

食材の正しい産地を知るうえで、今、注目を集めているのが、遺伝子を使って生物の種の系統を分析する技術だ。東京農工大学の竹山助教授のグループでは、DNA解析によってマグロの種を迅速に判別する自動分析装置の実用化を進めている。

## 遺伝子から魚の産地を探る試み DNA解析によるマグロの魚種判別

竹山春子 東京農工大学工学部生命工学科 助教授  
取材・文=小原誠之



たけやま・はるか  
工学博士。専門は生物工学、遺伝子工学、微生物学、マリンバイオテクノロジー。東京農工大学大学院工学研究科卒業。株式会社アドバンス研究所研究員、マイアミ大学海洋研究所研究員、東京農工大学工学部助手などを経て、現在、東京農工大学工学部生命工学科助教授。

### 貴重な資源としてのマグロ

そもそもなぜマグロの種の判別というテーマが出てきたのかというと、資源量が多く比較的安価なキハダも、資源量が少なく非常に高価なクロマグロやミナミマグロといった種類も見た目にはよく似ていて、嘘の申告をされてもよくわからない、というところにあります。また、多くの水産資源でもそうですが、漁業と資源の現状を把握して、資源を有効に利用してゆくために関係国が科学的調査に基づいて協議し、この種は少なくなったらそれ以上は獲らないとか、頭数制限をするなどの規約があるわけです。資源の減少が危惧されているクロマグロやミナミマグロではとくに規制が厳しいのはそのためです。

インド洋にはまったくみられませんが、完壁に隔離ができていて考えられるので、これらは個別の資源として扱っています。しかし、形態から見ると別種ともいえないので、一つランク下の亜種とか別系群という概念でとらえています。互いに交流のないこのような系群を守るためには、それぞれに適した管理方策が必要なのです。

漁獲していいのはどれくらいかという基準を決めるときに、完全に別種であれば、たとえばクロマグロとメバチは種が違いますから、それぞれ別個に規定を決めていかなければいけません。一方、太平洋のクロマグロと大西洋のクロマグロはほとんど見分けが付きませんが、地理的な生息状況を見ると、それぞれ南半球にはほとんど生息しませんし、途中

こうしたことから、マグロ類の系群もしくは種というものを遺伝子レベルできちんと定義できるのかという研究が始まりました。同時に、頭数の制限などいろいろな対応についても研究が進められています。現在、クロマグロ、ミナミマグロのように高級なものに関してはとくに規制が厳しくて、資源保護の協定に加盟している国々では、どこで獲ったマグロかという履歴書を付けて輸出しているのです。日本に入ってくるクロマグロを見ると、ちゃんとタグのようなものに履歴が記されて出荷されています。ところが、協定に加盟していない国から輸入する場合には、どういふものを獲っているのかよくわからないのが現状です。とにかく日本はマグロの消費量が一番多く、いろいろな国が日本への輸出をしていますから、規制対象のマグロを輸

入してしまうと、日本がバッシングの対象になってしまいます。ですからそういう対応をきちんとしていくためには、分子生物学的なレベルで、正しく種の判別をする必要があったというわけなのです。

また、今はマグロの場合一匹まるごとの形で輸入されますが、なかには切り身やブロックで輸入されている場合もあり、将来的にはそのような形態での取引が増加することも考えられます。そうなると、ますます素性がわからなくなるわけですね。クロマグロをキハダあるいはまったく別の動物と称して輸出するというように、輸出国で実際とは違うことが記載されていてもわからない。そういう場合にどうやって判別するのかということとは以前から課題となっていて、DNAか、もしくはタンパク質が決め手になるだろうとされてきました。ところがタンパク質は、かなり以前から研究されていますが、非常に種が近いものに関しては厳密にわけられないことから、DNA鑑定に期待が寄せられているのです。

