

にしん加工品（かずのこ等）の原料原産地判別法の検討

高嶋 康晴, 井口 潤
Yasuharu Takashima, Jun Iguchi

要 約

ニシン及びタイセイヨウニシンについて、ミトコンドリア DNA の 3 遺伝子領域（16S rRNA、COI、Cytb）の部分配列を決定し、両種の相異塩基から PCR-RFLP 法による判別法の検討を行った。その結果、Cytb 遺伝子領域上にプライマーを設計した PCR-RFLP 法により、両種を判別することが可能となった。開発した判別法は、こんぶ巻や甘露煮等の加工度の高い加工食品では、PCR 産物が得られない商品もみられたが、塩蔵品、乾燥品等の原料原産地表示が義務付けられている加工食品では、分析可能であることを確認した。これらの結果より、にしん加工品について原材料であるニシン属の種を判別することで、両種の生息海域が異なることから、原料原産地の表示の検証が可能となった。

1. はじめに

我が国における生鮮の水産物の品質に関する表示は、農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS 法）に基づき制定された生鮮食品品質表示基準により「名称」及び「原産地名」の表示が義務付けられており、加工食品に関する表示は、加工食品品質表示基準によって、「名称」及び「原材料名」等の表示が義務付けられている。さらに、塩蔵品や塩干品等の一部の加工食品では、その主な原材料の原産地名を記載しなければならない。

ニシン属は北大西洋（バルト海、地中海等を含む）及び北太平洋（日本海、オホーツク海等を含む）の温水域に住む魚種で、古くから食用魚として広く利用されており、その熟した卵巣は「かずのこ」として親しまれている。北海道では 1800 年代後半から 1900 年代初頭にかけては年 50 万トン以上の漁獲量があったが、その後は徐々に減少し、近年の漁獲量は年 1 万トン以下となっている^{1, 2)}。このように日本におけるニシン属の漁獲量は大きく減少したが、ニシン属に対する食用魚としての需要は依然として根強いものがあり、2012 年にはアメリカ、ロシア等から「にしん」として約 2.5 万トン、「にしんの卵」として約 5.5 千トン輸入されている³⁾。国産のニシン属はその漁獲量の少なさから珍重されており、輸入されるニシン属と判別するための科学的な検証技術の開発が要望されている。日本で流通する主なニシン属は、太平洋に生息するニシン *Clupea pallasii* と大西洋に生息するタイセイヨウニシン *C. harengus* であるが、国内で漁獲されるニシン属はニシンであり、タイセイヨウニシンの漁獲はほとんど見られず、輸入されるのみである。このため、両種を判別することで、原料原産地の表示の検証が可能となる。しかし、形態的に近似している上に、加工されることにより両種を判別することは、さらに困難となる。このため、本研究では、両種の遺伝的な差異を明らかにし、市販されるにしん加工品の表示点検業務に利用することができる分析法として、PCR-RFLP 法による両種の判別法について開発を行い、さらに、原料原産地表示が義務付けられている品目を中心に検査への適用の可否について検討を実施した。

2. 実験方法

2. 1 試料

ミトコンドリア DNA の塩基配列決定用試料としてニシン 7 個体、タイセイヨウニシン 3 個体を使用した。開発した判別法の適用範囲確認用試料には、市販のにしん加工品 36 件を使用した。内訳は塩蔵品 6 件（塩蔵にしん 3 件、塩蔵かずのこ 3 件）、乾燥品 10 件（身欠にしん 7 件、開き干し 3 件）、調味加工品 10 件（調味かずのこ 8 件、酢漬けにしん 2 件）、にしん焼切身 2 件、にしんを中芯具材に用いたこんぶ巻き 4 件、甘露煮 4 件を使用した。

2. 2 DNA 抽出

DNA 抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) 又は Maxwell[®] 16 DNA Purification Kit (Promega) を用いた。

DNeasy Blood & Tissue Kit を用いる場合は、10-25 mg 採取し、抽出操作はキットの製品プロトコールに従って実施した。Maxwell[®] 16 DNA Purification Kit を用いる場合は、約 25 mg を採取し、抽出操作は、核酸・タンパク自動精製システム Maxwell[®] 16 (Promega) を用い、装置の動物・植物組織用のプログラムにより DNA 抽出を行った。

