

DNA 解析によるイワシの種判別

桂 弘毅*, 八木 潤*, 石川 順一*, 村上 孝之*, 寺内 豊*, 松崎 隆一*

Species Identification of Sardines with DNA Analysis

Hiroataka KATSURA*, Jun YAGI*, Junichi ISHIKAWA*, Takayuki MURAKAMI*,
Yutaka TERAUCHI* and Ryuichi MATSUZAKI*

*Tokyo Customs Laboratory

2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

In Japan, among imported sardines, three genera of sardines (*Engraulis*, *Sardinops* and *Etrumeus*) are controlled by import quotas in compliance with the Import Trade Control Order. Therefore, species identification of sardines is necessary for customs clearance. In general, species can be identified on the basis of morphological knowledge. However, for juvenile fish such as “chirimenjako (boiled and dried baby sardines)” with fewer outward features, or processed fish in which a part having vital information for species identification has been removed, a morphological judgment based on outward features is virtually impossible. Accordingly, in this study, we tried to identify the species of sardines using partial genetic regions encoding cytochrome *b* on mitochondrial DNA. As a result, we confirmed that it was possible to discriminate sardines at the species level.

1. 緒 言

実行関税率表において第 3 類に分類される「イワシ」のうち、カタクチイワシ属 (*Engraulis spp.*)、マイワシ属 (*Sardinops spp.*) 及びウルメイワシ属 (*Etrumeus spp.*) のものについては、輸入貿易管理令により輸入が制限されている (IQ 該当品目)。一方、これら以外の種 (例えば、タイワンアイノコイワシ属 (*Encrasicholina spp.*) のもの) については、輸入貿易管理令による輸入制限を受けない IQ 非該当品目であることから、IQ 該当の判断のため、輸入通関の際は、イワシの種の確認が必要である。

一般に、対象とする個体が新鮮で完全な状態の成魚であれば、形態学的な知見をもとに魚種の判別を行うことが可能である。しかし、ちりめんじゃこのように外観上の特徴の少ない稚魚や、種判別のために必要な情報を有する部位が切除された加工品などでは、形態学的な判別方法だけで、種を特定することはほぼ不可能である。

これに対して DNA 解析では、対象とする個体の部位を考慮に入れる必要が無く、またタンパク質に比べ熱等の外的要因に対して比較的安定であるため、近年、その情報は様々な加工食品の原料推定に利用されている^{1)~3)}。

ちりめんじゃこに関しては、Akasaki らにより、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 上の 16S rRNA の一部、あるいはシトクロム *b*

の一部 (前半 521 塩基) を利用した魚種推定の研究が行われ、IQ 該当の判別 (属レベル) が可能であることが報告されている^{4),5)}。

本研究では、種判別の指標に用いる遺伝子領域について、製造工程中の煮沸及び乾燥処理による DNA の断片化を考慮して、mtDNA 上のシトクロム *b* 領域の前半部分 (414 塩基) を標的とした、より増幅対象塩基配列長の短いプライマーを用い、イワシの魚種判別に関する検討及び輸入ちりめんじゃこについて魚種の推定を試みたので報告する。

2. 実 験

2. 1 試料

イワシの成魚試料は、事前に形態学的な知見から魚種の査証が行われた生鮮のもの計 3 種 24 検体 (種ごと 8 検体ずつ) である。輸入ちりめんじゃこは、神戸税関、名古屋税関より提供されたもの及び販売業者から購入したもので、韓国産のものは 2 ロット、中国産のものは 1 ロット、インドネシア産のものは 3 ロット、タイ産のものは 1 ロットであり、各ロットから 8 検体ずつ選出した。試料の種名や原産地等、詳細については、Table 1、2 に示す。

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海 2-56

Table 1 Grown sardines used in this study

code	Common name	Scientific name	Family	Location or Origin
K_1_1-2	カタクテイワシ(Japanese anchovy)	<i>Engraulis japonicus</i>	<i>Engraulidae</i>	Ise, Aichi
K_2_1-2	— " —	— " —	— " —	Akune, Kagoshima
K_3_1-2	— " —	— " —	— " —	Kujukuri, Chiba
K_4_1-2	— " —	— " —	— " —	Mikawa, Aichi
M_1_1-2	マイワシ(Japanese sardine)	<i>Sardinops melanostictus</i>	<i>Clupeidae</i>	Kujukuri, Chiba
M_2_1-2	— " —	— " —	— " —	— " —
M_3_1-2	— " —	— " —	— " —	Aichi
M_4_1-2	— " —	— " —	— " —	— " —
U_1_1-2	ウルメイワシ(Bigeys sardine)	<i>Etrumeus teres</i>	— " —	Kouchi
U_2_1-2	— " —	— " —	— " —	Kagoshima
U_3_1-2	— " —	— " —	— " —	Mie
U_4_1-2	— " —	— " —	— " —	Wakayama

