

DNA バーコーディング法を用いた 魚卵同定技術について

平岡 礼鳥

1. はじめに

魚卵の種類や数は、魚類の分布や資源変動などを理解するために必要不可欠な情報である (Stratoudakis *et al.*, 2006)。しかし、魚卵研究の多くはマイワシ属やカタクチイワシ属などの一部の魚種に留まっている。その理由として、魚卵は形態的特徴が乏しく、同定が困難であることが挙げられる (川上, 2012)。一般に魚卵の同定の際には、卵の形状、卵膜構造、囲卵腔、卵黄構造、油球数、卵径・油球径、油球の位置、胚の特徴などの情報を参考に実施されるが、これらの形態的特徴は発生が進むに従い変化する種が知られている (池田ら, 2014; 水戸, 1960)。さらに、魚卵は固定保存した場合、活性を有する時の状態から大きく変化することが知られている。例えば、卵膜は固定によりしわ状を呈する場合や、通常は透明である卵黄が、固定後には白濁してしまい、卵黄の亀裂が確認できない場合がある (池田ら, 2014)。このように形態による同定が困難であることをふまえ、近年、魚卵を対象としたDNAバーコーディング法の有効性が報告されている (例えば河合ら, 2017や川上, 2012)。

形態を用いた魚卵同定は当社において、長年、主要業務の一環として行なわれてきたが、上述した理由から、多くが同定困難な不明卵として扱われてきた。現在、当社でもDNAバーコーディング法による魚卵の同定技術を導入し始め、形態同定とあわせることでより精度の高い分析結果を示すことに成功している。

本稿では当社のDNAバーコーディング法を用いた魚卵の同定技術を紹介するとともに、形態同定と結果を比較し、DNAバーコーディング法の有効性を紹介する。

2. DNAバーコーディング法による同定

2. 1. 方法

魚卵を対象としたDNAバーコーディング法による同定の概略を図1に示す。DNAバーコーディング法による同定を行なうにあたり、採集した魚卵は最終濃度が70%になるようにエタノールで固定し、冷蔵にて保管する。ホルマリンなどで固定を行なうとDNAが断片化してしまうため、本手法を採用する場合には使用を避ける。エタノールにより固定した魚卵は目合いの異なる複数のネット (2mm, 1mm, 0.67mm, 0.30mm) を用いて、サイズ別に区分し、カップに保管する。その後、光学顕微鏡下でソーティングをし、卵径、油球数、油球径などの特徴からそれぞれタイプ別に区分を行なう。ただし、全個体をDNAバーコーディング法に用いる場合はタイプ別の区分は必要としない。区分した魚卵は蒸留水を用いてエタノールを抜き、1×ExTaq™ Buffer (Takara Bio Inc.) が10µl入った0.2mlチューブに1個体ずつ分取し、DNAフリーのステンレス製の棒を用いて破碎する。次に、0.2mlチューブ内にプロテイナーゼKを1µl添加し、サーマルサイクラーにて55°Cで30分間タンパク質の溶解を行ない、次に70°Cで10分間プロテイナーゼKの失活を目的としたインキュベートを行なう。その後、GeneReleaser™ (Bioventures Inc.) を20µl添加し、サーマルサイクラーでインキュベート後、遠心処理を行ない、上澄みを新しい0.2mlチューブに移す。得られたDNAはWard *et al.* (2005)の反応条件 (94°Cで2分の熱変性後、94°C 30秒の熱変性、54°C 30秒のアニーリング、72°C 30秒の伸長反応を30サイクル行ない、最後に72°Cで10分間の伸長反応) に従ってPCR (Polymerase Chain Reaction) を

