

メダカのDNA鑑定による雌雄判別実験

谷 良夫¹⁾ ・ 笠原 恵²⁾

Yoshio TANI and Megumi KASAHARA : Evaluation of polymerase chain reaction-based methods for medaka sexing

Abstract : Many DNA-based experiments have been developed to help high school teenagers understand theoretical concepts in genetics and to attract them to biology. The medaka, *Oryzias latipes*, has an XX/XY sex determination mechanism. A Y-linked DMY gene with DM domain has been identified as the sex-determining gene. We determined the phenotypic and genotypic sexes by observation the anal fins of medaka fish and by using polymerase chain reaction (PCR). We evaluated 3 primer sets for PCR-based sexing and found that 1 of the primer sets satisfied the requirements for experiments performed in high school science classes.

はじめに

メダカは日本では江戸時代からよく飼育され、早くから遺伝学の研究にも用いられてきた(成瀬 2008)。近年自然集団の遺伝学的研究(Takehana *et al.*, 2003)や脊椎動物で2番目の性決定遺伝子 *DMY* の発見(Matsuda *et al.*, 2002)、メダカ近縁種を用いた性決定システムの進化に関する研究(竹花 2008)へと広がりを見せている。これを受けて高等学校の教育現場でも同様に研究されてきている(橋本 2009)。

遺伝子解析を行う際にメダカの雌雄判別は主に鱗の形態で行われている(森 2000)。この方法によって確実に判別するには観察個体が成熟していること、観察者が熟練していることが必要であるため、遺伝子解析によって雌雄を判別できるかどうか試してみた。

材料

2009年7月に兵庫県立伊川谷北高等学校(神戸市西区学園西町)の西を流れる伊川で生徒と共に採集し、

現在飼育中の個体を7個体用いた。ここでは雄雌3個体ずつの解析結果を示す。残る1個体は雄で本文で述べた3尾の他の雄と同等の結果を得た。

(1) DNA増幅とアガロースゲル電気泳動

雌雄判別可能な既報プライマーを用いて、核DNAをPCR法にてDNA増幅した(表1)。反応液はdNTPs 1.0 nmol, フォワードとリバースのプライマーそれぞれ50 pmol, Blend *Taq* Polymerase (東洋紡績) 0.40 units, サンプルDNA (20ng) を含む50 μ Lであった。反応条件は94 $^{\circ}$ Cで4分加熱後, 94 $^{\circ}$ C 30秒, 55 $^{\circ}$ C 2分, 72 $^{\circ}$ C 4分のサイクルを40回行い, 最後に72 $^{\circ}$ Cで10分加熱した。プライマーセットAについてはPCR産物に制限酵素 *Alu* I を反応させ, 得られた断片を解析した。PCR産物及び制限酵素分解産物はアガロースゲル(2%)電気泳動法により展開し解析した。

表1. 使用プライマー (A, B, Cは本実験で用いたプライマーのセット名を示す。)

	記号	配列 (5' - 3') フォワード	記号	配列 (5' - 3') リバース	文献
A	51H7.F2	CAGGCCTGAAGATCAACGAGT	51H7.F3	AGTGCATCTAGTGTACATGGGT	Matsuda <i>et al.</i> (2002)
B	PG17.5	CCGGGTGCCCAAGTGCTCCCGCTG	PG17.6	GATCGTCCCTCCACAGAGAAGAGA	Matsuda <i>et al.</i> (2002)
C	PG17.25	CCCACCAGATCCTATACAAGTGAC	PG17.48	GGCTGGTAGAAGTTGTAGTAGGAGGTTT	Matsuda <i>et al.</i> (2003)

