

7) AFLP法によるイワナ筋肉組織と鰭でのDNAバンドパターンの比較

亀甲武志 (醒井養鱒分場)、甲斐嘉晃、中山耕至 (京大院農)

【目的】滋賀県では琵琶湖東部流入河川ではヤマトイワナ *Salvelinus leucomaenis* が西部流入河川ではニッコウイワナ *Salvelinus leucomaenis* が生息するとされているが、両者の形態的識別は困難であり、またその分布の実態についてはまだ不明点が多く残されている。在来イワナの遺伝的多様性を保持しつつ放流事業を行うには、琵琶湖水系でのイワナ個体群構造および醒井産イワナの遺伝的特徴を把握しておくことが必要である。

そこで、本研究では琵琶湖水系でのイワナ個体群構造および醒井産イワナの遺伝的特徴を解明するために AFLP 法 (増幅断片長多型解析法) をイワナに適用した。AFLP 法は多型感度が高いだけでなく、PCR ベースのため、用いるサンプルが少量でも解析可能である。河川ごとの在来イワナ個体群はかなり小さいことが予想されるため、研究のためのイワナサンプル採集ができるだけ、在来イワナ個体群に影響を与えないようにすることが必要である。検体を再放流するには、鰭からの DNA 抽出が望ましい。しかし、鰭は外部環境と直接接しているため、目的以外の DNA の混入、いわゆるコンタミの危険性がある。そこで、鰭におけるコンタミの危険性を筋肉組織と比較し、確かめることを目的とした。

【方法】醒井産イワナ 2 個体の筋肉組織、よく洗浄した腹鰭各約 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 (図 1,2)。ただし、restriction-ligation 反応は 20 °C、20 時間で行った。Selective PCR で用いたプライマーセットは、3 組 [*Eco* R I + *Mse* I (ACA + CTA, AGC + CTA, AGG + CTA)] を用いた。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 ~ 400bp である。

【結果】同一個体の筋肉組織、腹鰭から抽出した DNA をもとに AFLP 法で解析した DNA バンド数および、DNA バンドパターンをそれぞれ表 1、図 3、4 に示す。3 プライマーセットで得られた DNA バンドは、80~400bp 内でピークの高さ 100 以上のものに関しては、すべての個体で筋肉組織、腹鰭で完全に一致し、DNA バンド数 もすべての個体で筋肉組織、腹鰭で完全に一致した。以上のことから、同一個体の筋肉組織、腹鰭から抽出した DNA をもとに AFLP 法で解析した DNA バンド数および、DNA バンドパターンは、80~400bp 内の十分に高いピークでは、完全に一致することが確かめられた。つまり、DNA 抽出用サンプルとして 筋肉組織の代わりに鰭でも代用可能であることが確かめられた。

したがって、今後イワナサンプル採集にあたっては、イワナを採捕後、鰭の一部を DNA 抽出用サンプルとして用いることも問題なく、採捕した地点に再放流することで、採集によって在来のイワナ個体群に与える影響を軽減できることがわかった。

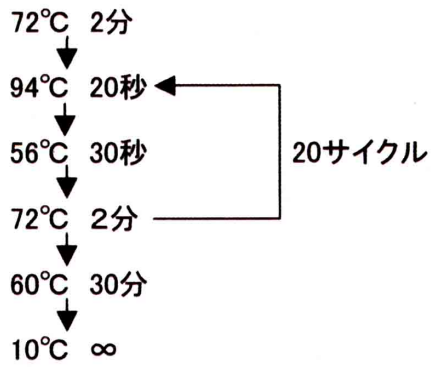


図1 Preselective PCRのPCRサイクル

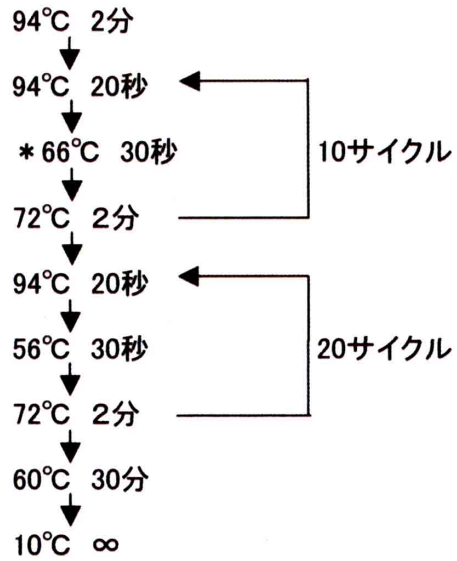


図2 Selective PCRのPCRサイクル
*は1サイクルごとに、1°C下げる

個体	組織	プライマーセット(Mse I/Eco RI)		
		CTA/ACA	CTA/AGG	CTA/AGC
1	筋肉	69	78	92
	腹鱭	69	78	92
2	筋肉	78	85	90
	腹鱭	78	85	90

表1 同一個体の筋肉、腹鱭組織から得たDNAバンド数

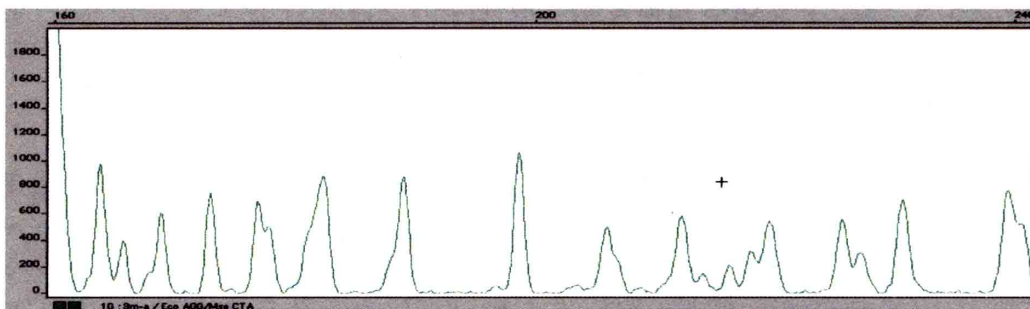


図3 プライマーセットCTA/AGCにおいて、
個体1の筋肉組織から得たDNAバンドパターン

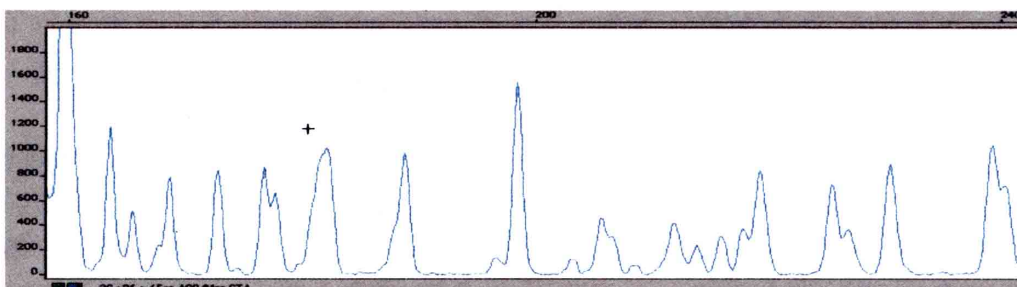


図4 プライマーセットCTA/AGCにおいて、
個体1の腹鱭組織から得たDNAバンドパターン