

国産魚介類の DNA データの集積及び登録について

山崎 実緒¹, 高嶋 康晴¹

YAMAZAKI Mio, TAKASHIMA Yasuharu

要約

FAMIC ではこれまで 200 種以上の魚介類試料の DNA データを収集し、名称や産地表示の真正性の確認に活用している。新たに国産の食用魚介類 19 種の試料を収集し、ミトコンドリア DNA の特定遺伝子領域の一部の塩基配列を決定し、塩基配列データの集積及び国際的な塩基配列データベースへの登録を行った。

1. はじめに

一般向けに販売される食品は、食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）に基づく食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）において、生鮮食品にあつては「名称」及び「原産地」を、加工食品にあつては「名称」、「原材料名」等を表示することが義務付けられている¹⁾。魚介類の「名称」の表示は、「魚介類の名称のガイドライン」が示され、標準和名に準じて生物種名を記載する方法が推奨されている¹⁾。

魚介類には多くの生物種が含まれ、その生物種を推定することで「名称」だけでなく、その生物種の生息域から「原産地」の表示について検証できる場合がある。形態的な特徴から生物種を同定することは可能とされているが、高い熟練度を必要とする²⁻⁶⁾。

DNA は遺伝子を構成する物質で、4 種類の塩基（アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T））の組合せにより生物学的な情報を保存している。1990 年代以降、様々な生物種の塩基配列の特定遺伝子領域の配列について解析が行われるようになり、ミトコンドリア DNA の cytochrome *b* (Cytb)⁷⁾、cytochrome *c* oxidase subunit I (COI)⁸⁾、16S ribosomal RNA (16S rRNA)⁹⁾ 遺伝子領域の他、核 DNA の Internal Transcribed Spacer (ITS) 遺伝子領域¹⁰⁾ などの研究が進んでいる。これまでに多くの生物種について当該遺伝子領域の塩基配列が解析され、国際的な塩基配列データベース（the International Nucleotide Sequence Databases ; 以下「INSID」という。）に登録されることで、情報が共有されている。それに伴い、当該遺伝子領域の塩基配列の差異により生物種を推定することが可能であることが報告されている¹¹⁻¹³⁾。

FAMIC においても、これまでに 200 種以上の魚介類について特定の遺伝子領域の塩基配列を確認し、解析結果を用いた検査法の開発¹⁴⁻²⁰⁾ や生物種の推定に活用している。

今回、食用魚介類の中で新たに確認が必要な魚介類を中心に試料を収集し、特定の遺伝子領域の塩基配列の解析を行い、得られた塩基配列のデータについては、INSID のへの登録を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

静岡県水産・海洋技術研究所から 2 種、北海道浜中漁業協同組合から 1 種、有限会社日本シジミ研究所からは 16 種の魚介類について、形態的な同定済み試料を入手した。

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

2.2 DNA 抽出

DNA 抽出は、筋肉組織 10~25 mg を採取し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用い、製品プロトコールに従い DNA 抽出を行った。

2.3 DNA シークエンス法 (DNA 塩基配列解析)

各試料の DNA 塩基配列の決定は、ダイレクトシークエンス法によって行った。塩基配列の決定は、魚類については Cytb 遺伝子領域内の約 400 bp、魚類以外については COI 遺伝子領域内の約 700 bp を対象とした。PCR 反応液は、0.5 Units DNA ポリメラーゼ TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (以下「Ex Taq[®] HS」; タカラバイオ) を含み、最終濃度が 1× Ex Taq Buffer (Ex Taq[®] HS 添付試薬)、0.2 mmol/L dNTP Mixture (Ex Taq[®] HS 添付試薬)、各 0.25 μmol/L プライマー対 (表 2) となるように混合し、2.0 μL の抽出 DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 20 μL とした。PCR の温度条件は、最初の熱変性として 94 °C 1 分で保持後、熱変性 94 °C 20 秒、アニーリング 55 °C 20 秒、伸長反応 72 °C 40 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル後、最後の伸長反応を 72 °C 7 分行った。

PCR 産物の精製には、illustra[™] ExoProStar[™] (Cytiva) を用いた。0.5 μL の Exonuclease I、0.5 μL の Alkaline Phosphatase 及び 1.5 μL の滅菌水を混合後に、PCR 後の反応液 2.5 μL を加え、37 °C で 15 分間処理した後、80 °C で 15 分間加熱し、酵素を不活性化した。