1) 兵庫県立伊川谷北高等学校

2) 兵庫教育大学 自然・生活教育学系

2011年2月20日受理

結果

(1) 形態観察

鱗の形態観察により雌3個体, 雄3個体を判別し, これらに個体記号 (a~f) を付けた (図1, 表2)。

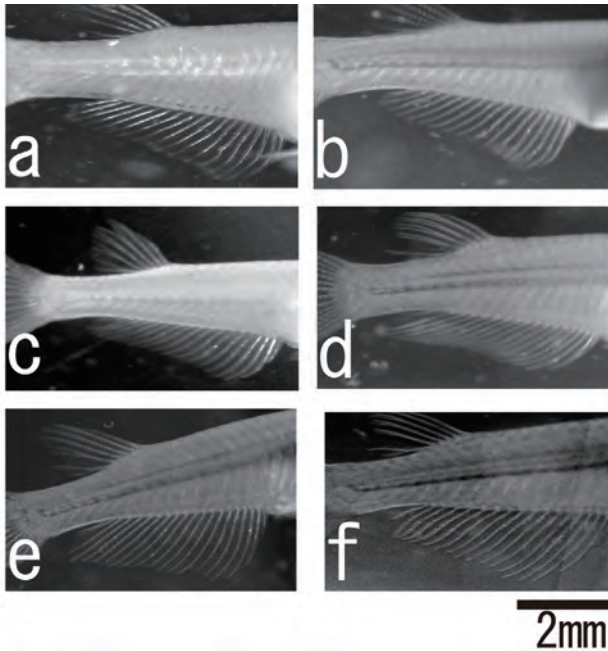


図1 個体 a~f の鱗

表2 各個体の記号と鱗の形態による雌雄判別

個体	a	B	c	d	e	f
雌雄	雌	雌	雌	雄	雄	雄

(2) 遺伝子解析

プライマーセット A (51H7.F2 と 51H7.F3) を用いた場合, 雌雄ともに約 700 塩基対 (bp) の増幅産物が得られた。雌雄に差は見られなかった。さらに制限酵素 *Alu* I を作用させて分解産物を解析したが, 雌雄ともに約 380 bp の DNA 断片が得られ, 雌雄の明確な判別は難しかった。(図2A)。

プライマーセット B (PG17.5 と PG17.6) を用いた場合, 雌では約 1200bp の増幅産物のみが見られた。雄では約 1200bp の増幅産物と約 1000bp の増幅産物が2本見られた。雌雄判別は可能であり, 高い再現性

のある結果が得られた (図2B)。

これに対しプライマーセット C (PG17.25 と PG17.48) を用いた場合は雌では約 3000bp の増幅産物のみが見られた。雄では約 1800bp の増幅産物のみが見られた。増幅産物の長さの違いにより, 雌雄判別は可能であり, 高い再現性のある結果が得られた (図2C)。

考察

メダカは 24 対の染色体を持っており, このうち 1 番染色体が X と Y の染色体に相当する。*DMY* 遺伝子は 2002 年に同定された性決定遺伝子で, Y 染色体上にあり, 進化のある段階でメダカの 9 番染色体の *DMRT1* 周辺領域がコピーされて現在の Y 染色体に挿入され, *DMY* が生じたと考えられている (竹花 2008)。

メダカの場合, *DMY* 周辺以外では X 染色体と Y 染色体の相違は知られていないので *DMY* 周辺を中心に解析する必要がある (酒泉 2007)。

今回用いたプライマーセット A は遺伝子 *DMY* のすぐ近くの下流側に存在する 51H7.F 領域に対するプライマーである。先行研究では雌雄の違いが見られ, 判別可能であった (Matsuda *et al.* 2002) が, 今回は PCR 法でのアニーリング温度を下げた条件下 (52°C・50°C・49°C・48°C) においても DNA 増幅を試みた後に制限酵素 *Alu* I で処理したが, 先行研究にある雄特有の約 200bp の DNA 断片は観察されなかった。このため雌雄判別のための明確な結果を得ることはできなかった。今回抽出したサンプル DNA の精製度が低いため, 目的とする *DMY* 遺伝子領域の増幅がうまくできなかったことが原因であると考えられる。今回本校で行った DNA 抽出方法では, プライマーセット A を用いて雌雄判別を行うことは難しいと思われる。

プライマーセット B は *DMRT1* 領域と *DMY* 遺伝子両方と相補的な配列を持ち, Y 染色体をもたない雌では *DMRT1* 領域のみを増幅するので 1 種類の増幅産物, 雄においては *DMRT1* 領域と Y 染色体上の *DMY* 遺伝子の 2 領域を増幅するので 2 種類の増幅産物が現れる (Matsuda *et al.* 2002; Matsuda *et*

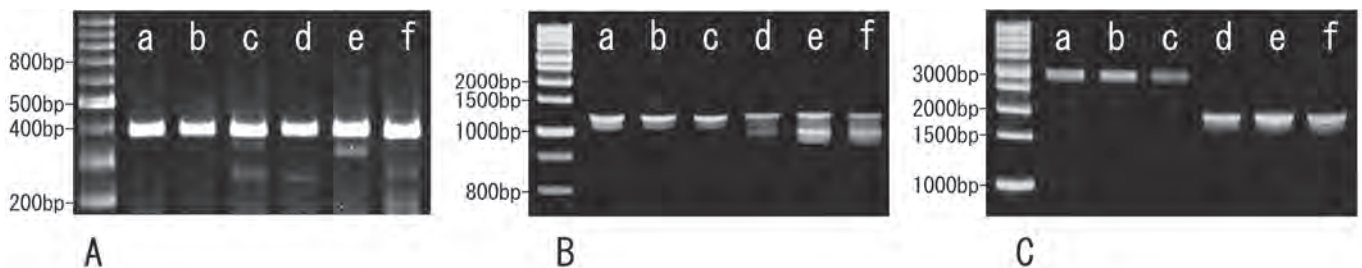


図2 プライマーセット A~C による DNA 増幅結果

al. 2003)。実験結果は先行研究と同等の増幅産物が観察された(図2B)。雌では *DMRT1* 領域に対する約1200bpの増幅産物が観察され、雄では約1200bpと *DMY* に対する約1000bp増幅産物が2種類観察された。雌雄判別は可能であった。

