

# PCR-RFLP 法およびマイクロサテライト DNA マーカーを用いた 信州サーモンの簡易魚種判別

小松典彦・上島 剛・降幡 充・尾崎照遵\*

A simple identification of Shinsyu Salmon in the salmonid fishes, using PCR-RFLP and  
microsatellite DNA markers

Norihiko Komatsu, Go Ueshima, Mitsuru Furihata and Akiyuki Ozaki\*

信州サーモンは、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* 四倍体雌とブラウントラウト *Salmo trutta* 性転換雄の交配によって作出される全雌異質三倍体品種である。現在、長野県を代表する特産品として、県内のマス類養殖業者が主体となって、地域ブランド化を推し進めており、年々その生産量を伸ばしている。本品種は消費者にとって、その外観が他のサケ・マス類とよく似ており、区別が付きにくい。また、フィレーなどに加工された状態では、外観からは他のサケ・マス類と区別することは極めて困難である。したがって、他の安価なサケ・マス類による食品偽装に対して、信州サーモンの魚種判別技術が必要であると考えられる。

近年、産地偽装や品種表示不正などの防止手段として、

遺伝子による判別が行われている。特に缶詰のような加工品など、外観からの判別が困難であるような場合に、このような手法は有効である。例えば、PCR-制限酵素断片長多型法 (以下、PCR-RFLP法) によるサバ属やアジなどの魚種判別技術が開発されている。<sup>1,2)</sup> また、果樹などの農産物の品種判別においては、マイクロサテライト DNA マーカー (以下、MS-DNA マーカー) が利用されている。<sup>3)</sup> これらの方法で着目すべき点は、DNA シークエンサーなどの高価な分析機器等を使用せずとも、比較的簡便に実施できることである。

そこで、本研究では PCR-RFLP 法と MS-DNA マーカーを用いて、安価かつ簡便に種々のサケ・マス類と信州サーモンを判別する技術を開発した。

表1 判別に用いた魚種とその由来および供試した方法

魚種	供試魚の産地	PCR-RFLP法	有用なMS-DNAマーカーの選抜	MS-DNAマーカーによる魚種判別
ニジマス	長野県水産試験場産		○	○
ニジマス	チリ産養殖 (市販品刺身)	○		○
ニジマス三倍体	長野県水産試験場産	○		○
ニジマス四倍体	長野県水産試験場産			○
ブラウントラウト	長野県水産試験場産	○	○	○
タイセイヨウサケ <i>S.salar</i>	ノルウェー産養殖 (市販品刺身)	○		
ベニザケ <i>O.nerka</i>	アメリカ産天然 (市販塩蔵品)	○		
ギンザケ <i>O.kisutchi</i>	チリ産養殖 (市販塩蔵品)	○		
ヤマメ <i>O.mason mason</i>	長野県水産試験場産	○		
アマゴ <i>O.masou ishikawae</i>	長野県産	○		
信州サーモン	長野県水産試験場産	○	○	○
ギンヒカリ <sup>1)</sup>	群馬県産	○		○
魚沼深雪ます <sup>2)</sup>	新潟県産	○		○
ヤシオマス (中禅寺湖系統) <sup>3)</sup>	栃木県産	○		○
ヤシオマス (ドナルドソン系統) <sup>3)</sup>	栃木県産	○		○
絹姫サーモン (イワナ系) <sup>4)</sup>	愛知県産	○		○
絹姫サーモン (アマゴ系) <sup>5)</sup>	愛知県産	○		○

<sup>1)</sup> 3年成熟系ニジマス

<sup>2)</sup> ニジマスとアメマス *Salvelinus leucomaenis leucomaenis* の全雌異質三倍体

<sup>3)</sup> ニジマスの全雌三倍体

<sup>4)</sup> ニジマスとイワナ *S. leucomaenis* の全雌異質三倍体

<sup>5)</sup> ニジマスとアマゴの全雌異質三倍体

材料と方法

供試魚

本研究で供試した魚種を表1に示した。これらのうち、PCR-RFLP法では15種類を、有用なMS-DNAマーカーの選抜では3種類を、MS-DNAマーカーによる判別法では12種類を供試した。

