

非放射性プローブを用いたヒラメの DNAフィンガープリント

原 素之¹⁾・出羽厚二²⁾・内藤笑美子²⁾・山内春夫²⁾

DNA-Fingerprinting with non-Radioactive Probe in a Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Motoyuki HARA¹⁾, Koji DEWA²⁾, Emiko NAITO²⁾ and Haruo YAMANOUTI²⁾

Abstract

DNA-fingerprinting with non-radioactive probe was applied to individual identifications in a flounder, *Paralichthys olivaceus*.

(1) A human genome-derived minisatellite, called myoprobe, could be used for DNA-fingerprinting of a flounder.

(2) DNA for analysis of DNA-fingerprinting were extracted from as little as 0.1 ml blood of a flounder or less.

(3) Individuals in a flounder were performed by means of DNA-fingerprinting with non-radioactive probe.

(4) The DNA-fingerprinting of a flounder which was established on this experiment does not need the radioactive substance as marker attached to the probe. Therefore, it is considered that this method is applied in many laboratories without radio isotope equipment.

Key words DNA-fingerprinting, non-radioactive, myoprobe, flounder

はじめに

種苗生産技術の進歩と染色体操作技術の向上により、数魚種においてクローンの作出が試みられている (NARUSE *et al.* 1985, STREISINGER *et al.* 1981).

これらのクローン魚の遺伝的均一性については、移植組織の適合性やアイソザイム遺伝子に

1992年12月8日受理, 日本海区水産研究所業績A第484号

1) 〒951 新潟市水道町1丁目5939-22 日本海区水産研究所
(Japan Sea National Fisheries Research Institute, Suido-cho, Niigata 951, Japan)

2) 〒951 新潟市旭町通1丁目757 新潟大学医学部
(School of Medicine, Niigata University, Asahimachidori, Niigata 951, Japan)

よって検討されている (HAN *et al.* 1991). しかし, 組織移植では操作が繁雑であったり, またアイソザイムでは検出できる遺伝子座に限られていることなどから, より効率的な検査方法の開発が期待されている.

最近, 法医学の分野において個人識別や親子鑑定で有力な分析法の1つになっているものとして, DNA フィンガープリント法(出羽ら 1991)がある. DNA フィンガープリント法は, 同時に多くの染色体座の変異を検出できるため, 水産分野においても個体の同定や系統判別を行うための有効な手法と考えられる. この方法の応用例としては人為雌性発生アユや天然雌性発生ギンブナのクローン解析に用いられ, その有用性が示されている (HAN *et al.* 1992; 藤川ら 1992). しかし, これらの DNA フィンガープリント法は, 放射性 ^{32}P をプローブの標識(ホットプローブ)として用いていることから, 特殊な施設や厳重な管理が必要であるという難点がある.

本研究では, 魚類における非放射性プローブを用いた DNA フィンガープリント法を確立するため, ヒトのミオプローブ (JEFFREYS *et al.* 1985) を用いて, ヒラメの DNA フィンガープリントの検出方法を検討した.

材料と方法

1 ゲノム DNA の抽出

(1) 採血

ゲノム DNA の抽出材料として, ヒラメの血液を用いた. 採血に用いたヒラメは新潟県五十嵐浜で1992年9月に採集された天然ヒラメ6個体と, 新潟県栽培漁業センターから供与された人工種苗ヒラメ12個体である. 天然ヒラメと人工種苗ヒラメの体長(体重)は, それぞれ279mm(234g)~334mm(279g), 9.5mm(6.6g)~14mm(24g)であった. 採血は尾動脈から注射器により行った. 魚体が小さく, 注射器による採血が困難なものは, 尾部を切断し, 生理食塩水を切断部に流しながら採血した. 血液は0.5~5ml採取し, クエン酸ナトリウム入り生理食塩水を30~50ml加え, 4000~5000RPMで20分間, 遠心分離し血球を集めた.

(2) 除蛋白

沈殿した血球に3~4倍量のTNE溶液(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA)を加えて懸濁させた. これに, SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)を1%, 蛋白分解酵素プロテナーゼKを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるよう加え, 58 $^{\circ}\text{C}$ で2~4時間反応させた.

