

(6) DNA 標識技術の開発

⑨ 有明海におけるタイラギの DNA 標識技術の開発

水産研究・教育機構 中央水産研究所

關野正志・小林真弓・中道礼一郎

【目的】

有明海のタイラギ資源は非常に厳しい状態が続いており、近年は休漁を余儀なくされている。一方、有明海特産魚介類の資源回復を目的とした浮遊幼生・着底稚貝の定量評価、浮遊幼生の輸送シミュレーションおよび人工種苗生産技術開発等の調査研究が進展している。これを踏まえ、2017 年度有明海・八代海等総合調査評価委員会報告において、有明海のタイラギ資源の再生方策として、浮遊幼生の移動ルートや稚貝の着底場所の把握とともに、種苗放流による母貝団地造成に適した成育場所の選定および母貝団地への放流・移植による広域的な母貝集団ネットワーク形成の必要性が提言された。

近年の DNA 分析技術の進歩により、血縁関係を推定できる DNA マーカーが多く魚介類で開発され、血縁解析による放流効果の調査が進められている。タイラギでも DNA マーカーを開発し、種苗生産に用いた親貝の DNA マーカー情報、すなわちジェノタイプ（遺伝子型）情報さえ把握していれば、DNA マーカーを標識とした血縁解析が可能である。タイラギ DNA 血縁解析システムが確立され、種苗生産に用いられた親個体（ G_0 ）の DNA が利用できれば、漁獲物が放流された人工種苗（ G_1 : G_0 の子供世代）か否か、あるいは G_1 の子供（ G_0 の孫世代）か否かを推定することができ、母貝団地選定の提案が可能になると期待できる。

DNA マーカーの候補として、ミトコンドリア DNA (mtDNA)、核ゲノム上のマイクロサテライト DNA (MS) および同じく核ゲノム上の一塩基多型 (SNP) が挙げられる。このうち mtDNA は細胞質遺伝し、基本的に母親からしか子供に DNA 情報が伝わらないため、血縁解析の DNA マーカーとしては不十分である。MS は両性遺伝であり、通常 1 マーカーあたり 10 種類以上のアレル（対立遺伝子）が見られ、高度な多型を示すという点では血縁解析用の DNA マーカーとして非常に優れているが、貝類を含む水生無脊椎動物では多検体（集団サンプル）の解析に適したマーカーの大量開発が困難である。さらに遺伝子型決定（ジェノタイピング）の自動化と、異なるラボ間でのデータの共有が難しい。一方、SNP は MS と同様に両性遺伝であるが、1 マーカーあたりのアレル数が通常 2 種類しかなく、MS と比較すると多型性の点で大きく劣る。しかしゲノム中に膨大な数が存在するために容易にマーカー数を増やすことができ、コンピューターによるジェノタイピングの半自動化が可能であり、かつデータに汎用性があることなどの優位点がある。報告者らは、以上のよう

なそれぞれのマーカーとしてのメリット・デメリットを考慮し、タイラギの血縁解析を実施する上では SNP が適していると判断した。そこで本課題では、本種の血縁解析に使用できる SNP マーカーセットを開発することを目的とする。本課題の全実施期間を通した最終的な数値目標として、シミュレーションの結果で祖父-孫間の同定に必要とされた 600 個程度の SNP マーカーを開発する。

