

DNA 分析による魚類の判別

河嶋 優美*, 片山 貴之*, 山崎 幸彦*

Identification of Fish Species using DNA Method

Yuumi KAWASHIMA*, Takayuki KATAYAMA* and Yukihiro YAMAZAKI*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan

Identification of fish species is necessary for customs work such as HS classification. However, it is sometimes difficult to identify the species based on morphological appearance because most of the morphological information is removed during the manufacturing process. Therefore, we studied to identify species of fish by phylogenetic analysis using the mitochondrial DNA gene encoding 16S rRNA region and cytochrome b region. The results showed the possibility of identifying fish species at the family level.

1. 緒 言

HS 条約（商品の名称及び分類についての統一システムに関する国際条約）の 2012 年改正に伴い、関税率表第 3 類の魚類は、新たに目、科、属及び種ごとに号が細分化される予定である。また、一部の魚種は輸入貿易管理令により輸入数量が制限されているため、輸入通関の際に魚種の確認が必要となる。

輸入時において完全な形態を保持した成魚であれば、形態学的な知見より魚種の判別は可能である。しかし、切り身等の加工品として輸入された場合、形態上の情報が少ないため、目視による魚種の判別は困難となる場合がある。このため、魚種の判別法として形態上の情報を必要としない DNA 分析が有用と考えられる。

近年、特定の属や種を対象とした DNA 分析による魚種の判別法が報告されている^{1)~3)}。しかし、各報告におけるプライマーは属や種に個別に対応したものであり、新たに取り扱う魚種や未知試料に対しては、都度、プライマーを検討する必要がある。

そこで本研究では、第 3 類に分類される魚類全般を対象とし、

単一のプライマーを用いた DNA 分析により魚種の判別が可能か検討を行った。魚種判別の指標には、DDBJ（DNA Data Bank of Japan）において広範な魚種の塩基配列情報が多数登録されているミトコンドリア DNA の 16S rRNA 後半領域及び Cytochrome b 前半領域を利用した。また、16S rRNA 領域及び Cytochrome b 領域の塩基配列データを用いた分子系統解析により、魚類の近縁関係を調べ、魚類を目、科、属及び種のいずれのレベルまで判別することが可能か検討した。

2. 実 験

2.1 試 料

試料は、事前に形態学的な知見から魚種の査証が行われた関税中央分析所が保有する標準品及び市販品である。また、一部の標準魚種の塩基配列データは、DDBJ（DNA Databank of Japan）よりダウンロードしたものである。各々の詳細については、Table 1 及び Table 2 に示す。

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

Table 1 Collected sample list used in this study

Order	Family	Scientific name	Order	Family	Scientific name
Anguilliformes	Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i> <i>Conger myriaster</i> <i>Muraenesox cinereus</i>	Perciformes	Scombridae	<i>Katsuwonus pelamis</i> <i>Scomber australasicus</i> <i>Scomber japonicus</i> <i>Scomber scombrus</i> <i>Scomberomorus niphonius</i> <i>Thunnus alalunga</i> <i>Thunnus albacares</i> <i>Thunnus maccoyii</i> <i>Thunnus obesus</i> <i>Thunnus orientalis</i> <i>Thunnus thynnus</i> <i>Dentex abei</i> <i>Pagrus major</i> <i>Rhabdosargus sarba</i> <i>Sphyrna pinguis</i> <i>Peprilus alepidotus</i> <i>Trichiurus japonicus</i> <i>Xiphias gladius</i>
Aulopiformes	Synodontidae	<i>Saurida elongata</i>		Sparidae	<i>Atheresthes evermanni</i> <i>Glyptocephalus stelleri</i> <i>Hippoglossoides elassodon</i> <i>Pleuronichthys cornutus</i> <i>Reinhardtius hippoglossoides</i> <i>Cynoglossus lighti</i> <i>Cynoglossus oligolepis</i> <i>Paralichthys olivaceus</i> <i>Oncorhynchus keta</i> <i>Oncorhynchus kisutch</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Salmo salar</i> <i>Salangichthys ishikawae</i> <i>Salangichthys microdon</i>
Beloniformes	Scomberesocidae	<i>Cololabis saira</i>		Stromateidae	<i>Scorpaena elongata</i> <i>Sebastes marinus</i> <i>Sebastiscus marmoratus</i> <i>Pangasius sutchi</i> <i>Stephanolepis cirrhifer</i> <i>Thamnaconus modestus</i> <i>Lagocephalus gloveri</i> <i>Lagocephalus inermis</i> <i>Lagocephalus lunaris</i> <i>Lagocephalus wheeleri</i> <i>Sphoeroides pachygaster</i> <i>Takifugu chinensis</i> <i>Takifugu chrysops</i> <i>Takifugu pardalis</i> <i>Takifugu poecilonotus</i> <i>Takifugu rubripes</i> <i>Takifugu stictonotus</i> <i>Takifugu vermicularis</i> <i>Takifugu xanthopterus</i> <i>Diodon holocanthus</i> <i>Diodon hystrix</i>
Clupeiformes	Hemiramphidae	<i>Hyporhamphus sajori</i>		Trichiuridae	
	Clupeidae	<i>Clupea pallasii</i> <i>Etrumeus teres</i> <i>Ilisha elongata</i> <i>Konosirus punctatus</i> <i>Sardinella zunasi</i> <i>Sardinops melanostictus</i> <i>Sardinops sagax</i> <i>Spratelloides gracilis</i> <i>Coilia nasus</i> <i>Encrasicholina heteroloba</i> <i>Engraulis japonicus</i> <i>Engraulis mordax</i> <i>Carassius carassius</i> <i>Cyprinus carpio</i> <i>Pseudorasbora parva</i> <i>Boreogadus saida</i> <i>Eleginus gracilis</i> <i>Gadus morhua</i> <i>Micromesistius australis</i> <i>Micromesistius poutassou</i> <i>Theragra chalcogramma</i> <i>Macruronus novaezealandiae</i> <i>Merluccius australis</i> <i>Merluccius gayi</i> <i>Laemonema longipes</i> <i>Lampris guttatus</i> <i>Dasyatis akajei</i> <i>Doederleinia berycoides</i> <i>Branchiostegus albus</i> <i>Decapterus maruadsi</i> <i>Seriola dumerilii</i> <i>Seriola lalandi</i> <i>Seriola quinqueradiata</i> <i>Trachurus japonicus</i> <i>Hyperoglyphe japonica</i> <i>Psenopsis anomala</i> <i>Oreochromis mossambicus</i> <i>Girella punctata</i> <i>Parapristipoma trilineatum</i> <i>Makaira indica</i> <i>Lates niloticus</i> <i>Nemipterus bathybius</i> <i>Lateolabrax japonicus</i> <i>Johnius belengerii</i> <i>Epinephelus bruneus</i> <i>Triso dermopterus</i>		Xiphiidae	
			Pleuronectiformes	Pleuronectidae	
Cypriniformes	Cyprinidae			Cynoglossidae	
Gadiformes	Gadidae			Paralichthyidae	
			Salmoniformes	Salmonidae	
	Macruronidae			Salangidae	
	Merlucciidae		Scorpaeniformes	Scorpaenidae	
Lampridiformes	Moridae				
Myliobatiformes	Lampridae		Siluriformes	Pangasiidae	
Perciformes	Dasyatidae		Tetraodontiformes	Monacanthidae	
	Acropomatidae			Tetraodontidae	
	Branchiostegidae				
	Carangidae				
	Centrolophidae				
	Cichlidae				
	Girellidae				
	Haemulidae				
	Istiophoridae				
	Latidae				
	Namipteridae				
	Percichthyidae				
	Sciaenidae				
	Serranidae				

