

朝鮮半島及びその周辺から輸入されるあさり (*Ruditapes philippinarum*) の遺伝的多型に関する調査

赤崎 哲也*, 井上 純*, 伊藤 聰美*, 熊澤 勉*

Investigation of Genetic Diversity of Asari or Short Necked Clams (*Ruditapes philippinarum*) Imported from the Coasts of the Korean Peninsula and Adjacent Areas

Tetsuya AKASAKI*, Jun INOUE*, Satomi ITO*, Tsutomu KUMAZAWA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

Analysis of the genetic diversity of Asari or short necked clams (*Ruditapes philippinarum*) imported from the coasts of the Korean peninsula and adjacent areas may be important for helping to identify clams from a certain designated exporting country of this region. In the present work, the 565 nucleotide partial sequence of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I was sequenced for 69 clam samples from populations collected at eight sites along the Korean and Chinese coasts. Comparison of the sequences gave 28 haplotypes, one of which demonstrated as many as seven substitutions. A phylogenetic analysis of these haplotypes, made using a different kind of clam as the outgroup, showed that Asari clams of this region could be roughly divided into two clusters, those living in the area contained between the eastern coast of China and the western coast of the Korean peninsula, and those living along the southern and eastern coasts of the Korean peninsula. This suggests that Asari clams originated from the coast facing the open sea into the western embayment of the Korea peninsula.

1. 緒 言

あさり (*Ruditapes philippinarum*) は、日本の食卓においてごく普通に調理される食品の一つである。しかしながら、国内におけるあさりの漁獲量は、減少の一途を辿っており、それに相反する形であさりの輸入量が増加してきている。

ところで、1996年から中国・韓国産のあさりに関しては、貝毒が検出されたために通関時に食品衛生法に基づく検査が義務付けられており、朝鮮半島付近を原産とするものに関しては、原産国の確認が必要となっている。このため、当所においてミトコンドリアDNAのATCO領域を使ったPCR-RFLP分析や、砂抜きで得た貝中の無機成分についての化学分析を行ってみたが、有用な知見は得られなかった。

そこで、本研究では、以前に門司税關で取り扱われた朝鮮半島および北朝鮮に隣接する地域を仕出し地とするサンプルを用いて、DNAレベルの解析を行った。DNAレベルの集団解析には、いくつかの方法が存在するが、ここでは貝類についての文献^{1)~5)}をもとに、ミトコンドリアDNAのチトクローム酸化酵素

サブユニット I (以下、mtDNA CO I) の部分配列についての比較を行い、原産地毎に遺伝的な差異を有するかどうかを調査した。

2. 実 験

2. 1 試 料

冷凍あさり：門司税關からの提供試料(漁獲地をFig. 1に示す。)

2. 2 装 置

DNA増幅器 MIR-D40 (SANYO製)

ジェネティックアナライザ ABI PRISM 310
(Applied Biosystems製)

2. 3 方 法

2. 3. 1 DNAの抽出

門司税關からの提供試料から漁獲地毎に任意に数個体を選び、各個体の筋肉組織部分を切り取った後、DNA抽出⁶⁾を行った。

2. 3. 2 PCR条件

mtDNA CO I の部分領域を増幅するプライマー⁵⁾を用いて

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

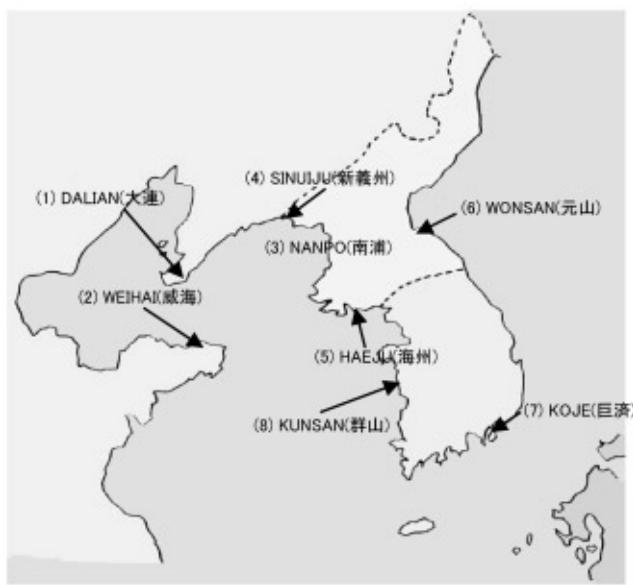


Fig. 1 Location of sampling site of *Ruditapes philippinarum* in Korea Peninsula and its neighborhood