2. 3 PCR 及び電気泳動による PCR 産物の確認

PCR は、ミトコンドリア DNA の 16S リボソーム RNA (16S rRNA) 遺伝子領域、チトクロム c オキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子領域、チトクロム b (Cytb) 遺伝子領域を対象とし、各遺伝子領域の部分配列を増幅するプライマーセット⁴⁶⁾ (表 1) ごとに PCR を行った。

表 1 16S rRNA、COI、Cytb 遺伝子領域の部分配列解析用プライマーセット

遺伝子領域	プライマー名	forward/reverse	配列(5'→3')	決定配列(bp)	文献
16S rRNA	16LSAR-L	forward	CGCCTGGTTGATTA AAAACAT	573	4
	16SBR-H	reverse	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT		
COI	CO1490	forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	659	5
	HCO 2198	reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA		
Cytb	L14735-Glu	forward	AACCACCGTTGTTATTCAAC	402	6
	H15149-CYB	reverse	GGTGGCKCCTCAGAAGGACATTTGKCCTCA		

PCR 反応液の組成は、終濃度が 0.5 Units/tube の TaKaRa Ex Taq[®] HS (タカラバイオ)、1× Ex Buffer (20 mM Mg²⁺ plus)、0.2 mmol/L dNTP Mixture 及び各 0.25 μmol/L のプライマーセットを含む反応液に、DNA 抽出液を 2.0 μL 加え、滅菌水で全量を 20 μL とした。PCR はサーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) 又は PTC 220[™] (Bio-Rad Laboratories) を用いた。PCR の温度サイクルは、最初の熱変成として 94 °C で 1 分、次に (1) 熱変成として 94 °C で 20 秒、(2) アニーリングとして 16S rRNA 及び COI 遺伝子領域の部分配列を増幅するプライマーセットでは 50 °C、Cytb 領域のプライマーセットでは 55 °C で 20 秒、(3) 伸長反応として 72 °C で 40 秒の (1) ~ (3) を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応の延長として 72 °C で 7 分反応させた。

PCRにより得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動を行い、PCR産物の有無を確認した。アガロースゲルはAgarose LE（和光純薬）を用い、ゲルの濃度は3.0%（w/v）とし、エチジウムブロマイド（10 mg/mL）（和光純薬）をゲル100 mL当たり5.0 µL使用し、電気泳動緩衝液は40 mmol/L Tris-acetate, 1 mmol/L EDTAで調製したTAE緩衝液を用いた。PCR反応液2.5 µLを電気泳動に供し、電気泳動装置は、Mupid-exU（アドバンス）を用い、電気泳動後のゲルは、電気泳動撮影装置AE-6931FXCF（アトー）を用いてPCR産物を確認した。

2. 4 塩基配列解析

塩基配列決定は、ダイレクトシーケンス法によって行った。

PCR産物の精製には、PCR産物の精製キット *illustra*TM ExoProStar（GE Healthcare Bio-Sciences）を用い、精製キットの反応組成は、1.0 µLのExonuclease1、1.0 µLのAlkaline Phosphatase、3.0 µLの滅菌水を混合後に、PCR後の反応液5.0 µLを加えた。精製キットの反応温度は37 °Cで15分間処理した後、80 °Cで15分間加熱し、使用した2種類の酵素（Exonuclease1及びAlkaline Phosphatase）を不活性化させた。

サイクルシーケンス反応は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いた。サイクルシーケンス反応液の組成は、2.0 µLのBigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Premix、3.0 µLのBigDye[®] Sequencing Buffer（5x）（Thermo Fisher Scientific）、0.6 µLのプライマー（5 µM）、2.0 µLの*illustra*TM ExoProStar処理液を混合し、滅菌水で全量を20 µLとし、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 又は PTC 220TMを用いて行った。反応温度は、最初の熱変成として94 °Cで1分、次に（1）熱変成として94 °Cで20秒、（2）アニーリングとして50 °Cで15秒（3）伸長反応として60 °Cで4分の（1）～（3）を1サイクルとして25サイクルで行った。

サイクルシーケンス後の余分な蛍光色素の除去には *illustra*TM AutoSeqTM G-50 Terminator Removal kit（GE Healthcare Bio-Sciences）を用いた。*illustra*TM AutoSeqTM G-50カラムに10 µLの100 µM EDTAを加えカラム担体の調製後、製品プロトコールに従って、余分な蛍光色素の除去を行った。

