

9) AFLP 法によるヤマトイワナ、ニッコウイワナの遺伝的識別

亀甲武志（醒井養鱒分場）、甲斐嘉晃、中山耕至（京大院農）

【目的】我々は、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する一環として、木曽川水系産ヤマトイワナと千曲川水系産ニッコウイワナを遺伝的に識別するマーカーを開発した。しかし、2水系から採集したイワナ5個体ずつの遺伝的特徴だけからヤマトイワナ、ニッコウイワナのDNAマーカーとするのは問題がある。

そこで本研究では、さらに多くの個体数を用い、異なる水系から採集したイワナサンプルをAFLP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ことを目的とした。

【方法】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る木曽川水系産ヤマトイワナ19個体、千曲川水系産ニッコウイワナ16個体（長野県水産試験場分譲）、富士川水系産ヤマトイワナ16個体（山梨県水産技術センター分譲）、利根川水系産ニッコウイワナ18個体（群馬県水産試験場分譲）を用いて、AFLP法による解析を行った。DNA抽出は筋肉、鱗組織約0.1gからDNeasy（キアゲン）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では木曽川水系産ヤマトイワナと千曲川水系産ニッコウイワナを遺伝的に識別するマーカーとして有効な6通りのプライマーセット〔*Eco*RI + *Mse*I (ACA + CAA, ACC + CAA, ACA + CAC, AGG + CTA, AGG + CTC, ACC + CTG)〕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、それぞれのDNAバンドをもつ水系ごとのイワナの個体数を水系間で比較した。

【結果】それぞれのDNAバンドをもつ水系ごとのイワナの個体数を表1に示す。6通りのプライマーセットから約400個のDNAバンドを得ることができた。そのうちヤマトイワナではすべての個体でDNAバンドがあるが、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ヤマトイワナとニッコウイワナを遺伝的に識別できるバンドを1個体を除いて、2種類みつけることができた。さらにヤマトイワナとニッコウイワナ間で有意差があるバンドも2種類みつけることができた。さらにそれぞれの水系ごとに固定されたバンドを28種類みつけることができ、それ以外にも、水系間でバンドの有無に有意差があるものを32種類みつけることができた。つまり、ヤマトイワナとニッコウイワナの識別マーカーを見つけることができたものの、それ以上に数多くの水系ごとの識別マーカーが見つかった。

以上の結果から、ヤマトイワナ、ニッコウイワナの遺伝的な違いよりも水系ごとのイワナの遺伝的な違いが大きいことが示唆された。したがって今後、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するには、これらの識別に有効なバンドを用いて琵琶湖水系、醒井産イワナを解析することが有効であることが考えられた。

