

## ミトコンドリアDNA解析によるイカのIQ該非の判別（第2報）

竹元 賢治\*，小川 竜平\*，長岐 潤弥\*，柴田 正志\*，笹谷 隆\*

### Identification of whether cuttlefish and squids require import quotas or not by mitochondrial DNA analysis – Part II

Kenji TAKEMOTO\*, Ryohei OGAWA\*, Junya NAGAKI\*, Masashi SHIBATA\*

\*Tokyo Customs Laboratory

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

In the Customs Tariff Schedule, Decabrachia (cuttlefish and squids) classified under heading 03.07 are all controlled by an import trade control ordinance except the so-called "mongo ika" cuttlefish; that is, *Sepia officinalis*, *S. pharaonis*, *S. lycidas*, *S. latimanus* and *S. apama*. Therefore, it is necessary to differentiate species of "mongo ika" from all other cuttlefish and squids. In this study, we determined the partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal RNA (*16SrRNA*) and cytochrome c oxidase subunit 1 (*COI*) genes of *Sepia apama*, and analyzed phylogenetic relationships based on the sequences of *16SrRNA* and *COI* for 35 Sepiida species including five species of "mongo ika" cuttlefish and two Teuthida species. Consequently, this study makes it possible to estimate whether importation of a sample requires an import quota or not. In addition, we investigated several methods of extracting DNA of cuttlefish and squids. As a result, we found that the alkaline lysis method is time-saving, economical, and suitable for many specimens for the preparation of PCR-quality Decabrachia genomic DNA without organic solvents, such as phenol and chloroform.

### 1. 緒 言

関税率表において、イカは、加熱又は調味が十分になされたものは第 16.05 項に、不十分なものは第 03.07 項に分類される。第 03.07 項に分類されるイカのうち、輸入割当 (Import Quota, 以下 IQ) 該当のものは、「もんごういか」と称されるコウイカ属の 5 種 (ヨーロッパコウイカ *Sepia officinalis*、トラフコウイカ *S. pharaonis*、カミナリイカ *S. lycidas*、コブシメ *S. latimanus* 及びオーストラリアコウイカ *S. apama*) のみであり、これらを除く全てのイカが IQ に該当し、輸入貿易管理令によって輸入が規制されている。従って、IQ か否かを判断するためには、コウイカ属 5 種とその他のイカを判別する必要がある。

輸入時に完全な形態を保持したイカであれば、形態学的な知見をもとにイカの IQ 該非を判別することが可能である。しかし、切り身やボイル品等の加工品及び形態上の情報が少ない稚イカ等については、その種を目視で判別することは容易ではない。このような試料の IQ 該非を判別するためには、形態上の情報を必要としないDNA情報を利用した判別方法が有効である<sup>1)-4)</sup>。

前報において筆者らは、ミトコンドリア DNA の 16S ribosomal RNA 遺伝子 (以下 *16SrRNA* 遺伝子) 及び Cytochrome c oxidase subunit 1 遺伝子 (以下 *COI* 遺伝子) の二つの領域を用いてダイレクトシーケンス法によりイカ類の IQ 該非の判別を試みた<sup>1)</sup>。ま

た、高野らは、ミトコンドリア DNA の *16SrRNA* 及び *COI* 遺伝子の二つの領域を用いて分子系統解析を行い、イカ類の IQ 該非の判別を行った。しかし、これらの研究では、もんごういか 5 種のうち、オーストラリアコウイカの試料入手できなかったために、未知試料で、その塩基配列が国際 DNA データベースに登録されていないものについて IQ 該非を判別することは容易ではなかった。また、イカから DNA を抽出するために一般的に使用されている市販の DNA 抽出キットは高価であり、多検体の分析には適していない。さらに、イカの IQ 該非を判別するためには、ミトコンドリア DNA の *16SrRNA* 及び *COI* 遺伝子の部分領域が適していることが示唆されている<sup>1)-2)</sup>が、二つの領域を使うべきか、又は一方の領域のみで十分かの検証は行われていない。

本研究では、DNA 抽出キット、フェノール・クロロホルム法、プロティナーゼ K 法、アルカリ溶解法及びボイリング法といった DNA の抽出法について比較・検討し、安価かつ迅速・簡便で多検体の分析に適したイカの DNA の抽出法を確立することを目的とした。また、イカの IQ 該非を判別するために、*16SrRNA* 及び *COI* 遺伝子の二つの領域を使うべきか、又は一方の領域のみで十分かについて、新たに入手したオーストラリアコウイカを含む IQ 非該当のイカ 5 種及び IQ 該当のイカ、更に国際 DNA データベースに登録されているイカの塩基配列データを加えて分子系統解析を用いて検討した。

\* 東京税関業務部 〒135-8615 東京都江東区青海 2-7-11

## 2. 実験

### 2.1 試料

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、ヒヨウモンコウイカ *S. pardex* 及びシリヤケイカ *Sepiella japonica* は、大阪大学大学院古谷秀隆准教授から、オーストラリアコウイカは、アデレード大学菅野雄耶氏から提供されたものを

標準品として使用した。アジアコウイカ *S. recurvirostra* は、市場で購入した試料を使用した。また、標準品以外のイカの塩基配列データは、国際DNAデータベースに登録されているものを用いた。標準品の種及び産地をTable 1に、国際DNAデータベースに登録されているイカのうち、使用した種及びミトコンドリアDNAの領域をTable 2に示す。

Table 1 Collected cuttlefish and squid species used for molecular analyses

Order	Family	species	origin
Sepiida	Sepiidae	<i>Sepia officinalis</i>	Morocco
		<i>Sepia pharaonis</i>	Taichung, Taiwan
		<i>Sepia lycidas</i>	Hachimanham, Ehime, Japan
		<i>Sepia latimanus</i>	Itoman, Okinawa, Japan
		<i>Sepia apama</i>	Gulf St Vincent, Australia
		<i>Sepia recurvirostra</i>	Malaysia
		<i>Sepia pardex</i>	Yawatahama, Ehime, Japan
		<i>Sepiella japonica</i>	Osaka, Japan

