

フグ鑑別における RAPD 法応用の可能性

○棚橋高志 田中 豊 山田貞二
原田明郎 佐藤猛男

1 はじめに

フグは強力な毒を持ち、冬場には毎年食中毒が発生している。国や自治体ではフグによる食中毒を防止するため様々な規制を設けている。その規制の中で食用となる種類・部位が定められ、また有毒部位を取り除いた「身欠きフグ」やフグ加工品には原料フグの種類を表示することとされている。しかし、フグによる食中毒の際は、加工・調理された残品が少ないため種の特定は極めて困難である。また、身欠きフグやフグ加工品は鑑別の用に供する部位（皮、ヒレ等）が除去されているため、目視検査では原料フグの特定ができない。そこで今回、種の確認方法として多用されている遺伝子検査のうち、PCR(Polymerase Chain Reaction)法の一つである RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)法を用いて、増幅遺伝子断片を比較することにより、フグの鑑別を試みたのでその概要を報告する。

2 実験方法

(1) 試料

丸フグ 8 種類：トラフグ、シロサバフグ、クロサバフグ、マフグ、ナシフグ、ヒガンフグ、コモンフグ、ゴマフグ

身欠きフグ 2 種類：検体 No1（表示シロサバフグ）、
検体 No2（表示トラフグ）

フグ加工品 3 種類：検体 No3 フグ刺身（表示トラフグ）、
検体 No4 フグ一夜干し（表示シロサバフグ）
検体 No5 フグみりん干し（表示シロサバフグ）

その他 2 種類：検体 No6 むきアンコウ、検体 No7 むきハギ（ウマヅラハギ）
上記の筋肉部分を各 25mg 秤取し、試料とした。

(2) 試薬・機器等

DNA 抽出キット：QIAGEN 社 DNeasy Tissue Kit

PCR キット：Amersham Biosciences 社 Ready-To-Go RAPD Analysis Kit

サーマルサイクラー：Applied Biosystems 社 GeneAmp PCR System 9700

電気泳動装置：アドバンス社 Mupid

ゲルイメージ解析装置：アトー(株)プリントグラフ AE-6920V-CX

(3) DNA 試料液の調製

DNA 抽出キットの説明書に従い、DNA 試料原液を調製し、DNA 濃度が 10ng/ μ L となるよう各原液に水を加えて希釈し DNA 試料液とした。

(4) PCR

①プライマー

PCR キットの下記 6 種類のプライマーを使用した。

プライマー 1 : 5' -d[GGTGC GGGAA]-3'、プライマー 2 : 5' -d[GTTTCGCTCC]-3'

プライマー 3 : 5' -d[GTAGACCCGT]-3'、プライマー 4 : 5' -d[AAGAGCCCGT]-3'

プライマー5 : 5' -d[AACGCGCAAC]-3'、プライマー6 : 5' -d[CCCGTCAGCA]-3'

②PCR 条件

RAPD Analysis beads、5pmol/ μ L の各プライマー5 μ L、10ng/ μ LDNA 試料液 5 μ L 及び水 15 μ L を PCR 用チューブに加えて混和し、以下の条件で PCR 反応を行った。

95°C 5 分 \rightarrow (95°C 1 分 \rightarrow 36°C 1 分 \rightarrow 72°C 2 分) \times 45 回 \rightarrow 4°C

(5) 電気泳動及び解析

PCR 反応液 5 μ L にローディング緩衝液 1 μ L を加え混和後、3%アガロースゲル (0.5 g/mL エチジウムブロミド含有) の well に注入し、TAE 緩衝液中で 100V 定電圧電気泳動を行った。泳動を終了後、直ちにゲルイメージ解析装置を用いて UV 照射により、電気泳動パターンを確認した。また、プライマーの違いによる PCR 産物を解析装置付属の処理ソフト (アトー(株)Lane&Spot Analyzer ver. 6) で解析した。

