

Application Note

島津アプリケーションノート No.25 (ライフサイエンス)



Lifescience

AFLP 法を用いた太平洋クロマグロ雄に 特徴的な DNA 断片のスクリーニング － MultiNA の活用 –

阿川 泰夫^{*1}
Y.AGAWA

曾我部 有司^{*2}
Y.SOGABE

1. はじめに

太平洋クロマグロ *Thunnus orientalis* の完全養殖技術は天然資源保護の観点から重要です。大西洋クロマグロは2010年3月ワシントン条約締約国会議にて全面取引禁止提案がなされたほど、その天然資源量は危惧されています。今後太平洋クロマグロについても漁獲規制が行われる可能性があります。近畿大学水産研究所では1970年よりクロマグロ養殖研究を開始し、完全養殖すなわち生簀(いけす)内で養殖親魚から受精卵を得て再び成魚、親魚にまで飼育する技術を確立しました。2009年の近畿大学水産研究所クロマグロ稚魚生産尾数はおよそ4万尾でした。年間40万尾以上とも推計される養殖用稚魚の国内需要を満たしてはいらないものの、天然資源への負荷削減には一定の役割を担っており、将来国内クロマグロ養殖に必要な全稚魚供給も期待されています。

クロマグロ稚魚増産には様々な取り組みが必要です。その一つは安定的に良質な受精卵を得る技術開発です。繁殖期には生簀内の雄のほぼ全てが性成熟している一方で、雌は産卵期でも個体毎に卵巢成熟度が大きく異なり、性成熟する個体の割合が低い事が知られています。従って、生簀内の親魚群は雌の割合を雄よりも高めておく事が重要です。

しかし困った事に、マグロ類では雌雄に顕著な形態学的な特徴がありません。さらに、優に体重100 kg以上に成長する親魚は簡単に取り扱うことができません。捕獲して開腹手術による生殖腺観察で雌雄判別は可能ですが、この方法ではマグロは死んでしまうので無理なのが現状です。

クロマグロ雌雄に特徴的なDNAを同定することが出来れば、少量の血液、鰓の一部等を採取して雌雄判別が可能となります。扱いの比較的容易な幼魚期に雌雄の比率を最適化した親魚編成を行えると期待されます。

*1 近畿大学水産研究所大島実験場

*2 (株)島津製作所 分析計測事業部 応用技術部 京都ADC

2.AFLP 法

私達は、クロマグロの雌雄を判別するための手法開発としてAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)法¹⁾を用いました。

1995年に発表されたAFLP法は、制限酵素サイトの多型とPCRを利用した方法で、ゲノム配列未知の生物でも得られる断片の解析により遺伝的多型を知ることが出来るというものでした(図1, 図2)。その後、植物や魚類でも個体形質に連鎖した断片を得られる事が報告されました。クロマグロの雌雄判別手法開発当初は放射性同位体 (RI) ラベルしたプライマーを用いて高感度にDNA断片を検出していました。その後、蛍光DNAシーケンサーでもAFLPが適用可能であることが明らかになりました。

私達の研究室は紀伊半島の南端にあり、大学本部の分析室とは遠く離れています。そのためRIやDNAシーケンサーを簡単に使える環境にはありません。マイクロチップ電気泳動装置MultiNAは蛍光色素を用いることによりエチジウムプロマイド (EtBr)よりもおよそ一桁以上高い感度を実現した全自動電気泳動装置です。蛍光DNAシーケンサーの分解能と感度には及びませんが(※蛍光DNAシーケンサーの感度はおよそ0.01 - 0.1 fmol/ulです。たとえば400 bpのdsDNA断片が0.1 fmolの場合、その重量は264 pgと概算されます。), MultiNAならAFLP法によるDNA断片の概略情報からクロマグロの雌雄判別のスクリーニングが可能ではないかと予想しました。

