

# 養殖アワビ優良品種の作出

増養殖対策科 岡村 愛

平成 11 年度県プロジェクト研究事業として取上げられた、PCR 法による養殖メガイアワビ高成長系の作出に関する研究は、メガイアワビの飼育について基礎データを収集したが、DNA 解析を行うに当たって PCR に不可欠なプライマーが開発されておらず、その設計から始める必要があった。

そこで 12 年度は育種目標をクロアワビに変更し、同種の種苗生産において問題となっている筋萎縮症の耐病性品種作出とした。

## 1 目 的

クロアワビ種苗生産及び中間育成の過程において、春から夏の水温上昇期に筋萎縮を伴う感染症が流行し、県栽培漁業センターでは 50% の減耗を見る年がある。いわゆる筋萎縮症は、原因病原体が特定されておらず、したがってその対策も紫外線照射海水を用いた飼育のように消極的な技術が開発されるに留まっている。一方、三重県栽培漁業センターでは耐病性の系統があるらしいことをつきとめ、この形質は母系遺伝すると報告している<sup>1)</sup>。

本研究では RAPD-PCR を用いて、筋萎縮症に抵抗性を示す個体とそうでない個体の遺伝的差異を分析した。

## 2 材料及び方法

### (1) 供試材料

県栽培漁業センターで平成 11 年 10 月に採卵し種苗生産したクロアワビ稚貝で、平成 12 年 6 月に発病した 10 個体及び健丈貝 10 個体を、同年 10 月に耐過貝 10 個体をサンプルとした。

### (2) DNA 抽出

各個体の体液及び外套膜から、前者は核酸抽出剤 SepaGenc(三光純薬)を、後者はフェノール・クロロホルム抽出法を用いて DNA を抽出した。

### (3) RAPID 分析

市販のランダムプライマー 12 種類 (DNA オリ

ゴマーセット A-1、12 塩基、A01 ~ A12 : 和光純薬社製) 及び同 A09 をベースに設計した 13 及び 14 塩基のプライマー (外注 : 表 1) 各 4 種類を用いて PCR を行った。なお、A09 は予備実験で特に増幅断片の出現が良好であった。

オリゴマーセットは 1 種類を単独で用いると、増幅断片が多く検出され分析に向かないため、4 種類を混合して用いた。

表1 DNAプライマー

| No. | 塩基数 | 配 列                  |
|-----|-----|----------------------|
| 1   | 14  | 5,-CCGCAGTTAGATCG-3, |
| 2   | 14  | 5,-CCGCAGTTAGATAG-3, |
| 3   | 14  | 5,-CCGCAGTTAGATCT-3, |
| 4   | 14  | 5,-CCGCAGTTAGATAC-3, |
| 5   | 13  | 5,-CCGCAGTTAGATA-3,  |
| 6   | 13  | 5,-CCGCAGTTAGATT-3,  |
| 7   | 13  | 5,-CCGCAGTTAGATC-3,  |
| 8   | 13  | 5,-CCGCAGTTAGATG-3,  |

PCR 反応液組成及び PCR 条件を表 2、3 に示した。PCR 後、アガロースゲルで 100V-1.5 時間の電気泳動後、GelStar(宝酒造)で染色した。DNA サイズマーカーは TOYOBO  $\lambda$ /Hind III digest -  $\phi$  X174/Hinc II digest を用いた。得られた断片は 2 個体間で検出された総断片数に占める共有断片数の割合 (Band Sharing Index, BSI) を用い、各集団間の遺伝的な類似性を示した。BSI は次式により算出した。

$$BSI = 2 \times N_{ab} / (N_a + N_b)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} N_{ab} : \text{個体 a 及び個体 b に共通する断片数} \\ N_a, N_b : \text{a, b 各個体に見られた断片数} \end{array} \right.$$

表2 PCR反応液組成(1検体分)

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| 10 × PCR Buffer            | 2 $\mu$ l   |
| dNTP-Mixture (2.5mM each)  | 2 $\mu$ l   |
| Taq DNA Polymerase         | 0.5 $\mu$ l |
| Sterilized distilled water | 13 $\mu$ l  |
| Template DNA               | 2 $\mu$ l   |
| Primer                     | 0.5 $\mu$ l |

表3 PCR反応条件

|            |      |
|------------|------|
| ① 94 °C    | 3min |
| ② 35cycles |      |
| 93 °C      | 1min |
| 48.5 °C    | 2min |
| 72 °C      | 2min |
| ③ 72 °C    | 5min |
| ④ 4 °C     |      |

### 3 結果及び考察

病貝としてサンプリングした稚貝が筋萎縮症に罹っていることを確認するために組織切片を作成した。腹足部の神経幹に筋萎縮症の特徴とされる異常細胞塊が形成されていた(図1)。なお、異常細胞塊は健丈と思われる稚貝にも軽度の形成が観察された。

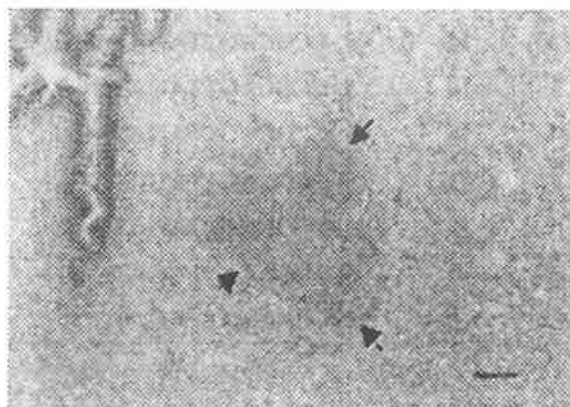


図1 神経幹に形成された異常細胞塊(矢印、Bar:100  $\mu$  m)

