

ゲノムワイド SNP タイピングにおける 皮膚粘液由来 DNA の有効性評価

研究成果のポイント

- ・皮膚粘液 DNA を用いた非侵襲的な SNP タイピング技術を開発
- ・MIG-seq により一般的な組織から抽出された DNA と同等の SNP 情報を取得可能であることを実証
- ・フィールド試験においても実用性を確認し、養殖現場での応用が期待される
- ・従来の鰭組織に代わる新たな DNA 採取法として有望

研究成果の概要

養殖魚のゲノム解析には数千～数万個の一塩基多型 (SNP) を用いてゲノムワイド解析を行うことが近年のトレンドとなっています。そのためには、高品質なゲノム DNA を用いてゲノムリシーケンスや(dd)RAD-seq 法などの手法が考案されてきました。高品質なゲノム DNA を得るためには生体から尾鰭などの組織をサンプリングし、DNA を抽出する必要があります。しかし、尾鰭等の組織をサンプリングすることは魚にとって負担となり、傷口から病原菌が感染する可能性があります。また、商業生産されている養殖魚からサンプリングする場合、尾鰭などを欠損すると商品価値を損なうため、大規模な遺伝子型解析の律速となっていました。

本研究では、尾鰭に代わる DNA サンプルとして体表の粘液に着目しました。体表粘液から DNA を抽出すると尾鰭由来の DNA と比べて収量が少なく、分解も進んでいることがわかりました。そこで、分解の進んだ DNA でも PCR が可能な MIG-seq 法 (Multiplexed ISSR Genotyping by Sequencing) を採用し、体表粘液由来の DNA を用いたゲノムワイド SNP タイピングが可能であるかを検討しました。また、実際の養殖場で同技術を応用し、今後予想される大規模ジェノタイプングへ転用可能かを検証しました。

研究成果の詳細

(背景)

ゲノムワイド SNP タイピングは、養殖魚の遺伝解析・選抜育種・保全生物学において重要な技術です。しかし、従来の DNA 採取方法である 尾鰭のサンプリングは魚にストレスを与える可能性があり、経済的な影響も考慮する必要があります。皮膚粘液 DNA は 非侵襲的な代替サンプルとして期待されていますが、ゲノムワイド SNP タイピングへの適用は未検証でした。本研究では、MIG-seq を用いて皮膚粘液 DNA の有用性を検証し、その実用性を評価しました。

(研究手法)

① ラボ試験

養殖マダイの稚魚を研究室へ輸送し、体表粘液と尾鰭をサンプリングしました。体表粘液は綿棒でサンプリングしました。各組織は磁性ビーズを用いて精製し、電気泳動により品質を確認しました。その後、抽出した DNA を用いて 16 個の MIG-seq プライマーを用いた PCR を行いました。PCR 増幅したサンプルは電気泳動により増幅の有無や増幅サイズなどを確認しました。

MIG-seq 法で構築した DNA ライブラリは次世代シーケンサーにより塩基配列を取得し、各種バイオインフォマティクス解析により SNP 情報を取得しました。得られた SNP 情報を用い、系統樹や遺伝関係行列による類似性の検討を行いました。また、染色体上の SNP の分布についても検証しました。

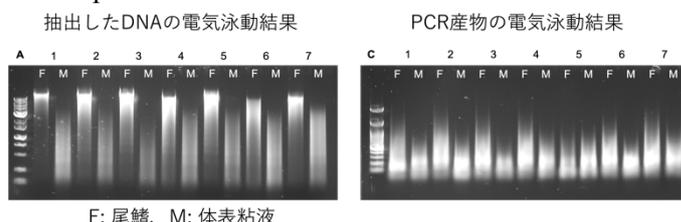
② フィールド試験

高知県の養殖場でサンプリングを実施しました。成魚の出荷時に体表粘液をサンプリングして、ラボ試験と同様に体表粘液から DNA を抽出し、MIG-seq 法により DNA 増幅を行い、DNA ライブラリを構築しました。その後、定法に従いデータ解析を行い、ラボ試験と同等の SNP 数が得られるかを検証しました。

(研究成果)

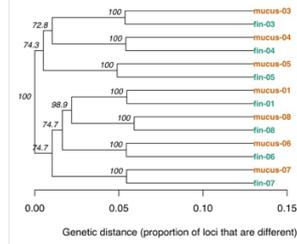
① ラボ試験

どちらの組織からも DNA を抽出することはできましたが、尾鰭から抽出した DNA は高分子 DNA が多く、分解が少ない傾向がありました。一方で、体表粘液から抽出した DNA は高分子 DNA が無く、1kb 未満のサイズとなっていました。これらの DNA を使って MIG-seq プライマーで増幅したところ、体表粘液由来の DNA は尾鰭由来の DNA と比べて低分 (100~300bp) の DNA が増幅されていることがわかりました。



次に、MIG-seq 法で構築した DNA ライブラリを次世代シーケンサーで解読し、SNP 情報を取得しました。その結果、それぞれの組織由来の DNA ライブラリから 1.3~1.4 万個の SNP を得ることができました。しかし、両組織に共通する SNP は約半数の 7 千個でした。これらの共通する SNP を使い系統樹を作成したところ、由来の異なる DNA であっても遺伝的に類似していることが確認できましたが、体表粘液由来の DNA はヘテロ接合体率の有意な上昇が認められましたので、輸送中に他個体の粘液が付着し、汚染されたものと示唆され

ました。



体表粘液と尾鰭由来DNAを比較した遺伝的類縁度

この結果から、汚染に気をつければ体表粘液由来 DNA を用いた SNP タイピングは有効であると考えられました。

② フィールド試験

養殖場での成魚出荷に立ち会い、体表粘液を採取しました。①と同様の手法で DNA 抽出と DNA ライブラリの構築を行い、SNP 情報を取得しました。その結果、1.7 万個の高品質な SNP を得ることができ、ヘテロ接合体率も通常値となりました。この結果から、本研究で開発した体表粘液を使ったゲノムワイド SNP タイピング技術が、実際のフィールドにおいても有効であることが示されました。



(今後の展望)

体表粘液を用いた DNA 抽出とゲノムワイド SNP タイピング技術が開発されたことから、商品価値を損なうことなく、成魚から DNA 情報を得ることが可能になりました。そのため、今後は養殖現場で問題となっている病気への感受性や成長などの育種形質について本技術を用いたゲノムワイド SNP タイピングを行い、選抜育種に有効な SNP や親魚を探索していく予定です。

発表論文の概要

研究論文名

Skin mucus DNA with MIG-seq: a valuable combination for genome-wide SNP typing in aquaculture fish.

著者

小野木健起 (日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科 4 年 (当時))
澤山英太郎 (日本大学生物資源科学部海洋生物学科 准教授)

公表雑誌

Aquaculture International

<https://doi.org/10.1007/s10499-025-01903-2>

公表日：2025年3月12日

お問い合わせ先

日本大学生物資源科学部海洋生物学科 海洋生物生理学研究室
准教授 澤山英太郎（さわやま えいたろう）
TEL 0466(84)3724 E-mail: sawayama.eitaro@nihon-u.ac.jp

文責：澤山英太郎