3 結果及び考察

(1) 丸フグの PCR 産物の解析

各プライマーごとに得られた PCR 産物を電気泳動し、得られた泳動パターンを図に示した。また、画像処理ソフトを利用して、各バンドの泳動距離を算出し、これと 100bpDNA ラダーの泳動距離との比較により、各バンドの長さ (bp 単位) を推定した。丸フグについて特徴的なバンドを表 1 にまとめた。

各プライマーによる増幅バンドを解析した結果、どのプライマーにおいても、全てのフグに共通するバンドは見られなかった。しかし、各プライマー で数種類のフグに共

通するバンドが見られた。すなわち、プライマー1 では 345bp、プライマー2 では 500bp、プライマー3 では 330bp、プライマー4 では 380 と 420bp、プライマー5 では 640 と 480bp、プライマー6 では 360 と 300bp の各バンドであった。

各フグの特徴的なバンドについて、トラフグでは、何れのプライマーにおいても 1,000bp 前後にバンドがあり、他のフグと容易に区別できた。特にプライマー3、5、6 で輝度の強いバンドがあった。

シロサバフグとクロサバフグはプライマー3、4、6 で明確に異なるバンドが観察されたことから、これらのバンドによって両フグを、またその他のプライマーの比較により他のフグとの区別をすることができた。

マフグ、ナシフグ、ヒガンフグ、コモンフグは同じようなバンドパターンを示していた。しかし、プライマー3 で 830、440、330bp の 3 本のバンドの有無によりこれら 4 種のフグを区別できた。また、プライマー1 の 550、470bp のバンドによりナシフグとヒガンフグが区別できた。プライマー2 のヒガンフグの 600bp やプライマー4 のナシフグに 420bp がいないことなどもこれらのフグの区別に役立った。

