

DNA 反復配列数多型による魚類の遺伝・育種に関する研究*¹高木 基裕*²Genetic and Breeding Studies on the
Variable Number Tandem Repeat of DNA in Fish*¹Motohiro Takagi*²

目 次

緒言	154
第1章 序論	154
I 研究の背景と現状	155
II DNA反復配列数多型の原理	156
第2章 DNA反復配列数多型の検出法および条件検討	161
I ミニサテライト	161
1. 材料および方法	161
1) 未変性DNAの抽出	161
2) 制限酵素によるDNAの切断	162
3) 電気泳動	162
4) ハイブリダイゼーション	163
2. 結果	165
3. 論議	178
II マイクロサテライト	181
1. 材料および方法	181
1) マイクロサテライト領域の単離	181
ゲノムライブラリーの作成	181
ライゲーションおよびトランスフォーメーション	182
形質転換菌の培養	182
陽性クローンの検出および培養	182
シーケンス (マニュアル法)	182
シーケンス (オート)	183

水産大学校研究業績 第1608号, 1998年12月11日受付.

Contribution from National Fisheries University, No.1608, Received Dec. 11, 1998.

*¹ 本論文は愛媛大学へ提出した博士論文 (1997年3月) を基本とし、その一部を改変したものである。*² 水産大学校小野臨湖実験実習場 (Ono Limnological Laboratory, National Fisheries University)

プライマーの設計	183
2) DNA多型解析	183
PCR	184
電気泳動	184
2. 結果および論議	184
第3章 魚類集団のミニサテライトDNA多型による変異量の評価	188
I 天然集団の遺伝変異保有量	188
1. 材料および方法	188
1) 供試魚	188
2) 方法	188
2. 結果	188
3. 論議	197
II 養殖改良系統における遺伝変異保有量の変化	206
1. 材料および方法	206
1) 供試魚	206
2) 方法	206
2. 結果	206
3. 論議	208
III 染色体操作系統の変異量特性	211
1. 材料および方法	211
1) 供試魚	211
2) 方法	213
2. 結果	213
3. 論議	213
第4章 マイクロサテライトDNA多型の遺伝・育種学的研究への応用	220
I マイクロサテライト遺伝子座の遺伝様式	220
1. 材料および方法	220
1) 供試魚	220
2) 方法	220
2. 結果	220
3. 論議	221
II 養殖系統の遺伝変異保有量の変化	224
1. 材料および方法	224
1) 供試魚	224
2) 方法	224
2. 結果	224
3. 論議	231
III 絶滅危惧集団の変異性の評価	231
1. 材料および方法	232
1) 供試魚	232
2) 方法	232
2. 結果	232
3. 論議	234
第5章 総合考察	239
I DNA反復配列数多型の多型性および応用性の評価	239
II 今後の展望	240

要約	243
Synopsis	245
謝辞	248
引用文献	248

緒言

水産業は改良品種に依存する農業や畜産業と異なり、その生産を野生集団に依存してきた。しかし、野生集団の資源量の減少にともない、近年、高級魚を中心に、養殖生産が急速に増加している (FAO, 1995; Tacon 1996)。一方、減少した天然資源を回復する目的で人工種苗の放流が各都道府県において行なわれている (水産庁と日裁協, 1996)。これまで養殖業および栽培漁業において、単なる種苗生産およびその育成や放流による資源量の増大について重点が置かれてきた。しかし、健全な種苗の持続的な生産にもとづき、天然集団の再生産を確保するため、これら養殖系統、放流用種苗および天然魚の遺伝的管理の必要性に関心が払われるようになってきた (FAO, 1993)。したがって、今後の適正な育種計画をたてるうえで育種系統および天然集団の遺伝的構成を把握すること、また、天然集団の遺伝的構成の変化防止の立場から、放流用系統の遺伝的特性を解明することは極めて重要な課題となっている (FAO, 1993)。

これまで水産生物資源の維持管理と持続的生産の確保において集団遺伝学的研究は多くの基本的情報を提供してきたが、その成果は採用される遺伝標識の種類とその感度に左右される (Carvalho & Hauser, 1994; Park & Moran, 1994)。近年のタンパク質電気泳動多型の研究により、魚類の系統分類や集団の遺伝的構成の解析にさまざまな情報が与えられてきた。しかし、この方法は種間や遠縁の地域集団の識別には有効な遺伝的マーカーであるものの、多型の遺伝子座が少なく、分析感度が必ずしも高いとは言えなかった (Wright & Benzen, 1994)。そのため、養殖業における近交系や血統解析、びん首効果や近交度の判定、近縁の地理的集団の識別等に必要の高感度の遺伝標識の開発が望まれていた。一方、現在主に用いられている mt-DNA の D-loop 領域は感度の高い多型の遺伝マーカーであると言われている。しかしながら、この方法は母系遺伝であるため、育種研究において必要な同祖性と異祖性に関する情報を得ることができない (高木と谷口, 1996)。

一方、真核生物には核 DNA 上に類似した塩基配列の繰り返しによる反復配列が存在し、これらの繰り返し数の違いを検出する多型解析法は DNA 反復配列数多型とよばれ (Nakamura et al., 1987)、ミニサテライト DNA 多型 (Jef-

freys et al., 1985 a, b, c) およびマイクロサテライト DNA 多型 (Weber & May, 1989) が知られている。ミニサテライト DNA 多型は10-64塩基単位から成り立ち (Bell et al., 1982)、マイクロサテライト多型はそれよりもはるかに短い、2から5塩基を単位とした繰り返し配列である (Miesfield et al., 1981)。ミニサテライト DNA 多型およびマイクロサテライト DNA 多型ともにそれらの領域の反復配列数は極めて高い多型性を示し、またメンデル遺伝するため、野生集団の系群判別だけでなく育種分野へも応用性が高いと考えられる。現在のところ、これらの方法は世界的に用いられ始めているが、わが国の水産研究機関においては未だ普及に至っていない。したがって、これらの方法を技術的に確立すること、そして、実際に水産生物に応用し、集団遺伝研究への有用性について把握することは水産学的に重要であるばかりでなく、生態系における生物の種および集団の遺伝的多様性を維持するうえでも急がれる。

本研究ではマダイとアユの2種を研究対象魚種に選んだ。これらの2種はわが国の水産業において重要魚種であり、種苗生産技術が確立し、養殖および種苗の放流が行なわれている。また、従来の選択育種だけでなく、染色体操作技術も進んでおり (Taniguchi et al., 1988; Sugama et al., 1998a)、様々な遺伝的特性を有する系統が作出されている。また、これまでにこれらの魚種のアイソザイムを主とする集団解析研究がなされており (関ら, 1988; Taniguchi & Sugama, 1990; 谷口ら, 1995)、データの比較が可能である。したがって、ミニサテライト DNA 多型およびマイクロサテライト DNA 多型の遺伝マーカーとしての有用性の評価をするのにマダイおよびアユは適当な魚種であると言えよう。

本研究ではマルチローカスのミニサテライト DNA 多型およびシングルローカスのマイクロサテライト DNA 多型の実用化、普及のために1) 検出条件の検討、2) 魚類集団のミニサテライト DNA 多型による変異量の評価、3) マイクロサテライト DNA 多型の魚類遺伝・育種学的研究への応用について検討した。またマダイおよびアユ供試魚集団それぞれの遺伝的特性を把握するとともに、各多型解析法を比較しミニサテライト DNA 多型およびマイクロサテライト DNA 多型の遺伝マーカーとしての有用性を評価し、今後の展望について考察した。

第1章 序論

I 研究の背景と現状

これまで水産生物の集団遺伝学的研究はアインザイム多型の研究により、魚類の系統分類や集団の遺伝的構成の解析にさまざまな情報が与えられてきた。しかし、この方法は種間や遠縁の地域集団の識別には有効な遺伝的マーカーであるものの、養殖集団のような近交系や近縁の地理的集団の識別等において、遺伝標識となり得る多型的遺伝子座が少なく、分析感度が必ずしも高いとは言えなかった (Wright & Benzen, 1994)。このような背景のもと、高率の遺伝変異をそなえるマーカーの開発が試みられ、タンパク多型を用いる方法からDNAを用いた方法へと集団解析法は移りつつあった。分子生物学が隆盛する中で、遺伝マーカーの探索は繰り返され、真核生物ゲノムDNA上に類似した塩基配列の繰り返しより成る反復配列の存在が発見された。最初に見つかったものはサテライトDNA (Skinner, 1977) と呼ばれ、数百から数千という長い配列を1単位とするものである。また、ヒトのインシュリンの研究において10-64塩基単位から成り立つ反復配列が見つけられ (Bell et al., 1982)、これは反復単位の塩基数が少ないことからミニサテライトと名付けられた (Jeffreys et al., 1985a)。この多型が反復配列数の差によることからVNTR (Variable Number Tandem Repeat) とも呼ばれている (Nakamura et al., 1987)。このミニサテライトDNA領域はメンデル遺伝を示すとともに集団中に変異を多量に蓄積している。当初、複数の遺伝子座を同時に検出するマルチローカスフィンガープリントが、遺伝的変異性、親子鑑別、個体識別に用いられた (Jeffreys et al., 1985a, b, 1986)。後にその技術は多くの分類群における様々な生物学的問題、鳥における親の判定 (Burke et al., 1987) や種間差 (Meng et al., 1989)、家畜における遺伝的類縁関係の把握 (Kuhnlein et al., 1989; Mannen et al., 1993) などに利用されている。魚類についても高度に変異性を示すミニサテライトの存在が示され (Fields et al., 1989; Taggart & Ferguson 1990)、野生集団の系統識別への有効性が示された (Prodohl et al., 1992)。また、人為集団についてはクローン魚の均一性 (Han et al., 1992; 原ら, 1993) や雌性発生育種における変異量の変化がDNAフィンガープリントによって解明されている (Han et al., 1995)。また、単一の遺伝子座の多型についてのみ検出することのできるシングルローカス法も開発され、異集団の識別に用いられている

(van Pijlen et al., 1989)。

一方、ミニサテライトの発見に先立つ1981年に Miesfield et al., (1981) らは、ミニサテライトよりはるかに短い塩基単位の反復配列を発見している。これらは2から5塩基を単位としており、ミニより短いという意味からマイクロサテライトと呼ばれている (Litt & Luty et al., 1989)。これらはまた、シンプルシークエンス (Tautz, 1989) やショートタンデムリピート (Edwards et al., 1991) とも呼ばれている。マイクロサテライトは当初マーカーとして採用されなかったが、Weber & May, (1989) がPCRを用いて多型を検出して以来、これらは遺伝子地図の作成や連鎖解析だけでなく、集団遺伝マーカーとしても注目されるようになった。この多型検出法は変異性が高く、感度が優れていることはもちろんのこと、PCRをベースとした実験法であるため、少量のDNAをサンプルとして多量の個体を処理できる。また、実験行程が比較的簡便であり、遺伝子座毎に対立遺伝子頻度を正確に推定することができ、再現性が確実に上がった。このようにマイクロサテライトDNAマーカーは多くの優れた特徴を備え、有効な集団遺伝マーカーとして多用されるようになった。(O'Reilly & Wright 1995) マイクロサテライトDNA多型の魚類における応用研究は、これまでに大西洋タラ (Brooker et al., 1994)、サケ科魚類 (大西洋サケ Sletten et al., 1993; McConell et al., 1995、ブラウントラウト Estoup et al., 1993、レインボートラウト Sakamoto et al., 1994; Morris et al., 1996、カワマス Angers et al., 1995、ベニザケ Scribner et al., 1996)、イトヨ (Rico et al., 1993)、スズキ科の一種 (García de Leon et al., 1995)、ブルーギル (Keneth et al., 1996)、金魚 (Zheng et al., 1995) などでマイクロサテライトプライマーが開発され、野生集団の系群判別や人為集団の遺伝変異保有量の研究が始まったところであり (Herbinger et al., 1995)、マイクロサテライトDNA多型の集団遺伝解析研究への有用性の立証が待たれている。

本研究の供試魚であるマダイとアユについてみると、野生集団の資源量の減少および消費者の需要の増大にともない、養殖魚生産が急速に増加し、染色体操作魚の育種への応用も行なわれている。一方、減少した天然資源を回復する目的で種苗の放流が各都道府県において行われている。したがって、今後の適正な育種計画をたてるうえで育種系統および染色体操作魚の遺伝的特性を把握すること、また、天然集団の遺伝的構成に変化を与え得る放流用系統および天然集団の遺伝的構成を把握することは極めて重要な課題となっている。

これまでマダイ集団の遺伝的解析においてアイソザイム分析が行われ、野生魚と人工種苗間の遺伝的差異 (谷口と田島, 1978)、アイソザイムマーカーの探索 (谷口と岡田, 1980)、人工種苗における変異性の減退 (Sugama et al., 1988b)、野生魚各標本群間の遺伝的分化 (Taniguchi and Sugama, 1990)、染色体操作魚の家系判別への応用 (Sugama et al., 1992) および人工種苗5系統の遺伝的変異性 (谷口ら, 1995) について研究がなされている。

一方、アユの集団の遺伝的解析においてもアイソザイム分析が行なわれ、天然魚においては両側回遊型と陸封型の遺伝的分化 (谷口ら, 1988)、西南日本におけるアユ集団間の遺伝的分化 (関と谷口, 1985)、放流湖産アユの追跡 (関と谷口, 1988a)、日本および韓国産アユの分化 (関ら, 1988b)、放流アユ混合率の季節的変動 (関ら, 1994) などの研究が行なわれている。亜種であるリュウキュウアユについては、アユとの遺伝的分化およびその遺伝変異保有量 (関ら, 1988)、琉球アユの河川間分化 (Sawashi & Nishida, 1994) などの研究が行なわれている。また、ミトコンドリア DNA を用いた研究では放流個体の再生産の証明 (Pastene et al., 1991) がなされている。一方、人為作出集団においては染色体操作魚作出の確認 (Taniguchi et al., 1988; Han et al., 1991) について研究がなされている。しかし、アイソザイムマーカーはマダイおよびアユ集団の変異の減退や野生集団の構造解析においては必ずしも十分な感度を備えていないと考えられ、高率の遺伝変異をそなえるゲノムマーカーの開発が望まれている。

II DNA 反復配列数多型の原理

シングルローカスマイクロサテライト DNA 多型

2塩基を単位としたマダイのダイヌクレオチドマイクロサテライト領域のシークエンス泳動像の1例を Fig. 1 に示す。マイクロサテライト領域は短い塩基単位の繰り返しであり、このような領域はゲノム全体に豊富に存在するが、GT/CA 型リピートをはじめとする2塩基単位のダイヌクレオチドリピートが最も多い。このような特徴はいずれの真核生物においても共通する。そして一般的にその塩基単位の繰り返し数は個体ごとに極めて多型に富むとともに各遺伝子座によっても多型性の程度が異っている。マイクロサテライト DNA 多型は各遺伝子座ごとにこの繰り返し配列数の型を個体レベルで判定し、集団分析を行なうものである。

Fig. 2 はシングルローカスマイクロサテライト DNA 多

型を模式的にえがいたものである。シングルローカスマイクロサテライト法は一つの遺伝子座の反復配列数多型を検出する方法で、当該のマイクロサテライト遺伝子座の繰り返し配列数が同一の場合 (ホモ接合) 1本のバンドが、異なる場合には (ヘテロ接合) 2本のバンドが検出される。今、一つのマイクロサテライト遺伝子座において繰り返し数によって区別される対立遺伝子を A、B、C、D とし、雄親の繰り返し数が5回のもを A、3回のもを B、同様に雌親の繰り返し数が4回のもを C、2回のもを D とすると、それぞれの親の遺伝子型は AB 型および CD 型となる (Fig. 2 上部)。子供の遺伝子型は両親の対立遺伝子のいずれかを受け継ぐので、この場合、両親ともにヘテロ型であるから、一腹子には4つの遺伝子型 AC, AD, BC, BD が出現する (Fig. 2 下)。マイクロサテライト多型においては対立遺伝子数、ヘテロ接合体率の平均は集団の遺伝的変異保有量の指標となり、対立遺伝子頻度分布の差によって集団間の遺伝的距離を算出できる。このように、マイクロサテライト多型はメンデル遺伝に従い、データの解析法は基本的にアイソザイム分析と同じ様な手順で集団の分析を行なうことができるのである。一方、いくつかの遺伝子座を組み合わせれば親子判別はもとより、個体識別のマーカーとしても利用できる。

なお、多型の検出法は PCR をベースとしたもので、繰り返し配列の上流および下流部の塩基配列をプライマーとし、マイクロサテライト領域を増幅後、増幅断片数の違いを電気泳動によって分画し、それを可視化するものである (Fig. 2 左下)。

一方、マイクロサテライト多型解析を行なうには、研究対象種ごとにマイクロサテライト領域の上流と下流域の塩基配列を決定し、PCR を行なうための最適プライマー領域を選択することが不可欠である。ただし、近縁種の多型解析への応用は可能である。

データ解析法 {対立遺伝子数およびヘテロ接合体率}

多型のデータの解析は基本的にアイソザイム分析 (Nevo, 1978) と同じ様な手順で集団の分析を行なうことができ、各遺伝子座における集団ごとの対立遺伝子数やヘテロ接合体を持つ個体の占める割合 (ヘテロ接合対立率) の平均は集団の遺伝的変異保有量の指標となり、集団間の遺伝的類似または異質性の程度を示す遺伝的距離は集団の対立遺伝子頻度分布の違いによって算出することができる。

対立遺伝子数は各遺伝子座における集団の対立遺伝子の

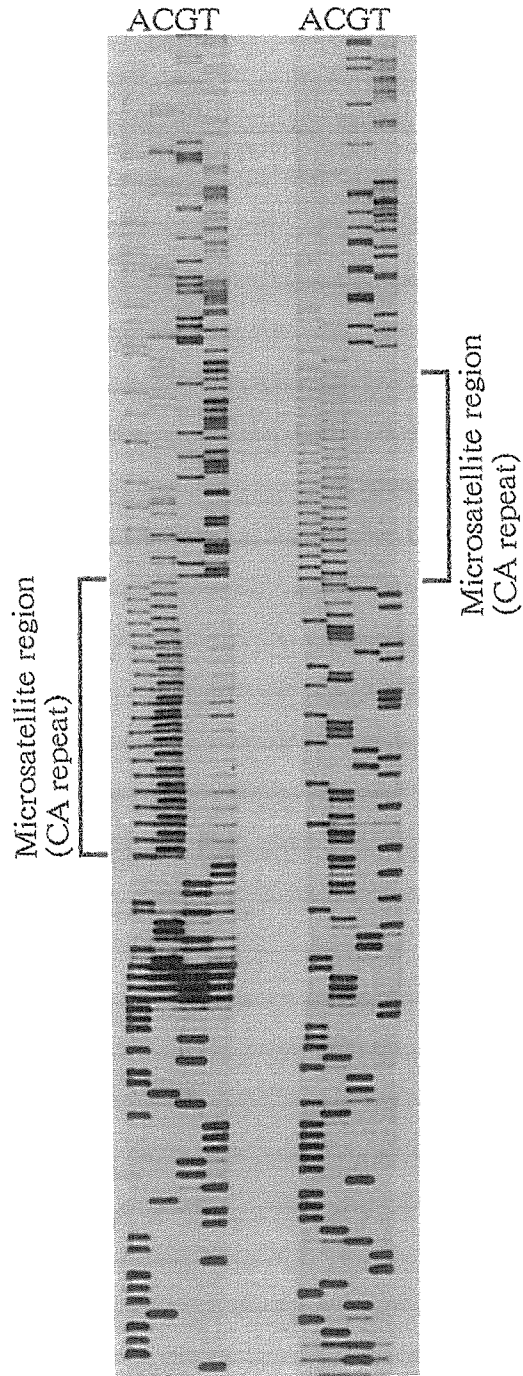


Fig. 1. Example of DNA sequences of microsatellite loci.

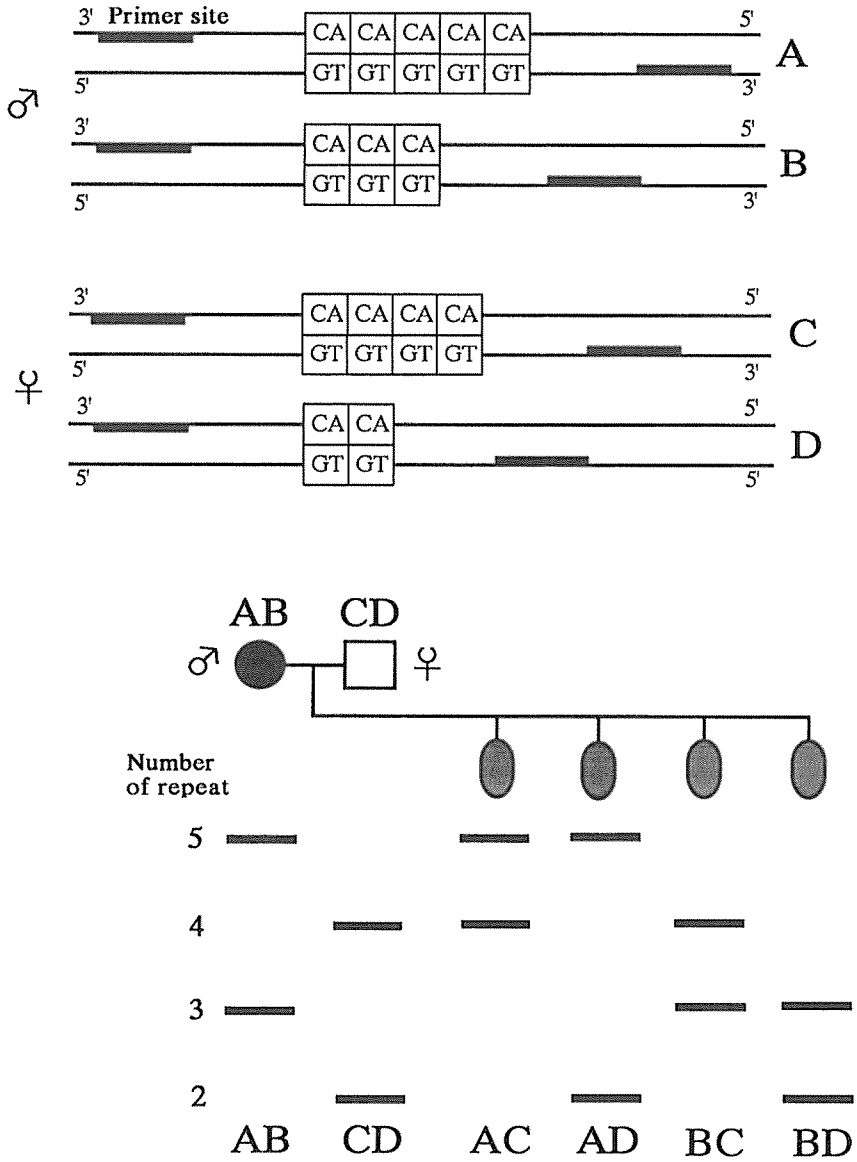


Fig. 2. Schematic diagram for principle of microsatellite polymorphism.

数を示すものであり、遺伝的多様性を保持した集団ほど高い値を示し、遺伝的変異が減少した集団ほど低い値を示す。一方、ヘテロ接合体率は0から1の間の値をとる変数であり、遺伝的多様性を保持した集団ほど1に近い値を示し、遺伝的変異が減少した集団ほど0に近い値を示す。また、ヘテロ接合体率には2種の算出法があり、 H_o で略記される平均ヘテロ接合体率の観察値と H_e で略記される平均ヘテロ接合体率の期待値があり、平均ヘテロ接合体率の観察値は各遺伝子座において実際に観察されたヘテロ接合体を示す個体の割合を求め、それを遺伝子座ごとに求め平均したものである。平均ヘテロ接合体率の期待値はサンプル集団がハーディワインバークの平衡にあると仮定したときに期待される値であり、対立遺伝子 A_1, A_2, \dots, A_m があり、それらの頻度が X_1, X_2, \dots, X_m であるときに遺伝子座のヘテロ接合体率 h_i は以下の式

$$h_i = 1 - \sum_{j=1}^m X_j^2$$

で求め、それを遺伝子座ごとに求め平均したものである。なお、これら平均ヘテロ接合体率の観察値と期待値の比(H_o/H_e)は一般に野生集団の場合1に近くなり、これをずれることは近親交配、同類交配および集団の細分化などの要因が考えられる。

また、集団間の遺伝的類似または異質性の程度を示す遺伝的距離は本研究においては Nei, (1971)の方法を採用し、集団の対立遺伝子頻度分布の差によって算出した。

マルチローカスミニサテライト DNA 多型

ミニサテライト領域は10-64塩基を1単位とする繰り返し配列であり、このような領域はゲノム全体に豊富に散在し、現在までに20種類程度の塩基配列が知られており、これらの配列は一般に多くの生物種において共通に存在する。そして、一般的にその塩基単位の繰り返し数は個体ごとに極めて多型に富むとともに各遺伝子座によっても多型性の程度が異っている。マルチローカスミニサテライト DNA 多型は個体ごとに同一のバンドパターンを示すことがないために DNA 指紋法 (DNA フィンガープリント) とも呼ばれており、個体識別に使われるとともにメンデル遺伝することから、親子鑑別にも用いられている。これは、複数の

ローカスの繰り返し配列数の多型を同一のゲルに検出し、集団分析においては個体間のバンドの共有度を遺伝的類似度として判定し、この値により、集団内の遺伝的変異保有量を示すものである。Fig. 3はマルチローカスミニサテライト DNA 多型を模式的にえがいたものである。マルチローカスミニサテライト法は複数のシングルローカス多型を同時に検出する方法で、図のようにミニサテライト遺伝子座数が6であり、繰り返し配列数が全ての遺伝子座において同一のホモ接合の場合には最少の6本バンドが、また、全ての遺伝子座において異なるホモ接合の場合には最多の12本バンドが検出され、バンド数は解析する個体の全ての遺伝子座におけるホモまたはヘテロの数で決定される。

なお、多型の検出法はサザンブロッティングをベースとしたもので、適当な制限酵素で DNA を断片化、電気泳動により分画し、用いるミニサテライト領域の繰り返し配列をプローブとしてハイブリダイゼーションし、複数の可視化するものである。

データ解析法 {検出断片共有度 (BSI)}

現在、最も一般に用いられているマルチローカスミニサテライト DNA 多型のデータ解析法としては検出されたフィンガープリント像の検出断片の共有度 (Band sharing index) が使われ、これは比較する2個体間の検出バンド数に占める共有バンド数の割合で示される (Wetton et al., 1987)。BSI (Band sharing index) は以下の式で求められる。

$$2N_{AB} / (N_A + N_B)$$

N_A および N_B はA、B各個体にみられた断片数、 N_{AB} はA、B両個体に共有する断片数を示す。集団内および集団間の平均BSIはそれぞれのサンプルの平均値を求めばつきは標準偏差を求めた。BSI値は同一集団内においては遺伝的変異保有量を示し、理論的には0から1の間の値をとる変数であり、ミニサテライト領域の反復配列数が全て等しく、遺伝的に全く均質な場合には1、すべて異なる場合には0となる。BSI値は集団間においては比較する集団の遺伝的類似度を表す指数であり、 $1 - BSI$ は比較する集団の遺伝的異質度を表す指数となる。

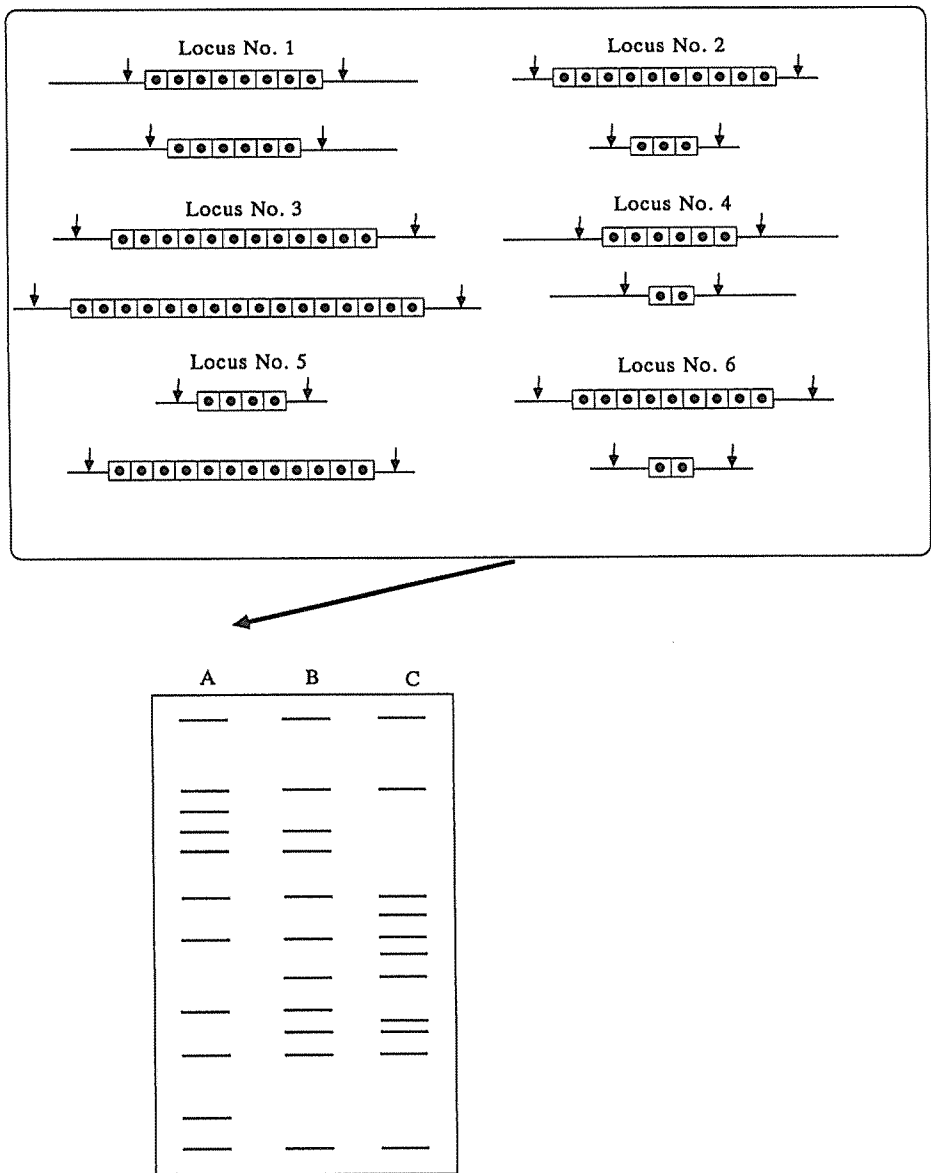


Fig. 3. Schematic diagram for principle of multiplex minisatellite polymorphism.

第2章 DNA反復配列数多型の検出法 および条件検討

I ミニサテライト

DNAフィンガープリント法における一連の分子生物学的手法の基本的な実験法は、現在のところほぼ確立されている。しかしながらそれぞれの実験過程の最適な条件は種によって異なるため実験条件の検討が必要である。そこで本章では本研究で採用した多型検出法(万年ら, 1990)を示すとともにアユにおけるDNAフィンガープリントの至適実験条件および簡便化を模索するため以下の項目1. ゲノムDNAの抽出、2. 制限酵素によるDNAの切断、3. 電気泳動、4. ハイブリダイゼーションの4項目について検討を行った。なお至適実験条件を示すための供試魚には高知大学で養成したアユを用いた。

1. 材料および方法

DNAフィンガープリントの一連の実験法の詳細および検討条件を以下に示した。

1) 未変成DNAの抽出

DNAフィンガープリント法においてDNAの抽出、精製は一連の実験操作の最初の行程であり、DNAの抽出状態および純度により実験の成否も左右される重要な技術である。また抽出する組織および魚種により、実験法や溶液濃度等の適正条件が異なる。本研究ではアユゲノムDNAの簡易抽出について2つの検討を行った。第1はゲノムDNAの抽出において、全血からのDNA抽出法は他の組織からの抽出よりも容易であり、また純度も高いのであるが、血液であるためにサンプルを実験室まで生かして運ばなければならないという制約がある。そこで他の血液実験で用いられている血液保存液(Absorber sol.)を用いて血液を保存し、DNAが抽出できるかどうか検討した。第2はゲノムDNAの抽出は時間と手間がかかる工程であり、またフェノールなどの有機溶媒を用いるため有害性の高い工程でもある。しかし最近、ヒトゲノムDNAを有機溶媒を用いず、短時間でしかも1本のマイクロチューブ内で行うことのできるDNA抽出キットが発売されたので魚類にも応用ができるかどうか検討を加えた。

保存血液からのDNAの抽出

血液を一定期間保存した後、DNAを抽出し、DNAの

濃度および純度を測定するとともにDNAの抽出状態を確認し、実際にDNAフィンガープリント法を行い、保存血液からのゲノムDNAの抽出について検討した。

血液はしり鱗付近の腹大動脈よりヘパリン処理したシリンジを用いて採血し、1個体あたり0.2-0.5ml採取した。DNA抽出を行うまで全血を等量の血液保存液(アブサーパー液(Dextrose 20.5g/l, NaCl 4.2g/l, Citric Acid 0.55g, Sodium Citrate 8.0g))で一定期間(8日間)冷蔵保存した。保存した血液は10mlの生理食塩水/EDTA(0.9%NaCl, 1mMEDTA)を加え、1000rpmで10分間遠心し、赤血球を分離、沈澱させた。沈澱させた赤血球を100ul採取し、ToritonX-100溶液(0.3M Sucrose, 10mM Tris-HCl pH8.0, 5mM MgCl₂, 0.8% TritonX-100)を900ul加え血球膜を溶解させ、1000rpmで10分間遠心し、核を沈澱させた。沈澱した核は生理食塩水/EDTA 1mlを用いて遊離させたのち10倍量のザルコシル溶液(0.5%N-lauroylsarcosine Sodium salt, 10mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH8.0)および10分の1量のプロテナーゼK(10mg/ml)を加え37℃で1晩インキュベートし、核を溶解させDNAを抽出した。続いてDNAの精製を次の手順で行った。DNA抽出液と等量のTE緩衝液飽和フェノール(TE(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mMEDTA):Phenol=1:1(V/V), 酸化防止剤として0.1% 8-hydroxy quinolineを含む)を加えゆっくりと10分間混合した後、3000rpmで10分間遠心し、水層を分取する。同様の操作をフェノール/クロロフォルム(Phenol:chloroform:isoamyl alcohol=25:24:1(V/V))、クロロフォルム/イソアミルアルコール(Chloroform:isoamyl alcohol=24:1(V/V))についても行い、たんぱく質、脂質を除去した。そしてフェノール除去のために水層と等量のジエチルエーテルを加えて混合、軽く遠心しエーテル層を除いた。同様の操作を再度行い、風乾させて完全にエーテルを除去し、DNAの精製を行った。精製を行ったDNA溶液は10分の1量の3M酢酸ナトリウム、続けて2倍量の100%エタノールを加え1000rpmで10分間遠心し、エタノール沈澱を行いDNAを濃縮した。沈澱を確認しながら、上清を捨て10mlの70%エタノールを加えてさらに1000rpm10分間遠心し、脱塩を行いDNAの洗浄を行った。この操作をもう1度繰り返して上清を捨て風乾し、実験を行うまでTEに溶かして保存し、実験にはDNAを十分に溶解させるために少なくとも1日以上経過したサンプルを用いた。

DNAの抽出状態は1×TBE緩衝液(0.09M Tris, 0.09M ホウ酸, 2.5mM EDTA)を用い1.2%のアガロースゲルに

おいて電気泳動を行い、ゲノムDNAを分画し、DNAが切断されているかどうか判断した。また抽出DNAの濃度および純度は分光光度計によって測定した。なおDNAの濃度は260nmにおいて1 OD/ml=50ugとし、DNAの純度は260nm/280nm (280nmはタンパク質量)のOD比によって算出した。

抽出キットによるゲノムDNAの抽出

ヒトゲノムDNA抽出キットによってDNAを抽出し、濃度および純度を測定するとともに抽出状態を確認し、実際にDNAフィンガープリント法を行い、抽出キットによるゲノムDNAの抽出について検討した。

抽出キットには和光純薬工業(株)のDNAエキストラクターWBキットを用いた。DNA抽出の原理は溶解液で全血中の赤血球から核をとり出した後、タンパク分解酵素で核膜および核タンパクを破壊し、よう化ナトリウムを加え、タンパク質および脂質等を可溶化させ、イソプロピルアルコールでDNAを沈澱させ、回収するというものであり、方法は添付マニュアルに従い、以下のように行なった。

全血0.5mlをマイクロチューブにいれ等量の溶解液を加えて軽く混合し、4℃で10000rpm、20秒遠心した後、上清を除く。ここに溶解液1mlを加えてマイクロチューブミキサーにて攪拌し、4℃で10000rpm、20秒遠心し上清を除く。この操作を再度くりかえし、酵素反応液200ulとタンパク分解酵素10ulを加えて混合し、37℃で1時間インキュベートする。ここによく化ナトリウム溶液300ulを加えて混合、続いてイソプロピルアルコールを0.5ml加えて混合し、DNAを抽出する。室温で10000rpm、10分間遠心し、上清を除く。洗浄液(A)を1ml加えて十分混合し、室温で10000rpm、5分間遠心し、上清を除きさらに洗浄液(B)を1ml加えて同様の操作を行う。DNA沈澱を乾燥させた後、1mlのTEを加えて実験を行うまで保存し、実験には少なくとも1日以上経過したサンプルを用いた。

DNAの抽出状態は電気泳動を行い、DNAが切断されているかどうか判断した。また抽出DNAの濃度および純度は分光光度計によって測定した。これら血液保存液から抽出したゲノムDNAおよびキットによって抽出したDNAは実際にDNAフィンガープリントを行い、断片像が検出できるか確認した。

2) 制限酵素によるDNAの切断

DNAフィンガープリントにおいて用いられる制限酵素は、現在のところ20種類程度知られており、主に4塩基、5

塩基、6塩基認識の制限酵素が使われている。異なった制限酵素を用いて検出される断片パターンは制限酵素特異的であり、同時に種特異的でもある。そこで数種の異なった制限酵素を用いて検出される断片パターンを比較し、情報量を増大させるとともにアユにおいて適正な制限酵素の選択を試みた。

供試魚には1988年に作出されその後、毎年継代されたF⁵のクローンアユ系統を用いた。ゲノムDNAの制限酵素による消化法は次のとおりである。TE緩衝液にとかして保存したゲノムDNA溶液50ugをマイクロチューブにとり、1/10量の3M酢酸ナトリウム、続いて2.5倍量の100%エタノールを加え、6000rpmで5分間遠心分離し、エタノール沈澱を行いDNAを濃縮した。沈澱を確認しながら、上清を捨て1mlの70%エタノールを加えてさらに6000rpm5分間遠心し、脱塩を行い上清をすて風乾した。ここに滅菌水=500ul(酵素反応液の総液量)-50(10×Bufferの液量)-制限酵素100unitの液量となるように滅菌水をいれ混合し、DNAを溶かした。つづいて制限酵素の種類に適合した組成の10×Bufferを50ul加えて混合し、さらに制限酵素を100unit加えて混合し、37℃で一晩インキュベートしゲノムDNAを消化した。ここにフェノール/クロロフォルム(Phenol:chloroform:isoamyl alcohol=25:24:1(V/V))を等量加え混合し、1000rpmで5分間遠心分離し、上清をとり酵素タンパク質、脂質等を除去した。そしてフェノール除去のために水層と等量のジエチルエーテルを加えて混合、1000rpm、2分間遠心しエーテル層を除き、風乾させて完全にエーテルを除去し、DNAの精製を行った。精製を行ったDNA溶液は10分の1量の3M酢酸ナトリウム、続けて2倍量の100%エタノールを加え-80℃に1時間放置した。サンプルを10000rpm、15分間遠心し、沈澱を確認しながら上清を捨て、1mlの70%エタノールを加えてさらに10000rpm5分間遠心し、脱塩を行い上清をすて風乾した。ここにサンプル処理液[TE:BPB溶液(40%グリセリン、0.25%BPB、100mM EDTA)=3:1]を25ulいれサンプルDNAとし、実験に用いるまで保存した。なお制限酵素には4塩基認識のHae III、Msp I、5塩基認識のHinf I、6塩基認識のEcoR I、Hind IIIを用いた。

3) 電気泳動

DNAフィンガープリント法において電気泳動の条件(泳動時間、電圧量およびゲル濃度)をかえることによって検出されるフィンガープリント像がどのように変化するかを観察し、適正な泳動条件を検討した。

DNAフィンガープリント法における電気泳動法は以下の方法によった。始めにゲルトレイにサンプルコームをセットし、三角フラスコに1×TAE緩衝液(0.04M Tris、19mM 酢酸、10mM EDTA)または1×TBE緩衝液(0.09M Tris、89mM Boric Acid、50mM EDTA)と適性濃度のアガロース粉末をいれ、121℃になるまでオートクレーブし、アガロースを溶解した。オートクレーブしたフラスコをはじめよくかきまぜ、その後ゆっくりとかきまぜながら手で持てる程度(50℃)まで冷却させた後、水準器で水平にしたゲルトレイ上に注ぎこみ静置した。そしてアガロースが完全に固まってから、サンプルコームを静かに抜き、水平にした泳動槽へ移し、1×TAE緩衝液を満たしサンプルを試料溝にアプライした。アプライするサンプルDNA量は以下の方法によった。制限酵素によって消化し、25ulのサンプル処理液を添加して保存したDN

A溶液から3ulとり、電気泳動により、制限酵素によって消化されているか確認すると同時に泳動像の濃さによって本泳動に用いるDNA量を決定した(標準のサンプルは11ul、濃いサンプルおよび薄いサンプルは10-14ulの間で加減して用いる)。続いて泳動装置の電極を試料側を陰極、反対側を陽極に接続し、さらに緩衝液が下流側から上流側にまわるようにポンプをセットし、所定の電圧で泳動を行った。泳動後、約2LのTAE緩衝液にゲルをいれ、そこに100ulのエチジウムブロマイド溶液10mg/mlをいれ混合した後、30分程度静置して2本鎖のDNA断片を染色し、ゲルに紫外線を照射して、泳動状態を確認すると同時に分子量マーカーとなるHindIII切断λDNAの泳動像によって分子量の推定を行った。泳動の終わったゲルは、続いてサザンブロッティングを以下の方法で行った。ゲルを約2Lの変性液(0.5M NaOH、1.5M NaCl)に浸し、ゲルが沈むまで緩やかに振とうし、2本鎖のDNAをアルカリ変性し、1本鎖にした。そしてゲルを約2Lの中和液(1M 酢酸アンモニウム、0.03M NaOH)に移し約1時間振とうし、ブロッティング緩衝液に中和液を用い、1本鎖のDNAをニトロセルロースメンブランにペーパータオル1束分キャピラリートランスファーした。ブロッティングの終了したメンブランは中和液で軽くすすぎ、自然乾燥させた後、80℃で2時間ベーキングし、DNA

を固着させハイブリダイゼーションを行うまで保存した。本研究では以下の3つの泳動条件について検討を行った。1) 1×TBE緩衝液、0.7%、20cmのアガロースゲルを用いて65Vの定電圧で(31.5時間)電気泳動した。2) 電圧および泳動開始時の電流を1)の約半分にし、泳動(59時間)する。

3) 1×TAE緩衝液、1.2%、40cmのアガロースゲルで60Vの定電圧で65時間電気泳動を行った。なお1)では制限酵素にHae III、プローブにNon-RIのNice probe 33.15、2)および3)では制限酵素にHinf I、プローブにはRIのYN22を用いた。

4) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションにおいてDNA断片を検出するときに用いる放射性同位元素は特別な施設や管理、技術が必要であるという制限がある。またラジオアイソトープは半減期が短く、プローブが不安定なこと、環境や人体の汚染の心配がある等の欠点がある。そこで最近開発されたラジオアイソトープを用いずにアルカリフォスファターゼで標識し、化学発光によってDNA断片を検出するNon-RIによるフィンガープリントを検討し、RI法との比較を行った。また異なった数種のプローブを用いて情報量を増やすとともにそれぞれのプローブとの適合性をみた。なおRIによるプローブのラベル法においてはクレノウフラグメントによる方法とBcaBEST Labelling Kit (TaKaRa社製)による方法、Non-RIによるプローブのラベル法についてはECLダイレクトDNAラベリング-検出システム(Amersham社製)とNICE Probe (CELLMARK社製)による方法を用いた。

クレノウフラグメントによるプローブの標識

プローブの標識はつぎの方法によった。2本鎖の鋳型DNA 5ugを500ul容量のマикроチューブにいれ100℃、3分間熱変性後、氷水中で5分間急冷し、鋳型DNAを1本鎖にした。そこにランダムプライマーを250nM、クレノウバッファーを5ulとり、滅菌水を加えて80ulにメスアップし、60℃で1時間インキュベートし、プライマーをアニーリングさせた後、徐々に室温に戻した。室温になったら軽く遠心し、ここにクレノウバッファーを5ul、dNTP (dATP, dTTP, dGTP)を2500pMずつ加え、さらにクレノウフラグメントを4unit、32P dCTP (50uCi)を加え、42℃で20分間インキュベートし、プライマーを伸長させた。再び100℃で10分間加熱、氷中で急冷し鋳型DNAとプローブとを分離させ、遠心し回収した。そして1.5mlのチューブにスパンカラム (Bio-Rad BIO-GEL P-60)を入れ、プローブ溶液50ulを加え、750rpmで1分程度遠心ゲルろ過し、ろ過液とスパンカラムに残存した放射線量をサーベイメーターで測定し、ろ過液/スパンカラム残存量>0.5になるようにしてこれを標識DNAとした。なおスパンカラムは以下の方法で作成した。

