

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

足立 静香¹, 豊田 正俊², 高嶋 康晴¹, 澤田 桂子³, 石原 敏史⁴, 若林 敏江⁵, 柳本 卓⁶

ADACHI Shizuka, TOYODA Masatoshi, TAKASHIMA Yasuharu, SAWADA Keiko,

ISHIHARA Toshifumi, WAKABAYASHI Toshie, YANAGIMOTO Takashi

要 約

農林水産消費安全技術センター (FAMIC) では、イカ類の名称 (種名) 表示の真正性の確認のため、ミトコンドリアDNAのCOI領域内の約560 bpの配列を解析するDNAシーケンス法により種を判別している。イカ加工品の主要な原材料であるスルメイカは、近年、漁獲量が減少しており、アメリカオオアカイカ等の他のイカ類への置換えが進んでいる。DNAシーケンス法は、得られたDNA塩基配列とDNAデータバンクに登録されているDNA塩基配列情報との相同性を検索することにより、広範な種の判定が可能であるが、分析操作が煩雑であることから、多検体の検査を短時間で行うには不向きである。このため、原料種に「スルメイカ」を使用した旨が表示された加工食品の表示が正しく行われているか否かを判別するスクリーニング法として、スルメイカ及びその他7種を対象としたPCR-RFLP法を開発し、イカ加工品への適用を確認した。

1. はじめに

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、一般用生鮮食品にあつては「名称」及び「原産地」を、一般用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。

スルメイカ (*Todarodes pacificus*) は、アカイカ科 (*Ommastrephidae*) に属するイカ類で、東シナ海南部から日本海全域、オホーツク海、さらに東経 170 度に至る北西太平洋に広く分布している。スルメイカはイカ類の中で国内漁獲量が最も多く²⁾、生食用の他、干物 (するめ等)、さきいか、塩辛、惣菜等の加工食品の原材料として広く利用されている。また、スルメイカ以外にもアメリカオオアカイカ (*Dosidicus gigas*)、アカイカ (*Ommastrephes bartramii*)、アルゼンチンマツイカ (*Illex argentinus*)、カナダマツイカ (*Lillecebrosus*) などが使用されている^{3)~5)}。近年、スルメイカの国内漁獲量は顕著に減少しており、平成 20 年の約 22 万トンに対して平成 30 年は約 5 万トンであった²⁾。こうしたスルメイカ不漁の影響を受け、イカ加工品の原材料は、上述したイカ類への代替が進んでいる。

また、スルメイカを使用した加工食品には、「スルメイカ使用」等の特色のある原材料の表示

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部

³ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部 (現) 神戸センター

⁴ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター本部 (現) 福岡センター

⁵ 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産大学校

⁶ 国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産資源研究所

がされていることが多い。しかしながら、イカ類は、一部に全形で流通及び販売されるものもあるが、その多くは生鮮食品であれば、柵、細切されたいかそうめん等、加工食品であれば、さきいか等の乾燥珍味、塩辛、惣菜や冷凍食品に用いる切身といった外観から種を判別することは容易ではない形状で流通及び販売されている。

魚介類は、種により品質や価格に違いがある場合が多く、種名は消費者の商品選択に重要な情報であることから、平成 19 年に水産庁より「魚介類の名称のガイドライン」（現 食品表示基準 Q&A 別添（消費者庁 平成 27 年 3 月））⁶⁾が示され、魚介類の正確な名称の表記が求められることとなった。こうした制度の見直しを踏まえ、特に外観では名称（種名）表示の真正性の確認が難しい魚介類に適用できる科学的な判別分析法が必要とされ、FAMIC では、イカ類に対し、ミトコンドリア DNA の cytochrome c oxidase subunit I (COI) の遺伝子領域内の約 560 bp の配列を解析する DNA シークエンス法により種を判別している⁷⁾。しかし、DNA シークエンス法は、分析操作が煩雑であり、試薬も高額であることから、多検体の検査を簡便、かつ安価に行うスクリーニング法の開発が望まれた。若林らは、イカ加工品の原料種を COI 遺伝子領域の 854 bp をポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction ; PCR) により増幅し、当該 PCR 産物を制限酵素により種間で異なる長さの DNA 断片に切断する制限酵素断片長多型法 (Restriction Fragment Length Polymorphism ; RFLP) による判別法を開発している⁸⁾。そこで、この成果を活用して、幅広い加工度の食品に対応できるよう増幅長を短縮し、原料種に「スルメイカ」を使用した旨が表示された加工食品の表示が正しく行われているか否かを判別するスクリーニング法として、スルメイカ及び他のイカ類 7 種 (アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ、オーストラリアスルメイカ、ケンサキイカ及びソデイカ) を対象とした PCR-RFLP 法を開発したので、報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