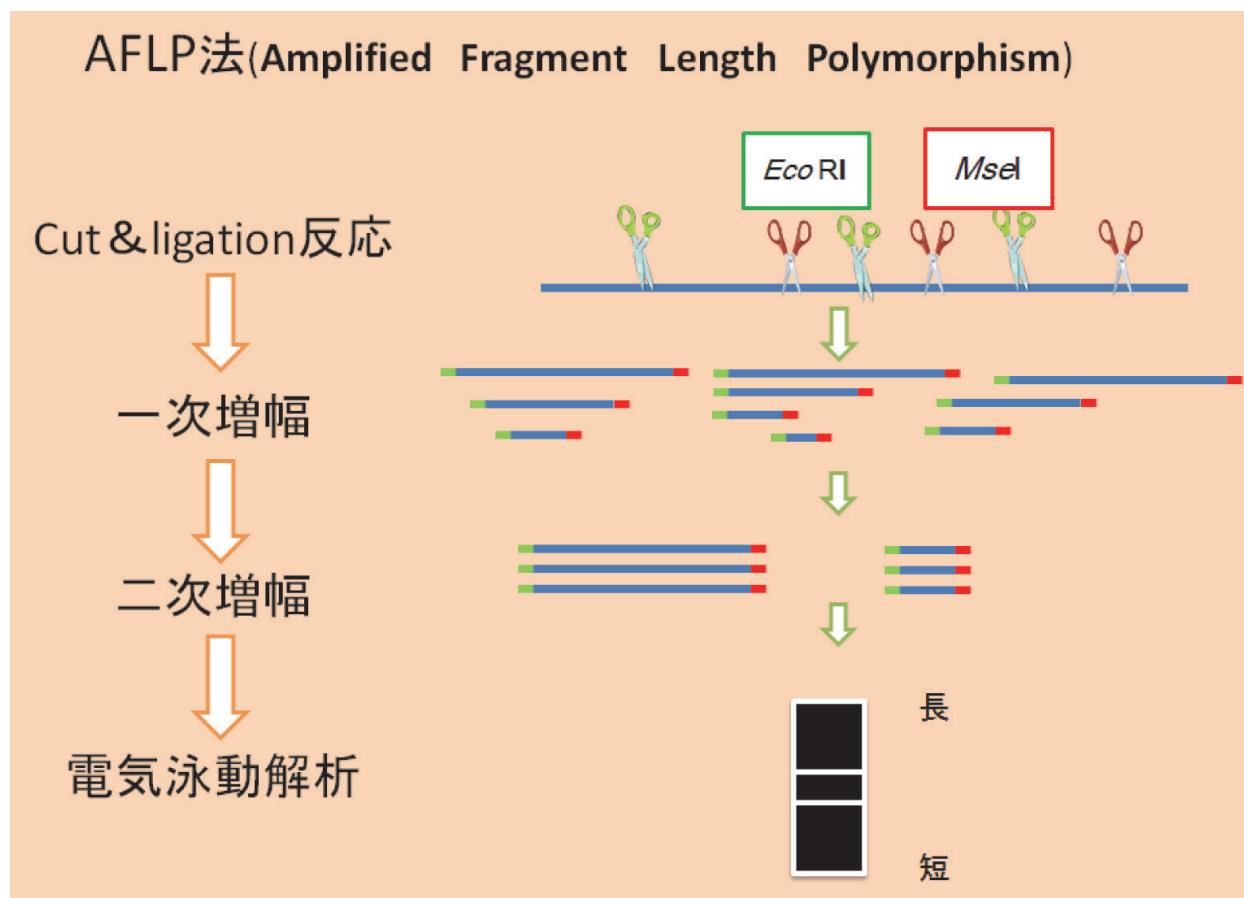


図1.AFLP 法の概略

1.Cut & Ligation 反応



ゲノム配列の模式
(・は任意の塩基、青線は制限酵素切断部位)

ゲノムDNAにはある頻度でEcoRIとMseIで切断される配列が存在します。
制限酵素EcoRIはGAATTC配列をMseIはTTAA配列を特異的に切断します。



制限酵素で切断されたゲノムDNAは上記の様に突出末端を形成します。
EcoRI側はAATTが突出。MseI側はTAが突出します。

CTCGTAGACTGCGTACCAATTCA GT**TACTCAGGACTCAT**
CATCTGACGCATGGTTAAGT CAAT**GAGTCCTGAGTAGCAG**

緑: EcoRIアダプター
赤: MseIアダプター

突出末端に結合するアダプターを過剰に加えると、アダプターとゲノム切断物が上記のように結合します。AFLPの妙はここからなのですが、DNAを切断する制限酵素と、DNAを結合するライゲースと一緒に反応系に添加します。アダプターの配列は切断されたゲノムに結合した際に再びEcoRI配列GAATTC, MseI配列TTAAを形成しない様にデザインされています。もし、ゲノム同士が結合して、EcoRI, MseI配列を再形成した場合には反応系に存在する制限酵素により再び消化され、反応物はゲノムとアダプターの結合物に偏ります。従って最終的にはGAATTC, TTAA配列はなくなります。