Table 2 Genbank accession numbers of specimens used in this study

Order	Family	species	DDBJ Accession No.	
			16S rRNA	CO1
Sepiida	Sepiidae	<i>Sepia officinalis</i>	AB193804	AB193812
		<i>Sepia pharaonis</i>	AB240155	AB240155
			AM088006	AB430408
			DQ988072	HM164489
				HM164494
				HM164504
		<i>Sepia lycidas</i>	AB675087	AB675088
			HQ846020	HQ846109
		<i>Sepia latimanus</i>	AB192322	AB192338
				AB430406
		<i>Sepia apama</i>	AB675086	AB675092
			AY616977	
		<i>Sepia recurvirostra</i>	AM088003	AB430410
			HQ846001	AB430413
				HQ846092
		<i>Sepia pardex</i>	AB193801	AB193809
		<i>Sepia aculeata</i>	AM088002	AB430400
			HQ846017	HQ846083
		<i>Sepia andreana</i>	—	AB430401
		<i>Sepia aureomaculata</i>	—	AB430402
		<i>Sepia bertheloti</i>	—	AB430403
		<i>Sepia elegans</i>	—	AB430404
		<i>Sepia elliptica</i>	AM088005	—
		<i>Sepia esculenta</i>	AB192319	AB192335
			HQ845995	AB266516
		<i>Sepia furcata</i>	—	AY530207
		<i>Sepia gibba</i>	—	AB430405
		<i>Sepia hierredda</i>	AY368675	AJ583492
		<i>Sepia hirunda</i>	—	AY530211
		<i>Sepia kobiensis</i>	AB192323	AB193813
		<i>Sepia lorigera</i>	AB193802	AB193810
		<i>Sepia madokai</i>	AM088004	AB430407
		<i>Sepia opipara</i>	—	AF000063
		<i>Sepia orbigniana</i>	X79578	—
		<i>Sepia papuensis</i>	—	X79586
		<i>Sepia peterseni</i>	AB192324	AB192339
		<i>Sepia prashadi</i>	—	AB430409
		<i>Sepia ramani</i>	—	HM164530
		<i>Sepia robsoni</i>	—	AF350495
		<i>Sepia smithi</i>	AM088007	—
		<i>Sepia tenuipes</i>	—	AB430411
		<i>Sepia tokioensis</i>	—	AB430412
		<i>Metasepia tullbergi</i>	AB192325	AB192340
		<i>Sepiella japonica</i>	AB675082	AB675082
			AM088001	AB430415
			AY616978	
		<i>Sepiella maindroni</i>	AB192326	AB192341
		<i>Sepiella inermis</i>	EU735190	AY557522
Teuthida	Ommastrephidae Loliginidae	<i>Todarodes pacificus</i>	AB191134	AB191285
		<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	AB191133	AB191284

## 2.2 主な試薬及び装置

DNA 抽出キット	: DNeasy Blood & Tissue Kit ( QIAGEN, Hilden, Germany )
プロティナーゼ K	: Proteinase K( 27 units/mg, Wako, Osaka, Japan )
加熱機能付き振とう器	: Thermomixer comfort 1.5ml( Eppendorf Japan, Tokyo, Japan )
PCR 増幅装置	: Gene Amp PCR System9700 ( Applied Biosystems, Foster City, CA, USA )
塩基配列解析装置	: 3130xl Genetic Analyzer ( Applied Biosystems, Foster City, CA, USA )
冷却遠心機及びローター	: MX-301、TMA-300 ( Tomy Seiko Co., Ltd., Tokyo, Japan )

### プライマー :

#### *16SrRNA* 領域<sup>5)</sup>

16S-L (5'-CGCCTGTTATCAAAAACAT-3')  
 16S-H (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3')  
*CO1* 領域<sup>6)</sup>  
 CO1-L (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')  
 CO1-H (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')

## 2.3 実験方法

### 2.3.1 DNA の抽出法の検討

DNA 抽出キット、フェノール・クロロホルム法、プロティナーゼ K 法、アルカリ溶解法及びボイリング法を用いて標準品のアジアコウイカから DNA を抽出し、2.0%アガロースゲル電気泳動により、その DNA の塩基長及び濃度分布を比較した。また、各方法で抽出した DNA 溶液について、*16SrRNA* 遺伝子部分領域と比較して、より長い塩基長の増幅が必要な *CO1* 遺伝子部分領域を PCR 増幅し、アガロースゲル電気泳動で分離することにより、目的の DNA 断片が得られているか確認した。これらの結果から、多検体の分析に適したイカの DNA の抽出法を検討した。(1)～(5)に各 DNA の抽出法を示す。

#### (1) DNA 抽出キットによる方法

検体の筋肉組織約 20 mg を眼科用ハサミで細かく裁断した後、DNA 抽出キットに添付のプロトコールに従い DNA を抽出した。抽出した DNA 溶液は、4°C で保存した。

#### (2) フェノール・クロロホルム法<sup>7)</sup>

検体の筋肉組織約 20 mg を眼科用ハサミで細かく裁断した後、抽出緩衝液 100 μl ( pH 6.8 の 50 mM Tris-HCl 緩衝液中にプロティナーゼ K 500 μg/ml、1 mM EDTA、20 mM NaCl 及び 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む) 中で、加熱機能付き振とう器を用いて 1400 rpm、56°C で 1 時間以上溶解した。溶解後、100 μl の 0.5M Tris-HCl ( pH 8.0 ) 飽和フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール ( 以下、PCI 溶液という。 ) を加え、完全に混合するまで緩やかに転倒混和した。15000 rpm、20°C で 5 分間遠心分離後、その上層を新しいチューブに移し、再度 100 μl の PCI 溶液を加え、完全に混合するまで緩やかに転倒混和し、15000 rpm、20°C で 5 分間遠心分離後、その上層を新しいチューブに移した。10 μl ( 1/10

容 ) の 3M 酢酸ナトリウム溶液及び 200 μl ( 2 容 ) のエタノールを加え転倒混和し、常温で約 10 分間放置後、15000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離し、上清を完全に捨てた。上清を捨てたチューブに 100 μl の 70% エタノールを加え、混合し、15000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離後、上清を完全に捨てた。上清を捨てたチューブに再度 100 μl の 70% エタノールを加え、同様に混合、遠心分離を行い、上清を完全に捨てた。これを 50 μl の 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl ( pH 8.0 ) 緩衝液に溶解し、4°C で保存した。

#### (3) プロティナーゼ K 法<sup>8)</sup>

検体の筋肉組織約 10 mg を眼科用ハサミで細かく裁断した後、抽出緩衝液 ( pH 6.8 の 50 mM Tris-HCl 緩衝液中に Proteinase K 500 μg/ml、1 mM EDTA、20 mM NaCl 及び 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む ) 100 μl 中で、加熱機能付き振とう器を用いて 1400 rpm、56°C で 1 時間以上溶解した。溶解液を 94°C で 10 分間加熱し、14000 rpm、20°C で 15 分間遠心分離後、その上清を 4°C で保存した。

#### (4) アルカリ溶解法<sup>9)</sup>

検体の筋肉組織約 10 mg を眼科用ハサミで細かく裁断した後、アルカリ溶解液 75 μl ( pH 12.0 の 25 mM NaOH 中に 0.2 mM EDTA を含む ) 中で、加熱機能付き振とう器を用いて 1400 rpm、95°C で 1 時間溶解した。溶解液に 75 μl の 40 mM Tris-HCl ( pH 5.5 ) を加え混合し、4000 rpm、20°C で 3 分間遠心分離後、その上清を 4°C で保存した。

#### (5) ボイリング法<sup>10)</sup>

検体の筋肉組織約 10 mg を眼科用ハサミで細かく裁断した後、滅菌水 75 μl 中で、加熱機能付き振とう器を用いて 1400 rpm、99°C で 15 分間加熱した。4000 rpm、20°C で 3 分間遠心分離後、その上清を 4°C で保存した。

