

# AFLP 法によるアコヤガイ集団の遺伝解析

吉岡 武志・福澄 賢二・深川 敦平  
(研究部)

## Genetic Analysis in Population of *Pinctada fucata martensii* by AFLP

Takeshi YOSHIOKA・Kenji FUKUZUMI and Atsutoshi FUKAGAWA  
(Research Department)

日本におけるアコヤガイは、日本海側では秋田県男鹿半島以南、太平洋側では房総半島から南西諸島までの外洋に面した内湾および瀬戸内海に分布しており<sup>1)2)</sup>、各地で真珠養殖が営まれている。しかし、1994年から一部の養殖場で貝柱の赤変化を伴うアコヤガイの大量死(以下、赤変病)が発生するようになり、'96年以降、西日本各地で問題となっている<sup>3)</sup>。この疾病の蔓延により、国産の真珠母貝生産量は'99年には'92年最盛期の25%にまで減少し<sup>4)</sup>、良質な国産貝の入手が極めて困難な状況となっている。

一方、本県においては、アコヤガイが筑前海各地の漁港周辺に点在していることが確認されている。筑前海では現在まで真珠産業がなかったことから赤変病はなく、無病の国産天然貝として有望視されている。しかし、貝の特性については知見がなく、良質な真珠貝として重要な要素となる貝の成長や真珠の巻き特性、遺伝的特性、水温耐性等の解明が急がれている。

このうち遺伝的特性の解明については、アコヤガイのDNA塩基配列情報が乏しいため、DNA多型検出法によって遺伝変異保有量を推定することが有効な手段であると考えられる。このDNA多型検出法<sup>5)</sup>にはいくつか方法があるが、中でもAFLP法<sup>6)</sup>(Amplified Fragment Length Polymorphism)はRFLP法やRAPD法の長所を併せ持ち、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高いこと<sup>7)</sup>などから、近年ではアユ<sup>8)9)</sup>、マダイ<sup>10)11)</sup>、アワビ<sup>7)</sup>などの魚種で解析が行なわれている。しかしAFLP法の水産生物への応用例はまだ少なく、アコヤガイに用いた報告は見当たらない。

本報告ではAFLP法のアコヤガイへの有効性を検討するとともに、県内、県外の天然アコヤガイと真珠母貝用の人工具について多型解析を行った。その結果、同法はアコヤガイに有効であり、また検出された増幅断片のBSI<sup>12)</sup>(断片の共有度)からアコヤガイ集団の遺伝的な多様性や類似度について知見が得られたので報告する。

## 方 法

供試アコヤガイおよびAFLP解析方法は次のとおりとした。

### 1. 供試貝

天然貝として、図1に示した福岡県の相島と福吉、本州日本海側のA県および本州太平洋側のB県で採集された個体を使用した。これら採集地はアコヤガイ養殖がない海域で、他地域のアコヤガイとの交雑はないものと考えられている。

また人工具には実際に真珠養殖用の母貝に使われているもの(継代数11代、4県の貝を交配)を使用した。

これら供試貝は'03~'04年に採集したもので、解析に用いた個体数は各集団10個体とした。採集後はDNA抽出処理まで-20℃で冷凍保存した。

### 2. DNA抽出

DNAは各個体の閉殻筋からDNeasy Kit(QIAGEN)を用いて抽出した。抽出法はDNeasy Kitのプロトコールに従った。抽出後AFLP処理を行なうまで-20℃で保存した。

