

分野横断的課題(平成22年度)

誌名	栃木県水産試験場研究報告
ISSN	13408585
著者	武田, 維倫 飯郷, 雅之
巻/号	55号
掲載ページ	p. 24-25和文抄録(p.1)
発行年月	2012年3月

分野横断的課題（平成 22 年度）

武田 維倫・飯郷 雅之¹

—アユのなわばり行動と関連する遺伝子を探す—

目 的

アユは養殖生産量、放流量、漁獲量等各種の指標から見て本県水産業の最重要魚種である。一般に、養殖魚は成長性や抗病性などの形質が優れている事が求められるが、アユは友釣りでの漁獲を期待される放流用種苗としての用途が大半を占める事から、なわばり形成能力が高い（＝友釣りで釣れる）ことも重要な形質である。また、アユの友釣りを愛好する遊漁者数は県内外を問わず非常に多く、その放流の成否は水産関係のみならずアユ漁場周辺地域に経済的影響を与えている。つまり、アユのなわばり形成能力は地域経済の活性化に貢献可能な形質といえることができる。しかしながら、昨今放流アユの放流効果の低下が指摘されており対策が求められている。このような状況下、近年、分子生理学的研究手法が進展したことにより、各種のモデル生物では行動（なわばり行動等を含む）と関連する遺伝子群の解析が進み、それらの研究成果を手がかりにアユでもなわばり行動について、分子レベルでの研究を進める基盤が整いつつある。そこで本課題では、分子育種への活用が期待される性格関連遺伝子を標的として cDNA クローニングを実施した。

材料および方法

RNA 抽出及び cDNA 合成 アユ全脳及び網膜より ISOGEN (Nippongene, Tokyo) を用いて total RNA を抽出し、Ready-To-Go T-primed-First-strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare, Tokyo) を用いて逆転写し cDNA ライブラリーを作成した。反応は付属のマニュアルに従って行った。

アユ性格関連遺伝子部分配列の cDNA クローニング 標的とする性格関連遺伝子について、米国立生物工学情報センター (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のデータベースに登録された塩基配列情報を幅広く収集し、CLUSTALW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いて整列し塩基配列の保存性が高い部位に Fw3 種、Rv3 種の縮重プライマーを設計した。設計した縮重プライマーを用いてアユの脳と網膜を用いて作成した cDNA ライブラリーを鋳型に標的とする配列を PCR 法により増幅した。PCR 溶液の組成は、cDNA 溶液 0.5 μ L, 0.5U の *TAKARA LA Taq* (Takara, Ootsu), 10 \times LA-Buffer 2 μ L, 2.5mM MgCl₂ 1 μ L, 1 μ M dNTP 1.6 μ L, 0.5 μ M Fw および Rv プライマーを全量 20 μ L となるように調整し、温度サイクルは、94 $^{\circ}$ C5 分のインキュベーションの後、94 $^{\circ}$ C1 分、42, 45, 50, 55 $^{\circ}$ C の 4 種のアニーリング温度で 1 分、72 $^{\circ}$ C1 分のサイクルを 40 回、最後に 72 $^{\circ}$ C10 分のインキュベーションとした。増幅された DNA 断片は、エチジウムブロマイド入り 2%アガロース S ゲルを用いて電気泳動によ

て分離し、紫外線照射下で目的のバンドを切り出した。切り出したバンドは QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Tokyo) を用いて精製した。精製した DNA 断片を p-GEM T Easy (Promega, Tokyo) に挿入した。このプラスミドをヒートショック法によって大腸菌株 JM109 に導入・形質転換した。その後、形質転換した JM-109 菌体を X-gal および IPTG を添加した LB-アンピシリン寒地培地に塗布し 37 $^{\circ}$ C で 15 時間培養した。培地上に形成されたコロニーにおける PCR 産物導入の確認はカラーセレクション、コロニー-PCR によるインサートチェックにより行った。目的とする形質転換菌体を LB 液体培地で 15 時間振蕩培養し、培養液から LaboPass Plasmid Mini Purification kit (COSMO Genetech, Seoul) を用いてプラスミド抽出を行った。プラスミド抽出物については ABI Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, Tokyo) を用いて塩基配列を決定した。

RACE 法による cDNA 全長塩基配列の決定 アユ全脳及び網膜より RNeasy Mini (Qiagen, Tokyo) を用いて total RNA を抽出し、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Takara, Ootsu) を用いて逆転写しアダプター付加 cDNA ライブラリーを作成した。反応は付属のマニュアルに従って行った。部分配列の cDNA クローニングで得られた塩基配列情報を基に、5'-RACE 用及び 3'-RACE 用遺伝子特異的プライマーを設計した。PCR 溶液の組成は、cDNA 溶液 0.5 μ L, 0.5U の *TAKARA LA Taq*, 10 \times LA-Buffer 2 μ L, 2.5mM MgCl₂ 1 μ L, 1 μ M dNTP 1.6 μ L, 遺伝子特異的プライマー (10 μ M) 0.4 μ L, UPM mix プライマー 2 μ L を全量 20 μ L となるように調整し、温度サイクルは、94 $^{\circ}$ C2 分のインキュベーションの後、94 $^{\circ}$ C30 秒、72 $^{\circ}$ C2 分のサイクルを 5 回、94 $^{\circ}$ C30 秒、70 $^{\circ}$ C30 秒、72 $^{\circ}$ C2 分のサイクルを 5 回、94 $^{\circ}$ C30 秒、68 $^{\circ}$ C30 秒、72 $^{\circ}$ C2 分のサイクルを 25 回とした（タッチダウン PCR）。以降 cDNA 全長塩基配列の決定は前出の部分配列の決定と同様の方法で実施した。

