

## PCR-RFLP法によるいかの種判別

高野 香織\*, 河嶋 優美\*, 片山 貴之\*, 山崎 幸彦\*

### Species Identification of Cuttle fish Using PCR-RFLP Method

Kaori TAKANO\*, Yuumi KAWASHIMA\*, Takayuki KATAYAMA\* and Yukihiko YAMAZAKI\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

In the Customs Tariff Schedule, Cuttle fish and Squid classified under heading 03.07 are all controlled by import restrictions except those called "mongo ika". Therefore, it is necessary to differentiate species of "mongo ika" from all other cuttle fish and squids. In this study, we identified cuttle fish species by using two DNA analyses: molecular phylogenetic analysis, and the PCR-RFLP method, the latter can be used in Customs laboratories in Japan. The results showed that the PCR-RFLP method can identify for screening purposes the species of "mongo ika" used in this study.

### 1. 緒 言

関税率表第 03.07 項に分類されるいかは、もんごういかを除く全てが輸入貿易管理令によって輸入規制されている。ここでいうもんごういかとは、分類例規第 2 編国内分類例規 03.07 項 1. 「もんごういかの取扱について」において規定されている、コウイカ科のヨーロッパコウイカ (*Sepia officinalis*)、トラフコウイカ (*Sepia pharaonis*)、カミナリイカ (*Sepia lycidas*)、コブシメ (*Sepia latimanus*)、オーストラリアコウイカ (*Sepia apama*) の 5 種類のいかのことである。

従来いかの種判別は、形態学的な知見を元にした判別法により行われてきたが、同法ではいかの加工度合により判別困難な場合がある。近年、税關で実施してきた種判別法として、遺伝子配列情報を利用した DNA 分析法がある。DNA 分析法は外観を考慮に入れる必要が無く、熱等の外的要因からも比較的安定であることから、いかの種判別にも有効な手法と考えられる。

しかし、今までにいかの種判別法として報告されているのは、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した後、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されている標準の塩基配列と比較することによって種判別を行う方法である<sup>1)</sup>。この方法に必要な DNA シークエンサーは関税中央分析所と一部の税關にのみ配備されていることから、多くの税關分析室においては同法を実施できない状況にある。また、これまでの研究ではもんごういか 5 種全てのデータを用いて解析していないことから、もんごういかの種判別を完全に行なうことは困難であった。以上のことから、各税關においていかの種判別を行うためには、もんごういか 5 種全

ての遺伝子情報を用いて、多くの税關で実施可能な実験手法を確立する必要があると考えられた。

当研究では、DNA 分析においていかの種判別に有効なミトコンドリア DNA の 16S rRNA 遺伝子の前半領域（以下 16S 領域）及び Cytochrome oxydase subunit I 遺伝子の前半領域（以下 CO I 領域）を用いたダイレクトシークエンス法<sup>2)</sup>を行って実験に用いたいかの塩基配列情報を決定し、このデータにもんごういか 5 種全てを含む標準のいかの塩基配列データを加え、分子系統解析によるもんごういかの種判別の検討を行った。また、多くの税關でも使用できる種判別法を確立することを目的として、DNA を分離・可視化する電気泳動法の一つである PCR-RFLP 法による種判別の検討を行った。

### 2. 実 験

#### 2.1 試 料

標準試料として、形態学的知見に基づき種を確定した関税中央分析所所有の標準品及び市販品を使用した。市販品については、ミトコンドリア DNA の 16S 領域及び CO I 領域の遺伝子配列をダイレクトシークエンス法により決定後、DDBJ に登録されているいかの遺伝子配列と相同性検索を行い、一致率 100% のものをその種として確定した。標準試料以外のいかの塩基配列データは、DDBJ よりダウンロードした。

使用した標準試料及び DDBJ データを Table 1 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 List of species of cuttle fish and squid used as standard samples and DDBJ accession numbers

