

クローンヒラメのクローン性の証明と系統判別 第2報 マイクロサテライトDNA多型による証明と判別

齊藤節雄*¹, 森 立成*²

Verification and identification of clonal lines induced by chromosome manipulation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

II. Verification and identification by microsatellite DNA polymorphism

Setsuo SAITOH*¹, Tatsunari MORI*²

Microsatellite DNA analysis was applied for confirmation and identification of clones of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Twelve homozygous and five heterozygous clonal lines were examined by microsatellite DNA markers which have been developed for Japanese flounder. PCR Amplification was done using four of the primer sets designed according to each locus (*Pol-2**, *Pol-3**, *Pol-4**, *Pol-5**), and the fragments were analyzed using an DNA sequencer. The alleles present in DNA from each clonal line were identical to the same lines and were easily distinguished among the different lines. In some clonal fish, however, alleles were not detected even in the same clonal line.

キーワード： ヒラメ, クローン, マイクロサテライトDNA

まえがき

高変異領域を含むDNAの塩基配列多型を利用した遺伝マーカーとして、近年マイクロサテライト部位が利用されることが多くなった。マイクロサテライトは、非遺伝子領域（イントロン）に存在する数塩基程度を基本単位とする繰り返し配列の領域であり、そのDNA断片は遺伝子座（ローカス）および対立遺伝子（アレル）と呼ばれ、これら断片は全てメンデルの法則に従って遺伝する^{1,2)}。マイクロサテライトDNAは、PCR法により多型検出されるので、DNAサンプルは少量で良く、再現性にも優れている。

クローン魚のクローン性の証明には、従来からDNAフィンガープリント法が用いられてきたが、この方法のみでは不十分との報告もある^{3,4)}。そこで、本研究ではヒラメ用に開発されたマイクロサテライトDNAマーカー⁵⁾を用いて、前報⁶⁾で報告したホモ型およびヘテロ型クローン系統、更にその後作出した系統を材料に、クローン性の証明とクローン系統の判別を試みたので報告する。

材料および方法

1. クローンヒラメの作出

材料として、前報で作出したホモ型クローンヒラメ9系統（71, 72, 73, 74, 75, 77, 82, 83, 90）および2000年に前報と同様の方法で新たに作出したホモ型クローン3系統（78, 79, 86）を用いた。一方、前報で作出した3系統のヘテロ型クローン（71×90, 75×77, 77×72（♂×♀））と2000年に新たに同様の方法で作出した2系統（71×78, 77×73（♂×♀））を使用した（Fig. 1）。

2. DNAの抽出とPCR反応

各系統の全長約15cmの5～10個体から血液を採取し、前報と同様の手順でゲノムDNAを抽出し、TE緩衝液で希釈した後、4℃の冷蔵庫に保存した。高木ら⁵⁾が開発したヒラメ用マイクロサテライトDNAマーカー座のうち*Pol-2**, *Pol-3**, *Pol-4**, *Pol-5**の4種類を使用した。プライマーセットのうちフォワードプライマーの5'側を蛍光色素(6-FAM, HEX, NED)で標識を施し、次のPCR

報文番号A384 (2005年1月31日受理)

*¹ 北海道立栽培漁業総合センター (Hokkaido Institute of Mariculture, Shikabe, Hokkaido, 041-1404, Japan)

*² 北海道立中央水産試験場 (Hokkaido Central Fisheries Experimental Station, Yoichi, Hokkaido, 046-8555, Japan)

