

PCR-制限断片多型法を用いたウナギ種簡易 DNA 鑑定

若尾卓成, 疋田雄一, 常吉俊宏
梶 眞壽, 久保田裕明, 久保田隆之

(1997 年 12 月 1 日受付)

A Simple DNA Analysis for Identifying Eel Species by using Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Method

Takashige Wakao,^{*1,*3} Yuichi Hikida,^{*1,*4} Toshihiro Tsuneyoshi,^{*1}
Shinji Kaji,^{*1} Hiroaki Kubota,^{*2} and Takayuki Kubota^{*2}

A simple, rapid, inexpensive and reliable DNA analysis method has been developed for identifying eel species by using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique. Present method is for practical use to prevent the illegal trade of selling glass eels of foreign species as Japanese species (*Anguilla japonica*). Three restriction enzymes were selected to digest recognition sites which are specific only for *A. japonica*. Additional enzymes were used for simple identification of species by comparing a digestion pattern of recognition sites specific for 6 respective species.

キーワード：ウナギ, ウナギ属魚類, ミトコンドリア DNA, 塩基配列, DNA 鑑定, PCR, RFLP

近年, 日本種ウナギ *Anguilla japonica* のシラス捕獲量の減少, ウナギの蒲焼きなどの需要拡大により, 日本種シラスが異常な高値となると共に多量の外国種 (*A. anguilla* など) シラスの輸入が始まっている。

ウナギには日本・アメリカ・欧州・東南アジアなど各地由来の, 3 亜種を含めた 18 種があると言われている。^{1,2)} これらの種を鑑定するため従来, 成鰻では, 脊椎骨数や斑紋の有無, 鋤骨歯帯と上顎骨歯帯の広さの比較, 背鰭基底の長さなどによる判別方法,²⁾ シラスでは, 以前農薬として用いられていたサイオドリンに対する耐性を判定する方法が一般に用いられてきた。³⁾ しかしながらこれらの方法は信頼性が低く, より確度の高い鑑定法の要望が強かった。シラスの形状では, 欧州種の *A. anguilla* はサイオドリン法あるいは魚体の大きさで, おおよそ区別ができるが, その他の種はシラスの段階ではほとんど区別がつかない。このため外国種を日本種と偽ったり, 多量に混入させたりするなどの不正取引により養鰻業者が被害を受けており, 確実に簡易・迅速・安価なウナギ種鑑定法の開発が望まれていた。谷口ら⁴⁻⁶⁾ によるアイソザイムの電気泳動がこれまで一定の成果をあ

げてきたが, より系統的で簡易な鑑定法の確立が急務であった。

一方, 警察機関などにおける, 人の個人識別への DNA 鑑定の実用化など遺伝子工学の発展には著しいものがある。そこで, これらの技術を応用し, 現在までに知られている 7 種のウナギの DNA 塩基配列データ^{7,8)} などを基にして簡易・迅速・安価なウナギ種 DNA 鑑定法の開発を行うことを目的とした。RAPD 法を利用して 3 種のウナギを鑑定する方法が Takagi ら⁹⁾ により最近試みられたが本報告では, より系統的で確実な方法を採用した。鑑定方法としては, 従来からの方法あるいは簡易法によって DNA を抽出し, ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で目的の遺伝子領域を大量にコピーを行う。この PCR 産物を, 各種制限酵素で消化し, 切断断片長の差違を判定する制限断片多型法 (RFLP 法) を用い種を判別した。この方法における, 日本種か否かの判定に対する信頼性を高めるため, 3 重チェックまでを可能にした。更に, 非日本種に対して同法の切断パターンから種の簡易判定を行った。また, RFLP 法で決定した種の学名を特定するために, 直接塩基配列解読法を用い

^{*1} 静岡理科大学 (Shizuoka Institute of Science and Technology, Toyosawa, Fukuroi, Shizuoka 437-8555, Japan).

^{*2} 株式会社 (Atsumi Co. Ltd., Yagyu-cho, Toyohashi, Aichi 441-8041, Japan).

^{*3} 現住所; ホテルフーズコーポレーション (Hotei Foods Corporation, Kanbara-cho, Shizuoka 421-3203, Japan).

^{*4} 現住所; 大日本ビロッド (Dainippon Biroodo Co. Ltd. Goten, Iwata, Shizuoka 438-0078, Japan).

た。

実験方法

材料 供試魚には、シラス捕獲地が日本、アメリカ、インドネシア、オーストラリア、フィリピン、フランス、中国の、シラス、クロコ、成鰻、白焼き、蒲焼きのいずれかを用いた。RFLPに用いた供試魚について、シラスの産地、形態、試料数、試料入手時期、今回のDNA鑑定で判定した学名、塩基配列解読に供した試料の数、などの詳細をTable 1に示した。シラス、クロコ、成鰻は国内で養成したものを冷凍状態で輸送後、あるいは生きたままで輸送されたものを冷凍保存して実験に用いた。白焼き、蒲焼きは、日本国内、中国、フランス、それぞれ由来、および由来不明のシラスから国内・国外で養成され加工されたものを用いた。これらも実験まで冷凍保存を行った。

DNA抽出 それぞれの試料から小指の先程の大きさの薄片を採取し液体窒素で凍結したあと乳鉢ですりつぶし、洗浄バッファー (10 mM トリス・10 mM EDTA・50 mM NaCl 緩衝溶液; pH 8) で洗浄後、消化バッファー (2% SDS+洗浄バッファー) および Proteinase K (10 mg/ml) 40 μ l を加え 56°C で一晩消化した。この消化物からフェノールクロロホルム抽出・エタノール沈殿でDNAを抽出した。