Table 1 Alignment of the 33 variable site in the 565 nucleotide fragment of the mitochondrial CO I gene sequenced for 28 *Ruditapes philippinarum* CO I haplotypes

	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 5 5 0 1 2 2 2 4 5 6 8 0 3 4 7 7 8 8 2 5 6 7 2 3 3 5 5 5 7 4 6 8 3 3 3 4 1 3 5 0 2 1 2 4 3 8 0 3 0 8 4 0 2 5 8 5 0 3 0 4 9 4 4 7 6 3 4
Hap01	G G G G T G G C T A A T A A C T T G G T T G G C T T T T T C T A G T T
Hap02	G G G G T G T C T A A C A A C T T G G T T G G C T T C T C C A A T T
Hap03	G G G G T G T T T A A C A A C T T G G T T G G C T T C T C C A A T T
Hap04	G G G G T G G C T A G C A A C T T G G T T G G C T T T T C C A A T T
Hap05	G G G G T G G C C A A T A A T T G G T T G G C T T T T C T A G T T
Hap06	G G G G T G T C T A A C A A C T T G G T T A G C T T T T C C A A T T
Hap07	G G G G T G T C T A A C A A C T T G G T T G G C T T T T C C A A T T
Hap08	G G G G T G T T T A A C A A C T T G G T T G G C T T T T C C A A T T
Hap09	G G G G T G G C T A A T A A C T A G T T G G C T T T T C T A G T T
Hap10	T G G G T G G G T C A A C A A C T A G T T G G C T T T T C C G A T T
Hap11	T G G G T G G G T C A A C A A C T A G T C G G C T T T T C C G A T C
Hap12	T G G G T G G G T C A A C A A C T A G C T G G C C T T T T C C G A T T
Hap13	T G G G C G G G T C A A C A A C T A G T T G G C T T T C C C G A C T
Hap14	G G G G T G G C T A A T A A C T T G G T T G G C T C T T C T A G T T
Hap15	G G G G T G G C T A A T A A T T G G T T G G C T T T T C T A G T T
Hap16	T G G G T G G G T C A A C A G C T A G T T G G C T T T T C C G A T T
Hap17	G G G G T T T T A A C A A C T T G G T T G G C T T C T C C A A T T
Hap18	G G G G T G T C T G A C A A C T G A T T G G C T T C T C C A A T T
Hap19	G G G G T G G C T A A C G A C T T G G T T G G C T T T T C C A A T T
Hap20	G G G G T G T T T A A C A A C T T G G T T G G C T T T T C C A A T T
Hap21	T G G G T G G G T C A A C A A C T A G T T G G T T T T C C G A T C
Hap22	T G G G C G G G T C A A C A A C T A G T T G G C T T T T C C C G A T T
Hap23	G G G G T G T T T A A C A A C T T G G T T G G C T T C T C T A A T T
Hap24	T G G G T G G G T C A A C A A C T A G T T G G G T C T T T C G A T T
Hap25	T G G G T T G T C A A C A A C C A G T T G G C T T T T C C G A T T
Hap26	T G T G T T G T C A A C A A C T A G T T G G C T T T T C C G A T T
Hap27	T G G G T G G G T C A A C A A C T A G T T G G C T T T T C C A A T T
Hap28	T A T A T T G T C A A C A A C T A G T T G G C T T T T C C G A T T

PCRを行った。今回の実験では、1反応あたり50 μlの溶液を用い、100 ngのプライマー1組、100 ngのDNA、各0.2 mmolのdNTPを加え、95°C 1分、52°C 1分、72°C 1分のサイクルを30回繰り返した。

2. 3. 3 シーケンス反応

mtDNA CO I 遺伝子の部分領域を増幅したPCR 産物について、エキソスクレアーゼ及びアルカリフォスファターゼによって過剰の残存プライマーを除去した後、ダイターミネーター法(パークリンエルマー(株))によりシーケンス反応を行い、オートシーケンサー(ABI310)により塩基配列の解読を行った。