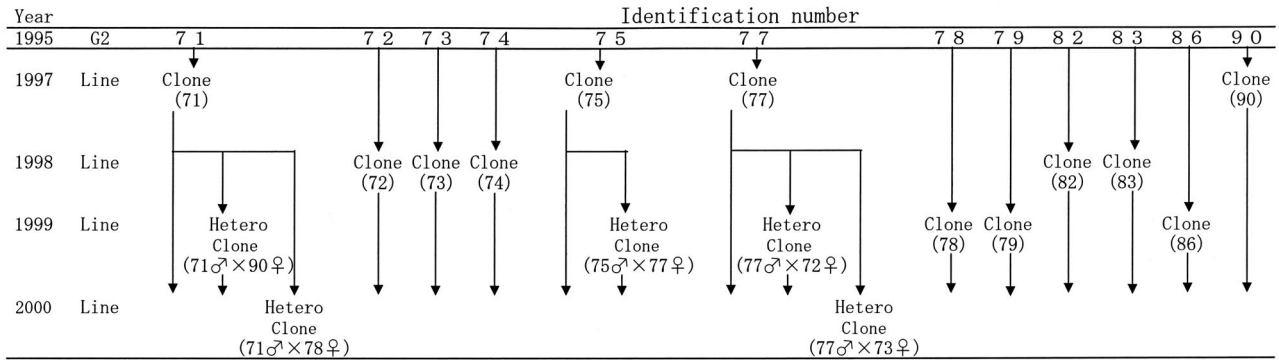


Fig. 1 Schematic diagram for the production of mitotic-gynogenetic diploids and clones.

条件によりDNA増幅産物を得た。95°Cで10分間の予熱の後、94°Cで30秒、53°C又は50°Cで30秒、72°C 1分間で45サイクルし、72°Cで5分間伸長反応した。Pol-2*及びPol-5*のアニーリング温度は53°C、Pol-3*及びPol-4*は50°Cとした。酵素には、Amplitaq Gold (Perkin Elmer) を使用し、Gene Amp PCR システム 9600 サーマルサイクラー (Perkin Elmer) で増幅した。

3. マイクロサテライトDNA解析

PCR産物を脱イオンホルミアミドで適宜希釈し、95°Cで2分間熱変性した後水中で急冷し一本鎖とした。ABI prism 310 ジェネティックアナライザー (Perkin Elmer, USA) を用い、サイズスタンダード 500 ROX (Perkin Elmer) と共に、POP4ポリマー (Perkin Elmer) を充填したキャピラリー電気泳動に供した。PCR産物のフラグメント解析には、Gene Scan Program (Perkin Elmer, USA) を使用した。

結果

1. クローン性の証明

ホモ型クローンヒラメおよびクローン魚の元になる第一卵割阻止型雌性発生二倍体 (G 2) のフラグメント解析結果の内、Pol-2*およびPol-5*遺伝子座における対立遺伝子をFig.2に示した。Pol-2*およびPol-5*遺伝子座においては、同一クローン系統内ではG 2魚と同じ対立遺伝子が検出されたが、異なる系統間では検出される対立遺伝子が異なった。一方、同一クローン系統内においても、遺伝子座によっては対立遺伝子が検出されない個体もあった。71系統のG 2魚では、Pol-5*遺伝子座において*113および*117の二つの対立遺伝子を持つが、71系統のNo.5クローンでは*117が検出されなかった。一方77系統のG 2魚は、Pol-2*遺伝子座において*108と*110を保持していた。しかし、77系統のクローン系統のNo.1からNo.5においては、*108または*110を欠く個体が認められた。これらのように、同一クローン内においても、ある

遺伝子座においては、対立遺伝子を持たない場合が認められた。

2. クローン系統の判別

ホモ型クローンヒラメ12系統から検出された各遺伝子座の対立遺伝子をTable1に示した。遺伝子座の違いにより、検出された対立遺伝子の数は3~7と異なった。クローン系統の違いにより、検出される対立遺伝子が異なり、このことから12系統全ての判別が可能であった。特にPol-4*では系統特異的な対立遺伝子も検出された。すなわち、71系統では*130、72系統では*152、73系統では*154、77系統では*138であった。