1gのBio-gelを(Biorad社製)10mlのTEで膨張させオートクレープし、さらに等量のTEを加え混合した。これを底に穴を開けた0.5ml容量のマイクロチューブに0.3ml加え1000rpm1分間遠心し、余分なTEを除きこれをスパンカラムとした。ハイブリダイゼーションは以下の方法で行った。プラスチックバックにメンブランおよびハイブリダイゼーション溶液(40%ホルムアミド、26×SSC、5mMEDTA、0.25% skim milk)20mlをいれ、37℃で2時間振とうし、プレハイブリダイゼーションした。そしてRI標識プローブをプラスチックバックに加え37℃で一晩振とうし、ハイブリダイゼーションした。メンブランを少量の洗浄液(2×SSC、0.1%SDS)で軽くゆすぎ、さらに洗浄液約1Lで60℃30分振とうし洗いを行った。同様の操作をもう1度繰り返した。ペーパータオルでメンブラン表面の余分な水気を取りラップに包みX線カセットに入れ-70℃で2日程度露光させた。カセットを冷凍庫からだし、温度が室温になったところでフィルムを現像液5分、停止液2分、定着液5分の手順で現像しフィンガープリント像を得た。

BcaBESTによるプローブの標識

従来よく用いられたクレノウフラグメントによる方法では反応時間が長く、GC含量が高い鋳型DNAあるいは高次構造を取り易い鋳型DNAを用いると取り込み率が低下する傾向がある。そのためこのような欠点を補い、さらに伸長性の高いBcaBEST DNA Polymeraseを用いたラベリングキットによるプローブの標識およびハイブリダイゼーションの検討を試みた。プローブの標識は以下の方法で行った。マイクロチューブに鋳型DNA 25ng、Random Primer 2ulを入れ、さらに蒸留水を加え全量を5ulにし、95℃で3分間加熱後水中で急冷、5分間放置することで鋳型DNAを一本鎖とした。10×Buffer、dNTP Mixtureを各2.5ul、標識dCTP(1.85MBq,50mCi)を5ul加え、さらに蒸留水で溶液全量を24ulにした。BcaBEST DNA Polymeraseを1ul加え、50-55℃で10分間インキュベートし、プライマーの伸長を行い、EDTAを最終濃度が30mMになるように加えた。95℃で3分間加熱した後水中で急冷し、合成された相補鎖(標識DNA鎖)を一本鎖DNAとして鋳型DNAから解離させ、これをハイブリダイゼーションプローブ液とした。ハイブリダイゼーションは以下の方法によって行った。ハイブリオープンボトルにメンブランおよびハイブリダイゼーション溶液(40%ホルムアミド、20×SSC、5mMEDTA、0.25% skim milk)20mlをいれ、37℃で2時間振とうし、プレハイブリダイゼーションした。そしてRI

標識プローブをハイブリオープンボトルに加え42℃で一晩振とうし、ハイブリダイゼーションした。メンブランを少量の洗浄液(2×SSC、0.1%SDS)で軽くゆすぎ、さらに同洗浄液約200mlで55℃30分振とうし洗いを行った。さらに(1×SSC、0.1%SDS)約200mlで55℃15分間同様の洗いを行った。ペーパータオルでメンブラン表面の余分な水気を取りラップに包みX線カセットに入れ-70℃で15時間程度露光させ現像した。なおフィンガープリント像の濃淡により2回目以降の露光時間を加減した。

ECL ラベリングシステムによるプローブの標識

この方法ではRIによる標識法と異なり、プローブの増幅と標識を同時に行うことができないため、標識を行う前にプローブとなるDNAを増幅する必要があり、プローブの増幅にはPCR法(Polymerase chain reaction)を用いた。PCR法によるプローブの増幅は(TaKaRa GeneAmp PCR Reagent kit with Ampliqa DNA Polymerase)を用いて以下の方法で行った。マイクロチューブにバッファーを10ul、鋳型DNAを1ng、各dNTPをそれぞれ5mM、2種類のプライマーをそれぞれ50pM、タックポリメラーゼを5unitとり蒸留水で全量を100ulにした。増幅中のDNA溶液の蒸発を防ぐため、等量のミネラルオイルを加え、増幅装置で最初94℃で5分間反応させた後、94℃1分間、55℃2分間、72℃1分間のサイクルを31サイクル行いプローブを増幅した。なお反応液より5ulとりこれを1.2%アガロース電気泳動を行い、プローブが増幅されているか確認する。プローブが増幅された反応液は以下の方法で精製する。フェノール/クロロホルム(Phenol:chloroform:isoamyl alcohol=25:24:1(V/V))を等量加え混合し、1000rpmで5分間遠心分離し、上清をとり酵素タンパク質、脂質等を除去した。そしてフェノール除去のために水層と等量のジエチルエーテルを加えて混合、1000rpm、2分間遠心しエーテル層を除き、風乾させて完全にエーテルを除去し、DNAの精製を行った。精製を行ったDNA溶液は10分の1量の3M酢酸ナトリウム、続けて2倍量の100%エタノールを加え-80℃に1時間放置した。凍ったサンプルを溶かした後、10000rpm、15分間遠心し、沈澱を確認しながら上清を捨て、1mlの70%エタノールを加えてさらに10000rpm5分間遠心し、脱塩を行い上清をすて風乾し、これを50ulの滅菌水に溶かした。プローブの標識はECLダイレクトDNAラベリング-検出システムにより以下の方法で行った。DNA溶液を95℃で3分間加熱した後、水中で急冷し、合成された相補鎖(標識DNA鎖)を一本鎖DNA

Aとして鋳型DNAから解離させ、軽く遠心し溶液を集めた。そこに等量のDNA標識試薬を加え混合した後、さらにDNA溶液と等量のグルタルアルデヒド溶液を加え混合、軽く遠心、37°C10分間インキュベーションした。ハイブリダイゼーションは以下の方法によった。メンブランをプラスチックバッグにいれ、メンブラン1cm²あたり0.25mlのハイブリダイゼーション溶液を加えシールし、37°Cで15分間プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを加え37°Cで1晩振とうし、ハイブリダイズした。1次洗浄バッファー (0.5×SSC, 0.4% SDS, 6M Urea) で37°C30分間振とうして洗い、洗浄液をかえ同様の操作を繰り返した。引き続き2次洗浄バッファー (2×SSC) にかえ、室温で5分間振とうし、洗浄液をかえ同様の操作を繰り返した。メンブラン1cm²あたり0.0625mlの検出試薬2をメンブランに直接かけ、引き続き同量の検出試薬1をかけて1分間穏やかに混合した。ペーパータオルでメンブラン表面の余分な水気を取りラップに包みX線カセットに入れ、2時間程度露光させ現像し、フィンガープリント像を得た。

NICE Probe によるプローブの標識

この方法はアルカリフォスファターゼですでに標識されたプローブ (33.15および33.6) (Jeffreys et al., 1985a) と検出試薬 (Lumi-Phos 530) の市販のキットであり、プローブの増幅および標識の必要がなく、また操作が煩雑でないため今後有用な方法になりうると考えられるためフィンガープリント像が検出されるかどうかを検討した。

ハイブリダイゼーションおよび検出は以下の方法によって行った。メンブランをDNA面が内側になるようにハイブリボットルに入れ、1×SSCでリンスした後、50°Cのプレハイブリダイゼーション溶液 (0.5M Na₂HPO₄ pH7.2 : 10%SDS=99 : 1) を約100ml加え、50°Cで20分間振とうした。プレハイブリダイゼーション溶液をすて、50°Cのハイブリダイゼーション溶液 [Pre-hybridisation Buffer : Membrane blocking reagent sol. [10%W/V solution of blocking reagent (Boehringer Mannheim) in Wash solution (2)] =9 : 1] 24mlをいれさらに16ulのNICE probeを加えて50°Cで20分間振とうした。ハイブリダイゼーション溶液をすて50°Cの洗浄液 (1) [0.5M Na₂HPO₄ pH 7.2=160ml/l, 10%SDS=10ml/l] を約100ml注ぎ、50°Cで10分間振とうし、洗浄液をかえて同様の操作をもう1度繰り返した。洗浄液 (1) を捨てた後、室温の洗浄液 (2) [0.1M マレイン酸一ナトリウム, 0.15M NaOH] を約100ml注ぎ、室温で5分

間振とうし、洗浄液をかえて同様の操作をもう1度繰り返した。メンブラン1cm²あたり10ulのLumi-Phos 530をゲル面に噴霧し、プラスチックシートに包んで余分な水気を取り、X線カセットに入れ、33.15の場合約4時間、33.6の場合約16時間程度室温で露光させ現像した。なおフィンガープリント像の濃淡により2回目以降の露光時間を加減した。

2. 結果

簡易抽出法におけるゲノムDNAの抽出状態とDNA量および純度

ザルコシル抽出・フェノール精製による通常の方法により抽出したゲノムDNA、血液保存液 (Absorber sol.) で8日間保存した後、ザルコシル・フェノール法により抽出したゲノムDNA、ヒトゲノムDNA抽出キットにより抽出したゲノムDNAを直接電気泳動し、エチジウムブロマイド染色したものを Fig. 4 に示す。どの方法においても同様のDNAがみられ、キレートされないためにDNAseが働き、ゲノムDNAが断片化されたサンプルと比較して抽出状態は良好であった。

ザルコシル抽出・フェノール精製による通常抽出DNA、保存した血液から通常法で抽出したDNA、ヒトゲノムDNA抽出キットによる抽出DNAの回収量および純度を Table 1 に示す。純度はどの方法においても良好でフィンガープリント法に使用する基準となる1.7を越えた。またDNA回収量は常法による抽出DNA量と保存した後、常法により抽出したDNAでは同程度であり、抽出キットを用いて抽出したDNA量は前2法により抽出したDNAと比較してかなり高い値となった。

またこれらの方法により抽出されたサンプルDNAを制限酵素 Hinf I によって消化し、NonRIの33.15によって検出されたDNAフィンガープリント像を Fig. 5 に示した。いずれの方法においてもフィンガープリント像が得られ、ゲノムDNAの抽出において簡易抽出法の有効性が示唆された。

制限酵素によるフィンガープリントパターンの比較

クローン系統 (WA1) を5種類の制限酵素 (4塩基認識 : Hae III, Msp I, 5塩基認識 : Hinf I, 6塩基認識 : EcoRI, Hind III) で消化し、プローブに Non-RI 標識の33.15および33.6を用いて検出したフィンガープリントを Fig. 6 に示す。また各酵素およびプローブにおける断片数を Table 2 に示す。2.0kbp から23.1kbp の範囲のDNA断片数は制限酵素によって異なり、33.16プローブにおいて

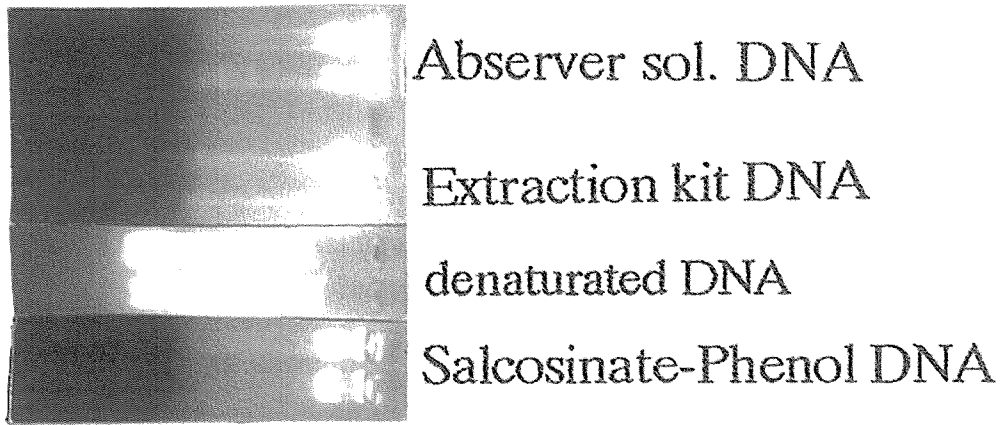


Fig. 4. Extracted condition of total unclear DNA.

Table 1. Comparison of DNA extraction conditions

method	volume of DNA extracted	Purity (OD 260/280)
Salcosinate-Phenol method	5.22ug/ul (red blood cell)	1.755
Abserver solution (Salcosinate-Phenol method)	4.89ug/ul (red blood cell)	1.743
DNA Extraction Kit	7.905ug/ul (total blood)	1.734

Hae III で51本、Msp I で57本、Hinf I で57本、EcoR I で61本、Hind III で60本であった。33.6プローブにおいて Hae III で45本、Msp I で47本、Hinf I で38本、EcoR I で19本、Hind III で45本であった。また断片パターンも制限酵素特異的であった。33.15プローブにおいて6塩基認識の EcoR I、Hind III の断片が9.4-23.1kbp の高分子領域に多くみられた。33.6プローブにおいては4、5塩基認識の Hae III、Msp I、Hinf I の断片が9.4-23.1kbp の高分子領域に少なく、6塩基認識の EcoR I、Hind III の断片が9.4-23.1kbp の高分子領域に多くみられた。また EcoR I については2.0-4.3の低分子領域では2本と他の酵素と比較して極端に少なかった。

泳動条件によるフィンガープリントパターンの変化

検討を行った以下の3つの泳動条件 ①) 1×TBE 緩衝液、0.7%、20cm のアガロースゲルを用いて65V の定電圧で31.5時間電気泳動した。2) 電圧および泳動開始時の電流を1) の約半分にし、泳動 (59時間) する。3) 1×TAE 緩衝

液、1.2%、40cm のアガロースゲルで60V の定電圧で65時間電気泳動を行う①) において検出されたフィンガープリントを Fig. 7 に示す。1) の条件下のフィンガープリント像では各レーンが電流の流れに対して平行でなく歪んでおり、DNA 断片は断片中央部が両端よりも先に流れ、弓状になって検出された。2) の条件下では1) と比較して度合が少量のもの、断片は弓状を呈していた。3) の条件下では1)、2) と異なり明瞭な断片が得られ、制限断片長多型の解析に有効であった。

プローブの標識法と違いによるフィンガープリントパターンの変化

RI による2種類の標識法、Non-RI による2種類の標識法について実験を行い、同じメンブランについて RI、Non-RI 標識プローブをそれぞれハイブリダイゼーションをさせ、フィンガープリントパターンを比較した。

Fig. 8 はサンプルにリュウキュウアユ、制限酵素に HaeIII、プローブに M13ファージ DNA (Vassart et al.,

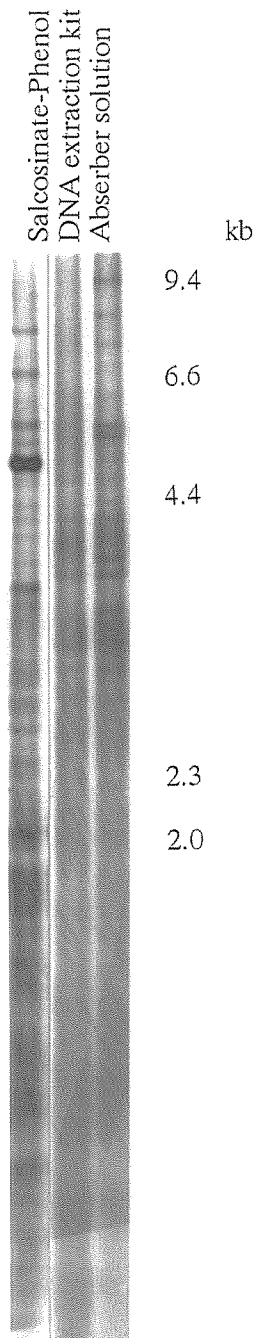


Fig. 5. DNA fingerprinting of ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hinf*I, hybridized with alkaline phosphatase labelled 33.15 probe. DNA was extracted by three methods salcosinate -phenol, extraction kit and absorber solution methods.

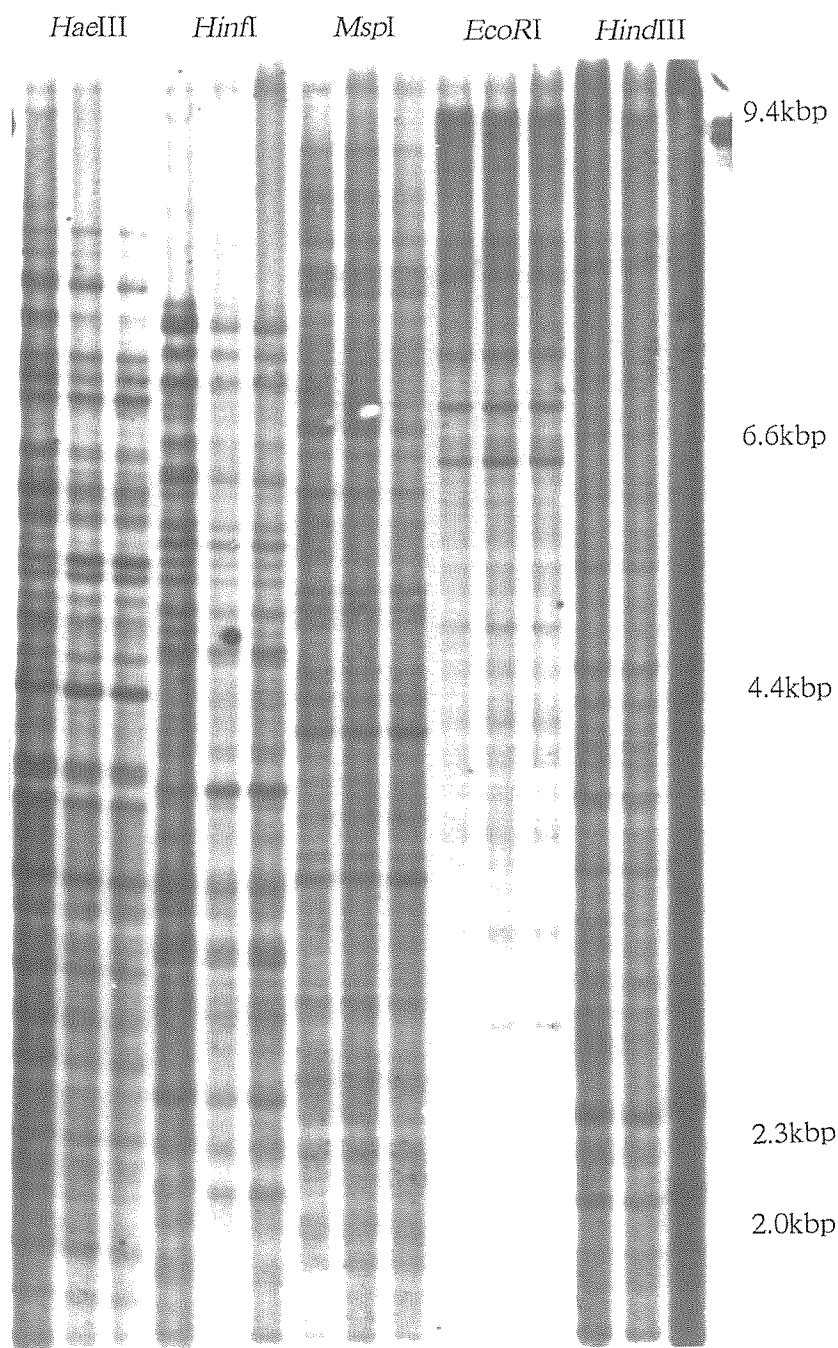


Fig. 6 - 1. DNA fingerprinting of clonal ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Eco* R I and *Hind* III, hybridized with alkaline phosphatase labelled 33.15 probe.

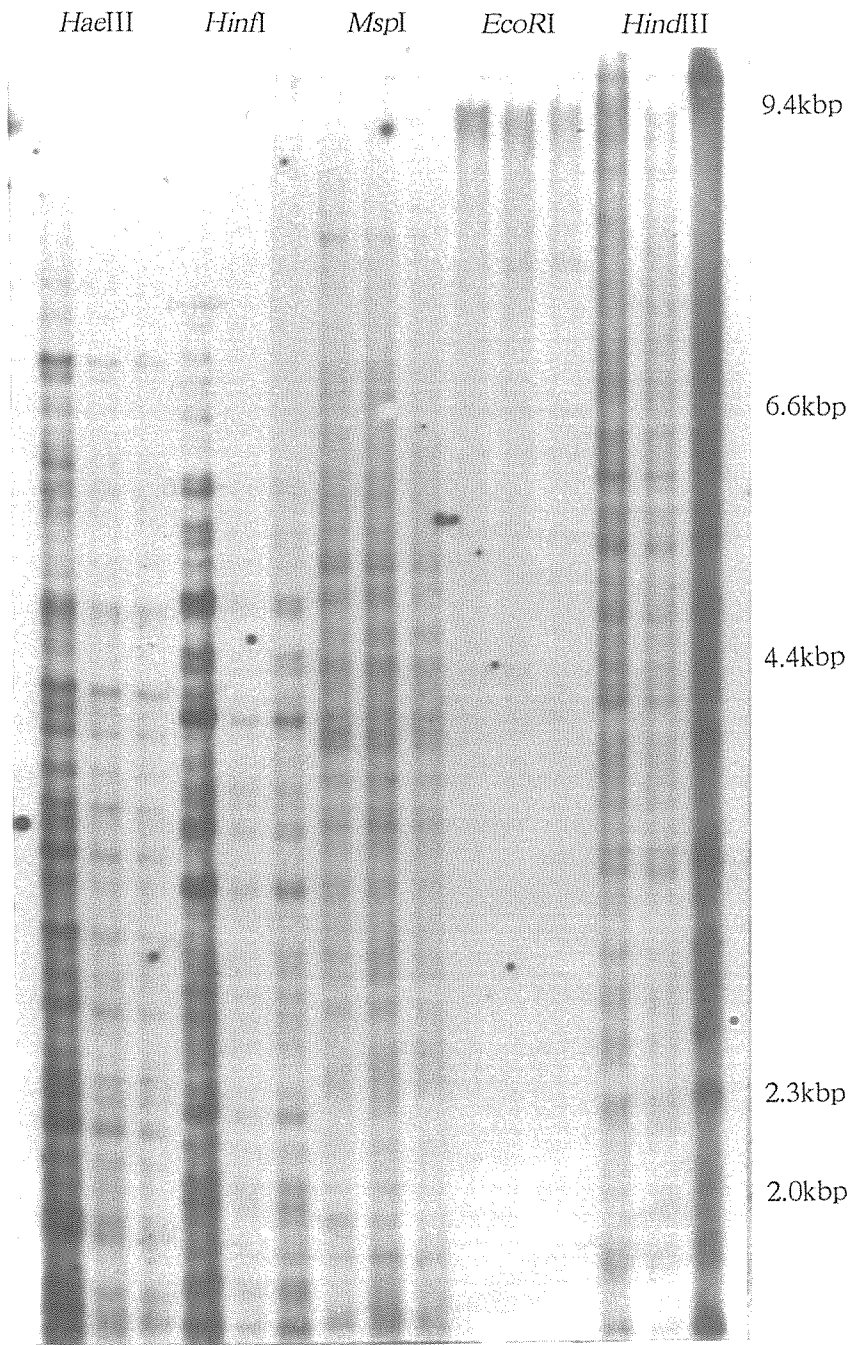


Fig. 6 - 2 . DNA fingerprinting of clonal ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Eco* R I and *Hind* III, hybridized with alkaline phosphatase labelled 33.6 probe.

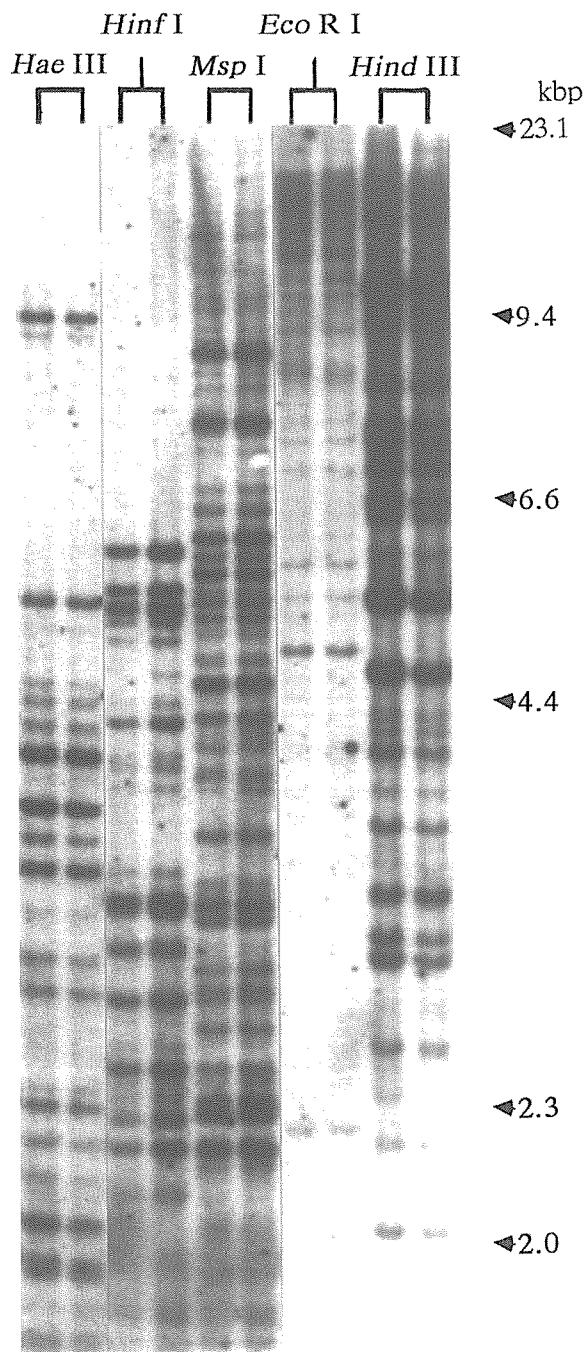


Fig. 6 - 3. DNA fingerprinting of clonal ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, *Hinf* I, *Msp* I, *Eco*R I and *Hind* III, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe.

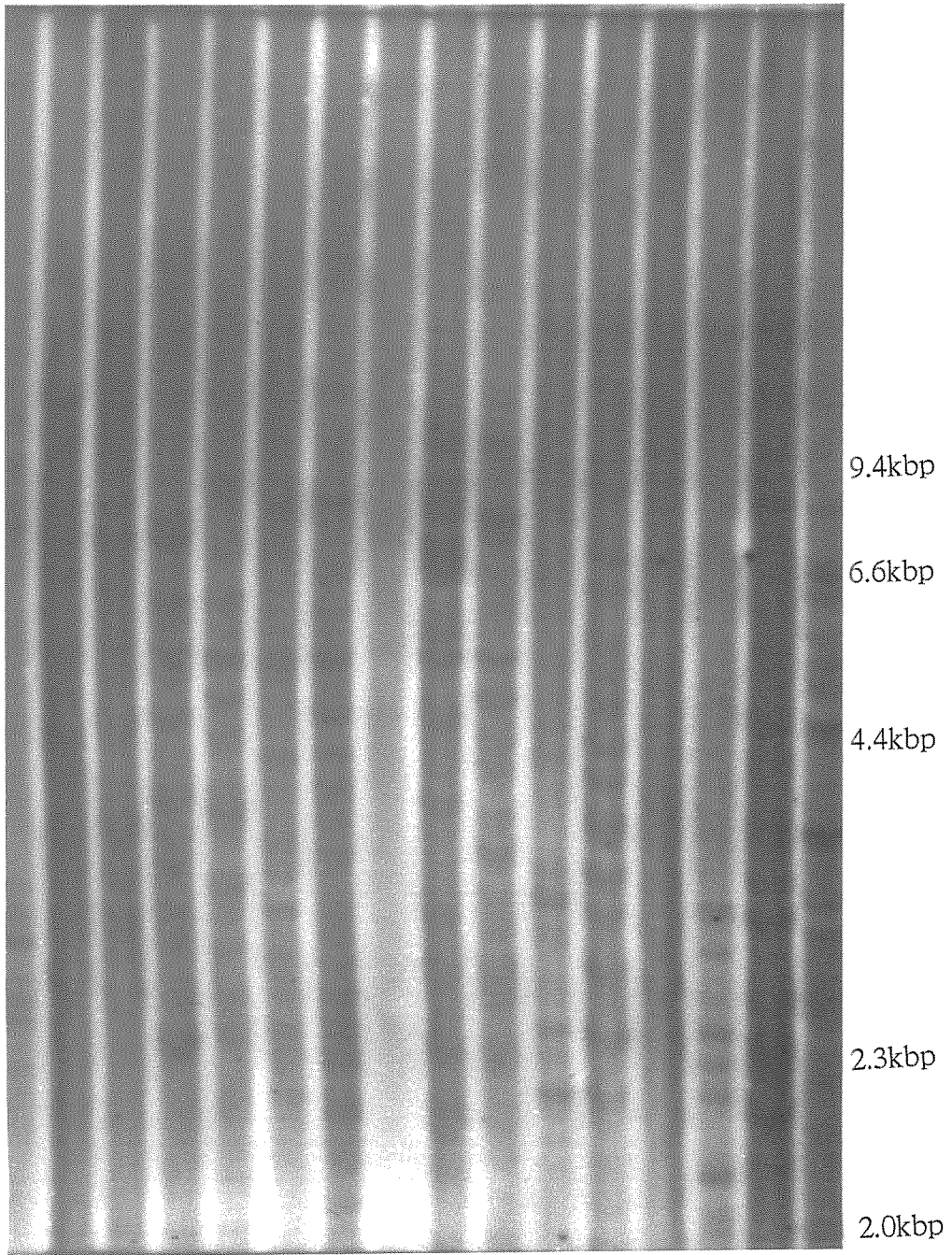


Fig. 7 - 1 . Comparison of electrophoresis conditions. 1XTBE buffer, 0.7% agarose gel (20cm), 65VX31.5hrs.

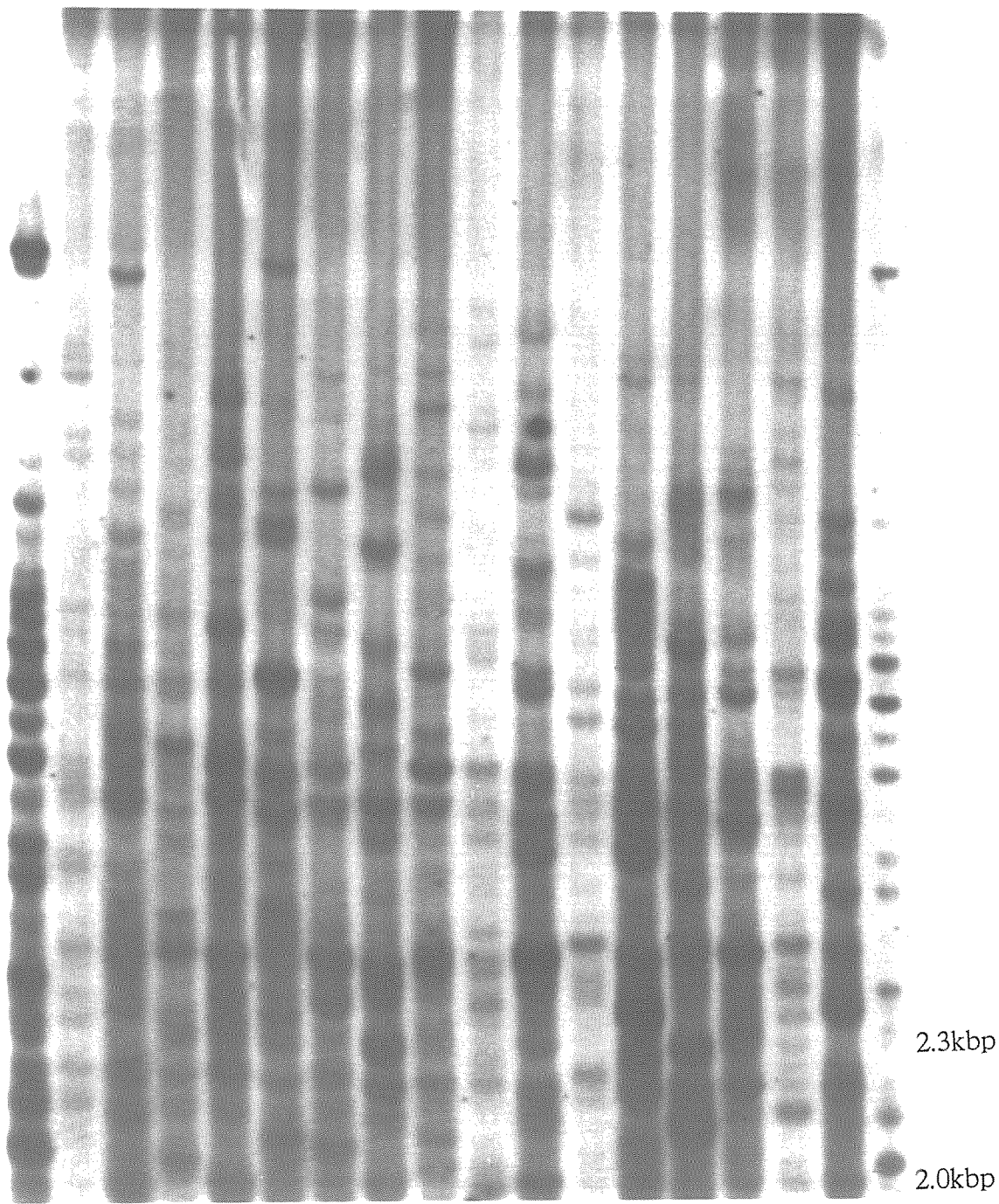


Fig. 7 - 2. Comparison of electrophoresis conditions. 1XTBE buffer, 0.7% agarose gel (20cm), 30VX59hrs.

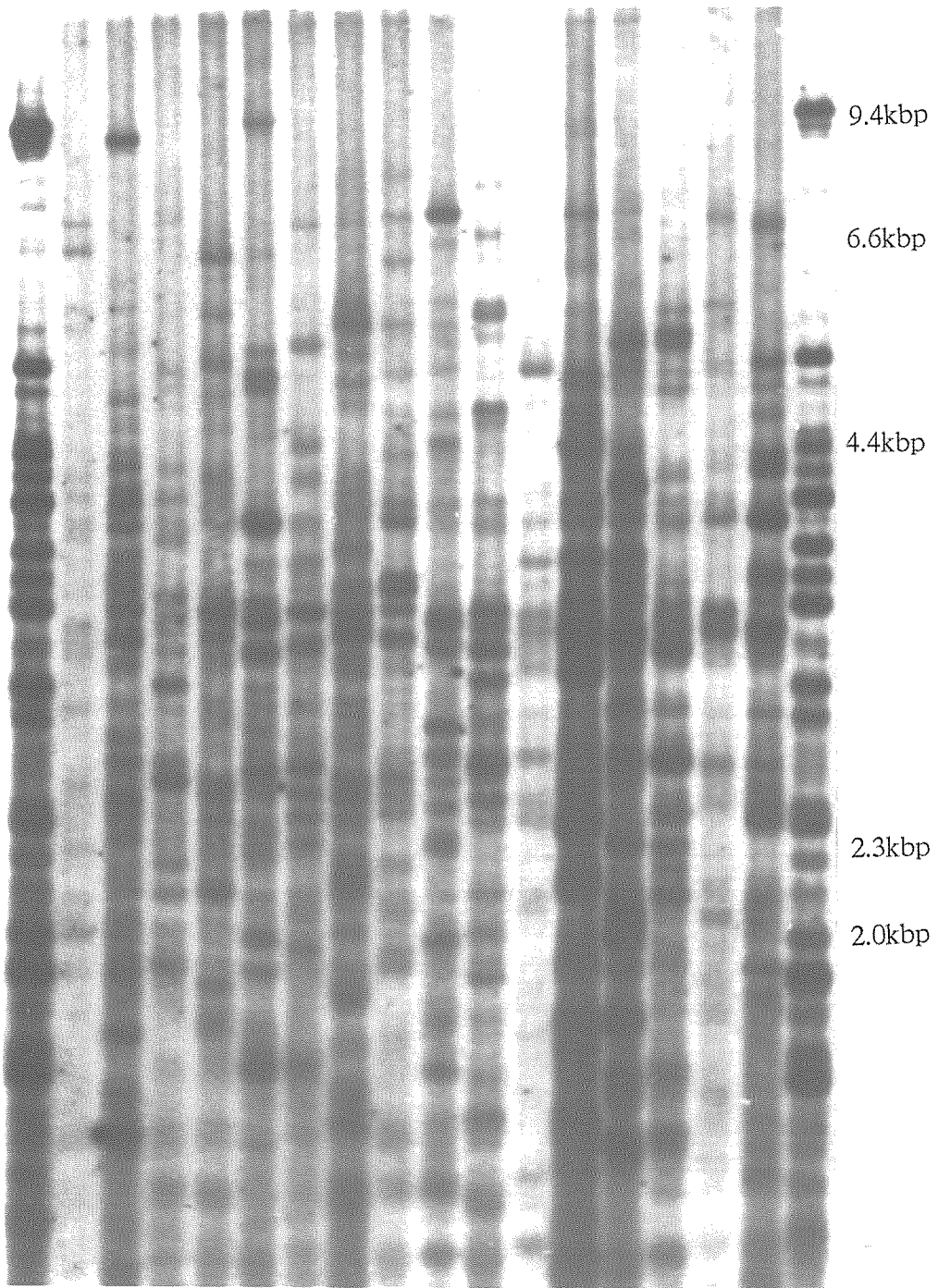
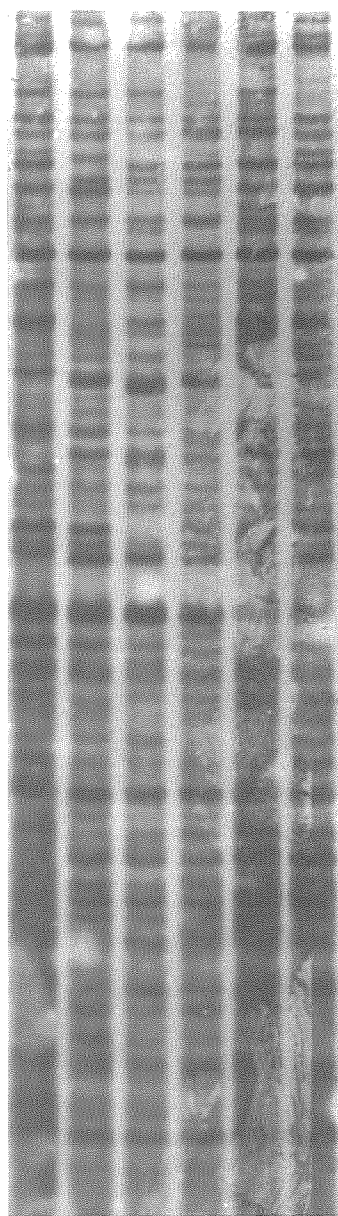
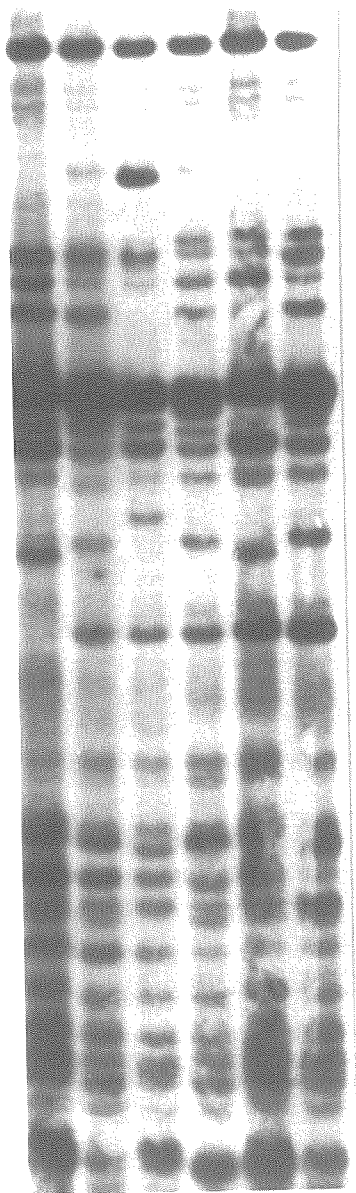


Fig. 7 - 3. Comparison of electrophoresis conditions. 1XTBE buffer, 1.2% agarose gel (40cm), 65VX60hrs.

RI Klenow fragment labelled
M13 phage DNA

Non-RI ECL labelled
M13 phage DNA



1.0kbp

6.6kbp

Fig. 8. DNA fingerprinting of Ryukyu Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, hybridized with radio isotope labelled M13 DNA probe and Non-RI labelled M13 DNA probe of the same membrane.

1987) を用い、RI法はクレノウフラグメントによる標識法、Non-RIはECLダイレクトDNA検出システム(Amersham)による標識法の同一個体のフィンガープリントを示した。2.3-6.6kbpの分子量の範囲の3サンプルについて比較したところクレノウフラグメントによる方法では14-20本、ECL法においては36-38本のDNA断片が検出され、Non-RI標識のECLの方が検出される断片数が高い傾向がみられた。またECLの方が検出されたDNA断片が明瞭に分離した。

Fig. 9はサンプルにクローン2系統(WA1,WA2)、制限酵素にHaeIII、プローブに33.15を用い、RI法はBcaBEST

Labelling Kit (TaKaRa) による標識法、Non-RIはNICE Probe (CELLMARK) による標識法の同一メンブランのフィンガープリントを示した。2.3-6.6kbpの分子量の範囲の3サンプルについて比較したところBcaBESTによる方法ではクローンWA1で30本、WA2で31本のDNA断片が検出され、NICE ProbeにおいてはWA1で34本、WA2で36本のDNA断片が検出され、断片数はさほど変化しなかった。また検出されたDNA断片は両方とも明瞭であった。

つぎに同じ標識法を用い、異なったプローブでハイブリダイゼーションを行い、情報量を増やすとともにフィン

Table 2. Comparison of the fragment number by restriction endonuclease detected with 33.15, 33.6 and YNZ 22 probes on the clone WA-1

Restriction enzymes		<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>EcoR</i> I	<i>Hind</i> III
Cognition number		4	4	5	6	6
Probes	Position (kbp)					
33.15	23.1					
		7	8	6	11	13
	9.4					
		9	9	7	9	9
	6.6					
		14	14	15	14	12
	4.4					
	24	26	29	27	26	
2.0						
	total	54	57	57	61	60
33.6	23.1					
		3	5	1	7	8
	9.4					
		8	7	6	4	7
	6.6					
		11	12	10	6	11
	4.4					
	23	23	21	2	19	
2.0						
	total	45	47	38	19	45
YNZ 22	23.1					
		5	9	0	8	10
	9.4					
		4	6	1	5	9
	6.6					
		7	10	8	4	5
	4.4					
	14	16	12	6	10	
2.0						
	total	30	41	21	23	34

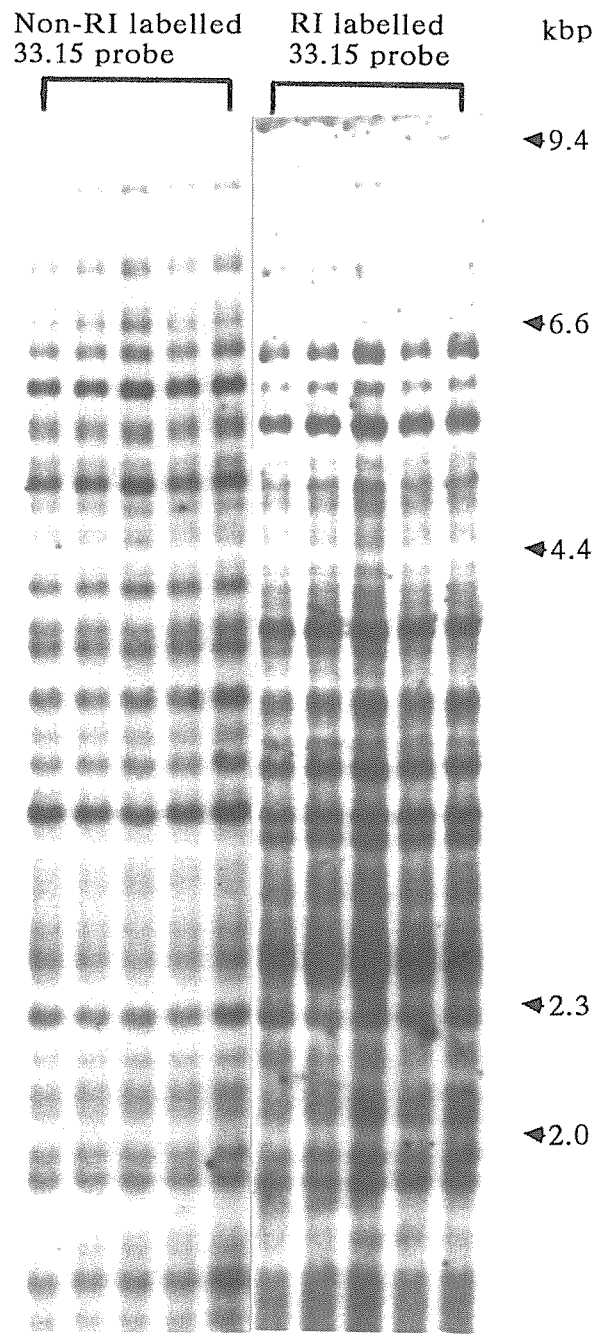


Fig. 9. DNA fingerprinting of clonal Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, hybridized with radio isotope labelled 33.15 probe and Non-RI labelled 33.15 probe of the same membrane.

