

## PCR-SSCP 法を用いた魚種判別

原 素之<sup>1)</sup>・野口昌之<sup>2)</sup>・内藤笑美子<sup>3)</sup>・出羽厚二<sup>3)</sup>・山内春夫<sup>3)</sup>

### Ribosomal RNA Gene Typing of Fish Genome Using PCR-SSCP Method

Motoyuki HARA<sup>1)</sup>, Masayuki NOGUCHI<sup>2)</sup>, Emiko NAITO<sup>3)</sup>,  
Koji DEWA<sup>3)</sup> and Haruo YAMANOUCI<sup>3)</sup>

#### Abstract

DNA typing of ribosomal RNA genes was performed with a PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) assay for fish identification. A variable region of the 28S ribosomal RNA gene was amplified with primers complementary to flanking sequences phylogenetically well conserved. The product of twelve taxa of fishes (Rajiformes, Salmoniformes, Myctophiformes, Cypriniformes, Anguilliformes, Gasterosteiformes, Syngnathiformes, Gadiformes, Perciformes, Scorpaeniformes, Pleuronectiformes and Tetraodontiformes) classified in order levels were denatured to a single strand DNA and electrophoresed in a non-denaturing polyacrylamide gel. Electrophoretic mobility patterns differed among order levels of fishes, respectively. They indicate the possibility of application of this typing to species identification, using small DNA samples such as an egg or a larva.

**Key words:** DNA, Fishes classification, Genetic variation, PCR-SSCP method, 28S ribosomal RNA

#### ま え が き

近年, 多くのDNA分析技術が開発・改良されてきた。その中でも1980年代に実用化されたPCR(Polymerase chain reaction)法(SAKAI *et al.* 1988)は, 分子生物学の進展速度を大きく変えたばかりでなく, DNA分析が多くの分野で応用される大きな要因となった。PCR法は, 膨大なDNAの塩基配列の中から, 短い目的領域(通常100~1000塩基対程度)だけを耐熱性DNA合成酵素(ポリメラーゼ)の働きによって, 試験管内で数時間のうちに数十万倍に増幅する酵素反応である。この反応では目的領域の両端と相補的に結合し, 合成を始めるきっかけとなる

---

1994年1月6日受理 日本海区水産研究所業績A493号

<sup>1)</sup> 〒305 つくば市大わし1-2 国際農林水産業研究センター  
(Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ohwashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki, 305, Japan)

<sup>2)</sup> 〒951 新潟市水道町1丁目5939-22 日本海区水産研究所  
(Japan Sea National Fisheries Research Institute, Suido-cho, Niigata 951, Japan)

<sup>3)</sup> 〒951 新潟市旭町通1丁目757 新潟大学医学部  
(School of Medicine, Niigata University, Asahimatidori, Niigata 951, Japan)

プライマーと呼ばれる20~30塩基の合成オリゴヌクレオチドが重要な働きをしている。このPCR法の大きな特徴は操作が簡単であること、また非常に高感度であるため極微量の試料で分析が行えることである。これらの利点から現在PCR法は、医学、考古学、農学などさまざまな分野に取り入れられ、DNA分析法の主流になりつつある。

水産分野でもPCR法は関心が持たれており、例えば形態からでは同定の難しい卵稚仔の分類や遺伝的変異の検索などへの応用が期待されている。しかし、PCR法では増幅領域の決定やその成否の鍵であるプライマーを設計し合成をしなければならない。そのためには、魚類のDNA塩基配列の情報が必要となるが、魚類ではDNA塩基配列の研究は今まで殆ど行われていない。そこで、今回は多くの生物で比較的共通性が高いと考えられているリボソームRNA遺伝子をコードしているDNA領域に注目した。そして、入手しやすいヒト用に設計されたプライマーを用いて、魚類への適用を調べた。さらに、増幅領域の変異性によって、魚種判別が可能であるかを検討した。

報告をまとめるに当たり、有益な御助言や諸々のご支援を頂いた新潟大学医学部第一生化学教室木南凌教授、本研究のきっかけと校閲の労をとられた日本海区水産研究所資源増殖部飯倉敏弘部長に感謝する。また、標本の入手に当っては新潟県内水面水産試験場本場並びに小出支場の方々に御協力頂き厚くお礼申し上げます。

## 材 料 と 方 法

### 1 DNAの抽出

分析に供した魚類は、Table 1に示す12目15亜目の30種である。これらは、1992年9月から1993年4月に新潟市地先で採集、または新潟県内水面水産試験場で飼育されていたものである。これら魚類の血液から既報(原ら 1993)に従いDNAを抽出した。