スルメイカ、アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ、ニュージーランドスルメイカ、オーストラリアスルメイカ、ケンサキイカ、アオリイカ、ソデイカ、コウイカ (以上 11 種、各 5 点) 及びヨーロッパコウイカ (3 点) は、国立研究開発法人水産研究・教育機構から入手した。ヤリイカ及びカリフォルニアヤリイカ (各 5 点) は、一般小売店から入手した。これらのイカ 14 種をイカ種判別の検討に供した。

イカ加工品は、原料にスルメイカを使用する商品群から選定し、乾燥珍味 (するめ、さきいか、焼きいか、いか足、くん製、イカフライ (スナック))、塩辛、惣菜 (沖漬、焼きいか、松前漬、唐揚げ)、冷凍食品 (イカリング、シーフードミックス、天ぷら) 及び缶詰の計 45 点を一般小売店で購入し、検討に供した (表 1)。このうち、スルメイカの別名である「真イカ」の表示を含め 14 点にスルメイカである旨記載があった。

2.2 DNA 抽出

試料は、表面を避けた内部の組織から 10~25 mg を採取した。イカ加工品にあつては、調味液等が付着している試料は表面を滅菌水で洗浄後に、また、イカフライ (スナック) は、試料を滅菌水に浸し、衣をふやかしてイカと衣を分離してから採取した。DNA 抽出は、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用い、製品プロトコールに従った。