Classification	Species	Standard sample	DDBJ Accession No (16S)	DDBJ Accession No (CO I)
<b>Superorder Decapodiformes</b>				
<b>Order Sepiida</b>				
<b>Suborder Sepiina</b>				
Family Sepiidae	<i>Sepia officinalis</i>	○	AB193804	AB193812
— " —	— " —			AB240155
— " —	<i>Sepia latimanus</i>	○	AB192322	AB192338
— " —	— " —			AB430406
— " —	<i>Sepia pharaonis</i>	○	AB369117	AB430418
— " —	— " —		AM088006	
— " —	— " —		DQ988072	
— " —	<i>Sepia esculenta</i>	○	AB192319	AB192335
— " —	— " —		AF369114	AB266516
— " —	<i>Sepia recurvirostra</i>	○	EU234587	AB430410
— " —	— " —		AM088003	AB430413
— " —	<i>Sepia lycidas</i>		AB192321	AB192337
— " —	<i>Sepia apama</i>		AY616977	no data
— " —	<i>Sepia aculeata</i>		AF369113	AB430400
— " —	— " —		AM088002	AF340494
— " —	<i>Sepia robsoni</i>		AF369957	AF350495
— " —	<i>Sepia elegans</i>		AY377630	AY293707
— " —	— " —		AY293657	
— " —	<i>Sepia elliptica</i>		AM088005	AY393707
— " —	<i>Sepia kobiensis</i>		AB192323	AB193813
— " —	<i>Sepia lorigera</i>		AB193802	AB193810
— " —	<i>Sepia hierredda</i>		AY368675	AB192339
— " —	<i>Sepia peterseni</i>		AB192324	AB192339
— " —	<i>Sepia pardex</i>		no data	AB193809
— " —	<i>Sepia andreana</i>		no data	AB430401
— " —	<i>Sepia aureomaculata</i>		no data	AB430402
— " —	<i>Sepia bertheloti</i>		AY368677	AB430403
— " —	<i>Sepia gibba</i>		no data	AB430405
— " —	<i>Sepia madokai</i>		AM088004	AB430407
— " —	<i>Sepia prashadi</i>		no data	AB430409
— " —	<i>Sepia subtenipes</i>		no data	AB430414
— " —	<i>Sepia tokioensis</i>		no data	AB430412
— " —	<i>Sepia opipara</i>		no data	AF000063
— " —	<i>Sepia furcata</i>		no data	AY530207
— " —	<i>Sepia hirunda</i>		no data	AY530211
— " —	<i>Sepiella japonica</i>		AY616978	AB430415
— " —	— " —		AM088001	AB430415
— " —	<i>Sepiella inermis</i>		no data	AY557522
— " —	<i>Sepiella maindroni</i>		AB192326	AB192341
— " —	— " —		AF369119	AF346853
— " —	<i>Metasepia tullbergi</i>		AB192325	AB192340
— " —	— " —		AM087999	AY616891
— " —	— " —		AY616885	
— " —	<i>Semirossia tenera</i>		AY426435	AY426436
Family Sepiadariidae	<i>Sepiadarium kochii</i>		AB191141	AB191292
— " —	— " —		AY293678	AY293726
— " —	<i>Sepiadarium austrinum</i>		AY616976	no data
<b>Order Teuthida</b>				
<b>Suborder Oegopsina</b>				
Family Ommastrephidae	<i>Todarodes pacificus</i>	○	AB191134	AB158364
— " —	— " —		AB191134	AB191285
— " —	— " —		AB191134	AB199559
— " —	— " —		AB191134	AB240153
— " —	<i>Ommastrephes bartramii</i>	○	AB509451	AF000057
— " —	<i>Eucleoteuthis luminosa</i>	○	this study	AB199554
— " —	— " —		this study	GQ850529
— " —	<i>Dosidicus gigas</i>		no data	EU068697
Family Gonatidae	<i>Gonatopsis borealis</i>	○	AY681025	AF131872
— " —	<i>Gonatus onyx</i>	○	this study	AF000041
— " —	<i>Gonatus pyros</i>		no data	GU072735
Family Thysanoteuthidae	<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	○	AB191135	this study
Family Enoplateuthidae	<i>Watasenia scintillans</i>	○	AB240152	AB191290
				AB240152
<b>Suborder Myopsina</b>				
Family Loliginidae	<i>Loligo bleekeri</i>	○	AB191142	AB191293
— " —	— " —		AB252859	GU188439
— " —	<i>Loligo vulgaris</i>	○	AF110082	AF075397
— " —	<i>Loligo edulis</i>	○	EU349489	EU349461
— " —	<i>Loligo chinensis</i>	○	EU349480	EU349442
— " —	<i>Loligolus japonica</i>	○	EU349491	AF075407
— " —	<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	○	AB240154	AB191284
— " —	— " —		AB191133	AB240154
— " —	— " —			EU349466

## 2.2 装 置

PCR 増幅装置 : Gene Amp PCR9700 (Applied Biosystem)  
 画像解析装置 : BIO-PROFIL システム II (VILBER LOURMAT)  
 DNA シークエンサー : 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem)  
 電気泳動装置 : MUPID ミニゲル泳動槽 (ADVANTEC)

## 2.3 実 験

いかからの DNA 抽出は、10mg 程度の筋肉片から、DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN) を用いて行った。

いかの種判別を行う指標領域は、ミトコンドリア DNA の 16S 領域及び CO I 領域を用いた。

PCR 反応において、各領域の増幅に用いたプライマーは以下のとおりである。

### 16S 領域

16sar (5'-CGCCTGTT(GA)(CAT)CAAAACAT -3')  
 16sbr (5'-CCGGT(CT)TGAACTCAGATCA(CT )GT -3')

### CO I 領域

LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG -3')  
 HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA -3')

Taq polymerase は TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) を用いた。PCR 反応溶液は、抽出 DNA 溶液 1.0μl、Ex Taq バッファー—3.0μl、dNTP mixture (25 mM each) 2.4μl、プライマー各 10 pmol、ExTaq 0.75 Unit、滅菌水（合計 30μl に調製）とした。PCR 条件は、94°Cで 5 分加熱後、94°C30 秒、40°C1 分、72°C1 分のサイクルを 35 回行い、最後に 72°Cで 10 分加熱した。PCR 産物は、2.0%アガロースゲル (TaKaRa L03、1×TAE、0.1 mg/ml ethidium bromide) を用いて電気泳動を行い、画像解析装置により確認を行った。

サイクルシークエンス反応は、PCR 産物をイソプロピルアルコール沈殿により精製し、PCR 反応と同様のプライマーを鑄型に、Big Dye Cycle Sequencing Kit Ver3.1 に添付のプロトコールに従い、遺伝子領域の 5'側及び 3'側の両鎖について行った。反応後、エタノール沈殿で未反応の色素を除去した後、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。得られた塩基配列データは、DNA Data Bank of Japan に登録されているデータと比較し、いかの種を決定した。種を決定した塩基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、近隣結合法により分子系統解析を行った。

RFLP 反応において各 PCR 産物の切断に用いた制限酵素は、16S 領域では *Afa* I、*Alu* I、*Dra* I を用い、CO I 領域では *Afa* I、*Alu* I、*Bsp* I<sub>286</sub> I、*Bmg* T<sub>120</sub> I、*Mbo* I、*Xsp* I を用いた。各 PCR 産物を制限酵素に添付のプロトコールに従い切断した後、2.5%アガロースゲル (NuSieve GTG : TaKaRa L03=2:1、1×TBE、0.1 mg/ml ethidium bromide) を用いて電気泳動を行い、画像解析装置により切断片長多型の確認を行った。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 分子系統解析

今回使用した標準試料 18 種について、各領域を PCR 法により増幅した結果を Fig.1 に示す。PCR 産物は、16S 領域が約 550 bp、CO I 領域が約 710 bp であった。

