

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 27 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における両親種判別法の開発を検討した。今年度は、まずトラフグとマフグ間の交雑種に焦点を絞り、人工交雑種（トラマおよびマトラ）計 14 個体、人工交雑種の両親、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したともの推定された交雑個体 4 個体を用い、mtDNA を鋳型として 16S rRNA およびシトクローム *b* の各部分領域による母系種の判別を行なうとともに、トラフグおよびマフグの 2 種を明確に区別しうる核 DNA マイクロサテライト（MS）マーカーの選抜を行った。その後、判別に適用可能な MS マーカーにおける PCR 条件の最適化の検討および PCR 産物の塩基配列解析に基づく MS の反復回数を決定したのち、最終的にトラフグ 26 個体およびマフグ 20 個体を用いて、再現性の検証を行った。さらに、自然交雑種を用いて本 MS マーカーの有効性を検証した。

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トラフグおよびマフグ間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（mtDNA）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ー解析による父系魚種の同定を試みた。

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（ ）11 個体）ならびに、人工交雑種の両親、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体を用いた。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㈱製）を用いて全ゲノム DNA を抽出・精製した。つぎに、全ゲノム DNA を用いて

mtDNA 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 μL、10×緩衝液（TaKaRa）5.0 μL、2.5 mM dNTP mix 4.0 μL、20 μM 各プライマー 0.75 μL、TaKaRa EX Taq DNA ポリメラーゼ 0.4 μL を加えた後、全量が 50 μL 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。

つぎに、トラフグおよびマフグにおいて種特異的な MS マーカーを探索することを目的に、両親種が既知である人工交雑種およびトラマの両親を対象に、計 11 個の MS 領域を標的として PCR を行い、トラフグおよびマフグの 2 種を明確に区

別しうる MS の選抜を行った。その後、判別に適用可能な MS マーカーにおける PCR 条件の最適化の検討および PCR 産物の塩基配列解析に基づく MS の反復回数を決定したのち、最終的にトラフグ 26 個体およびマフグ 20 個体を用いて、再現性の検証を行った。さらに、自然交雑種を用いて本 MS マーカーの有効性を検証した。

## C. 研究結果

### 1) フグ類の分類に関する研究

今回人工交配フグ種トラマ(トラフグ( ) × マフグ( ))3 個体およびマトラ(トラフグ( ) × マフグ( ))3 個体ならびに、人工交配種の両親である単一系統のトラフグおよびマフグ、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体につき、mtDNA 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、トラマおよびマトラはともに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 2)。人工交配種の両親である単一系統のトラフグおよびマフグ、形態学的特徴から単一系統と推定されたトラフグ 4 個体およびマフグ 4 個体、形態学的特徴からトラフグとマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 4 個体においても、母系種を同定することが可能であった(表 2)。したがって、mtDNA 中の 16S rRNA およびシトクローム *b* 部分塩基配列はフグ種における母系種判別に有効であることが明らかとなった。

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 反復配列であったが、GAAAG 反復配列の解析においてのみ、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 1)。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 194 ~ 209 および 125 ~ 145bp であった(図 1 中の No.15 および 16)。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ことから、反復回数 5 ~ 9 回がマフグ由来、20 ~ 25 回はトラフグ由来で

あると推測された(表 3)。

そこで、形態学的にトラフグおよびマフグ間の自然交雑であろうと推定される交雑種 4 個体を用いて本 MS マーカーの有効性を検証したところ、トラフグ由来とマフグ由来の各 MS 反復回数が検出された(表 4)。このうち、2 個体は母系種がトラフグであることから父系種はマフグ、残りの 2 個体は母系種がマフグであることから父系種はトラフグであると判定でき、本法が両親種判別に適用できることを明らかにした。

## D. 考察

### 1) フグ類の分類に関する研究

今回、トラフグおよびマフグ間に焦点を絞って、mtDNA 解析法による母系種の同定および GAAAG マーカーを用いた核 DNA による父系種同定法の構築を試みた結果、従来通り、mtDNA 解析法による母系種同定の有効性が再確認されるとともに、新たに核 DNA による GAAAG 反復配列の回数の差から父系種同定が可能であることが示された。この MS 領域は、人工交配種すべてにおいて、トラフグ由来の 194 ~ 209 bp (反復回数 20-25 回) およびマフグ由来の 125 ~ 145 bp (反復回数 5-9 回) の PCR 産物が得られ、保存性が高く普遍的であることが確認された。また、一般的に流通している市販トラフグでは 26 個体中 20 個体(77%)、マフグでは 20 個体中 14 個体(70%)で上述した分子量の PCR 産物が得られた(図示せず)。なお、市販されているトラフグおよびマフグにおいて 70 ~ 77% 程度の再現性を示しているが、これはおそらく市販されているフグの一部が必ずしも単一系統ではない可能性があるものと考えている。

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

### 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。母系種においては、mtDNA 法によって確実に同定できることが確認され、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。しかしながら、その他の交雑種、例えばショウサイフグ、コモンフグ、ゴマフグなどからなる交雑種に本 GAAAG マーカーが適用できるかどうかは定かではない。他のマイクロサテライト領域も含め、次年度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) A. Kiriake, A. Ohta, E. Suga, T. Matsumoto, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Comparison of tetrodotoxin uptake and gene expression in the liver between juvenile and adult tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Toxicon* doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.12.007 (in press).
- 2) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二: しらす加工品に混入したフグ稚魚の種判別と毒性. *食品衛生学雑誌* 2016; 57:13-18.
- 3) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. *Toxicon* 2015; 93: 98-102.

### 2. 著書・総説

- 1) 石崎松一郎, 臼井芽衣 (2016): フグの分類 - 最前線 -. *Sunatec e-Magazine*, vol. 120 (1) (2016).

### 3. 学会発表

- 1) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の種判別と毒性. 第 109 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 5 月, 東京都江東区.

- 2) 臼井芽衣, 石崎松一郎, 長島裕二: マイクロサテライト遺伝子座を用いた交雑フグ種の両親種同定. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月, 宮城県仙台市.
- 3) 桐明 絢, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすに混入したフグ稚魚の遺伝子による種判別. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 10 月, 京都府京都市.
- 4) 岡山桜子, 桐明 絢, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬け製造工程における毒成分変化. 第 110 回日本食品衛生学会学術講演会, 2015 年 10 月, 京都府京都市.
- 5) 大木理恵子, 石橋敏章, 石崎松一郎, 長島裕二: ボウシュウボラおよびキンシバイの毒性とフグ毒成分. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月, 東京都港区.
- 6) 桐明 絢, 太田 明, 岡山桜子, 松浦啓一, 石崎松一郎, 長島裕二: しらすへのフグ稚魚の混入 種判別とフグ毒分析. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 2016 年 3 月, 東京都港区.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) なし