

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 Yukihiro 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、税関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、現在までにいかの種判別法として報告されているのは、ダイレクトシーケ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¹⁾。この方法に必用な DNA シーケンサーは関税中央分析所と一部の税関にのみ配備されていることから、多くの税関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うことは困難であった。以上のことから、各税関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、多くの税関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 oxidase 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ケンス法²⁾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、多くの税関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ケ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)
Superorder Decapodiformes				
Order Sepiida				
Suborder Sepiina				
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 kobeensis</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 subtenuipes</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 Sepiariidae	<i>Sepiadium kochi</i>		AB191141	AB191292
— " —	— " —		AY293678	AY293726
— " —	<i>Sepiadium austrinum</i>		AY616976	no data
Order Teuthida				
Suborder Oegopsina				
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
Suborder Myopsina				
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>Loliolus 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

いかにからの 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。

いかに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'-CGCCTGTTT(GA)(CAT)CAAAAACAT -3')

16sbr (5'-CCGGT(CT)TGAAGTCAGATCA(CT)GT -3')

CO I 領域

LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG -3')

HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA -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℃で 5 分加熱後、94℃30 秒、40℃1 分、72℃1 分のサイクルを 35 回行い、最後に 72℃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。

サイクルシーケンシング反応は、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鋳型に、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、いかにの種を決定した。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、Bsp1286 I、Bmg120 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に 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にとはいずれも配列が異なっていたことから、今回系統解析を行ったいかににおいては、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、他のいかにとの種判別は可能であった。

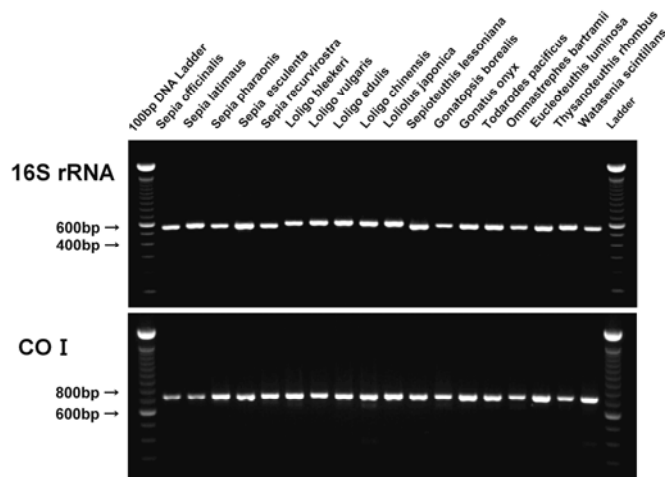


Fig.1 PCR products in 16S rRNA and partial COI region of 18 cuttle fish and squid species

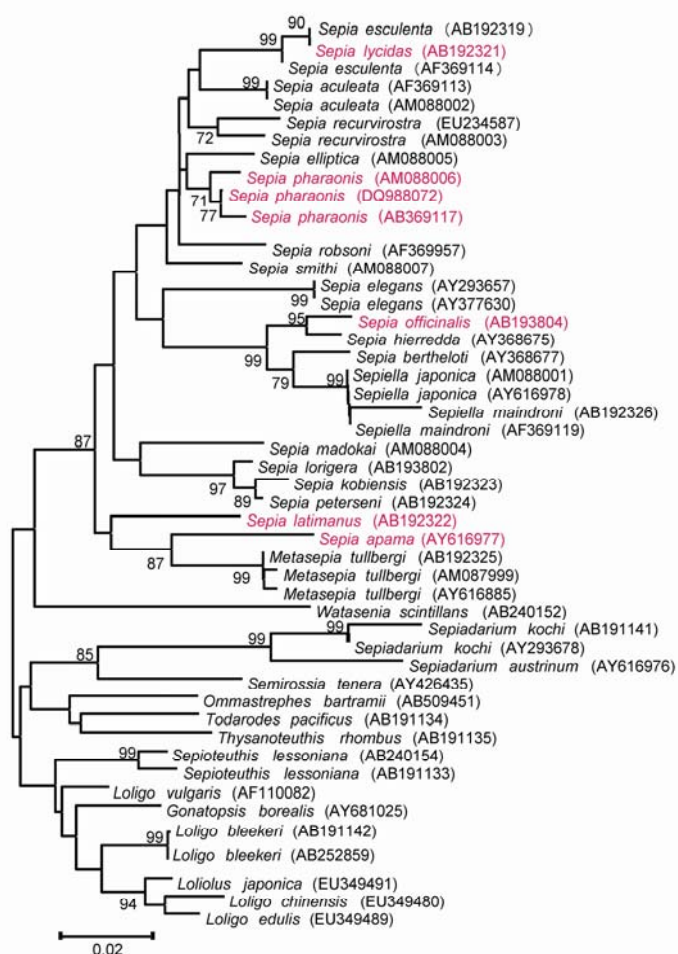


Fig.2 Phylogenetic tree among 34 cuttle fish and squid species based on the sequence of mitochondrial 16S rRNA gene (red characters: “mongo ika” species)
Bootstrap values >70% are reported on nodes of the tree (bootstrap replication = 1000).

