

リアルタイムPCRによるクエおよびアブラボウズ判別法の開発

門間 公夫^{a,b}, 牛山 博文^b, 井部 明広^{c,d}

クエおよびアブラボウズを迅速に判別するため、リアルタイムPCR法を開発した。新規に設計したクエおよびアブラボウズ用のプライマー、プローブを用い、Threshold lineを0.20に設定し、クエについてはCt値が35以下、アブラボウズについてはCt値が39以下での増幅の観察を行うことにより、これらを判別できた。開発したリアルタイムPCR法の特異性を確認するために10魚種（サワラ、マダラ、スズキ、アカカマス、ヒラメ、マハタ、コノシロ、マカジキ、シロアマダイおよびカワハギ）について、本法で試験を行ったところ、これらの魚種では非特異的な増幅は見られなかった。また、試料を加熱することによる影響を調べたところ、沸騰水中で15分間加熱した試料においても、クエおよびアブラボウズを検出することができた。これらの結果より、本法はクエおよびアブラボウズを判別するための有用な試験法であると考えられた。

キーワード: クエ, アブラボウズ, リアルタイムPCR, 判別

はじめに

ハタ科のクエ (*Epinephelus bruneus*) は太平洋側では房総半島以南、日本海側では新潟県以南の主に西日本沿岸に生息し、体長60 cmから100 cmほどに成長する魚で、刺身や鍋料理の食材として高値で取引されている¹⁻³⁾。一方、ギンダラ科のアブラボウズ (*Erilepis zonifer*) は伊豆半島 (相模湾) 以北の北太平洋からベーリング海にかけての深海の岩礁域に生息し、体長60 cmから100 cmほどに成長する魚で筋肉中にグリセリドを多く含み、多量に摂食すると下痢等の健康被害を起こす場合があるが、一部地域では食用とされ流通している^{1,3-5)}。2008年には、アブラボウズを高級魚のクエと偽り販売を行った事件が発生し、消費者の食品に対する信頼を揺るがせた。これを受け、農林水産省は流通業界、漁業関係者、市場関係者及び都道府県あてにアブラボウズの名称表示適正化のために依頼文書を発出した⁶⁾。このような偽装事件を防ぎ消費者の食品に対する信頼を確保するためには、日常的な監視を行い、偽装を防ぐことが重要となる。

クエ (Photo 1.) とアブラボウズ (Photo 2.) は外観から判別することは可能であるが、切り身等に加工された状態では判別を行うことは困難である。したがって、外観が不明な場合にはウナギ、タイ、マグロ等の魚種判別法として報告のあるPCR-RFLP法⁷⁻⁹⁾ やDNAシーケンサーによる塩基配列の比較を行う方法¹⁰⁾ 等で判別する必要がある。しかし、これらの方法でクエとアブラボウズの判別を行った報告はなされていない。またこれらの方法はやや操作が煩雑である。そこで、クエとアブラボウズを短時間で判別するために、辛子めんたいこの魚卵や家畜の肉種の判別法として報告されているリアルタイムPCR法^{11,12)} を用いてクエとアブラボウズを判別する方法の検討を行なったので以下、報告する。

実験方法

1. 試料

陽性試料としてクエ2尾、アブラボウズ2尾、特異性確認用試料としてサワラ、マダラ、スズキ、アカカマス、ヒ



Photo 1. Kue (*Epinephelus bruneus*), Sample NO. 1



Photo 2. Aburabouzu (*Erilepis zonifer*), Sample NO. 3

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 当時：東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