各 PCR 産物における 16S および CO I 領域の部分配列に、DDBJ に登録されていた他のいか 31 種の塩基配列データを加え、分子系統解析を行った。両領域における分子系統樹を Fig.2 及び 3 に示す。

16S 領域においては、もんごういか 5 種の塩基配列は他のいかとはいずれも配列が異なっていたことから、今回系統解析を行つたいかにおいては、もんごういか 5 種全ての種判別は可能であった。CO I 領域においては、オーストラリアコウイカ (*Sepia apama*) の塩基配列データのみ入手していないが、それ以外のもんごういか 4 種については、他のいかとの種判別は可能であった。

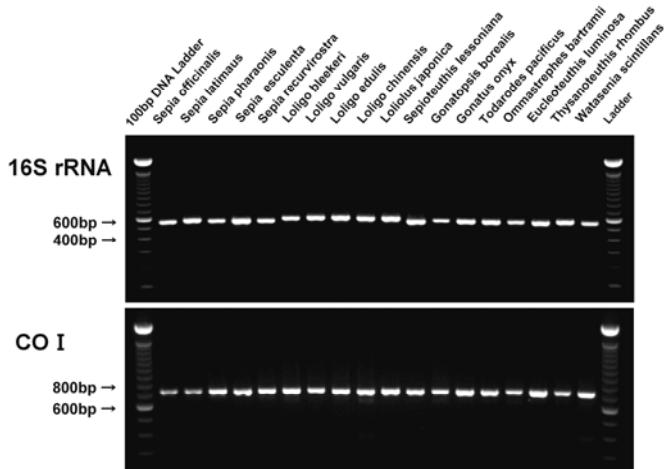


Fig.1 PCR products in 16S rRNA and partial COI region of 18 cuttle fish and squid species

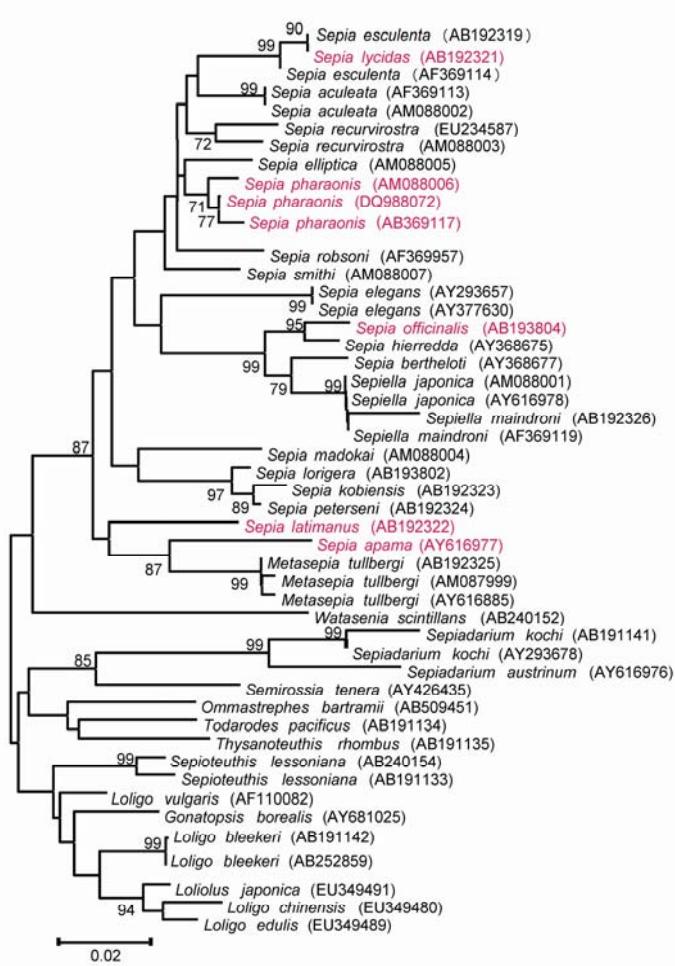


Fig.2 Phylogenetic tree among 34 cuttle fish and squid species based on the sequence of mitochondrial 16S rRNA gene (red characters: “mongo ika” species)

Bootstrap values >70% are reported on nodes of the tree (bootstrap replication = 1000).

### 3.2 PCR-RFLP 法

標準試料 18 種の 16S 領域の PCR 産物を *Afa I*、*Alu I*、*Dra I* により制限酵素処理した切断辺長多型を Fig.4 に、CO I 領域の PCR 産物を *Afa I*、*Alu I*、*BspI286 I*、*BmgT120 I*、*Mbo I*、*Xsp I* により制限酵素処理した切断辺長多型を Fig.5 に示す。

もんごういかの判別について、16S 領域ではトラフコウイカ (*Sepia pharaonis*) の切断辺長多型パターンが、ヤリイカ (*Loligo bleekeri*) 及びソデイカ (*Thysanoteuthis rhombus*) のパターンと全ての制限酵素において同一であり、トラフコウイカの判別については当領域では不可能であった。しかし、ヨーロッパコウイカとコブシメについては、制限酵素の切断辺長多型パターンの組み合わせが他のいかとそれぞれ異なっていたことから、16S 領域を用いた判別は可能であった。CO I 領域においては、5 つの制限酵素

