

DNA 分析によるヨーロッパウナギの判別

五十嵐 智大*, 竹元 賢治*, 片山 貴之*

Identification of European eel by DNA analysis

Tomohiro IGARASHI*, Kenji TAKEMOTO* and Takayuki KATAYAMA*

* Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

European eel (*Anguilla anguilla*) is listed in the “Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora” (CITES) appendix II. On the contrary, other *Anguilla* spp., for example, Japanese eel (*Anguilla japonica*) and American eel (*Anguilla rostrata*), are not listed in the CITES appendices. When importing items that are listed in the CITES appendices, importers must obtain in advance a certificate from the country of export. Therefore, it is important to distinguish between *Anguilla anguilla* and other *Anguilla* spp. to ensure appropriate customs procedures. In this study, we focused on interspecies variations among *Anguilla* spp. in mitochondrial DNA, and investigated a method to distinguish *Anguilla anguilla* from other *Anguilla* spp.

1. 緒 言

うなぎは、ウナギ属に属する魚の総称であり、日本では広く食されている。ウナギ属は全16種からなり¹⁾、そのうち食用として用いられている種は、ニホンウナギ、アメリカウナギ、ヨーロッパウナギ、オオウナギ等がある。

ウナギ属の種のうちヨーロッパウナギは、ワシントン条約附属書IIに記載されており²⁾、輸入の際にはワシントン条約に基づく輸出国の輸出証明書を必要とする。一方、その他のウナギ属の種は、ワシントン条約の附属書に記載が無く、輸出証明書を必要としない。このため、輸出証明書を所持していない者がヨーロッパウナギをその他のウナギと偽って申告する恐れがあり、輸入申告の際にはヨーロッパウナギか否かを識別する必要がある。

ウナギ属の種を形態学的に識別する際には、専門的知識が必要となる。また、輸入されるウナギの多くは調理済の状態で輸入され、全形を確認することができないため、形態学的な識別は困難である。形態学的特徴に基づく種の識別が困難な場合、生物の遺伝情報に着目したDNA分析が有効である。現状、輸入申告されたウナギについては、DNA分析により特定領域の塩基配列を解析することで種の識別を行っている。塩基配列解析による手法は、精度が高い識別を行うことが可能である一方で、高価な試薬と煩雑な前処理を必要とするため、種の識別には長時間を要する。このことから、塩基配列解析と比較してより迅速で簡易な手法の開発が求められている。

塩基配列解析よりも簡易な手法としては、PCR-RFLP法がある³⁾。この手法は、PCRにより対象となる領域のDNAを増幅したのち、制限酵素を用いてPCR産物を切断し、種によって制限酵素を用いた際の切断辺長多型（フラグメントパターン）が異なることを利用して種を判別する手法であるが、制限酵素を用いた処理及びフラグメントパターン

を確認するための電気泳動に時間を要する。その他の手法として、種特異的なプライマーを用いてPCRを行い、増幅の有無により種を判別する手法がある。この手法は、過去にWatabeら⁴⁾がニホンウナギとヨーロッパウナギの判別を行っているが、ヨーロッパウナギとアメリカウナギ等その他のウナギの種との判別は、検討されていない。

本研究では、ウナギ属のミトコンドリア DNA において、種間変異の存在する塩基配列に着目し、ヨーロッパウナギに特異的な配列をプライマーとして設計して用いることで、PCR による判別が可能か検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

ウナギ属3種類

ヨーロッパウナギ (*Anguilla anguilla*) 17検体

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) 20検体

アメリカウナギ (*Anguilla rostrata*) 15検体

2.2 試 薬

DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN社製)

TaKaRa Ex Taq™ (タカラバイオ社製)

プライマー (シグマ - アルドリッチ社製)

ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems社製)

2.3 装 置

PCR増幅装置 : GeneAmp® PCR System 9700 (Life technologies社製)

DNAシーケンサー : 3500XL Genetic Analyzer (Life technologies社製)

* 財務省関税中央分析所 〒272-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

動を行った後、画像解析装置で確認した。

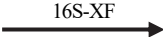
3. 結果及び考察

3.1 種特異的プライマーを用いたヨーロッパウナギの判別

DNA Data Bank of Japan (DDBJ)から、登録されているウナギ属の一部の種についてミトコンドリア DNA の塩基配列を取得し、ウナギ属の種間でヨーロッパウナギのみ配列が異なる部位を対象として、ヨーロッパウナギに特異的なプライマー及びヨーロッパウナギ以外のウナギに特異的なプライマーを設計した。設計したプライマーの塩基配列及び Tm を Table1 に、ウナギ属の各塩基配列における各プライマーの位置を Fig.1-3 に示す。

Table 1 List of primers used for specific PCR in 3.1.