^c 当時：東京都健康安全研究センター食品化学部

^d 現所属：実践女子大学生活科学部食生活科学科
191-8510 東京都日野市大坂上 4-1-1

Table 1. List of Fish Samples Used in This Study

NO.	Fish species	Japanese name	Length (cm)	Weight (kg)	Fishing location
1	<i>Epinephelus bruneus</i>	Kue	56	2.6	Fukuoka
2	<i>Epinephelus bruneus</i>	Kue	65	3.6	Nagasaki Amakusa
3	<i>Erilepis zonifer</i>	Aburabouzu	70	8.3	Tokyo Izu-Ohshima
4	<i>Erilepis zonifer</i>	Aburabouzu	81	10.0	Chiba Katsuura
5	<i>Scomberomorus niphonius</i>	Sawara	72	3.1	Kyoto
6	<i>Pagrus major</i>	Madara	59	2.6	Miyagi
7	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Suzuki	70	2.3	Chiba
8	<i>Sphyrnaea pinguis</i>	Aka-kamasu	27	0.12	Kyoto
9	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Hirame	48	1.4	Korea
10	<i>Hyporthodus septemfasciatus</i>	Mahata	45	1.5	Mie
11	<i>Konosirus punctatus</i>	Konoshiro	23	0.17	Chiba
12	<i>Kajikia audax</i>	Makajiki	150	54.4	Pacific Ocean
13	<i>Branchiostegus albus</i>	Shiro-amadai	52	2.3	Yamaguchi
14	<i>Stephanolepis cirrhifer</i>	Kawahagi	20	0.29	Kanagawa

ラメ, マハタ, コノシロ, マカジキ, シロアマダイおよびカワハギ各1尾を実験に供した (Table 1). これらの魚種の筋肉部を, DNAの抽出を行うまで-80°Cの冷凍庫で保存した.

2. 試薬

1) **プライマーおよびプローブ** クエとアブラボウズの16S rRNA遺伝子の塩基配列をDDBJが公開しているマルチプルアライメントツールのClustalWを用いて比較を行い, これら魚種に特異的なプライマー対 (クエ用TKUE-F11/TKUE-R11, アブラボウズ用TABB-F12/TABB-R11) とMGBプローブ (クエ用TKUE-P, アブラボウズ用TABB-P) の設計を行った. Table 2に本研究に用いたプライマーおよびプローブの塩基配列を示した. また, Fig.1にプライマーおよびプローブ位置の模式図を示した.

2) **その他の試薬** 試薬特級品または分子生物学用を用いた.

3. 装置

遠心機: ラボ用冷却遠心機3617型 (久保田商事製), 分光光度計: Ultraspec 3300 pro (アマシャムファルマシアバイオテク社製), サーマルサイクラー: GeneAmp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ社製), DNAシーケンサー: ABI PRISM 310 (アプライドバイオシステムズ社製), リアルタイムPCR装置: ABI PRISM™ 7900HT (アプライドバイオシステムズ社製), 電気泳動装置: Mupid-2Plus (アドバンス社製), UV照射装置: NTM-15 (UVP社製), ポラロイドカメラ DL-300L (フナコシ製).

4. DNAの抽出

DNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン社製) を用いてキット添付の操作手順書に従って試料 (筋肉部) 25 mgよりDNAの抽出を行った. なお, クエ (NO. 1) およびアブラ

Table 2. List of Primers and MGB Probes Used in This Study

Target	Primer or probe name	Specificity	Sequence (5' → 3')	Amplicon	Reference
16S RNA coding region	16sar-L	16S	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	618 bp	14)
	16sbr-H	16S	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT		
Kue (<i>Epinephelus bruneus</i>)	TKUE-F11	16S/sense	GACACTAAAGCAGATCAGCA	148 bp	This study
	TKUE-R11	16S/antisense	CTGTCACTCTTGGTTGTGAAT		
	TKUE-P	16S/sense probe	(FAM)-CGCGGAGAAATATAAAA-(NFQ)(MGB)		
Aburabouzu (<i>Erilepis zonifer</i>)	TABB-F12	16S/sense	AAATTGATCTTCCCGTGCAG	139 bp	This study
	TABB-R11	16S/antisense	CAAAGACATTCGGGCAGGC		
	TABB-P	16S/sense probe	(FAM)-TTAACACCCCCTTAATAC-(NFQ)(MGB)		