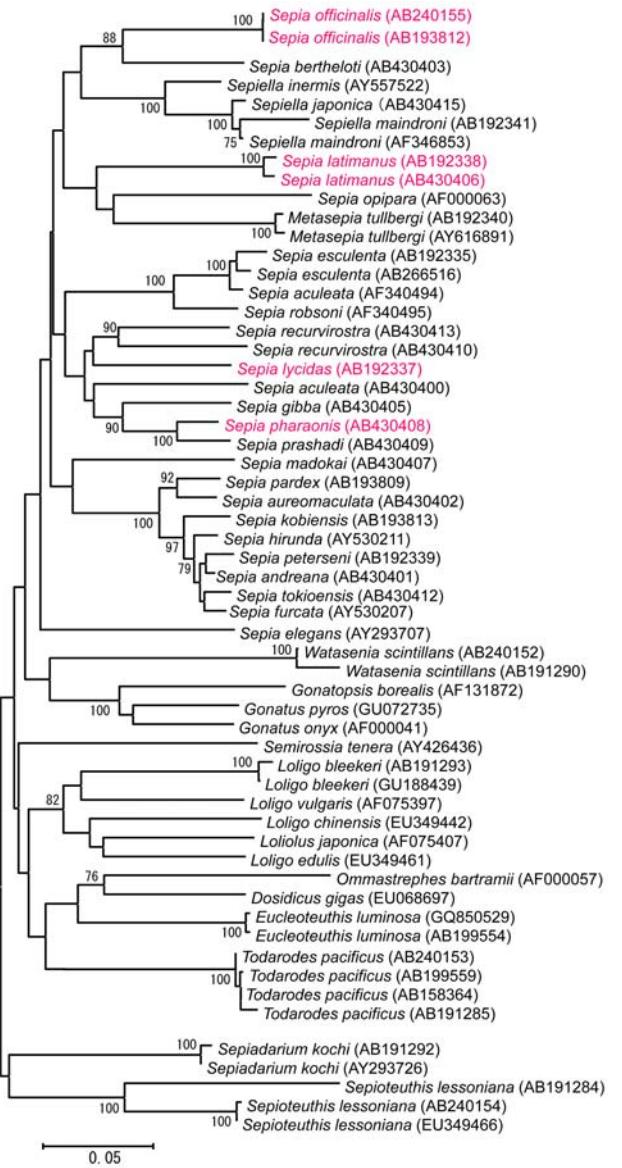


Fig.3 Phylogenetic tree among 45 cuttle fish and squid species based on the sequence of mitochondrial COI gene (red characters: “mongo ika” species) Bootstrap values >70% are reported on nodes of the tree (bootstrap replication = 1000).

の切断辺長多型パターンの組み合わせが 18 種のいかにおいて全て異なっていた。以上の結果から、今回用いた標準試料 18 種においては、16S 及び CO I の 2 つの領域において PCR-RFLP 法を用いることで、もんごういかに該当するか否かの判別は可能であった。

標準試料以外のいかについても、PCR-RFLP 法によりもんごういかか否かの判別が可能であるかを検討するために、データベースに登録されているいかについて切断片長多型のシミュレーションを行った。標準試料 18 種及び DDBJ に登録されているいか類 31 種の合計 49 種を用いて、同一領域の塩基配列情報を元に切断片長多型パターンを予測した。シミュレーションから算出した 16S 領域の切断片長を Table 2 に、CO I 領域の切断片長を Table 3 に示し、各領域の切断片長から多型パターンを作成したものを

Table 4 及び 5 に示す。多型パターンは、電気泳動で差異の判別が可能であると考えられる分子量ごとにグループ分けした。シミュレーションデータの正確さを確認するため、標準試料の切断片長多型パターンの電気泳動結果と、データベース上の同一種の塩基配列から予測したパターンを照らし合わせたところ、いずれも一致する結果が得られた。

もんごういか 5 種は、シミュレーションでも 16S、CO I 両領域において特徴的な切断片長多型パターンの組み合わせを示した。このことから、本研究で用いた遺伝子領域及び制限酵素が、もんごういかの種判別に有効な手段である可能性が高いと考えられた。しかし、今回のシミュレーションはあくまでもいか 49 種で行ったものであり、それ以外の種における切断片長多型パターンは確認していないことから、今回用いた標準試料以外の種が同様もしくは類似したパターンを示す可能性がある。また、同一種であっても塩基配列が一部異なる遺伝子多型については今回考慮していないため、より確実なもんごういかの種判別を検討するためには、更なる標準品の種及び検体数の充実が必要である。

以上の結果から、現段階では PCR-RFLP 法ではもんごういかの種の確定までは行えず、もんごういかとして申告された輸入貨物が確かにあるかを判別するなどのスクリーニング目的で用いるのであれば、種判別法としては有効であると考えられた。より詳細にいかの種を判別する必要がある場合には、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定し分子系統解析を行う必要がある。

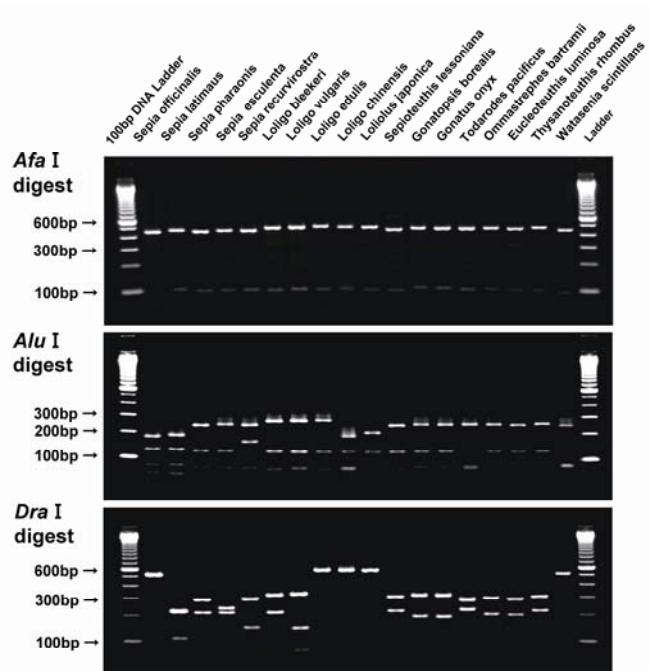


Fig.4 Fragment patterns observed in 18 cuttle fish and squid species after digestion of the 16S rRNA partial region PCR products with restriction enzymes