2.一次増幅

制限酵素配列の末端から3'側に1塩基増やしたプライマーでPCRを行います。

EcoRI側プライマー（黒字Aが+1）
5' - **CTCGTAGACTGCGTACCAATTCA**
CTCGTAGACTGCGTACCAATTCA GT**TACTCAGGACTCAT**
CATCTGACGCATGGTTAAGT CAAT**GAGTCCTGAGTAGCAG**
CAATGAGTCCTGAGTAGCAG - 5'
MseI側プライマー（黒字Cが+1）

3.二次増幅

さらに3'側に2塩基増やしたプライマーを用いてPCRを行い、増幅対象のDNA断片を選抜します。

EcoRI側プライマー（この場合GAを付加）
5' - **CTCGTAGACTGCGTACCAATTCA**
CTCGTAGACTGCGTACCAATTCA GTGT**TACTCAGGACTCAT**
CATCTGACGCATGGTTAAGTCT CACAA**TAGTCCTGAGTAGCAG**
CACAATGAGTCCTGAGTAGCAG - 5'
MseI側プライマー（この場合CAを付加）

図 2.AFLP 法の原理

まず、ゲノムを2種類の制限酵素EcoRIとMseIで消化し、それぞれの切断末端に結合するアダプターを結合させます。一次増幅では両末端アダプター3'側に1塩基付加したプライマーを用いる事で片側アダプターから増幅される断片を1/4 (A, T, G, Cのうちの任意の1塩基)に選抜できます*。両側では1/16に選抜できます。さらに同二次増幅では、両末端アダプターに3塩基付加されたプライマーを用い、対象断片をさらに片側アダプターで1/16に (A, T, G, Cのうちの任意の連続する2塩基)、両側では1/256選抜されます。多数の制限酵素断片を選抜しながらPCR増幅する事で対象を絞りながら断片を検出しています。

(*PCR反応の特性上、3'側が鋲型にマッチしないとプライマー3'側からのDNAポリメラーゼによる伸長反応が起きにくい事を利用しています。)

3. クロマグロ雌雄の AFLP 分析

雌雄4尾ずつ、計8尾をEcoRI+3A, MseI+3Cプライマー16本64組み合わせでAFLP解析しました。MultiNAのゲルイメージ表示画面（図3）で、二次増幅産物を分析した結果、1038本のバンドを確認し、そのうち183本のバンドが個体間で多型を示しました。

二次増幅プライマーの内、EcoRI+AGG, MseI+CATを用いると、雄特徴的に出現するDNA断片を確認できました。さらに検体数を雌雄32尾ずつに増やし、検証しました。その結果、およそ400 bpの少し上に雄に特徴的な断片が確認されました。