クロアワビのDNA多型解析を行うに当たり、RAPD-PCR法の条件設定として、適切な増幅断片数が得られるプライマーの選択や組み合わせ、PCR条件を明らかにした。抽出したクロアワビのDNAは、健丈貝、病貝及び耐過貝の各6個体をPCRに供した。オリゴマー12種類を用いた11の組み合わせのうち、断片数が適切であった組合せはオリゴマーNo. 1, 2, 11, 12の1組であった。14塩基のプライマーは4種類中3種類で適切な断片数が得られたのに対し(図2)、13塩基では断片数が多くなり分析には不適であった。

全ての増幅断片は0.39kbpから6.0kbpの間に検出

された。集団間において4種類のプライマーを用いたRAPD-PCR法によって得られた増幅断片及び断片パターンはプライマーによって異なったが、個体間の変異は少なかった。4種類のプライマーから求められた平均BSIは健丈貝-病貝間が0.439、健丈貝-耐過貝間が0.380、病貝-耐過貝間が0.472であった。

庄司ら(1995)<sup>2)</sup>がRAPD-PCR法によるタイ科3亜科5属6種の遺伝的類縁関係を報告している。それによれば、同種内(集団内)の平均BSIは0.81~0.82、同亜科内の魚種間での0.420~0.448と高い値を示し、タイ科魚種間の平均BSIは0.155であった。今回のクロアワビ3集団は同種間にも関わらず、平均BSIは0.3~0.4であった。これはクロアワビが高い多型性を持つためであると考えられた。また、目視的には各集団のバンドパターンに差があるように見られるが、BSIに大きな差は認められなかった。これは健丈貝及び病貝と耐過貝の間に、薄い同様の位置に増幅断片が出現したためである。

岡田ら(1999)<sup>1)</sup>は筋萎縮症の耐病性は母貝に由来すると報じているが、今回のRAPD-PCRを用いた比較ではこれを裏付けることはできなかった。耐病性の差異が、環境要因や個体差によるものを排除し、遺伝的形質によるものであることを確認する必要がある。この点については、現在、養殖研究所と三重県の共同研究で、マイクロサテライトDNA多型解析技術を応用してクロアワビ耐病性系統の作出が試みられている。

原因病原体が特定されておらず、生産現場での防除法も確立されていない現状において、DNAマー

カーを用いた耐病性親貝の選別は、放流用種苗生産現場においても遺伝的多様性を損なわずに生産効率を高めると言う点で、注目される生産手段であると考えられる。

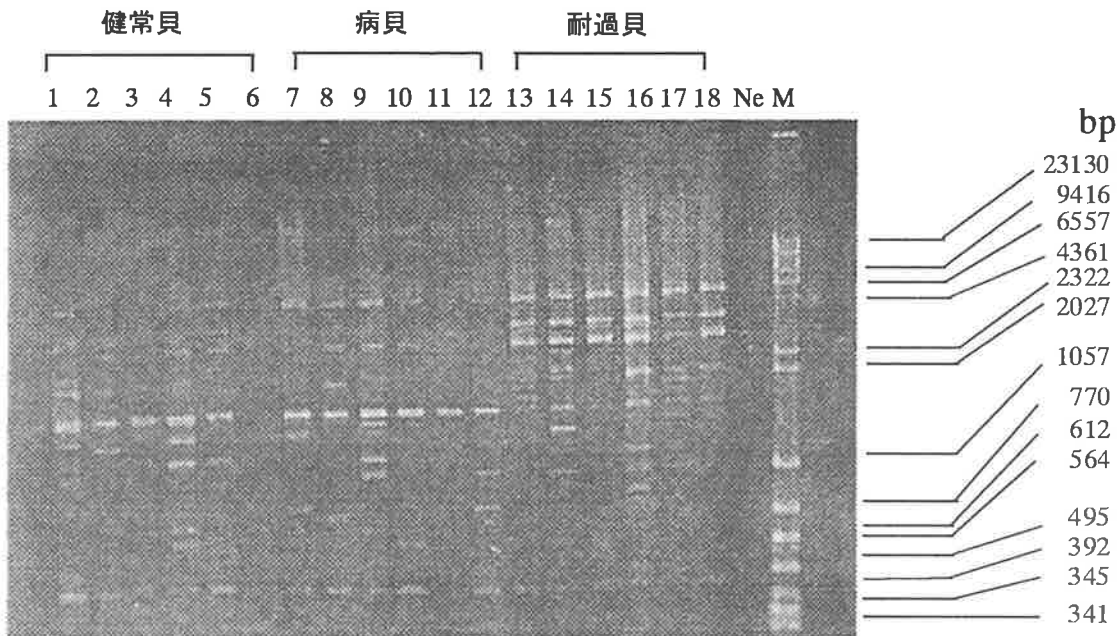


図2 14塩基プライマー(No.3)による増幅断片パターン

## 文 献

- 1) 岡田一宏・西村守央・川村剛・林政博(1999):  
親貝に由来するクロアワビ稚貝の筋萎縮症に対する抵抗力の差異. 水産増殖, 47(4), 573-582
- 2) 庄司栄治郎・高木基裕・谷口順彦(1995):  
RAPD-PCR によるタイ科魚類の遺伝的類縁関係.  
水産育種, 22, 77-8