

ミトコンドリア DNA (シトクローム *b*) を利用した 「ちりめんじゃこ」の原料魚種推定について

赤崎 哲也*, 猿渡 敏郎**, 片山 貴之*, 朝長 洋祐*

Species Identification of Boiled and Dried Larval and Juvenile Sardines (Chirimen) Based on Information of Mitochondrial Partial Cytochrome *b*

Tetsuya Akasaki¹, Toshiro Saruwatari², Takayuki Katayama¹, Hirosuke Tomonaga¹, Yoshiro Watanabe²

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

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

**Biology of Fisheries Resource, Ocean Research Institute, The University of Tokyo

1-15-1 Minamidai, Nakano-ku, Tokyo 164-8639, Japan

Boiled and dried larval and juvenile sardines are produced by boiling and drying sardines in their larval and juvenile stages. Three genera of sandines, (*Sardinops*, *Engraulis* and *Etrumeus*) are controlled by import quotas in Japan. Accordingly, it is distinguish controlled sardines from others for customs clearance. Identifying them from their morphological appearance is difficult because they lose most of the morphological information during the manufacturing process. Therefore, we tried to identify ingredients of Chirimen by a direct sequencing method based on a part of the cytochrome *b* region (521 nuc.) of mitochondrial DNA, using data available from the Gene Bank. As a result, we could more or less distinguish import-restricted Chirimen. Abundant reference data, particularly on *Engraulis*, enabled us to perform analytical experiments more thoroughly than our previous analysis using the partial 16S gene of mitochondrial DNA.

1. 緒 言

ちりめんじゃこは、ニシン目の稚魚（特にマイワシやカタクチイワシ等）が原料として用いられているが、海外から輸入されるイワシ類のうち関税率表第03類に分類されるマイワシ属（*Sardinops* spp.）、カタクチイワシ属（*Engraulis* spp.）及びウルメイワシ属（*Etrumeus* spp.）のものは、輸入貿易管理令により輸入が制限されている。このため、輸入通関に際しては原料魚種の確認が必要となっている。

一般に、対象とする輸入品が新鮮で完全な状態の成魚であれば、形態学的な知見を基に魚種判別を行なうことが可能である。しかしながら、魚種判別のために重要な情報を有する部分が切除されていたり、十分に成長していない稚魚を利用したりする加工品に対しては、外観上の特徴に基づく形態学的な判別方法

だけでは、もはや対応不可能な場合も少なくない。実際に、ちりめんじゃこもイワシ類の稚魚を原料とし、煮沸・乾燥工程を経て製造される加工品であるため、元々魚体自体に形態学的な特徴が十分に現れていないのに加え、製造工程において外観が崩れてしまっているため、形態学的な情報から原料魚種を推定するのは、ほぼ不可能である。

原料魚種の推定に関する研究については、過去に HPLC 法による有機酸分析や等電点電気泳動法によるたんぱく質の解析、アロザイム分析等が報告されている¹⁻³⁾。これらの方法は、一部では加熱処理された製品にも対応した例が報告されているものの⁴⁾、一般的に目的成分の熱による変質や原料部位によって組成が異なること等、外因的影響を受け易く、加工品の原料推定にはあまり向いていないように思われる。