DNAの抽出およびPCR反応液の調製

PCR-RFLP法およびMS-DNAマーカーによる魚種判別では、供試魚の鱗もしくは筋肉組織10 mgから、Puregene Cell and Tissue Kit (Gentra Systems, Pennsylvania, U. S. A.) を用いて、DNAを抽出した。PCR反応液の組成は、終濃度が0.5 unitsのTaKaRa Ex TaqもしくはTaKaRa Ex Taq Hot Start Version (Takara Bio, Shiga, Japan)、1×Ex Taq buffer、0.2 mmol/L dNTP Mixture、0.5 μmol/Lの各プライマーセットとなるよう調製した反応液に1.0 μlの鋳型DNA溶液を添加し、滅菌超純水を加えて全量を20 μlとした。

魚種判別に有用なMS-DNAマーカーの選抜では、供試魚の鱗から、Quick Gene (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いてDNAを抽出した。終濃度が0.025 unitsのTaKaRa Ex Taq (Takara Bio)、1×buffer、0.2 mmol/L dNTP、2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1%BSA、0.05 μmol/Lの蛍光標識したフォワードプライマー、0.5 μmol/Lのリバースプライマーとなるよう調製した反応液6.0 μlに、10 ng/μlの鋳型DNA溶液5.0 μlを添加し、全量を11 μlとした。

PCR-RFLP法

PCR-RFLP法については、Russell *et al.* (2000) の方法<sup>3)</sup>を参考とした。前述のとおりPCR反応溶液を作製し、94℃、5分の変性の後、94℃で40秒、50℃で80秒、72℃で80秒を35サイクル行い、最終伸長を72℃で7分の条件でPCRを行った。なお、プライマーの塩基配列はフォワードプライマーをL14735 (5'-AAAAACCACCGTTGTTATTCACCTA-3')、リバースプライマーをH15149ad (5'-GCICCTCAR AATGAYATTTGTCCTCA-3')とした。

PCR産物を制限酵素Dde I、NlaIII、Sau3A IおよびHae IIIで37℃、1時間処理した後、3%アガロースゲル (Nusieve 3:1 Agerose, Takara Bio) による電気泳動 (100V、1時間) を行い、DNA断片長を比較した。

魚種判別に有用なMS-DNAマーカーの選抜

判別に有用であるMS-DNAマーカーの選抜を行うため、既報のサケ・マス類の33種類のMS-DNAマーカー (表2) のプライマーセットを用いて、PCRを行った。PCR条件については、95℃で5分の変性の後、95℃で30秒、58℃で60秒、72℃で60秒を36サイクル、最終伸長を72℃で10分とした。それらのPCR産物を7 M尿素を含む6%アクリルアミドゲル (PAGE-PLUS Concentrate, AMRESCO, Ohio,

U.S.A.) により電気泳動 (1800V、1.5時間) した。その後、FMBIO III Multi View fluorescence image analyser (Hitachi Solutions, Tokyo, Japan) により泳動像を読み取り、それぞれ比較した。

MS-DNAマーカーによる魚種判別

魚種判別に有用と判定された3つのMS-DNAマーカー (Ssa402UoS、Ssa419UoSおよびOMM1372) についてPCRを実施し、ニジマスと雌親魚とする魚種群と信州サーモンが判別可能か検討した。PCR条件については、95℃で5分の変性の後、95℃で30秒、58℃で60秒、72℃で60秒を36サイクル、最終伸長を72℃で10分とした。プライマーには、Ssa402UoSのフォワードプライマー (5'-GCTTTGGCAATGCATGTGGTAAT-3') およびリバースプライマー (5'-CCTATCCCTGTTGTTGCTGAC-3')、Ssa419UoSのフォワードプライマー (5'-GGTCGTATCGCGTTTCA