余分な蛍光色素を除去したサイクルシーケンス反応液を自動DNAシーケンサー Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザ（Thermo Fisher Scientific）供して、塩基配列の決定を行った。

DNAデータベース登録データとの比較には、オンライン上の検索ツール nucleotide Blast（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）を使用し、配列の並び換えには Genetix ver.12.1（ゼネティックス）を用いた。

2. 5 PCR-RFLP 分析

ニシン及びタイセイヨウニシンのCytb遺伝子領域の部分配列を比較し、両種間で消化に差異がみられる制限酵素を選定した。また、選定した制限酵素の認識配列を含むようにプライマーを設計した（表5）。PCR反応液の組成は、終濃度が0.5 Units/tubeの*TaKaRa Ex Taq*[®] HS、1× Ex Buffer（20 mM Mg²⁺ plus）、0.2 mmol/L dNTP Mixture及び各0.25 µmol/Lのプライマーセットを含む反応液に、DNA抽出液を2.0 µL加え、滅菌水で全量を20 µLとした。PCRの温度サイクルは、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700を用い、最初の熱

変成として 94 °C で 1 分、次に (1) 熱変成として 94 °C で 20 秒、(2) アニーリングとして 55 °C で 20 秒、(3) 伸長反応として 72 °C で 30 秒の (1) ~ (3) を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応の延長として 72 °C で 7 分反応させた。

制限酵素処理溶液の組成は、5 units の制限酵素、1× 制限酵素用緩衝液（各制限酵素添付品）を含む反応液に 7.5 μL の PCR 反応液を加え、滅菌水で全量を 15.0 μL とした。

制限酵素処理反応は、GeneAmp PCR System 9700 を用い、37 °C で 1 時間以上静置した。

制限酵素処理後のアガロースゲル電気泳動は、2. 3 の電気泳動による PCR 産物の確認に準じて行い、制限酵素処理液 5.0 μL を供し、制限酵素により切断された DNA 断片を確認した。

3. 結果及び考察

3. 1 ミトコンドリア DNA の 16S rRNA、COI、Cytb 遺伝子領域の塩基配列

ニシン及びタイセイヨウニシンのミトコンドリア DNA について、16S rRNA 遺伝子領域、COI 遺伝子領域、Cytb 遺伝子領域の部分配列を決定したところ、各プライマーセットで決定される塩基配列は、16S rRNA 遺伝子領域用で 573 塩基、COI 遺伝子領域用で 659 塩基、Cytb 遺伝子領域用で 402 塩基であり、いずれも両種間に欠損や挿入は見られなかった。各遺伝子領域の部分配列における種特異的な相異塩基の数は、16S rRNA 遺伝子領域で 3 塩基、COI 遺伝子領域で 8 塩基、Cytb 遺伝子領域で 7 塩基あることを確認した（表 2 ~ 4）。

表 2 16S rRNA 遺伝子領域の部分配列（573 塩基）中の相異塩基

魚種名	試料数	サイト*		
		10	273	274
ニシン	7	C	C	C
タイセイヨウニシン	3	A	T	T

*配列を決定した 16S rRNA 遺伝子領域の部分配列 573 塩基中の 5'末端からの位置。

表 3 COI 遺伝子領域の部分配列（659 塩基）中の相異塩基

魚種名	試料数	サイト**							
		91	250	289	322	355	367	439	556
ニシン	7	C	C	C	A	T	C	C	G
タイセイヨウニシン	3	T	T	A	G	A	T	T	A

**配列を決定した COI 遺伝子領域の部分配列 659 塩基中の 5'末端からの位置。

表 4 Cytb 遺伝子領域の部分配列（402 塩基）中の相異塩基

魚種名	試料数	サイト***							
		33	36	66	87	174	246	345	
ニシン	7	A	A	A	C	T	G	T	
タイセイヨウニシン	3	G	G	G	T	C	A	C	

