

【原著】

メダカ幼魚の簡易・迅速な性別判断方法

西口慶一、五郎丸（新海）美智子

東邦大学薬学部薬学総合教育センター・薬学総合実験部門

(受付：平成 22 年 12 月 3 日)

(受理：平成 22 年 12 月 13 日)

要 旨

高校生を対象にした遺伝子実験を行う場合は、未成年のプライバシー保護の観点から、ヒトの DNA を使用した実験はむやみに行えない。よって、DNA の性差を学習するために、性決定遺伝子が明らかな、メダカを材料にしたオス・メスの鑑定の実験を、教育材料として以前に報告した。本研究は、実験時間を短く、簡易に実験をするために、DNA 精製を行わずに PCR で簡易にメダカのオス・メスの判定ができる方法を検討した。増幅効率が高い KOD-FX Kit と生体試料破壊器具を用いた方法がもっともよい条件であった。この方法により、性別が外部形態では分かりにくいメダカの幼魚の簡易・迅速な性別判定が可能になった。

キーワード：メダカ、性別判定、教材

緒 言

1985 年にジェフリーが DNA 指紋の手法を発表した¹⁾。この方法は、ミニサテライトと呼ばれる 10 から数十塩基程度の配列を 1 単位とし、数十から数百繰り返している領域を使用している。ヒトゲノムでは、このようなミニサテライトが数千箇所あることがわかっている。現在、主として用いられている検査は、マイクロサテライトと呼ばれる反復配列である。マイクロサテライトは、ミニサテライトと同様の連続する反復配列であるが、リピートユニットが数塩基と短いものである。マイクロサテライトは、全体の長さが 100 塩基から 400 塩基程度と短く、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) に適しているとともに、長さの決定が正確にできるという利点があることから急速に発展してきた。

これらの手法を用いることにより、DNA 部分の個人個人の差異を、個人識別²⁾や親子鑑定³⁾に用いることが可能となった。

個人個人で異なる遺伝子で、人口中 1% 以上の頻度で存在する遺伝子の変異を多型とよぶ。この多型には、① 塩基が挿入や欠失しているもの、② 2 ~ 数十塩基の繰り返し配列の繰り返し回数が個人で異なっているもの、③ 1 つの塩基が他の塩基に置き換わっているものがある。①、③は一塩基多型 (SNP) と呼ばれている。②の繰り返し多型のうち、マイクロサテライトの繰り返し多型をマイクロサテライト多型という。

臨床上まったく同じ症状を示す患者に、ある薬物を投与した場合、よく効く患者、少し効く患者、まったく効かない患者に分かれる場合がある。また、危篤な副作用が現れる場合がある。薬物の有効性や副作用には、薬物代謝酵素、輸送タンパク質、受容体などの遺伝子多型が大きくかかわっている。

以上の DNA 鑑定や遺伝子多型と薬の効きやすさも、ヒトの DNA の個体差に関係している。日本 DNA 多型学会の DNA 鑑定についての指針では、「DNA 情報はその内容の如何にかかわらずプライバシーとして保護されるべきである。DNA 鑑定は犯罪の捜査などの法律による手続きに基づくもののほかは、関係者の同意のもとで実施されるべきである」。

以上の理由で、高校生を対象にした実験を行

う場合は、未成年のプライバシー保護の観点から、ヒトの DNA を使用した実験はむやみに行えない。よって、DNA の個体差を学習するために、性決定遺伝子が明らかな、メダカを材料にしたオス・メスの鑑定の実験を行い、メダカの性決定遺伝子を分析することにより、性別が分かりにくい幼魚の性別判定を以前報告した⁴⁾。実習には時間的制約があり、3 時間から 4 時間で行わなくてはならない。DNA の実験で最も障害となるのは DNA の抽出、増幅に関する時間である。これを短縮するために使い捨ての生体試料破壊器具と増幅効率が高い KOD-FX Kit を用い、DNA 精製をしない方法を開発した。これにより簡易で短時間 (3 時間以内) の実習が可能となった。