結果および考察

決定された cDNA 塩基配列のサイズは 2,194-2,120bp (5'UTR+CDS+3'UTR: 595-521bp+1,192bp+407bp) であり、364 アミノ酸残基をコードしていた。5'UTR については複数のバリエーションの存在が認められたことから、標的遺伝子は複数の転写開始点を持つと考えられた。また、アミノ酸配列を TMHMM Server, V.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) を用いて構造解析したところ、7 回膜貫通型の構造を示し標的とする性格関連遺伝子の予測される構造と一致した (図 1)。

¹ 宇都宮大学農学部

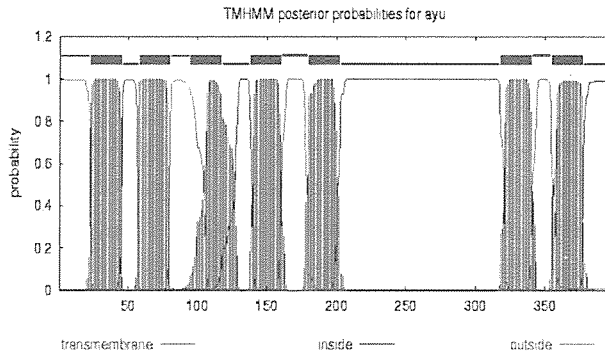


図1 標的遺伝子の構造推定結果

また、縮重プライマーの作成時に塩基配列情報を収集した生物種のアミノ酸配列について MEGA4.0.2 (<http://www.megasoftware.net/>) を利用して近隣接合法による分子系統樹を作成した (図 2)。その結果、この分子系統樹は哺乳類 (有袋類を含む) から成るクレードとそれ以外の脊椎動物から成るクレードに分岐し、次に鳥類と爬虫類、両生類と魚類が分岐した。それぞれの分岐の大部分は高いブートストラップ値により支持された。今回クローニングしたアユの性格関連遺伝子はゼブラフィッシュやコイと同じ硬骨魚類のクレードに位置づけられ、魚類内部の系統関係はミトコンドリア DNA 全長データに基づく主要魚類の進化系統樹とはほぼ一致していた。¹⁾ このことから本試験では、標的とした性格関連遺伝子の完全長 cDNA の塩基配列を決定することができたと考えられた。今後は、当該性格関連遺伝子のゲノム構造を明らかにすると共に多型部位の探索とマーカータ化を進め、性格関連遺伝子の分子育種への利用可能性を検討することを計画している。

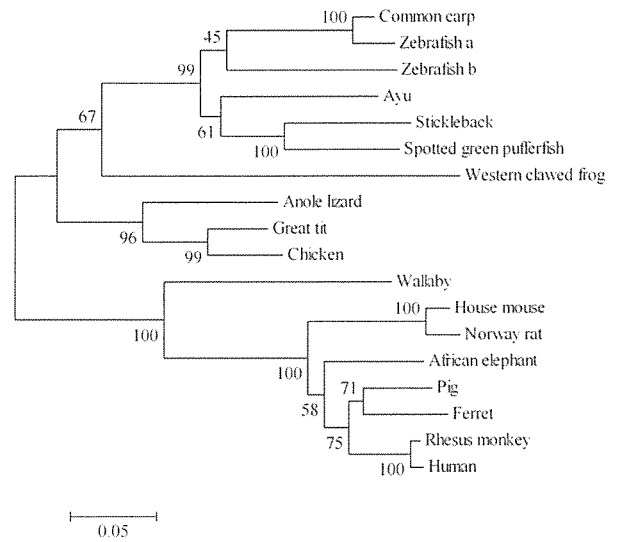


図2 標的遺伝子の分子系統樹

引用文献

- 1) Inoue J, Miya M, Venkatesh B, Nishida M. The mitochondrial genome of Indonesian coelacanth *Latimeria menadoensis* (Sarcopterygii: Coelacanthiformes) and divergence time estimation between the two coelacanths: *Gene* 2005; 349: 227-235.

(指導環境部)

分野横断的課題ーアユのなわばり行動と関連する遺伝子を探すー (p24-25)

アユは養殖生産量, 放流量, 漁獲量等各種の指標から見て本県水産業の最重要魚種です。一般に, 養殖魚は成長性や抗病性などの形質が優れていることが求められますが, アユは友釣りでの漁獲を期待される放流用種苗としての用途が大半を占めるので, なわばり形成能力が高い(=友釣りで釣れる)ことも重要な形質となっています。そこで, 複数の生物種で行動の傾向との関連が指摘されている性格関連遺伝子について分子育種への利用可能性を検討しました。その結果, 目的とするcDNAの塩基配列を決定することができました。