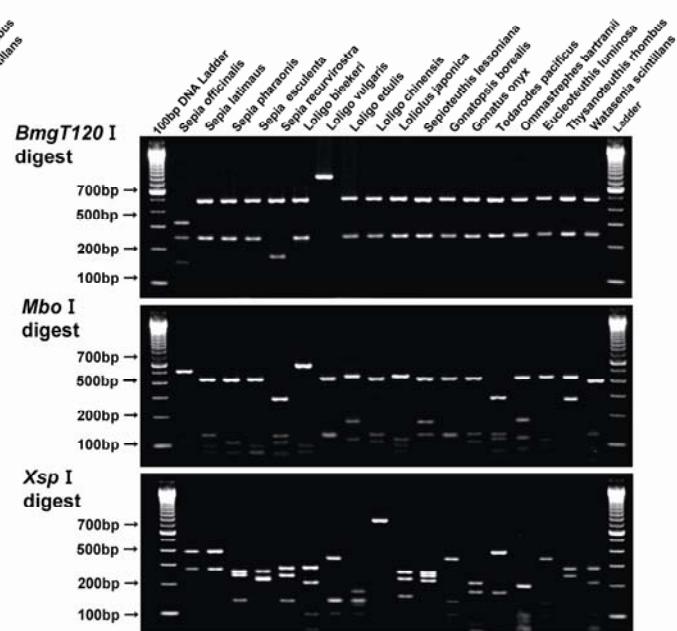
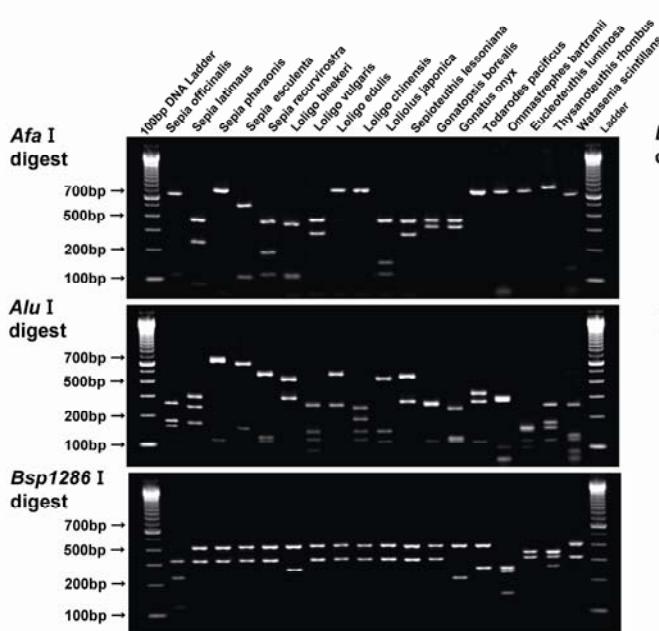


Fig.5 Fragment patterns observed in 18 cuttle fish and squid species after digestion of the partial COI region PCR products with restriction enzymes

Table 2 PCR-RFLP fragment size in 16S rRNA partial regions of 35 cuttle fish and squid species (unit: bp)

Species	PCR	<i>Afa</i> I			<i>Alu</i> I		<i>Dra</i> I		
<i>Sepia officinalis</i>	547	449			180	129	517		
<i>Sepia latimanus</i>	557	457			100	187	130	224	223
<i>Sepia pharaonis</i>	543	448			95	242	129	295	218
<i>Sepia lycidas</i>	545	268	107	96	244	129	239	219	
<i>Sepia apama</i>	545	448			97	245	130	324	
<i>Sepia esculenta</i>	549	453			96	247	129	242	219
<i>Sepia recurvirostra</i>	524	452				246	166	299	152
<i>Sepia aculeata</i>	549	255	198	96	247	129	519		
<i>Sepia robsoni</i>	534	440			94	171	129	287	147
<i>Sepia elegans</i>	534	440			94	171	129	287	147
<i>Sepia kobiensis</i>	555	457			98	251	129	275	221
<i>Sepia lorigera</i>	554	458			98	250	129	239	221
<i>Sepia peterseni</i>	559	459			100	253	129	277	223
<i>Sepia madokai</i>	537	269	176	92	239	129	226	215	
<i>Sepia elliptica</i>	548	452			96	246	129	299	219
<i>Sepia smithi</i>	548	451			97	245	129	274	220
<i>Sepiella japonica</i>	550	452			98	184	130	276	222
<i>Sepiella maindroni</i>	553	379			98	182	130	301	222
<i>Metasepia tullbergi</i>	542	445			297	130	197	97	97
<i>Sepiadarium kochi</i>	558	461			97	254	130	307	197
<i>Sepiadarium austrinum</i>	551	454			97	250	130	302	221
<i>Semirossia tenera</i>	548	451			97	244	167	297	221
<i>Loligo bleekeri</i>	568	474			94	267	130	320	218
<i>Loligo vulgaris</i>	577	480			97	273	130	326	148
<i>Loligo edulis</i>	568	473			95	187	130	538	
<i>Loligo chinensis</i>	575	480			95	273	130	545	
<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	546	451			95	244	130	297	219
<i>Loliolus japonica</i>	574	477			97	207	130	544	
<i>Ommastrephes bartramii</i>	552	455			97	248	130	282	197
<i>Todarodes pacificus</i>	552	456			96	249		274	220
<i>Eucleoteuthis luminosa</i>	553	456			97	248	130	283	197
<i>Gonatus onyx</i>	555	456			99	248	130	302	186
<i>Gonatopsis borealis</i>	559	457			102	249	130	303	188
<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	557	461			96	253	130	307	220
<i>Watasesia scintillans</i>	545	446			99	240		491	

Table 3 PCR-RFLP fragment size in partial COI region of 45 cuttle fish and squid species (unit: bp)