### 2.3.2 *16SrRNA* 及び *CO1* 遺伝子領域の分子系統解析

#### (1) PCR 増幅

Table 1 に示した標準品について、ミトコンドリア DNA の *16SrRNA* 及び *CO1* 遺伝子部分領域を PCR 法により増幅した。PCR 反応溶液は、Ex Taq polymerase ( Takara Bio, Otsu, Japan ) 添付のプロトコールに従い、各抽出法で得られた DNA 溶液 0.5 μl、各プライマー ( 5 μM ) 1.0 μl を用いて総容量 20 μl に調製した。調製した溶液を、PCR 増幅装置により、予備変性 ( 94°C、2 分間 ) した後、変性 ( 94°C、20 秒間 )、アニーリング ( 45°C 又は 50°C、20 秒間 ) 及び伸長反応 ( 72°C、1 分間 ) を 30 サイクル行い、最後に 72 °C で 5 分間の伸長反応を行った。

#### (2) 塩基配列の決定

PCR 増幅した溶液に 3.0 μl の 5M NaCl 溶液を加え、さらに 22 μl の滅菌水及び 50 μl のイソプロピルアルコールを加え転倒混和した。この溶液を 15000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を完全に捨てた。DNA を含むマイクロチューブに 90 μl の 70% エタノール (-20°C) を加え、混合し、15000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した後、上清を完全に捨てて DNA の沈殿を得た。これを 20 μl の 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 ( pH 7.5 ) に溶解した。以上の手順で精製された DNA 溶液を、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Ready Reaction Kit ( Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA)添付のプロトコールに従って、各プライマーを用いてサイクルシークエンス反応させ、塩基配列解析装置により、H鎖及びL鎖の塩基配列を決定した。塩基長は、*16S rRNA* 遺伝子部分領域のPCR産物が545–551 bp、*COI* 遺伝子部分領域のPCR産物が708–709 bpであった。

### (3) 分子系統解析

Table 1に示した標準品8検体の*16S rRNA* 遺伝子の部分塩基配列に、Table 2に示したコウイカ属のイカ21種及び外群としてツツイカ目のイカ2種の*16S rRNA* 遺伝子の部分塩基配列を加えて、Clustal X ver.2.1<sup>11)</sup>でアライメントを行った。アライメント後の420塩基をClustal W ver.2.1<sup>12)</sup>を用いて近隣結合法により分子系統解析を行った。

また、Table 1に示した標準品8検体の*COI* 遺伝子の部分塩基配列に、Table 2に示したコウイカ属のイカ32種及び外群としてツツイカ目のイカ2種の*COI* 遺伝子の部分塩基配列を加えて、Clustal X ver.2.1<sup>11)</sup>でアライメントを行った。アライメント後の610塩基をClustal W ver.2.1<sup>12)</sup>を用いて近隣結合法により分子系統解析を行った。

これらの分子系統解析を行うにあたり、塩基配列の種内変異について考慮するため、コウイカ目のイカについては、可能な限り種ごとに複数の塩基配列データを使用した。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 DNAの抽出法の比較・検討

DNA抽出キット、フェノール・クロロホルム法、プロティナーゼK法、アルカリ溶解法及びボイリング法を用いてDNAを抽出し、2.0%アガロースゲル電気泳動で分離した結果をFig. 1に示す。その結果、いずれの抽出法を用いてもDNAバンドを確認することができたが、その塩基長及び濃度分布に差異が見られた。抽出したDNA鎖が最も長く、かつ最も高い濃度で得られたのは、DNA抽出キットを用いた方法であった。

次に、各抽出法で得られたDNA溶液をテンプレートにして、*COI* 遺伝子部分領域をPCR增幅し、2.5%アガロースゲル電気泳動で分離した結果をFig. 2に示す。全ての抽出法のPCR産物について、DNAバンドを確認することができたが、ボイリング法のPCR産物は、増幅効率が悪かった。フェノール・クロロホルム法、プロティナーゼK法及びアルカリ溶解法では、高価なDNA抽出キットを使用せずにDNAの抽出をするという目的を達することができた。これらの方のうち、フェノール・クロロホルム法は、有機溶媒を使用し、かつ実験操作が煩雑である。プロティナーゼK法とアルカリ溶解法は、共に有機溶媒を使用しない方法だが、アルカリ溶解法は、高価な酵素を使用しないため、プロティナーゼK法よりも実験操作が簡単で、かつ、より短時間でDNAを抽出することが可能である。

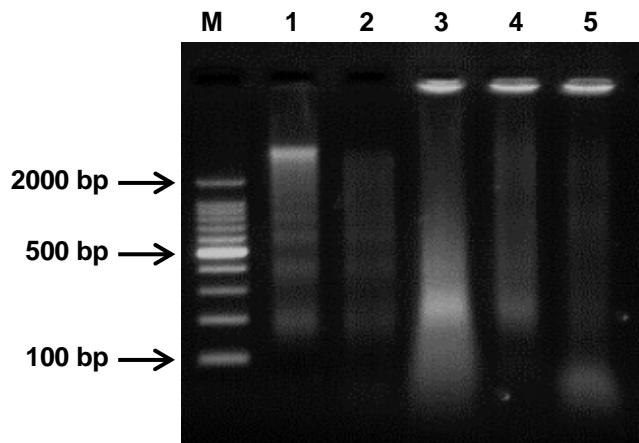


Fig. 1 Electrophoresis separation of genomic DNA from *Sepia recurvirostra* tissue samples. Total DNA extracted from tissues was analyzed by electrophoresis through 2.0% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane M, 100 bp DNA ladder as size markers; Lane 1, Total DNA extracted by DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany); Lane 2, Total DNA extracted by phenol-chloroform method; Lane 3, Total DNA extracted by proteinase K method; Lane 4, Total DNA extracted by alkaline lysis method; Lane 5, Total DNA extracted by rapid-boiling method.

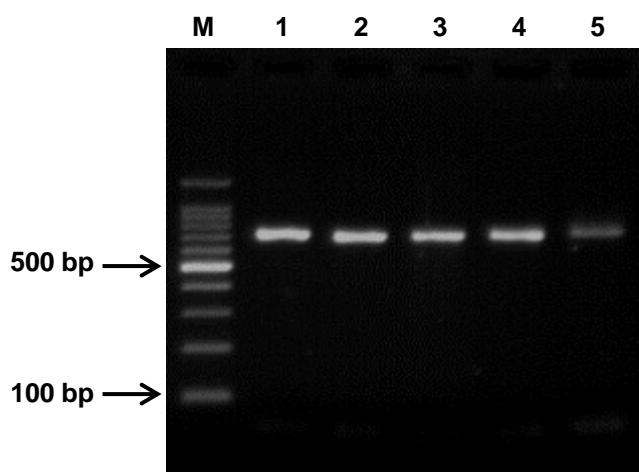


Fig. 2 Electrophoresis pattern of the PCR products in the mitochondrial *COI* region for the *Sepia recurvirostra* tissue samples. Total DNA extracted from tissues was analyzed by electrophoresis through 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane M, 100 bp DNA ladder as size markers; Lane 1, Total DNA extracted by DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany); Lane 2, Total DNA extracted by phenol-chloroform method; Lane 3, Total DNA extracted by proteinase K method; Lane 4, Total DNA extracted by alkaline lysis method; Lane 5, Total DNA extracted by rapid-boiling method.