材料と方法

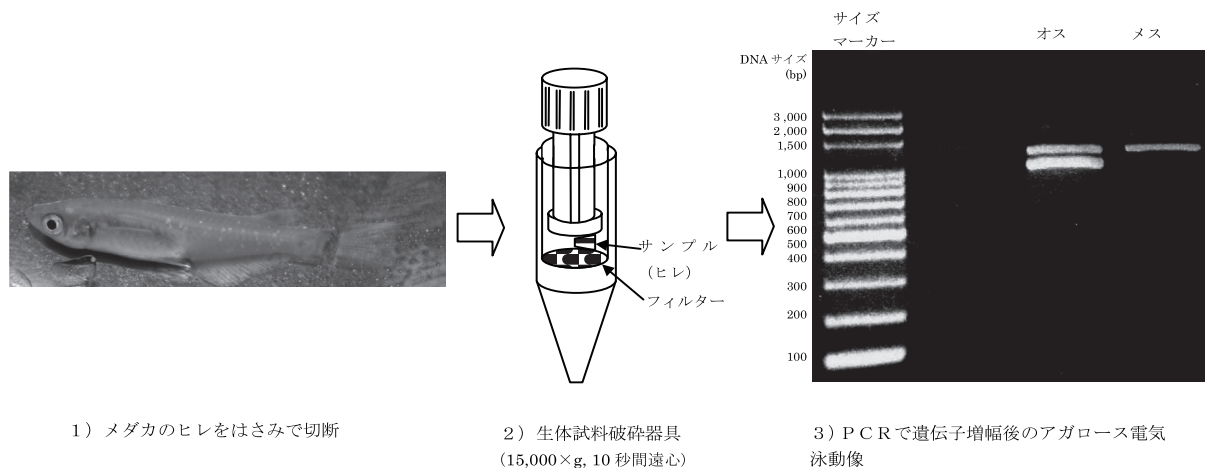
材料は、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) の成魚のオス、メスおよび幼魚 (性別不明) を使用した。ヒメダカの成魚のオス、メスおよび幼魚 (性別不明) の尾びれをそれぞれ 5 mg 切り取り、生体試料破壊器具 (BioMasher, 株式会社ニッピ バイオマトリックス) の中に入れて 15,000 × g で 10 秒間遠心し抽出液を得た。その抽出した溶液を鋳型として、PCR を行った (図 1)。PCR に使用した酵素は、*Thermus aquaticus* 由来の Tag DNA polymerase (SIGMA 社) と *Thermococcus kodakaraensis* 由来の KOD FX DNA polymerase (東洋紡績株式会社) を用いた。プライマーは

DMY F (5' CCGGGTGCCCAAGTGCTCCCGCTG 3') および DMY R (5' GATCGTCCCTCCACAGA GAAGAGA3') を用いて DMY (DM domain gene on the Y chromosome) 遺伝子と DMRT1 (DM-related transcription factor 1) のそれぞれの一部を PCR にて増幅した。温度条件は、Tag DNA polymerase は、94℃で 2 分間保った後、熱変性の 94℃で 1 分間、アニーリングの 55℃で 1 分間、および伸長反応の 72℃で 1 分間の反応を 30 サイクル行い、最後に伸長反応を 72℃で 7 分間行った⁵⁾。KOD FX DNA polymerase は、94℃で 2 分間保った後、熱変性の 98℃で 10 秒間、アニーリングの 55℃で 30 秒間、および伸長反応の 68℃で 1 分間の反応を 30 サイクル行い、最後に伸長反応を 68℃で 5 分間行った。それぞれの PCR 産物の検出は、2% アガロースゲル電気泳動後にエチジウムブロマイドで染色した。

結果および考察

DNA の精製法に SDS- フェノール法がある。この方法は組織を懸濁した後、SDS で溶解させ、解離したタンパク質をフェノールで変性させて水溶液にし、未変性の DNA を水溶液として得る方法である。この方法は煩雑であり時間もかかる。この DNA 精製法を簡易で短時間でできるように検討した。

ヒメダカヒレから DNA を精製せずに、生体試料破壊器具を用いて 15,000 × g で 10 秒間遠心し、抽出液を得た。この液は、直接 PCR を行っ



1) メダカのヒレをはさみで切断
 2) 生体試料破壊器具 (15,000 × g, 10 秒間遠心)
 3) PCR で遺伝子増幅後のアガロース電気泳動像

図1. メダカのヒレから簡易・迅速にオス・メスを判定する方法

た。PCR の酵素は、Tag DNA polymerase と KOD FX DNA polymerase を検討した結果、KOD FX DNA polymerase のみアガロース電気泳動法でバンドが確認され、この酵素は遺伝子増幅効率が高いことが分かった。KOD FX DNA polymerase による PCR 後のアガロースの電気泳動法により、ヒメダカメスとオスの PCR 産物のサイズを確認した。その結果、メスは、1300 bp の DMRT1 のバンドが確認された。また、オスは 1300 bp の DMRT1 のバンドと、1000 bp の DMY のバンドの 2 本が確認された (図 2)。今回用いたプライマーの増幅部位は、DMY と 9 番染色体上の DMRT1 の遺伝子と塩基配列が 93% と高い相同性を示すことから、PCR で DMY と DMRT1 を増幅することで可能となった。この

