

DNA解析によるいかの種判別

竹元 賢治*, 積田 優一郎*, 岩下 伸行*, 村上 孝之*, 寺内 豊*, 松崎 隆一*

Species Identification of Squid by DNA Analysis

Kenji TAKEMOTO*, Yuichiro TSUMITA, Nobuyuki IWASHITA, Takayuki MURAKAMI, Yutaka TERAUCHI and Ryuichi MATSUZAKI*

Tokyo Customs Laboratory

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

There are only five species of squid that are not controlled by import quotas in Japan: *Sepia officinails*, *Sepia pharaonis*, *Sepia lycidas*, *Sepia latimanus* and *Sepia apama*. Accordingly, species identification of squid is necessary for customs clearance. However, in the case of processed foods, it tends to be difficult to identify squid species based on morphological appearance because most of the morphological information is lost during the manufacturing process. Therefore, in this study, we tried to identify species of squid using partial sequences of two mitochondrial genes, 16S rRNA and Cytochrome c Oxidase subunit I (COI) gene. As a result, we succeeded in discriminating squid at the species level.

1. 緒 言

関税率表における「いか」は、加熱または調味が十分になされたものについては第 1605.90 号に分類されるが、不十分なものについては第 03.07 項に分類される。第 03.07 項に分類されるいかのうち、輸入貿易管理令による輸入規制がないもの (IQ 非該当のもの) は、「もんごういか」と呼ばれる 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) のみである。従って IQ 該非の判断には、いかの種の確認が必要となっている。

一般に、対象とする個体が新鮮で完全な状態ならば、形態的な知見を基にイカの種の判別が可能である。しかしながら、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イカ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、もはや種判別が不可能な場合も少なくない。実際、輸入されるイカは、ほとんどのものが煮沸・切断工程を経て製造される加工品であるため、形態学的な情報から種を推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 DNA が熱等の外的要因に対して比較的安定であるため、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、過去にも報告されている¹⁻³⁾。

そこで今回、我々は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 上の 16S rRNA 及び Cytochrome Oxidase subunit I (COI) をコードする遺伝子領域の一部を利用していかの種判別に関する検討を行ったので報告する。

2. 実 験

2. 1 試料

標準試料は、大阪大学大学院理学研究科古屋研究室から提供されたもの、市場等で購入したもの及び日本近海で採取した生鮮のもの計 9 種 15 検体である。

輸入品は、加熱・調味が十分になされたものとして当分析部門に分析依頼があったもの計 2 種 5 検体である。

各標準試料及び輸入品の種名や原産地等、詳細については Table 1 及び Table 2 に示す。

Table 1 Standard samples used in this study

和名	Scientific name	Family	Location or Origin	Code
ヨーロッパコウイカ	<i>Sepia officinalis</i>	Sepiidae	Morocco	S_off
トラコウイカ	<i>Sepia pharaonis</i>	Sepiidae	Taichung, Taiwan	S_phar
カミナリイカ	<i>Sepia lycidas</i>	Sepiidae	Hachimanham, Ehime	S_lyc1
			Himeji, Hyogo	S_lyc2
			Himeji, Hyogo	S_lyc3
コブシメ	<i>Sepia latimanus</i>	Sepiidae	Itoman, Okinawa	S_lat
シリヤケイカ	<i>Sepia Japonica</i>	Sepiidae	Izumisano, Osaka	S_jap
ヒヨウモンコウイカ	<i>Sepia pardex</i>	Sepiidae	Yawatahama, Ehime	S_par
アオリイカ	<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	Loliginidae	Nagasaki	S_les1
			Hamasaka, Hyogo	S_les2
			Hamasaka, Hyogo	S_les3
			Himeji, Hyogo	S_les4
スルメイカ	<i>Todarodes pacificus</i>	Ommastrephidae	Tsushima, Nagasaki	T_pac1
ソディカ	<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	Thysanoteuthidae	Tsukiji Market	T_pac2
			Okinawa	T_rho