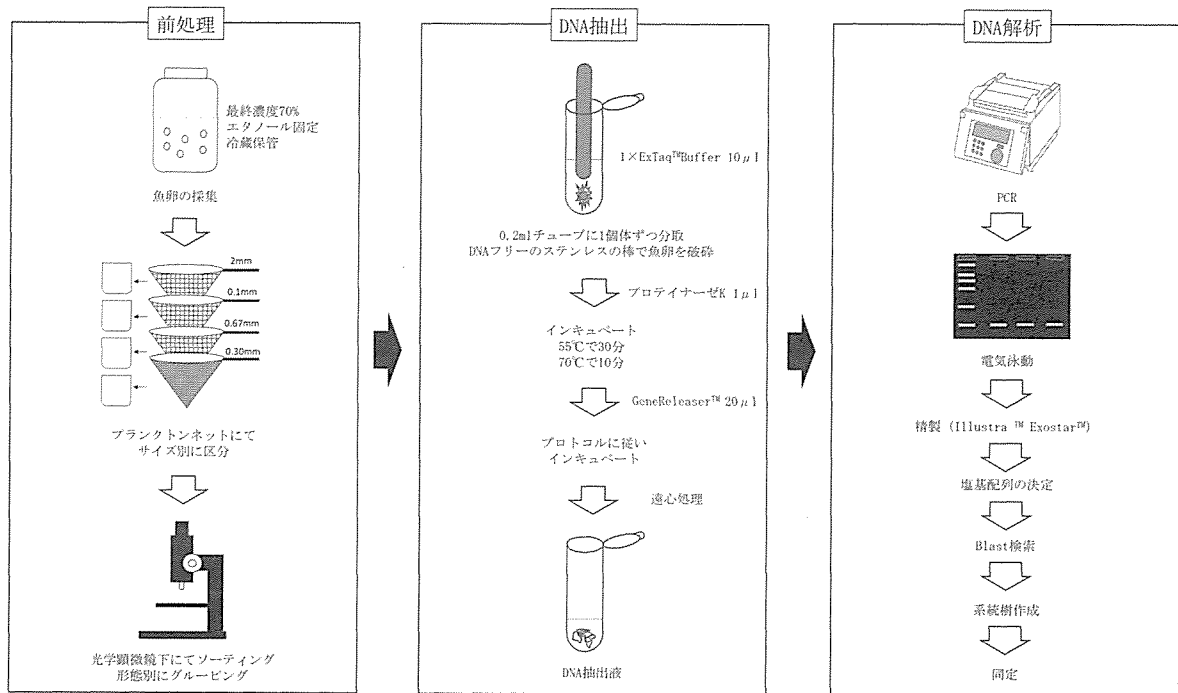


図1 魚卵を対象としたDNAバーコーディング法による同定方法の概略

行ない、ミトコンドリアDNAのCOI遺伝子の単離および増幅を行なう。ミトコンドリアDNAのCOI遺伝子は進化速度が速く、タンパク質をコードしているため、アミノ酸レベルでは保存性が高いが、塩基レベルでは保存性が低い。そのため、種特異的な検出に優れた領域であり、データの蓄積も非常に多く、一般に動物のDNAバーコーディング法に使用されている(源ら, 2016)。当社では魚類で汎用されているプライマー、FishF1-(5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3')およびFishR1-(5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3')を魚卵の遺伝子分析に用いている。PCRにおける反応液の組成は滅菌蒸留水11 μl、ExTaq™ (Takara Bio Inc.) 12.5 μl、プライマー2種を0.25 μlずつ、抽出DNA 1 μlの計25 μlである。得られたPCR産物はアガロースゲル電気泳動法を用いて増幅を確認後、Illustra™ Exostar™ (GE Healthcare.)による精製を行なう。当社ではDNAシーケンシングを民間の検査機関に依頼し、3730xl DNA Analyzerにより目的とする塩基配列を決定している。得られた塩基配列はNCBIでBlast検索による同源性検索を行なう。川上(2012)は99%の同源性を基準に種査定が可能であることを示しているが、当社ではBlast検索による同源性結果に加え、系統解析を行なっている。これにより同源性が同

じ配列が多数検索された際に、系統的な違いから正確な種査定が可能になる。系統的な解析は坪田ら(2014)に一部従い、上位100配列を対象に、MEGA6.06を用いて近隣結合法により外群に当たる配列を絞った後、最尤法で系統樹を作成し、魚卵の同定を行なう。

2. 2. 魚卵を対象としたDNAバーコーディング法の留意点

DNA抽出を行なうにあたり、採集した魚卵はエタノール固定を行なうと前述したが、エタノール固定を行なうと魚卵の色が抜けるだけでなく、脱水作用による外形および胚の収縮などが生じ、卵径などの特徴を正確に把握することが困難になる。そのため、エタノール固定したサンプルは長期間の保管はできるだけ避け、固定後の区分は早期に行なう必要がある。

次に、DNA分析において、留意すべき点としてDNAの混入、いわゆるコンタミネーションが挙げられる。コンタミネーションを防ぐためには実験時のゴム手袋の着用、使用機材の入念な洗浄などが挙げられる。当社では各実験機材に対し、次亜塩素酸処理(キッチンハイター)を行なった後、蒸留水で入念に洗浄する方法でコンタミネーションのリスクを低減させている。