Table 2 Standard sample data of DDBJ used in this study

Order	Family	Scientific name	16S	Cytb
Beloniformes	Scomberesocidae	<i>Cololabis saira</i>	AP002932	AP002932
Clupeiformes	Clupeidae	<i>Clupea pallasii</i>	AB126386	AB126386
		<i>Dorosoma cepedianum</i>	DQ536426	DQ536426
		<i>Engraulis encrasicolus</i>	AP009137	AP009137
		<i>Engraulis japonicus</i>	AB040676	AB040676
		<i>Sardina pilchardus</i>	AP009233	AP009233
		<i>Sardinops melanostictus</i>	AB032554	AB032554
Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Aristichthys nobilis</i>	EU343733	EU343733
		<i>Bhria zezera</i>	AB250107	AB250107
		<i>Camptostoma anomalum</i>	DQ536421	DQ536421
		<i>Carassius auratus auratus</i>	AB111951	AB111951
		<i>Carassius carassius</i>	AY714387	AY714387
		<i>Carassius curvieri</i>	AB045144	AB045144
		<i>Chondrostoma lemmingii</i>	DQ536427	DQ536427
		<i>Ctenopharyngodon idella</i>	EU391390	EU391390
		<i>Cyprinella spiloptera</i>	DQ536422	DQ536422
		<i>Danio rerio</i>	AC024175	AC024175
		<i>Gila robusta</i>	DQ536424	DQ536424
		<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	EU315941	EU315941
		<i>Megalobrama amblycephala</i>	EU434747	EU434747
		<i>Notropis stramineus</i>	DQ536429	DQ536429
		<i>Opsariichthys bidens</i>	DQ367044	DQ367044
		<i>Phenacobius mirabilis</i>	DQ536431	DQ536431
		<i>Procypris rabaudi</i>	EU082030	EU082030
		<i>Pseudopungtungia nigra</i>	EU597300	EU597300
		<i>Sinocyclocheilus altishouderus</i>	FJ984568	FJ984568
		<i>Sinocyclocheilus grahami</i>	GQ148557	GQ148557
Gadiformes	Gadidae	<i>Boreogadus saida</i>	DQ356936	DQ356936
		<i>Gadus morhua</i>	AM489716	AM489716
		<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	AM489717	AM489717
		<i>Theragra chalcogramma</i>	AB094061	AB094061
		<i>Theragra finnmarchica</i>	AM489718	AM489718
		<i>Silurus microdonalis</i>	DQ321756	DQ321756
		<i>Oncorhynchus clarkii henshawii</i>	AY886762	AY886762
		<i>Oncorhynchus masou formosanus</i>	DQ858456	DQ858456
		<i>Oncorhynchus masou masou</i>	DQ864465	DQ864465
		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	DQ288268	DQ288268
		<i>Oncorhynchus nerka</i>	EF055889	EF055889
		<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	AF392054	AF392054
		<i>Salmo salar</i>	AF133701	AF133701
		<i>Salmo trutta</i>	AM910409	AM910409
		<i>Thymallus arcticus</i>	FJ872559	FJ872559
		<i>Thymallus thymallus</i>	FJ853655	FJ853655
Perciformes	Carangidae	<i>Trachurus trachurus</i>	AB108498	AB108498
	Cichlidae	<i>Oreochromis niloticus</i>	GU238433	GU238433
	Istiophoridae	<i>Tetrapturus sudax</i>	AB470302	AB470302
		<i>Xiphias gladius</i>	AB470301	AB470301
	Rachycentridae	<i>Rachycentron canadum</i>	FJ154956	FJ154956
	Scombridae	<i>Axodus rochei</i>	AB103467	AB103467
		<i>Euthynnus alletteratus</i>	AB099716	AB099716
		<i>Scomber scombrus</i>	AB120717	AB120717
		<i>Scomberomorus cavalla</i>	DQ536428	DQ536428
		<i>Thunnus alalunga</i>	AB101291	AB101291
		<i>Thunnus orientalis</i>	AB185022	AB185022
		<i>Thunnus thynnus</i>	AY302574	AY302574
		<i>Katsuwonus pelamis</i>	AB101290	AB101290
	Xiphidae	<i>Istiophorus platypterus</i>	AB470306	AB470306
		<i>Makaira indica</i>	AB470305	AB470305
		<i>Makaira mazara</i>	AB470304	AB470304
		<i>Tetrapturus angustirostris</i>	AB470303	AB470303
Pleuronectiformes	Cynoglossidae	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	EU366230	EU366230
	Pleuronectidae	<i>Platichthys stellatus</i>	EF424428	EF424428
		<i>Verasper moseri</i>	EF025506	EF025506
		<i>Verasper variegatus</i>	DQ403797	DQ403797
	Scophthalmidae	<i>Psetta maxima</i>	EU419747	EU419747
	Soleidae	<i>Solea senegalensis</i>	AB270760	AB270760