これに対して、DNA 分析では、原料部位を考慮に入れる必要がなく、たんぱく質よりも熱等の外的要因に対して比較的安定

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

** 東京大学海洋研究所 〒164-8639 東京都中野区南台1-15-1

Table 1 Standard and imported Samples used in this study

Scientific name	Common name	Family	Location or Origin	Date or Accession No.	Abbrev.
<i>Engraulis japonicus</i>	Japanese anchovy	Engraulidae	off the coast of Kashima	Oct31, 2003 (in this study)	E_jap
— " —	— " —	— " —	—	AY923784(Grant et al. ¹⁶⁾)	E_jap1
— " —	— " —	— " —	—	AY923786(Grant et al. ¹⁶⁾)	E_jap2
<i>E. anchoita</i>	Argentine anchovy	— " —	—	AY923767(Grant et al. ¹⁶⁾)	E_anc1
— " —	— " —	— " —	—	AY923768(Grant et al. ¹⁶⁾)	E_anc2
<i>E. encrasicolus</i>	European anchovy	— " —	—	AY923809(Grant et al. ¹⁶⁾)	E_enc1
— " —	— " —	— " —	—	AY923810(Grant et al. ¹⁶⁾)	E_enc2
<i>E. mordax</i>	Californian anchovy	— " —	—	AY923775(Grant et al. ¹⁶⁾)	E_mor1
— " —	— " —	— " —	—	AY923777(Grant et al. ¹⁶⁾)	E_mor2
<i>E. ringens</i>	Anchoveta	— " —	—	AY923770(Grant et al. ¹⁶⁾)	E_ring1
— " —	— " —	— " —	—	AY923772(Grant et al. ¹⁶⁾)	E_ring2
<i>Stolephorus heterolobus</i>	Shorthead anchovy	— " —	Amami oshima (from the stomach of skipjack tuna)	Jun25, 2004 (in this study)	St_het
<i>Sardinops melanostictus</i>	Japanese sardine	Clupeidae	37°30.3'N, 141°17.75'E	Oct31, 2003 (in this study)	S_mel
<i>S. melanostictus</i>	— " —	— " —	—	AB032554(Inoue et al. ¹⁷⁾)	S_mel1
<i>S. sagax</i>	South American pilchard	— " —	—	AF472586(Jerome et al. ¹⁸⁾)	S_sag
<i>S. caeruleus</i>	California pilchard	— " —	—	AF472585(Jerome et al. ¹⁸⁾)	S_cae
<i>Etrumeus teres</i>	Bigeye sardine	Clupeidae	Ottawa Bay	Feb2, 2004 (in this study)	E_tere
<i>Salangichthys microdon</i>	Ice fish	Salangidae	Lake Hinuma, Ibaraki	(in this study)	S_mic
<i>S. ishikawae</i>	Ishikawa Ice fish	Salangidae	Ooarai Fish market	Jul16, 2003 (in this study)	S_ishi

Imported small baby sardines (Chirimens)

Abbreviation	Origin
A1 - 5	China
B1 - 5	Thailand
C1 - 5	Indonesia

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応用されており⁵⁻⁷⁾, 飼料の原料推定等においても利用されている^{8,9)}。ちりめんじゃこの原料魚種の推定に関しても、既に我々は、ミトコンドリア DNA 上の16S rRNA 遺伝子コード領域の一部を利用し、広範囲のニシン目魚類の標準品を用いた研究を行った結果、輸入ちりめんじゃこの原料の多くは、カタクチイワシ科の魚種であることを確認している¹⁰⁾。しかしながら、16S rRNA 領域を用いた研究では、同属の標準標本数が少なく、更なる検証実験を必要とした。

そこで今回、我々は、新たにミトコンドリア DNA 上のシトクローム *b* 遺伝子コード領域の一部を利用して、輸入ちりめんじゃこの原料魚種推定に関する再検討を行ったので報告する。

2. 実 験

2. 1 試 料

各いわし類の標準サンプルは、事前に形態学的な知見から魚種の査証が行なわれ、東京大学海洋学研究所から提供されたものである。輸入ちりめんじゃこについては、名古屋税関、大阪税関及び神戸税関より提供されたものである。また、一部の標準魚種の塩基配列データは、DDBJ (DNA Databank of Japan) よりダウンロードしたものである。各々の詳細については、Table 1 に示す。

2. 2 装 置

DNA 増幅装置

GeneAmp PCR System 9700
(Applied Biosystem 製)

ジェネティックアナライザー 3100 Genetic Analyzer

(Applied Biosystem 製)

画像解析装置

BIO-PROFILE System2

(VILBER LOURMAT 製)

電池泳動装置

i-MupidJ (コスモバイオ(株)製)

