

# 短鎖散在反復配列 (SINE) を用いた富士の介の遺伝子判別法

三浦 正之・平塚 匡・岡崎 巧

マス類養殖業においては、長引く不況による販売量の停滞、飼料代を中心とした生産経費の上昇によってその経営は厳しいものとなっている。このような状況の中、スペシャル・トラウト<sup>1)</sup>と呼ばれるバイテク技術等を用いて生産された付加価値の高いマス類においては、輸入鮭鱒類との差別化が図られ、近年食材としての地位を高めつつある。本県においても、生産者からはこのような生産コストに比して付加価値が高い地域特産魚の開発が求められている。また、ホテル、旅館及び飲食店等のユーザー側からも特色がある新たなブランド魚を望む声も多い。これらの要望を受け、山梨県水産技術センターではニジマス *Oncorhynchus mykiss* とマスノスケ *O. tshawytscha* を親魚とするバイテク魚 (仮称ニジノスケ) の開発に着手し、2016年12月にニジマス雌×マスノスケ偽雄の交配による全雌異質三倍体魚について、水産庁による「三倍体魚等の水産生物の利用要領」に基づく確認が完了した。また、2017年11月に富士の介という名称が決定し、2020年からの流通開始が予定されている。

富士の介の外観は他のサケ・マス類と類似している部分もあり、慣れた人でないと見分けることは難しい。また、フィレーなどに加工された状態では他のサケ・マス類と判別することはできない。このため、食品偽装対策などを目的として目視以外で確実に富士の介を判別する技術を確認しておく必要がある。本研究では、サケ・マス類において魚種特異性が確認されている短鎖散在反復配列 (以下「SINE」という) を検出することで「富士の介」と他のサケ・マス類を判別できるかどうかを検討した。SINEとは、多細胞生物のゲノム中に存在するおよそ100から500ヌクレオチド程度の短い散在性の反復配列で、レトロポゾンと総称される一群の反復配列の内の一つである<sup>2)</sup>。レトロポゾンとは、ゲノム中に存在する配列が、いったんRNAとして転写され、そのものがさらに逆転写酵素の働きで、相補的なDNAに写し換えられ、それがゲノム中に逆流入した配列の総称で、このような因子は進化のある特定の段階で生成し、ゲノム中に流入する、すなわち、ある種が他種から分岐した後に、SINEが流入した場合には、そのようなSINEは種特異的に存在しており、その性質は種の系統関係の決定のために応用できるとされている<sup>2)</sup>。SINEは比較的短い配列であるためPCRでの増幅を行いやすく、その配列を含む遺伝子座をPCRで増幅させた際にSINEの挿入の有無により増幅産物のサイズに差が生じるため、この差を検出することにより種の判別を行うことができる (図1)<sup>2)</sup>。サケ科魚類においては、数多くのSINEが単離されており (図2)<sup>3-5)</sup>、これらを利用してサケ科魚類の判別が可能であると考えられている<sup>2)</sup>。

## 材料及び方法

### 供試魚

本試験では、現在日本において実際に流通や飼育が行われている19種のサケ科魚類 (交雑魚を含む)、すなわち、富士の介 (ニジマス×マスノスケ)、ニジマス、マスノスケ、ギンザケ、イトウ、イワナ、カワマス、サクラマス、アマゴ、ビワマス、ヒメマス、クニマス、サケ、カラフトマス、タイセイヨウサケ、ブラウントラウト、信州サーモン (ニジマス×ブラウントラウト)、絹姫サーモン (ニジマス×アマゴ) 及び魚沼美雪ます (ニジマス×イワナ) を用いた (表1)。

表1 供試魚

	魚種	検体数	由来	平均体重(g)
1	富士の介(全雌異質三倍体:ニジマス雌×マスノスケ雄)	5	山梨県水産技術センター	190.4
2	ニジマス	5	山梨県水産技術センター	183.9
3	マスノスケ	5	山梨県水産技術センター	172.8
4	ギンザケ	3	宮城県水産技術総合センター	17.0
5	イトウ	3	山梨県水産技術センター	579.2
6	アメマス	3	新潟県内水面水産試験場	72.1
7	カワマス	3	新潟県内水面水産試験場	106.7
8	サクラマス	3	山梨県水産技術センター	113.7
9	アマゴ	3	愛知県水産試験場	83.6
10	ビワマス	3	滋賀県水産試験場	13.1
11	ヒメマス	3	山梨県水産技術センター	95.8
12	クニマス	3	山梨県水産技術センター	137.3
13	サケ	3	山形県内水面試験場	344.3
14	カラフトマス	3	豊平川さけ科学館	20.1
15	タイセイヨウサケ	3	豊平川さけ科学館	165.6
16	ブラウトラウト	3	山梨県水産技術センター	173.5
17	信州サーモン(全雌異質三倍体:ニジマス雌×ブラウトラウト雄)	3	長野県水産試験場	26.5
18	絹姫サーモン(全雌異質三倍体:ニジマス雌×アマゴ雄)	3	愛知県水産試験場	38.2
19	魚沼美雪ます(全雌異質三倍体:ニジマス雌×アメマス雄)	3	新潟県内水面水産試験場	45.3

