

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「フグ等の安全性確保に関する総括的研究」

平成 25 年度分担研究報告書

フグの分類に関する研究（遺伝子解析）

研究分担者 石崎松一郎 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科食品生産科学部門

研究要旨

フグ食中毒は毎年発生しており重篤な場合には死に至ることから、今なお食品衛生上重大な問題である。近年熱帯・亜熱帯海域に生息するドクサバフグの日本沿岸での出現とそれによる食中毒の発生、フグの高毒性化、自然交雑種の頻出など新たな問題も指摘されていることから、フグによる食中毒とフグ毒による中毒に対するリスク管理を強化、見直すことを目的に、近年頻繁に捕獲されるようになった交雑種をターゲットとして、形態学的手法と分子生物学的手法の両手法に基づく正確な交雑フグ種判別法について検討した。交雑フグ種のミトコンドリア DNA の塩基配列から、母系魚種を同定したところ、本研究で鑑別した交雑種のうち、トラフグとマフグの雑種やトラフグとシマフグの雑種のように、従来から存在が知られ、両親種の間隔的な特徴を明瞭に示すものは、外部形態による両親種の推定が可能であり、mtDNA 解析法によってその推定が支持されたが、ゴマフグとショウサイフグの雑種のような両親種の間隔的な特徴を示さないものや、外部形態から両親種を推定することが困難なもの、あるいは過去の類似事例の知見が適用できないものが存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

今年度は、漁獲時あるいは流通過程において確認されるあらゆる交雑フグ種を入手・保管し、それらの筋肉から抽出・精製した全ゲノム DNA を用いて、ミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域を対象とした PCR を行ない、検体の塩基配列を決定するとともに、母系魚種の同定を行った。次に、核 DNA マイクロサテライトマーカーとして V1R、MC1R、MC4R、POMC、ITS1 および ITS2 の各領域をクローニングし、それらの塩基配列から父系魚種の同定に適用可能なプライマーの設計を試みた。

B. 研究方法

1) フグ類の分類に関する研究

試料には日本各地から採集した外観からの形態学的判定に基づく交雑フグ種(トラフグ×クサフグ、トラフグ×マフグ、トラフグ×シマフグ、ショウサイフグ×コモンフグ、コモンフグ×ムシフグ、ショウサイフグ×ゴマフグおよびショウサイフグ×マフグ)計7種10個体を用い、これらの筋肉から DNA 組織キット S および QuickGene-810 (ともに和光純薬工業(株)製)を用

いて全ゲノム DNA を抽出・精製した。次に、全ゲノム DNA を用いてミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の各々約 620bp、390bp を含む部分領域を PCR 増幅した。PCR 増幅に用いたプライマーセットを表 1 に示した。PCR 増幅には TaKaRa EX Taq DNA ポリメラーゼを用い、PCR 反応液は、0.2mL PCR チューブ中に精製した鋳型 DNA 5.0  $\mu$ L、10 $\times$  緩衝液 (TaKaRa) 5.0  $\mu$ L、2.5 mM dNTP mix 4.0  $\mu$ L、20  $\mu$ M 各プライマー 0.75  $\mu$ L、TaKaRa EX Taq DNA ポリメラーゼ 0.4  $\mu$ L を加えた後、全量が 50  $\mu$ L となるように滅菌水を加えた。PCR の温度条件は、98 で 10 秒、53 で 30 秒、72 で 60 秒のサイクルを 30 回行った。PCR 終了後、PCR 断片を template として、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) と自動 DNA シーケンサー (ABI 3130 ジェネティックアナライザ) を用いて得られた PCR 産物の塩基配列を決定し、公的データベースおよび研究室で新たに構築したフグ種専用データベースから雌親種の同定を行った。

次に、サバフグ属 *L. suezensis* のミトコンドリア DNA 全塩基配列の決定を行った。サバフグ属においては、これまで *Lagocephalus suezensis*

(カイユウセンニンフグ)のミトコンドリア DNA 塩基配列情報が得られていなかった。今年度、トルコ地中海産ではあるが外観による判別によって *L. suezensis* と判断された標本が得られたため、サバフグ属交雑種の判別に資することを目的に、ミトコンドリア DNA 全塩基配列の決定を行った。すなわち、クロマグロ、マアジ、マダイ、カツオおよびマスノスケの塩基配列を基に設計されたおおよそ 20-30 bp のユニバーサルプライマーを 7 セット構築し、常法によって抽出した全ゲノム DNA を用いてプライマーウォーキング法により、ミトコンドリア DNA 全塩基配列を決定した。