### 2 目的領域DNAの増幅

DNA増幅領域とプライマーの塩基配列をFig. 1に示した。約1ngのDNA試料に1ユニットの耐熱性ポリメラーゼを加え、30 $\mu$ lのPCR反応溶液中、プライマーA、Bが各30pmol、Tris-HCl(pH 8.4)が10mM、KClが50mM、MgCl<sub>2</sub>が2.5mM、アデニン、チミン、シトシン、グアニンの4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)が各200 $\mu$ molになるよう調整した。また、これに20 $\mu$ lのミネラルオイルを加え、PCR操作中の反応液の蒸発を防いだ。DNAの増幅は、ヒートサイクリング装置によって95 $^{\circ}$ C 2分、57 $^{\circ}$ C 1分半、72 $^{\circ}$ C 1分半のサイクルを30回程度繰り返した。

### 3 変異の検出

DNAが増幅されているか確認するため、Table 2に示した組成のポリアクリルアミドゲル(160 $\times$ 160 $\times$ 0.75mm)を支持体として、10~15V/cmで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によりバンドを検出した。塩基対数の検討にはpBR322を制限酵素HinfIで75, 154, 220, 221, 298, 344, 396, 504, 517, 1632塩基対の長さに分解したものをマーカーとした。また、魚種間における増幅DNAの変異を調べるため、SSCP法(Single strand conformation polymorphism, 林 1990)を行った。試料は45%ホルムアミド中95 $^{\circ}$ Cに5分間さらし、DNAを2本鎖から1本鎖とした後、直ちに氷中で5分間急冷し電気泳動を行った。電気泳動の支持体は前述したポリアクリルアミドゲルと同様であるが、泳動槽の温度を20, 25, 30 $^{\circ}$ Cに変化させ、

**Table 1.** List of 30 species in fishes collected for DNA analysis

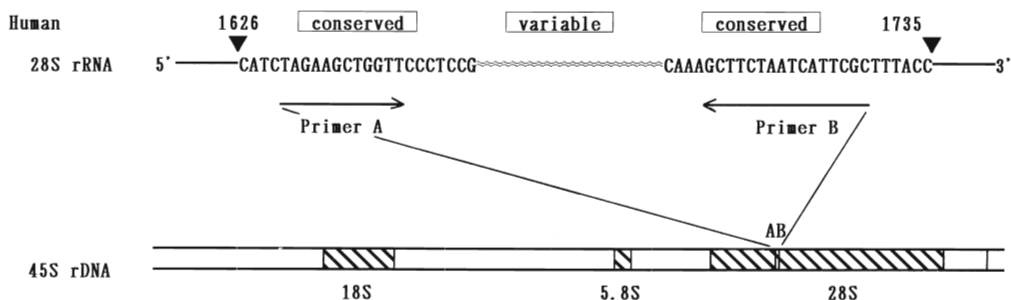
No.	Species	Family	Suborder	Order
1.	<i>Rhinobatos schlegelii</i>	Rhinobatidae		Rajiformes
2.	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmonidae	Salmonoidei	Salmoniformes
3.	<i>O. masou</i>	"	"	"
4.	<i>O. keta</i>	"	"	"
5.	<i>O. masou</i> <sup>a)</sup>	"	"	"
6.	<i>O. mykiss</i>	"	"	"
7.	<i>Salmo trutta</i>	"	"	"
8.	<i>Salvelinus fontinalis</i>	"	"	"
9.	<i>S. leucomaenis</i>	"	"	"
10.	<i>Saurida elongata</i>	Synodontidae		Myctophiformes
11.	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Cobitidae		Cypriniformes
12.	<i>Muraesox cinereus</i>	Muraenesocidae	Anguilloidei	Anguilliformes
13.	<i>Gastrosteus aculeatus</i>	Gasterosteidae		Gasterosteiformes
14.	<i>Syngnathus schlegeli</i>	Syngnathidae		Syngnathiformes
15.	<i>Gadus macrocephalus</i>	Gadidae	Gadoidei	Gadiformes
16.	<i>Scomber japonicus</i>	Scombridae	Scombroidi	Perciformes
17.	<i>Pagrus major</i>	Sparidae	Percoidei	"
18.	<i>Uranoscopus japonicus</i>	Uranoscopidae	Blennioidei	"
19.	<i>Tilapia mossambica</i>	Cichlidae	Percoidei	"
20.	<i>Cottus pollux</i>	Cottidae		Scorpaeniformes
21.	<i>Platycephalus indicus</i>	Platycephalidae		"
22.	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Paralichthyidae	Pleuronectoidei	Pleuronectiformes
23.	<i>Pseudorhombus pentophthalmus</i>	"	"	"
24.	<i>Pleuronectes herzensteini</i>	Pleuronectidae	"	"
25.	<i>P. yokohamae</i>	"	"	"
26.	<i>Pleuronichthys cornutus</i>	"	"	"
27.	<i>Kareius bicoloratus</i>	"	"	"
28.	<i>Paraplagusia japonica</i>	Cynoglossidae	Soleoidei	"
29.	<i>Cynoglossus joyneri</i>	"	"	"
30.	<i>Takifugu poecilonotus</i>	Tetraodontidae	Tetraodontidei	Tetraodontiformes

