

Long PCR によるトリガイのミトコンドリア DNA 増幅手法の検討 (短報)

今西裕一

Long PCR Amplification of Cockle *Fulvia mutica* Mitochondrial DNA

Yuichi Imanishi

キーワード: Long PCR, ミトコンドリア DNA, トリガイ

トリガイ *Fulvia mutica* はマルスダレガイ目ザルガイ科に属する二枚貝で、京都府立海洋センターでは従来からその養殖技術開発に取り組んでいる。トリガイ養殖業においては、単価の高い大型貝の生産割合が採算性を左右するため、藤原ら (2005) は自家受精や兄妹交配等により作出した近交系親貝を用いて、成長特性に優れた雑種第 1 代を生産する技術を開発した。この手法は、異なる系統を交配して得た個体で見られる雑種強勢を利用するものだが、その程度は親貝系統の組み合わせにより変化すると考えられており、大型貝の生産に適した系統の選抜が今後の課題とされている。

親貝系統の選抜や維持管理を効率良く進める上で、遺伝情報の多型を系統識別の指標に利用することは有効な手段の一つと考えられる。今回、その技術開発の基本となるトリガイ遺伝情報の収集を目的に、Hwang *et al.* (2001) が節足動物で行った手法を参考に、トリガイのミトコンドリアの (以下、mt- とする) 16S リボソーム RNA 遺伝子の部分塩基配列の決定を行うとともに、mt-DNA のほぼ全域を増幅する Long PCR について検討した。以下にその方法および結果の概要を述べる。

京都府立海洋センターで生産し、育成したトリガイ 1 個体 (殻長 5.9 cm) から採取した斧足部筋肉 1.5 g に、15 mL のホモジナイズバッファー (0.3 M ショ糖, 0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 0.01 M EDTA) を加え、ポリトロンホモジナイザー (Kinematica GmbH) でホモジナイズした後、4°C, 1,500×g で10分間遠心した。その上清をさらに 4°C, 10,000×g で10分間遠心して得られた沈渣を粗ミトコンドリア画分とした。DNeasy tissue kit (Qiagen) を用いて、粗ミトコンドリア画分から抽出した DNA を粗 mt-DNA とし、使用時まで -20°C で保存した。なお、抽出手順は製品添付のマニュアルに従った。

塩基配列データベース GenBank から、トリガイと同じザルガイ科に属するヨーロッパザルガイ *Cerastoderma edule*, ラグーンザルガイ *Cerastoderma glaucum*, に加え、マルスダレガイ科のアサリ *Venerupis philip-*

pinarum のミトコンドリア 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列 (GenBank のアクセッション番号はそれぞれ AF122971, AF122972, NC003354) を入手し、これらの中で塩基配列が良好に保存された領域において、トリガイの mt-16S リボソーム RNA 遺伝子の一部を増幅するプライマー fmuti_16S_F (5'-AGAAGAC CCGGTCGAGCTT-3'), fmuti_16S_R (5'-ATCCAA CATCGARGTCGCA-3') を設計した。PCR 反応は 2 μL の 10×PCR バッファー (Applied Biosystems), 2 μL の dNTP (2 mM), 4 pmol の各プライマー, 0.5 unit の AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼ (Applied Biosystems) および 1 μL のトリガイ粗 mt-DNA を含む 20 μL の反応液で行った。反応条件は、95°C で10分加熱後、95°C 30秒, 55°C 90秒, 72°C 60秒のサイクルを35回行い、最後に 72°C で10分加熱した。反応液の一部を1.5%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムによる染色の後、UV トランスイルミネーターで PCR の産物を確認した。

PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用い、製品添付のマニュアルに従って精製した後、その塩基配列を解析サービス (株式会社島津製作所) を利用して決定した (GenBank のアクセッション番号は AB246677)。また、得られた塩基配列を前述の二枚貝 3 種の配列と比較するため、CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) により多重整列化した。