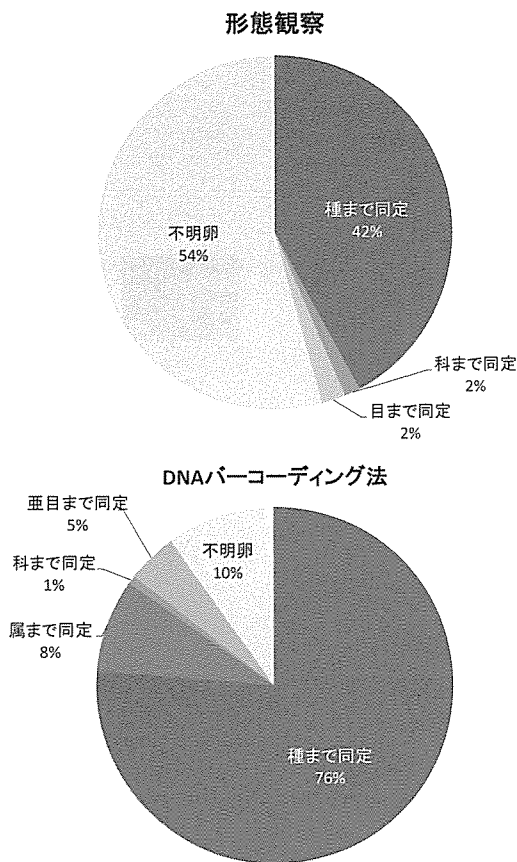


図2 小湊海域で採集した魚卵の形態同定とDNAバーコーディング法による同定の集計結果 (採集魚卵の大部分を占めるカタクチイワシを除いた個体数比率) (平岡ら (2017) から引用)

3. 形態同定とDNAバーコーディング法の比較

魚卵における形態同定とDNAバーコーディング法による分析結果 (平岡ら, 2017) を図2に示す。

本結果は、小湊海域で採集した魚卵を対象とし、形態観察とDNAバーコーディング法による同定結果の比較を行なったものである。形態観察では種、科まで同定できたのは44% (63個体/142個体) であり、54% (77個体/142個体) が不明卵であった。一方、DNAバーコーディング法では種、属、科まで同定できたのは85% (112個体/131個体) であり、10% (13個体/131

個体) が不明卵であった。以上の結果から、小湊海域で採集した魚卵において、DNAバーコーディング法による同定が有効であり、形態観察よりも精度の高い同定が可能であることが明らかになった。なお、DNAバーコーディング法による同定は対象とした魚卵の遺伝子情報が明らかになっている (Gene Bankに登録されている) ことが前提である。ミトコンドリアDNAのデータベースは魚類が最も充実していると考えられている。しかし、約3万種いると考えられている魚類においてミトコンドリア全ゲノムが明らかになっている種は1,849種である (源ら, 2016)。今後、より精度の高いDNAバーコーディング法の同定を行なうためには、魚類のミトコンドリアDNA情報を蓄積することが重要である。当社も魚卵のDNAを用いた同定技術の向上に貢献すべく、データの蓄積に努めていきたい。

引用文献

- 平岡礼鳥・奥俊輔・亭島博彦. 2017. DNAバーコーディング法を用いた浮遊性魚卵の種査定. 平成29年度海洋理工学会第秋季大会要旨, 69-72.
- 池田知司・平井明夫・田端重夫・大西康介・水戸 敏. 2014. 魚卵の解説と検索 *In*: 沖山宗雄 (編), 日本産稚魚図鑑 第2版. 東海大学出版会. 2-5.
- 河合賢太郎・岡崎隆真・苫野哲史・海野徹也. 2017. DNA種同定による広島湾における分離浮遊卵の季節変化. 日本水産学会誌, 83 (2): 215-217.
- 川上達也. 2012. DNAを分類形質とした浮遊性魚卵の種査定と初期発生に関する研究. 博士論文, 東京大学, 東京.
- 源 利文・内井喜美子・山中祐樹・高原輝彦・片野 泉・土居秀幸. 2016. 環境DNA分析のさらなる進展にむけて. 日本生態学会誌, 66: 621-623.
- 水戸 敏. 1960. 浮遊性魚卵および孵化仔魚の種の同定について. 九州大学農学部学芸雑誌, 18 (1): 61-70.
- Stratoudakis, Y., Bernal, M., Ganas, K. and A. Uriarte. 2006. The daily egg production method: recent advances, current applications and future challenges. *Fish and Fisheries*, 7: 35-57.
- 坪田博美・井上侑哉・中原 (坪田) 美保・内田慎治・向井誠二. 2014. 標本同定のツールとしてのDNAバーコーディング—植物標本の例—. 広島大学総合博物館研究報告, 6: 41-49.
- Ward, R.D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P. D. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360: 1847-1857.