2.2 試薬及び分析装置

DNA 抽出試薬 : DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN)

PCR 増幅装置 : Gene Amp PCR System9700
(Applied Biosystems)

電気泳動装置 : BE-580 (Bio Claft)

画像解析装置 : BIO-PROFILE System2
(VILBER LOURMAT)

塩基配列解析装置 : 3130 XL Genetic Analyzer
(Applied Biosystems)

プライマー :

16S rRNA 領域¹⁾

Herring16S R 5'-YAYTCGGTCTTTTCGTACT-3'

Herring16S F 5'-TTTACCAAAAACATCGCCTC-3'

Cytochrome b 領域²⁾

Gad_Cytb R 5'-GCYCCTCAGAATGAYATTTGTCTC-3'

Gad_Glu F 5'-AAGCCACTGTTGTAATTCAACTA-3'

(Y=C, T)

2.3 実験

各試料からの DNA 抽出は、10 mg 程度の筋肉片から DNeasy Blood & Tissue Kit に添付のプロトコールに従い行った。

DNA 抽出を電気泳動法により確認した後、ミトコンドリア DNA 上の 16S rRNA 領域及び Cytochrome b 領域の一部を PCR 法により増幅した (Fig.1,2)。PCR 反応のプライマーは、赤崎ら^{1),2)}によって広範な魚種の 16S rRNA 領域及び Cytochrome b 領域が増幅可能となるよう設計されたものを使用した。PCR 反応溶液は、鋳型 DNA : 約 100 ng、プライマー : 各 5 pmol、dNTP mixture (2.5 mM each) : 2.4 µl、10×Ex-Taq buffer : 3.0 µl、Ex-Taq (5.0 Unit/µl) : 0.15 µl、滅菌水 : (合計 30 µl に調製) とした。PCR 反応条件は、Herring16S R-Herring16S F プライマーセットでは、熱変性 (94°C、5 分) を行った後、denature (94°C、30 秒)、annealing (48°C、1 分)、extension (72°C、1 分) を 35 回繰り返し、Final extension (72°C、5 分) を行うよう設定した。一方、Gad_Cytb R-Gad_Glu F プライマーセットでは、熱変性 (94°C、5 分) を行った後、denature (94°C、30 秒)、annealing (50°C、1 分)、extension (72°C、1 分) を 35 回繰り返し、Final extension (72°C、5 分) を行うよう設定した。PCR 産物は、電気泳動法により DNA の増幅を確認した。

