

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

フグ交雑種の両親種判別法に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小山, 夏美 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/2145

修士学位論文

フグ交雑種の両親種判別法に関する研究

平成 30 年度
(2019 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
食機能保全科学専攻

小山 夏美

修士学位論文

フグ交雑種の両親種判別法に関する研究

平成 30 年度
(2019 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
食機能保全科学専攻

小山 夏美

修士学位論文内容要旨
Abstract

専攻 Major	食機能保全科学	氏名 Name	小山 夏美
論文題目 Title	フグ交雑種の両親種判別法に関する研究		

【目的】フグは神経毒の一種であるテトロドトキシンを保持しており、その強度や有無は種によって異なるため、厚生労働省通知にて食用可能な種類および部位が定められている。フグ種の判別は従来から形態学的特徴を基に行われているが、近年、自然交雑種と推定される個体が頻繁に出現しており、形態学的手法による種判別が困難になっている。フグの可食部位は種によって異なるため、交雑種を食用とする際は両親種の判定が極めて重要であり、正確な種判別を行う必要がある。そこで本研究では、トラフグとマフグ間の交雑種を対象に、ミトコンドリア DNA (mtDNA) および核 DNA 上のマイクロサテライト (MS) 領域を用いた精度の高い両親種判別法を開発し、本法の再現性および適用性を検証した。

【方法】試料にはトラフグとマフグ間の人工交雑種 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、マフグ各 4 個体、トラフグ属種間の自然交雑種 27 個体を用いた。まず、試料の筋肉もしくは鱗から全ゲノム DNA を常法によって抽出した。つぎに、mtDNA 中の 16S rRNA および *cyt b* 部分領域を PCR 増幅し、母系種の判別を行った。

続いて、トラフグとマフグにおける種判別に適用可能な MS マーカーを探索することを目的に、両親が既知の人工交雑種、単一系統と推定されたトラフグおよびマフグにつき 8 個の MS 領域を対象として PCR 増幅し、トラフグとマフグの種判別に適用可能な MS マーカーを選抜した。種判別に適用可能な MS 領域における PCR 産物の塩基配列および反復配列の回数を決定し、単一系統と推定されるトラフグ、マフグ各 26 個体を用いて再現性を検証した。さらに、トラフグ属種間の自然交雑種 27 個体を用いて本 MS マーカーの適用性を検証した。

【結果】mtDNA 解析により、16S rRNA および *cyt b* 部分領域塩基配列を用いて、人工交雑種、自然交雑種、単一系統と推定された種の母系種判別が可能であった。トラフグとマフグの種判別に適用可能な MS マーカーの探索を行った結果、GCA 反復配列から構成される MS 領域が有効であることが明らかになった。人工交雑種における本 MS 領域の反復回数は、トラフグ由来の 23-42 回 (314-371 bp) およびマフグ由来の 6 回 (262 bp) であり、保存性が高く普遍的であることが確認された。また、単一系統トラフグでは 28-44 回 (329-377 bp)、マフグでは 6-7 回 (262-265 bp) であることが確認され、トラフグとマフグ間自然交雑種 6 個体においてもトラフグ由来とマフグ由来の MS 反復回数が検出された。そのうち 4 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、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と判定され、本 MS 領域はトラフグとマフグ間交雑種の両親種判別に適用可能であることが明らかになった。一方、他種間の自然交雑種においては本 MS マーカーによる父系種の判定が困難であり、他種間交雑種の両親種判別には適さないと考えられた。

目次

序論.....	1
第1章 ミトコンドリア DNA を用いた母系種判別.....	6
1-1 目的.....	6
1-2 方法.....	6
1-2-1 試料.....	6
1-2-2 ゲノム DNA の抽出.....	7
1-2-3 16S rRNA および <i>cyt b</i> 領域を対象とした PCR 増幅.....	7
1-2-4 PCR 産物の精製.....	8
1-2-5 塩基配列の決定.....	8
1-3 結果および考察.....	9
第2章 父系種判別のための核 DNA マイクロサテライトマーカの選抜.....	34
2-1 目的.....	34
2-2 方法.....	34
2-2-1 試料.....	34
2-2-2 マイクロサテライト領域を対象とした PCR 増幅.....	34
2-2-3 PCR 産物の精製.....	35
2-2-4 サブクロニング.....	35
2-2-5 塩基配列および反復回数の決定.....	36
2-3 結果および考察.....	37
第3章 マイクロサテライトマーカの適用性の検証.....	51
3-1 目的.....	51
3-2 方法.....	51
3-2-1 試料.....	51
3-2-2 選抜したマイクロサテライト領域を対象とした PCR 増幅.....	51

3-2-3 マイクロサテライト解析	52
3-3 結果および考察.....	53
第4章 総合考察.....	67
謝辞.....	72
引用文献.....	73

序論

近年、日本では食の安全を脅かす事件や事故が多発しているが、食の安全を脅かす要因の一つとして食中毒が挙げられる。厚生労働省によると、平成 20 年から 29 年の 10 年間で食中毒の発生件数は 11,095 件、患者数は 218,430 人、死者数は 52 人に及ぶ¹⁾。食中毒の原因物質としては、細菌、ウイルス、化学物質、自然毒などが挙げられる。平成 20 年から 29 年の 10 年間でフグを原因とした自然毒食中毒発生件数は 230 件、患者数は 332 人、死者数は 6 人である¹⁾。食中毒全体に対するフグ食中毒の割合は、発生件数は約 2.1%、患者数は約 0.2%と極めて小さいが、死者数は約 11.5%を占める。そのため、フグは高致死率を伴う有毒な食品として位置づけられ、フグによる食中毒は食品衛生上極めて重要である。一方で、フグは日本の食文化を代表する水産物として古くから親しまれており、農林水産省によると、平成 29 年におけるフグの年間漁獲量は 8,200 t (うち 3,800 t は養殖漁業) であることから、極めて価値の高い水産物であるといえる²⁾。

フグによる食中毒の原因物質は、フグの体内に蓄積されているテトロドトキシン (tetradotoxin, 以下 TTX と示す) であり、TTX はナトリウムチャンネルに作用する神経毒の一種である。フグ毒による中毒症状は食後 20 分から 3 時間程度で現れる³⁾。中毒症状は臨床的に 4 段階に分けられ、まず、第 1 段階として口唇部および舌端、指先に痺れが現れ、歩行がおぼつかなくなる³⁾。また、同時に頭痛や腹痛を伴うこともある³⁾。第 2 段階では不完全運動麻痺が起こり、嘔吐後運動不能になる³⁾。さらに知覚麻痺や言語障害、血圧降下が起こり、第 3 段階として全身麻痺、骨格筋の弛緩が起こることで呼吸困難となる³⁾。最終的に第 4 段階として意識が消失し、呼吸が停止する³⁾。フグ毒中毒に対する有効な治療法や解毒剤は未だ存在しておらず、人工呼吸により呼吸を確保し、適切な処置を施すことで確実に延命することができる³⁾。

食品衛生法 (昭和 22 年法律第 233 号) 第 6 条第 2 号において、「有毒な、若しくは有害な物質が含まれ、若しくは付着し、又はこれらの疑いがあるもの」の販売や、販売の用に供するために採取、製造、輸入、加工、使用、調理、貯蔵若しくは陳列することが禁じられており、フグはこの対象となる。しかしながら、フグは専門知識を持つ者によって有毒部位を除去することで、人の健康を損なうおそれがないと認められる無毒な食品となるため、販売が行われている。同法第 6 条第 2 号のただし書きとして、「人の健康を損なうおそれがない場合として厚生労働大臣が定める場合においては、この限りでない」とされており、フグはただし書き規定に該当する。同法施行規則 (昭和 23 年厚生省令第 23 号) 第 1 条第 1 号では、「厚生労働大臣が定める場合」として「有毒な又は有害な物質であっても、自然に食品又は添加物に含まれ又は附着しているものであって、その程度又は処理により一般に人の健康を損なうおそれがないと認められる場合」と規定されている。さらに、昭和 58 年には厚生省 (現 厚生労働省) 環境衛生局長通知 (環乳第 59 号)⁴⁾において、「処理等により人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び部位」により食用可能なフグの種類および部位が詳細に定められ (Table i)、その後も調査に基づいて食用可能な種類や部位が一部見直され (Table ii)、現在に至る。