表2 有用性の選抜に供したMS-DNAマーカー

MS-DNAマーカー	Accession No. もしくはReference
OMM1020	AF346679
OMM1066	AF346697
OMM1084	AF352754
OMM1148	AY039630
OMM1155	AY039637
OMM1158	AY039640
OMM1168	AF469958
OMM1197	AF469982
OMM1204	AF469989
OMM1209	AF469993
OMM1213	AF469996*
OMM1214	AF469996*
OMM1236	AF470016
OMM1237	AF470017
OMM1294	AF470054
OMM1310	G73550
OMM1315	G73554
OMM1372	BV005159
Omy1011UW	AY518334
Omy13DIAS	AF239030
Ssa402UoS	AJ402719
Ssa403UoS	AJ402720
Ssa408UoS	AJ402725
Ssa413UoS	AJ402730
Ssa417UoS	AJ402734
Ssa418UoS	AJ402735
Ssa419UoS	AJ402736
Ssa4DIAS	私信
Str1INRA	Gharbi, K., and R. Guyonard, Jouy-en-Josas, INRA <sup>3)</sup>
Str4INRA	Gharbi, K., and R. Guyonard, Jouy-en-Josas, INRA <sup>3)</sup>
Str5INRA	Gharbi, K., and R. Guyonard, Jouy-en-Josas, INRA <sup>3)</sup>
Str7INRA	Gharbi, K., and R. Guyonard, Jouy-en-Josas, INRA <sup>3)</sup>
Str11INRA	Gharbi, K., and R. Guyonard, Jouy-en-Josas, INRA <sup>3)</sup>

\* 登録された塩基配列中にOMM1213とOMM1214の2領域を含む。

GGA-3') およびリバースプライマー (5'-TGCTGCAA TAAAGAGATGCTTGTT-3'), OMM1372のフォワードプライマー (5'-CACTTCATGATGCCGAAAGCAG-3') およびリバースプライマー (5'-CCCCATCATGACTC CT TCTAGTT-3') の3セットを用いた。PCR産物は3%アガロースゲル (Agarose HS, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いた電気泳動 (100V, 1時間) により分析した。

結果

PCR-RFLP法による魚種判別

PCRによる増幅産物を制限酵素*Dde* I, *Nla* III, *Sau* 3A I および*Hae* IIIで処理したDNA断片の電気泳動像を図1に示した。

*Dde* Iによる酵素処理では、各魚種のパンドパターンは、ベニザケとニジマスを雌親魚とする魚種のグループ、タイセイヨウサケとブラウントラウトのグループ、ヤマメとアマゴのグループ、ギンザケの4つに分けられた。*Nla* IIIでは、同様にパンドパターンは5つのグループに分けられ、タイセイヨウサケとブラウントラウトのグループ、ヤマメとアマゴのグループ、ニジマスを雌親魚とする魚種のグループ、ベニザケ、ギンザケであった。*Sau* 3A Iでは、4つのグループに分けられ、タイセイヨウサケ、ブラウントラウト、ヤマメおよびアマゴのグループ、ニジマスを雌親魚とする魚種のグループ、ベニザケ、ギン

ザケであった。*Hae* IIIによる酵素処理では、ブラウントラウトとそれ以外の魚種のグループの2つに分けられた。

また、それぞれの制限酵素により得られたDNA断片長は異なっており、酵素間で同一長のDNA断片は得られなかった。

魚種判別に有用なMS-DNAマーカーの選抜

サケ・マス類の33種類のMS-DNAマーカーの電気泳動像を比較した結果、タイプA:ニジマスにPCR産物が認められるMS-DNAマーカー (6種類)、タイプB:ブラウントラウトにPCR産物が認められるMS-DNAマーカー (1種

表3 魚種判別に有用と判定されたMS-DNAマーカーとタイプ

分類のタイプ*	MS-DNAマーカー
A	OMM1148
	OMM1158
	OMM1214
	OMM1294
	OMM1315
	Ssa402UoS
B	Ssa419UoS
C	OMM1372
	Omy13DIAS
	Str7INRA

\* 分類のタイプは、A:ニジマスにPCR産物が認められるMS-DNAマーカー、B:ブラウントラウトにPCR産物が認められるMS-DNAマーカー、C:ニジマスとブラウントラウトに長さの異なるPCR産物が認められるMS-DNAマーカーを示す。

