences and variability of mitochondrial DNA among cultured stocks of the masu salmon complex. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 1431-1436.
- NEI, M. (1972) Genetic distance between populatiuon. *Am. Nat.*, 106, 283-292.
- NEI, M. (1975) *Molecular population genetic and evolution*. North- Holland American Elsevier publissing Co., Amsterdam and New York, 1-288pp.
- 日本水産資源保護協会 (1989) 海洋生物集団の識別等に関する先導的評価手法の開発事業報告書. アイソザイムによる魚介類の集団解析, 1-555.

[質疑応答]

- 小林 (日裁協能登島) ミトコンドリアDNAの保存方法による変性について, どのような保存方法で変性するのか, また変性させないためにはどうしたらよいのか.
- 原 (日水研) 現状では, 生体または水蔵で非常に鮮度のよい事が条件です. これはミトコンドリアDNAが, 凍結により壊れやすいということが知られているからです. 今後はこの点の方法の改善が是非必要でしょう.
- 加畑 (日裁協小浜) ①アイソザイムの分析方法の統一化はできているのか. 分析者により結果が異なるが. ②ミトコンドリアDNAの分析方法の統一化は. アイソザイムのデータで人により結果が異なっており, データを利用する者として困る.
- 原 平成元年3月に, 日本水産資源保護協会でもまとめている「アイソザイムによる魚類の集団解析」において, 魚介類75種のアイソザイムマニュアルがでており, この分析方法が現在一般的と考えられる. しかし完全に統一化するのは各個人の好みもあり, なかなか難しいと思う. ミトコンドリアDNAについては, まだまだ研究が少なく, 現在ミトコンドリアDNAの抽出方法を含めた分析方法の検討中というところで, 方法の統一化には至っていない. ほぼ確立されたアイソザイム分析でも, よりよい条件でアイソザイムバンドの分離がよくなることもある. 実験操作中の変性等による人工産物でないのなら, 分離が良いデータの方が正しいと思う.