表1 イカ加工品の分類、表示された種名、DNA 塩基配列解析による推定種及び PCR-RFLP の結果

試料番号	商品群1	商品群2	表示された原料イカ種	塩基配列解析により推定された種*	PCR-RFLPの結果**
18TpDM1	乾燥珍味	魚介乾製品 (するめ)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM7	乾燥珍味	魚介乾製品 (するめ)	-	アルゼンチンマツイカ	非切断
18UDM9	乾燥珍味	魚介乾製品 (するめ)	-	スルメイカ	切断
18UDM13	乾燥珍味	魚介乾製品 (するめ)	-	スルメイカ	切断
18UDM15	乾燥珍味	魚介乾製品 (するめ)	-	スルメイカ	切断
18TpDM2	乾燥珍味	魚介乾製品 (さきいか)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18TpDM6	乾燥珍味	魚介乾製品 (さきいか)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM3	乾燥珍味	魚介乾製品 (さきいか)	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UDM12	乾燥珍味	魚介乾製品 (さきいか)	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18TpDM3	乾燥珍味	魚介乾製品 (焼きいか)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM5	乾燥珍味	魚介乾製品 (ソフトいか)	-	PCR増幅せず	PCR増幅せず
18TpDM4	乾燥珍味	魚介乾製品 (下足)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM6	乾燥珍味	魚介乾製品 (下足)	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UDM8	乾燥珍味	魚介乾製品 (いか耳ロール)	-	スルメイカ	切断
18UDM2	乾燥珍味	いかくん製品	-	アカイカ	非切断
18UDM4	乾燥珍味	いかくん製品	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18TpDM5	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM14	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	-	-	PCR増幅せず
19TpDM1	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	スルメイカ	-	切断
19UDM1	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	-	-	切断
19UDM2	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	-	-	PCR増幅せず
19UDM3	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	-	-	切断
19UDM4	乾燥珍味	イカフライ(スナック)	-	-	切断
18TpDM7	乾物	乾燥するめ(細切)	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UDM10	乾物	乾燥するめ(細切)	-	スルメイカ	切断
18UDM11	乾物	乾燥するめ(細切)	-	スルメイカ	切断
18TpAM1	魚介類加工品	塩辛	スルメイカ	スルメイカ	切断
18TpAM2	魚介類加工品	塩辛	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UAM1	魚介類加工品	塩辛	-	アカイカ	非切断
18UAM2	魚介類加工品	塩辛	-	スルメイカ	切断
18UAM3	魚介類加工品	塩辛	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UAM4	魚介類加工品	塩辛	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UAM5	魚介類加工品	塩辛	-	スルメイカ	切断
18UAM6	魚介類加工品	塩辛	-	アルゼンチンマツイカ	非切断
18TpBM1	魚介類加工品	ポイルカット	真いか	スルメイカ	切断
18TpCM1	惣菜	沖漬	スルメイカ	スルメイカ	切断
18TpCM2	惣菜	焼きいか	真いか	スルメイカ	切断
18UCM3	惣菜	焼きいか	-	アルゼンチンマツイカ	非切断
18UCM2	惣菜	松前漬	-	スルメイカ	切断
18DgCM1	惣菜	いかステーキ	アメリカオオアカイカ	アメリカオオアカイカ	非切断
18UCM1	惣菜	いか唐揚げ	-	スルメイカ	切断
18TpFM1	冷凍食品	いかリング	スルメイカ	スルメイカ	切断
18UFM1	冷凍食品	シーフードミックス	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UFM2	冷凍食品	いかの天ぷら	-	アメリカオオアカイカ	非切断
18UKM1	缶詰	味付いか	-	カナダマツイカ	非切断

* IkaCOI プライマー対による COI遺伝子領域 337 bp による判別結果

** IkaCOI プライマー対による PCR 産物を制限酵素 BstXI により処理した結果

表 2 プライマー設計において比較したイカ類及び IkaCOI プライマー対による PCR 結果

種名	学名	DDBJデータの比較数	BstXI認識部位の有無*	IkaCOIプライマー対による378 bpの増幅**
アカイカ科				
スルメイカ	<i>Todarodes pacificus</i>	36	+	+
ヨーロッパスルメイカ	<i>T. sagittatus</i>	4	-	
ミナミスルメイカ	<i>T. filippovae</i>	1	-	
アメリカオオアカイカ	<i>Dosidicus gigas</i>	27	-	+
アカイカ	<i>Ommastrephes bartramii</i>	6	-	+
アルゼンチンマツイカ	<i>Illex argentinus</i>	6	-	+
カナダマツイカ	<i>I. illecebrosus</i>	1	-	+
ニュージーランドスルメイカ	<i>Nototodarus sloanii</i>	2	-	-****
オーストラリアスルメイカ	<i>N. gouldi</i>	1	-	+
トビイカ	<i>Sthenoteuthis oualaniensis</i>	10	-	
ヤリイカ科				
ケンサキイカ	<i>Uroteuthis edulis</i>	3	-	+
ヤリイカ	<i>Heterololigo bleekeri</i>	13	-	-
カリフォルニアヤリイカ	<i>Doryteuthis opalescens</i>	2	-	-
パタゴニアヤリイカ	<i>D. gahi</i>	2	-	-
アオリイカ	<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	4	***	-
ソデイカ科				
ソデイカ	<i>Thysanoteuthis rhombus</i>	2	-	+
テカギイカ科				
ドスイカ	<i>Beryteuthis magister</i>	4	-	
コウイカ科				
コウイカ	<i>Sepia esculenta</i>	1	-	-
ヨーロッパコウイカ	<i>S. officinalis</i>	1	-	-