**遺伝子の塩基配列の差異**

こうした背景のもと、遺伝子を利用する研究が進んだ結果、現在では

遺伝子の差異を見ながら種の判別ができるようになってきました。これは、遺伝子のある部分を特殊な酵素で切断してやるやり方です。

DNAには四つの塩基、アデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)がずらつと並んでいますが、ある遺伝子部分の塩基の配列を、特定の酵素で切ることができず。ところが配列が違っていると、その酵素では切れなくなります。この微妙な配列の違いを変異といいます。種間や種内でこの変異を検索しパターン化してゆくわけです。このパターンに基づいて分類していくと、この種はこの型、こっこのマグロはこっこの型というふうにマグロの種を判別することが可能です。

しかし、こうした分子生物学的手法はまだ時間と手間がかかるため、非常に多数の検体を短時間に処理して調べなければならぬという輸入現場での種判別には、必ずしも適していませんでした。たとえば実際の防疫の現場での抜き打ち検査などを考えると、二時間くらいで結果が出るようなシステムが必要でしょう。そこで私たちは、より高感度の検出、より迅速な種判別ができるシステムの開発に取り組んだのです。市場に流通しているおもな六種類

のマグロ(メバチ、太平洋クロマグロ、大西洋クロマグロ、ミナミマグロ、キハダ、ピナガ)を取り上げ、それぞれのDNA上のATPase 6と呼ばれる遺伝子を比較したところ、NR1、NR2という二つの領域の塩基配列に種特有の塩基置換があることを発見しました(図1)。

遺伝子の情報はDNA上の塩基三個の並び、コドンと呼ばれますが、それによって、その塩基情報からつくられるアミノ酸が決まります。しかし、コドンの三つ目の塩基には多少のバリエーションがあつて、結構変異が見られるのです。ただし、三つ目の塩基が置換していても、そのコドンからは同じアミノ酸がつくられるような変異なので、検体の切り身をアミノ酸レベルで調べてもマグロの種としての差異は現れません。

一方で、その場合でも、塩基配列という微妙な情報を見れば、種の違いを読み取ることが出来ます。この三つ目の塩基の違いというのが、NR1、NR2という二つの領域において、マグロの種によってかなり固定されていることを私たちは突き止めました。

そこで、NR1、NR2領域のDNAの二本鎖をほどいて一本にし、そこに、あるマグロ種の塩基配列に

ぴったり合うような(相補的な)、プローブと呼ばれる検査用の短い一本鎖DNAを結合させてやるとどうなるか。すると、同じ配列をもつマグロどうしは結合して二本鎖になりますが、ミスマッチであれば結合しない。そういう、結合する率・結合しない率を測定、数値化して評価することで、マグロの種の正確な判別が可能になりました。この場合、NR1について三種類、NR2については四種類の配列を調べれば、六種類のマグロの同定が可能です。

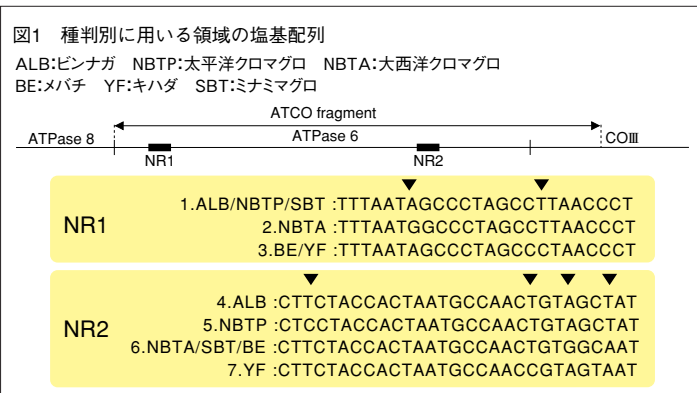


図2 発光量の違いに基づく相対値から得られる種判別パターン  
 1: ALB/NBTP/SBT 2: NBTA 3: BE/YF 4: ALB  
 5: NBTP 6: NBTA/ABT/BE 7: YF

