

3) ニゴロブナの遺伝的多様性検出のためのDNA増幅の試み

小林 徹・井戸本純一

【背景】栽培漁業における放流対象魚種の大量放流事業の進展に伴い、天然資源の遺伝的多様性への影響が危惧される。放流種苗および天然資源の遺伝的多様性を把握し、多様性保全のための指標とすることが必要である。

【目的】遺伝的変異性把握のための遺伝標識を検索するため、DNA分析による遺伝的多型検出技術の開発と改良や集団解析に有効な遺伝子領域の探索を行い、フナ資源の遺伝的多様性の把握法を確立する。

【成果概要】

①多型性を豊富に保存していると考えられているミトコンドリアDNAのうち特に系群分析に多く用いられているD-loop領域の多型性を明らかにするため、まず1尾のニゴロブナのDNAをサンプルとして、D-loop領域を挟む4種類のプライマー(図1, 表1)を用いてPCR(図2)を行い、D-Loop領域の遺伝子の増幅を試みた。CB3R-L(mix)と12SAR-H(mix)、CB3R-L(mix)とPhe-H(mix)、Pro-L(mix)とPhe-H(mix)ではいずれの場合もDNAは増幅されなかったが、Pro-L(mix)と12SAR-H(mix)では約1500塩基のDNA断片が増幅され、これがD-Loop領域を含んでいることが推定された(図5)。さらに、Pro-L(mix)と12SAR-H(ヒト)、CB3R-L(コイ)と12SAR-H(ヒト)、CB3R-L(コイ)とPhe-H(mix)の組み合わせのプライマーを使って、従来のAmpliTaqTMとExTaqTMとで増幅能を比較した(図3)ところ、AmpliTaqTMで増幅が不可能な場合もExTaqTMで増幅することがわかったが、D-Loopを含む領域のみを増幅するには、さらにPCR条件の詳細な検討が必要である。また、ExTaqTMについてはアニール反応の温度が50℃と37℃の場合について検討したが、37℃の場合は非特異的領域の増幅が起こって特定の領域のみの増幅はできなかった(図6)。

④簡便な遺伝的多型検出方法としてのRAPD-PCR(Random Amplified Polymorphic

DNA-Polymerase Chain Reaction)法によるDNAの増幅(図4)を試行したところ、任意に作成した5種類のプライマーのうち、4種で3~18本の断片の増幅が認められた(図7)。

【成果の活用】今後のPCR適正条件の検討および増幅された遺伝子の制限酵素切断多型検出に活用できる。

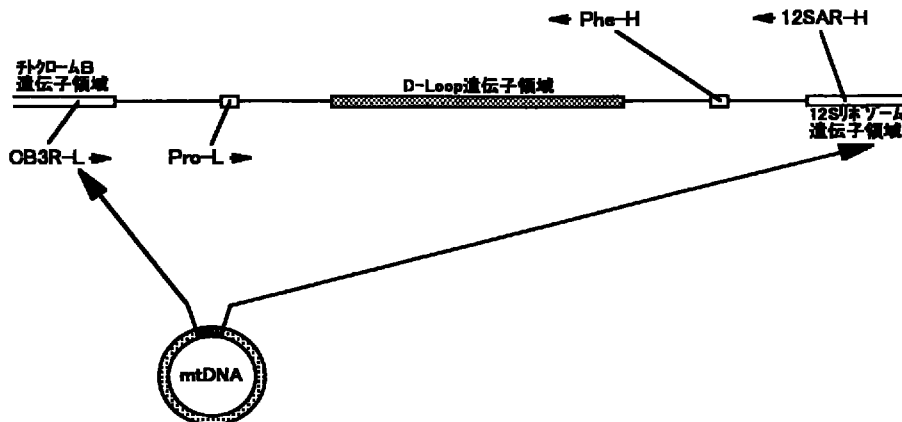


図 1. PCR法で増幅したミトコンドリアD-Loop領域周辺の遺伝子配置およびプライマーの接合位置.