2. 3 実 験

ニシン目魚類の標準標本及び輸入ちりめんじゃこの DNA は、Blin and Stanford¹¹⁾の方法に従って抽出した。抽出後は TE (10mM Tris-HCl, 5mM EDTA; pH8.0) 緩衝液に溶解し、冷蔵庫に保管した。

PCR 反応に使用したプライマーは、ニシン目に属する魚類及びその近縁魚種についての GeneBank データを参照して作成した (L14724-Glu¹²⁾: 5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3', Sard-CytbR: 5'-GGGTGTTCTACTGGYATWCCTCC-3')。PCR 反応の条件は、鋳型 DNA: 100ng, プライマー各 5pmol, dNTP mixture (25mM each): 2.4μl, Ex-Taq buffer: 3μl, Ex-Taq: 0.75 Unit, 滅菌水: (合計 30μl に調整) とし、熱変性 95°C (4 分) を行なった後、95°C (1 分), 49°C (1 分), 72°C (40 秒) を 30 回繰り返すように設定した。

シークエンス反応には、PCR 産物の 25 μl をイソプロパノール沈澱により精製し、PCR 反応と同じプライマーを用いて BigDye Cycle Sequencing Kit Ver3.1 添付のプロトコールに従い、5' 側及び 3' 側の両方向分の反応を行った。反応後、エタノール沈澱により未反応色素を除去し、ジェネティックアナライザーにより両方向から 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、近隣結合

法により分子系統解析を行なった。

3. 結果及び考察

一般的に加工食品中の DNA の保存状態は、加熱・調理(調味)、乾燥等の様々な加工処理を経ているために生鮮食料品に比べてかなり劣悪である。特に缶詰はその最たるもので、Quinteiro ら¹³⁾は、まぐろの缶詰中の DNA が、100塩基対程度にまで分解しているものも存在することを報告している。ちりめんじゃこも製造工程において煮沸及び乾燥処理が施されるため、抽出される DNA は、1000塩基対程度を中心とした分解の進んだものであることが報告されている¹⁰⁾。一般に種判別に利用する塩基配列情報は、多ければ多い程、結果の正確さを増すことが報告されているものの¹⁴⁾、加工品の場合には基礎的研究とは異なり、対象とする試料の状態により利用できる塩基配列長にも制限があると共に、リファレンス・データの有無が問題となってくる。いわし類の加工品についての DNA 種判別は、Marc ら⁷⁾によってミトコンドリア DNA 上のシトクローム *b* 領域103塩基を利用した方法が報告されているが、ここでは実験結果の正確さを確保するために解析対象塩基配列長を増やし、イワシ類に関して GeneBank 上に最も多く登録されているミトコンドリア DNA 上のシトクローム *b* 領域 (前半521塩基) を輸入ちりめんじゃこの原料魚種推定に用いることにした。

図1は、各輸入サンプルのシトクローム *b* 部分領域を増幅した結果である。過去にちりめんじゃこと称した輸入品の原料魚種が白魚であった事例⁴⁾があることを考慮して、ニシン目及びサケ目の魚種に対応したプライマー・セットを設計したため、プライマー設計の制約上、1000塩基対程度の比較的大きな PCR 産物を生じる実験条件となった。

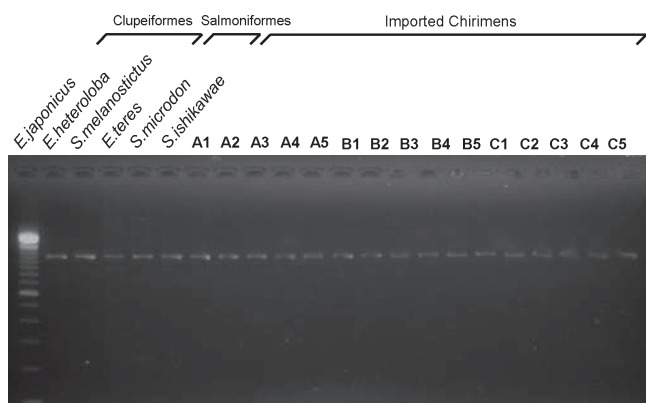


Fig.1 Electrophoresis of PCR products of which major sardines and imported chirimens were amplified by a universal primer set corresponding to cytochrome *b* region.