【研究方法】

1) MassARRAY による SNP ジェノタイピングのための領域特異的 PCR プライマーと一塩基伸長プローブ設計

報告者らは、2018 年度に実施された有明 4 県委託事業「タイラギ親子判別等血縁解析システム開発のための一塩基多型マーカーの探索」において、有明海産のタイラギ集団サンプル ($N=40$) を使い、RADseq 法 (Restriction site-associated DNA sequencing; Baird et al. 2008) ^{注1} によって、有明海産タイラギゲノム上の SNP サイトとその周辺の塩基配列情報を得た。そこでこの情報を利用し、Agena Bioscience から提供されている MALDI-TOF/MS に基づく MassARRAY システム (Gabriel et al. 2009; Ellis and Ong 2017) で SNP のジェノタイピングを行うための領域特異的 PCR プライマー (Region-specific PCR primer : RSP) と SNP 検出のための一塩基伸長プローブ (Extension probe ; ExP) を設計した (図 1)。なお、現在有明海で漁獲されるのはほとんどが有鱗型タイラギ (ケン) であるが、過去には無鱗型タイラギ (ズベ) も見られたということ (橋本和正、私信) および mtDNA 解析では有明海産のケンの中に低頻度ながらズベの mtDNA (L1 タイプ。ケンには L2 タイプ ; Liu et al. 2011) が検出されることから (Hashimoto et al. 2018)、遺伝子浸透によってケンの核ゲノム中にズベの DNA が混入している可能性がある。従って両者の DNA が混在するゲノムを持つ個体でも適用できる SNP マーカーの開発が必要である。そこで RSP と ExP 設計にあたっては、すでに取得しているケンとズベのレファレンスゲノム配列を参照に、両者のゲノム上でよく保存されている領域にある SNP サイトを選択した。SNP サイトを含む塩基配列に基づき、Assay Design Suite ソフトウェア (Agena Bioscience) を用いて RSP と ExP を設計するとともに、複数の SNP マーカーを一反応で同時に検出するためのマルチプレックスパネル (以降パネルと略記する) を作成した。

2) MassARRAY による SNP ジェノタイピング

1) で作成したパネルについて、有明海産 (佐賀県) タイラギ ($N=22$) を用いて RSP/ExP のスクリーニングを行った。SNP を含む領域の RSP による PCR 増幅、増幅産物の精製、

ExP を使った一塩基伸長には、Complete iPLEX Pro Genotyping Reagent Set (Agena Bioscience) を用いた。また得られた質量データに基づく自動アリルコールは、Typer ソフトウェア (Agena Bioscience) によった。

3) 人工種苗とその親候補個体の DNA 抽出

開発した SNP マーカーが、親から子供に伝わる遺伝マーカーであることを確認するために用いる親子サンプルとして、2019 年度に瀬戸内海区水産研究所百島庁舎で人工種苗生産に用いられた有明海産の親候補個体 (♂8 個体 ; ♀6 個体) とその人工種苗の提供を受け、それらの DNA 抽出に着手した。また参考データとして、全親個体候補について mtDNA の COI 領域の部分塩基配列を調べた。

【研究成果の概要】

1) SNP ジェノタイピングのための RSP・ExP 設計

前記の有明 4 県委託事業で得られた、血縁解析に有効と期待される SNP、すなわちハーディ・ワインベルグ平衡を満たし、MAF (Minor allele frequency : 一つの SNP の 2 種類のアリルのうち、集団中で出現率が低い方のアリルの頻度) が 0.3 以上で、かつケン・ズベのゲノム上で良く保存されている領域にある SNP 数は計 14,439 で、これらは 8,651 の短い DNA 領域上 (150 bp) に存在していた。150 bp という短い領域上に 2 個以上の SNP が存在する場合、それらは連鎖している (独立ではない) と考えられる。血縁解析では、基本的に DNA マーカー間の独立性を仮定するため、複数の SNP が同一領域に存在する場合は、その中から一つをランダムに選び、それをマーカー候補とした。

MassARRAY では、40 個までの SNP マーカーを一反応で同時に検出するマルチプレックスが可能である (ある 1 個体について 40 個までの SNP マーカーを 1 ウェル内で同時に検出できる)。そこで上記の 8,651 領域の塩基配列を Assay Design Suite のインプットデータとし、酵素反応時の RSP 間および ExP 間の干渉 (RSP は PCR 反応時、ExP は一塩基伸長反応時) が最小限になること、アニーリング温度が同程度になること、また一塩基伸長後の ExP の期待質量が SNP 間で重複しないこと等を条件としてパネルを作成した (本年度は 6 パネルを作成 ; 表 1 のパネル v1)。この計 237 個の SNP を含むパネル v1 のジェノタイピングを行ったところ、いくつかの SNP ではジェノタイピングが困難であった (後述)。そこでそれらの SNP を除外した上で、ジェノタイピングできた SNP を含む新たなパネルを作成した (表 1 のパネル v2 ; 計 229 個の SNP)。

