

DNA 解析による甲殻類の判別

市川 智一*, 桂 弘毅*, 菊地 大輔*, 石川 順一*, 村上 孝之*, 三枝 朋樹*

Identification of Crustaceans Using DNA Analysis

Toshikazu ICHIKAWA*, Hirotaka KATSURA*, Daisuke KIKUCHI*,
Junichi ISHIKAWA*, Takayuki MURAKAMI* and Tomoki SAEGUSA*

*Tokyo Customs Laboratory

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

In the Customs Tariff Schedule, crustaceans classified under Chapter 3 and Chapter 16 have different tariff rates depending on the biological species. In this study, we investigated the direct sequencing method using partial genetic regions encoding 16S-rRNA on mitochondrial DNA. As a result, as long as sufficient DNA is extracted and the appropriate primers are used, we confirmed that it is possible to determine the sequence of the DNA. When the resultant DNA sequence matches the sequence data registered in the DNA database, the sample is assumed to be from the corresponding species of crustacean.

1. 緒 言

関税率表において甲殻類は、生きているものなどは第 3 類に、その調製品は第 16 類に分類される。第 3 類に分類される甲殻類は、いせえび科のいせえび（パリヌルス属、パヌリルス属又はヤスス属のもの）、ロブスター（ホマルス属のもの）、シュリンプ及びブローン、かに、その他のもの（えび、その他のもの）で税番が分かれており、税率も異なる。また、第 16 類に分類される甲殻類の調製品も同様である。例えば、アミの塩辛として売られているものは、原料のアミと称するものの種類により税率が変わる。アミと称するものには、アキアミ、オキアミなどがある。オキアミはえびとは形態が異なるので、生物学上はえびではない甲殻類のオキアミ目に分類される。また、アキアミは名前にアミと付いているが、サクラエビ科のえびである。したがって、原料のアミがアキアミであれば「シュリンプ及びブローン」、オキアミなどのえび以外であれば「その他のもの」に分類され税率に差が生じる。そのため通関の際には、これらを区別する必要がある。むき身や加工品では、形態学的な特徴による判別が不可能であるが、DNA 解析は、そのような試料でもある程度の量と質の DNA を抽出でき、適切なプライマーを用いれば、塩基配列を決定でき、種の推定に利用できる。

今回、JENNIFER L.BRZEZINSKI が 2005 年に発表した論文¹⁾をもとに、ミトコンドリア DNA 上の 16S リボソーム RNA (16S-rRNA) をコードする遺伝子領域の後半の塩基配列を決定し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されている配列データと

比較することにより、えびとその他の甲殻類の判別が可能であるかどうか検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

甲殻類の試料は、市販品あるいは輸入品から 13 検体を用いた。いずれの検体も事前に生物学的な種の判別までは行っておらず、表示された名称で取引されていたものである。

2.2 分析装置及びプライマー

PCR 増幅装置	Gene Amp [®] PCR system9700 (Applied Biosystems)
DNA シークエンサー	ABI PRISM [®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
電気泳動装置	Mupid-exU ((株)アドバンス)
Forward プライマー ¹⁾	5'-TAAAGTCTGGCCTGCCCA-3'
Reverse プライマー ¹⁾	5'-GCTTTATAGGGTCTTATCGT-3'

2.3 実 験

各試料約 30 mg から DNeasy[®] Blood & Tissue KIT (QIAGEN) により DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA 上の 16S-rRNA をコードする遺伝子領域の一部を PCR 法で増幅した。PCR の反応溶液は、鋳型 DNA : 0.6 µl, プライマー各 5 pmol, dNTP mixture (25 nM