***配列を決定した Cytb 遺伝子領域の部分配列 402 塩基中の 5'末端からの位置。

3. 2 PCR-RFLP 法によるニシンとタイセイヨウニシンの判別法の開発

ニシン及びタイセイヨウニシンの塩基配列から制限酵素認識配列において差異がみられる配列を検討したところ、Cytb 遺伝子領域の部分配列 402 塩基中の 66 番目の塩基にある相違塩基を含む配列では、ニシンにおいて制限酵素 AluI の認識配列、タイセイヨウニシンにおいて制限酵素 MspI の認識配列がそれぞれの種で特異的にみられた。そこで、両制限酵素認識配列を含むように 217 塩基を増幅するプライマーセット（表 5、図 1）を設計した。設計したプライマーセットで PCR を行ったのち、その PCR 産物を制限酵素で処理し、アガロースゲル電気泳動で分離した。制限酵素 MspI による処理では、タイセイヨウニシンは 161 塩基と 56 塩基の DNA 断片となるが、ニシンでは消化による切断がおこらず、217 塩基の PCR 産物のまま検出された（図 2 (a)）。一方、制限酵素 AluI による処理では、ニシンに特異的な制限酵素認識配列のほかに、両種ともに存在する認識配列があるため、ニシンが 87、72、58 塩基の DNA 断片、タイセイヨウニシンは 145、72 塩基の DNA 断片となり（図 2 (b)）、アガロースゲル電気泳動で両種の判別が可能であった。

表 5 PCR-RFLP 法によるニシンとタイセイヨウニシンの判別に用いるプライマーセット

プライマー名	配列 (5'→3')	増幅産物長(bp)
L-NS	CTWCGRAAAACCCACCCCT	217
H-NS	CATAGTTTACATCTCGGCAAATGTG	