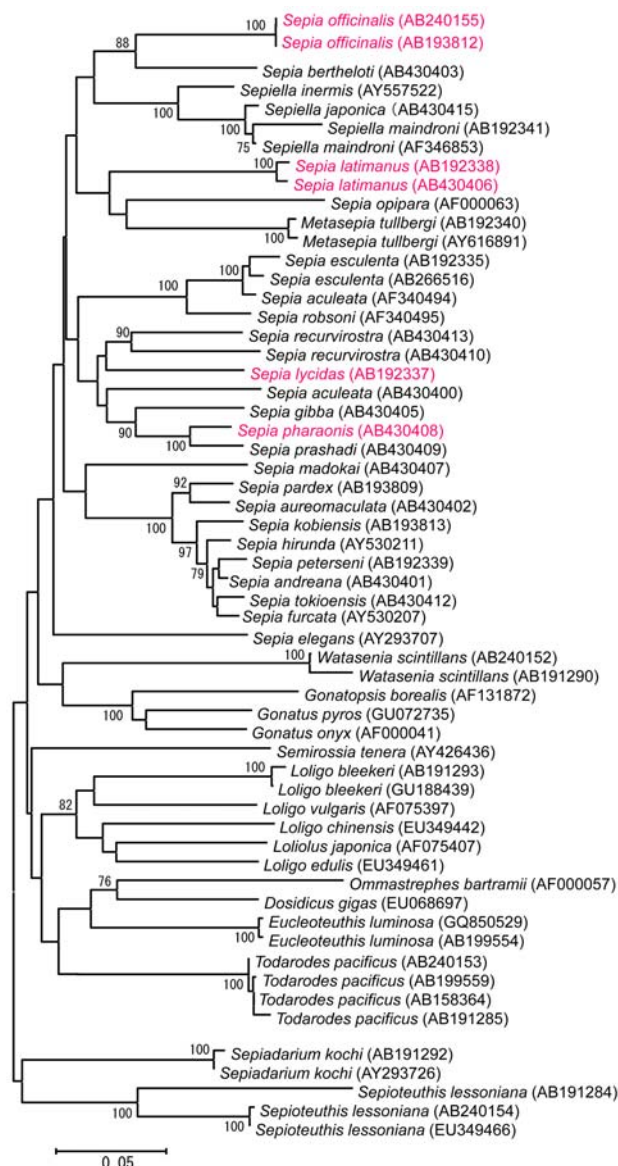


Fig.3 Phylogenetic tree among 45 cuttle fish and squid species based on the sequence of mitochondrial COI gene (red characters: “mongo ika” species)
Bootstrap values >70% are reported on nodes of the tree (bootstrap replication = 1000).

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、*Bsp*1286 I、*Bmg*T120 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。

もんごういかにの判別について、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該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

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に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、COI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に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で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、ダイレクトシーケ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。

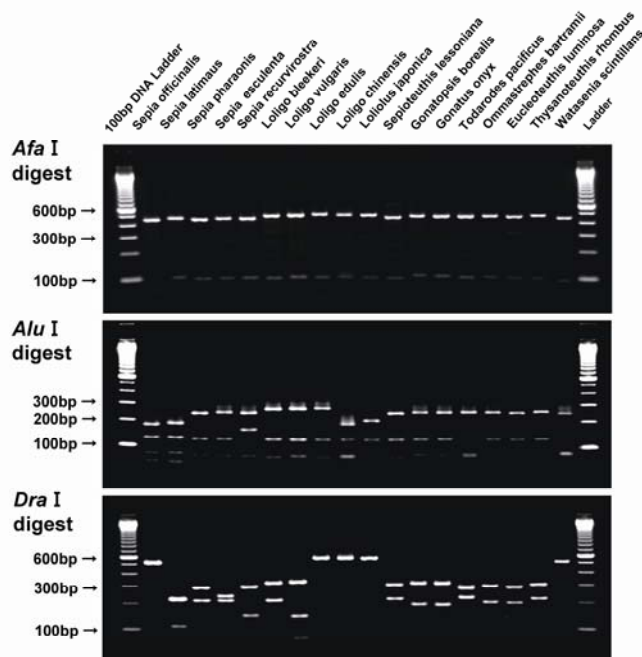


Fig.4 Fragment patterns observed in 18 cuttle fish and squid species after digestion of the 16S rRNA partial region PCR products with restriction enzymes

