

AFLPフィンガープリント法で求めたBSIによる アワビ集団の遺伝変異保有量の推定

岩渕 光伸・太刀山 透・筑紫 康博・深川 敦平
(研究部)

Estimation of Genetic Variability in Population of Abalone by BSI from AFLP Fingerprinting

Mitsunobu IWABUCHI, Toru TACHIYAMA, Yasuhiro CHIKUSHI and Atsutoshi FUKAGAWA
(Research Department)

西日本におけるアワビの栽培漁業は、クロアワビ (*Haliotis discus discus*)の種苗放流による生産性の増大が図られ成果を上げてきた。しかし疾病の発生によるクロアワビ種苗生産の不調のため、エゾアワビ (*H. d. hanai*)の種苗生産、放流が西日本各地で行われるようになった。クロアワビとエゾアワビでは生態的な違いがあると言われているが、形態的には似通っており、判別は難しく、エゾアワビの放流が生態系に与えた影響や、今後の種苗放流が遺伝的多様性に与える影響を把握することは重要な課題であると考えられる。

遺伝的多様性を推定する方法としてDNA多型の検出による方法があり、最近では水産生物においてもアユ、¹⁾²⁾マダイ³⁾⁴⁾をはじめとして多くの魚種で解析が行なわれている。また、DNA多型の検出法にはいくつかの方法があるが、⁵⁾植物の多型解析用に開発されたAFLPフィンガープリント法(以下AFLP法と略記)⁶⁾が有望視されている。その理由として、従来の方法に比べて解析に使用するDNAが微量で良いこと、1回の解析で多くのDNA断片を解析できること、データの再現性と信頼性が非常に高いことがあげられる。しかし水産生物に対するAFLP法の応用例はまだ少なく、アワビに用いた報告は見当たらない。本研究では、植物用に開発されたAFLP法がアワビのDNA多型検出に利用できるか否かについて検討し、同法によるアワビ集団の遺伝変異保有量推定の有効性を調べた。その結果、AFLP法によって検出された増幅断片のBSI(断片の共有度)が、クロアワビとエゾアワビ集団の地理的隔離距離と遺伝的分化程度を示唆するという知見が得られたので報告する。

材料及び方法

供試アワビ クロアワビのサンプルとして1996年に福岡県大島地先で採集された個体と1999年に静岡県で採集された個体を用いた。またエゾアワビのサンプルとして1996年宮城県で採集された個体を用いた。福岡県ではエゾアワビの種苗放流は1990年に開始されており、今回のクロアワビのサンプルは採集年、採集場所及び年齢査定の結果6年以上経過したものと判断され、エゾアワビの種苗放流の影響を受けていない集団である。一方静岡県においてはエゾアワビの種苗放流は行われておらず、サンプルはクロアワビであると判断された。

供試個体数は各サンプル10個体で、採集後、DNA抽出処理まで-20℃で冷凍保存した。

DNA抽出 DNAは各個体の筋肉部からSDS-フェノール法を用いて抽出した。抽出後AFLP処理を行なうまで-20℃で保存した。

AFLP解析 AFLP処理はパーキンエルマーバイオシステムズ社のAFLP™ Plant Mapping Kit Regular Plant Genomes用を用いた。処理手順は添付マニュアルに従い、以下のように行なった。

(1) サンプルDNA0.05 µgを制限酵素EcoRIとMseIで切断し、同時にアダプターをライゲーション処理した。この処理は25℃の温度条件で一晩行なった。

(2) アダプターに相補的で末端に1塩基を付加したプライマーを用いてPre Selective PCRを行ない、両端がEcoRIとMseIの組み合わせの断片のみを増幅した。

