

DNA分析における分析時間短縮についての検討

澤田 桂子¹, 豊田 正俊¹, 高嶋 康晴²

Keiko Sawada, Masatoshi Toyoda, Yasuharu Takashima

要 約

魚種判別法等のDNA分析については、DNA抽出、PCR、制限酵素処理、電気泳動、DNAシーケンス法による判別など、複数の工程があるが、今回、マグロ属の魚種判別法を対象に、複数工程を通した迅速化の検討を行ったところ、一連の工程を合わせて分析時間を50%程度削減することが可能であった。

1. はじめに

独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC）では、魚種判別法等のDNA分析を行っているが、DNA抽出、PCRによる増幅、制限酵素処理、電気泳動、DNAシーケンス法による判別など、複数の工程があり、結果が出るまでに時間を要している。現在までに、FAMICでは、DNA分析における分析時間短縮のため、簡易DNA抽出法の検討¹⁾など、1工程ごとの迅速化の検討を行ってきたが、複数工程の一連の迅速化検討は行っていなかった。

FAMICで実施しているマグロ属の魚種判別法は、マグロ属のDNA解析の報告^{2)~4)}を基にして、FAMICがDNA分析を開始した初期に導入したものであり、PCR反応に3時間を要するなど、近年開発した他のDNA分析法と比較すると分析時間を要している。

そこで今回は、マグロ属の魚種判別法を対象に、工程ごとに分析時間の短縮化を検討した。

マグロ属の魚種判別法の概要について述べる。マグロ試料からDNAを抽出し、抽出したDNA溶液を鋳型として、マグロ属のミトコンドリアDNAのATPase 6遺伝子の一部からcytochrome c oxidase subunit III (COIII) 遺伝子の一部にまたがる領域(以下「ATCO領域」という。)の915bpを増幅するプライマー²⁾を用いてPCRを行う。得られたPCR産物を制限酵素で処理し、断片長パターンの違いによりマグロ属の魚種を判別する。試料が想定と異なるDNA断片長パターンであった場合には、ミトコンドリアDNAのATCO領域のDNA配列を決定し、各魚種に特有な配列と比較することで判別している。

ただし、クロマグロ(大西洋産)ではビンナガのミトコンドリアDNAと同じ配列を持つ個体が存在することが報告されている⁵⁾ため、クロマグロと想

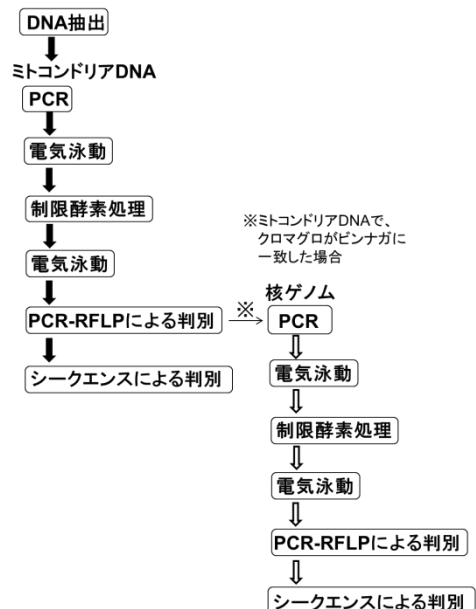


図1 判別法のフローチャート

¹独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

²独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

定された試料で、DNA断片長パターンがビンナガに一致した場合には、核DNAのミオグロビン遺伝子の一部領域の529 bpを増幅するプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR産物を制限酵素で処理し、DNA断片長パターンの違いによりクロマグロとビンナガの両魚種を判別する。DNA断片長パターンにより判別できない場合は、シーケンスで核DNAのミオグロビン遺伝子のDNA配列を解析し、クロマグロとビンナガに特有な配列を確認することで判別している。なお、核DNAの遺伝子領域について「太平洋産クロマグロ」と「大西洋産クロマグロ」を比較した報告³⁾⁶⁾⁷⁾はあるが、いずれの遺伝子領域も塩基配列は近似しており、ミトコンドリアDNAのような差異のある遺伝子領域の知見は得られていない。

これらの工程において、DNA抽出における簡易抽出法、PCR反応におけるプライマーの変更及びDNA合成酵素の変更、制限酵素試薬の変更、サイクルシーケンスのSTeP⁹⁾法の導入を検討し、判別法全体の分析時間の短縮化を図ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

