

DNA分析によるアジ科マアジ属及びムロアジ属の識別

福岡 翔平*, 市川 智一*, 桂 弘毅*, 柴田 正志*,
村上 孝之*, 笹谷 隆*, 山下 倫明**

Identification of *Carangidae Trachurus* and *Decapterus* with DNA analysis

Shohei FUKUOKA*, Toshikazu ICHIKAWA*, Hirotaka KATSURA*,
Masashi SHIBATA*, Takayuki MURAKAMI*, Takashi SASATANI*,
and Michiaki YAMASHITA**

*Tokyo Customs Laboratory

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

**National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency

2-12-4, Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-8648 Japan

Horse mackerel belonging to two genera in *Trachurus* spp. and *Decapterus* spp. is controlled by an Import Trade Control Order in Japan, so customs clearance must distinguish between the controlled horse mackerel species and other fish species. This study developed a PCR-based species identification method using the partial nucleotide sequences of the cytochrome b gene of mitochondrial DNA in *Trachurus* spp. and *Decapterus* spp. By homology analysis of the nucleotide sequence of the fish samples against known nucleotide sequences deposited in the DNA Databases, the fish species can be identified for various horse mackerel samples. Therefore, the direct sequencing method seems to be applicable for identifying the species in *Trachurus* and *Decapterus* from other fish species. In addition, we also developed four specific PCR-primer sets for species identification in *Trachurus* spp. and *Decapterus* spp. Eight fish species in *Trachurus* spp. and *Decapterus* spp. were discriminated from the other 10 species in Carangidae, and their related species were used for the analysis. We need to confirm whether this PCR-based method can be applied to all 26 species belonging to *Trachurus* and *Decapterus* in future.

1. 緒 言

関税率表において第3類に分類されるアジ科魚種のうち、マアジ属 (*Trachurus* spp.) 及びムロアジ属 (*Decapterus* spp.) については、輸入貿易管理令により、輸入が制限されている IQ 該当品目である。このため輸入通関に際しては、これらの属であるか否かの確認が必要である。

輸入時において完全な形態を保持した成魚であれば、形態学的な知見をもとにアジの種の識別が可能である。しかし、種識別のために必要な情報を有する部分が切除されている加工品や、形態上の情報が少ない稚魚などでは、目視による魚種の識別が困難である。このような場合、魚種の識別法として形態上の情報を必要としない DNA 分析が有効である。また、過去にも魚の属や種の特定を目的とした DNA 分析による識別法が報告されている^{1)~5)}。

そこで、マアジ属及びムロアジ属に属する魚種識別法を開発するため、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) において広範な魚種の塩基配列情報が登録されているミトコンドリア DNA の Cytochrome b 領域の前半部分を標的としたプライマーで、ダイレクトシーケンシング法によるアジの魚種識別を行い、その有効性を確認した。

また、DNA シーケンサーを配備していない税関でも分析できる手法として、Cytochrome b 領域の一部を増幅する新規プライマーを作成し、電気泳動法による属レベルの識別について検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

アジの成魚試料は、事前に形態学的な知見から魚種の検証が行

* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海 2-7-11

** (独)水産総合研究センター 中央水産研究所 〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-4

われたもの7属10種13検体、及び市販されている加工品など、事前に形態学的に魚種の特정이できていないもの6属11種17検体、計11属19種30検体を試料とした。

試料の名称及び原産地は、Table 1 及び Table 2 に示す。

Table 1 Morphologically identified samples

Japanese name	Scientific name	Origin
マアジ①	<i>Trachurus japonicus</i>	Misaki, Kanagawa
マアジ②	<i>Trachurus japonicus</i>	Shizuoka
マアジ③	<i>Trachurus japonicus</i>	Chiba
マルアジ①	<i>Decapterus maruadsi</i>	Misaki, Kanagawa
モロ①	<i>Decapterus macrosoma</i>	Misaki, Kanagawa
モロ②	<i>Decapterus macrosoma</i>	Misaki, Kanagawa
オアカムロ	<i>Decapterus tabl</i>	Izu, Shizuoka
イトヒキアジ	<i>Alectis ciliaris</i>	Misaki, Kanagawa
ナンヨウカイワリ	<i>Carangoides orthogrammus</i>	Misaki, Kanagawa
カイワリ	<i>Carangoides equula</i>	Misaki, Kanagawa
オニアジ	<i>Megalaspis cordyla</i>	Misaki, Kanagawa
メアジ	<i>Selar crumenophthalmus</i>	Misaki, Kanagawa
アイブリ	<i>Seriolina nigrofasciata</i>	Misaki, Kanagawa

