

“赤魚”のDNA鑑定

石黒直哉*・平林裕一郎**

DNA tests for red rockfish

Naoya Ishiguro*, Yuichiro Hirabayashi**

Abstract: The Japan Agricultural Standard (JAS) law obligates correct labeling of quality representation. However, some food put together in the kind with which close species and appearance were alike does not have the labeling of exact raw materials. In a previous study, we applied DNA analysis to fish fry having white flesh. The result has shown that the DNA analysis is applicable to the identification of fishery processed food. Therefore, in this study we used red rockfish fillets having incorrect labeling of raw materials. The sequence of mitochondrial DNA 16S rRNA and cytochrome b region of red rockfish fillets was investigated. We were able to identify *Sebastes mentella*, *Sebastes altus* and *Sebastes norvegicus*.

Keywords: DNA analysis, mitochondrial DNA, species identification, red rockfish fillets

1. 序論

JAS法の改正により、2000年7月から市販される全ての飲食物品に品質表示が義務づけられた。しかし、一部の食料品では、特定の種（品種）や国産品を好む消費者心理を利用するために、食品表示の偽装が起り問題となっている。また偽装をしているわけではないが、近縁種や見た目が似た種を一まとめにして、白身魚や単にマグロという表記がされているだけで正確な原材料名を記載していない食品もある。

このような食品の中に赤魚と表記されている食品がある。この赤魚とは特定の種の名前ではなく、いくつかの輸入のメヌケ類の流通上の名称として使われている¹⁾。それとは別に、正式和名で、アカウオ (*Ctenopoma microcephalus*) という魚が存在している。本魚種はスズキ目ハゼ科アカウオ属の魚で、日本近海から大西洋にかけて生息している²⁾。また、地方名としてアカウオという名称は使われており、富山県のアコウダイ (*Sebastes matsubarae*) や宮城県釜石のヤナギメバル (*Sebastes itinus*) (宮城、釜石) などは同じメヌケ属であるが、北海道北見の地方名のシワイカナゴ (*Hypoptychus dybouskii*) に至ってはトゲウオ目シワイカナゴ科の魚でこれもまた全く形が異なる魚である²⁾。このように、全く異なる分類群に属し姿かたちが全く違うものもいれば、同じ属に属し区別が難しいものもいる。

*環境生命化学科 **環境生命化学科学生

本研究で取り上げる“赤魚”は、おもにアラスカや北欧から輸入されてスーパーなどの小売店でその名で売られている魚である。アラスカメヌケ (*Sebastes altus*)、チヒロアカウオ (別名オキアカウオ *Sebastes mentella*)、タイセイヨウアカウオ (別名モトアカウオ *Sebastes norvegicus*) の3種のメヌケ属の魚がおもに使用されていることが知られている³⁾。しかし、販売されている赤魚の切り身に明確に表記されているものはほとんどない。また、食味も非常に似ているため、これらの判別を外見・味から判別することは不可能である。そこで本研究のDNA鑑定の対象には、原材料の魚種名が表記されていない、解凍された赤魚の切り身を用いた。

前実験において魚種の表示が明確に表記されていない自身フライのChelex法によるDNAの抽出を用いたDNA鑑定を行い魚種の決定をした。このことから、Chelex法によるDNAの抽出を用いた食品原材料のDNA鑑定は有効であることが証明された⁴⁾。そこで、本研究では、市販されている赤魚の切り身に対しChelex法によるDNAの抽出を行い、塩基配列を決定することにより、使用されている赤魚の判別を行った。

2. 材料と方法

2-1 サンプル

福井県福井市のスーパーマーケットのアピタ、ハーツ、ハニー、ユースの4店舗で販売されているアイスランド産の赤魚の切り身を実験に供した。赤魚の筋肉片を5 %Chelex液中で、95 °Cで15分間ボイルし、DNAを抽出した。

2-2 PCRによるミトコンドリアDNA 16SリボソームRNA遺伝子領域部分配列の増幅

抽出されたDNA試料溶液を鋳型とし、PCR法によりミトコンドリアDNAの16SリボソームRNA遺伝子領域部分配列約570 bpとシトクローム遺伝子領域部分配列約1140bpの増幅をおこなった。プライマーは、ミトコンドリアDNA 16SリボソームRNA遺伝子領域を増幅するために、L2510-16S (5'-CGC CTG TTT ACC AAA AAC AT-3') とH3084-16S (5'-AGA TAG AAA CTG ACC TGG AT-3') を、シトクロームb遺伝子領域を増幅するために、L14733-Glu (5'-AAC CAC CGT TGT TAT TCA AC-3') とH15973-Pro (5'-TTG GGA GTT AGK GGT RRG AGT T-3') を用いた。PCRにはTaKaRa rTaq® (タカラバイオ) を用い、DNA溶液1 µl、プライマー各1 µl (5 pmol/ µl)、10×rTaq® buffer 1 µl、dNTP Mixture (2.5 mM each) 0.8 µl、Takara rTaq® 0.05 µl加え、全量10 µlで以下のプログラムにより反応を行った: 初期変性を94 °Cで2分行い、熱変性94 °C15秒、アニーリング52~60 °C10~20秒、伸長反応72 °C60秒のサイクルを35~45サイクル、その後72 °Cで2分間伸長反応を行い、10 °Cで保存した。PCR反応の後、1 %アガロースゲルを用いて100 V 10~20分間の電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線照射によって目的領域の増幅を確認した。

