

目 的

アユは栃木県の内水面漁業および養殖業の重要魚種であるが、河川漁協・養殖経営体ともに冷水病を中心に深刻な魚病被害を受けている。

そこで本課題では、魚病に強いアユを作出するために、魚類が病原体に感染した時に関与するといわれている主要組織適合遺伝子 (MHC 遺伝子) の遺伝子構造を調査するために、その cDNA クローニングを実施した。

材料および方法

供試魚 試験には水産試験場片府田試験池で飼育している那珂川系アユ F1 の全脳および腎臓を用いた。

RNA 抽出および cDNA 合成 アユの全脳および腎臓は、1%メルカプトエタノールを含んだ lysis buffer でホモジナイズし、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。次に、cDNA 合成には、抽出して得られた total RNA に DNase I, 10×buffer, 25mM EDTA Solution を各 1μl 加え、室温に 15 分間放置した後、ヒートブロックを用いて 65°C で 10 分間加熱し、DNA 除去を行った。その後、室温まで冷却し、下記の逆転写反応を行った。逆転写反応は oligodT(50pmol) 1 μl, RNA 6 μl, 10mM dNTP Mix 1 μl, DEPC 水 5 μl を加え 65°C 5 分間、氷冷 1 分間以上行い、5×First Strand buffer 4 μl, 0.1M DTT 2 μl, RNaseOUT 1 μl を加え、Superscript III RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen) を 1 μl 加えて 50°C 5 分間、70°C 15 分のサイクルを行い、cDNA を合成した。

MHC 遺伝子の cDNA クローニング 標的とする MHC 遺伝子をクローニングするために、米国立生物学情報センター (National Center for Biotechnology Information, NCBI) の塩基配列データベースから MHC 遺伝子に関する情報を収集した。得られた塩基配列を CLISTALX を用いてアライメント解析を行い、塩基配列の保存性の高い領域に縮重プライマーを設計した。設計した縮重プライマーを用いて PCR 反応を行った。PCR 溶液の組成

は、cDNA 10ng, 10×PCR buffer 2.5μl, dNTP Mixture 2μl, 10pmol f primer 1.25μl, 10pmol r primer 1.25μl, extaq 0.25μl, 滅菌 DW 15.75 μl を全量 25 μl になるように調製し、94°C 3 分間の後、94°C 1.5 分、45°C 1 分間、72°C 1.5 分間のサイクルを 30 サイクル行った。その後 72°C で 7 分間の伸長反応を行った。その後、1.5% アガロースゲルで電気泳動し、標的部位の切り出しを行った。切り出した標的部位を pGEM-TEasy Vector System I (promega) を用いてライゲーションを行い、大腸菌 DH5 α に導入および形質転換した。その後、陽性コロニーの塩基配列を ABI Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems) を用いて決定した。

結果および考察

アユにおける MHC 遺伝子の単離を行った結果、縮重プライマーを用いて切り出した標的部位からは、189bp の断片がクローニングされた。クローニングされた断片の BLAST 検索を行ったところ、MHC 遺伝子と相同性が認められた。今後は、アユの MHC 遺伝子の全長単離を行い、多型部位の探索とマーカー化を行い、遺伝子による選抜育種に利用できるように進行する予定である。

参考文献

- 1) M. Kasahara *et al.* (1992) Evolution of the major histocompatibility complex: Isolation of class II A cDNA clones from the cartilaginous fish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6688-6692
- 2) K.M Wegner, M.Kalbe *et al.* (2006) Genetic variation in MHC class II expression and interactions with MHC sequence polymorphism in three-spined sticklebacks. Molecular Ecology 15, 1153-1164

(水産技術部)