

## ミトコンドリア DNA 解析によるイカの IQ 該非の判別 (第 2 報)

竹元 賢治\*, 小川 竜平\*, 長岐 潤弥\*, 柴田 正志\*, 笹谷 隆\*

### Identification of whether cuttlefish and squids require import quotas or not by mitochondrial DNA analysis – Part II

Kenji TAKEMOTO\*, Ryohei OGAWA\*, Junya NAGAKI\*, Masashi SHIBATA\*

\*Tokyo Customs Laboratory

2-7-11, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

In the Customs Tariff Schedule, Decabrachia (cuttlefish and squids) classified under heading 03.07 are all controlled by an import trade control ordinance except the so-called “mongo ika” cuttlefish; that is, *Sepia officinalis*, *S. pharaonis*, *S. lycidas*, *S. latimanus* and *S. apama*. Therefore, it is necessary to differentiate species of “mongo ika” from all other cuttlefish and squids. In this study, we determined the partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal RNA (16SrRNA) and cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) genes of *Sepia apama*, and analyzed phylogenetic relationships based on the sequences of 16SrRNA and COI for 35 Sepiida species including five species of “mongo ika” cuttlefish and two Teuthida species. Consequently, this study makes it possible to estimate whether importation of a sample requires an import quota or not. In addition, we investigated several methods of extracting DNA of cuttlefish and squids. As a result, we found that the alkaline lysis method is time-saving, economical, and suitable for many specimens for the preparation of PCR-quality Decabrachia genomic DNA without organic solvents, such as phenol and chloroform.

### 1. 緒 言

関税率表において、イカは、加熱又は調味が十分になされたものは第 16.05 項に、不十分なものは第 03.07 項に分類される。第 03.07 項に分類されるイカのうち、輸入割当 (Import Quota, 以下 IQ) 非該当のものは、「もんごういか」と称されるコウイカ属の 5 種 (ヨーロッパコウイカ *Sepia officinalis*、トラフコウイカ *S. pharaonis*、カミナリイカ *S. lycidas*、コブシメ *S. latimanus* 及びオーストラリアコウイカ *S. apama*) のみであり、これらを除く全てのイカが IQ に該当し、輸入貿易管理令によって輸入が規制されている。従って、IQ が否かを判断するためには、コウイカ属 5 種とその他のイカを判別する必要がある。

輸入時に完全な形態を保持したイカであれば、形態学的な知見をもとにイカの IQ 該非を判別することが可能である。しかし、切り身やボイル品等の加工品及び形態上の情報が少ない稚イカ等については、その種を目視で判別することは容易ではない。このような試料の IQ 該非を判別するためには、形態上の情報を必要としない DNA 情報を利用した判別方法が有効である<sup>1)~4)</sup>。

前報において筆者らは、ミトコンドリア DNA の 16S ribosomal RNA 遺伝子 (以下 16SrRNA 遺伝子) 及び Cytochrome c oxidase subunit 1 遺伝子 (以下 COI 遺伝子) の二つの領域を用いてダイレクトシーケンス法によりイカ類の IQ 該非の判別を試みた<sup>1)</sup>。ま

た、高野らは、ミトコンドリア DNA の 16SrRNA 及び COI 遺伝子の二つの領域を用いて分子系統解析を行い、イカ類の IQ 該非の判別を行った。しかし、これらの研究では、もんごういか 5 種のうち、オーストラリアコウイカの試料を入手できなかったために、未知試料で、その塩基配列が国際 DNA データベースに登録されていないものについて IQ 該非を判別することは容易ではなかった。また、イカから DNA を抽出するために一般的に使用されている市販の DNA 抽出キットは高価であり、多検体の分析には適していない。さらに、イカの IQ 該非を判別するためには、ミトコンドリア DNA の 16SrRNA 及び COI 遺伝子の部分領域が適していることが示唆されている<sup>1)~2)</sup>が、二つの領域を使うべきか、又は一方の領域のみで十分かの検証は行われていない。

本研究では、DNA 抽出キット、フェノール・クロロホルム法、プロティナーゼ K 法、アルカリ溶解法及びボーリング法といった DNA の抽出法について比較・検討し、安価かつ迅速・簡便で多検体の分析に適したイカの DNA の抽出法を確立することを目的とした。また、イカの IQ 該非を判別するために、16SrRNA 及び COI 遺伝子の二つの領域を使うべきか、又は一方の領域のみで十分かについて、新たに入手したオーストラリアコウイカを含む IQ 非該当のイカ 5 種及び IQ 該当のイカ、更に国際 DNA データベースに登録されているイカの塩基配列データを加えて分子系統解析を用いて検討した。

\* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海 2-7-11

## 2. 実 験

### 2.1 試 料

ヨーロッパコウイカ、トラフコウイカ、カミナリイカ、コブシメ、ヒョウモンコウイカ *S. pardex* 及びシリヤケイカ *Sepiella japonica* は、大阪大学大学院古谷秀隆准教授から、オーストラリアコウイカは、アデレード大学菅野雄耶氏から提供されたものを

標準品として使用した。アジアコウイカ *S. recurvirostra* は、市場で購入した試料を使用した。また、標準品以外のイカの塩基配列データは、国際 DNA データベースに登録されているものを用いた。標準品の種及び産地を Table 1 に、国際 DNA データベースに登録されているイカのうち、使用した種及びミトコンドリア DNA の領域を Table 2 に示す。

Table 1 Collected cuttlefish and squid species used for molecular analyses

| Order   | Family   | species                    | origin                     |
|---------|----------|----------------------------|----------------------------|
| Sepiida | Sepiidae | <i>Sepia officinalis</i>   | Morocco                    |
|         |          | <i>Sepia pharaonis</i>     | Taichung, Taiwan           |
|         |          | <i>Sepia lycidas</i>       | Hachimanhama, Ehime, Japan |
|         |          | <i>Sepia latimanus</i>     | Itoman, Okinawa, Japan     |
|         |          | <i>Sepia apama</i>         | Gulf St Vincent, Australia |
|         |          | <i>Sepia recurvirostra</i> | Malaysia                   |
|         |          | <i>Sepia pardex</i>        | Yawatahama, Ehime, Japan   |
|         |          | <i>Sepiella japonica</i>   | Osaka, Japan               |