Table 2 Imported samples used in this study

和名	Scientific name	Family	Location	Code
アメリカオオアカイカ	<i>Dosidicus gigas</i>	Ommastrephidae	Chile	D_gig1
			Mexico	D_gig2
アジアケンサキイカ	<i>Uroteuthis duvaucelii</i>	Loliginidae	Vietnam	U_duv1
			Vietnam	U_duv2
			Myanmar	U_duv3

2. 2 分析装置及びプライマー

PCR 増幅装置 : Gene Amp[®] PCR system 9700 (Applied Biosystems 社製)

電気泳動装置 : Mupid-exU ((株)アドバンス製)

DNA シークエンサー : ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製)

プライマー16S-L

CGCCTGTTTATCAAAAACAT⁴⁾

プライマー16S-H

CCGGTCTGAACTCAGATCACGT⁴⁾

プライマーCOI-L

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG⁵⁾

プライマーCOI-H

TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA⁵⁾

2. 3 実験

各試料について、肉片約 30mg を採取した。DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社) により DNA を抽出し、mtDNA 上の 16S rRNA 及び COI をコードする遺伝子領域の一部を PCR 法で増幅した。PCR 反応溶液は、錫型 DNA:約 100ng、プライマー:各 25pmol、dNTP mixture (2.5mM each): 1.6μl、10×PCR Buffer: 2.0μl、Takara Taq:0.5U、滅菌水 (合計 20μl に調製) とした。PCR 反応条件は、1×94°C/30sec、30× (94°C/30sec、50°C/1min、72°C/30sec)、1×72°C/5min とした。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 産物をイソプロピルアルコ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 BigDye[®] Cycle Sequencing Kit Ver3.1 添付のプロトコールに従い、L鎖及び H鎖の両鎖のサイクルシークエンス反応を行った。反応後、エタノール

沈殿法で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、アライメントした配列データについて、近隣結合法により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 に示す。生成物は、16S rRNA 部分領域で約 600bp、COI 部分領域で約 800bp であり、標準試料及び分析依頼品全てにおいて増幅を確認することができた。

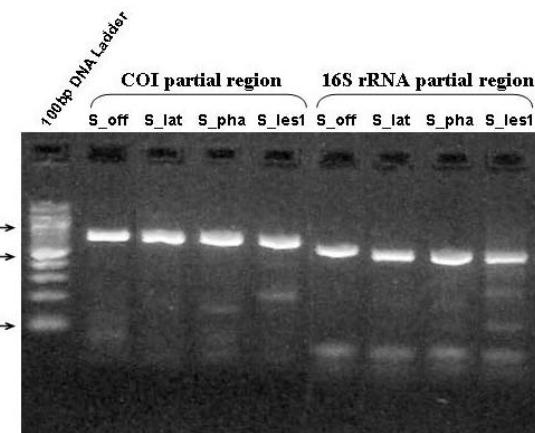


Fig.1 Electrophoresis of PCR products of 4 species by two primer sets.

3. 2 DNA シーケ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 産物を用いて、16S rRNA 部分配列及び COI 部分配列を決定した。決定した塩基配列を、DDBJ に登録されている塩基配列データと比較した結果を Table 3 に示す。カミナリイカ(*Sepia lycidas*)及びトラフコウイカ(*Sepia pharaonis*)を除く全ての標準試料及び輸入品において、各種イカの 16S rRNA 及び COI 部分配列の登録データとほぼ一致した。

次に、各試料から得られた 16S rRNA 部分配列及び COI 部分配列について、それぞれ分子系統解析を行った結果を Figs.2,3 に示す。この解析の結果、ツツイカ目の試料とコウイカ目の試料は、それぞれ独立したクラスターを形成した。Takumiya ら⁶⁾が構築した分子系統樹においても、ツツイカ目とコウイカ目はそれぞれ独立してクラスターを形成しており、今回構築した分子系統樹は彼らのものと矛盾しない結果が得られ、コウイカ目とツツイカ目を判別することが可能であると考えられる。また、各試料は、16S rRNA 及び COI 領域において、種ごとに異なる塩基配列をもっており、種レベルでの判別も可能であると考えられる。なお、今後は、標準となるイカの収集を進め、塩基配列データを蓄積していくことにより、より正確な種の判別が可能になると考えられる。