ゴマフグは、プライマー3 の 930、830bp やプライマー4 で 380bp がいないことなどにより、他のフグと区別できた。

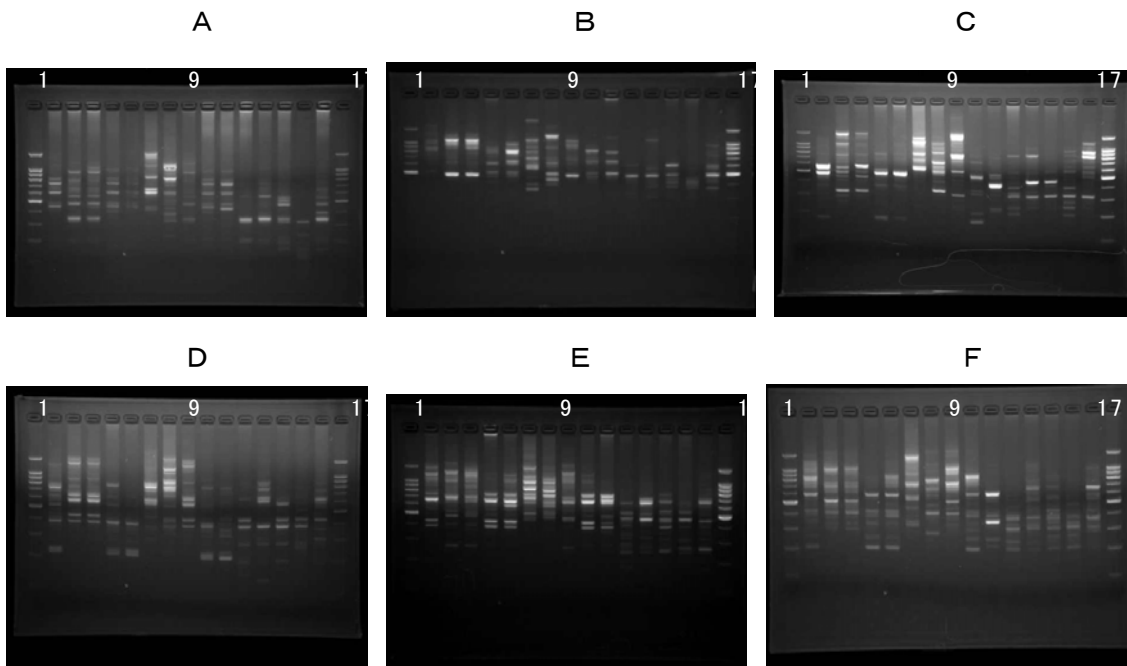


図 6 種プライマーによる PCR 産物の電気泳動

A: プライマー1、B: プライマー2、C: プライマー3、D: プライマー4、E: プライマー5、F: プライマー6

各レーンは全ての画像に同じ。左からレーン 1: 100bpDNA ladder, レーン 2: 検体 No1, レーン 3: 検体 No2, レーン 4: 検体 No3, レーン 5: 検体 No4, レーン 6: 検体 No5, レーン 7: 検体 No6, レーン 8: 検体 No7, レーン 9: トラフグ, レーン 10: シロサバフグ, レーン 11: クロサバフグ, レーン 12: マフグ, レーン 13: ナシフグ, レーン 14: ヒガンフグ, レーン 15: コモンフグ, レーン 16: ゴマフグ, レーン 17: 100bpDNA ladder

表 1 丸フグの特徴的な PCR 産物

| プライマー | トラフグ | シロサバフグ | クロサバフグ | マフグ | ナシフグ | ヒガンフグ | コモンフグ | ゴマフグ |
|-------|------|--------|--------|-----|------|-------|-------|------|
| 1 | 940 | 720 | 720 | 345 | 550 | 500 | 320 | 470 |
| | 470 | 600 | 600 | | 345 | 470 | | 390 |
| | 345 | 440 | 420 | | | 345 | | 345 |
| 2 | 1000 | 800 | 800 | 490 | 1100 | 600 | 420 | 600 |
| | 900 | 600 | 600 | | 490 | 500 | | 500 |
| | 480 | 500 | 500 | | | 440 | | 370 |
| 3 | 1500 | 490 | 500 | 830 | 830 | 440 | 390 | 1200 |
| | 750 | 160 | 390 | 380 | 440 | 330 | 330 | 930 |
| | 500 | | | 330 | 330 | | 250 | 830 |
| | 330 | | | | | | | 330 |
| 4 | 1500 | 750 | 210 | 420 | 750 | 560 | 420 | 600 |
| | 600 | 380 | | 380 | 600 | 420 | 380 | 420 |
| | 560 | 210 | | | 380 | 380 | | |
| | 420 | | | | | | | |
| | 380 | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1300 | 740 | 740 | 640 | 640 | 640 | 480 | 640 |
| 5 | 690 | 640 | 640 | 480 | 480 | 480 | | 480 |
| | 480 | 420 | 420 | | | 420 | | 260 |
| | | 380 | 380 | | | 260 | | |
| | 1000 | 820 | 580 | 360 | 640 | 420 | 360 | 650 |
| 6 | 700 | 580 | 330 | 300 | 360 | 360 | 300 | 360 |
| | 500 | 400 | | 230 | 300 | 300 | 200 | 300 |
| | 400 | 210 | | 210 | | | | |

※単位：ベースペア (bp)

(2) 身欠きフグ等の PCR 産物の解析

身欠きフグ等検体 No1~7 の特徴的なバンドについて、その結果を表 2 に示した。

検体 1~5 ではどのプライマーでも表示のフグとほぼ同じバンドパターンを示していた。しかし、プライマー3 では、表示フグのバンド以外に検体 1 に 560bp や検体 2、3 に 1000、560、450bp のバンドが見られた。特に検体 1 の 560bp は輝度が強いが、表示のシロサバフグには見られなかった。検体 1 のフグで DNA 塩基対の一部が標準として用いたシロサバフグと異なり、その部分がプライマー3 と相同性があったため PCR で増幅されたと思われる。検体 6、7 は各プライマーで 500bp から 1500bp で複数のバンドがあり、今回用いた 8 種類のフグと全く異なるバンドパターンを示した。