簡易DNA抽出法 試料を細かく切断した後、TE緩衝液 (50 mM トリス・100 mM EDTA・100 mM NaCl) で洗浄し、STE緩衝液 (TE緩衝液+1% SDS) および Proteinase K を加え、組織を 56°C, 30 分で消化した。反応溶液を遠心し上清を採取、98°C で 10 分間加熱して酵素失活のあと、溶液を直接 PCR 試料として用いた。¹⁰⁾

標的DNA 鑑定するために用いた塩基配列はミトコ

Table 1. Specimens of various eels examined

Locality	Condition of specimens	Number of specimens	Sampling date	Species	Number of specimens sequenced
Swan Riv., Maine, USA	Adult	3	Oct. 1995	<i>A. rostrata</i>	1
Pelabuhan Ratu, Java, Indonesia	Adult	4	Oct. 1995	<i>A. celebesensis?</i>	1
Green Riv., Victoria, Australia	Adult, spot*1	1	Jan. 1996	<i>A. reinhardti</i>	1
Green Riv., Victoria, Australia	Adult, no spot*2	1	Jan. 1996	<i>A. australis</i>	1
Ohta Riv., Shizuoka, Japan	Adult	1	Nov. 1995	<i>A. japonica</i>	1
Akabane port, Aichi, Japan	Glass eel	5	Jun. 1996	<i>A. japonica</i>	
Other places, Japan	Glass eel	39	Mar.-Nov. 1997	<i>A. japonica</i>	
Other places, Japan	Young	7	Mar.-Nov. 1997	<i>A. japonica</i>	
Other places, Japan	Adult	14	Mar.-Nov. 1997	<i>A. japonica</i>	
Other places, China	Adult	2	Apr. 1997	<i>A. japonica</i>	
Other places, Japan	Shirayaki*3	3	Jun. 1997	<i>A. japonica</i>	
Other places, Japan	Kabayaki*4	5	Mar.-Nov. 1997	<i>A. japonica</i>	
Unknown place, China	Kabayaki*4	1	Mar. 1997	<i>A. japonica</i>	
Unknown places	Kabayaki*4	4	1996-Dec. 1997	<i>A. japonica</i>	
Magat Riv., Luzon, Philippines	Adult	2	Nov. 1995	<i>A. marmorata</i>	1
Magat Riv., Luzon, Philippines	Young, dried	12	Oct. 1996	<i>A. marmorata</i>	
Other places, Philippines	Adult	2	Mar. 1997	<i>A. marmorata</i>	
Loire Riv., France	Adult	7	Oct. 1995	<i>A. anguilla</i>	1
Loire Riv., France	Glass eel	13	May 1996	<i>A. anguilla</i>	
Other places, France	Glass eel	2	Apr. 1997	<i>A. anguilla</i>	
Other places, France	Young	12	May 1997	<i>A. anguilla</i>	
Other place, France	Adult	1	Jun. 1997	<i>A. anguilla</i>	
Other places, France	Kabayaki*4	2	Mar.-Jun. 1997	<i>A. anguilla</i>	
Unknown places	Kabayaki*4	5	Dec. 1997	<i>A. anguilla</i>	

*1 Adult specimen with black spots on the body.

*2 Adult specimen without black spots on the body.

*3 Plain broiled eel for Japanese style dishes.

*4 Soy broiled eel for Japanese style dishes.

ンドリア DNA (チトクロム b, D ループ, 12SrRNA, 16SrRNA などを含む) のものである。ミトコンドリア DNA は核内 DNA よりも進化速度が速く,¹¹⁾ ミトコンドリア DNA 内においては, 非コード領域の中の D ループはチトクロム b, 12SrRNA, 16SrRNA などより進化速度が速い特徴がある。¹²⁾ しかしながら D ループは, 同一種内でも配列が異なるほど進化速度が速いため,⁷⁾ 今回の種判定にはある程度進化速度の遅いチトクロム b 領域を用いた。

本研究で用いたチトクロム b 遺伝子の 2 つの領域を Fig. 1, Fig. 2 に示した。Fig. 1 は Sang ら⁷⁾ の塩基配列データの一部で, チトクロム b 遺伝子の 3' 末端側 102 塩基とそれに続く 2 つの tRNA の塩基配列部分 (以下, S 領域と呼ぶ) である。Sang らの示した *A. japonica*, *A. marmorata* 以外に我々の出したフィリピン, フランス捕獲の種の配列 (結果の項で後述) も示した。日本種特有の塩基は反転文字で示した 6 箇所にあるが, この内, 制限酵素認識配列に含まれるのは太実線の四角で囲んだ *Sca* I で消化される部分の塩基である。従ってこの領域全体の PCR 産物を *Sca* I で消化すると, 日本種では切断されるが他種では切断されないため, 両者の判別が可能である。Fig. 2 は青山ら⁸⁾ の塩基配列データ部分で, 同遺伝子 5' 末端側 398 塩基 (以下, A 領域と呼ぶ) である。上記と同様に, 日本種特有の塩基は反転文字で示した 6 箇所にある。この内, 制限酵素で切断されるのは *Hinf* I, *Pst* I で消化される太実線の四角で囲んだ部

分である。従って, さらにこれら 2 つの制限酵素により日本種か否かの判別が可能である。また *Mbo* II と *Rsa* I で切断されるべき認識配列が細実線の四角で囲んだ部分に現れ, 種によってパターンが異なるため, PCR 産物が切断されたか否かの組み合わせで種の簡易判別が可能である。