このうちの GeneBank 上の標準イワシ類のデータと相同な521塩基部分を抽出し、輸入サンプルの塩基配列データに対して各標準魚種及び GeneBank の塩基配列データを加え、分子系統解析を行なった結果が図2に示す系統樹である。この解析の結果、カタクチイワシ属及びマイワシ属は、それぞれ独立したクラスターを形成した。

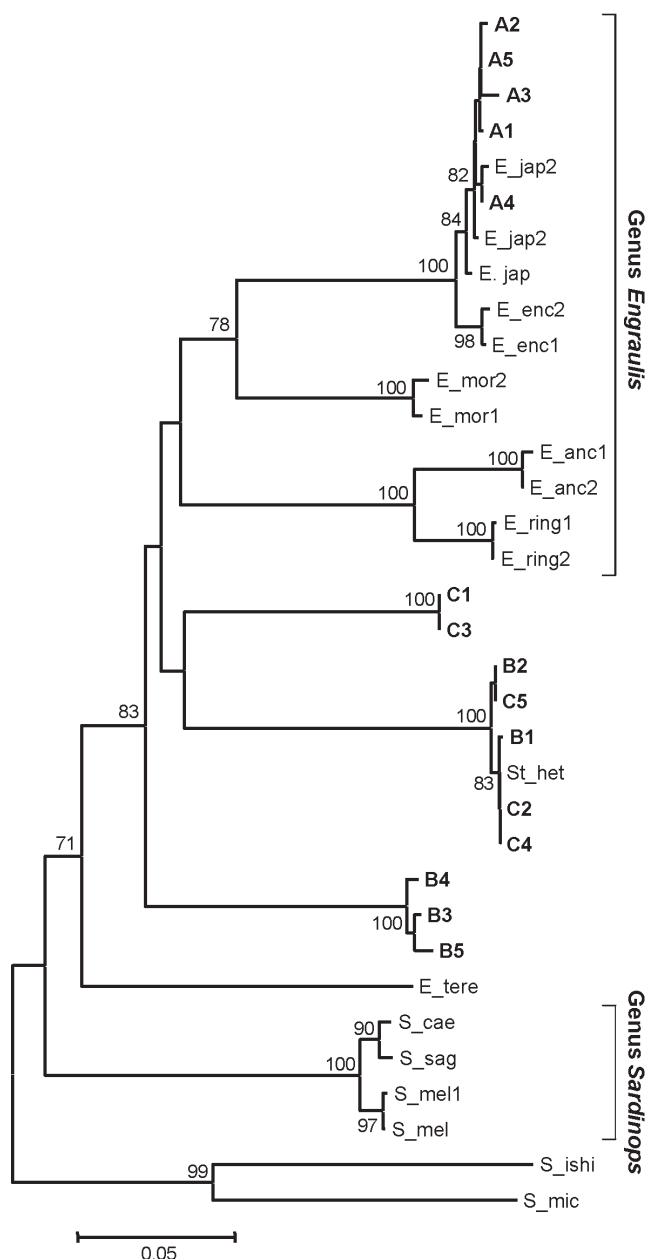


Fig.2 Identification of small baby sardines (chirimens) and phylogenetic relationships among 15 chirimens with standard fishes based on 521 nucleotide sequence of mitochondrial cytochrome *b* gene. Bootstrap values >70% are reported on the nodes of tree (bootstrap replications = 1000).