2. 3. 4 塩基配列の解析

各漁獲地毎のサンプルから得られたCO I 遺伝子の部分配列について、Genetix-Mac 10.1(ソフトウェア開発㈱)を用いてアライメントを行った。系統樹解析については、PHYLIP 3.57c(Felsenstein 1995)を用いて行った。

3. 結果及び考察

3. 1 結果

朝鮮半島及びその周辺(8箇所)で漁獲されたあさり69サン

ブルについて、CO I 遺伝子の部分配列565塩基の配列を決定した。これらのデータを用いて各々の個体間の塩基配列を比較したところ、全体で565塩基中の34個所の塩基に変異が認められ、各々のサンプルは28のハプロタイプに分類することができた(Table. 1)。34個所の変異のうち、第3コドンのトランジションが24、第1コドンのトランジションが5、第3コドンのトランスマージョンが3、第2及び第1コドンのトランスマージョンが、共に1であった。このうち非同義置換は、6個所で認められた。また今回選択した遺伝子の領域においては、各ハプロタイプ相互間の塩基置換数は、最大で8(1.4%)であり、塩基の欠損は認められなかった。この結果から、朝鮮半島及びその周辺に生息するあさりは、フロリダ半島及びその近辺に生息するムラサキイガイ⁵⁾と比べて、CO I 遺伝子に著しく変異が蓄積しており、ムラサキイガイよりも進化速度が速いことが分かった。

Table 2 Frequency distribution of mitochondrial DNA haplotypes detected in *Ruditapes philippinarum*
((1),(2),(3),(4),(5),(6),(7) and (8) indicate locations where samples were captured.)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Hap01	2	1	2		2		1	
Hap02	1	1	2	2	1			
Hap03	1							
Hap04	1							
Hap05	1							
Hap06	1							
Hap07	2		1	2	3			
Hap08	1		1					
Hap09		1						
Hap10		1						
Hap11	1			1	6	7	1	
Hap12	1							
Hap13	1							
Hap14		1						
Hap15		1						
Hap16		1						
Hap17		1						
Hap18		1				1		
Hap19		1				1		
Hap20		1						
Hap21			1					
Hap22			1			5		
Hap23			1					
Hap24				1				
Hap25				1				
Hap26				1				
Hap27					1			
Hap28						1		
Total	10	7	10	7	10	9	9	8 69

漁獲地とそれに対応するあさりの各ハプロタイプの出現頻度をTable. 2に示した。それぞれの漁獲地で検出されたハプロタイプは、内湾部ほど多様であり、相対的に各々の頻度は小さい

ことが分かった。しかしながら、今回検討したCO I 遺伝子の部分配列を基とした集団解析では、朝鮮半島及びその周辺から輸入されるあさりの原産地を特定するほどの地域毎の明確な遺伝的差異を検出することはできなかった。

3. 2 考 察

今回の調査で確認した28のハプロタイプ及び1つのアウトグループ (*Gomphia melanegis*: Accession no. AB076948) を用いて、近隣結合法により系統樹を作成した (Fig. 2)。この結果から、各々のハプロタイプは、外湾部において観測されるものと内湾部において観測されるものの2つのクラスターに大別できることが分かった。更に、この系統樹は、朝鮮半島及びその周辺に生息するあさりが、外湾部から内湾部に向かって分布を拡大させたことを示唆している。このことを朝鮮半島の地形形成と関連させて考えると、朝鮮半島は、鮮新世(200万~500万年前)に現在の地形が形成され始めたと考えられており⁷⁾、この後、現在に至るまでに海面が現在よりも低かった氷河期には、朝鮮半島の湾は小さく、あさりは、現在の半島の先端部分のみにしか生息できないが、氷河期の終焉に伴う海面の上昇により湾は拡大され、生息域を内湾の方に拡大させたものと推定される。このため、内湾部では、数回に及ぶ氷河期と間氷期による海面の変動の度に、各集団間相互の遺伝的交流が促されたため多様性に富み、外湾部では、海面の変動が小さかったこと、および潮流等の影響で他の集団と分断され、遺伝的多様性が乏しくなっているものと推測される。特に巨済(韓国)及び元山(北朝鮮)で漁獲されたあさりについては、遺伝的多様性が著しく乏しく、瓶首効果が働いている可能性が考えられる。