Table 2 Samples that could not be identified from morphological observation

Trade name	Origin
マアジ④	Kanagawa
マアジ⑤	Yamaguchi
マアジ⑥	Hyogo
マアジ⑦	Korea
ニシマアジ①	Netherland
ニシマアジ②	Netherland
ミナミマアジ	Chili
ニューゼーランドマアジ	New Zealand
マルアジ②	Yamaguchi
マルアジ③	Yamaguchi
クサヤモロ	Niijima, Tokyo
シマアジ	Nagasaki
ホソヒラアジ①	Nagasaki
ホソヒラアジ②	Yamaguchi
オキアジ	Chiba
ブリ	Nagasaki
カンパチ	Kagoshima

2.2 分析装置

PCR 増幅装置	Gene Amp® PCR system9700 (Applied Biosystems 製)
DNA シークエンサー	ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems 製)
電気泳動装置	Mupid-exU (株)アドバンス製)

2.3 実験

2.3.1 ダイレクトシークエンス法による魚種識別

各試料約 30 mg から、DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社)により DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA 上の Cytochrome *b* をコードする遺伝子領域の前半部分を PCR 法で増幅した。PCR の反応溶液は、鋳型 DNA: 100 ng, プライマー (L14735⁶):5'-AACCACCGTTGTATTCAAC-3', H15149⁶):5'-GGTGGCKCCTCAGAAGGACATTGKCCTCA-3') 各 3 pmol, dNTP Mixture (25 mM each): 2.0 µl, 10×Ex-taq buffer: 2.0 µl, Ex-taq HS: 0.5 Unit, 滅菌水: (合計 20 µl に調製) とした。PCR の反応条件は、熱変性 95°C (1 分間) を行った後、94°C (30 秒間)、60°C

(30 秒間)、72°C (1 分間) を 30 回繰り返した後、72°C (5 分間) 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、5' 側及び 3' 側両方向分のサイクルシークエンス反応を行った。

サイクルシークエンス反応後、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、PCR 生成物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。

2.3.2 PCR 法によるマアジ属及びムロアジ属の識別

PCR 法による識別を行うため、DDBJ に登録されているアジ科魚種 64 種の Cytochrome *b* 領域の塩基配列を比較した。そして配列に対する特異性が高く⁷⁾、誤反応が起こる可能性が低いと考えられる PCR-RFLP 法による識別法を検討したが、適当な制限酵素切断部位を見つけることができなかったため、マアジ属及びムロアジ属の魚種のみで、増幅が可能となるようなプライマーの作成を行った。

マアジ属の魚種のみで増幅するプライマーの作成にあたり、20 塩基程度の長さにより配列がマアジ属では共通しており、他の属の魚種では一部以上が異なっている部分を見出した。このような部分に基づいて、マアジ属識別用のプライマーを作成した。同様に、ムロアジ属識別用のプライマーも作成した。

こうしたプライマーを 36 種作成し、プライマーの組み合わせを検討した結果、今回実験を行った魚種に限れば、マアジ属及びムロアジ属それぞれの魚種のみで、DNA 断片が増幅するプライマーセットを 2 組ずつ見出した。

