

マルチプレックスPCRによる5種ウナギの判別法

門間 公夫^{ab}, 大石 充男^b, 牛山 博文^c

ウナギのかば焼きや白焼きから原料ウナギを判別するため、5種のウナギ（ニホンウナギ、ヨーロッパウナギ、バイカラウナギ、アメリカウナギ及びオーストラリアウナギ）を対象にマルチプレックスPCR法の検討を行った。ウナギのミトコンドリアDNAのD-Loop領域に設計した種特異的プライマーを用いリアルタイムPCRを行うことにより、これらウナギの判別が可能となった。開発したリアルタイムPCR法は迅速で経済的に5種のウナギを判別するための有用なツールになるものと考えられた。

キーワード：マルチプレックスPCR, 判別, ウナギ, ニホンウナギ, ヨーロッパウナギ, バイカラウナギ, アメリカウナギ, オーストラリアウナギ

はじめに

平成18年に改正された「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律」（改正JAS法）により水産加工品の生産地表示が義務化された。しかし、中国で養殖されたヨーロッパウナギ（*Anguilla anguilla*）を原料とした蒲焼を国産と偽り表示を行った事例等の不正事件が頻発し、食品表示に対する消費者の信頼を揺るがせた。これを受け水産庁はウナギ表示の適正化を図るため、業界団体宛に消費者への正確な情報を提供するため、ウナギ在来種である*A. japonica*及び当該種を使用したウナギ加工品の原材料名についてはニホンウナギと表示することを推奨する旨の通知を発出した²⁾。

ヨーロッパウナギは大西洋沿岸やヨーロッパの河川、湖沼に分布するが、中国ではヨーロッパウナギの稚魚を種苗として輸入し、養殖している地域もある。一方、ニホンウナギ（*A. japonica*）は、日本、中国、台湾、韓国などにかけて分布し、これらの国々で養殖されている。

近年、日本ではウナギ稚魚の不漁によりニホンウナギの養殖が困難になりつつある。またヨーロッパウナギも乱獲が原因と考えられる資源の減少により国際取引が規制さ

れている³⁻⁵⁾。このため、これまで日本ではほとんど流通していなかった外国産ウナギの利用が始まっている。オーストラリア産のオーストラリアウナギ（*A. australis*）は現地で漁獲後、空輸された天然活鰻がかば焼きにされ販売されている。マダガスカル産のモザンビークウナギ（*A. mossambica*）も一時期かば焼き用に輸入されていた。インドネシアで養殖されたバイカラウナギ（*A. bicolor*）は、かば焼きに加工され、一部小売店で販売されている。北アメリカから南アメリカ北東部にかけての淡水や河口域の広範囲に分布するアメリカウナギ（*A. rostrata*）は中国で養殖されたウナギがかば焼きとして輸入されている。ニホンウナギのシラスの漁獲量が減少し、これら外国産ウナギの輸入量が増加すると産地や種名を偽って高価な国産のニホンウナギとして販売される可能性も考えられる。

そこで、ウナギ原産国の適正表示が行われているか否かの判断材料を得る目的で、現在、国内で流通している可能性があり試料が入手できた5種ウナギ（ニホンウナギ、オーストラリアウナギ、バイカラウナギ、ヨーロッパウナギ、アメリカウナギ）を対象にマルチプレックスPCRによる判別法の検討を行ったので、以下報告する。

Table 1. List of Samples Used in This Study

No.	Species ^{a)}	Production area	Remark
1	<i>Anguilla japonica</i>	Kagoshima	Kabayaki, Purchased in Online store
2	<i>Anguilla australis</i>	Tasmania	Shirayaki, Purchased in Online store
3	<i>Anguilla bicolor</i>	Indonesia	Kabayaki, Purchased in Supermarket
4	<i>Anguilla anguilla</i>	China	Kabayaki, Purchased in Online store
5	<i>Anguilla rostrata</i>	China	Kabayaki, Purchased in Online store

a): The species were identified by sequencing extracted DNA from Kabayaki or Shirayaki

