

# ミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子解析による未処理ふぐの鑑別について

生活衛生部門

## Identification of Pufferfish by mitochondrial 16S rRNA gene analysis

Division of Food and Environmental Hygiene

### Abstract

Puffer fish contain tetrodotoxin, a powerful neurotoxin in skin, ovaries, intestines, and liver. Since poison of puffer fish can kill diners, handling of puffer fish is strictly controlled by law in Japan. Only chefs qualified through rigorous training are allowed to prepare the fish by removing toxic organs. In December 2010, it was revealed that small puffer fish had been sold illegally without removing toxic parts at supermarket in Nishikyō Ward Kyoto City. Since poisonous parts vary among different kind of puffer fish, we identified the species of the puffer fish to avoid food poisoning incident. Species identification was carried out for three puffer fish sold at supermarket based on comparison of characteristic components and nucleotide sequence of the mitochondrial 16S rRNA genes. Polymerase chain reaction (PCR) with a template of total DNA from muscle tissues of puffer fish successfully amplified DNA fragments of 615bp in the 16S rRNA gene, which were identified as *Takifugu poecilonotus* ("Komonfugu") and *Takifugu vermicular* ("Nashifugu").

### Key Words

16S rRNA , PCR , ミトコンドリア DNA mtDNA , フグ Puffer Fish , シークエンス sequence

#### 1 はじめに

フグによる食中毒は、有毒部位に強力な神経毒であるテトロドトキシン(TTX)を含むため、発生件数こそ少ないが、症状が重く、死亡率が高いことが特徴である。そのため、フグについては厚生労働省通知「フグの衛生確保について」により、食してよい種、部位、漁獲地域が定められている。また、京都府では「ふぐの取扱及び販売に関する条例」により、内臓などの有毒部位の除去処理を行ったものでなければ、食品としての販売、調理、加工を禁じている。

平成22年12月 京都市西京区内のスーパーで、内臓などを取り除いていない未処理のフグを小フグとして食用に販売されていることが、購入した男性からの相談で明らかになった。

このような事例において、販売していた魚種を鑑別し同定することは、健康被害の防止、原因の究明及び再発の防止の観点からも非常に重要である。

フグは種類が非常に多いことが特徴であり、フグ科の魚は世界に約160種、日本近海には約50種が分布している。そのうち日本で食用と認められているフグは22種類である。従来、その鑑別にあたっては、体色(皮の模様、斑紋)、鱗の色及び棘の有無等による形態学的鑑別がとられてきた。しかし、切り身や汁等の加工、調理済みの状態では、鱗、皮等が除去されているため、目視による形態学的鑑別は困難である場合が多い。

近年、中国産のカワハギやアンコウの乾製品にフグが混入する事件が発生しており、外部形態によらない鑑別法として PCR 法により魚介類加工品中フグの混入を検査する方法が厚生労働省より通知されている。<sup>1)</sup>

今回、スーパーの店頭に陳列されていたフグ2種類と購入者が保管していたフグ1種類について、形態学的鑑別に加えて、PCR 法を用いてミトコンドリア DNA の 16SrRNA 遺伝子部分領域の塩基配列を決定する遺伝子解析による鑑別を試みたので報告する。

#### 2 方法

##### (1) 試料

スーパーに陳列されていたふぐ2種類(以下フグA、Bと表記する。) 購入者が調理し保管していたフグ1種類、(以下フグCと表記する。)について鑑別を行った。

##### (2) 使用装置

ア 分光光度計 島津製作所 UV-1600  
イ サーマルサイクラー ASTEC PC-818  
ウ 電気泳動装置 Advance Mupid-Ex  
エ ゲルイメージ撮影装置 BioRad GelDoc1000  
オ シークエンサー ABI 3130GeneticAnalyzer