各プライマーセットの名称、配列及び PCR 法の反応条件については、Table 3 及び Table 4 に示す。

Table 3 Primer sets used for the species identification by PCR

Name	Direction	Sequences (From 5' to 3')
<i>Trachurus</i> -1	Forward	AACATCTCAGCATGATGAACTTCGGCTC
	Reverse	TGAAGGTAAATGCAAATGAAAAGAAGGAG
<i>Trachurus</i> -2	Forward	CACAGCCCTCGCCGCCCTCGCA
	Reverse	AAGAAGGAAGTAGAGGACGGAAG
<i>Decapterus</i> -1	Forward	CTCTTCTCCCTAACCTGCTTGG
	Reverse	GACTAGGATTGAAAACAGGAGGGCCAA
<i>Decapterus</i> -2	Forward	CGTCCCTACGTAGGAAACACCC
	Reverse	GACTAGGATTGAAAACAGGAGGGCCAA

Table 4 PCR conditions for each primer set

Name	PCR condition
<i>Trachurus</i> -1	95°C 1min→(94°C 30sec→60°C 30sec→72°C 1min) 30cycles→72°C 5min
<i>Trachurus</i> -2	95°C 1min→(94°C 30sec→63°C 30sec→72°C 1min) 30cycles→72°C 5min
<i>Decapterus</i> -1	95°C 1min→(94°C 30sec→60°C 30sec→72°C 1min) 30cycles→72°C 5min
<i>Decapterus</i> -2	95°C 1min→(94°C 30sec→62°C 30sec→72°C 1min) 30cycles→72°C 5min

PCR の反応溶液の組成は、プライマーを除いて前記 2.3.1 と同様とし、PCR 反応を行ったのちに電気泳動法により増幅確認を行

った。

なお、この実験では、形態学的に魚種が特定された試料、及び形態学的に魚種の特정이できていないが DDBJ の登録データと高い一致率を示した試料、計 18 種を試料とした。

3. 結果及び考察

3.1 ダイレクトシーケンス法による魚種識別

3.1.1 電気泳動法による DNA の増幅確認

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。すべての試料について 500 bp 付近に DNA 断片の増幅を確認した。

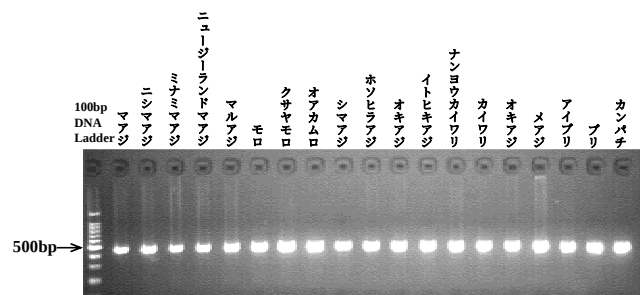


Fig.1 Electrophoresis of PCR products of 19 species of horse mackerel by the primer set of L14735 and H15149

3.1.2 ダイレクトシーケンス法による塩基配列の解析

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。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。その結果を、Table 5 に示す。

Table 5 Identity against the known sequence in the DDBJ Database (%)

	Japanese name/Trade name	Scientific name	Accession No.	Rate of corresponding with DDBJ(%)
Identified by morphology	マアジ①	<i>Trachurus japonicus</i>	AP003092	99.7
	マアジ②	<i>Trachurus japonicus</i>	AP003091	99.7
	マアジ③	<i>Trachurus japonicus</i>	AP003091	100
	マルアジ①	<i>Decapterus maruadsi</i>	EF512291	100
	モロ①	<i>Decapterus macrosoma</i>	AB374073	100
	モロ②	<i>Decapterus macrosoma</i>	AB374073	100
	オアカムロ	<i>Decapterus tabl</i>	AB374074	99.0
	イトヒキアジ	<i>Alectis ciliaris</i>	AF363739	100
	ナンヨウカイワリ	<i>Carangoides orthogrammu</i>	—†	—†
	カイワリ	<i>Carangoides equula</i>	—†	—†
	オニアジ	<i>Megalaspis cordyla</i>	—†	—†
	メアジ	<i>Selar crumenophthalmus</i>	AY050731	99.7
	アイブリ	<i>Seriola nigrofasciata</i>	EF512298	99.7
	マアジ④	<i>Trachurus japonicus</i>	AP003091	99.7
Not identified by morphology	マアジ⑤	<i>Trachurus japonicus</i>	AP003092	100
	マアジ⑥	<i>Trachurus japonicus</i>	AP003091	100
	マアジ⑦	<i>Trachurus japonicus</i>	AP003091	99.7
	ニシマアジ①	<i>Trachurus trachurus</i>	EU492279	100
	ニシマアジ②	<i>Trachurus trachurus</i>	EU492279	100
	ミナミアジ	<i>Trachurus declivis</i>	AY526543	99.4
	ニューゼalandマアジ	<i>Trachurus novaezelandiae</i>	AY526545	99.1
	マルアジ②	<i>Decapterus maruadsi</i>	EF512291	100
	マルアジ③	<i>Decapterus maruadsi</i>	EF512291	100
	クサヤモロ	<i>Decapterus macarellus</i>	AB374076	99.4
	シマアジ	<i>Pseudocaranx dentex</i>	AB326980	99.1
	ホソヒラアジ①	<i>Selaroides leptolepis</i>	EF512296	99.1
	ホソヒラアジ②	<i>Selaroides leptolepis</i>	AY050718	100
	オキアジ	<i>Uraspis helvola</i>	—†	—†
	プリ	<i>Seriola quinqueradiata</i>	AB326982	100
	カンパチ	<i>Seriola dumerili</i>	EU036499	99.7