^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

Table 2. List of Primers for *Anguilla* spp. mtDNA D-Loop Region in This Study

Primer name	Species	Sequence	Amplicon (bp)
TEAA-DF2	<i>Anguilla anguilla</i>	5'-ACCAAGACATACATAATACATTACG-3'	104
TEAA-DR5		5'-CATAGGAATATGGGGATGATAG-3'	
TEAB-F3	<i>Anguilla bicolor</i>	5'-TGTGGGACACCTTTAAGAG-3'	160
TEAB-R5		5'-GAGATCTTAATATTACTTGGATTAGG-3'	
TEAR-F4	<i>Anguilla rostrata</i>	5'-CTATTTTCAGTTCCCCACG-3'	208
TEAR-R6		5'-CATGAAATAATACATTATGTTCTACCC-3'	
TEAAU-2F2	<i>Anguilla australis</i>	5'-GGTAGAACATTATGTATTGCTCAC-3'	258
TEAAU-2R1		5'-ATGTATTGTTTGTGTTTAGTTTGC-3'	
TEAJD2-F1	<i>Anguilla japonica</i>	5'-TTACCCACCAAGCCGG-3'	333
TEAJD2-R1		5'-GTATGTGCTTCTTTCGACTTTG-3'	

実験方法

1. 試料

通信販売とスーパーマーケットで購入した国産、中国産、オーストラリア産またはインドネシア産のウナギを原料とするウナギかば焼きまたは白焼きの筋肉部を試料に用い実験に供した (Table 1) . これらの試料は、実験に使用するまで-80°Cの冷凍庫で保存した.

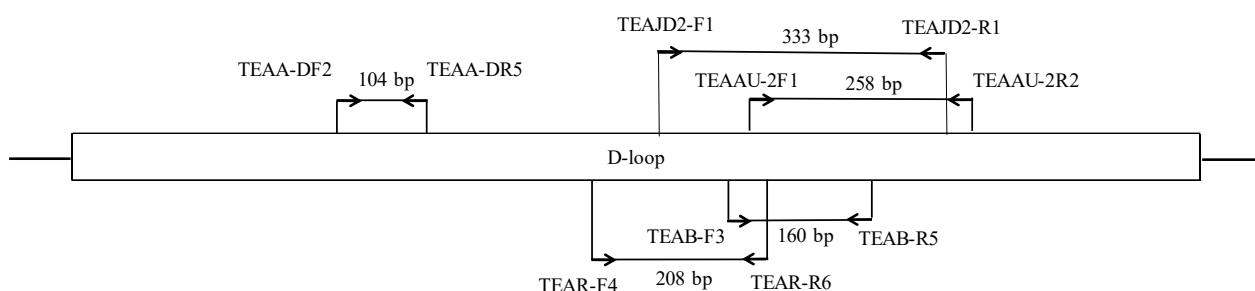
2. 試薬

1) プライマー 試料からDNAが正常に抽出していることの確認及び試料のウナギ種の塩基配列確認には、若林ら⁶⁾によって報告されたウナギのミトコンドリアDNA (mtDNA) のチトクロムb領域をターゲットとするユニバーサルプライマーであるTW6 (5'-TACGAAAAACCCA CCCACTTCT-3') とTW11 (5'-TCCTCATGGAAGTACATA TCCTACGACTGC-3') を用いた.

また、本研究で対象としたヨーロッパウナギ、ニホンウナギ、バイカラウナギ、アメリカウナギ及びオーストラリアウナギの判別には、DDBJに登録されている主要な9

種ウナギであるニホンウナギ (アクセッション番号: AB038556) , ヨーロッパウナギ (AP007233) , オーストラリアウナギ (AP007234) , バイカラウナギ (AP007236) , セレベスウナギ (AP007239) , オオウナギ (AP007242) , モザンビークウナギ (AP007244) , *A. reinhardti* (AP007248) 及びアメリカウナギ (AP007249) のmtDNAの全塩基配列をマルチアライメントツールの MAFFTで比較し、対象の5種ウナギを判別でき、かつPCR増幅産物の増幅長が異なるプライマーの検討を行った. その結果、mtDNAのD-Loop領域にその条件を満たすプライマー対を見出した (Table 2) . なお、プライマー位置を示す模式図をFig. 1に示した.