ホモ型の各系統の交配により作出されたヘテロ型クローンのそれぞれ2個体において、Pol-2*およびPol-5*遺伝子座における対立遺伝子をTable2に示した。ヘテロ型クローンの場合は、各遺伝子座において、異なる2系統の両方またはいずれか一方の対立遺伝子が検出されることが多かった。その一部の71×78(A)と72×77(C)と73×77(D)の場合をFig.3に示した。A系統では、2個体で*117または*119が検出されなかった。C系統では、2個体とも*113が認められなかった。D系統では、同様に*110が検出されなかった。

考察

1. クローン性の証明

ホモ型クローンヒラメ12系統を用いて、ヒラメ用に開発されたマイクロサテライトDNA遺伝子座のPol-2*からPol-5*の4遺伝子座について、クローン系統の対立遺伝子を調べた。同一クローン系統内では、ほぼ対立遺伝子は一致した。しかし遺伝子座によっては、同一クローン系統においても、同じ対立遺伝子が検出されない個体が認められた。理論的には、同一クローン系統であれば、すべてのクローン個体は同じ対立遺伝子を持つはずであるが、この点は他の報告^{3,4)}と一致するところである。同一クローン系統内でも、個体によってはプライマー領域

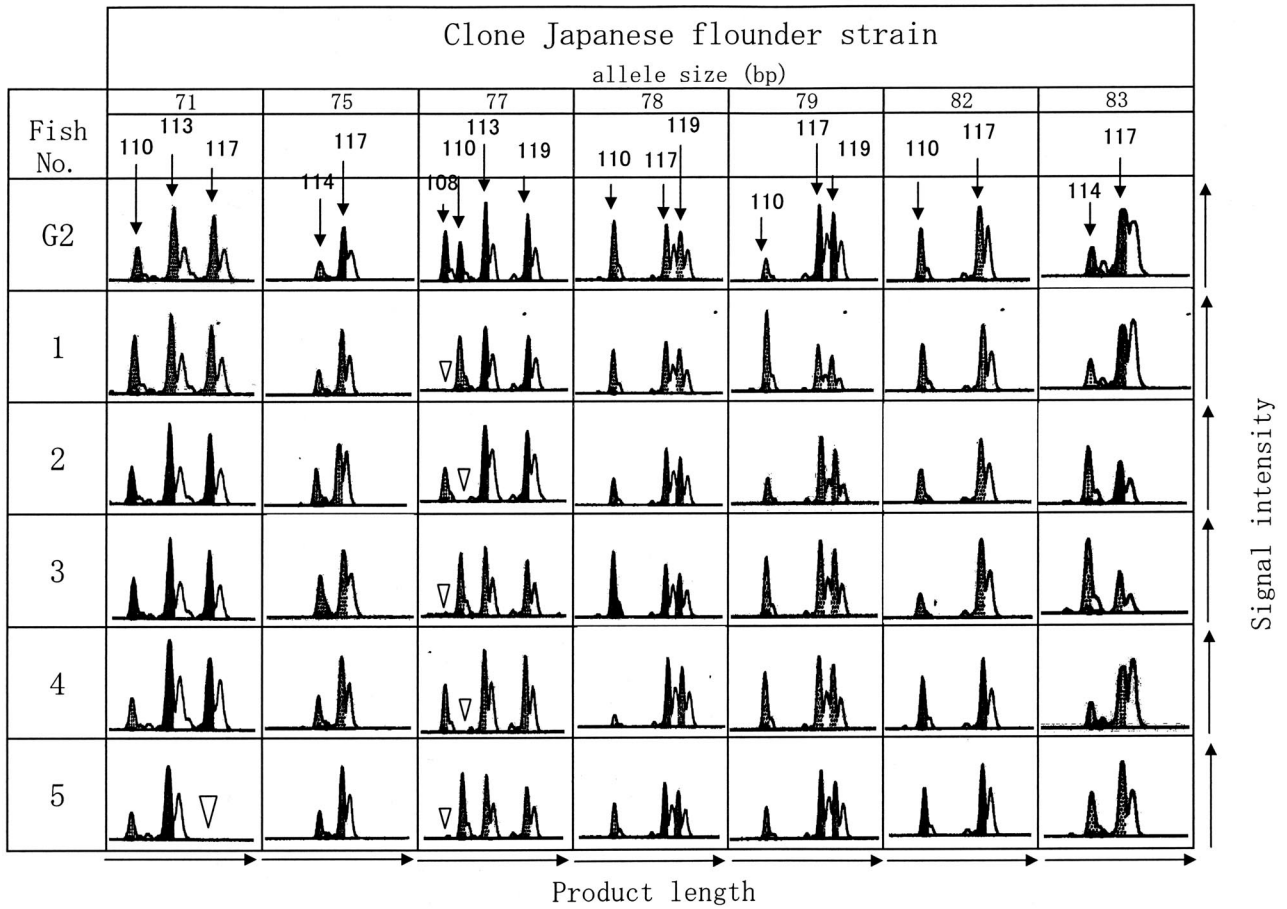


Fig. 2 Electropherograms of PCR products of *Pol-2** & *Pol-5** microsatellite loci of Japanese flounder clones. G2; Gynogenetic diploid induced by suppression of first cleavage (complete homozygous fish). 1~5; clone fish. ∇Mark; Absence of allele

Table 1 Genotypes of clonal lines of Japanese flounder at four microsatellite loci

Locus	Allele (bp)	Clone Japanese flounder strain											
		71	72	73	74	75	77	78	79	82	83	86	90
<i>Pol-2*</i>	*108			+					+				
	*110	+	+		+		+	+	+	+		+	
	*114				+	+					+	+	+
<i>Pol-3*</i>	*126							+	+				
	*128		+	+	+	+			+	+	+	+	
	*138	+											+
	*140	+						+					
	*150				+				+				+