対象魚種はマグロ属の太平洋産クロマグロ（クロマグロ；*Thunnus orientalis*）、大西洋産クロマグロ（タイセイヨウクロマグロ；*T.thynnus*）、ミナミマグロ（*T.maccoyii*）、メバチ（*T.obesus*）（ α 及び β タイプ）、キハダ（*T.albacares*）、ビンナガ（*T.alalunga*）とした⁸⁾。生鮮品の部位については赤身、トロ及びハラモを用いた。加工品については、表面を軽く炙っているたたき、みりん漬及び茹でたものを用いた。

2.2 機器

PCR及び制限酵素処理には、サーマルサイクラーGeneAmp[®] PCR System 9700（Thermo Fisher Scientific）又は9700シミュレーションモードに設定したProFlex[™] PCR System（Thermo Fisher Scientific）を用いた。DNAシーケンサーは、Applied Biosystems[™] 3130xl ジェネティックアナライザ（Thermo Fisher Scientific）を用いた。

2.3 DNA抽出

マグロ肉片の表面を避けた内部の組織から10~25 mgを採取し、DNAを抽出した。

2.3.1 通常法

DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN）を用い、製品の添付プロトコールに従った。

2.3.2 迅速法

簡易DNA抽出法では、1試料につきテイル溶解液を100 μ L、プロテイナーゼK溶液（関東化学）を7.5 μ L、ジルコニアボール1個を加えた。インキュベーターを用いて56 $^{\circ}$ Cで10分間程度保温し、その間、ジルコニアボールが上下に動くよう、試験管ミキサーで適宜かくはんし、試料をほぼ完全に溶解させた。その後、インキュベーターを用いて85 $^{\circ}$ Cで10分間加温し、プロテイナーゼKを失活させた。卓上小型遠心機で10秒程度遠心し、残渣を沈殿させた。その後、浮遊物等がある場合はできる限り採取しないよう上清を採取し、上清を滅菌水で50倍に希釈した。また、既報⁹⁾による簡易DNA抽出液も使用できることを確認するために併せて用意した。

2.4 ミトコンドリア DNA の PCR

2.4.1 通常法

通常法の PCR には、フォワードプライマー L8562 及びリバースプライマー H9432 を用いた (表 1)。プライマーは、株式会社ファスマックでオリゴ DNA を合成し、逆相カラムで精製したものをを用いた (以下のプライマーも同じ)。

PCR 反応液は、3.75 U DNA 合成酵素 AmpliTaq Gold® (Thermo Fisher Scientific) を含み、最終濃度が 1× PCR Buffer II (AmpliTaq Gold® 添付試薬)、0.2 mmol/L dNTP (AmpliTaq Gold® 添付試薬)、1.5 mmol/L MgCl₂ (AmpliTaq Gold® 添付試薬)、各プライマー 0.5 μmol/L となるように混合し、5 μL の抽出 DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 50 μL とした。

PCR の温度条件は、最初の熱変性として 95 °C・8 分の後、熱変性 94 °C・1 分、アニーリング 53 °C・1 分、伸長反応 71 °C・1 分 30 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル後、最後の伸長反応を 71 °C・7 分で行った。

2.4.2 迅速法

迅速法の PCR には、ビンナガの増幅効率を考慮して通常法のプライマーを改良したフォワードプライマー L8562-kai 及びリバースプライマー H9432-kai を用いた (表 1)。

PCR 反応液は、0.3 U DNA 合成酵素 KOD FX Neo (東洋紡) を含み、最終濃度が 1× PCR Buffer for KOD FX Neo、0.4 mmol/L dNTPs Mixture (KOD FX Neo 添付試薬)、各プライマー 0.3 μmol/L となるように混合し、1.5 μL の抽出 DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 15 μL とした。

PCR の温度条件は、最初の熱変性として 94 °C・2 分の後、熱変性 98 °C・3 秒、アニーリング 53 °C・3 秒、伸長反応 68 °C・15 秒を 1 サイクルとして 35 サイクルで行った。

表 1 ミトコンドリア DNA の PCR 及びシーケンスに使用するプライマーの配列

用途	プライマー名	向き	配列
ミトコンドリア DNA (通常法)	L8562	F	CTTCGACCAATTTATGAGCCC
	H9432	R	GCCATATCGTAGCCCTTTTTG
ミトコンドリア DNA (迅速法)	L8562-kai	F	CTTTGACCAATTTATGAGCCC
	H9432-kai	R	ACCATATCGGAGACCTTTTTG
ミトコンドリア DNA (通常法及び迅速法) ※シーケンスで追加	L8526tuna-ATP6	F	GTACTAATTGTCATCGAAACAAT
	H8548tuna-ATP6	R	GGTCGGATGAATAAGCTAA