2) その他の試薬 DNAポリメラーゼは、単一PCR及びDNA塩基配列決定のためのPCRには、TaKaRa EX Taq HS (タカラバイオ製) を、マルチプレックスPCRには、AmplifyTaq Gold LD (アプライドバイオシステムズ製) を、また、dNTP及びPCR緩衝液はそれぞれのDNAポリメラーゼの附属品を用いた. アガロースはL03「TAKARA」 (タカラバイオ製) を用いた. PCR増幅産物の精製には

Fig. 1. The Locations of Primers in *Anguilla* spp. mtDNA D-loop Region in This Study

Microcon YM-50 (ミリポア製) を用いた。サイクルシーケンスキットはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ製) を用いた。未反応ダイターミネーターの除去にはAutoSeq G-50 (GEヘルスケアバイオサイエンス製) を用いた。精製水は分子生物学用 (ニッポンジーン製) を用いた。その他の試薬類は市販の特級品を用いた。

3. DNAの抽出

凍結保存試料の筋肉部25 mgを採取後、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よりDNAの抽出を行った。抽出したDNA溶液は実験に供するまで-20°C以下で保存した。

4. PCR

1) 単一プライマー対によるPCRの反応条件

PCR反応液は、10×PCR緩衝液 (20 mmol/L MgCl₂含有) を2.5 μL, 2.5 mol/L dNTPsを2 μL, フォワードプライマーとリバープライマーは0.6 μmol/L (最終濃度), 5 U/μLのTaKaRa EX Taq HSを0.125 μL, 12.5 ngの抽出DNAを加えた後、水で全量が25 μLになるように調製した。PCRは、熱変性 (98°C 10秒間), アニーリング (30秒間), 伸長反応 (72°C 1分間) を1サイクルとして40サイクルの反応を行い、PCR増幅産物を得た。なお、アニーリング温度は、プライマーにTEAA-DF2, TEAA-DR5のペアを用いる場合は57°C, TEAR-F4, TEAR-R6のペアを用いる場合は58°C, TEAB-F3, TEAB-R5のペア及びTEAU-2F2, TEAAU-2R1のペアを用いる場合は56°C, TEAJD2-F1, TEAJD2-R1のペアを用いる場合は60°Cに各々設定した。

2) マルチプレックPCRの反応条件

PCR反応液は、10×PCR緩衝液を2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂を3 μL, 2 mmol/L dNTPsを2.5 μL, プライマーは各々

最終濃度 (0.6 μmol/L), AmplyTaq Gold LDを0.125 μL, 12.5 ngの抽出DNAを加えた後、水で全量が25 μLになるように調製した。PCRは熱変性 (98°C 10秒間), アニーリング (56°C 30秒間), 伸長反応 (72°C 1分間) を1サイクルとして40サイクルで行った。

なお、陽性対照には新規設計プライマーによるPCRで得られた各ウナギのPCR増幅産物をマイクロコンYM50 (メルクミリポア製) で精製したPCR増幅産物を各々2.5 ngを含有する鋳型を用いた。

5. 電気泳動

PCR増幅反応液5 μLをゲルローディング緩衝液2 μLと混合後、エチジウムブロマイドを0.5 μg/mL含有する2.5% アガロースゲルに付加し、TAE緩衝液中100 Vの定電圧で電気泳動を行った。泳動後、UV照射装置上で予想される増幅長のバンド検出の有無を観察した。

6. 塩基配列の決定と相同性検索

実験に用いた試料ウナギの塩基配列の決定は、遠藤ら⁷⁾の方法に準じ、PCR増幅産物からBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いたダイレクトシーケンセスにより塩基配列を決定した。各試料から得られた塩基配列データとBlastプログラムにより相同性検索を行った。

結果及び考察

1. 試料ウナギ種の確認

最初に、実験に供した試料からDNAが正常に抽出されているか確認するため、プライマーTW6とTW11を用いてPCRを行った。その結果、実験に供した5種ウナギ試料の全てから予想される398 bpの増幅長のバンドが観察され、DNAが正常に抽出されたことが確認された (Fig. 2)。