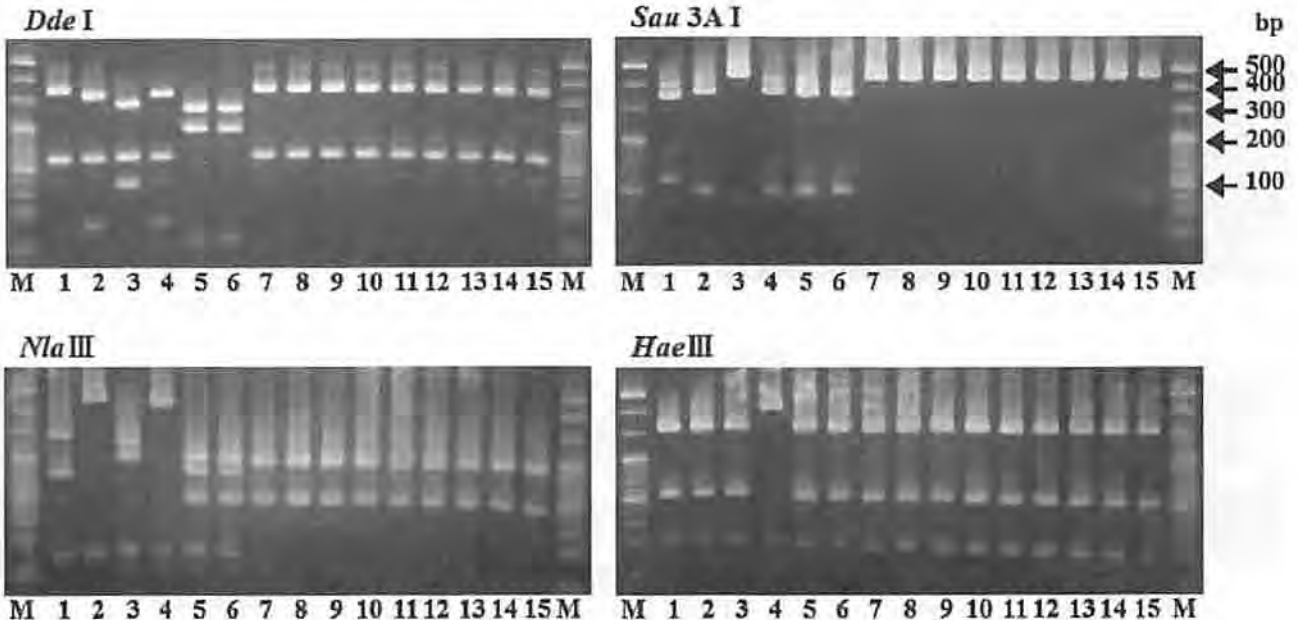


図1 PCR-RFLP法における制限酵素処理後のサケ・マス類のDNA断片の泳動像

1:ベニザケ、2:タイセイヨウサケ、3:ギンザケ、4:ブラウントラウト、5:ヤマメ、6:アマゴ、7:ニジマス (チリ産)、8:ギンヒカリ、9:ニジマス三倍体、10:ヤシオマス (中禅寺湖系)、11:ヤシオマス (ドナルドソン系)、12:魚沼深雪ます、13:絹姫サーモン (イワナ系)、14:絹姫サーモン (アマゴ系)、15:信州サーモン、M: 20 bp DNA Ladder

類)、タイプC:両者でPCR産物が認められるが、互いに長さが異なるMS-DNAマーカー(3種類)の3タイプに分類可能であった(表3)。それ以外のMS-DNAマーカーについては、バンドが得られない、あるいはバンドが多数認められて分析が煩雑となるため、判定に有用ではなかった。

これら3タイプのMS-DNAマーカーのうち、通常用いられる低分解能の電気泳動装置においても判定が容易に行えるものとして、タイプA: Ssa402UoS、タイプB: Ssa419UoS、タイプC: OMM1372を選抜した。

