

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 29 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 11 個体、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、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、マイクロサテライトマーカーを併用したより正確な両親種の判別を目指し、判別に適用可能な MS マーカーにおける 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。

A. 研究目的

今年度は、長崎大学水産学部荒川修教授、高谷智裕教授、水産総合研究センター柳本卓博士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、それらの筋肉もしくは鱗から抽出・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)、水産総合研究センターから分与された人工交配フグ種（トラフグ (♂) ×マフグ (♀) 5 個体）ならびに、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 個体を用いた。これらの筋肉もしくは鱗から 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。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 50ng、10×緩衝液 (TaKaRa) 5.0μL、2.5mM dNTP mix 4.0μL、10μM 各プライマー 1.0μL、TaKaRa Ex Taq DNA ポリメラーゼ 0.25μL を加えた後、全量が 50μL 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。

つぎに、トラフグおよび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、両親種が既知である人工交雑種および単一系統と推定されたトラフグ、マフグを対象に、計 8 個のマイクロサテライト領域を標的として 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マイクロサテライトの選抜を行った。その後、判別に適用可能な MS マーカー

における PCR 産物の塩基配列解析に基づく MS の反復回数を決定した。

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 (♀)) 8 個体ならびに、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)。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 CATC 反復配列、GCA 反復配列、AGC 反復配列、AATC 反復配列であったが、GCA 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およそ 370bp および 270bp であった (図 1 中の Torafugu, Mafugu)。そこで、人工交配フグ種を対象に、GCA 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バンドが見られたことから、反復回数 6 回がマフグ由来、33~34 回がトラフグ由来であると推測された (表 3)。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、トラフグおよびマフグ間に焦点を絞り、mtDNA 解析法による母系種の同定および GCA 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 GCA 反復配列の回数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、人工交配種において、トラフグ由来の 344-347 bp (反復回数 33-34 回) およびマフグ由来の 262 bp (反復回数 6 回) 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トラフグおよびマフグで上述した分子量に近い PCR 産物が得られた (図 1 中の Torafugu, Mafugu)。本マイクロサテライトマーカーはトラフグおよびマフグにおいて有効であると考えられる。今後は、他のトラフグ属あるいはサバフグ属においても GCA がマーカーとして有効であるかどうかやトラフグおよびマフグにおける GCA の再現性を確認する必要がある。

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。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、GCA 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、現在マイクロサテライトの反復回数は未決定の個体が多いため、本 GCA 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 GCA 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

なし

2. 著書・総説

なし

3. 学会発表

1) N. Koyama, M. Usui, S. Ishizaki, T. Yanagimoto, Y.

Nagashima: Species identification of hybrid pufferfish between *Takifugu rubripes* and *Takifugu porphyreus*. International Symposium on Pufferfish in Bodrum, Turkey, 2017. 13-14 October, 2017.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 母系種の判別に用いたプライマー

プライマー	配列
16Sar-L	5' -CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'
16Sbr-H	5' -CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'
L14317Glu	5' -CAGGATTTTAACCAGGACTAATGGCTTGAA-3'
H15149	5' -CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'

表2 人工交雑種および単一系統種の母系種判別結果

Sample	16S rRNA		cyt <i>b</i>	
	Species	Identify (bp)	Species	Identify (bp)
Torama	1	Torafugu	Torafugu , Karasu	396/396
	2	Torafugu	Torafugu , Karasu	392/392
	3	Torafugu	Torafugu , Karasu	388/388
Matora	1	Mafugu , Mefugu	Mafugu	408/408
	2	Mafugu , Mefugu	Mafugu	404/404
	3	Mafugu , Mefugu	Mafugu	405/405
	4	Mafugu , Mefugu	Mafugu	401/401
	5	Mafugu , Mefugu	Mafugu	401/401
	6	Mafugu , Mefugu	Mafugu	406/406
	7	Mafugu , Mefugu	Mafugu	412/412
	8	Mafugu , Mefugu	Mafugu	407/407
Torafugu	1	Torafugu	Torafugu , Karasu	410/411
	2	Torafugu	Torafugu , Karasu	418/418
	3	Torafugu	Torafugu , Karasu	390/390
	4	Torafugu	Torafugu , Karasu	390/392
Mafugu	1	Mafugu , Mefugu	Mafugu	343/343
	2	Mafugu , Mefugu	Mafugu	372/373
	3	Mafugu , Mefugu	Mafugu	400/400
	4	Mafugu , Mefugu	Mafugu	412/413

表3 人工交雑種におけるマイクロサテライト解析結果

Sample		GCA repeat	Molecular weight (bp)
Torama	1	6/-	262/-
Matora	1	6/-	262/-
	3	-/34	-/347
	4	6/33	262/344

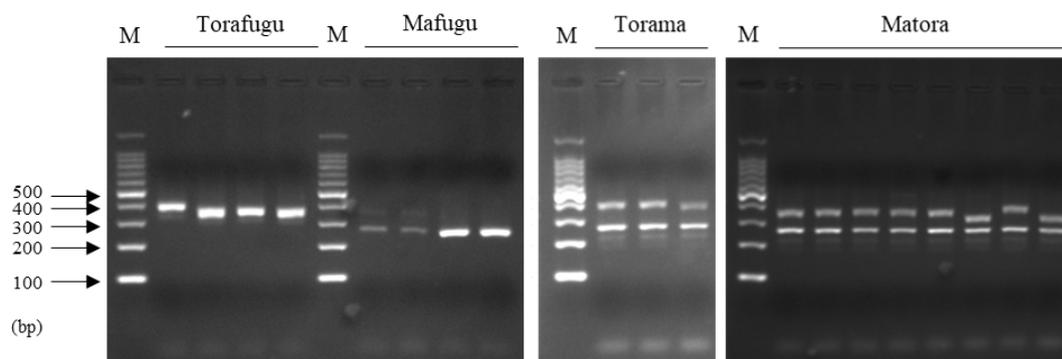


図1 トラフグ、マフグおよび人工交雑種の GCA 反復配列における泳動パターン

M; マーカー, Torafugu; 単一系統トラフグ, Mafugu; 単一系統マフグ, Torama; トラフグ-マフグ間人工交雑種 (トラ (♀) × マ (♂)), Matora; トラフグ-マフグ間人工交雑種 (トラ (♂) × マ (♀))