<sup>a)</sup> landlocked form

10～15V/cm の定電圧で行った。DNA バンドは銀染色法によって検出し、魚種間での変異を調べた。

## 結果と考察

30魚種の血液から抽出したDNAを試料として、Fig. 1 のプライマーA、Bに挟まれた領域の増幅を試みた。Fig. 2 にPCRを行った試料の一部をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイド染色した結果を示した。PCRを試みた30魚種の全てで特定の領域が合成されていた。今回用いたプライマーは28SrDNA領域にあり、その塩基配列は多く

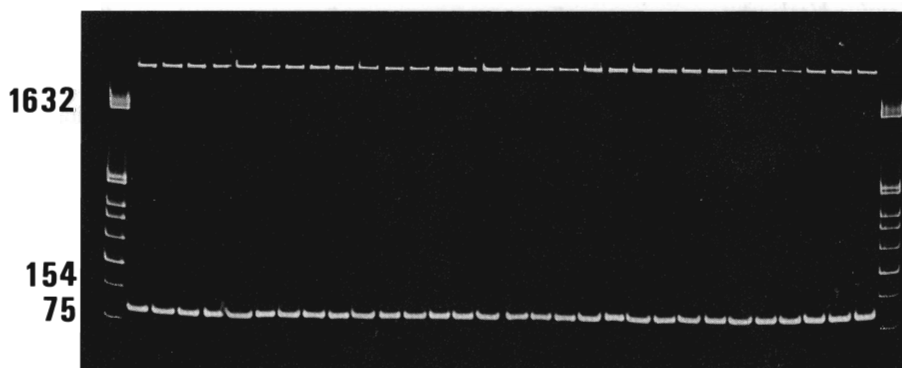


**Fig. 1.** A strategy of DNA amplification for species identification. A pair of primers—Primers A and Primers B were used to amplify the ribosomal DNA regions that contained a variable sequence in the 28S ribosomal RNA gene. Primers A, 5'-CATCTAGAAGCTGGTTCCTCCG-3'; and Primers B, 5'-CAAAGCTTCTAATCATTCGCTTTACC-3'

**Table 2.** Reagents composition of 12% acrylamide gel.

Component	Volume
20 × TBE <sup>a)</sup>	0.5 ml
50% Glycerin	2.0 ml
40% Acrylamide/bis(1 : 50)	6.0 ml
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine	10 μl
10% Ammonium persulfate	0.2 ml
Distilled water	11.3 ml

<sup>a)</sup> TBE: 1 M Tris, 20mM EDTA (3Na), 0.97 M boric acid (pH 8.2)



**Fig. 2.** Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of amplified DNA samples from blood of thirty species of fishes in Table 1 (from left to right). The samples were amplified with PCR under the strategy shown in Fig. 1. The products were separated in 12% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. The lanes of both sides are base pair markers and numbers on left side indicate base pairs of markers.

