

RFLP/SSCP 法を用いたクロマグロ
Thunnus orientalis の mtDNA 多様性解析

○鈴木伸明(西水研石垣)・升間主計(栽培セ宮津)・田邊智唯
(遠洋水研)・青沼佳方(西水研石垣)・張 成年(中央水研)

【目的】クロマグロ (*Thunnus orientalis*) 養殖では、採卵時に、産卵親魚を特定するためミトコンドリア DNA (mtDNA)調節領域を対象に PCR-RFLP 分析が行われているが、ハプロタイプ
の検出感度や作業時間の点で改良の余地がある。より簡便迅速かつ検出感度の高い手法を構築するため、SSCP 法を用いて mtDNA ハプロタイプ変異の検出を試みた。

【方法】mtDNA 調節領域の高度可変領域(約 310 bp)を PCR 法により増幅した。検出感度の向上を図るため、*Bsp*HI により制限酵素処理を施した後、SSCP 分析に供した。アクリルアミドプレキャストゲル電気泳動により得られた RFLP/SSCP 泳動像を画像処理ソフトに取り込み、PC モニター上でハプロタイプの異同を判別した。

【結果】初めに従来の PCR-RFLP 分析により 10 ハプロタイプと判別された卵標本(36 個体)を用いて RFLP/SSCP 分析を行った。ゲル温度 5°C、泳動時間 1 時間の条件で明瞭な泳動像が安定して得られた。約半数の個体において *Bsp*HI による消化断片(約 200 および 110 bp)が確認され、従来法で 10 タイプとされた標本は、本法において 14 ハプロタイプと判定された。次に天然より採集された稚魚標本(3 集団、計 135 個体)に本法を応用したところ、計 129 タイプが検出され($H=0.999$)、十分に高い検出感度が確認された。これらのことから、mtDNA ハプロタイプ判別に RFLP/SSCP 法が有効であると考えられ、産卵モニタリングや天然卵仔稚の多様性評価に応用が期待できる。