Table 2 Genbank accession numbers of specimens used in this study

| Order    | Family                        | species                        | DDBJ Accession No. |          |
|----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|----------|
|          |                               |                                | 16S rRNA           | CO1      |
| Sepiida  | Sepiidae                      | <i>Sepia officinalis</i>       | AB193804           | AB193812 |
|          |                               |                                | AB240155           | AB240155 |
|          |                               | <i>Sepia pharaonis</i>         | AM088006           | AB430408 |
|          |                               |                                | DQ988072           | HM164489 |
|          |                               |                                |                    | HM164494 |
|          |                               |                                |                    | HM164504 |
|          |                               | <i>Sepia lycidas</i>           | AB675087           | AB675088 |
|          |                               |                                | HQ846020           | HQ846109 |
|          |                               | <i>Sepia latimanus</i>         | AB192322           | AB192338 |
|          |                               |                                |                    | AB430406 |
|          |                               | <i>Sepia apama</i>             | AB675086           | AB675092 |
|          |                               |                                | AY616977           |          |
|          |                               | <i>Sepia recurvirostra</i>     | AM088003           | AB430410 |
|          |                               |                                | HQ846001           | AB430413 |
|          |                               |                                |                    | HQ846092 |
|          |                               | <i>Sepia pardex</i>            | AB193801           | AB193809 |
|          |                               | <i>Sepia aculeata</i>          | AM088002           | AB430400 |
|          |                               |                                | HQ846017           | HQ846083 |
|          |                               | <i>Sepia andreaana</i>         | —                  | AB430401 |
|          |                               | <i>Sepia aureomaculata</i>     | —                  | AB430402 |
|          |                               | <i>Sepia bertheloti</i>        | —                  | AB430403 |
|          |                               | <i>Sepia elegans</i>           | —                  | AB430404 |
|          |                               | <i>Sepia elliptica</i>         | AM088005           | —        |
|          |                               | <i>Sepia esculenta</i>         | AB192319           | AB192335 |
|          |                               |                                | HQ845995           | AB266516 |
|          |                               | <i>Sepia furcata</i>           | —                  | AY530207 |
|          |                               | <i>Sepia gibba</i>             | —                  | AB430405 |
|          |                               | <i>Sepia hierredda</i>         | AY368675           | AJ583492 |
|          |                               | <i>Sepia hirunda</i>           | —                  | AY530211 |
|          |                               | <i>Sepia kubiensis</i>         | AB192323           | AB193813 |
|          |                               | <i>Sepia lorigera</i>          | AB193802           | AB193810 |
|          |                               | <i>Sepia madokai</i>           | AM088004           | AB430407 |
|          |                               | <i>Sepia opipara</i>           | —                  | AF000063 |
|          |                               | <i>Sepia orbignyana</i>        | X79578             | —        |
|          |                               | <i>Sepia papuensis</i>         | —                  | X79586   |
|          |                               | <i>Sepia peterseni</i>         | AB192324           | AB192339 |
|          |                               | <i>Sepia prashadi</i>          | —                  | AB430409 |
|          |                               | <i>Sepia ramani</i>            | —                  | HM164530 |
|          |                               | <i>Sepia robsoni</i>           | —                  | AF350495 |
|          |                               | <i>Sepia smithi</i>            | AM088007           | —        |
|          |                               | <i>Sepia tenuipes</i>          | —                  | AB430411 |
|          |                               | <i>Sepia tokioensis</i>        | —                  | AB430412 |
|          |                               | <i>Metasepia tullbergi</i>     | AB192325           | AB192340 |
|          |                               | <i>Sepiella japonica</i>       | AB675082           | AB675082 |
|          |                               |                                | AM088001           | AB430415 |
|          |                               |                                | AY616978           |          |
|          |                               | <i>Sepiella maindroni</i>      | AB192326           | AB192341 |
|          |                               | <i>Sepiella inermis</i>        | EU735190           | AY557522 |
| Teuthida | Ommastrephidae<br>Loliginidae | <i>Todarodes pacificus</i>     | AB191134           | AB191285 |
|          |                               | <i>Sepioteuthis lessoniana</i> | AB191133           | AB191284 |

## 2.2 主な試薬及び装置

|             |                                                                        |
|-------------|------------------------------------------------------------------------|
| DNA 抽出キット   | : DNeasy Blood & Tissue Kit ( QIAGEN, Hilden, Germany )                |
| プロティナーゼ K   | : Proteinase K( 27 units/mg, Wako, Osaka, Japan )                      |
| 加熱機能付き振とう器  | : Thermomixer comfort 1.5ml( Eppendorf Japan, Tokyo, Japan )           |
| PCR 増幅装置    | : Gene Amp PCR System9700 ( Applied Biosystems, Foster City, CA, USA ) |
| 塩基配列解析装置    | : 3130xl Genetic Analyzer ( Applied Biosystems, Foster City, CA, USA ) |
| 冷却遠心機及びローター | : MX-301、TMA-300 ( Tomy Seiko Co., Ltd., Tokyo, Japan )                |

## プライマー :

16SrRNA 領域<sup>5)</sup>

16S-L (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3')

16S-H (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3')

COI 領域<sup>6)</sup>

COI-L (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')

COI-H (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')

## 2.3 実験方法

## 2.3.1 DNA の抽出法の検討

DNA 抽出キット、フェノール・クロロホルム法、プロティナーゼ K 法、アルカリ溶解法及びボイリング法を用いて標準品のアジアコウイカから DNA を抽出し、2.0%アガロースゲル電気泳動により、その DNA の塩基長及び濃度分布を比較した。また、各方法で抽出した DNA 溶液について、16SrRNA 遺伝子部分領域と比較して、より長い塩基長の増幅が必要な COI 遺伝子部分領域を PCR 増幅し、アガロースゲル電気泳動で分離することにより、目的の DNA 断片が得られているか確認した。これらの結果から、多検体の分析に適したイカの DNA の抽出法を検討した。(1)~(5) に各 DNA の抽出法を示す。

## (1) DNA 抽出キットによる方法

検体の筋肉組織約 20 mg を眼科用ハサミで細かく裁断した後、DNA 抽出キットに添付のプロトコールに従い DNA を抽出した。抽出した DNA 溶液は、4°C で保存した。

(2) フェノール・クロロホルム法<sup>7)</sup>

検体の筋肉組織約 20 mg を眼科用ハサミで細かく裁断した後、抽出緩衝液 100 µl ( pH 6.8 の 50 mM Tris-HCl 緩衝液中にプロティナーゼ K 500 µg/ml、1 mM EDTA、20 mM NaCl 及び 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む ) 中で、加熱機能付き振とう器を用いて 1400 rpm、56°C で 1 時間以上溶解した。溶解後、100 µl の 0.5M Tris-HCl ( pH8.0 ) 飽和フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール ( 以下、PCI 溶液という。 ) を加え、完全に混合するまで緩やかに転倒混和した。15000 rpm、20°C で 5 分間遠心分離後、その上層を新しいチューブに移し、再度 100 µl の PCI 溶液を加え、完全に混合するまで緩やかに転倒混和し、15000 rpm、20°C で 5 分間遠心分離後、その上層を新しいチューブに移した。10 µl ( 1/10

容 ) の 3M 酢酸ナトリウム溶液及び 200 µl ( 2 容 ) のエタノールを加え転倒混和し、常温で約 10 分間放置後、15000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離し、上清を完全に捨てた。上清を捨てたチューブに 100 µl の 70%エタノールを加え、混合し、15000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離後、上清を完全に捨てた。上清を捨てたチューブに再度 100 µl の 70%エタノールを加え、同様に混合、遠心分離を行い、上清を完全に捨てた。これを 50 µl の 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl ( pH8.0 ) 緩衝液に溶解し、4°C で保存した。

(3) プロティナーゼ K 法<sup>8)</sup>

検体の筋肉組織約 10 mg を眼科用ハサミで細かく裁断した後、抽出緩衝液 ( pH 6.8 の 50 mM Tris-HCl 緩衝液中に Proteinase K 500 µg/ml、1 mM EDTA、20 mM NaCl 及び 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む ) 100 µl 中で、加熱機能付き振とう器を用いて 1400 rpm、56°C で 1 時間以上溶解した。溶解液を 94°C で 10 分間加熱し、14000 rpm、20°C で 15 分間遠心分離後、その上清を 4°C で保存した。