(3) EcoRI側にAGG、MseI側にCTTの塩基配列を加えたプライマーペアを用いてSelective PCRを行なった。

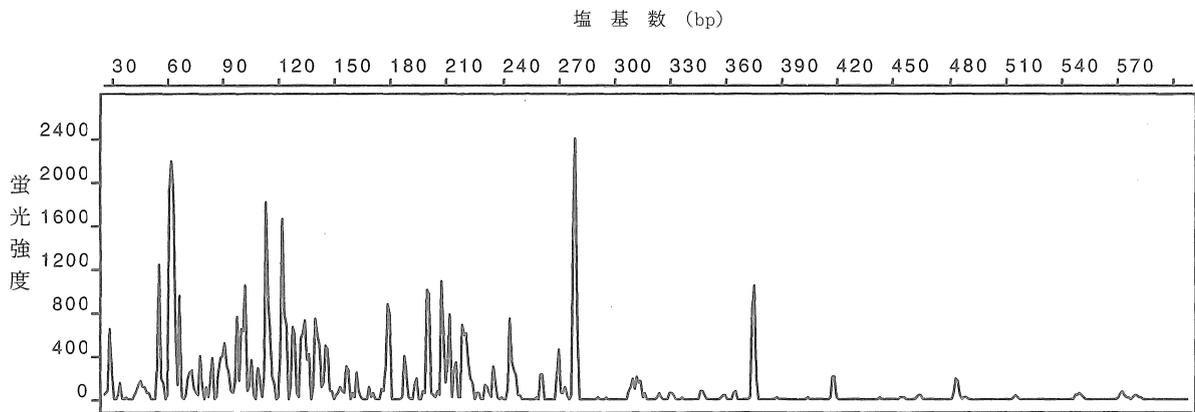


図1 アラビDNAのAFLP解析パターン

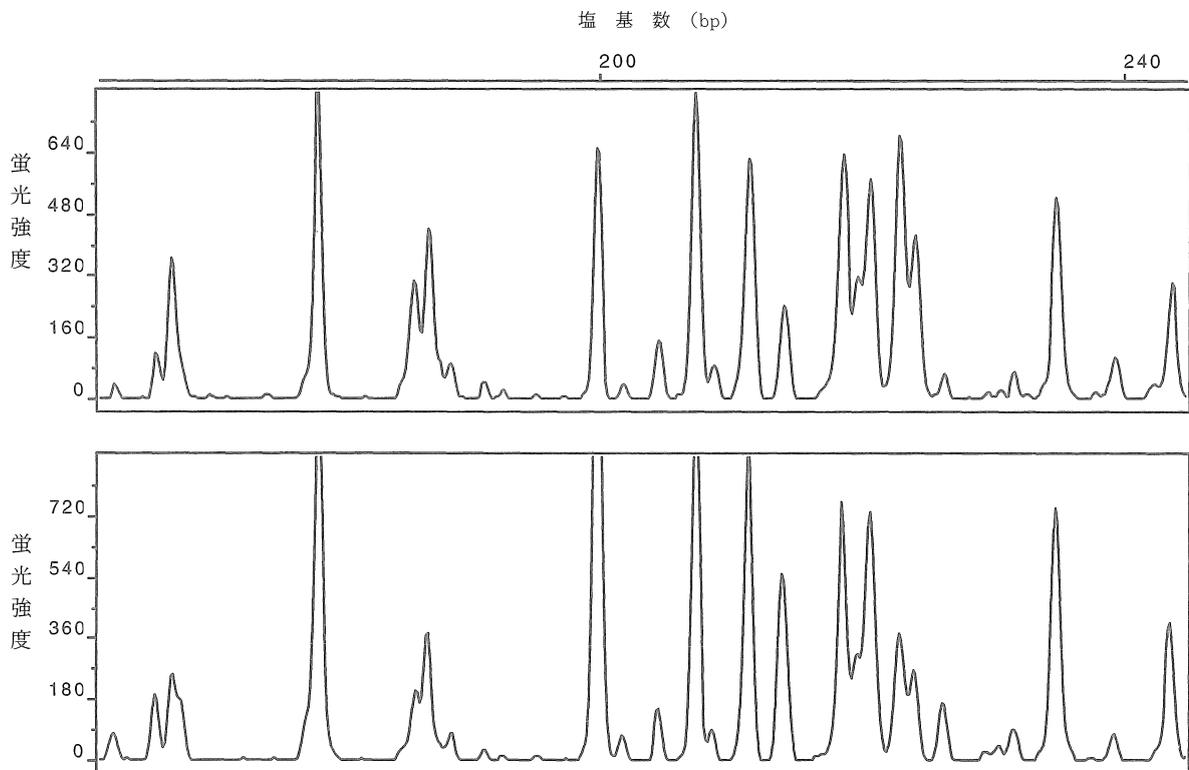


図2 同一の固体から採集したDNAのAFLPパターン

(4) PCR後の増幅断片はパーキンエルマーバイオシステムズのGenetic Analyzer 310によって検出した。サンプル中には分子量マーカを加え、Gene Scanソフトウェアで増幅断片のサイズを決定した。