(3) フェノール抽出

プロテナーゼKで反応させた後, 等量のTEフェノール溶液(10mM Tris-HCl pH7.5, 0.1mM EDTAにフェノールを飽和)を加え, 2時間ゆっくりと振盪した. その後, 4000~5000RPMで20分間遠心分離し, 上清液(水層部)を採取した. 再度, この水層部にTEフェノール溶液を加え, 12時間ゆっくりと振盪後, 遠心分離した. さらに, この水層部にTEフェノール-クロロホルム(1:1)溶液を加え, 1~2時間ゆっくりと振盪後, 遠心分離した. 最後に, この水層部にクロロホルムを加え, 1~2時間ゆっくりと振盪後, 遠心分離した.

(4) エタノール沈殿

分離した水層部に2倍量の-20 $^{\circ}\text{C}$ で冷却した100%エタノールを加え, 攪拌しゲノムDNAを析出させた. このDNAを遠心分離(3000~4000RPM)により回収し, 70%冷エタノールで脱塩後, 風乾した. 乾燥したDNAにTE溶液(10mM Tris-HCl pH7.5, 0.1mM EDTA)を加え, DNA試料とした. この段階でDNAが抽出されているか, 1%アガロースゲル(50 \times 50 \times 3mm)電気泳動(50V, 60分間)でチェックした.

2 制限酵素による DNA の切断

DNA 試料20 μ g に対して, *Hea* III (制限酵素) 30 Units, 10 \times buffer (*Hea* III に添付) 20 μ l を加え, 再蒸留水で200 μ l にした. この溶液をエペンドルフ型チューブに入れ, 37 $^{\circ}$ C で3~4 時間反応させた. 等量の TE フェノール溶液を加え, 5~10分間激しく攪拌し DNA を抽出した. 遠心分離(12000RPM, 10分間)で得られた上清に等量のクロロホルムを加え, 水層画分からフェノールを除いた. 再度, 遠心分離 (12000RPM, 10分間) を行い, ここで得られた水層に1/10容量の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加えた後, 2 倍量の100%冷エタノールを加えた. -20 $^{\circ}$ C で2時間以上放置し遠心分離 (12000RPM, 10分間, 4 $^{\circ}$ C) し, DNA を沈殿させた. 沈殿した DNA を70%冷エタノールで脱塩後, 風乾し, TE 溶液に溶かして DNA フィンガープリント用試料とした.

3 アガロースゲル電気泳動

アガロースゲルの作成には250 \times 125 \times 7 mm のゲル枠を用いた. TAE 溶液に1.3%の濃度でアガロースを溶解し加熱した後, ゲル枠に流し込んだ. 電気泳動はサブマリン型を用い, TAE 溶液中, 約3 V/cmの定電圧で, 24~48時間行った. DNA 試料のゲルへの添加は, 3~5 μ g の DNA に1/5容量の色素液(0.25% ブロムフェノールブルー, 0.25%キシレンシアノール, 50%グリセロール)を混和して行った. 電気泳動のサイズマーカーとして λ DNA/*Hind* IIIを用い, 泳動後エチジウムブロマイド (0.5 μ g/ml) で染色し DNA 塩基対の長さの基準とした.

4 プロットイング

(1) ゲル処理

泳動後のゲルの処理として, まず250mM HCl 溶液で15分間緩やかに振盪し脱プリンを行った. 次に, DNA の2本鎖を1本鎖にするため, アルカリ溶液 (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) 中で30分間緩やかに振盪した. さらに, 中和溶液 (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl) 中で30分間緩やかに振盪した.

(2) バキュームプロットイング

DNA をメンブランフィルターへ移動させるため, バキュームプロットイング装置の上に Hybond N⁺メンブラン, ゲル, 特殊パットの順に気泡が入らないよう注意して乗せた. プロットイングのためのトランスファー液には20 \times SSC (0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム) 溶液を用い, 40分間, -7cmHg で吸引した.