フグ目魚類は現在でも新種が発見されており、10 科 107 属 435 種に分類される⁵⁾。そのうち、日本において食用が認められているトラフグ属、サバフグ属およびヨリトフグ属はフグ科に属する。フグは種により食用可能部位が異なるため、専門知識を持たない者による誤った種判別は、

食中毒の原因となり得る。フグの種判別は、主に体表の斑紋、尻鰭の色、棘の有無等の形態学的特徴に基づき行われているが、専門知識を持たない者には非常に困難である。しかしながら、現状では形態学的特徴に頼らざるを得ないため、厚生労働省からフグによる発生防止の一助として、分類および鑑別のための指針が公開されている⁶⁾。にもかかわらず、フグによる食中毒は毎年発生している。2019年1月に発表された「平成30年(2018年)食中毒発生事例(速報)」によると、2018年1月から2019年1月4日までに厚生労働省に報告があったフグによる食中毒10件は、全て専門知識を持たないと推測される家庭での調理によって発生している¹⁾。また、そのうち1件では、喫食されたフグについて種類不明と示されている¹⁾。

さらに、2種類のフグの形態学的特徴を併せ持った交雑種のような個体も頻繁に出現しており、形態学的特徴に基づいて正確な種判別を行うのは容易ではない。交雑種については、環境衛生局長通知(環乳第59号)⁴⁾の表「処理等により人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類および部位」にて注6「フグは、トラフグとカラスの中間種のような個体が出現することがあるので、これらのフグについては、両種とも○(○は有毒でない部位)の部位のみを可食部位とする。」と定められている。交雑種は自然に放置された状態での交雑により生じた自然交雑種と、人工的に交配させた人工交雑種に分けられる。以前からトラフグとカラスの他に、形態学的特徴からシマフグとナシフグ、ナシフグとコモンフグ、トラフグとゴマフグ、トラフグとマフグの自然交雑種と推定される個体が漁獲されている⁷⁻⁹⁾。近年、ミトコンドリアDNAによる分子系統関係の推定が行われ、トラフグ属魚類は遺伝的に極めて近縁であることが明らかになり^{10, 11)}、種間雑種の受精および育成が可能であると報告された^{12, 13)}。特に、トラフグ漁場で混獲されるトラフグ、マフグ、ゴマフグ間の交雑と推定される個体は比較的大型であり、採捕量も少なくない¹⁴⁾。形態学的特徴が類似した自然交雑種の場合、正確な両親種の判別は困難であり、食品衛生上問題となるため、食用として流通させることはできない。実際、山口県瀬戸内海海域において、自然交雑種が複数確認されている¹⁵⁾。多い場合には10匹に2, 3匹の割合で漁獲されており¹⁵⁾、親の種類が特定できない中間種(交雑)フグは販売したり、食したりしないこと、漁獲した中間種(交雑)フグは海に戻さないことを注意喚起している¹⁶⁾。

自然交雑種の毒性に関する知見および正確な種判別に関する知見についても若干の報告がなされている。自然交雑種の毒性に関する知見として、シマフグとトラフグ、マフグとゴマフグ、マフグとトラフグ、トラフグとゴマフグの自然交雑種20個体について毒性試験を行い、両種の可食部位である皮や筋肉において、毒性が確認されたと報告されている¹⁷⁾。また、トラフグ類似個体95個体について毒性評価および毒成分分析を行い、トラフグでは食用可能部位である皮および精巢から毒性が検出されたと報告されている¹⁸⁾。一方で、正確な種判別法を開発するため、形態学的手法ではなくDNAの塩基配列を直接分析し、塩基配列の差異を利用して判別する分子生物学的手法が研究されてきた。DNAを用いた品種鑑別の基盤となるDNA鑑定は法医学領域において始まり、PCR(polymerase chain reaction)法が開発され、めざましく発展した¹⁹⁾。現在では植物分野や動物分野にも波及しており、イチゴ、インゲンマメ、イネ、イグサ、アズキ、オウトウの品種鑑別²⁰⁾やウシ、ブタ、トリの肉種鑑別²¹⁻²³⁾などに幅広く活用されている。水産物ではマグロ、サバ、ウナギ、アジなどの種判別²⁴⁻²⁷⁾に活用されており、アサリやカキなどの二枚貝や干物などの調味加工品においても実施例が報告される²⁸⁾など、研究の進展に伴い、種判別可能な生物種が増

加している。フグに関しては、これまでもミトコンドリア DNA (mitochondrial DNA, 以下 mtDNA と示す) 配列に基づく種判別法が研究されてきた。mtDNA とは、核 DNA とは別に、細胞小器官であるミトコンドリア内に存在する DNA である。2003 年に、mtDNA のチトクローム *b* (cytochrome *b*, 以下 *cyt b* と示す) 部分領域を対象とした PCR-制限酵素断片長多型 (PCR restriction fragment length polymorphism, 以下 PCR-RFLP と示す) 分析により 8 種のフグを判別する方法が報告された²⁹⁾。また、2006 年には mtDNA の 16S リボソーム RNA (16S ribosomal RNA, 以下 16S rRNA と示す) 部分領域を対象とした RFLP 分析により 9 種のフグを判別する方法が報告された³⁰⁾ が、対象種は多くない。Ishizaki らはさらに、16S rRNA 領域の塩基配列を直接比較することにより種判別を行う方法を提案し³⁰⁾、平成 20 年 4 月 25 日付食安輸発第 0425005 号通知³¹⁾にて「遺伝子解析法に基づいたフグ加工品の鑑別検査方法」として示され、全国の検疫所において種判別法として採用されている。この 16S rRNA 領域の塩基配列を直接比較することにより種判別を行う方法は、母系遺伝である mtDNA を標的としているため、単一系統種の種判別および交雑種の母系種判別は可能であるが、交雑種の父系種を判別することはできない。そこで、父系種判別法として核 DNA の嗅覚受容体 *VIR* 領域の塩基配列を用いた種判別法が提案されたが、種判別法として未だ確立はしていない⁹⁾。さらに、核 DNA の *Ptr* 領域および *myh6* 領域を用いた種判別が行われたが、判別に適用可能であるかは種に依存することが明らかになった³²⁾。また、ショウサイフグとゴマフグ間の交雑種を対象に、AFLP (amplified fragment length polymorphism, 以下 AFLP と示す) 法を用いた種判別を行うことで両親種および交雑世代が明らかになった³³⁾が、AFLP 法は制限酵素を要する方法であるため、再現性の低さが問題とされている。交雑種における食品衛生上の問題を解決し、食の安全・安心を確保するためには、両親種の正確な同定が急務である。

そこで本研究では、トラフグとマフグ間の交雑種を対象に、mtDNA の塩基配列および核 DNA 上の短い反復配列から構成されるマイクロサテライト (microsatellite, 以下 MS と示す) 領域を用いた両親種判別法を開発し、本法の再現性および適用性を検証した。トラフグとマフグ間の交雑種を対象とした両親種判別は既に関連されている³⁴⁾が、本研究では新たな MS マーカーを探索し、精度の高い両親種判別法の確立を目指した。

本研究で得られた成果の一部は、以下の通り発表済みである。

ポスター発表：

小山夏美, 石崎松一郎, 柳本 卓, 長島裕二. フグ交雑種の両親種判別法に関する研究. 平成 30 年度日本水産学会大会秋季大会 (2018 年 9 月 17 日、広島).