### 3. 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

## 結 果

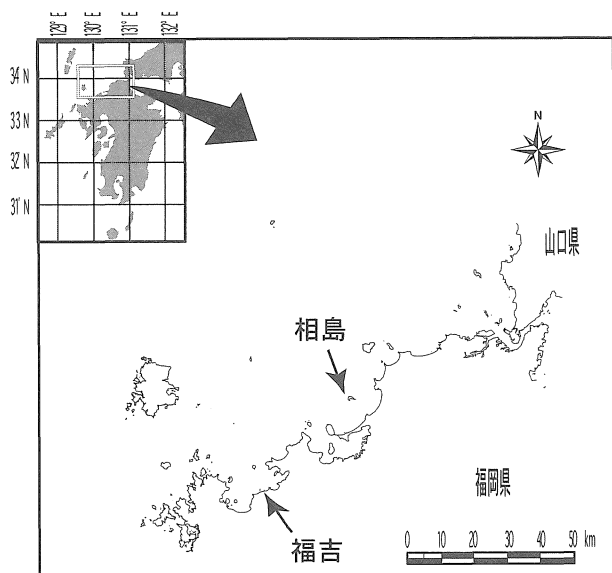


図1 福岡県内のアコヤガイ採集場所

た。処理手順は添付マニュアル<sup>13)</sup>に従い、次のように行った。

- (1) サンプルDNA 0.05  $\mu$ g 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°C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AGC, 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。
- (4) PCR後の増幅断片はパーキンエルマーバイオシステム社の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。なお人工具については天然貝との集団間BSIの数値に意味を持たないため、集団内BSIについてのみ求めた。

$$BSI = 2Nab / (Na + Nb)$$

Nab : 個体 a および b に共有する断片数

Na : 個体 a に認められた断片数

Nb : 個体 b に認められた断片数

増幅断片は図1に示したように塩基数50bpから400bp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は、AFLPパターンが完全に一致し、DNeasy Kitで単離したDNAがAFLP解析に使用できること、植物用のAFLPキットでもアコヤガイ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明らかとなった。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あること、また75bp未満のものについては増幅断片が多く密集しており1塩基単位の識別が困難であったことから、これらについては今回の解析から除外した。また、解析に用いた増幅断片は、原則として蛍光ピークが200以上を示したものを使用した。200未満のものについては各サンプルの増幅断片と比較し、ノイズによるものかサンプルの増幅断片かの区別をつけ、サンプルの断片と判断されたものは解析に用いることとした。

その結果、増幅断片サイズ75~300bpで、上記の条件を満たした断片は、相島のサンプルが60本~70本(総断片数113本)、福吉が59本~65本(総断片数109本)、A県が52本~64本(総断片数110本)、B県が59本~73本(総断片数110本)、人工具では54本~65本(総断片数90本)認められた。

各集団の遺伝的多様性の指標となる単型を示した断片数、すなわち各集団ごとのすべてのサンプルで認められた断片数は相島が12.4%にあたる14本、福吉が16.5%にあたる18本、A県が13.6%にあたる15本、B県が12.7%にあたる14本、人工具では23.3%にあたる21本であった。

全てのサンプルの総断片数は169本で、共通の断片は塩基数79, 80, 92, 110, 123, 124, 137 bpおよび143bpの8本であった。

各個体間のBSIから求めた集団内、集団間のBSI平均値、標準偏差および各集団間のt検定の結果を表1に示した。

集団内のBSIは類似度が高い順に、人工具0.783, 福吉0.704, B県0.675, A県0.671, 相島0.667となり、天然貝は人工具に比べていずれも低く、遺伝的多様性が高い結果となった( $p < 0.01$ )。天然貝の中では、福吉が最も類似度が高く、相島が最も低かった。