の生物種で保存性が高いと考えられている。PCRを試みた試料は12目15亜目の魚種が含まれていることから、多くの魚類においても28SrDNAに相当するDNA領域が存在することが確認された。そして、哺乳類のDNA配列を基に作られたプライマーが多く魚類でも十分に使用可能であることがわかった。

今回増幅を試みた魚類30種では、増幅されたDNAの長さに大きな差が認められなかった。これに対して高等動物の種間ではプライマーAとプライマーBに挟まれたDNAは、種間で塩基対数が変化することにより、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離できると報告されている(NAITO *et al.* 1992)。この点については今後泳動距離の長い装置を用いてより詳細に調べる必要があるだろう。

次に、魚種間における塩基配列の差異についてSSCP法により検討を行った。Figs. 3, 4, 5, 6, 7, 8はその結果を示したものである。Fig. 3はギンザケ6個体とサクラマス6個体のSSCP法を行い銀染色した泳動パターンである。同種内の個体間のみならず *Oncorhynchus* 属内の種間においても差異を検出することができなかった。Fig. 4はサケ目内のサケ科3属8種における泳動パターンである。バンドの濃淡など多少泳動パターンに差異がみられるが、バンドの位置では大きな違いはなかった。Fig. 5はカレイ目内のカレイ亜目2科6種とササウシノシタ亜目2種の泳動パターンである。サケ目と同様種間での泳動パターンには顕著な差異を認めることはできなかった。以上のSSCP電気泳動時の泳動槽の温度は25℃にコントロールさ

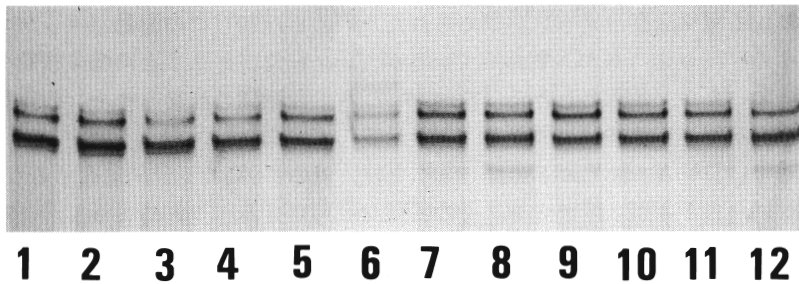


Fig. 3. Electrophoretic patterns of *Oncorhynchus kisutch* (1 to 6) and *O. masou* (7 to 12) performed with a PCR—single strand conformation polymorphism at the temperature condition of 25°C.

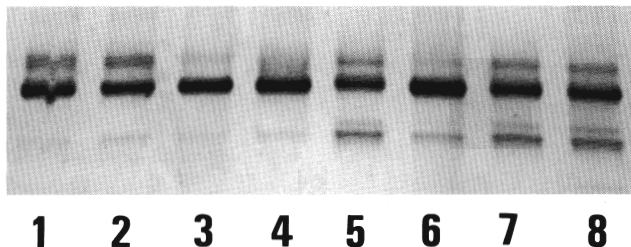


Fig. 4. Electrophoretic patterns of Salmoniformes performed with a PCR—single strand conformation polymorphism at the temperature condition of 25°C (1: *Oncorhynchus kisutch*, 2: *O. masou*, 3: *O. keta*, 4: *O. masou* (landlocked form), 5: *O. mykiss*, 6: *Salmo trutta*, 7: *Salvelinus fontinalis* and 8: *S. leucomaenis*).

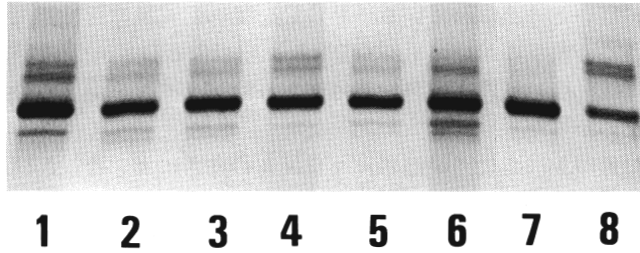


Fig. 5. Electrophoretic patterns of Pleuronectiformes performed with a PCR-single strand conformation polymorphism at the temperature condition of 25°C (1: *Paralichthys olivaceus*, 2: *Pseudorhombus pentophthalmus*, 3: *Pleuronectes herzensteini*, 4: *P. yokohamae*, 5: *Pleuronichthys cornutus*, 6: *Kareius bicoloratus*, 6: *Paraplagusia japonica*, 8: *Cynoglossus joyneri*).