サイクルシークエンス反応には、BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。反応液は、BigDye[™] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix 0.5 μL、BigDye[™] sequencing buffer (5×) 2.0 μL に、最終濃度が 0.15 μmol/L となるようにプライマーを混合した。使用するプライマーは、魚類にあつてはプライマー L14735-Glu 及び H15149-CYB22²⁰⁾ を、魚類以外にあつては LCO1490 及び HCO2198 のプライマー対を用いた⁸⁾ (表 1)。これに魚類の場合は約 5 ng/μL、それ以外の魚介類の場合は約 10 ng/μL に調製した精製 PCR 産物各 1.0 μL を加え、滅菌水で全量を 10 μL とした。サイクルシークエンス反応の温度条件は、最初の熱変性として 96 °C 1 分で保持後、3 ステップの反応により行った。第 1 ステップでは、熱変性 96 °C 10 秒、アニーリング 50 °C 5 秒、伸長反応 60 °C 1 分 15 秒を 1 サイクルとして 15 サイクル、第 2 ステップでは、熱変性 96 °C 10 秒、アニーリング 50 °C 5 秒、伸長反応 60 °C 1 分 30 秒を 1 サイクルとして 5 サイクル、第 3 ステップでは、熱変性 96 °C 10 秒、アニーリング 50 °C 5 秒、伸長反応 60 °C 2 分を 1 サイクルとして 5 サイクル行った。サイクルシークエンス後の余剰な蛍光色素の除去は、エタノール沈殿により行った。シークエンス反応物を Hi-Di ホルムアミド (Thermo Fisher Scientific) に溶かし 95 °C 2 分間加熱後氷上又は 4 °C で処理し、DNA シークエンサーに供し、塩基配列を決定した。

PCR 及びサイクルシークエンス反応には、サーマルサイクラー ProFlex 及び VeritiPro (共に Thermo Fisher Scientific) を用い、DNA シークエンサーには、SeqStudio[™] (Thermo Fisher Scientific) を用いた。得られた配列の並び替えには遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX Ver.15 (株式会社ゼネティックス) を使用した。得られた各種 DNA の配列情報について、INSD の一つである大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所が管理する日本 DNA データバンク (DNA Data Bank of Japan) (略称 DDBJ) による登録システムに従い、1 種につき 1 個体ずつ得られた塩基配列情報の登録を行った。

表 1 使用プライマー

プライマー名	配列(5'→3')	遺伝子領域	参考文献
L14735-Glu	AACCACCGTTGTTATTCAAC	tRNA ^{Glu}	21
H15149-CYB	GGTGGCKCCTCAGAAGGACATTTGKCCTCA	Cytb	
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	COI	8
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	COI	

K:G 及び T の混合配列

tRNA^{Glu}: glutamyl-transferRNA, Cytb: cytochrome *b*, COI: cytochrome *c* oxidase subunit I

3. 結果及び考察

3.1 塩基配列情報の決定

複数個体を解析した種について、種内各個体の塩基配列の差異を比較したところ、魚類 11 種中では、Cytb 遺伝子領域 402 塩基中 3 塩基の相違がみられたものが 1 種、2 塩基の相違がみられたものが 1 種あったが、それ以外の種では見られなかった。魚類以外の 4 種では、COI 遺伝子領域 658 塩基中 1 塩基の相違がみられたものが 2 種あった。今回解析を行った魚介類では、同一種内の個体間で塩基配列の相同性が 99.0 % 以下となる個体は見られなかった。

また、これまでに FAMIC で確認した魚介類（魚類 163 種、魚類以外 51 種）を含めて種間の相同性を確認したところ、今回塩基配列を決定した魚類 11 種及び魚類以外 8 種について、それぞれの塩基配列の相同性が 98.0 % 以上となる当該種以外の種は見られなかった。このため、塩基配列の相同性が種の推定の参考となると考えられた。

3.2 INSD への登録

各種についてそれぞれ 1 個体の塩基配列情報を INSD の一つである DDBJ の登録システムに従い申請を行い、各登録データについて識別番号（アクセッション番号）を得た。

4. まとめ

新たに国産の食用魚介類 19 種の試料を収集し、ミトコンドリア DNA の特定遺伝子領域の一部の塩基配列を決定し、塩基配列データの集積及び国際的な塩基配列データベースへの登録を行った。