得られた mt-16S リボソーム RNA 遺伝子の部分塩基配列のうち、プライマー部分を除いた領域内に、mt-DNA のほぼ全領域を増幅するための Long PCR プライマー fmuti_mtDNA_F (5'-GACGACCAGAG AGTTCTTATCTAAGGCCG-3'), fmuti_mtDNA_R (5'-CGCTGTTATCCCCGCGGTAAGTTT-3') を設計した。PCR 反応は 2 μL の 10×LA PCR バッファー II (Takara), 3.2 μL の dNTP (2.5mM), 4 pmol の各プライマー, 1 unit の TaKaRa LA Taq (Takara), 2 μL の 25 mM MgCl₂ および 1 μL のトリガイ粗 mt-DNA を含む 20 μL の反応液で行った。反応条件は、95°C で2分加熱後、95°C 20秒, 68°C 18分

F.muti		fmuti_mt16S_F →	1 A	AGAGGA-AAA	ATAGTAATTA	CTTTTT----	-----TTT	TCAGTTTTAT
C.edul	192	<u>AGAAGACCCC</u>	<u>GTCGAGCTTG</u>	.AT--G..G	C.T-CC.C..	TGG.AA----	-----CCG	AA.T...A..
C.glau	192	<u>.....G</u>	<u>.ATTG.-.GG</u>	C.T-.GTC..	TGG.C-----	-----	-----CG	AA.T...A..
V.phil	861TT	.TTAA.T...	.A.C..GA..	TGG..AAATG	AAAAGTG..A	AT....A..
F.muti	40	TGGGG-----	-----CAATA	AAGG-----	--AGAAGAAT	AAACCTCCAG	TTTTTTGT---	-----
C.edul	247	-----T	GC..-----	--A...T-	-.....GC	..A..A.G--	-----
C.glau	248	-----T	GC..-----	--...C.T-	-.....GC	..A..A.A-	-----
V.phil	931	..TT.GCTGA	GTTTTT...T	G.A.TTTAGT	TGG.G...GC	TG.GT.TA..	G.AA.AAACT	TAAGAAATAC
F.muti	79	TATTGATCCA	TCTGTTGATG	ATAATAAGAA	<u>AAAGTTACCG</u>	<u>CGGGGATAAC</u>	<u>AGCGCAAGAC</u>	<u>GACCAGAGAG</u>
C.edul	285	.GAG.....	.TAC..-...	.AT..-....C.....T	TG.TTT....
C.glau	286	.GAA.....	.T--..-...	.A..-.....C.....T	TG.TTT....
V.phil	1001	..AA.....T	CT--...GA	GA.G.T..C.C.....	.A.....T..TT.	TTTTTA....
F.muti	149	<u>TTCTTATCTA</u>	<u>AGGCCGTAAG</u>	168	← fmuti_mt16S_R			
C.edul	353	CC.....G.	C...AA...T	<u>TGCGACTTCG</u>	<u>ATGTGGAT</u>	391		
C.glau	352	GC.A...G.	C...AA...T	<u>.....C...</u>	390		
V.phil	1069	A.....TG.	G..AA.AGTTC...	1107		

Fig. 1 Sequence alignment of partial mitochondrial 16S ribosomal RNA from *Fulvia mutica* and three species of Veneroidea: *Fulvia mutica* (F. muti; present study, GenBank AB246677), *Cerastoderma edule* (C. edul; GenBank AF122971), *Cerastoderma glaucum* (C. glau; GenBank AF122972) and *Venerupis philippinarum* (V. phil; GenBank 18249923). Primer sequences for *F. mutica* partial mitochondrial 16S ribosomal RNA are shown in shaded boxes and those for almost the entire mitochondrial genome are underlined.

のサイクルを30回行い、最後に 72°C で10分加熱した。反応液の一部を0.6%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムにより染色した後、UV トランスイルミネーターで反応産物を確認した。さらに、同時に泳動した λ /Hind III マーカーと泳動距離を比較して産物のサイズを推計した。

得られたトリガイ mt-16S リボソーム RNA 遺伝子の部分塩基配列と、プライマー設計に利用した3種のマルスダレガイ目二枚貝の塩基配列とを多重整列した結果を Fig. 1 に示した。トリガイを含むザルガイ科二枚貝3種間で塩基配列を比較した結果、トリガイの168塩基配列中104塩基、すなわち61.9%の配列が保存されていた。