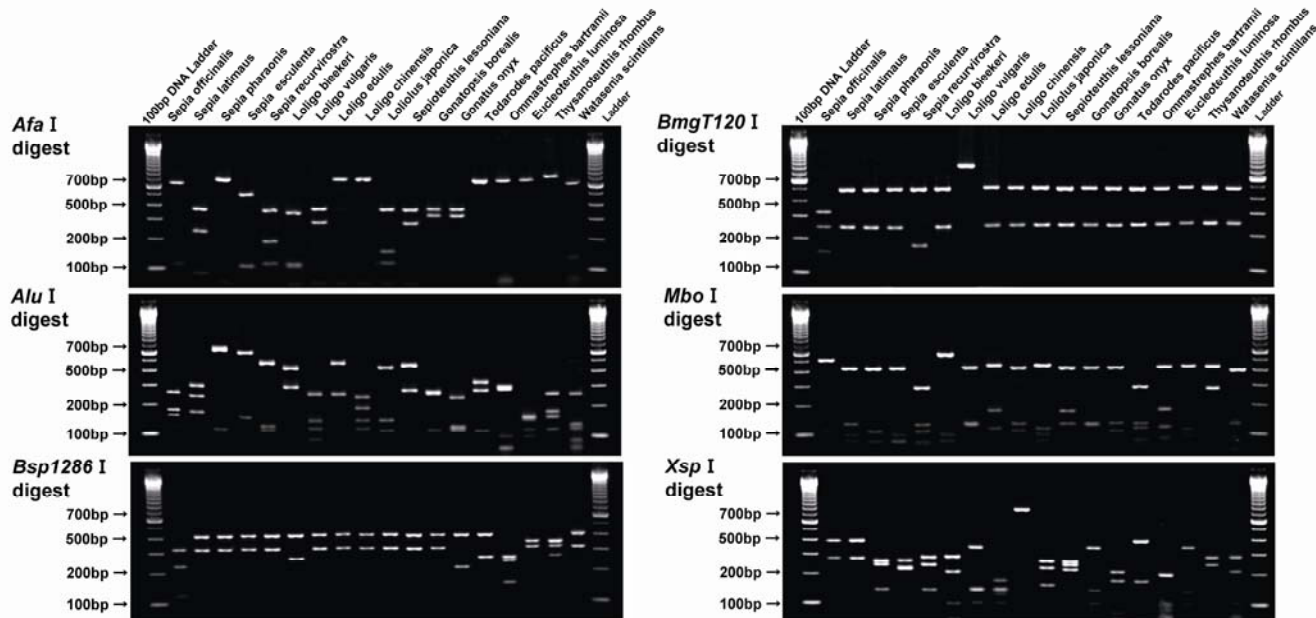


Fig.5 Fragment patterns observed in 18 cuttle fish and squid species after digestion of the partial COI region PCR products with restriction enzymes

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	110
<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 koiensis</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>Gonatopus 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>Watasenia 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		463 245
<i>Sepia lycidas</i>	709		362		121	113 113	414		157		93	464 245
<i>Sepia esculenta</i>	711	485				113 113	552		159			466 245
<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			463 245
<i>Sepia elegans</i>	707		361	279					150	121 117	108	463 129 115
<i>Sepia kobeensis</i>	707			233	128	121 113	335		177		117	463 244
<i>Sepia longera</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	117	463 244
<i>Sepia andreana</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	117	463 160
<i>Sepia prashadi</i>	708	640					591				117	463 245
<i>Sepia tenuipes</i>	708	595				113		255	177	159	117	309 245 154
<i>Sepia subtenuipes</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		249	155	134	124	463 244
<i>Sepia furcata</i>	707				233	128 121 113	512		117			463 244
<i>Sepia hirunda</i>	707				233	128 121 113	335		177		117	463 244
<i>Sepiella japonica</i>	708	595					327			123	117	463 245
<i>Sepiella inermis</i>	707		361	234			326		150		117	463 244
<i>Sepiella maindroni</i>	708	595					327			123	117	463 245
<i>Metasepia tullbergi</i>	707	482				113		182	156	134	97 93	707
<i>Sepiadarium kochi</i>	706		360	314			413		177		116	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				463 245
<i>Loliolus japonica</i>	709		362			158 121	414			150	118	468 241
<i>omastrephes bartamii</i>	711	619				92		296	281		96	465 265
<i>Todarodes pacificus</i>	708	616					318	273			117	463 245
<i>Eucleuthis luminosa</i>	709	617							159	157	150	98 468 241
<i>Dosidicus gigas</i>	708	616						255	177		117 96	463 245
<i>Gonatus oryx</i>	711		363	322				244		132	127 118	465 246
<i>Gonopsis borealis</i>	708		361	321			264	255			117	467 241
<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	711	671						256	178	159	118	465 246
<i>Watasenia scintillans</i>	703	574				129		254		132	118	459 244