(4) アルカリ溶解法<sup>9)</sup>

検体の筋肉組織約 10 mg を眼科用ハサミで細かく裁断した後、アルカリ溶解液 75 µl ( pH 12.0 の 25 mM NaOH 中に 0.2 mM EDTA を含む ) 中で、加熱機能付き振とう器を用いて 1400 rpm、95°C で 1 時間溶解した。溶解液に 75 µl の 40 mM Tris-HCl ( pH 5.5 ) を加え混合し、4000 rpm、20°C で 3 分間遠心分離後、その上清を 4°C で保存した。

(5) ボイリング法<sup>10)</sup>

検体の筋肉組織約 10 mg を眼科用ハサミで細かく裁断した後、滅菌水 75 µl 中で、加熱機能付き振とう器を用いて 1400 rpm、99°C で 15 分間加熱した。4000 rpm、20°C で 3 分間遠心分離後、その上清を 4°C で保存した。

## 2.3.2 16SrRNA 及び COI 遺伝子領域の分子系統解析

## (1) PCR 増幅

Table 1 に示した標準品について、ミトコンドリア DNA の 16SrRNA 及び COI 遺伝子部分領域を PCR 法により増幅した。PCR 反応溶液は、Ex Taq polymerase ( Takara Bio, Otsu, Japan ) 添付のプロトコールに従い、各抽出法で得られた DNA 溶液 0.5 µl、各プライマー ( 5 µM ) 1.0 µl を用いて総容量 20 µl に調製した。調製した溶液を、PCR 増幅装置により、予備変性 ( 94°C、2 分間 ) した後、変性 ( 94°C、20 秒間 )、アニーリング ( 45°C 又は 50°C、20 秒間 ) 及び伸長反応 ( 72°C、1 分間 ) を 30 サイクル行い、最後に 72 ° C で 5 分間の伸長反応を行った。

## (2) 塩基配列の決定

PCR 増幅した溶液に 3.0 µl の 5M NaCl 溶液を加え、さらに 22 µl の滅菌水及び 50 µl のイソプロピルアルコールを加え転倒混和した。この溶液を 15000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を完全に捨てた。DNA を含むマイクロチューブに 90 µl の 70%エタノール ( -20°C ) を加え、混合し、15000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した後、上清を完全に捨てて DNA の沈殿を得た。これを 20 µl の 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 ( pH7.5 ) に溶解した。以上の手順で精製された DNA 溶液を、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Ready Reaction Kit( Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA) 添付のプロトコールに従って、各プライマーを用いてサイクルシークエンス反応させ、塩基配列解析装置により、H鎖及びL鎖の塩基配列を決定した。塩基長は、16SrRNA 遺伝子部分領域のPCR産物が545-551 bp、COI 遺伝子部分領域のPCR産物が708-709 bpであった。

### (3) 分子系統解析

Table 1 に示した標準品8検体の16SrRNA 遺伝子の部分塩基配列に、Table 2 に示したコウイカ属のイカ21種及び外群としてツツイカ目のイカ2種の16SrRNA 遺伝子の部分塩基配列を加えて、Clustal X ver.2.1<sup>11)</sup> でアライメントを行った。アライメント後の420塩基をClustal W ver.2.1<sup>12)</sup> を用いて近隣結合法により分子系統解析を行った。

また、Table 1 に示した標準品8検体のCOI 遺伝子の部分塩基配列に、Table 2 に示したコウイカ属のイカ32種及び外群としてツツイカ目のイカ2種のCOI 遺伝子の部分塩基配列を加えて、Clustal X ver.2.1<sup>11)</sup> でアライメントを行った。アライメント後の610塩基をClustal W ver.2.1<sup>12)</sup> を用いて近隣結合法により分子系統解析を行った。

これらの分子系統解析を行うにあたり、塩基配列の種内変異について考慮するため、コウイカ目のイカについては、可能な限り種ごとに複数の塩基配列データを使用した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 DNAの抽出法の比較・検討

DNA抽出キット、フェノール・クロロホルム法、プロティナーゼK法、アルカリ溶解法及びボイリング法を用いてDNAを抽出し、2.0%アガロースゲル電気泳動で分離した結果をFig. 1に示す。その結果、いずれの抽出法を用いてもDNAバンドを確認することができたが、その塩基長及び濃度分布に差異が見られた。抽出したDNA鎖が最も長く、かつ最も高い濃度で得られたのは、DNA抽出キットを用いた方法であった。

次に、各抽出法で得られたDNA溶液をテンプレートにして、COI 遺伝子部分領域をPCR増幅し、2.5%アガロースゲル電気泳動で分離した結果をFig. 2に示す。全ての抽出法のPCR産物について、DNAバンドを確認することができたが、ボイリング法のPCR産物は、増幅効率が悪かった。フェノール・クロロホルム法、プロティナーゼK法及びアルカリ溶解法では、高価なDNA抽出キットを使用せずにDNAの抽出をするという目的を達することができた。これらの方法のうち、フェノール・クロロホルム法は、有機溶媒を使用し、かつ実験操作が煩雑である。プロティナーゼK法とアルカリ溶解法は、共に有機溶媒を使用しない方法だが、アルカリ溶解法は、高価な酵素を使用しないため、プロティナーゼK法より安価にDNAを抽出することができる。また、プロティナーゼK法よりも実験操作が簡単で、かつ、より短時間でDNAを抽出することが可能である。

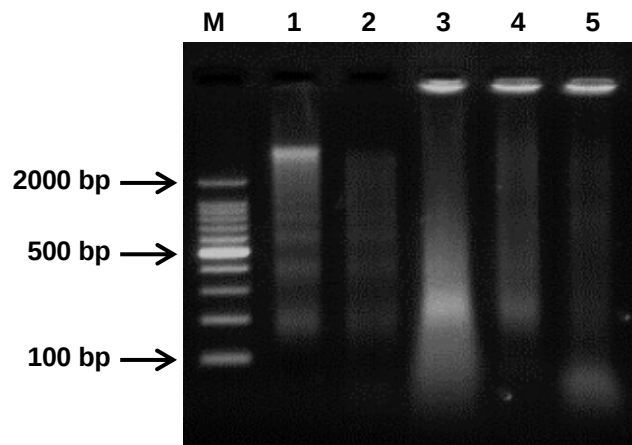


Fig. 1 Electrophoresis separation of genomic DNA from *Sepia recurvirostra* tissue samples. Total DNA extracted from tissues was analyzed by electrophoresis through 2.0% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane M, 100 bp DNA ladder as size markers; Lane 1, Total DNA extracted by DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany); Lane 2, Total DNA extracted by phenol-chloroform method; Lane 3, Total DNA extracted by proteinase K method; Lane 4, Total DNA extracted by alkaline lysis method; Lane 5, Total DNA extracted by rapid-boiling method.