口頭発表：

Natsumi KOYAMA, Mei USUI, Shoichiro ISHIZAKI, Takashi YANAGIMOTO, Yuji NAGASHIMA. Species identification of hybrid pufferfish between *Takifugu rubripes* and *Takifugu porphyreus*. International Workshop on Pufferfish, Oct. 13, 2017, Bodrum, Turkey.

Table i 処理等により人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び部位

科名	種類 (種名)	部位		
		筋肉	皮	精巣
フグ科	クサフグ	○	—	—
	コモンフグ	○	—	—
	ヒガンフグ	○	—	—
	ショウサイフグ	○	—	○
	マフグ	○	—	○
	メフグ	○	—	○
	アカメフグ	○	—	○
	トラフグ	○	○	○
	カラス	○	○	○
	シマフグ	○	○	○
	ゴマフグ	○	—	○
	カナフグ	○	○	○
	シロサバフグ	○	○	○
	クロサバフグ	○	○	○
	ヨリトフグ	○	○	○
サンサイフグ	○	—	—	
ハリセンボン科	イシガキフグ	○	○	○
	ハリセンボン	○	○	○
	ヒトヅラハリセンボン	○	○	○
	ネズミフグ	○	○	○
ハコフグ科	ハコフグ	○	—	○

注 1 本表は、有毒魚介類に関する検討委員会における検討結果に基づき作成したものであり、ここに掲載されていないフグであっても、今後、鑑別法及び毒性が明らかになれば追加することもある。

2 本表は、日本の沿岸域、日本海、渤海、黄海及び東シナ海で漁獲されるフグに適用する。ただし岩手県越喜来湾及び釜石湾並びに宮城県雄勝湾で漁獲されるコモンフグ及びヒガンフグについては適用しない。

3 ○は可食部位

4 まれに、いわゆる両性フグといわれる雌雄同体のフグが見られることがあり、この場合の生殖巣はすべて有毒部位とする。

5 筋肉には骨を、皮にはヒレを含む。

6 フグは、トラフグとカラスの中間種のような個体が出現することがあるので、これらのフグについては、両種とも○の部位のみを可食部位とする。

(厚生省 環境衛生局長通知 (環乳第 59 号) ⁴⁾ より転載)

Table ii 処理等により人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び可食部位 (漁獲海域が限定されているもの。)

科名	種類 (種名)	可食部位
フグ科	ナシフグ (有明海、橘湾、香川県及び岡山県の瀬戸内海域で漁獲されたものに限る。)	筋肉
	ナシフグ (有明海及び橘湾で漁獲され、長崎県が定める要領に基づき処理されたものに限る。)	精巢

注 1 有明海とは、漁業法 (昭和 24 年法律第 267 号) 第 109 条第 4 項に規定する海面のうち、長崎県及び佐賀県の県境から熊本県及び福岡県の県境に至る直線より南側の海面をいう。橘湾とは、長崎県瀬詰崎から熊本県天神山に至る直線、長崎県脇岬南端から南に樺島に至る直線、樺島南端から熊本県魚貫崎に至る直線及び陸岸によって囲まれた海面をいう。

注 2 香川県及び岡山県の瀬戸内海域とは、愛媛県土居町仏崎から愛媛県魚島東端見通し線、香川県と徳島県の境界から兵庫県上島灯台見通し線及び陸岸によって囲まれた海面のうち香川県及び岡山県の漁業者が操業できる海面で漁獲されたものであること。

注 3 筋肉には骨を含む。

第1章 ミトコンドリア DNA を用いた母系種判別

1-1 目的

現在、全国の検疫所においてフグ加工品を対象に、フグ種判定のための検査が実施されている³¹⁾。その方法は、検体の可食部（筋肉部位）を試料として DNA を抽出し、mtDNA 中の 16S rRNA 遺伝子部分領域を増幅する定性 PCR である。得られた PCR 産物を用いてダイレクトシーケンシングを行い、決定した塩基配列を既存のフグ種塩基配列と比較し種を判定する。本研究においても Ishizaki ら³⁰⁾および横山³⁵⁾が決定した既存のフグ種塩基配列と比較し、種を判別した。本研究では mtDNA 中の 16S rRNA および *cyt b* 部分領域を増幅し、種判別を行った。*cyt b* 部分領域の PCR は、*cyt b* 部分領域を増幅することができるユニバーサルプライマーを用い、16S rRNA 部分領域の PCR と同様の方法を用いて行った。形態学的特徴を基にした判別により単一系統と推定されたトラフグ、マフグ、クサフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモフグ、形態学的特徴から両親もしくは片親の種を推定した自然交雑種、両親種が既知の人工交雑種において、形態学的特徴から推定された種と先述した手法を用いた母系種判別結果が一致するかを確認することを目的とした。

1-2 方法

1-2-1 試料

試料には単一系統種および人工交雑種、自然交雑種を用いた。

単一系統種は、形態学的特徴からトラフグ、マフグ、クサフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモフグと認定された各 4 個体（水産総合研究センターより恵与）の計 24 個体を用いた。

人工交雑種は、(雌)トラフグと(雄)マフグの交雑によるトラマ 3 個体（長崎大学より恵与）、(雌)マフグと(雄)トラフグの交雑によるマトラ 8 個体（うち 3 個体は長崎大学、5 個体は水産総合研究センターより恵与）の計 11 個体を用いた。

自然交雑種は、形態学的特徴からトラフグとマフグ間の交雑種と推定される 6 個体（水産総合研究センターより恵与）、トラフグと不明種間の交雑種と推定される 10 個体（東京都市場衛生検査所より恵与）、トラフグとヒガンフグもしくはアカメフグ間の交雑種と推定される 1 個体（東京都市場衛生検査所より恵与）、トラフグとマフグもしくはショウサイフグ間の交雑種と推定される 2 個体（東京都市場衛生検査所より恵与）、トラフグとシマフグ間の交雑種と推定される 1 個体（東京都市場衛生検査所より恵与）、ショウサイフグとゴマフグ間の交雑種と推定される 1 個体（東京都市場衛生検査所より恵与）、ショウサイフグと不明種間の交雑種と推定される 3 個体（うち 1 個体は水産総合研究センター、2 個体は東京都市場衛生検査所より恵与）、マフグと不明種間の交雑種と推定される 1 個体（東京都市場衛生検査所より恵与）、ゴマフグと不明種間の交雑種と推定される 1 個体（東京都市場衛生検査所より恵与）、ムシフグと不明種間の交雑種と推定される 1 個体（東京都市場衛生検査所より恵与）の計 27 個体を用いた。

これらは当研究室にて半解凍され、筋肉を分離した後、筋肉を使用時まで -80°C で保存した。な

お、人工交雑種 11 個体、トラフグ 2 個体およびトラフグとマフグ間の交雑種と推定される 6 個体については、既に採取された筋肉もしくは鰭を 100% EtOH 中に浸漬し、使用時まで-30°Cで保存した。今回用いた試料を Table 1.1 に示した。また、試料の形態図を Fig. 1.1 に示した。なお、自然交雑種 No. 1-6 は水産総合研究センターの柳本氏により種が推定された個体であるため、形態図は示していない。