Region	Primer		Sequence	Tm(°C)
16S rRNA	forward	16S-XF	5'- CCAACACAGGAGTGGMTM -3'	60
	reverse	16sbr ⁵⁾	5'- CCGGTYTGAAGCTCAGATCAYGT -3'	
ATP6	forward	ATP-F	5'- TCGACCAATTCATAAGCCCCAC -3'	55
	reverse	ATP-XR	5'- GTGTATAAAAGRAAYAGTACWGC -3'	
Cytb	forward	Cytb-AF	5'- CGTCCCATATGTGGCGAA -3'	58
	reverse	Cytb-R	5'- CTTCGGATTACAAAACCGATGC -3'	

16S-XF 

<i>Anguilla anguilla</i>	: TCAACGGACCCAAACAGAGAGAAAAAGAACGAAC TACAAAAACAAGAAAAACTATTTAATACCACAAACCGTTAACCCAAACAGGAGTGCCCAAAGG
<i>Anguilla rostrata</i>	: A C T T
<i>Anguilla japonica</i>	: A T T
<i>Anguilla marmorata</i>	: C - A C ... C ATC ...
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: A T CT TT ...

<i>Anguilla anguilla</i>	: AAAGACTAAAGGAGAAGAAGGAACT - CGGCAAAACACAAGCCCGCGCTGTTACCAAAAACATCGCCTCTTGCTAACAAAGGAAGTACTAGAGGTCCCGC
<i>Anguilla rostrata</i>	: -
<i>Anguilla japonica</i>	: - A
<i>Anguilla marmorata</i>	: - A
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: C T T ... G G ... T

<i>Anguilla anguilla</i>	: CTGCCCTGTGACCACAAAGTTTAAACGGCCGCGGTATCCTGACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCATTGTCTTTTAAATAGAGACCTGTATGAATGGCATAA
<i>Anguilla rostrata</i>	:
<i>Anguilla japonica</i>	:
<i>Anguilla marmorata</i>	:
<i>Anguilla reinhardtii</i>	:

<i>Anguilla anguilla</i>	: CGAGGGTTTAACTGTCTCCTTCCCTAGTCAATGAAATTGATCTGCCCGTGCAGAAGCGGACATAAACACATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAG
<i>Anguilla rostrata</i>	: C T
<i>Anguilla japonica</i>	:
<i>Anguilla marmorata</i>	: C C
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: T T

<i>Anguilla anguilla</i>	: A C A A A A G A T C A A A C A T G T A A A G A A C C A A C C A A C C A A A A G G A A C A G A A G G C C A C A A A C C C A A C G T A A A C T G A T C T A A A T G T C T T C G G T G G G G C G A C
<i>Anguilla rostrata</i>	: A
<i>Anguilla japonica</i>	: G T T A G G C
<i>Anguilla marmorata</i>	: A A A
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: T A C
<i>Anguilla anguilla</i>	: C A T G G G G A A A A A A G C C C C A C G A G G A A C A G G G A - C A A C C C - C T A A A C T A A G A G A G A C A C C T C T A A G C A A C A G A A A A T C T G A C C A A A A - T G A C C C A G G
<i>Anguilla rostrata</i>	: - - G -
<i>Anguilla japonica</i>	: G . A C T . T . - G . C T G A
<i>Anguilla marmorata</i>	: T A A . G G . T . A T . G . C T A
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: - - A
<i>Anguilla anguilla</i>	: A T A C T A A T C C T G A T C A A C G A A C C A A G T T A C C C T A G G G A T A C A G C G C A A T C C T T T C C A G A G T C C A T A T C G A C G A A A G G G T T A C G A C C T C G A T G T T G G A
<i>Anguilla rostrata</i>	:
<i>Anguilla japonica</i>	: T
<i>Anguilla marmorata</i>	: . C
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: T
<i>Anguilla anguilla</i>	: T C A G G A C A T C C T A A T G G T G C A G C C G C T A T T A A G G T T C G T T T G T T C A A C G A T T A A T A G T C C T A C G T G A T C T G A G T T C A G A C C G G A G T A A T C C A G G T C G G T
<i>Anguilla rostrata</i>	:
<i>Anguilla japonica</i>	:
<i>Anguilla marmorata</i>	: C
<i>Anguilla reinhardtii</i>	:

Fig.1 Partial DNA sequence of the 16S rRNA gene region (mitochondrial DNA) from *Anguilla* spp.. Arrows indicate the location of primers used in 3.1.