2) SNP ジェノタイピング

MassARRAY 解析で得られる質量データは自動的にアリルコールされ、図 2 のような二次元平面で各個体のジェノタイプを可視化することができる。ジェノタイピングの成功は、NTC (Non-temperate control ; DNA が入っていないネガティブコントロール) がコールされていないこと、Mass height (一塩基伸長後の ExP の総質量) が十分高いことおよび異なるアリルのホモ接合間あるいはホモ接合とヘテロ接合間が良く分離していることで判断した。図 2A、B はジェノタイピング成功例で、上記条件をよく満たしている。一方図 2C と 2D はジェノタイピングの不成功例で、図 2C では Mass height が低いためにホモ接合とヘテロ接合の区別をつけにくい個体が多く、図 2D では Mass height は高いが、プロットが広がりすぎて、ホモ・ヘテロ接合間の境界が曖昧である。パネル v1 のジェノタイピングを行ったところ、各パネルにおいてジェノタイピング可能であった SNP 数は 29 から 35 個 (成功率は 72.5–95.0%) で、全体では 201 個であった (84.8%)。ジェノタイピング不可であった SNP を除外した上で各パネルに別の SNP マーカー候補を加えてパネル v2 を作成し、ジェノタイピングを行った。各パネルにおいてジェノタイピングが可能であった SNP 数は 33 から 38 個で (成功率 91.7–100.0%)、総数は 222 個 (96.9%) に増加した (表 1)。以上のように、本年度の結果として、SNP マーカーの最終開発目標数 (600 個) の約 1/3 に相当するマーカーを得ることができた。

3) 人工種苗とその親個体候補の DNA 抽出

瀬戸内海区水産研究所百島庁舎より提供された、2019 年度の人工種苗生産に用いられた有明海産の親候補個体とその人工種苗の DNA 抽出を進め、すべての親候補個体と、91 個体分の人工種苗について、MassARRAY 解析に十分な量の DNA を得た。全親個体候補について mtDNA の COI 領域の部分塩基配列を決定し (611 bp)、配列情報に基づき個体間の遺伝距離 (K2P distance ; Kimura 1980) を計算して、近隣結合法 (Saitou and Nei 1987) で個体のクラスタリングを行ったところ、百島庁舎で行われた LAMP 法による判別通り、親個体候補の mtDNA はすべて L2 タイプであった (図 3)。一方、調べた領域では変異がほとんどなく、14 個体のうち 13 個体は同一のハプロタイプを有していた。このことから、今回対象にした mtDNA の COI 部分配列に限って言えば、血縁解析における有用性はほとんど無いと言える。

【次年度に向けた提言】

引き続き MassARRAY 解析におけるパネルを設計し、有明海産タイラギ集団をサンプル

としてスクリーニングを行って、SNP マーカーを蓄積する。また SNP マーカー候補領域数が多いほどパネルの設計が容易になるため、2018 年度有明 4 県委託事業で行った RADseq 解析とは異なる制限酵素を用いて同法を行い、SNP マーカー候補数を増やす。

※1 ゲノム DNA を、特定の塩基配列を認識して消化する制限酵素 (RE) で処理し、RE 認識サイトの両側の短い塩基配列 (通常 50–150 bp 程度) を読み取る方法。

【引用文献】

- Baird et al. (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE* 3:e3376
- Ellis JA, Ong B (2017) The MassARRAY® system for targeted SNP genotyping. In: White S, Cantsilieris S (eds) *Genotyping. Methods in Molecular Biology* volume 1492. Humana Press, NY
- Gabriel et al. (2009) SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Current Protocols in Human Genetics* 60:2.12.1–2.12.18
- Hashimoto et al. (2018) Lineage specific detection of the scaly form of the pen shell *Atrina* spp. by a loop-mediated isothermal amplification method. *Fisheries Science* 84:837–848
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111–120
- Liu et al. (2011) Cryptic diversity in the pen shell *Atrina pectinata* (Bivalvia: Pinnidae): high divergence and hybridization revealed by molecular and morphological data. *Molecular Ecology* 20:4332–4345
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406–425