2.5 ミトコンドリア DNA の制限酵素処理

2.5.1 通常法

3 種類の制限酵素すなわち AluI (Thermo Fisher Scientific) を 5.0 U、MseI (New England BioLabs) 又は TruII (Thermo Fisher Scientific) を 2.5U、Tsp509I (TasI) (Thermo Fisher Scientific) を 2.5U 使用した。

制限酵素反応液は、2.4.1 で調製した PCR 産物 10 μL に制限酵素と緩衝液、滅菌水を加えて全量を 20 μL とした。制限酵素処理は、AluI 制限酵素反応液及び MseI 制限酵素反応液は 37 °C で、TruII 制限酵素反応液及び Tsp509I (TasI) 制限酵素反応液は 65 °C で各 1 時間 30 分以上処理を行った。

2.5.2 迅速法

3種類の制限酵素すなわち AluI (Thermo Fisher Scientific)を 3.0 U、FastDigest TruII (Thermo Fisher Scientific)を 1 μ L 及び FastDigest TasI (Thermo Fisher Scientific)を 1 μ L 使用した。

制限酵素反応液は、2.4.2 で調製した PCR 産物 2 μ L に制限酵素と緩衝液、滅菌水を加えて全量を 10 μ L とした。制限酵素処理は、AluI 制限酵素反応液については 37 °C で 15 分、FastDigest TruII 及び FastDigest TasI 制限酵素反応液については 65 °C で 5 分処理を行った。

2.6 ミトコンドリア DNA のゲル電気泳動

ゲル電気泳動には、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を 0.5 μ g/mL 含むアガロースゲル (Agarose L03 (タカラバイオ)) を用い、ゲル濃度は通常法は 3.0 % (w/v)、迅速法は 3.5 % (w/v) とした。電気泳動緩衝液は、1 \times TAE 緩衝液 (ニッポンジーン) を用いた。

2.7 ミトコンドリア DNA の塩基配列解析

塩基配列決定はダイレクトシーケンス法によって行った。DNA 塩基配列の解析には、遺伝子情報処理ソフトウェア GENETYX[®] ver.12 (ゼネティックス) を用いた。

2.7.1 通常法

PCR 産物の精製には illustra[™] ExoProStar[™] (GE Healthcare) を用いた。エキソヌクレアーゼ I 1 μ L、アルカリフォスファターゼ 1 μ L 及び滅菌水 3 μ L を混合後、PCR 後の反応液 5 μ L を加え、37 °C で 15 分間処理した後、80 °C で 15 分間加熱し、酵素を不活性化した。

サイクルシーケンス反応には、BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix 2 μ L、BigDye[®] Sequencing Buffer (5 \times) 3 μ L (いずれも Thermo Fisher Scientific) に、最終濃度が 0.15 μ mol/L となるように L8562、H9432、L8526tuna-ATP6 又は H8548tuna-ATP6 プライマー (表 1) を混合し、これに 10 ng/ μ L に調製した精製 PCR 産物 2 μ L を加え、滅菌水で全量を 20 μ L とした。PCR の温度条件は、最初の熱変性として 94 °C \cdot 1 分の後、熱変性 94 °C \cdot 20 秒、アニーリング 50 °C \cdot 15 秒、伸長反応 60 °C \cdot 4 分を 1 サイクルとして 25 サイクルで行った。

サイクルシーケンス後の余剰な蛍光色素の除去は、エタノール沈殿により行った。シーケンス反応物 20 μ L に 125 mM EDTA を 5 μ L 添加後、エタノール (99.5 %以上) を 60 μ L 添加し、かくはん後、室温で 15 分間静置した。室温、2000 \times g で 45 分間遠心後、96 well Plate を上下反転させて、最大 185 \times g でスピンドウンし、ウェル内の液を廃棄した。さらに、各ウェルに 70 %エタノールを 60 μ L 添加後、室温、1700 \times g で 15 分間遠心した。最大 185 \times g でスピンドウンし、ウェル内の液を廃棄した。

エタノールが気化してから、Hi-Di Formamide (Thermo Fisher Scientific) を 20 μ L 添加し、95 °C で 2 分間加温後、4 °C に冷却した溶液から、DNA シークエンサーにより塩基配列を解析した。

2.7.2 迅速法 (STeP 法)