PCR 増幅 上記の領域を増幅するためのプライマーとして, TW8 (5'-TACATTATCATCGGTCAAGTAGCATCA-3') と TW9 (5'-GGTCTAATTTATGATCTCAGCTTT-3'), TW6 (5'-TACGAAAAACCCACCCACTTCT-3') と TW11 (5'-TCCTCATGGAAGTACATATCCTACGACTGC-3'), の各 2 ペアーを用いた。ここでプライマー TW11 の 3' 末端側の 4 番目の塩基は制限酵素 *Pst* I で認識されるために不整合塩基 (C) を導入した。

先述の DNA 試料から, PCR 試薬 (dNTP_{mix}・PCR 緩衝溶液・DNA 合成酵素) と各プライマーペアーを用いて, 95°C-8 分で熱変性後, 94°C-1 分・60°C-1 分・73°C-1 分の熱サイクルを 35 回行い, ミトコンドリア DNA チトクロム b 遺伝子と相同な DNA 断片を作成した。

アガロースゲル電気泳動 PCR 産物の増幅の成否や制限酵素消化の有無をバンドの長さで確認するための簡易方法として, 4% アガロース (タカラ, NuSieve GTG) をゲル材料に用いた電気泳動 (コスモ・バイオ, Mupid-2) を行った。バンドの長さの対照物としては

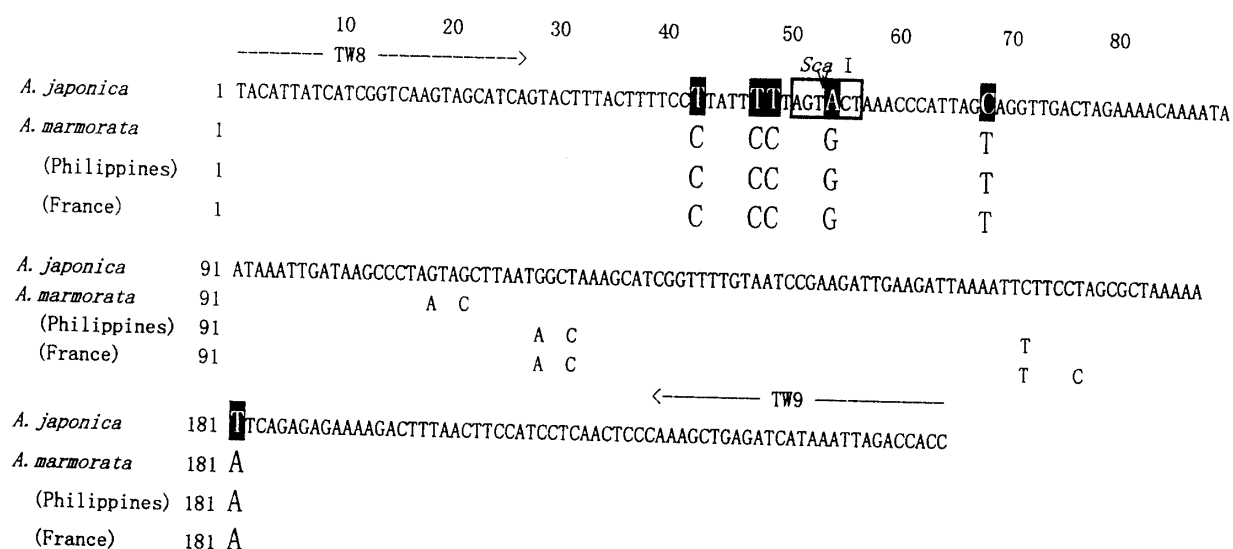


Fig. 1. Sequences of mitochondrial DNA of *A. japonica* and *A. marmorata*⁷⁾ with those of Philippines and French eels we obtained.

Sequences contain the 3'-end of cytochrome b, Thr-tRNA and Pro-tRNA gene region. All nucleotide sequences are shown for *A. japonica* and only different nucleotides from them are shown for other species. TW8 and TW9 show forward and reverse PCR primer's sequence, respectively. Nucleotides specific only for *A. japonica* are shown in reverse characters. Restriction enzyme *Sca* I recognition site sequences, which are also specific only for *A. japonica*, are shown in bold solid square.