### 3.2 分子系統解析

*16S rRNA* 領域の部分塩基配列を用いて作成した系統樹をFig. 3に、*COI* 領域の部分塩基配列を用いて作成した系統樹をFig. 4に示す。*16S rRNA* 領域の系統樹においては、IQ該当のシリヤケイカのクラスターにIQ該当の*Sepiella maindroni*が含まれるという種間の交差があったが、他の種については、種ごとに一つのクラスターを形成した(Fig. 3の網掛け部分)。また、*COI* 領域の系統樹においては、IQ非該当のトラフコウイカのクラスターにIQ該当のアラビアコウイカ*S. prashadi*及びIQ該当の*S. ramani*が含まれるという種間の交差があったが、他の種については、種ごとに一つのクラスターを形成した(Fig. 4の網掛け部分)。

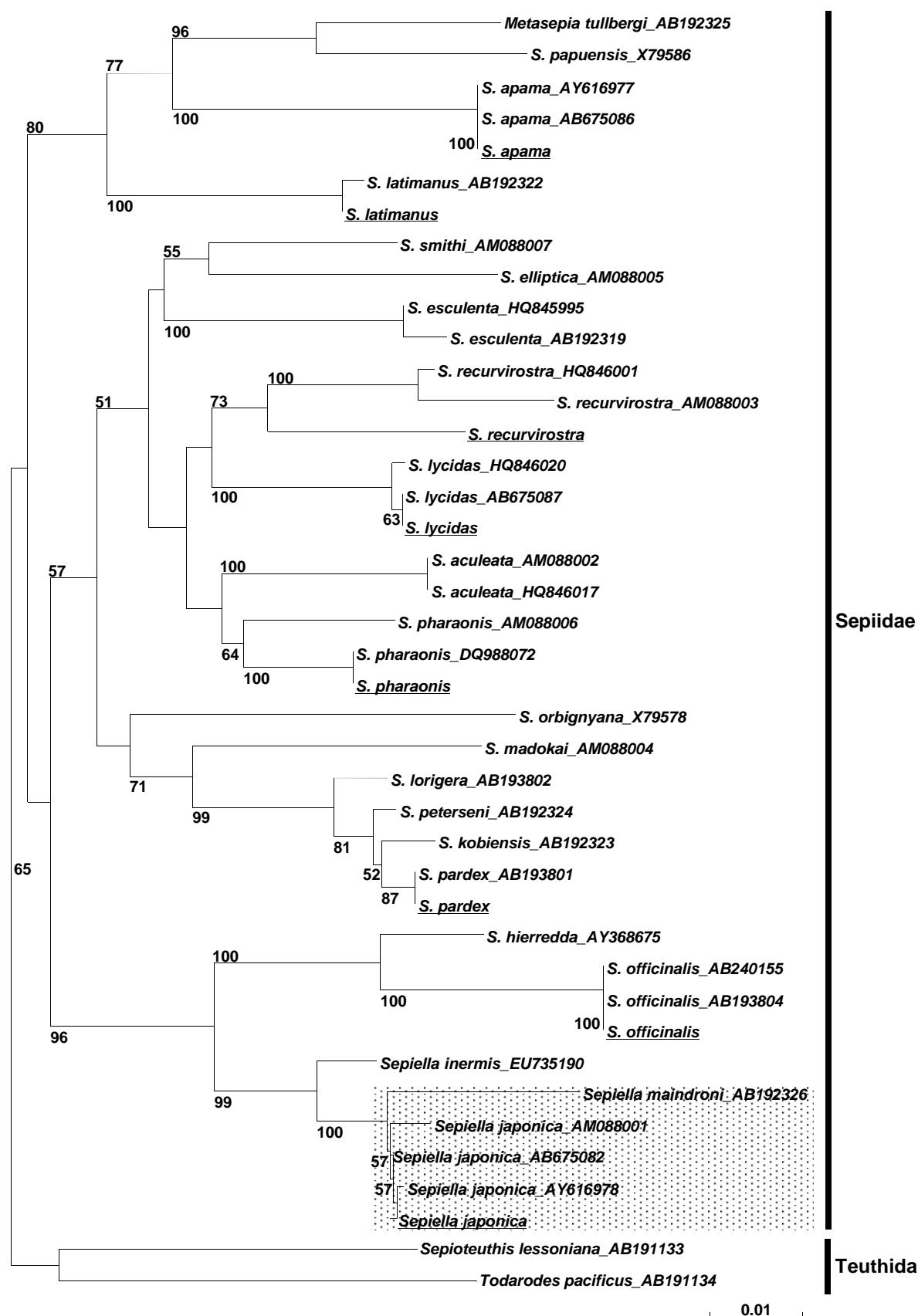


Fig. 3 Phylogenetic tree of cephalopods by the neighbor joining method with the 16S rRNA genes. Numbers of nodes indicate bootstrap support values >50% (1000 replicates). The scale indicates the evolutionary distance of one amino acid substitution per site. Standard samples used in this study are underlined.