PCR 産物の精製には、illustra[™] ExoProStar[™] を用い、通常法の半量で実施した。また、ExoSAP-IT[™] PCR Product Cleanup Reagent 又は ExoSAP-IT[™] Express PCR Product Cleanup Reagent (いずれも Thermo Fisher Scientific) を用いた場合は、エキソヌクレアーゼ I 及びアルカリフォスファターゼが混合された ExoSAP-IT[™] 1 μ L 及び滅菌水 1.5 μ L を混合後、PCR 後の反応液 2.5 μ L を加え反応させた。ExoSAP-IT[™] PCR Product Cleanup Reagent は 37 °C で 15 分間処理した後、80 °C で 15 分間加熱し、ExoSAP-IT[™] Express PCR Product Cleanup Reagent は 37 °C で 4 分間処理した後、80 °C で 1 分間加熱し、酵素を不活性化した。

サイクルシーケンス反応は、STeP法⁹⁾を参照して行った。BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix 0.5 μ L、BigDye[®] Sequencing Buffer (5 \times) 2.0 μ Lに、最終濃度が0.15 μ mol/LとなるようにL8562-kai、H9432-kai、L8526tuna-ATP6又はH8548tuna-ATP6 (表1) を混合し、これに約5 ng/ μ Lに調製した精製PCR産物1 μ Lを加え、滅菌水で全量を10 μ Lとした。サイクルシーケンス反応の温度条件は、最初の熱変性として96 $^{\circ}$ C \cdot 1分の後、熱変性96 $^{\circ}$ C \cdot 10秒、アニーリング50 $^{\circ}$ C \cdot 5秒、伸長反応60 $^{\circ}$ C \cdot 1分15秒を1 サイクルとして15 サイクル、熱変性96 $^{\circ}$ C \cdot 10秒、アニーリング50 $^{\circ}$ C \cdot 5秒、伸長反応60 $^{\circ}$ C \cdot 1分30秒を1 サイクルとして5 サイクル、熱変性96 $^{\circ}$ C \cdot 10秒、アニーリング50 $^{\circ}$ C \cdot 5秒、伸長反応60 $^{\circ}$ C \cdot 2分を1 サイクルとして5 サイクルで行った。

サイクルシーケンス後の余剰な蛍光色素の除去は、エタノール沈殿により通常法の半量で実施した。Hi-Di Formamide を10 μ L 添加し、95 $^{\circ}$ C で2分間加温後、4 $^{\circ}$ C に冷却した溶液から、DNA シークエンサーにより塩基配列を解析した。

2.8 核 DNA の PCR

2.8.1 通常法

プライマーは、フォワードプライマーTunaMyoF及びリバープライマーTunaMyoR (橋本ら・未公表) を用いた。

PCR 反応液は、0.5 U DNA 合成酵素*TaKaRa Ex Taq[®] HS* (タカラバイオ) を含み、最終濃度が1 \times *Ex Taq Buffer*、0.2 mmol/L dNTP Mixture (*TaKaRa Ex Taq[®] HS*添付試薬)、各プライマー0.25 μ mol/L となるように混合し、2 μ L の抽出DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を20 μ L とした。

PCR の温度条件は、最初の熱変性として94 $^{\circ}$ C \cdot 1分の後、熱変性94 $^{\circ}$ C \cdot 30秒、アニーリング60 $^{\circ}$ C \cdot 30秒、伸長反応72 $^{\circ}$ C \cdot 30秒を1 サイクルとして35 サイクル、最後の伸長反応を72 $^{\circ}$ C \cdot 7分で行った。

2.8.2 迅速法

迅速法には、上記通常法と同じプライマーであるTunaMyoF及びTunaMyoRを用いた。

PCR 反応液は、0.3 U DNA 合成酵素KOD FX Neoを含み、最終濃度が1 \times PCR Buffer for KOD FX Neo、0.4 mmol/L dNTPs Mixture (KOD FX Neo 添付試薬)、各プライマー0.3 μ mol/L となるように混合し、1.5 μ L の抽出DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を15 μ L とした。

PCR の温度条件は、最初の熱変性として94 $^{\circ}$ C \cdot 2分の後、熱変性98 $^{\circ}$ C \cdot 10秒、アニーリング60 $^{\circ}$ C \cdot 30秒、伸長反応68 $^{\circ}$ C \cdot 30秒を1 サイクルとして35 サイクルで行った。

2.9 核 DNA の制限酵素処理

2.9.1 通常法

制限酵素はPvuII (Thermo Fisher Scientific)を2.5 U 使用した。制限酵素反応液は、PCR 産物7.5 μ L に制限酵素と緩衝液、滅菌水を加えて全量を20 μ L とした。制限酵素処理は、37 $^{\circ}$ C で1時間処理を行った。