<i>Pol-4*</i>	*126	+				+		+		+		+	
	*130	+											
	*138							+					
	*144		+			+				+	+	+	+
	*150				+		+	+	+				
	*152		+										
<i>Pol-5*</i>	*113	+						+					
	*117	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+
	*119			+			+	+	+			+	
	*125		+	+	+								

+ ; Presence of allele

に塩基置換が起こっている可能性が考えられた。この様に前報のDNAフィンガープリント法では検出されなかった違いが、マイクロサテライトDNA多型では鋭敏に多型検出される⁷⁾ことが確かめられた。

哺乳類では体細胞クローンが作出され、クローンヒツジ⁸⁾に続きウシ⁹⁾、マウス¹⁰⁾等で作出の成功が報告されて

いる。これらクローン動物においても、マイクロサテライトDNA多型解析により、クローン性が証明されており、今後DNA多型解析技術における大きな方向性の一つになるとと思われる。

Table 2 Microsatellite analysis of hetero-clones of Japanese flounder

Locus	Allele (bp)	Clonal strain				Locus	Allele (bp)	Clonal strain			
		71	78	A-1	A-2			71	90	B-1	B-2
<i>Pol-2*</i>	*108					<i>Pol-2*</i>	*108				
	*110	+	+	+	+		*110	+		+	+
	*114						*114		+	+	
<i>Pol-5*</i>	*113	+		+	+	<i>Pol-5*</i>	*113	+			+
	*117	+	+				*117	+	+	+	+
	*119		+	+			*119		+	+	
	*125						*125				

Locus	Allele (bp)	Clonal strain				Locus	Allele (bp)	Clonal strain			
		72	77	C-1	C-2			73	77	D-1	D-2
<i>Pol-2*</i>	*108		+	+	+	<i>Pol-2*</i>	*108	+	+	+	+
	*110	+	+	+	+		*110		+		
	*114						*114				
<i>Pol-5*</i>	*113		+			<i>Pol-5*</i>	*113		+	+	+
	*117	+			+		*117				
	*119		+	+	+		*119	+	+	+	
	*125	+		+			*125	+			+

