

東濃地方に生息するメダカの遺伝子に関する研究

3514 佐々木万由子 3524 丹羽さくら 3538 山田潮路 3610 鬼頭美森 3632 宮木萌里

要旨

日本に生息する野生のメダカの遺伝子タイプは、ミトコンドリア DNA (mtDNA) のシトクロム b 領域を解析した研究によると、北日本集団 (CladeA)、南日本集団 (CladeB)、関東固有集団 (CladeC) の 3 Clade に分類される。さらに、北日本集団は SubCladeA - I ~ A - III の 3 個の型、南日本集団は SubCladeB - I ~ B - XI の 11 個の型に分類されている。(5 ページの図 1 参照)

以前先輩方が採取したメダカの遺伝子解析の結果は様々であり、論文のデータと一致しないものもあった。そのひとつに恵那市内の寺の池にいるメダカがあり、そのメダカが東濃地方独自のメダカではないかと考え、サンプル数と制限酵素の種類を増やして実験を行った。

1. 目的

- 東濃地方のメダカの mtDNA を日本に生息するメダカの mtDNA と比較し、東濃地方特有のメダカの存在を明らかにする。

2. 使用した器具・装置

- サンプル (メダカ) ・ ビーカー ・ ホモジェナイザー ・ メス ・ マイクロチューブ ・ メデューム瓶
- 滅菌水 ・ マイクロピペット ・ ピペットチップ ・ ボルテックス ・ 小型遠心機 ・ チューブラック
- PCR マシン ・ パラフィルム ・ タッパー ・ ミニシェーカー ・ UV トランスイルミネーター
- 6mL メスシリンダー ・ 蒸留水 ・ 電気泳動装置 ・ DNA 染色液 ・ サランラップ ・ アルミホイル
- カラム ・ アガロースゲル ・ TAE ・ Wash Buffer NT3 ・ BufferNE ・ BufferNT1 ・ Premix
- Loading Dye ・ DNA ラダー ・ M Buffer ・ K Buffer ・ T Buffer ・ HaeIII ・ Mbo I ・ Msp I

3. 手順

①メダカのDNA抽出

- メダカの尾を切断し、マイクロチューブに入れる。
- 尾びれの入ったチューブに、BufferT1 を 180 μ L、事前準備で調整した ProteinaseK を 25 μ L 加えて、ボルテックスする。
- チューブラックにチューブを入れ、56°C の恒温水槽に浮かべて 1~3 時間以上反応させる。
- 恒温水槽からチューブをとりだし、恒温水槽を 70°C にあたためる。
- BufferB3 を 200 μ L 加えてボルテックスし、チューブラックに入れて、70°C の恒温水槽に 10 分間浮かべる。
- 10 分後からボルテックスし、96~100% エタノールを 210 μ L 加えてボルテックスする。
- Nucleo Spin TissueColumn を CollectionTube の上にセットしその上から 6 のサンプルをマイクロピペットを使って全量のせる。
- 小型遠心機で 1 分間遠心分離し CollectionTube に回収された液を捨てる。(DNA はカラムに結合している) カラムを再び Collection Tube にセットする。
- カラムに Buffer BW を 500 μ L 加え 1 分間遠心分離し、Collection Tube に回収された液を

捨てる。カラムを再び Collection Tube にセットする。

10. カラムに BufferB5 を 600 μ L 加え 1 分間遠心分離し、Collection Tube に回収された液を捨てる。カラムを再び Collection Tube にセットする。
11. メンブレンを乾燥させるために、さらに 1 分間遠心分離し今度はカラムを新しいマイクロチューブにセットする。
12. 4 で温めておいた Buffer BE を 100 μ L カラムの中央に滴下し室温で 1 分間放置する。
13. これを 1 分間遠心分離しチューブに DNA 溶液を回収する。