2.9.2 迅速法

制限酵素はFastDigest PvuII (Thermo Fisher Scientific)を1 μ L 使用した。制限酵素反応液は、PCR 産物を生鮮品は2 μ L、加工品は5 μ L に制限酵素と緩衝液、滅菌水を加えて全量を10 μ L とした。制限酵素処理は、37 $^{\circ}$ C で5分処理を行った。

2.10 核 DNA のゲル電気泳動及び塩基配列解析

シーケンス用のプライマーは、TunaMyoF 及び TunaMyoR を用い、その他の操作は、2.6 及び 2.7 のミトコンドリア DNA と同様に行った。

3. 結果及び考察

3.1 DNA 抽出法

迅速法の簡易 DNA 抽出法では、既報法¹⁾を改変して溶解液量を 1/4 へ変更し、ジルコニアボールを加えて試験管ミキサーで適宜かくはんすることで、溶解時間を既報法¹⁾の 40 分以上から 10 分程度へ短縮することができ、迅速な簡易 DNA 抽出が可能であった (16 点)。なお、既報法¹⁾による簡易 DNA 抽出液 (DNA 濃度は迅速法の 1/4 濃度に相当) の場合 (14 点) や通常法のキットで抽出した DNA 溶液 (7 点) についても、以降の迅速法に使用可能であった。

3.2 ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 法

3.2.1 迅速法用 PCR プライマーの設計

通常法のキットで抽出した DNA (7 点) を用い、DNA 合成酵素を AmpliTaq Gold[®]から増幅効率の良い KOD FX Neo へ変更し、KOD FX Neo の製品の添付 PCR プロトコルを参照して通常法のプライマーセットにて PCR 増幅を行ったが、他種のマグロに比べてビンナガの PCR 増幅効率が悪かった。PCR の増幅効率が 1 種のみ異なる場合、PCR の迅速化の妨げとなるため、PCR 増幅が悪いビンナガにも適するようプライマー配列の一部を変更した。なお、塩基の種類のみの変更のため、増幅長や制限酵素の切断パターンは通常プライマーセットと同じである。改変したプライマーで KOD FX Neo により PCR 増幅を行ったところ、6 種 7 タイプで同等に PCR 増幅が得られたため、以降の検討は改変したプライマーを用いることにした。

(a) フォワードプライマー		10	20	30	40																																			
プライマー-通常法	C	T	T	C	G	A	C	C	A	A	T	T	T	A	T	G	A	G	C	C	C																			
プライマー-迅速法	C	T	T	T	G	A	C	C	A	A	T	T	T	A	T	G	A	G	C	C	C																			
太平洋産クロマグロ	C	T	T	T	G	A	C	C	A	A	T	T	T	A	T	G	A	G	C	C	C	T	G	T	T	T	C	C	T	A	G	G	C	A	T	T	C	C	T	40
大西洋産クロマグロ	40
ミナミマグロ	40
メバチαタイプ	40
メバチβタイプ	40
キハダ	40
ビンナガ	40
(b) リバースプライマー		890	900	910																																				
プライマー-通常法(相補鎖)					C	A	A	A	A	G	G	G	C	T	A	C	G	A	T	A	T	G	G	C																
プライマー-迅速法(相補鎖)					C	A	A	A	A	G	G	T	C	T	C	C	G	A	T	A	T	G	G	T																
太平洋産クロマグロ	A	C	A	C	C	C	C	T	C	C	T	G	T	C	C	A	A	A	A	G	G	T	C	T	C	C	G	A	T	A	T	G	G	T		915				
大西洋産クロマグロ	.	Y	915		
ミナミマグロ	.	T	915			
メバチαタイプ	915			
メバチβタイプ	915			
キハダ	.	T	915			
ビンナガ	Y	.	.	915		

図 2 プライマー配列及びマグロ属 6 種 7 タイプの配列

プライマー迅速法について、変更した塩基部分を赤字で示した。

3.2.2 迅速法による PCR

3.2.1 で改変したプライマーと、不純物の多い DNA においても増幅効率の良い DNA 合成酵素である KOD FX Neo を用いた 2.4.2 の条件により、3.1 の DNA 溶液 37 点について迅速法による PCR を行ったところ、通常法の 3 時間に対し、45 分間で PCR 増幅することが可能であった。