Table 2 Imported small baby sardines (chirimenjako) used in this study

origin	Abbreviation
Korea	KR_1_1-8
— " —	KR_2_1-8
China	CH_1-8
Indonesia	IN_1_1-8
— " —	IN_2_1-8
— " —	IN_3_1-8
Thai	TH_1-8

2. 2 分析装置及びプライマー

PCR 増幅装置	Gene Amp [®] PCR system9700 (Applied Biosystems 社製)
DNA シークエンサー	ABI PRISM [®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製)
電気泳動装置	Mupid-exU (株)アドバンス製)

プライマー-L14735⁶⁾

AACCACCGTTGTTATTCAAC

プライマー-H15149⁶⁾

GGTGGCKCCTCAGAAGGACATTTGKCCTCA

2. 3 実験

各試料について、肉片約 30mg から DNeasy[®] Blood & Tissue KIT (QIAGEN 社) により DNA を抽出し、mtDNA 上のシトクロム *b* をコードする遺伝子領域の一部を PCR 法で増幅した。PCR の反応溶液は、鋳型 DNA: 約 100ng, プライマー各 5pmol, dNTP mixture (25nM each) : 2.4μl, Ex-taq buffer : 3μl, Ex-taq : 0.75 Unit, 滅菌水 : (合計 30μl に調製) とした。PCR の反応条件は、熱変性 95°C (1 分) を行った後、94°C (30 秒)、55°C (30 秒)、72°C (1 分) を 40 回繰り返した後、72°C (5 分) の伸長反応を行った。アガロースゲル電気泳動により、増幅した DNA 断片の有無を確認した後、PCR 産物をイソプロパノール沈殿により精製し、PCR 反応と同じプライマーを用いて Big Dye[®] Cycle Sequencing KIT Ver.3.1 添付のプロトコールに従い、Forward 鎖及び Reverse 鎖の両鎖のサイクルシーケンシング反応を行った。

サイクルシーケンシング反応後、エタノール沈殿法により未反応色素を除去し、DNA シークエンサーにより両鎖から PCR 産物の

塩基配列を決定した。得られた配列データを用いて相互比較によりアライメントした後、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されている塩基配列データと比較した。また、アライメントした輸入ちりめんじゃこの配列データについて、近隣結合法による分子系統解析を行った。

3. 結果及び考察

3. 1 電気泳動法による DNA の増幅確認

PCR 法で増幅した各試料の生成物について、アガロースゲル電気泳動を行った結果の一部を Fig.1、2 に示す。生成物は、いずれの試料についても 500bp 付近に特異的な長さの DNA 断片の増幅を確認することができた。

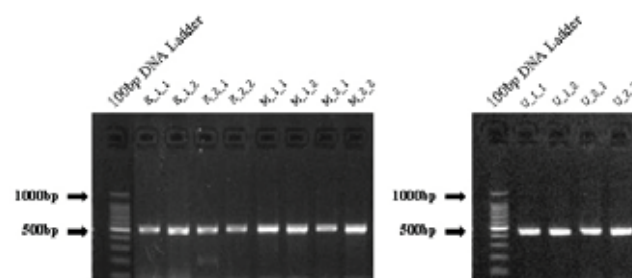


Fig.1 Electrophoresis of PCR products of grown sardines by a primer set corresponding to the cytochrome *b* region.

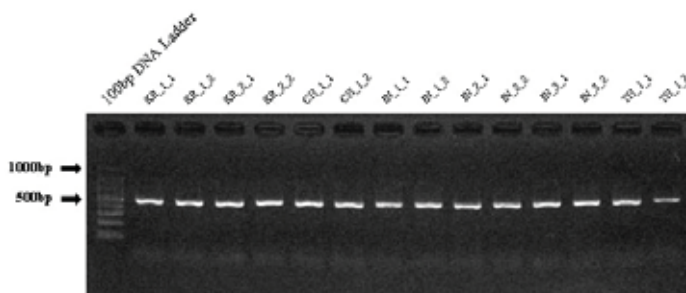


Fig.2 Electrophoresis of PCR products of imported small baby sardines (chirimenjako) by a primer set corresponding to the cytochrome *b* region