表1 それぞれのDNAバンドをもつ水系ごとのイワナの個体数

プライマーセット		ヤマトイワナ		ニッコウイワナ		有意差					
Mse I EcoR I	サイズ	A木曾川	B富士川	C千曲川	D利根川	A/B	A/C	A/D	B/C	B/D	C/D
ヤマトイワナとニッコウイワナでDNAバンドの有無に有意差があるもの											
CAA ACA	116.6	0/19	1/16	16/16	18/18	—			**	**	
CAC ACA	243	19/19	16/16	0/16	1/18			**		**	
CTA AGG	250.2	0/19	0/16	7/16	18/18		**		*		**
CTC AGG	244.3	0/19	1/16	8/16	16/18	—	*	**	*	**	*
水系ごとのイワナでDNAバンドの有無が固定されているもの											
CAA ACA	92.4	19/19	16/16	16/16	0/18						
CAA ACA	111.1	19/19	16/16	16/16	0/18						
CAA ACA	132	19/19	16/16	16/16	0/18						
CAA ACA	136.1	19/19	0/16	0/16	0/18						
CAA ACA	145.2	19/19	0/16	0/16	0/18						
CAA AGC	113.3	19/19	16/16	16/16	0/18						
CAA ACC	260.5	0/19	0/16	16/16	0/18						
CAA ACC	356.1	0/19	0/16	0/16	18/18						
CAC ACA	128.5	19/19	16/16	16/16	0/18						
CAC ACA	149.8	19/19	16/16	16/16	0/18						
CAC ACA	231.1	0/19	0/16	0/16	18/18						
CAC ACA	253.1	19/19	16/16	16/16	0/18						
CAC ACA	261	0/19	0/16	0/16	18/18						
CTA AGG	84.2	0/19	0/16	0/16	18/18						
CTA AGG	97.6	19/19	16/16	16/16	0/18						
CTA AGG	103.4	19/19	0/16	0/16	0/18						
CTA AGG	114.1	0/19	16/16	0/16	0/18						
CTA AGG	191.4	0/19	0/16	0/16	18/18						
CTA AGG	196.7	0/19	16/16	0/16	0/18						
CTC AGG	86.5	19/19	16/16	16/16	0/18						
CTC AGG	100.6	0/19	16/16	0/16	0/18						
CTC AGG	135.1	19/19	16/16	16/16	0/18						
CTC AGG	169.6	0/19	0/16	0/16	18/18						
CTC AGG	180.1	0/19	0/16	0/16	18/18						
CTC AGG	236.4	19/19	16/16	16/16	0/18						
CTC AGG	318.9	0/19	0/16	0/16	18/18						
CTC AGG	342.7	0/19	0/16	0/16	18/18						
CTG ACC	177	19/19	0/16	0/16	0/18						
	213.8	19/19	16/16	16/16	0/18						
水系ごとのイワナでDNAバンドの有無に有意差があるもの											
CAA ACA	150.6	0/19	1/16	0/16	18/18	—			—	**	
CAA ACA	230.1	16/19	0/16	0/16	0/18	**	**	**			
CAA ACA	322.5	0/19	0/16	15/16	0/18		**		**		**
CAA ACC	94.8	11/19	15/16	10/16	0/18	*	—	**	—	**	**
CAA ACC	123.9	19/19	14/16	16/16	0/18	—			—	**	
CAA ACC	227.2	17/19	16/16	16/16	0/18	—	—	**			
CAA ACC	279.2	0/19	0/16	15/16	0/18		**		**		**
CAA ACC	290.5	0/19	2/16	0/16	18/18	—			—	**	
CAC ACA	100.7	18/19	1/16	16/16	18/18	**	—	—	**	**	
CAC ACA	125.9	0/19	16/16	16/16	4/18			—		**	**
CAC ACA	228.4	19/19	1/16	6/16	18/18	**	**		—	**	**
CAC ACA	273.8	19/19	1/16	0/16	5/18	**			—	—	—
CAC ACA	330.5	9/19	0/16	0/16	0/18	**	**	**			
CTA AGG	118.7	15/19	0/16	0/16	0/18	**	**	**			
CTA AGG	192.9	0/19	0/16	11/16	0/18		**		**		**
CTA AGG	292.6	17/19	16/16	16/16	0/18	—	—	**			
CTA AGG	295	2/19	16/16	15/16	0/18	**	**	—	—		**
CTA AGG	305	0/19	0/16	0/16	13/18			**		**	**
CTA AGG	349.1	1/19	0/16	0/16	17/18	—	—	**		**	**
CTC AGG	94.8	16/19	1/16	0/16	18/18	**	**	—	—	**	**
CTC AGG	106.1	0/19	0/16	11/16	0/18		**		**		**
CTC AGG	107	19/19	1/16	0/16	0/18	**			—	—	
CTC AGG	108.4	1/19	15/16	0/16	0/18	**	—	—	**	**	
CTC AGG	174.8	0/19	0/16	0/16	15/18			**		**	**
CTC AGG	196	3/19	16/16	16/16	18/18	**	**	**			
CTC AGG	225.5	0/19	0/16	0/16	8/18			**		**	**
CTG ACC	85.2	19/19	1/16	16/16	17/18	**		—	**	**	—
CTG ACC	171.3	2/19	16/16	16/16	18/18	**	**	**			
CTG ACC	178.3	0/19	0/16	16/16	1/18			—		—	**
CTG ACC	194.7	19/19	1/16	0/16	13/18	**		—	—	**	**
CTG ACC	211.6	0/19	1/16	0/16	17/18	—		**	—	**	**
CTG ACC	314	17/19	16/16	14/16	0/18	—	—	**	—	**	**

*、**は水系間でそれぞれ5%、1%で有意差があることを示し、—は有意差がないことを示す。