Long PCR 産物の電気泳動結果を Fig. 2 に示した。産物と同時に泳動したマーカーとの比較から、産物のサイズは21千塩基対 (kb) と推計され、これがトリガイ mt-DNA のサイズと考えられた。現在 GenBank 上で mt-DNA の全塩基配列が公開されている二枚貝は、マゼランツキヒガイ *Placopecten magellanicus*, アメリカガキ *Crassostrea virginica*, マガキ *Crassostrea gigas*, ムラサキガイ *Mytilus galloprovincialis*, ヨーロッパイガイ *Mytilus edulis*, サザンポケットブック *Lampsilis ornata*, アサリの7種である。これらの mt-DNA のサイズは、それぞれ 32.1, 17.2, 18.2, 16.7, 16.7, 16.1, 22.7 kb で、アメリカガキとマガキ, ムラサキガイとヨーロッパイガイ間に見られるように、同属種間では比較的近似したサイズを示し、種分化の過程を反映しているように見える。今回明らかになったトリガイ mt-DNA のサイズは、推計値ながら上記7種の中で唯一トリガイと同じマルスダレガイ目に属するアサリに最も近く、両者の分類学的な位置関係を支持してい

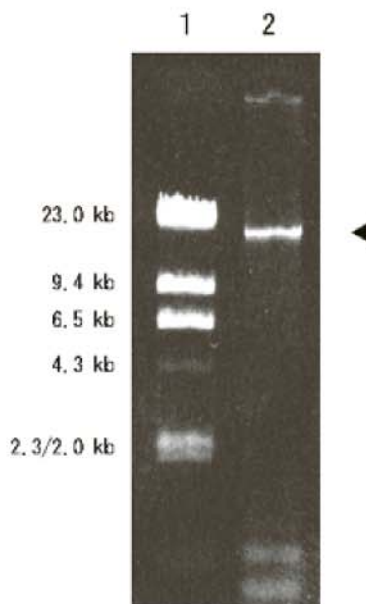


Fig. 2 Long PCR product with fmuti_mtDNA_F and fmuti_mtDNA_R designed for *Fulvia mutica* mitochondrial DNA amplification. PCR product was electrophoresed through a 0.6% agarose gel. Lane 1, λ DNA/Hind III size marker; lane 2, long PCR product in this study. The arrowhead indicates long PCR product, which is approximately 21 kb in length.

るように思われた。

魚類の系統識別に mt-DNA の多型を利用する場合、D-loop 領域またはコントロール領域と呼ばれる進化速度の速い領域が多用される (Tabata and Mizuta, 1997; Higuchi and Kato, 2002; 柳本, 2004)。しかしながら、二枚貝で明確に定義されたコントロール領域を有するのはムラサキガイなど一部の種に限られ、

その他の二枚貝の集団解析においては、多型に富んだ非コード領域を便宜的に利用しているのが現状である (Aranishi and Okimoto, 2005)。トリガイにおいても、mt-DNA の多型を利用して系統識別を行う場合には、あらかじめ非コード領域等の多型に富んだ領域を検索する必要がある。

今回行った Long PCR では、塩化セシウム密度勾配遠心等により生貝から直接 mt-DNA を調製する従来法に比べ、容易に夾雑物の少ない mt-DNA を入手可能である。得られた mt-DNA は制限酵素地図の作成やクローニングの材料として用いることが可能と考えられ、非コード領域をはじめとする詳細な遺伝情報の解析への積極的な活用が期待できる。

文 献

- Aranishi F., Okimoto T. 2005. Sequence polymorphism in a novel noncoding region of Pacific oyster mitochondrial DNA. *J. Appl. Genet.*, **46**: 201-206.
- 藤原正夢, 田中雅幸, 岡部三雄. 2005. トリガイ近交系間交雑に見られた雑種強勢. 京都海洋セ研報, **27**: 25-30.
- Higuchi M., Kato K. 2002. Sequence variability in the mitochondrial DNA control region of five *Sebastes* species. *Fish. Sci.*, **68**: 643-650.
- Hwang U.W., Park C.J., Yong T.S., Kim W. 2001. One-Step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **19**: 345-352.
- Tabata K., Mizuta A. 1997. RFLP analysis of the mtDNA D-loop region in red sea bream *Pagrus major* population from four locations of western Japan. *Fish. Sci.*, **63**: 211-217.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673-4680.
- 柳本 卓. 2004. mtDNA の PCR-RFLP 分析によって明らかになったハタハタ集団の地理的分化. 日本水誌, **70**: 583-591.