

## 迅速なヨーロッパウナギの判別方法の開発（短報）

藤原 亮

西湖のクニマス *Oncorhynchus kawamurae* 産卵場において、ヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* によるクニマス卵の食卵行動が確認されて以降、水産技術センターでは、産卵場周辺でヨーロッパウナギの捕獲を行っている<sup>1)</sup>。西湖には、ヨーロッパウナギ以外にニホンウナギ *A. japonica* も生息しているが、両種を形態のみで同定することは難しく、これまで捕獲した個体の同定は、業務委託によるシーケンス解析に頼ってきた。そこで、解析費用の削減と作業時間の短縮を目的として、新たなヨーロッパウナギの判別方法を確立したので報告する。

### 材料及び方法

西湖で捕獲したヨーロッパウナギとニホンウナギを供試魚とした。DNA の抽出は、過去に木南ら<sup>6)</sup>が開発した粘液抽出法により行った。まず、やわらか歯間ブラシ (SS-M サイズ, 小林製薬株式会社) を用いて、胸鰭裏から粘液を採取し、その粘液を 50  $\mu$ L の 50 mM NaOH に入れて、95°C で 20 分加熱した。その後、5  $\mu$ L の 1M Tris-HCl (pH 8.0) を加えて、激しく攪拌した後、上清 1  $\mu$ L を PCR に供した。PCR 判別はヨーロッパウナギとニホンウナギを識別可能な種特異的プライマーを設計し、KOD FX Neo (東洋紡株式会社) を用いてマルチプレックス PCR を行った。PCR 判別に用いたプライマーの塩基配列及び PCR 反応液組成を表 1, 2 に示した。PCR の反応条件は、熱変性を 94°C で 2 分間行った後、94°C (30 秒), 60°C (20 秒), 68°C (30 秒) のサイクルを 28 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 1 PCR 判別に用いたプライマー

Region	Primer		Sequence
mitochondrial transfer RNA	forward	eel-mt16SrRNA-AF	5'-TCTATAATCAAAAACATTACCGACCA-3'
		eel-mt16SrRNA-JF2	5'-TAGGTGATAGAAAAGGACAAAACGC-3'
	reverse	eel-mt16SrRNA-R	5'-ACAGTTAAACCCTCGTTATGCCATT-3'

表 2 PCR 反応液の組成

組成	濃度	終濃度	Vol.
PCR Buffer for KOD FX Neo	2×	1×	5 $\mu$ L
dNTP	各 2 mM	各 0.4 mM	2 $\mu$ L
eel-mt16SrRNA-AF	10 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	0.3 $\mu$ L
eel-mt16SrRNA-JF2	10 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	0.3 $\mu$ L
eel-mt16SrRNA-R	10 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M	0.3 $\mu$ L
DW			0.9 $\mu$ L
KOD FX Neo	1 U/ $\mu$ L	0.2 U/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ L
Template			1 $\mu$ L
計			10 $\mu$ L

## 結果

ニホンウナギでは約 900 bp, ヨーロッパウナギでは約 600 bp に PCR 産物が検出された (図 1)。このことから, 本研究ではヨーロッパウナギとニホンウナギを識別可能な種特異的プライマーを設計し, ウナギから採取した体表粘液のみを用いた迅速な種判別が可能となった。従来のシーケンス解析では, 種の同定までに数日間を要していたが, 本手法により半日かからずにヨーロッパウナギの判別が可能である。今後, 解析費用の削減と作業時間の短縮による駆除作業の効率化が期待される。

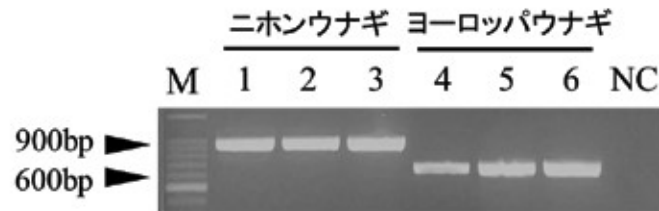


図 1 三種類のプライマーを用いたマルチプレックス PCR 産物の電気泳動像.

M: 100 bp DNA Ladder, 1-3: ニホンウナギ, 4-6: ヨーロッパウナギ, NC: 陰性対照区

## 文献

- 1) 大浜秀規・青柳敏裕・芦澤晃彦・長谷川裕弥 (2018) : 西湖におけるクニマスの産卵環境一II. 山梨県水産技術センター事業報告書, 45, 13-22.
- 2) 加地弘一・青柳敏裕・大浜秀規・塚本勝巳 (2019) : 西湖におけるクニマスの産卵環境一III. 山梨県水産技術センター事業報告書, 46, 46-59.
- 3) 加地弘一・青柳敏裕・大浜秀規・塚本勝巳 (2020) : ヨーロッパウナギによるクニマス卵の捕食実態調査. 山梨県水産技術センター事業報告書, 47, 48-54.
- 4) 加地弘一・青柳敏裕 (2021) : 西湖における効率的なヨーロッパウナギ捕獲方法の検討. 山梨県水産技術センター事業報告書, 48, 67-75.
- 5) 加地弘一・青柳敏裕 (2022) : 西湖における効率的なヨーロッパウナギ捕獲方法の検討一II. 山梨県水産技術センター事業報告書, 49, 26-33.
- 6) 木南竜平・佐藤孝幸 (2016) : 全雌集団を必要としないさけます類の XX オス作出法. 平成 28 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 244.