各サンプルの遺伝的類似度を示す指標として2個体間で検出された総断片数に占める共有断片数の割合 (Band Sharing Indices : BSI) を次式によって算出し、集団内と集団間の平均を求めて集団の遺伝的な類似度を求めた。

$$BSI = \frac{2N_{ab}}{N_a + N_b}$$

N_{ab} : 個体 a および b に共有する断片数

N_a : 個体 a に認められた断片数

N_b : 個体 b に認められた断片数

結 果

増幅断片は図1に示したように塩基数50bpから500bpの間に検出された。また、図2に示したように同一の個体から単離したDNAではAFLPパターンは完全に一致

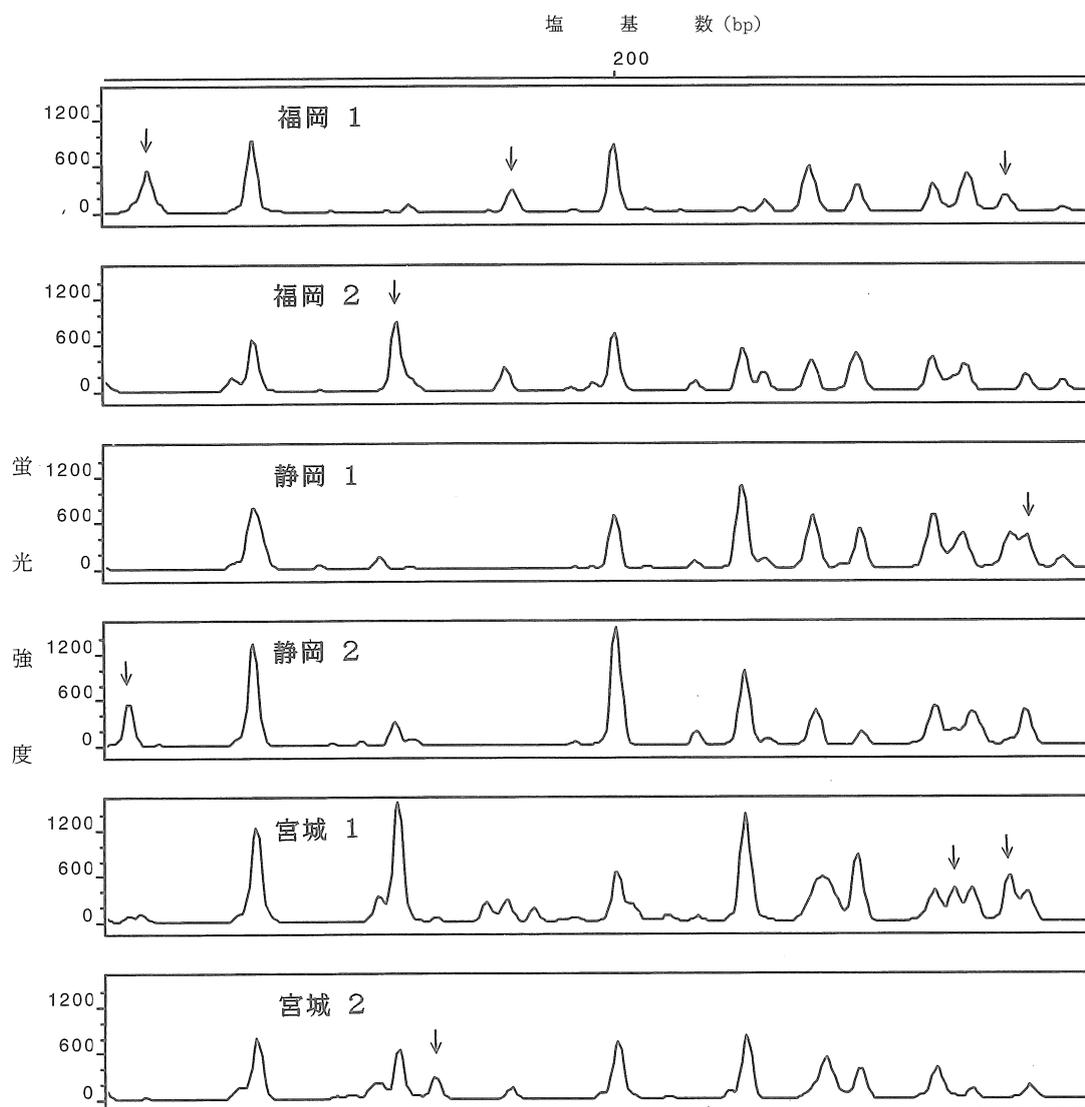


図3 各サンプルのAFLPフィンガープリントパターン
矢印は多型を示した主な増幅断片ピークを表す

し、SDS-フェノール法で単離したDNAがAFLP解析に使用できること、植物用のAFLPキットでもアワビDNAを処理できることが判明した。さらに図3に示したように、個体ごとに多型を示す増幅断片が多く確認され、DNA多型の検出と遺伝変異保有量の推定が可能であることが分かった。しかし300bp以上の増幅断片では検出されるピークの幅が広くなり、データの信頼性が低下する傾向が認められたため、今回の解析からは除外した。また、図中の縦軸に相当する検出した増幅断片のピークが200未満のものについても除外し、強い蛍光ピークが得られた増幅断片のみを解析することとした。

したがって増幅断片サイズ50~300bpで、ピークが