* IkaCOI プライマー対による 378 bp の増幅領域内の制限酵素 BstX I 認識部位の有無 + : 認識部位あり
- : 認識部位なし

** 種判別に供した 14 種のイカ試料による PCR 増幅の結果 + : 増幅あり - : 増幅なし

*** 4 データ中 1 データに制限酵素 BstX I 認識部位があった。

**** 378 bp 以外の増幅を確認

2.3 プライマーの設計及び PCR 条件

プライマーは、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録されているイカ類のデータベースから 19 種のイカ (スルメイカ、ヨーロッパスルメイカ、ミナミスルメイカ、アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ、ニュージーランドスルメイカ、オーストラリアスルメイカ、トビイカ、ケンサキイカ、ヤリイカ、カリフォルニアヤリイカ、パタゴニアヤリイカ、アオリイカ、ソデイカ、ドスイカ、コウイカ及びヨーロッパコウイカ) (表 2) の COI 遺伝子領域を比較して、BstXI 認識部位を含み、幅広い加工度の食品に対応できるよう増幅長を短縮するように設計した。プライマーの設計には、Primer3Plus (<http://www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を用いた。

PCR 反応液は、0.4 Units の DNA ポリメラーゼ KOD FX Neo (東洋紡) を含み、最終濃度が 1× PCR Buffer for KOD FX Neo (DNA ポリメラーゼ添付品)、0.4 mmol/L dNTP Mixture (DNA ポリメラーゼ添付品)、プライマー対 (フォワードプライマー IkaCOI-F 及びリバースプライマー IkaCOI-R) (図 1) 各 0.3 μmol/L となるよう混合し、2.0 μL の抽出 DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 20.0 μL とした。PCR の温度条件は、最初の熱変性として 94 °C 2 分で保持後、熱変性 98 °C 10 秒、アニーリング 56 °C 30 秒、伸長反応 68 °C 10 秒を 1 サイクルとして 35 サイクルで行った。PCR は、サーマルサイクラー GeneAmp® PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を主に使用し、Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)、ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific) 及び TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (タカラバイオ) を用いて、PCR 条件の頑健性の確認を行った。

アガロースゲル電気泳動は、エチジウムブロマイド (ニッポンジーン) を 0.5 μg/mL 含む質量分率 2~3 % アガロースゲル (Agarose L03 「TAKARA」 (タカラバイオ) 又は Agarose S (ニッポ

ンジーン)) を用い、泳動緩衝液は、1×TAE 緩衝液 (ニッポンジーン) を用いた。

2.4 DNA シークエンス法 (DNA 塩基配列解析)

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。種判別に供したイカ 14 種の DNA 塩基配列は、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 (フォワードプライマー LCO1490:GGTCAACAAATCATAAA GATATTGG 及びリバースプライマー HCO2198:TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA)⁸⁾ 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 50 °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 分を行った。イカ加工品は、設計したプライマー対 (IkaCOI-F 及び IkaCOI-R) を用い、2.3 に示した条件で PCR を実施した。

PCR 産物の精製には、*illustra*[™] *ExoProStar*[™] (グローバルライフサイエンステクノロジーズ ジャパン) を用いた。1.0 μL の *Exonuclease I*、1.0 μL の *Alkaline Phosphatase* 及び 3.0 μL の滅菌水を混合後に、PCR 後の反応液 5.0 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* 2.0 μL、*BigDye*[™] *sequencing buffer (5×)* 3.0 μL に、最終濃度が 3.0 pmol/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、種判別に供したイカ 14 種にあっては、プライマー-LCO1490 又は HCO2198 を、イカ加工品にあっては、プライマー-IkaCOI-F 又は IkaCOI-R を用いた。これに約 2.5 ng/μL に調製した精製 PCR 産物 2.0 μL を加え、滅菌水で全量を 20 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 94 °C 1 分で保持後、熱変性 94 °C 20 秒、アニーリング 50 °C 15 秒、伸長反応 60 °C 4 分を 1 サイクルとして 25 サイクルで行った。DNA 塩基配列の決定にかかる PCR は、サーマルサイクラー-GeneAmp[®] PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