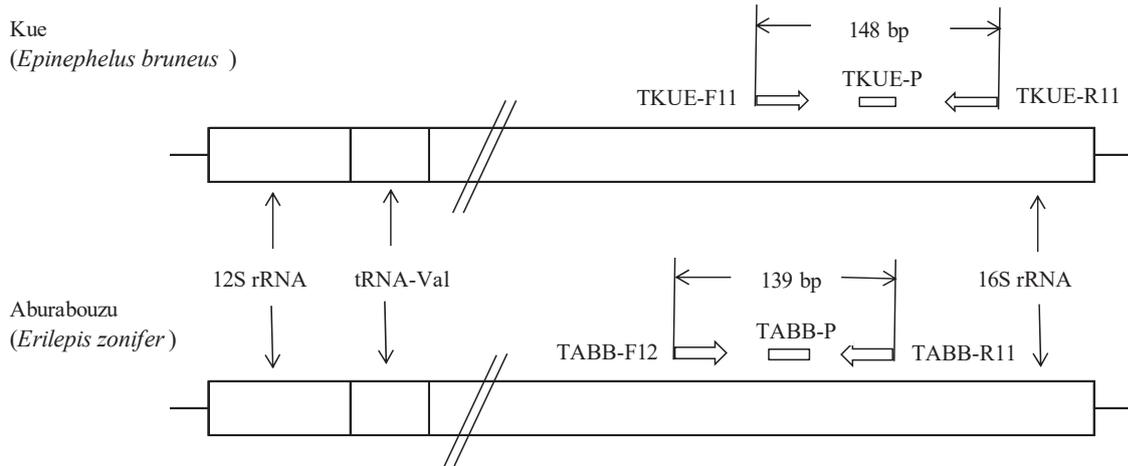


Fig. 1. Schematic Diagram of PCR Primer Pairs and MGB Probe Designed for Discrimination of Kue (*Epinephelus bruneus*) and Aburabouzu (*Erilepis zonifer*)

ボウズ (NO. 3) については、試料1 gを沸騰精製水中で15分間加熱処理をした筋肉部25 mgからもDNAの抽出を行った。各試料から抽出したDNAは波長260 nmの吸光度を分光光度計で測定し濃度を算出後に実験に供した。

5. PCR

1) 単一PCR条件 PCR反応液は、最終濃度が1×PCR緩衝液 (2 mmol/L MgCl₂含有), 0.2 mmol/L dNTPs, 0.5 μmol/Lのフォワードプライマー, リバースプライマーおよび反応液25 μL当たり1.0 unitsのDNAポリメラーゼ (Takara EX Taq), 12.5 ngの抽出DNAを含有するように調製した。PCRは、熱変性 (98°C 10秒間), アニーリング (60°C 30秒間), 伸長反応 (72°C 1分間) を1サイクル

として40サイクルの増幅反応を行った。

2) リアルタイムPCR条件 PCR反応液は1wellあたり, TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5 μL, 50 μmol/Lのフォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ0.14 μL, 10 μmol/LのTaqMan MGBプローブ0.5 μL, 25 ngの抽出DNAを加えた後, 水で25 μLになるように調製した。PCRは, 50°C 2分間保持, 95°C 10分間加温後, 95°C 30秒, 59°C 1分間を1サイクルとして9600エミュレーションモードで45サイクルの増幅反応を行った。データ解析の際はリアルタイムPCRを用いた魚卵の判別法¹²⁾および安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査法¹³⁾の例を参考にThreshold lineを0.20に設定した。