②PCR法

1. PCRチューブにラベルをしておく。ラベルをし終わったら氷上に置く。
2. 0.2m L PCRチューブ一本当たり Premix を 10 μ L、Primer1 (5'-AGG ACC TGT GGC TTG AAA AAC CAC-3')を 1.0 μ L、Primer2(5'-TYC GAC YYC CGR WTT ACA AGA CCG-3')を 1.0 μ L、DNA 溶液を混合したのち、滅菌水を加え 20 μ L に調節する。
これを必要なサンプル数+もう 1 サンプル分作る。
3. 酵素を破壊しないように穏やかによく混合する。
4. 20 μ L ずつ 0.2m L PCRチューブにDNA 溶液を分注する。
5. 遠心分離機で 3 秒間フラッシュする。
6. PCRマシンで反応させる。反応が終わったら 4°C で保存する。

③Clean up

1. PCR 溶液が少ないため、PCR 溶液 20 μ L に滅菌水 32 μ L 加え計 50 μ L にした後、BufferNT1 100 μ L を添加し反応液の調節を行う。
2. NucleoSpin Gel and PCR Clean up Column を Collection Tube にセットする。
3. Wash BufferNT3 700 μ L をカラムに添加し 30 秒遠心分離し、ろ液を捨てた後、同じ Collection Tube にカラムをセットする。
4. 乾燥させるためカラムを 1 分間遠心分離する。
5. カラムをマイクロチューブにセットする。BufferNE を 30 μ L 加え室温で 5 分間放置した後、1 分間遠心分離する。マイクロチューブに回収された溶液を反応液とし、冷凍保存する。

④制限酵素処理

1. サンプル数に応じて共通試薬を 1.5m L チューブにまとめて作製し、良く混合する。

	1 サンプルあたり
10×M Buffer	2 μ L
滅菌水	17-X μ L
HaeIII (最後に加える)	1 μ L
合計	20-X μ L

* X は Clean up した PCR 反応液の量

* サンプルの本数+1 サンプル分を目安に多めに作っておく。

* HaeIII は重要な酵素且つ、室温に置いておくと失活しやすいので、使用後は冷凍庫にすぐ戻す。

2. 0.2m L マイクロチューブに共通試薬を分注し、そこへ各 Clean Up 済みの PCR 反応液を X μ L 加えて良く混合する。(PCR 反応液中の DNA 量に応じて変化させる。通常は、2~5 μ L)
* Mbo I の場合は、10×M Buffer ではなく、10×K Buffer を使い、Msp I の場合は、10×T Buffer を使う。分量は同じ。
3. PCR マシンにチューブをセットする。各制限酵素に合う温度で 1~3 時間反応させる。反応後は、70°C で 15 分間処理し酵素を失活させる。

⑤電気泳動

1. 4% Nusieve GTG Agarose ゲルを作製する。
2. Mupid-2puls に冷えた Nusieve GTG Agarose をセットし、1×TAE をアガロースが浸るまで加える。
3. パラフィルムを机の上に置いて 10×Loading Dye を 2 μ L と DNA サンプル 2 μ L をパラフィルムの上で混ぜる。
4. アガロースのウェル (溝) に上記の DNA 溶液を入れ、さらに 100 b p DNA Ladder (Dye 入りタイプ) を 4 μ L ウェルに加える。
5. 50V で 60 分電気泳動機にかける。
6. SYBRsafe をアガロースゲルが浸るくらいまで入れて、遮光した状態で 600 r p m で 30 分間ミニシェーカーにかけトランスイルミネーター (302nm) で観察をする。

4. 結果

写真 1、2 は制限酵素 HaeIII、Mbo I、写真 3 はすべて制限酵素 Mbo I を使用して電気泳動した結果である。中央のラダーは 100bp DNALadder (*マーク) を使用した。すべて恵那市内の寺で採取したメダカである。写真 1、2 の制限酵素 HaeIII の数値は、ラダーと比較すると、上から 500~600bp、400~500bp、100~150bp だと分かる。

制限酵素 Mbo I の数値は、写真 1、3 では、ラダーと比較すると、上から 800~900bp、500~600bp、300~400bp だと分かる。写真 2 では、ラダーと比較すると、上から 500~600bp、400~500bp、200~300bp だと分かる。これは論文のデータにならなかった。しかし、肉眼では 800~900bp のバンドが見えていたが、写真では見にくくなってしまった。