サイクルシーケンス反応は、PCR 産物をイソプロパノール沈殿により精製し、BigDye Cycle Sequencing Kit Ver3.1 添付のプロトコールに従い、PCR 反応と同じ各プライマーを用いて、5'側及び 3'側の両方向分の反応を行った。反応後、エタノール沈殿により未反応色素を除去し、塩基配列解析装置により両方向から PCR 産物の塩基配列を決定した。得られた塩基配列データ及び DDBJ に登録されている塩基配列データを用いて相互比較によるアライメント後、近隣結合法により分子系統解析を行った。

```

TAAGGAAAGACTAAAAAGAAAGGAACTCGGCAACATACCAAGCCT
CGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCATTGCAAAACAAAGAATAAGAGGTC
CAGCCTGCCCTGTGACTATATGTTTAAACGCGCCGCGGTATTTAACCGTGC
GAAGGTAGCGCAATCACTTGTCCTTTTAAATGGAGACCTGTATGAATGGCAT
TACGAGGGCTTAACGTCTCCTTTTCTAGTCAGTGAAATTGATCTCCCCG
TGCAGAGACCGGGATATAACCAAGACGAGAAGACCTATGGAGCTTTA
GACACCAAGGCATATCATGTCAAACACCCCTAAACAAAGGACTAAACAAA
TGAATTATGCCCCCATGTCTTTGGTTGGGCGACCGCGGGGAAATAAAAA
ACCCCAAGTGGGAGTACTACCTCTACAACCAAGAGCTGCAGCT
CTAAAGAACAGAATATCTGACCAATAAGATCCGGCAACGCCGATCAACGG
ACCGAGTTACCTAGGGATAACAGCGCAATCCCTTTTAGAGCCCATATC
GACAAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGC
AGCCGCTGTTAAGGGTTCGTTTGTTCACAGATTAAAGTCTACGTGATCTG
AGTTTCAGACCGGAGTGATCCAGGTCAAGTTTCTATCTATGATATGTTCTTTT
CTAGTACGAAAGGACCGAAAAGAGAGGCCAATGCTAAAAGCACGCCCTC
ACCCCTCCTATTGAAAACAACTAAATAGGCAAAAGGCATACCCCTCCAC

```

Fig.1 Location of primers in the 16S rRNA region (mitochondrial DNA) from *Thunnus alalunga*

GGATTTTAACCAAGGACTAATGGCTTGAAAAACACCGTTGTAATTCACCTA
 CAAGAACCCTAATGGCAAGCCTCCGAAAACTCACCGCTACTAAAAATCG
 CTAACGACGCACTAGTTGACCTCCCTACCCCTCTAATATCTCTGCATGAT
 GAAACTTTGGCTCACTACTTTGGCCTTTGCCTTATTCTCAAATCCTTACAGG
 ACTATTCTCGCAATACACTATACCCCTGATGTCGAATCAGCCTTCGCCTCA
 GTAGCCACATTTGCCGAGATGTCAACTTCGGTTGACTCATCCGGAACCTC
 CAGGCAAAACGGGGCCTCTTTCTTTTATCTGCATCTACTCCACATCGGC
 CGAGGCCTTTACTACGGCTCTTACCTGTACAAAGAAACATGAAACATCGGA
 GTAGTACTCTACTTCTAGTTATGATGACCGCCTTCGTTGGCTACGCTCTTC
 CCTGAGGACAAATGTCCTTCTGAGGAGCTACCGTCATTACTAACCTCCTAT

Glu-F
Cytb-R

Fig.2 Location of primers in the cytochrome b region (mitochondrial DNA) from *Thunnus alalunga*

3. 結果及び考察

3.1 電気泳動法によるDNAの増幅確認

各魚種の試料からDNAを抽出し、PCR法により増幅した生成物について、16S rRNA領域の電気泳動図をFig.3、Cytochrome b領域の電気泳動図をFig.4に示す。電気泳動図において、16S rRNA領域では約600 bpに単一のバンドが確認された。また、Cytochrome b領域では約400 bpにバンドが確認されたが、アナゴ、ナイルパーチ及びバリセンボンは目的領域以外の増幅も認められた。

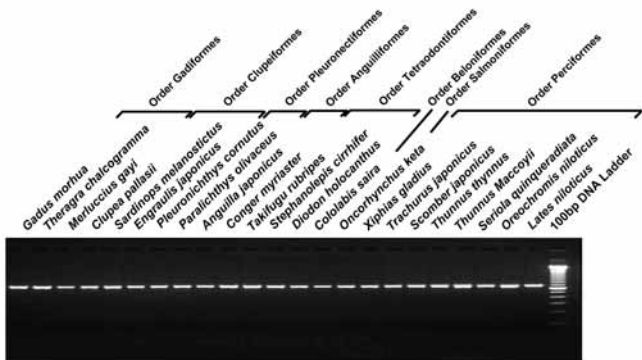


Fig.3 Electrophoresis of PCR products in 16S rRNA partial region
 Electrophoresis was performed on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

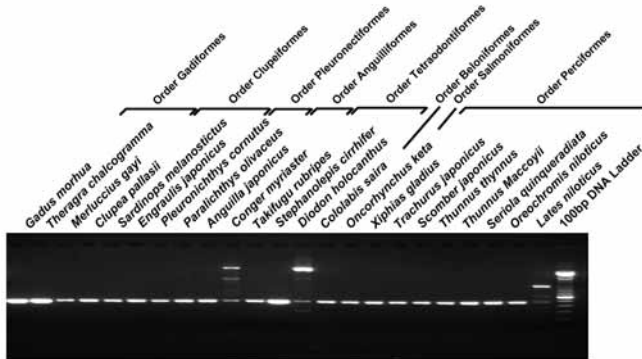


Fig.4 Electrophoresis of PCR products in cytochrome b partial region
 Electrophoresis was performed on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