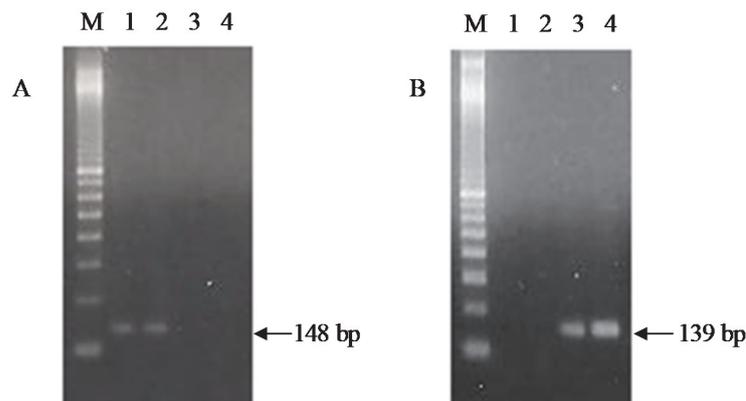


Fig. 2. Agarose Gel Electrophoresis of PCR Amplified Products with Newly Developed Primer Pairs for Kue (*Epinephelus bruneus*) and Aburabouzu (*Erilepis zonifer*)

A: PCR was carried out with primer set (TKUE-F11/TKUE-R11) for Kue
 B: PCR was carried out with primer set (TABB-F12/TABB-R11) for Aburabouzu
 M: 100 bp Ladder, Lane 1: Kue (NO. 1), Lane 2: Kue (NO. 2),
 Lane 3: Aburabouzu (NO. 3), Lane 4: Aburabouzu (NO. 4)