制限酵素 Mbo I の結果が明確でなかったため、再度、制限酵素 Mbo I のみで実験を行った。その結果が写真 4 である。ラダーと比較して、上から順に数値を読むと、800~900bp、500~600bp、300~400bp となる。

さらに、結果を明確なものとするために制限酵素 Msp I も使い、実験を行った。写真 5 よりラダーと比較して、上から順に数値を読むと、500~600bp、400~500bp、200~300bp となる。

この数値の単位の bp は塩基対の数を指し、表 1 の数値が大きいほど DNA の断片の長さが長いことを表している。塩基配列はメダカの種類によって異なるため、制限酵素で切れる場所も異なってくる。そのため、DNA 断片の長さも異なり、種類を特定できる。



写真 1

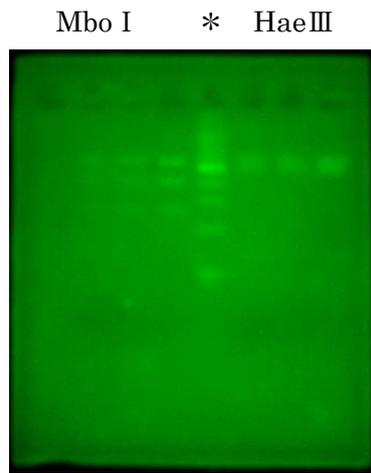


写真 2

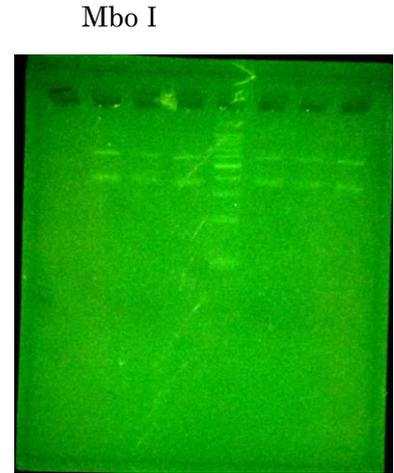


写真 3

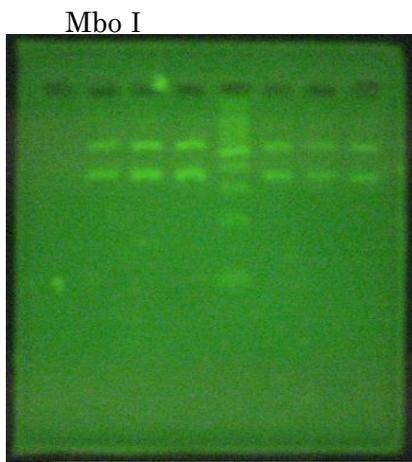


写真 4

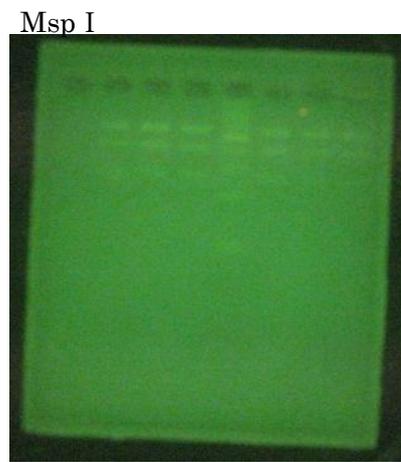


写真 5

Endonuclease Fragment pattern	HaeIII																									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Z	
Molecular size (bp)	563	312*	306*	480	284	765	1049	765	563	563	563	423	563	563	563	306	563	486	284	765	625	282	563	284	423	734
	284	284	284	284	251	284	173	284	284	486	284	284	236	486	284	284	486	480	282	284	284	281	202	248	423	175
	202	251*	257*	202	229	173	19	120	202	173	202	202	202	192	202	257	139	139	281	139	140	236	159	202	202	140
	173	202	202	173	202	19		53	192	19	139	140	139		120	202	53	83	202	53	139	202	139	175	140	139
	19	173	173	83	173			19			53	139			53	139		53	139		53	139	125	140	53	53
		19	19	19	83						53				19	53			53			53	53	139		
					19																	48		53		