## C. 研究結果

### 1) フグ類の分類に関する研究

今回採集した交雑フグ種 7 種 10 個体につき、ミトコンドリア DNA 塩基配列に基づく雌親種の同定を行った結果、形態学的鑑別法による推定どおりの結果であったものは 5 種 8 個体であり、2 種( ショウサイフグ × コモンフグの 1 個体および コモンフグ × ムシフグの 1 個体 )については形態学的鑑別法による推定と異なった(表 2)。

カイユウセンニンフグのミトコンドリア DNA 全塩基配列をすでに解析されている他のサバフグ種と比較した結果、ミトコンドリア DNA の塩基組成は他のサバフグ種と大きな差異は認められなかった(表 3)。しかしながら、分子系統樹の結果から、サバフグ種はセンニンフグ、カイユウセンニンフグのグループとその他のグループで大きく分岐し、さらにその後カイユウセンニンフグがある時点でセンニンフグから分岐したことがわかった(図 1)。

## D. 考察

### 1) フグ類の分類に関する研究

トラフグ × クサフグ 1 個体およびトラフグ × マフグの交雑種 2 個体は、体表の小棘や斑紋の形状、体側中央の白点および黄色縦帯の形状から、両親種をトラフグおよびクサフグあるいはマフグと推定した。mtDNA 解析法によりトラフグ × クサフグ 1 個体およびトラフグ × マフグ 2 個体の母系魚種はそれぞれトラフグおよびマフグと同定されたことから、形態学的鑑別法による推定が正しいことが確認された。

トラフグ × シマフグの交雑種 1 個体は、不規則

な斜め模様と大黒斑がトラフグとシマフグの間を示し、白い臀鰭がトラフグの特徴を示していたため、両親種をトラフグおよびシマフグと推定した。mtDNA 解析法では母系魚種がシマフグと同定され、本個体においても形態学的鑑別法による推定が正しいことが確認された。

ショウサイフグ × コモンフグの交雑種 3 個体は、背面および腹面の小棘はコモンフグ、体表の斑紋はショウサイフグ、黄白色の臀鰭は両者の中間をそれぞれ示していたため、両親種をショウサイフグおよびコモンフグと推定したが、mtDNA 解析法によって母系魚種を同定した結果、1 個体はゴマフグ、2 個体はショウサイフグとの判定結果が示され、形態学的鑑別法と一部異なる結果となり、形態学的鑑別法が必ずしも完全ではない場合があることが示唆された。

コモンフグ × ムシフグの交雑種 1 個体においても、体表における円形・虫食い状の模様からコモンフグとムシフグの中間雑種と推定したが、mtDNA 解析法による母系魚種がシマフグと同定され、形態学的鑑別法と異なる結果となった。

ショウサイフグ × ゴマフグおよびショウサイフグ × マフグの交雑種 2 個体は、小棘の分布および体表の斑紋によってショウサイフグとゴマフグあるいはショウサイフグとマフグの中間と推定されたため、それぞれショウサイフグ × ゴマフグおよびショウサイフグ × マフグの雑種と推定した。mtDNA 解析法ではそれぞれ母系魚種がゴマフグおよびショウサイフグと同定された。

本研究で鑑別した交雑種のうち、トラフグとマフグの雑種やトラフグとシマフグの雑種のように、従来から存在が知られ、両親種の中間的な特徴を明瞭に示すものは、外部形態による両親種の推定が可能であり、mtDNA 解析法によってその推定が支持されたが、ゴマフグとショウサイフグの雑種のような両親種の中間的な特徴を示さないものや、外部形態から両親種を推定することが困難なもの、あるいは過去の類似事例の知見が適用できないものが存在することが明らかとなった。

したがって、報告や事例の蓄積が十分とは言えない交雑種に関しては、外部形態のみで両親種を判別することには注意が必要であると思われる。

一方、核 DNA マイクロサテライト領域を対象にした父系魚種の同定に関しては、トラフグ属、サバフグ属で個別の領域設定が必要であることがわかり、マーカーとして有効と考えられる V1R,

MC1R, MC4R, POMC, ITS1 および ITS2 領域のクローニングを個々の個体で確認中である。これらの情報を基に、父系魚種の同定に向けたプライマーの構築を行っていく計画である。

## **E. 結論**

### **1) フグ類の分類に関する研究**

交雑フグ種の親種判別に関しては、外部形態のみで両親種を判別することには注意が必要であり、遺伝子による判別法を併用して慎重に判定する必要があると考えられた。

## **F. 健康危険情報**

特になし

## **G. 研究発表**

### **1. 論文発表**

1) なし

### **2. 学会発表**

1) Acar Caner, 石崎松一郎, 長島裕二: Complete mtDNA sequences of common Turkish puffer fish species and comparison among species. 平成26年度日本水産学会春季大会, 2014年3月, 北海道函館市.

## **H. 知的財産権の出願・登録状況**

1) エビ類検出用プライマーセット, 特許第5483173号, 2014年2月28日.