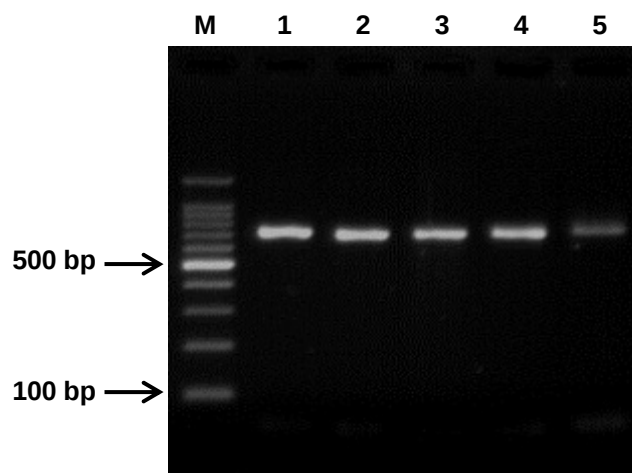


Fig. 2 Electrophoresis pattern of the PCR products in the mitochondrial COI region for the *Sepia recurvirostra* tissue samples. Total DNA extracted from tissues was analyzed by electrophoresis through 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane M, 100 bp DNA ladder as size markers; Lane 1, Total DNA extracted by DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany); Lane 2, Total DNA extracted by phenol-chloroform method; Lane 3, Total DNA extracted by proteinase K method; Lane 4, Total DNA extracted by alkaline lysis method; Lane 5, Total DNA extracted by rapid-boiling method.

### 3.2 分子系統解析

16SrRNA 領域の部分塩基配列を用いて作成した系統樹をFig. 3に、COI 領域の部分塩基配列を用いて作成した系統樹をFig. 4に示す。16SrRNA 領域の系統樹においては、IQ 該当のシロヤケイカのクラスターにIQ 該当の *Sepiella maindroni* が含まれるという種間の交差があったが、他の種については、種ごとに一つのクラスターを形成した(Fig. 3の網掛け部分)。また、COI 領域の系統樹においては、IQ 非該当のトラフコウイカのクラスターにIQ 該当のアラビアコウイカ *S. prashadi* 及びIQ 該当の *S. ramani* が含まれるという種間の交差があったが、他の種については、種ごとに一つのクラスターを形成した(Fig. 4の網掛け部分)。

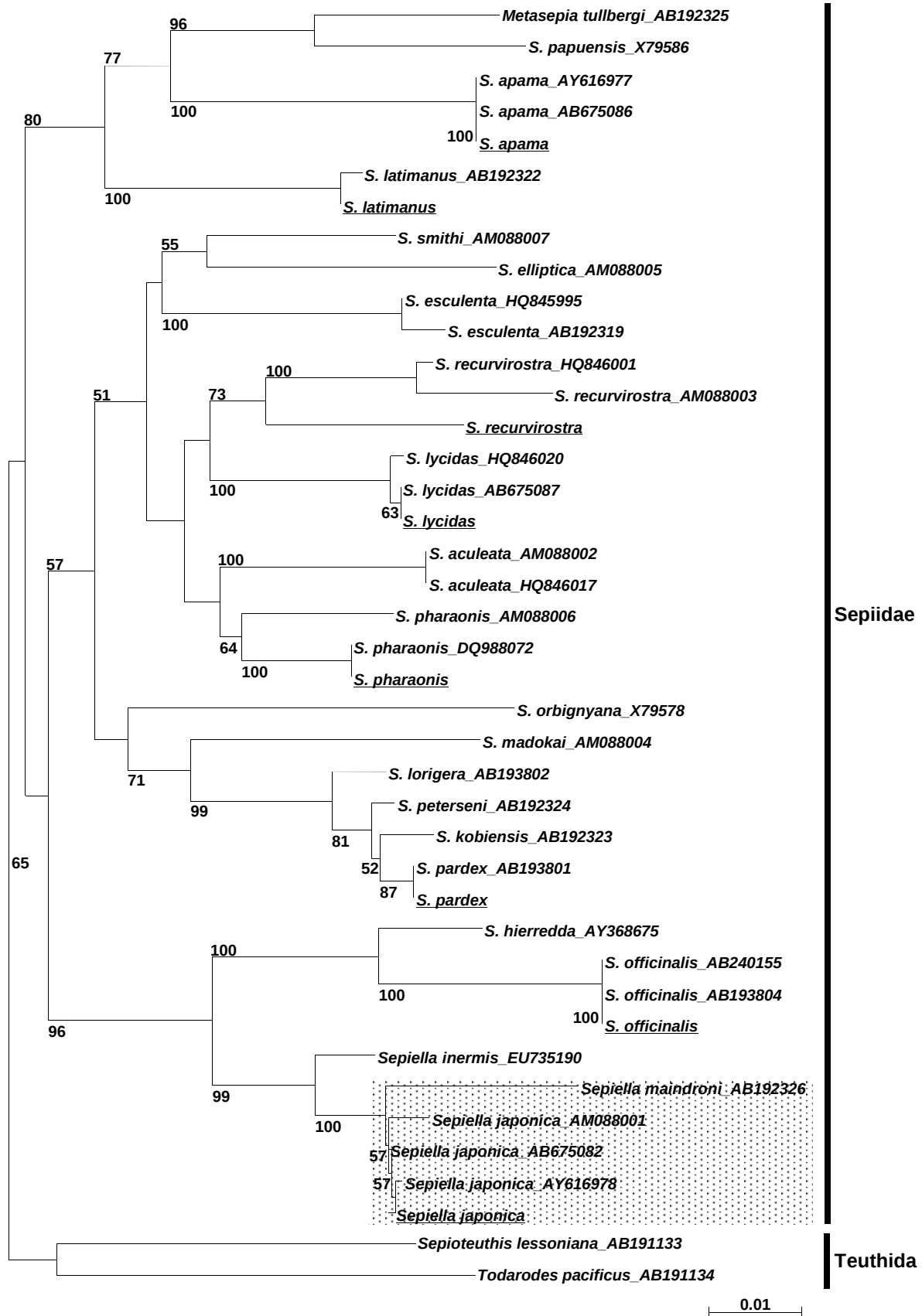


Fig. 3 Phylogenetic tree of cephalopods by the neighbor joining method with the 16S rRNA genes. Numbers of nodes indicate bootstrap support values >50% (1000 replicates). The scale indicates the evolutionary distance of one amino acid substitution per site. Standard samples used in this study are underlined.