† No corresponding data

形態学的に識別された試料 10 種中、7 種の塩基配列データが DDBJ に登録されており、その 7 種 10 検体の塩基配列と DDBJ に登録されている塩基配列データとの一致率は 99.0~100%であり、形態学的に特定された魚種と一致し、種の識別が可能であった。ここで、99.0%以上の一致率を採用したのは、食品衛生法の規制を受けるフグの鑑別方法の判定基準を参考とした⁸⁾。しかし、ナンヨウカイワリ、カイワリ及びオニアジについて塩基配列は決定できたが、DDBJ に塩基配列の登録データがないため、種の識別ができなかった。以上のことから、ダイレクトシーケンス法は、DDBJ にその種の塩基配列が登録されているものについては、有

効であることが確認できた。

形態学的な識別ができていない試料については、試料 17 検体中 16 検体で DDBJ の登録データと高い一致率を示し、種の特정이可能であった。しかし、オキアジと称するものについては、塩基配列は決定できたが、DDBJ に塩基配列の登録データがないため、種の識別ができなかった。

なお、決定した各試料の塩基配列及び Table 5 に示した DDBJ 登録データについて、分子系統解析を行った結果を Fig.2 に示す。この解析の結果、マアジ属及びムロアジ属は、それぞれ独立したクラスターを形成した。