表1 作成したSNPマルチプレックスパネルとスクリーニング結果

マルチプレックス パネルv1	SNP数	スクリーニング後 SNP数*	成功率 (%)
Panel 1	40	32	80.0
Panel 2	40	31	77.5
Panel 3	40	36	90.0
Panel 4	40	29	72.5
Panel 5	40	38	95.0
Panel 6	37	35	94.6
計	237	201	84.8
マルチプレックス パネルv2	SNP数	スクリーニング後 SNP数*	成功率 (%)
Panel 1	39	38	97.4
Panel 2	37	36	97.3
Panel 3	39	38	97.4
Panel 4	36	33	91.7
Panel 5	40	39	97.5
Panel 6	38	38	100.0
計	229	222	96.9

*スクリーニングの結果、ジェノタイピングが困難なSNPを除いた数

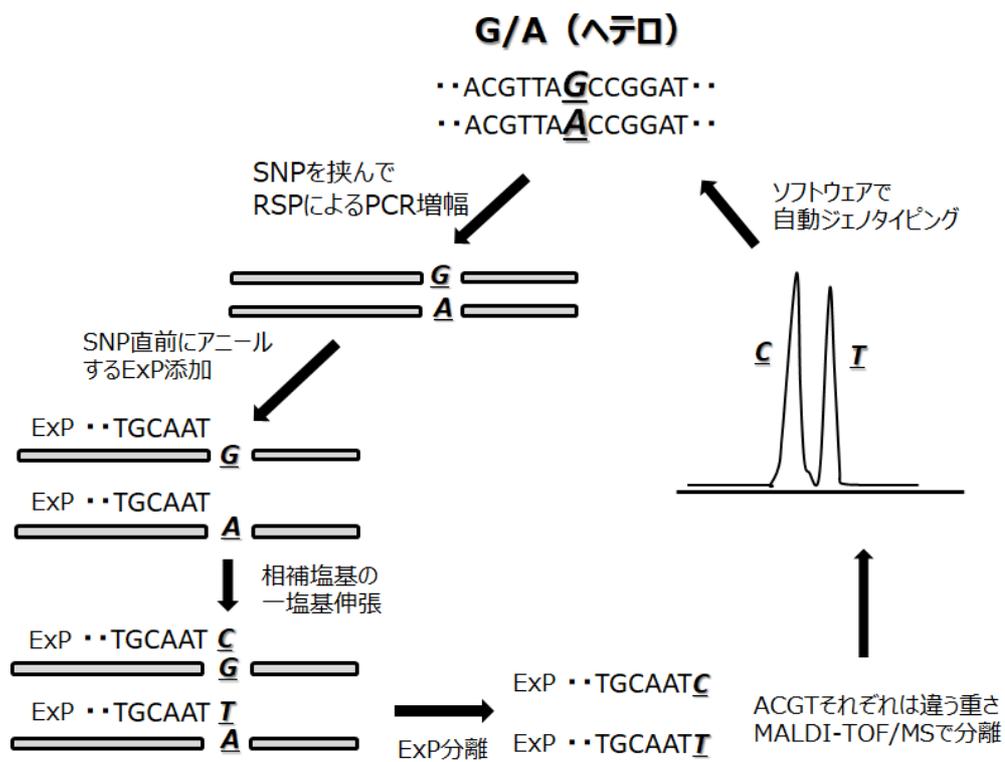


図 1. MassARRAY による SNP 検出の原理

RSP は領域特異的 PCR プライマー、ExP は一塩基伸長反応に用いるプローブ

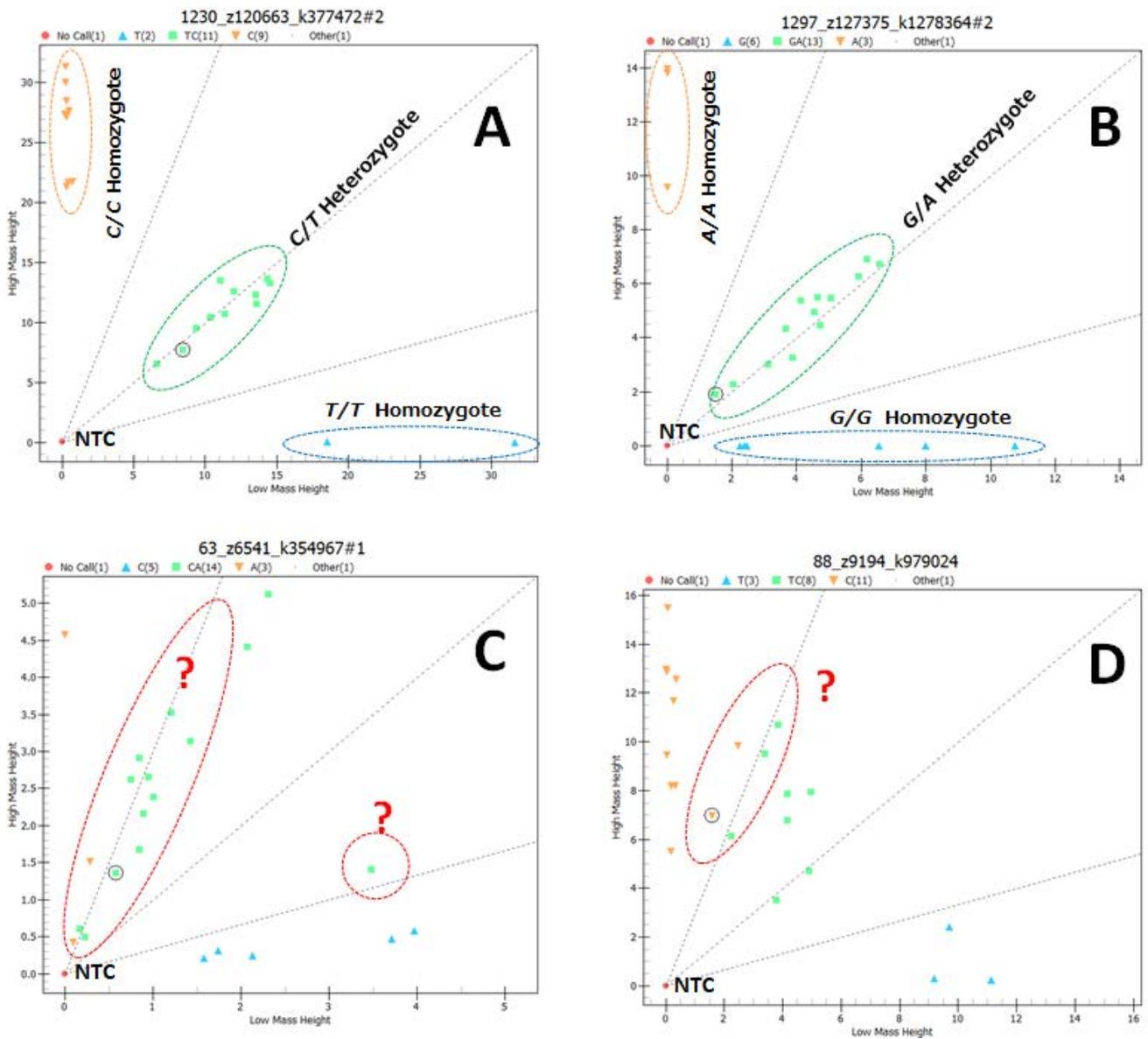


図 2. MassARRAY におけるジェノタイピング例

A および **B** はジェノタイピング成功例、**C** および **D** は不成功例。各色は自動でコールされたホモ接合（オレンジあるいは水色）とヘテロ接合（緑）を表す。NTC（ピンク）はネガティブコントロール。**C** および **D** では、コールされたがホモ接合とヘテロ接合の区別をつけにくい個体が多い（赤で囲った個体）。