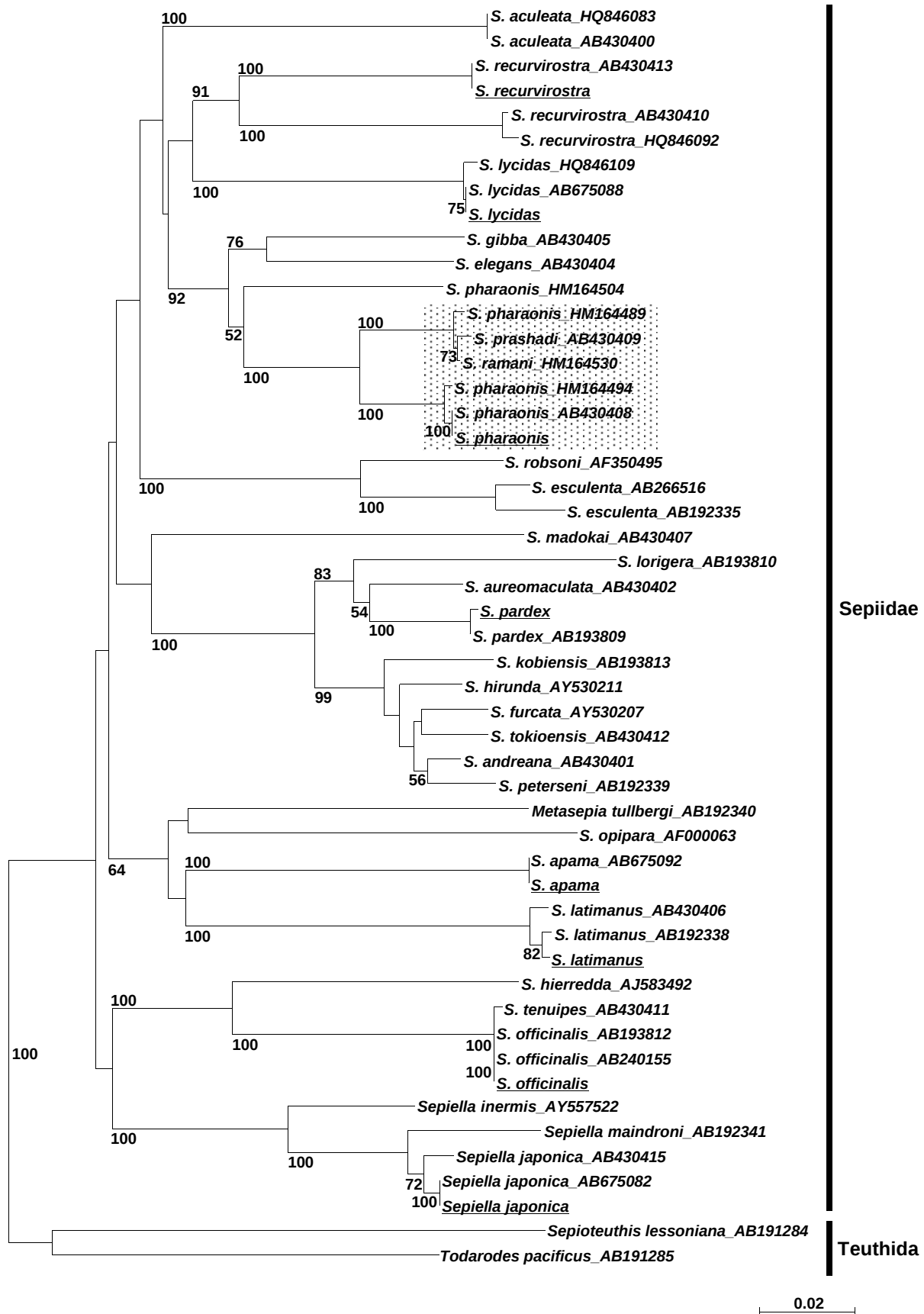


Fig. 4 Phylogenetic tree of cephalopods by the neighbor joining method with the CO1 genes. Numbers of nodes indicate bootstrap support values >50% (1000 replicates). The scale indicates the evolutionary distance of one amino acid substitution per site. Standard samples used in this study are underlined.

### 3.3 未知試料の解析

この IQ 該非の判別法の有効性を確認するために、未知試料について分析を行った。未知試料は、分析依頼された冷凍品のイカ 81 検体を用いた。

#### 3.3.1 未知試料の相同性解析

未知試料 81 検体の 16SrRNA 及び COI 領域の部分塩基配列を決定し、BLAST ( Basic Logical Alignment Search Tool ) により、国際 DNA データベースに登録されているイカの遺伝子配列と相同性検索を行った。その結果、A ~ G の 7 つの種のグループに分かれた ( Table 3 )。A グループ ( 1 検体 ) は、16SrRNA 及び COI 領域のいずれにおいても、カミナリイカとの相同性が 99% 以上であった。B グループ ( 21 検体 ) は、16SrRNA 及び COI 領域のいずれ

においても、トラフコウイカとの相同性が 99% 以上であった。C グループ ( 15 検体 ) は、16SrRNA 及び COI 領域のいずれにおいても、アジアコウイカとの相同性が 99% 以上であった。D グループ ( 11 検体 ) は、16SrRNA 領域においてスミスコウイカ *S. smithi* との相同性が 99% 以上であった。E グループ ( 23 検体 ) は、16SrRNA 領域においてミナミハリイカ *S. elliptica* との相同性が 99% 以上であった。F グループ ( 6 検体 ) は、アミノコウイカ *S. aculeata* との相同性が 16SrRNA 領域において 97.2 ~ 97.9%、COI 領域において 92.1 ~ 92.3% であった。G グループ ( 4 検体 ) は、16SrRNA 領域においてコウイカ *S. esculenta* と最も相同性が高かった ( 92.4 ~ 93.0% ) が、COI 領域では、ヤマタコウイカ *S. gibba* と最も相同性が高かった ( 88.1 ~ 88.3% )。

Table 3 Species identification of imported frozen cuttlefish based on BLAST using 16SrRNA and COI region nucleotide sequences

| Code | Sample no. | Species identification by 16SrRNA region nucleotide sequence homology |                   |             | Species identification by COI region nucleotide sequence homology |                   |             |
|------|------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------|
|      |            | identified species                                                    | identity          | %           | identified species                                                | identity          | %           |
| A    | 1          | <i>Sepia lycidas</i>                                                  | 469/471           | 99.6        | <i>Sepia lycidas</i>                                              | 657/658           | 99.8        |
| B    | 21         | <i>Sepia pharaonis</i>                                                | 493/494 – 502/502 | 99.8 – 100  | <i>Sepia pharaonis</i>                                            | 568/571 – 658/658 | 99.5 – 100  |
| C    | 15         | <i>Sepia recurvirostra</i>                                            | 479/483 – 482/482 | 99.2 – 100  | <i>Sepia recurvirostris</i>                                       | 652/658 – 657/658 | 99.1 – 99.8 |
| D    | 11         | <i>Sepia smithi</i>                                                   | 492/497 – 496/497 | 99.0 – 99.8 | <i>Sepia pharaonis</i>                                            | 569/637 – 570/637 | 89.3 – 89.5 |
| E    | 23         | <i>Sepia elliptica</i>                                                | 491/496 – 493/496 | 99.0 – 99.4 | <i>Sepia pharaonis</i>                                            | 584/657 – 528/587 | 88.9 – 89.9 |
| F    | 6          | <i>Sepia aculeata</i>                                                 | 494/508 – 419/428 | 97.2 – 97.9 | <i>Sepia aculeata</i>                                             | 607/659 – 608/659 | 92.1 – 92.3 |
| G    | 4          | <i>Sepia esculenta</i>                                                | 412/446 – 398/428 | 92.4 – 93.0 | <i>Sepia gibba</i>                                                | 580/658 – 581/658 | 88.1 – 88.3 |

#### 3.3.2 未知試料の分子系統解析

Figs. 3, 4 に用いた塩基配列データに未知試料 81 検体の 16SrRNA 及び COI 遺伝子の部分塩基配列データを加えて分子系統解析を行った ( Figs. 5, 6 )。16SrRNA 領域の系統樹においては、Fig. 3 の系統樹と同様に、シロヤケイカのクラスターに *Sepiella maindroni* が含まれるという種間の交差があり、また、樹形も Fig. 3 のものと類似していた。また、COI 領域の系統樹においては、Fig. 4 の系統樹と同様に、トラフコウイカのクラスターにアラビアコウイカ及び *S. ramani* が含まれるという種間の交差があり、また、樹形も Fig. 4 のものと類似していた。