	ATP-F →
<i>Anguilla anguilla</i>	: G C T T T T T C G A C C A A T T C A T A A G C C C A C A T A T A T A G G A T T T C T T T A A T C A C C T T A G C C T T A C C C T A C C A T G A A T T C T T A C C C T A C C C A A C A T C C C G
<i>Anguilla rostrata</i>	: . T T
<i>Anguilla japonica</i>	: . T T C T . T C . T G C T
<i>Anguilla marmorata</i>	: T T A T . T T T
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: . T T C T . T C . G . T T
<i>Anguilla anguilla</i>	: A T G A C T A A A T A A C C G A A T C C T A A C C C T A C A A A G C T G G T T C G T T G G C C G A T T T A C A C A A C A C T C C T T C T A C C A C T A A A T G T T G G A G G A C A T A A A T G A G C A
<i>Anguilla rostrata</i>	: C A A A G
<i>Anguilla japonica</i>	: C G G . T A A C G
<i>Anguilla marmorata</i>	: T T T G A A A C C
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: C A A A C C . C C
<i>Anguilla anguilla</i>	: G T T A C T A A C A T C A C T A A T A C T A T T C C T A C T A A C A A T A A C C T G C T A G G C C T G C T C C C A T A C A G A T T T A C A C C A A C A C C C A A T T A T C C C T A A A T A T G G
<i>Anguilla rostrata</i>	: T C T C G
<i>Anguilla japonica</i>	: . A T T T . T C A A . A C T
<i>Anguilla marmorata</i>	: C . G T G A . T A . A A . A . A C C A C . A
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: . A T G T T . T A C C C
<i>Anguilla anguilla</i>	: G A C T T G C A G T C C C A C T A T G A C T A G C C A C C G T A A T T A T T G G T A T A C G A A A T C A A C C A A C T G T A G C A T T A G G A C A C C T A C T G C C A G A A G G A A C A C C A G T C C C
<i>Anguilla rostrata</i>	: . T G A C G
<i>Anguilla japonica</i>	: . T T C G C T
<i>Anguilla marmorata</i>	: . T A C C G . C G C
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: . T A . T . . C C C . C C C

<i>Anguilla anguilla</i>	: TCTAATCCCTGTGCTTATCATCATCGAAACAATTAGCTTATTTATTCGTCCACTAGCCCTGGGCGTACGACTTACAGCAAACCTGACAGCAGGGCACCTC
<i>Anguilla rostrata</i>	: T A A
<i>Anguilla japonica</i>	: G. A. T A. T. G. T. .
<i>Anguilla marmorata</i>	: A. A. T A. T. A. T. A
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: C. A. T. T T A G A
ATP-XR	
<i>Anguilla anguilla</i>	: TTAATTCAACTAATCGCCACTGCAGTCTTTGTTCTTATACCAATAATGCCTACAGTAGCTATTTAAGCAATCGTGCTATTCTTTTAACACTATTAG
<i>Anguilla rostrata</i>	: A. . A. A. G. T. . A.
<i>Anguilla japonica</i>	: T. T. G. . T. A. C. CA. C. C. G.
<i>Anguilla marmorata</i>	: C. T. . T. C. A. . T. C. CA. . A. . GC. T. GC. .
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: C. T. T. A. . T. C. G. CA. . A. . G. . C. T. . C. .

Fig.2 Partial DNA sequence of the ATP6 gene region (mitochondrial DNA) from *Anguilla* spp.. Arrows indicate the location of primers used in 3.1.

