

## 8) AFLP 法による木曾川水系産ヤマトイワナ、千曲川水系産ニッコウイワナの 識別マーカーの探索

亀甲武志（醒井養鱒分場）、甲斐嘉晃、中山耕至（京大院農）

**【目的】**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には、ヤマトイワナとニッコウイワナを、遺伝的に識別するマーカーの開発が必要である。AFLP 法は多型感度が高いため、近縁な集団間の遺伝的差異を検出するのに有効と考えられているが、64 種類もあるプライマーセットから、効率的に識別マーカーを探索するには、ヤマトイワナ、ニッコウイワナ間でなるべく多くの多型が得られるプライマーを選択する必要がある。そこで、本研究ではヤマトイワナ、ニッコウイワナ 5 個体ずつを用いて、64 通りすべてのプライマーセットによって得られる識別マーカーの数を比較することを目的とした。

**【方法】**外部形態が詳しく調べられた木曾川水系産ヤマトイワナ 5 個体、千曲川水系産ニッコウイワナ 5 個体（山本ら 2000、長野県水産試験場分譲）を用いた。サンプルは放流イワナの遺伝的影響を受けていない野生群と考えられている。DNA 抽出は筋肉組織約 0.1g から DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて行い、前章と同様に AFLP 法による解析を行った。ただし、Selective PCR では AFLP Plant Mapping Kit (Applied Biosystems) の 64 通りすべてのプライマーセットで DNA 増幅させた。解析に用いた DNA バンドのサイズは約 80 ~ 360bp で、個体ごとに DNA バンドの有無を 1,0 標記で示した。そして、プライマーによって得られた識別マーカーの数を比較した。

**【結果】**64 通りのプライマーによって得られた、木曾川水系産ヤマトイワナ 5 個体と千曲川水系産ニッコウイワナ 5 個体の識別マーカーの数を表 1 に示す。2 セットのプライマーセット [*Eco* R I + *Mse* I (AGG + CAA, ACG + CAA)] を除き、すべてのプライマーセットで DNA が増幅され、各プライマーセットにおいて約 50~100 種類の DNA バンドを得ることができた。そのうち、木曾川水系産ヤマトイワナではすべての個体で DNA バンドがあるが、千曲川水系産ニッコウイワナではすべての個体で DNA バンドがない、といった両水系間のイワナを遺伝的に識別できるバンドを 44 セットのプライマーで確認することができた。また、その遺伝的に識別できるバンドつまり識別マーカーは 44 セットのプライマー間でも、1~4 個と差が見られた。実際の Gene Scan による識別マーカーの一例を図 1 に示す。

以上の結果から AFLP 法では用いるプライマーセットによって得られる木曾川水系産ヤマトイワナ、千曲川水系産ニッコウイワナの識別マーカーが大きくことなることがわかった。したがって、ヤマトイワナ、ニッコウイワナのマーカーを効率的に探すには多くの識別マーカーが得られたプライマーセットを用いて、さらに複数水系からの多くのサンプルを解析することで、ヤマトイワナ、ニッコウイワナの DNA マーカーを探索する必要があると考えられた。

表1 64通りのプライマーによる木曽川水系産ヤマトイワナ5個体と千曲川水系産ニッコウイワナ5個体の識別マーカークの数

		Mse I							
		CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT
Eco R I	ACA	4	4	2	1	2	1	3	2
	ACT	1	2	0	1	0	2	3	0
	AAC	2	0	3	0	0	2	0	2
	ACC	2	1	1	0	2	2	3	0
	AGC	2	0	0	2	1	2	0	0
	AAG	1	2	1	0	0	2	2	1
	AGG	-	0	1	1	4	4	1	2
	ACG	-	0	0	2	1	0	1	2

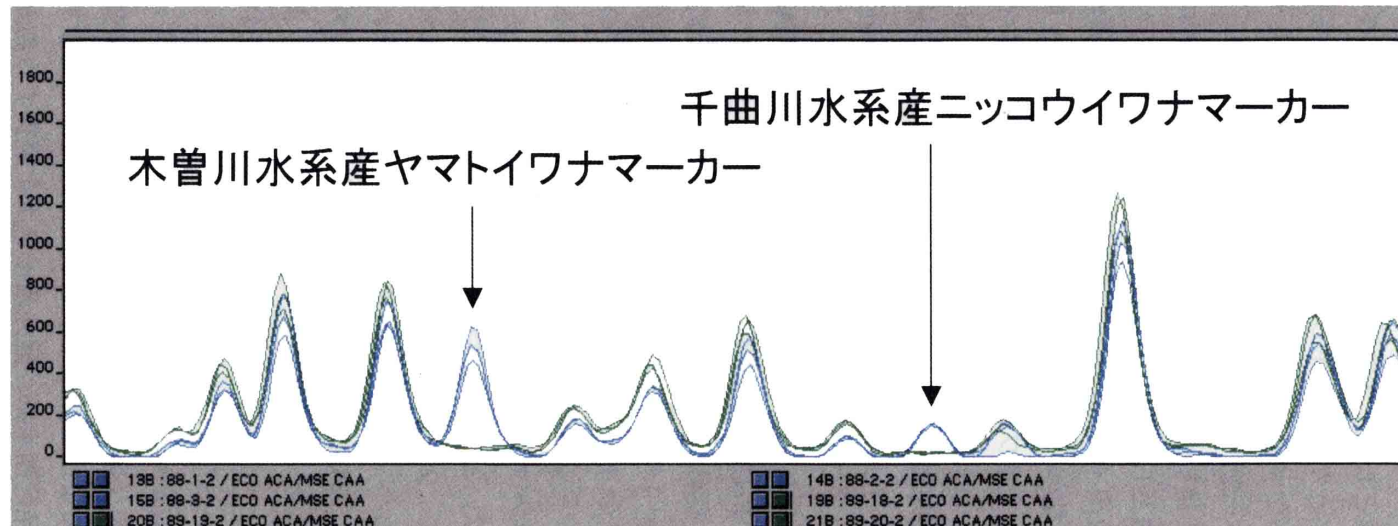


図1 プライマーセットCAA/ACAにおいて、得られた木曽川水系産ヤマトイワナマーカーと千曲川水系産ニッコウイワナマーカー