Locus	Allele (bp)	Clonal strain			
		75	77	E-1	E-2
<i>Pol-2*</i>	*108		+		
	*110		+	+	+
	*114	+		+	+
<i>Pol-5*</i>	*113		+	+	
	*117	+		+	+
	*119		+		+
	*125				

+ ; Presence of allele

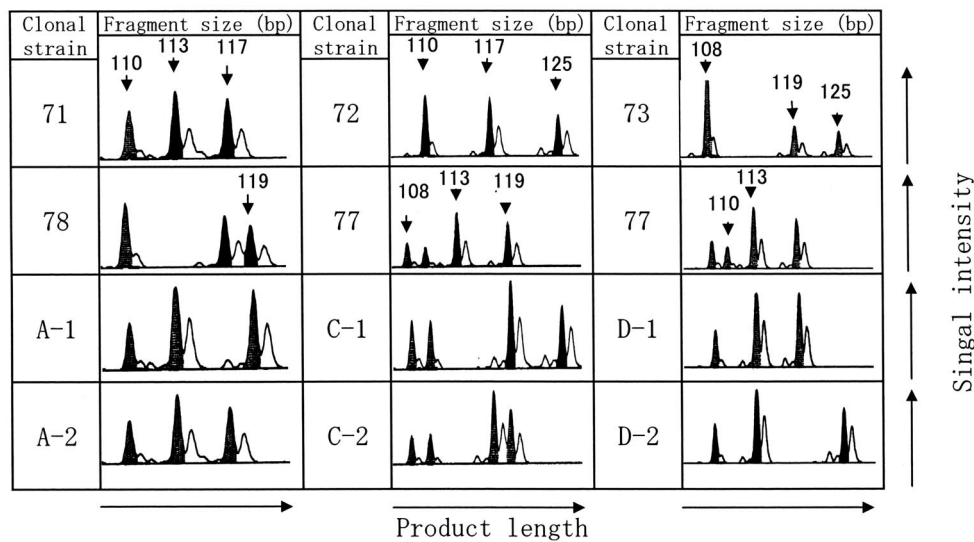


Fig. 3 Electropherograms of PCR products of *Pol-2** & *Pol-5** microsatellite loci of Japanese flounder clones. A, C, D; Hetero-type clone.

2. クローン系統の判別

クローン系統間で対立遺伝子を比較すると、系統により異なる対立遺伝子を保有することから系統判別が可能であった。ヘテロ型クローンでは個体により、両親の持つ対立遺伝子の内、両方または片方を持つ場合が多かった。これは前報のRAPD解析の結果と同様であった。マイクロサテライトDNA解析では更に、ホモ型クローンの片親の対立遺伝子が、いずれのヘテロ個体からも検出されない場合もあり、この点については更に検討が必要である。

3. マイクロサテライトDNA多型解析の有効性

遺伝マーカーとしてマイクロサテライトDNAは、再現性が良く信頼性の高いデータが得られるが、種特異性が高いため魚種毎に開発する必要がある。一方近縁種では互換性もあり、ヒラメ用のマイクロサテライトDNAのプライマーを用いた場合においても、マツカワでPCR産物が得られている（著者ら未発表）。

育種研究において、DNAマーカーを利用した選抜、則ちマーカー選抜育種が注目を集めている。特に成長、肉質、耐病性等の量的形質は、多数の遺伝子が関与しており、連続的な変異を示すため、マイクロサテライトDNAを利用した量的形質遺伝子座（quantitative trait loci, QTL）の解析が盛んに行われている。農業や畜産¹¹⁾分野における育種研究のQTL解析に、マイクロサテライトDNAマーカーの利用が図られ、水産育種¹²⁾においても、QTL解析や連鎖地図の作成が活発化している。