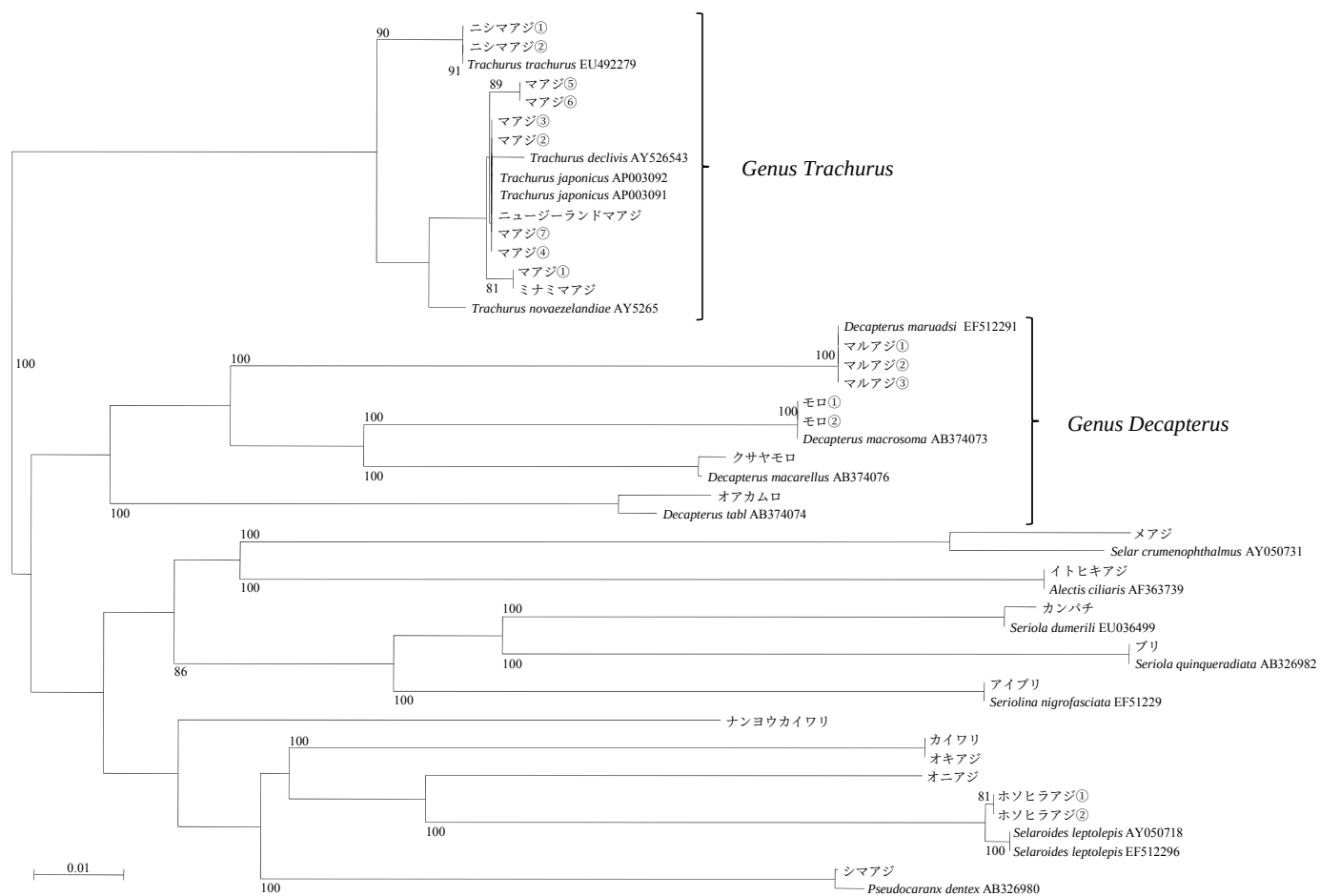


Fig.2 Neighbor-joining tree derived from analysis among 30 samples of horse mackerel and DDBJ data based on the partial sequences of mitochondrial cytochrome *b* gene. Bootstrap values > 70% bootstrap support values (1000 replicates)
(Japanese name indicates the sequence of samples used in this study, and alphabetical name indicates the sequence that was downloaded from DDBJ.)

3.2 PCR 法によるマアジ属及びムロアジ属の識別

3.2.1 マアジ属

Trachurus-1 のプライマーセットでは 200 bp 付近、*Trachurus* -2 のプライマーセットでは 400 bp 付近にマアジ属の魚種のみで DNA 断片の増幅を確認した (Fig.3,4)。

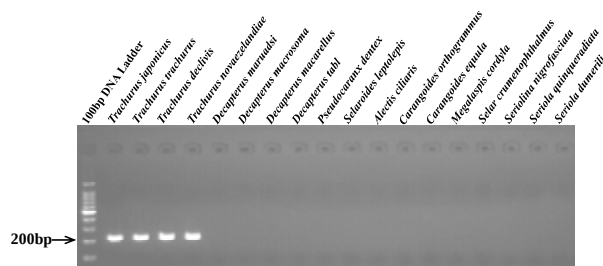


Fig.3 Electrophoresis of PCR products of 18 species of horse mackerel by the primer set of *Trachurus*-1