(3) DNA の固定

プロットイングしたメンブランと0.4M NaOH 溶液を滲み込ませた3 MM ろ紙を20分間接触させ, DNA をメンブランに固定させた. 次に, メンブランを5 \times SSC 溶液中で30秒間振盪し, 風乾した.

以下のプローブの標識から DNA フィンガープリントの検出は, アマシャムジャパン社の ECL 遺伝子検出システムを用い, その取り扱い方法に従った.

5 DNA フィンガープリントの検出

(1) プローブの標識化

ミオプローブ(200 μ g/20 μ l H₂O)を95 $^{\circ}$ C で, 5分間熱変性させた後, 氷中で5分間急冷した. これにラベリング試薬(oxidase complex)を20 μ l, さらにグルタルアルデヒド溶液20 μ l を混和し, 37 $^{\circ}$ C で10分間反応させることにより, ミオプローブにペルオキシターゼを結合させた.

(2) ハイブリダイゼーション

NaCl 濃度が0.5M になるようにハイブリダイゼーションバッファーを調整し, さらにプロッキング試薬を5%添加し, 65 $^{\circ}$ C で溶解させた. 標識プローブのメンブランへの非特異的結合を

防ぐため、シールドバックにメンブランを入れ、調合したハイブリダイゼーション液を加え、37°Cで15～30分間反応させた（プレハイブリダイゼーション）。

次に、ハイブリダイゼーション液にペルオキシターゼで標識したミオプローブを加え、均一になるよう十分混和した。そして、37°Cで一晩、標識プローブとその相補的DNA配列との結合反応（ハイブリダイゼーション）を行った。

(3) 検出

結合していない標識プローブを洗浄するため、洗浄液（6M 尿酸，0.4% SDS，0.5×SSC）にメンブランを浸し、室温で正確に10分間振盪した。さらに、2×SSC 溶液中で正確に10分間の振盪を2回行った。

次に、検出試薬2（ルミノール）中にメンブランを浸し、試薬2と等量の検出試薬1（H₂O₂）を加え振盪しながら1分間反応させた。最後に、X線フィルムカセット中でメンブランと高感度フィルムを接触させ、約1時間感光させることにより、DNAフィンガープリントを得た。

結果と考察

今回の採血量は0.5～5 mlであった。4～5 ml程を1度に採血した場合には、凝血塊が生じ血球の洗浄を困難にさせた。この凝血塊にTNE溶液を加えても懸濁状態にならず、SDSやプロテナーゼKによる除蛋白操作の障害になった。多量の血液を処理する時には、クエン酸ナトリウムやヘパリン等の血液凝固防止剤を含んだ生理食塩水を10倍量以上の十分な量加えて、洗浄操作を行なうことが必要と思われる。また、魚体が小さいものや死んだ個体については、採血中に血液が凝固し易いので、さらに多量の生理食塩水で薄めながら採血することが、血液中のDNAの効率的な抽出を行うためのポイントと考えられる。

ヒラメの血液から抽出したゲノムDNA試料の泳動像を図1に示した。ヒラメ血液から抽出

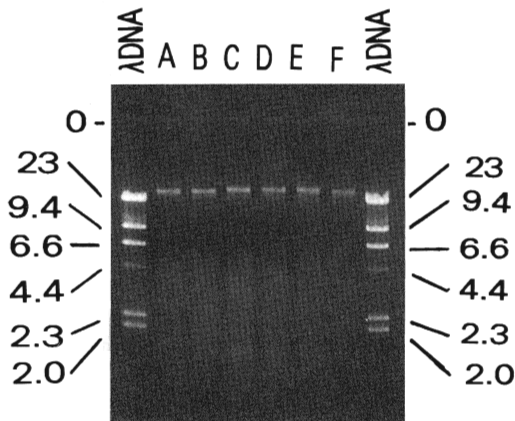


図1 ゲノムDNAのアガロース電気泳動像(0：原点，A, B, C：天然ヒラメ，D, E, F：人工種苗ヒラメ)

Fig. 1. Electrophoresis pattern of genomic DNA extracted from blood of a flounder, *Paralichthys olivaceus*. (0: origin, A, B, C: a natural flounder, D, E, F: an artificial seed of a flounder)