Species	PCR	<i>Afa</i> I			<i>Alu</i> I				<i>Bsp</i> 1286 I		
<i>Sepia officinalis</i>	709	596	113		255 177 159 118				310	245	154
<i>Sepia latimanus</i>	711	362	234	115	295 245 171				464	247	
<i>Sepia pharaonis</i>	708	640	591				117				463
<i>Sepia lycidas</i>	709	362	121 113 113			414	157 93				464
<i>Sepia esculenta</i>	711	485	113 113			552	159				245
<i>Sepia recurvirostra</i>	709	362	200	121	459	132 118				464	176
<i>Sepia aculeata</i>	708	361	158 121		708	463				245	
<i>Sepia robsoni</i>	708	595	552				156				463
<i>Sepia elegans</i>	707	361	279	150 121 117 108				463	129 115		
<i>Sepia kobiensis</i>	707	233 128 121 113				335	177	117	463	244	
<i>Sepia lorigera</i>	707	361	121 113			335 294	463				244
<i>Sepia peterseni</i>	707	233 128 121 113				335	177	117	463	244	
<i>Sepia pardex</i>	707	233	128	121	113	201 177 134				463	244
<i>Sepia andreae</i>	708	233 128 121 113				335	177	117	463	245	
<i>Sepia aureomaculata</i>	708	361	121 113		335	177	117	708			
<i>Sepia bertheloti</i>	708	482	113			157 117 99 98				463	245
<i>Sepia gibba</i>	708	361	200	121	414	138 117				463	245
<i>Sepia madokai</i>	708	467	128			176 132				463	160
<i>Sepia prashadi</i>	708	640	591				117				463
<i>Sepia tenuipes</i>	708	595	113			255 177 159				309	245 154
<i>Sepia subtenipes</i>	708	616	387 249				463				245
<i>Sepia tokioensis</i>	708	234	233	128	335	177	117	463	245		
<i>Sepia opipara</i>	707	234	233	128	112	249 155 134 124				463	244
<i>Sepia furcata</i>	707	233 128 121 113				512	117	463			
<i>Sepia hirunda</i>	707	233 128 121 113				335	177	117	463	244	
<i>Sepiella japonica</i>	708	595	327				123 117				463
<i>Sepiella inermis</i>	707	361	234			326	150 117				463
<i>Sepiella maindroni</i>	708	595	327				123 117				463
<i>Metasepia tullbergi</i>	707	482	113			182 156 134 97				707	
<i>Sepiadarium kochi</i>	706	360 314			413	177				462	244
<i>Semirossia tenera</i>	707	616	91			294 254	463				244
<i>Loligo bleekeri</i>	707	345	121 113			413 294	463				244
<i>Loligo vulgaris</i>	709	362	279	255 150 124				93	709		
<i>Loligo edulis</i>	709	641	454 255				468				241
<i>Loligo chinensis</i>	709	641	243 192 150 124				468				241
<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	708	361	279	435 273				463			
<i>Loliolus japonicus</i>	709	362	158 121			414	150 118				468
<i>ommastrephes bartramii</i>	711	619	92			296 281	96				465
<i>Todarodes pacificus</i>	708	616	318 273				117				463
<i>Eucleoteuthis luminescens</i>	709	617	159 157 150 98				468				241
<i>Dosidicus gigas</i>	708	616	255 177				117 96				463
<i>Gonatus onyx</i>	711	363	322	244 132 127				118	465	246	
<i>Gonatopsis borealis</i>	708	361 321			264	255	117				467
<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	711	671	256 178 159				118				465
<i>Watasesia scintillans</i>	703	574	129			254	132	118	459	244	

Species	PCR	<i>BmgT120</i> I			<i>Mbo</i> I			<i>Xsp</i> I						
<i>Sepia officinalis</i>	709	313	224	116	483	104	376 267							
<i>Sepia latimanus</i>	711	398	313	406			130	98	378	267				
<i>Sepia pharaonis</i>	708	396	312	406			104	255 237 139						
<i>Sepia lycidas</i>	709	396	313	406			122	332 277						
<i>Sepia esculenta</i>	711	371	289	406			98	216						
<i>Sepia recurvirostra</i>	709	396	313	279			127	104						
<i>Sepia aculeata</i>	708	340	312	279			127	104	313	255				
<i>Sepia robsoni</i>	708	396	312	406			97	453	255					
<i>Sepia elegans</i>	707	395	312	279			127	122	313	276				
<i>Sepia kobiensis</i>	707	395	312	483			122	313 190						
<i>Sepia lorigera</i>	707	395	312	406			375 207							
<i>Sepia peterseni</i>	707	395	312	483			104	452	190					
<i>Sepia pardex</i>	707	395	312	406			104	313 267						
<i>Sepia andreae</i>	708	396	312	483			104	313 190						
<i>Sepia aureomaculata</i>	708	396	312	406			104	313 267						
<i>Sepia bertheloti</i>	708	396	312	406			104	376 255						
<i>Sepia gibba</i>	708	396	312	406			104	255 193 120						
<i>Sepia madokai</i>	708	396	260	406			174	376 332						
<i>Sepia prashadi</i>	708	396	312	406			104	255 183 139						
<i>Sepia tenuipes</i>	708	312	224	116	483	104	376 267							
<i>Sepia subtenipes</i>	708	396	312	406			267 193							
<i>Sepia tokioensis</i>	708	396	312	587			376 190							
<i>Sepia opipara</i>	707	371	312	406			97	375	267					
<i>Sepia furcata</i>	707	395	260	483			104	313	190					
<i>Sepia hirunda</i>	707	395	312	406			313 267							
<i>Sepiella japonica</i>	708	396	312	407			97	376	267					
<i>Sepiella inermis</i>	707	395	312	406			267 154 123							
<i>Sepiella maindroni</i>	708	396	312	406			376 267							
<i>Metasepia tullbergi</i>	707	395	312	483			354 255				98			
<i>Sepiadarium kochi</i>	706	311	223	172	423	122	313 232							
<i>Semirossia tenera</i>	707	251 223 172			423	97	375	276						
<i>Loligo bleekeri</i>	707	395	259	533			98	277 266						
<i>Loligo vulgaris</i>	709	399	310	406			132	122	331	139 138				
<i>Loligo edulis</i>	709	399	310	423			171	139 138 125						
<i>Loligo chinensis&lt;/i</i>														