3.2 分子系統解析

電気泳動法により単一のバンドが確認された各魚種のPCR産物は、塩基配列解析装置により塩基配列を決定した。決定した16S rRNA領域及びCytochrome b領域の塩基配列並びにDDBJに登録されている魚種の塩基配列データを用いて分子系統解析を行った。

まず、14目から任意に抽出した25種を用いて、16S rRNA領域及びCytochrome b領域における分子系統解析を行った結果、いずれの領域においても目レベルで独立したクラスターを形成した(Fig.5, Fig.6)。また、スズキ目(order Perciformes)、ニシン目(order Clupeiformes)、タラ目(order Gadiformes)、フグ目(order Tetraodontiformes)、サケ目(order Salmoniformes)及びカレイ目(order Pleuronectiformes)の各目について分子系統解析を行った結果、いずれの領域においても科レベルで独立したクラスターの形成を確認した。例として、HS条約改正に伴い新たに号が設けられる予定の多数の魚種が属するスズキ目における分子系統樹をFig.7及びFig.8に示す。

次に、標準品及びDDBJの塩基配列データが充実しているスズキ目サバ科(family Scombridae)、ニシン目ニシン科(family Clupeidae)、サケ目サケ科(family Salmonidae)及びコイ目コイ科(family Cyprinidae)について分子系統解析を行った結果、いずれの領域においても属レベルで独立したクラスターの形成を確認した。例として、IQ品目に該当するサバ及びマグロ等が属するスズキ目サバ科における分子系統樹をFig.9及びFig.10に示す。

さらに、スズキ目サバ科マグロ属(genus *Thunnus*)を用いて分子系統解析を行ったところ、16S rRNA領域では異種間で単一のクラスターを形成するため、種レベルでの判別は困難であったのに対し、Cytochrome b領域では、種ごとに独立したクラスターの形成が認められた(Fig.11)。今後、漁獲場所や採取時期の異なる同一種の塩基配列データを蓄積し、Cytochrome b領域における分子系統解析を行うことが、マグロ属の種レベルでの判別に有効な手段となる可能性が示唆された。

本研究では、Cytochrome b領域における一部の魚種を除き、単一のプライマーにより目的領域を増幅し、塩基配列の決定が可能となった。また、決定した塩基配列を用いて分子系統解析を行ったところ、少なくとも科レベルでの魚種の推定が可能であることが示唆された。しかし、今回入手できていない魚種について、本研究で使用したプライマーを用いて、PCR法により各領域の増幅が可能か検証する必要がある。また、Cytochrome b領域で目的領域のみを増幅できなかった一部魚種は、新たなプライマーの設計を行うことで、対応可能になると考える。今後、更なる検体の収集を行い、塩基配列データを蓄積することにより、より正確な魚類の判別が可能になると考えられる。

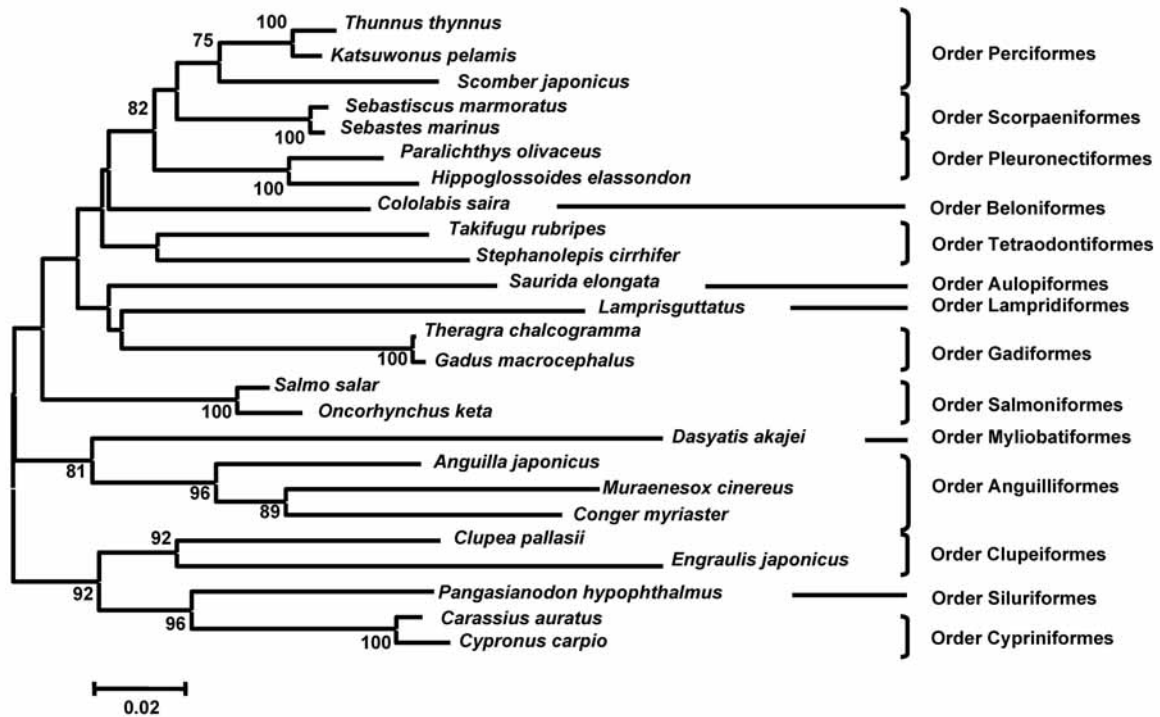


Fig.5 Phylogenetic tree among 25 fishes based on the sequence of mitochondrial 16S rRNA gene. Bootstrap values >70% are reported on the nodes of the tree (bootstrap replications = 1000).