200を超える条件を満たした断片は、福岡県のサンプルが42本~55本（総断片数103本）、静岡県のサンプルが39本~51本（総断片数89本）、宮城県のサンプルが38本~55本（総断片数85本）認められ、総断片数は142本であった。各集団の遺伝的多様度の指標となる各県ごとのすべてのサンプルで認められた断片数、すなわち単型を示した断片数は福岡県が16.5%にあたる17本、静岡県が24.7%にあたる22本、宮城県が18.8%にあたる16本であった。すべての30サンプルで認められた共通の断片は、塩基数61bp、64bp、98bp、100bp、122bp、136bp、200bp、212bp及び279bpの9本であった。

各個体間のBSIから求めた各集団内と集団間のBSIの

表1 各県アワビの集団内と集団間のBSIの平均

	福 岡 県	静 岡 県	宮 城 県
福 岡 県	0.7134±0.050	0.0709±0.045	0.6571±0.051
静 岡 県		0.7494±0.040	0.6720±0.049
宮 城 県			0.7223±0.055

平均を表1に示した。集団内は静岡県0.749、宮城県0.722、福岡県0.713となり、静岡県がもっとも遺伝的類似度が高く、福岡県がもっとも低い結果となった。一方、集団間のBSI平均は、福岡県と静岡県間が最も高く0.709となり、福岡県と宮城県間が0.657と最も低くなった。

考 察

単型を示した断片の割合と集団内のBSIの平均から、静岡県のサンプルが最も遺伝的類似度の高いことが判明した。この理由は明らかではないが、静岡県のサンプル採集年が1999年と、福岡県、宮城県のサンプル採集年より3年遅かったことから、遺伝的多様度の低い人工種苗の放流が天然アワビ集団の遺伝変異保有量を低下させている可能性も考えられた。この点を明らかにするためには、種苗放流の影響を全く受けていないと判断される海域の天然アワビ集団の解析、福岡県と宮城県の最新のサンプルの解析、さらには人工種苗集団の解析が必要である。