今後は、他の遺伝子領域(調節領域等)を用いた解析に取り組むと共に、より適切なアウトグループの選択を行うことで、あさりの原産国に対する良好な結果が得られるものと予想される。

4. 要 約

ミトコンドリアDNAのチトクローム酸化酵素サブユニットI (mtDNA CO I) 遺伝子の部分配列を用いて、朝鮮半島及びその周辺から輸入されるあさりの遺伝的多様性を調査した。その結果から、あさりは、朝鮮半島の内湾部ほど遺伝的多様性に富み、外湾部ほど遺伝的多様性は乏しいことが分かった。また、各々のハプロタイプを用いた系統解析から、外湾部から内湾部に向かって生息域を拡大させたことを示唆する系統樹が得られた。しかしながら、当該遺伝子領域を用いた解析では、あさりの原産国を特定するには至らないことが判明した。

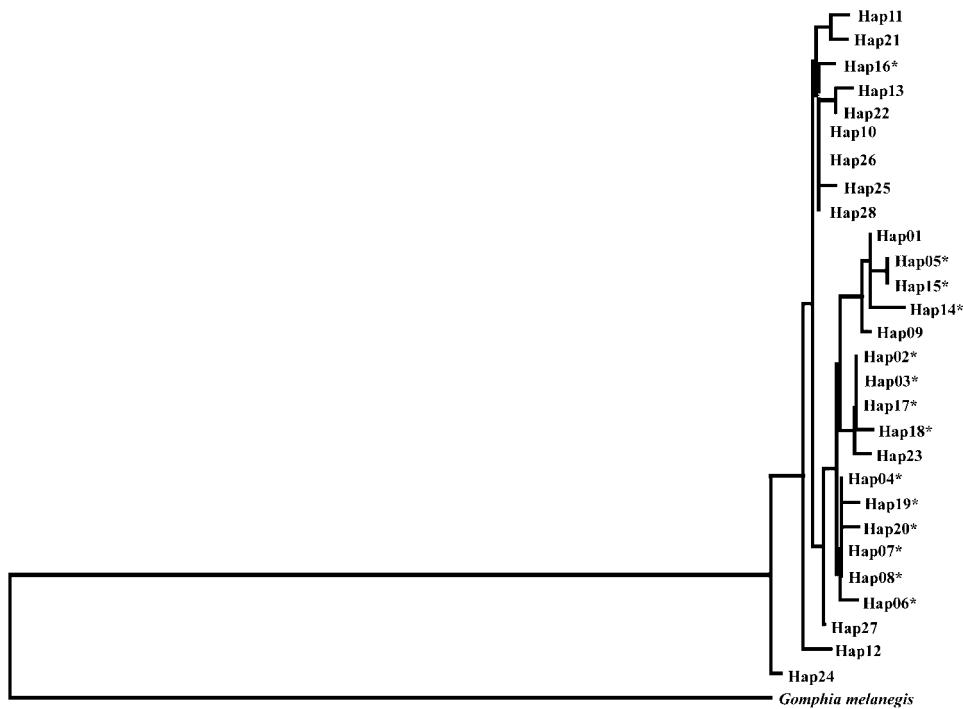


Fig. 2 Phylogenetic relationship of CO I gene estimated using neighbor-joining method with evaluated by Kimura's two-parameter method (*: inside of Korean Bay specific haplotypes)

文 献

- 1) A. Canapa, I. Marota, F. Rollo, E. Olmo : J. Mol. Evol., 43, 517-522 (1996)
- 2) A. Canapa, I. Marota, F. Rollo, E. Olmo : J. Mol. Evol., 48, 463-468 (1999)
- 3) A. Canapa, M. Barucca, A. Marinelli, and E. Olmo : Mol. Phylogenetic Evol., 21(1), 156-161 (2001)
- 4) Daniel L. Distel : Mol. Phylogenetic Evol., 15(1), 25-33 (2000)
- 5) J. Park and D. O. Foilghil : Biol. Bull., 198, 396-403 (2000)
- 6) Takasaki N, Park L, Kaeriyama M, Gharrett AJ, and Okada N : J. Mol. Evol., 42, 103-116 (1996)
- 7) 動物大百科19巻「進化と遺伝」(平凡社)