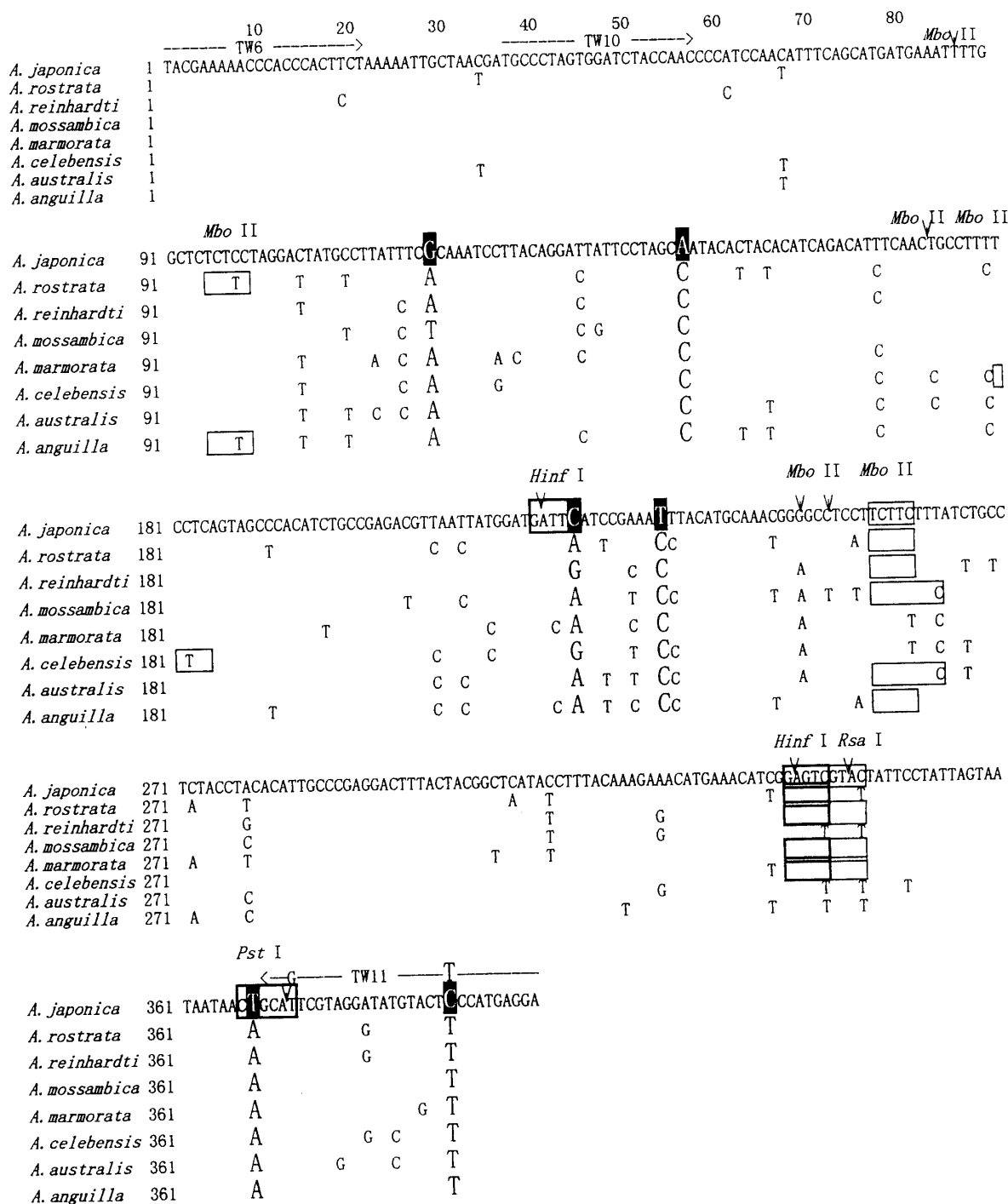


Fig. 2. Sequences of mitochondrial DNA for 8 eel species.⁸⁾ Sequences are from the 5'-end of cytochrome b gene region.

All nucleotide sequences are shown for *A. japonica* and only different nucleotides from them are shown for other species. TW6 and TW11 show forward and reverse PCR primer's sequence, respectively. TW10 shows forward sequencing primer's sequence. Nucleotides specific only for *A. japonica* are shown in reverse characters. Nucleotide sequences of restriction enzyme *Hinf* I and *Pst* I recognition site are shown in bold solid square. TW11 sequence contains an unmatched nucleotide C four nucleotides far from the 3'-end, which is complementary to the nucleotide G in the sense consensus sequence, to produce the *Pst* I recognition site only for *A. japonica* PCR products. *Mbo* II and *Rsa* I recognition site sequences are shown in solid square.

サイズマーカー ϕ X174/*Hae* III 消化物を用いた。

制限酵素消化 PCR産物の生成を上記ゲル上のバンドの長さで確認後、限外ろ過カラム（分画分子量3万、

Millipore UFC3BTK）で精製濃縮した。これらを各種制限酵素（*Hinf* I, *Pst* I, *Sca* I, *Mbo* II, *Rsa* I）と、酵素それぞれに適切な、酵素製造メーカー作成の緩衝液を加

え 37°C, 1 時間で消化した。消化物を, 再びアガロースゲル電気泳動にかけ切断断片長を判定 (RFLP) した。試料としては Table 1 に示した各産地のシラス由来の各形態のウナギすべてを用いた。

シーケンシング 試料の学名を特定するため, A 領域の塩基配列データ部分について PCR 直接シーケンシングにより塩基配列を解読した。試料としては, Table 1 に示したように, 各産地のシラスから養成した成鰻 1 検体ずつ合計 7 検体を用いた。PCR 産物を上記と同じ限外ろ過カラムで精製した後, dNTP_{mix} と蛍光標識 ddNTP およびシーケンシングプライマーとして TW10 (5'-TGCCCTAGTGGATCTACCAAC-3') を用い, 96°C-30 秒・60°C-15 秒・60°C-4 分の 25 サイクル・シーケンシング反応を行った。その後, 産物をフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿で精製し,

DNA シーケンサー (Perkin-Elmer, ABI373A) で解析した。

結 果

日本種の判定 A 領域において制限酵素 *Hinf* I で消化しゲル電気泳動した結果を Fig. 3(a) に示した。電気泳動において市販蒲焼き・日本産 (第 5-6 レーン) は 2 本のバンド (対応すると推定される理論値 (以下同様); 220 塩基長 (bp), 118 bp) を示した。他種では泳動距離の異なる (398 bp または 338 bp) 1 本のバンドを示した。

Pst I で消化した結果 (Fig. 3(b)) でも日本種と他種とでは切断の有無の違いのために泳動距離が異なった (371 bp または 398 bp)。

S 領域においても *Sca* I で消化した結果 (Fig. 3(c))