1-2-2 ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出には QuickGene DNA tissue kit S (倉敷紡績) を用いた。まず、各試料の筋肉を滅菌したピンセットとメスを用いて細かく刻み、20 mg を滅菌した 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに移した。鰭を用いる場合にも同様に細かく刻み、2 mg を滅菌した 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに移した。Tissue Lysis Buffer MDT 180 μ L、Proteinase K EDT 20 μ L を加え 15 秒間ボルテックスし、数秒間スピンドウンした後、55°Cで 1 時間インキュベートした。その後、23°C、10,000 rpm (9,167 \times g) で 3 分間遠心分離し、上清を新たなエッペンドルフチューブに移した。Lysis Buffer LDT 180 μ L を加え 15 秒間ボルテックスし、数秒間スピンドウンした後、70°Cで 10 分間インキュベートした。100% EtOH 240 μ L を加え 15 秒間ボルテックスし、数秒間スピンドウンして溶解液を得た。次に、QuickGene-810 (富士フイルム) を用いて溶解液から DNA を抽出した。キャリアジに Cartridge、Waste Tube、Collection Tube をセットし、Cartridge に溶解液をアプライする方法で行った。最終的に QuickGene-810 の DNA TISSUE モードで Wash Buffer WDT による洗浄を行った後、Elution Buffer CDT 200 μ L に溶解させ DNA 試料原液とした。得られた DNA 試料原液を 2 μ L 取り、BioSpec-nano (島津製作所) を用いて DNA 濃度および光学密度 (Optical Density, 以下 O.D. と示す) 260 および 280 の値を測定した。DNA 試料原液は使用時まで-25°Cで保存した。

1-2-3 16S rRNA および *cyt b* 領域を対象とした PCR 増幅

プライマーセットには mtDNA 中の 16S rRNA 部分領域を増幅することができるユニバーサルプライマーを採用し、16Sar-L および 16Sbr-H を用いた。プライマー配列は Table 1.2 に示し、mtDNA の簡易構造および PCR 増幅に用いた領域は Fig. 1.2 に示した。一方、mtDNA 中の *cyt b* 部分領域を増幅することができるユニバーサルプライマーは L14317Glu および H15149 を用いた。同様にプライマー配列は Table 1.2 に示し、PCR 増幅に用いた領域は Fig. 1.2 に示した。PCR 増幅には TaKaRa Ex Taq® (タカラバイオ) を用いた。0.2 mL 容 PCR チューブに TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ L) 1.25 U、10 \times Ex Taq Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) 5 μ L、dNTP Mixture (2.5 mM each) 4 μ L、10 μ M Forward primer 1 μ L (終濃度 0.2 μ M)、10 μ M Reverse primer 1 μ L (終濃度 0.2 μ M)、DNA 50 ng を加え、滅菌水で 50 μ L の反応系とした。温度条件は 98°Cで 10 秒、53°Cで 30 秒、72°Cで 60 秒を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。なお、*cyt b* 部分領域の PCR 増幅を行う場合はアニーリング温度を 55°Cとした。PCR 増幅後、得られた反応液 10 μ L を GelGreen® Nucleic Acid Stain, 10,000X in water (BIOTIUM) 入り 2.0%アガロースゲル電気泳動に供した。通電は 100 V で 30 分間とし、LAS-4000mini (富士フイルム) を用いてバンドを確認した。

1-2-4 PCR 産物の精製

PCR 産物の精製には ExoSAP-IT® Express PCR Product Cleanup (affymetrix) を用いた。0.2 mL 容 PCR チューブに PCR 産物 5 μ L、滅菌水で 10 倍希釈した ExoSAP-IT® Express PCR Product Cleanup 2 μ L を加え、37°C で 4 分間酵素反応を行い、80°C で 1 分間加熱して酵素を失活させた。

1-2-5 塩基配列の決定

精製した PCR 産物をラベリング反応に供した。ラベリング反応には BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、シーケンサーとして 4 キャピラリー型 ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。ラベリング反応は 0.2 mL 容 PCR チューブに精製した PCR 産物 3.5 μ L、2 μ M プライマー 0.8 μ L (終濃度 0.16 μ M)、5×Sequencing Buffer 1.5 μ L、BigDye® Terminator v3.1 1.0 μ L を加え、滅菌水で 10 μ L の反応系とした。温度条件は 96°C で 1 分間加熱後、96°C で 10 秒、50°C で 5 秒、60°C で 4 分を 1 サイクルとし、25 サイクル行った。ラベリング反応後、エタノール沈殿法を用いて未反応の蛍光ターミネーターを除去した。

すなわち、1.5 mL 容エッペンドルフチューブにラベリング反応後の PCR 産物 10 μ L、125 mM EDTA (pH 8.0) 2.5 μ L、100% EtOH 30 μ L を加え 15 秒間ボルテックスし、室温で 15 分間静置した。その後、4°C、15,000 rpm (20,627 \times g) で 20 分間遠心分離後、上清を除去した。70% EtOH 30 μ L を加え、4°C、15,000 rpm (20,627 \times g) で 10 分間遠心分離後、再度上清を除去した。エッペンドルフチューブの蓋を開けアルミホイルで覆い、7 分間真空乾燥を行い沈殿を乾燥させた。エッペンドルフチューブの蓋を閉め数秒間スピンドウンした後、Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) 15 μ L を加えボルテックスし、再度スピンドウンした。95°C で 3 分間加熱後、氷上で 2 分間冷却し、これをシーケンスサンプルとした。シーケンスサンプルを ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer に供し、塩基配列を決定した。データの解析には SeqEd v1.0.3 (PerkinElmer) を用いた。

種判別には DNASIS pro (日立ソリューションズ) および DNASIS Taxon (日立ソリューションズ) を用いた。決定した塩基配列を、既存のトラフグ属魚種の 16S rRNA および *cyt b* 部分領域塩基配列データベースに BLAST 検索し、相同性が 99.0% 以上を示す種でありかつ同一の相同性を示す他種が存在しない場合に種を判別できたと判断した。既存のトラフグ属魚種における 16S rRNA 部分領域塩基配列は Fig. 1.3、*cyt b* 部分領域塩基配列は Fig. 1.4 に示した。

1-3 結果および考察

単一系統種および人工交雑種、自然交雑種の母系種判別結果を Table 1.3 に示した。単一系統と推定されたマフグ 1 個体 (マフグ No. 3)、クサフグ 1 個体 (クサフグ No. 1)、ゴマフグ 1 個体 (ゴマフグ No. 2)、人工交雑種であるマトラ 8 個体 (マトラ No. 1-8)、トラフグとシマフグ間の交雑種と推定された 1 個体 (自然交雑種 No. 8)、トラフグと不明種間の交雑種と推定された 1 個体 (自然交雑種 No. 17)、マフグと不明種間の交雑種と推定された 1 個体 (自然交雑種 No. 18)、トラフグとマフグもしくはショウサイフグ間の交雑種と推定された 1 個体 (自然交雑種 No. 23) および既存のトラフグ、マフグ、クサフグ、ゴマフグの 16S rRNA 部分領域塩基配列を Fig. 1.5 に示した。単一系統と推定されたトラフグ 2 個体 (トラフグ No. 1, 4)、マフグ 2 個体 (マフグ No. 2, 4)、クサフグ 1 個体 (クサフグ No. 1)、ゴマフグ 1 個体 (ゴマフグ No. 1)、トラフグとマフグ間の交雑種と推定された 2 個体 (自然交雑種 No. 2, 4)、トラフグと不明種間の交雑種と推定された 2 個体 (自然交雑種 No. 13, 14)、マフグと不明種間の交雑種と推定された 1 個体 (自然交雑種 No. 18)、トラフグとマフグもしくはショウサイフグ間の交雑種と推定された 1 個体 (自然交雑種 No. 23)、ショウサイフグと不明種間の交雑種と推定された 1 個体 (自然交雑種 No. 26) および既存のトラフグ、マフグ、クサフグ、ゴマフグの *cyt b* 部分領域塩基配列を Fig. 1.6 に示した。他の個体は既存の塩基配列と 100%一致していた (図示せず)。

mtDNA 解析により、単一系統種と推定されたトラフグ、マフグ、クサフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモンフグ各 4 個体はそれぞれトラフグ、マフグ、クサフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモンフグであると判定され、形態学的特徴を基に判別した種と一致した。母系種はそれぞれトラフグ、マフグ、クサフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモンフグであると判定されたが、父系種は不明であるため、交雑種である可能性も否定はできない。しかしながら、現段階では単一系統種であると判断して差し支えないと考えられた。第 2 章以降においても、単一系統種としてこれらの個体を用いた。