### 新たな交雑魚の出現を想定した PCR 及び加熱加工サンプルからの検出

将来的に新たな交雑魚が出現した場合を想定し、この場合においても富士の介を判別できることを確認するため、人為的に新たな交雑魚の鋳型 DNA を作成し判別の可否を調べた。なお、新たな交雑魚を仮定した鋳型 DNA は後述の方法で 2 魚種から抽出した鋳型 DNA 溶液を 1:1 の割合で混合することにより作成した。

また、加熱加工処理したサンプル、すなわち、塩焼き、フライ及びオートクレーブ処理した富士の介における判別の可否を確認した。供試魚は表 1 に示した富士の介とは別の体重 4,194 g の富士の介 1 尾を用いた。塩焼きは富士の介の筋肉約 100 g に塩をふり、両面に焦げ目がつくまで焼いたものをサンプルとして用いた。フライは約 100 g の筋肉に塩コショウをふり、小麦粉、溶き卵及びパン粉の順に付け、180 °C に熱したサラダ油中できつね色になるまで揚げ、衣を取り除いたものをサンプルとして用いた。オートクレーブ処理は約 100 g の富士の介の筋肉をガラスビーカーに入れ、アルミホイルで蓋をした上で 121 °C、15 分の処理をしたものを用いた。

### DNA 抽出及び PCR 反応液の調整

供試魚の脂鱗約 20mg から GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits (Sigma-Aldrich) を用いて、哺乳動物組織サンプルの調整プロトコルに従って DNA を抽出した。加熱加工サンプルにおいては、サンプル約 20 mg を用いて同様に抽出した。PCR は計 20 µL の反応液で行い、0.5 unit の Takara EX Taq HS (Takara)、1×Ex Taq Buffer、0.2 mmol/L dNTP Mixture、各プライマー 1 µmol/L となるように滅菌超純水で調整し、0.5µL の鋳型 DNA 溶液を加えて PCR 反応に供した。

PCR の反応条件は、最初の熱変性として 94 °C で 5 分、次に 94 °C で 30 秒、57 °C で 30 秒、72 °C で 1 分を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応の延長として 72 °C で 5 分とし、Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems) を用いて反応を行った。

なお、プライマーについては、富士の介の判別に利用できると想定された 3 つの遺伝子座 Hpa-100<sup>6)</sup>、Hpa-506<sup>5)</sup> 及び Hpa-52<sup>5)</sup> を増幅するようその両側に設定された 3 セットのプライマーを用いた (図 2 及び表 2)。なお、Hpa-100 はマスノスケ及びギンザケ、Hpa-506 はニジマス、Hpa-52 はギンザケにおいて種特異的に SINE が挿入さ

れている遺伝子座である (図 2)。

遺伝子座 Hpa-100 及び Hpa-506 を増幅する PCR には、表 1 に示す全魚種の鋳型 DNA を供試した。遺伝子座 Hpa-52 を増幅する PCR には、表 1 に示す魚種のうち、富士の介、ニジマス、マスノスケ及びギンザケの 4 魚種を用いた。

新たな交雑魚の出現を想定した PCR では、遺伝子座 Hpa-100 及び Hpa-506 を増幅する PCR を用いた。用いた鋳型 DNA は① Hpa-506 で SINE の挿入がある魚種、② Hpa-100 で SINE の挿入がある魚種、③ Hpa-506 及び Hpa-100 ともに SINE の挿入がない魚種、④ ①と②の魚種で構成された交雑魚、⑤ ①と③の魚種で構成された交雑魚、⑥ ②の魚種同士で構成された交雑魚、⑦ ②と③の魚種で構成された交雑魚を想定して PCR を行った。①にはニジマス、②にはマスノスケ及びギンザケ、③にはカラフトマス、④には富士の介及びニジマス+ギンザケ、⑤にはニジマス+カラフトマス、⑥にはマスノスケ+ギンザケ、⑦にはギンザケ+カラフトマスの鋳型 DNA を用いた。加熱加工サンプルを用いた PCR の鋳型 DNA は前述のとおり富士の介のみを用いた。

電気泳動に用いたアガロースゲルは AGAROSE 3:1 HRB™ (コスモバイオ) を用い、ゲルの濃度は 3% (w/v) とした。電気泳動緩衝液は TAE を用いた。DNA の染色は DNA 染色試薬を含むローディングバッファー EZ-Vision<sup>(R)</sup> One, DNA Dye As Loading Buffer 6X (コスモバイオ) を用いた。

