

### 3) 琵琶湖産フナ属三亜種、ニゴロブナ、ゲンゴロウブナ、およびギンブナ(ヒワラ)のミトコンドリア16S領域の塩基配列

小林 徹・小林敬典(水産庁養殖研)

【目的】琵琶湖産フナ属3亜種、ニゴロブナ・ゲンゴロウブナ・ギンブナ(ヒワラ)の魚種判別をおこなうため、フナのDNAのうち種変異性が予想されるミトコンドリア(mt)16S領域の464塩基の配列を調べた。

【方法】体側筋からフェノール・クロロホルム法で抽出した粗全DNAを鋳型として、16S領域を挟むユニバーサルプライマー(表1)を用いて、PCR(表2, 図1)を行った。増幅された1本鎖のDNA断片を用いて、片方のプライマー(16SAR L)に配列既知のM13配列をつけたものを使って再PCRを行った。増幅されたDNA断片はDNAシーケンサABI PRISM™377を用いて、ダイプライマー法によって16S領域の塩基配列を決定した。

【結果】ニゴロブナ、ゲンゴロウブナ、およびヒワラ(ギンブナ)のミトコンドリア16S領域の464bpの塩基配列(図2)をコイ(データベースEMBLから採用)のものと比較した結果、コイをアウトグループとしたフナのクラスターが形成され、まずゲンゴロウブナが別れ、三者ではニゴロブナとヒワラが比較的近いという結果となり、従来提唱されてきた分類体系が16S領域の塩基配列においても当てはまった(図3)。またこれら464bpの塩基配列中ではニゴロブナとヒワラは1.3%またこれらとゲンゴロウブナは3.2%の置換がおこっていた。これらのことから、この16S領域をPCRで増幅し三者の16S配列の違いのある部分を認識する制限酵素を用いて断片長多型を調べれば三者における魚種判別が可能である。さらに明瞭な違いの検出と、3亜種の遺伝的關係がどのようになっているかについてはさらに他の領域における塩基配列の調査が必要である。但し、今回調べた領域はミトコンドリアDNAであり、これは母系遺伝をするので交雑が起こっていた場合は検知できない。各亜種間で交雑が起こっているのか否かは、ゲノムDNAの中のターゲット領域を定めた上で同様の分析を行うか、またはRAPDをつかって種特異的な増幅断片を見つけるなどの今後のさらなる手法の改良開発が必要である。

表1, ミトコンドリア16S領域増幅に用いたプライマーとその塩基配列

プライマー	塩基配列
16SAR-L	5'-CGCCT (CG) TT (GT) (AC) (ACT) (CT) AAAAAAT-3'
16SBR-H	5'-CCGGT (CT) TGAACCTCAGATCA (CT) GT-3'

表2, mt16S領域増幅のためのPCR反応液の組成

	μl
サンプル	5
10×PCR Buffer	5
10×dNTPs	5
ポリメラーゼ	0.5
16SAR-L	0.5
16SBR-H	0.5
D W	33.5
合計	50