2-3 塩基配列の決定

増幅が確認出来たPCR産物に対しExoSAP-IT (GEヘルスケアバイオサイエンス) により酵素的

に精製を行った。その後、精製を行ったPCR産物を鋳型とし、BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) と、ミトコンドリアDNA 16SリボソームRNA遺伝子領域部分では、プライマーL2560-16s、H3084-16sを用い、ミトコンドリアDNA cytb遺伝子領域部分ではプライマーL14733-Glu、H15973-Proを用いて塩基配列の決定を行った。反応溶液は、PCR産物を濃度に応じて、1~3 µl、プライマーを0.7 µl、BigDye® Terminator v1.1, 3.1 5×Sequencing Buffer 1.15 µl、BigDyeを0.5 µl加え、全量7 µlとなるように滅菌蒸留水を加えた。反応条件は以下のプログラムにより行った：初期変性を95 °C2分行い、熱変性95 °C30秒、アニーリング50 °C10秒、伸長反応60 °C4分のサイクルを25サイクル、その後10 °Cで保存した。反応終了後、エタノール沈澱法によりシーケンス産物の精製を行った。精製を行ったシーケンス産物をABI PRISM310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によりキャピラリー電気泳動を行い、塩基配列を決定した。

2-4 相同性検索

決定した塩基配列に対し、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) による、DNAデータベース (DDBJ/ EMBL/ GenBank) 内のデータとの比較を行い、赤魚の切り身に使用されている魚種の判別を行った。

3. 結果

シーケンスの結果、それぞれアピタ 559 bp、ハーツ 494 bp、ハニー542bp、ユース 569 bp のミトコンドリア DNA 16S リボソーム RNA 遺伝子領域部分塩基配列を決定できた。それらの塩基配列を比較したところ、3 つのタイプの塩基配列が出てきた。それらを、A: アピタ、B: ハーツ、C: ハニー、ユースとした。それぞれの塩基配列に対し BLAST による相同性検索を行ったところ、A の塩基配列はチヒロアカウオ *Sebastes mentella* (Accession No.DQ678249) の、B の塩基配列はアラスカメヌケ *Sebastes altus* (Accession No.EF446549) の 16S リボソーム RNA 遺伝子領域と 100 %一致した。一方、C の塩基配列はタイセイヨウアカウオ *Sebastes norvegicus* (Accession No.DQ678246) とニシアカウオ *Sebastes viparus* (Accession No.DQ678271) の 2 種が 100 %の確率で出てきた。すなわち、登録されている 16S リボソーム RNA 遺伝子領域の塩基配列が両種で一致しているということである。よって、C の塩基配列をもつ原材料種を特定するためには、16S リボソーム RNA 遺伝子領域で不適であり、ミトコンドリア DNA のなかでもより進化速度の速い別の領域を調べる必要がある。DNA データバンクに登録されている塩基配列を調べた結果、シトクローム b 遺伝子領域において両種間に差異がみられたため、その領域の塩基配列を決定した。その結果、ハニーで販売されている赤魚の切り身からは 1024 bp、ユースのそれからは 919 bp のミトコンドリア DNA cytb 遺伝子領域部分塩基配列を決定することが出来た。それらの塩基配列は同一であった。再度 BLAST による相同性検索を行ったところ、この塩基配列はタイセイヨウアカウオ *Sebastes norvegicus* (Accession No. DQ678452) と 99 %一致した。

4. 考察

本研究の結果、アピタではチヒロアカウオが、ハーツではアラスカメヌケが、ハニーとユースではタイセイヨウアカウオが使用されていることが明らかとなり、同じ地域でも店舗により異なる魚種が使われている実態が明らかとなった。しかしながら、本研究では1店舗1個体のみしか調査していないため、それぞれのスーパーで仕入れ業者が違うためにこのような結果になったのか、業者などは関係がなく、捕獲した時点でこれらの魚種が区別されず混在して売られていたのかは判断できかねる。これは今後、同じ店舗で複数個体を調査する必要がある。本研究で用いたアラスカメヌケなど安価な食品では、地域によるブランドが存在しないが、表示義務がある以上消費者には食品の正確な由来を知る権利がある。また上述したように、もし捕獲した時点で魚種の区別がつかず複数の魚種が混ざっていた場合、特定の種の漁獲量が曖昧になり、複数の中の1種が極端に減少しても気がつかず、絶滅してしまう恐れもあり、多様性保護にも問題が出てくる可能性がある。もちろん、原産地によるブランドが存在する食品についての意図的な産地偽装は問題外であり、その追求手段の開発は急務である。

近年DNAデータベースが充実されつつあり、DNAを用いた食品原材料の鑑定法の開発が行いやすい環境が整いつつある。しかしながら、我々が口にする食品全てを判別出来るまでのデータは蓄積されていない。加工原料として用いられ、消費量の多い種については、DNA塩基配列及びその集団構造の調査は、その原料の産地の把握を可能とすると同時に、循環可能な消費を目的とした計画的な資源消費の指標となると考えられる。多様な食品を網羅するDNAデータベースの構築は、安全な食を安定に供給するにあたり、重要な課題であると考えられる。

引用文献

- 1) 阿部宗明.2003.新顔の魚1970-1995.新泉社
- 2) 中坊徹次. 1993.日本産魚類検索全種の同定.東海大学出版
- 3) 尼岡邦夫,仲谷一宏,矢部衛.1995.北日本魚類大図鑑.北日本海洋センター
- 4) 水野剛志,平林裕一郎,石黒直哉.2010.水産加工食品の原材料のDNA鑑定の有効性.
- 5) Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumer. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- 6) Hyde. J. R., R. D. Vetter.2007. The origin, evolution, and diversification of rockfishes of the genus *Sebastes* (Cuvier). Mol. Phylogenet. Evol. 44: 790-811.

(平成 24 年 3 月 31 日受理)