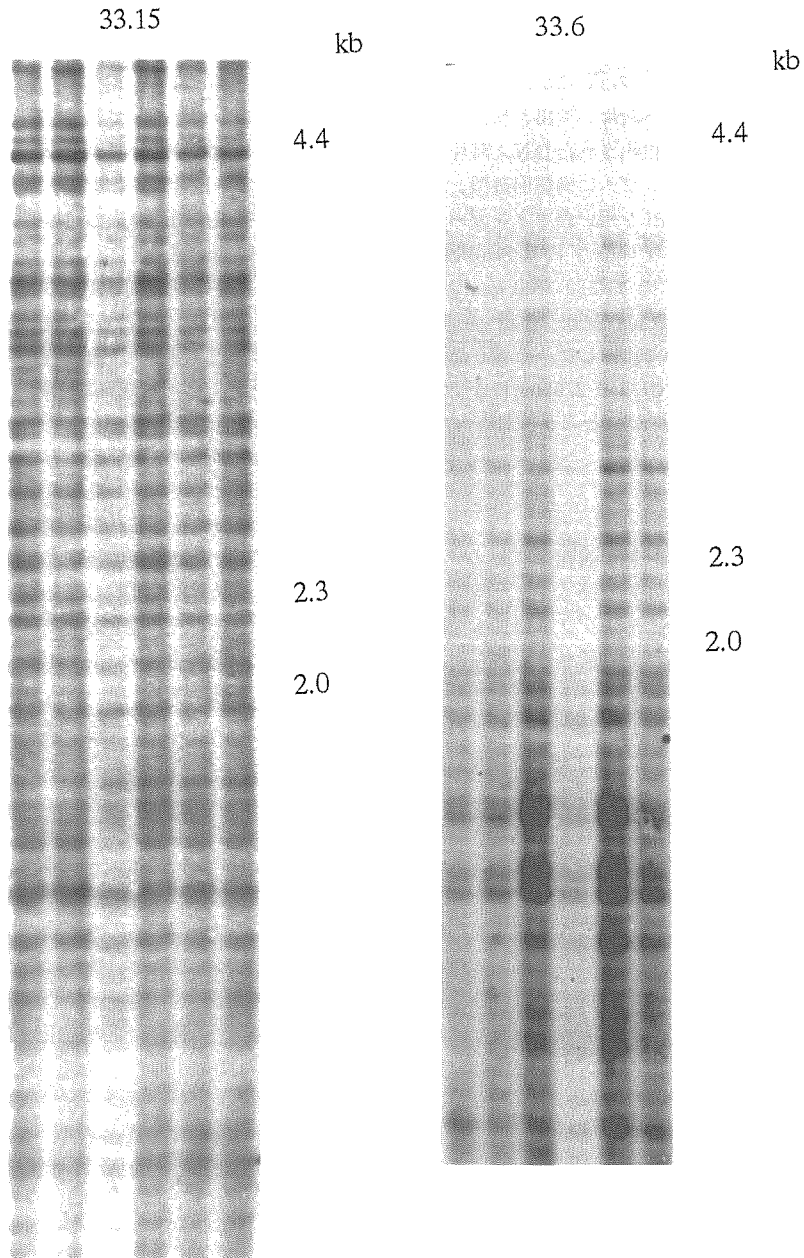


Fig. 10. DNA fingerprinting of clonal Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, hybridized with alkaline phosphatase labelled 33.15 probe and 33.6 probe of the same membrane.

ガープリント像の変化を観察した。Fig. 10はサンプルにクローン (WA1)、制限酵素にHaeIIIを用いた同一メンブランのフィンガープリントを示した。プローブにはNon-RIのNICE Probeの33.15と33.6を用いた。1.0-10.0kbpの分子量について比較したところ33.15プローブでは46本、33.6プローブで41本のDNA断片が検出され、断片数はさほど変化しなかった。また検出されたDNA断片は両方とも明瞭であった。さらにサンプルに両側回遊型、陸封型アユを用い、制限酵素にEcoRIを用いたフィンガープリント像を示した (Fig. 11)。プローブにはBeaBEST Labelling KitによってRIを標識したYNZ22 (Nakamura et al., 1987) と α -Globin (Schafer et al., 1990)を用い、1.0-23.1kbpの分子量の範囲について比較した。それぞれメンブランは異なるが、 α -Globinでは1.0-2.0kbpおよび4.4-6.6kbpの分子量の範囲では断片がほとんど検出されずプローブ特異的であった。

3. 論議

これまでDNA抽出においてその精製過程はフェノールなどの有機溶媒を用いたために有害性が高く、また時間と手間のかかる過程であった。しかしヒトゲノムDNA抽出キットを用いることにより、DNAが切断されておらず、また純度、回収量ともにフィンガープリントに適したものが得られた。魚類においてはヒトの白血球と異なり、赤血球に核が含まれているため、本法では赤血球からDNAを抽出したと考えられるが、実際にフィンガープリント像が得られたことから、今後、短時間でしかも1本のチューブで多数の個体を処理することのできるこのような簡易キットによる核DNAの抽出が有効であることが示唆された。

魚類においてDNAの抽出組織は、DNAの物理的切断が少なく純度も高いことから血液が多く用いられてきた。しかし血液であるためにサンプルを実験室まで生かして運ばなければならない、また、ただちに抽出過程を行わなければならないという制限があった。しかし、本研究において血液保存液 (Absorber sol.)を用いて一定の期間 (8日間) 保存した後、通常のDNA抽出法によってDNAが切断されておらず、また純度、回収量ともにフィンガープリントに適したDNAが得られ、実際にフィンガープリント像が得られたことから、野外におけるサンプリングや長時間の輸送において有用性の高い方法になると考えられた。さらに簡易なDNA抽出法を組み合わせることでより利便性の高いDNA抽出が可能になるであろう。5種の制限酵素 (4塩基認識:HaeIII, MspI, 5塩基認識:HinfI, 6塩基認識EcoRI,

HindIII)を用いたフィンガープリントパターンは制限酵素特異的であった。4種の塩基によって構成されるDNAのポリヌクレオチド鎖上の各認識配列の出現頻度は理論的には4塩基認識では256 (=4⁴)塩基に1回、5塩基認識では1024 (=4⁵)塩基に1回、6塩基認識では4096 (=4⁶)塩基に1回出現する。したがって認識配列数の多い酵素は少ないものよりも全体的に断片数が少なく、またDNA断片は高分子領域に多く見られるはずである。また検出されるミニサテライト領域に制限酵素の認識部位が存在せず、その他の領域に制限部位が一様に存在するならば、それぞれ同数の認識配列数を持つ制限酵素においては似たパターンを持つフィンガープリントになると考えられる。33.15プローブについて4塩基認識のHaeIII, MspI, 6塩基認識のEcoRI, HindIIIにおいては同じ認識塩基数を持つ制限酵素では同様の断片パターンを示すフィンガープリントパターンが得られ、6塩基認識の制限酵素の方が4塩基認識の酵素よりも高分子領域に断片が多く見られた。これは上記の理由によるもののほかに6塩基認識の制限酵素ではその認識部位がミニサテライト領域の前後に存在する割合が低く複数のミニサテライトを含んでいることも考えられる。また、33.6プローブにおいても4塩基認識のHaeIII, MspI, 5塩基認識のHinfI, 6塩基認識のHindIIIについて同様の傾向が見られた。どの制限酵素を用いてもDNA断片は検出されたが、断片数が多い、断片やバックグラウンドがスミアになっていない、断片が散在するため分析が容易であることからHaeIII, MspI, HinfIがアユのフィンガープリントについて適していると考えられた。

DNAフィンガープリントにおける電気泳動において主として問題となるのは電圧とアガロースゲル濃度である。電圧が高いほどDNA断片の移動度が高くなり、ゲル濃度が薄いほどDNA断片の移動度は高くなる。また緩衝液の温度が高い場合にも移動度が高くなる。電圧については小さなDNA断片の場合、高い電圧で電気泳動を行った方が、シャープな泳動像が得られるが、大きなDNA断片の場合テーリングが生じやすい。一方ゲル濃度と分離に適したDNAの塩基対数には関係があり、ゲル濃度が0.7%において10-0.8kbp, 1.0%において7-0.5kbp, 1.2%において6-0.4kbpのDNA断片の分画に適しているとされている。1)の結果においてレーンが歪みテーリングが生じたのは、DNA断片の大きさに対して電圧が強すぎたものと考えられる。2)においてもテーリングが生じたのは、ゲル濃度が低いため分子ふるいの効果が弱いことによると考えられる。3)において明瞭な断片が検出されたことより1.2%のゲル

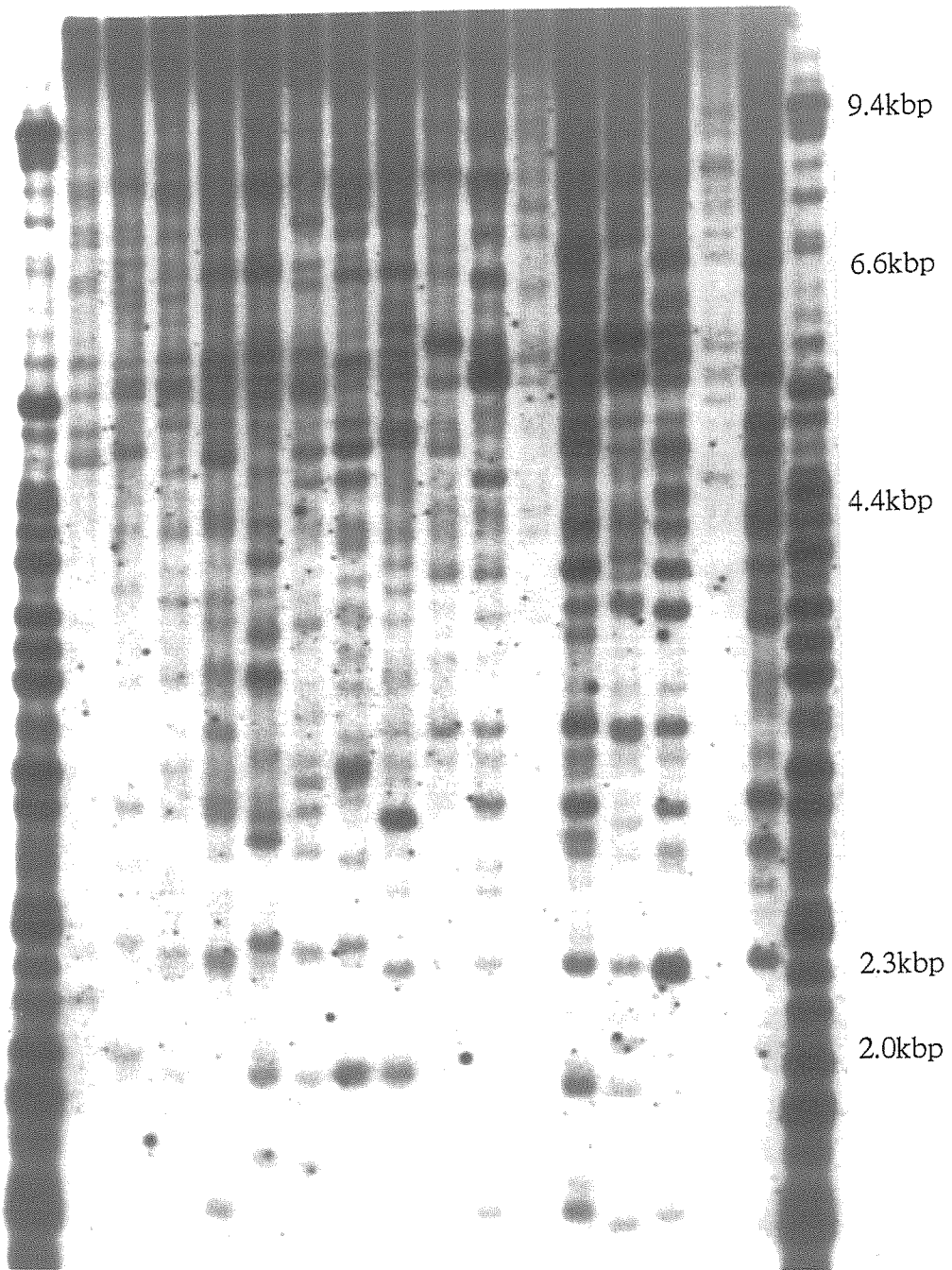


Fig.11-1. DNA fingerprinting of Ayu. Genomic DNA, which was digested by *EcoRI*, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe.

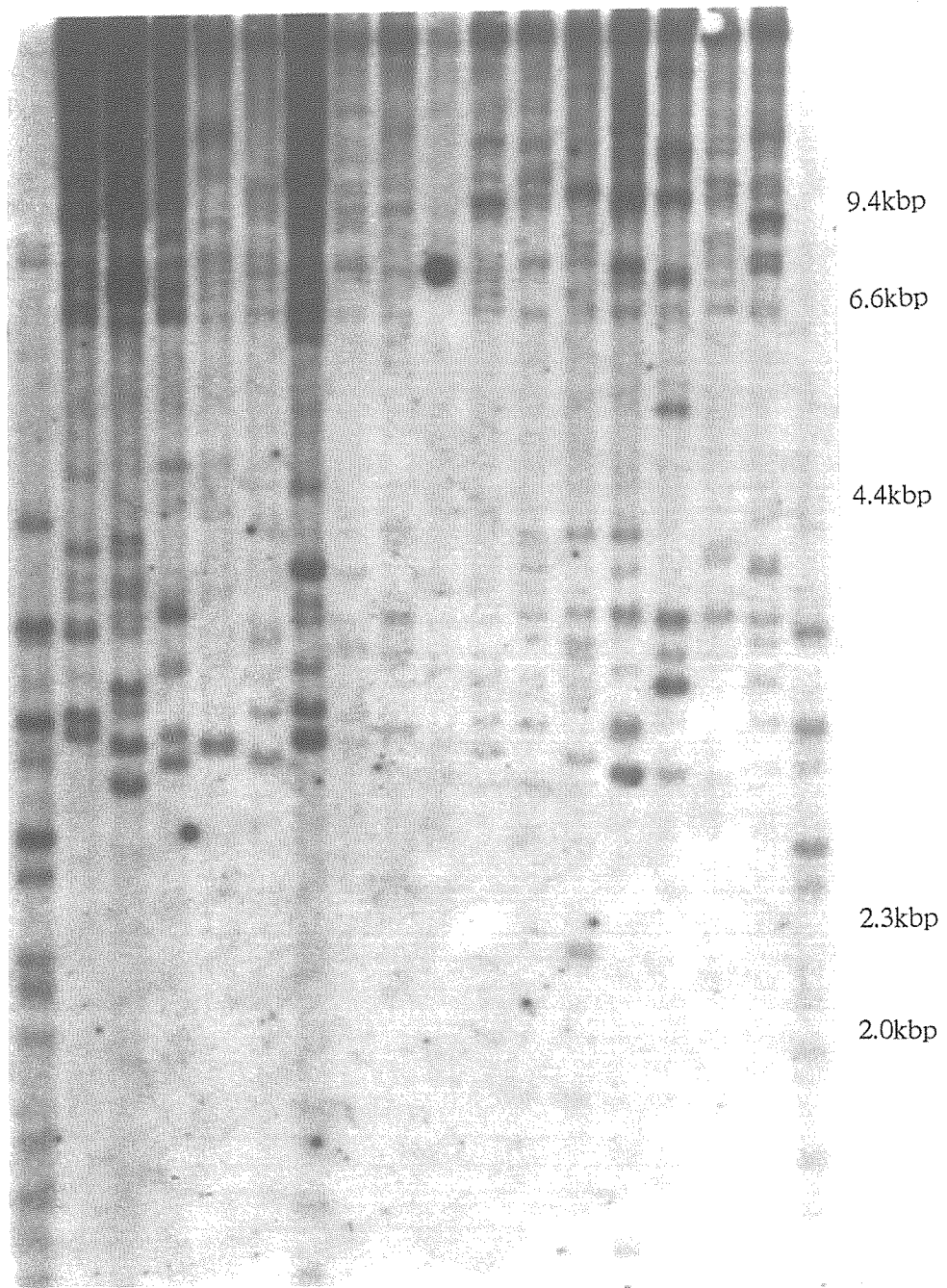


Fig. 11-2. DNA fingerprinting of Ayu. Genomic DNA, which was digested by *EcoR* I, hybridized with radio isotope labelled α - globin probe.

濃度において60Vの定電圧(1.5V/cm)で65時間程度の泳動条件が適当であると考えられた。

M13プローブのRI標識(クレノウフラグメントによる標識法)とNonRI標識(ECL)におけるフィンガープリントの比較においてNon-RIのECLによる標識の方が断片数が多い傾向がみられ、同時に検出断片が明瞭であることから解析が容易であり、情報量が多くRIを用いないため安全であるという面でNon-RIのECLによる標識の方が優れていると考えられた。しかし操作が煩雑であり、感度が低いという短所もみられた。33.15プローブのRI標識(BeaBEST)とNonRI標識(NICE Probe)におけるフィンガープリントの比較においては両標識法とも断片数はほとんどかわらなかった。多少とも変化したのはメンブレンの洗いの条件によるものと考えられる。また検出された断片は両方とも明瞭であった。しかしながらNICE Probeにおいては感度が低い場合もみられた。以上RI標識2法、Non-RI標識2法を比較したところ、RI標識の(BeaBEST)とNonRI標識の(NICE Probe)が優れていると考えられた。実際にハイブリダーゼーションプローブとしてこれらの標識法を用いる場合にはフィンガープリントを用いる研究施設の諸事情にあわせた選択(RI標識のBeaBESTは安価で検出感度が強い、NonRI標識のNICE Probeは多少高価であるが、特別な施設、管理、技術を必要とせず、環境や人体の汚染の心配がなく、長期間安定である)を行うことが必要であると考えられる。

異なったプローブ33.15と33.6においては断片数に変化がみられなかった。しかしYNZ22と α -Globinにおいては1.0-2.0kbpおよび4.4-6.6kbpの分子量の範囲では断片がほとんど検出されずプローブ特異的であった。これは制限酵素によって切断されたDNA断片のプローブに対する特異性によるものと考えられるため、今後様々な制限酵素とプローブの組み合わせを試し、魚種ごとに相補性が高い組み合わせを選択することが必要であると考えられた。

以上のことから本研究においてアユのDNAフィンガープリントの検出条件を検討し、血液保存液(Absorber sol.)により一定期間血液を保存した後、ヒトゲノムDNA抽出キットによって容易にDNAを抽出することが可能であると考えられた。また制限酵素にはHaeIII、MspI、HinfI、泳動条件は1.2%のゲル濃度において60Vの定電圧(1.5V/cm)で65時間程度、用いるプローブにおいてはRIによる標識では(BeaBEST)による方法が、NonRI法においては(NICE Probe)を用いることが適した検出条件であると考えられた。

II マイクロサテライト

マイクロサテライト法における遺伝子座の単離と多型解析の一連の分子生物学的手法の基本的な実験法は、現在のところほぼ確立されている。しかしながらそれぞれの実験過程は実験室の施設、機器等により異なるため、各研究施設において最も適した方法を採用すべきである。

そこで本章ではマイクロサテライト遺伝子座の単離におけるプラスミドDNAのシーケンシングについてマニュアルシーケンシングとシーケンサーによるオートシーケンシングによる方法について比較し、シーケンシング法の簡略化について検討した。

1. 材料および方法

1) マイクロサテライト領域の単離

本研究において採用したマイクロサテライトDNA領域の単離における一連の実験法の詳細(Brooker et al., 1994)および検討したシーケンシング法を以下に示す。

ゲノムライブラリーの作成

ゲノムライブラリーを作成しようとする研究対象魚種5個体より抽出、精製したそれぞれ10 μ gずつのゲノムDNA 50 μ gをひとつのマイクロチューブに集め、平滑末端に切断する制限酵素3種(Rsa I, Hinc II, Hae III)をそれぞれ十分量加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし、ゲノムDNAの切断片を得た。切断したDNA消化液を1%アガロース電気泳動により分画し、必要な断片長をもつDNA断片をゲルより回収した。なお、ゲルからのDNA断片の回収は以下の方法で行なった。

ゲノムマーカーの泳動されている部分をゲルより切り取り、エチジウムブロマイド染色する。マニュアルシーケンシングによりマイクロサテライト領域の塩基配列を決定する場合は300-700bpの範囲を切り出し、オートシーケンシングを行なう場合は300bp以上のシーケンシングを切り出した。切り出したゲルはメス等を用いて粉碎した。バランスをとるため50ml容量程度の遠沈管2本に等量に粉碎したゲルを分け入れ、-80 $^{\circ}$ Cで1時間以上静置した。ゲルが凍ったままの遠沈管に中性フェノールをゲル容量の3倍程度加え、10分程度ボルテックスした。もう1本の遠沈管についても同様の操作を行ない、それぞれに3滴程度のクロロフォルムを加え、12000rpm, 15min. 遠心分離した。上清を別の遠沈管に移し、

クロロフォルムを7ml程度加え、軽く混合後、12000rpm, 10min. 遠心した。2つのチューブから上清を一つの遠沈管に移し、NaClを0.2Mの濃度になるように加え、グリコーゲンは1mlあたり20ug加え、軽く混合した後、-80℃で1時間静置した。静置後、18000rpm 30min. 遠心し、上層液を取り除いた。下層液に適当量のTEを加え、振りかき混ぜ、1.5mlのチューブに1本あたり500 μ l移した。0.2MになるようにNaClを加え、さらに2倍量のエタノールを加え、-80℃で凍結させた。凍ったままの状態では14000rpm 15min. 遠心し、適当な長さのDNA断片をエタノール沈澱させた。沈澱をとらないように、上清を捨て乾燥後、TEを20 μ l加え4℃でDNAを溶解保存し、これをゲノムライブラリーとした。なお、必要とする長さのDNA断片が回収されているかどうかアガロース電気泳動により確認した。

ライゲーションおよびトランスフォーメーション

本研究において平滑末端に切断する制限酵素を用いたため、連結するクローニングベクターとして平滑末端切断酵素Sma Iですでに消化済みの直鎖状のpUC18を用いた。ライゲーションはクローニングベクターとDNA断片とをT4 DNAリガーゼにより室温で6時間から一晩反応させることにより連結させた。

トランスフォーメーションの宿主はDH5 α 遺伝子型をもつ大腸菌セルを用い、コンピテント・セル法により行なった。ライゲーション産物をコンピテント・セルとチューブ内で混合し、水中に30分間静置した。静置後、42℃の湯中に45秒間さらし、ヒートショックを与えた後、水中に戻し、形質転換させた。なお、プレート培養において最適なコロニー分布密度を得るため、トランスフォーメーションに用いるライゲーション産物の量はいくつかの段階を設けた。

形質転換菌の培養

形質転換菌の培養は以下の方法で行なった。形質転換菌にLB brothを加え、37℃で1時間攪拌した。アンピシリン添加LB培地にスプレッターで形質転換菌を塗り広げ、1時間程度静置した後、倒置して37℃でコロニーが十分に成長するまで培養した。なお、プレートにおける最適なコロニー分布密度を得るため、塗り広げる形質転換菌の量はいくつかの段階を設け実験を行ない、コロニーがプロット後にプレートに残る程度の大きさを持ち、大きさが平均していること、隣接するコロニーが互いに離れているという条件を満たしたプレートを選択した。

陽性クローンの検出および培養

陽性クローンは以下のプロットティング、ハイブリダイゼーション、ウオッシングの行程で検出した。プロットティングはプレートにメンブランをかぶせ、プレートとメンブランが対応するように穴を開けるなど印をつけ、3分間静置することにより行なった。プロットティング後のDNAの変性は以下の方法で行なった。アルカリ変性液0.5M NaOH、1.5M NaClを湿潤させたろ紙にコロニー面を上にして7分間メンブランを静置し、DNAを変性させた。メンブランを中和液1.5M NaCl、0.5M Trisを湿潤させたろ紙にコロニー面を上にして3分間静置し、同様の処理を再度行ない、DNAを中和した。最後に6 \times SSCでメンブランをリンスすることにより塩濃度を調整し、メンブランが乾くまで空気乾燥した。乾燥させたメンブランは80℃で2時間ベーキングし、DNAをメンブランに固着させた。

ハイブリダイゼーションプローブには(GT)₁₅のオリゴヌクレオチドをT4ポリヌクレオチドキナーゼにより γ ³²P dATP 標識したものをを用いた。ハイブリダイゼーションはベーキング後のメンブラン上の残さを0.2% SDS、2 \times SSC 溶液中でおとし、5 \times SSPE、5 \times Denhardt's、0.5% SDS、100 μ g/ml RNAをハイブリダイゼーション溶液として標識プローブをくわえ、60℃で一晩行なった。

ウオッシングは2 \times SSC、0.2% SDSを用い、室温で15分2回、洗浄後、SSC濃度および洗浄温度をあげるなどして洗浄条件を上げて適正なRI強度に減少するまで行なった。メンブランはカセットにいれ、X線フィルムと適当な時間感光させた後、現像しポジティブクローンを検出した。

陽性クローンの培養はX線フィルム上の陽性クローンを示す黒点とプレート上のコロニーを照らし合わせ、陽性のコロニーを拾い、アンピシリン添加LB Brothで37℃で24-36時間攪拌して行なった。

シークエンス (マニュアル法)

マニュアルシークエンス法による陽性クローンの塩基配列の決定を行なうためのテンプレートDNAの抽出は以下の方法で行なった。LB Broth培養液を遠心分離し、上清を除いた。そこに50mM Tris HCl, pH8.0、4% Triton X-100、2.5M LiCl、62.5mM EDTA溶液を加えよく混合し、大腸菌を溶解しプラスミドDNAを抽出した。さらにフェノールクロロフォルムを加え混合、遠心分離し、プラスミドDNAを精製した。境界面をとらないようにして上清を移し、エタノール沈澱を行なった。沈澱したDNAは空気乾燥させた後、TEに溶解した。さらに2N NaOHを加え2本

鎖DNAの変性を行なった。変性したDNAサンプルはエタノール沈澱、乾燥を行ない、シークエンスを行なうまで5 μ lの純水に溶解して冷蔵保存した。

シークエンス反応はファルマシア社製のT7 Sequencing kitを用い、方法はキットのプロトコルを改変して行なった。サンプルDNAに1 μ lのAnnealing Bufferを加え、さらにUniversal Primerを加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、プライマーとアニーリングさせた。ここに、1サンプルあたり1.5 μ lのLabelling Mix-dATP、0.5 μ lの純水、0.5 μ lの37MBqの 35 S dATP、0.15 μ lのT7 DNA polymerase および0.85 μ lのEnzyme dilution Bufferを加え、混合してこれをサンプルチューブとした。A Mix-Short, C Mix-Short, G Mix-Short, T Mix-Shortのそれぞれが1.25 μ l入った各チューブにサンプルチューブからサンプル溶液を2.25 μ lずつ分注・混合させ、37 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートし、シークエンス伸長反応を行なった。伸長反応の終了したサンプルに5 μ lのStop Solutionを加え電気泳動を行なうまで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

電気泳動は8%変性ポリアクリルアミドゲルを用いて行なった。本泳動の前に75mA定電流のプレランニングを50分行なった。本泳動を行なう前に各シークエンスサンプルを90 $^{\circ}$ C 3分間熱処理し、1本鎖にした。サンプルはA, C, G, Tそれぞれ2.5 μ lずつアプライし、60mAで2時間程度泳動した。

泳動後のゲルは10%酢酸、10%メチルアルコール溶液で1時間程度固定し、ろ紙に移した後、ゲルドライヤーで乾燥した。乾燥したゲルはX線フィルムと露光させた後、現像してシークエンス泳動像を得た。

シークエンス (オート)

オートシークエンスに用いたシークエンスはアプライドバイオシステム社製の373A DNA Sequencing Systemを用い、電気泳動およびデータ収集はオペレーションマニュアルによった。

オートシークエンスを行なうためのテンプレートの抽出は村松ら(1988)の方法を改変して行なった。LB Broth 培養液を遠心分離し、上清を除いた。そこに100 μ lの50mM グルコース、25mM Tris-HCl pH 8.0、10mM EDTA 溶液を加えよく混合し、5分間静置後、200 μ lの0.2N NaOH、1%SDSを加え混合し水中に5分間静置した。さらに、150 μ lの3M酢酸カリウム、11.5%酢酸を加えよく混合し、水中に5分間静置、遠心後、上清を別のマイクロチューブに移した。400 μ lのフェノールクロロフォルムを

加え混合、遠心分離し、プラスミドDNAを精製した。境界面をとらないようにして上清を移し、エタノール沈澱を行なった。沈澱したDNAは空気乾燥させた後、TEに溶解した。さらに100分の1容の1mg/ml RNase A (DNase free)を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間消化した。30 μ lの20%ポリエチレングリコール-2.5M NaCl溶液を加え、0 $^{\circ}$ Cで1時間静置した後、12000rpm、10分間遠心した。沈澱は70%エタノールで軽くすすいだ後、乾燥させ50 μ lのTEに溶解し、シークエンスを行なうまで冷蔵保存した。

シークエンス反応はパーキンエルマー社製のABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kitを用い、方法はキットのプロトコルを改変して行なった。シークエンスには500ngの2本鎖DNAを用い、フォワードまたはリバースプライマーを3.2pM、キットのTerminator Ready Reaction Mixを8 μ lマイクロチューブに加え、純水で20 μ lに調整した。シークエンスのPCRはTakara社製のPCR Thermal Cycler MPを用いて96 $^{\circ}$ C 10秒、50 $^{\circ}$ C 5秒、60 $^{\circ}$ C 4分のサイクルを25回繰り返して行なった。シークエンス産物は以下の方法のエタノール沈澱により精製した。1.5ml容のマイクロチューブにシークエンス産物を移し、2.0 μ lの酢酸ナトリウム pH 5.2および50 μ lのエタノールを加え混合し、水中に10分間静置した後、20分遠心した。沈澱を70%のエタノールで洗った後、乾燥させ、泳動に用いるまで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

電気泳動は変性ポリアクリルアミドゲルを用い、シークエンスによって行なった。本泳動の前に40W定電力のプレランニングを10分行なった。本泳動を行なう前に各サンプルをローディング用バッファーに溶解させた後、90 $^{\circ}$ C 2分間熱処理し、1本鎖にした。サンプルをアプライし、40Wで14時間泳動した。泳動後、システムよりシークエンスのデータを取り出し、プライマーの設計に用いた。

プライマーの設計

プライマーの設計は決定されたマイクロサテライトDNA領域の両端の塩基配列よりプライマー解析ソフト(OLIGOTM, National Bioscience Inc.)を用い、2種のプライマーにおいてプライマーダイマー、ヘアピンループが生じないようなPCRを阻害しない配列を選択し、プライマーとした。

2) DNA多型解析

本研究において採用したマイクロサテライトDNA多型解析法の詳細を以下に示す。

PCR

作製されたプライマーを用いてPCR多型解析を行なった。プライマー組のうち、リバースプライマーを $\gamma^{32}\text{P}$ dATPでポリヌクレオチドキナーゼを用いて標識した。PCRは10ng/ μl または25ng/ μl の各供試魚のDNA1 μl に5 μl のPCRカクテル {0.25 μM 標識リバースプライマー、各3 μM のフォワードおよびリバースプライマー、1 \times バッファー (10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1mM MgCl_2 , 50mM KCl, 0.001% gelatin)、各1.75 μM dNTP} を加え、ミネラルオイルを重層して行った。PCRの温度条件は94 $^{\circ}\text{C}$ で1分、各プライマーに最適アニーリング温度で30秒、72 $^{\circ}\text{C}$ で30秒のサイクルを7回行った後、90 $^{\circ}\text{C}$ で30秒、アニーリング温度30秒、72 $^{\circ}\text{C}$ で30秒のサイクルを33回行った。

電気泳動

電気泳動は変性ポリアクリルアミドゲルを用いて行なった。本泳動の前に75mA定電流のプレランニングを50分行った。本泳動を行なう前に各サンプルを90 $^{\circ}\text{C}$ 3分間熱処理し、1本鎖にした。サンプルを3 μl 程度アプライし、75mAで2時間程度泳動した。なお、対立遺伝子の異同度の判定のためにマニュアルシーケンス法により標識したシングルストランドのM13mp18 DNAのシーケンスリーダーを同時に電気泳動し、分子量マーカーとした。

泳動後のゲルは10%酢酸、10%メチルアルコール溶液で1時間程度固定し、ろ紙に移した後、ゲルドライヤーで乾燥した。乾燥したゲルはX線フィルムと露光させた後、現像しシーケンス泳動像を得た。

2. 結果および論議

マニュアルシーケンスおよびオートシーケンスによって検出されたシーケンス電気泳動像を Fig. 12 に示す。マニュアルシーケンスは泳動像におけるA、C、G、Tのバンドの現れる順番で塩基配列が決定され、オートシーケンスは順番に現れる色の違いで現される4種類のピークによって塩基配列が決定され、両方法とも明瞭に塩基配列を決定することができた。

マニュアルシーケンスおよびオートシーケンス法の実際のデータ収集における実験の利便性について差異の検出された項目を Table 3 に比較した。1回のシーケンス電気泳動において得ることができる情報量についてであるが、マニュアルシーケンスにおいて読むことができる塩基数は電気泳動槽の違いにもよるが、250bp程度と少ないのに対して、オートシーケンス法では500塩基程度と約

2倍の塩基数を解読することが可能であった。本研究においてシーケンスを行なうのはプラスミドの切断末端と挿入断片の接続部からであり、いかにすれば既知のプラスミドの末端部の塩基配列をプライマーつまり始点としてシーケンス反応を行ない、マイクロサテライト配列およびそれをささむ部分の塩基配列を解読するのである。その中で、特に必要となるのはマイクロサテライト領域を増幅させるプライマー組を設計するためのマイクロサテライトをささむ領域である。このプライマー組の配列を設計するのはシーケンス解析ソフトによるのであるが、同種のプライマーが互いに結び付いたり、一つのプライマーの末端部が結び付いたり、また、プライマー組が互いに結び付きやすい配列のときにはPCRを行なっても明瞭な増幅断片を得られない。実際のところマイクロサテライト領域のすぐ両端にプライマーを設計するのに適当な配列が存在する可能性は低く、適当なプライマー配列を見つけるのにマイクロサテライト領域を中心として、1塩基づつ、より外側の配列の配列を探ることになり、結果として200-250bp程度の塩基数になるのが一般的である。ここで200-250bp程度というのはその後の多型解析における電気泳動で分画できるほぼ最大値であると同時に、マニュアルシーケンスにおいて検出し得る塩基数の値でもある。しかるにマニュアルシーケンスの場合、マイクロサテライト領域がプラスミドの切断末端と挿入断片の接続部から遠位に存在すれば、電気泳動の原理から上流のバンド間の間隔が狭くなり、バンドの解読が困難である。また、プライマーを探すことが可能な塩基配列数が短く、マイクロサテライト領域を増幅するのに適したプライマーの設計が困難となり、設計効率は低い。一方、オートシーケンスにおいては塩基配列の解読はシステムソフトが自動的に行ない、また、解読できる塩基配列数は500bpと長いことから遠位にプライマーが存在しても比較的プライマーの設計が容易であり、設計効率は高い。さらに、一回のシーケンスにおいて電気泳動することができるクローニングサンプルは、マニュアルシーケンスではA、C、G、T 4種の反応を異ったチューブで行い、電気泳動においてはそれぞれ隣あう4つのレーンにアプライするので横幅の長い電気泳動槽を用いても12サンプル程度であったのに対して、オートシーケンス法では4種の蛍光色素を用い、レーザー光線で混合された各塩基を検出するため、電気泳動の際には1サンプルあたり1レーンのみ必要とし、最大36サンプルのシーケンスが可能であり、マニュアルシーケンス3回分の手間および時間を短縮することができた。

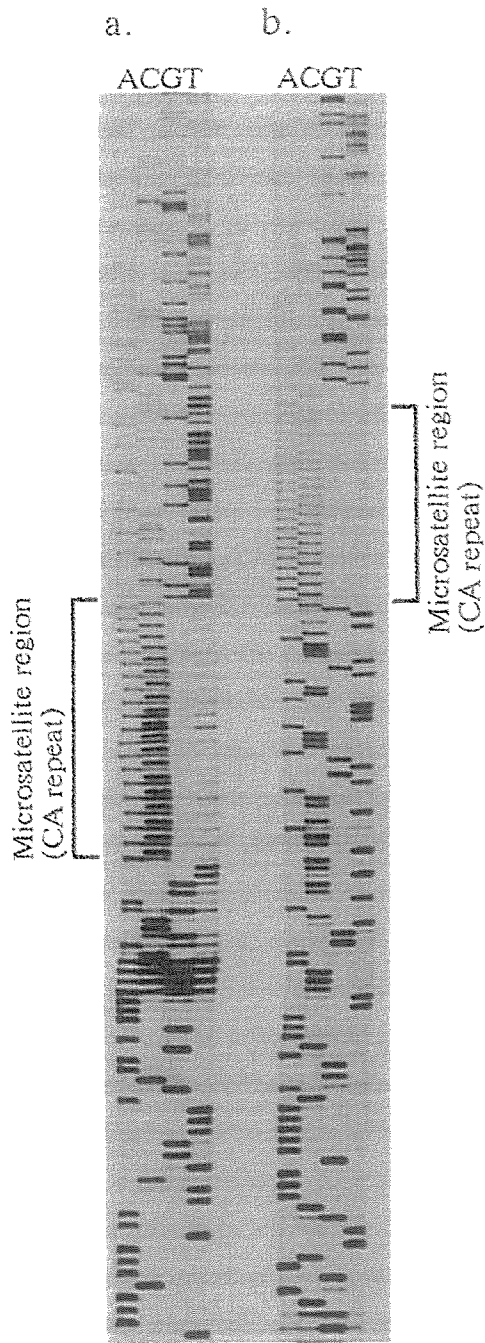


Fig.12- 1 . Example of sequence laddar in microsatellite loci with manual DNA sequence method.

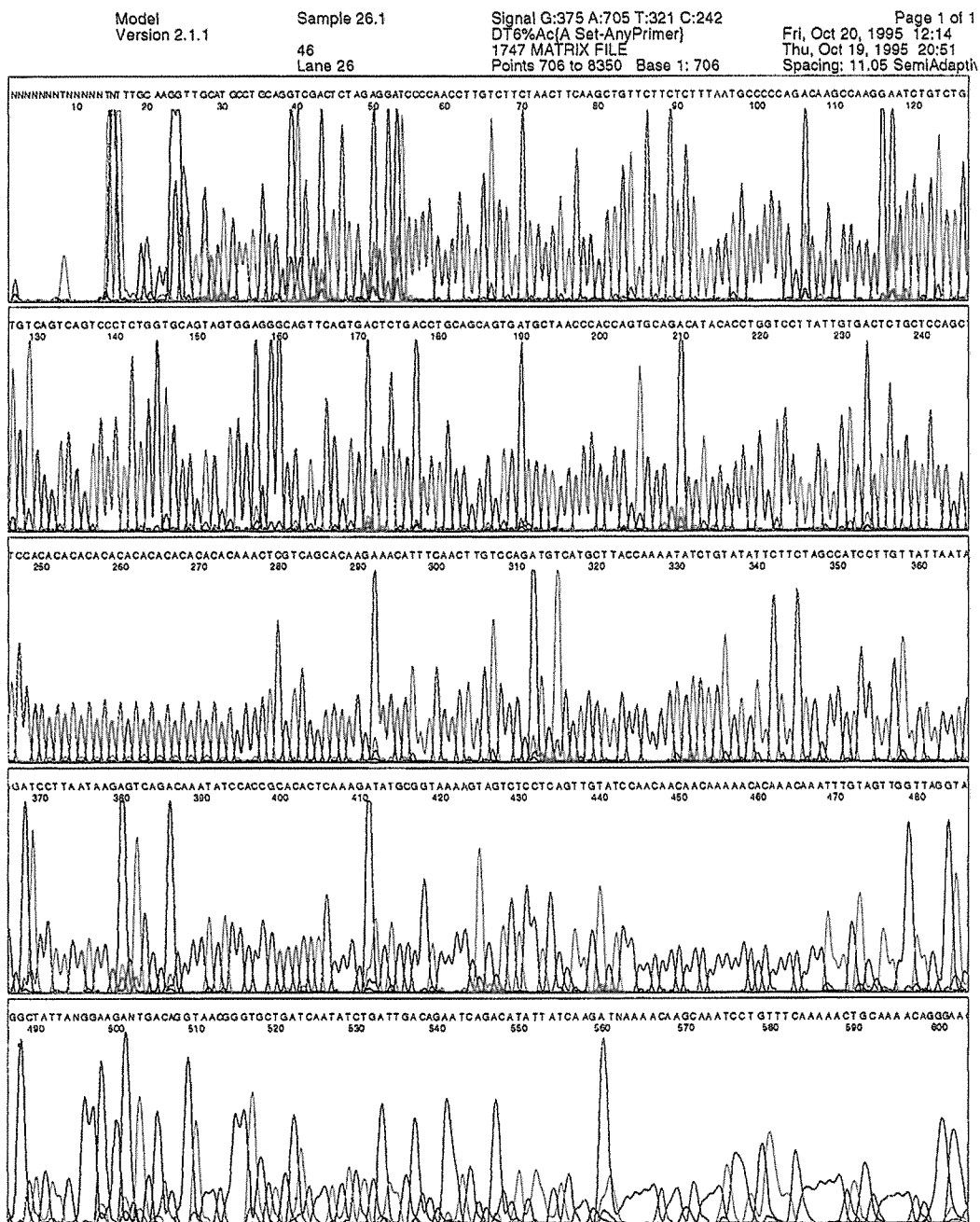


Fig. 12- 2. Example of sequence in microsatellite loci with auto DNA sequence method.