Table 4 PCR-RFLP fragment patterns in 16S rRNA partial region of 35 cuttle fish and squid species

Species	PCR	<i>Afa</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Afa</i> I					
<i>Sepia officinalis</i>	547	B	0	B	0	B	0			
<i>Sepia latimanus</i>	557	A	1	B	0	D	2			
<i>Sepia pharaonis</i>	543	A	1	A	0	A	1			
<i>Sepia lycidas</i>	545	C	0	A	0	D	1			
<i>Sepia apama</i>	545	A	1	A	0	C	0			
<i>Sepia esculenta</i>	549	A	1	A	0	D	1			
<i>Sepia recurvirostra</i>	524	A	1	C	0	A	3			
<i>Sepia aculeata</i>	549	D	0	A	0	B	0			
<i>Sepia robsoni</i>	534	A	1	B	0	A	3			
<i>Sepia elegans</i>	534	A	1	B	0	A	3			
<i>Sepia kobiensis</i>	555	A	1	A	0	A	1			
<i>Sepia lorigera</i>	554	A	1	A	0	D	1			
<i>Sepia petterseni</i>	559	A	1	A	0	A	1			
<i>Sepia madokai</i>	537	D	0	A	0	D	1			
<i>Sepia elliptica</i>	548	A	1	A	0	A	1			
<i>Sepia smithi</i>	548	A	1	A	0	A	1			
<i>Sepiella japonica</i>	550	A	1	B	0	A	1			
<i>Sepiella maindroni</i>	553	A	2	B	0	A	1			
<i>Sepiadarium kochi</i>	558	A	1	A	0	A	2			
<i>Sepiadarium austrinum</i>	551	A	1	A	0	A	1			
<i>Semirossia tenera</i>	548	A	1	C	0	A	1			
<i>Loligo bleekeri</i>	568	A	1	A	0	E	1			
<i>Loligo vulgaris</i>	577	A	1	A	0	E	2			
<i>Loligo edulis</i>	568	A	1	A	0	B	0			
<i>Loligo chinensis</i>	575	A	1	B	0	B	0			
<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	546	A	1	A	0	A	1			
<i>Loliolus japonica</i>	574	A	1	B	0	B	0			
<i>Ommastrephes bartramii</i>	552	A	1	A	0	A	2			
<i>Todarodes pacificus</i>	552	A	1	D	0	A	1			
<i>Eucleoteuthis luminosa</i>	553	A	1	A	0	A	2			
<i>Gonatus onyx</i>	555	A	1	A	0	A	2			
<i>Gonatopsis borealis</i>	559	A	1	A	0	A	2			
<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	557	A	1	A	0	A	1			
<i>Wataseania scintillans</i>	545	A	1	D	0	B	0			

<i>Afa</i> I											
440 -480	379	270 -250	170 -200	110 -90	パターン						
+					+	A	1				
	+				+	A	2				
+						B	0				
	+				++	C	0				
	+		+	+		D	0				

<i>Alu</i> I											
240 -280	170 -190	129 -130	パターン								
+		+	A	0							
	+	+	B	0							
+	+		C	0							
	+		D	0							

<i>Dra</i> I											
490 -545	320 -326	274 -307	215 -239	186 -197	147 -152	97 -110	パターン				
		+	+				A	1			
		+		+			A	2			
		+			+		A	3			
+							B	0			
	+						C	0			
		++					D	0			
	+		+				E	1			
	+				+		E	2			

Table 5 PCR-RFLP fragment patterns in partial COI region of 45 cuttle fish and squid species