また、人工交雑種トラマ 3 個体の母系種はトラフグ、人工交雑種マトラ 8 個体の母系種はマフグであると判定された。これは交雑時に用いた母親個体の種と一致しており、人工交雑種においても、mtDNA を用いた母系種判別法が適用可能であると確認することができた。

自然交雑種においても、mtDNA 解析により母系種を判別することが可能であった。自然交雑種 27 個体において、母系種と形態学的特徴から推定された種が一致したのは 22 個体 (自然交雑種 No. 1-7, 9-19, 21-23, 27) であった。母系種が形態学的特徴から推定された種以外を示したものは 5 個体 (自然交雑種 No. 8, 20, 24-26) であったが、いずれにおいても母系種由来と推定される特徴が現れていることを確認した。判定された母系種と形態学的特徴を基に、父系種を推定することができたものは 11 個体 (自然交雑種 No. 1-6, 8, 20, 21, 23, 24) であった。現段階では、16 個体において父系種の推定が困難であったが、うち 3 個体においてはおよその父系種を推定することができた。

トラフグとマフグもしくはショウサイフグ間の交雑種と推定された個体 (自然交雑種 No. 22) の母系種はトラフグであると判定された。形態学的特徴により、父系種はマフグもしくはショウサイフグであると推定されるが、尻鰭が黄色であることから、父系種はマフグである可能性が極

めて高いと考えられた。

さらに、ゴマフグと不明種間の交雑種と推定された個体（自然交雑種 No. 19）の母系種はゴマフグであると判定された。形態学的特徴から推定された種はゴマフグのみであったが、形態が自然交雑種 No. 20 と非常に近似しており、父系種はショウサイフグである可能性が高いと考えられた。

一方、トラフグとヒガンフグもしくはアカメフグ間の交雑種と推定された個体（自然交雑種 No. 9）の母系種はトラフグであると判定され、形態学的特徴により、父系種はヒガンフグもしくはアカメフグであると推定された。背面および体側に見られる特徴的な模様はトラフグには見られない模様であるが、ヒガンフグ由来の特徴であるのか、あるいはアカメフグ由来の特徴であるのかを判断するのは困難であった。加えて、黄色い目は赤い目を持つ種との中間的特徴として現れたと考えられるが、ヒガンフグ由来の特徴であるのか、あるいはアカメフグ由来の特徴であるのかは不明確である。父系種がアカメフグであった場合、アカメフグの有毒部位は皮であり、筋肉および精巣は無毒であるため、筋肉および精巣は食用可能であるが、父系種がヒガンフグであった場合、ヒガンフグの有毒部位は皮および精巣であるため、筋肉のみが食用可能となる。さらに、ヒガンフグの筋肉は一般に無毒であるが、三陸沿岸産は有毒であるため、産地によっても食用可能部位が異なる。この個体は三重県にて漁獲されたものであることから、三陸沿岸産のヒガンフグが父系種である可能性は低いと考えられるが、アカメフグおよびヒガンフグがともに生息する海域であるため、漁獲地から父系種を絞り込むのは困難であった。

mtDNA を用いた判別法により決定した母系種の特徴は、試料である自然交雑種 27 個体全てにおいて確認された。また、形態に現れる特徴の多くは母系種由来であり、父系種由来と推定される特徴が確認不可能な個体も少なくなかった。すなわち、自然交雑種は父系種由来の特徴に比べ、母系種由来の特徴が形態に強く現れる傾向があることを確認した。形態学的特徴に加え mtDNA 解析の結果を踏まえても、父系種の推定が可能な個体は 27 個体中 13 個体に留まった。父系種が不明確である場合、食用可能部位も不明確であるため、流通させることができない。よって、食用可能部位を明確にするためには父系種判別法の開発が必要である。トラフグとマフグ間の交雑種における両親種判別法は臼井³⁴⁾により既に確立されたが、本研究ではより再現性、適用性の高い両親種判別法の確立を目指す。

Table 1.1 List of natural hybrid pufferfish used for maternal species identification

Natural hybrid No.	Date	Locality	Species by morphology
1	2016.01.05	unknown	Torafugu, Mafugu
2	2016.01.05	unknown	Torafugu, Mafugu
3	2016.01.05	unknown	Torafugu, Mafugu
4	2017.01.20	unknown	Torafugu, Mafugu
5	2017.01.20	unknown	Torafugu, Mafugu
6	2017.01.20	unknown	Torafugu, Mafugu
7	2016.03.01	Nagasaki Pref.	Torafugu, unknown
8	2016.03.17	unknown	Torafugu, Shimafugu
9	2016.04.01	Mie Pref.	Torafugu, Higanfugu or Akamefugu
10	2016.01.23	Kanagawa Pref.	Torafugu, unknown
11	2016.01.23	Kanagawa Pref.	Torafugu, unknown
12	2016.01.23	Kanagawa Pref.	Torafugu, unknown
13	2016.01.23	Kanagawa Pref.	Torafugu, unknown
14	2016.01.23	Kanagawa Pref.	Torafugu, unknown
15	2016.01.23	Kanagawa Pref.	Torafugu, unknown
16	2016.01.23	Kanagawa Pref.	Torafugu, unknown
17	2016.01.23	Kanagawa Pref.	Torafugu, unknown
18	2016.04.23	Shizuoka Pref.	Mafugu, unknown
19	2016.05.19	Niigata Pref.	Gomafugu, unknown
20	2014.06.18	unknown	Shosaifugu, unknown
21	2016.07.14	Miyagi Pref.	Shosaifugu, Gomafugu
22	2016.09.12	Kanagawa Pref.	Torafugu, Mafugu or Shosaifugu
23	2016.09.12	Chiba Pref.	Torafugu, Mafugu or Shosaifugu
24	2016.10.18	Aichi Pref.	Mushifugu, unknown
25	2016.10.21	Kanagawa Pref.	Shosaifugu, unknown
26	2016.10.21	Kanagawa Pref.	Shosaifugu, unknown
27	2017.03.04	Aichi Pref.	Torafugu, unknown



Torafugu (*Takifugu rubripes*)
(Photo by Ministry of Health, Labour and Welfare³⁾)



Mafugu (*T. porphyreus*)



Kusafugu (*T. alboplumbeus*)



Gomafugu (*T. stictonotus*)

Fig. 1.1 Pufferfish used in this study.



Shimafugu (*T. xanthopterus*)



Komonfugu (*T. flavipterus*)



Artificial hybrid pufferfish Torama (♀ *T. rubripes* × ♂ *T. porphyreus*)
(Photo by Dr. Arakawa and Dr. Takatani at Nagasaki University)



Artificial hybrid pufferfish Matora (♀ *T. porphyreus* × ♂ *T. rubripes*)
(Photo by Dr. Arakawa and Dr. Takatani at Nagasaki University)

Fig. 1.1 Continued.



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Torafugu and unknown pufferfish (Natural hybrid pufferfish No. 7)



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Torafugu and Shimafugu (Natural hybrid pufferfish No. 8)



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Torafugu and Higanfugu or Akamefugu (Natural hybrid pufferfish No. 9)

Fig. 1.1 Continued.



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Torafugu and unknown pufferfish (Natural hybrid pufferfish No. 10-17)



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Mafugu and unknown pufferfish (Natural hybrid pufferfish No. 18)



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Gomafugu and unknown pufferfish (Natural hybrid pufferfish No. 19)

Fig. 1.1 Continued.