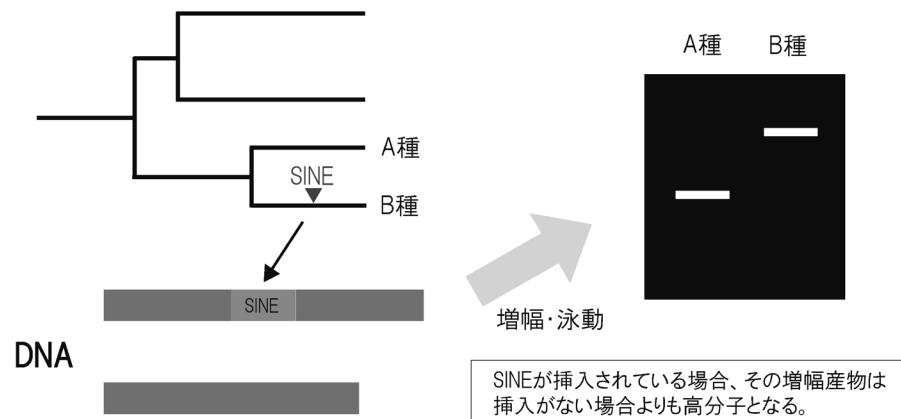


図 1 本手法のイメージ図

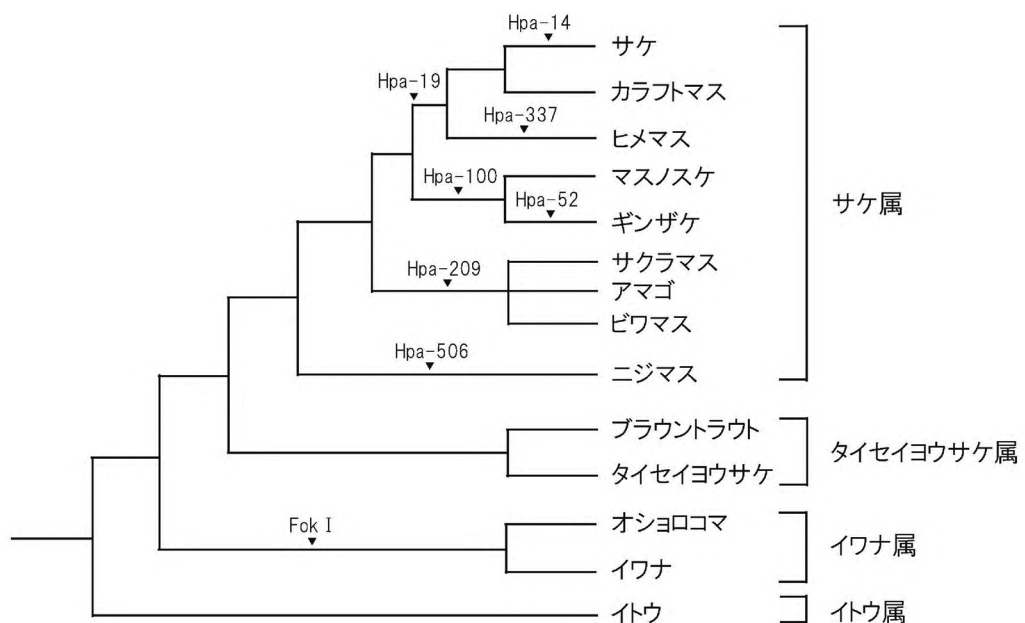


図 2 サケ・マス類で挿入が確認されている短鎖散在反復配列 (SINE) <sup>3-5)</sup>

表2 試験に用いたプライマー

Locus	Forward primer	Reverse primer
Hpa-100 <sup>6)</sup>	5'-GCTGGCATGTCCATAAGATTG-3'	3'-GACTTGTCTGTAAACTAAG-5'
Hpa-506 <sup>5)</sup>	5'-GAATGTCTTTGGTAGGGTAA-3'	3'-GAGTTTGTTCACGTAAGGG-5'
Hpa-52 <sup>5)</sup>	5'-ACTTCCCGACCAAGCTTCTCCATT-3'	3'-CACTTTCGGATACAAGACAGTCACC-5'

## 結果

### 各座位ごとの PCR 結果

Hpa-100 について、PCR 産物の電気泳動像を図 3 に示した。19 種のうちマスノスケ及びギンザケでは、SINE の挿入を示す 380 bp 付近のバンドが確認された。但し、ギンザケではマスノスケよりもわずかに低分子のバンドが確認された。ヒメマス及びクニマスでは増幅産物は確認されなかった。それ以外の魚種では SINE の挿入がないことを示す 230 bp 付近のバンドが確認された。富士の介のみ SINE の挿入を示す高分子のバンドと SINE の挿入がないことを示す低分子のバンドの両方が確認された。