3. 2 DNA シークエンサーによる塩基配列の解読及び解析

各試料から得られた PCR 産物の配列を決定し、DDBJ に登録されている標準イワシ類のデータと共通な mtDNA 上のシトクロム *b* 領域の前半部分 (384 塩基部分) を抽出した。この 384 塩基部分を用い、各試料の配列データと DDBJ 登録データを比較した。

イワシの成魚試料は、カタクチイワシ、マイワシ、ウルメイワシいずれの魚種のおいても、DDBJ 登録データと 99~100% の相関性を示した (Table 3、4)。このことから、今回の研究で用いたプライマーにより、これらの属のイワシ 3 種のものについては、判別が可能であることを確認した。

Table 3 Concordance rate with DDBJ registration data of each grown sardine

code	Accession No.	concordance rate	code	Accession No.	concordance rate	code	Accession No.	concordance rate
K_1_1	AB040676	99.3%	M_1_1	AB032554	99.8%	U_1_1	AP009139	99.8%
K_1_2	AY923784	100.0%	M_1_2	— " —	100.0%	U_1_2	— " —	100.0%
K_2_1	AY923786	99.8%	M_2_1	— " —	100.0%	U_2_1	— " —	99.8%
K_2_2	— " —	100.0%	M_2_2	— " —	100.0%	U_2_2	— " —	99.1%
K_3_1	— " —	99.5%	M_3_1	— " —	99.5%	U_3_1	— " —	99.1%
K_3_2	AY923784	99.5%	M_3_2	— " —	99.5%	U_3_2	— " —	99.8%
K_4_1	AB040676	99.3%	M_4_1	— " —	99.8%	U_4_1	— " —	100.0%
K_4_2	AY923784	99.3%	M_4_2	— " —	100.0%	U_4_2	— " —	99.8%

Table 4 Standard sample data of DDBJ used in this study

Scientific name	Common name	Family	Accession No.	code
<i>Engraulis japonicus</i>	Japanese anchovy	Engraulidae	AB040676(Inoue et al. ⁷⁾)	E_jap1
— " —	— " —	— " —	AY923784(Grant et al. ⁸⁾)	E_jap2
— " —	— " —	— " —	AY923786(Grant et al. ⁸⁾)	E_jap3
<i>E. encrasicolus</i>	European anchovy	— " —	AY923809(Grant et al. ⁸⁾)	E_enc1
— " —	— " —	— " —	AY923810(Grant et al. ⁸⁾)	E_enc2
<i>E. mordax</i>	Californian anchovy	— " —	AY923775(Grant et al. ⁸⁾)	E_mor1
— " —	— " —	— " —	AY923777(Grant et al. ⁸⁾)	E_mor2
<i>E. anchoita</i>	Argentine anchovy	— " —	AY923767(Grant et al. ⁸⁾)	E_anc1
— " —	— " —	— " —	AY923768(Grant et al. ⁸⁾)	E_anc2
<i>E. ringens</i>	Anchoveta	— " —	AY923770(Grant et al. ⁸⁾)	E_rin1
— " —	— " —	— " —	AY923772(Grant et al. ⁸⁾)	E_rin2
<i>Sardinops melanostictus</i>	Japanese sardine	Clupeidae	AB032554(Inoue et al. ⁹⁾)	S_mel1
— " —	— " —	— " —	AF472586(Jerome et al. ¹⁰⁾)	S_mel2
<i>S. caeruleus</i>	— " —	— " —	AF472585(Jerome et al. ¹⁰⁾)	S_cae
<i>Etrumeus teres</i>	Bigeye sardine	Clupeidae	AP009139(Lavoue, S et al. ¹¹⁾)	E_ter

輸入ちりめんじゃこの中で、韓国産のものは 16 検体中 15 検体、中国産のものは 8 検体中 7 検体について、日本近海物のカタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) の塩基配列データと 99~100% の相関性を示した。しかし、各々残りの 1 検体については、DDBJ に高い相関性を示す塩基配列データが無く、カタクチイワシ (*E. japonicus*) との相関性が 84% 程度と低いことから、異なる種と推定され、ちりめんじゃこと一緒に捕獲されたものと考えられる。