##### (3) 試薬

ア DNA 抽出試薬 QIAGEN DNeasy Blood&TissueKit  
イ ProtenaseK QIAGEN  
ウ RNaseA QIAGEN

- エ TaqDNA ポリメラーゼ Takara ExTaq  
 オ TBE 緩衝液 Promega  
 エ PCR 産物精製試薬  
 GEhealthcare ExoSAP-IT  
 GEhealthcare AutoSep G-50  
 カ ラベリング試薬  
 ABI BigDyeTerminatorV3.1 Cycle Sequencing kit
- (4) DNA の抽出  
 フグの筋肉部分を細切,均一化し 25mg 採取し,厚生労働省の通知法に基づき, DNeasy Blood&TissueKit を用いて, DNA を抽出し, 得られた溶液を DNA 試料原液とした。分光光度計を用い 200nm-320nm の範囲で DNA 試料原液の紫外部吸収スペクトルを測定した。260nm の吸光度の値 1 を 50ng/  $\mu$ LDNA とし て DNA 試料原液の DNA 濃度を算出した。DNA 試料原液を滅菌超純水で希釈し 5ng/  $\mu$ L としたものを DNA 試料液とし PCR の鑄型に用いた。
- (5) PCR プライマー<sup>2)</sup>  
 Forward primer (16SarL) 5' -CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'  
 Reverse primer (16SbrH) 5' -CCGGTCTGAAGCTCAGATCAGT-3'
- (6) PCR 反応液組成  
 滅菌水 14.3  $\mu$ L, 10  $\times$  PCRbuffer 2.5  $\mu$ L,  
 25mM MgCl<sub>2</sub> 2  $\mu$ L, 2.5mM each dNTPmix 2  $\mu$ L,  
 10  $\mu$ M each primer mix 1.5  $\mu$ L,  
 DNA polymerase (ExTaq) 0.2  $\mu$ L,  
 鑄型 DNA (5ng/  $\mu$ L) 2.5  $\mu$ L, 総量 25  $\mu$ L の反応系で行った。
- (7) PCR 温度条件 (mtDNA 16SrRNA 遺伝子部分領域の増幅)  
 30cycle (98 20sec 53 30sec 72 60sec)
- (8) PCR 増幅産物の精製  
 PCR 増幅後の DNA 産物の塩基配列の決定を行うため, 過剰な PCR プライマー及び dNTP を除去する目的で PCR 産物 12.5  $\mu$ L に ExoSAP-IT 原液を 5  $\mu$ L を加え, 37 1hr で酵素処理した後, 85 15min 加熱して酵素を不活性化させた。
- (9) シークエンシング反応  
 BigDyeTerminatorV3.1 Cycle sequencing Kit を用いて, ExoSAP-IT 処理した PCR 産物を鑄型として Forward 側, Reverse 側の両側でシークエンシング反応を行った。  
 反応は, 滅菌蒸留水 3.0  $\mu$ L,  
 シークエンスキットプレミックス 1.0  $\mu$ L,  
 2  $\mu$ M forward or reverse primers 1.0  $\mu$ L  
 5  $\times$  Sequencing Buffer 1.5  $\mu$ L  
 DNA (PCR 産物) 3.5  $\mu$ L, 総量 10  $\mu$ L の反応系で行った。
- (10) PCR 温度条件 (シークエンシング反応)  
 96 60sec 25  $\times$  (96 10sec 50 5sec 60 120sec) 4
- (11) シークエンシング反応後の精製  
 未反応のダイターミネーターを除去する目的でシークエンシング反応産物を核酸精製用マイクロスピナラム AutoSeq G-50 を用いて精製した。

### 3 結果及び考察

#### (1) 形態学的鑑別

フグ A (図 1) については体長約 19cm であった。表面は小棘がありざらざらしていた。胸鰭後方に境界が不明瞭な黒紋 (図 8) が見られた。表面の模様 (図 4) には小白点が見られ, 背鰭後方のものが円形に近かった。また尻鰭 (図 6) は淡黄色であった。以上の特徴からフグ A はコモンフグであると考えられた。

フグ B (図 2) については体長約 17cm であった。表面 (図 5) には小棘はなくつるつるしていた。胸鰭のそばにまわりが白く菊花状にふちどられた黒紋 (図 9) が見られた。また尻鰭 (図 7) は白色であった。尾鰭の下方は白かった。以上の特徴からフグ B はナシフグであると考えられた。

フグ C (図 3) については, 購入者により調理され内臓や皮などが分離された状態で搬入されたが, 残っていた皮の模様の特徴が一致することから, フグ A と同じコモンフグであると考えられた。

#### (2) 遺伝子解析による鑑別

フグ A, B, C から DNeasy Blood&TissueKit を用いて DNA を抽出し, ミトコンドリア DNA 16SrRNA 遺伝子領域に設計されたプライマー (Forward 側: 16SarL, Reverse 側: 16SbrH) を用いて PCR 増幅した。PCR 増幅産物を 2% アガロースゲルで電気泳動を行った。電気泳動用のマーカーに 100bp ladder を使用し目的サイズ (615bp) の PCR 増幅バンドを確認した。(図 10) PCR 増幅産物を精製後, Forward 側と Reverse 側の両側でシークエンシング反応を行い, 塩基配列を決定した。決定した塩基配列の結果を図 11, 図 12 に示す。

決定した塩基配列と GenBank/EMBL/DBJ データベースに登録されている遺伝子配列との相同性を BLAST により検索した。

フグ A とフグ C の塩基配列 (図 11) は, 同一であり, コモンフグ *Takifugu poeclionotus* の 16SrRNA 遺伝子領域の配列 (accession number AP009539) と最も相同性が高かった。(配列相同性 100%)