れた。Fig. 6 は目又は亜目の異なる11魚種(1. サカタザメ, 2. ギンザケ, 3. トカゲエソ, 4. ドジョウ, 5. ハモ, 6. イトヨ, 7. マダイ, 8. ミシマオコゼ, 9. テラピア, 10. カジカ, 11. コモンフグ)を30°Cの一定温度でSSCP法を行ったときの泳動パターンである。11魚種間において明らかに異なる電気泳動パターンが認められた。Fig. 7 は目の異なる11魚種について25°Cで電気泳動をおこなった泳動パターンである。ここではFig. 6と魚種が異なるものがあるが11目の魚種間で明らかに異なる電気泳動パターンが認められた。Fig. 8 は20°Cでの泳動パターンである。ここではFig. 7のイトヨとコチが入替わっているが、Fig. 6及びFig. 7と同様魚種間で明らかに異なる電気泳動パターンが認められた。Figs. 6, 7, 8の魚種間の泳動パターンの差異は、増幅DNA断片の塩基配列が魚種間で異なることを示唆している。

SSCP法ではDNAを95°Cに5分間さらした後、直ちに0°Cで5分間急冷することにより、DNAを2本鎖から1本鎖に変性させ、その状態を維持させる。これによって、1本鎖それぞれが相補的結合を行いやすくなり、塩基配列の違いによって異なる高次構造を取ることになる。そしてその高次構造は1塩基の違いでも、異なる高次構造となり、それが電気泳動を行ったとき移動度の差として検出できる。このようにSSCP法は高感度であり、塩基数の小さいDN

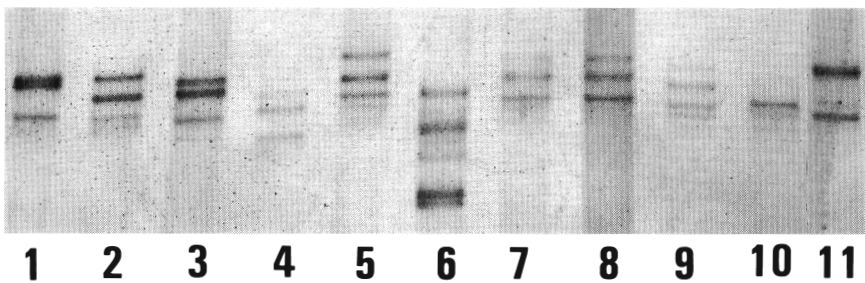


Fig. 6. PCR-SSCP electrophoretic patterns of eleven species in different orders or suborders. Electrophoresis was done at the condition of 30°C. (1: *Rhinobatos schlegelii*, 2: *Oncorhynchus kisutch*, 3: *Saurida elongata*, 4: *Misgurnus anguillicaudatus*, 5: *Muraesox cinereus*, 6: *Gastrosteus aculeatus*, 7: *Pagrus major*, 8: *Uranoscopus japonicus*, 9: *Tilapia mossambica*, 10: *Cottus pollux*, 11: *Takifugu poecilonotus*).

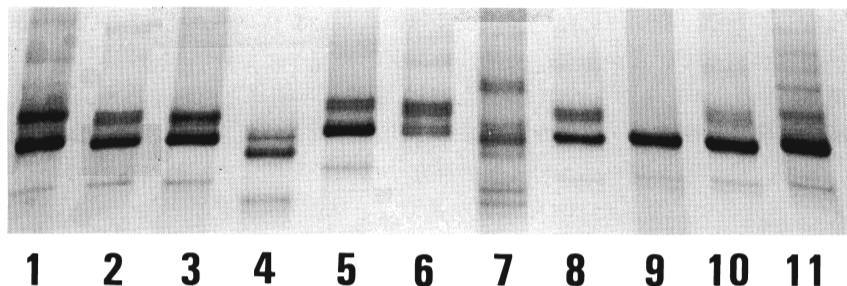


Fig. 7. PCR-SSCP electrophoretic patterns of eleven species in different orders. Electrophoresis was done at the condition of 25°C. The fishes of No. 1 to No. 5 and No. 11 are the same as those of Fig. 6. (6: *Syngnathus schlegeli*, 7: *Gastrosteus aculeatus*, 8: *Gadus macrocephalus*, 9: *Scomber japonicus*, 10: *Pleuronectes herzensteini*).