Table 3. Comparison of auto sequencing method with manual sequencing

	Manual sequencing	Auto Sequencing
Applicable sequencing number in one electrophoretic run	Short (about 250bp)	Long (about 500bp)
Applicable sample number in one electrophoretic run	Small (12 clones)	Large (36 clones)
Purity of sample DNA	Enough of rapid method	Necessary
Purity of PAG	Not necessary	Necessary
Time needed	(2 days)	(2 days)
Hazardness	Use of radio isotope	Safety
Running cost	Low 1/2 of auto sequencing	High 2 times of manual sequencing
Facilities	Need of radio isotope room	Need of auto sequencer

実際の各実験行程における利便性はプラスミドDNAの抽出およびポリアクリルアミドゲルの作成において、オートシーケンシングではこれらの行程の良し悪しが、実験結果を左右するため、マニュアルシーケンシングのそれと比較してDNAの抽出においては実験行程が煩雑となり、ゲル作成に関しては丁寧さが要求された。しかしながら、オートシーケンシングにおいて電気泳動からその後の塩基配列のデータ解析は全て自動であり、シーケンシング実験における熟練度も必要としなかった。

一方、実験の安全性、施設、機材および費用についてであるが、マニュアルシーケンシングは放射性同位元素を用いるため、危険がともなうとともに放射性同位元素実験室が必要となるが、オートシーケンシングはRIを必要とせず、安全性が極めて高く、特別な施設、管理を必要としなかった。しかしながら、シーケンサー本体の価格が極めて高いことが大きな難点である。また、実験にかかる費用であ

るが、オートシーケンシングにかかる試薬類はマニュアルによるもののおよそ2倍であった。

オートシーケンサーは1つの研究室で購入するには難があるが、日本においては理科系大学の多くに設置されていると考えられる。従って、実験にかかる費用はマニュアルシーケンシングにかかるそれと比較して約2倍ほどかかるが、解読できる塩基配列の情報量が多いためプライマー設計の効率が高いこと、一度にマニュアルシーケンシングの3倍のサンプルを解析でき、時間の短縮化を可能にしたこと、電気泳動およびデータ解析が自動化され手間が省け、熟練を必要としないこと、そして、RIを用いず安全で特別な施設・管理を必要としないことから、今後オートシーケンサーによるシーケンシングがわが国において主流になると考えられた。なお、RI施設およびシーケンサーのない実験施設においては銀染色や蛍光抗体反応を利用したNon-RIによる方法の改良、普及が必要となるであろう。

第3章 魚類集団のミニサテライトDNA多型による変異量の評価

I 天然集団の遺伝変異保有量

野生魚の集団の遺伝特性はその種のもつ歴史、つまり分化年代や地理的環境、そしてその種が獲得していった分散能力や習性といった行動特性を反映したものと考えられる。また、自然環境を変化させる人間の作用やそれに伴う自然環境からの反作用の影響などについても考慮する必要がある。アユについては、日本列島と朝鮮半島や大陸および日本列島と琉球列島との関係、琵琶湖における陸封化という地理的環境の変化による隔離、両側回遊型の生活史の特性などがからみあって現在のアユの全貌がある。実際には、大陸系アユと日本産アユ、日本の河川の地域間における遺伝的分化、両側回遊型（海産）アユと陸封型（琵琶湖産）アユにおける系統間差、さらに、アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* とその亜種であるリュウキュウアユ *Plecoglossus altivelis ryukyensis* の差異といった諸事象が問題となる。一方、近年の人工増加および社会生活の機械化や高度化により工場の建設や宅地の造成が急速に進み、その結果として河川の改修による生息地の減少、工場、家庭排水の増加による水質の汚濁、漁獲量の増大が資源量の減少を引き起こしている。なかでも絶滅危惧種であるリュウキュウアユにおいてはその傾向が著しく資源の保護が叫ばれている。また漁獲および遊魚用として琵琶湖産アユ種苗を主に各地で種苗アユの放流が盛んに行われており、遺伝的变化および劣化防止の観点からモニタリングの必要性が生じている。遺伝的劣化は遺伝変異の減少とそれにとまなう適応値の低下によることが考えられるので、ここでは、遺伝変異保有量の推定、種内集団の遺伝特性の解明をめざす。

本章ではDNAフィンガープリント法を用いて以下の項目について検討を試みた。1) 両側回遊型（海産）および陸封型（湖産）アユの遺伝的変異性の把握とその識別
2) ダム湖（野村ダム）における放流アユの遺伝的類似度の把握
3) リュウキュウアユの遺伝的変異保有量と地理的分化程度の推定

1. 材料および方法

1) 供試魚

本研究に用いた野生集団アユには高知県内水面漁業協同組合連合会で採集され養成された両側回遊型（土佐湾産）、陸封型（琵琶湖産）アユをそれぞれ22、25個体用いた。移

植集団としてはダム湖放流アユ；愛媛県野村湖において投網によって採集したアユを15個体用いた。また絶滅危惧集団としてはリュウキュウアユ；鹿児島県奄美大島の山間川（住用湾・太平洋側）と河内川（焼内湾・東シナ海側）において投網によって採集したアユをそれぞれ17、18個体用いた。なお、採集地点は Fig. 13 に示した。

2) 方法

DNAフィンガープリント

方法の詳細は第2章に従い、実験条件を下記に記した。ゲノムDNAはザルコシル、フェノール法によって抽出し、制限酵素には4塩基認識の *HaeIII*、5塩基認識の *HinfI*、6塩基認識の *EcoRI* を用いた。ハイブリダイゼーションブローブには M13ファージDNA、YNZ22、 α -Globin を用いた。

DNAフィンガープリントの評価

DNAフィンガープリントの評価は検出したフィンガープリント像より第1章のデータ解析法の項に従い、各個体間の遺伝的類似度（BSI）を求めた。また、集団内および集団間のBSIはそれぞれの平均値を求めた。

2. 結果

両側回遊型および陸封型アユ

制限酵素に4塩基認識の *HaeIII*、ブローブに YNZ 22 を用いた両側回遊型アユのDNAフィンガープリントを Fig. 14 に示す。DNA断片は1.4から9.4kbpの範囲で検出され、検出された断片数は16から19本（平均18.0本）であった。検出されたDNAフィンガープリントに基づいて求めた各個体間のBSIと両側回遊型系統内のBSIの平均を Table 4 に示す。両側回遊型アユ系統内のBSIの平均は0.253と低い値を示した。

制限酵素に5塩基認識の *HinfI*、ブローブに YNZ 22 を用いた両側回遊型アユおよび陸封型アユのDNAフィンガープリントを Fig. 15 に示す。DNA断片は1.4から9.4kbpの範囲で検出され、検出された断片数は両側回遊型で23から34本（平均28.4本）であり、陸封型で18から28本（25.3本）であった。検出されたDNAフィンガープリントに基づいて求めた各個体間のBSIと両系統内および系統間のBSIの平均を Table 5 に示す。両側回遊型アユ系統内のBSIの平均は0.265、陸封型系統内のBSIの平均は0.325であり陸封型アユの方がBSIがやや高い値を示した。また、系統間のBSIの平均は0.262と低く、両側回遊型系統内の

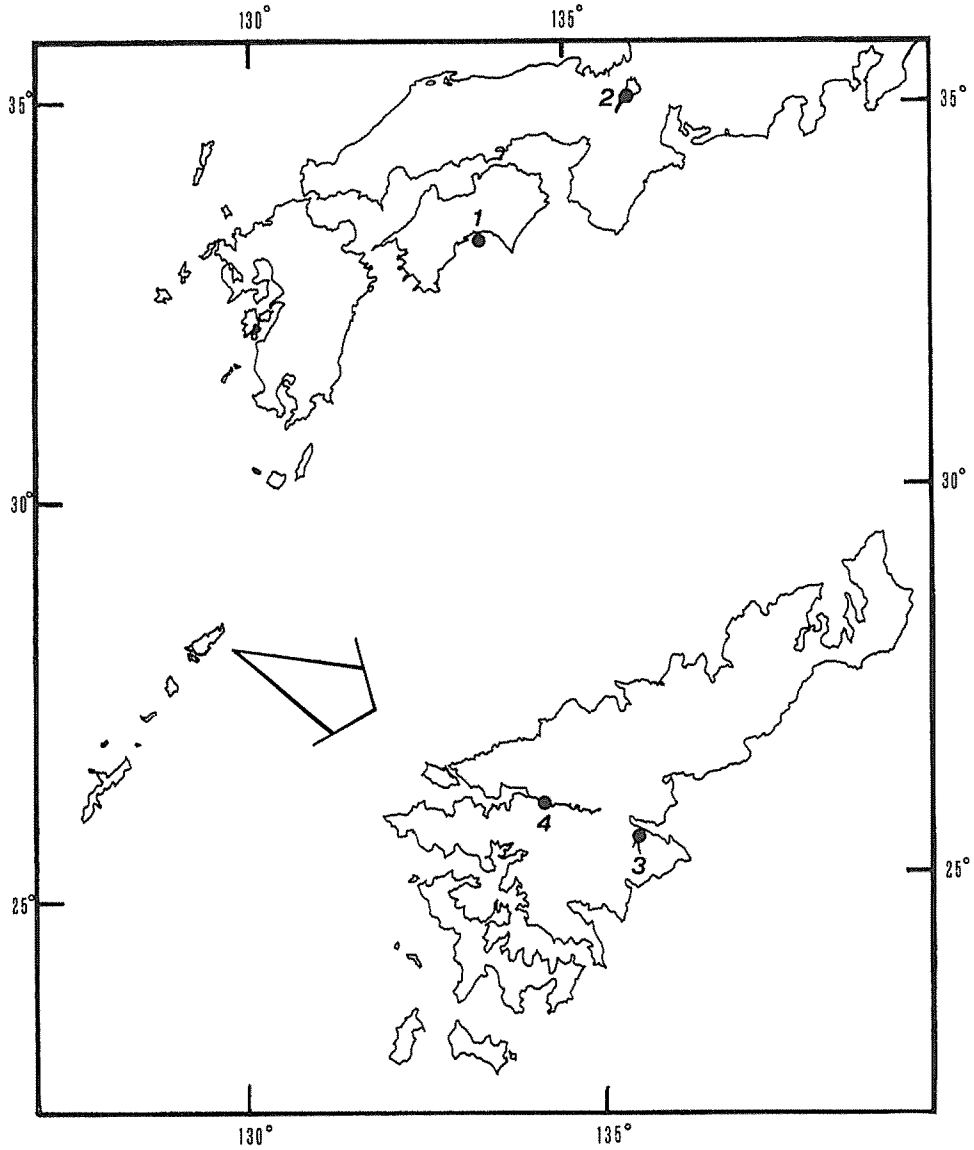


Fig. 13. Sampling locations of Ayu and Ryukyu-Ayu examined. 1: Amphidromous Ayu (Tosa Bay), 2: Landlocked Ayu (Biwa Lake), 3: Ryukyu-Ayu (Yanma Rivre), 4: Ryukyu-Ayu (Kawauchi Rivre).

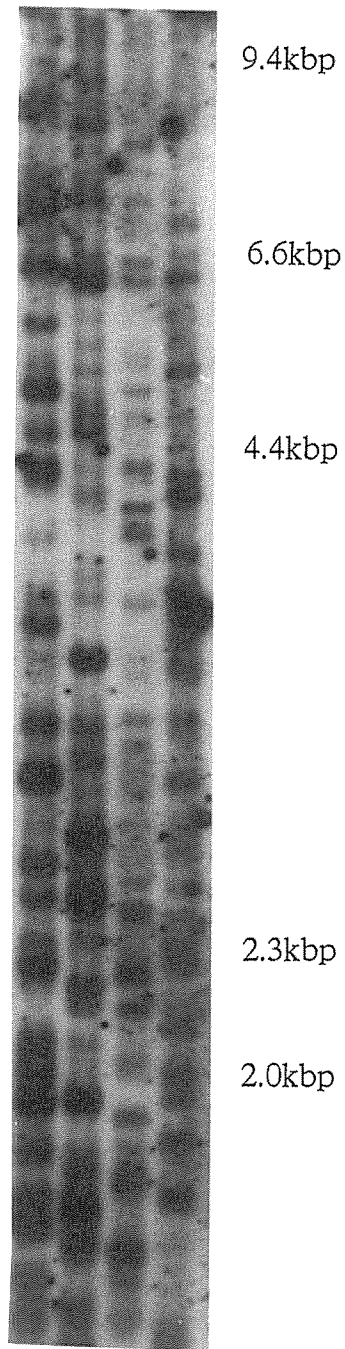


Fig. 14. DNA fingerprinting of Amphidromous Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe.

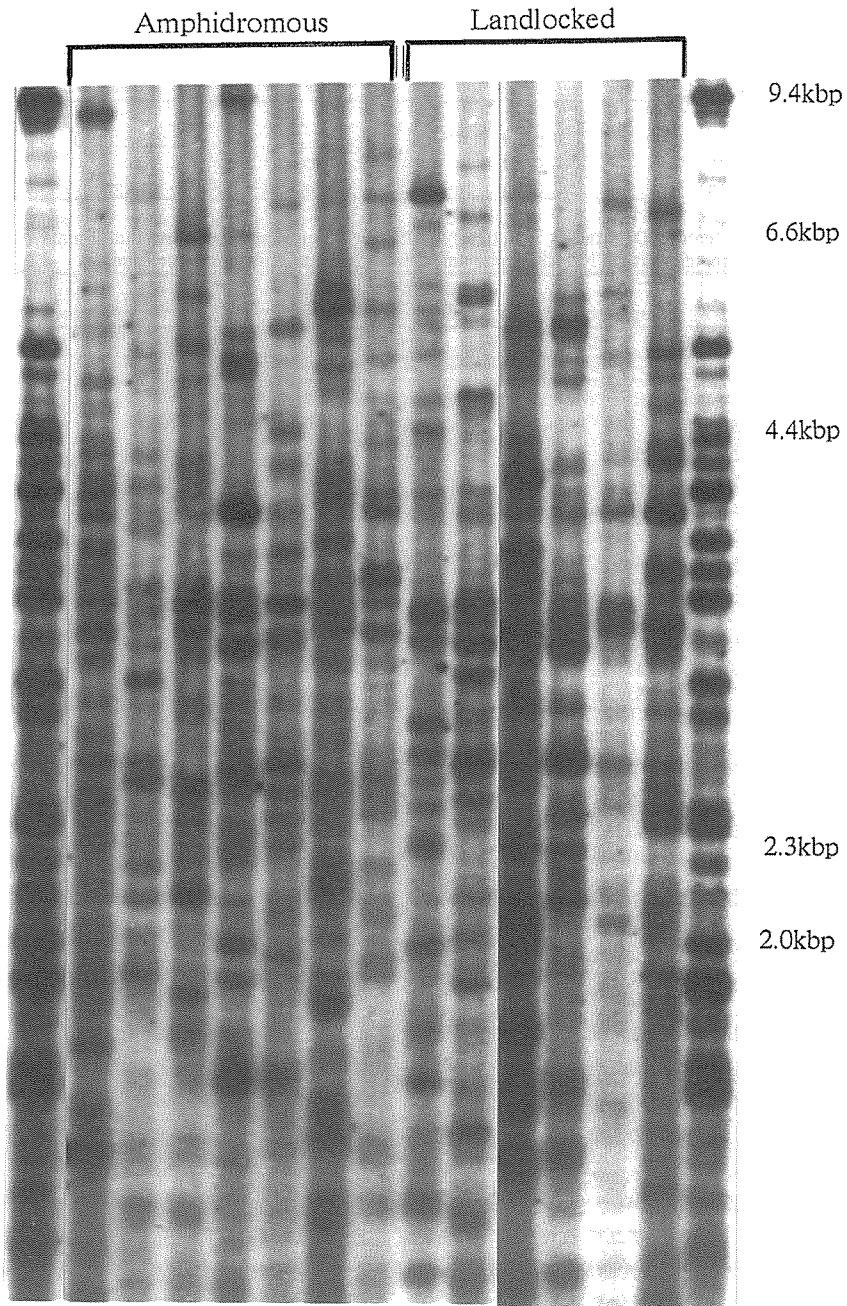


Fig. 15. DNA fingerprinting of Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hinf*I, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe. Counting from the left, lane 2-8: Amphidromous form, lane 9-14: Landlocked form, lane 1, 15: clone ayu molecular marker.

Table 4. The value of BSI (Mean \pm SD) between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with YNZ 22 probe and *Hae* III restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	Amphidromous			
		# 10	# 29	# 32	# 35
# 10	16				
# 29	19	0.262		0.253 \pm 0.063	
# 32	18	0.286	0.273		
# 35	19	0.276	0.295	0.127	

Table 5. The value of BSI (Mean \pm SD) between genetically different groups and between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with YNZ 22 probe and *Hinf* I restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	Amphidromous form							Landlocked form					
		# 20	# 21	# 24	# 25	# 29	# 34	# 35	# 9	# 10	# 18	# 20	# 21	# 27
# 20	33													
# 21	26	0.203												
# 24	34	0.448	0.300					0.265 \pm 0.078						0.262 \pm 0.085
# 25	31	0.125	0.281	0.246										
# 29	21	0.296	0.213	0.291	0.192									
# 34	30	0.413	0.286	0.313	0.262	0.157								
# 35	23	0.214	0.245	0.175	0.300	0.273	0.340							
# 9	26	0.339	0.308	0.267	0.211	0.255	0.214	0.163						
# 10	26	0.203	0.192	0.233	0.351	0.170	0.321	0.286	0.269					
# 18	27	0.400	0.378	0.295	0.207	0.250	0.105	0.360	0.264	0.264				0.325 \pm 0.096
# 20	27	0.267	0.415	0.361	0.414	0.250	0.105	0.280	0.302	0.453	0.370			
# 21	18	0.275	0.182	0.269	0.163	0.256	0.125	0.244	0.273	0.364	0.178	0.311		
# 27	28	0.393	0.259	0.323	0.102	0.327	0.310	0.196	0.370	0.333	0.291	0.255	0.578	

BSI と同レベルの値を示した。

制限酵素に6塩基認識の *Eco*R I、プローブに YNZ 22 を用いた両側回遊型アユおよび陸封型アユの DNA フィンガープリントを Fig. 16 に示す。DNA 断片は2.0から9.4kbp の範囲で検出され、検出された断片数は両側回遊型で17から25本 (平均20.6) 本であり、陸封型で18から28本 (平均24.0本) であった。検出されたDNA フィンガープリントに基づいて求めた各個体間の BSI と両系統内および系統間の BSI の平均を Table 6 に示す。両側回遊型アユ系統内の BSI の平均は0.318、陸封型系統内の BSI の平均は0.442であり、陸封型アユの方が BSI が高い値を示した。また、系統間の BSI の平均は両系統内の BSI の平均と比較して0.283とやや低い値を示した。

制限酵素に6塩基認識の *Eco*R I、プローブに α -Globin を用いた両側回遊型アユおよび陸封型アユの DNA フィンガープリントを Fig. 17 に示す。DNA 断片は2.0から9.4kbp の範囲で検出され、検出された断片数は両側回遊型で8から23本 (平均15.1本) であり、陸封型で12から13本 (平均12.6本) であり、プローブに YNZ22を用いた場合よりも両系統ともに断片数の減少がみられた。検出された

DNA フィンガープリントに基づいて求めた各個体間の BSI と両系統内および系統間の BSI の平均を Table 7 に示す。両側回遊型アユ系統内の BSI の平均は0.282、陸封型系統内の BSI の平均は0.333であり陸封型アユの方が BSI が高い値を示した。また、系統間の BSI の平均は0.268とであり、両側回遊型系同程度の値を示した。

制限酵素に4塩基認識の *Hae* III、プローブに M13 フェージDNAを用いた両側回遊型アユおよび陸封型アユのDNA フィンガープリントを Fig. 18 に示す。DNA 断片は1.0から6.6kbp の範囲で検出され、検出された断片数は両側回遊型で27から36本 (平均32.0本) であり、陸封型で29から42本 (平均33.2本) であった。検出されたDNA フィンガープリントに基づいて求めた各個体間の BSI と両系統内および系統間の BSI の平均を Table 8 に示す。両側回遊型アユ系統内の BSI の平均は0.396、陸封型系統内の BSI の平均は0.314であり、両側回遊型の方が BSI が高い値を示した。また、系統間の BSI の平均は0.338とあり、両系統内の BSI と同レベルの値を示した。

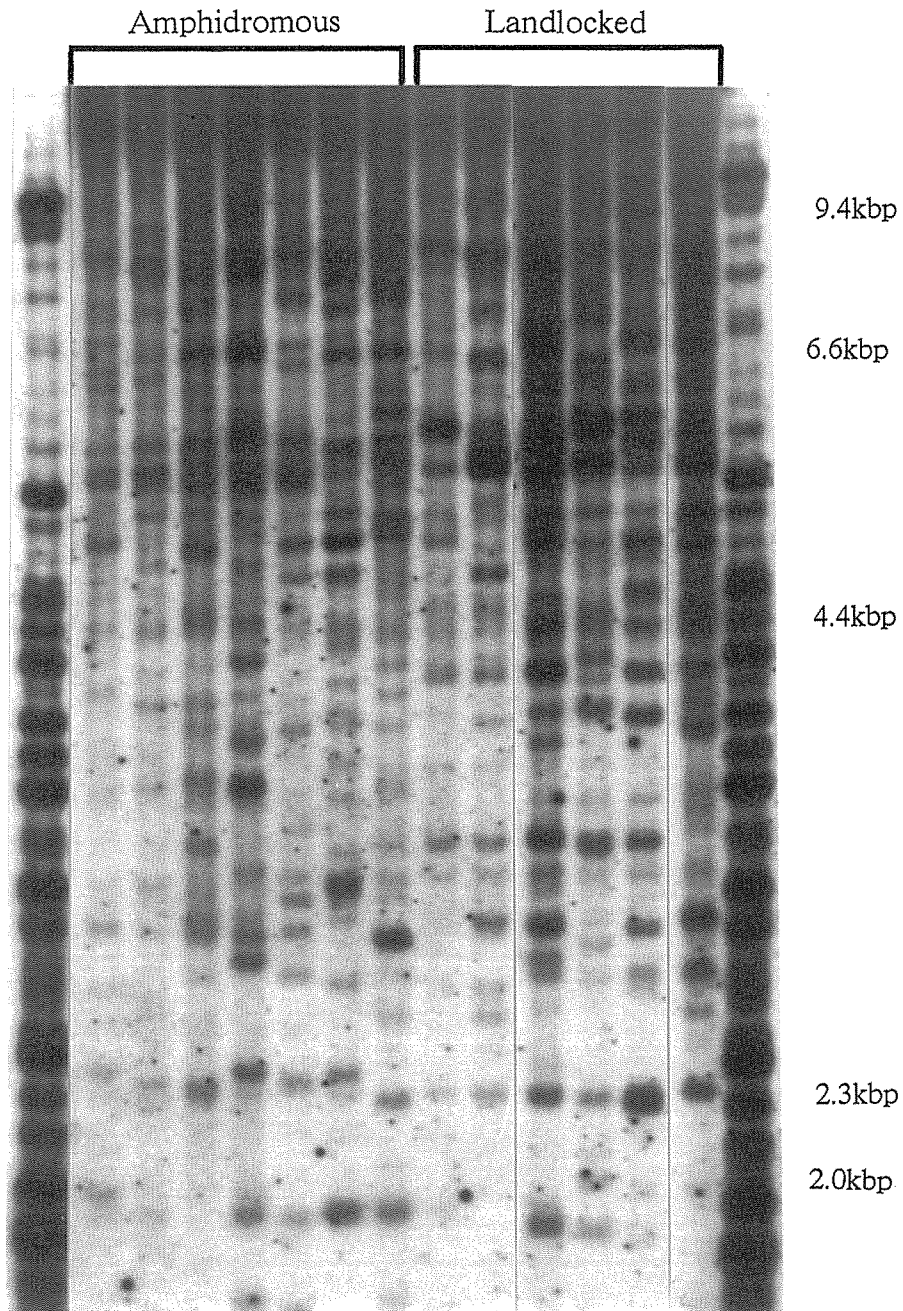


Fig. 16. DNA fingerprinting of Ayu. Genomic DNA, which was digested by *EcoRI*, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe. Counting from the left, lane 2-8: Amfidromous form, lane 9-14: Landlocked form, lane 1, 15: clone ayu as molecular marker.

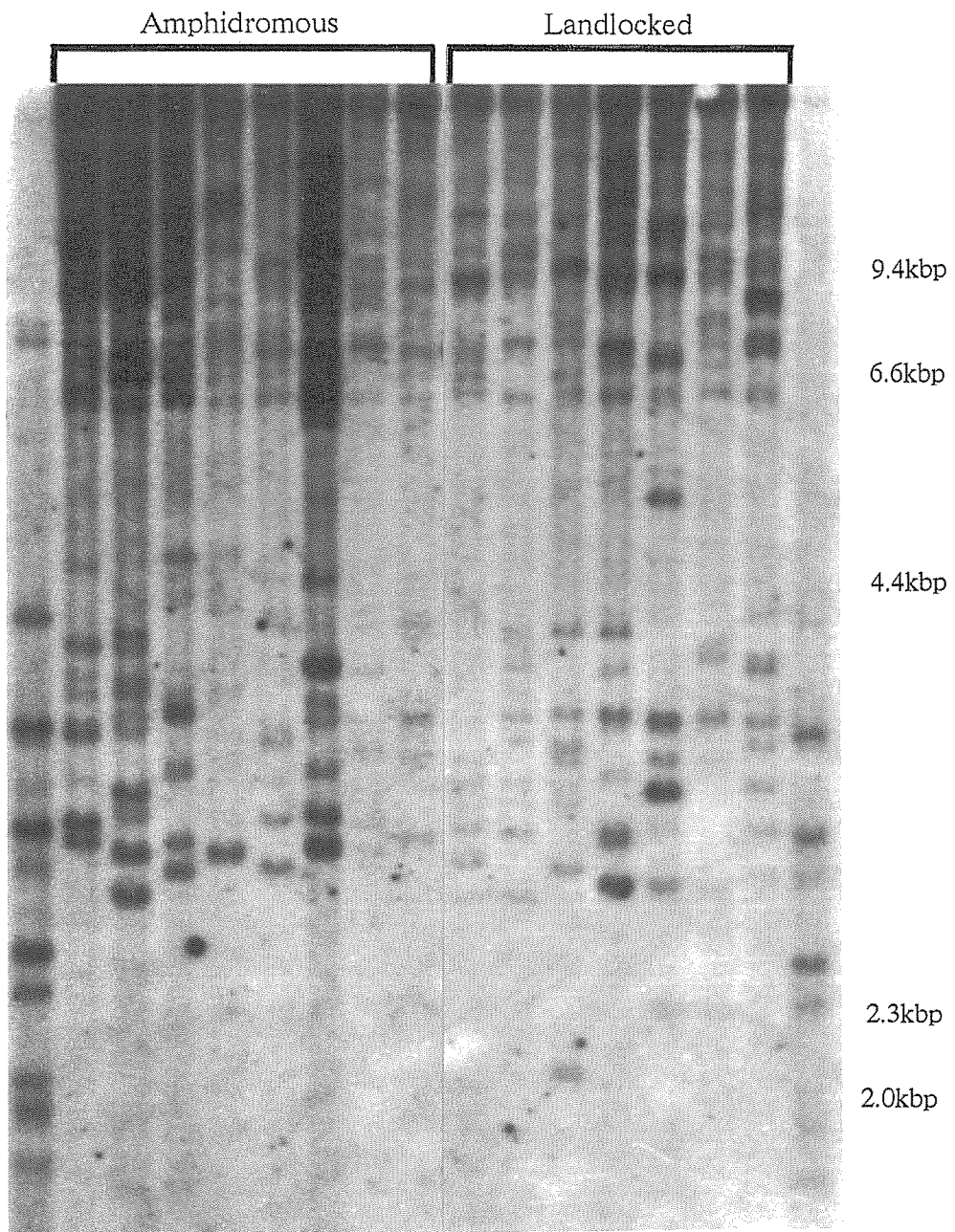


Fig.17. DNA fingerprinting of Ayu. Genomic DNA, which was digested by *EcoR* I, hybridized with radio isotope labelled α -globin probe. Counting from the left, lane 2-9: Amphidromous form, lane 10-16: Landlocked form, lane 1, 17: clone ayu as molecular marker.

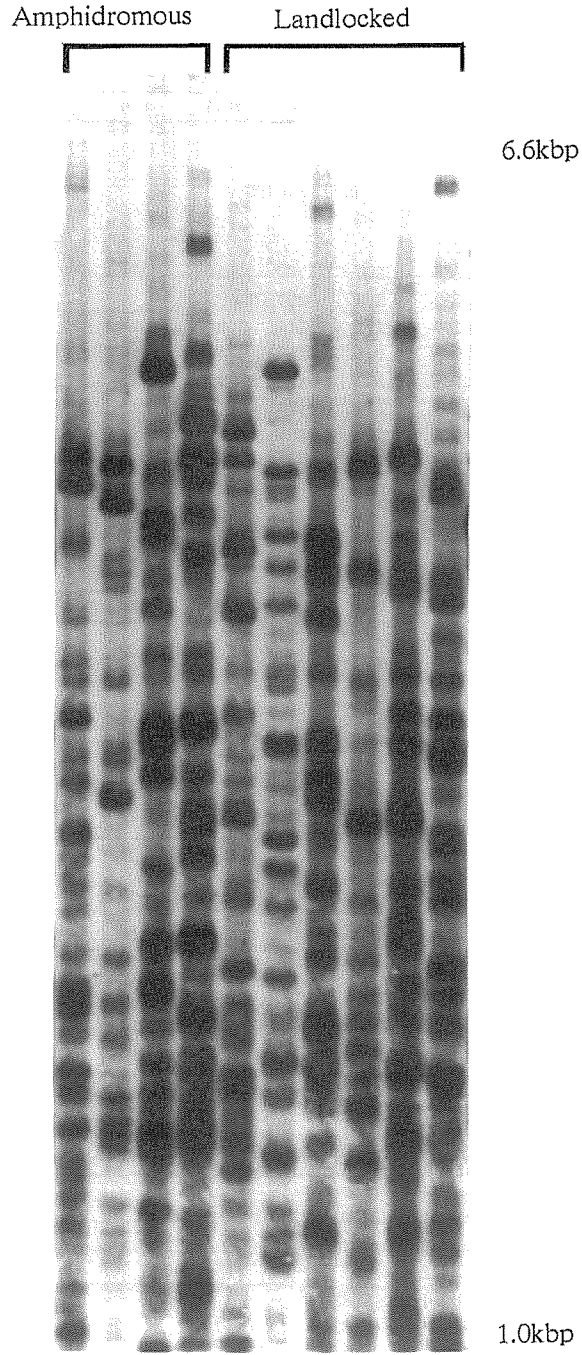


Fig. 18. DNA fingerprinting of Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, hybridized with radio isotope labelled M13 probe. Counting from the left, lane 1-4: Amfidromous form, lane 5-10: Landlocked form.

Table 6. The value of BSI(Mean±SD)between genetically different groups and between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with YNZ 22 probe and *EcoR* I restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	Amphidromous form							Landlocked form					
		# 10	# 21	# 24	# 25	# 29	# 34	# 35	# 9	# 10	# 16	# 18	# 20	# 27
# 10	17													
# 21	19	0.333												
# 24	22	0.154	0.439					0.318±0.105					0.283±0.087	
# 25	21	0.316	0.400	0.419										
# 29	17	0.471	0.222	0.103	0.211									
# 34	23	0.300	0.238	0.356	0.364	0.300								
# 35	25	0.286	0.409	0.340	0.522	0.238	0.250							
# 9	18	0.286	0.324	0.200	0.205	0.171	0.244	0.465						
# 10	24	0.390	0.326	0.217	0.089	0.244	0.255	0.245	0.286					
# 16	28	0.267	0.170	0.240	0.286	0.222	0.431	0.340	0.478	0.346			0.442±0.085	
# 18	24	0.244	0.465	0.391	0.267	0.244	0.170	0.499	0.476	0.458	0.423			
# 20	23	0.300	0.286	0.222	0.136	0.300	0.304	0.333	0.390	0.468	0.627	0.511		
# 27	27	0.227	0.304	0.367	0.250	0.273	0.360	0.385	0.444	0.353	0.545	0.392	0.440	

Table 7. The value of BSI(Mean±SD)between genetically different groups and between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with α -globin probe and *EcoR* I restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	Amphidromous form							Landlocked form							
		# 3	# 4	# 5	# 8	# 13	# 30	# 32	# 36	# 14	# 17	# 19	# 22	# 24	# 25	# 26
# 3	18															
# 4	21	0.359														
# 5	14	0.250	0.229					0.282±0.114						0.268±0.108		
# 8	12	0.267	0.485	0.154												
# 13	14	0.313	0.171	0.286	0.231											
# 30	23	0.341	0.227	0.216	0.343	0.324										
# 32	11	0.276	0.250	0.080	0.261	0.400	0.412									
# 36	8	0.308	0.138	0.182	0.200	0.364	0.194	0.632								
# 14	13	0.258	0.176	0.148	0.240	0.222	0.278	0.333	0.476							
# 17	13	0.258	0.353	0.222	0.320	0.296	0.222	0.167	0.095	0.462						
# 19	13	0.194	0.294	0.296	0.240	0.370	0.111	0.167	0.286	0.385	0.615			0.333±0.143		
# 22	12	0.200	0.121	0.462	0.083	0.308	0.343	0.348	0.300	0.400	0.320	0.160				
# 24	12	0.400	0.303	0.385	0.083	0.154	0.343	0.348	0.300	0.400	0.080	0.160	0.500			
# 25	12	0.067	0.303	0.462	0.083	0.308	0.057	0.261	0.300	0.240	0.240	0.400	0.417	0.417		
# 26	13	0.258	0.235	0.148	0.400	0.296	0.333	0.417	0.190	0.385	0.462	0.385	0.320	0.160	0.080	

Table 8. The value of BSI(Mean±SD)between genetically different groups and between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with M13 DNA probe and *Hae* III restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	Amphidromous				Landlocked								
		# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10			
# 1	33													
# 2	27	0.433				0.396±0.034								0.338±0.065
# 3	32	0.431	0.373											
# 4	36	0.377	0.349	0.412										
# 5	29	0.258	0.393	0.361	0.338									
# 6	31	0.250	0.345	0.444	0.239	0.267								0.314±0.087
# 7	36	0.319	0.444	0.382	0.333	0.215	0.299							
# 8	31	0.349	0.246	0.323	0.333	0.339	0.393	0.394						
# 9	42	0.293	0.261	0.378	0.462	0.253	0.301	0.436	0.389					
# 10	31	0.344	0.276	0.317	0.418	0.133	0.226	0.358	0.426	0.274				

野村ダム湖放流アユ

制限酵素に6塩基認識のEcoRI、プローブにYNZ22を用いた野村ダム産アユのDNAフィンガープリントをFig. 19に示す。DNA断片は1.4から6.6kbpの範囲で検出され、検出された断片数は15から21本（平均18本）であった。また、両側回遊型、陸封型アユのフィンガープリントと比較して2.3から3.0kbpの範囲でDNA断片がほとんど検出されないという特徴がみられ、フィンガープリント像は全体的に非常に似通った断片パターンを示した。検出されたDNAフィンガープリントに基づいて求めた各個体間のBSIとダム湖集団内のBSIの平均をTable 9に示す。両側回遊型アユ系統内のBSIの平均（0.318）と比較して野村ダム系統内のBSIの平均は0.586と高い値を示した。

リュウキュウアユ

制限酵素に4塩基認識のHae III、プローブにYNZ 22を用いた山間川産（住用湾）および河内川産（焼内湾）のリュウキュウアユのDNAフィンガープリントをFig. 20に示す。DNA断片は1.0から6.5kbpの範囲で検出され、検出された断片数は山間川産で28から39本（平均35.4本）であり、河内川産では24から35本（平均28.7本）であった。検出されたDNAフィンガープリントに基づいて求めた各個体間のBSIと両集団内および集団間のBSIの平均をTable 10に示す。山間川集団内のBSIの平均は0.561、河内川集団内のBSIの平均は0.591であり、両集団ともに非常に高いBSIを示した。また集団間のBSIの平均は集団内のBSIの平均と比較して0.366と低い値を示した。

制限酵素に5塩基認識のHinf I、プローブにYNZ 22を用いた山間川産（住用湾）のリュウキュウアユのDNAフィンガープリントをFig. 21に示す。DNA断片は1.0から6.6kbpの範囲で検出され、検出された断片数は23から37本（平均29.7本）であった。検出されたDNAフィンガープリントに基づいて求めた各個体間のBSIと集団内のBSIの平均をTable 11に示す。山間川集団内のBSIの平均は0.550であり、制限酵素にHae IIIを用いた場合と同様に非常に高いBSIを示した。

制限酵素に5塩基認識のHinf I、プローブにYNZ 22を用いた河内川産（焼内湾）のリュウキュウアユのDNAフィンガープリントをFig. 22に示す。DNA断片は1.0から5.5kbpの範囲で検出され、検出された断片数は22から32本（平均26.1本）であった。検出されたDNAフィンガープリントに基づいて求めた各個体間のBSIと集団内のBSIの平均をTable 12に示す。山間川集団内のBSIの平

均は0.586であり、住用湾産と同様に非常に高いBSIを示した。

制限酵素に6塩基認識のEcoR I、プローブにYNZ 22を用いた住用湾産（山間川）、焼内湾産（河内川）および人工採卵F₃のリュウキュウアユのDNAフィンガープリントをFig. 23に示す。DNA断片は1.4から6.6kbpの範囲で検出され、検出された断片数は山間川産で18から26本（平均22.8本）、河内川産では23から26本（平均24.2本）、人工採卵F₃では23から28本（平均26.0本）であった。検出されたDNAフィンガープリントに基づいて求めた各個体間のBSIと両集団内および集団間のBSIの平均をTable 13に示す。山間川集団内のBSIの平均は0.364、河内川集団内のBSIの平均は0.405、人工採卵F₃集団内のBSIの平均は0.373を示し、河内川集団内のBSIの平均がやや高くなったものの、4塩基認識の制限酵素Hae III、5塩基認識の制限酵素Hinf Iと比較して全体的に低かった。また集団間のBSIの平均は山間川/河内川で0.366、山間川/人工採卵F₃で0.366、河内川/人工採卵F₃で0.380であり、ほとんど差が認められなかった。また、それぞれの集団内のBSIの平均とも同レベルの値を示し、集団内レベルと集団間レベルにおいて差は認められなかった。

3. 論議

両側回遊型および陸封型アユ

制限酵素に4塩基認識のHae III、プローブにYNZ22を用いた両側回遊型アユの系統内のBSIが低かったのは遺伝的変異保有量が高いことを示したものと考えられる。この両側回遊型においてBSIが低く、遺伝変異保有量が大きい傾向は制限酵素に5塩基認識のHinf I、6塩基認識のEcoR I、プローブにYNZ 22、制限酵素にEcoR I、プローブに α -Globin、制限酵素にHae III、プローブにM13ファージDNAを用いたいずれの制限酵素とプローブとの組み合わせにおいても認められた。これは両側回遊型の集団の有効な大きさ(Ne)が健全な状態にあることを反映したと考えられる。

また、本研究で採集した個体は採集地が土佐湾における個体であり、両側回遊型アユは河川下流域で産卵し、孵化した仔魚はただちに流下し、仔稚魚期を海で生活するという行動的特性をもつことから土佐湾において複数の河川集団の仔稚魚が混合され、それを採集したサンプリングにおける影響も考えられる。今後さらに複数の採集地点（太平洋側；北部・南部集団、日本海側；北部・南部集団、陸封型アユの放流されていない1河川内集団、朝鮮半島および中

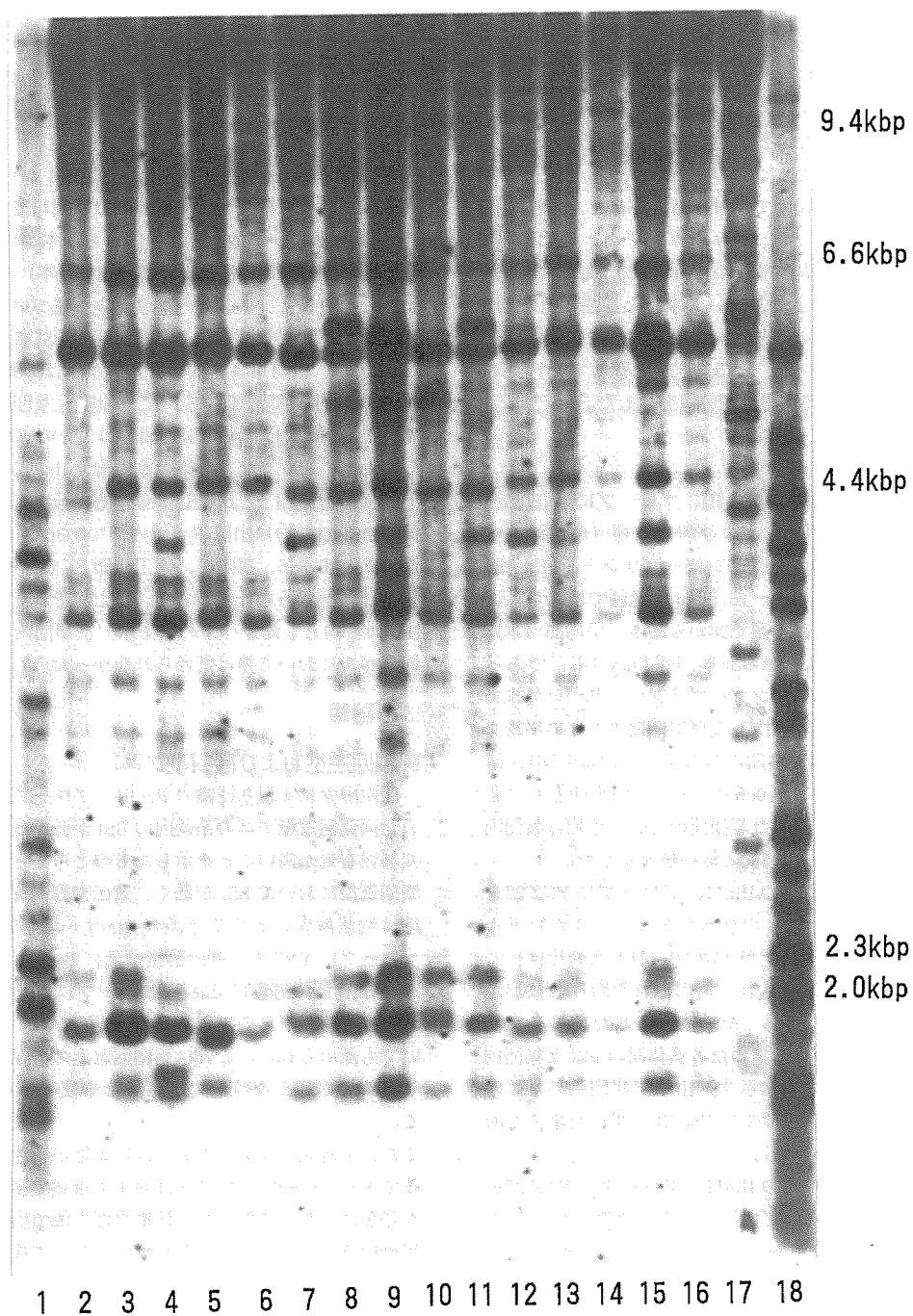


Fig.19. DNA fingerprinting of Ayu in the Nomura's population. Genomic DNA, which was digested by *EcoRI*, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe. Counting from the left, lane 2-16: Nomura's Ayu, lane 17: Landrocked form, lane 1, 18: clone ayu as molecular marker.

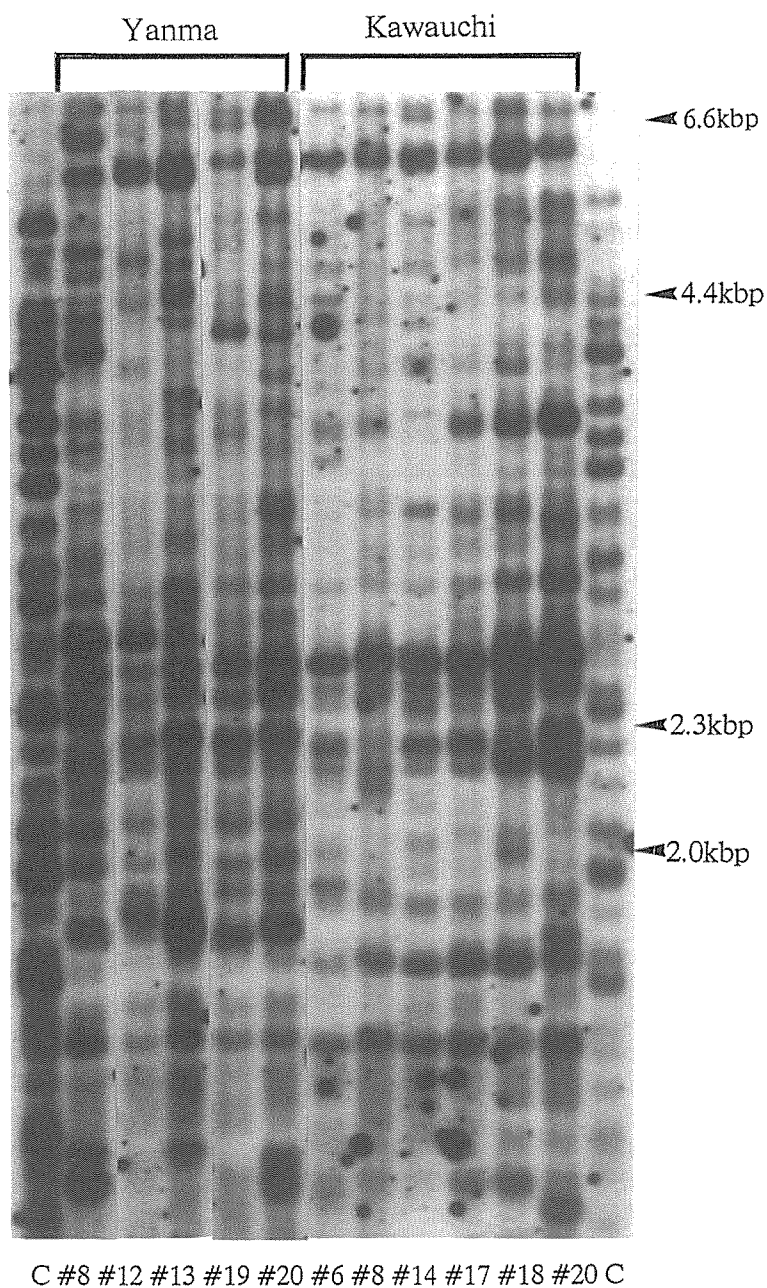


Fig. 20. DNA fingerprinting of Ryukyu-Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe. Counting from the left, lane 2-6: Yanma River, lane 7-12: Kawauchi River, lane 1, 13: clone ayu as molecular marker.

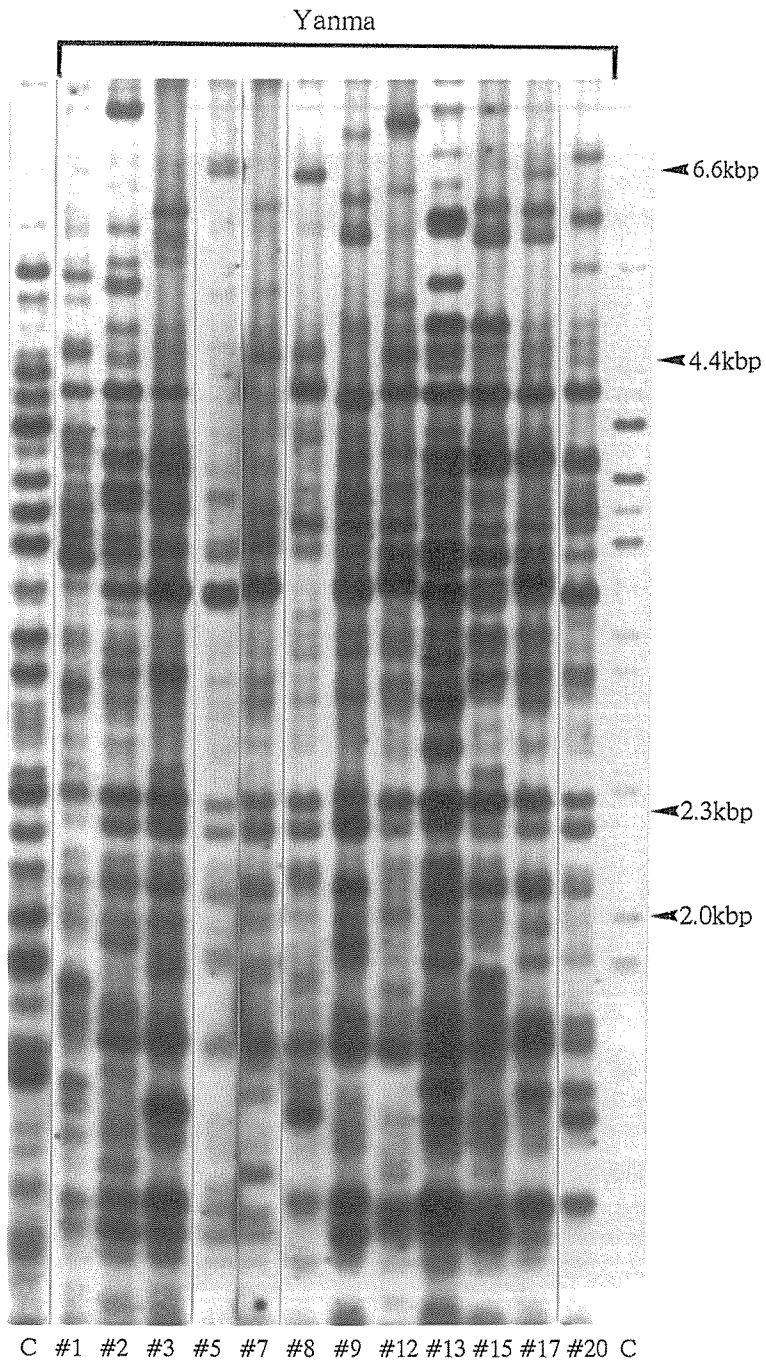


Fig. 21. DNA fingerprinting of Ryukyu-Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hinf*I, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe. Counting from the left, lane 2-13: Yanma River, lane 1, 14: clone ayu as molecular marker.