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海 2-7-11

each) : 2.0 µl, Ex-taq buffer : 2.0 µl, Ex-taq HS : 0.5 Unit, 滅菌水 : (合計 20.9 µl に調製) とした。PCR の反応条件は、熱変性 95°C (1 分) を行った後、95°C (15 秒)、50°C (30 秒)、72°C (30 秒) を 30 回繰り返した後、72°C (5 分) の伸長反応を行った。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 生成物をイソプロパノ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 Big Dye® Cycle Sequencing KIT Ver.3.1 添付のプロトコールに従い、Forward 鎖及び Reverse 鎖それぞれについてサイクルシーケンス反応を行った。

サイクルシーケンス反応後、エタノール沈殿法により未反応蛍光色素を除去し、DNA シークエンサーにより両鎖の塩基配列を読み取った。16S-rRNA の後半の塩基配列を決定し、DDBJ に登録されている塩基配列データと比較した。

3. 結果及び考察

PCR 法で増幅した生成物について、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。アミの塩辛を除くいずれの試料についても 200 bp 付近に DNA 断片の増幅を確認することができた。

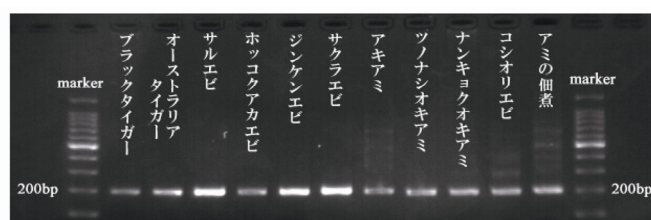


Fig.1 Electrophoresis of PCR products

次に各試料から得られた PCR 生成物の塩基配列を解析し、プライマー部分を除いた塩基配列を決定した。各試料の塩基配列と DDBJ に登録されている塩基配列のデータを比較した結果、Table 1 に示すように 13 検体中 8 検体が DDBJ に登録されている塩基配列のデータと 99%以上一致し、種の推定が可能であった。しかし、サルエビ、ジンケンエビ、サクラエビ、アキアミと称するものは、塩基配列は決定できたが、DDBJ に登録されている塩基配列データからは種の推定ができなかった。また、アミの塩辛については、今回の方法では DNA を増幅することができなかった。これは、アミの塩辛は自己消化酵素等により発酵させる製造工程の影響で DNA が分解されたためと考えられる。

Table 1 Results of DNA homology search on 16S-rRNA region partial sequence

試料名	Sample name	Assumed species from DDBJ	Rate of concordance with DDBJ(%)
ブラックタイガー	Black tiger prawn	<i>Penaeus monodon</i> (AF217843)	100
オーストラリアタイガー	Brown tiger prawn	<i>Penaeus esculentus</i> (AF279828)	99.4
サルエビ	Southern rough shrimp	—	—
ホッコクアカエビ	Northern shrimp	<i>Pandalus eous</i> (Delated)	100
ジンケンエビ	Jinken shrimp	—	—
サクラエビ	Sakura shrimp	—	—
アキアミ	Akiami paste shrimp	—	—
ツノナシオキアミ	Pacific krill	<i>Euphausia pacifica</i> (AF177176)	100
ナンキョクオキアミ	Antarctic krill	<i>Euphausia superba</i> (AB084378)	100
パナメイエビ	Pacific white shrimp	<i>Litopenaeus vannamei</i> (DQ534543)	100
コシオリエビ	Koshiori shrimp	<i>Gervimunida johni</i> (AY351244)	100
アミの佃煮	Ami boiled down in soy	<i>Euphausia pacifica</i> (AF177176)	100
アミの塩辛	Solted ami	—	—

4. 要 約

本研究では、ミトコンドリア DNA 上の 16S-rRNA をコードする遺伝子領域の一部の塩基配列を決定し、えびとその他の甲殻類

を判別することが可能であるかどうか検討した結果、DNA が分解されていないサンプルであれば、塩基配列を決定でき、DDBJ に登録されている塩基配列のデータに一致するものがあれば、甲殻類の種を推定することが可能であることを確認した。

文 献

- 1) JENNIFER L.BRZEZINSKI: *Journal of Food Protection*, **68**, 1866 (2005)