Hpa-506 について、PCR 産物の電気泳動像を図 4 に示した。19 種のうちニジマスでは、SINE の挿入を示す 420 bp 付近のバンドが確認された。それ以外の魚種では SINE の挿入がないことを示す 240 bp 付近のバンドが確認された。ニジマスを雌親とする交雑魚の富士の介、信州サーモン、絹姫サーモン及び魚沼美雪ますでは SINE の挿入を示す高分子のバンドと SINE の挿入がないことを示す低分子のバンドの両方が確認された。

Hpa-52 について、PCR 産物の電気泳動像を図 5 に示した。PCR を行った 4 種、すなわち富士の介、ニジマス、マスノスケ及びギンザケのうちギンザケのみ SINE の挿入を示す 430 bp 付近のバンドが確認された。それ以外の魚種では SINE の挿入がないことを示す 310 bp 付近のバンドが確認された。

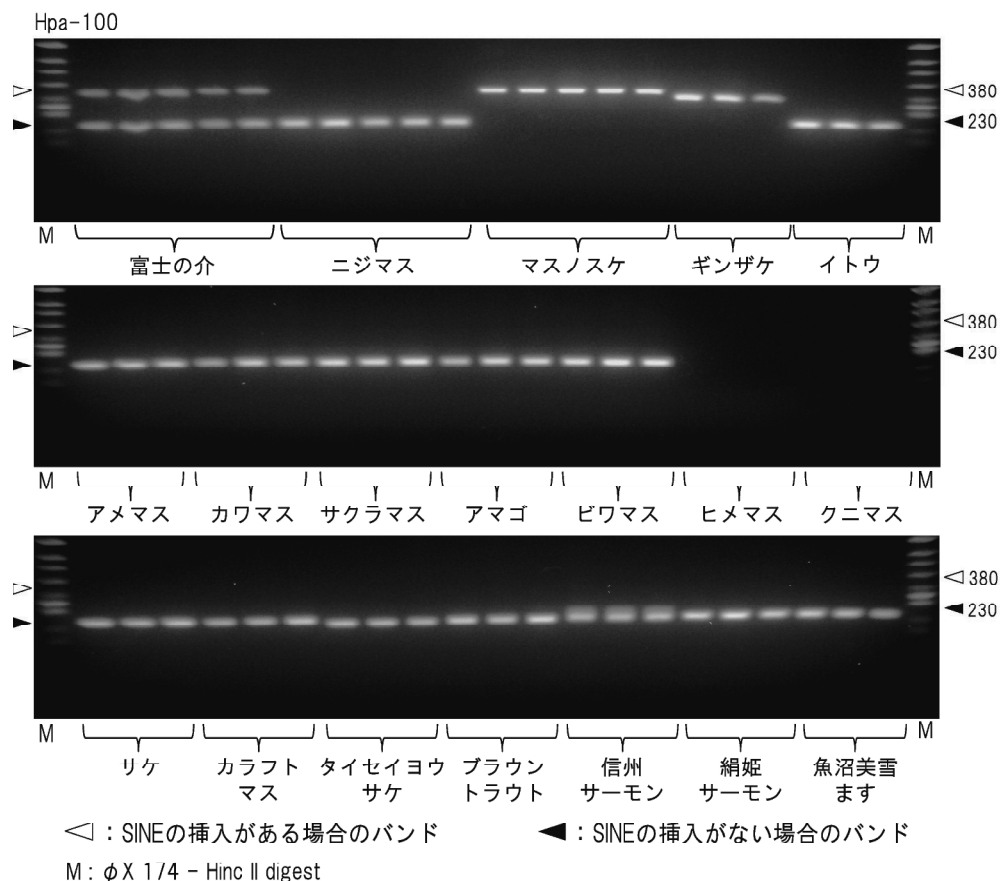


図3 PCR産物の泳動像 (Hpa-100)