3.2.3 迅速法による制限酵素処理

迅速法による制限酵素処理後の電気泳動像を図 3 に示す。PCR 産物 37 点の制限酵素処理時間は通常法の 1 時間 30 分以上に対し、AluI は 15 分間、FastDigest TruI 及び FastDigest TasI は 5 分間で処理することが可能であった。

また、FastDigest 制限酵素で処理を行う際、電気泳動用の色素が添加されている Green Buffer (FastDigest 制限酵素添付品) を用いることで、電気泳動時の制限酵素処理溶液と色素の混合操作がなくなることから、より迅速に電気泳動を行うことができた。

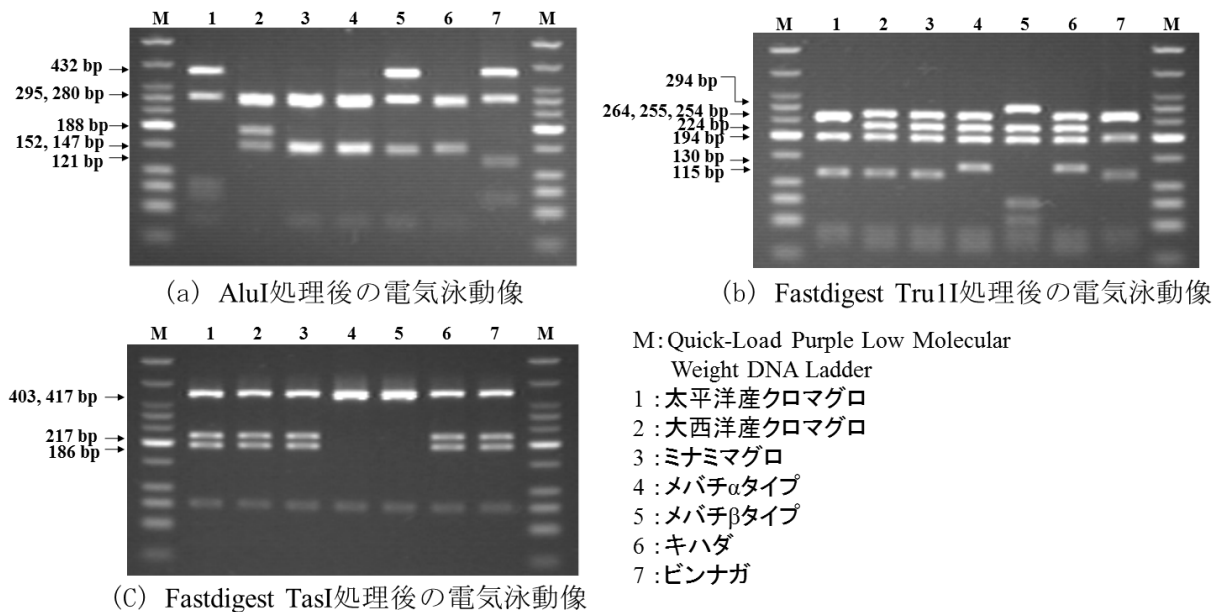


図 3 迅速法による制限酵素処理後の電気泳動像

なお、AluI について、FastDigest AluI (Thermo Fisher Scientific) を用いた場合も同じ 15 分間の処理であり、時間短縮のメリットはなかった。また、FastDigest TruI 及び FastDigest TasI について、試薬のコストを優先して通常法で用いる制限酵素 MseI、TruI 及び Tsp509I (TasI) で処理を行った場合、PCR 産物 2 μL に対し各 2U の使用により 15 分間で切断可能であった。

3.2.4 制限酵素の種類削減

現在行っている魚種の判別では、表示された魚種にかかわらずすべての試料において、制限酵素を 3 種類使用している。FAMIC では試料が想定とは異なる DNA 断片長パターンとなった場合は、次に DNA シークエンスにより判別を行っている。そこで、分析時間短縮のため、想定される魚種により使用する制限酵素の削減を検討した (表 2)。

表2 マグロ6種7タイプの基本のDNA断片長パターン

制限酵素	太平洋産 クロマグロ	大西洋産 クロマグロ	ミナミ マグロ	メバチ α タイプ	メバチ β タイプ	キハダ	ビンナガ
AluI	A	B	C	C	D	C	E
MseI (TruI)	A	B	B	C	D	C	A
Tsp509I (TasI)	A	A	A	B	B	A	A