Cytb-AF	
<i>Anguilla anguilla</i>	: GGACAGATATCATTCTGAGGTGCTACAGTAATTACCAACCTACTATCTGCCGTCCCATATGTGGGAACTCCCTAGTCCAATGAATCTGAGGGGATTCT
<i>Anguilla rostrata</i>	: T. C. . A. . A. C. . T. .
<i>Anguilla japonica</i>	: A. C. . T. . A. C. . A. . G. T. A. . C. .
<i>Anguilla marmorata</i>	: A. C. C. . A. . AG. . A. T. A. . C. . T.
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: . . G. A. C. . T. A. C.
<i>Anguilla anguilla</i>	: CAGTTGACAACGCCACATTAACCGATTCTTCGATTCCACTTCCTATTCCATTGTAGTTGCTGGAGGCCAATACTTCACCTCCTATTCTCCATGA
<i>Anguilla rostrata</i>	: . . . C. G. C. . C. . G. G.
<i>Anguilla japonica</i>	: C. . C. . T. A. T.
<i>Anguilla marmorata</i>	: C. C. . T. . T. A. C.
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: C. . C. . T. A. T.
<i>Anguilla anguilla</i>	: AACAGGATCAAAACAACCGGTAGGATTAACCTCCGACGACAGACAAAATCCCATTCACCCATACTTCTCCTACAAAGACCTACTGGGGTTCAATATCATG
<i>Anguilla rostrata</i>	: A. T. A.
<i>Anguilla japonica</i>	: A. C. G. T. G. T. T. A. A
<i>Anguilla marmorata</i>	: G. A. G. G. T. G. . A. . A. A
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: A. C. G. T. . T. G. . A. . A. T. A
<i>Anguilla anguilla</i>	: CTCACCGCCTAACAATACTTGCCTATTCTACCGAACCTGCTTGGAGACCCAGACAACTTCACCCGGGAAATCCAATAGTTACTCCGCCACACATTA
<i>Anguilla rostrata</i>	: T. T. T. . T. T. C. A. T. C.
<i>Anguilla japonica</i>	: . . A. C. . A. G. T. T. C. . C. . A. C.
<i>Anguilla marmorata</i>	: . . A. T. T. A. C. A. C. . A. C.
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: . . A. TT. A. C. T. C. C. . G. C. . A. C.
<i>Anguilla anguilla</i>	: AGCCAGAGTGGTATTTTCTATTTGCCTACGCCATTCTACGATCAATTCTAATAAACTCGCGGGGTATTAGCCTTGTATCCTCCATCCTAGTTCTAAT
<i>Anguilla rostrata</i>	: A. A. C. C. T. . T.
<i>Anguilla japonica</i>	: A. A. . C. C. C. C. C. C. A. C. AC. C.
<i>Anguilla marmorata</i>	: A. A. . C. T. C. C. T. T. A. . C. C. A. T. C.
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: A. A. . C. G. C. C. C. T. A. . C. C. AC. C. G.
<i>Anguilla anguilla</i>	: AGTAGTACCAATTCTTCACACCTCAAAACAACGAGGACTTACATTCGACCTGCTTCCCACTACTATTCTGAATTTTAGTAGCAGATATACTAGTACTA
<i>Anguilla rostrata</i>	: C. G. G.
<i>Anguilla japonica</i>	: C. T. C. C. A. C. A. T. C.
<i>Anguilla marmorata</i>	: A. C. A. C. C. C.
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: G. C. A. A. C. C. C.

<i>Anguilla anguilla</i>	: ACATGAATCGGAGGAATACCACTAGAACATCCATATATTATCATCGGCCAAGTAGCATCAGTACTTTATTTTCCCTATTCTGGTGCTAAACCCCTTAG
<i>Anguilla rostrata</i>	: C. T. T. A.
<i>Anguilla japonica</i>	: C. C. T. C. T. TT. A. A. A.
<i>Anguilla marmorata</i>	: T. G. C. C. T. C. A. A.
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: T. C. C. T. C. T. A. A.
← Cytb-R	
<i>Anguilla anguilla</i>	: TCGGCTGACTAGAAAAAAGTAATAAACTGATAAGCCCTAGTAGCTTAATAGCCAAAGCATCGGTTTGTAAATCCGAAGATTGAAGATTAATAATCTTC
<i>Anguilla rostrata</i>	: A. T. A. T. T.
<i>Anguilla japonica</i>	: A. T. A. T.
<i>Anguilla marmorata</i>	: A. T. A. T.
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: A. T. G. A. T. C. C.