	NR1			NR2				
	1	2	3	4	5	6	7	
A.	0.76	0.69	1.00	0.83	0.78	1.00	0.90	→メバチ(BE)
B.	1.00	0.81	0.84	0.88	1.00	0.69	0.79	→太平洋クロマグロ(NBTP)
C.	0.84	1.00	0.73	0.65	0.56	1.00	0.83	→大西洋クロマグロ(NBTA)
D.	1.00	0.83	0.84	0.67	0.53	1.00	0.77	→ミナミナグロ(SBT)
E.	0.80	0.63	1.00	0.74	0.60	0.70	1.00	→キハダ(YF)
F.	1.00	0.79	0.82	1.00	0.76	0.50	0.51	→ピンナガ(ALB)

磁性細菌粒子を用いた  
 マグロ魚種判別システム

さらに、DNAの反応効率を高めるために、私たちは磁性細菌粒子を使うことを考えました。これは磁性細菌といって体の中に五〇〜一〇〇ナノメートルくらいの非常に小さなビーズ状の磁石の微粒子をもつ細菌があり、その磁石を利用するというものです。

この磁性細菌粒子(バイオナノビーズ)は、東京農工大学工学部生命工学科

の松永是教授のグループが以前から微生物学的な基礎テーマ、さらにはそのビーズの応用研究として取り組んでいるもので、なぜ彼らはこういうものをつくれるのか、自然界で何をしながら生きていくのかといったことを、遺伝子的な解析、分子生物学的な解析で明らかにしてきました。また、このビーズを用いた免疫測定やDNA判別のシステムを開発してきました。そこで、これをマグロの種の判別に応用しようと考えたのです。

五〇〜一〇〇ナノメートルという微細なこのバイオナノビーズの上に、タンパク質でも遺伝子でも架橋してつなぐことができるのですが、この磁石は周りが脂質の二重膜で覆われているので、普通の磁石が互にくっついてしまうのに比べ、適度に分散しやすいという利点があります。また、普通、化学的に反応させる場合、お互いどうしがぶつかる率が高いほど反応が速く進みます。したがって、こういう小さなビーズの場合、反応場の中で動き回りますからよくぶつかって反応が効率的に進むわけです。それに、ビーズが小さくなればなるほど、体積に占める表面積の割合は大きくなりますから、表面積が大きくなるということは、

さらにその分、反応場の広さが大きくなるということです。従来の反応でたとえば数時間かかっていたものが、極小のビーズを使うと一〇分程度で終わってしまうくらいのメリットがあります。また、このビーズは磁石になっていきますから回収も簡単です。通常、いろいろなものを分離するには遠心分離機にかけて上と下に分けなければなりません。これは磁石で簡単に集めることができ、分離も非常に簡単なのです。

さらに、あらかじめ検体のDNAを増幅させるとき、発光したり蛍光を発したりするように化学的なマーカー(標識)をつけてやれば、ビーズに架橋したDNA一本鎖(ロープ)と検体のDNAが相補的に結合した反応の結果を、発光あるいは蛍光によって可視化して検出することができます。今はその精度を上げていくようにしているところです。そうやってビーズを検体マグロのDNAに反応させ、ビーズの発光量を測定、解析をおこなったところ、同種のマグロの塩基配列を用いたときと、違う種のマグロの塩基配列を用いたときとは、発光量に差異が認められました(図2)。そこで、発光強度がいちばん高かったものを1.0

として、その他を相対値化したところ、七種類のプロフィールを用いたとき、どこが1.0の結果になったかの組み合わせによって、AからFまでの六種類のマグロの種判別が可能であることが示されたのです。

このシステムの利点は、バイオナノビーズを用いることで工程の自動化が可能であり、大量に速く処理できることです。その利点を生かして、検体のDNAの抽出からその増幅、それと相補的なDNAとの結合、測定、解析と、一連の作業をすべて自動化することを目指しているところです。さらに、装置そのものをかなり小さいユニットにして、取り扱っても簡単に、より低コストにするというところ。これが今後の課題ですね。

現在はマグロの判別をテーマにやっていますが、それ以外にも遺伝子レベルで識別したいというものはすべてできる、そういうことを目指しています。今後ますます、マグロ以外にもコメ、豚肉、牛肉と、最終的には遺伝子の配列に頼らざるを得ない部分が出てくるでしょう。食の安全、そして食の信頼は今や、遺伝子が担っているといえるのではないのでしょうか。