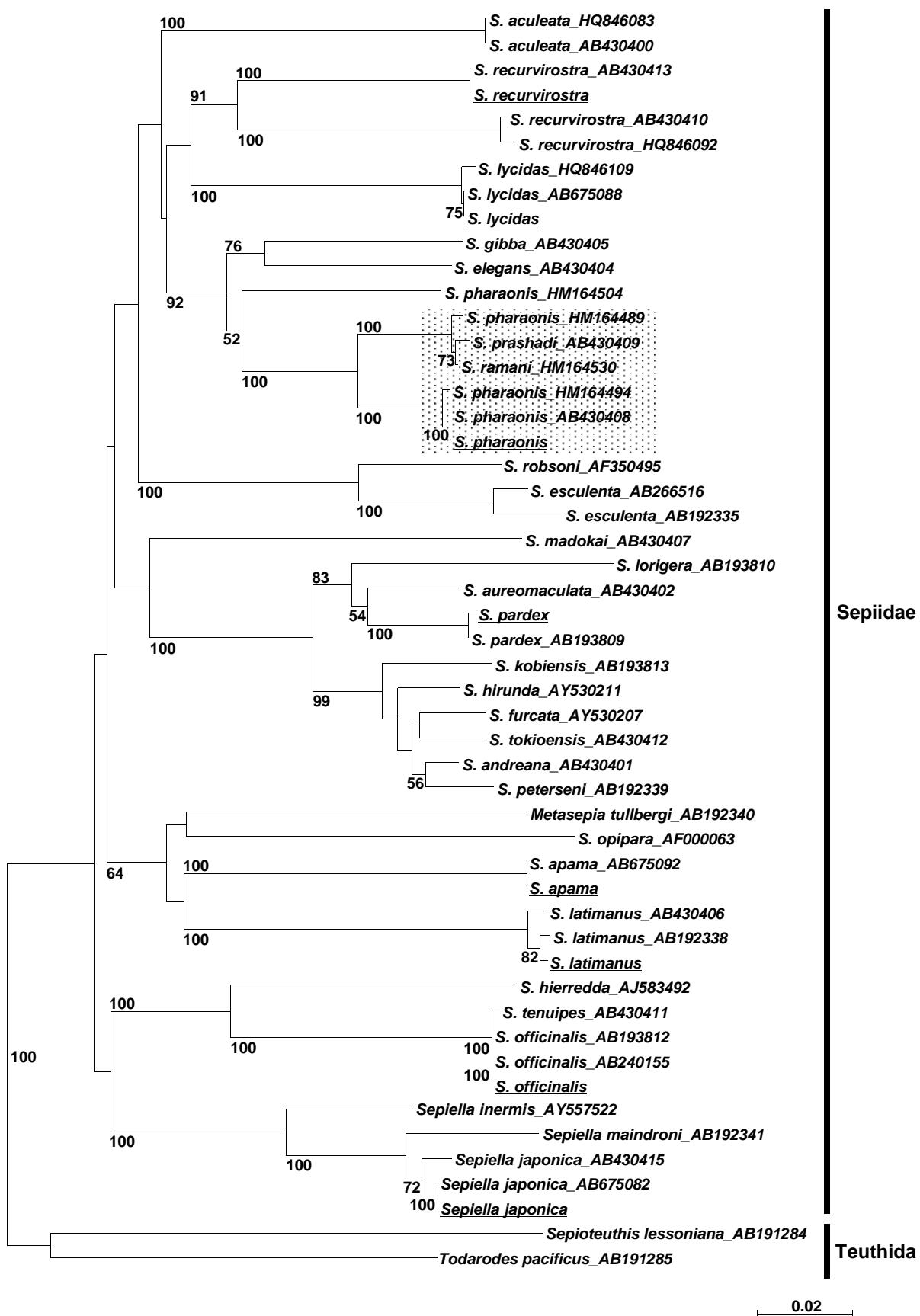


Fig. 4 Phylogenetic tree of cephalopods by the neighbor joining method with the CO1 genes. Numbers of nodes indicate bootstrap support values >50% (1000 replicates). The scale indicates the evolutionary distance of one amino acid substitution per site. Standard samples used in this study are underlined.

### 3.3 未知試料の解析

この IQ 評定の判別法の有効性を確認するために、未知試料について分析を行った。未知試料は、分析依頼された冷凍品のイカ 81 検体を用いた。

#### 3.3.1 未知試料の相同性解析

未知試料 81 検体の *16S rRNA* 及び *COI* 領域の部分塩基配列を決定し、BLAST ( Basic Logical Alignment Search Tool ) により、国際 DNA データベースに登録されているイカの遺伝子配列と相同性検索を行った。その結果、A ~ G の 7 つの種のグループに分かれた (Table 3)。A グループ (1 検体) は、*16S rRNA* 及び *COI* 領域のいずれにおいても、カミナリイカとの相同性が 99% 以上であった。B グループ (21 検体) は、*16S rRNA* 及び *COI* 領域のいずれ

においても、トラフコウイカとの相同性が 99% 以上であった。C グループ (15 検体) は、*16S rRNA* 及び *COI* 領域のいずれにおいても、アジアコウイカとの相同性が 99% 以上であった。D グループ (11 検体) は、*16S rRNA* 領域においてスミスコウイカ *S. smithi* との相同性が 99% 以上であった。E グループ (23 検体) は、*16S rRNA* 領域においてミナミハリイカ *S. elliptica* との相同性が 99% 以上であった。F グループ (6 検体) は、アミモンコウイカ *S. aculeata* との相同性が *16S rRNA* 領域において 97.2 ~ 97.9%、*COI* 領域において 92.1 ~ 92.3% であった。G グループ (4 検体) は、*16S rRNA* 領域においてコウイカ *S. esculenta* と最も相同性が高かった (92.4 ~ 93.0%) が、*COI* 領域では、ヤマタカコウイカ *S. gibba* と最も相同性が高かった (88.1 ~ 88.3%)。

Table 3 Species identification of imported frozen cuttlefish based on BLAST using *16S rRNA* and *COI* region nucleotide sequences

Code	Sample no.	Species identification by <i>16S rRNA</i> region nucleotide sequence homology			Species identification by <i>COI</i> region nucleotide sequence homology		
		identified species	identity	%	identified species	identity	%
A	1	<i>Sepia lycidas</i>	469/471	99.6	<i>Sepia lycidas</i>	657/658	99.8
B	21	<i>Sepia pharaonis</i>	493/494 - 502/502	99.8 - 100	<i>Sepia pharaonis</i>	568/571 - 658/658	99.5 - 100
C	15	<i>Sepia recurvirostra</i>	479/483 - 482/482	99.2 - 100	<i>Sepia recurvirostris</i>	652/658 - 657/658	99.1 - 99.8
D	11	<i>Sepia smithi</i>	492/497 - 496/497	99.0 - 99.8	<i>Sepia pharaonis</i>	569/637 - 570/637	89.3 - 89.5
E	23	<i>Sepia elliptica</i>	491/496 - 493/496	99.0 - 99.4	<i>Sepia pharaonis</i>	584/657 - 528/587	88.9 - 89.9
F	6	<i>Sepia aculeata</i>	494/508 - 419/428	97.2 - 97.9	<i>Sepia aculeata</i>	607/659 - 608/659	92.1 - 92.3
G	4	<i>Sepia esculenta</i>	412/446 - 398/428	92.4 - 93.0	<i>Sepia gibba</i>	580/658 - 581/658	88.1 - 88.3

#### 3.3.2 未知試料の分子系統解析

Figs. 3,4 に用いた塩基配列データに未知試料 81 検体の *16S rRNA* 及び *COI* 遺伝子の部分塩基配列データを加えて分子系統解析を行った (Figs. 5, 6)。*16S rRNA* 領域の系統樹においては、Fig. 3 の系統樹と同様に、シリヤケイカのクラスターに *Sepiella maindroni* が含まれるという種間の交差があり、また、樹形も Fig. 3 のものと類似していた。また、*COI* 領域の系統樹においては、Fig. 4 の系統樹と同様に、トラフコウイカのクラスターにアラビアコウイカ及び *S. ramani* が含まれるという種間の交差があり、また、樹形も Fig. 4 のものと類似していた。

#### 3.3.3 未知試料の IQ 評定の推定

3.3.1 及び 3.3.2 の結果をもとに、未知試料 81 検体について、IQ 評定及び種の推定を以下のとおり行った。

##### (1) A グループ

A グループ (1 検体) は、*16S rRNA* 及び *COI* 領域のいずれにおいても、国際 DNA データベースに登録されているカミナリイカの塩基配列との相同性が 99% 以上であった。また、*16S rRNA* 及び *COI* 領域のいずれの系統樹においても、カミナリイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成し、かつカミナリイカと各検体の枝が極めて短いことから、IQ 評定のカミナリイカと推定される。従って、A グループのイカは、*16S rRNA* 又は *COI* 遺伝子のどちらか一方の領域を分析することにより、IQ 評定の判別を行うことが可能と考えられる。