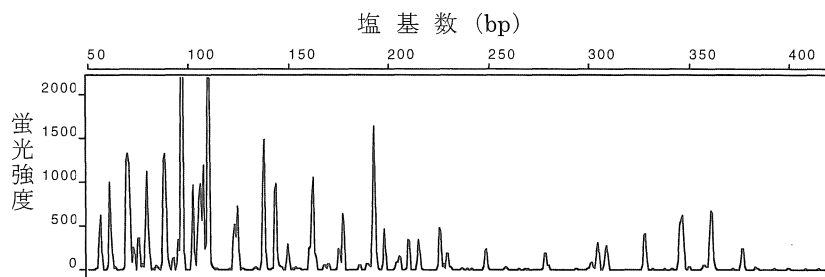


図2 アコヤガイ DNA の AFLP パターン

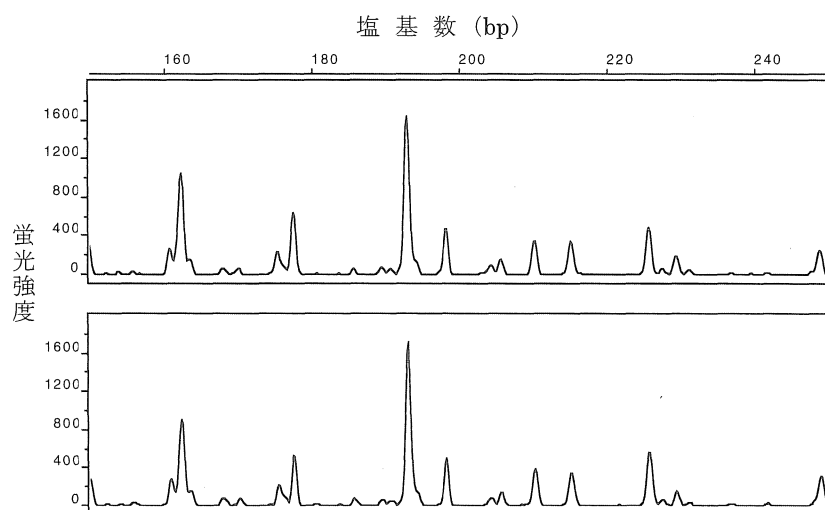


図3 同一の個体から採集した DNA の AFLP パターン

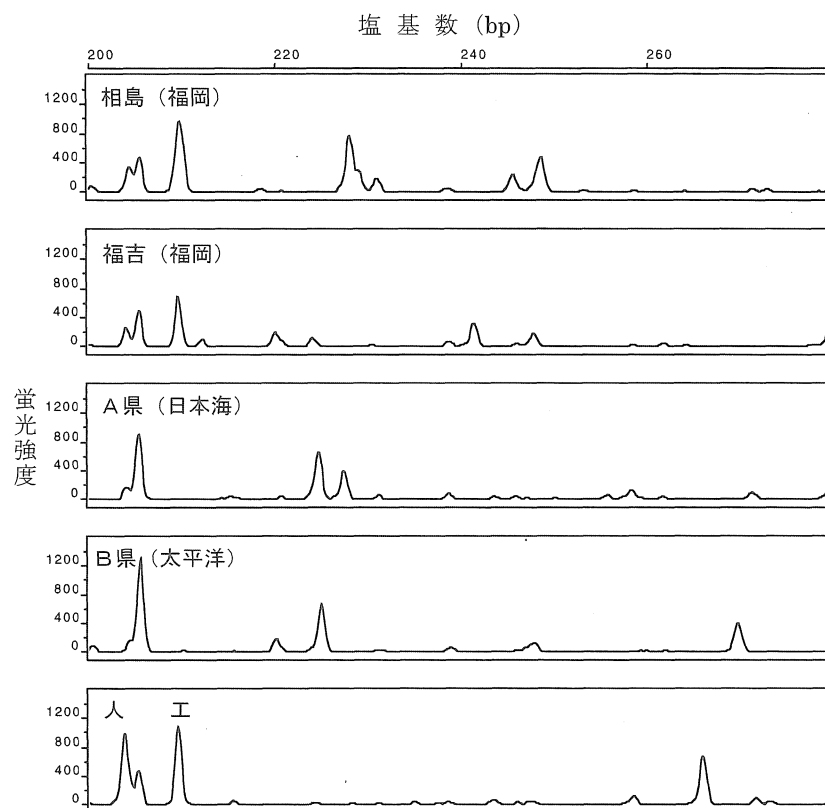


図4 各サンプルの AFLP パターン

表1 アコヤガイの集団内および集団間BSIの平均値

	相島(福岡)	福吉(福岡)	A県(日本海)	B県(太平洋)	人 工
相島(福岡)	0.667±0.066	0.613±0.056	0.581±0.046	0.581±0.046	
福吉(福岡)		0.704±0.052	0.595±0.038	0.604±0.040	
A県(日本海)			0.671±0.059	0.575±0.043	
B県(太平洋)				0.675±0.042	
人 工					0.783±0.077

※ 集団間の検定(全て $p < 0.01$ )

一方、天然貝の集団間BSIでは、類似度が高い順に福岡県の相島と福吉間で0.613、福岡県(相島、福吉)とA県間で0.581~0.595、同B県間が0.581~0.604、A県とB県間では0.575となり、地理的距離に応じて類似度は低下した。また各集団間のBSIは、t検定の結果いずれも有意差が認められ、各々異なった集団であることが明らかとなった( $p < 0.01$ )。

## 考 察

福岡県産の天然貝は、単型を示した断片の割合と集団内のBSIから、人工貝と比較して遺伝的類似度が低く、他県の天然貝と同程度の遺伝的多様性を持った貝であることが明らかとなった。遺伝的多様性が高いことは、様々な特質を持った貝が存在することであり、真珠母貝となりうる良質な巻き特性や光沢、色等を持った貝が存在する可能性があるものと思われた。