各集団間のBSIの平均は、福岡県と宮城県のアワビ集団間で最も低い値を示し、次いで静岡県と宮城県間、そして福岡県と静岡県間で最も高い値を示した。これは、集団間の地理的な隔離距離を表しているものと推定された。また、クロアワビとエゾアワビの遺伝的分化程度を示唆していることも推察され、さらに多くのサンプルの解析が必要である。またクロアワビ、エゾアワビの他にも、メガイアワビ、マダカアワビなど種の異なる集団についても同様に解析して比較することも重要であると考えられる。

今回、植物用のキットを用い、DNAシーケンサーで増幅バンドを検出するAFLP法によって、アワビ集団の遺伝変異保有量の推定が可能となった。AFLP法は、サイズマーカーとの比較により増幅断片サイズを1塩基単位で特定することが可能である。また、再現性が高いため、RFLP法やRAPD法のように比較したいサンプルを同一ゲル上に泳動しなくてもデータを比

較することが可能である。このため、集団の遺伝的多様度の推定など多数のサンプルを解析しなければならない場合には、非常に有効な手法であると考えられる。しかしながら今回、同じ条件で処理しているにもかかわらず、同じ塩基数の増幅断片でもサンプルによってはピークの高さに大きな違いが認められるものがあった。本研究では、増幅断片のピークとノイズとを明確に区別する目的で、解析に使用する増幅断片のピークを200以上に限定した。このため、ピークの高さが200に近く、増幅断片であることが疑われる断片も排除している。より信頼性の高い解析結果を得るためには、多くのデータを蓄積し、解析に使用するピークの下限について検討を加えていくことが必要であると考えられた。

今回使用したプライマーペアはEcoRI-AGG, MseI-CTTであるが、AFLPキットには、プライマーペアの組み合わせが他に63通りある。したがって同じサンプルでもプライマーペアの組み合わせを変えることによって、遺伝変異保有量の推定などのデータの信頼性は高まることが期待される。また、EcoRI-AGG, MseI-CTTのプライマーペアではクロアワビとエゾアワビを個体レベルで明確に識別するマーカーは見つからなかったが、他のプライマーペアの組み合わせの中に、クロアワビとエゾアワビの識別が可能なマーカーが見つかることも期待される。

謝 辞

本研究を行なうにあたり、サンプルを提供いただいた東京大学海洋研究所小島茂明助教授および静岡県水産試験場伊豆分場川嶋尚正氏にお礼申し上げます。

要 約

- 1) 福岡県、静岡県、宮城県の天然アワビ10個体ずつからDNAを抽出し、EcoRI-AGG, MseI-CTTのプライマーペアを用いてAFLP解析を行なった。
- 2) 塩基数50bpから300bpの間に認められた増幅断片数は、福岡県のサンプルが42~55本、静岡県のサンプルが39~51本、宮城県のサンプルが38~55本であった。
- 3) それぞれの集団内のBSIが最も高かったのは静岡県の集団で、最も低かったのは福岡県の集団であった。
- 4) 集団間では福岡県と宮城県のBSIが最も低く、地理的隔離距離が長いことを反映している結果が得られた。

文 献

- 1) 高木基裕, 谷口順彦 : DNAフィンガープリントにおけるリュウキュウアユの遺伝保有量と地理的分化. 水産育種, 20,29-37(1984).
- 2) 高木基裕, 曾我部五郎, 谷口順彦 : AFLPフィンガープリント法によるアユの遺伝変異保有量と分化. 水産育種, 26,55-61(1998).
- 3) K.Tabata,H.Kishioka,A.Mizuta and N.Taniguchi : Genetic Diversity of Five Strains of Red Sea Bream *Pagrus major* by RFLP Analysis of mtDNA D-loop Region. *Fish. Sci.*, 63,344-348 (1997).
- 4) M.Takagi,N.Taniguchi,D.Cook and R.W.Doyle : Isolation and characterization of micro satellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. *Fish. Sci.*, 63,199-204(1997).
- 5) 谷口順彦・高木基裕 : DNA多型と魚類集団の多様性解析, 「魚類のDNA」(青木宙・隆島史夫・平野哲也編), 恒星社厚生閣, 東京, 1997,pp.117-137.
- 6) P.Vos,R.Hoger,M.Bleeker,et al. : AFLP:a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23,4407-4414(1995).