

3) AFLP 法によるニジマスクローン作出の成否の検討

亀甲武志 (醒井分場)・小林 徹 (近大農)・中山耕至・甲斐嘉晃 (京大院農)
井戸本純一 (琵琶博)

【目的】

昨年度作出したニジマス第一卵割阻止型雌性発生魚の雌性発生継代魚は、理論上はその同胞は遺伝的に均一なクローンとなる。これまで、ゼブラフィッシュ、メダカ、アユ、コイ、ヒラメ、アマゴなどでクローンが作られているが、そのクローン作出の成否を検討する方法においては、親子、同胞間での組織移植実験や、DNA フィンガープリント法が用いられてきた。

そこで、本研究では比較的新しいDNA フィンガープリント法である AFLP 法を用いて、ニジマス第一卵割阻止型雌性発生魚の雌性発生継代魚として次世代を作出できた 2 系統 (24 系統と 27 系統) のクローン作出の成否を検討した。

【材料と方法】

まず 2 系統の祖母魚にあたる醒井産普通ニジマスのプライマ間での多型的バンドの割合を確認するために 9 通りのプライマセットを用いて、醒井産普通ニジマス 5 尾間での総バンド数と多型的バンド数をプライマ間で比較した (表 1)。そして、多型的バンドの割合が多かった 3 プライマセットを用いて、24 系統内の 5 尾および、27 系統内の 5 尾での多型的バンドの割合を求め (表 2)、系統間を識別できるバンド数を調べた (表 3)。

DNA 抽出は、脂鱗各 0.1g から DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて、Total DNA を抽出した。そして、AFLP Plant Mapping Kit (Applied Biosystems) のプロトコールに従い、AFLP 解析を行った。ただし、restriction-ligation 反応は 20℃、20 時間で行った。増幅した DNA は自動 DNA シーケンサー (Applied Biosystems 310A) で泳動し、DNA バンドは GENESCAN 2.1.1 ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて解析した。解析に用いた DNA バンドのサイズは約 80 ~ 360bp である。

【結果】

表 1 よりプライマ間で得られる多型的バンド数や総バンド数が異なることがわかった。そして、多型的バンドが得られる割合が多い 3 プライマセットにおいて、24・27 系統内でバンドの有無が完全に一致したことから (図 3、表 2)、これらの系統はクローンであると判定した。また、クローン系統間での比較では識別バンド数が数多く得られた (表 3) ことから、クローン系統間の遺伝的差異が大きいことが示唆された。

以上の結果から、AFLP 法はクローン魚作出の成否を検討する手段として有効であると考えられた。また、クローン 24 系統 (図 1 浮上から約 1 年で 181 尾飼育、平均体長 23.3 ± 2.7 cm、平均体重 245.3 ± 69.3g)、クローン 27 系統 (図 2 浮上から約 1 年で 24 尾飼育、平均体長 21.6 ± 2.3 cm、平均体重 213.3 ± 52.7g) は現在飼育、育成中であり、今後実験魚としての利用を予定している。

表1 醒井産ニジマス5個体間で得られた、各プライマセットにおける多型的バンドの割合(多型的バンド数/総バンド数)

		Mse I		
		CAG	CAT	CTT
Eco R I	ACT	16/76	24/74	14/54
	AAC	23/74	9/39	6/48
	ACG	8/31	5/25	8/31



図1 24系統



図2 27系統

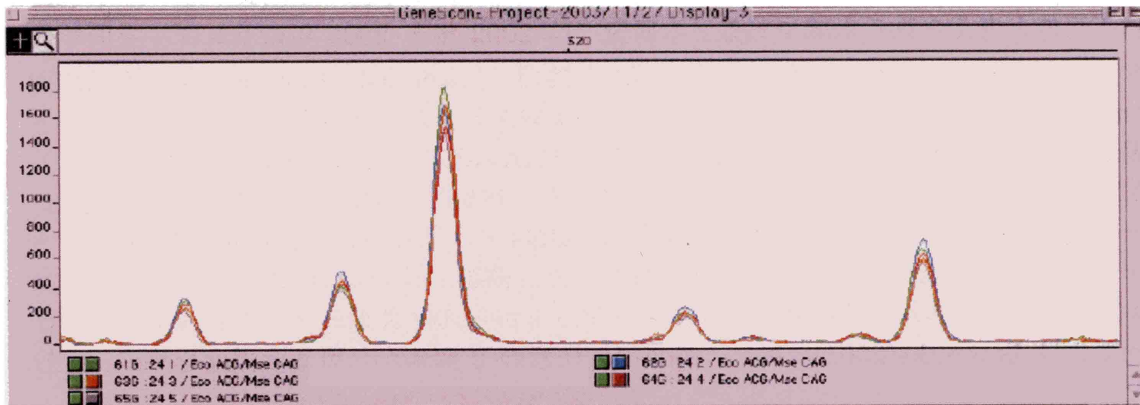


図3 プライマセットCAG/ACGにおいて、24系統内の5尾のDNAバンドパターンを重ねた

表2 24系統内(5尾)、27系統内(5尾)で得られた、3通りのプライマセットにおける多型バンドの割合(多型的バンド数/総バンド数)

	プライマセット(Mse I /Eco R I)		
	CAT/ACT	CAG/AAC	CAG/ACG
24系統内(8尾)	0/74	0/74	0/31
27系統内(7尾)	0/74	0/74	0/31

表3 3通りのプライマセットにおける、24系統(5尾)と27系統(5尾)を完全に識別できたバンド数

	プライマセット(Mse I /Eco R I)		
	CAT/ACT	CAG/AAC	CAG/ACG
系統間を識別できるバンド数	12	9	3