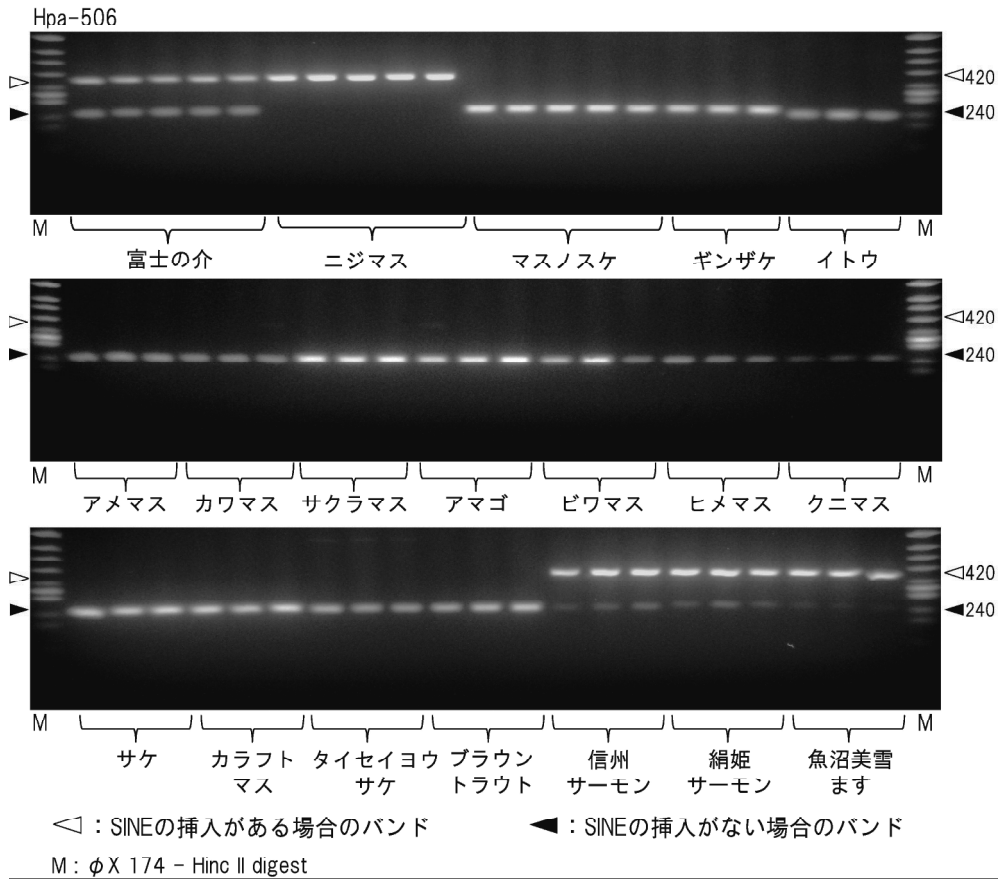


図4 PCR産物の泳動像 (Hpa-506)

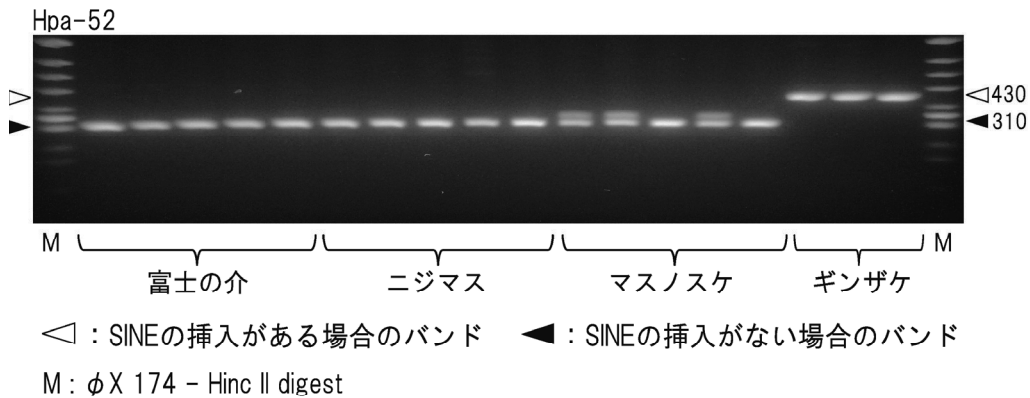


図5 PCR産物の泳動像 (Hpa-52)

### 新たな交雑魚の出現を想定した PCR

PCR産物の電気泳動像を図6に示した。Hpa-100のPCRでは、ニジマス+ギンザケ、マスノスケ+カラフトマス及びギンザケ+カラフトマスで、富士の介同様のSINEの挿入を示す高分子のバンドとSINEの挿入がないことを示す低分子のバンドの両方が確認された。また、Hpa-506のPCRではニジマス+ギンザケ及びニジマス+カラフトマスで富士の介同様のSINEの挿入を示す高分子のバンドとSINEの挿入がないことを示す低分子のバンドの両方が確認された。両方の遺伝子座のPCRともに高分子のバンドと低分子のバンドが確認されたのは、富士の介及びニジマス+ギンザケのみであった。