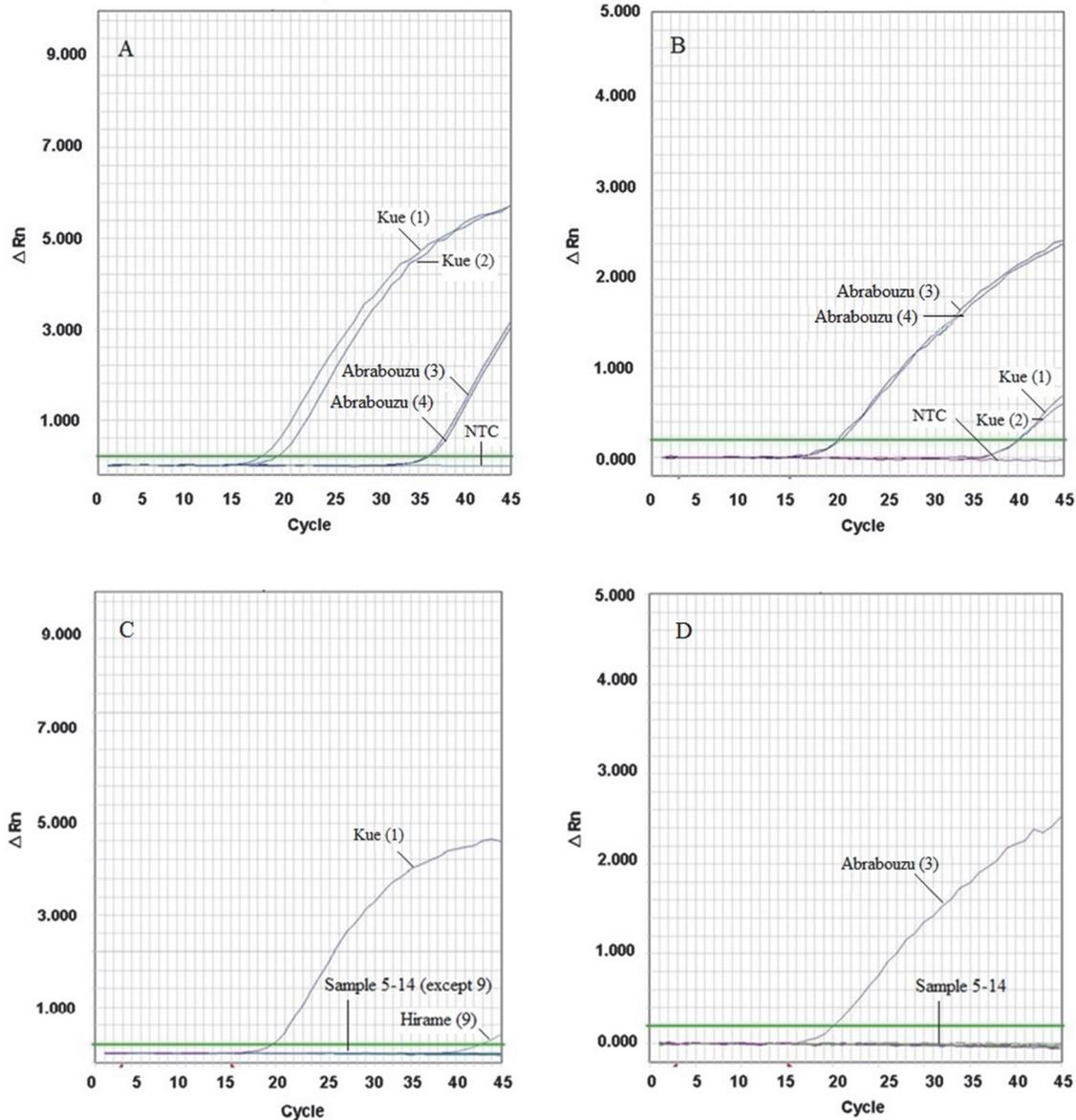


Fig. 3. Amplification Curves of Real-Time PCR Detection for Kue (*Epinephelus bruneus*), Aburabouzu (*Erilepis zonifer*) and Various Fish Samples

A and C, Samples were tested with primer set (TKUE-F11/TKUE-R11) and probe (TKUE-P) for kue. B and D, Samples were tested with primer set (TABB-F12/TABB-R11) and probe (TABB-P) for aburabouzu. NTC, no-template control. The sample number of kue, aburabouzu and hirame are indicated in parentheses. C and D, Specificity of primer and probe for kue and aburabouzu was investigated using varies fish samples. The fish samples used for this experiment are shown in Table 1. Threshold lines were set at 0.20.

結果および考察

1. 陽性試料の塩基配列の確認

実験に供したクエおよびアブラボウズ各2尾について多種の生物においてミトコンドリアDNA中の16S rRNA遺伝子領域を増幅するプライマー対 (16sar-L/16sb-H)¹⁴⁾を用いてPCRを実施した。得られたPCR産物についてダイレクトシーケンズを行い、NBCCのBlastにより相同性検索を行ったところ、試料番号1および2のクエはデータベースに登録されているクエ (Accession No. KP009977, JN603832,

JQ518290, FJ594964, DQ067303) と100%の配列相同性を示した。また、試料番号3および4のアブラボウズは (Accession No. KP682335) と100%の配列相同性を示した (データ省略)。これらの結果より実験に供したクエおよびアブラボウズは、それぞれ陽性試料として適切であることが確認された。

2. プライマーの特異性

新規に設計したプライマーの特異性を確認するため、ク

エ用のプライマー対TKUE-F11/TKUE-R11およびアブラボウズ用のプライマー対TABB-F12/TABB-R11を用いて、クエおよびアブラボウズから抽出したDNAを鋳型としてPCRを行った。その結果、クエ用プライマーを用いたPCRでは、鋳型がクエ抽出DNAの場合に予想される増幅長148 bpのバンドが出現したが、アブラボウズから抽出したDNAを鋳型にした場合はバンドが出現しなかった(Fig. 2 A)。一方、アブラボウズ用プライマー対を用いたPCRでは、鋳型がアブラボウズ抽出DNAの場合に予想される増幅長139 bpのバンドが出現したが、クエ抽出DNAを鋳型にした場合はバンドが出現しなかった(Fig. 2 B)。これらによりプライマー対TKUE-F11/TKUE-R11およびプライマー対TABB-F12/TABB-R11を用いPCRを行うことによりクエとアブラボウズの判別が行える可能性が示唆された。