##### (2) B グループ

B グループ (21 検体) は、*16S rRNA* 及び *COI* 領域のいずれにおいても、国際 DNA データベースに登録されているトラフコウイカの塩基配列との相同性が 99% 以上であった。また、*16S rRNA*

及び *COI* 領域のいずれの系統樹においても、トラフコウイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成したことから、IQ 評定のトラフコウイカと推定される。従って、B グループのイカは、*16S rRNA* 又は *COI* 遺伝子のどちらか一方の領域を分析することにより、IQ 評定の判別を行うことが可能と考えられる。

##### (3) C グループ

C グループ (15 検体) は、*16S rRNA* 及び *COI* 領域のいずれにおいても、国際 DNA データベースに登録されているアジアコウイカの塩基配列との相同性が 99% 以上であった。また、*16S rRNA* 及び *COI* 領域のいずれの系統樹においても、アジアコウイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成し、かつアジアコウイカと各検体の枝が極めて短いことから、IQ 評定のアジアコウイカと推定される。従って、C グループのイカは、*16S rRNA* 又は *COI* 遺伝子のどちらか一方の領域を分析することにより、IQ 評定の判別を行うことが可能と考えられる。

##### (4) D グループ

D グループ (11 検体) は、*COI* 領域において相同性の高い種は無く、*COI* 領域の系統樹においてもクラスターを形成する種は無い。しかし、*16S rRNA* 領域において、国際 DNA データベースに登録されているスミスコウイカの塩基配列との相同性が 99% 以上であった。また、*16S rRNA* 領域の系統樹においても、スミスコウイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成し、かつスミスコウイカと各検体の枝が極めて短いことから、IQ 評定のスミスコウイカと推定される。従って、D グループのイカは、*16S rRNA* 領域を分析することにより、IQ 評定の判別を行うことが可能と考えられる。

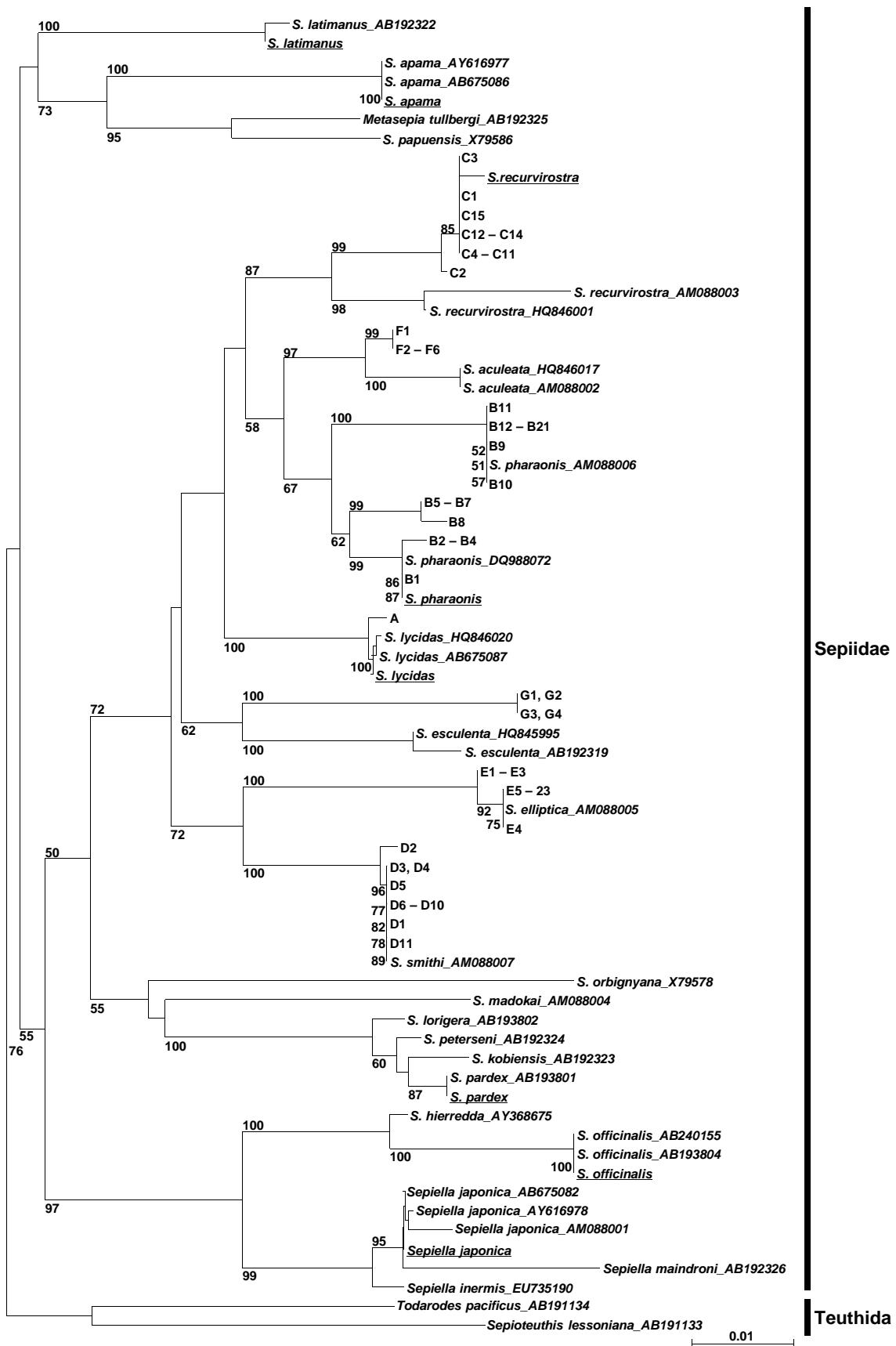


Fig. 5 Phylogenetic tree of cephalopods by the neighbor joining method with the 16S rRNA genes. Numbers of nodes indicate bootstrap support values >50% (1000 replicates). The scale indicates the evolutionary distance of one amino acid substitution per site. Standard samples used in this study are underlined.