謝辞

本研究を実施するにあたり、水産物の試料収集にご協力いただいた静岡県水産・海洋技術研究所、散布漁業協同組合、浜中漁業協同組合及び有限会社日本シジミ研究所に深く感謝いたします。

文献

- 1) 食品表示法（平成 25 年法律第 70 号）
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/food_labeling_act 令和 7 年 2 月現在
 食品表示基準 Q&A について（平成 27 年 3 月 30 日付け消食表第 140 号消費者庁通知）別添「魚介類の名称のガイドライン」
- 2) 中坊徹次 編 (2000). 「日本産 魚類検索 全種の同定 第二版」, 東海大学出版会, 神奈川.
- 3) 関口秀夫 (2014). イセエビ・セミエビ類の和名について. 日本動物分類学会誌, 37, 36-45.
- 4) 三宅貞祥 (1982). 「原色日本大型甲殻類図鑑 (I)」 保育社, 大阪.

- 5) 三宅貞祥 (1983). 「原色日本大型甲殻類図鑑 (II)」保育社, 大阪.
- 6) 奥谷喬司 (2015). 「新編 世界イカ類図鑑」, 全国いか加工業協同組合, 東京.
- 7) Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 6196–6200
- 8) Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate. *Mol. Biol. Biotechnol.*, **3**, 294–299.
- 9) Palumbi, S.R., Nucleic acids II: The Polymerase chain reaction. In “Molecular Systematics” (Hills, D.M., Morits, C., and Mable, B.K., Eds.), 2ed., 1996; 205–221. Sinauer, Sunderland, MA.
- 10) Angers-Loustau, A., Petrillo, M., Paracchini, V., Kagkli, D.M., Rischitor, P.E., and Gallardo, A.P. (2016). Towards plant species identification in complex samples: A bioinformatics pipeline for the identification of novel nuclear barcode candidates. *PLoS One.*, **11**(1).
- 11) Herbert, P.D.N., Ratnasingham, S., and deWaard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *The Royal Society.*, **270**, S96–S99.
- 12) 魚類乾製品等のフグ混入検査について (平成 20 年 4 月 25 日付け食安輸発第 0425005 号厚生労働省通知)
- 13) Katugin, O.N., Chichvarkhina, O.V., Zolotova, A.O., and Chichvarkhin, A.Y. (2017). DNA barcoding for squids of the family Gonatidae (Cephalopoda: Teuthida) from the boreal North Pacific. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.*, **28**(1), 41–49.
- 14) 榎智之, 小岩智宏, 今田敬子, 津村明宏, 杉村豊裕, 高嶋康晴, 森田貴己, 山下倫明(2004). ミトコンドリアチトクロム b 遺伝子の DNA 分析によるスズキ, タイリクスズキおよびナイルパーチの種判別. 日本食品科学工学会誌, **51** (9), 471–476.
- 15) 榎智之, 小岩智宏, 今田敬子, 津村明宏, 杉村豊裕, 高嶋康晴, 森田貴己, 山下倫明(2005). ミトコンドリアチトクロム b 遺伝子の DNA 分析によるタイ科魚類の魚種判別. 日本食品科学工学会誌, **52** (8), 366–372.
- 16) Sezaki, K., Itoi, S., and Watabe, S. (2005). A simple method to distinguish two commercially valuable eel species in Japan *Anguilla japonica* and *A. anguilla* using polymerase chain reaction strategy with a species-specific primer. *Fish. Sci.*, **71**, 414–421.
- 17) Iguchi, J., Isshiki, M., Takashima, Y., Yamashita, Y., and Yamashita, M., (2012). Species identification method for marine products of *Seriola* and related species. *Fish. Sci.*, **78**, 197–206.
- 18) 高嶋康晴, 井口潤(2014). にしん加工品(かずのこ等)の原料原産地判別法の検討. 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. **38**, 23–29.
- 19) 足立静香, 西川加寿子, 中山祐輔, 藤原守, 松岡猛, 高嶋康晴(2018). ズワイガニ属 3 種のスクリーニング判別法の開発. 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, **42**, 24–31.
- 20) 足立静香, 豊田正俊, 高嶋康晴, 澤田桂子, 石原敏史, 若林敏江, 柳本卓(2020). DNA 分析によるスルメイカ判別法の開発及びその加工品における原料種判別の適用検討. 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, **44**, 26–34.
- 21) Miya, M., Nishida, M. (2000). Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: A tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol. Phylogent. Evol.*, **17**, 437–455.