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Shosaifugu and unknown pufferfish (Natural hybrid pufferfish No. 20)



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Shosaifugu and Gomafugu (Natural hybrid pufferfish No. 21)



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Torafugu and Mafugu or Shosaifugu (Natural hybrid pufferfish No. 22)



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Torafugu and Mafugu or Shosaifugu (Natural hybrid pufferfish No. 23)

Fig. 1.1 Continued.



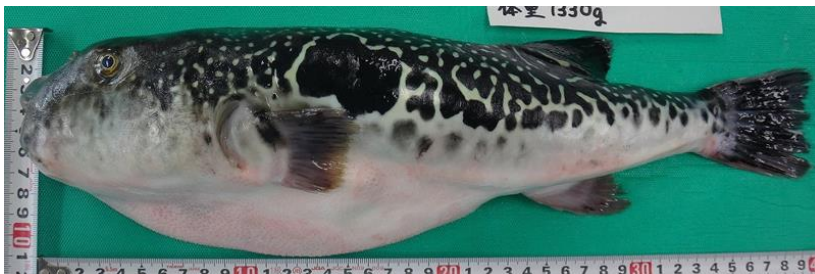
Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Mushifugu and unknown pufferfish (Natural hybrid pufferfish No. 24)



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Shosaifugu and unknown pufferfish (Natural hybrid pufferfish No. 25)



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Shosaifugu and unknown pufferfish (Natural hybrid pufferfish No. 26)



Natural hybrid pufferfish estimated to be consisting of Torafugu and unknown pufferfish (Natural hybrid pufferfish No. 27)

Fig. 1.1 Continued.

Table 1.2 Primers used for maternal species identification

Primer	Sequence
16Sar-L	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'
16Sbr-H	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'
L14317Glu	5'-CAGGATTTTAACCAGGACTAATGGCTTGAA-3'
H15149	5'-CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'

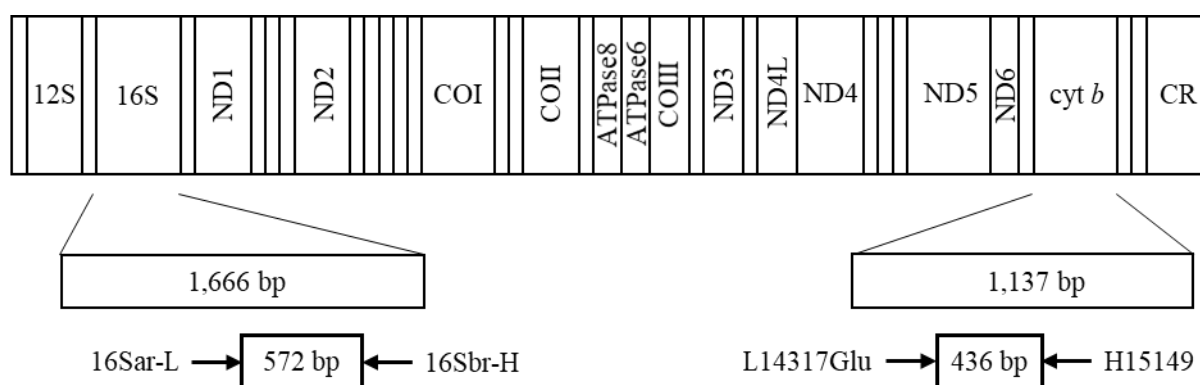


Fig. 1.2 Structure of mtDNA and sequencing regions used for maternal species identification.

Torafugu	C G C C T C T T G C T T C A G T G A A T A A G A G G T C A C G C C T G C C C T G T G A C T A T A T G
Karasu C
Mafugu
Shimafugu
Kusafugu A
Shosafugu C . . . A
Nashifugu
Higanfugu
Gomafugu C . T . A
Komonfugu
Akamefugu
Mefugu
Mushifugu
Torafugu	T T T A A C G G C C G C G G T A T T T T G A C C G T G C A A A G G T A G C G C A A T C A C T T G T C
Karasu
Mafugu
Shimafugu
Kusafugu
Shosafugu
Nashifugu
Higanfugu
Gomafugu
Komonfugu
Akamefugu
Mefugu
Mushifugu
Torafugu	C T T T A A A T G T G G A C C T G T A T G A A T G G C A T A A C G A G G G C T T A G C T G T C T C C
Karasu
Mafugu
Shimafugu
Kusafugu
Shosafugu
Nashifugu
Higanfugu
Gomafugu
Komonfugu
Akamefugu
Mefugu
Mushifugu
Torafugu	T T T C T C A A G T C A A T G A A C T T G A T C T C C C C G T G C A G A A G C G G G G A T A A A A C
Karasu
Mafugu
Shimafugu
Kusafugu C
Shosafugu
Nashifugu
Higanfugu
Gomafugu G
Komonfugu
Akamefugu
Mefugu
Mushifugu

Fig. 1.3 DNA sequences of partial 16S rRNA gene from 13 pufferfish species.

A dot (.) indicates identity with the 1st sequence.

Torafugu	C A T A A G A C G A G A A G A C C C T A T G G A G C T T T A G A C A A A A A C A G C C C C T G T C
Karasu G
Mafugu
Shimafugu
Kusafugu
Shosafugu
Nashifugu
Higanfugu
Gomafugu
Komonfugu
Akamefugu
Mefugu
Mushifugu

Torafugu	A A T A A A C C C T A A A T A A A G G G A A T A A A C C T A G T G A A C C T G T T T T A A T G T C T
Karasu
Mafugu A
Shimafugu A
Kusafugu C A
Shosafugu C A
Nashifugu A
Higanfugu A C
Gomafugu C
Komonfugu A
Akamefugu A G C
Mefugu A
Mushifugu A

Torafugu	T T G G T T G G G G C G A C C G C G G G G T A A C A A A A A C C C C C A T G T G G A A T G A A A A
Karasu
Mafugu
Shimafugu
Kusafugu
Shosafugu
Nashifugu
Higanfugu
Gomafugu
Komonfugu
Akamefugu G
Mefugu
Mushifugu

Torafugu	C A C C C T T T T T A A A C C C A A G A G T C A C C A C T C T A G G A T A C A G A A C A T C T G A C
Karasu
Mafugu A
Shimafugu A A . T
Kusafugu A A . T
Shosafugu A A . T
Nashifugu A A . T
Higanfugu A A . T
Gomafugu A A . T
Komonfugu A A . T
Akamefugu C . C A A . T
Mefugu A
Mushifugu A A . T

Fig. 1.3 Continued.

Torafugu	A A A C C A T C G T T G T T A C T C A A C T A C A A A A C A C T A A T G G C C A G C C T A C G C A
Karasu
Mafugu
Shimafugu
Kusafugu
Shosafugu
Nashifugu C
Higanfugu
Gomafugu
Komonfugu
Akamefugu
Mefugu
Mushifugu

Torafugu	A A A C C C A C C C C T A C T A A A A A T C G T A A A C G A C A T A G T A A T T G A C C T T C C T
Karasu
Mafugu
Shimafugu C
Kusafugu T T
Shosafugu T C
Nashifugu G T
Higanfugu C
Gomafugu T C
Komonfugu C
Akamefugu C
Mefugu T C
Mushifugu C

Torafugu	A C C C C C T C A A A C A T T T C C G C C T G A T G A A A C T T T G G C T C T C T A C T C G G A T T
Karasu
Mafugu T C
Shimafugu T C G
Kusafugu C
Shosafugu C
Nashifugu C
Higanfugu T C G
Gomafugu C
Komonfugu C C
Akamefugu T C G
Mefugu T C
Mushifugu C C

Torafugu	A T G C C T T A T T A C A C A A A T C A T C A C A G G A C T G T T C C T T G C A A T A C A C T A C A
Karasu
Mafugu G
Shimafugu A
Kusafugu G A T
Shosafugu G
Nashifugu G G
Higanfugu G C
Gomafugu G G
Komonfugu G T
Akamefugu C
Mefugu	. .
Mushifugu G T

Fig. 1.4 DNA sequences of partial *cyt b* gene from 13 pufferfish species.