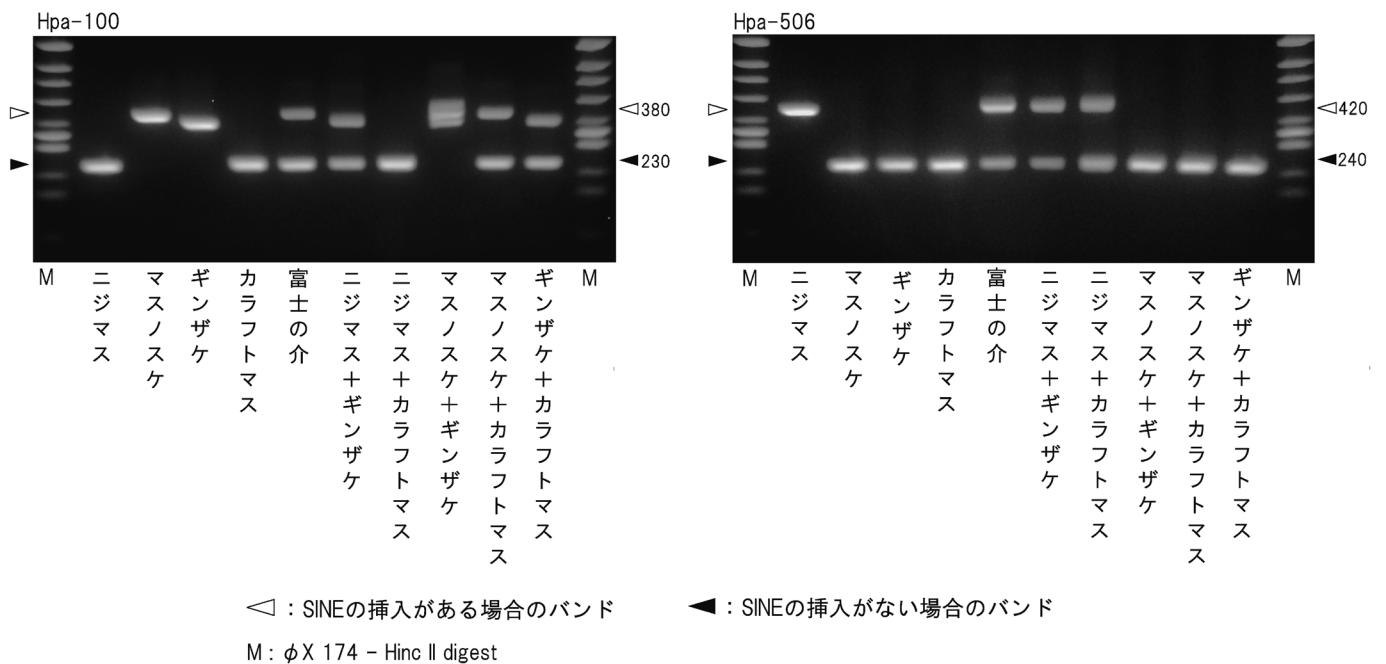


図6 新たな交雑魚の出現を想定したPCR産物の泳動

### 加熱加工した富士の介を用いたPCR

PCR産物の電気泳動像を図7に示した。高圧蒸気滅菌、フライ及び塩焼きのすべてにおいて、SINEの挿入を示す380 bp付近のバンドとSINEの挿入がないことを示す230 bp付近のバンドが確認された。

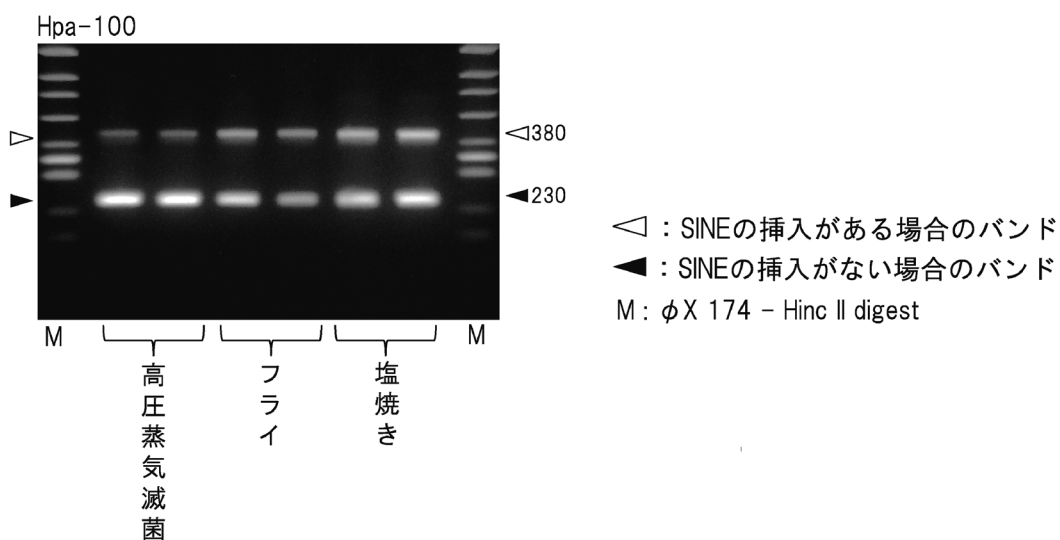


図7 加熱加工した富士の介を用いたPCR産物の泳動

### 考 察

魚類の同定は一般的に形態学的な特徴に基づき行われるが、富士の介については、現在その同定基準がない。また、慣れた人でないと目視での簡易的な判別も困難である。さらに、フィレーのように一部の部位が切り分けられた場合、目視での判別が全くできなくなる。近年、遺伝子による魚類の判別方法が数多く開発されてきており、塩基配列決定法、特異的プライマー法、PCR酵素多型法 (RFLP法)、PCR-SSCP法、SSR法 (マイクロサテ