インドネシア産のものは 24 検体中 1 検体について、カタクチイワシ (*E. japonicus*) の塩基配列データと 99.7% の相関性を示した。

インドネシア産の残りの 23 検体及びタイ産のもの 8 検体については、DDBJ に高い相関性を示す塩基配列データが無かった。

3. 3 輸入ちりめんじゃこの分子系統解析

各産地の輸入ちりめんじゃこ試料のうち、それぞれ 1 ロット 8 検体を抽出し、3. 2 で用いた 384 塩基部分の配列データに、DDBJ 登録データを加え、分子系統解析を行った結果を Fig.3-1, 2 に示す。この解析の結果、カタクチイワシ属、マイワシ属及びウルメイワシ (*Etrumeus teres*) は、それぞれ独立したクラスターを形成した。

Fig.3 Neighbor-joining tree of imported chirimenjako with standard fishes based on 384 nucleotide sequences of the mitochondrial cytochrome *b* gene. Bootstrap values >70% are reported on the nodes of the tree (1,000 replicates).

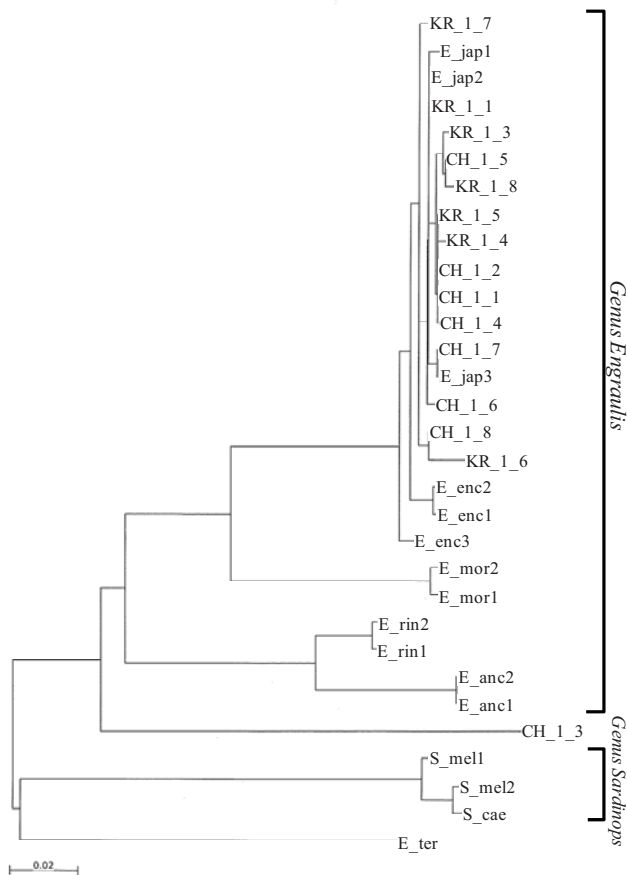


Fig.3-1 Chirimenjako imported from China or Korea

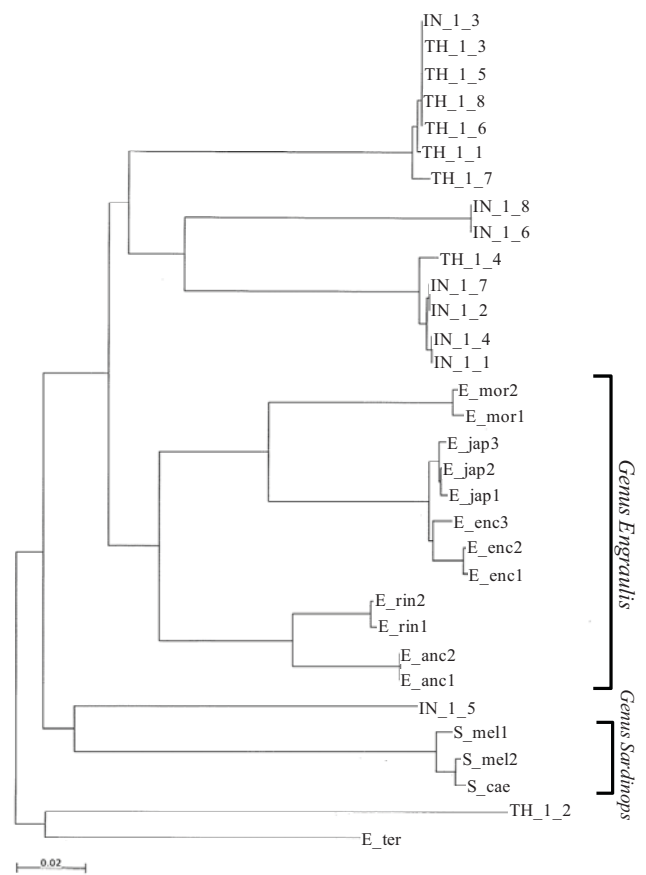


Fig.3-2 Chirimenjako imported from Indonesia or Thailand

韓国産及び中国産ちりめんじゃこは、3. 2でDDBJ登録データとの相同性の低かったものを除き、カタクチイワシ属 (*Genus Engraulis*) の魚種から形成されるクラスターの内部に位置している。これらについては、カタクチイワシ (*E. japonicus*) の塩基配列データと 99~100%の相同性を示していることから、日本近海に生息するカタクチイワシ (*E. japonicus*) と同一種と思われる。この結果は、Akasaki らが L14724-Glu, Sard-CytbR のプライマーセットを用い、シトクロム *b* 領域の部分配列から輸入ちりめんじゃこについて原料魚種の判別を行った際の分子系統解析結果と矛盾しない。

インドネシア産及びタイ産のものは、IQ 該当品目であるカタクチイワシ属 (*Genus Engraulis*)、マイワシ属 (*Genus Sardinops*) の魚種が形成するクラスター及びウルメイワシ (*E. teres*) とは別のクラスターを形成し、いずれのクラスターも遺伝的な距離が大きい関係であることが解る。このことからインドネシア産及びタイ産のちりめんじゃこは、IQ 該当の 3 属とは属レベルで異なる魚種であると推定できる。これらについては、比較的カタクチイワシ属に近縁であること及びインドネシアやタイの海域に生息するこ

とを考慮すると、カタクチイワシ科のタイワンアイノコイワシ属 (*Genus Encrasicholina*) の魚種である可能性が高い。

なお、今後標準となるイワシ類の収集に努め、イワシの塩基配列データを蓄積させることにより、今回魚種の判別にいたらなかった検体についても、正確な種の特定が可能になると思われる。