サイクルシークエンス後の余剰な蛍光色素の除去は、*AutoSeq G-50* (グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン) を用い、製品プロトコールに従った。G-50 カラムから溶出した精製 DNA 溶液を DNA シークエンサーにそのまま供し、DNA 塩基配列を決定した。DNA シークエンサーは、*Applied Biosystems*[™] 3130xl ジェネティックアナライザ (Thermo Fisher Scientific) を用いた。DNA 塩基配列の解析には、遺伝子情報処理システム *Genetix ver.12.1* (ゼネティックス) を用いた。DNA 塩基配列の比較は、DDBJ に登録されているスルメイカ (AB158364)、アメリカオオアカイカ (AB571181)、アカイカ (AB715401)、アルゼンチンマツイカ (AB675089)、カナダマツイカ (AB270933)、ニュージーランドスルメイカ (AB270938)、オーストラリアスルメイカ (AB270939)、ケンサキイカ (AB675080)、ヤリイカ (AB441181)、カリフォルニアヤリイカ (KP336703)、アオリイカ (KM878671、KF019369)、ソデイカ (EU735371)、コウイカ (AB266516) 及びヨーロッパコウイカ (AB266516) と比較し、相同性の高いものを当該種と判定した。

3. 結果及び考察

3.1 DNA シークエンス法による種の判定

種判別に供したイカ 14 種について、COI プライマー対 (LCO1490-HCO2198) を用いた PCR を行い、得られた約 700 bp の増幅産物を用いて、DNA 塩基配列解析を行った。プライマー配列及びそれに続く約 50 bp の DNA 塩基配列を除いた COI 遺伝子領域 558 bp の配列を決定し、DDBJ に登録された DNA 塩基配列と照合した判定結果は、供試した試料の種と一致しており、今回供試した試料がスルメイカ判別の検討試料として使用できることを確認した。アオリイカは 5 点分析し、2 点に制限酵素 BstXI 認識部位が存在していた。

3.2 判別用プライマーの設計及び PCR-RFLP 法によるスルメイカ判別

スルメイカ判別の検討対象としたイカ 14 種の COI 遺伝子領域の比較から、スルメイカと一部のアオリイカに存在する制限酵素 BstXI 認識部位 (5' CCANNNNN[^]NTGG 3') を含み、アオリイカでは増幅せず、かつ、アガロースゲル電気泳動で判別できる断片長となる位置にフォワードプライマー IkaCOI-F (GCTGTAGAAAGAGGGGCAGG)、リバースプライマー IkaCOI-R (TTCGGGATGACCAAAGAACC A) を設計し、その増幅長は 378 bp であった (図 1)。

種判別に供したイカ 14 種における IkaCOI プライマー対による PCR の結果を表 2 及び図 2 に、PCR 増幅産物の得られた 8 種の PCR-RFLP の結果を図 3 に示した。スルメイカのみが制限酵素 BstXI により切断される「切断型 (スルメイカ型)」となり、アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ、オーストラリアスルメイカ、ケンサキイカ及びソデイカは切断されない「非切断型」であった。一方、アオリイカは制限酵素 BstXI 認識部位の存在の有無にかかわらず、ヤリイカ、カリフォルニアヤリイカ、コウイカ、ヨーロッパコウイカと同様に PCR 増幅されず、ニュージーランドスルメイカは約 700 bp 付近にバンドを検出した。

これらの結果から、IkaCOI プライマー対による PCR において種判別に供したイカ 14 種のうちスルメイカを含む 8 種に 378 bp の増幅産物が得られ、これら 8 種を対象に制限酵素 BstXI を用いた PCR-RFLP によりスルメイカであるか否かを判別するスクリーニングが可能であることが確認できた。