Fig.3 Partial DNA sequence of the *Cytb* gene region (mitochondrial DNA) from *Anguilla* spp.. Arrows indicate the location of primers used in 3.1.

各試料から抽出した DNA について、Table1 に示したプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物の電気泳動図を Fig.4-6 に示す。

各試料において、16S-XF と 16sbr のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図(Fig.4)及び ATP-F と ATP-XR のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図(Fig.5)においては、ニホンウナギ及びアメリカウナギのみ単一バンドが確認でき、ヨーロッパウナギは PCR による増幅が認められなかった。一方、各試料において、*Cytb*-AF と *Cytb*-R のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図(Fig.6)では、ニホンウナギ及びアメリカウナギは PCR による増幅が認められず、ヨーロッパウナギのみ単一バンドが確認できた。このことから、これら 3 組のプライマーを用いて PCR を行うことで、増幅の有無の確認により、分析試料がヨーロッパウナギか否かを判別することが可能である。

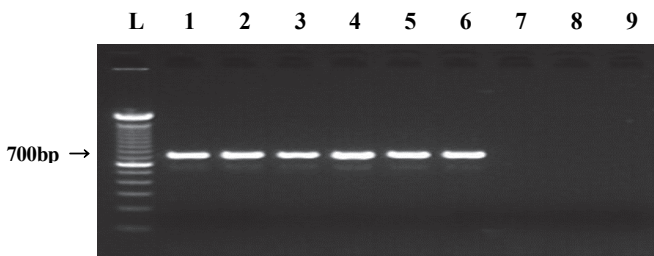


Fig.4 Electrophoresis image of PCR products of the 16S rRNA gene region with 2% agarose-TAE gel. 16S-XF and 16sbr were used as primers. Other samples used showed the same amplification pattern.

Lane L: 100bp DNA ladder. Lanes 1-3: *Anguilla japonica*. Lanes 4-6: *Anguilla rostrata*. Lanes 7-9: *Anguilla anguilla*

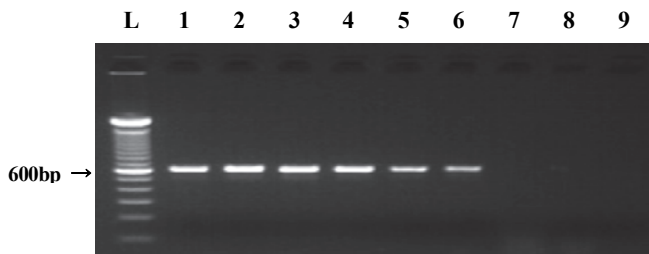


Fig.5 Electrophoresis image of PCR products of the *ATP6* gene region with 2% agarose-TAE gel. ATP-F and ATP-XR were used as primers. Other samples used showed the same amplification pattern.

Lane L: 100bp DNA ladder. Lanes 1-3: *Anguilla japonica*. Lanes 4-6: *Anguilla rostrata*. Lanes 7-9: *Anguilla anguilla*

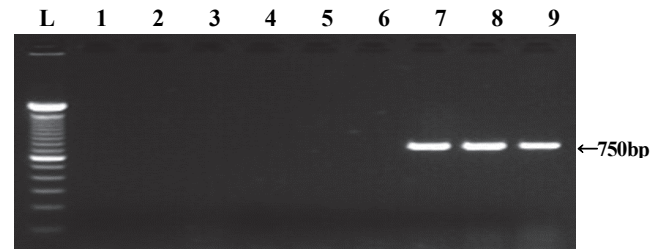


Fig.6 Electrophoresis image of PCR products of the *Cytb* gene region with 2% agarose-TAE gel. *Cytb*-AF and *Cytb*-R were used as primers. Other samples used showed the same amplification pattern.