A dot (.) indicates identity with the 1st sequence.

Torafugu	G T A A T G G C C A C C G C T T T C G T A G G C T A C G T T C T T C C A
Karasu C
Mafugu G C
Shimafugu T A
Kusafugu T G C
Shosaifugu T A
Nashifugu G C C
Higanfugu	. . G . . A G
Gomafugu T A
Komonfugu T A C
Akamefugu	. . G . . A G
Mefugu A C
Mushifugu G C

Fig. 1.4 Continued.

Table 1.3 Maternal species identification of pufferfish by sequence of 16S rRNA region and *cyt b* region

Sample	16S rRNA		<i>cyt b</i>	
	Species	Identity (bp)	Species	Identity (bp)
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
Kusafugu	1	Kusafugu	Kusafugu	353/354
	2	Kusafugu	Kusafugu	375/375
	3	Kusafugu	Kusafugu	380/380
	4	Kusafugu	Kusafugu	321/321
Gomafugu	1	Gomafugu	Gomafugu	372/373
	2	Gomafugu	Gomafugu	371/371
	3	Gomafugu	Gomafugu	375/375
	4	Gomafugu	Gomafugu	373/373
Shimafugu	1	Shimafugu	Shimafugu	373/373
	2	Shimafugu	Shimafugu	338/338
	3	Shimafugu	Shimafugu	380/380
	4	Shimafugu	Shimafugu	370/370
Komonfugu	1	Komonfugu	Komonfugu	379/379
	2	Komonfugu	Komonfugu	370/370
	3	Komonfugu	Komonfugu	388/388
	4	Komonfugu	Komonfugu	385/385
Artificial hybrid Torama	1	Torafugu	Torafugu, Karasu	396/396
	2	Torafugu	Torafugu, Karasu	392/392
	3	Torafugu	Torafugu, Karasu	388/388
Artificial hybrid 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

Table 1.3 Continued

Sample	16S rRNA			cyt <i>b</i>	
	Species	Identity (bp)	Species	Identity (bp)	
Artificial hybrid Matora	7	Mafugu, Mefugu	501/503	Mafugu	412/412
	8	Mafugu, Mefugu	500/501	Mafugu	407/407
Natural hybrid	1	Torafugu	508/508	Torafugu, Karasu	400/400
	2	Mafugu, Mefugu	441/441	Mafugu	404/406
	3	Torafugu	441/441	Torafugu, Karasu	404/404
	4	Mafugu, Mefugu	501/501	Mafugu	401/403
	5	Torafugu	513/513	Torafugu, Karasu	402/402
	6	Torafugu	501/501	Torafugu, Karasu	420/420
	7	Torafugu	396/396	Torafugu, Karasu	385/385
	8	Mafugu, Mefugu	495/496	Mafugu	419/419
	9	Torafugu	482/482	Torafugu, Karasu	329/329
	10	Torafugu	485/485	Torafugu, Karasu	390/390
	11	Torafugu	479/479	Torafugu, Karasu	342/342
	12	Torafugu	453/453	Torafugu, Karasu	416/416
	13	Torafugu	466/466	Torafugu, Karasu	390/391
	14	Torafugu	471/471	Torafugu, Karasu	407/408
	15	Torafugu	459/459	Torafugu, Karasu	416/416
	16	Torafugu	456/456	Torafugu, Karasu	403/403
	17	Torafugu	522/523	Torafugu, Karasu	412/412
	18	Mafugu, Mefugu	516/517	Mafugu	377/378
	19	Gomafugu	522/522	Gomafugu	371/371
	20	Gomafugu	410/410	Gomafugu	363/363
	21	Shosaifugu	513/513	Shosaifugu	388/388
	22	Torafugu	526/526	Torafugu, Karasu	404/404
	23	Mafugu, Mefugu	527/528	Mafugu	392/393
	24	Torafugu	531/531	Torafugu, Karasu	404/404
	25	Mafugu, Mefugu	528/528	Mafugu	406/406
	26	Mafugu, Mefugu	522/522	Mafugu	397/399
	27	Torafugu	464/464	Torafugu, Karasu	381/381

Torafugu	C G C C T C T T G C T T C A G T G A A T A A G A G G T C A C G C C T G C C C T G T G A C T A T A T G
Natural hybrid No. 17	- - - - -
Mafugu
Mafugu No. 3	- - - - -
Matora No. 1	- - - - -
Matora No. 2	- - - - -
Matora No. 3	- - - - -
Matora No. 4	- - - - -
Matora No. 5	- - - - -
Matora No. 6	- - - - -
Matora No. 7	- - - - -
Matora No. 8	- - - - -
Natural hybrid No. 8	- - - - -
Natural hybrid No. 18	- - - - -
Natural hybrid No. 23	- - - - -
Kusafugu A
Kusafugu No. 1	- - - - -
Gomafugu C . T . A
Gomafugu No. 2	- - - - -
Torafugu	T T T A A C G G C C G C G G T A T T T T - G A C C G T G C A A A G G T A G C G C A A T C A C T T G T
Natural hybrid No. 17
Mafugu
Mafugu No. 3
Matora No. 1
Matora No. 2
Matora No. 3
Matora No. 4
Matora No. 5
Matora No. 6
Matora No. 7 T
Matora No. 8
Natural hybrid No. 8
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Kusafugu
Kusafugu No. 1
Gomafugu
Gomafugu No. 2
Torafugu	C C T T T A A A T G T G G A C C T G T A T G A A T G G C A T A A C G A G G G C T T A G C T G T C T C
Natural hybrid No. 17
Mafugu
Mafugu No. 3
Matora No. 1
Matora No. 2
Matora No. 3
Matora No. 4
Matora No. 5
Matora No. 6
Matora No. 7
Matora No. 8
Natural hybrid No. 8
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Kusafugu
Kusafugu No. 1
Gomafugu
Gomafugu No. 2

Fig. 1.5 Comparison of DNA sequences of the partial 16S rRNA gene from 19 pufferfish.

A dot (.) indicates identity with the 1st sequence.

A bold indicates difference from the sequence on the database.

Torafugu	C T T T C T C A A G T C A A T G A A C T T G A T C T C C C C G T G C A G A A G C G G G G A T A A A A
Natural hybrid No. 17
Mafugu
Mafugu No. 3
Matora No. 1
Matora No. 2
Matora No. 3
Matora No. 4
Matora No. 5
Matora No. 6
Matora No. 7
Matora No. 8
Natural hybrid No. 8
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Kusafugu C
Kusafugu No. 1 C
Gomafugu G
Gomafugu No. 2 G

Torafugu	C C A T A A G A C G G A A G A C C C T A T G G A G C T T T A G A C A A A A A A C A G C C C C T G T
Natural hybrid No. 17
Mafugu
Mafugu No. 3
Matora No. 1
Matora No. 2
Matora No. 3
Matora No. 4
Matora No. 5
Matora No. 6
Matora No. 7
Matora No. 8
Natural hybrid No. 8
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Kusafugu
Kusafugu No. 1
Gomafugu
Gomafugu No. 2

Torafugu	C A A T A A A C C C T A A A T A A A G G - G A A T A A A C C T A G T G A A C C T G T T T T A A T G T
Natural hybrid No. 17 -
Mafugu - A
Mafugu No. 3 G A
Matora No. 1 G A
Matora No. 2 G A
Matora No. 3 G A
Matora No. 4 G A
Matora No. 5 G A
Matora No. 6 G A
Matora No. 7 G A
Matora No. 8 G A
Natural hybrid No. 8 - A C
Natural hybrid No. 18 - A C
Natural hybrid No. 23 - A C
Kusafugu C - A
Kusafugu No. 1 C - A
Gomafugu C G A
Gomafugu No. 2 C G A

Fig. 1.5 Continued.