#### 3.3.3 未知試料の IQ 該非の推定

3.3.1 及び 3.3.2 の結果をもとに、未知試料 81 検体について、IQ 該非及び種の推定を以下のとおり行った。

##### (1) A グループ

A グループ ( 1 検体 ) は、16SrRNA 及び COI 領域のいずれにおいても、国際 DNA データベースに登録されているカミナリイカの塩基配列との相同性が 99% 以上であった。また、16SrRNA 及び COI 領域のいずれの系統樹においても、カミナリイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成し、かつカミナリイカと各検体の枝が極めて短いことから、IQ 非該当のカミナリイカと推定される。従って、A グループのイカは、16SrRNA 又は COI 遺伝子のどちらか一方の領域を分析することにより、IQ 該非の判別を行うことが可能と考えられる。

##### (2) B グループ

B グループ ( 21 検体 ) は、16SrRNA 及び COI 領域のいずれにおいても、国際 DNA データベースに登録されているトラフコウイカの塩基配列との相同性が 99% 以上であった。また、16SrRNA

及び COI 領域のいずれの系統樹においても、トラフコウイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成したことから、IQ 非該当のトラフコウイカと推定される。従って、B グループのイカは、16SrRNA 又は COI 遺伝子のどちらか一方の領域を分析することにより、IQ 該非の判別を行うことが可能と考えられる。

##### (3) C グループ

C グループ ( 15 検体 ) は、16SrRNA 及び COI 領域のいずれにおいても、国際 DNA データベースに登録されているアジアコウイカの塩基配列との相同性が 99% 以上であった。また、16SrRNA 及び COI 領域のいずれの系統樹においても、アジアコウイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成し、かつアジアコウイカと各検体の枝が極めて短いことから、IQ 該当のアジアコウイカと推定される。従って、C グループのイカは、16SrRNA 又は COI 遺伝子のどちらか一方の領域を分析することにより、IQ 該非の判別を行うことが可能と考えられる。

##### (4) D グループ

D グループ ( 11 検体 ) は、COI 領域において相同性の高い種は無く、COI 領域の系統樹においてもクラスターを形成する種は無い。しかし、16SrRNA 領域において、国際 DNA データベースに登録されているスミスコウイカの塩基配列との相同性が 99% 以上であった。また、16SrRNA 領域の系統樹においても、スミスコウイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成し、かつスミスコウイカと各検体の枝が極めて短いことから、IQ 該当のスミスコウイカと推定される。従って、D グループのイカは、16SrRNA 領域を分析することにより、IQ 該非の判別を行うことが可能と考えられる。

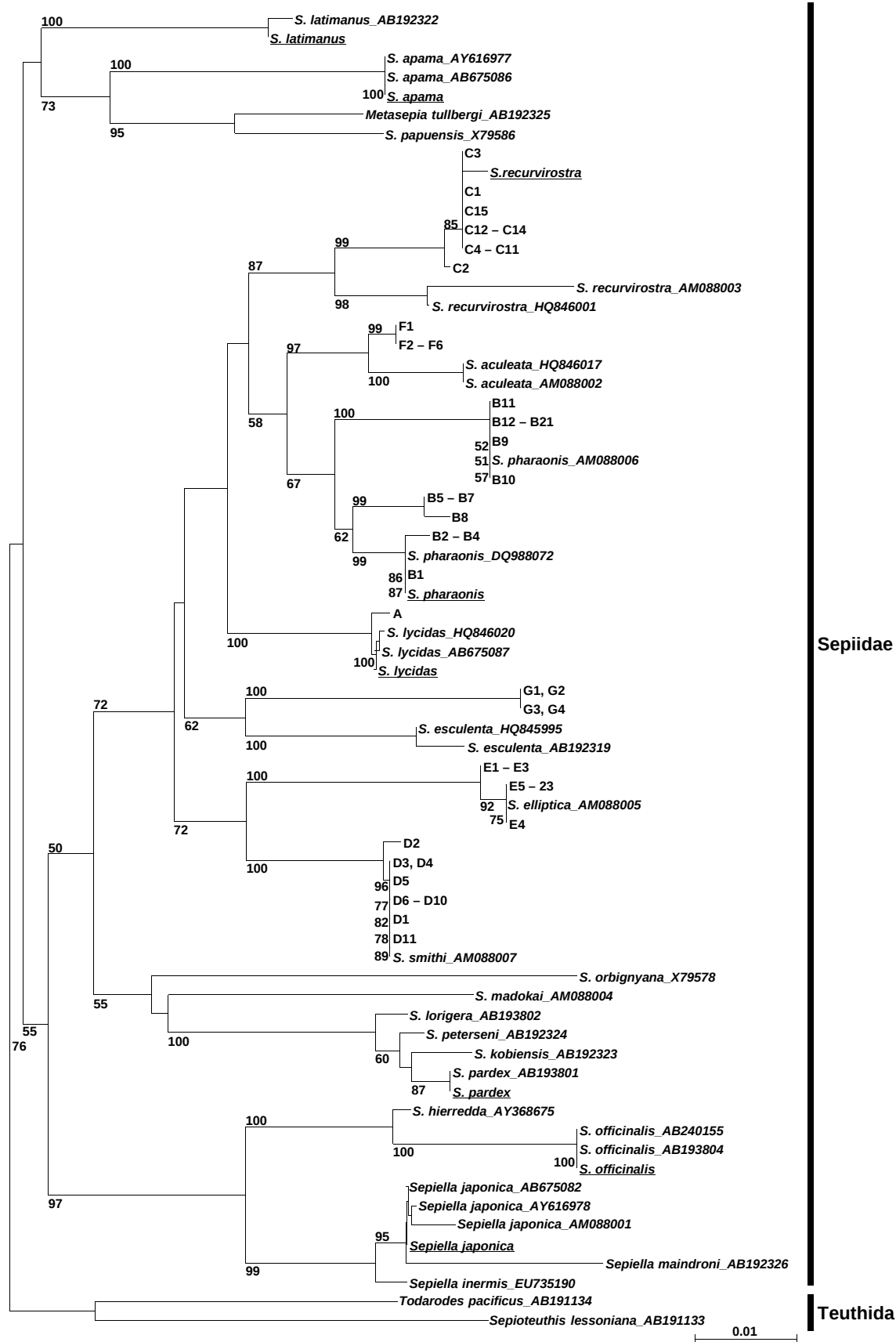


Fig. 5 Phylogenetic tree of cephalopods by the neighbor joining method with the 16S rRNA genes. Numbers of nodes indicate bootstrap support values >50% (1000 replicates). The scale indicates the evolutionary distance of one amino acid substitution per site. Standard samples used in this study are underlined.