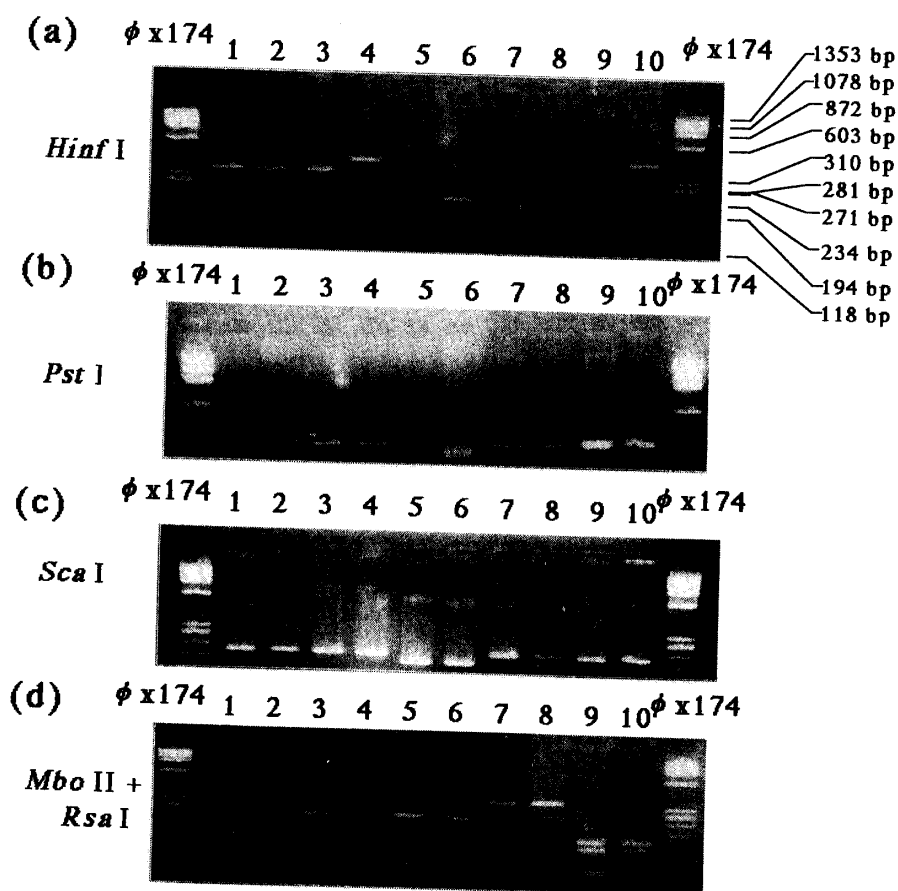


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of restriction enzyme digestion products of PCR amplified mitochondrial DNA from various eel samples.

PCR products are from 398 bp at the 3'-end of cytochrome b gene, with an exception that those of panel (c) are from 102 bp of the 3'-end of cytochrome b gene and following two tRNA genes. Digestions were performed with (a) *Hinf* I, (b) *Pst* I, (c) *Sca* I, and (d) mixture of *Mbo* II and *Rsa* I for eel samples from America (lane 1), Indonesia (lane 2), Australia with spot on the body (lane 3), Australia without spot (lane 4), commercial Kabayaki eel sold in Japan (lane 5), Japan (lane 6), Philippines (lane 7), Philippines dried glass eel (lane 8), France (lane 9), and France glass eel (lane 10). All samples were run with molecular size marker, ϕ X174 DNA *Hae* III digest. The various band sizes of the marker are shown in base pair length (bp) in panel (a).

から日本種と他種とでは, 切断の有無の違いで泳動距離が異なった (194 bp または 218 bp)。

さらに, 入手した 81 検体の日本種ウナギについて上記の *Hinf* I, *Pst* I, *Sca* I の 3 種の制限酵素の内, 2 から 3 の制限酵素を用いた RFLP を行ったところ, 1 つでも矛盾が出る例はなく, 全ての RFLP について日本種のバンドパターンが得られた。また Table 1 にあげた各産地のシラス由来のウナギ試料についても同様の RFLP を行ったところ種内ですべて同一のバンドパターンが得られた。すなわちこれらの制限酵素で消化された認識配列には遺伝的変異が認められなかったことになる。

種の簡易判定 A 領域において制限酵素 *Mbo* II と *Rsa* I の混合物で消化した結果を Fig. 3(d) に示した。インドネシア産以外の 6 地域産の試料については, 各ウナギ種の塩基配列の違いから推定されるバンドパターン (*A. japonica*, *A. reinhardti* (対応すると推定される理論値 (以下同様); 249 bp, 95 bp, 54 bp), *A. rostrata*, *A. anguilla* (162 bp, 149 bp, 87 bp) *A. marmorata* (344 bp, 54 bp) *A. australis* (249 bp, 146 bp)) を反映した結果が得られた。この結果と, *Hinf* I による消化結果 (*A. japonica* (220 bp, 118 bp), *A. rostrata*, *A. reinhardti*, *A. marmorata* (338 bp), *A. australis*, *A. anguilla* (398 bp)) との組み合わせで種を振り分けた。これを Fig. 4 に示す。各産地毎の 1 種類それぞれが独立した形で分ける事ができた。インドネシア産については *A. celebesensis* と想定していたパターンとは異なったが, *Mbo* II と *Rsa* I のバンドパターン (249 bp), および *Hinf* I のバンドパターン (338 bp) の組み合わせが他種とは異なる結果となった。