3. リアルタイムPCRによるクエおよびアブラボウズの判別

クエおよびアブラボウズ各2尾から抽出したDNAについて、プライマー対TKUE-F11/TKUE-R11およびプローブTKUE-Pならびにプライマー対TABB-F12/TABB-R11およびプローブTABB-Pを用いリアルタイムPCRを行った。その結果、クエ用のプライマー対とプローブを用いた系の場合、クエではNO. 1が17サイクル、NO. 2が18サイクルで、アブラボウズではNO. 3およびNO. 4ともに34サイクルで増幅曲線の立ち上がりが見られ、サイクル数の増加とともに ΔRn 値は増加した(Fig. 3 A)。Threshold line 0.20におけるクエのCt値はNO. 1で17.91、NO. 2で19.62、アブラボウズのCt値はNO. 3が36.23、NO. 4が35.92であった。

一方、アブラボウズ用のプライマー対とプローブを用いた場合、アブラボウズではNO. 3およびNO. 4の2試料とも18サイクルで、クエではNO. 1およびNO. 2の2試料とも38サイクルで増幅曲線の立ち上がりが見られた(Fig. 3 B)。Ct値は、アブラボウズではNO. 3が20.22、NO. 4が20.64、クエではNO. 1で40.09、NO. 2で40.19、であった。これらの結果より、Threshold lineが0.20において、クエの場合はCt値が35以下、アブラボウズの場合はCt値が39以下の場合に検出されたと判定することが適切と考えられた。

なお、鍋調理で加熱した試料からの判別の可否を検討するため、未加熱と沸騰精製水中で15分間の加熱処理を行ったクエ(NO. 1)およびアブラボウズ(NO. 3)から抽出したDNAを鋳型にてリアルタイムPCRを行い比較した(データ省略)。その結果、クエではCt値は未加熱の場合は22.90、加熱処理を行った場合は28.55であり加熱処理を行った場合にCt値が大きくなった。また、アブラボウズではCt値は未加熱の場合は22.10、加熱処理を行った場合は26.86であり、クエと同様に加熱処理を行った場合にCt値が大きくなった。しかし、クエの検出基準であるCt値35、およびアブラボウズの検出基準であるCt値39よりは明らかに小さいCt値であり、増幅曲線も明確に観察された。キノコおよび有毒植物においては鍋調理を想定して煮沸による

加熱を行った試料からもDNAが検出されることが報告されている^{15,16)}。これらと本結果より、鍋調理で加熱をした試料においても本法を用いることによりクエとアブラボウズの判別を行えることが明らかとなった。

4. リアルタイムPCRの特異性の確認

クエを検出対象する場合はクエのNO. 1を陽性対照として、アブラボウズを検出対象とする場合は、NO. 3を陽性対照として、Table 1に示した10魚種についてリアルタイムPCRを行い特異性を確認した。その結果、クエを検出対象とする系では、ヒラメにおいて40サイクルで立ち上がりが見られ、Threshold line 0.20におけるCt値は42.85であったが、その他の魚種では増幅曲線の立ち上がりは見られなかった(Fig. 3 C)。前述のクエの判別において、Ct値が35以下である場合に、検出されたと判定することが適切であることが示唆されたため、この判定基準を適応するとヒラメは不検出と判定される。

一方、アブラボウズを検出する系では、10魚種すべてにおいて増幅曲線の立ち上がりは見られなかった(Fig. 3 D)。

これらの結果より、本研究で新規に設計したプライマーおよびプローブを用いることにより迅速に特異性の高いクエおよびアブラボウズ用の判別が行えるものと考えられた。

今後はクエとアブラボウズの判別を効率的、経済的に実施するため、リアルタイムマルチプレックスPCR法の検討を行いたい。

ま と め

クエとアブラボウズの判別を行う目的でリアルタイムPCRを開発した。新規に設計したプライマーとプローブを用いることによりこれらを判別することができた。また、特異性を確認するため10魚種について調べたところ、特異性が確認できた。さらに、加熱による影響を調べたところ15分間煮沸した試料においても判別が可能であった。