他に Jawahar らはメダカの *dmrt1bY* と *dmrt1a* のイントロンの部位の違いに着目した性別の判定を行う方法を開発している⁶⁾。今後はこれら遺伝子部位を増やすプライマーを用いて、今回開発した方法 (KOD FX polymerase の PCR、生体試料破壊器具) を試したい。

生体試料破壊器具と KOD FX DNA polymerase を用いた新しく開発した方法で、外部形態からは性別が不明のヒメダカの幼魚 6 種類の性別を分析した。個体 1, 3 が 1300bp の DMRT1 のバンドと 1000 bp の DMY のバンドの 2 本を確認されたためオスであることが分かった。また、個体 2, 4, 5, 6 は、1300bp の DMRT1 のバンドのみが検出されたため、メスであることが分かった (図 3)。

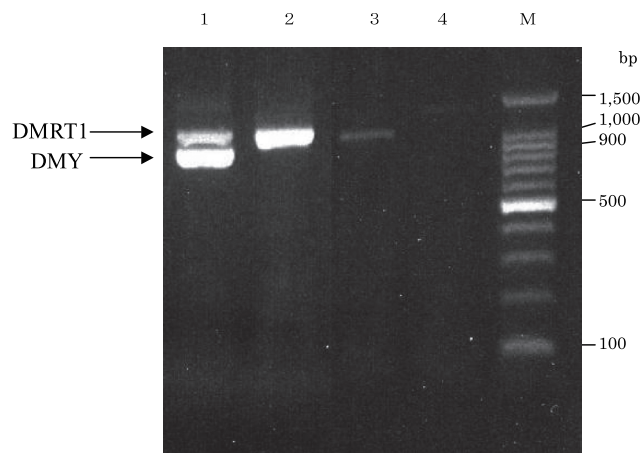


図2. DNAポリメラーゼの違いによるDNA増幅効率の影響
 1: KOD FX DNA polymerase (メダカ、オス)、2: KOD FX DNA polymerase (メダカ、メス)、3: Tag DNA polymerase (メダカ、オス)、4: Tag DNA polymerase (メダカ、メス)、M: サイズマーカー