さらに, 先程と同様に, 入手した 81 検体の日本種ウナギ試料の内 34 検体について *Mbo* II と *Rsa* I の混合物による RFLP を行ったところ, 全てについて 249 bp, 95 bp, 54 bp に対応すると推定される 3 本のバンドパターンが得られた。また Table 1 にあげた各産地のシラス由来のウナギ試料についても種内で同一のバンドパターンが得られた。すなわちこれらの制限酵素で消化された認識配列には遺伝的変異が認められなかったことになる。

学名の特定 Fig. 4 で振り分けた各産地毎のウナギ試料の種について, 更に学名を特定するために, A 領域のシークエンシングを行った。その結果の蛍光スペクトルより, 種によって異なる塩基, 種特有の塩基部分を比較 (Fig. 5) したところ, インドネシア産以外は青山らの同定した, それぞれの種と塩基配列がほぼ一致し, 学名の特定ができた。フィリピン産とフランス産の試料, すなわちここで学名が *A. marmorata* と *A. anguilla* と特定できた試料について 3' 末端側の S 領域の塩基配列

		<i>Hinf</i> I		
		220 bp 118 bp	338 bp	398 bp
<i>Mbo</i> II + <i>Rsa</i> I	249 bp 95 bp	(e) Japan <i>A. japonica</i>	(c) Australia(SP) <i>A. reinhardti</i>	
	249 bp 146 bp		(b) Indonesia <i>A. celebesensis?</i>	(d) Australia(NSP) <i>A. australis</i>
	344 bp		(f) Philippines <i>A. marmorata</i>	
	162 bp 149 bp 87 bp		(a) America <i>A. rostrata</i>	(g) France <i>A. anguilla</i>

Fig. 4. RFLP pattern of various eel samples from 7 different countries.

PCR amplified mitochondrial DNA of 398 bp at the 5'-end of cytochrome b gene were digested with *Hinf* I, *Mbo* II and *Rsa* I. Band length of the digestion products is shown in bp. The names of the species identified in Fig. 5 are also shown in each column.

(a) America <i>A. rostrata</i>	TTTACTCCTTCTCCTCCCTATNTCCCTGACTCCN ***** TTTACTCCTTCTCCTCCCTATATCCCTGACTCCT
(b) Indonesia <i>A. celebesensis</i>	TCTCAGTCCCTTCCCGGTCCACNCCCCAACCTTC ***** TCTCAGTTCCTCCCTCCCTCATGCTCCCACTCTCA
(c) Australia(SP) <i>A. reinhardti</i>	TCTCACTCCCTTCCCTTTATGCCCTCACCTTTG ***** TCTCACTCCCTTCCCTTTATGCCCTCACCTTTG
(d) Australia(NSP) <i>A. australis</i>	TTCCACTTCCTCCCTCCCTATATCCCACTCC ***** TTCCACTTCCTCCCTCCCTATATCCCACTCC
(e) Japan <i>A. japonica</i>	CCTTGCTTACCTTTCCTTTATCCATTNGCCNCCN ***** CCTTGCTTACCTTTCCTTTATCCATTNGCCCTCA
(f) Philippines <i>A. marmorata</i>	TCNCAACCCCTTCCCTTTTGACCCCTCACTCCCT ***** TCNCAACCCCTTCCCTTTTGACCCCTCACTCCCT
(g) France <i>A. anguilla</i>	TTTACTCCTTCTCCTCCCTACATCCCTGACTCCC ***** TTTACTCCTTCTCCTCCCTACATCCCTGACTCCC

Fig. 5. Sequence comparison of mitochondrial cytochrome b gene.

Comparison were performed for selected 35 nucleotides from 191 nucleotides which have variations among 8 species identified by Aoyama *et al.*⁸⁾ to identify species of the present eel samples. Sampling area of each eel and its sequence are shown in the upper part of each column. The name of the species identified by Aoyama *et al.* and its sequence are shown in the lower part of each column. The agreement between two sequences is shown by *. # shows the unknown sequence in this study.

データも求め、Fig. 1 に Sang らのデータとともに示した。

簡易 DNA 抽出法 以上の判定実験をより短時間に行うために、シラスを細かく切断する処理を行う簡易 DNA 抽出法を用い、愛知県渥美半島で採捕された日本種と考えられる 5 匹のシラスを分析した結果を Fig. 6 に示した。*Hinf* I による消化では 2 本のバンド (対応すると推定される理論値 (以下同様) ; 220 bp, 118 bp), *Pst* I による消化では短いバンド (371 bp) が得られたことから、2 重チェックにより、全て *A. japonica* と判定できた。

各形態試料からの種鑑定 本法がどのような形態のウナギ試料まで適用可能かを調べるため、以上の成鰻 (活鰻を冷凍)、シラス (冷凍、乾燥)、蒲焼き以外に、日本種のクロコ (冷凍) 7 検体、白焼き 3 検体、フランス種のクロコ (冷凍) 12 検体についても通常の DNA 抽出法により 2 から 3 種類の RFLP を行った。その結果、両形態についてもすべて、ひとつの異常データもなく日本種、フランス種のそれぞれの判定結果が得られた。