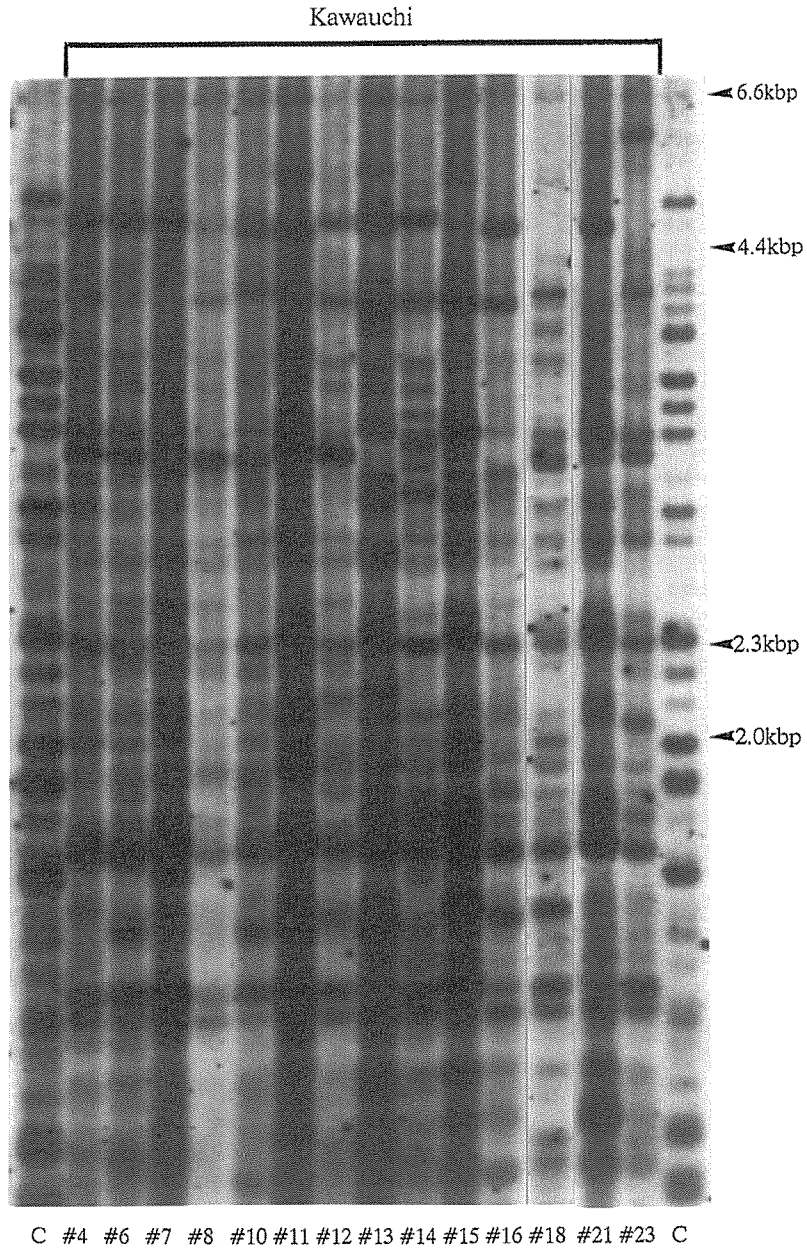


Fig. 22. DNA fingerprinting of Ryukyu-Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hinf*I, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe. Counting from the left, lane 2-15: Kawauchi River, lane 1, 16: clone ayu as molecular marker.

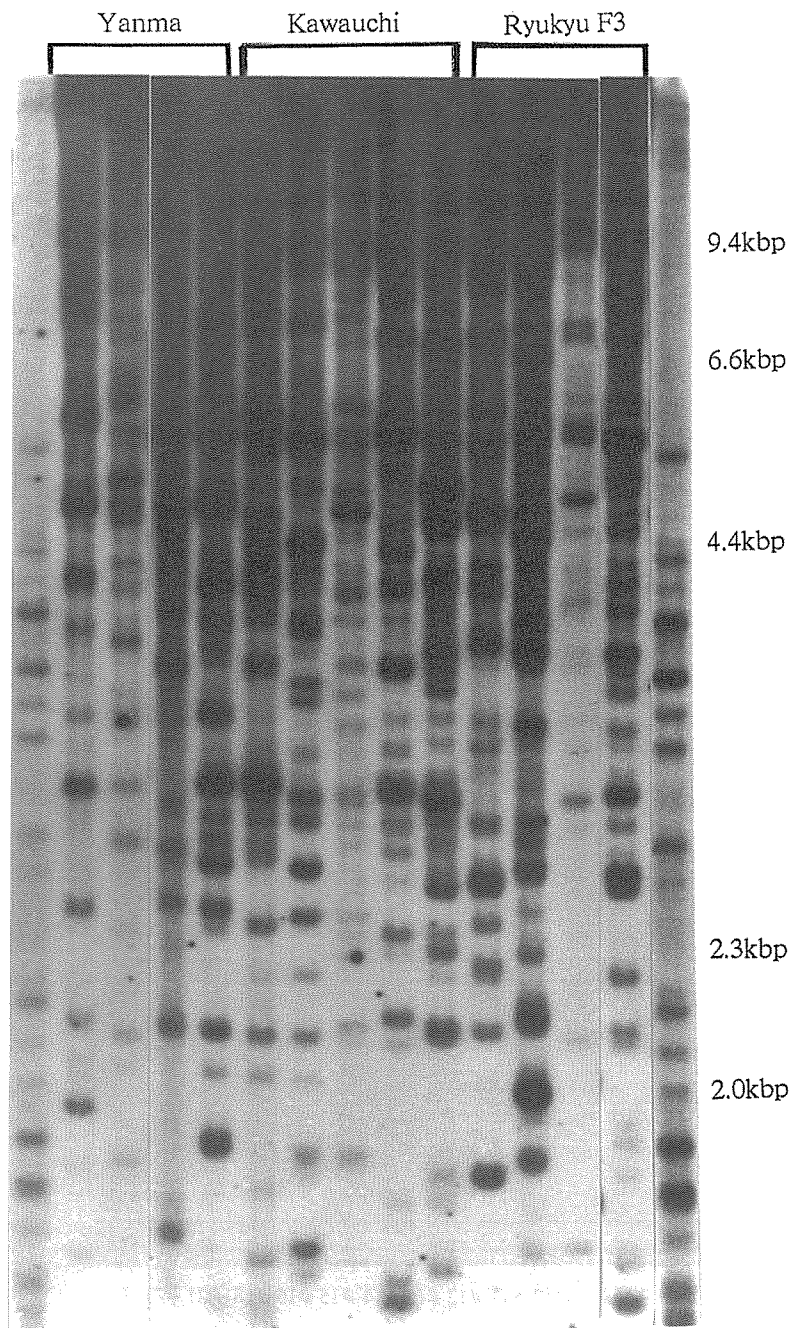


Fig. 23. DNA fingerprinting of Ryukyu-Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Eco*R I, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe. Counting from the left, lane 2-5: Yanma River, lane 6-10: Kawauchi Rivre, lane 11-14: F3 cont., lane 1, 15: clone ayu as molecular marker.

Table 9. The value of BSI (Mean±SD) between individuals estimated from DNA fingerprinting pattern detected with YNZ 22 probe and *EcoR* I restriction endonuclease

No.	No. of bands detected															
		# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7	# 8	# 9	# 10	# 11	# 12	# 13	# 14	# 15
# 1	16															
# 2	19	0.686														
# 3	18	0.471	0.700													
# 4	19	0.514	0.632	0.757								0.586±0.139				
# 5	16	0.563	0.514	0.588	0.800											
# 6	17	0.364	0.444	0.629	0.500	0.545										
# 7	17	0.485	0.389	0.571	0.389	0.485	0.706									
# 8	19	0.514	0.579	0.649	0.474	0.400	0.667	0.667								
# 9	18	0.412	0.324	0.444	0.270	0.412	0.743	0.800	0.649							
# 10	19	0.400	0.412	0.541	0.474	0.514	0.889	0.722	0.632	0.811						
# 11	20	0.500	0.513	0.579	0.769	0.833	0.649	0.541	0.513	0.526	0.712					
# 12	21	0.430	0.450	0.564	0.700	0.757	0.632	0.526	0.500	0.513	0.700	0.927				
# 13	17	0.424	0.444	0.571	0.722	0.788	0.588	0.412	0.389	0.400	0.611	0.811	0.944			
# 14	19	0.629	0.737	0.703	0.632	0.571	0.556	0.444	0.737	0.432	0.526	0.667	0.650	0.611		
# 15	15	0.581	0.647	0.606	0.647	0.774	0.500	0.438	0.471	0.485	0.529	0.743	0.667	0.688	0.765	

Table 10. The value of BSI (Mean±SD) between genetically different groups and between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with YNZ 22 probe and *Hae* III restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	Yanma River					Kawauchi Riner									
		# 8	# 12	# 13	# 19	# 20	# 6	# 8	# 14	# 17	# 18	# 20				
# 8	39															
# 12	28	0.537			0.561±0.104								0.366±0.072			
# 13	34	0.521	0.710													
# 19	38	0.468	0.606	0.639												
# 20	38	0.494	0.394	0.528	0.711											
# 6	26	0.431	0.333	0.300	0.313	0.375										
# 8	24	0.476	0.385	0.379	0.355	0.452	0.720						0.594±0.120			
# 14	31	0.371	0.310	0.308	0.319	0.406	0.667	0.545								
# 17	27	0.303	0.291	0.262	0.338	0.369	0.755	0.627	0.690							
# 18	29	0.265	0.351	0.317	0.478	0.478	0.582	0.453	0.567	0.679						
# 20	35	0.351	0.349	0.290	0.521	0.493	0.459	0.407	0.455	0.516	0.781					

Table 11. The value of BSI (Mean±SD) between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with YNZ 22 probe and *Hinf* I restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	Yanma River														
		# 1	# 2	# 3	# 5	# 7	# 8	# 9	# 12	# 13	# 15	# 17	# 20			
# 1	31															
# 2	37	0.588														
# 3	28	0.542	0.431													
# 5	22	0.491	0.508	0.560								0.550±0.073				
# 7	23	0.444	0.567	0.471	0.622											
# 8	28	0.508	0.462	0.393	0.480	0.471										
# 9	30	0.525	0.627	0.552	0.577	0.453	0.552									
# 12	27	0.517	0.563	0.400	0.531	0.560	0.618	0.667								
# 13	35	0.545	0.583	0.667	0.667	0.483	0.540	0.646	0.516							
# 15	36	0.507	0.575	0.656	0.517	0.508	0.531	0.636	0.540	0.620						
# 17	30	0.590	0.448	0.552	0.538	0.528	0.621	0.700	0.632	0.615	0.667					
# 20	29	0.533	0.455	0.561	0.549	0.423	0.491	0.576	0.464	0.656	0.615	0.644				

Table 12. The value of BSI (Mean \pm SD) between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with YNZ 22 probe and *Hinf* I restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	Kawauchi River													
		# 4	# 6	# 7	# 8	# 10	# 11	# 12	# 13	# 14	# 15	# 16	# 18	# 21	# 23
# 4	27														
# 6	29	0.857													
# 7	30	0.667	0.814												
# 8	22	0.735	0.824	0.692								0.586 \pm 0.096			
# 10	28	0.727	0.632	0.483	0.720										
# 11	28	0.655	0.667	0.655	0.560	0.679									
# 12	25	0.616	0.667	0.691	0.638	0.491	0.528								
# 13	28	0.545	0.667	0.552	0.560	0.500	0.643	0.453							
# 14	32	0.542	0.492	0.548	0.556	0.500	0.467	0.632	0.433						
# 15	24	0.627	0.566	0.630	0.565	0.615	0.615	0.571	0.577	0.464					
# 16	24	0.431	0.528	0.519	0.522	0.385	0.423	0.490	0.538	0.536	0.542				
# 18	23	0.600	0.654	0.642	0.711	0.627	0.549	0.583	0.667	0.582	0.681	0.596			
# 21	22	0.490	0.549	0.500	0.500	0.400	0.560	0.511	0.800	0.444	0.609	0.609	0.667		
# 23	23	0.560	0.577	0.528	0.533	0.549	0.667	0.458	0.667	0.473	0.596	0.596	0.696	0.667	

Table 13. The value of BSI (Mean \pm SD) between genetically different groups and between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with YNZ 22 probe and *EcoR* I restriction endonuclease

No. of bands detected	Yanma				Kawauchi					F 3			
	# 8	# 9	# 13	# 20	# 4	# 7	# 11	# 13	# 15	# 2	# 3	# 6	# 7
21													
18	0.410		0.364 \pm 0.069				0.366 \pm 0.113					0.366 \pm 0.086	
26	0.340	0.269											
26	0.383	0.318	0.462										
24	0.267	0.477	0.360	0.440									
25	0.391	0.279	0.392	0.588	0.408		0.405 \pm 0.078					0.380 \pm 0.072	
23	0.227	0.390	0.449	0.367	0.426	0.417							
23	0.273	0.195	0.367	0.408	0.511	0.208	0.391						
26	0.213	0.318	0.615	0.308	0.400	0.392	0.449	0.449					
23	0.227	0.341	0.367	0.327	0.340	0.333	0.348	0.348	0.408				
27	0.417	0.222	0.377	0.415	0.431	0.346	0.400	0.440	0.377	0.320		0.373 \pm 0.072	
26	0.340	0.364	0.462	0.538	0.360	0.510	0.367	0.327	0.577	0.449	0.377		
28	0.367	0.348	0.481	0.259	0.308	0.340	0.314	0.275	0.444	0.471	0.327	0.296	

国産アユ集団、島嶼におけるアユ集団等)においてさらに詳しい調査を行い、各採集地点における遺伝変異保有量について比較検討を行い、アユにおける遺伝資源の全体像を把握する必要があると考えられた。

制限酵素に5塩基認識の *Hinf*I、プローブに YNZ22を用いた陸封型(琵琶湖産)系統内の BSI は全体に低かった。これは陸封型系統についても遺伝的変異保有量が高いことを示している。この、陸封型において BSI が低く、遺伝変異保有量が大きい傾向は実験を行ったいずれの制限酵素とプローブとの組み合わせ(制限酵素に6塩基認識の *EcoR*I、プローブに YNZ22、制限酵素に6塩基認識の *EcoR*I、プローブに α -Globin、制限酵素に4塩基認識の *Hae*III、プローブに M13ファージ DNA)においても認められた。こ

れは両側回遊型と同様、集団の有効な大きさ (N_e) が大きく遺伝資源が健全な状態にあることを反映したと考えられる。また、採集地は琵琶湖であり、陸封型アユは琵琶湖へ流入する河川の下流域で産卵し、孵化した仔魚はただちに流下し、仔稚魚期を琵琶湖で生活するという行動的特性をもつことから琵琶湖において複数の河川集団の仔稚魚が混合され、それを採集したサンプリングにおける影響も考えられる。制限酵素に4塩基認識の *Hae* III、プローブに M13ファージ DNA を用いた場合を除いて、全ての制限酵素とプローブの組み合わせにおいて陸封型系統内の BSI の方が両側回遊型系統内の BSI よりも高い値を示した。これは陸封型の遺伝変異保有量が両側回遊型と比較して低く、陸封型系統内において遺伝的多様性が減少しつつあることに

よると考えられた。さらに琵琶湖は4型の異なる生活型をとるアユに識別されていることからそれぞれの系統の独立したサンプリングを行い、遺伝変異保有量を調査する必要も示唆された。

両側回遊型と陸封型系統間のBSIは制限酵素に6塩基認識のEcoRI、プローブにYNZ22、制限酵素に6塩基認識のEcoRI、プローブに α -Globinをもちいた場合に両系統内のBSIレベルと比較してやや低くなった。このことは両側回遊型と陸封型における遺伝的類似性がやや低いことを示し、両集団が遺伝的に分化しつつあるものと考えられ、関ら、(1988)のアイソザイムの結果とも対応している。しかしながら、そのBSI値の差は少なく、制限酵素に5塩基認識のHinfI、プローブにYNZ22を用いた場合に系統間のBSIが両側回遊型系統内のBSIレベルと同程度であったことは、両系統間において遺伝的分化が生じているもののその程度は小さいことが推測された。

野村ダム湖放流アユ

制限酵素に6塩基認識のEcoRI、プローブにYNZ22を用いた野村ダム産アユ系統内のBSIの平均は両側回遊型アユ系統内のBSIの平均(0.32)と比較して0.58と極めて高い値を示した。このことは野生集団と比較して遺伝変異保有量が減少し、遺伝的に類似性が高いことを示している。また両側回遊型、陸封型アユのフィンガープリントと比較して2.3から3.0kbpの範囲でDNA断片がほとんど検出されないという特徴がみられたことも制限部位の遺伝的多様性が失われ、均質化していることのあらわれであると考えられた。関ら、(1988c)は移植集団においてアイソザイムを用い、遺伝変異保有量を推定し、機会的な遺伝的浮動および創始者効果について考察しているが、本研究においてもこれらの要因が顕在化したものと考えられる。また、このような遺伝的変異に乏しい集団は適応能力も減退している可能性が考えられ、DNAフィンガープリントを用いて集団の遺伝変異保有量を把握することは今後のダム湖放流アユ資源の管理において重要な示唆を示すといえる。

リュウキュウアユ

制限酵素に4塩基認識のHaeIII、プローブにYNZ22を用いた山間川産(住用湾)および河内川産(焼内湾)の集団内のBSIの平均は両側回遊型系統内のBSI(0.253)と比較して両集団ともに非常に高い値(山間川で0.561、河内川で0.591)であった。また、測定誤差を少なくするために個体数を増やし、制限酵素に5塩基認識のHinfI、プ

ローブにYNZ22を用いた山間川および河内川の集団内のBSIの平均はともに(0.561、0.591)であり、制限酵素にHaeIIIを用いた場合と同様に両側回遊型アユ(0.256)と比較して非常に高いBSIを示した。以上の結果はリュウキュウアユの2つの主要生息地域の集団ともに遺伝変異保有量が低下し、多様性が失われ遺伝的に均質化していることを示唆した。また、制限酵素HaeIIIにおいて集団間のBSIの平均が集団内のBSIの平均と比較して0.366と低い値を示したことから、遺伝変異保有量が減退し、結果として両系統の遺伝的分化が生じていると考えられた。

プローブにYNZ22を用いた住用湾産(山間川)、焼内湾産(河内川)および人工採卵F3の山間川集団内のBSIの平均は0.37、河内川集団内のBSIの平均は0.41、人工採卵F3集団内のBSIの平均は0.38を示し、河内川集団内のBSIの平均が高くなったものの、4塩基認識の制限酵素HaeIII、5塩基認識の制限酵素HinfIと比較して全体的に低く、また、両側回遊型の系統内のBSIと同レベルであった。このことは制限酵素EcoRIが6塩基認識であり、高分子領域にDNA断片が集中したことにより断片を判別した領域において相同性が少なくなったことが考えられる。人工採卵F3集団は住用湾由来の3代目であり親魚数も少なく、種苗生産の影響による均質化が生じていると考えられるが、本研究の結果においては天然集団の住用湾産(山間川)とほぼ等しい値であった。このことは継代を行うことによる遺伝変異の減少を無視しうる程、天然集団の遺伝的近交度が上昇しているものと考えられた。これらの現象は、道路および河川改修等の土木工事や森林伐採による赤土の流出、家庭排水による水質の汚濁等の原因でリュウキュウアユの生息環境が悪化し、個体数が現象するために生じた遺伝的変異の減少であると考えられる。リュウキュウアユの主要生息地である住用湾と焼内湾において遺伝的分化が認められていることから、リュウキュウアユの移出や、種苗生産をする際の親魚の選択にはその由来について十分な注意を払うべきであろう。関ら、(1988)はリュウキュウアユの遺伝変異保有量の減少をSawashi & Nishida, (1994)は住用湾集団と焼内湾集団の遺伝的差異をアイソザイム分析によって示しているが、本研究の結果はこれらの結果をさらに顕在化させたものといえる。今後、リュウキュウアユの保全対策を講じる上でフィンガープリント法を用い、集団の遺伝的構成を継続的にモニタリングする必要があると考えられた。

両側回遊型、陸封型、ダム湖放流アユおよびリュウキュウアユの結果より、DNAフィンガープリント法は天然集

団における遺伝変異保有量および近交度の把握、遺伝的変異が減退している種における集団間の遺伝的分化程度の推定において有力な遺伝マーカーとなると考えられた。

II 養殖改良系統における遺伝変異保有量の変化

マダイ、*Pagrus major* の人工種苗の大量生産技術が確立されて以来、養殖マダイの重要性は年々増大し、大量に生産された人工種苗が各地の養殖業者に供給されている。また、今日では民間の種苗生産場において選択を始めとする育種がなされ、成長がよく、個体差が少ない等、養殖品種として優れた形質をもつ品種の作出が試みられている。また、香港や韓国等からの輸入種苗が導入され、日本産マダイとの交雑育種も行われている。したがって、各養殖品種の遺伝的特性を把握することは今後、適正な育種計画をたてるための重要な課題である。谷口ら、(1995) は各種苗生産場より受精卵を同一日に集め、育成した増養殖系統について成長比較し、系統間差の解明を試みている。

近年、DNA レベルで集団の遺伝的構造を解析する試みがなされ、さまざまな手法によって分析が進められている。そのうち、DNA フィンガープリント法 (以下、DNA-FP) は多数の遺伝子座の DNA 断片を同一メンブラン内で同時に発現させる方法でそれぞれの DNA 断片はメンデル遺伝する。個体間の類似度は断片の共有度によって求められる遺伝的類似度 (BSI) で表され、それらは0から1の間の値をとる変数である。したがって人工採苗の集団の遺伝変異保有量の変化を検知するための指標として有効であると考えられている (Kuhnlein et al., 1989)。これまで魚類において DNA-FP は親子鑑別や個体識別に用いられるとともに野生集団では系統識別 (Prodohl et al., 1992) や希少生物の遺伝変異レベルの推定、人工集団では染色体操作魚、とくにクローン魚の作出の証明において有効性を示している (Han et al., 1993; 原ら, 1993; Nagoya et al., 1996)。

本研究では養殖用マダイ種苗系統の遺伝変異保有量を DNA-FP により把握することを目的とした。

1. 材料および方法

1) 供試魚

本研究には各種苗生産施設で保持されている5系統の人工種苗を用いた (谷口ら, 1995)。S 1 は天然マダイ (高知、徳島) を起源とした継代交配2代目、S 2 は S 3 の4代目を起源とし、独自に選択した3代目、S 3 は和歌山産

天然マダイを独自に選択育種した7代目、S 4 は玄海灘産天然マダイを起源とした選択育種2代目、S 5 は韓国産マダイと瀬戸内海産天然マダイの交雑種を起源とする選択育種4代目である。また、対照として福井産天然マダイを用いた。

2) 方法

DNA-フィンガープリント法

ゲノムDNAは血液より SDS-フェノール/クロロフォルム法により抽出した (Harris et al., 1991)。制限酵素には *Hinf*I をプローブには 33.15 と YNZ 22 の2種類を用いた。

DNA-フィンガープリントの評価

各系統間の遺伝変異保有量は各個体間の検出断片共有度 (BSI) より求めた。なお、系統内および系統間の BSI はその平均を求め、解析には、2.0から23.4kbpの範囲の検出断片を用いた。分子量マーカーおよびバンドの異同度の判定基準として両側にクローンアユを配置し、共有する断片の判定は左右のクローン個体の断片を結ぶ線を目安に行った。

また、異なったメンブラン間における5系統の養殖マダイの系統内の BSI を比較するために S 2、S 3 および S 4 の同一個体をそれぞれのメンブランに配し、メンブラン間の差異を以下の式にしたがって補正し、標準化した。

$$\text{Corrected BSI} = \frac{B_{ax}}{B_{ay}} \times B_{by}$$

ここで、 B_{ax} は基準となるメンブラン x で推定された系統 a の BSI を、 B_{ay} はメンブラン y で推定された系統 a の BSI を、 B_{by} はメンブラン y で推定された系統 b の BSI を示している。

2. 結果

33.15プローブを用いた S 2 と S 3 の DNA-FP を Fig. 24 に示す。S 2、S 3 の両系統内において共有する割合の高い断片が見られ、そのうちのいくつかの断片は両系統とも共有していた。

検出された DNA 断片に基づいて求めた S 2 と S 3 の各個体間の BSI と両系統内および両系統間の BSI の平均を Table 14 に示す。S 2 の BSI の平均は 0.382、S 3 の BSI の平均は 0.301 と、ともに BSI が上昇し、S 2 のほうがやや高かった。また、系統間の BSI の平均は S 3 の BSI レベルとほぼ等しかった。

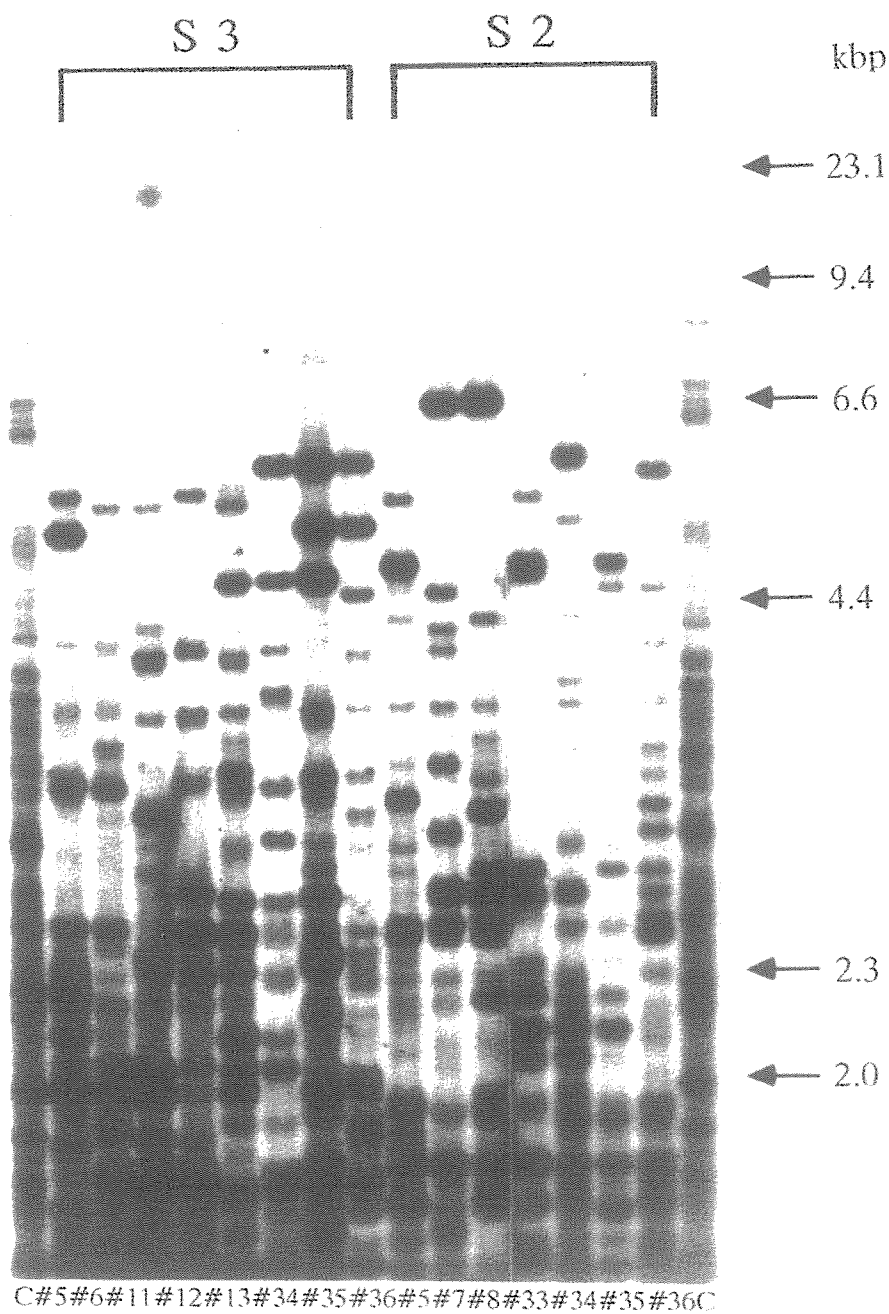


Fig. 24. DNA fingerprinting of artificially produced red sea bream. Genomic DNA, which was digested by *Hinf*I, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe. Counting from the left, lane 2-9: S3, lane 10.-16: S2, lane 1.-13: clone ayu as molecular marker.

Table 14. Band sharing indices (BSI) between individuals and mean of BSI within and between groups estimated from DNA fingerprint pattern detected with 33.15 probe and *Hinf* I restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	S 2							S 3							
		# 36	# 35	# 34	# 33	# 8	# 7	# 5	# 36	# 35	# 34	# 13	# 12	# 11	# 6	# 5
# 36	16															
# 35	13	0.207														
# 34	15	0.323	0.500													
# 33	13	0.138	0.615	0.286												
# 8	13	0.414	0.462	0.357	0.231											
# 7	14	0.533	0.222	0.276	0.222	0.296										
# 5	18	0.412	0.645	0.545	0.516	0.452	0.375									
# 36	15	0.194	0.214	0.333	0.071	0.214	0.207	0.242								
# 35	16	0.375	0.138	0.258	0.207	0.276	0.200	0.294	0.516							
# 34	13	0.414	0.154	0.286	0.308	0.231	0.370	0.129	0.214	0.276						
# 13	19	0.286	0.438	0.471	0.500	0.375	0.364	0.486	0.412	0.457	0.375					
# 12	12	0.500	0.240	0.296	0.240	0.400	0.385	0.400	0.148	0.214	0.160	0.194				
# 11	12	0.286	0.160	0.148	0.240	0.320	0.077	0.333	0.296	0.429	0.240	0.258	0.167			
# 6	11	0.296	0.333	0.538	0.333	0.417	0.240	0.345	0.308	0.148	0.250	0.467	0.348	0.348		
# 5	15	0.167	0.357	0.467	0.357	0.214	0.167	0.424	0.333	0.258	0.286	0.353	0.444	0.074	0.462	

Fig. 25 は、33.15プローブを用いた S 4 と S 5 の DNA-FP である。両系統ともに系統内で断片の共有度が低く、また、系統間においても断片の共有度は低かった。

検出された DNA 断片に基づいて求めた S 4 と S 5 の各個体間の BSI と両系統内および両系統間の BSI の平均を Table 15 に示す。両系統ともに系統内、系統間でバンドの共有度が低いために S 4 で 0.165、S 5 で 0.205 と低い値を示し、系統間についても 0.140 と低かった。

33.15プローブを用いた各メンブランにおける養殖マダイ 5 系統および野生集団の系統内の BSI の平均、標準偏差およびメンブラン間の差異を補正した系統内の BSI を Table 16 に示す。野生集団の BSI は養殖集団 5 系統の BSI と比較して特に低かった。また、S 1 の BSI は S 4、S 5 と同等に低かった。

また、YNZ 22 プローブを用いた各メンブランにおける養殖マダイ 5 系統および野生集団の系統内の BSI の平均、標準偏差およびメンブラン間の差異を補正した系統内の BSI を Table 17 に示す。YNZ 22 プローブの方が全体的に BSI が低い、このプローブにおいても 33.15 プローブと同様の断片の共有性を示したために、33.15 プローブにおける各系統内の BSI レベルの大小とほぼ等しくなった。

以上のことより、養殖マダイ 5 系統は極めて高い野生集団の遺伝変異性と比較するとやや遺伝変異が低かった。また、S 2 と S 3 の系統内の BSI は S 1、S 4、S 5 と比較して遺伝変異性が低く、さらに S 2 は S 3 と比較してより遺伝変異が低かった。一方、S 2 と S 3 の系統間の SI は

S 3 系統内の BSI レベルと同等であった。

3. 論議

これまで、いくつかの水産対象種について DNA-FP が検出されているが、マダイについては検出例がない。対照魚種が変る場合、制限酵素とマルチローカスプローブとの適切な組み合わせ (restriction enzyme/multi-locus probe combination) を調べる必要がある (Hanotte et al., 1991)。本研究に用いた 2 種のプローブはともに制限酵素 *Hinf* I で切断した DNA 断片とハイブリダイズし、明瞭な DNA-FP 像が得られた。また、それより求めた BSI は 2 種のプローブとも同様の結果を示した。このことは、マダイの DNA-FP 分析において、推定された BSI の信頼度が高いことを示している。

複数の集団の平均 BSI を比較するには同一メンブラン内の DNA-FP を用いる必要がある。これはメンブランによってゲル濃度、泳動時間、洗浄等の実験条件の違いにより断片の位置や断片数に多少の増減が生じるためである。しかしながら、同一集団を異なったメンブランに配し、前述の補正式により、標準化することによって複数の系統の BSI レベルを比較することが可能である (Table 16, 17)。

一般に、近交度の高い選択系集団において変異の縮小により DNA-FP の BSI は高く、近交度の低い非選択系集団において BSI は低く維持されることが予測される。本研究で用いた養殖マダイ 5 系統は野生集団と比較してやや BSI レベルが高かった。なかでも継代数の多い選択系のも

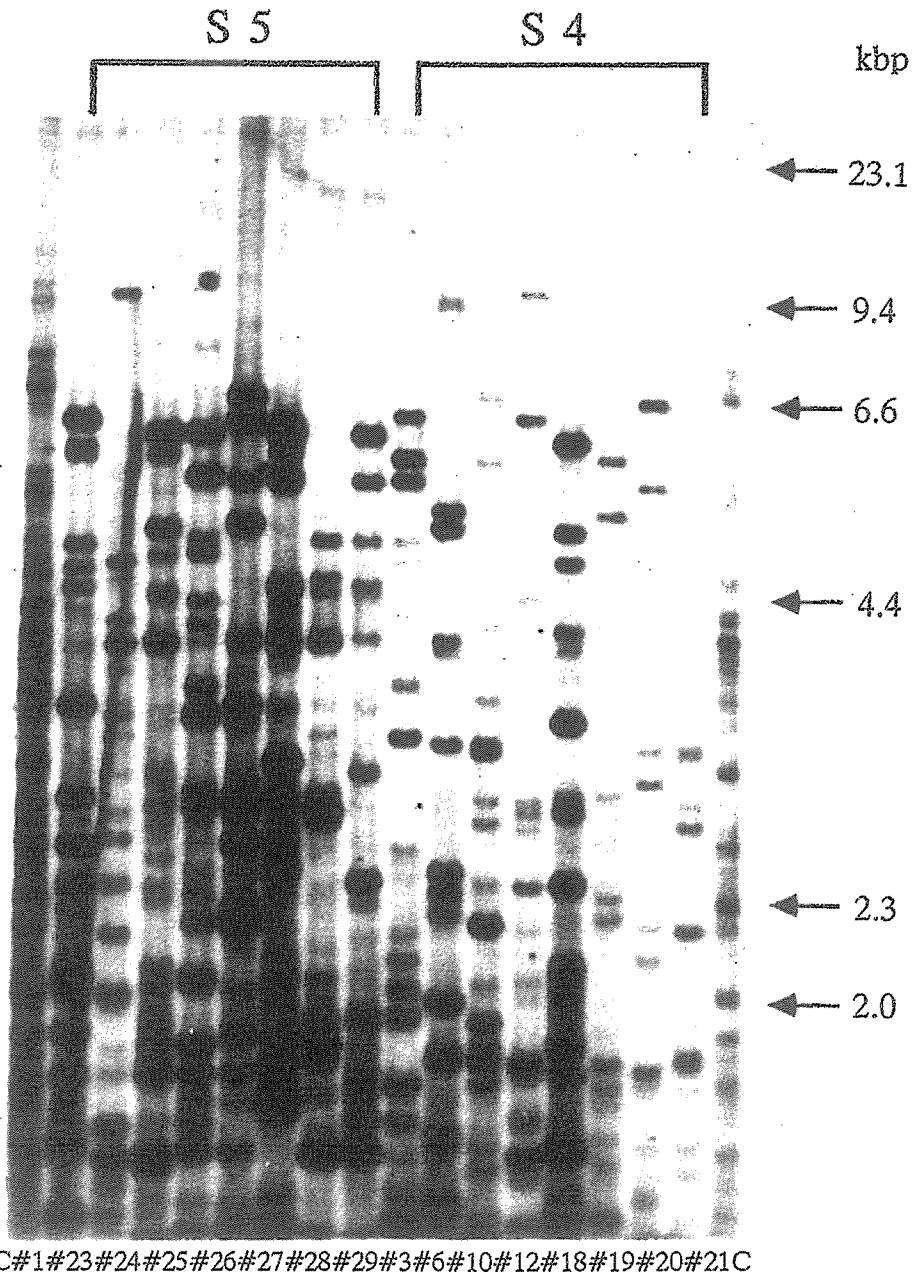


Fig. 25. DNA fingerprinting of artificially produced red sea bream. Genomic DNA, which was digested by *Hinf*I, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe. Counting from the left, lane 2-9: S5, lane 10,-17: S4, lane 1, 18: clone ayu as molecular marker.

Table 15. Band sharing indices (BSI) between individuals and mean of BSI within and between groups estimated from DNA fingerprinting pattern detected with 33.15 probe and *Hinf* I restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	S 4							S 5								
		# 21	# 20	# 19	# 18	# 12	# 10	# 6	# 3	# 29	# 28	# 27	# 26	# 25	# 24	# 23	# 1
# 21	10																
# 20	10	0.300															
# 19	12	0.000	0.091														
# 18	15	0.160	0.240	0.296													
# 12	13	0.261	0.174	0.080	0.286												
# 10	11	0.381	0.190	0.261	0.154	0.333											
# 6	8	0.000	0.111	0.200	0.174	0.000	0.000										
# 3	12	0.000	0.273	0.167	0.148	0.240	0.087	0.000									
# 29	10	0.000	0.100	0.000	0.240	0.087	0.095	0.000	0.182								
# 28	13	0.261	0.000	0.160	0.143	0.077	0.083	0.000	0.240	0.087							
# 27	14	0.083	0.167	0.231	0.276	0.148	0.000	0.182	0.167	0.250	0.222						
# 26	14	0.167	0.250	0.154	0.138	0.148	0.000	0.182	0.167	0.083	0.148	0.429					
# 25	16	0.154	0.154	0.143	0.258	0.207	0.074	0.083	0.214	0.231	0.207	0.333	0.333				
# 24	13	0.000	0.087	0.240	0.357	0.385	0.250	0.000	0.080	0.435	0.000	0.148	0.148	0.138			
# 23	14	0.083	0.083	0.154	0.138	0.222	0.160	0.091	0.077	0.250	0.222	0.214	0.071	0.200	0.222		
# 1	15	0.080	0.080	0.222	0.133	0.143	0.308	0.000	0.148	0.240	0.143	0.138	0.207	0.065	0.357	0.207	

Table 16. Bands sharing indices (BSI) within strains and corrected BSI in the DNA-FP detected with 33.15 probe and *Hinf* I restriction endonuclease

Membrane No.	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	Wild
1	0.207 ± 0.129		0.276 ± 0.108			
*2		0.382 ± 0.144	0.301 ± 0.116			
3				0.165 ± 0.114	0.205 ± 0.105	
4		0.315 ± 0.165		0.137 ± 0.208		0.099 ± 0.111
Mean		0.349	0.289	0.151		
Correct	0.226	*0.382	*0.301	0.166	0.206	0.120

*The value of the membrane was used as a standard

Table 17. Bands sharing indices (BSI) within strains and corrected BSI in the DNA-FP detected with YNZ 22 probe and *Hinf* I restriction endonuclease

Membrane No.	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	Wild
1	0.159 ± 0.118		0.233 ± 0.126			
*2		0.279 ± 0.151	0.257 ± 0.190			
3				0.115 ± 0.164	0.113 ± 0.183	
4		0.302 ± 0.157		0.171 ± 0.265		0.089 ± 0.070
Mean		0.291	0.245			
Correct	0.175	*0.279	*0.257	0.158	0.122	0.082

*This value of the membrane was used as a standard

のはS2, S3ともにBSIレベルが最も高く、継代数の少ないS4および交雑育種系のS5では非選択系のS1と同程度のBSIレベルであった。S1, S4ともにBSIが低い値を示したのは継代2代目であり、ほとんど近交が進んでいないことを反映したものと考えられる。また、S5は韓国産マダイと日本産マダイの交雑育種によるものであり、継代数は4代を数えるもののBSIレベルが低いのは交雑育種におけるヘテロ接合体率の増加によるものと推測された。一方、S2とS3は他の3系統と比較するとBSIはやや高かった。しかしながら、アユの近交系におけるDNA-FPのBSIの上昇傾向と比較した場合、S2とS3は継代7代目にもかかわらず、遺伝変異が比較的高い。これは、採苗時使用される親魚数が多いことに起因する。このようなDNA-FPによる養殖種苗5系統の結果は先の谷口ら(1995)の研究におけるアイソザイム分析において、低頻度遺伝子が消失し、多型の遺伝子座率が減ったものの、ヘテロ接合体率は比較的高く、顕著な近交が起こっていないと結果とよく対応している。一方、S2とS3の系統間のBSIレベルがS3の系統内のBSIレベルと同等であったのはS2とS3の起源が等しいことを反映している。

このように、遺伝的变化の追跡調査のマーカーとしてDNA-FPは有効であることが明かになった。今後は遺伝子座別の変異性の分析が可能なシングルロカスプローブの応用により、このような遺伝的变化をより正確に把握することが必要であろう。

Ⅲ 染色体操作系統の変異量特性

これまでの魚介類における従来の選択育種では純系を得るまでに20世代程度の年月を要し、さらに人力や施設の面などでも多大な困難を伴うが、染色体操作により第1卵割阻止型雌性発生2倍体を作成すると遺伝子型がホモ化し変異が拡大する。そして、それらの個体から雌性発生2倍体を作成すると遺伝的純系(クローン)が得られる。染色体操作によって作出されるクローンは完全ホモ接合体であり、遺伝分散が少ない。また、一世代目の第一卵割阻止型雌性発生2倍体において有害遺伝子が顕在化および除去されるので良質な育種特性を持つ個体よりクローンを作成することで水産育種において選択効果が期待できる(谷口, 1991)。実際、幾つかの魚種においてクローン魚が作出され、その証明がなされている(Han et al., 1991)。しかしながら、完全ホモ接合体であることをアイソザイムのような検出感度の低い遺伝マーカーで証明することは困難で

ある。また、複数のクローン系統の識別に対する有効性は個体識別を行なうことと同様であるのでその可能性は低い。一方、組織移植は供試魚が実験に供するサイズに達するまでの期間および判定をおこなうまでの実験期間が長い。また、個体間および系統間の遺伝的類似度を把握するのに問題がある。それに対して、DNAフィンガープリント法によって検出されるゲノムDNAの変異は高度な多型性を示し、2個体間で同じ断片パターンを示す可能性は極めて低い。また、検出される断片はメンデル遺伝を示す。そのためDNAフィンガープリントは集団遺伝や親子鑑別、個体識別等の有力な標識として利用されている。さらに、DNAフィンガープリント法は組織移植に比べクローン性の判定期間が短く、バンドの共有度 Bands sharing index (BSI)を示すことで個体間および系統間の遺伝的分化の程度を数値化することができる。

魚類においても様々な用途でDNAフィンガープリントが示されており、野生集団においては集団の系統識別に用いられている(Prodhon et al., 1992)。クローン魚についてはアユ(Han et al., 1992)や(原ら, 1993)ヒラメについてフィンガープリントが示された。

本研究ではDNAフィンガープリントを染色体操作によって作出された7系統のクローンアユの作出の確認および識別をおこなうとともにクローン系統間の変異性の定量を行った。

1. 材料および方法

1) 供試魚

供試魚には第一卵割阻止型雌性発生2倍体、7系統のクローンアユを用いた。また、対照として両側回遊型アユから作出した人工採卵正常2倍体を用いた。クローン系統は初代のクローン2系統(9201, 9227)、F₄の継代クローン(WA-1)、F₂の継代クローン2系統(WA-2, WA-3)およびヘテロクローン(H-1, H-5)の計7系統であった。雌性発生魚の作出方法はTaniguchi et al., (1988)に従い、作出された系統のフローをFig. 26に示す。第一卵割阻止型雌性発生2倍体は紫外線を照射して不活性化させた精子を用い、卵に媒精を行った後、高圧処理を行って第一卵割を阻止して誘導した。初代クローンは第一卵割阻止型雌性発生2倍体の卵に紫外線照射して不活性化させた精子を用い卵に媒精を行った後、低圧処理により第二極体の放出を阻止して作出した。継代クローンは全雌集団であるクローン系統の一部をニセ雄化させ、その精子を同一のクローン系統

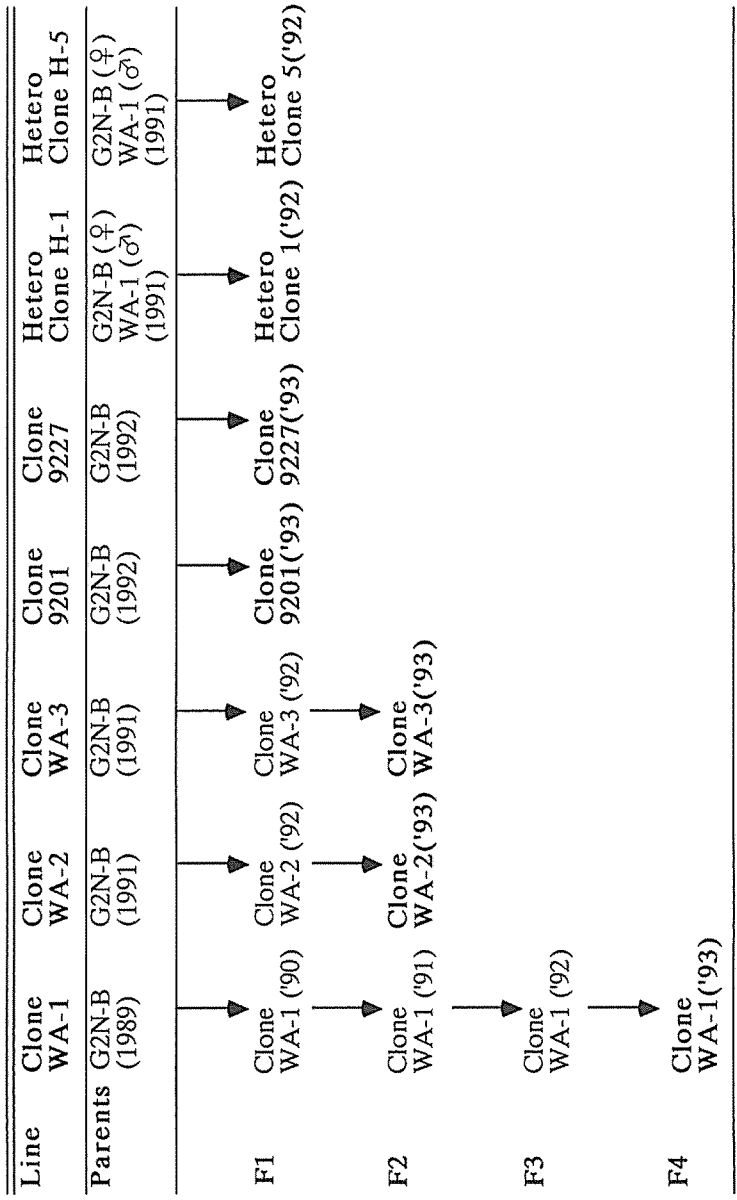


Fig. 26. Schematic diagram for the production of mitotic-gynogenetic diploids and clones.

