

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 26 年度分担研究報告書
遺伝子解析によるフグの種判別

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、近年頻りに捕獲されるようになった交雑種をターゲットとして、分子生物学的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。昨年度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と mtDNA 解析法による母系種の同定が合致した。一方、父系種の同定に用いた核 DNA マイクロサテライトマーカ（AGAT repeat）解析では、反復回数がトラフグおよびマフグでそれぞれ 33-40 回および 35 回であり、種間差が明瞭ではなかった。しかしながら、GAAAG repeat 解析ではトラフグおよびマフグで顕著な差が確認できたことから、父系種同定に使用可能であると判断された。

A. 研究目的

今年度は、長崎大学水産学部 荒川 修 教授から分与された父系および母系系統が既知の人工交配フグ種を対象に、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 解析による母系魚種の同定および各種核 DNA マイクロサテライトマーカ解析による父系魚種の同定を試みた。

B. 研究方法

試料には長崎大学水産学部 荒川 修 教授から分与された人工交配フグ種（トラフグ（ ）×マフグ（ ）3 個体およびトラフグ（ ）×マフグ（ ）3 個体）ならびに、研究室保管のトラフグ、マフグ、カラスを用い、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 μ L、10×緩

衝液（TaKaRa）5.0 μ L、2.5 mM dNTP mix 4.0 μ L、20 μ M 各プライマー 0.75 μ L、TaKaRa EX Taq DNA ポリメラーゼ 0.4 μ L を加えた後、全量が 50 μ 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母系種の同定を行った。一方、父系種同定に関しては、父系種同定に使用可能なマイクロサテライトマーカの選別を目的に、まずトラフグにおいて NCBI データベースに登録されている 244 個のマイクロサテライト遺伝子座のうち、トラフグ内で比較的多様性が低いと想定される遺伝子座を 2 種選択した。それらのマイクロサテライト領域を含むプライマーを設計し、トラフグ属 3 種および人工交配フグ個体の DNA を鋳型として PCR を行った（表 2）。PCR 産物を 4%アガロースゲル電気泳動により検出することで、多型の存否を確認した。なお、PCR は 25 μ l の反応系で行い、DNA 50 ng、TaKaRa EX Taq

DNA ポリメラーゼ 0.125 μ l、10 \times EX Taq buffer 2.5 μ l、dNTP mixture (2.5 mM each) 2 μ l、プライマーの終濃度は各 0.2 μ M とした。反応条件は、98 60 秒、各プライマーのアニーリング温度で 30 秒、72 60 秒のサイクルを 40 回とした。最終的に、塩基配列を決定し、マイクロサテライトの反復回数を測定した。

C. 研究結果

今回提供された人工交配フグ種(トラフグ() \times マフグ())3 個体およびトラフグ() \times マフグ()3 個体の外観を図 1 に示す。トラフグを母系とする交配個体にはトラフグの特徴がより強く発現されており、一方マフグを母系とする交配個体にはマフグの特徴がより強く発現される傾向であることがわかった。そこで、まずこれらの人工交配フグ種につき、ミトコンドリア DNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 領域の塩基配列に基づいて母系種の同定を行った結果、すべての個体で交配通りに母系種を同定することができた(表 3)。

一方、父系種の同定に用いることができるマイクロサテライトマーカーの選抜を行った結果、アガロースゲル電気泳動距離に違いが見られたマイクロサテライト遺伝子座は ATAG 反復配列および GAAAG 反復配列であったことから、これら 2 種につき解析を行った。AGAT 解析の結果、反復回数は同一種においても異なり、トラフグ 3 個体では 33-40 回、カラス 6 個体では 18-47 回、マフグ 1 個体では 35 回だったことから、この 3 種において明瞭な ATAG 反復回数の違いを確認することはできなかった(表 4、図 2)。一方、GAAAG 反復配列の解析では、トラフグおよびマフグ間で電気泳動距離が異なる反復配列を示すことが認められた(図 3)。泳動距離から推定される PCR 産物の分子量は、トラフグおよびマフグでそれぞれ約 200 および 140bp であった。そこで、人工交配フグ種を対象に、GAAAG 反復回数の普遍性を確認したところ、両親種(トラフグとマフグ)の分子量の各位置に複数のバンドが見られた(図 4)ことから、トラフグ() \times マフグ()1 個体におけるマイクロサテライト解析を行ったところ、反復回数は 8 回、9 回、23 回の 3 遺伝子型が存在し、そのうち 8 回または 9 回の反復回数がマフグ由来、23 回はトラフグ由来であると推測された。

D. 考察

長崎大学水産学部 荒川 修 教授から分与された人工交配フグ種(トラフグ() \times マフグ())3 個体およびトラフグ() \times マフグ()3 個体は、体表の斑紋の形状、体側中央の白点および黄色縦帯の形状ならびに尻鰭の色から、トラフグおよびマフグ両種の特徴を有しており、典型的な交雑種であると推定された。しかしながら、トラフグを母系とする交配個体にはトラフグの特徴がより強く発現されており、一方マフグを母系とする交配個体にはマフグの特徴がより強く発現される傾向であることもわかった。

ミトコンドリア DNA 解析法により、トラフグ() \times マフグ() 個体およびトラフグ() \times マフグ() 個体の母系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種の推定は主として母系種の特徴が大きく反映されている可能性が示唆されるとともに、ミトコンドリア DNA 解析法は交雑種の母系種同定に極めて有効な判定法であることが確認された。

一方、父系種同定に用いることができる核 DNA マイクロサテライト領域の探索を行ったところ、トラフグおよびマフグ間の交雑種を対象にした場合において、GAAAG 反復配列の回数の差から父系種同定が可能である可能性が示唆された。すでに公開されているトラフグゲノムデータベースでは、今回標的にした GAAAG は 22 反復、推定 PCR 産物分子量は 190 bp であることが確認されている。マフグのゲノムデータが未だに提供されていない現状では、数多くのマフグ個体から GAAAG 反復の Repeat 範囲を調べ、マフグにおける GAAAG がトラフグで確認された反復回数とは明らかに異なった、明瞭でかつ普遍的である反復回数を示すことを明らかにする必要がある。さらに、他のトラフグ属あるいはサバフグ属においても GAAAG がマーカーとして有効であるかどうかを検証することが必要であると考えられる。

E. 結論

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。母系種においては、今回確立したミトコンドリア DNA 法によって確実に同定できることが確認された。一方、父系種に関しては、

トラフグおよびマフグからなる交雑種においては GAAAG 反復配列から推定できる可能性が示唆されたが、他のマイクロサテライト領域も含め、さらなる追試が必要であると考えられた。

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:Analysis of three Lessepsian puffers' complete mitochondrial genomes with phylogenetic consideration. 平成 27 年度日本水産学会春季大会, 2015 年 3 月, 東京都港区 .

2) 臼井芽衣, 徐 超香, 石崎松一郎, 長島裕二 : ショウサイフグの交雑種と推定されるフグの種判別と毒性 .平成 27 年度日本水産学会春季大会 , 2015 年 3 月, 東京都港区 .

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) なし