マイクロサテライトDNA多型では、親と子の遺伝子型を遺伝子座毎に比較できるので、親子鑑定が可能である。従って、人工種苗生産において、再生産に直接関わった親魚の特定が可能であり、再生産への貢献を評価する試みが成され^{13,14)}、種苗の放流後の追跡調査への応用も図られつつある¹⁵⁾。今後、育種研究のみならず、遺伝資源保全の観点¹⁶⁾からも、より多くの魚種でマイクロサテライトマーカーが開発され、遺伝学的調査研究に活用されることが期待される。

要 約

1. ホモ型クローンヒラメ12系統およびヘテロ型クローンヒラメ5系統について、ヒラメ用に開発されたマイクロサテライトDNA多型解析により、クローン性の証明とクローン系統の判別を行った。
2. *Pol-2**から*Pol-5**の4遺伝子座について、各対立遺伝子を調べた。同一クローン系統内では、ほぼすべての対立遺伝子は一致した。しかし、個体によっては対立遺伝子が検出されないものもあった。一方、

クローン系統間で比較すると、対立遺伝子は各系統で異なり、系統判別が可能であった。

3. ヘテロ型クローンについて、*Pol-2**と*Pol-5**の遺伝子座について対立遺伝子を調べた。ヘテロ型クローンでは、ホモ型クローン両系統の対立遺伝子のうち少なくとも一方保持するか、あるいは全く検出されない場合もあった。

文 献

- 1) 高木基裕, 谷口順彦: ミニサテライトおよびマイクロサテライトDNA領域多型と魚類遺伝育種研究への応用. 水産育種. 23, 1-12 (1996)
- 2) 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, 分子遺伝学的アプローチ (青木 宙・隆島史夫・平野哲也編), 恒星社厚生閣, 東京, 1997, pp.117-137
- 3) 水田 章, 田畑和男, 金尾博和: マイクロサテライトDNAマーカーによるホモ型クローンヒラメ誘起の証明, 平成12年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, pp.55, (2000)
- 4) Morishima K., I. Nakayama and K. Arai: Microsatellite-centromere mapping in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Genetica*, 111, 59-69 (2001)
- 5) Takagi, M., K. Yoshida, N. Taniguchi: Isolation of microsatellite loci from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and detection of PCR fragments with simple non-RI methods. *Fisheries Science*, 65(3), 486-487 (1999)
- 6) 森 立成, 齊藤節雄: クローンヒラメのクローン性の証明と系統判別 第1報 DNAフィンガープリント法による証明と判別. 北水試研報. 67, 81-88 (2004)
- 7) 谷口順彦: 魚類の遺伝的多様性とDNAマーカー. 次世代の水産バイオテクノロジー (隆島史夫編), 成山堂書店, 東京, 2000, pp.18-41
- 8) Campbell, K. H., McWhir, W. A. and I. Wilmut: Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380, 64-67 (1996)
- 9) Kato, Y., T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurokawa, J. Kato, H. Doguchi and H. Yasue: Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282, 2095-2098 (1998)
- 10) Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K., R. and R. Yanagimachi: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394, 369-374 (1998)

- 11) 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会 (編) : 動物ゲノム解析と新たな家畜育種戦略, 第6回動物遺伝育種シンポジウムプロシーディングス, 東京, 2000, pp.1-44
- 12) 岡本信明, 尾崎照遵 : DNAマーカーを利用した新しい水産育種. 次世代の水産バイオテクノロジー (隆島史夫編), 成山堂書店, 東京, 2000, pp.42-53
- 13) Perez-Enriquez, R., M. Takagi and N. Taniguchi: Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 173, 413-423 (1998)
- 14) Sekino, M., Saitoh, K., Yamada, T., Kumagai, A., Hara, M. and Y. Yamashita: Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implication for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, 221, 255-263 (2003)
- 15) Perez-Enriquez, R., and N. Taniguchi: Use of microsatellite DNA as genetic tags for the assessment of stock enhancement program of red sea bream. *Fisheries Science*, 65, 374-379 (1999)
- 16) 谷口順彦 : 水生遺伝資源の利用と保全について—FAO専門家会議の報告書(1993). 水産育種. 22, 83-102 (1995)