表 1. 実験に使用したプライマーの接合標的領域および塩基配列

プライマー名	接合領域	塩基配列
12SAR-H(ヒト)	ヒの12SリボソームRNA	ATA GTG GGG TAT CTA ATC CCA GTT
OB3R-L(ヒト)	ヒの16SリボソームRNA	CAT ATT AAA CCC GAA TGA TAT TT
OB3R-L(コイ)	コイの16SリボソームRNA	CAC ATC AAA CCA GAA TGA TAC TT
12SAR-H(mix)	12SリボソームRNA一般	ATA(AG)T(AG)GGGTATCTAATCC(CT)AGTT
OB3R-L(mix)	16SリボソームRNA一般	CA(CT)AT(CT)(AC)A(AG)CC(AC)GAATG(AG)TATTT
Pro-L(mix)	プロリン tRNA一般	(CT)(TC)AC(TC)(TAC)(CT)(CT)(AG)(AG)C(TAC)CGCAAAGC
Phe-H(mix)	フェニルアラニン tRNA一般	(TC)C(TGA)TCT(AC)(GA)(GA)CATTTTCAGTG
RAPD-1	ランダム	GTGTGTGTGA
RAPD-2	ランダム	GAGAGAGAGC
RAPD-3	ランダム	CAGTCAGTGT
RAPD-4	ランダム	ATCGATCGTC
RAPD-5	ランダム	TACGTACGAG

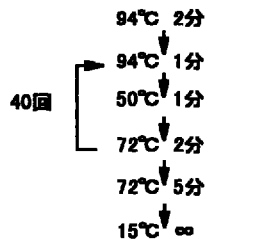


図 2. ミックスプライマーでのD-Loop増幅実験に用いたPCRサイクル.

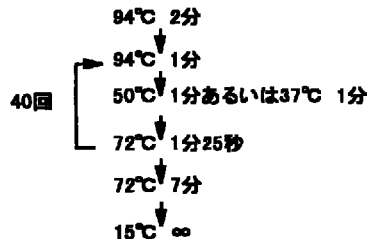


図 3. 各種プライマーでのD-Loop増幅実験に用いたPCRサイクル.

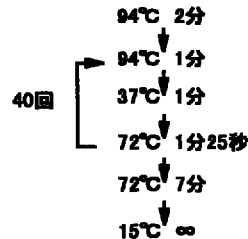


図 4. RAPD-PCR実験に用いたPCRサイクル.

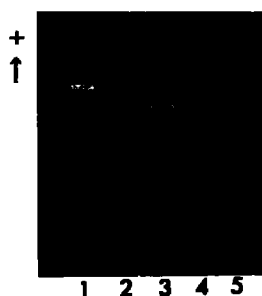


図 5. ミックスプライマーによるフナ
のミトコンドリアDNAのD-Loop
領域の増幅実験。
レーン左から
1. 分子重マーカ、
2. Pro-LとPhe-H、
3. Pro-Lと12SAR-H、
4. OB3R-LとPhe-H、
5. OB3R-Lと12SAR-H。
ポリマーゼはExTaqを用いた。

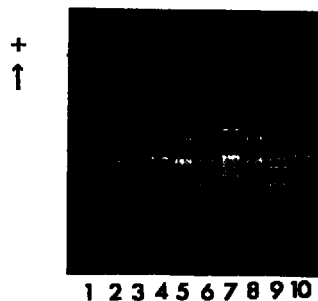


図 6. 各種のプライマーによるフナ
のミトコンドリアDNAのD-Loop領域の増幅実験。
レーン左から
1. 分子重マーカ、
2,5,8. Pro-L(mix)と12SAR-H(ヒト);
3,6,9. OB3R-L(コイ)とPhe-H(mix);
4,7,10. OB3R-L(コイ)と12SAR-H(ヒト)。
使用ポリマーゼ:
AmpliTaq(2-4); ExTaq(5-10)。
アニール温度: 50°C(2-7); 37°C
(8-10)。

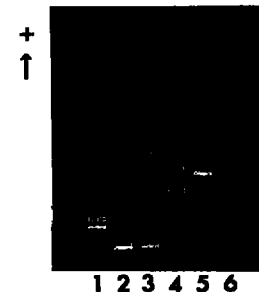


図 7. RAPD-PCRによるフナDNA多型
検出。レーン左から 1. 分子重マーカ、
2. RAPD-1; 3. RAPD-2; 4. RAPD-3;
5. RAPD-4; 6. RAPD-5。