次いで、Blastプログラムにより相同性検索を行った結果、試料No. 1は二ホンウナギ、No. 2はオーストラリアウナギ、No. 3はバイカラウナギ、No. 4はヨーロッパウナギ、No. 5はアメリカウナギであることが確認された。

2. 新規設計プライマーによるPCR

新規に設計したプライマー対であるヨーロッパウナギ用 (TEAA-DF2 / TEAA-DR5), バイカラウナギ用 (TEAB-F3 / TEAB-R5), アメリカウナギ用 (TEAR-F4 / TEAR-R6), オーストラリアウナギ用 (TEAAU-2F2 / TEAAU-2R1) 及び二ホンウナギ用 (TEAJD2-F1 / TEAJD2-R1) をそれぞれ用いて各試料から抽出したDNAを鋳型にPCRを行った。その結果、ヨーロッパウナギ用のプライマー対を用いたPCRでは、ヨーロッパウナギから抽出したDNAを鋳型にした場合のみ予想された104 bpのバンドが検出された。同様にその他のウナギについても判別対象とする試料から抽出したDNAを鋳型とした場合のみ予想されるバンド (バイカラウナギ160 bp, アメリカウナギ208 bp, オーストラリアウナギ258 bp, 二ホンウナギ333 bp) が検出され、

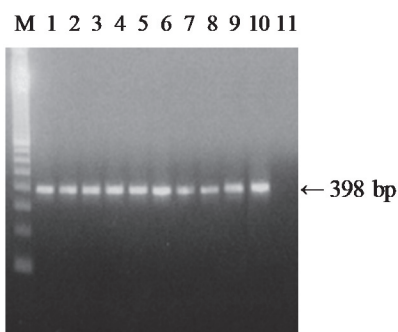


Fig. 2. Agarose Gel Electrophoresis of PCR Amplified Products for Eel samples with Primer Pair TW6/TW11

M: 100 bp Ladder, Lane 1, 2: *A. japonica* (No. 1), Lane 3, 4: *A. australis* (No. 2), Lane 5, 6: *A. bicolor* (No. 3), Lane 7, 8: *A. anguilla* (No. 4), Lane 9, 10: *A. rostrata* (No. 5), Lane 11: Negative control (no DNA)

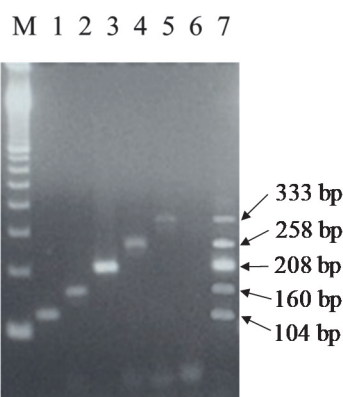


Fig. 3. Agarose Gel Electrophoresis of Multiplex PCR Amplified Products of Extracted DNA from Samples

M: 100 bp Ladder, Lane 1: *Anguilla anguilla* (No. 4), Lane 2: *A. bicolor* (No. 3), Lane 3: *A. rostrata* (No. 5), Lane 4: *A. australis* (No. 2), Lane 5: *A. japonica* (No. 1), Lane 6: Negative control (no DNA), Lane 7: Positive control.

プライマーの特異性が確認された。

次に、判別の迅速化、経済性を考慮して一反応で5種ウナギの判別を行うため、各ウナギ判別用のプライマーを混合して、マルチプレックスPCRを行った。その結果、TaKaRa EX Taq HSを用いた場合には、予想される増幅長以外の非特異バンドも検出され、マルチプレックスPCRが適切に実施できないことが判明した。そこで、DNAポリメラーゼを非特異増幅の減少が期待される AmpliTaq Gold LD に変え、マルチプレックスPCRを行った。その結果、それぞれのウナギ種で予想される増幅長のバンドのみが観察され、非特異的なバンドは出現しなかった。このことから、DNAポリメラーゼに AmpliTaq Gold LD を使用することにより、マルチプレックスPCRが実施できることが明らかとなった (Fig. 3)。