したDNAは塩基対数で23kb以上の位置にあり、また殆どスミアもなかった。これらのことから、DNAは長いままで分解されずに抽出されたことが確認できた。

図2は天然ヒラメ、図3は人工種苗ヒラメのミオプローブを用いたDNAフィンガープリントである。天然ヒラメと人工種苗ヒラメにおいて、DNA塩基対数で2.3–23kbの間に10–15本の鮮明なDNAバンドと数本の薄いバンドが認められた。ヒラメの個体間のバンドの比較では、それぞれの個体間の組合せにおいて数本ずつの同一のバンドが認められた。しかし、すべての個体間の組合せにおいて、DNAバンドのパターンは異なっていた。

各染色体上には、10–100塩基で1単位の縦列に繰り返した反復配列の領域が存在する。この領域をミニサテライトと呼んでいる。ミニサテライトでは反復配列の反復数が染色体の位置、個々の染色体や個体間で異なっている。そして、この反復数の違いは、制限酵素でDNAを切断し、このミニサテライトをプローブとしてサザン・プロット法を行うと、DNA断片の長さの違い、すなわち、RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) として検出される。ミオプローブもこのミニサテライトの1つで、個体特異的なDNAフィンガープリントが得られ、個体を識別する方法として非常に有効であることが報告されている (JEFFREYS *et al.* 1985)。つまり、DNAフィンガープリントにおいてバンドのパターンが異なるということは、

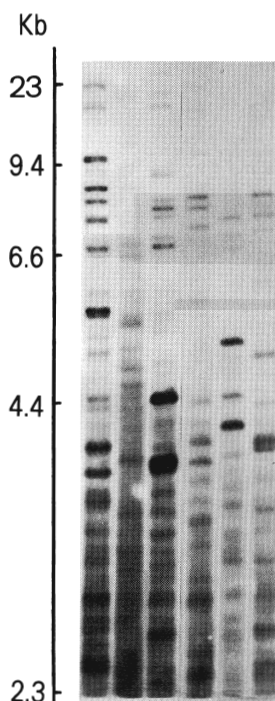


図2 天然ヒラメのDNAフィンガープリント

Fig. 2. DNA fingerprint of natural flounders, *Paralichthys olivaceus*. Genomic DNA was digested by *Hea* III and was hybridized with non-radioactive myoprobe labelled peroxidase complex.

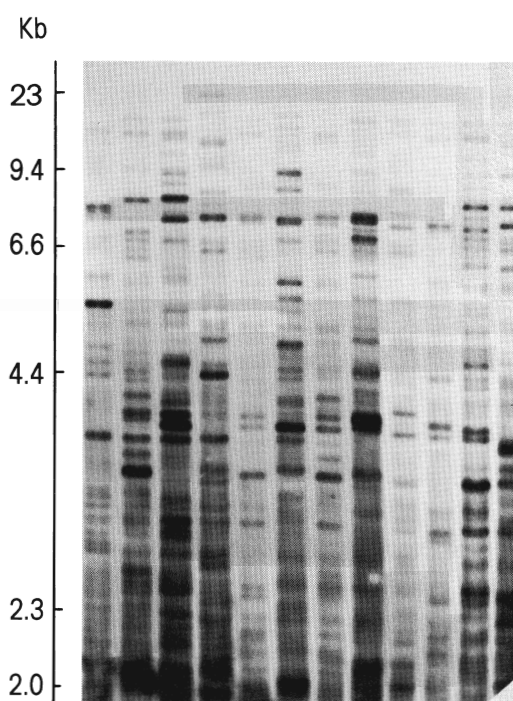


図3 人工種苗ヒラメのDNAフィンガープリント

Fig. 3. DNA fingerprint of artificial seeds of a flounder, *Paralichthys olivaceus*. Genomic DNA was digested by *Hea* III and was hybridized with non-radioactive myoprobe labelled peroxidase complex.

