

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）

「マリントキシンのリスク管理に関する研究」

平成 28 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 東京海洋大学学術研究院食品生産科学部門

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、近年頻繁に捕獲されるようになったフグ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、まずマフグとシマフグ間の交雑種に焦点を絞り、自然交雑種 20 個体（うちマフグとシマフグ間で自然交配したものと推定された 1 個体）、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 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うとともに、マフグおよびシマフグの 2 種を明確に区別しうる核 DNA マイクロサテライトマーカーの選抜を行った。その後、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いて、再現性の検証を行った。

A. 研究目的

今年度は、東京都市場衛生検査所および水産総合研究センターから分与された父系および母系系統が未知の個体を含むトラフグ属自然交雑フグ種を対象に、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を行い、形態学的特徴からマフグとシマフグ間で自然交配したものと推定された交雑個体 1 個体を対象に、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

試料には東京都市場衛生検査所から分与された自然交雑フグ種 19 個体ならびに水産総合研究センターから分与された自然交雑フグ種 1 個体、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いた。今回用いた自然交雑種を表 1 に示した。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(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 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 2 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 50ng、10× 緩衝液 (TaKaRa) 5.0 $\mu$ L、2.5mM dNTP mix 4.0 $\mu$ L、10 $\mu$ M 各プライマー 1.0 $\mu$ L、TaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ 0.25 $\mu$ 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 16S rRNA 領域では、98 で 10 秒、53 で 30 秒、72 で 60 秒のサイクルを 30 回行い、シトクローム *b* 領域では 98 で 10 秒、55 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、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。

次に、マフグおよびシマフグにおいて種特異的なマイクロサテライトマーカーを探索することを目的に、自然交雑フグ種全 20 個体を対象に、計 11 個のマイクロサテライト領域を標的として PCR を行い、マフグおよびシマフグの 2 種を明確に区別しうるマイクロサテライトの選抜を行った。その後、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 個体を用いて、再現性の検証を行った。

## C. 研究結果

### 1) フグ類の分類に関する研究

今回自然交雑フグ種 20 個体、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 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、自然交雑フグ種 20 個体はすべての個体で母系種を同定することができた(表 3)。形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグ 20 個体およびシマフグ 10 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 4)。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になった。

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 TATC 反復配列、TGTA 反復配列、TAGA 反復配列および AAAG 反復配列であったが、TATC 反復配列の解析においてのみ、マフグおよびシ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、マフグおよびシマフグでおよそ 350bp および 520bp であった(図 1 中の No.1)。そこで、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグおよびシマフグを対象に、TATC 反復配列の普遍性を確認したところ、両親種(マフグとシマフグ)の分子量の各位置に複数のバンドが見られたことから、分子量 350bp がマフグ由来、520bp はシマフグ由来であると推測された(図 1 中の No.2-5, No.6-9)。このことから、本法が両親種判別に適用できる可能性が極めて高い。

## D. 考察

### 1) フグ類の分類に関する研究

今回、自然交雑フグ種 20 個体につき mtDNA 解析法による母系種の同定を行い、マフグおよびシマフグ間に焦点を絞り、TATC 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。その結果、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 TATC 反復配列の電気泳動距離の違いから父系種同定に適用可能であることが示された。こ

のマイクロサテライト領域は、マフグとシマフグ間交雑種と推定された個体(Hybrid No.2)において、マフグ由来の 350bp およびシマフグ由来の 520bp の PCR 産物が得られた。また、形態学的特徴から単一系統と推定されたマフグでは 20 個体中 13 個体(65%)、シマフグでは 10 個体中 8 個体(80%)で上述した分子量に近い PCR 産物が得られた(図示せず)。しかしながら、今回用いたマフグおよびシマフグにおいて、複数本のバンドを得た個体も存在した。これはマフグおよびシマ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、昨年度トラフグおよびマフグからなる交雑種における GAAAG 反復配列の有効性を明らかにし、今年度はマフグおよびシマフグからなる交雑種において TATC 反復配列から推定できる可能性を明らかにした。しかしながら、現在マイクロサテライトの反復回数は未決定であるため、本 TATC マーカーが適用できるかどうかは定かではない。さらに、その他の交雑種、例えばシヨウサイフグ、コモンフグ、ゴマフグなどからなる交雑種に本 TATC マーカーが適用できるかどうかも定かでない。他のマイクロサテライト領域も含め、次年度も引き続き、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* 2016; 111: 6-12.
- 2) C. Acar, S. Ishizaki, Y. Nagashima: Toxicity

of the Lessepsian pufferfish *Lagocephalus sceleratus* from eastern Mediterranean coasts of Turkey and species identification by rapid PCR amplification. Eur. Food Res. Technol. 2016; DOI 10.1007/s00217-016-2721-1.

1) なし

- 3) 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.

## 2. 著書・総説

1) なし

## 3. 学会発表

- 1) T. Matsumoto, A. Kiriake, S. Ishizaki, S. Watabe, Y. Nagashima: Pharmacokinetics and biliary excretion of tetrodotoxin in the marine pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration. 7th World Fisheries Congress in Busan, Korea, May, 2016.
- 2) 徐 超香, 太田 晶, 岡山桜子, 崔 浩, 石崎松一郎, 長島裕二: 食用フグの見直し - 日本沿岸ホシフグの安全性評価 - .第 112 回日本食品衛生学会学術講演会, 北海道函館市, 平成 28 年 10 月.
- 3) 岡山桜子, 永井 慎, 石崎松一郎, 長島裕二: フグ卵巣ぬか漬けにおける減毒要因の検討 .第 112 回日本食品衛生学会学術講演会 .北海道函館市, 平成 28 年 10 月.
- 4) 松本拓也, 北島冴美, 青柳 充, 三苦好治, 石崎松一郎, 長島裕二: トラフグ薬物排泄トランスporter-Bcrp をコードする Abcg2 遺伝子のクローニング. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 29 年 3 月.
- 5) 大木理恵子, 松本拓也, 石崎松一郎, 長島裕二: 組織培養法によるパイのテトロドトキシン取り込み .平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 29 年 3 月.
- 6) 崔 浩, 横塚峻介, 岡山桜子, 石崎松一郎, 長島裕二: 凍結解凍によるコモフグ筋肉へのフグ毒の移行. 平成 29 年度日本水産学会春季大会, 東京都港区, 平成 29 年 3 月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況