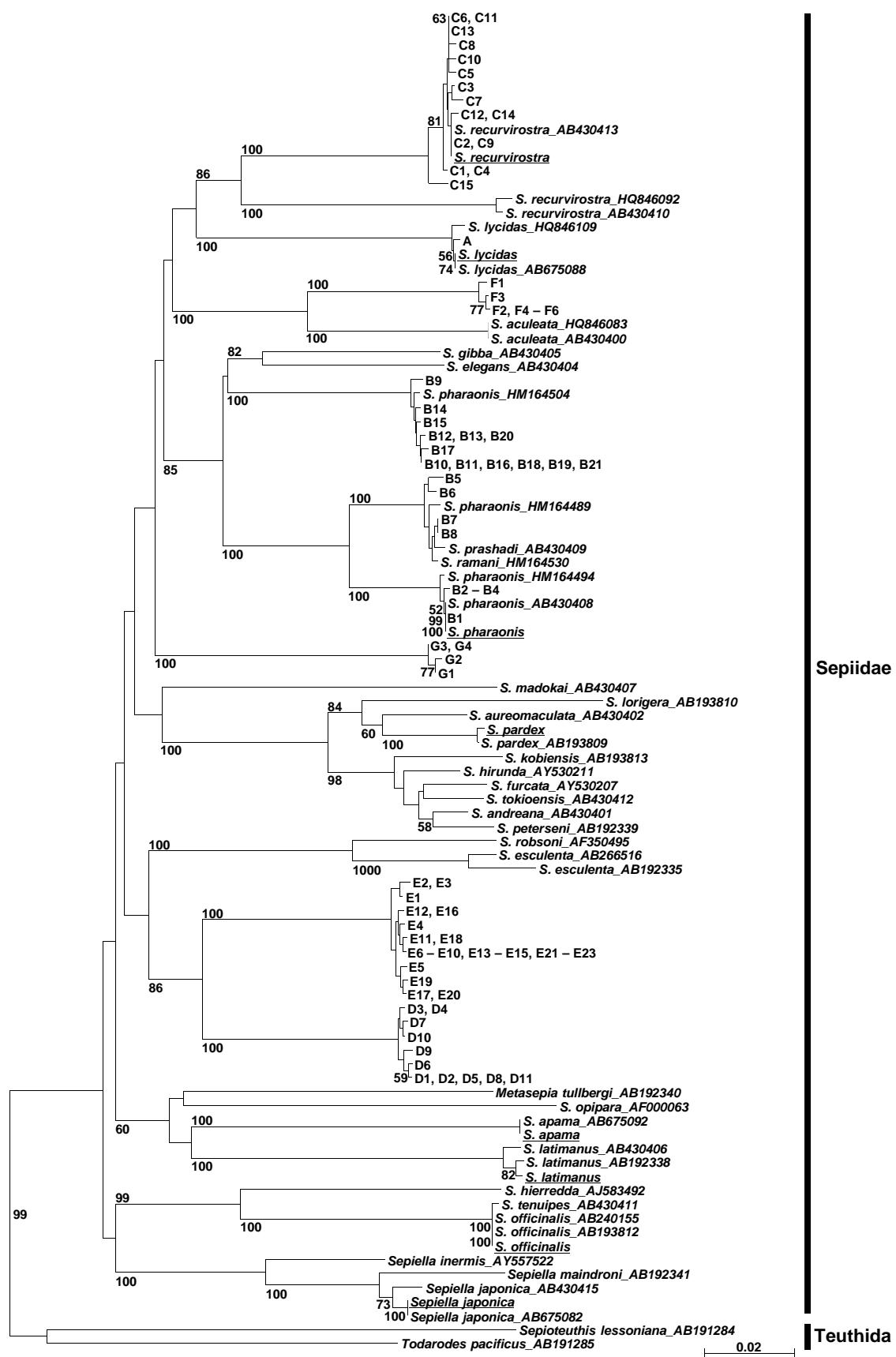


Fig. 6 Phylogenetic tree of cephalopods by the neighbor joining method with the CO1 genes. Numbers of nodes indicate bootstrap support values >50% (1000 replicates). The scale indicates the evolutionary distance of one amino acid substitution per site. Standard samples used in this study are underlined.

### (5) E グループ

E グループ(23検体)は、*COI* 領域において相同性の高い種は無く、*COI* 領域の系統樹においてもクラスターを形成する種は無い。しかし、*16SrRNA* の部分領域において、国際 DNA データベースに登録されているミナミハリイカの塩基配列との相同性が 99%以上であった。また、*16SrRNA* 領域の系統樹においても、ミナミハリイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成し、かつミナミハリイカと各検体の枝が極めて短いことから、IQ 該当のミナミハリイカと推定される。従って、E グループのイカは、*16SrRNA* 領域を分析することにより、IQ 該非の判別を行うことが可能と考えられる。

### (6) F グループ

F グループ(6検体)は、アミモンコウイカとの相同性が *16SrRNA* 領域において 97.2~97.9%、*COI* 領域において 92.1~92.3% であった。また、*16SrRNA* 及び *COI* 領域のいずれの系統樹においても、アミモンコウイカと高いブートストラップ確率でクラスターを形成した。しかし、いずれの系統樹においても同一種としては枝が長いことから、アミモンコウイカの近縁種であり、IQ 該当のイカと推定される。従って、F グループのイカは、*16SrRNA* 又は *COI* 遺伝子のどちらか一方の領域を用いて分子系統解析を行い、近縁関係にある種を調べることにより、IQ 該非の判別を行うことが可能と考えられる。

### (7) G グループ

G グループ(4検体)は、*16SrRNA* 領域においてコウイカとの相同性が 92.4~93.0% であり、また、*COI* 領域でも、ヤマタカコウイカ *S. gibba* との相同性が 88.1~88.3% であり、一致する種は見出せなかった。分子系統解析においても、*16SrRNA* 及び *COI* 領域では、一致した見解が得られないことから、その種を特定することはできない。これらは、特定の種を推定することはできないが、*16SrRNA* 及び *COI* 領域のいずれにおいても、国際 DNA データベースに登録された IQ 非該当のイカ 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)のいずれともクラスターを形成しないことから、IQ 該当のイカと推定される。従って、G グループについては、*16SrRNA* 及び *COI* 遺伝子の二つの領域を用いて分子系統解析を行い、近縁関係にある種を調べることにより、IQ 該非の判別を行うことが可能と考えられる。

## 3.4 考察

### 3.4.1 *16SrRNA* 及び *COI* 領域をイカ類の IQ 該非の推定に用いる根拠

*16SrRNA* 領域は、生物の系統分類に広く使用されており、多くの種の塩基配列が登録されている<sup>13)</sup>。また、*16SrRNA* 領域の塩基配列は、種間変異が多く、種内変異が少ないため、動物種の識別に利用できると考えられており、未登録の種でも BLAST による相同性検索で近縁種の推定が可能であると考えられている<sup>13)</sup>。更に、フグ種鑑別検査法においては、*16SrRNA* 領域の 615 塩基における配列相同性が 99.0%以上のものは、同一種と判定すると定められている<sup>14)</sup>。

*COI* 領域は、約 650 塩基の配列が DNA バーコーディングにおいて、動物の種同定の標準的なバーコード領域として認定され、Barcode of Life Data systems (<http://www.barcodinglife.com/>) に 2013 年 5 月時点で 132,000 種を超える動物のデータが蓄積されている<sup>15)</sup>。そのため、*COI* 領域を用いた生物種の同定は、今後、生物種判別の主要な手段の一つになると考えられている<sup>16)</sup>。イカ類においても、*COI* 領域の塩基配列は種間変異が多く、種内変異が少ないため、約 650 塩基における配列相同性が 99%以上であれば、その配列をもつ種と同一種と考えられている<sup>17)</sup>。