表 2 身欠きフグ等の特徴的な PCR 産物

| プライマー | 検体 No2 | 検体 No3 | トラフグ | 検体 No1 | 検体 No4 | 検体 No5 | シロサバフグ | 検体 No6 | 検体 No7 |
|-------|-----------|--------|------|-------------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | (トラフグの表示) | | | (シロサバフグの表示) | | | | (アンコウ) | (ウマヅラハギ) |
| 1 | 940 | 940 | 940 | 720 | 720 | 720 | 720 | 1500 | 1100 |
| | 470 | 470 | 470 | 600 | 600 | 600 | 600 | 850 | 810 |
| | 345 | 345 | 345 | 440 | 440 | 440 | 440 | 645 | 600 |
| | | | | | | | | 600 | |
| 2 | 1000 | 1000 | 1000 | - | - | 900 | - | 1000 | 1200 |
| | - | - | 900 | 800 | 800 | 800 | 800 | 800 | 600 |
| | 480 | 480 | 480 | - | 600 | 600 | 600 | 630 | 500 |
| | | | | - | 500 | 500 | 500 | 530 | 410 |
| | | | | | | | 330 | | |
| 3 | 1500 | 1500 | 1500 | 560 | - | - | - | 1300 | 800 |
| | 1000 | - | - | 490 | 490 | 490 | 490 | 1200 | 600 |
| | 750 | - | 750 | 160 | 160 | 160 | 160 | 750 | 500 |
| | 560 | 560 | - | | | | | 560 | 330 |
| | 500 | 500 | 500 | | | | | | |
| | - | 450 | - | | | | | | |
| | 330 | 330 | 330 | | | | | | |
| 4 | 1500 | 1500 | 1500 | 750 | 750 | - | 750 | 750 | 1200 |
| | 600 | 600 | 600 | 380 | 380 | 380 | 380 | 560 | 820 |

| | | | | | | | | |
|---|------|------|------|------|-----|-----|-----|------|
| | 560 | 560 | 560 | 210 | 210 | 210 | 210 | 750 |
| | 420 | 420 | 420 | | | | | |
| | 380 | 380 | 380 | | | | | |
| | 1300 | 1300 | 1300 | 1200 | - | - | - | 1000 |
| | 690 | 690 | 690 | 740 | 740 | 740 | 740 | 850 |
| 5 | 480 | - | 480 | 640 | 640 | 640 | 640 | 680 |
| | | | | - | - | 580 | - | 500 |
| | | | | 420 | 420 | 420 | 420 | 600 |
| | | | | 380 | 380 | 380 | 380 | |
| | 1000 | 1000 | 1000 | 820 | - | 820 | 820 | 1400 |
| 6 | 700 | 700 | 700 | 580 | 580 | 580 | 580 | 700 |
| | 500 | 500 | 500 | - | 400 | 400 | 400 | 550 |
| | 400 | 400 | 400 | 210 | 210 | 210 | 210 | 300 |

※単位：ベースペア(bp)

4 まとめ

PCR法の一つであるRAPD法を用いてフグの鑑別を行った。6種類のプライマーを用いて8種類のフグのバンドを比較したところ、同一のバンドパターンを示すプライマーもあったが、各フグをほぼ区別できた。また、身欠きフグやフグ加工品を同様に測定したところ、表示のフグとほぼ同じパターンを示し、表示にあやまりがないことが確認できた。フグ以外の魚種ではフグと全く異なるパターンを示し、フグと明確に区別できた。

今回用いた6種類のプライマーの中でプライマー3が8種類のフグの鑑別に有効だった。

しかし、検体で表示フグと異なるパターンを示すものがあったため、6種プライマーにより鑑別する必要がある。

今回試みた検査法は試薬の調整がほとんどいらず、短期間に結果が得られることから、フグの筋肉を用いた種類鑑別に有効な方法であり、種類不明フグによる食中毒の際にも種の特定に利用できると思われる。

(平成15年度尾西地区保健所等食品衛生監視員研修会)