Species	PCR	Afe I	Alu I	Bsp1286 I	BmgT120 I	Mbo I	Xsp I
<i>Sepia officinalis</i>	709	A 2	E 1	B 0	B 1	B 1	A 1
<i>Sepia latimanus</i>	711	B 2	D 2	A 1	A 1	A 1	A 1
<i>Sepia pharaonis</i>	708	A 1	C 2	A 1	A 1	A 1	D 1
<i>Sepia leucoides</i>	709	C 2	A 1	A 1	A 1	A 1	A 2
<i>Sepia esculenta</i>	711	D 3	C 1	A 1	A 1	A 1	E 1
<i>Sepia recurvirostra</i>	709	B 3	A 1	A 2	A 1	C 1	D 1
<i>Sepia aculeata</i>	708	C 3	Z 0	A 1	A 1	C 1	A 1
<i>Sepia robsoni</i>	708	A 1	C 1	A 1	A 1	A 1	F 1
<i>Sepia elegans</i>	707	B 1	F 1	A 3	A 1	C 2	A 1
<i>Sepia kobiensis</i>	707	F 1	B 1	A 1	A 1	B 2	B 1
<i>Sepia longirostris</i>	707	C 1	B 3	A 1	A 1	A 3	B 2
<i>Sepia peterseni</i>	707	F 1	B 1	A 1	A 1	B 1	F 2
<i>Sepia pardex</i>	707	F 1	F 2	A 1	A 1	A 1	A 1
<i>Sepia andreae</i>	708	F 1	B 1	A 1	A 1	B 1	B 1
<i>Sepia aureonamaculata</i>	708	C 1	B 1	Z 0	A 1	A 1	A 1
<i>Sepia bertheloti</i>	708	D 1	F 3	A 1	A 1	A 1	A 1
<i>Sepia gibba</i>	708	B 3	A 1	A 1	A 1	A 1	D 1
<i>Sepia madakoi</i>	708	D 2	F 4	A 2	A 2	A 11	A 3
<i>Sepia prashadi</i>	708	A 1	C 2	A 2	A 1	A 1	D 1
<i>Sepia subtenueps</i>	708	A 1	B 4	A 1	A 1	A 3	E 2
<i>Sepia tokioensis</i>	708	F 2	B 1	A 1	A 1	D 0	B 1
<i>Sepia opipara</i>	707	F 3	E 2	A 1	A 1	A 1	A 1
<i>Sepia furcata</i>	707	F 1	C 2	A 1	A 1	B 1	B 1
<i>Sepia hirunda</i>	707	F 1	B 1	A 1	A 1	A 1	A 1
<i>Sepiella japonica</i>	708	A 1	B 2	A 1	A 1	A 1	A 1
<i>Sepiella inermis</i>	707	B 1	B 2	A 1	A 1	A 3	D 1
<i>Sepiella mairanroni</i>	708	A 1	B 2	A 1	A 1	A 3	A 1
<i>Metasepia tullbergi</i>	707	D 1	F 5	Z 0	A 1	B 3	A 2
<i>Sepiadarium kochi</i>	706	E 0	A 1	A 1	B 2	A 4	B 2
<i>Semirossia tenera</i>	707	A 2	D 3	A 1	C 0	A 1	A 1
<i>Loligo bleekerii</i>	707	C 1	A 2	A 1	A 1	D 0	E 3
<i>Loligo vulgaris</i>	709	B 1	E 3	Z 0	A 1	A 6	C 2
<i>Loligo edulis</i>	709	A 1	A 3	A 1	A 1	A 5	G 0
<i>Loligo chinnensis</i>	709	A 1	E 4	A 1	A 1	A 1	Z 0
<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	708	B 1	A 2	A 1	A 1	A 7	E 4
<i>Loliolus japonicus</i>	708	C 4	A 1	A 1	A 1	A 8	E 5
<i>Ommastrephes bartramii</i>	711	A 2	D 1	A 1	C 0	A 5	D 2
<i>Todarodes pacificus</i>	708	A 1	D 1	A 1	A 1	C 1	B 1
<i>Eucoleoteuthis luminosus</i>	709	A 1	F 6	A 1	A 1	A 9	C 1
<i>Dosidicus gigas</i>	708	A 1	E 5	A 1	A 1	B 4	C 3
<i>Gonatus onyx</i>	711	E 0	E 6	A 1	A 3	A 2	D 3
<i>Gonatopsis borealis</i>	708	E 0	E 7	A 1	A 1	A 12	C 1
<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	711	A 1	E 1	A 1	A 1	A 10	E 1
<i>Watasenia scintillans</i>	703	A 3	E 1	A 1	A 1	A 4	E 16

Afe I								Alu I							
574	467	345	314	200	158	91	パターン	708	512	413	327	273	249	171	121
-671	-485	-363	-322	-279	-121	-115		-591	-459	-387	-318	-255	-201	-159	-118
+							A 1	+	+	+	+	+	A 1		
+							A 2	+	+	+	+	+	A 2		
+							A 3	+	+	+	+	+	A 3		
													B 1	+	+
													B 2	+	+
													B 3	+	+
													B 4	+	+
													C 1	+	+
													C 2	+	+
													D 1	+	+
													D 2	+	+
													D 3	+	+
													E 1	+	+
													E 2	+++	+++
													E 3	++	++
													E 4	++	++
													E 5	++	++
													E 6	++	++
													Z 0	0	0

Bsp1286 I								BmeT120 I							
707	459	309	241	154	115	パターン	709	452	313	255	207	154	125	93	パターン
-708	-467	-310	-247	-170	-129		-399	-313	-261	-242	-172	-139	-101	-101	
+						A 1	+	+	+	+	+	A 1			
+						A 2	+	+	+	+	+	A 2			
+						A 3	+	+	+	+	+	A 3			
													B 1	+	+
													B 2	+	+
													C 1	+	+
													C 2	++	++
													C 3	++	++
													D 1	+	+
													D 2	+	+
													E 1	+	+
													E 2	+	+
													E 3	+	+
													E 4	++	++
													E 5	+	+
													E 6	+	+
													F 1	+	+
													F 2	+	+
													G 0	+++	+++
													Z 0	0	0

Mbo I								Xsp I							
533	483	401	225	171	122	94	パターン	709	452	313	255	207	154	125	93
-587	-484	-423	-279	-174	-130	-115		-453	-378	-278	-237	-193	-139	-101	-101
+							A 1	+	+	+	+	+	A 1		
+							A 2	+	+	+	+	+	A 2		
+							A 3	+	+	+	+	+	A 3		
+							A 4	+	+	+	+	+	A 4		
+							A 5	+	+	+	+	+	A 5		
+							A 6	++	++	++	++	++	A 6		
+							A 7	+	+	+	+	+	A 7		
+							A 8	++	++	++	++	++	A 8		
+							A 9	++	++	++	++	++	A 9		
+							A 10	+	+	+	+	+	A 10		
+							A 11	+	+	+	+	+	A 11		
+													B 1	+	+
+													B 2	+	+
+													B 3	+	+
+													B 4	+	+
+													C 1	+	+
+													C 2	+	+
+													D 1	+	+
+													D 2	+	+
+													E 1	+	+
+													E 2	+	+
+													E 3	+	+
+													E 4	++	++
+													E 5	+	+
+													E 6	+	+
+													F 1	+	+
+													F 2	+	+
+													G 0	+++	+++
+													Z 0	0	0

## 4. 要 約

1) 竹元賢治、積田優一郎、岩下伸行、村上孝之、寺内豊、松崎隆一：関税 中央分析所報, **48**, 9 (2008).

2) Takumiya, M., Kobayashi, M., Tsuneki, K., Furuya, H. *Zoological Science*, **22**, 147 (2005).

## 文 献

subunit I (CO I) 遺伝子についての塩基配列 (16S 遺伝子: 約 550 塩基、CO I 遺伝子: 約 710 塩基) を利用した結果、分子系統解析によりもんごういかの種判別は可能であった。

また、PCR-RFLP 法による切断片長多型パターンの解析により、

もんごういか 5 種のスクリーニングが可能であると考えられた。