フグ B の塩基配列 (図 12) は, ナシフグ *Takifugu vermicularis* の 16SrRNA 遺伝子領域の配列 (accession number AP009532) と最も相同性が高かった。(配列相同性 99.8%)

遺伝子解析による鑑別でも形態学的鑑別結果と一致する結果が得られた。

### 4 まとめ

今回鑑別したコモンフグ, ナシフグともに有毒部位を有している。コモンフグは, 皮及び精巢は食用不可であり筋肉部分のみ食用可とされている。ただし, 岩手県越喜来湾及び釜石湾並びに宮城県雄勝湾で漁獲されたものについては食用不可とされる。ナシフグは, 原則食用不可であるが, 有明海, 橘湾, 香

川県及び岡山県の瀬戸内海域で漁獲されたものの筋肉ならびに、有明海及び橋湾で漁獲され、長崎県が定める要領に基づき処理されたものの精巢に限り食用可とされる。ともに全体的な大きさ、形はよく似ており、地方によっては通称「ナゴヤフグ」として区別せずに取り扱われている。専門家でなければ形態学的鑑別は困難な場合があり、今回 PCR を用いた遺伝子解析による鑑別を併せて行うことで確実な同定が可能であった。

また、今回検体 25mg から DNA 抽出することにより遺伝子解析による鑑別が可能であったことから種類不明フグによる食中毒で残品が少なく形態学的鑑別が困難な場合も検体が数 10mg 残存していれば、DNA を抽出しフグ種が同定できる可能性があると考えられた。

16SrRNA 遺伝子は原核生物から真核生物まで広く存在しており、様々な生物の系統解析に使用されている。

今回使用したミトコンドリア DNA16SrRNA 遺伝子部分領域のフ

16SarL	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1	CGCCTGTTTATCAAAAACATCGCCTCTTGCTTCAGTGAATAAGAGGTCACGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAA																							
	GCGGACAAAATAGTTTTTGTAGCGGAGAACGAAGTCACTTATTTCCAGTGCGGACGGGACACTGATATACAAAATGCCGGCGCCATAAAACTGGCACGT																							
101	AAGGTAGCGCAATCACTTGTCTCTTAAATGTGGACCTGTATGAATGGCATAACGAGGGCTTAGCTGTCTCCTTTCTCAAGTCAATGAACCTTGATCTCCCC																							
	TTCATCGCGTTAGTGAACAGGAAAATTACACCTGGACATACTTACCGTATTGCTCCGAAATCGACAGAGGAAAGAGTTCAGTTACTTGAACCTAGAGGGG																							
201	GTGCAGAAGCGGGATAAAAACATAAGACAGAGAAGACCCATGAGGCTTTAGACAAAAACAGCCCTGTCAATAAACCCATAAATAAGGAAATAAACCT																							
	CACGCTTCGCCCCATTTTTGGTATTCTGTCTCTCTGGGATACCTCGAAATCTGTTTTTTGTGGGACAGTTATTTGGGATTTATTTCTCTTATTGGA																							
301	AGTGAACCTGTTTTAATGTCTTTGGTGGGGCGACCGCGGGGTAACAAAAACCCCATGTGGAATGAAAACACCCTTTTTAAAACCAAGAGTCAACACT																							
	TCACTTGGACAAAATTACAGAAAACCAACCCCGCTGGCGCCCCATTGTTTTTGGGGGTACACCTACTTTTTGTGGGAAAATTTTGGTTCCTCAGTGGTGA																							
401	CTAAGTTACAGAACATCTGACCAGTAATGATCCGGCTTAAGCCGATTAACGAACCAGGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATA																							
	GATTCAATGTCTTGTAGACTGGTCACTTAGGCCGAATTCGGCTAATTTGCTTGCTCAATGGGATCCCTATTGTGCGCTTAGGAGAAAATCTCAGGTAT																							
501	TCGACAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGTATTAAAGGTTGTTTTGTCAACGATTAAGTCTTACGTGAT																							
	AGCTGTTCTCCCAAATGCTGGAGCTACAACCTAGTCCTGTAGGGTACCACGTGCGCGATAATTTCCAAGCAAACAAGTTGCTAATTTACAGGATGCACTA																							
601	CTGAGTTCAGACCGG																							
	GACTCAAGTCTGGCC																							
																							16SbrH	