の卵と媒精することにより作出した。本研究で用いたF₂およびF₄の継代クローンはこの作出法を毎年繰り返して作出した。ヘテロクローンはG-2NBの卵にあるクローン系統のニセ雄精子を媒精して作出した。

2) 方法

DNAフィンガープリント法の詳細は第2章に従い、実験条件を以下に示す。ゲノムDNAはザルコシル・フェノール法によって抽出し、制限酵素には4塩基認識のHae III、プローブにはM13ファージDNA、33.15、YNZ22を用いた。各クローン系統間の遺伝的類似度はフィンガープリントの断片パターンより検出断片共有度 (BSI) を求めた。

2. 結果

染色体操作魚各系統のDNAフィンガープリント

制限酵素にHae III、プローブにM13ファージDNAを用いた正常2倍体、第1卵割阻止型雌性発生2倍体、継代クローンのDNAフィンガープリントをFig. 27に示す。DNA断片は1.0から5.0kbpの範囲で検出され、検出された断片数は染色体操作魚各系統により異なり、17から31本の間で変化した。正常2倍体では27から30本の断片が検出された。第1卵割阻止型雌性発生2倍体で検出された断片は17から19本であり、断片数の減少がみられた。継代クローンでは26本の断片が検出されたが、これらの断片は全ての個体で共有していた。

得られたDNAフィンガープリント像に基づいて求めた各個体間のBSIと各集団内および各集団間のBSIの平均をTable 18に示す。

両側回遊型アユから作出したF₁である正常2倍体系統内のBSIの平均は0.527であり、天然集団である両側回遊型、陸封型アユの0.396、0.316 (未発表)と比較して高かった。第1卵割阻止型雌性発生2倍体系統内のBSIの平均は0.314であり同じF₁である正常2倍体と比較して低く、天然集団のレベルと同等であった。

継代クローンでは検出された断片が全ての個体で共有しているためBSIの平均は1となり遺伝的に同質であることを示した。一方各集団間のBSIの平均は天然集団の変異レベルと比較して差がなかった。

クローンアユ5系統の作出の証明と比較

クローンアユ5系統について制限酵素にHae III、プローブにRI標識のYNZ 22およびNon RI標識の33.15をもちい

たDNAフィンガープリントをFig. 28に示す。5系統全てのクローンについて検出されたDNA断片は系統内において全て共通であった。一方、全てのクローン系統間においてフィンガープリントパターンは系統特有の断片パターンを示し、2.0-9.4kbpの範囲でWA-1で31本、WA-2で31本、WA-3で30本、9201で33本、9227で30本であり、それぞれのクローンを識別することができた。また、プローブ33.15と33.6に変えた場合にも検出されたDNA断片はクローン系統内において全て共通であり、系統間では系統特有の断片数および断片パターンを示した。

クローンアユ5系統間の断片の共有度 (BSI) をTable 19に示す。33.15、33.6、YNZ22プローブともにほとんどの系統間のBSIは低く、YNZ22プローブにおける天然集団のBSIの平均0.253 (未発表)と比較してかわりなかった。しかしながら、WA-2とWA-3間のBSIは33.15プローブで0.820、33.6プローブで0.688、YNZ22プローブで0.607と高い値を示した。また、系統内のSIは全ての断片が共有しているため、1となった。

ヘテロクローンの作出の証明と比較

ヘテロクローン (H-1, H-5) およびWA-1について制限酵素にHae III、プローブにM13ファージDNAをプローブをもちいたDNAフィンガープリントを示す (Fig. 29)。検出されたDNA断片は系統内において全て共通である一方、ヘテロクローン系統間においてフィンガープリントパターンは系統特有の断片パターンを示し、1.4-5.0kbpの範囲でH-1で24本、H-5で29本、WA-1で26本であり、ヘテロクローンの作出の確認ができたのと同時に各ヘテロクローン系統を識別することができた。

3. 論議

天然集団である両側回遊型アユから採卵した正常2倍体のF₁系統内のBSI値の平均が0.527と両側回遊型の平均値の0.396と比較して高いことについては、親魚数が少ないために生じるビン首効果により、遺伝的多様性が低下したものと考えられる。このことは養殖集団を継代していくうちに生じる遺伝的多様性の減少のモニタリングマーカーとしてDNAフィンガープリントが有効であることを示唆したものと考えられる。

一方第1卵割阻止型雌性発生2倍体系統内のBSI値の平均が、F₁であるにもかかわらず、0.314と低く遺伝的多様性が天然集団と同程度であった。これは、谷口ら (1991) が、述べている第1卵割阻止型雌性発生2倍体は

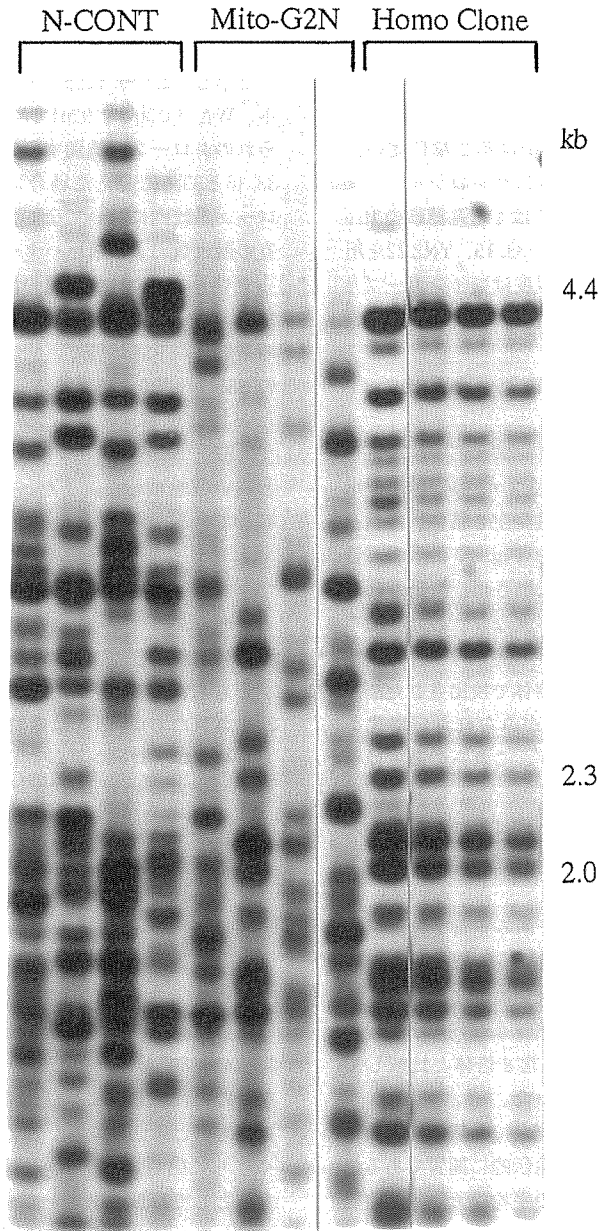


Fig. 27. DNA fingerprinting of Gynogenetic Ayu. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, hybridized with radio isotope labelled M13 DNA probe. Counting from the left, lane 1-4: Normal diploids, lane 5-8: Mitotic gynogenetic diploids, lane 9-12: Homozygous clone.

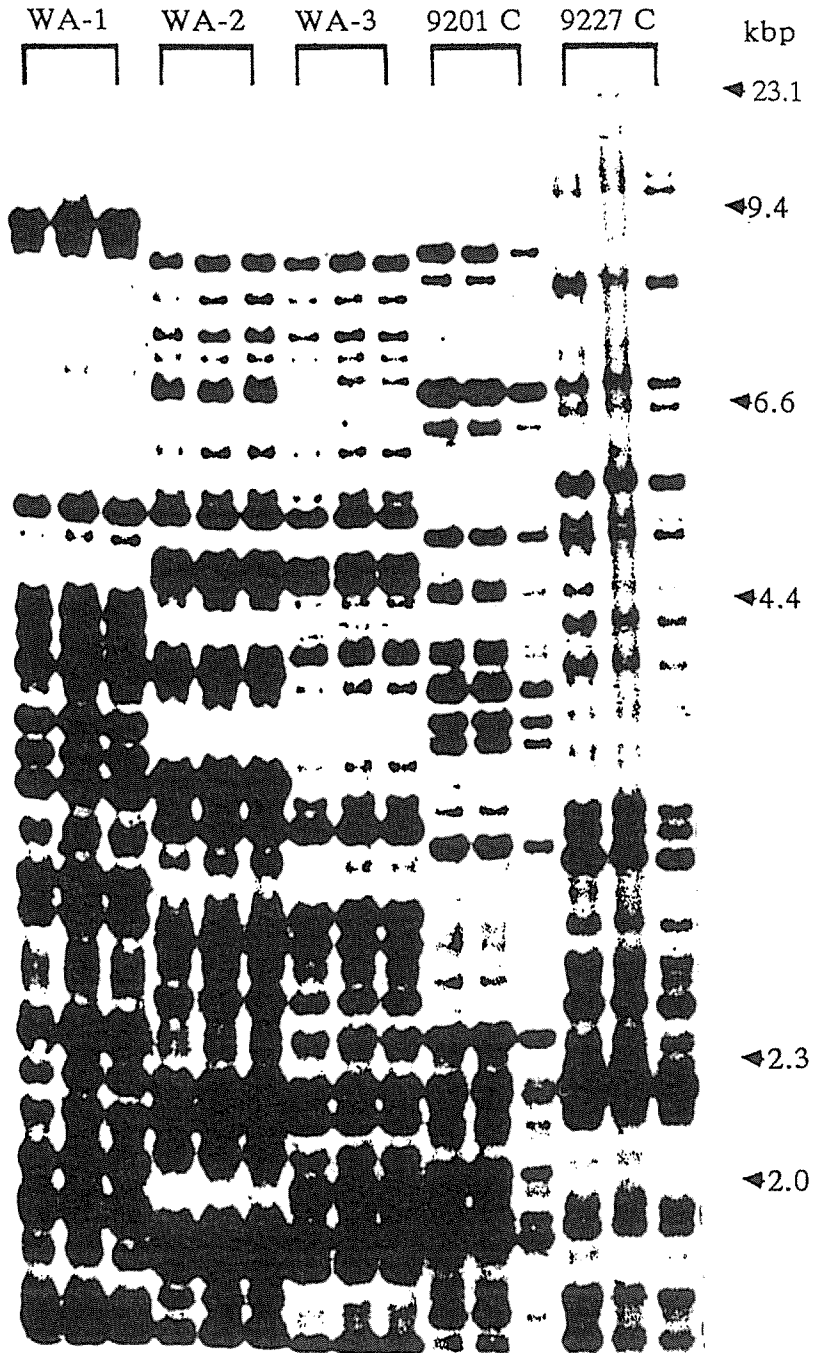


Fig.28-1. DNA fingerprinting of five clonal lines. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, hybridized with radio isotope labelled YNZ 22 probe. Counting from the left, lane 1-3: Clone WA-1, lane 4-6: Clone WA-2, lane 7-9: Clone WA-3, lane 10-12: Clone 9201, lane 13-15: Clone 9227, respectively.

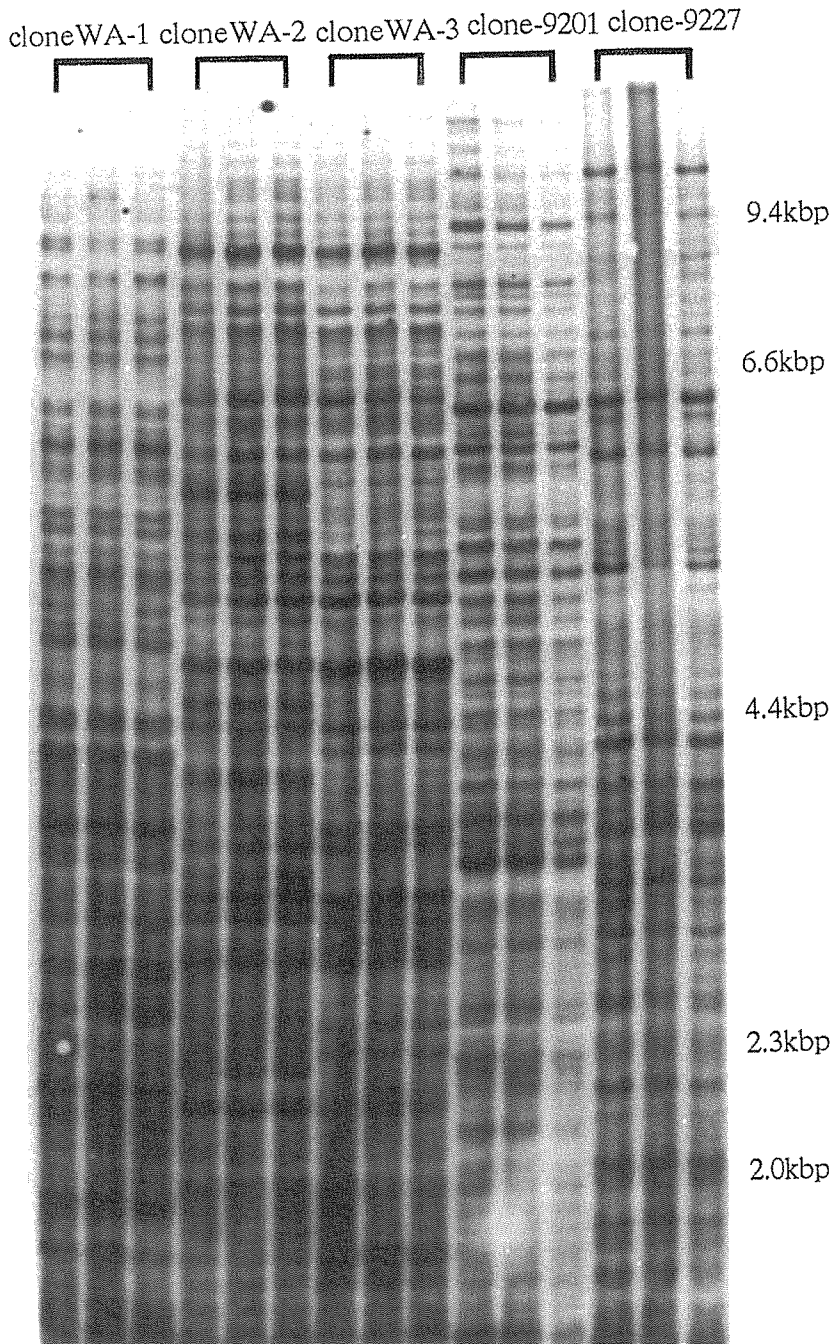


Fig. 28- 2 . DNA fingerprinting of five clonal lines. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, hybridized with alkaline phosphatase labelled 33.15 probe. Counting from the left, lane 1-3: Clone WA-1, lane 4-6: Clone WA-2, lane 7-9: Clone WA-3, lane 10-12: Clone 9201, lane 13-15: Clone 9227, respectively.

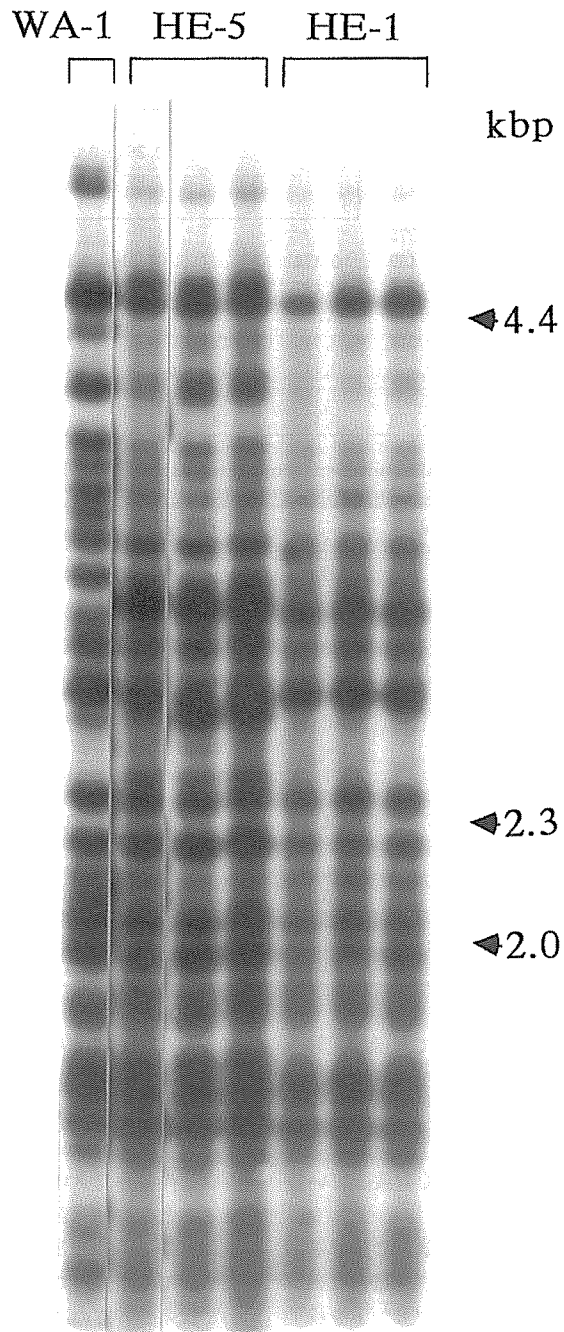


Fig. 29. DNA fingerprinting of the heteroclonal lines. Genomic DNA, which was digested by *Hae* III, hybridized with radio isotope labelled M13 DNA probe. Counting from the left, lane 1: Clone WA-1, lane 2-4: Hetroclone H-5, lane 5-7: Hetroclone H-1, respectively.

Table 18. The value of BSI (Mean \pm SD) between genetically different groups and between individuals estimated from DNA fingerprint pattern detected with M13 phage DNA probe and *Hae* III restriction endonuclease

No.	No. of bands detected	N-CONT				Mitotic-G2N				S. Homo Clone			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	30												
2	29	0.508			0.527 \pm 0.12								
3	29	0.678	0.448						0.363 \pm 0.08				0.421 \pm 0.09
4	27	0.456	0.679	0.393									
5	17	0.383	0.261	0.304	0.273								
6	18	0.292	0.383	0.298	0.489	0.114			0.314 \pm 0.12				0.385 \pm 0.30
7	18	0.333	0.340	0.298	0.311	0.457	0.333						
8	19	0.449	0.500	0.458	0.435	0.333	0.270	0.378					
9	26	0.357	0.473	0.327	0.528	0.140	0.818	0.272	0.311				
10	26	0.357	0.473	0.327	0.528	0.140	0.818	0.272	0.311	1.000			1.000
11	26	0.357	0.473	0.327	0.528	0.140	0.818	0.272	0.311	1.000	1.000		
12	26	0.357	0.473	0.327	0.528	0.140	0.818	0.272	0.311	1.000	1.000	1.000	

Table 19. The value of SI between genetically different groups estimated DNA fingerprinting pattern detected with 33, 15, 33.6 and YNZ 22 probe with *Hae* III restriction endonuclease

	No. of bands detected			WA-1	WA-2	WA-3	9201 C	9227 C
33.15	56	WA-1	1.000					
	49	WA-2	0.220	1.000				
	56	WA-3	0.226	0.820	1.000			
	57	9201C	0.308	0.408	0.442	1.000		
	56	9227C	0.247	0.242	0.309	0.333	1.000	
33.6	53	WA-1	1.000					
	45	WA-2	0.240	1.000				
	47	WA-3	0.283	0.688	1.000			
	46	9201C	0.220	0.234	0.280	1.000		
	47	9227C	0.184	0.217	0.220	0.196	1.000	
YNZ 22	31	WA-1	1.000					
	31	WA-2	0.145	1.000				
	30	WA-3	0.145	0.607	1.000			
	33	9201C	0.296	0.255	0.109	1.000		
	30	9227C	0.157	0.231	0.231	0.278	1.000	

個体による遺伝子型の分離により、集団として遺伝的変異が拡大するという説を支持するものである。また断片の数が17から19本と少ないのは、雌性発生の作出過程で遺伝子型が完全ホモ型となることを意味し、DNAフィンガープリントの断片パターンはG-2Nの理論とよく合致している。

Han et. al. (1992) は初代のクローンの系統内における断片パターンの均質性について報告している。本研究における複数のクローン系統についてフィンガープリントを検出したところ同一系統内において断片パターンは均質で別の系統において断片パターンは異なっていたことからDNAフィンガープリントがクローン識別法として最も精度の

高い方法であると考えられた。また、F₂およびF₄のクローンにおいてもクローン性が確認されたことから同じクローン系統の一部をホルモン処理することにより雄性化し、それをかけあわせ、クローンを作出する方法が一度作出することのできたクローンを半永久的に維持するのに有効であるとともにDNAフィンガープリントが突然変異率の推定に有効であることを示している。また、ヘテロクローンについても系統内でバンドの多型はみられず、系統間においては系統特有の断片が検出され系統を識別することができた。したがって、ヘテロクローンの作出においては第一卵抑制型雌性発生2倍体の卵にニセ雄クローン精子を媒精する方法がヘテロクローンの作出に有効であると考えら

れる。

クローンアユ5系統の遺伝的類似度 (BSI) は雌親が等しいWA-2,3の系統間を除いて低い結果となった。これはそれぞれの系統が遺伝的に関わりのない別の系統であることを反映したものと考えられる。一方、WA-2,3の系統間においてSIが高くなったのは、遺伝的に関わりがあるためと考えられる。

以上の結果として、DNAフィンガープリントはクローンの作出の証明とクローン系統の識別に有効である。DNAフィンガープリントは今後、クローンの血統の鑑別の役割を担うと考えられる。そして、DNAフィンガープリントは個体識別、親子鑑別だけでなく、自然の雌性発生集団の生殖メカニズムや系統の識別および集団の管理の遺伝的マーカーとして広く用いられると考えられる。

第4章 マイクロサテライトDNA多型の遺伝・育種学的研究への応用

I マイクロサテライト遺伝子座の遺伝様式

現在までの20年以上の期間、アイソザイム分析により、様々な魚種の集団構造の解析が行われてきた (Avice & Smith, 1974; Allendorf et al., 1976; Winans, 1980; Waples, 1990)。しかしながらアイソザイム多型は種や地理的に隔離された集団の識別において有効な遺伝マーカーであるものの、地理的に隣接する地理的集団やびん首効果を経験した集団の遺伝的解析においてその感度は十分ではなく (Wright & Benzen, 1994)。DNA 多型による集団解析法の開発が進められてきた (Jeffreys et al., 1985a, b)。そのようなDNA 多型解析法のうち、マイクロサテライト領域は高度の多型を有し (Litt & Luty, 1984; Tauts, 1989; Weber et al., 1989)、魚類においても高度の多型性を示した (Brooker et al., 1994)。また、マイクロサテライト領域はPCRによって直接増幅することができ、対立遺伝子はポリアクリルアミドゲル電気泳動によって1本または2本のバンドとして検出することができ、正確にアレライズを決定することができる。さらに、高度の多型性を有し、簡易で正確な対立遺伝子の解析が可能なマイクロサテライト法を応用することは集団解析における遺伝マーカーとして極めて有効であると考えられる (Estoup et al., 1993)。

本章ではマダイのマイクロサテライト遺伝子座を単離するとともに、これらの遺伝子座の集団解析への有用性を明らかにした。また、単離した遺伝子座が他のタイ科魚種において応用が可能であるかどうかを検討した。

1. 材料および方法

1) 供試魚

マダイ供試魚は1994年に高知、福岡、福井県より各15個体集めた。タイ科魚種の供試魚は1994年にマダイを高知から、チダイを愛媛から、キダイを福井から、ヘダイを高知から、クロダイを香川から、キチスを高知県から各8個体集めた。マダイおよび他魚種のDNA サンプルは血液よりフェノール/クロロフォルム法により抽出し、PCR 解析に用いるまで4℃で保存した。

2) 方法

マイクロサテライトDNA 領域の抽出および多型解析

マイクロサテライトDNA 領域の単離および多型解析は

2章の方法により行ない、マイクロサテライトDNA 領域の塩基配列の決定はマニュアルシーケンスで行なった。

2. 結果

マイクロサテライト遺伝子座の検出と多型性

5つの (GT)_n または (CA)_n 反復配列においてマイクロサテライト遺伝子座の両端にプライマーを設計するのに十分な塩基配列数を持つクローンが見つかり、プライマーを設計することができた (Table 20)。Fig. 30 に M13 のシーケンスラダーをマーカーとした Pma 4 遺伝子座の増幅断片の電気泳動像を示す。プライマーの塩基配列、アニーリング温度、対立遺伝子数、増幅断片の検出範囲、ヘテロ接合体率を Table 20 に示した。5つのマイクロサテライト遺伝子座は高度に多型的であったが、その程度は遺伝子座によって異なった。45個体のマダイ供試魚 (高知、福岡、福井ともに15個体ずつ) を用い、多型の程度について検討したところ、Pma 1 について16対立遺伝子が、Pma 2 について25対立遺伝子が、Pma 3 について23対立遺伝子が、Pma 4 について32対立遺伝子が、Pma 5 について16対立遺伝子が観察された。対立遺伝子の観察された範囲は Pma 1 では115-169bp、Pma 2 では147-219bp、Pma 3 では87-189bp、Pma 4 では87-189、Pma 5 では120-160bp であった。観察されたヘテロ接合体率は Pma 1 では低く0.675であり、Pma 2 では高く0.907であった。Pma 1 は5つの遺伝子座のうち最も変異性が低く、Pma 2 と Pma 3 は対立遺伝子数とヘテロ接合体率において似ており最も変異に富んでいた。Pma 4 は対立遺伝子数は最も高いものとなったが、ヘテロ接合体率は0.711と低かった。Pma 5 は対立遺伝子数および増幅断片の検出範囲は低かったが、ヘテロ接合体率の観察値は Pma 2、3 と同程度であった。

マダイ 3 採集地点の予備的集団遺伝解析

5つのマイクロサテライト遺伝子座における3採集地点のマダイの対立遺伝子頻度を Table 21 に示す。Pma 1 遺伝子座において最も頻度高い対立遺伝子は115であり、0.571から0.682の間の値になった。Pma 2 遺伝子座においていずれの対立遺伝子もその頻度は低く、最も高いものでも0.100から0.133の値となった。他の遺伝子座はそれらの中間の値をとり、頻度の高いものでおよそ0.200から0.300であり、Pma 4 においては最も頻度の高い対立遺伝子は集団ごとに異なった。

5つのマイクロサテライト遺伝子座における3採集地点のマダイの対立遺伝子数、増幅断片の検出される範囲、ヘ

テロ接合体率を Table 22 に示す。対立遺伝子数の平均、ヘテロ接合体率の観察値および期待値の平均は高知の供試魚で最も低く、福井の供試魚において最も高かった。また、ヘテロ接合体率観察値と期待値の割合は高知の供試魚で低く、福井の供試魚で高かった。Pma 4 遺伝子座における高知の供試魚のヘテロ接合体率の観察値は期待値と比較して十分に低く、他の供試魚の観察値と比較しても低かった。マダイマイクロサテライトプライマーの近縁魚種への応用マダイより検出した5つのマイクロサテライトプライマーを近縁のタイ科魚種チダイ、キダイ、ヘダイ、クロダイ、キチヌに適用した。検出されたバンドパターンは同一のPCR条件において多型的、単型的、増幅断片が検出されないものに分類した (Table 23)。Pma 1 遺伝子座は用いた全ての種において多型的であり、Pma 4 遺伝子座はキチヌを除いた魚種について増幅断片が確認されたが、クロダイにおいては単型であり、キダイにおいてはナルアレレがみられた。Pma 2、3 においてはチダイとキダイにおいて多型的であったが、Pma 2 のチダイにおいてナルアレレが観察された。Pma 5 においては他のタイ科魚種において増幅断片は検出されなかった。

3. 論議

マイクロサテライト法は養殖魚の遺伝的管理や天然魚の

集団解析への応用について特に有力な方法となり (McConnell et al., 1995; Ruzzante et al., 1996)、従来の遺伝マーカーでは変異の少なくなった集団やびん首を経験した集団の遺伝解析に有効である (Herbinger et al., 1995)。

マイクロサテライトにみられる変異性はマダイにおけるアロザイム分析と比較して高い。Taniguchi & Sugama, (1990) は日本沿岸の9採集地と東シナ海の2地点の935個体について16遺伝子座を用いて集団解析を行ない、各遺伝子座において平均3.1対立遺伝子であることを示した。本研究において、用いた個体はたった45個体であったものの、マイクロサテライト遺伝子座は平均22.4対立遺伝子であった。ここで見られた高レベルの反復配列数多型は他魚種 (Brooker et al., 1994) においても同様でこのようなマイクロサテライト遺伝子座はマダイの野生集団の地理的分化や孵化場における遺伝的変化の解明に有効であろう。

3採集地のマダイの比較において、遺伝的変異性は高知において低く、福井において高い傾向がみられた。Pma 1 と Pma 4 遺伝子座の高知のマダイのヘテロ接合体率の観察値は0.455、0.467とそれぞれ低かった。Pma 1 遺伝子座のヘテロ接合体率の観察値は期待値とよく相関した。しかしながら、Pma 4 遺伝子座のヘテロ接合体率の観察値は期待値より低いものとなり、この集団においてナルアレレが存在が示唆され、今後、より詳細な研究を行なう必要がある。

Table 20. Nucleotide sequence, allele size, heterozygosity at red sea bream microsatellite loci detected by PCR amplification in 45 individuals

Primer	Sequence 5'-3'	Tann (C) *3	No. of alleles	Size (bp) *4	Heterozygosity
Pma 1	(GT)21 F*1 TTCCAATGTGCCTTTATGC R*2 CAAATTCCCAAGGTCATCC	48	16	115-169	Ho=0.675 He=0.600 Ho/He=1.125
Pma 2	(GT)24 F AGAGGTGAGGACAAAGAG R TCTTGAACACTCTCCTCACAG	54	25	147-219	Ho=0.889 He=0.947 Ho/He=1.939
Pma 3	(CA)20 F GGGTTAGCAAGAGAAAGGG R TAAACATGACAACTGAGGTG	51	23	87-189	Ho=0.711 He=0.905 Ho/He=1.001
Pma 4	(CA)14 F GTTGGCTCGGTCTAAAGTC R TCTCCACTCCGTATTGCTC	53	32	99-255	Ho=0.711 He=0.905 Ho/He=0.786
Pma 5	(GT)22 F TCGGATTGAGTATCTTGGG R AGGTTCTCCGTCACTGTCC	49	16	121-160	Ho=0.881 He=0.887 Ho/He=0.993

F*1=forward primer. R*2=reverse primer. *3=Annealing temperature. *4=Estimated size of the PCR fragment when compared with M31 sequence fragments of known length.

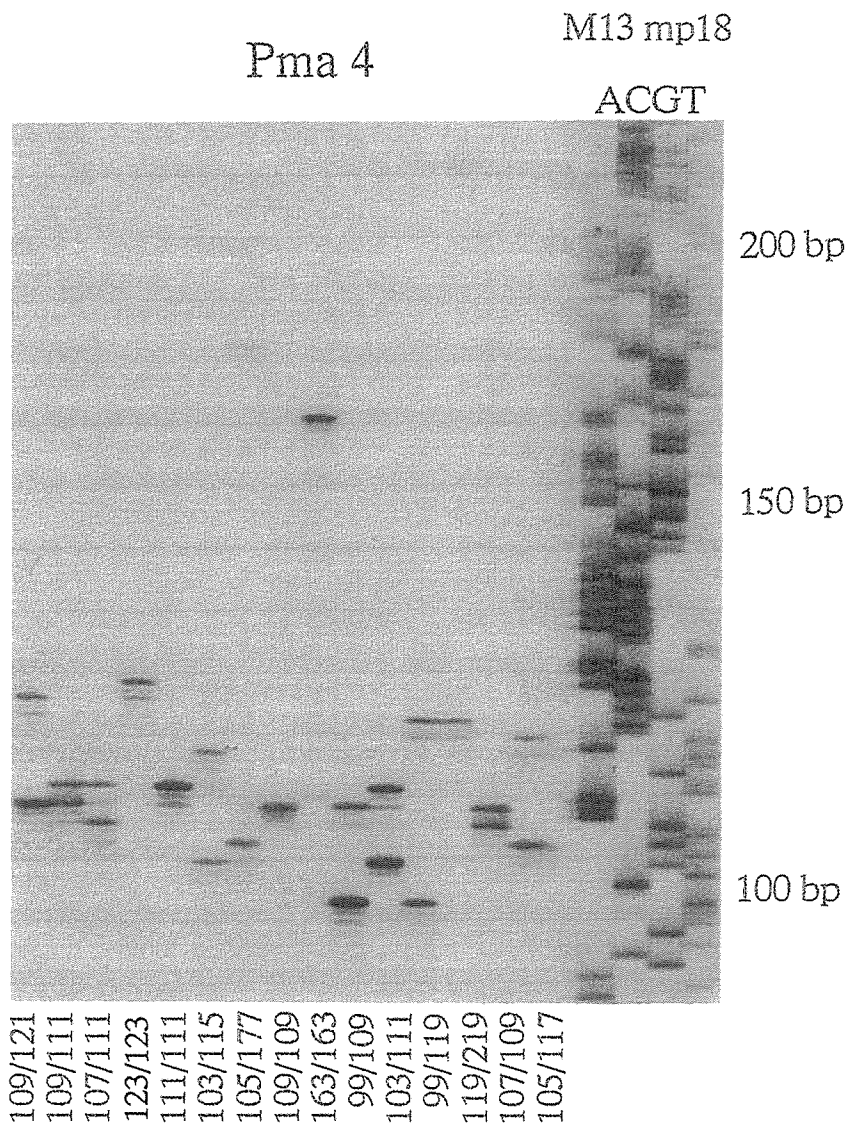


Fig. 30. Microsatellite variation in Pma 4 with 15 individuals of *Pagrus major*. Genotype shown in bottom of figure. The size standard is a sequence ladder of M13 mp18.

また、本研究において各採集地の供試個体数は少なく、多くの個体を用い、て日本沿岸の人為的影響による野生集団の遺伝的变化についてより精査を行なう必要があると考えられる。

マダイより単離した5つのマイクロサテライトプライマーをタイ科他魚種において応用できるかどうか検討した。

プライマーの有用性は遺伝子座と種によって異なり、用いることのできるプライマー組の数はマダイにより近縁な魚種ほど多くなった。用いることのできるプライマー数の魚類による差は、形態学、アイソザイム分析、RAPD-PCR分析(庄司ら, 1995)と同様の結果となり、プライマー配列の保持の度合は種の分化を反映しているかもしれない。

Table 21. Allele frequency of five polymorphic microsatellite loci in three local populations in red sea bream

Allele	Pma 1			Pma 2			Pma 3			Pma 4			Pma 5						
	Kochi	Fukuoka	Fukui	Allele	Kochi	Fukuoka	Fukui	Allele	Kochi	Fukuoka	Fukui	Allele	Kochi	Fukuoka	Fukui	Allele	Kochi	Fukuoka	Fukui
169	0.045	0.000	0.036	219	0.000	0.033	0.000	189	0.067	0.000	0.000	255	0.000	0.000	0.033	161	0.000	0.036	0.000
153	0.000	0.033	0.000	217	0.000	0.000	0.033	137	0.033	0.000	0.000	247	0.000	0.000	0.033	157	0.000	0.036	0.000
145	0.000	0.000	0.036	213	0.033	0.033	0.000	135	0.033	0.000	0.077	237	0.067	0.000	0.000	155	0.000	0.000	0.033
143	0.045	0.000	0.000	211	0.000	0.000	0.033	131	0.000	0.000	0.038	223	0.000	0.000	0.033	151	0.038	0.036	0.033
141	0.000	0.000	0.036	203	0.000	0.000	0.067	125	0.000	0.000	0.038	219	0.000	0.033	0.000	147	0.115	0.071	0.033
139	0.000	0.033	0.000	201	0.000	0.067	0.000	123	0.033	0.100	0.038	205	0.000	0.000	0.033	143	0.077	0.036	0.100
137	0.045	0.033	0.000	199	0.067	0.033	0.000	121	0.033	0.000	0.038	199	0.033	0.000	0.000	141	0.038	0.036	0.067
135	0.000	0.067	0.000	197	0.033	0.000	0.067	119	0.067	0.033	0.000	193	0.000	0.000	0.033	139	0.038	0.000	0.100
133	0.000	0.000	0.071	195	0.000	0.033	0.033	117	0.000	0.067	0.038	177	0.000	0.033	0.000	137	0.000	0.107	0.067
129	0.045	0.000	0.071	193	0.067	0.000	0.033	115	0.000	0.033	0.000	171	0.067	0.000	0.033	135	0.038	0.143	0.033
127	0.000	0.000	0.071	189	0.100	0.000	0.067	113	0.033	0.000	0.000	169	0.033	0.000	0.000	133	0.154	0.143	0.033
125	0.045	0.033	0.036	187	0.033	0.033	0.033	111	0.000	0.033	0.038	163	0.000	0.067	0.000	131	0.000	0.071	0.067
121	0.045	0.000	0.000	185	0.033	0.000	0.067	109	0.000	0.033	0.038	155	0.033	0.000	0.000	129	0.231	0.250	0.333
119	0.045	0.000	0.000	183	0.067	0.100	0.000	107	0.000	0.067	0.000	151	0.000	0.000	0.033	125	0.115	0.000	0.033
117	0.000	0.167	0.071	181	0.100	0.033	0.000	105	0.067	0.167	0.038	149	0.000	0.000	0.033	123	0.115	0.000	0.067
115	0.682	0.633	0.571	179	0.000	0.100	0.167	103	0.300	0.033	0.231	143	0.033	0.000	0.000	121	0.038	0.037	0.000
				177	0.067	0.067	0.033	101	0.067	0.033	0.077	135	0.000	0.000	0.033				
				175	0.133	0.133	0.100	99	0.067	0.100	0.000	127	0.033	0.000	0.000				
				173	0.033	0.000	0.000	97	0.067	0.100	0.077	125	0.033	0.000	0.067				
				171	0.067	0.133	0.033	95	0.000	0.033	0.000	123	0.000	0.067	0.033				
				169	0.000	0.067	0.133	93	0.033	0.033	0.038	121	0.067	0.033	0.000				
				167	0.000	0.033	0.033	89	0.033	0.033	0.038	119	0.000	0.067	0.000				
				159	0.000	0.067	0.033	87	0.067	0.100	0.154	117	0.000	0.033	0.033				
				157	0.167	0.000	0.033					115	0.033	0.033	0.033				
				149	0.000	0.033	0.000					113	0.000	0.000	0.067				
												111	0.100	0.100	0.067				
												109	0.300	0.267	0.200				
												107	0.033	0.067	0.033				
												105	0.133	0.067	0.100				
												103	0.000	0.067	0.033				
												101	0.000	0.000	0.033				
												99	0.000	0.067	0.000				

Table 22. Genetic variability of five microsatellite loci in three lots of red sea bream

		Pma 1	Pma 2	Pma 3	Pma 4	Pma 5	Mean
							(within population)
Kochi	No. of samples	(11)	(15)	(15)	(15)	(13)	
	No. of allele	8	14	15	14	11	12.4
	Heterozygosity (Ho)	0.455	0.867	0.867	0.467	0.846	0.702
	(He)	0.521	0.914	0.871	0.852	0.876	0.807
	(Ho/He)	0.873	0.949	0.995	0.548	0.966	0.870
Fukuoka	No. of samples	(15)	(15)	(15)	(15)	(14)	
	No. of allele	7	16	16	14	12	13.0
	Heterozygosity (Ho)	0.667	0.867	0.933	0.793	0.786	0.798
	(He)	0.566	0.918	0.924	0.882	0.867	0.831
	(Ho/He)	1.178	0.944	1.010	0.899	0.907	0.960
Fukui	No. of samples	(14)	(15)	(13)	(15)	(15)	
	No. of allele	11	17	15	20	13	15.2
	Heterozygosity (Ho)	0.857	0.933	0.923	0.933	1.000	0.928
	(He)	0.650	0.916	0.891	0.935	0.954	0.869
	(Ho/He)	1.318	1.019	1.036	0.998	1.048	1.068

Table 23. Detection of microsatellite loci in Sparid species using primers of red sea bream

species	locus				
	Pma 1	Pma 2	Pma 3	Pma 4	Pma 5
<i>P. major</i>	P	P	P	P	P
<i>E. japonica</i>	P	P*	P	P	—
<i>D. tumifrons</i>	P	P	P	P*	—
<i>S. sarda</i>	P	—	—	P	—
<i>A. schlegeli</i>	P	—	—	M	—
<i>A. latus</i>	P	—	—	—	—

P=polyomorphic ($P \leq 0.995$); M=monomorphic; P*=null allele was detected

他魚種においても増幅断片を検出することのできるプライマーはそれらの種の集団解析に用いることができ、それぞれの種ごとのマイクロサテライト遺伝子座の単離に要する時間と費用を省くことができると考えられる。

これらのマイクロサテライト遺伝子座は高度に多型性を示し、PCR法を基礎とし、簡易で費用をさほど要しないことから、これからの地理的集団の遺伝解析や養殖系統の遺伝的管理に広く用いられるようになるであろう。

II 養殖系統の遺伝変異保有量の変化

水産業は改良品種に依存する農業や畜産業と異なり、天然集団に依存して生産をあげてきた。しかし、天然集団の資源量の減少にともない、高級魚を中心に養殖生産が急速に増加している (FAO, 1995; Tacon, 1996)。一方、減少した天然資源を回復する目的で種苗の放流が各都道府県において行われている (水産庁 & 日裁協, 1996)。したがって、今後の適正な育種計画をたてるうえで天然集団の遺伝的構成、それに变化を与え得る放流用系統の遺伝的特性および養殖系統の遺伝的特性を把握することは極めて重要な課題となっている (FAO, 1993)。

これまでマダイ集団においてアイソザイム分析が行われ、天然魚と人工種苗間の遺伝的差異 (谷口と田島, 1978)、人工種苗における変異性の減退 (Sugama et al., 1988b)、また天然魚各標本群間の遺伝的分化 (Taniguchi & Sugama, 1990) について研究がなされている。しかし、アイソザイムマーカーは集団の変異の減退や野生集団の構造解析においては必ずしも十分な感度を備えていなかった (Park & Moran 1994)。

本研究では、マイクロサテライトマーカーを用いてマダイの天然魚、放流用種苗および養殖系統について遺伝変異保有量の推定を行ない、マイクロサテライト DNA 多型の集団解析における有効性について検討した。

1. 材料および方法

1) 供試魚

供試魚として放流用マダイ系統および養殖用マダイを用いた。放流用系統 (S 1) は天然マダイ (高知, 徳島) を起源とした継代交配 2 代目を用いた。養殖用系統 (S 2-S 5) は各種苗生産施設で保持されている人工種苗を用いた。S 2 は S 3 の 4 代目を起源とし、独自に選択した 3 代目, S 3 は和歌山産天然マダイを独自に選択育種した 7 代目, S 4 は玄海灘産天然マダイを起源とした選択育種 2 代目, S 5 は韓国産マダイと瀬戸内海産天然マダイの交雑種を起源とする選択育種 4 代目を用いた。なお、対照として福井および福岡産の天然マダイを合わせて 30 個体を用いた。

2) 方法

マイクロサテライト DNA 多型解析法は 2 章の方法に従った。

2. 結果

マイクロサテライトの Pma 2 遺伝子座の S 1 と S 3 の泳動像を Fig. 31 に示す。継代数を重ねた養殖系統の S 3 において対立遺伝子数の減少およびその検出範囲の減少がみられた。

検出された増幅断片に基づいて求めた 5 つのマイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子頻度を Table 24 に示した。天然集団および放流用系統の S 1、養殖系統の S 4、S 5 において検出された対立遺伝子数は多く、頻度が全体に分布しているのに対して S 2 と S 3 において対立遺伝子数が少ない傾向が見られた。また、いずれの遺伝子座においても S 2 と S 3 において共有度の高い対立遺伝子がみられた。

天然集団、放流用系統および各養殖系統の遺伝的変異水準を比較するため、5 つのマイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子数およびヘテロ接合体率を Table 25 に示した。

いずれの遺伝子座においても天然魚、放流用系統のS1および養殖系統のS4、S5で対立遺伝子数が多く、5つのローサイにおける対立遺伝子数の平均は天然魚で19.8、S1で17.8、S4で16.8、S5で14.4であるのに対してS2で9.4、S3では7.4と対立遺伝子数の減少がみられた。一方、5つの遺伝子座におけるヘテロ接合体率（観察値）の平均は天然魚およびS4、S5において最も高く（0.869、0.846、0.859）、S3において最も低く（0.684）、放流用系統およびS2はその中間の（0.773、0.780）であった。なお、S3を除く他の系統でPma3遺伝子座のヘテロ接合体

率（観察値）は0.839-0.933と高かったが、S3のPma3遺伝子座の対立遺伝子103遺伝子の遺伝子頻度は0.817と極めて高い値を示し、また、ホモ接合を示す個体が多かったため、ヘテロ接合体率（観察値）は0.333と極めて低い値を示した。

5つのマイクロサテライト遺伝子座の遺伝子頻度分布にみられた系統間の類似性の指標として遺伝的距離（D）を算出し、UPGMA法によりデンドログラムを作成したところ、S2とS3において遺伝的距離は近く、同じクラスターを形成した（Fig. 32）。

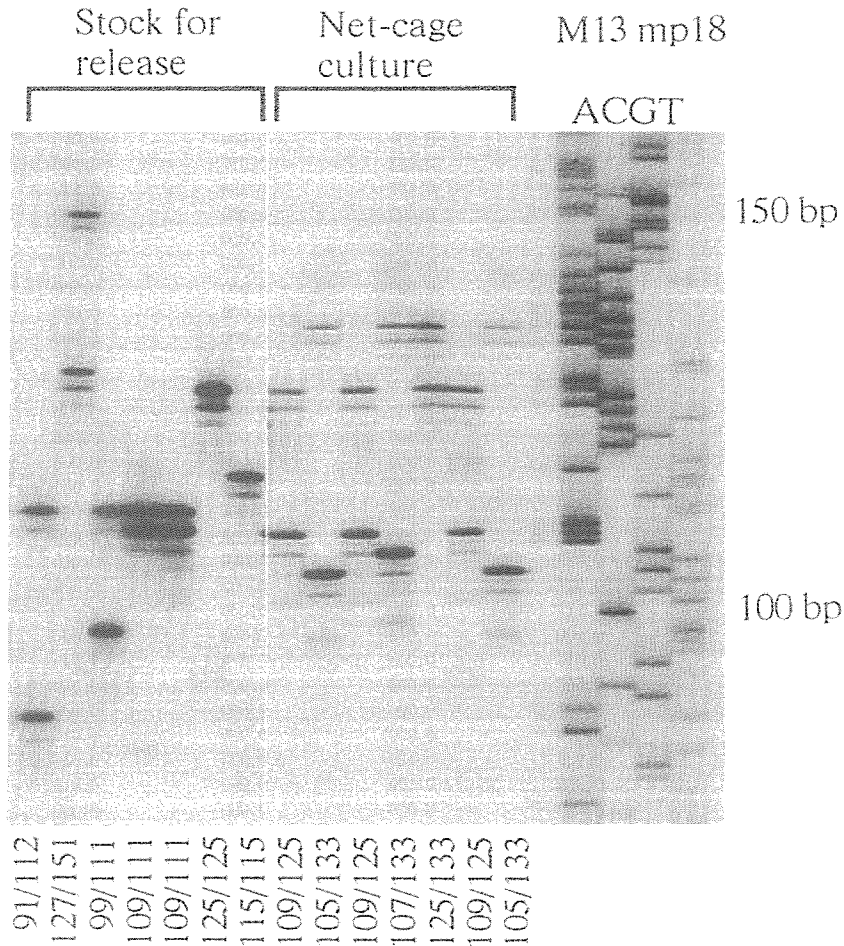


Fig. 31. Microsatellite variation in Pma 4, in 7 individuals of *Pagrus major*. Stock for release (left) and Net-cage culture (right). Genotype shown in bottom of figure. The size standard is a sequence ladder of M13 mp18.