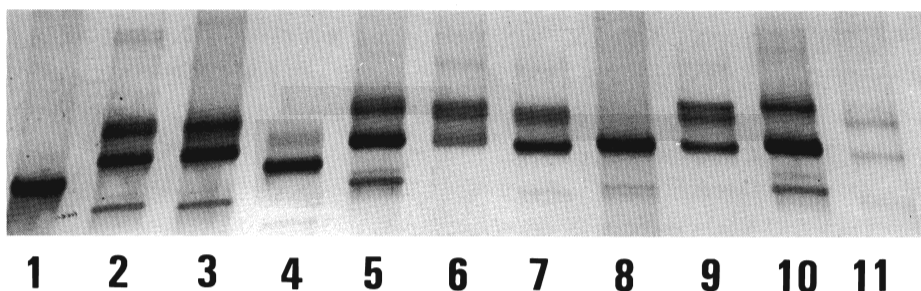


Fig. 8. PCR-SSCP electrophoretic patterns of eleven species in different orders. Electrophoresis was done at the condition of 20°C. The fishes of 1 to 5 are the same as those of Fig. 6. (6: *Syngnathus schlegeli*, 7: *Gadus macrocephalus*, 8: *Scomber japonicus*, 9: *Pleuronectes herzensteini*, 10: *Takifugu poecilonotus*, 11: *Platycephalus indicus*).

A断片の分析に適している。さらに、現在DNAの変異検出によく用いられている制限酵素断片型多型分析より操作が簡便である。しかし、変異のある場所によって検出感度が異なったり、またゲルの温度や泳動槽の塩濃度などの電気泳動条件によって異なる立体構造をとるため泳動パターンが変化するといわれている。Figs. 6, 7, 8の結果からもこのことが確かめられた。今回、SSCP法によってバンドの位置に明らかな違いが認められたのは、目間レベルの魚種間においてであった。しかし、亜目間だけでなく属間や科間でも泳動パターンが完全に一致していたわけではない。このことから、目間より近縁関係にある魚種間でも差異が存在する可能性も否定できない。さらに、より近い類縁関係や生物進化などの観点からの研究には、増幅DNAの配列解析による検討が必要と考える。

今回PCRの材料となったDNAは1ngと非常に微量であった。このことは形態分類からでは種の同定の難しい魚類の卵や稚仔などの微小な検体でも、種判別に適したDNA領域を増幅することにより、新しい種判別法の開発の可能性が示された。このことに関連して、張・WALSH\*はフェダイ類の受精卵及びふ化仔魚の微量なミトコンドリアDNAを増幅し、種判別が可能で

\*張 成年・WALSH, P. J. 魚類卵稚仔の種判別に対するPCR法の有効性. 平成3年度日本水産学会春季大会要旨, 89.

あったと報告している。今回用いた増幅領域は魚類において目レベルでの判別に有効であったが、種レベルの判別はできなかった。水産の資源解析研究等において種や系統レベルでの判別が重要である。この点からみると今回の増幅 DNA 領域は不適當と思われる。しかし、大きな生物進化の解析や卵稚仔調査のような種々雑多の不明種を調査対象とする場合には、まず大きな篩い分けとして、目や亜目間レベルで変異の存在する DNA 領域の解析は有効であると考えられる。つまり、研究目的に合った DNA 領域を選ぶことにより、従来の形態分類とは異なった遺伝情報によるものさしが確立できると考えられる。今後、PCR法をもちいたDNA解析による新しい卵稚仔調査法の開発・確立をはかるためには、生物種間でDNA塩基配列の保存性の高い領域及び種特異的な変異性の高い領域の検索が必要と考える。

## 要 約

魚類血液から抽出したDNAを材料としてPCR法によりDNAの増幅を試み、その変異性を調べ、種判別法への応用の可能性を検討した。

- ①今回、PCR法で増幅した領域は、28SリボソームRNAをコードする遺伝子の塩基配列から設計・合成されたプライマーであるが、多くの魚類においてうまく増幅することができた。
- ②このことは、魚類においても28SリボソームDNA領域が存在し、広い生物種間で共通性の高い領域であることが確かめられた。
- ③28SリボソームDNA領域の変異解析では、目間レベルの魚種判別が可能であった。
- ④極めて微量なDNAで分析が可能であったことから、卵や稚仔など形態からの同定の難しい個体における、新しい魚種判別法の開発の可能性が示された。

## 文 献

- 原 素之・出羽厚二・内藤笑美子・山内春夫 (1993) 非放射性プローブを用いたヒラメDNAフィンガープリント。日水研報告, (43), 117-123.
- 林 健志 (1990) PCR法を用いたDNA多型の新しい検出法。蛋白 核酸 酵素, **35**, 3085-3090.
- NAITO, E., DEWA, K., YAMANOUTI, H. and KOMINAMI, R. (1992) Ribosomal ribonucleic acid (rDNA) gene typing for species identification. *J. Forensic Sci.*, **37**, 396-403.
- SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. HORN, G., ERLICH, H. A. and AMHEIM, N. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.