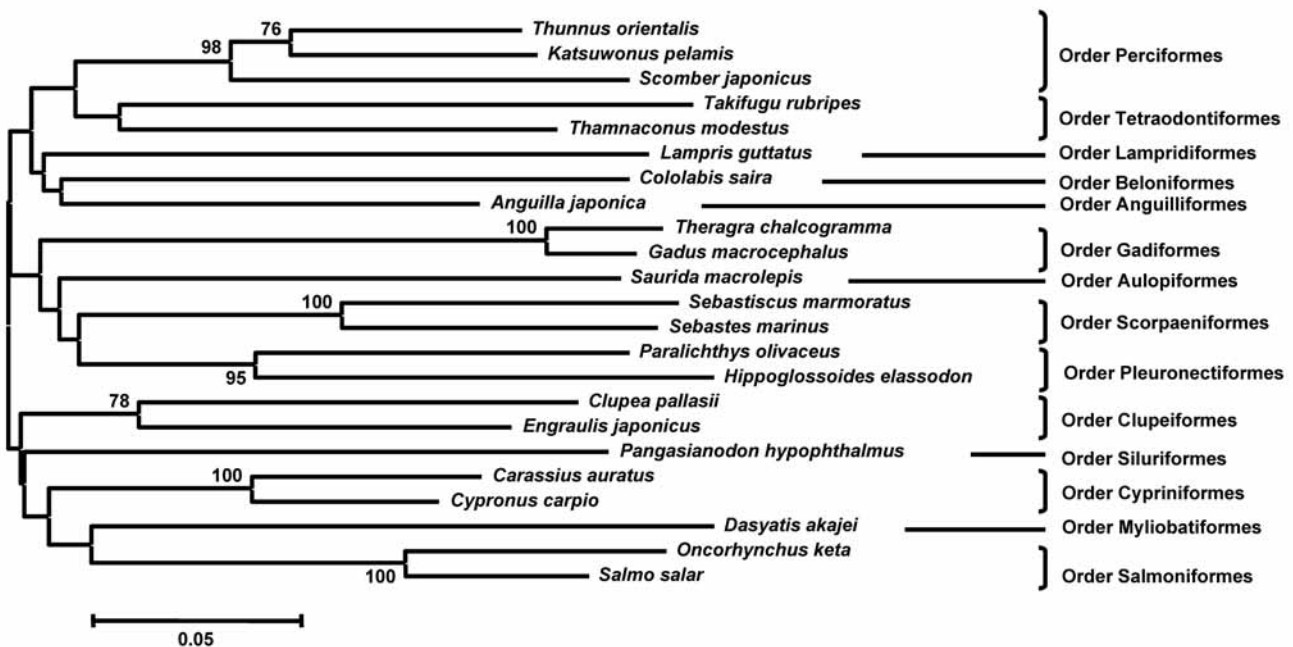


Fig.6 Phylogenetic tree among 23 fishes based on the sequence of mitochondrial cytochrome b gene. Bootstrap values >70% are reported on the nodes of the tree (bootstrap replications = 1000).

