4) セタシジミのＤＮＡ分析手法の検討

井戸本純一・小林　徹

【背景】種苗生産技術の確立にともない、近い将来、本格的なセタシジミの種苗生産・放流事業の実施が期待されている。閉鎖的な環境における人工種苗の大量放流にあたっては、その遺伝的な影響についても十分な注意が必要であるが、セタシジミの遺伝学的特性に関する知見は乏しく、研究手法の確立が望まれる。

【目的】Ｄ型仔貝のような微少試料についても分析が可能なＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）法による増幅ＤＮＡを用いた分析手法について、ＤＮＡ増幅の鍵となるプライマーの作出を試みた。

【成果概要】

1. セタシジミ成貝の閉殻筋から常法によりＤＮＡの粗抽出液を得た。
2. 魚類などの知見に基づいて作成したミトコンドリアＤＮＡの特定部位を増幅するプライマーを用いてＰＣＲ法を行ったところ、複数の明瞭な分画が検出された。
3. 単純な繰り返し配列を持った5通りの比較的短いプライマー（ランダムプライマー）を使って全ＤＮＡからの不特定部位の増幅を試みたところ、数本から十数本の分画が検出された

【成果の活用】

1. ミトコンドリアＤＮＡの増幅に関しては、全ＤＮＡから不特定の部位が増幅されたと思われ、プライマーの塩基配列およびＰＣＲ法の諸条件の検討が必要である。
2. ランダムプライマーに関しては、不明瞭な分画もあるものの、いくつかの強い分画が得られていることから、諸条件を最適化して再現性を確認すれば、集団の分析に応用が可能と思われる。

表1　実験に使用したプライマーの塩基配列とその接合が見込まれる部位

プライマー名	接合領域	塩基配列
12SAR-H(ﾋﾄ)	ﾋﾄの12SﾘﾎﾞｿｰﾑRNA	ATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTT
CB3R-L(ｺｲ)	ｺｲのﾁﾄｸﾛｰﾑB	CACATCAAACCAGAATGATACTT
Pro-L(mix)	ﾌﾟﾛﾘﾝtRNA一般	(CT)(TC)AC(TC)(TAC)(CT)(CT)(AG)(AG)C(TAC)CCCAAAGC
Phe-H(mix)	ﾌｪﾆﾙｱﾗﾆﾝtRNA一般	(TC)C(TGA)TCT(AC)(GA)(GA)CATTTTCAGTG
RAPD-1	ﾗﾝﾀﾞﾑ	GTGTGTGTGA
RAPD-2	ﾗﾝﾀﾞﾑ	GAGAGAGAGC
RAPD-3	ﾗﾝﾀﾞﾑ	CAGTCAGTGT
RAPD-4	ﾗﾝﾀﾞﾑ	ATCGATCGTC
RAPD-5	ﾗﾝﾀﾞﾑ	TACGTACGAG

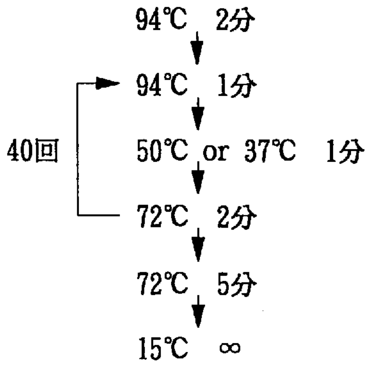

図1　ミトコンドリアＤＮＡの増幅に用いたＰＣＲサイクル.

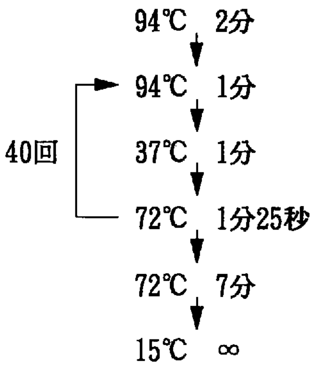

図2　ランダムプライマーによる増幅に用いたＰＣＲサイクル.

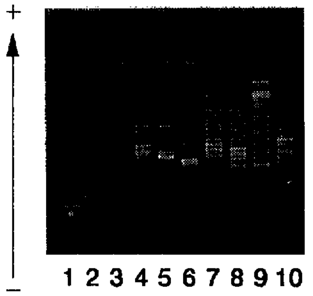

図3　セタシジミのミトコンドリアＤＮＡの増幅実験結果. 1, 分子量マーカー; 2:5:8, Pro-L(mix)と12SAR-H(ﾋﾄ); 3:6:9, CB3R-L(ｺｲ)とPhe-H(mix); 4:7:10, CB3R-L(ｺｲ)と12SAR-H(ﾋﾄ). 2～4と5～10はﾎﾟﾘﾒﾗｰｾﾞの種類が, 2～7と8～10はｱﾆｰﾙ温度が異なる.

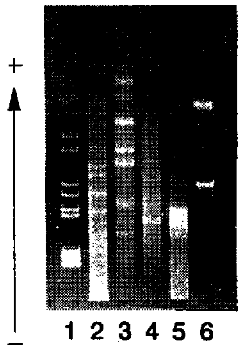

図4　ランダムプライマーによるセタシジミのＤＮＡ増幅実験結果. 1. 分子量マーカー, 2. RAPD-1, 3, RAPD-2; 4, RAPD-3; 5. RAPD-4; 6. RAPD-5.