Lane L: 100bp DNA ladder. Lanes 1-3: *Anguilla japonica*. Lanes 4-6: *Anguilla rostrata*. Lanes 7-9: *Anguilla anguilla*

3.2 デュプレックスPCRによるヨーロッパウナギの判別

3.1 により、ヨーロッパウナギ及びヨーロッパウナギ以外のウナギの判別が可能となった。しかし 3.1 の手法では、ヨーロッパウナギを増幅する PCR と、ヨーロッパウナギ以外のウナギを増幅する PCR をそれぞれ行う必要がある。3.1 の手法よりも短時間で実施可能な手法として、1 回の PCR で判別するデュプレックス PCR により、ヨーロッパウナギとヨーロッパウナギ以外のウナギを判別する手法を検討した。

デュプレックス PCR で用いるプライマーは、3.1 で用いた 16S-XF と 16sbr のプライマー及び ATP-F と ATP-XR のプライマーに対し、それぞれヨーロッパウナギと反応するプライマーを新たに設計し、追加した。デュプレックス PCR で用いたプライマーの塩基配列及び T_m を Table2 に、ウナギ属の各塩基配列における各プライマーの位置を Fig.7-8 に、得られた PCR 産物の電気泳動図を Fig.9-10 に示す。

Table 2 List of primers used for duplex PCR in **3.2**. 16S-XF, 16sbr, ATP-F and ATP-XR are identical to those of Table 1.

Region	Primer		Sequence	Tm(°C)
16S rRNA	forward	16S-AF	5'- ACAGAGAGAAAAAGATCG -3'	55
		16S-XF	5'- CCAACACAGGAGTGGMTM -3'	
	reverse	16sbr ⁵⁾	5'- CCGGTYTGAACTCAGATCAYGT -3'	
<i>ATP6</i>	forward	ATP-F	5'- TCGACCAATTCATAAGCCCCAC -3'	55
	reverse	ATP-AR	5'- TTGTTGTGTAAATCCGCC -3'	
		ATP-XR	5'- GTGTATAAAAGRAAYAGTACWGC -3'	

16S-AF

Anguilla anguilla: TCAACGGACCCAAACAGAGAGAAAAAGAAGGAAGTACAAAAACAAGAAAAAATCTTTTAATACCACAAAACCGTTAACCCAACACAGGAGTGCCCAAAGG
..... A C T
Anguilla rostrata: A T
Anguilla japonica: A T
Anguilla marmorata: C - A C . C ATC ...
Anguilla reinhardtii: A T CT TT ...

16S-XF

Anguilla anguilla: AAAGACTAAAGGAGAAGAAGGAAGT-CGGCAAACACAAGCCCCGCCTGTTTACCAAAAACATCGCCTCTTGCTAACAAAGGAAGTACTAGAGGTCCC GC
..... -
Anguilla rostrata: - A
Anguilla japonica: - A
Anguilla marmorata: C . T . T . G G . T
Anguilla reinhardtii: C . T . T . G G . T

Anguilla anguilla: CTGCCCTGTGACCACAAAGTTTAACGGCCGCGGTATCCTGACCGTGCGAAGGTAGCGTAATCATTTGTCTTTTAAATAGAGACCTGTATGAATGGCATAA
Anguilla rostrata:
Anguilla japonica:
Anguilla marmorata:
Anguilla reinhardtii:

Anguilla anguilla: CGAGGGTTTAAGTGTCTCCTTCCCTAGTCAATGAAATTGATCTGCCCGTGCGAAGCGGACATAAACACATAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAG
..... C T
Anguilla rostrata: C T
Anguilla japonica: C C
Anguilla marmorata: T T
Anguilla reinhardtii:

Anguilla anguilla: AC AAAAGATCAAAACATGTAAGAAACCAAAACCAAAAAGGAACACGAAGGCCACAAAACCAACGTAAGTCTAAATGTCTTCGGTTGGGGCGAC
..... A GTT A G G C
Anguilla rostrata: A A A A
Anguilla japonica: T A C
Anguilla marmorata: T A C
Anguilla reinhardtii:

Anguilla anguilla: CATGGGGGAAAGAAAAGCCCCACGAGGAACAGGGA-CAACCC-CTAAACTAAGAGAGACACCTCTAAGCAACAGAAAAATCTGACCAAAA-TGACCCAGG
..... - - G -
Anguilla rostrata: G . A CT . T . - G . C T G A
Anguilla japonica: TAA . GG . T . AT . G . C T A
Anguilla marmorata: - - A
Anguilla reinhardtii:

