

短 報

PCR-RFLP 分析によるマゴチと
ヨシノゴチの種判別

長富 潔,^{1*} 濃添多恵子,² 常本和伸,¹
原 研治,² 市ノ木 健,¹ 田北 徹,² 石原 忠²

(2000 年 5 月 29 日受付, 2000 年 11 月 27 日受理)

¹長崎大学大学院生産科学研究科, ²長崎大学水産学部

PCR-RFLP analysis of Two Flathead Species of the
Genus *Platycephalus* from the Ariake Sound, Japan

Kiyoshi Osatomi,^{1*} Taeko Nozoe,²

Kazunobu Tsunemoto,¹ Kenji Hara,²

Takeshi Ichinoki,¹ Touru Takita,² Tadashi Ishihara²

¹Graduate School of Science and Technology, Nagasaki
University, Nagasaki 852-8521, ²Faculty of Fisheries,
Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan

キーワード: マゴチ, ヨシノゴチ, PCR-RFLP, ミト
コンドリア DNA

コチ属 *Platycephalus* は, インド洋・西太平洋の温帯
から熱帯域にかけて広く分布する沿岸性魚類である。日
本では, コチ *P. indicus* 1 種のみとされてきた^{1,2)}が, 亀
井は瀬戸内海の西部海域において, 体色が濃暗褐色で,
体背部に 3-10 条の黒色横帯があるマゴチと, 体色がよ
り淡色で, 体背部に明瞭な帯がないヨシノゴチの 2 型
が存在することを明らかにした。³⁾その後, 両者は生態
的にも異なり, 側線有孔鱗数が著しく相違し, 筋肉蛋白
の電気泳動パターンも全く異なっていることから, 明ら
かに別種とみなされている。³⁻⁶⁾

このように成魚の両種については, 形態学的比較及び
アイソザイム分析により, その識別が可能である。しか
し, 幼魚の場合, 両種共に非常に類似しているので形態
で判別するのは難しく, また, 全魚体を試料として用い
るため, 摂餌後の消化物が混入する恐れがありアイソザ
イム分析を用いるのは困難である。

本研究ではマゴチとヨシノゴチの種判別が幼魚期でも
出来るようにすることを目的に, アイソザイム解析より
簡便で, かつ解析能が優れているとされている PCR-
RFLP (restriction fragment length polymorphism, 制限
酵素切断長多型)を試みた。

試料魚としては, 1999 年 5 月に長崎県島原半島沖で
漁獲された体長 398~432 mm のマゴチ 5 尾 (♂ 1, ♀
4) と体長 398~458 mm のヨシノゴチ 6 尾 (♂ 3, ♀ 3)
を用いた。本研究対象である有明海産マゴチとヨシノゴ

チの成魚の体表面と鰭写真を Fig. 1 に示す。粗全 DNA
の抽出は, 通常, 体側筋が用いられるが, 鰭から粗全
DNA を抽出する方が, 個体を傷つけることなく分析す
ることができ有用である。しかしながら, 従来の抽出法
では, 鰭を完全に溶かすのは困難であったため, DNA
抽出キット ISOHAIR (ニッポンジーン社製)を用いた。
その結果, 鰭 3 mg から PCR 10 回分の粗全 DNA が抽
出され, 体長数 cm の幼魚の鰭からの抽出も十分可能で
あることが確認された。

抽出した粗全 DNA を鋳型にマゴチ及びヨシノゴチの
ミトコンドリア DNA (mtDNA) の cytochrome *b* 並び
に 12S rRNA を含んだ領域を PCR 法を用いて増幅し
た。プライマーには, マグロ属の種判別に用いられてい
た 6 プライマー⁷⁾とタラ *Gadus morhua*,⁸⁾ ニジマス *On-
corhynchus mykiss*,⁹⁾ コイ *Cyprinus carpio*¹⁰⁾ の mtDNA
の塩基配列データを参考に設計した 3 プライマー, 即
ち L 鎖側; TAE-L1 (5'-AAC TTA CAC ATG CAA
GTC TCC GC-3'), H 鎖側; TAE-H1 (5'-TCT TTG
TAT GAG AAG TAT GGG TGG AA-3'), TAE-H2 (5'-
TGT TAC GAC TTG CCT CCC CTT-3')を用いた。

PCR は反応液 50 μ L; 95°C 10 分のプレヒートの後,
95°C 1 分, 50°C 1 分, 72°C 45 秒を 40 サイクル, 伸長
反応 72°C 7 分を 1 サイクルのプログラミング温度制御
により行った。その結果, 12S rRNA 領域では今回設計
したプライマー TAE-L1—TAE-H2 により 870 bp 断
片 (12S rRNA 断片) が, cytochrome *b* 領域ではマグ
ロ属の種判別に用いられたプライマー L14838—H15150
により 340 bp の特異的増幅断片 (cyt *b* 断片) が認めら
れた (Fig. 2A)。

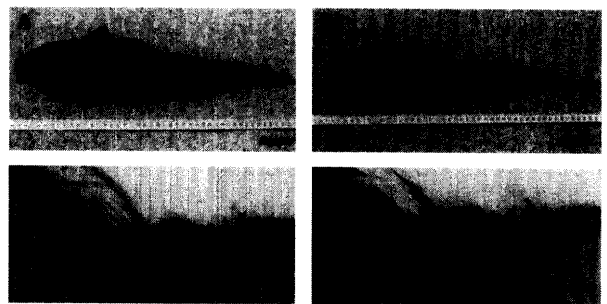


Fig. 1. Dorsal and fin views of two *Platycephalus* species.
A and C: *Platycephalus* sp. I⁵⁾ (Japanese name:
Magochi), SL=432 mm. B and D: *P.* sp. II⁵⁾
(Japanese name: Yoshinogochi), SL=458 mm. Bars
indicate 50 mm (A and B) or 10 mm (C and D).