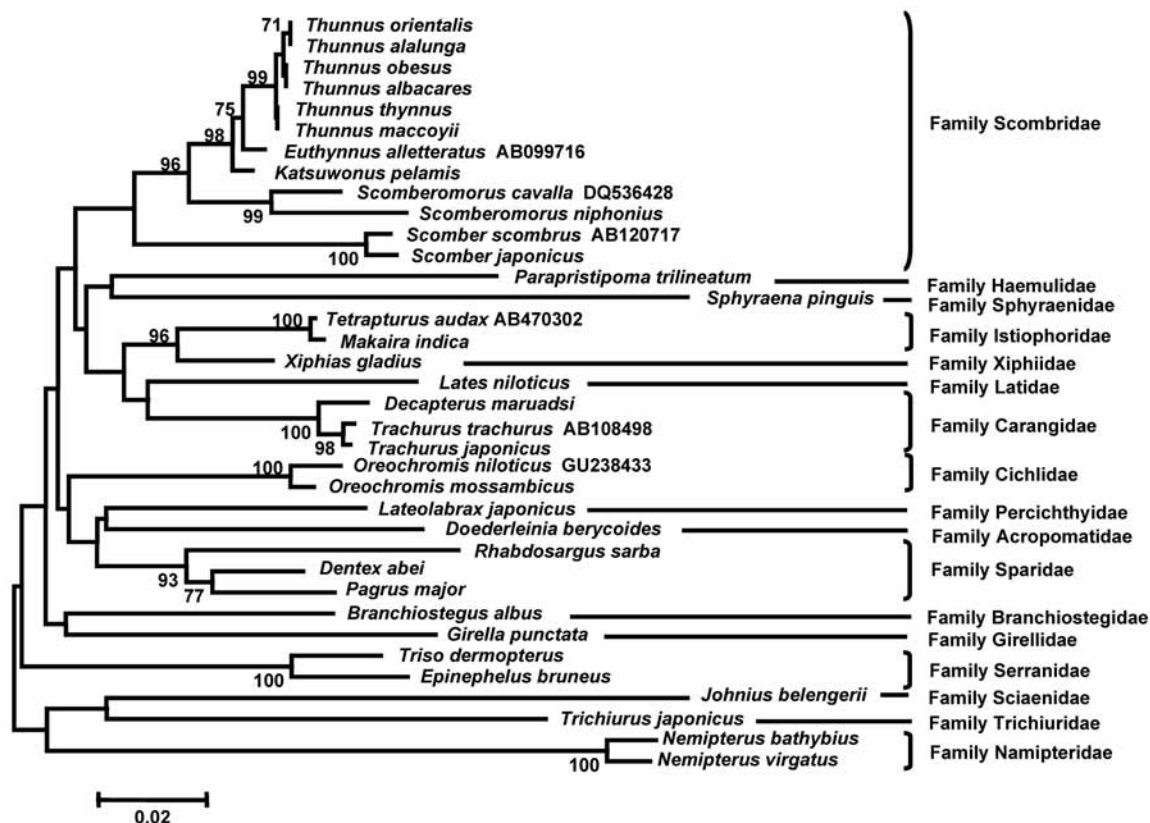


Fig.7 Phylogenetic tree among order Perciformes species based on the sequence of mitochondrial 16S rRNA gene
Bootstrap values >70% are reported on the nodes of the tree (bootstrap replications = 1000).

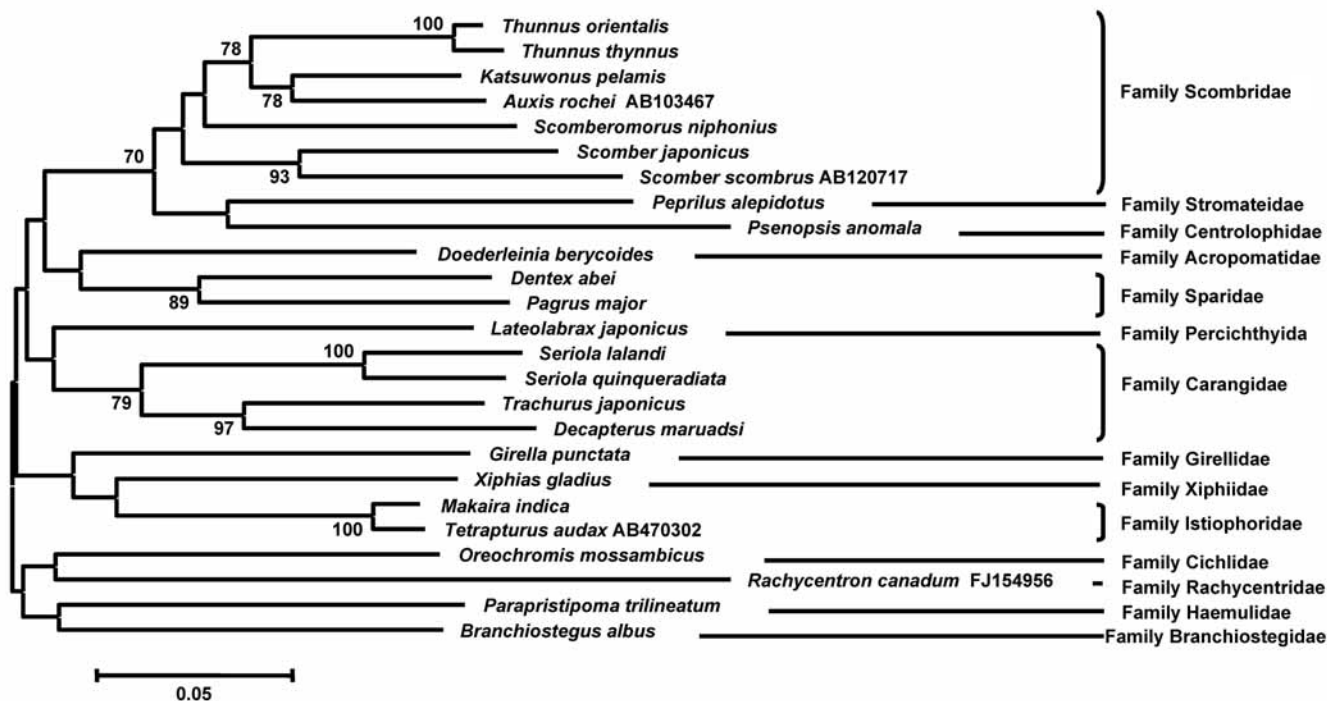


Fig.8 Phylogenetic tree among order Perciformes species based on the sequence of mitochondrial cytochrome b gene
Bootstrap values >70% are reported on the nodes of the tree (bootstrap replications = 1000).