Table 3 The concordance rate with DDBJ registration data of each sample

Code	16S rRNA	Accession No.	COI	Accession No.
S_off	100 %	AB193804	100 %	AB240155
S_pha	99.8%	DQ958072	—†	—†
S_lyc1	—†	—†	100 %	AB192337
S_lyc2	—†	—†	100 %	AB192337
S_lyc3	—†	—†	100 %	AB192337
S_lat	99.8%	AB192322	99.7%	AB192338
S_jap	100 %	AF369119	100 %	AF346853
S_par	100 %	AB193801	99.8%	AB193809
S_les1	100 %	AB240154	100 %	AY131065
S_les2	99.8%	AB240154	100 %	AY131065
S_les3	100 %	AB240154	100 %	AY131065
S_les4	100 %	AB240154	100 %	AY131065
T_pac1	100 %	AB158364	100 %	AB158364
T_pac2	100 %	AB158364	100 %	AB158364
T_rho	99.6%	AB191135	99.1%	AF000070
D_gig1	100 %	EU068697	100 %	EU068697
D_gig2	99.8%	EU068697	99.8%	EU068697
U_duv1	99.8 %	AF110093	100 %	AF075398
U_duv2	99.6 %	AF110093	100 %	AF075398
U_duv3	99.8 %	AF110093	100 %	AF075398

† No agreement data

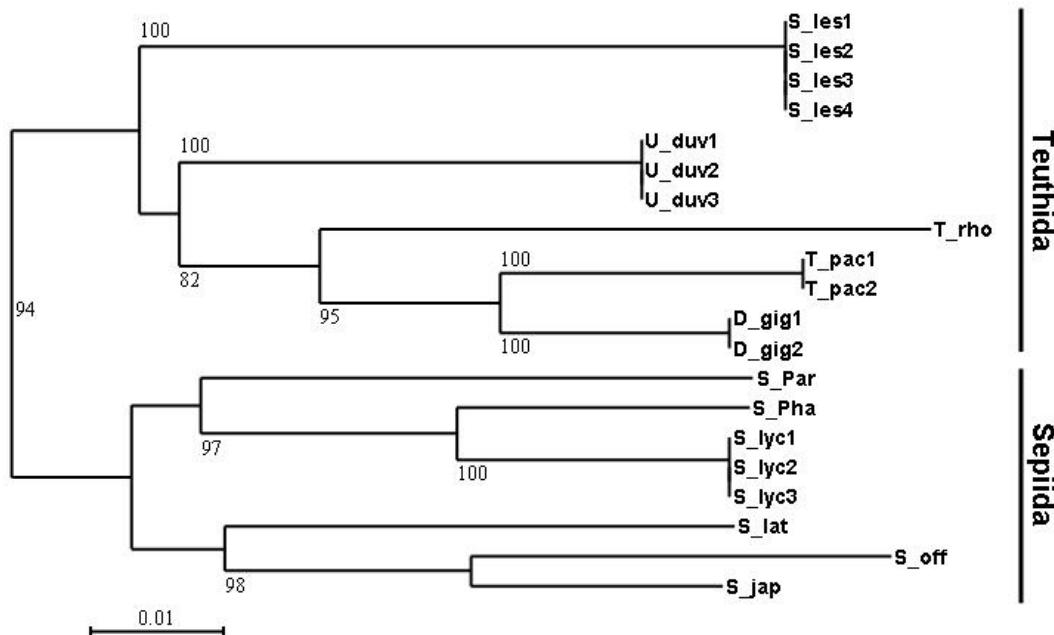


Fig.2 Neighbor-joining tree derived from analysis of squid mitochondrial 16S rRNA partial sequences data. Squid lineage can be separated into two main clusters, Teuthida (I) and Sepiida (II). Numbers of nodes indicate >70% bootstrap support values (1000 replicates).