* Tel: +81-95-847-1111, Fax: +81-95-844-3516, E-mail: osatomi@net.nagasaki-u.ac.jp

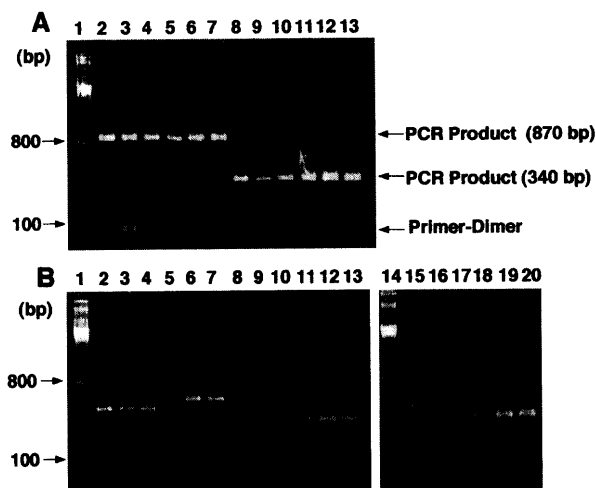


Fig. 2. (A). Patterns of mitochondrial DNA 12S rRNA (Lanes 2-7, primer TAE-L1 and TAE-H2) and cytochrome *b* (Lanes 8-13, primer L14838 and H15150) region of two flathead species *Platycephalus* amplified by PCR method. *Platycephalus* sp. I (Lanes 2-4, 8-10); *Platycephalus* sp. II (Lanes 5-7, 11-13); Lane 1, 100 bp DNA ladder (GIBCO, BRL). (B). Patterns of RFLP in the mitochondrial DNA 12S rRNA (Lanes 2-7) and cytochrome *b* (Lanes 8-20) region of two flathead species *Platycephalus*. *Mse* I digest of PCR product (Lanes 2-13); *Alu* I digest of PCR product (Lanes 15-20); *Platycephalus* sp. I (Lanes 2-4, 8-10, 15-17); *Platycephalus* sp. II (Lanes 5-7, 11-13, 18-20); Lanes 1 and 14, 100 bp DNA ladder (GIBCO, BRL).

次に、増幅産物を9種類の制限酵素 (*Alu* I, *Mse* I, *Hinf* I, *Eco*R I, *Hind* III, *Sma* I, *Sac* II, *Hinc* II, *Xba* I, *Eco*R V) を用いて切断し、2% アガロースゲル電気泳動によってRFLPを検出した。その結果、12S rRNA断片では *Mse* I, *cyt b*断片では *Mse* I, *Alu* Iにより特異的な切断多型が確認され (Fig. 2B), これらのPCR-RFLP分析はマゴチとヨシノゴチの種判別に有効であると考えられた。

マゴチとヨシノゴチは日本近海産のコチ科魚類の中で産業上重要な魚種であるが、資源に減少傾向が見られ、

その適正な資源管理や種苗生産技術の確立が望まれている。¹¹⁾ しかしながら、2種の生態、特に幼魚期の分布と生活様式には不明な点が多く、資源管理方策や種苗放流技術向上のネックとなっている。今回の研究はマゴチとヨシノゴチの幼魚期における種判別に応用が可能である。従って、このような産業重要種の保全を行っていく上で、PCR-RFLP分析は十分に役立つものと考えられる。

文 献

- 1) Jordan DS, Richardson RE. A review of the flatheads, gurnards, and other mail-cheeked fishes of the waters of Japan. *Proc. U. S. Natl. Mus.* 1908; **33**: 629-670.
- 2) Matsubara K, Ochiai A. A revision of the Japanese fishes of the family Platycephalidae (the flatheads). *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* 1955; **68**: 1-10.
- 3) 亀井正法. 日本産コチ属 *Platycephalus* 2型の形態学的ならびに生態学的比較研究. 魚類学雑誌 1969; **16**: 87-88.
- 4) Taniguchi N, Ochiai A, Miyazaki T. Comparative studies of the Japanese platycephalidae fishes by electropherograms of muscle proteins. LDH and MDH. *Jpn. J. Ichthyol.* 1972; **19**: 89-96.
- 5) 増田育司, 篠原宣夫, 小沢貴和. 八代海南部におけるコチ属2種の漁獲量と分布. 日水誌 1991; **57**: 1257-1262.
- 6) 増田育司, 原口美茶江, 小澤貴和, 松井誠一, 林功. 周防灘西部および八代海南部海産コチ属2種の形態学および遺伝生化学的比較. 日水誌 1997; **63**: 345-352.
- 7) Chow S, Inoue S. Intra- and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bull. Nat. Res. Inst. Far Seas Fish.* 1993; **30**: 207-225.
- 8) Johansen S, Bakke I. The complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic cod, *Gadus morhua*: relevance to taxonomic studies among cod-fishes. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1996; **5**: 203-214.
- 9) Zardoya R, Garrido-Pertierra A, Bautista JM. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Mol. Evol.* 1995; **41**: 942-951.
- 10) Chang YS, Huang FI, Lo TB. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* 1994; **38**: 138-155.
- 11) 町田末広, 田代征秋, 中田 実, 池田義弘, 吉田範秋, 桐山隆哉, 松尾輝久. 雲仙岳火山活動影響調査. 平成8年長崎県水産試験場事業報告, 長崎, 1997; 34-42.