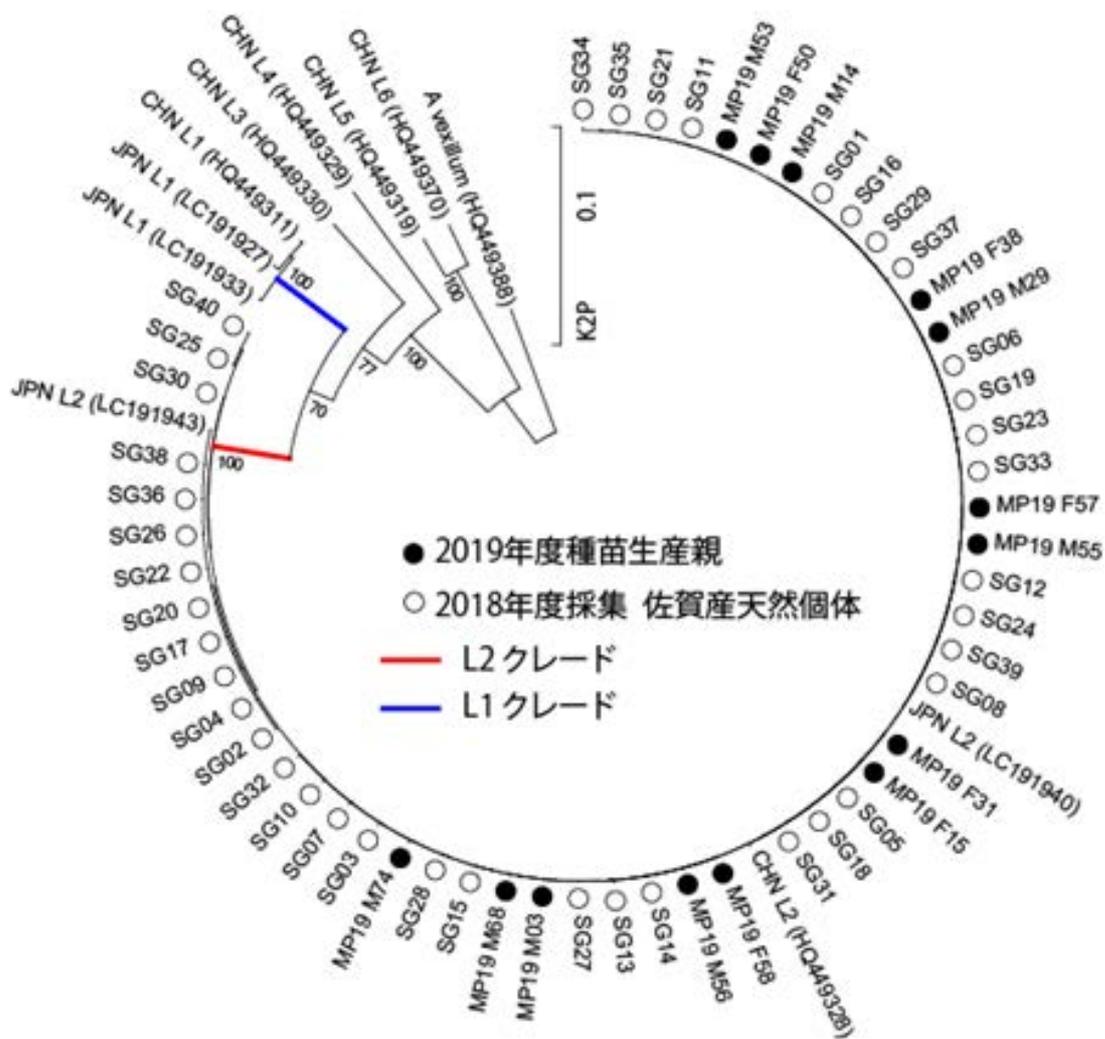


図3. ミトコンドリア DNA-COI 塩基配列に基づく親個体の分類

●は2019年度に百島庁舎で種苗生産に使われた有明海産の親個体 ($N=14$)、○は有明海（佐賀県）産天然個体 ($N=40$ ；2009年採集の9個体、2019年採集の31個体)、その他はDNAデータベース（DDBJ/EMBL/GenBank）に登録されている配列。遺伝距離の計算には K2P（Kimura 1980）を用い、得られた距離に基づく個体のクラスタリングは近隣結合法（Saitou and Nei 1987）によった。ノード上の数字はブーツストラップ法による枝間の結びつきの信頼度を表す（1,000回試行；信頼度70%以上のみ表示）。