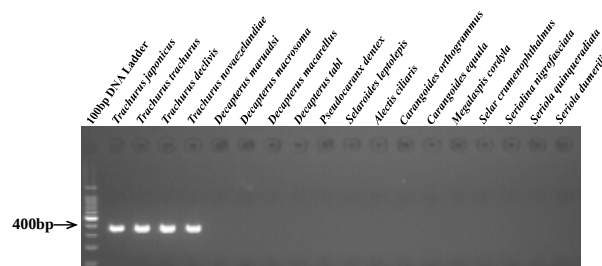


Fig.4 Electrophoresis of PCR products of 18 species of horse mackerel by the primer set of *Trachurus*-2

3.2.2 ムロアジ属

Decapterus-1 のプライマーセットでは 200 bp 付近、*Decapterus* -2 のプライマーセットでは 500 bp 付近にムロアジ属の魚種のみで DNA 断片の増幅を確認した (Fig.5,6)。

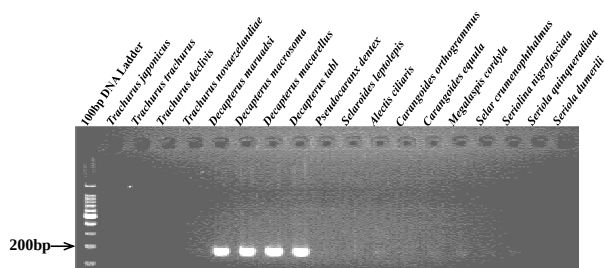


Fig.5 Electrophoresis of PCR products of 18 species of horse mackerel by the primer set of *Decapterus*-1

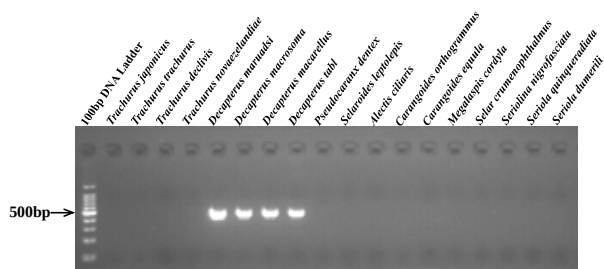


Fig.6 Electrophoresis of PCR products of 18 species of horse mackerel by the primer set of *Decapterus*-2

3.2.3 考 察

今回設計したプライマーを用いた PCR 法では、収集した試料に限れば、マアジ属またはムロアジ属の魚種のみで DNA 断片が増幅するという結果が得られた。今後は、マアジ属またはムロアジ属の全 26 種についても試料を入手し、本手法の適用の可否を明らかにする必要がある。

4. 要 約

本研究では、マアジ属及びムロアジ属の魚種を識別するために、ミトコンドリア DNA 上の Cytochrome *b* をコードする遺伝子領域の一部を用い、ダイレクトシーケンス法及び PCR 法による識別法の検討を行った。その結果は以下のとおりである。

- ① ダイレクトシーケンス法では、DDBJ に塩基配列が登録されているアジ科魚種の識別が可能であることを確認した。
- ② 今回設計したプライマーを用いた PCR 法では、収集した試料に限れば、マアジ属またはムロアジ属の魚種のみで DNA 断片が増幅するという結果が得られた。

(謝 辞)

本研究にあたって、魚種の形態識別を行って頂いた、おさかな普及センター資料館の坂本一男館長に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 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).
- 2) 桂弘毅, 八木潤, 石川順一, 村上孝之, 寺内豊, 松崎隆一: 関税中央分析所報, **49**, 5 (2009).
- 3) 片山貴之, 三浦徹, 三枝朋樹: 関税中央分析所報, **49**, 21 (2009).
- 4) 河嶋優美, 片山貴之, 山崎幸彦: 関税中央分析所報, **50**, 5 (2010).
- 5) Yasuharu Takashima, Takami Morita and Michiaki Yamashita: Fisheries Sci., **72**, 1054 (2006).
- 6) Miya M., and Nishida M.: Mol. Phylogenet., E vol. **17**, 437 (2000).
- 7) Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter: 細胞の分子生物学第 5 版, P.533(2010), (NEWTON PRESS).
- 8) 農林水産省医薬食品局食品安全部監視安全課/魚類乾製品等のフグ混入検査について (食安輸発第 0425005 号).