図 1 1 フグ A、フグ C の mtDNA16SrRNA 遺伝子部分領域の塩基配列

16SarL	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1	CGCCTGTTTATCAAAAACATCGCCTCTTGCTTCAGTGAATAAGAGGTCACGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAAACGGCCGCGGTATTTTGACCGTGCAA																							
	GCGGACAAAATAGTTTTTGTAGCGGAGAACGAAGTCACTTATTTCCAGTGCGGACGGGACACTGATATACAAAATGCCGGCGCCATAAAACTGGCACGT																							
101	AGGTAGCGCAATCACTTGTCTCTTAAATGTGGACCTGTATGAATGGCATAACGAGGGCTTAGCTGTCTCCTTTCTCAAGTCAATGAACCTTGATCTCCCCG																							
	TTCATCGCGTTAGTGAACAGGAAAATTACACCTGGACATACTTACCGTATTGCTCCGAAATCGACAGAGGAAAGAGTTCAGTTACTTGAACCTAGAGGGGC																							
201	TGCAGAAGCGGGATAAAAACATAAGACAGAGAAGACCCATGAGGCTTTAGACAAAAACAGCCCTGTCAATAAACCCATAAATAAGGAAATAAACCTA																							
	ACGCTTCGCCCCATTTTTGGTATTCTGTCTCTCTGGGATACCTCGAAATCTGTTTTTTGTGGGACAGTTATTTGGGATTTATTTCTCTTATTGGA																							
301	GTGAACCTGTTTTAATGTCTTTGGTGGGGCGACCGCGGGGTAACAAAAACCCCATGTGGAATGAAAACACCCTTTTTAAAACCAAGAGTCAACACTC																							
	CACTTGGACAAAATTACAGAAAACCAACCCCGCTGGCGCCCCATTGTTTTTGGGGGTACACCTTACTTTTTGGGAAAATTTTGGTTCCTCAGTGGTGA																							
401	TAAGTTACAGAACATCTGACCAATTAATGATCCGGCTAAGCCGATTAACGAACCAGGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATCCTCTTTTAGAGTCCATA																							
	ATTCAATGTCTTGTAGACTGGTTAATTAATAGGCCGATTTTCGGCTAATTTGCTTGCTCAATGGGATCCCTATTGTGCGCTTAGGAGAAAATCTCAGGTAT																							
501	TCGACAAGAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCAATGGTGCAGCCGTATTAAAGGTTGTTTTGTCAACGATTAAGTCTTACGTGAT																							
	AGCTGTTCTCCCAAATGCTGGAGCTACAACCTAGTCCTGTAGGGTACCACGTGCGCGATAATTTCCAAGCAAACAAGTTGCTAATTTACAGGATGCACTA																							
601	CTGAGTTCAGACCGG																							
	GACTCAAGTCTGGCC																							
																							16SbrH	

図 1 2 フグ B の mtDNA16SrRNA 遺伝子部分領域の塩基配列

ライマー (16SarL, 16SbrH) は、脊椎動物、節足動物、軟体動物等でも使用可能であり、PCR で増幅した DNA 断片の塩基配列をデータベースに登録されている配列と比較することにより他の生物種の鑑別にも応用可能であると考えられた。

## 5 謝辞

シークエンサーの使用及び遺伝子解析についてご協力いただきました当所微生物部門の方々に感謝いたします。

## 6 参考文献

- (1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、「輸入魚類加工品のフグ種鑑別検査法について」(食安発第 0330003 号, 平成 21 年 3 月 30 日)
- (2) Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G (1991). The simple fools guide to PCR, version II. University of Hawaii, Honolulu



図1 フグA (コモンフグと鑑別)全体写真



図2 フグB (ナシフグと鑑別)全体写真



図3 フグC 全体写真



図4 フグA 表面模様



図5 フグB 表面模様



図6 フグA 尻鰭



図7 フグB 尻鰭

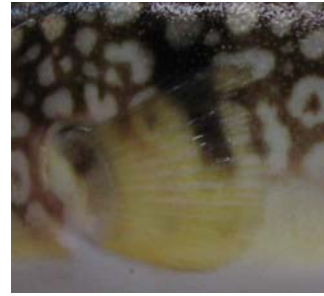


図8 フグA 胸鰭後方の黒紋



図9 フグB 胸鰭後方の黒紋

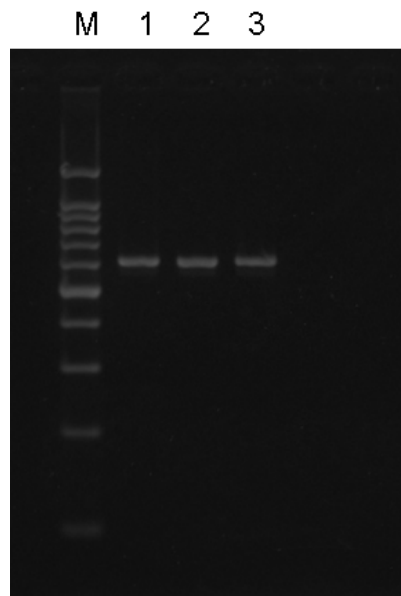


図10 mtDNA16SrRNA 遺伝子部分領域のPCR 増幅  
M : 100bp ladder  
1 : フグA , 2 : フグB , 3 : フグC