3.3 イカ加工品における判別用プライマーの適用

イカ加工品 39 点について、IkaCOI プライマー対を用いた PCR を行ったところ、38 点から 378 bp の増幅産物が得られた。増幅しなかった 1 点 (18UDM5) は、醸造酢を主体に調味された商品であり、酸の影響により DNA の消化が進んでいることが考えられた⁹⁾。得られた 378 bp の増幅産物を用い、DNA 塩基配列解析を行い、プライマー配列を除いた COI 遺伝子領域 337 bp の配列を決定した。この配列と種判別に供したイカ 14 種との相同性を比較した結果、種の判定を行ったイカ加工品 38 点は、スルメイカ 23 点、アメリカオオアカイカ 9 点、アルゼンチンマツイカ 3 点、アカイカ 2 点及びカナダマツイカ 1 点であった (表 1)。なお、スルメイカ表示のある 14 点は、いずれもスルメイカと判別された。

種の判定を行ったイカ加工品 38 点について、増幅した 378 bp の PCR 産物を用いて、制限酵素 BstXI 処理を行った。その結果、DNA シークエンス法によりスルメイカと判別された 23 点すべての試料が、制限酵素 BstXI により切断される「切断型 (スルメイカ型)」となり、アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカと判別された試料は、いずれも制限酵素 BstXI により切断されない「非切断型」となり、誤判定となる試料はなかった (表 1)。