ライト法)、RAPD 法などの手法が知られており、実際にマグロ類、ぶり類、アジ塩干品及び辛子めんたいこなどでこれらの遺伝子判別法が活用されている<sup>7)</sup>。また、各地のスペシャル・トラウトにおいても、遺伝子による判別技術の確立を目指した研究が行われている<sup>8,9)</sup>。本研究において富士の介の判別に用いた手法も遺伝子による判別法であるが、今回用いた SINE の挿入の有無を検出する遺伝子判別法は前述の特異プライマー法に近い手法であり、上記に挙げた遺伝子判別法の中でも特に簡便な手法であると考えられる。サケ科魚類では、数多くの SINE が単離されていることから<sup>3-5)</sup>、この手法を活用できる魚種であれば、遺伝子判別法の開発を一から行う必要がなく、利用する価値は高い。今回は、富士の介の元親であるニジマスとマスノスケの判別に利用可能な遺伝子座 Hpa-100<sup>6)</sup>、Hpa-506<sup>5)</sup>及び Hpa-52<sup>5)</sup>に着目し、この領域を増幅する PCR で実際に交雑魚を含む 18 種の魚種、さらには今後開発の可能性のある新たな交雑魚と富士の介を判別できるかどうか検討した。

マスノスケとギンザケにおいて SINE の挿入が確認されている遺伝子座 Hpa-100 の PCR においては、19 種のうち富士の介のみマスノスケ由来の高分子のバンドとニジマス由来の低分子のバンドの両方が確認された。今回供試した 19 種で輸入品も含めて現在日本において流通または飼育されているサケ科魚類のほぼ全てが網羅されているため、Hpa-100 の PCR を行うだけで十分に実用レベルの判別を行うことができると考えられた。さらに、ニジマスにおいて SINE の挿入が確認されている遺伝子座 Hpa-506 の PCR を行った結果、バンドの現れ方はニジマス、ニジマスと他魚種の交雑魚及びそれ以外の魚種の 3 パターンに分かれた。基本的には、富士の介の判別に Hpa-506 の PCR を用いる必要はないが、例えば、Hpa-100 の PCR で切り身の判別を行った結果、富士の介と判定されなかった場合にその切り身が、前述の 3 パターンのどれに該当するかを簡易的に判別する際など、必要に応じて用いれば良いと考えられる。

以上により、Hpa-100 の PCR を行えば、富士の介を簡便に判別できることが明らかになったが、今後新たな交雑魚が開発された場合であっても富士の介を判別できるようにしておくため、交雑魚を想定した鋳型 DNA を人為的に作成して試験を実施した。その結果、Hpa-100 の PCR であってもニジマス×ギンザケ、マスノスケ×カラフトマス、マスノスケ×ギンザケのような、SINE の挿入がある魚種とない魚種の組み合わせでは 2 つの異なる分子量の DNA が増幅されるため、Hpa-100 の PCR だけでは、富士の介を判別できないことが示された。この場合、Hpa-506 の PCR を併用すれば、Hpa-100 と Hpa-506 とともに 2 つの異なる分子量の DNA が増幅される魚種は富士の介とニジマス×ギンザケのみに絞られ、ニジマス×ギンザケを除いてサケ科魚類のどの組み合わせでも明確に富士の介との判別が可能であることが示された。今後、ニジマス×ギンザケの組み合わせの交雑魚が開発された場合には、判別の際注意が必要となるが、本研究では Hpa-100 の PCR でギンザケの方がマスノスケよりもわずかに低分子の位置にバンドが現れたため、この点で富士の介との判別が出来る可能性がある。この点についてはさらに検体数を増やして検証すべきである。いずれにせよ、現時点では、ギンザケのみに SINE が挿入されている遺伝子座 Hpa-52 の PCR を追加で行うことが確実に富士の介とニジマス×ギンザケの交雑魚を判別する手段であると言える。

スペシャル・トラウトは刺身など生食用として利用されるイメージが強いが、必ずしもそうではなく、加熱して用いられる場合も多い。このため、加熱加工した富士の介においても本判別法が有効であるかどうかを検討した。その結果、塩焼き、フライ及びオートクレーブ処理した富士の介すべてにおいて、目的とする DNA が増幅された。このため、加熱加工されたサンプルであっても、本手法が有効であると考えられる。今後は、さらに検体数を増やし、かつ別の加熱方法で調理されたサンプルも加えた上で試験が行われることが望ましいが、今回用いた加熱処理はどれも比較的加熱強度が高いため、多くの調理法で富士の介の遺伝子を検出できる可能性が高いと考えられる。

近年、水産物の偽装事件は多くなっており、特にブランド化された水産物の偽装はその商品価値を下げるリスクとしてあげられている<sup>10)</sup>。今後、本種の判別技術が存在していることが関係者に周知され、このような事件が