制限酵素の使用例として、想定される魚種が太平洋産クロマグロ、大西洋産クロマグロ、メバチ β タイプ及びビンナガの場合は AluI のみの使用で、想定される魚種であるか否かの判別が可能である。このとき、太平洋産クロマグロ及び大西洋産クロマグロがビンナガと判別された場合は、クロマグロ（太平洋産又は大西洋産）ではビンナガのミトコンドリア DNA と同じ配列を持つ個体が存在することから核 DNA 分析を行う。同様に、ミナミマグロは AluI 及び MseI (TruI) を、メバチ α タイプ又は β タイプは Tsp509I (TasI) を、キハダは MseI (TruI) 及び Tsp509I (TasI) を使用することで、想定される魚種であるか否かの判別が可能である。これにより制限酵素処理を3種類から1又は2種類へ削減することが可能になった。

3.3 核 DNA の PCR-RFLP

簡易抽出した DNA（迅速法5点及び既報法¹⁾3点）及び通常法のキットにより抽出した DNA（2点）を用いて迅速法により PCR を行ったところ、いずれも PCR 増幅が可能であった。核 DNA はミトコンドリア DNA と比べて PCR 増幅効率が悪く、PCR 増幅の時間は通常法に要する1時間26分に比べて迅速法は1時間11分と15分のみの短縮となった。簡易 DNA 抽出法において、DNA 合成酵素に TaKaRa Ex Taq[®] HS を用いた場合、通常は PCR のサイクル数を増やす必要があり増幅時間は長くなるが、迅速法に KOD FX Neo を用いたことでサイクル数を増やす必要はなかった。また、制限酵素処理時間も通常法の1時間に対し FastDigest PvuII では5分間で処理することが可能であった。なお、試薬のコストを優先して通常法で用いる PvuII で処理を行った場合、PCR 産物 2 μ L に対し 2U の使用により 15分間で切断された。

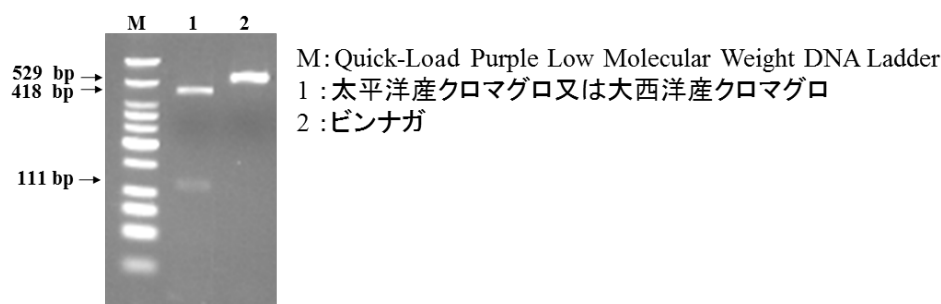


図4 FastDigest PvuII 処理後の電気泳動像

3.4 STeP 法による塩基配列決定

サイクルシーケンシングにおける STeP 法⁹⁾とは、伸長反応の時間を3段階（1分15秒→1分30秒→2分）で徐々に長くすることで、全反応時間を2.5時間から1時間程度へ短縮化できる方法であり、反応時間の短縮化だけでなく、BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Premix の使用量が1/4量となる利点もある方法である。

今回、STeP 法でミトコンドリア DNA を対象に簡易抽出 DNA（迅速法13点及び既報法¹⁾13点）を各4プライマーで、また、核 DNA を対象に簡易抽出 DNA（迅速法3点及び既報法¹⁾3点）及

び通常法によるキット抽出 DNA (2 点) を各 2 プライマーで分析した結果、解析は可能であった。

また、FAMIC の調査研究において、STeP 法はマグロ以外の米、大豆及びコンブのシーケンスを行った際にも使用可能であった (未公表データ) ことから、他品目にも拡大することが可能と考えられた。

3.5 サイクルシーケンス後の精製

エタノール精製の他、BigDye® XTerminator™ Purification Kit の製品の添付プロトコールによるシーケンス反応物の精製も可能であった。エタノール精製は 1 時間 30 分程度を要するが、BigDye® XTerminator™ Purification Kit では 30 分程度で精製可能であり、1 回の分析試料数が少ない場合には有用であった。

3.6 分析に要する時間

マグロについて 1 点ずつ分析した場合、DNA 抽出、ミトコンドリア DNA の PCR、制限酵素処理及び電気泳動 (PCR-RFLP 分析) で判別を行う場合は、分析に要する時間が通常法の 17.9 時間から迅速法では 8.3 時間となり、分析時間が 54.0 %削減された。ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 分析に加えて、ミトコンドリア DNA のシーケンスにより判別を行う場合は、分析に要する時間が 28.4 時間から 14.7 時間となり、分析時間が 48.4 %削減された。また、ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 分析に加えて、核 DNA の PCR-RFLP 分析を行う場合は分析に要する時間が 25.8 時間から 15.0 時間となり 42.1 %削減された (表 3)。