考 察

松井らによる種の分布図¹³⁾によれば、我々の手持ち

の試料の内、解析済みの種はアメリカ付近に生息する *A. rostrata*, フランス付近に生息する *A. anguilla*, 日本・中国・台湾付近に生息する *A. japonica*, フィリピン付近に生息する *A. marmorata*, オーストラリア南東付近に生息する *A. australis*, オーストラリア東岸付近に生息する *A. reinhardtii* の 6 種である。インドネシア産で、青山らの同定した *A. celebesensis* とは相同性が低かった種は、分布図から判断して、インドネシアが多くの種の併存地域であることを考慮すれば、他種の可能性が高いと考えられる。以上の 7 種は現在、公式に流通しているすべての種であることから、実質的にこれら全種の混在を本法で鑑定することが可能であると考えられる。

本法ではシラスの流通段階で最も重要な関心事である、日本種か否かについて、*Hinf* I, *Pst* I, *Sca* I の 3 種の制限酵素を用いて、3 通りの RFLP を行い、すなわち 3 重チェックの信頼性で鑑定ができる。またこれに加え、同じ PCR 産物に別の 2 種類の酵素、*Mbo* II, *Rsa* I を混合して RFLP を行うことにより、試料が何種であるかの簡易判定が可能である。しかしながら上記 6 種以外の未知の種が対象となった場合には、当該種が見かけ上、上記 6 種のいずれかに誤って判定され

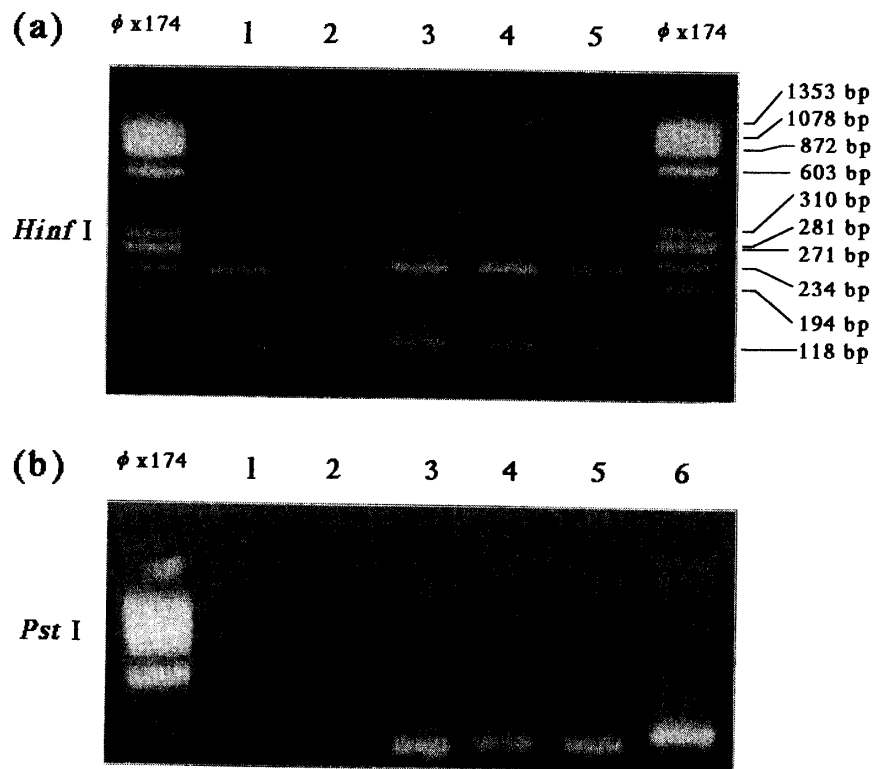


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of RFLP pattern of five Japanese glass eel samples.

PCR amplified mitochondrial DNAs of 398 bp at the 5'-end of cytochrome b gene were digested with (a) *Hinf* I, (b) *Pst* I. Lane 6 of panel (b) was from American eel. All samples were run with molecular size marker, ϕ X174 DNA *Hae* III digest. The various band sizes of the marker are shown in base pair length (bp) in panel (a).

る可能性がある。シークエンシング法を用いれば当該領域のすべての塩基配列を解読し、対照配列との比較を行えば確実に種の判定が行える。しかしこの方法では時間と費用が相当かかることになる。本法では日本種か否かについては3重チェックにより高い信頼性を保ちながら鑑定が可能であるが、種の判定については不確実性が残る。しかしながら、先述のように流通している種は極めて限られているため実用上は充分であると考えられ、本法の特長としての短時間かつ低い試薬コストで簡易に鑑定できるという点が実用に大きく利すると思われる。

本研究で対象とした *A. japonica*, *A. anguilla*, *A. marmorata* 以外の種はサンプル数が少なく、個体変異に由来する種判定の間違ひの可能性が残されている事も事実である。チトクロム b 領域は D ループ領域に比較して進化速度が遅いが、その中で各コドンの第3塩基は第1・2塩基に比べ進化速度が速いと予想される。しかしながら、各地からの81個体の、日本種ウナギと鑑定された試料について行った、日本種か否かの判定のための、*Hinf* I, *Pst* I, *Sca* I の各制限酵素を用いた RFLP 法による2重あるいは3重チェック、さらに *Mbo* II, *Rsa* I の混合物を用いた RFLP による種の判定結果で、1個体も変異が認められなかった。これらの RFLP では日本種でなければ制限酵素認識部位が消失するように設計しているため、この部位の塩基の中にひとつでも変異があれば、上記の4種類の RFLP の内のひとつに異常が出るはずである。これらの部位の中のコドン第3塩基の総数は10である事を考慮すると、日本種では種内の個体のコドン第3塩基では、個体数を掛けた約500塩基について全く変異が見られなかった結果になる。同様の事が他種でも確実に当てはまるかどうかは定かではないが、本法で対象としたチトクロム b 遺伝子では、種間の変異に比べて種内の塩基変異は2桁から3桁ほど少ないと推測される。