<i>Anguilla anguilla</i>	: ATACTAATCCTGATCAACGAACCAAGTTACCCAGGATAACAGCGCAATCCTTTCCAGAGTCCATATCGACGAAAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGA
<i>Anguilla rostrata</i>	:
<i>Anguilla japonica</i>	: T
<i>Anguilla marmorata</i>	: . G
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: T
<i>Anguilla anguilla</i>	: TCAGGACATCCTAATGGTGCAGCGCTATTAAGGGTCTGTTGTTCAACGATTAATAGTCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGTAATCCAGGTCGGT
<i>Anguilla rostrata</i>	:
<i>Anguilla japonica</i>	:
<i>Anguilla marmorata</i>	: C
<i>Anguilla reinhardtii</i>	:

Fig.7 Partial DNA sequence of the 16S rRNA gene region (mitochondrial DNA) from *Anguilla* spp.. Arrows indicate the location of primers used in 3.2. 16S-XF and 16sbr are identical to those in Fig.1.

		ATP-F		
<i>Anguilla anguilla</i>	: GCTTTTTCGACCAATTCAAGCCGCACATATATAGGAATTTCTTTAATCACCTTAGCCTTAACCGTACCATGAATTCCTTACCGTACCCCAACATCCGG			
<i>Anguilla rostrata</i>	: . T			T
<i>Anguilla japonica</i>	: . T TC T . T . . . C . T . . . G C . . . T			
<i>Anguilla marmorata</i>	: T TA T . T . . . T T			
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: . T TC T . T . . . C . G . T T			
		ATP-AR		
<i>Anguilla anguilla</i>	: ATGACTAAATAACCGAATCCTAACCCCTACAAAGCTGGTTCGTTGGCCGATTTACACAACAACCTCTTCTACCACTAAATGTTGGAGGACATAAATGAGCA			
<i>Anguilla rostrata</i>	: C A . . . AA G			
<i>Anguilla japonica</i>	: C . . G G . T . . . AA C G			
<i>Anguilla marmorata</i>	: T . . . T . . . T . . . G . . A . . . AA . . . C . . . C			
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: C A . . . AA . . . C . . . C . C . . . C			
<i>Anguilla anguilla</i>	: GTTATACTAACATCACTAATACTATTCTACTAACAATAAACCTGCTAGGCCTGCTCCCATACACATTACACCAACAACCAATTATCCCTAAATATGG			
<i>Anguilla rostrata</i>	: T . . . C T . . . C G			
<i>Anguilla japonica</i>	: A T TT . T . . . C . . . A . . A . . . C T			
<i>Anguilla marmorata</i>	: C . G . . T . . G . . . A T . . . A . A . . A . . A . . . C . . . C . A . C . A .			
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: A T . . G . . TT . T A C C			
<i>Anguilla anguilla</i>	: GACTTGCAGTCCCACTATGACTAGCCACCGTAATTATTGGTATACGAAATCAACCAACTGTAGCATTAGGACACCTACTGCCAGAAGGAACACCACTGCC			
<i>Anguilla rostrata</i>	: . T G A . . . C . . G			
<i>Anguilla japonica</i>	: . T T C GC T			
<i>Anguilla marmorata</i>	: . T A . . . C . . . CG . C . . . G . C			
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: . T . . . A . T . . C . . . C . . C . C . . . C C			
<i>Anguilla anguilla</i>	: TCTAATCCCTGTGCTTATCATCATCGAAACAATTAGCTTATTTATTCGTCCTAGCCCTGGGCGTACGACTTACAGCAAACCTGACAGCAGGCCACCTC			
<i>Anguilla rostrata</i>	: T A A			
<i>Anguilla japonica</i>	: G . A . . T A . T . . G T			
<i>Anguilla marmorata</i>	: A . A T A . T A T . A			
<i>Anguilla reinhardtii</i>	: C A . T . . T T A G A			



Anguilla anguilla : TTAATTCAACTAATGCCACTGCAGTCTTTGTTCTTATACCAATAATGCCTACAGTAGCTATTTTAAACAGAAATCGTGCTATTTCTTTTAAAGACTATTAG
Anguilla rostrata : A A A G. T. A
Anguilla japonica : T T G. T A C CA C C. G
Anguilla marmorata : C T. T C A. T C T. CA. A. GC T. GC
Anguilla reinhardtii : C. T T A. T C G. CA. A. G. C T. C

Fig.8 Partial DNA sequence of the *ATP6* gene region (mitochondrial DNA) from *Anguilla* spp. Arrows indicate the location of primers used in 3.2. ATP-F and ATP-XR are identical to those in Fig.2.