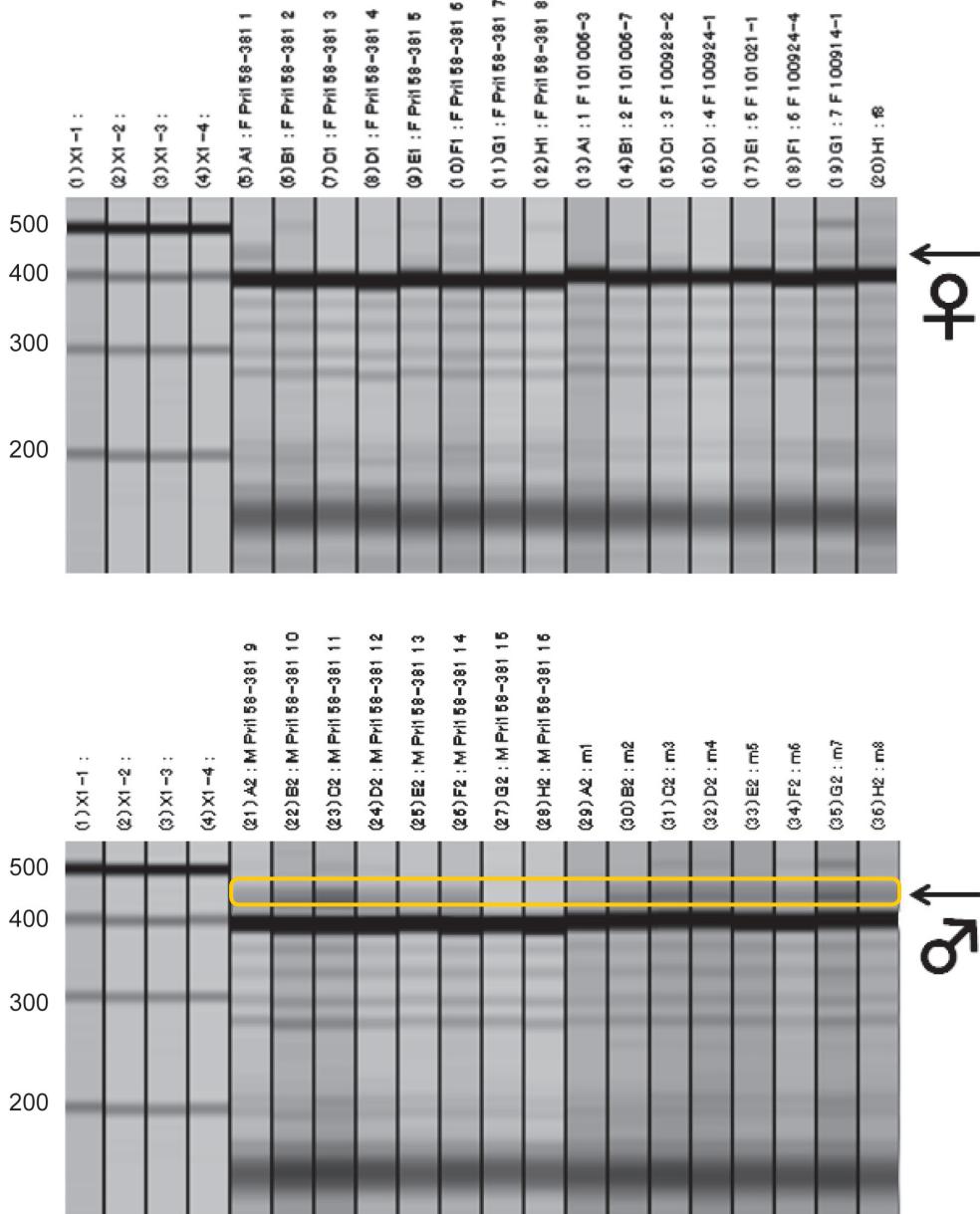


図3. MultiNAでAFLP二次増幅産物をゲルイメージで表示した結果
矢印付近に、雄で特徴的に検出される断片を確認しました。図はスペースの都合上16検体ずつを示しています。

4. 雄に特徴的なDNA断片の詳細解析

MultiNAのエレクトロフェログラム表示で、400 bp付近を拡大し、フラグメントのピーク面積を表示しました(図4)。縦軸は蛍光強度、横軸は移動時間で、図中の数字は自動測定したピーク面積の結果です。MultiNAは自動的に内部標準マーカと比較定量し、DNA量を算出します。その結果、雄特徴的な断片は437, 454 bpである事、雌にもこの付近の断片がわずかに検出されましたが、出現頻度とDNA量により、雄とは明確に区別することが出来ました。雌32個体中13個体に437 bpの、8個体に454 bpのDNA断片

が確認されました。雄では32個体中30個体に437 bpの、29個体に454 bpのDNA断片が検出され、これらは雄で検出される傾向が高かく、また、そのDNA断片の量は雌よりも雄が有意($P<0.01$)多い事が示されました²⁾。

太平洋クロマグロ表現型に連鎖するDNAの情報は今回の報告が初めてです。私達は雌の比率を高くしたクロマグロ親魚群編成を目的として本研究を開始しました。扱いやすい若魚期に、分子遺伝学的に雌雄判別する目的の達成に随分近づいたと思います。

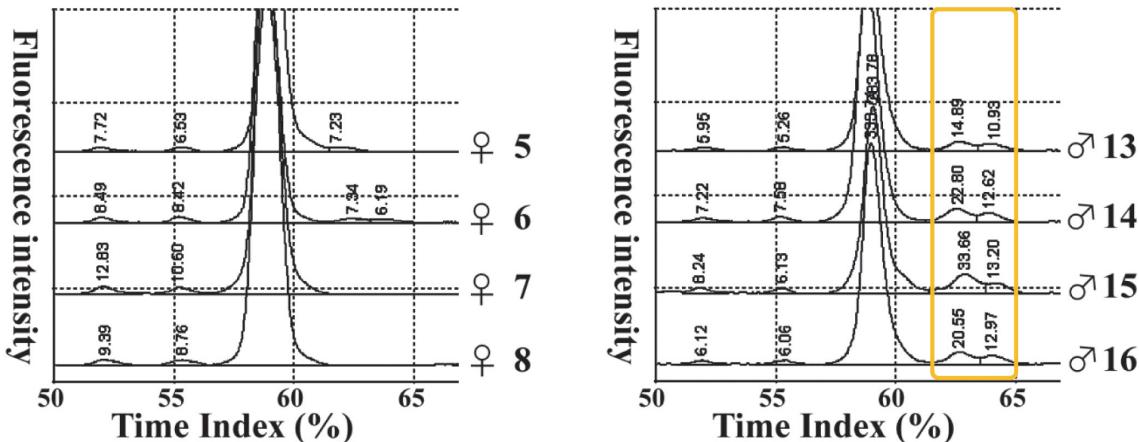


図4. エレクトロフェログラム表示で400 bp付近を拡大した画面
(MultiNA原図をPhotoshopでモノクロにし、検体番号を記しました)