**MS-DNAマーカーによる魚種判別**

Ssa402UoSについては、信州サーモンで160-200 bp付近にバンドが確認できた(図2上段)。ニジマス、ギンヒカリ、ニジマス三倍体、ヤシオマス、魚沼深雪ます、絹姫サーモン(イワナ系)は160-200 bp付近にバンドが確認でき、信州サーモンとよく似たパターンであった。Ssa419UoSでは、信州サーモンとブラウントラウトで550 bp付近に同一と考えられるバンドが確認できた(図2中段)。魚沼深雪ますと絹姫サーモン(イワナ系)にもバン

ドは認められるものの、長さが290-320 bp付近であり、明らかに信州サーモンおよびブラウントラウトと異なるものであった。その他の魚種ではバンドは認められなかった。OMM1372では、信州サーモンに190 bp付近と220-240 bp付近にバンドが確認できた(図2下段)。ニジマス、ギンヒカリ、魚沼深雪ますは190 bp付近に、ヤシオマスと絹姫サーモン(イワナ系)は190 bp付近と210 bp付近に、絹姫サーモン(アマゴ系)では190 bp付近と220 bp付近、ブラウントラウトでは220 bp付近にバンドが確認できた。信州サーモンの190 bp付近のバンドはニジマスと、220 bp付近のバンドはブラウントラウトとそれぞれ同一のバンドと考えられた。

**考 察**

PCR-RFLP法では、制限酵素の種類毎に得られるDNA断片のパターンはそれぞれ異なることから、一つの酵素で同一のDNA断片パターンを示す魚種間であっても、複数の酵素を組み合わせるにより、魚種を判別することが可能となる。本研究では、ブラウントラウト以外の全ての魚種で同一のDNA断片パターンを示すHaeIIIを除いた3種類の制限酵素を併用することで、ニジマスを雌親魚とする魚種群とその他のサケ・マス類(ベニザケ、タイセイヨウサケ、ギンザケ、ブラウントラウト、ヤマメおよびアマゴ)とに大別することが可能であった。本研究の目的である信州サーモンの判別においては、PCR-RFLP法だけでは不十分であることも分かった。

そこで、ニジマスを雌親魚とする魚種群から信州サーモンを判別することを目的として、既報のMS-DNAマーカーを用いた魚種判別が可能であるか検討した。信州サーモンは、ニジマスとブラウントラウトの交雑種であることから、両者の遺伝子を持っている。<sup>6)</sup>したがって、前述のタイプA、タイプBおよびタイプCのMS-DNAマーカーの条件をすべて満たす魚種が高確率で信州サーモンと判定できると予想される。そこで、低分解能の泳動装置でも解析が容易なものとして、タイプAのSsa402UoS、タイプBのSsa419UoS、タイプCのOMM1372を選抜し、ニジマスを雌親魚とする魚種の判別を行った。その結果、前述の条件に合致するものは、信州サーモンのみであり、ニジマスを雌親魚とする魚種群の中から、信州サーモンを判別することが可能であることが示された。アガロース電気泳動は安価であり、分析にかかる時間や労力が少ないという利点があるが、分解能が比較的 low、バンドが判別しにくいこともある。大量のサンプルを簡易判別した際に、このような疑陽性のサンプルがあった場合にはアクリルアミド電気泳動による確定検査を実施することで解決が可能と考える。