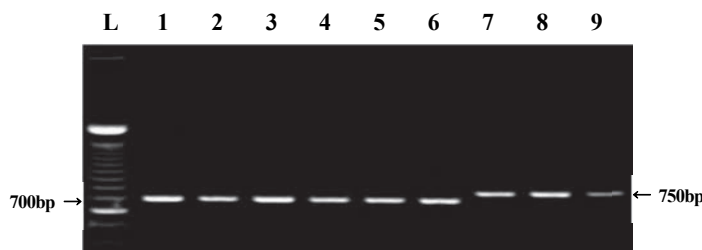


Fig.9 Electrophoresis image of duplex PCR products of the 16S rRNA gene region with 2% agarose-TAE gel. 16S-AF, 16S-XF and 16sbr were used as primers. Other samples used showed the same amplification pattern.

Lane L: 100bp DNA ladder. Lanes 1-3: *Anguilla japonica*. Lanes 4-6: *Anguilla rostrata*. Lanes 7-9: *Anguilla anquilla*

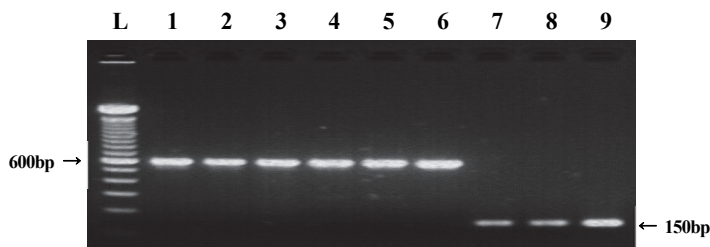


Fig.10 Electrophoresis image of duplex PCR products of the *ATP6* gene region with 2% agarose gel. ATP6-F, ATP6-AR and ATP6-XR were used as primers. Other samples used showed the same amplification pattern.

Lane L: 100bp DNA ladder. Lanes 1-3: *Anguilla japonica*. Lanes 4-6: *Anguilla rostrata*. Lanes 7-9: *Anguilla anguilla*

各試料において、16S-XF、16S-AF 及び 16sbr を用いた PCR 産物の電気泳動図(Fig.9)ではニホンウナギ及びアメリカウナギでは約 700bp、ヨーロッパウナギでは約 750bp に PCR 産物が検出された。同様に、各試料において、ATP-F、ATP-XR 及び ATP-AR を用いた PCR 産物の電気泳動図(Fig.10)ではニホンウナギ及びアメリカウナギでは約 600bp、ヨーロッパウナギでは約 150bp に PCR 産物が検出された。

このことから、16S rRNA 領域及び ATP6 領域について、デュプレックス PCR を行い、増幅された PCR 産物の塩基長を確認することで、ヨーロッパウナギとヨーロッパウナギ以外のウナギを 1 回の PCR により判別が可能となった。また、2 領域についてそれぞれ PCR を行うことで、種内変異等による誤判定の可能性をより少なくすることができると考えられる。ただし、16S rRNA 領域については、PCR 産物の増幅長の差が約 50bp と小さく、PCR 産物の増幅長を誤って判断する恐れがあることから、電気泳動の時間を通常より長くして増幅長の差を明確にする、標準試料を用いたポジティブコントロールを行い比較する等、注意深く判定を行う必要がある。

4. 要 約

ウナギ属について、ミトコンドリア DNA 中の種間変異に着目し、ヨーロッパウナギまたはヨーロッパウナギ以外のウナギを種特異的に増幅するプライマーを開発した。また、ヨーロッパウナギとヨーロッパウナギ以外のウナギをデュプレックス PCR により、1 回の PCR で判別する手法も開発した。以上のことから、これらの手法を用いて、ヨーロッパウナギを PCR により判別することが可能となった。

文献

- 1) 渡邊 俊：日本水産学会誌, **77**, 589(2011)
- 2) "Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Appendices I, II and III" (2017)
- 3) 農林水産消費技術センター：うなぎの品種鑑別マニュアル(2004)
- 4) K. Sezaki, S. Itoi, S. Watabe : Fish. Sci., **71**, 414 (2005)
- 5) Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Pääbo S., Villablanca F. X., Wilson A. C. : Proc. Natl. Acad. Sci. Am., **86**, 6192 (1989).