数値は自動算出されたフラグメントのピーク面積。縦軸は蛍光強度(mV)、横軸は移動時間インデックス(%)。MultiNAは自動的に内部標準に含まれている高分子マーカと比較定量し、DNA量を算出します。雌にも雄に特徴的な断片がわずかに検出されましたが、雄とは有意にその量が異なる事が分かりました²⁾。

5. まとめ

マイクロチップ電気泳動装置MultiNAを用いてクロマグロ雌雄のAFLP産物の解析を行いました。その結果、クロマグロ雄に特徴的な遺伝子断片を確認することができました。雄に特徴的な断片は雌にも若干検出されましたが、MultiNAのエレクトロフェログラムの表示、及び自動定量値算出機能によって雄のそれとは量が有意に違う事を明らかにすることができました。

一般的に、AFLP解析はRIや蛍光DNAシーケンサーを用いて行われます。MultiNAは分析データを数値で得ることができるので、RIや蛍光DNAシーケンサの精度には及ばないものの、数値で得られるデータによりAFLP解析を行うことができます。今後は比較的扱いやすいクロマグロの仔魚を用いて雌雄判別を実施し、養殖における雌の比率を高めた親魚群を編成し受精卵取得の効率化の検討を行っていきたいと考えています。

6. マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”

アガロースゲル電気泳動法は試薬の調合、ゲルの作成、電気泳動、結果の画像取得、後片付けと一連の作業に多くの時間と手間を要します。さらにデータに関しては感度、分離、再現性、定量性など客観性に乏しいものです。



図 5. マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”

マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 “MultiNA”はアガロースゲル電気泳動の問題を解決します。

MultiNA特長

・わずか3ステップで分析

分析操作は非常にシンプル。分析スケジュールを作成したらあとは試薬とサンプルをセットしてスタートボタンをクリックするだけです。ゲルの作成は不要です。

・最大120分析(108検体)まで自動分析

最大4枚セットすることができるマイクロチップで120分析(96+12検体)を自動分析します。

・幅広い分野に活用

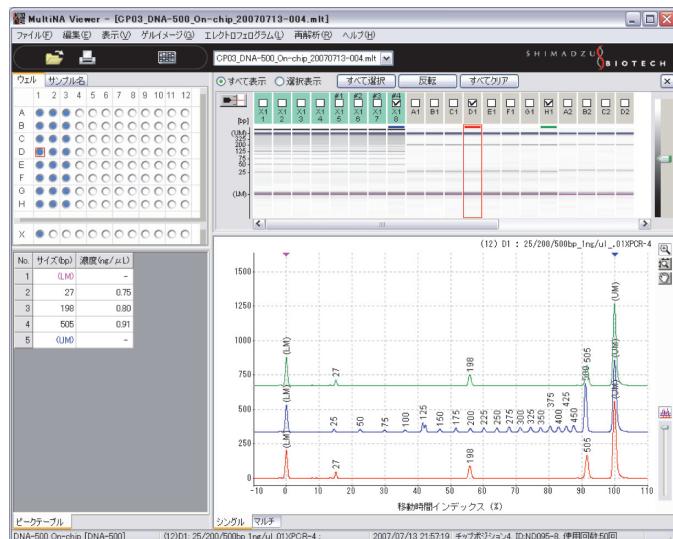
遺伝子研究用途をはじめ食品分析、ジェノタイピング、微生物分析、感染症分析、RNA分析など広い分野で活躍します。



図 6. MultiNA 専用試薬キット



図 7. MultiNA 専用マイクロチップ



[引用文献]

- 1: Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Horres M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 1995; 23: 4407-4414.
- 2: Agawa Y, Komiya T, Honryo T, Kurata M, Okada T, Murata O, Kumai H, Sawada Y. Screening of the male characteristic DNA fragment using AFLP analysis in Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. Nippon Suisan Gakkaishi. 2011; 77: 639-646.

表紙写真提供: 近畿大学水産研究所大島実験場
完全養殖クロマグロ3歳魚

*本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行 2012年2月
A改訂版発行 2012年9月

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津コールセンター

TEL:0120-131691
TEL:075-813-1691

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制Webの閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。