分子系統解析の結果から、全ての中国産ちりめんじゃこは、カタクチイワシ属 (genus *Engraulis*) の魚種から形成される大きなクラスターの内部に位置し、カタクチイワシ属の魚種であることがほぼ間違いないと思われる。更に全ての検体が、ブートストラップ確立100%でカタクチイワシ (*Engraulis japonicus*) とクラスターを形成し、かつ標準カタクチイワシの内部に各検体が位置した。Terol ら¹⁵⁾は、ブートストラップ確立70%以上で検体が標準標本とクラスターを形成すれば、かなりの確率 (≥95%) で種判別が可能であることを報告していることから、中国産の

Table 2. Genetic Distances among Sequences from Chinese Chirimens and several reference sardines estimated by Kimura 2 parameter method

	S_mel	A2	A5	A3	E_jap1	A1	E_jap2	A4	E_jap	E_enc2	E_enc1
S_mel											
A2	0.246										
A5	0.243	0.002									
A3	0.240	0.008	0.006								
E_jap1	0.245	0.006	0.004	0.010							
A1	0.243	0.004	0.002	0.008	0.002						
E_jap2	0.251	0.008	0.006	0.012	0.006	0.008					
A4	0.248	0.006	0.004	0.010	0.004	0.006	0.002				
E_jap	0.246	0.008	0.006	0.012	0.006	0.008	0.008	0.006			
E_enc2	0.229	0.021	0.020	0.025	0.018	0.019	0.021	0.020	0.018		
E_enc1	0.234	0.020	0.018	0.023	0.016	0.018	0.020	0.018	0.016	0.004	

Table 3. Genetic Distances among Sequences from Indonesian and Thai Chirimens with several reference sardines estimated by Kimura 2 parameter method

E_ring1	E_ring2	St_het	C2	C4	B1	B2	C5	E_tere
E_ring1								
E_ring2	0.002							
St_het	0.204	0.201						
C2	0.204	0.201	0.000					
C4	0.204	0.201	0.000	0.000				
B1	0.201	0.199	0.002	0.002	0.002			
B2	0.201	0.199	0.004	0.004	0.004	0.006		
C5	0.201	0.199	0.004	0.004	0.004	0.006	0.000	
E_tere	0.240	0.240	0.223	0.223	0.223	0.220	0.229	0.229

ちりめんじゃこは、カタクチイワシが原料に使用されている可能性が極めて高いといえる。なお、中国産ちりめんじゃこの遺伝子距離は0.002~0.010、標準カタクチイワシに対する遺伝子距離は0.002~0.012であった。また、次いで近縁魚種と推定される *Engraulis encrasicolus* との遺伝子距離は0.018~0.025であった。なお、今回解析に使用した標準標本の同一種間についての遺伝子距離は0.002~0.008であった（データ量が膨大なため、結果の一部を Table 2 に示す。）。

一方、タイ産のちりめんじゃこ（B1,2）及びインドネシア産ちりめんじゃこ（C2,4,5）は、カタクチイワシ科インドアイノコイワシ属のミズスル (*Stolephorus heterolobus*) とブートストラップ確立100%でクラスターを形成した。ミズスルを含めたこれら検体間の遺伝子距離は0.000~0.006であり（Table 3）、他の標準標本の同一種間の遺伝子距離が0.002~0.008の範囲であることを考慮すると、これらの検体はミズスルと同一種である可能性が極めて高い。

インドネシア産ちりめんじゃこ（C1,3）に関しては、ミズスルのグループとクラスターを形成することから、インドアイノコイワシ属の他の魚種である可能性が示唆される。タイ産のちりめんじゃこ（B3~5）については、今回の解析では原料魚種を推定することはできなかったが、規制対象となっているカタクチイワシ属、マイワシ属及びウルメイワシ属のいずれの魚種にも該当しないことを確認することは可能であった。

今回の解析では、以前に報告した16S 遺伝子を利用した原料魚種推定法¹⁰⁾と基本的に同様の結果が得られた。16S 遺伝子を用いた解析では、標準品の不足からカタクチイワシ属に該当する魚種か否かの判別に曖昧さを残したが、カタクチイワシ属に関

するシトクローム *b* 遺伝子の情報が GeneBank 上に比較的豊富に登録されているため、それらのデータ・セットを利用することで、カタクチイワシ属に関しては前回よりも確度の高い魚種推定を行うことができた。