起こらないための抑止力として働くことを期待したい。また、例えばニジマスと富士の介との外観的な判別が特に難しい稚魚期<sup>11)</sup>に標識することなく両種を混泳させて行う実験が可能となるなど、食品偽装対策以外にもこの判別法を活用できるものと思われる。さらに、SINEを用いた遺伝子判別法は富士の介以外のサケ科魚類の判別にも広く活用できる手法であるため、他のスペシャル・トラウトの判別や天然河川での異魚種間の交配状況の確認など活用できる幅は広いと考えられる。

## 謝 辞

本判別法の実施にあたり手法などを丁寧にご指導いただいた国立研究開発法人 水産研究・教育機構増養殖研究所の名古屋博之氏に厚く御礼申し上げます。本研究に使用した供試魚の提供にご協力いただいた山形県内水面水産試験場の粕谷和寿氏、宮城県水産技術総合センターの松崎圭佑氏、長野県水産試験場の川之辺素一氏、新潟県内水面水産試験場の小林健一郎氏、愛知県水産試験場の今井彰彦氏、滋賀県水産試験場の上野世司氏、豊平川さけ科学館の有賀望氏に厚く感謝の意を表します。

## 要 約

1. 山梨県で開発した富士の介（ニジマス雌とマスノスケ偽雄を交配した全雌異質三倍体魚）について、サケマス類での特異的な挿入が確認されている短鎖散在反復配列（SINE）を用いた遺伝子判別が利用できるかどうかを検討した。
2. 供試魚には、富士の介、ニジマス、マスノスケ、ギンザケ、イトウ、アメマス、カワマス、サクラマス、アマゴ、ビワマス、ヒメマス、クニマス、サケ、カラフトマス、タイセイヨウサケ、ブラウントラウト、信州サーモン、絹姫サーモン及び魚沼美雪ますを用いた。
3. 遺伝子座 Hpa-100 を増幅する PCR により 2 本のバンドが見られた魚種は富士の介のみであり、この遺伝子座を増幅する PCR により、現在流通や飼育が行われているほぼ全てのサケマス類と富士の介を判別できることが明らかとなった。
4. 塩焼き、フライ及びオートクレーブ処理したサンプルからでも本手法により目的となる富士の介の遺伝子を検出可能であった。このため、加熱加工処理されたサンプルでも本手法を利用できる可能性が示された。

## 文 献

- 1) 小堀彰彦 (2016) : 内水面のスペシャル・トラウト市場と愛知県における「絹姫サーモン」の開発. 養殖ビジネス, 53, 7-10.
- 2) 岡田典弘 (1996) : 魚類の繰り返し配列構造. 日水誌, 62, 689-690.
- 3) Kido, Y., Aono, M., Yamaki, T., Matsumoto, K., Murata, S., Saneyosh, M., Okada, N. (1991): Shaping and reshaping of salmonid genomes by amplification of tRNA-derived retroposons during evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2326-2330.
- 4) Murata, S., Takasaki, N., Saitoh, M., Okada, N. (1993): Determination of the phylogenetic relationships among Pacific salmonids by using short interspersed elements (SINEs) as temporal landmarks of evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6995-6999.
- 5) Takasaki, N., Murata, S., Saitoh, M., Kobayashi, T., Park, L., Okada, N. (1994): Species-specific amplification of tRNA-derived short interspersed repetitive elements (SINEs) by retroposition: a process of parasitization of entire genomes during the evolution of salmonids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 10153-10157.
- 6) Murata, S., Takasaki, N., Saitoh, M., Tachida, H., Okada, N. (1996) Details of Retropositional Genome Dynamics That



Provide a Rationale for a Generic Division: The Distinct Branching of All the Pacific Salmon and Trout (*Oncorhynchus*) From the Atlantic Salmon and Trout (*Salmo*). *Genetics*, 142, 915-926.

- 7) 高嶋康晴・井口潤・浪越充司・山下由美子・山下倫明 (2014) : 魚介類の「名称」及び「原産地」表示の検証のための DNA 分析技術. *分析化学*, 63, 797-807.
- 8) 小松典彦・上島剛・降幡充・尾崎照遵 (2014) : PCR-RFLP 法及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. *長野水試研報*, 15, 21-25.
- 9) 神澤裕平・泉庄太郎・新井肇・清水延浩・小西浩司・松岡栄一 (2014) : 三年成熟系ニジマス「ギンヒカリ」の DNA 判別技術の検討. *群馬水試研報*, 20, 35-39.
- 10) 財団法人岐阜県産業経済振興センター (2007) : 地域ブランド化に関する調査研究報告書. 財団法人岐阜県産業経済振興センター, 岐阜.
- 11) 高橋一孝 (2012) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について－II 異質三倍体ニジマスの成長と成熟状況について. 平成 22 年度山梨県水産技術センター事業報告書, 26-31.