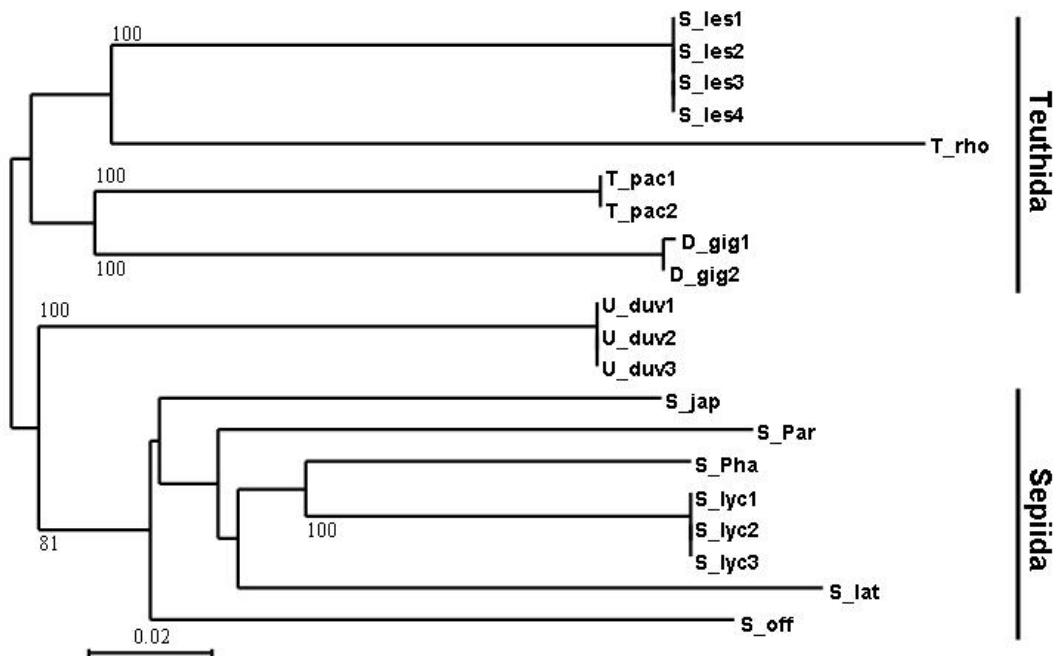


Fig.3 Neighbor-joining tree derived from analysis of squid mitochondrial COI partial sequences data. Squid lineage can be separated into two main clusters, Teuthida (I) and Sepiida (II). Numbers of nodes indicate >70% bootstrap support values (1000 replicates).

4. 要 約

日本では、5種のコウイカ（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、通関手続きのためには、イカの種判別が必要となる。しかしながら、加工品の場合、加工の過程において形態的な特徴が失われることが多く、形態学的な特徴から種判別を行うことは困難なことが多い。そこで本研究では、mtDNA上の16S rRNA及びCOIをコードする遺伝子領域の一部を利用したイカの種判別に関する検討を行った。その結果、イカを種レベルで識別することに成功した。

（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理学研究科の古屋氏に深くお礼申し上げます。

また、本研究に当たって、ご指導頂いた独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所の山下氏に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 小倉郁史, 山上薰, 富田健次, 篠田智: 関税中央分析所報, **44**, 7 (2004).
- 2) 赤崎哲也, 猿渡敏郎, 片山貴之, 朝長洋祐: 関税中央分析所報, **45**, 5 (2005).
- 3) 片山貴之, 山盛愛子, 赤崎哲也, 朝長洋祐, 四ツ倉典滋: 関税中央分析所報, **46**, 5 (2005).
- 4) Palumbi, S. R. : Nucleic acids. The Polymerase chain reaction. in "Molecular Systematics" (D. M. Hillis, C. moritz, and Mable, Eds.), 2nd Ed., P.205(1996),(Sinauer, Sunderland, MA).
- 5) Folmer,O., Black,M., Hoeh,W., Lutz,R. and Vrijenhoek,R.: Molecular Marine Biology and Biotechnology, **3**, 294(1994).
- 6) Takumiya,M., Kobayashi,M., Tsuneki,K. and Furuya, H. : Zoological Science, **22**, 147(2005).