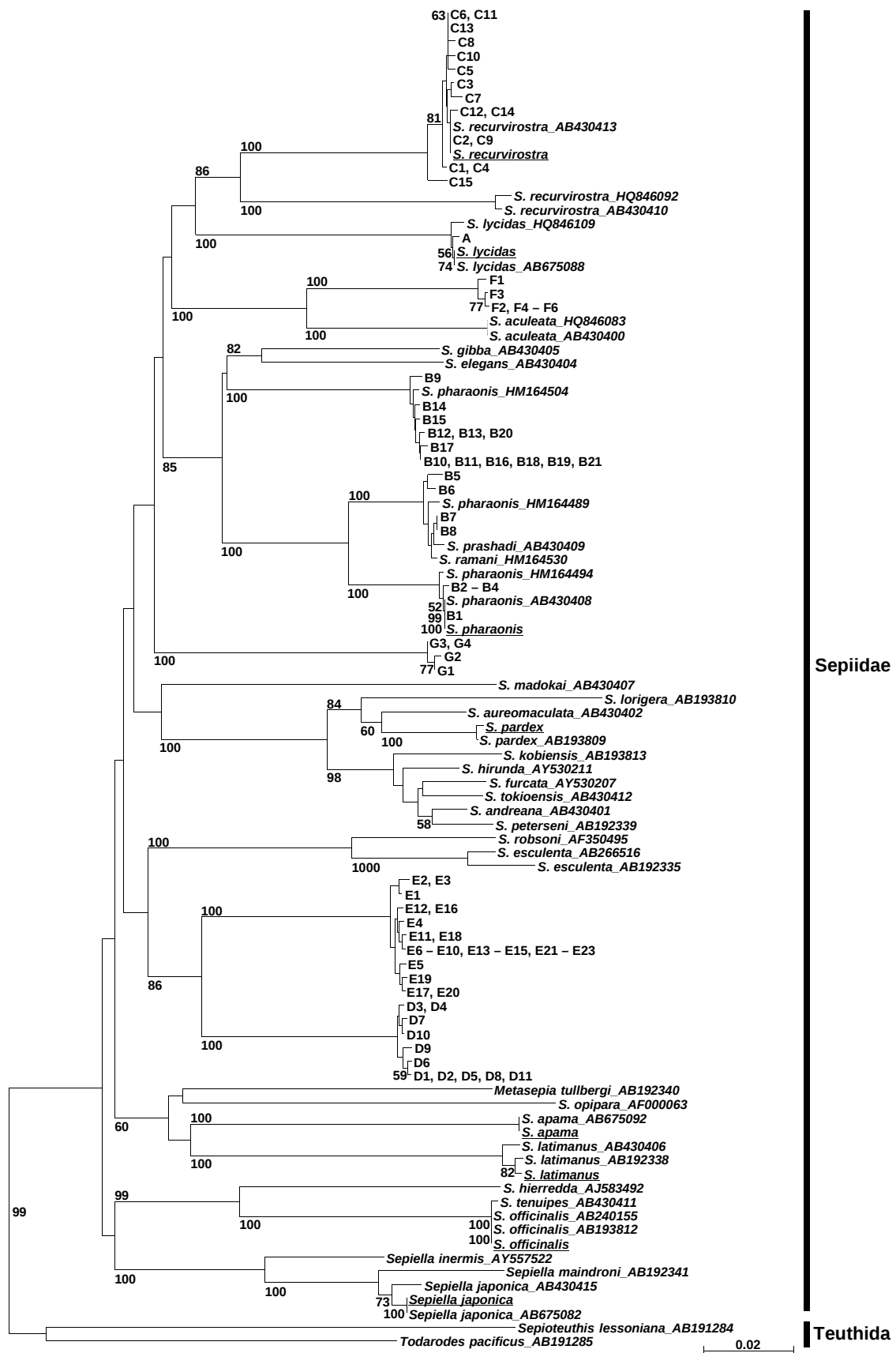


Fig. 6 Phylogenetic tree of cephalopods by the neighbor joining method with the CO1 genes. Numbers of nodes indicate bootstrap support values >50% (1000 replicates). The scale indicates the evolutionary distance of one amino acid substitution per site. Standard samples used in this study are underlined.

## (5) E グループ

E グループ(23 検体)は、*CO1* 領域において相同性の高い種は無く、*CO1* 領域の系統樹においてもクラスターを形成する種は無い。しかし、*16SrRNA* の部分領域において、国際 DNA データベースに登録されているミナミハリイカの塩基配列との相同性が99%以上であった。また、*16SrRNA* 領域の系統樹においても、ミナミハリイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成し、かつミナミハリイカと各検体の枝が極めて短いことから、IQ 該当のミナミハリイカと推定される。従って、E グループのイカは、*16SrRNA* 領域を分析することにより、IQ 該非の判別を行うことが可能と考えられる。

## (6) F グループ

F グループ(6 検体)は、アモンコウイカとの相同性が *16SrRNA* 領域において 97.2~97.9%、*CO1* 領域において 92.1~92.3%であった。また、*16SrRNA* 及び *CO1* 領域のいずれの系統樹においても、アモンコウイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成した。しかし、いずれの系統樹においても同一種としては枝が長いことから、アモンコウイカの近縁種であり、IQ 該当のイカと推定される。従って、F グループのイカは、*16SrRNA* 又は *CO1* 遺伝子のどちらか一方の領域を用いて分子系統解析を行い、近縁関係にある種を調べることに、IQ 該非の判別を行うことが可能と考えられる。

## (7) G グループ

G グループ(4 検体)は、*16SrRNA* 領域においてコウイカとの相同性が 92.4~93.0%であり、また、*CO1* 領域でも、ヤマタカコウイカ *S. gibba* との相同性が 88.1~88.3%であり、一致する種は見出せなかった。分子系統解析においても、*16SrRNA* 及び *CO1* 領域では、一致した見解が得られないことから、その種を特定することはできない。これらは、特定の種を推定することはできないが、*16SrRNA* 及び *CO1* 領域のいずれにおいても、国際 DNA データベースに登録された IQ 非該当のイカ 5 種(ヨーロッパコウイカ、トラフコウイカ、カミナリイカ、コブシメ及びオーストラリアコウイカ)のいずれともクラスターを形成しないことから、IQ 該当のイカと推定される。従って、G グループについては、*16SrRNA* 及び *CO1* 遺伝子の二つの領域を用いて分子系統解析を行い、近縁関係にある種を調べることに、IQ 該非の判別を行うことが可能と考えられる。

## 3.4 考察

3.4.1 *16SrRNA* 及び *CO1* 領域をイカ類の IQ 該非の推定に用いる根拠

*16SrRNA* 領域は、生物の系統分類に広く使用されており、多くの種の塩基配列が登録されている<sup>13)</sup>。また、*16SrRNA* 領域の塩基配列は、種間変異が多く、種内変異が少ないため、動物種の識別に利用できると考えられており、未登録の種でも BLAST による相同性検索で近縁種の推定が可能であると考えられている<sup>13)</sup>。更に、フグ種鑑別検査法においては、*16SrRNA* 領域の 615 塩基における配列相同性が 99.0%以上のものは、同一種と判定すると定められている<sup>14)</sup>。

*CO1* 領域は、約 650 塩基の配列が DNA バーコーディングにおいて、動物の種同定の標準的なバーコード領域として認定され、Barcode of Life Data systems (<http://www.barcodinglife.com/>) に 2013 年 5 月時点で 132,000 種を超える動物のデータが蓄積されている<sup>15)</sup>。そのため、*CO1* 領域を用いた生物種の同定は、今後、生物種判別の主要な手段の一つになると考えられている<sup>16)</sup>。イカ類においても、*CO1* 領域の塩基配列は種間変異が多く、種内変異が少ないため、約 650 塩基における配列相同性が 99%以上であれば、その配列をもつ種と同一種と考えられている<sup>17)</sup>。