### 3.4.2 IQ 該非の推定に用いる領域の検討

コウイカ科のイカ類のうち、ミナミハリイカ、オルビニコウイカ *S. orbignyanus*、スミスコウイカの 3 種は、*16SrRNA* 遺伝子部分領域の塩基配列は、国際 DNA データベースに登録されているが、*COI* 遺伝子部分領域の塩基配列は登録されていない(Table 2)。これらのイカ類については、塩基配列が登録されている *16SrRNA* 遺伝子領域を分析することにより、IQ 該非の判別が可能である。また、エゾハリイカ *S. andreana*、ハクテンコウイカ *S. aureomaculata*、ヤセコウイカ *S. bertheloti*、ヨーロッパヒメコウイカ *S. elegans*、*S. furcata*、ヤマタカコウイカ、*S. hirunda*、ウツクシコウイカ *S. opipara*、パプアコウイカ *S. papuensis*、アラビアコウイカ、*S. ramani*、*S. robsoni*、ウデボソコウイカ *S. tenuipes* 及びスジコウイカ *S. tokioensis* の 14 種は、*COI* 遺伝子部分領域の塩基配列は、国際 DNA データベースに登録されているが、*16SrRNA* 遺伝子部分領域の塩基配列は登録されていない(Table 2)。これらのイカ類については、塩基配列が登録されている *COI* 遺伝子領域を分析することにより、IQ 該非の判別が可能である。

3.2 及び 3.3.2において、*16SrRNA* 領域の系統樹においては、シリヤケイカのクラスターに *Sepiella maindroni* が含まれるという種間の交差があった。これは、シリヤケイカ及び *Sepiella maindroni* が非常に近縁な種で、ミトコンドリア DNA の *16SrRNA* 領域の部分塩基配列が非常に類似している可能性が考えられる。もしくは、国際 DNA データベースに *Sepiella maindroni* として登録されている塩基配列がシリヤケイカのものである可能性も考えられる。また、*COI* 領域の系統樹においては、トラフコウイカのクラスターにアラビアコウイカ及び *S. ramani* が含まれるという種間の交差があった。トラフコウイカについては、現在トラフコウイカとして分類されているイカに、*S. ramani* を含む複数の種が含まれ、いくつかの種に細かく分類される可能性があるという報告がある<sup>18)</sup>。アラビアコウイカについても、アラビアコウイカとトラフコウイカが近縁な種で、ミトコンドリア DNA の *COI* 領域の部分塩基配列が非常に類似している可能性が考えられる。もしくは、国際 DNA データベースにアラビアコウイカとして登録されている塩基配列が、他の種のものである可能性もある。トラフコウイカは IQ 非該当のイカであるので、IQ 該非の推定は、これらのこと考慮して行う必要がある。

更に、3.3.3において、(7) G グループの塩基配列は、国際 DNA データベースに登録されていない種であると考えられる。このように塩基配列が登録されていないイカ類の試料については、*16SrRNA* 及び *COI* 遺伝子の二つの部分領域を用いて相同性検索

及び分子系統解析を行い、近縁関係にある種を調べることにより、IQ 評定が可能であると考えられる。

### 3.4.3 結論及び今後の展望

国際 DNA データベースに塩基配列が登録されている種については、*16S rRNA* 又は *COI* 遺伝子部分領域のいずれか一つの領域を分析することにより、イカ類の未知試料の IQ 評定が可能であると考えられる。

国際 DNA データベースに塩基配列が登録されていない種については、*16S rRNA* 及び *COI* 遺伝子の部分領域を用いて分子系統解析を行い、近縁関係にある種を調べることにより、イカ類の未知試料の IQ 評定が可能であると考えられる。ただし、*COI* 領域の系統樹においては、IQ 非該当であるトラフコウイカのクラスターに IQ 評定が含まれるという種間の交差があるため、そのことを考慮して IQ 評定を行なう必要がある。

今後、IQ 評定の精度を更に高めるためには、IQ 非該当種が唯一含まれるコウイカ科内のイカ類の塩基配列データを蓄積する必要がある。コウイカ科のイカ類は、約 110 種生息すると考えられているが<sup>19)</sup>、2013 年 5 月現在、国際 DNA データベースに登録されているコウイカ科のイカ類は、約 40 種であり、今後の塩基配列データの充実が望まれる。

## 4. 要 約

関税率表第 03.07 項に分類されるイカ類は、「もんごういか」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）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、もんごういかと他のイカ類とを判別する必要がある。本研究では、オーストラリアコウイカのミトコンドリア DNA の *16S rRNA* 及び *COI* 部分領域の塩基配列を決定し、「もんごういか」5 種全ての塩基配列データを含む 35 種のコウイカ属のイカ及び 2 種のツツイカ目のイカを用いて分子系統解析を行った。その結果、イカの未知試料の IQ 評定は、国際 DNA データベースに塩基配列が登録されている種については、*16S rRNA* 又は *COI* 領域のいずれか一つの領域を分析することにより可能であった。また、国際 DNA データベースに塩基配列が登録されていない種については、*16S rRNA* 及び *COI* 領域を用いて分子系統解析を行い、近縁関係にある種を調べることにより、IQ 評定が可能と考えられた。また、多検体の分析に適したイカの DNA の抽出法を検討した結果、アルカリ溶解法により、フェノール、クロロホルム等の有機溶媒を使用せず、多検体から短時間かつ安価に DNA を抽出することが可能であることを示した。

（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古谷秀隆准教授、アデレード大学菅野雄耶氏に深くお礼申し上げます。

## 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) 高野香織、河嶋優美、片山貴之、山崎幸彦：関税中央分析所報, **50**, 13 (2010).
- 3) Santaclara FJ, Espineira M, Vieites JM : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 9913 (2007).
- 4) Wakabayashi T, Yanagimoto T, Sakai M, Ichii T, Miki K : *DNA polymorphism*, **17**, 1144 (2009).
- 5) Palumbi SR : Nucleic acids. The Polymerase chain reaction. in “*Molecular Systematics*” (Hillis DM, Moritz C, Mable , Eds.), 2nd Ed., P.205 (1996), (Sinauer, Sunderland, MA).
- 6) Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R : *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294 (1994).
- 7) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning : A laboratory manual. (1989), *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- 8) Transgenic Mouse Facility, University of California Irvine : DNA preparation techniques.
- 9) Truett GE, Heeager P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML : *Biotechniques*, **29**, 52 (2000).
- 10) 関谷剛男：“蛋白質 核酸 酵素”，Vol. 41, No. 5, P.455 (1996), (共立出版).
- 11) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG : *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876 (1997).
- 12) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ : *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673 (1994).
- 13) Mitani T, Akane A : *DNA polymorphism*, **16**, 32 (2008).
- 14) 厚生労働省：食安輸発 0906 第 1 号 (2011).
- 15) Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR : *Proceedings of the Royal Society*, **270**, 313 (2003).
- 16) Arami S, Sato E, Futo S : *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, **52**, 205 (2011).
- 17) 若林敏江：“6 章 イカ DNA の威力”，“新鮮イカ学（奥谷喬司編著）”, P.120 (2010), (東海大学出版会) .
- 18) Anderson FE, Engelke R, Jarrett K, Valinassab T, Mohamed KS, Asokan PK, Zacharia PU, Nootmorn P, Chotiyaputta C, Dunning M : *Journal of Molluscan Studies*, **77**, 65 (2011).
- 19) 奥谷喬司：“原色世界イカ類図鑑”. P.22 (1995), (全国いか加工業協同組合).