W:A または T R:A または G

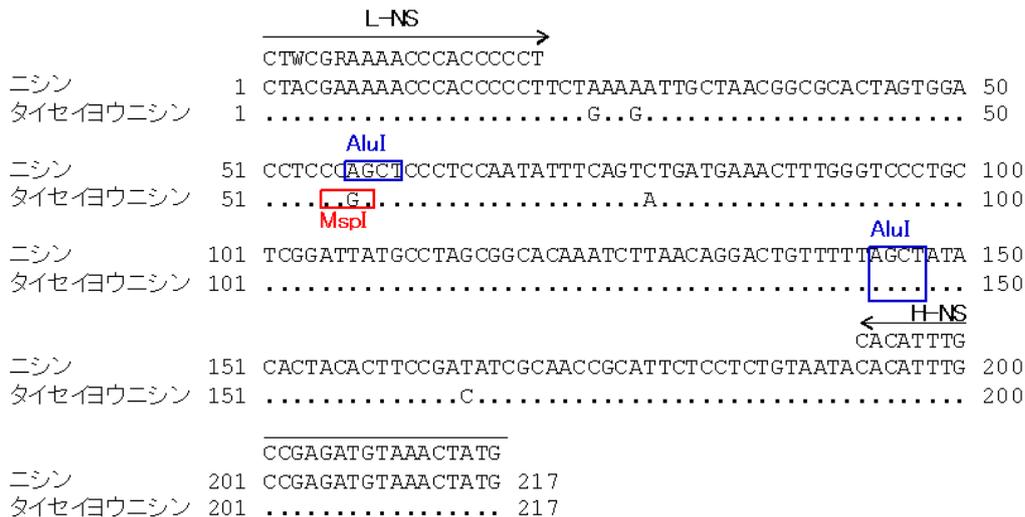


図 1 ニシンとタイセイヨウニシンの Cytb 遺伝子領域の部分配列

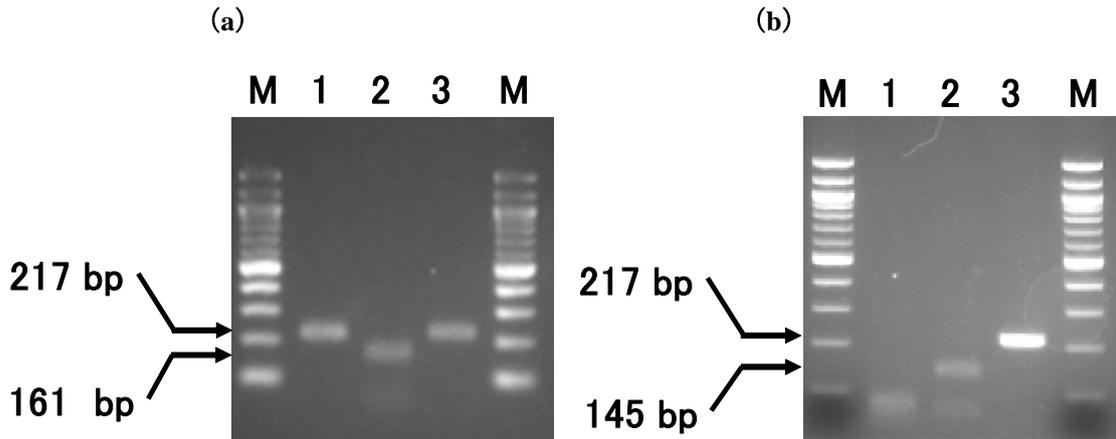


図2 各制限酵素処理後の電気泳動写真

(a) MspI 処理後のアガロースゲル電気泳動 (b) AluI 処理後のアガロースゲル電気泳動

M : 100bp DNA ラダー、1 : ニシン、2 : タイセイヨウニシン、3 : 制限酵素未処理

3. 3 市販品による判別結果

市販のにしん加工品 36 件を分析したところ、31 件で判別可能であった (表 6)。

主な原材料の原産地表示が義務付けられている塩蔵品、乾燥品、調味加工品については、判別に供した試料全てで判別可能であった。表面をあぶっただけの加工品については、該当する市販品が入手できなかったが、より加工度の高いにしん焼切身で、判別可能であったため、判別可能と考えられた。一方で、こんぶ巻 (中芯具材) やにしん甘露煮については、判別できない試料がみられた。こんぶ巻や甘露煮は、長時間 (数時間～一晚) 煮詰める工程に加えてレトルト包装される際に加圧・加熱工程がある製品もあり^{7,8)}、これまでの報告^{9,10)}と同様に加圧・加熱工程により、DNA の断片化が起これ、分析が困難となったと考えられた。

表 6 にしん加工品における判別の可否

品目	判別可能件数/試料件数
塩蔵にしん・塩蔵かずのこ	6/6
身欠にしん・開き干し	10/10
にしん酢漬・調味かずのこ	10/10
にしん焼切身	2/2
こんぶ巻(中芯の具材)	1/4
甘露煮	2/4

4. まとめ

ニシン及びタイセイヨウニシンについて、ミトコンドリア DNA の 3 遺伝子領域 (16S rRNA、COI、Cytb) の部分配列を決定した。両種の相異塩基から、Cytb 遺伝子領域上にプライマーを設計し、PCR-RFLP 法による両種の判別法を開発した。開発した PCR-RFLP 法による判別法は、こんぶ巻や甘露煮等の加工度の高い加工食品では、検出されない商品もみられたが、塩蔵品、乾燥

品等の原料原産地表示が義務付けられている加工食品では、分析可能であることを確認した。これらの結果より、にしん加工品について原材料であるニシン属の種を判別することで、両種の生息海域が異なることから、原料原産地の表示の検証が可能となった。

5. 謝 辞

本研究の実施に当たり、御助言をいただきまし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倫明博士及び山下由美子博士に深謝致します。

6. 文 献

- 1) 小林時正, 北海道におけるニシン漁業と資源研究 (総説), 北水試験報, 2002; **62**, 1-8
- 2) 年次別統計 (平成 14 年～ 24 年) イ 魚種別漁獲量, 平成 24 年漁獲統計, 農林水産省, 東京. 2012.
- 3) 平成 24 年度貿易統計, 財務省, 東京. 2013.
- 4) Palumbi, S. R. Nucleic acids II. The Polymerase chain reaction. In “Molecular Systematics” (D.M. M.Hills, C. Morits and B.K. Mable, Eds.) , 2ed. Sinauer, Sunderland MA. 1996; 205-221.
- 5) Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate. *Mol. Biol. Biotechnol.* 1994; **3**: 294-299.
- 6) Miya, M. and Nishida, M. Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics:A tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion *Mol. Phylogent. Evol.* 2000; **17**: 437-455.
- 7) 「全国水産加工品総覧(第 1 版)」光琳, 東京. 2005.
- 8) 水産品の加工, 「改訂 原色食品加工工程図鑑」株式会社建帛社, 東京. 1994; 118-139.
- 9) 高嶋康晴, 森田貴己, 山下倫明. ミトコンドリア DNA および成分分析による加工食品の原料原産地判別. 「水産物の原産地判別」(日本水産学会編) 恒星社厚生閣, 東京. 2006; 54-66.
- 10) 浪越充司. 缶詰等の水産加工食品の原料魚種判別. 農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告. 2011; **35**:7-17.