Table 24. Allele frequencies for 5 microsatellite loci in five cultured red sea bream strains

Locus	Allele (bp)	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
Pma 1	173	0.000	0.000	0.000	0.045	0.000
	171	0.000	0.000	0.050	0.000	0.015
	157	0.017	0.000	0.000	0.030	0.000
	145	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
	141	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000
	139	0.034	0.100	0.000	0.000	0.000
	137	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	135	0.086	0.067	0.133	0.061	0.067
	131	0.069	0.267	0.417	0.030	0.133
	129	0.052	0.000	0.000	0.000	0.017
	127	0.052	0.000	0.000	0.000	0.000
	125	0.052	0.000	0.000	0.015	0.017
	123	0.017	0.000	0.000	0.045	0.000
	121	0.017	0.000	0.000	0.061	0.000
	119	0.000	0.000	0.000	0.045	0.050
	117	0.069	0.083	0.017	0.136	0.100
	Pma 2	115	0.517	0.467	0.383	0.530
214		0.017	0.000	0.000	0.000	0.016
213		0.000	0.000	0.000	0.000	0.016
212		0.033	0.000	0.000	0.000	0.047
209		0.050	0.000	0.000	0.000	0.016
207		0.017	0.000	0.000	0.000	0.031
204		0.000	0.000	0.000	0.000	0.016
203		0.000	0.000	0.000	0.015	0.000
199		0.000	0.000	0.000	0.076	0.000
198		0.000	0.000	0.000	0.030	0.000
197		0.000	0.000	0.000	0.045	0.000
196		0.033	0.000	0.000	0.000	0.000
194		0.017	0.000	0.000	0.000	0.016
193		0.000	0.000	0.016	0.030	0.016
192		0.000	0.000	0.016	0.000	0.000
190		0.033	0.000	0.000	0.015	0.000
189		0.017	0.000	0.000	0.015	0.000
188		0.117	0.000	0.000	0.030	0.000
186		0.000	0.078	0.000	0.000	0.000
185		0.017	0.203	0.274	0.045	0.016
184	0.067	0.094	0.000	0.030	0.000	
183	0.017	0.000	0.000	0.000	0.063	
182	0.000	0.000	0.000	0.015	0.047	
181	0.033	0.125	0.323	0.030	0.188	
180	0.033	0.109	0.065	0.015	0.047	
179	0.000	0.000	0.000	0.030	0.000	
178	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	
177	0.017	0.016	0.000	0.000	0.000	
176	0.067	0.000	0.000	0.015	0.125	
175	0.017	0.000	0.097	0.000	0.063	

Table 24(continued).

Locus	Allele (bp)	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
	174	0.050	0.047	0.065	0.015	0.000
	173	0.050	0.094	0.048	0.045	0.016
	172	0.000	0.031	0.065	0.061	0.078
	171	0.033	0.031	0.016	0.045	0.047
	170	0.083	0.016	0.000	0.061	0.000
	169	0.067	0.000	0.000	0.030	0.047
	167	0.033	0.000	0.000	0.015	0.000
	165	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000
	160	0.000	0.000	0.000	0.030	0.000
	157	0.000	0.016	0.000	0.076	0.000
	156	0.017	0.016	0.016	0.076	0.047
	155	0.033	0.031	0.000	0.061	0.031
	153	0.000	0.094	0.000	0.000	0.000
	152	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016
	149	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000
	148	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000
Pma 3	155	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000
	153	0.000	0.000	0.000	0.047	0.017
	137	0.000	0.000	0.000	0.031	0.050
	133	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000
	129	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
	125	0.032	0.056	0.000	0.000	0.017
	123	0.048	0.259	0.017	0.000	0.033
	121	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000
	119	0.000	0.000	0.000	0.094	0.100
	117	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000
	115	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033
	113	0.016	0.019	0.000	0.047	0.017
	111	0.048	0.000	0.033	0.125	0.000
	109	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
	107	0.129	0.037	0.000	0.125	0.067
	105	0.016	0.000	0.000	0.078	0.170
	103	0.097	0.296	0.817	0.125	0.267
	101	0.097	0.111	0.050	0.016	0.167
	99	0.129	0.000	0.050	0.016	0.083
	97	0.081	0.148	0.017	0.063	0.083
	95	0.048	0.056	0.000	0.016	0.000
	93	0.065	0.000	0.000	0.000	0.017
	89	0.081	0.000	0.000	0.047	0.017
	87	0.000	0.019	0.017	0.094	0.017
Pma 4	251	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
	241	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031
	205	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000
	185	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000
	179	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000
	169	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031

Table 24(continued).

Locus	Allele (bp)	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5
	165	0.033	0.000	0.000	0.047	0.000
	153	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000
	151	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
	149	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000
	147	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
	145	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000
	135	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	133	0.017	0.250	0.238	0.000	0.016
	129	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000
	127	0.067	0.000	0.000	0.000	0.016
	125	0.033	0.109	0.190	0.000	0.313
	123	0.017	0.000	0.063	0.031	0.156
	121	0.000	0.000	0.063	0.031	0.000
	119	0.000	0.000	0.000	0.078	0.000
	117	0.000	0.000	0.000	0.016	0.016
	115	0.067	0.000	0.000	0.031	0.000
	113	0.000	0.000	0.048	0.031	0.016
	111	0.233	0.031	0.000	0.078	0.078
	109	0.217	0.297	0.270	0.047	0.266
	107	0.000	0.109	0.032	0.016	0.016
	105	0.017	0.000	0.079	0.391	0.000
	103	0.033	0.109	0.000	0.000	0.031
	101	0.050	0.016	0.000	0.031	0.000
	99	0.050	0.000	0.000	0.078	0.000
	91	0.017	0.047	0.000	0.000	0.016
Pma 5	165	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016
	155	0.000	0.000	0.000	0.016	0.032
	153	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016
	151	0.081	0.145	0.129	0.047	0.097
	149	0.016	0.000	0.000	0.047	0.016
	147	0.048	0.000	0.000	0.141	0.032
	145	0.097	0.113	0.129	0.000	0.081
	143	0.048	0.161	0.290	0.063	0.194
	141	0.032	0.000	0.000	0.063	0.016
	139	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
	135	0.048	0.016	0.000	0.063	0.032
	133	0.048	0.000	0.000	0.016	0.000
	131	0.161	0.016	0.113	0.031	0.016
	129	0.097	0.000	0.000	0.141	0.000
	127	0.177	0.452	0.306	0.219	0.242
	125	0.048	0.065	0.032	0.047	0.013
	123	0.000	0.032	0.000	0.016	0.000
	121	0.065	0.000	0.000	0.078	0.065
	119	0.000	0.000	0.000	0.160	0.000
	113	0.016	0.000	0.000	0.000	0.016

Table 25. Allelic number and heterozygosity for five microsatellite loci in five cultured Red sea bream strains

	Pma 1	Pma 2	Pma 3	Pma 4	Pma 5	Mean
Natural population						
No. of sample	(29)	(30)	(28)	(30)	(29)	
No. of allele	13	24	20	26	16	19.8
Size (bp)	115-169	149-219	87-135	99-255	121-161	
Ho.	0.762	0.900	0.928	0.863	0.893	0.869
He.	0.608	0.917	0.908	0.909	0.911	0.851
Ho./He.	1.253	0.981	1.022	0.949	0.980	1.037
S1						
No. of sample	(29)	(30)	(31)	(30)	(31)	
No. of allele	12	26	17	19	15	17.8
Size (bp)	115-157	155-214	89-129	91-251	113-151	
Ho.	0.552	1.000	0.839	0.667	0.806	0.773
He.	0.705	0.946	0.918	0.876	0.900	0.869
Ho./He.	0.783	1.057	0.914	0.761	0.896	0.882
S2						
No. of sample	(30)	(32)	(27)	(32)	(31)	
No. of allele	6	15	9	9	8	9.4
Size (bp)	115-141	153-186	87-125	91-185	123-151	
Ho.	0.833	0.844	0.852	0.563	0.806	0.780
He.	0.689	0.893	0.802	0.809	0.736	0.786
Ho./He.	1.209	0.945	1.062	0.696	1.095	1.002
S3						
No. of sample	(30)	(31)	(30)	(31)	(31)	
No. of allele	5	11	7	8	6	7.4
Size (bp)	115-171	156-193	87-123	105-135	127-151	
Ho.	0.700	0.839	0.333	0.839	0.710	0.684
He.	0.659	0.769	0.326	0.817	0.775	0.669
Ho./He.	1.062	1.091	1.021	1.027	0.916	1.024
S4						
No. of sample	(33)	(33)	(32)	(32)	(32)	
No. of allele	10	29	14	16	15	16.8
Size (bp)	151-173	143-203	87-155	99-205	119-155	
Ho.	0.697	1.000	0.906	0.656	0.969	0.846
He.	0.685	0.954	0.913	0.815	0.886	0.851
Ho./He.	1.018	1.048	0.922	0.805	1.094	0.991
S5						
No. of sample	(30)	(32)	(30)	(32)	(31)	
No. of allele	8	22	14	13	15	14.4
Size (bp)	115-171	152-214	87-153	91-241	113-165	
Ho.	0.833	0.969	0.933	0.719	0.839	0.859
He.	0.724	0.918	0.866	0.797	0.863	0.834
Ho./He.	1.151	1.056	1.077	0.902	0.972	1.032

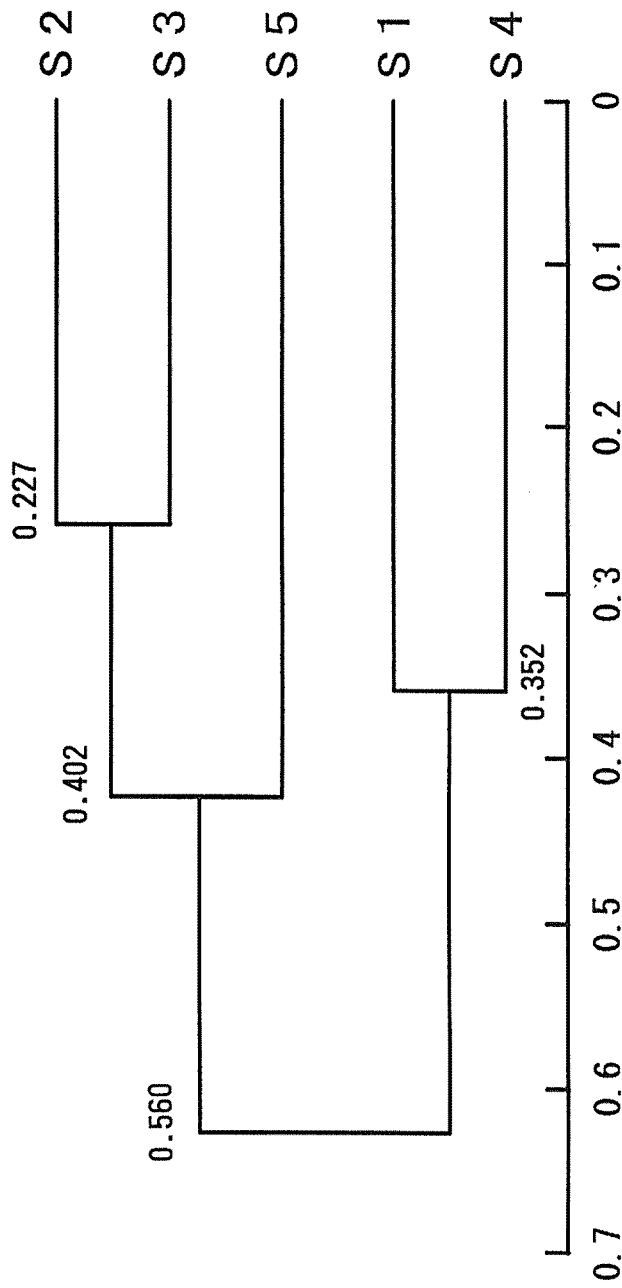


Fig. 32. A dendrogram based on the genetic distances between pairs of 5 strains of red sea bream.

3. 論議

天然集団の遺伝的構成に変化を与え得る放流用系統の遺伝的特性の把握することは栽培漁業を推し進めていくうえで極めて重要な課題となっている。また、養殖業において養殖系統の遺伝的特性を把握することは、適正な育種計画をたてるうえで不可欠である。これまで放流用種苗および養殖系統の遺伝的管理においてアイソザイム分析が行われてきたが、必ずしも感度が高いとはいえず、変異の減退した集団の遺伝解析には不十分であった。本研究に用いた5種のマダイマイクロサテライト遺伝子座はそれぞれ各供試系統において対立遺伝子数、ヘテロ接合体率ともにほぼ同様の結果を示した。このことは、マダイのマイクロサテライトDNA多型分析において求められた対立遺伝子数、ヘテロ接合体率が遺伝的変異保有量を示す指数として極めて信頼度が高いことを示している。

一般に近交度の高い選択系集団において変異の縮小により、対立遺伝子数およびヘテロ接合体率の減少が予想される。本研究で用いた供試魚は5つのマイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子数の平均は天然魚で最も高く19.8であり、続いて放流用種苗の17.8であり、継代の進んでいない養殖系統S4、S5においてはやや少なく16.8、14.4であったのに対して、継代数が7代目を数える選択系のS2、S3では9.4、7.4と著しく低かった。これは採卵時のピン首効果により、低頻度対立遺伝子が消失したことによると考えられる。一方、ヘテロ接合体率（観察値）の平均は天然魚の0.869と比較してS3は0.684と変異性が低下しているもののその割合は小さく、他の系統においてはヘテロ接合体率（観察値）の平均は相対的に高かった。これらのことは採卵の際に低頻度対立遺伝子が消失したものの、ヘテロ接合体率は比較的高く、顕著な近交が起こっていないものと考えられ、先のアイソザイム（谷口ら、1995）およびマルチローカスDNAフィンガープリントの結果とよく対応した。

各系統ごとにみると放流用種苗のS1とS4は継代2代目であり、ほとんど近交が進んでいないことを反映したものと考えられる。また、S1のヘテロ接合体率の観察値（ H_o ）と期待値（ H_e ）の割合（ H_o/H_e ）が低かったのは、採卵水槽において実際に受精に関与する親魚数が見かけの個体数とは異なり実際には少ないことによるかもしれない。S5は韓国産マダイと日本産マダイの交雑育種によるものであり、継代数が4代を数えるもののヘテロ接合体率が高いのは交雑育種におけるヘテロ接合体率の増加によるもの

と推測された。一方、S2とS3において対立遺伝子数が著しく減少しているものの、継代7代目にもかかわらず、ヘテロ接合体率が高いことは採卵時に用いられる親魚数が多いことを示唆すると考えられる。

S3においてヘテロ接合体率（観察値）の平均が低下したことはPma3遺伝子座について極端にヘテロ接合体率が減少したためであり、選択した形質に関与する遺伝子に連鎖している可能性が考えられる。また、S2とS3の遺伝子頻度分布が似ており遺伝的距離のデンドログラムにおいて同じクラスターを形成したのはSとS3の起源が等しいことを反映している。

このように、遺伝変異の追跡調査のマーカーとしてマイクロサテライトDNA多型は有効であることが明らかになった。これまでのアイソザイム多型と比較して極めて感度が高く、マルチローカスのミニサテライトDNA多型と異なり、遺伝子座別の変異性の分析が可能なシングルローカス多型であるマイクロサテライトDNA多型は今後の放流用種苗の種苗生産計画および放流計画のあり方や養殖系統の種苗生産計画や系統の維持管理における遺伝的変異の強力な追跡調査マーカーとして有益な示唆を与えるであろう。

III 絶滅危惧集団の変異性の評価

両側回遊型アユ資源の減少にともない、各地の河川で琵琶湖の陸封型アユの放流が行なわれている。陸封型アユは両側回遊型アユと比較して産卵期が1月程度はやく交雑をおこしにくく、また、孵化後、降海した仔魚は湖の水温と比較して高く生理的に生残が困難なため再生産に関与しないと考えられているが、このような現象がいつまでも続くとは限らない（西田、1989）。そのため、両品種の識別が必要であるが、形態的な差異による識別は難しい。また、亜種のリウキュウアユは絶滅が危惧されており、遺伝的変異性の把握が必要である。そのような背景から、アユ集団においてアイソザイム分析が行なわれ、両側回遊型と陸封型の遺伝的分化（谷口ら、1983）、西南日本における集団間の遺伝的分化（関と谷口、1985）、放流湖産アユの追跡（関と谷口、1988a）、日本および韓国産アユの分化（関ら、1988b）、放流アユ混合率の季節的変動（Seki et al., 1994）や亜種の琉球アユの分化および遺伝変異保有量（関ら、1988c）、琉球アユの河川間分化（Sawashi & Nishida et al., 1994）などの研究が行なわれている。また、ミトコンドリアDNAを用いた研究も行なわれている。（Pastene et

al., 1991) しかし、アイソザイムマーカーは集団の変異の減退や野生集団の構造解析においては必ずしも十分な感度を備えておらず、高率の遺伝変異をそなえるマーカーの開発が望まれている。

本研究では、高感度の遺伝マーカーであるマイクロサテライトDNA多型について注目し、アユ *Plecogrossus altivelis* のGTマイクロサテライト領域を単離するとともに、その多型性および遺伝的マーカーとしての可能性について検討し、海産アユ、湖産アユ、琉球アユにおいて多型解析を行ったので報告する。

1. 材料および方法

1) 供試魚

アユ供試魚として1994年に高知県土佐湾で採集した両側回遊型、琵琶湖産の陸封型、リュウキュウアユ供試魚として1993年に採集した奄美大島の山間川(20個体)および河内川産(20個体)の2集団(3章参照)をそれぞれ17-31個体用いた。

2) 方法

マイクロサテライトの単離およびPCRによる多型解析は2章の方法により行ない、マイクロサテライトDNA領域の塩基配列の決定はオートシーケンスで行なった。

2. 結果

マイクロサテライト遺伝子座の検出と多型性

(GT) n または (CA) n の反復配列においてマイクロサテライト遺伝子座の両端にプライマーを設計するのに十分な塩基配列を持つクローンが見つかり、プライマーを設計することができ、7マイクロサテライト遺伝子座を単離することができた(Table 26)。また、プライマーの塩基配列、アニーリング温度、対立遺伝子数、増幅断片の検出範囲、ヘテロ接合体率を Table 26 に示した。7つの対立遺伝子は高度に多型的であったが、その程度は遺伝子座によって異なった。30個体の高知(土佐湾)産の両側回遊型アユを用い、多型の程度について検討したところ、Pal 1 から Pal 4 について15、14、16、21、と対立遺伝子数が多かったのに対して Pal 5 においては対立遺伝子数が2と低く、Pal 6 および Pal 7 については9、6と中程度の対立遺伝子数が観察された。観察されたヘテロ接合体率(観察値)は Pal 1-4 で高く1.000、0.921、0.821、0.828と高かったのに対して Pal 5 においてはヘテロ接合体率(観察

値)が2と低く、Pal 6 および Pal 7 については0.679、0.640と中程度のヘテロ接合体率が観察された。遺伝的多型性の指標である対立遺伝子数とヘテロ接合体率は同様の傾向を遺伝子座ごとに同様の傾向を示し、Pal 1 から Pal 4 において高く、Pal 5 において低く、pal 6 および pal 7 において中程度の値を示した。

両側回遊型、陸封型およびリュウキュウアユ2集団の遺伝的多様性

両側回遊型、陸封型、リュウキュウアユ2集団の7マイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子数およびヘテロ接合体率を Table 27 に示した。陸封型アユにおいても各遺伝子座が示す多型性の程度は両側回遊型アユと同様であり、Pal 1-4 で高いのにたいして、Pal 5 で低く、Pal 6,7 で中程度であった。両側回遊型および陸封型アユの遺伝変異保有量において、7つのマイクロサテライトの遺伝子座の対立遺伝子数およびヘテロ接合体率の平均において差異はみられず、対立遺伝子数の平均は11.9、11.1、ヘテロ接合体率(観察値)の平均は0.758、0.708であった。また、ヘテロ接合体率の観察値と期待値の平均も同様であり、0.969、0.914の値を示した。

一方、リュウキュウアユにおいて山間川および河内川産リュウキュウアユともに7つの遺伝子座のうち5つにおいて増幅断片が検出されたが、Pal 1 および Pal 3 の2遺伝子座において同実験条件下では増幅断片を確認することができなかった。増幅断片の得られた5つの遺伝子座のうち、山間川産リュウキュウアユの Pal 6、Pal 7 の2遺伝子座において、河内川産リュウキュウアユの Pal 5、Pal 6、Pal 7 において多型がみられず単型であり、遺伝変異保有量の減少がみられた。なお、山間川産リュウキュウアユにおいて多型のみられた Pal 4 遺伝子座において多型のみられたのは19個体のうちわずか1個体であり、ヘテロ接合体率(観察値)は0.083と極めて低い値を示し

た。さらに、両側回遊型、陸封型アユで多型性の高かった Pal 2 および Pal 4 の2遺伝子座においてもリュウキュウアユの2集団において遺伝変異の減少がみられ、Pal 2 の対立遺伝子数は山間川で5、河内川で7と減少した。一方、Pal 4 においては対立遺伝子数およびヘテロ接合体率(観察値)ともに顕著に減少し、対立遺伝子数は山間川で2、河内川で3であり、ヘテロ接合体率(観察値)は0.083、0.206であった。また、ヘテロ接合体率の観察値と期待値の割合は Pal 4 において山間川で0.545、河内川で0.438と低い値を示した。リュウキュウアユ2集団間において遺伝変異保有量の

Table 26. Nucleotide sequence, allele size, heterozygosity at ayu (amphidromous form) microsatellite loci detected by PCR amplification in 30 individuals

Primer	Motif	Sequence 5'-3'	Tann (C) * ³	No. of alleles	Size (bp) * ⁴	Heterozygosity * ⁵
Pal 1	(GT)	F* ¹ TGTTTGGGAAGTGGGTGCGGG R* ² AGAAATCCACATCAACATCC	52	15	104-132	1.000
Pal 2	(GT)	F TCACACTCCCTCACTGGCAC R TTCAGCACACATTATCTCAC	52	14	158-188	0.921
Pal 3	(CT) + (CA)	F TCACCGTTCTCCTGTTCTC R AGTATTTATTTCAACCCGTC	52	16	212-254	0.821
Pal 4	(CA)	F GTCCAGGAAGGGCTTGT R GTCTGGTAAAAGCAAGGCGT	52	21	132-186	0.828
Pal 5	(CA)	F TGGCTGTGCTTTATGTGGTC R GGTGGTAGTATGTGGTCTC	52	2	207-213	0.414
Pal 6	(GT)	F CCCCACATAGACCCGACAGA R GAGGAGTTAGTGCTGTTT	52	9	209-225	0.679
Pal 7	(GT)	F CACAACACAAAGCCACAGA R ACACAGAGAGCAGGAGAGGG	52	6	137-149	0.640

F*¹=forward primer, R*²=reverse primer, *³Annealing temperature, *⁴Estimated size of the PCR fragment when compared with M31 sequence fragments of known length, *⁵Observed heterozygosity.

Table 27. Genetic variability of 7 microsatellite loci in 2 forms of *p. altivelis* and 2 river samples of *P. altivelis ryukyensis*

		Pal 1*	Pal 2*	Pal 3*	Pal 4*	Pal 5*	Pal 6*	Pal 7*	Mean
<i>p. altivelis altivelis</i> Amphidromous (Tosa Bay)	No. of samples	(24)	(28)	(28)	(29)	(29)	(28)	(25)	
	No. of allele	15	14	16	21	2	9	6	11.9
	Efficient no. of allele	9.09	9.09	11.24	13.51	1.67	4.48	3.41	7.50
	Heterozygosity (Ho)	1.000	0.921	0.827	0.793	0.414	0.679	0.640	0.753
	(He)	0.890	0.890	0.901	0.926	0.400	0.777	0.707	0.784
	(Ho/He)	1.124	1.035	0.918	0.856	1.035	0.874	0.905	0.964
		(31)	(31)	(28)	(31)	(29)	(31)	(30)	
Landlocked (Lake Biwa)	No. of samples	(31)	(31)	(28)	(31)	(29)	(31)	(30)	
	No. of allele	15	14	12	22	3	5	8	11.3
	Efficient no. of allele	12.05	6.13	5.95	11.90	1.78	2.67	3.66	6.31
	Heterozygosity (Ho)	0.903	0.742	0.786	0.871	0.276	0.548	0.767	0.699
	(He)	0.917	0.837	0.832	0.916	0.438	0.625	0.727	0.756
	(Ho/He)	0.985	0.886	0.945	0.951	0.630	0.877	1.055	0.904
		—	(19)	—	(18)	(19)	(19)	(19)	
<i>P. altivelis ryukyensis</i> (Yanma R.)	No. of samples	—	(19)	—	(18)	(19)	(19)	(19)	
	No. of allele	—	5	—	2	2	1	1	2.2
	Efficient no. of allele	—	3.10	—	1.18	1.05	1.00	1.00	1.47
	Heterozygosity (Ho)	—	0.632	—	0.167	0.053	0.000	0.000	0.170
	(He)	—	0.677	—	0.153	0.051	0.000	0.000	0.176
	(Ho/He)	—	0.934	—	1.093	1.079	—	—	1.022
		—	(19)	—	(17)	(19)	(19)	(19)	
(Kawauchi R.)	No. of samples	—	(19)	—	(17)	(19)	(19)	(19)	
	No. of allele	—	7	—	3	1	1	1	2.6
	Efficient no. of allele	—	4.83	—	1.51	1.00	1.00	1.00	1.87
	Heterozygosity (Ho)	—	0.737	—	0.412	0.000	0.000	0.000	0.230
	(He)	—	0.793	—	0.337	0.000	0.000	0.000	0.226
	(Ho/He)	—	0.929	—	1.223	—	—	—	1.076

顕著な差異は対立遺伝子数の平均およびヘテロ接合体率の平均ともに認められなかった。

7つのアヌマイクロサテライト遺伝子座の両側回遊型、陸封型、リュウキュウアユ2集団の対立遺伝子頻度をTable 28に示す。対立遺伝子頻度分布は各マイクロサテライト遺伝子座ごとに異なり、両側回遊型、陸封型アユにおいて、主要な対立遺伝子の検出範囲が10塩基以内、繰り返し配列数にして5リピートの間にあり、また、その数の多いもの(Pal 1、2、3)、対立遺伝子数がきわめて多く、主要な対立遺伝子をもたないもの(Pal 4)、対立遺伝子数が極めて少ないもの(Pal 5)、主要な対立遺伝子がおよそ5繰り返し配列の間にあり、また、その数の少ないもの(Pal 6、7)におよそ分けることができた。両側回遊型と陸封型アユ間について異質性試験を行なったところ、いくつかの遺伝子座において対立遺伝子頻度分布において有意差がみられ、両品種のいずれかが0.1以上の頻度をもつ対立遺伝子において頻度に有意差がみられたのはPal 1、2、3、5、7の5遺伝子座であり、さらに、Pal 2、3、5の3遺伝子座については両品種共に0.1以上の頻度をもつ対立遺伝子においても有意差がみられた。Pal 5遺伝子座における両側回遊型および陸封型アユの電気泳動像をFig. 33に示す。両側回遊型アユは対立遺伝子213について遺伝子頻度が高く0.724であったのに対して、陸封型アユは対立遺伝子207について遺伝子頻度が0.690と高く、顕著な差がみられた。

一方、リュウキュウアユにおいて増幅断片の検出されたPal 2、4、5、6、7遺伝子座のうちPal 6、7 (Fig. 34)は単型であり、Pal 5遺伝子座においても多型がみられたのはわずかにリュウキュウアユの山間集団の1個体についてのみであった。山間川と河内川集団間について異質性試験を行なったところ、多型のみられたPal 2、4遺伝子座において対立遺伝子頻度分布について有意差がみられた。Fig. 35はPal 4遺伝子座における山間川集団および河内川集団の電気泳動像を示す。両側回遊型アユは対立遺伝子213について遺伝子頻度が高く0.724であったのに対して、陸封型アユは対立遺伝子207について遺伝子頻度が0.690と高く、顕著な差がみられた。なお、Pal 5においては両側回遊型および陸封型のアユではみられない対立遺伝子205についてはほぼホモ接合として固定され、Pal 6遺伝子座においては両側回遊型および陸封型ではまれな低頻度の対立遺伝子においてホモ接合を示した。

3. 論議

関ら, (1988) はアイソザイム23遺伝子座を用い、両側回遊型、陸封型およびリュウキュウアユの集団分析を行っている。アイソザイム遺伝子座22もしくは23遺伝子座において両側回遊型および陸封型の多型的遺伝子座率はそれぞれ4集団および2集団の平均が0.182、0.136 (P<0.95)であったのに対して本研究において検出することのできたアヌマイクロサテライト7遺伝子座は全て多型を示した。一方、アイソザイム遺伝子座における平均対立遺伝子数は1.615、1.475であったのに対してマイクロサテライト遺伝子座では11.9、11.1であった。また、アイソザイム遺伝子座における平均ヘテロ接合体率は0.050、0.059であったのに対してマイクロサテライト遺伝子座では0.758、0.708であった。このように、アイソザイム遺伝子座の結果と比較するとマイクロサテライト遺伝子座の多型性を示す程度つまり感度が極めて高いことが示された。

両側回遊型と陸封型において異質性試験を行なったところ、5遺伝子座について両品種のいずれかが0.1以上の頻度をもつ対立遺伝子において頻度に有意差がみられ、3遺伝子座については両品種共に0.1以上の頻度をもつ対立遺伝子においても有意差がみられた。これまで谷口ら, (1983) および関ら, (1988) においてアイソザイム遺伝子座を用いて両集団の遺伝的分岐が示されているが、本研究の結果はそれを支持するものとなった。一方、アイソザイム遺伝子座においては頻度分布に違いのみられるGpi-1とMpiの異質性試験においても両品種間の有意差を示すことができなかったが、マイクロサテライト遺伝子座において有意差を示すことができたことは、このことからマイクロサテライトDNA多型の遺伝マーカーとしての感度の高さを示唆しており、Gpi-1、Mpi アイソザイム遺伝子座に、Pal 1、5、6、7マイクロサテライト遺伝子座を加えることでより確度の高い品種の識別が可能になると考えられた。これら2品種の間で明瞭な遺伝的差異がみられたことから、現在行なわれている陸封型アユの河川への放流は地方集団の遺伝的特性維持の観点から見直される必要があると考えられた。

リュウキュウアユにおいて増幅断片の検出された5遺伝子座のうち、2つの遺伝子座Pal 2、4で両側回遊型、陸封型と比較して対立遺伝子数およびヘテロ接合体率ともに少なく、Pal 6、7では単型であり、Pal 5も山間川集団においてのみ、わずかに多型がみられたにすぎなかった。一般にマイクロサテライトプライマーは他の属を含む近縁の魚種

Table 28. Allele frequency of 7 polymorphic microsatellite loci in amphidromous, landlocked ayu *Plecoglossus altivelis* and 2 local populations of *P. altivelis ryukyensis* (Yanma, Kawauchi River)

Allele	Pal 1		Allele	Pal 2				Allele	Pal 3		Allele	Pal 4			
	Amphi-	Land-		Amphi-	Land-	Yanma	Kawauchi		Amphi-	Land-		Amphi-	Land-	Yanma	Kawauchi
134	0.000	0.032	206	0.000	0.016	0.000	0.000	254	0.018	0.000	188	0.000	0.016	0.000	0.000
132	0.021	0.032	202	0.000	0.032	0.000	0.000	250	0.036	0.000	186	0.017	0.000	0.000	0.000
130	0.042	0.065	188	0.018	0.000	0.000	0.000	248	0.000	0.018	184	0.017	0.000	0.000	0.000
128	0.063	0.032	186	0.000	0.016	0.000	0.000	246	0.018	0.018	180	0.000	0.016	0.000	0.000
126	0.083	0.032	184	0.000	0.016	0.000	0.000	244	0.054	0.000	178	0.034	0.000	0.000	0.000
124	0.063	0.065	182	0.036	0.065	0.000	0.000	242	0.054	0.018	176	0.000	0.016	0.000	0.000
122	0.063	0.113	180	0.054	0.032	0.000	0.000	240	0.089	0.000	174	0.000	0.016	0.000	0.000
120	0.021	0.145	178	0.018	0.032	0.000	0.105	238	0.107	0.071	172	0.000	0.016	0.000	0.000
118	0.083	0.097	176	0.036	0.000	0.053	0.211	236	0.179	0.125	170	0.017	0.000	0.000	0.000
116	0.021	0.000	174	0.071	0.000	0.500	0.053	234	0.107	0.321	168	0.034	0.000	0.000	0.000
114	0.188	0.097	172	0.071	0.000	0.000	0.000	232	0.143	0.089	164	0.034	0.000	0.000	0.000
112	0.083	0.097	170	0.107	0.097	0.105	0.105	230	0.000	0.054	162	0.000	0.016	0.000	0.000
110	0.167	0.048	168	0.125	0.290	0.158	0.132	228	0.036	0.161	160	0.052	0.000	0.000	0.000
108	0.021	0.032	166	0.214	0.226	0.184	0.342	226	0.054	0.071	158	0.017	0.000	0.000	0.000
106	0.000	0.000	164	0.036	0.081	0.000	0.000	224	0.018	0.018	156	0.052	0.016	0.000	0.000
104	0.132	0.065	162	0.054	0.032	0.000	0.053	222	0.018	0.000	154	0.086	0.065	0.000	0.000
102	0.000	0.065	160	0.125	0.048	0.000	0.000	220	0.000	0.036	152	0.034	0.016	0.000	0.000
			158	0.036	0.016	0.000	0.000	216	0.054	0.000	150	0.034	0.065	0.000	0.000
								212	0.018	0.000	148	0.155	0.129	0.000	0.000
											147	0.000	0.016	0.000	0.000
											146	0.086	0.048	0.000	0.000
											144	0.052	0.081	0.000	0.000
											143	0.000	0.016	0.000	0.000
											141	0.017	0.000	0.000	0.000
											140	0.052	0.097	0.000	0.000
											139	0.000	0.048	0.000	0.000
											138	0.034	0.032	0.000	0.000
											136	0.121	0.177	0.000	0.000
											135	0.017	0.000	0.000	0.000
											132	0.034	0.032	0.917	0.176
											130	0.000	0.032	0.000	0.000
											128	0.000	0.032	0.000	0.000
											126	0.000	0.000	0.083	0.794
											118	0.000	0.000	0.000	0.029

Table 28 (Continued).

Allele	Pal 5				Allele	Pal 6				Allele	Pal 7			
	Amphi-	Land-	Yanma	Kawauchi		Amphi-	Land-	Yanma	Kawauchi		Amphi-	Land-	Yanma	Kawauchi
221	0.000	0.017	0.000	0.000	225	0.018	0.000	0.000	0.000	149	0.020	0.017	0.000	0.000
213	0.724	0.293	0.000	0.000	223	0.036	0.000	0.000	0.000	147	0.000	0.069	0.000	0.000
207	0.276	0.690	0.026	0.000	221	0.071	0.000	0.000	0.000	145	0.100	0.052	0.000	0.000
205	0.000	0.000	0.974	1.000	219	0.054	0.032	0.000	0.000	143	0.440	0.362	0.000	0.000
					217	0.143	0.242	0.000	0.000	141	0.220	0.069	0.000	0.000
					215	0.357	0.532	0.000	0.000	139	0.200	0.379	1.000	1.000
					213	0.250	0.177	0.000	0.000	137	0.020	0.052	0.000	0.000
					211	0.054	0.016	0.000	0.000					
					209	0.018	0.000	1.000	1.000					

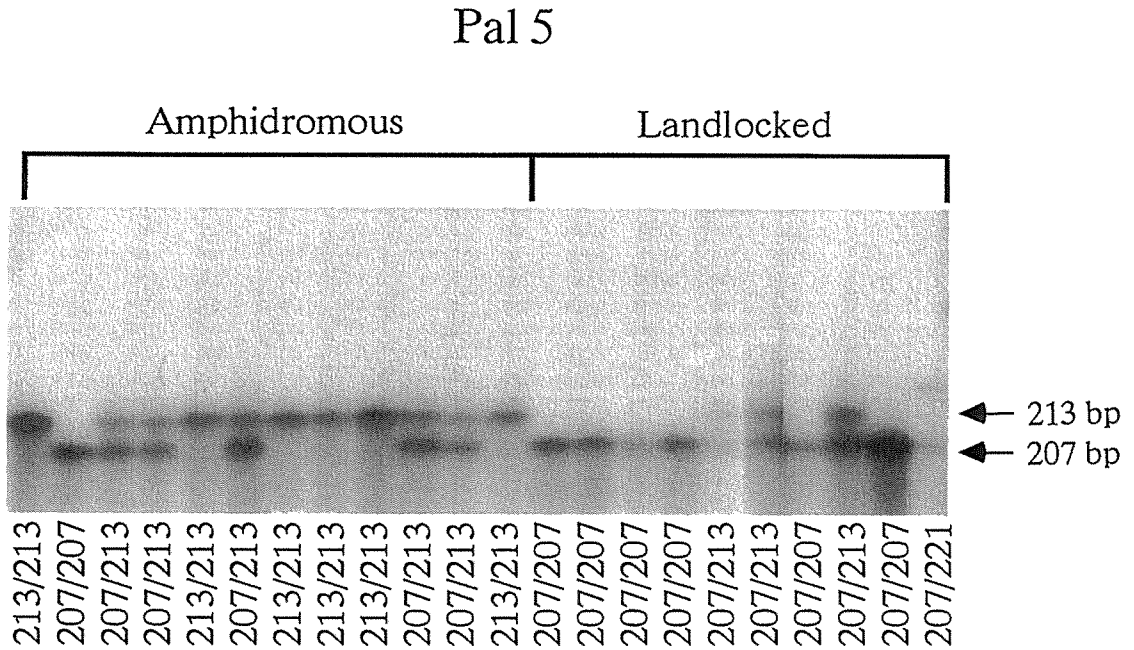


Fig. 33. Microsatellite electrophoretic pattern of Pal 5 locus. Counting from the left, lane 1-12: Amphidromous form, lane 13-22 Landlocked form.

にも応用することができ (O'Reily & Wright, 1995)、増幅断片の得られた遺伝子座は多型を示すことが知られている。従って、アユの亜種である琉球アユにおいてみられたこれらの結果はリュウキュウアユの遺伝的変異保有量の著しい減少を示していると考えられた。

一方、山間川集団、河内川集団について Pal 2、4 において対立遺伝子頻度分布について有意差がみられ、奄美大島の東西両集団において遺伝的分化が生じていることが示された。このことは Sawashi & Nishida, (1994) のアイソザイム分析の結果をさらにうらずけるものとなり、同一河川内において遺伝変異の顕著な減退がみられ、その結果として河川間に遺伝的分化が生じていることは、人工増殖およびそれに伴う移植を含めた今後の琉球アユ保護を考えるうえで重要な要因の一つになると考えられた。

アユより単離された 7 種のマイクロサテライト遺伝子座

のうち 2 種において増幅断片が得られなかった。このことは琉球アユのプライマー領域が挿入や欠失などの要因により海産および湖産アユの塩基配列と異なったため、PCR による増幅が行われなかったためと考えられる。また、リュウキュウアユの Pal 5 遺伝子座において、両側回遊型および陸封型のアユではみられない対立遺伝子についてはほぼホモ接合として固定され、Pal 6 遺伝子座においては両側回遊型および陸封型ではまれな低頻度の対立遺伝子においてホモ接合を示した。これらのことはアユとその亜種であるリュウキュウアユの遺伝的分化を示している。

今後、その感度の低さのためにアイソザイム等の分析において検出することが困難であった品種内各地方集団間の分析にもこれらのマイクロサテライト遺伝子座による解析が有効であることが示唆された。

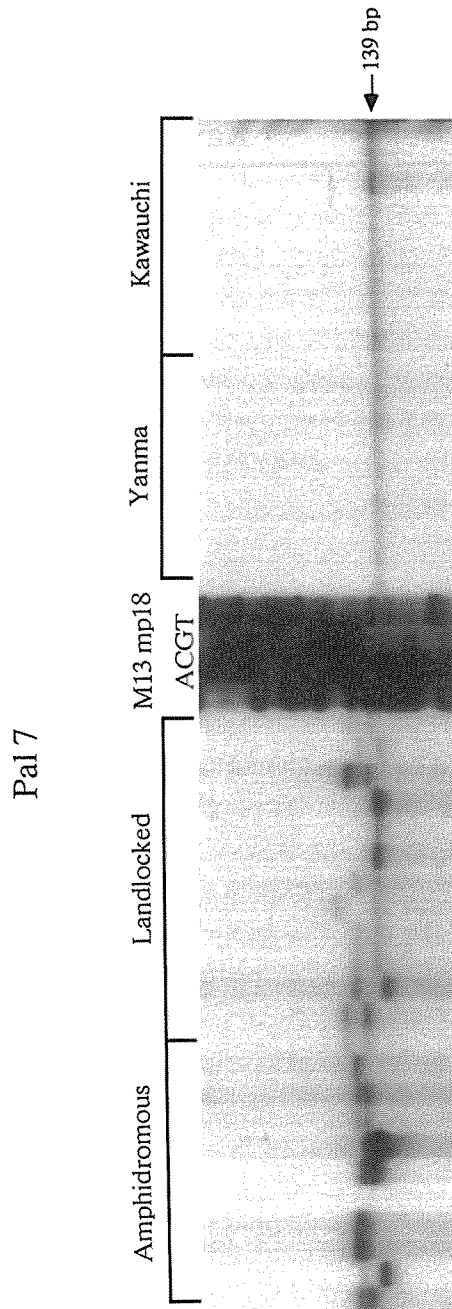


Fig.34. Microsatellite electrophoretic pattern of Pal 7 locus. Counting from the left, lane 1-10: Amphidromous form, lane 12-23 Landlocked form, lane 24-32: Ryukyu-Ayu (Yanma River), lane 33-41: Ryukyu-Ayu (Kawauchi River). The size standard is a sequence ladder of M13 mp18.