表 1

Mbo I														
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
659	730	537	659	659	531	531	893	531	531	531	410	403	348	358
348	348	348	211	511	362	362	348	348	348	348	362	362	265	348
163	163	163	163	71	348	211		182	282	260	348	348	256	256
71		122	137			137		180	80	102	121	128	138	138
		71	71										106	106
													91	37

←表 2

Msp I							
A	B	C	D	E	F	G	H
642	473	675	542	542	640	473	411
318	318	542	416	389	318	416	389
259	259	13	259	259	259	259	259
98	98	11	13	27	13	69	131
13	69		11	13	11	13	27
11	13			11		11	13
	11						11

表 3

5. 考察

写真 1、2 のバンドの数値は、制限酵素 HaeIII は表 1 より、500~600bp があるのは A,H,I,J,L,M,N,P,V で、その中で 400~500bp があるのは I,M,P で、3つのうち 100~150bp があるのは、P だけであることが分かる。しかし、P の数値は 4 つあるが、写真 1、2 から分かるように、今回の実験では bp の数値を示すバンドが 3 本しか出でいないため、これも論文にない結果となった。

制限酵素 Mbo I は写真 1、3、4 は同じ結果となり、表 2 と比較したところ 800~900bp があるのは H しかないが、次の数値は 500~600bp で、H の次の数値は 348bp なので論文にはない結果となった。写真 2 の結果は何か実験の過程で手違いがあり、失敗してしまったと考えられる。

制限酵素 Msp I は表 3 より、500~600pb があるのは D か E で、この 2 つのうち次の 400~500bp と 200~300bp があるのは D しかないことが分かる。しかし、D の数値は 5 つあるが、写真 5 から分かるように今回の実験では bp の数値を示すバンドが 3 本しか出でいないため、これも論文にない結果となった。

これらのことより、新潟大学酒泉先生に頂いた論文にあった下の図 1、2 のどこにも属さないため、恵那市内の寺のメダカは東濃地方独自のメダカと考えることができる。(図 1、2 は表 1、2、3 で分かったアルファベットにより分類されたメダカの生息地域を示す。)

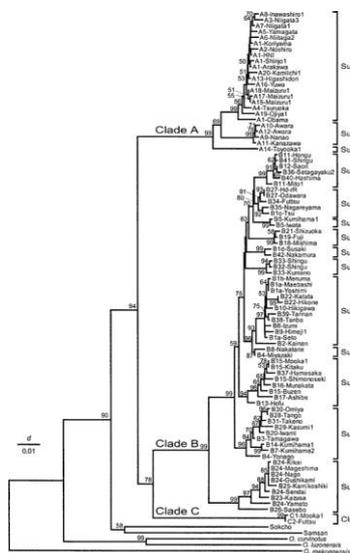


図 1

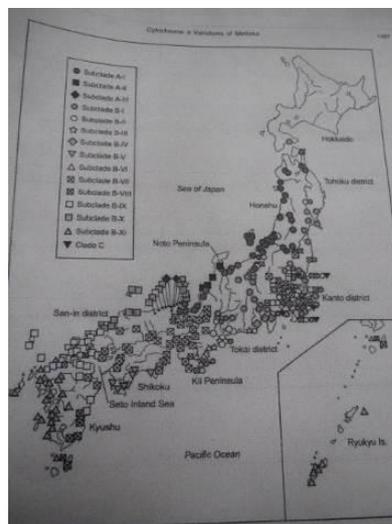


図 2

6. 今後の目標

実験を繰り返し行い、サンプル数を増やし、今出ている結果をさらに正確なものとしていく。
また、市販のメダカの遺伝子分析を行い、恵那市内の寺のメダカの遺伝子を比較する。

7. 参考文献、引用文献

Yusuke Takehana , Naoko Nagai , Masaru Matsuda , Kimiyuki Tsuchiya and Mitsuru Sakaizumi
Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome *b* Gene in Japanese of Medaka, *Oryzias latipes*