carp-16s	1	CTCTGGAG	10	GGATTCGG	20	TTATCCCTA	30	GGTAACCTG	40	TTTCGTTGAT	50
GENGORO Cons	1	CTCTGGAG	10	GGATTCGG	20	TTATCCCTA	30	GGTAACCTG	40	TTTCGTTGAT	50
HIMARA Cons	1	CTCTGGAG	10	GGATTCGG	20	TTATCCCTA	30	GGTAACCTG	40	TTTCGTTGAT	50
NIGORO Cons	1	CTCTGGAG	10	GGATTCGG	20	TTATCCCTA	30	GGTAACCTG	40	TTTCGTTGAT	50
carp-16s	51	CGGCTA TGT	60	TTAGCCGGAT	70	CATATTGGT	80	CAGATGTTCT	90	TTG - TTATG	100
GENGORO Cons	51	CGGCTA TGT	60	TTAGCCGGAT	70	CATATTGGT	80	CAGATGTTCT	90	TTG - TTATG	100
HIMARA Cons	51	CGGCTA TGT	60	TTAGCCGGAT	70	CATATTGGT	80	CAGATGTTCT	90	TTG - TTATG	100
NIGORO Cons	51	CGGCTA TGT	60	TTAGCCGGAT	70	CATATTGGT	80	CAGATGTTCT	90	TTG - TTATG	100
carp-16s	101	AGATGTCCT	110	TTAGTITTA	120	GGAAATTC	130	CGGTCCACC	140	GGAGGCTTT	150
GENGORO Cons	101	AGATGTCCT	110	TTAGTITTA	120	GGAAATTC	130	CGGTCCACC	140	GGAGGCTTT	150
HIMARA Cons	101	AGATGTCCT	110	TTAGTITTA	120	GGAAATTC	130	CGGTCCACC	140	GGAGGCTTT	150
NIGORO Cons	101	AGATGTCCT	110	TTAGTITTA	120	GGAAATTC	130	CGGTCCACC	140	GGAGGCTTT	150
carp-16s	151	CTTTCCCTC	160	TTGGTCCGC	170	CAACCGAAG	180	TAATACTCA	190	TTTCCACAA	200
GENGORO Cons	151	CTTTCCCTC	160	TTGGTCCGC	170	CAACCGAAG	180	TAATACTCA	190	TTTCCACAA	200
HIMARA Cons	151	CTTTCCCTC	160	TTGGTCCGC	170	CAACCGAAG	180	TAATACTCA	190	TTTCCACAA	200
NIGORO Cons	151	CTTTCCCTC	160	TTGGTCCGC	170	CAACCGAAG	180	TAATACTCA	190	TTTCCACAA	200
carp-16s	201	AGTTTTCAT	210	TTTATTGAC	220	TTGCTTAA	230	GGTTCAGTT	240	TTGTACCTTA	250
GENGORO Cons	201	AGTTTTCAT	210	TTTATTGAC	220	TTGCTTAA	230	GGTTCAGTT	240	TTGTACCTTA	250
HIMARA Cons	201	AGTTTTCAT	210	TTTATTGAC	220	TTGCTTAA	230	GGTTCAGTT	240	TTGTACCTTA	250
NIGORO Cons	201	AGTTTTCAT	210	TTTATTGAC	220	TTGCTTAA	230	GGTTCAGTT	240	TTGTACCTTA	250
carp-16s	251	AGCTCCAAAG	260	TTGCTTCCG	270	TTTGTATTA	280	TTATACCCG	290	TTTCCACGG	300
GENGORO Cons	251	AGCTCCAAAG	260	TTGCTTCCG	270	TTTGTATTA	280	TTATACCCG	290	TTTCCACGG	300
HIMARA Cons	251	AGCTCCAAAG	260	TTGCTTCCG	270	TTTGTATTA	280	TTATACCCG	290	TTTCCACGG	300
NIGORO Cons	251	AGCTCCAAAG	260	TTGCTTCCG	270	TTTGTATTA	280	TTATACCCG	290	TTTCCACGG	300
carp-16s	301	TTAGATCAAT	310	TTCACTGACT	320	TTAAAGGGGA	330	TACAGTTAAG	340	CCCTCGTTTA	350
GENGORO Cons	301	TTAGATCAAT	310	TTCACTGACT	320	TTAAAGGGGA	330	TACAGTTAAG	340	CCCTCGTTTA	350
HIMARA Cons	301	TTAGATCAAT	310	TTCACTGACT	320	TTAAAGGGGA	330	TACAGTTAAG	340	CCCTCGTTTA	350
NIGORO Cons	301	TTAGATCAAT	310	TTCACTGACT	320	TTAAAGGGGA	330	TACAGTTAAG	340	CCCTCGTTTA	350
carp-16s	351	TCCATTCAAT	360	TAGGTCCTA	370	TTAAAAGAC	380	TAGTATTTC	390	TCTACCTTC	400
GENGORO Cons	351	TCCATTCAAT	360	TAGGTCCTA	370	TTAAAAGAC	380	TAGTATTTC	390	TCTACCTTC	400
HIMARA Cons	351	TCCATTCAAT	360	TAGGTCCTA	370	TTAAAAGAC	380	TAGTATTTC	390	TCTACCTTC	400
NIGORO Cons	351	TCCATTCAAT	360	TAGGTCCTA	370	TTAAAAGAC	380	TAGTATTTC	390	TCTACCTTC	400
carp-16s	401	TACGGTCAAA	410	ATA TCCG	420	TCCCGTTGAA	430	TTTGTAGTCA	440	TTGGCAGGC	450
GENGORO Cons	401	TACGGTCAAA	410	ATA TCCG	420	TCCCGTTGAA	430	TTTGTAGTCA	440	TTGGCAGGC	450
HIMARA Cons	401	TACGGTCAAA	410	ATA TCCG	420	TCCCGTTGAA	430	TTTGTAGTCA	440	TTGGCAGGC	450
NIGORO Cons	401	TACGGTCAAA	410	ATA TCCG	420	TCCCGTTGAA	430	TTTGTAGTCA	440	TTGGCAGGC	450
carp-16s	451	TGACCTCC	460	TAC	470		480		490	500	
GENGORO Cons	451	TGACCTCC	460	TAC	470		480		490	500	
HIMARA Cons	451	TGACCTCC	460	TAC	470		480		490	500	
NIGORO Cons	451	TGACCTCC	460	TAC	470		480		490	500	

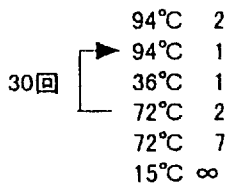


図1, mt16S領域増幅のためのPCRサイクル。

図2, コイ, ゲンゴロウブナ, ギンブナ, ニゴロブナのミトコンドリア16S領域の塩基配列。

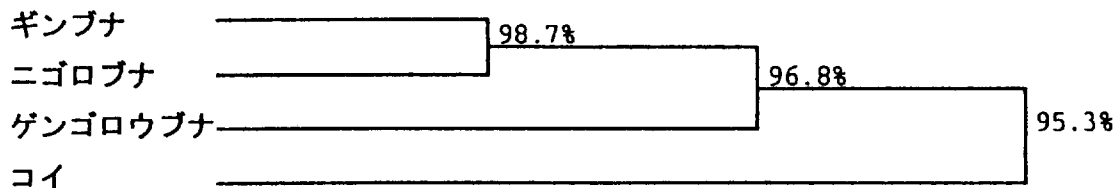


図3, コイをアウトグループとしたゲンゴロウブナ, ギンブナおよびニゴロブナの16S領域のシーケンスデータによる分子系統樹