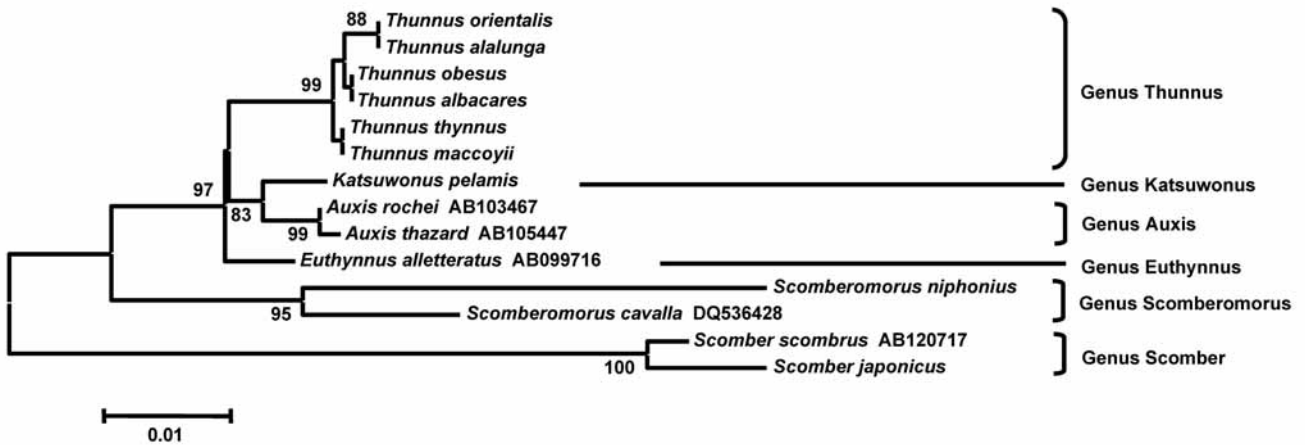


Fig.9 Phylogenetic tree among family Scombridae species based on the sequence of mitochondrial 16S rRNA gene
Bootstrap values >70% are reported on the nodes of the tree (bootstrap replications = 1000).

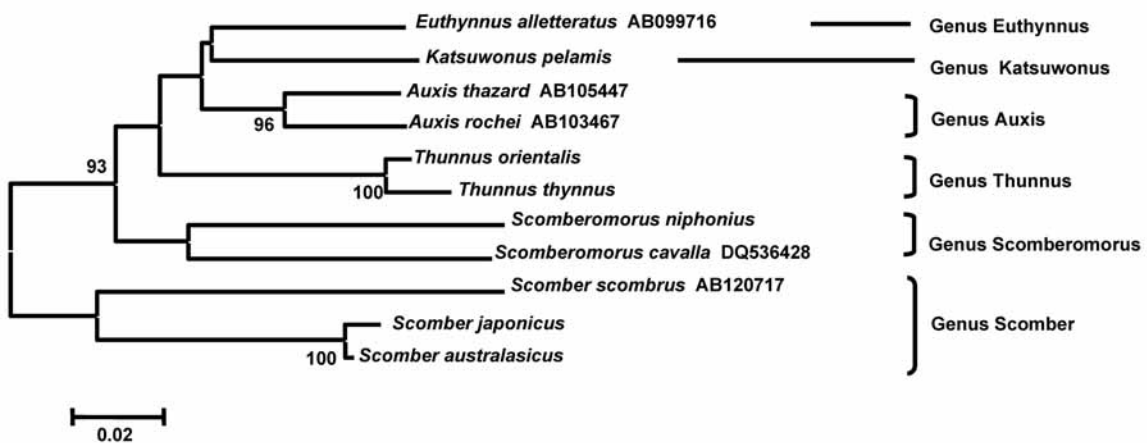


Fig.10 Phylogenetic tree among family Scombridae species based on the sequence of mitochondrial cytochrome b gene
Bootstrap values >70% are reported on the nodes of the tree (bootstrap replications = 1000).

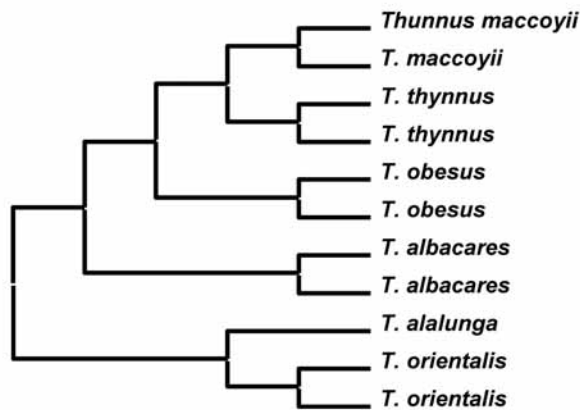


Fig.11 Phylogenetic tree among genus *Thunnus* species based on the sequence of mitochondrial cytochrome b gene

4. 要 約

関税率表第3類に分類される広範な魚種に対応可能なDNA分析法を検討した。16S rRNA領域では今回使用した全ての魚種に対して目的領域の増幅が可能となった。また、Cytochrome b領域

では一部魚種を除いて目的領域の増幅が可能となった。塩基配列解析装置により塩基配列を決定し、分子系統解析を行うことで少なくとも科レベルでの魚種の推定が可能となった。

文 献

- 1) T.Akasaki, T.Saruwatari, H.Tomonaga, S.Sato and Y.Watanabe: *Fisheries Sci.*, **72**, 686 (2006).
- 2) T.Akasaki, T.Yanagimoto, K.Yamakami, H.Tomonaga and S.Sato: *J. Food Sci.*, **71**, C190 (2006).
- 3) M.Jerome, C.Lemaire, V.Verrez-Bagnis and M.Etienne: *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7326 (2003).