4. 要 約

日本に輸入されるイワシのうち、カタクチイワシ属、マイワシ属、ウルメイワシ属の魚種については、輸入貿易管理令により輸入制限されている。そのためイワシの輸入通関に際しては、イワシの種判別が必要になる。しかしながら、輸入品が稚魚や加工品の場合、形態学的な特徴が欠如していることが多く、形態学による魚種の判別が非常に困難である。そこで本研究では、mtDNA 上のシトクロム *b* 領域の前半部分 (384 塩基部分) を用いてイワシの種判別を試み、ちりめんじゃこの魚種判別に関する検討を行った。その結果、イワシの種レベルでの識別が可能であることを確認した。

文 献

- 1) Javier Q., Rodrigo V., Monica I., Carmen G.S., Maria J.C., Ricard I.P., Harmut R., Georgina L.H., Valerie J.R., Susan E.P., Carla R., Ana T.S. and Manuel R., : *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5108 (2001)
- 2) Paola S., Paola Z. and Tauro M.N.: *J.Agric. Food Chem.*, **49**, 1194 (2001)
- 3) Marc J., Christophe L., Veronique V. and Monique E.: *J.Agric. Food Chem.*, **51**, 7326 (2003)
- 4) Akasaki T., Saruwatari T., Tomonaga H., Satou S. and Watanabe Y.: *Submitted to Fisheries Science*.
- 5) 赤崎哲也, 猿渡敏郎, 片山貴之, 朝長洋祐 : 関税中央分析所報 Vol.45 5-9 (2005)
- 6) 大原一郎、村田裕子、小林敬典、高嶋康晴、星野浩一 : DNA 多型 Vol.15,189-194 (2007)
- 7) Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K. and Nishida, M.: *Fish. Sci.* 67, 828-835 (2001)
- 8) Grant, W.S., Leslie, R. W. and Bowen, B.W.: *Fish Biol.* (2005) In press.
- 9) Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K. and Nishida, M.: *Fish. Sci.* 66, 924-932 (2000)
- 10) Jerome,M., Lemaire,C., Bautista,J.M., Fleurence,J. and Etienne,M.: *J. Agric. Food Chem.*, 51, 43 (2003)
- 11) Lavoue,S., Miya,M., Saitoh,K., Ishiguro,N.B. and Nishida,M.: *Mol. Phylogenet. Evol.* 43 1096-1105 (2007)