ウナギを判別する方法としては、外部形態から二ホンウナギとヨーロッパウナギを判別する方法⁸⁾、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の塩基配列を比較する方法⁹⁾、PCR-RFLPによる方法^{6,10)} 等が報告されているが、外部形態から判別する方法は加工食品には適用できないこと、及び判別対象が二ホンウナギとヨーロッパウナギに限定されること、mtDNAの塩基配列から判別する方法は操作が煩雑で検査費用が高価なこと、PCR-RFLPは操作が煩雑で検査費用がやや高価なこと等の短所がある。またウナギ魚体中の安定同位体の存在比率から生産地を推定する方法が報告¹¹⁾ されているが、高額な分析機器を必要とするため、この方法を実施できる施設は限られている。これらを考慮すると

本研究で開発したマルチプレックスPCRを用いることにより、迅速に経済的に5種ウナギの判別が可能になる。本法はウナギかば焼きや白焼きの原料ウナギの産地や種類の表示が適正に実施されているか否かの判断材料を得ることができる有用なツールになり得るものと考え、今後は今回対象としなかったウナギ種の判別も可能なマルチプレックスPCRの開発を行う必要がある。

ま と め

ヨーロッパウナギ、二ホンウナギ、バイカラウナギ、アメリカウナギ及びオーストラリアウナギの判別を行う目的でマルチプレックスPCR法を開発した。新規に設計したmtDNAのD-Loop領域に設計したプライマー対を用いることにより、これら5種のウナギを迅速に経済的に判別することが可能となった。

文 献

- 1) 農林水産省：農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律の一部を改正する法律（法律第67号）平成18年3月1日施行。
- 2) 水産庁魚政部加工流通課長、水産庁増殖水産部栽培養殖課長：二ホンウナギ (*Anguilla japonica*) の表示等について、平成25年5月30日。
<https://www.jfa.maff.go.jp/j/saibai/pdf/hyouji.pdf> (2021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)
- 3) 白石広美、ビッキー・クルーク：ウナギの市場の動態東アジアにおける生産・取引・消費の分析、2015、トラフィック イーストアジア ジャパン、東京。
http://www.trafficj.org/publication/15_Eel_Market_Dynamics_JP.pdf (2021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)
- 4) 神頭一郎：水産海洋研究，79, 61-66, 2015.
- 5) 塚本勝巳：ウナギの科学，2019，朝倉書店，東京。
- 6) 若尾卓成，疋田雄一，常吉俊宏，他：日水誌，65, 391-399, 1999.
- 7) 遠藤 昭，渡邊敬浩，米谷民雄，他：フグ鑑別試験法の信頼性確保に関する研究（最終報告），平成19年。
- 8) 岡村彰浩，帳 寶，山田祥朗，他：日水誌，67, 1056-1060, 2001.
- 9) 青山 潤，小林敬典，勝本勝巳：日水誌，62, 370-375, 1996.
- 10) 鈴木仁美，木本雅哉，吉添祐太，他：日水誌，77, 896-901, 2011.
- 11) 鈴木彌生子，中下留美子，伊永隆史：分析化学，58, 1067-1070, 2009.

Multiplex PCR for the Molecular Identification of Eels (*Anguilla* spp.)Kimio MONMA^a, Mitsuo OISHI^b and Hirofumi USHIYAMA^b

We developed a multiplex PCR to discriminate *Anguilla japonica*, *A. australis*, *A. bicolor*, *A. anguilla* and *A. rostrata* in processed eel food, such as kabayaki and shirayaki. These five species of eels can be discriminated by performing PCR using a species-specific primer designed for the D-loop region of the mitochondrial DNA of each species. The multiplex PCR methodology used in this study may be a useful tool for quickly and economically discriminating between *A. japonica*, *A. australis*, *A. bicolor*, *A. anguilla*, and *A. rostrata*.

Keywords: multiplex PCR, identification, eel, *Anguilla japonica*, *Anguilla australis*, *Anguilla bicolor*, *Anguilla anguilla*, *Anguilla rostrata*

^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