以上より、PCR-RFLP法とMS-DNAマーカーによる魚種判別技法の併用することで、比較的簡易かつ安価に信州サーモンとその他のサケ・マス類との判別が可能であ

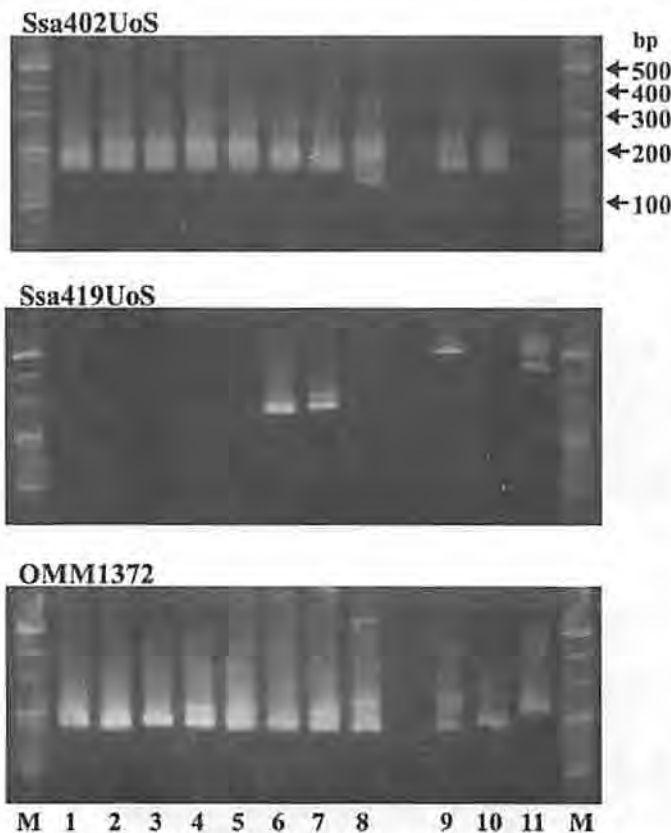


図2 ニジマスを雌親魚とする魚種のMS-DNAマーカーの泳動像

1:ニジマス(チリ産)、2:ギンヒカリ、3:ニジマス三倍体、4:ヤシオマス(中禅寺湖系統)、5:ヤシオマス(ドナルドソン系統)、6:魚沼深雪ます、7:絹姫サーモン(イワナ系)、8:絹姫サーモン(アマゴ系)、9:信州サーモン、10:ニジマス(長野水試産)、11:ブラウントラウト、M: 20 bp DNA Ladder

ることが示された。

### 要 約

1. 信州サーモンと他のサケ・マス類を判別するために、PCR-RFLP法およびMS-DNAマーカーによる魚種判別法の有用性を検討した。
2. *Dde* I、*Nla* III、*Sau*3A I の3つの制限酵素を用いたPCR-RFLP法により、信州サーモンを含むニジマスを雌親魚とする魚種群とその他のサケ・マス類に大別することが出来た。
3. ニジマスを雌親魚とする魚種群の中から信州サーモンを判別するため、3つのMS-DNAマーカー、*Ssa*402UoS、*Ssa*419UoSおよびOMM1372によるPCR産物長のパターンを比較したところ、信州サーモンを簡易的に判別することが可能であった。
4. 上記の2つの遺伝子工学的手法を併用することで、17種類のサケ・マス類から信州サーモンを判別することが可能であった。

### 文 献

- 1) サバ属魚類の魚種判別マニュアル。(独)農林水産消費安全技術センターおよび(独)水産総合研究センター, 2007; 1-14
- 2) サバ属魚類の魚種判別マニュアル。(独)農林水産消費安全技術センターおよび(独)水産総合研究センター, 2007; 1-15
- 3) Kimura T., Shi Y. Z., Shoda M., Kotobuki K., Matsuta N., Hayashi T., Ban Y., Yamamoto T. Identification of Asian Pear Varieties by SSR Analysis. *Breeding Science* 2002; **52**: 115-121.
- 4) Russell J. V., Hold G. L., Pryde S. E., Rehbein H., Quinteiro J., Rey-Mendez M., Sotele C. G., Pérez-Martin R. I., Santos A. T., Rosa C. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *J. Agric. Food Chem.* 2000; **48**: 2184-2188.
- 5) Gharbi K., Gautier A., Danzmann R. G., Gharbi S., Sakamoto T., Hoyheim B., Taggart J. B., Cairney M., Powell R., Krieg F., Okamoto N., Ferguson M. M., Holm L., Guyomard R. A Linkage Map for Brown Trout (*Salmo trutta*) : Chromosome Homeologies and Comparative Genome Organization With Other Salmonid Fish. *Genetics* 2006; **172**: 2405-2419.
- 6) 小原昌和, 傳田郁夫, 染色体操作による異質三倍体品種「信州サーモン」の開発. 水産育種 2008; **37**: 61-66