

## プール検体を用いたクニマス検出（短報）

藤原 亮

2021年10月17日からおよそ2週間にわたり、西湖漁業協同組合の西湖へとつながる排水路にてヒメマス *Oncorhynchus nerka* 成熟魚の遡上が確認され、人工採卵が行われた。西湖にはクニマス *O.kawamurae* が生息しており、遡上魚の中にクニマスが混じっていた場合、人為的に交雑種を作出する危険があるため、人工採卵に用いた親魚の種判別を行う必要があった。しかし、親魚の数が700尾以上と多く、1検体ずつの検査方法では種判別に大量の試薬と処理時間を要する。そこで、大量の検体検査と処理時間の短縮を両立したクニマス検出法を確立したので報告する。

### 材料及び方法

西湖で採捕されたクニマス及びヒメマスを供試魚とした。ヒメマス4検体の胸鰭をそれぞれ約10mgずつ採取し、これにクニマス1検体の胸鰭約10mgを混ぜて、5検体をプールした5検体プール区を作製した。同様の方法でヒメマス9検体にクニマス1検体を混ぜて10検体プール区を作製し、再現性の評価のためにそれぞれ3つの試験区を用意した。DNAの抽出は、各プール検体をDNeasy Blood & Tissue Kitに添付のプロトコルにより行った。各プール検体から抽出したDNA抽出液は上清1µlをPCRに供した。PCR判別は過去にNakayamaら<sup>1)</sup>が開発したクニマスとヒメマスの判別プライマーを改良し、TaKaRa Taqを用いて行い、3種類のプライマーを用いたマルチプレックスPCR（方法1）及びクニマスに特異的なプライマーのみ【Ok-spL2M2, Okn2-R】を用いたPCR（方法2）の二つの方法を行った。PCR判別に用いたプライマーの塩基配列を表に示す。PCRの反応条件は、熱変性を94°Cで2分間行った後、方法1では94°C（15秒）、53°C（15秒）、72°C（20秒）のサイクルを30回繰り返し、方法2では94°C（15秒）、60°C（20秒）、72°C（20秒）のサイクルを35回繰り返した。増幅したPCR産物は、2%アガロースゲルを用いて、15分間の電気泳動を行った。

表 PCR判別に用いたプライマー

Region	Primer		Sequence
mitochondrial transfer RNA	forward	Ok-spL2M2	5'-ATTATCAACATACRGTGGTGTC-3'
		On-spL1M2	5'-TAAACTACCCTCTGACGGATAC-3'
	reverse	Okn2-R	5'-CGTTGGTCGGTTCTTACTACAT-3'

### 結果

方法1において、5検体プール全ての試験区でクニマスのバンドが検出された（図）。一方で、10検体プールの試験区では3試験区中1つの試験区でクニマスが検出されなかった。方法2においても、5検体プール全ての試験区においてクニマスのバンドが検出されたのに対して10検体プールの試験区では3試験区中1つの試験区でクニマスが検出されなかった。

以上の結果から、方法1、2いずれにおいても、5検体プール全ての試験区でクニマスが検出可能であったことから、5検体プールはスクリーニングする方法として有効であると考えられる。

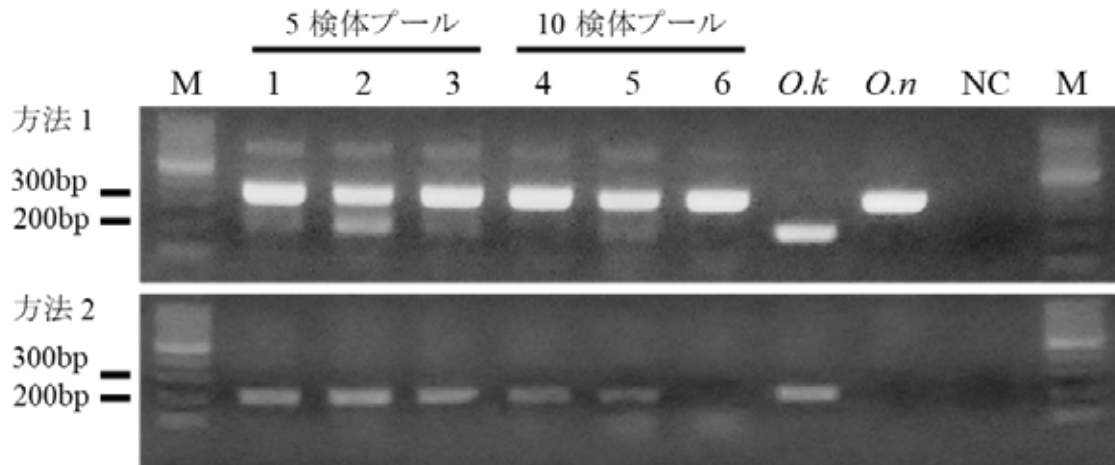


図 三種類のプライマーを用いたマルチプレックス PCR(方法 1)及びクニマス特異的なプライマーのみを用いた PCR(方法 2)の電気泳動像. M: 100 bp DNA Ladder, 1-3: 5 検体プール区, 4-5: 10 検体プール区, *O.k.*: クニマス対照区, *O.n.*: ヒメマス対照区. NC: 陰性対照区

## 文 献

1) Kouji Nakayama, Nozomu Muto, Tetsuji Nakabo (2013): Mitochondrial DNA sequence divergence between “Kunimasu” *Oncorhynchus kawamurae* and “Himemasu” *O. nerka* in Lake Saiko, Yamanashi Prefecture, Japan, and their identification using multiplex haplotype-specific PCR. *Ichthyological research*, 60, 277-281.