しかしながら、シトクローム *b* 遺伝子の情報は、広範囲のニシン目の魚種を取り扱うには塩基置換が飽和している可能性が高く、不向きであった（Data not shown）。今後、更にカタクチイワシ科内部の魚種に関する標準品の収集を進めることにより、より正確な輸入ちりめんじゃこの原料魚種推定を行うことが可能になるとと思われる。

4. 要 約

ミトコンドリア DNA 上のシトクローム *b* 遺伝子についての部分配列（521塩基）を利用して、輸入ちりめんじゃこの原料魚種の推定を試みた。分子系統解析の結果は、基本的に16S 遺伝子を用いたものと同じであったが、GeneBank 上にカタクチイワシ属のシトクローム *b* 遺伝子に関するリファレンス・データが多く登録されていたため、輸入ちりめんじゃこの原料魚種がカタクチイワシ属に該当するか否かについて、より詳細に解析することが可能であった。今回の研究で魚種を判別することができなかった検体についても、カタクチイワシ科の標準データを収集することにより、対応可能になるとと思われる。

（謝 辞）

本研究に当たって、共同研究の実施を快諾して頂いた東京大

学海洋研究所の渡邊良郎教授，および標準サンプルを提供して頂いた茨城水産試験場の二平氏，八角氏及び石川氏，九州大学の水谷氏，水産総研資源環境部の岡部氏に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Ashoor S.H., Monte W.C. and Stiles P.G.: J Assoc Off Anal Chem., **71**, 397 (1988).
- 2) Ukishima Y., Kino M., Kubota H., Wada S. and Okada S.: J Assoc Off Anal Chem., **74**, 943 (1991).
- 3) Carmen G., Carmen P., Jose M.G. and Ricardo I.P.: Trend in Food Science & Technology, **4**, 395 (1993).
- 4) 日本水産学会編：“水産食品の鑑定”(1979), (恒星社厚生閣).
- 5) Javier Q., Rodrigo V., Monica I., Carmen G.S., Maria J.C., Ricardo 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).
- 6) Paola S., Paola Z. and Tauro M.N.: J. Agric. Food Chem., **49**, 1194 (2001).
- 7) Marc J., Christophe L., Veronique V. and Monique E.: J. Agric. Food Chem., **51**, 7326 (2003).
- 8) Federica B., Vittorio M.M., Sergio C. and Franco V.: J. Agric Food Chem., **49**, 3775 (2001).
- 9) Pavel K. and Eva R.: J. Agric Food Chem., **51**, 7655 (2003).
- 10) Akasaki T., Saruwatari T., Tomonaga H., Satou S. and Watanabe Y.: Submitted to Fisheries Science.
- 11) Blin, N. and Stafford, D.W.: Nucleic Acids Res., **3**, 2303 (1976).
- 12) Inoue J.G., Miya M., Tsukamoto K. and Nishida M.: Mol. Phylogenet. Evol., **20**, 275 (2001).
- 13) Quinteiro J., Sotelo C.G., Rehbein H., Pryde S.E., Medina I., Perez-Martin R.I., Rey-Mendez M. and Mackie I.M.: J. Agric. Food Chem., **46**, 1662 (1998).
- 14) Andrew P.M., Bailey D.K. and Stephen R.P.: Mol. Biol. Evol., **7**, 485 (1990).
- 15) Terol J., Mascarell R., Fernandez-Pederosa V. and Perez-Alonso M.: J. Agric. Food Chem., **50**, 963 (2002).
- 16) Grant, W.S., Leslie, R.W. and Bowen, B.W.: J. Fish Biol. (2005) In press.
- 17) Inoue, J.G., Miya, M., Tsukamoto, K. and Nishida, M.: Fish. Sci., **66**, 924 (2000).
- 18) Jerome, M., Lemaire, C., Bautista, J.M., Fleurence, J. and Etienne, M.: J. Agric. Food Chem., **51**, 43 (2003).