文 献

- 1) 阿部宗明：原色魚類大図鑑，1987，北隆館，東京。
- 2) 蒲原稔治，岡林 収：原色日本海水魚図鑑 (I)，1985，保育社，大阪。
- 3) 日本アソシエーツ編：魚介類2.5万名大辞典，2008，日本アソシエーツ，東京。
- 4) 蒲原稔治，岡林 収：原色日本海水魚図鑑(II)，1985，保育社，大阪
原稔治，岡林 収：原色日本海水魚図鑑 (I)，1985，保育社，大阪。
- 5) 厚生労働省：自然毒のリスクプロファイル 魚類 異常脂質，
https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_08.html (2020年7月1日現在。なお本URLは変更ま

- たは消滅の可能性がある)
- 6) 農林水産省総合食料局流通課長, 農林水産省・安全局表示・規格課長, 水産庁魚政部加工流通課長: 19消安第14742号, アブラボウズの名称表示の適正化のための協力依頼について, 平成20年3月19日
<https://www.maff.go.jp/j/jas/kansi/attach/pdf/index-1.pdf>
(2020年7月1日現在. なお本URLは変更または消滅の可能性がある)
 - 7) Chow, S and Inoue, S. : *Bull. Nat. Res. Inst. Far Seas Fish.*, **30**, 207-224, 1993.
 - 8) Chow, S., Nohara, K., Tanabe, T., *et al.*: *Bull. Fish. Res. Agen.*, **8**, 1-14, 2003.
 - 9) 若尾卓成, 疋田雄一, 常吉俊宏, 他: 日水誌, **65**, 391-399, 1999.
 - 10) Aoyama, J., Mochioka, N., Otake, S. *et al.*: *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **188**, 193, 1999.
 - 11) Tanabe, S., Hase, M., Yano, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol Biochem.*, **71**, 3131-3135, 2007.
 - 12) 鶴田小百合, 坂本智徳, 赤木浩, 他: 食衛誌, **51**(3), 110-114, 2010.
 - 13) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長: 食安発1116第3号, 安全性未審査の組換えDNA技術応用食品の検査方法について, 平成24年11月16日
 - 14) Palumbi, SR, Martin, A., Romano, S. *et al.*: *The Simple Fool's Guide to PCR*, Version 2.0. Deptment of Zoology and Kewalo Marin Laboratory, University of Hawaii, Honolulu, HI, 1991.
 - 15) 昌山 敦, 村上太郎, 佐久間大輔, 他: 食衛誌, **53**, 237-242, 2012.
 - 16) 門間公夫, 大石充男: 東京健安研七年報, **68**, 109-115, 2017.

**Development of Real-time PCR for Discrimination of Kue (*Epinephelus bruneus*) and
Aburabouzu (*Erilepis zonifer*)**

Kimio MONMA^a, Hirofumi USHIYAMA^b and Akihiro IBE^{b,c}

We developed a real-time PCR to quickly discriminate between kue (*Epinephelus bruneus*) and aburabouzu (*Erilepis zonifer*) in fish fillets. Kue and aburabouzu were first discriminated by performing a real-time PCR using newly designed primer pairs and probes specific to each species. Then, a threshold line was set at 0.20. Amplification was observed at Ct values less than 35 for kue and Ct values less than 39 for aburabouzu. Next, we tested the specificity of our real-time PCR using 10 fish samples, namely sawara, madara, suzuki, akakamasu, hirame, mahata, konosiro, makajiki, siroamadai and kawahagi: we did not observed amplification curves for these samples. Furthermore, the expected amplification curves were detected from samples of kue and aburabouzu, after having been soaked in boiling water for 15 minutes. These initial data suggest that the developed real-time PCR may be a useful tool for discriminating between kue and aburabouzu.

Keywords: kue, *Epinephelus bruneus*, aburabouzu, *Erilepis zonifer*, real-time PCR, discrimination

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjyuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out

^c Present Address: Jissen Women's University,
4-1-1, Osakaue, Hino Tokyo 191-8510, Japan