表 3 1 点あたりの分析時間概算

工程	時間			
	通常法	迅速法	削減時間	削減率 (%)
DNA抽出	3.5 時間	0.8 時間	2.7 時間	76.2
ミトコンドリアDNA PCR(電気泳動含む)	5.8 時間	3.4 時間	2.3 時間	40.6
ミトコンドリアDNA 制限酵素処理(電気泳動含む)	8.7 時間	4.0 時間	4.7 時間	53.8
ミトコンドリアDNA シークエンス(精製時間を含む)	10.5 時間	6.4 時間	4.1 時間	39.0
核DNA PCR+制限酵素処理(電気泳動含む)	7.9 時間	6.7 時間	1.2 時間	15.2
ミトコンドリアDNA DNA抽出+PCR+制限酵素処理	17.9 時間	8.3 時間	9.7 時間	54.0
ミトコンドリアDNA DNA抽出+PCR+制限酵素処理+シーケンス	28.4 時間	14.7 時間	13.8 時間	48.4
ミトコンドリアDNA DNA抽出+PCR+制限酵素処理 核DNA PCR+制限酵素処理	25.8 時間	15.0 時間	10.9 時間	42.1
ミトコンドリアDNA DNA抽出+PCR+制限酵素処理 核DNA PCR+制限酵素処理+シーケンス	36.3 時間	21.4 時間	15.0 時間	41.2

4. まとめ

マグロ属の種判別法を用いて、DNA 分析の一連の工程 (DNA 抽出、PCR、制限酵素処理、制限酵素処理後の電気泳動、DNA シークエンス等) を通じた迅速化の検討を行った。簡易 DNA 抽出法の溶解操作の工夫、プライマーや DNA 合成酵素の変更による PCR 反応時間の短縮、FastDigest 制限酵素の使用や制限酵素使用数の削減等による分析時間の短縮、STeP 法によるシーケンス反応時間の短縮の検討を行い、DNA 分析の一連の工程を通じた分析時間が 50 %程度削減された。

今回の迅速化を検討した DNA 分析に係るそれぞれの工程は、他品目の DNA 分析の各工程に適宜組み合わせ導入することが可能であるため、他の品目の分析時間の短縮にも効果があると考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、マグロの魚種判別法についてご指導いただきました国立研究開発法人水産研究・教育機構 山下倫明氏、張成年氏、柳本卓氏、DNA分析の迅速法の検討につきまして、シーケンスの STeP 法等をご助言頂きました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門（現 農林水産省 消費・安全局）岸根雅宏氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 井伊悠介, 小岩智宏, 足立静香 : 水産物からの簡易 DNA 抽出の検討, 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, **40**, 33-41 (2017)
- 2) Chow S. and Inoue S.: Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of Thunnus tuna species: *Bull. Nat. Res. Inst. Far Seas Fish.*, **30**, 207-225 (1993)
- 3) Chow S. and Kishino H.: Phylogenetic relationships between tuna species of the genus Thunnus (Scombridae:Teleostei): Inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes: *J. Mol. Evol.*, **41**, 741-748 (1995)
- 4) Takeyama H., Chow S., Tsuzuki H. and Matsunaga T.: Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna Thunnus species and its application to species identification: *J. Fish Biology*, **58**, 1646-1657 (2001)
- 5) Alvarado Bremer JR., Viñas J., Mejuto J., Ely B. and Pla C.: Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes: *Mol. Phylogenet. Evol.*, **36**, 169-187 (2005)
- 6) Chow S., Nakagawa T., Suzuki N., Takeyama H. and Matsunaga T.: Phylogenetic relationships among Thunnus species inferred from rDNA ITS1 sequence: *J. Fish Biology*, **68**, 24-35 (2006)
- 7) Díaz-Arce N., Arrizabalaga H., Murua H., Irigoien X. and Rodríguez-Ezpeleta N.: RAD-seq derived genome-wide nuclear markers resolve the phylogeny of tunas: *Mol. Phylogenet. Evol.*, **102**, 202-207 (2016)
- 8) 北川貴士: クロマグロ *Thunnus orientalis* の行動生態と水温適応機構に関する研究 日本水産学会誌 **74**(4), 580-583 (2008)
- 9) Platt A.R., Woodhall R.W., George A.L. Jr.: Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques*, **43**, 58-62 (2007)