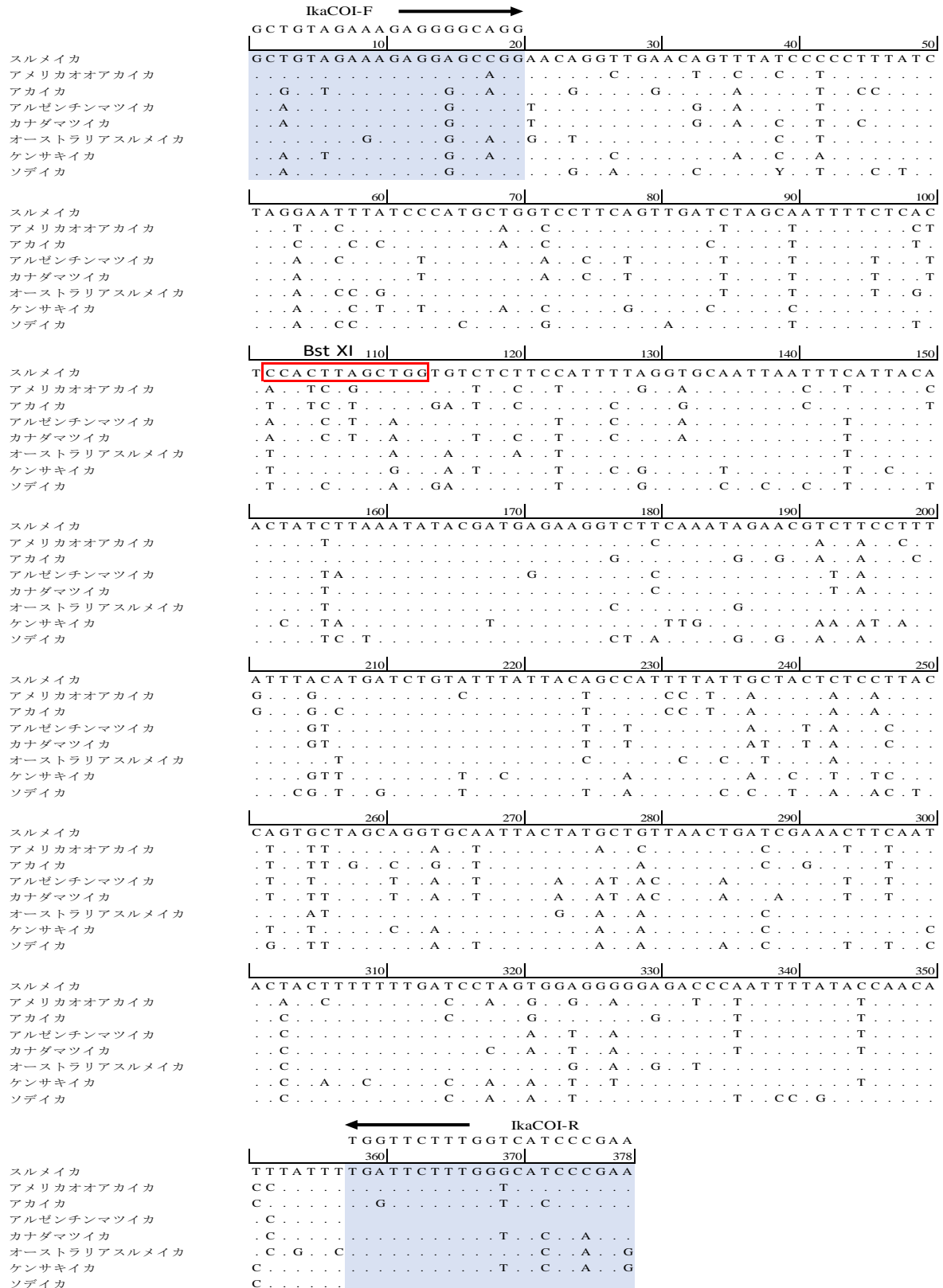


図1 イカ8種のDNA塩基配列

スルメイカ (AB158364)、アメリカオオアカイカ (AB571181)、アカイカ (AB715401)、アルゼンチンマツイカ (AB675089)、カナダマツイカ (AB270933)、オーストラリアスルメイカ (AB270939)、ケンサキイカ (AB675080)、ソデイカ (EU735371) における IkaCOI プライマー対による PCR 産物の DNA 塩基配列 (378 bp) である。スルメイカと共通の塩基は「・」で示し、異なる塩基はその塩基名を記載した。各プライマー領域の上部にプライマー配列を記し、プライマー IkaCOI-F 及び IkaCOI-R の領域を青色で、制限酵素 BstXI 認識部位を四角で囲んで示した。なお、塩基名の Y は T 又は C を表す。

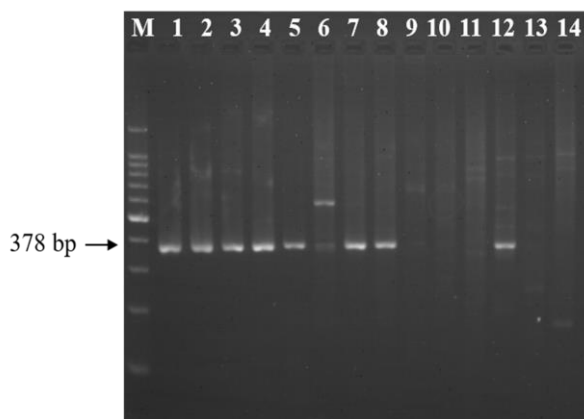


図2 イカ14種のPCRの泳動図

IkaCOI プライマー対による PCR 産物

1: スルメイカ 2: アメリカオオアカイカ 3: アカイカ 4: アルゼンチンマツイカ 5: カナダマツイカ 6: ニュージールランドスルメイカ 7: オーストラリアスルメイカ 8: ケンサキイカ 9: ヤリイカ 10: カリフォルニアヤリイカ 11: アオリイカ 12: ソデイカ 13: コウイカ 14: ヨーロッパコウイカ

M: 100 bp Ladder

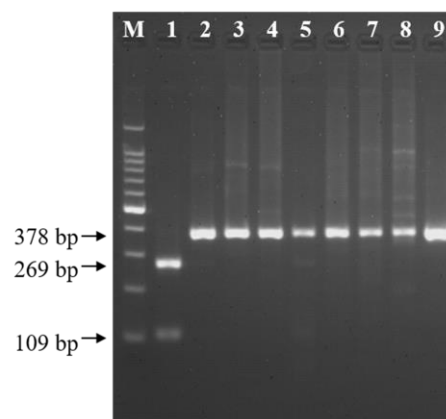


図3 イカ8種のPCR-RFLPの泳動図

IkaCOI プライマー対により PCR 産物が得られた試料を制限酵素 BstXI により処理した。

1: スルメイカ 2: アメリカオオアカイカ 3: アカイカ 4: アルゼンチンマツイカ 5: カナダマツイカ 6: オーストラリアスルメイカ 7: ケンサキイカ 8: ソデイカ 9: 制限酵素未処理 M: 100 bp Ladder