Species	PCR	<i>Bmg</i> T120 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	98
<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 kobeensis</i>	707	395	312		483		122	313		190
<i>Sepia longera</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 andreana</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 subtenuipes</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	98
<i>Loligo vulgaris</i>	709	399	310		406	132	122	331		139 138 101
<i>Loligo edulis</i>	709	399	310		423	171	115		171	139 138 125 101
<i>Loligo chinensis</i>	709	399	310		406	132	104	709		
<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	708	396	312		407	174	127		255	237 216
<i>Loliolus japonica</i>	709	399	310		423		115 94	254	224	154
<i>omastrephes bartamii</i>	711			261 242 154	408	175	111		191	124 99 93
<i>Todarodes pacificus</i>	708	396	312			279 127	111	376		171
<i>Eucleuthis luminosa</i>	709	343	310		406		104 89	331		132 101
<i>Dosidicus gigas</i>	708	396	312		484	225	122 111	332		123 99 93
<i>Gonatus oryx</i>	711	397		216	408	128	104		207	175
<i>Gonopsis borealis</i>	708	399	309		406	132	122	330		139 101
<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	711	341		261	408	271			278	238
<i>Watasenia scintillans</i>	703	396	312		401	122			273	205 127 98

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

Species	PCR	Afa I		Alu I		Dra 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 kobeensis</i>	555	A	1	A	0	A	1
<i>Sepia lorigera</i>	554	A	1	A	0	D	1
<i>Sepia peterseni</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>Watasenia scintillans</i>	545	A	1	D	0	B	0

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

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

Dra 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	Afa I	Alu I	BspI286 I	BmgT120 I	Mbo I	Xsp I
<i>Sepia officinalis</i>	709	A 2 E 1	B 0	B 1	B 1	A 1	A 1
<i>Sepia latimanus</i>	711	B 2 D 2	A 1	A 1	A 2	A 1	A 1
<i>Sepia pharaonis</i>	708	A 1 C 2	A 1	A 1	A 1	D 1	A 1
<i>Sepia lycidas</i>	709	C 2 A 1	A 1	A 1	A 4	A 2	A 2
<i>Sepia esculenta</i>	711	D 3 C 1	A 1	A 1	A 1	E 1	A 1
<i>Sepia recurvirostra</i>	709	B 3 A 1	A 2	A 1	C 1	D 1	A 1
<i>Sepia aculeata</i>	708	C 3 Z 0	A 1	A 1	C 1	A 1	A 1
<i>Sepia roboni</i>	708	A 1 C 1	A 1	A 1	A 1	F 1	A 1
<i>Sepia elegans</i>	707	B 1 F 1	A 3	A 1	C 2	A 1	A 1
<i>Sepia kobeensis</i>	707	F 1 B 1	A 1	A 1	B 2	B 1	A 1
<i>Sepia lorigera</i>	707	C 1 B 3	A 1	A 1	A 3	B 2	A 1
<i>Sepia peterseni</i>	707	F 1 B 1	A 1	A 1	B 1	F 2	A 1
<i>Sepia paradox</i>	707	F 1 F 2	A 1	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	A 1
<i>Sepia aureomaculata</i>	708	C 1 B 1	Z 0	A 1	A 1	A 1	A 1
<i>Sepia bertheloti</i>	708	D 1 F 3	A 1	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	A 1
<i>Sepia madokai</i>	708	D 2 F 4	A 2	A 2	A 11	A 3	A 1
<i>Sepia prashadi</i>	708	A 1 C 2	A 1	A 1	A 1	D 1	A 1
<i>Sepia subtenipes</i>	708	A 1 B 4	A 1	A 1	A 3	E 2	A 1
<i>Sepia tokioensis</i>	708	F 2 B 1	A 1	A 1	D 0	B 1	A 1
<i>Sepia opipara</i>	707	F 3 E 2	A 1	A 1	A 1	A 1	A 1
<i>Sepia furcata</i>	707	F 1 C 2	A 1	A 2	B 1	B 1	A 1
<i>Sepia hirundo</i>	707	F 1 B 1	A 1	A 1	A 3	A 1	A 1
<i>Sepia japonica</i>	708	A 1 B 2	A 1	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	A 1
<i>Sepiella maindroni</i>	708	A 1 B 2	A 1	A 1	A 3	A 1	A 1
<i>Metasepia tullbergi</i>	707	D 1 F 5	Z 0	A 1	B 3	A 2	A 1
<i>Sepiadium kochi</i>	706	E 0 A 1	A 1	B 2	A 4	B 2	A 1
<i>Semiosquilla tenera</i>	707	A 2 D 3	A 1	C 0	A 1	A 1	A 1
<i>Loligo bleekeri</i>	707	C 1 A 2	A 1	A 2	D 0	E 3	A 1
<i>Loligo vulgaris</i>	709	B 1 E 3	Z 0	A 1	A 6	C 2	A 1
<i>Loligo edulis</i>	709	A 1 A 3	A 1	A 1	A 5	G 0	A 1
<i>Loligo chinensis</i>	709	A 1 E 4	A 1	A 1	A 2	Z 0	A 1
<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	708	B 1 A 2	A 1	A 1	A 7	E 4	A 1
<i>Lolololus japonica</i>	709	C 4 A 1	A 1	A 1	A 8	E 5	A 1
<i>ommatrophes bartamii</i>	711	A 2 D 1	A 1	C 0	A 5	D 2	A 1
<i>Todarodes pacificus</i>	708	A 1 D 1	A 1	A 1	C 1	B 1	A 1
<i>Eucoteuthis luminosa</i>	709	A 1 F 6	A 1	A 1	A 9	C 1	A 1
<i>Dosidicus gigas</i>	708	A 1 E 5	A 1	A 1	B 4	C 3	A 1
<i>Gonatus onyx</i>	711	E 0 E 6	A 1	A 3	A 2	D 3	A 1
<i>Gonatosia borealis</i>	708	E 0 E 7	A 1	A 1	A 2	C 1	A 1
<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	711	A 1 E 1	A 1	A 1	A 10	E 1	A 1
<i>Watasenia scintillans</i>	703	A 3 E 1	A 1	A 1	A 4	E 6	A 1