一方、天然貝の集団間BSIでは、福岡県内の相島、福吉間で最も類似度が高く、異なる県間で低くなった。これは集団間の地理的な隔離距離を反映しているものと推察された。また、地理的距離で40km程度しか離れていない福岡県内の相島、福吉間においてもBSIに有意差が認められた。その理由として、両者の生息域はほぼ漁港内に限られており、海域特性も相島は外海性、福吉は内湾性と異なっていることから、両者は交雑がない状態にあり、遺伝的類似度が低くなったものと推察された。

福岡県内には今回解析した相島、福吉以外の地区にもアコヤガイの生息が確認されている。これらの生息域は水温や水質等の生息環境が異なっており、また生息域がほぼ漁港内に限られていることを考えると、各々には交雑がなく、それぞれ独自の生態系を持ち、また様々な特質を持った真珠母貝が生息している可能性がある。今後、福岡県内他地区のアコヤガイや他県産のものについても解析を進めていくことにより、県内の交雑程度や遺伝的

な特性についてさらに明らかになっていくものと思われた。

また近年、一部の真珠養殖業者では赤変病に強い中国産貝や同貝と日本産貝とのハーフ貝を使用した養殖が行われている<sup>14)</sup>。そのため天然に生息する国産種との交雑が心配されるが、現在DNAレベルでの識別方法はなく、その実態は明らかになっていない。今後、AFLP法で純国産貝と中国産貝および中国産と国産貝との交雑種を解析することにより、DNAレベルでの判別についても可能となるかもしれない。

一方問題点として、今回、同じ条件下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。今後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について検討を加えていくことが必要であると思われた。

またプライマーペアについても、今回使用したEcoRI-AGC、MseI-CTT以外のものを複数組み合わせることで、より信頼性の高い遺伝変異保有量の推定が可能となることが考えられた。

## 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株式会社ミキモト真珠研究所 永井清仁所長にお礼申し上げます。

## 要 約

- 1) 福岡県の相島と福吉、本州日本海側A県、本州太平洋側B県の天然貝および真珠母貝用の人工貝について各10個体、計50個体からDNAを抽出し、EcoRI-AGC、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75bpから300bpの間に認められた増幅断片数は、相島のサンプルが60~70本、福吉が59~65本、A県が52~64本、B県が59~73本、人工貝は52~59本であった。
- 3) 天然貝の集団内BSIは0.667~0.704で、人工貝の0.783よりも有意に低く、遺伝的多様性が高い結果となった( $p < 0.01$ )。天然貝の中では相島が0.667と最も低く、福吉が0.704と最も高かった。
- 4) 相島、福吉産貝の遺伝的多様性は、A、B県の貝と同程度であることが明らかとなった。
- 5) 天然貝の集団間BSIは、福岡県内間(相島と福吉)で0.613と高く、県間では0.575~0.604と低くなった。特に本州日本海側のA県と本州太平洋側のB県との間で0.575と低くなり、地理的な隔離距離を反映した結果となった。
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) 万年英之ら : ABRI, 19, 39-44 (1991).
- 13) PE Applied Biosystems : AFLP法による植物のマッピングとタイピング反応プロトコール. 1-5 (1998).
- 14) 森実庸男 : アコヤガイへい死の実際(下). 養殖, 8, 38-41 (1998).

## 文 献

- 1) 奥谷喬司 : 日本近海産貝類図鑑. 東海大学, 880-883 (2000).
- 2) 和田克彦 : 7.アコヤガイ. 日本の希少な野生水生生物に関する基礎資料 (I). 水産庁, 49-55 (1994).
- 3) 室賀清邦・乾靖夫ら : ワークショップ「貝類の新しい疾病」. 魚病研究, 34(4), 219-231 (1999).
- 4) 森実庸男・滝本真一ら : 愛媛県宇和海における軟体部の赤変化を伴うアコヤガイの大量へい死. 魚病研究, 36(4), 207-216 (2001).
- 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, 117-137 (1997).
- 6) P. Vos, R. Hoger, M. Bleeker, et al. : AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407-4414 (1995).
- 7) 岩淵光伸・太刀山透ら : 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. 福岡県水産海洋技術センター研究報告, 10, 35-39 (2000).
- 8) 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).
- 9) 高木基裕, 曾我部五郎ら : 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).