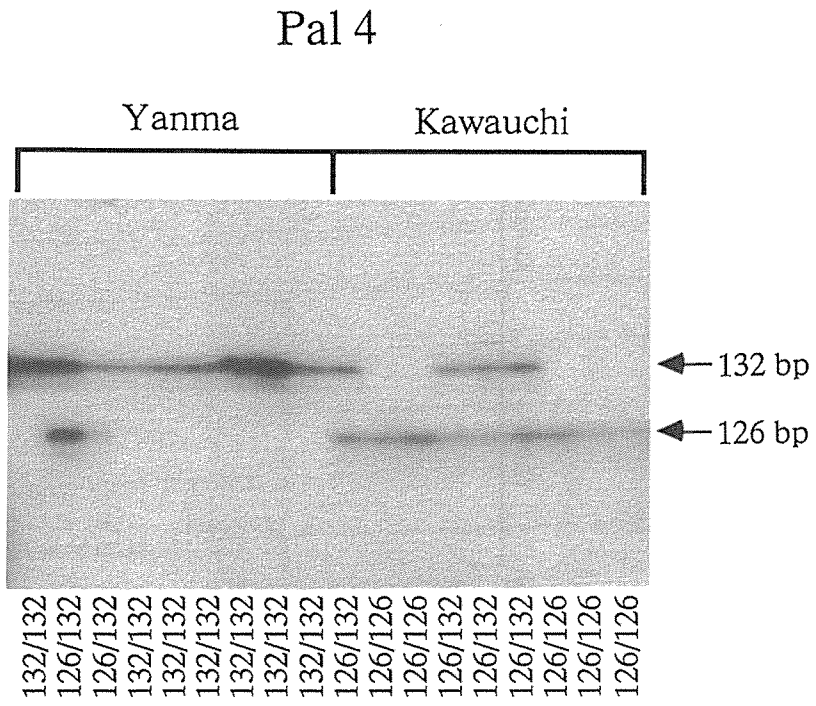


Fig. 35. Microsatellite electrophoretic pattern of Pal 4 locus. Counting from the left, lane 1-9: Ryukyu-Ayu (Yanma River), lane 10-18: Ryukyu-Ayu (Kawauchi River).

第5章 総合考察

I DNA反復配列数多型の多型性および応用性の評価

DNA反復配列数多型の多型性の評価 養殖系統

多型解析法の変異性の比較のため、遺伝的背景が異なる天然マダイ、放流用マダイ種苗、養殖マダイ系統を供試魚として用い、ミニサテライトDNA多型（マルチローカスDNAフィンガープリント）、マイクロサテライトDNA多型およびアイソザイム多型（谷口ら, 1995）の遺伝変異水準の指標を比較した（Table 29）。変異性の指標としてマイクロサテライトDNA多型およびアイソザイム多型については対立遺伝子数の平均とヘテロ接合体率の平均を、ミニサテライトDNA多型は集団における検出断片数および平均バンド共有度（1-BSI）（Wetton et al., 1987）を用いた。マイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子数の平均は人為的集団では大幅に減少し、天然魚が19.8、非選択の放流用人工種苗では17.8であり、継代の進んだ選択系の養殖系統では7.4と著しく低かった。これは採卵時のビン首効果により、低頻度対立遺伝子が消失したためと考えられる。一方、ヘテロ接合体率は天然魚と養殖系統の間に顕著な差がなく、変異性の低下は小さかった。このことは平均ヘテロ接合体率がやや減少しているものの近交による同祖接合が進んでいないものと考えられた。

一方、ミニサテライトDNA多型における遺伝性の変異指標のうち、集団における検出断片数は複数のマイクロサテライト遺伝子座における対立遺伝子数の平均と原理的には同じであり、天然魚が66.6と高いのに対して、非選択の放流用人工種苗では46.4であり、継代の進んだ選択系の養殖系統では38.0と低かった。また、マイクロサテライト遺伝子座のヘテロ接合体率はミニサテライトDNA多型の平均バンド共有度（1-BSI）の変化によく対応しており、シングルローカス多型とマルチローカス多型の違いはあるものの、類似した遺伝的指標としての有効性をもつことが示された。

このようなミニサテライトDNA多型およびマイクロサテライトDNA多型における遺伝的に異なるサンプル間の顕著な差は、アイソザイムにおける対立遺伝子数および平均ヘテロ接合体率が供試魚間にみられたわずかな差（谷口ら, 1995）と対照的である。

これらの結果は、ミニサテライトDNA多型およびマイクロサテライトDNA多型の遺伝的指標である対立遺伝子数とヘテロ接合体率の平均が、アイソザイム多型のそれと比較して極めて感度が高く優れた遺伝マーカーであることを示している。

絶滅危惧集団

多型解析法の変異性の比較のため、両側回遊型、陸封型および住用湾産のリウキュウアユを供試魚として用い、マダイと同様にミニサテライトDNA多型（マルチローカスDNAフィンガープリント）、マイクロサテライトDNA多型およびアイソザイム多型（関ら, 1988b）の遺伝変異水準の指標を比較した（Table 30）。

マイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子数の平均は両側回遊型アユでは11.9、陸封型アユでは11.1と高く、遺伝変異を十分に保有しているのに対して、リウキュウアユでは2.2と著しく低かった。これはビン首効果により、低頻度対立遺伝子が消失したためと考えられる。また、ヘテロ接合体率においても両側回遊型、陸封型アユともに0.758、0.708と高いのに対して、リウキュウアユでは0.148と低く、遺伝変異保有量の顕著な減退が示唆された。

一方、ミニサテライトDNA多型における遺伝性の変異指標のうち、平均バンド共有度（1-BSI）の遺伝的変化の程度はマイクロサテライトDNA多型のヘテロ接合体率における遺伝的減退と比較して低かった。また、集団における検出断片数においては両側回遊型、陸封型アユとリウキュウアユとの間に差はみられなかった。このことはミニサテライトDNA多型が複数の遺伝子座を同時に検出する方法であり、遺伝子座ごとの対立遺伝子を特定できないことやゲル間におけるストリンジェンシー等の実験条件の再現性の影響が現れたものと考えられる。

2種のDNAの反復配列数多型、特にマイクロサテライトDNA多型における遺伝的に異なるサンプル間の顕著な差は、マダイと同様、アイソザイムにおける対立遺伝子数および平均ヘテロ接合体率が供試魚間にみられたわずかな差（関ら, 1988b）と対照的である。

これらの結果は、マイクロサテライトDNA多型の遺伝的指標である対立遺伝子数とヘテロ接合体率の平均が、アイソザイム多型のそれと比較して極めて感度が高く優れた遺伝マーカーであるとともに、マイクロサテライトDNA多型がミニサテライトDNA多型とは異なり、実験条件等に左右されない確度の高い方法であることを示しているといえよう。

Table 29. Comparison of average genetic variability among microsatellite, minisatellite and isozyme loci in natural population, stock for release and net-cage culture of red sea bream

Sample	Microsatellite*1		Minisatellite*2		Isozyme*3	
	No. of alleles	Heterozygosity	No. of bands	1-BSI	No. of alleles	Heterozygosity
1. Natural population	19.8	0.869	66.6	0.899	2.2	0.124
2. Stock for release	17.8	0.773	46.6	0.800	1.8	0.124
3. Net-cage culture	7.4	0.684	38.0	0.721	1.7	0.135

*1 Number of allele and heterozygosity per locus examined 5 loci.

*2 Number of bands detected and average 1-(band sharing indices) of DNA fingerprinting using *Hinf* I restriction enzyme and YNZ22, 33.15 multilocus probe combination.

*3 Number of allele and heterozygosity per locus based on 17 loci (Taniguchi et al., 1995).

Table 30. Comparison of average genetic variability among microsatellite and isozyme loci in amphidromous, landlocked and Ryukyu ayu

Sample	Microsatellite*1		Minisatellite*2		Isozyme*3	
	No. of alleles	Heterozygosity	No. of bands	1-BSI	No. of alleles	Heterozygosity
1. Amphidromous	11.9	0.758	80	0.735	1.64	0.048
2. Land locked	11.1	0.708	95	0.675	1.50	0.056
3. Ryukyu	2.2	0.148	75	0.450	1.04	0.011

*1 Number of allele and heterozygosity per locus examined 5 loci.

*2 Number of bands detected and average 1-(band sharing indices) of DNA fingerprinting using *Hinf* I restriction enzyme and YNZ22 multilocus probe combination.

*3 Number of allele and heterozygosity per locus based on 22 and 23 loci (Seki et al., 1988).

DNA 反復配列数多型の多型性の評価

マイクロサテライト法とミニサテライト法の実際のデータ収集における実験の利便性についてミニサテライト法のシングルローカス多型も加えて Table 31 に比較した。供試サンプルとしてはミニサテライト法では高純度で未変性の多量の DNA サンプルが必要であるのに対して、マイクロサテライト法は PCR を用いるため、DNA の必要量は極めて少量でよく、純度もさほど必要としない。また、実験行程は、ミニサテライト法はサザン法を用いるので 1 週間程度の時間を必要とし、しかも 1 回の電気泳動に用いることができる個体数は実験の仕方によっても異なるが、一度に多数個体を処理することができない (15 個体程度)。それに対してマイクロサテライト法は多数個体の処理が可能 (40 個体程度) であり、しかも実験期間は 2 日と短期間である。

一方、検出断片の解析については、ミニサテライト DNA マルチローカス法は弱いストリーゼンシーにより、同時に多くの遺伝子座を検出するため、再現性に乏しく同一のゲル内で個体間、集団間の差異を検出しなければならない

い。また、バンドの解析が複雑であり、遺伝子座を特定することができない。一方、ミニサテライト DNA シングルローカス法およびマイクロサテライト法は遺伝子座を特定することができ、断片が 1 本または 2 本しか検出されないために解析が容易であり、再現性が確実である。しかもマイクロサテライト法においては 1 塩基ごとの分子量マーカーを配することでデータの蓄積および比較が可能となる。また、最少の対立遺伝子の差である 1 回の反復配列数の違いをも検出することができることはマイクロサテライト法の確度の高さを示している。なお、最近ではミニサテライト DNA シングルローカス法にも PCR を用いた簡便な方法があるが、1 回の反復配列の違いを検出することができないこと、マイクロサテライト遺伝子座と比較してミニサテライト遺伝子座の単離が容易でないことなどの難点が存在する。

II 今後の展望

ミニサテライトおよびマイクロサテライト DNA 領域はゲノム DNA のほとんどの領域を占める遺伝情報をコード

Table 31. Comparison of microsatellite method with minisatellite methods

	Minisatellite		Microsatellite
	(multilocus)	(single locus)	
Required volume of sample DNA	Much (about 10 μ g)	Much (about 10 μ g)	Little (about 10 ng)
Purity of sample DNA	Necessary	Necessary	Not necessary
Intactness of sample DNA	Necessary	Necessary	Not necessary
Applicable number in one electrophoretic run	Small (15 individuals)	Small (15 individuals)	Large (40 individuals)
Time needed	Long (one week)	Long (one week)	Short (two days)
Identification of allele	Not easy	Easy	Easy
Locus identification	Difficult (multilocus)	Easy (single locus)	Easy (single locus)
Repeatability	Not excellent	Excellent	Excellent
Data analysis	Not accurate (BSI)	Accurate (heritability)	Accurate (heritability)

しない介在配列（イントロン）内全体に広がり、遺伝情報をコードしないことから選択を受けず、その反復配列数は豊富な多型を示す (O'reilly & Wright, 1995)。また、反復配列数の違いで示される対立遺伝子は、集団における対立遺伝子の数（対立遺伝子数）、ヘテロ接合を示す割合（ヘテロ接合体率）および対立遺伝子頻度の分布は集団内および集団間の遺伝的変異保有量や集団間の遺伝的距離を示すこととなる。しかしながら、これら反復配列の機能や変異蓄積機構等がよくわかっておらず、その配列数の違いを集団の多型解析に用いる立場としては、その機構解明が待たれる。このことは、クローン魚を供試魚として再生産を行ない、多型解析をすることにより、クローン魚の突然変異率が示されるとともに、反復配列の変異蓄積機構についてなんらかの示唆が得られるかもしれない。

本研究においてマルチローカスのミニサテライト DNA 多型 (DNA フィンガープリント) の有用性が最も高いと考えられたのはクローン魚の作出証明と系統識別への応用研究についてであった。極めて多型性の高い多数の遺伝子座を同時に検出するため、同一ゲル内において比較する個体の全ての検出断片が等しい場合、遺伝的に均質であると考えられ、クローン魚の作出を証明することができる。また、比較する個体において異なる断片が検出された場合、クローン魚であることは棄却される。また、複数のクロー

ン系統を扱う場合に同じバンドパターンである場合には同一のクローン系統であることが示され、異なる場合にはクローン系統の識別を行なうことができた。実際に Taniguchi et al., (1996) は複数のクローンを同一水槽で飼育し、DNA フィンガープリント法によってクローン識別を行ない、クローン内およびクローン間の成長形質の比較をするとともに遺伝率を推定した。DNA フィンガープリント法はこのような個体識別に加えて親子鑑別においても最も精度の高い遺伝マーカーであるとされるので、この特徴を利用した同一水槽内飼育における成長等の形質における系統間差の研究や系統間の相互作用の研究への応用が期待される。

一方、集団の遺伝解析において (1-BSI) は集団の遺伝変異保有量を明瞭に示す結果となった。しかしながら、ミニサテライト DNA 多型は弱いストリンジエンシーにより、同時に多くの遺伝子座を検出するため再現性に乏しく同一ゲル内で個体間、集団間の差異を検出しなければならない。このことは、実験に用いた個体においては多くの遺伝子座が検出されるため精度の高い結果が得られるが、多数の個体を実験に供することができないことから、サンプルの抽出誤差が大きく、集団を代表した結果であるとはいえない。また、多くのバンドが検出されることから、バンドの異同度には慎重な判定が必要とされる。一方、同じ断片長

であると判定されたバンドが必ず同じ遺伝子座の対立遺伝子であるとはいえない。さらに、遺伝子座を特定することができないことから、出現した対立遺伝子を示すバンドがヘテロ接合であるのかホモ接合であるのか判定が困難であり、対立遺伝子頻度分布も得ることはできず、ヘテロ接合体率および集団の遺伝的距離を算出できない。両側回遊型と陸封型アユでみられた場合のように両集団ともに集団内の遺伝変異保有量が高い場合には集団間の顕著な遺伝的差異が見られなかったことは上記の理由によるものと考えられる。

現在、シングルローカスのミニサテライト DNA 多型が求められ、動物においては人間や家畜、実験動物等の研究の進んだ種においてはシングルローカスプローブは市販化され、普及が進み、最近では PCR を用いた簡易な方法も行なわれているが、遺伝子座の単離が技術的に難しく、対象種の多い水産研究においては一部の種 (Galvin et al., 1995) を除いて研究が活発であるとはいえない。

しかしながら、マルチローカスのミニサテライト DNA 多型を検出するためのプローブにおいては広く真核生物種全体に用いることができ、遺伝子座の単離を行なう必要がないことから、今後は多くのサンプルを処理する必要がないが、個体識別、親子鑑別等の精度の高い結果が必要な研究や、多くの種について遺伝変異保有量を算定する場合に有効な方法としての利用が適していると考えられる。

一方、マイクロサテライト DNA 多型は対象魚種のプライマー開発に数カ月の期間を要するが、ミニサテライト DNA 領域の単離に比べて比較的容易である。また、高い多型性を示し、多くの個体を短期間で正確に解析でき、近縁種の多型解析にも応用することができる。また、遺伝子座を特定して分析を行なうことができるとともに各遺伝子座ごとに多型性の程度は異なり、対立遺伝子の少ないものは野生集団に、対立遺伝子数の多いものは人為集団に有効であるとされ (Wright & Benzen, 1994)、分析レベルに応じた遺伝子座の選択が可能である。さらに、いくつかの遺伝子座を組み合わせることで個体やクローン識別に応用できる。マイクロサテライト DNA 多型においてマルチローカス DNA フィンガープリントでは検出の難しかったアユの両側回遊型と陸封型アユの遺伝的差異が示され、リュウキュウアユにおいては遺伝子座ごとに顕著な遺伝的変異保

有量の減退が示された。また、マダイにおいては、天然魚、放流用種苗、養殖各系統の遺伝的変異保有量の減退や養殖系統間の遺伝的距離が示された。マイクロサテライト DNA 多型による集団遺伝研究は緒についたばかりであり、今のところデータ解析法は検出されるバンドがホモ接合の場合 1 本、ヘテロ接合の場合 2 本であることから、アイソザイムと同様の方法でデータ解析が行なわれているが、アイソザイムでは見られなかったような高い値の対立遺伝子数、ヘテロ接合体率を示す遺伝子座が存在し、例えば、対立遺伝子数も 30 に及び、最も頻度の高い対立遺伝子においても 0.15 前後であるような遺伝子座も存在することから、多数のサンプル数が必要であることが容易に推測される。今後は、遺伝子座ごとに様々な多型レベルを有することから、用いる集団の遺伝変異保有レベルに応じた遺伝子座の選定、およびそれに伴う必要な個体数の基準化といったマイクロサテライト DNA 多型による集団遺伝研究におけるデータ解析マニュアルの策定が必要となろう。

水産分野の遺伝・育種研究の分析レベルには種識別および系統類縁関係、集団間の異同・混合、遺伝的多様性の推定、移入魚の遺伝的影響の把握、血統識別、親子鑑別および個体鑑別等、多岐に渡っている。これからはマイクロサテライト DNA 多型が、従来のアイソザイム多型やミニサテライト多型の短所を補い得る有力なゲノムマーカーとなり、分析レベルに応じた遺伝マーカーを使い分け、または他の多型解析法と組み合わせることによって、精度の高い解析法が確立し、新たな事実の発見や解明につながると考えられる。現在のところ、実際の多型解析法は RI 標識プライマーによる方法が用いられているため RI 施設やそれに伴う管理が必要であり、水産試験場等の研究機関へのマイクロサテライト DNA 多型解析法の普及の妨げとなっている。また、研究対象魚種のマイクロサテライトプライマーの開発における組換え DNA 実験は一般的になってきているものの、操作が煩雑でやや経験も必要と思われ、このことも普及を妨げる一因となっていると考えられる。今後、マイクロサテライト DNA 多型が優れた集団遺伝マーカーとして用いられるためには、特別の施設・管理を必要としない Non-RI 法の改良および普及と多くの魚種におけるマイクロサテライトプライマーの開発が望まれる。

要約

アユおよびマダイの天然集団、養殖集団および染色体操作魚を供試魚として用い、ミニサテライトおよびマイクロサテライトDNA多型により天然集団および人工集団各系統におけるDNAレベルの遺伝変異保有量および集団間の遺伝的分化について比較するとともに、これらのDNA多型の遺伝・育種研究における有用性を検討した。

1. マルチローカスのミニサテライトDNA多型について検出条件の検討を行なった。

保存血液およびDNA抽出キットから未変性のDNAの抽出を行なうことができ、DNA抽出の簡易化がはかられた。

用いる制限酵素とプローブの組み合わせにより、検出されるDNA断片の数や検出範囲は異なり、研究対象魚種ごとに適切な組み合わせを選択する必要があると考えられた。

電気泳動の条件は60Vの定電圧(1.5V/cm)で65時間程度の泳動条件が適当であると考えられた。

Non-RIプローブを用いたところ、十分な検出条件を得ることで、安全で特別な施設、管理を必要としないことから、今後の普及が期待された。

2. マイクロサテライト領域の単離におけるシークエンス法についてマニュアルシークエンスとオートシークエンスについて比較し、検出条件の検討を行なった。マニュアルシークエンスは実験にかかる費用が少ないものの一回のシークエンス実験で決定される塩基配列数は少ない。一方、オートシークエンスはマニュアルシークエンスと比較して実験にかかる費用は2倍程度かかるものの、得られる情報は2倍程度多く、また、RIを用いる必要がなく、電気泳動以降のデータ処理は自動的に行なわれるため、今後は一般化すると考えられた。

3. マルチローカスのミニサテライト法について供試魚にアユおよびマダイを用い、異なった遺伝的特性をもつ集団について集団解析を行なった。

両側回遊型アユ、陸封型アユについてDNAフィンガープリントを行なったところ、両集団ともにBSI値は低く、遺伝的変異保有量は高かった。一方、集団間のBSIは集団内のBSIと同程度であり、遺伝的分化を顕著に示さなかった。

野村ダム湖のアユについてDNAフィンガープリントを行ない遺伝的変異保有量を定量したところ天然海産アユ集団と比較して高い値を示し、遺伝的変異保有量が減少してい

ることが示された。

リュウキュウアユDNAフィンガープリントを行なったところ、住用湾、焼内湾の両集団ともに集団内の遺伝的変異性は低く、集団の大きさが小さいことを反映していた。一方、住用湾、焼内湾の集団間のBSIは両集団内のBSIレベルと比較して高く、両地域の独立性と地理的隔離による遺伝的分化が示唆された。

人工採卵正常2倍体アユではF1世代にして早くも遺伝的多様性の減少がみられ、DNAフィンガープリント法が、遺伝的多様性のモニタリングマーカーとしてきわめて有効であることが示唆された。

第一卵割阻止型雌性発生2倍体アユでは、ホモ型に分離することにより遺伝的多様性が拡大し、DNAフィンガープリントがG-2Nの理論と合致した。

クローン、継代クローン、ヘテロクローンアユの各系統それぞれについて、検出された全てのバンドが共有されており、各クローン作出法の有効性とその作出が証明され、同時にそれぞれのクローン系統の識別においてDNAフィンガープリントが有効であることが示された。

マダイの改良種苗の遺伝的変異保有量をDNA-FPを用いて推定した。野生集団のBSIは養殖集団のBSIと比較して特に低かった。選択育種系の系統内のBSIは非選択系と比較して遺伝的変異性がやや低かった。同一起源のS2とS3系統の系統間のBSIは系統内のBSIレベルと同等であり、S2がS3を導入した後、独自に選択育種したものであることを反映していた。

4. シングルローカスのマイクロサテライト法について供試魚にマダイおよびアユを用い、異なった遺伝的特性をもつ集団について集団解析を行なった。

マダイDNAより5つのマイクロサテライト遺伝子座を単離した。単離した遺伝子座はそれぞれ豊富な多型性を有していた。予備的に3採集地点のマダイについて多型解析を行ったところ福井産において対立遺伝子数およびヘテロ接合体率が高く、高知産ではその値が低く、福岡産はその中間であった。また、近縁魚種に5つのマダイマイクロサテライトプライマーを用いたところ、PCR増幅産物を得られた遺伝子座の数は魚種によって異なったが、マダイにより近縁とされるチダイおよびギダイが多かった。

マダイ天然魚、放流用種苗、養殖系統の遺伝的変異保有量を5つのマイクロサテライトローサイを用いて推定した。天然魚および放流用種苗で対立遺伝子数が多いのに対して養殖系統で大幅な対立遺伝子数の減少がみられた。また、

放流用種苗は天然魚と比較するとやや対立遺伝子数の減少傾向が見られた。一方、ヘテロ接合体率については、対立遺伝子数に比較するとその減少の割合は低くなったが、天然魚において最も高く、養殖系統において最も低く、放流用種苗はその中間の値であった。

アユDNAより7つのマイクロサテライト遺伝子座を単離した。単離した遺伝子座はそれぞれ多型の程度は異なった。両側回遊型、陸封型およびリュウキュウアユについて多型解析を行ったところアユにおいて対立遺伝子数およびヘテロ接合体率が高く、リュウキュウではその値が低かった。数種の遺伝子座の海産アユと湖産アユにおいて、また、リュウキュウアユ集団間においても遺伝子頻度に顕著な差

がみられ、両地域の独立性と地理的隔離による遺伝的分化が示唆された。

マイクロサテライトDNA多型は高い多型性を示し、多くの個体を短期間で正確に解析でき、近縁種が多型解析にも応用できる。また、遺伝子座を特定して分析を行なうことができるため、多型性の程度が異なる遺伝子座を分化レベルに応じて選択することが可能である。さらに、いくつかの遺伝子座を組み合わせることで個体やクローン識別に応用できることから、水産の遺伝・育種分野においてもマイクロサテライトDNA多型が、従来のアイソザイム多型、ミニサテライトDNA多型の限界を補い得る有力なゲノムマーカーになると考えられた。

Genetic and Breeding Studies on the Variable Number Tandem Repeat of DNA in Fish

By
Motohiro Takagi

For the past 20 or more years, population structures of various fish species have been studied by isozyme analysis. Although, isozyme polymorphism has been useful as a marker for the identification of fish species and separating geographically isolated populations, it is not sufficiently sensitive for genetic analysis of geographically proximate subpopulations or populations which have experienced bottlenecks.

Variable Number Tandem Repeat of DNA such as minisatellite and microsatellite DNA polymorphisms has been shown to exhibit much higher variability, and Mendelian inheritance.

In this study, minisatellite and microsatellite DNA polymorphisms of several fish species were detected to evaluate the availability of these markers for practical use in fish population genetic and breeding analysis.

I. Estimation of the genetic variability in fish using multilocus minisatellite markers

1) Genetic variability of natural populations

The genetic variability of the amphidromous (Biwa Lake) and landlocked formed population (Tosa Bay) of ayu *Plecoglossus altivelis* was investigated by DNA fingerprintings (DNA-FP). The genetic similarity (as Band Sharing Index, BSI) obtained by DNA fingerprinting was 0.265 in the amphidromous form and 0.325 in the landlocked form with *Hinf* I endonuclease and YNZ 22 probe.

The genetic variability of the landlocked population of ayu in the Nomura Dam was investigated by DNA-FP. The BSI value was 0.586 with the YNZ 22 probe, and 0.478 with the 33.15 probe. These values were higher than those of the native amphidromous populations, suggesting that the effective

population size (N_e) of the Nomura's population is decreasing.

The genetic variability of the two populations of Ryukyu-ayu *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* in the Amami Island (Yanma River and Kawauchi River) was investigated by DNA-FP. The BSI value was 0.561 in the Yanma River and 0.594 in the Kawauchi River with *Hae* III endonuclease and YNZ 22 probe, and 0.550 and 0.586 with *Hinf* I endonuclease and YNZ 22 probe, respectively. These values were higher than those of the native amphidromous populations, suggesting that a bottleneck effect has occurred in the Ryukyu-ayu populations.

2) Genetic change in cultural strains

The genetic variability of five strains of red sea bream *Pagrus major* was investigated by DNA fingerprintings (DNA-FP), using samples of one non-selected strain (S1), 3 size-selected strains (S2, S3, S4), one hybridized and size-selected strain (S5) and the wild population. The extracted DNA of these strains was digested by *Hinf* I restriction enzyme and hybridized with 33.15 and YNZ 22 probes. Bands sharing indices (BSI) were calculated from the banding patterns of DNA-FP.

The mean BSI of DNA-FP detected with a 33.15 multilocus probe was relatively high in S2 (0.382) and S3 (0.301), but relatively low in S1 (0.226), S4 (0.166) and S5 (0.206) which are comparable to the very low BSI values of the wild population (0.120). The BSI level of S2 is similar to that of S3. As significant difference was not observed between S2 and S3 in mean BSI values. There were no distinct differences in the BSI values by different probes.

These results well agreed with those of the allozyme analysis, and it is concluded that DNA-FP could be used as a marker for monitoring genetic change in the variability of artificially propagated fishes for aquaculture.

3) Genetic variability of gynogenetic fishes

The influence of chromosome manipulation of genetic variability was investigated by the methods

of DNA fingerprinting in ayu using fish samples from artificially propagated normal diploids (F1N-2n) mitotic gynogenetic diploid (Mitotic-G2n), and several clonal lines. The genetic variability of the N-2n fish was significantly decreased comparing with the natural population. In mitotic-G2n, genetic variability was expanded, and the number of fragments was decreased. The facts obtained here proved that segregation of the genotypes of the loci controlled DNA fingerprinting in G2n fish.

DNA fingerprint (DNA-FP) was applied for confirmation and identification of clones induced by chromosome manipulation in ayu. The samples used were 2 homozygous clonal lines, 3 successive homozygous clonal lines and 2 heterozygous clonal lines. All of the fragments were shared among individuals within the same clonal line, but the pattern of bands detected was significantly different between clonal lines.

DNA fingerprinting was effective to confirm the production of several clonal lines. It is concluded that DNA fingerprinting can be widely applied to the study of inbreeding and identification of individuals and families.

II. Application of microsatellite DNA polymorphisms to genetics and breeding studies

1) Genetic form of microsatellite polymorphism

(GT./CA)_n microsatellite loci were isolated from a size-selected genomic library of ayu and red sea bream. Primers for PCR amplification were constructed for the microsatellite loci and the loci characterized by screening polymorphisms in wild populations. Almost all of the loci displayed a high degree of length polymorphism, as observed in the total number of alleles per locus (2-32), and a high degree of heterozygosity ranging from 0.637-1.000.

The primers developed for red sea bream were also tested for their ability to amplify homologous sequences from 5 closely related species of Sparidae.

These microsatellite loci show great potential as indicators for genetic variability and divergence among subpopulations, and to a lesser degree, some of the related species tested.

2) Genetic change in cultural strains

The genetic variability of the hatchery stock of red sea bream was surveyed using 5 microsatellite markers. The mean number of alleles per locus was very low in the net cage culture stock ($n=7.4$), which is very high for that of the natural population ($n=17.8$). However, the heterozygosities of the samples were kept at a higher level, and were not so different among the samples ($H_o:0.684-0.869$). The reduction of genetic variability observed as an extension of minor alleles in the net-cage culture stock may be caused simply by the bottleneck effect, but not by the inbreeding effect.

These results agreed with those of DNA fingerprinting and isozymic analyses, and it is concluded that the microsatellite can be used as a sensitive marker for monitoring genetic change in artificially propagated stocks for aquaculture.

3) Genetic assessment of endangered species

The genetic variability of the amphidromous (Biwa Lake) and landlocked form populations (Tosa Bay) of ayu and Ryukyu-ayu (Amami Island) were investigated using 7 microsatellite markers. The mean number of alleles per locus was very low in Ryukyu-Ayu ($n=2.2$) compared to those of the amphidromous and landlocked populations ($n=11.9, 11.1$). In addition, the mean ratio of heterozygosity per locus was also very low in Ryukyu-Ayu (0.148) compared to those of the amphidromous and landlocked forms (0.758, 0.708). These results are in accordance with those of DNA fingerprinting and isozymic analyses, and it is concluded that the microsatellite can be used as a sensitive marker for monitoring the genetic change of endangered species.

III. Conclusions

Minisatellite DNA analysis has been widely used in fish population research and breeding sciences. However, because of technical difficulties, it was not always convenient to use these methods for fish population genetic studies. Among the minisatellite analysis, multi-locus fingerprinting was useful for pedigree analysis and identification of clonal lines, but there were some difficulties in the identification of marker bands and in the repeatability of the number of bands which appeared. Although the single-locus method of the minisatellite analysis seems to be more applicable in fish population genetics due to the ease of band identification, a single minisatellite locus has to be detected for each target species.

The microsatellite method is experimentally more practical, as it is not difficult to define each locus from so many microsatellite loci distributed throughout the genome. This method is also convenient experimentally because PCR can be applicable to amplify the microsatellite region with short tandem repeat consisting of only 2 to 5 bp units. In this method, one repeat unit difference can be identified based on the marker sequence ladders in the polyacrylamide gel electrophoresis.

Microsatellite polymorphism has some advantages as a genetic marker for population analysis and breeding science as follows: 1. each band is recognized as alleles of a locus in Mendelian inheritance, 2. a hyper-variable nature, 3. abundance of loci throughout the genome, and 4. accuracy in the identification of the marker bands.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切な御指導と御助言を頂き、本稿を丁寧に校閲して下さった高知大学農学部教授 谷口順彦博士に心より御礼申し上げます。また研究および生活姿勢について御助言と御支援を頂いた高知大学海洋生物教育研究センター教授 山岡耕作博士に心より謝意を表す。常に適確な御指導、御助言を頂いた高知大学農学部助教授 関仲吾博士に心より謝意を表す。また実験手法および研究姿勢について様々な面で御助言を頂いた(株)白雲水産の Hyon-sob Han 博士に心より謝意を表す。DNAフィンガープリント法を進めるにあたり御助言、ご指導を頂いた神戸大学農学部教授 辻莊一博士および万年英之博士に謝意を表す。マイクロサテライトプライマーの開発にあたり、ご指導を頂いた Dalhousie 大学 Roger W. Doyle 教授および Doug Cook 氏に感謝する。副指導教官として便宜をはかって頂いた愛媛大学教授 熊井清雄博士に感謝する。分子生物学実験を進めるにあたり御助言、御指導を頂いた高知大学農学部助教授 永田信治博士に謝意を表す。放射性同位元素の使用にあたり、便宜をいただき、また、オートシーケンサーの使用に関してご指導頂いた高知大学遺伝子実験施設助教授 古吉節夫博士および同助手 芦内誠博士に謝意を表す。また、供試魚の提供を頂いた高知県内水面漁業センター研究員 児玉修氏、和歌山県内水面漁業センター研究員 辻村明夫氏、福岡県内水面漁業センター研究員 稲田善和博士、福井県栽培漁業センター研究員 畑中宏之氏、香川県水産試験場研究員 横川浩治氏、(株)拓洋の浜野貞夫氏、愛媛大学連合農学研究科 工藤孝也氏に感謝する。また、高知県内水面漁業協同組合連合会、高知県栽培漁業センター、山崎技研、近畿大学、株式会社拓洋、株式会社バイ・エヒメの関係各位にも供試魚の提供を頂き、心より感謝する。また本研究において多大な協力をいただいた協同研究者山崎基資氏、幹田和彦氏および庄司栄治郎氏を始め高知大学農学部水族生態学研究室の卒業生および在学生諸氏に謝意を表す。

引用文献

- Allendorf, F. W., N. Ryman, A. Stennek and G. Stahl, 1976. Genetic variation in Scandinavian brown trout (*Salmo trutta*): evidence of distinct sympatric populations. *Hereditas* 83 : 73-82.
- Angers, B., L. Bernatchez, A. Angers and L. Desgroseillers, 1995. Specific microsatellite loci for brook charr reveal strong population subdivision on a micrographic scale. *J. Fish. Biol.* 47(Supplement A) : 1093-1096.
- Avice J. C. and M. H. Smith, 1974. Biochemical genetics of sunfish. I. Geographic variation and subspecific intergradation in the bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Evolution* 28 : 42-54.
- Bell, G. E., M. J. Selby and W. J. Rutter, 1982. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeated sequences. *Nature*, 295 : 31-35.
- Brooker A. L., D. Cook, P. Bentzen, J. M. Wright and R. W. Doyle, 1994. Organization of microsatellites differs between mammals and cold-water teleost fishes. *Can J. Fish. Biol.*, 51 : 1959-1996.
- Burke, T. and M. W. Bruford, 1987. DNA fingerprinting in birds. *Nature*, 327 : 149-452.
- Colbourne, J. K., B. D. Neff and M. R. Gross, 1996. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53 : 342-349.
- Carvalho and Hauser, 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in fish biology and fisheries*, 4, eds. by G. R. Carvalho and T. J. Pitcher., Chapman & Hall, pp 326-350.
- Edwards, A., A. Civitello, H. A. Hammond and C. T. Caskey, 1991. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, 49 : 746-756.

- Estoup, A., P. Presa, F. Krieg, D. Vaiman and R. Guyomard, 1993. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, 71 : 488-496.
- FAO, 1993. Report of the expert consultation on utilization and conservation of aquatic resources, FAO Fisheries Report, 491 : 58 pp.
- FAO, 1995. Fisheries information, data, and statistics service, Aquaculture production statistics, FAO Fisheries Circular, 815 : 186 pp.
- Fields, R. D., K. R. Johnson and G. H. Thorgard, 1989. DNA fingerprints in rainbow trout detected by hybridization with DNA of bacteriophage M13. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 120 : 273-282.
- Galvin P., D. McGregor and T. Cross, 1995. A single locus PCR amplified minisatellite region as a hypervariable genetic marker in gadoid species. *Aquaculture*, 137 : 31-40.
- García de Leon, F. J., J. F. Dallas, B. Chatain, M. Canonne, J. J. Versini and F. Bonhomme, 1995. Development and use of microsatellite markers in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Serranidae). *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4 : 62-68.
- Han, H. S., N. Taniguchi and A. Tsujimura, 1991. Production of clonal ayu by chromosome manipulation by isozyme marker and tissue grafting. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 : 833-836.
- Han, H. S., H. Mannen, A. Tsujimura and N. Taniguchi, 1992. Application of DNA fingerprinting to confirmation of clone in Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58 : 2027-2031.
- Han, H. S., N. Taniguchi, A. Tsujimura and H. Mannen, 1995. Use of DNA fingerprinting in gynogenetic breeding programs of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Bull. Mar. Sci. Fish. Kochi Univ.*, 15 : 99-104.
- Hanotte O., M. W. Bruford and T. Burke, 1991. Multilocus DNA fingerprints in gallinaceous birds: general approach and problems. *Heredity*, 68 : 481-494.
- 原素之・出羽厚二・山本栄一. 1993. DNAフィンガープリント法によるクローンヒラメの解析. *日本水産学会誌*, 59 : 731.
- Harris, A. S., S. Bieger, R. W. Doyle and J. M. Wright, 1991. DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. *Aquaculture* 92 : 157-163.
- Herbinger C. M., R. W. Doyle, E. R. Pitman, D. Paquet, K. A. Mesa, D. B. Morris, J. M. Wright and D. Cook, 1995. DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture*, 137 : 245-256.
- Jeffreys, A. J., V. Willson and S. L. Thein, 1985a. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314 : 67-73.
- Jeffreys, A. J., V. Willson and S. L. Thein, 1985b. Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature*, 316 : 76-79.
- Jeffreys, A. J., J. F. Y. Brookfield and R. Semmeonoff, 1985c. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprinting. *Nature*, 317 : 818-819.
- Kuhnlein, U. Y., Y. Dawe, D. Zadworny and J. S. Gavora, 1989. DNA fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry. *Theor. Appl. Genet.*, 77 : 669-672.
- Litt, M. and J. A. Luty, 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 4 : 397-401.
- McConnell, S. K., P. O' Reilly, L. Hamilton, J. M. Wright and P. Bentzen, 1995. Polymorphic microsatellite loci from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North

- American and European population. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52 : 1863-1872.
- 万年英之・辻莊一・後藤信男, 1990. M13フェージを用いたニワトリ核DNAのフィンガープリント. *日畜会報*, 61 : 1057-1062.
- Mannen, H., S. Tsuji, F. Mukai, N. Goto and S. Ohtagaki, 1993. Genetic similarity using DNA fingerprinting in cattle to determine relationship coefficient. *J. Heredity*, 84 : 166-169.
- Meng, A., R. E. Carter and D. T. Parkin, 1989. The variability of DNA fingerprinting in three species of swan. *Heredity*, 64 : 73-80.
- Miesfield, R., M. Krystal and N. Arnheim, 1981. A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human delta and beta globin genes. *Nucleic Acids Res.*, 9 : 5931-5947.
- Morris, D. B., K. R. Richard and J. M. Wright, 1996. Microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their use for genetic study of salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53 : 120-126.
- Nagoya, H., H. Okamoto, I. Nakayama, K. Araki and H. Onozato, 1996. Production of androgenetic diploids in amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. *Fisheries Science*, 62 : 380-383.
- Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin and R. White, 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human genome mapping. *Science*, 235 : 1616-1622.
- Nei, M., 1971. Interspecific genedifferences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity. *Amer. Natur.*, 106 : 283-292.
- Nevo, E., 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theoret. Pop. Biol.*, 13 : 121-177.
- 西田 睦. 1989. 日本の淡水魚 (川那部浩哉・水野信彦). 山と溪谷社, 東京, pp66-86.
- O'Reilly, P. and J. M. Wright, 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.*, 47 : 29-55.
- Park and Moran, 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in fish biology and fisheries*, 4, eds. by G. R. Carvalho and T. J. Pitcher., Chapman & Hall, pp 272-299.
- Pastene, L. A., K. Numachi and K. Tsukamoto, 1991. Examination of reproductive success of transplanted stocks in an amphidromous fish, *Plecoglossus altivelis* (Temminck et Schlegel) using mitochondrial DNA and isozyme markers. *J. Fish Biol.*, 39 : (Supplement A), 93-100.
- Prodoehl, P. A., J. B. Taggart and A. Ferguson, 1992. Genetic variability within and among sympatric brown trout (*Salmo trutta*) populations : multi-locus DNA fingerprint analysis. *Hereditas*, 117 : 45-50.
- Rico, C., D. Zadworny, U. Kuhnlein and G. J. Fitzgerald, 1993. Characterization of hypervariable microsatellite loci in the threespine stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Molecular Ecology*, 2 : 271-272.
- Ruzzante, D. E., Microsatellite polymorphism and sampling effects on genetic distance and population structure. *Molecular Ecology* (in press).
- Sakamoto T., N. Okamoto, Y. Ikeda, Y. Nakamura and T. Sato, 1994. Dinucleotide-repeat polymorphism in DNA of rainbow trout and its application in fisheries science. *J. Fish. Biol.*, 44 : 1093-1096.
- Sawashi, Y. and M. Nishida, 1994. Genetic differentiation in populations of the Ryukyu-ayu *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* on Amami-oshima island. *Japan. J. Ichthyol.*, 41 : 261-274.
- Schafer, R., H. Zischler, U. Birsner, A. Becker and J. T. Ep-

- plen, 1988. Optimised oligonucleotide probes for DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 9 : 369-374.
- Scribner, K. T., J. R. Gust and R. L. Fields, 1996. Isolation and characterization of novel salmon microsatellite loci: cross-species amplification and population genetic applications. *Can J. Fish. Aquat. Sci.*, 53 : 833-841.
- 関伸吾・谷口順彦. 1985. 西南日本におけるアユ地方集団の遺伝的分化. 高知大学海洋生物教育研究センター研究報告, 54 : 745-749.
- 関伸吾・谷口順彦. 1988a. アイソザイム遺伝標識による放流湖産アユの追跡. *日本水産学会誌*, 54 : 745-749.
- 関伸吾・谷口順彦・田祥麟. 1988b. 日本及び韓国の天然アユ集団間の遺伝的分化. *日本水産学会誌*, 54 : 559-568.
- 関伸吾・谷口順彦. 1988c. 天然湖および人工湖の移植陸封アユおよび人工採苗アユの由来について. *水産育種*, 13 : 39-44.
- Seki, S., N. Taniguchi, N. Murakami, A. Takamichi and I. Takahashi, 1994. Seasonal changes in the mixing rate of restocked Ayu-juveniles and assessment of native stock using allozyme marker. *Fisheries Science*, 60 : 31-35.
- 庄司栄治郎・高木基裕・谷口順彦. 1995. RAPD-PCR 法によるタイ科魚類の遺伝的類縁関係. *水産育種*, 22 : 77-82.
- Skinner, D. M., 1977. Satellite DNA's. *Bioscience*, 27:790-796.
- Slettan, A., I. Olasker and O. Lie, 1993. Isolation and characterization of variable (GT)_n repetitive sequences from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Animal Genetics*, 24 : 195-197.
- 水産庁・(社)日本栽培漁業協会(1996)平成6年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績(全国), 107pp.
- Sugama, K., N. Taniguchi, T. Arakawa and C. Kitajima, 1988a. Isozyme expression of artificially induced ploidy in red sea bream, black sea bream and their hybrid. *Rep. Usa Mar. Bio. Inst.*, 10 : 75-81.
- Sugama, K., N. Taniguchi and S. Umeda, 1988b. An experimental study on genetic drift in hatchery population of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 : 745-749.
- Sugama, K., N. Taniguchi and S. Seki, 1992. Survival, growth and gonad development of triploid red sea bream, *pagrus major* (Temminck et Schlegel): use of allozyme markers for ploidy and family identification. *Aquaculture and Fisheries Management*, 23 : 149-159.
- Tacon, A. G. J., 1996. Trends in aquaculture production, *FAO Newsletter*, 12 : 6-9.
- 高木基裕・谷口順彦. 1996. 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.
- Taggart, J. B and A. Ferguson, 1990. Minisatellite DNA fingerprints of salmonid fishes. *Animal Genetics*, 21 : 377-389.
- 谷口順彦・田島健司. 1978. マダいの肝臓エステラーゼにみられる遺伝変異について. *日水誌*, 44 : 619-622.
- 谷口順彦・岡田容典. 1980. マダいの生化学的多型に関する遺伝学的研究. *日水誌*, 46 : 437-443.
- 谷口順彦・関伸吾・稲田善和. 1983. 両側回遊型、陸封型および人工採苗アユ集団の遺伝変異保有量と集団間の分化について. *日水誌*, 49 : 1655-1663.
- Taniguchi, N., S. Seki, J. Fukai and A. Kijima, 1988. Induction of two types of gynogenetic diploids by hydrostatic pressure shock and verification by genetic marker in Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 : 1483-1491.
- Taniguchi N. and Sugama K., 1990. Genetic variation and population structure of red sea bream in the coastal waters of Japan and the East China Sea. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56 : 1069-1077.
- 谷口順彦. 1991. ゲノム操作による魚類の品種改良法. 第12回基礎育種学シンポジウム報告, pp.42-60.

谷口順彦・松本聖治・小松章博・山中弘雄. 1995. 同一条件で飼育された由来の異なるマダイ5系統の質的および量的形質に見られた差異. 日水誌, 61 : 717-726.

Taniguchi, N., M. Yamasaki, M. Takagi and A. Thujimura, 1996. Genetic and environmental variances of body size and morphological traits in communally reared clonal lines from gynogenetic diploid ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Aquaculture*, 140 : 333-341.

Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17 : 6463-6471.

van Pijlen, I. A., B. Amos and T. Burke, 1995. Patterns of genetic variability at individual minisatellite loci in mink whale *Balaenoptera acutorostrata* populations from three different oceans. *Mol. Biol. Evol.*, 12 : 459-472.

Vassart, G., M. Georges, R. Monsieur, H. Brocas, A. S. Lequarre and D. Christophe, 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science*, 235 : 683-684.

Waples R. S., 1990. Temporal changes of allele frequency in

pacific salmon: implications for mixed stock fishery analysis. *Can J. Fish Aquat. Sci.* 47 : 968-976.

Weber, J. L. and May, P. E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Amer. J. Hum. Genet.*, 44 : 388-396.

Wetton, J. H., R. E. Caeter, D. T. Parkin and D. Walters, 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 327 : 147-149.

Winans, G. A., 1980. Geographic variation in the milkfish *Chanos chanos* I. Biochemical evidence. *Evolution*, 34 : 558-574.

Wright, J. M. and P. Benzen, 1994. Microsatellites: genetic markers for the future, pp. 384-388, in *Reviews in fish biology and fisheries*, 4, eds. by G. R. Carvalho and T. J. Pitcher., Chapman & Hall.

Zheng, W., N. E. Stacey, J. Coffin and C. Strobeck, 1995. Isolation and characterization of microsatellite loci in the goldfish *Carassius auratus*. *Molecular Ecology*, 4 : 791-792.