

釣れるアユ種苗の作出（平成 23 年度）

武田 維倫・飯郷 雅之¹

目 的

アユは養殖生産量、放流量、漁獲量等各種の指標から見て本県水産業の最重要魚種である。一般に、養殖魚は成長性や抗病性などの形質が優れている事が求められるが、アユは友釣りでの漁獲を期待される放流用種苗としての用途が大半を占める事から、なわばり形成能力が高い（＝友釣りでの釣れる）ことも重要な形質となる。そこで本課題では、なわばり形成能力との関連が考えられる性格関連遺伝子を標的としてゲノム DNA 構造の決定と多型部位の探索を実施した。

材料および方法

エクソン-イントロン構造の予測に基づくアユ性格関連遺伝子のゲノム DNA 内コード領域塩基配列の決定 標的とする性格関連遺伝子（前年度にアユ cDNA の塩基配列を決定）について、Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) に登録された複数生物種の塩基配列情報を収集し、標的遺伝子のエクソン-イントロン構造を予測した。そして、各イントロン領域を増幅するための遺伝子特異的プライマーを予測された各エクソン内に設計し、ゲノム DNA を鋳型に標的とするイントロン配列を PCR 法により増幅した。PCR 溶液の組成は、ゲノム DNA 溶液 0.5μL, 0.5U の *TaKaRa LA Taq* (TaKaRa, 大津), 10×LA-Buffer 2μL, 2.5mM MgCl₂ 1μL, 1μM dNTP 1.6μL, 0.5μM Fw および Rv プライマーを全量 20μL となるように調整した。温度サイクルは、94°C5 分のインキュベーションの後、94°C1 分、55°C のアニーリング温度で 1 分、72°C8 分のサイクルを 40 回、最後に 72°C10 分のインキュベーションとした。増幅された DNA 断片は、エチジウムブロマイド入り 1%アガロース S ゲルを用いて電気泳動によって分離し、紫外線照射下で目的のバンドを切り出した。切り出したバンドは QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, 東京) を用いて精製した。精製した DNA 断片を p-GEM T Easy (Promega, 東京) に挿入した。このプラスミドをヒートショック法によって大腸菌株 JM109 に導入・形質転換した。その後、形質転換した JM-109 菌体を X-gal および IPTG を添加した LB-アンピシリン寒天培地に塗布し 37°C で 15 時間培養した。培地上に形成されたコロニーにおける PCR 産物導入の確認はカラーセレクションとコロニー-PCR によるインサートチェックにより行った。目的とする形質転換菌体を LB 液体培地で 15 時間振蕩培養し、培養液から LaboPass Plasmid Mini Purification kit (COSMO Genetech, ソウル) を用いてプラスミド抽出を行った。プラスミド抽出物に

については ABI Genetic Analyzer 3500 (Life Technologies, 東京) を用いて塩基配列を決定した。

ゲノムウォーカーキット™による標的遺伝子のゲノム DNA 内コード領域塩基配列の決定 アユ血液より DNeasy (Quiagen) を用いて total DNA を抽出し、GenomeWalker™ Universal Kit (TaKaRa) を用いて 4 種のアダプター付加ゲノム DNA ライブラリーを作成した。反応は付属のマニュアルに従って行った。cDNA クローニングで得られた塩基配列情報を基に、5'-GW 用及び 3'-GW 用遺伝子特異的プライマーを設計した。PCR 溶液の組成は、ゲノム DNA 溶液 0.5μL, 0.5U の *TAKARA LA Taq*, 10×LA-Buffer 2μL, 2.5mM MgCl₂ 1μL, 1μM dNTP 1.6μL, 遺伝子特異的プライマー (10μM) 0.4μL, UPmix プライマー 2μL を全量 20μL となるように調整し、温度サイクルは、94°C2 分のインキュベーションの後、94°C30 秒, 72°C2 分のサイクルを 5 回, 94°C30 秒, 70°C30 秒, 72°C2 分のサイクルを 5 回, 94°C30 秒, 68°C30 秒, 72°C2 分のサイクルを 25 回とした (タッチダウン PCR)。以降 5' 及び 3' 側ゲノム DNA 塩基配列の決定は前出の部分配列の決定と同様の方法で実施した。

多型部位の探索 5 個体のアユからエクソン 1 をクローニングし塩基配列の比較を行い多型部位の特定をした。また、エクソン 3 とエクソン 4 についてはダイレクトシーケンス法によって得られた波形データを Variant reporter™ ソフトウェア (Life Technologies) を用いて解析し 1 塩基多型部位の特定をした。

結果および考察

標的とした遺伝子のゲノムは 13kb 以上の領域内に存在する 4 つのエクソンから構成されていることが明らかとなった。また、多型部位を探索したところ、エクソン 1 には 74bp の反復配列多型、エクソン 3 には 3 箇所の一塩基多型、エクソン 4 には 4 箇所の一塩基多型があることが明らかとなった。

今後は、プロモーター領域の多型部位について探索を進めると共に、これまでに発見した全ての多型部位について育種への利用可能性を検討するため、行動との関連性を解析する。

(指導環境部)

¹宇都宮大学農学部