DNA の塩基配列が異なっていることであり、また、バンドのパターンが同じである時には、非常に高い確率で DNA 塩基配列、すなわち、遺伝的組成が同一であると考えられる。今回、ヒラメの DNA フィンガープリントに用いたミオプローブは、ヒトのミオグロビンのイントロン中に存在する反復配列である。このプローブがヒラメの DNA フィンガープリントにも適用できたことから、多くの魚類への応用が示唆される。

魚類の赤血球は有核であることから、赤血球が無核である哺乳類の血液と比較すると、血液の単位量当りのゲノム DNA 量は桁違いに多いと考えられる。実際、魚体が小さいために 0.5ml 程度しか採血できなかつた人工種苗ヒラメでも、20~25 μ g の DNA が抽出された。1 回の DNA フィンガープリントに使用する DNA 量は 3~5 μ g である。これらのことから、1/4 程度の採血量、すなわち、0.1ml 程度またはそれ以下の非常に微量な血液で DNA フィンガープリント法による個体識別が可能と計算できる。つまり、ヒラメでは DNA フィンガープリント法を用いることにより人工種苗生産の早い時期、受精後 2~3 ヶ月で遺伝的均一性やクローンの解析が可能と考えられる。また、体長 13~14cm のヒラメでは DNA フィンガープリントの生体検査が可能であり、遺伝子資源として重要な親魚を殺さずに、遺伝的調査を行ったり、また、交配実験のマーカーとしての利用が考えられる。

以上のことから、ヒトのミオプローブによる DNA フィンガープリントはヒラメの個体識別に有効であり、クローン解析法としての応用が考えられる。また、今回の DNA フィンガープリント法は放射性物質で標識しないコールド法であり、特別な施設や厳重な管理を必要としないことから、多くの場所での使用が可能である。

謝 辞

本研究の実施に当たり、終始暖かい御支援を頂きまた御校閲の労をとられた日本海区水産研究所資源増殖部飯倉敏弘部長並びに貴重な御意見を頂いた東北大学農学部藤尾芳久教授に心から感謝する。

また、標本の入手に当たっては、日本海区水産研究所魚類増殖研究室野口昌之、藤井徹生両研究員、新潟県栽培漁業センター安沢弥研究員に御協力頂きお礼申し上げる。

要 約

魚類における非放射性プローブを用いた DNA フィンガープリント法を確立するため、ヒトのミオプローブを用いてヒラメの DNA フィンガープリントの検出方法を検討した。

1. ヒラメでは非常に微量な血液からゲノム DNA の抽出が可能であった。
2. ヒトのミオプローブはヒラメの DNA フィンガープリント法にも使用でき、非常に応用範囲の広いことがわかった。
3. 非放射性プローブを用いた DNA フィンガープリント法はヒラメの個体識別やクローン解析に応用できることがわかった。
4. 今回の DNA フィンガープリント法は放射性物質を使用しないことから、RI の特別な施設を持たない場所での使用が可能である。

文 献

- JEFFREYS, A. J., WILSON, V. and THEIN, S. C. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, **314**, 67-73.
- 出羽厚二・内藤笑美子・山内春夫 (1991) ミニサテライト DNA の生物学的・医学的意義—DNA フィンガー

- プリント法の応用一. 最新医学, 46, 2235-2239.
- 藤川真規・中山一郎・中西照幸・小野里亘 (1992) DNA フィンガープリンティング法によるクローンの解析. 平成4年度日水会中部支部大会要旨集, 3.
- HAN, H. S., TANIGUCHI, N. and TSUJIMURA, A. (1991) Production of clonal ayu by chromosome manipulation and confirmation by isozyme marker and tissue grafting. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**(5), 825-832.
- HAN, H. S., MANNEN, H., TSUJIMURA, A. and TANIGUCHI, N. (1992) Application of DNA fingerprinting to confirmation of clone in ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**(11), 2027-2031.
- NARUSE, K., IJIRI, K., SHIMA, A. and EGAMI, N. (1985) The production of cloned fish in the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.*, **236**, 335-341.
- STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER D. and SINGER, F. (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish *Brachydanio rerio*. *Nature*, **291**, 293-296.