イカフライ（スナック）のように高度に加工された商品については、PCR 増幅がみられないことがあるとの報告⁴⁾があるが、増幅長を短縮した本分析法による PCR-RFLP では、今回の試料としたイカフライ（スナック）7点中2点で増幅が見られず、残り5点では判別が可能であった（表1）。今回のPCRで増幅しなかった商品は、衝撃を与えると商品が割れるような固めの状態であり、一方、増幅した商品は、いわゆる「ソフト」「やわらかい」と謳われている折り曲げることができる状態のものが含まれており、加工度の違いが反映していると考えられた。また、缶詰を1点供したが、PCR産物量が少なかったため、商品によっては判別ができない可能性が推測された。

以上の結果より、加工度により分析できない商品が含まれるものの、乾燥珍味、塩辛、イカの個体が分離できる総菜、冷凍食品及び缶詰といった商品群においてPCR-RFLP法によるスルメイカ判別法は適用可能であった。

4. まとめ

スルメイカは、イカ加工品の主要な原材料であるが、近年のスルメイカ不漁の影響を受け、アメリカオオアカイカなどへの代替が進んでいる。このため、原料に「スルメイカ」を使用している旨表示されている加工品の原材料がスルメイカであるか否かを迅速・簡便にスクリーニング判別法として、PCR-RFLP法を検討した。設計したIkaCOIプライマー対によるPCRでは、種判別に供したイカ類14種のうちスルメイカを含む8種に378 bpの増幅産物が得られ、これら8種を対象とした制限酵素BstXIを用いたPCR-RFLPの結果は、スルメイカのみが切断され、スルメイカ以外の7種は切断されなかった。これにより、スルメイカとその他7種のイカ（アメリカオオアカイカ、アカイカ、アルゼンチンマツイカ、カナダマツイカ、オーストラリアスルメイカ、ケンサキイカ、及びソデイカ）を対象としたPCR-RFLP法によるスクリーニング検査が可能となった。適用可能な加工食品は、乾燥珍味、塩辛、総菜、冷凍食品及び缶詰であった。

文 献

- 1) 新編・世界イカ類図鑑（全国いか加工業協同組合）
- 2) 農林水産省「平成 30 年漁業・養殖業生産統計」
- 3) 若林敏江，柳本 卓：塩基配列分析に基づくスルメイカ不漁期のイカ加工製品原料種判別，日本 DNA 多型学会第 26 回大会講演要旨（2017）
- 4) 若林敏江，柳本 卓，酒井光夫，一井太郎，三木克弘，小林敬典：DNA解析結果に基づくアメリカオオアカイカの利用実態，スルメイカ資源評価協議会報告（平成20 年度），日本海区水産研究所. 74（2009）
- 5) 水産物缶詰及び水産物瓶詰の日本農林規格，農林水産省告示第3110号（平成25年12月24日（最終改正））
- 6) 消費者庁 食品表示基準Q&A別添「魚介類の名称のガイドライン」（平成27年3月）
- 7) 若林敏江，柳本 卓，酒井光夫，一井太郎，三木克弘，小林敬典：mtDNA COI 領域を用いたイカ加工製品の原料種判別，DNA 多型，**17**，144-146（2009）
- 8) 若林敏江：ミトコンドリアDNA塩基配列データに基づく海外イカ加工製品の原料種判別，DNA 多型，**21**，99-102（2013）
- 9) 山下倫明：さかなの産地を調べる，第 3 回成果発表会講演要旨集（平成 17 年度），国立研究開発法人 水産研究・教育機構