## 3.4.2 IQ 該非の推定に用いる領域の検討

コウイカ科のイカ類のうち、ミナミハリイカ、オルビニコウイカ *S. orbignyana*、スミスコウイカの 3 種は、*16SrRNA* 遺伝子部分領域の塩基配列は、国際 DNA データベースに登録されているが、*CO1* 遺伝子部分領域の塩基配列は登録されていない(Table 2)。これらのイカ類については、塩基配列が登録されている *16SrRNA* 遺伝子領域を分析することにより、IQ 該非の判別が可能である。また、エゾハリイカ *S. andreana*、ハクテンコウイカ *S. aureomaculata*、ヤセコウイカ *S. bertheloti*、ヨーロッパヒメコウイカ *S. elegans*、*S. furcata*、ヤマタカコウイカ、*S. hirunda*、ウツクシコウイカ *S. opipara*、パプアコウイカ *S. papuensis*、アラビアコウイカ、*S. ramani*、*S. robsoni*、ウデボソコウイカ *S. tenuipes* 及びスジコウイカ *S. tokioensis* の 14 種は、*CO1* 遺伝子部分領域の塩基配列は、国際 DNA データベースに登録されているが、*16SrRNA* 遺伝子部分領域の塩基配列は登録されていない(Table 2)。これらのイカ類については、塩基配列が登録されている *CO1* 遺伝子領域を分析することにより、IQ 該非の判別が可能である。

3.2 及び 3.3.2 において、*16SrRNA* 領域の系統樹においては、シリヤケイカのクラスターに *Sepiella maindroni* が含まれるという種間の交差があった。これは、シリヤケイカ及び *Sepiella maindroni* が非常に近縁な種で、ミトコンドリア DNA の *16SrRNA* 領域の部分塩基配列が非常に類似している可能性が考えられる。もしくは、国際 DNA データベースに *Sepiella maindroni* として登録されている塩基配列がシリヤケイカのものである可能性も考えられる。また、*CO1* 領域の系統樹においては、トラフコウイカのクラスターにアラビアコウイカ及び *S. ramani* が含まれるという種間の交差があった。トラフコウイカについては、現在トラフコウイカとして分類されているイカに、*S. ramani* を含む複数の種が含まれ、いくつかの種に細かく分類される可能性があるという報告がある<sup>18)</sup>。アラビアコウイカについても、アラビアコウイカとトラフコウイカが近縁な種で、ミトコンドリア DNA の *CO1* 領域の部分塩基配列が非常に類似している可能性が考えられる。もしくは、国際 DNA データベースにアラビアコウイカとして登録されている塩基配列が、他の種のものである可能性もある。トラフコウイカは IQ 非該当のイカであるので、IQ 該非の推定は、これらのことを考慮して行う必要がある。

更に、3.3.3 において、(7) G グループの塩基配列は、国際 DNA データベースに登録されていない種であると考えられる。このように塩基配列が登録されていないイカ類の試料については、*16SrRNA* 及び *CO1* 遺伝子の二つの部分領域を用いて相同性検索

及び分子系統解析を行い、近縁関係にある種を調べることににより、IQ 該非の推定が可能であると考えられる。

### 3.4.3 結論及び今後の展望

国際 DNA データベースに塩基配列が登録されている種については、16S rRNA 又は CO1 遺伝子部分領域のいずれか一つの領域を分析することにより、イカ類の未知試料の IQ 該非の判別が可能であると考えられる。

国際 DNA データベースに塩基配列が登録されていない種については、16S rRNA 及び CO1 遺伝子の部分領域を用いて分子系統解析を行い、近縁関係にある種を調べることににより、イカ類の未知試料の IQ 該非の推定が可能であると考えられる。ただし、CO1 領域の系統樹においては、IQ 非該当であるトラフコウイカのクラスターに IQ 該当種が含まれるという種間の交差があるため、そのことを考慮して IQ 該非の推定を行う必要がある。

今後、IQ 該非の推定の精度を更に高めるためには、IQ 非該当種が唯一含まれるコウイカ科内のイカ類の塩基配列データを蓄積する必要がある。コウイカ科のイカ類は、約 110 種生息すると考えられているが<sup>19)</sup>、2013 年 5 月現在、国際 DNA データベースに登録されているコウイカ科のイカ類は、約 40 種であり、今後の塩基配列データの充実が望まれる。

種（ヨーロッパコウイカ、トラフコウイカ、カミナリイカ、コブシメ及びオーストラリアコウイカ）を除く全てのイカが輸入貿易管理令による輸入規制を受ける。従って、もんごういかと他のイカ類とを判別する必要がある。本研究では、オーストラリアコウイカのミトコンドリア DNA の 16S rRNA 及び CO1 部分領域の塩基配列を決定し、「もんごういか」5 種全ての塩基配列データを含む 35 種のコウイカ属のイカ及び 2 種のツツイカ目のイカを用いて分子系統解析を行った。その結果、イカの未知試料の IQ 該非の推定は、国際 DNA データベースに塩基配列が登録されている種については、16S rRNA 又は CO1 領域のいずれか一つの領域を分析することにより可能であった。また、国際 DNA データベースに塩基配列が登録されていない種については、16S rRNA 及び CO1 領域を用いて分子系統解析を行い、近縁関係にある種を調べることににより、IQ 該非の推定が可能と考えられた。また、多検体の分析に適したイカの DNA の抽出法を検討した結果、アルカリ溶解法により、フェノール、クロロホルム等の有機溶媒を使用せず、多検体から短時間かつ安価に DNA を抽出することが可能であることを示した。

（謝 辞）

本研究に当たって、試料を提供して頂いた大阪大学大学院古谷秀隆准教授、アデレード大学菅野雄耶氏に深くお礼申し上げます。

## 4. 要 約

関税率表第 03.07 項に分類されるイカ類は、「もんごういか」5

## 文 献

- 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) 高野香織，河嶋優美，片山貴之，山崎幸彦：関税中央分析所報，50, 13 (2010).
- 3) Santaclara FJ, Espineira M, Vieites JM : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9913 (2007).
- 4) Wakabayashi T, Yanagimoto T, Sakai M, Ichii T, Miki K : *DNA polymorphism*, 17, 1144 (2009).
- 5) Palumbi SR : Nucleic acids. The Polymerase chain reaction. in “*Molecular Systematics*” (Hillis DM, Moritz C, Mable , Eds.), 2nd Ed., P.205 (1996), (Sinauer, Sunderland, MA).
- 6) Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R : *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294 (1994).
- 7) Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T. Molecular cloning : A laboratory manual. (1989), *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- 8) Transgenic Mouse Facility, University of California Irvine : DNA preparation techniques.
- 9) Truett GE, Heeager P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML : *Biotechniques*, 29, 52 (2000).
- 10) 関谷剛男：“蛋白質 核酸 酵素”，Vol. 41, No. 5, P.455 (1996), (共立出版).
- 11) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG : *Nucleic Acids Research*, 25, 4876 (1997).
- 12) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ : *Nucleic Acids Research*, 22, 4673 (1994).
- 13) Mitani T, Akane A : *DNA polymorphism*, 16, 32 (2008).
- 14) 厚生労働省：食安輸発 0906 第 1 号 (2011).
- 15) Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR : *Proceedings of the Royal Society*, 270, 313 (2003).
- 16) Arami S, Sato E, Futo S : *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 52, 205 (2011).
- 17) 若林敏江：「6 章 イカ DNA の威力」，“新鮮イカ学（奥谷喬司編著）”，P.120 (2010), (東海大学出版会) .
- 18) Anderson FE, Engelke R, Jarrett K, Valinassab T, Mohamed KS, Asokan PK, Zacharia PU, Nootmorn P, Chotiyaputta C, Dunning M : *Journal of Molluscan Studies*, 77, 65 (2011).
- 19) 奥谷喬司：“原色世界イカ類図鑑”，P.22 (1995), (全国いか加工業協同組合).