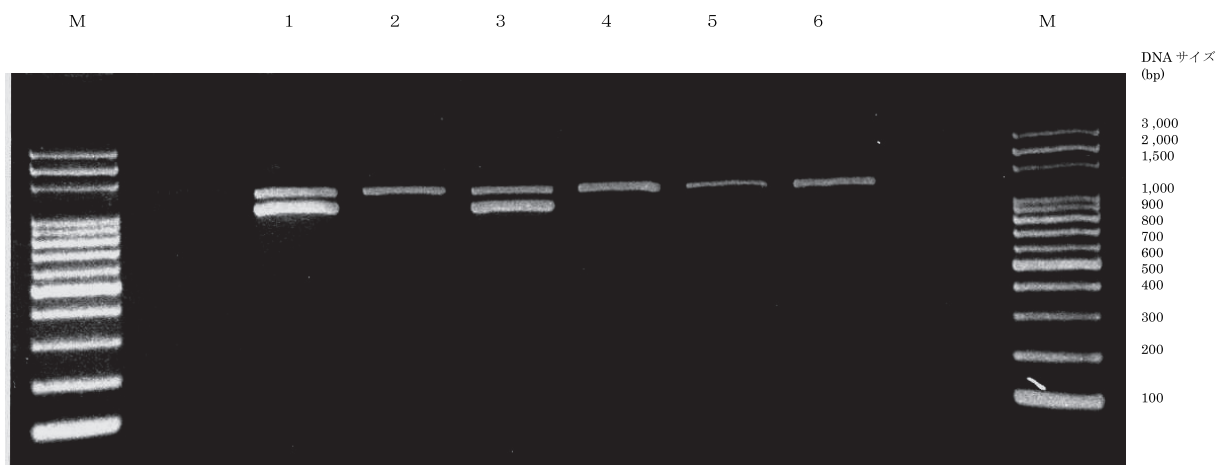


図3. メダカ幼魚のオス・メスの遺伝子解析結果
 M: 分子量マーカー、1-6: メダカ幼魚のサンプル

今回、開発した方法は、増幅効率が高い KOD-FX Kit と生体試料破壊器具を用い、簡易で短時間（3 時間以内）の実習が可能となった。

KOD FX polymerase を用いる方法は林田らが報告している。これらはヒトの髪の毛⁷⁾や血液⁸⁾から DNA を精製せずに簡易の抽出法のみで PCR を行い、短時間の分析を可能にしている。KOD FX polymerase は超高温性古細菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来の α 型酵素であり、動植物のクルードサンプル、カビ、酵母などから直接 PCR が可能である⁹⁾。今回は、この酵素を用いてメダカ幼魚の遺伝子鑑定を行った。

佐々木らは薬学部で DNA を扱う基礎技術の習得を目的とした実習を検討している¹⁰⁾。実習では、時間的制約、安全性および施設面を考へることは実習教材を作成する上で重要であると報告している。

今回、新しく開発した実習教材であるメダカ幼魚の簡易・迅速な性別判断方法は、短時間で簡易な方法であり、特別な器具を必要としない。

この実験を通じて生徒が DNA 鑑定や遺伝子多型を学ぶきっかけになることを願っている。

謝 辞

本研究において PCR の酵素についてご指導いただいた東洋紡績株式会社ライフサイエンス事業部の前原芳郎氏、井村宗昭氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Jeffreys AJ, Wilson V et al.: Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* **314**: 67-73 (1985)
- 2) Jeffreys AJ, Wilson V et al.: Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature* **316**: 76-79 (1985)
- 3) Jeffreys AJ, Brookfield JFY et al.: Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* **317**: 818-819 (1985)
- 4) 西口慶一、五郎丸美智子：DNAを用いたメダカ幼魚の性別判断—DNA診断を理解させる教材の開発—. *医学と生物学* **153** (11): 493-498 (2009)
- 5) Shinomiya A, Otake H et al.: Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: Genotypic sexing of wild populations. *Zool. Sci.* **21**: 616-619 (2004)
- 6) Jawahar GP, Susan JH: Simplex PCR assay for positive identification of genetic sex in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Mar. Biotechnol.* **10**: 641-644 (2008)
- 7) Hayashida M, Iwao-Koizumi K, et al.: Single-tube genotyping from a Human hair root by direct PCR. *Anal. Science* **25**: 1487-1489 (2009)
- 8) Hayashida M, Iwao-Koizumi K, et al.: Genotyping of polymorphisms in alcohol and aldehyde dehydrogenase genes by direct application of PCR-RFLP on dried blood without DNA extraction. *Anal. Science* **26**: 503-505 (2010)
- 9) Mizuguchi H, Nakatsuji M, et al.: Characterization and application to hot start PCR of neutralizing monoclonal antibodies against KOD DNA polymerase. *J. Biochem.* **126** 762-768 (1999)
- 10) 佐々木陽平、南雲清二：簡易な植物の遺伝子多型解析実験の検討. *薬学雑誌* **125** 205-211 (2005)

連絡先：西口慶一
東邦大学薬学部薬学総合教育センター・薬学総合実験部門
千葉県船橋市三山 2-2-1 (〒274-8510)
Tel: 047-472-1301
E-mail: guchi@phar.toho-u.ac.jp

Simple, Rapid Identification of Genetic Sex in Young Japanese Medaka, *Oryzias latipes*

Yoshikazu NISHIGUCHI, Michiko GOROMARU-SHINKAI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University

Summary

In genetic experiments designed for high school students, genetic privacy should be respected and human DNA samples should not be used. We previously developed experiments to determine the sex of medaka (*Oryzias latipes*) and then investigated PCR enzymes and extraction of DNA to devise simpler, more rapid experiments. A method using both KOD-FX for PCR enzymes and a BioMasher was subsequently developed. This method utilizes young fish in which sex is not distinguishable based on appearance. (Med Biol **155**: 78-82 2011)

Key words: medaka, judgment of sex, teaching materials

Corresponding address: Yoshikazu NISHIGUCHI

Center for General Pharmacy Education, Department of Pharmaceutical Practice, School of Pharmaceutical Sciences, Toho University

Miyama, 2-2-1, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

Phone: +81-47-472-1301

E-mail: guchi@phar.toho-u.ac.jp