実用化の可能性 今回試行した簡易 DNA 抽出法を用いても従来法と同様に種の判別が可能であったことから、同簡易法も充分実用に耐え得る方法であると考えられる。従来法と簡易法での所要時間を比較すると従来法では DNA 抽出を含めて全分析に約3日を要したが、簡易法では約8時間で判別が可能であった。本鑑定法に必要な設備・備品については、大きなところでは PCR 装置が必要であるが、その他はほとんど10万円以下の簡単な備品で済む。従って設備投資金額合計でも200万円程度の設備投資で実験の立ち上げが可能である。また本法の実施担当者としては、必ずしも遺伝子工学実験の経験者である必要はなく、通常範囲内の分析化学実験修得者1人がいれば充分である。1人の担当者が1日に

並行処理できる試料数としては30程度が妥当な数と考えられる。更に設備費や労働力を除いた試薬・消耗品コストについては、シークエンシングを行うと1サンプル約2000円に達したが、本法では約500円と安価に鑑定が可能であった。

アイソザイムの電気泳動法と本法を比較すると、アイソザイム法ではタンパク質の分析にある程度習熟している必要があるが、本法では習熟度は低くても可能であると考えられる。またアイソザイム法において、異なる種でもタンパク質の性質が類似して泳動パターンにあまり差が見られない場合でも、本法では塩基配列の違いを確実に捕えられ、より系統的で確実な鑑定が可能であると考えられる。

さらに RAPD 法と比較すると、RAPD 法では PCR プライマー対から生ずる微妙かつ由来が不明な PCR 産物の存否の再現性が問題になるが、本法では既知の PCR 産物の塩基配列の違いだけに焦点を絞るため、系統的で確実な鑑定が可能であると考えられる。

試料の形態としては、本法はシラス（生、冷凍、乾燥問わず）のみならず、クロコ、成鰻、白焼き、蒲焼きに至る、すべての形状のウナギ試料に適用が可能であった。白焼き、蒲焼きの試料については、本試料のウナギの加工の特性上、新鮮な成鰻から直ちに加熱調理が行われるため、DNA を分解する諸酵素が最初に失活し、DNA の劣化が防止され容易に PCR 増幅が行えたと考えられる。従って、白焼き・蒲焼き等の最終製品に至っても、種の追跡が可能となった。これは形態学的あるいはアイソザイム法による鑑定法等では全く不可能であった領域である。

近年、日本種シラスの捕獲量の減少や最終加工製品である蒲焼き鰻の消費需要量の増加などにより、養鰻業界では原料の日本種シラスの高騰が頭の痛い問題となっている。このような状況下において、シラスの流通段階で日本種シラスと称して極めて安価な外国種シラスを取り出すという不正が多々あると言われている。本法がこのような商取引の現場において、短時間、安価、かつ正確に種を鑑定できる実効力として用いられたり、不正商取引の抑止力として機能することが期待される。

今回用いたチトクロム b 遺伝子内の他の未解読領域や、12S あるいは 16SrRNA などの領域を用いる事により、ウナギ種の鑑定についての信頼性が、より高まると期待される。

文 献

- 1) V. Ege: A revision of the genus *Anguilla* SHAW, a systematic, phylogenetic and geographical study. *Dana Rep.*, **16**, 1-256 (1939).
- 2) 落合 明, 田中 克: 魚類学(下), 第1版, 恒星社厚生

- 閣, 東京, 1986, pp. 555-570.
- 3) 日本水産資源保護協会: ヨーロッパウナギの養殖, 石崎書店, 東京, 1979, pp. 15-20.
 - 4) 谷口順彦, 高橋次郎, 小西芳信: ヨーロッパおよびニホンウナギの生化学的識別法に関する研究. 日本誌, **38**, 627-631 (1972).
 - 5) N. Taniguchi and K. Numachi: Genetic variation of 6-phosphogluconate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, and glutamic-oxaloacetic transaminase in the liver of Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **44**, 1351-1355 (1978).
 - 6) 谷口順彦, 森田敏夫: LDH および MDH のツァイモグラムによるヨーロッパウナギ, アメリカウナギ, およびニホンウナギの識別. 日本誌, **45**, 37-41 (1979).
 - 7) T. K. Sang, H. Y. Chang, C. T. Chen, and C. F. Hui: Population structure of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Mol. Biol. Evol.*, **11**, 250-260 (1994).
 - 8) 青山 潤, 小林敬典, 塚本勝巳: ウナギ属 8 種のミトコンドリア DNA シトクローム b 遺伝子による分子系統樹. 日本誌, **62**, 370-375 (1996).
 - 9) M. Takagi and N. Taniguchi: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis* and *A. bicolor*. *Fisheries Sci.*, **61**, 884-885 (1995).
 - 10) R. Drews, W. N. Drohan, and H. Lubon: Transgene detection in mouse tail digests. *Biotechniques*, **17**, 866-867 (1994).
 - 11) J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller: ワトソン・組換え DNA の分子生物学 (松橋通生ら訳), 第 2 版, 丸善, 東京, 1993, pp. 400-401.
 - 12) 宝来 聰: PCR 法による分子考古学的展開, 蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊 遺伝子増幅 PCR 法, 共立出版, 東京, 1990, pp. 194-199.
 - 13) I. Matsui: Fisheries in Japan, Eel, Japan Marine Products Photo Materials Association, Tokyo, 1977, pp. 213-216.