プライマーセットCについては雌では約3000bpの塩基長の増幅産物が、雄では約1800bp増幅産物が1種類ずつ観察された。前者は *DMRT1*、後者は *DMY* に対する増幅産物である(Matsuda *et al.* 2002)。雄の *DMRT1* に対する増幅産物は今回観察されなかった。この先行研究との相違は増幅条件の差による違いであると思われる。しかし雌雄判別は増幅産物の塩基長の差により可能であった。

プライマーセットB、Cにおいて雌雄判別が可能であった。プライマーセットCでは増幅産物が長いのでDNA増幅に時間がかかる。伸長時間は約4分必要であった。これに対しプライマーセットBは伸長時間を2分に設定できた。これにより全操作時間は約4時間30分から約3時間になり、1時間30分短縮することができた。またPCR法によって得られるDNA断片は200bpから1000bpぐらいに設定するほうが実験の再現性が高くなるので、高等学校の実験室で高校生がDNA鑑定によりメダカの雌雄判別を行う場合、プライマーセットB(PG17.5とPG17.6)の組み合わせが雌雄判別に適していると思われる。

謝辞

お世話になった兵庫県立神戸高等学校 稲葉浩介先生ならびに繁戸克彦先生、総合理学科のスタッフの生徒の方々、ご協力いただいた兵庫県立星陵高等学校 千脇久美子先生、兵庫県立明石城西高等学校 深水正和先生、実験に参加してくれた伊川谷北高等学校 22回生理系及び有志生徒と星陵高等学校 63回生有志生徒に深く感謝いたします。特に繁戸克彦先生にはメダカの麻酔の仕方、薬品の選定から実験手順について詳しくご指導いただきました。改めて感謝いたします。なお本研究は兵庫教育大学同窓会共同研究助成金の援助を受けて実施しました。

引用文献

- Matsuda, M., Y. Nagahama, A. Shinomiya, T. Sato, T. Toyazaki, C. Matsuda, T. Kobayashi, C. E. Morrey, N. Shibata, N. Shimizu, H. Hori, S. Hamaguchi and M. Sakaizumi. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, **417** : 559-563.
- Matsuda, M., T. Sato, Y. Toyazaki, Y. Nagahama, S. Hamaguti and M. Sakaizumi. 2003. *Oryzias*

curvinotus Has DMY, a Gene That Is Required for Male Development in the Medaka, *O. latipes*. *ZOOLOGICAL SCIENCE*, **20** : 159-161.

Takehana, Y., N. Nagai, M. Matsuda, K. Tsuchiya and M. Sakaizumi. 2003. Geographic Variation and Diversity of the Cytochrome b Gene in Japanese Wild Populations of Medaka, *Oryzias latipes*. *ZOOLOGICAL SCIENCE*, **20** : 1279-1291.

酒泉満・松田勝. 2007. メダカの性決定に関する遺伝子・分子生物学的研究.

http://www.zoology.or.jp/news/index.asp?pattern_cd=12&page_no=20, 日本動物学会(平成19年度社団法人日本動物学会賞), (アクセス 2011.02.19.)

竹花佑介. 2008. メダカに見る性染色体の進化. 総研大ジャーナル, **13** (平田光司編) : 12-15. 総合研究大学院大学, 神奈川.

成瀬清. 2008. 世界に誇る日本のメダカ研究. 総研大ジャーナル, **13** (平田光司編) : 2-7. 総合研究大学院大学, 神奈川.

橋本明日香・兼吉航平・樋口真之輔・松本泰典・森下咲・渡邊信寛. 2009. DNA解析によるメダカの遺伝子の研究. 平成20年度指定スーパーサイエンスハイスクール 研究開発実施報告書(平成20年度指定・第1年次, 153pp. 兵庫県立神戸高等学校, 兵庫.

森文俊・内山りゅう・山崎浩二. 2000. ヤマケイボケットガイド ⑩ 淡水魚. 山と溪谷社, 東京.