Afa I									
574 -671	467 -485	345 -363	314 -322	200 -279	158 -121	91 -115	パターン		
+							A	1	
+							A	2	
+							A	3	
		+					B	1	
		+					B	2	
		+					B	3	
		+					C	1	
		+					C	2	
		+					C	3	
		+					C	4	
	+						D	1	
	+						D	2	
	+						D	3	
							E	0	
		+					F	1	
							F	2	
							F	3	

BspI286 I									
707 -708	459 -467	309 -310	241 -247	154 -170	115 -129	パターン			
	+					A	1		
	+					A	2		
	+					A	3		
		+				B	0		
+						Z	0		

BmgT120 I									
341 -399	289 -313	251 -261	216 -242	154 -172	116	パターン			
+	+					A	1		
+		+				A	2		
+						A	3		
						B	1		
						B	2		
						C	0		

Mbo I									
533 -587	483 -484	401 -423	225 -279	171 -174	122 -130	94 -115	パターン		
	+						A	1	
	+						A	2	
	+						A	3	
	+						A	4	
							A	5	
							A	6	
							A	7	
							A	8	
							A	9	
							A	10	
							A	11	
	+						B	1	
	+						B	2	
	+						B	3	
	+						B	4	
							C	1	
							C	2	
+							D	0	

Alu I									
708	512 -591	413 -459	327 -387	273 -318	249 -255	171 -201	121 -159	96 -118	パターン
		+							A 1
		+							A 2
		+							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
									F 1
									F 2
									F 3
									F 4
									F 5
									F 6
+									Z 0

Xsp I									
709	452 -453	313 -378	255 -278	207 -237	154 -193	125 -139	93 -101	パターン	
		+	+						A 1
		+	+						A 2
		+	+						A 3
		+							B 1
		+							B 2
		+							C 1
		+							C 2
		+							C 3
									D 1
									D 2
									D 3
									E 1
									E 2
									E 3
									E 4
									E 5
									E 6
	+								F 1
	+								F 2
									G 0
+									Z 0

4. 要 約

関税率表第 03.07 項のいか類において、もんごういか 5 種を判別するために、DNA 分析法を用いた判別方法を検討した。ミトコンドリア DNA の 16S rRNA (16S) 遺伝子及び Cytochrome oxidase

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。

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