Torafugu	C T T T G G T T G G G G C G A C C G C G G G G T A A C A A A A A C C C C C A T G T G G A A T G A A
Natural hybrid No. 17
Mafugu
Mafugu No. 3
Matora No. 1
Matora No. 2
Matora No. 3
Matora No. 4
Matora No. 5
Matora No. 6
Matora No. 7
Matora No. 8
Natural hybrid No. 8
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Kusafugu
Kusafugu No. 1
Gomafugu
Gomafugu No. 2

Torafugu	A A C A C C C T T T T T A A A C C C A A G A G T C A C C A C T C T A G G A T A C A G A A C A T C T G
Natural hybrid No. 17
Mafugu A
Mafugu No. 3 A
Matora No. 1 A
Matora No. 2 A
Matora No. 3 A
Matora No. 4 A
Matora No. 5 A
Matora No. 6 A
Matora No. 7 A
Matora No. 8 A
Natural hybrid No. 8 A
Natural hybrid No. 18 A
Natural hybrid No. 23 A
Kusafugu A A . T
Kusafugu No. 1 A A . T
Gomafugu A A . T
Gomafugu No. 2 A . T A . T

Torafugu	A C C A A T A A T G A T C C G G C T - A A A G C C G A T T A A C G A A C C G A G T T A C C C T A G G
Natural hybrid No. 17
Mafugu
Mafugu No. 3
Matora No. 1
Matora No. 2
Matora No. 3
Matora No. 4
Matora No. 5
Matora No. 6
Matora No. 7
Matora No. 8
Natural hybrid No. 8
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Kusafugu T
Kusafugu No. 1 G T
Gomafugu
Gomafugu No. 2

Fig. 1.5 Continued.

Torafugu	G A T A A C A G C G C A A T C C T C T T T T A G A G T C C A T A T C G A C A A G A G G G T T T A C G
Natural hybrid No. 17 A
Mafugu
Mafugu No. 3
Matora No. 1
Matora No. 2
Matora No. 3
Matora No. 4
Matora No. 5
Matora No. 6
Matora No. 7
Matora No. 8
Natural hybrid No. 8
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Kusafugu
Kusafugu No. 1
Gomafugu
Gomafugu No. 2

Torafugu	A C C T C G A T G T T G G A T C A G G A C A T C C T A A T G G T G C A G C C G C T A T T A A A G G T
Natural hybrid No. 17
Mafugu
Mafugu No. 3
Matora No. 1
Matora No. 2
Matora No. 3
Matora No. 4
Matora No. 5
Matora No. 6
Matora No. 7
Matora No. 8
Natural hybrid No. 8
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Kusafugu C
Kusafugu No. 1
Gomafugu C
Gomafugu No. 2

Torafugu	T C G T T T G T T C A A C G A T T A A A G T C C T
Natural hybrid No. 17
Mafugu
Mafugu No. 3
Matora No. 1
Matora No. 2
Matora No. 3
Matora No. 4
Matora No. 5
Matora No. 6
Matora No. 7
Matora No. 8
Natural hybrid No. 8
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Kusafugu
Kusafugu No. 1
Gomafugu
Gomafugu No. 2

Fig. 1.5 Continued.

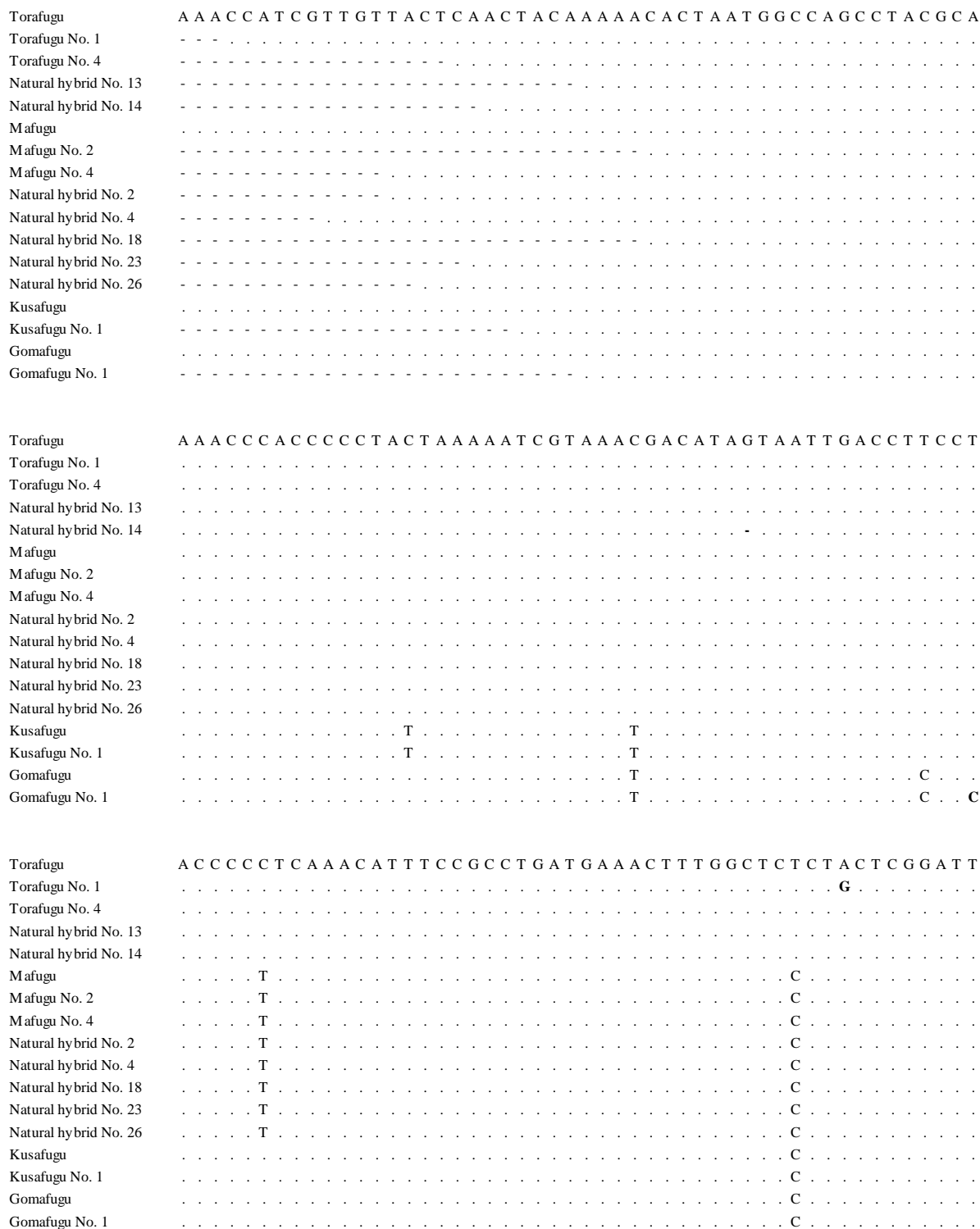


Fig. 1.6 Comparison of DNA sequences of the partial *cyt b* gene from 17 pufferfish.

A dot (.) indicates identity with the 1st sequence.

A bold indicates difference from the sequence on the database.

Torafugu	A T G C C T T A T T A C A C A A A T C A T C A C A G G A C T G T T C C T T G C A A T A C A C T A C A
Torafugu No. 1
Torafugu No. 4
Natural hybrid No. 13
Natural hybrid No. 14
Mafugu G
Mafugu No. 2 G
Mafugu No. 4 G
Natural hybrid No. 2 G
Natural hybrid No. 4 G
Natural hybrid No. 18 G
Natural hybrid No. 23 G
Natural hybrid No. 26 G
Kusafugu G A T
Kusafugu No. 1 G A T T
Gomafugu G G
Gomafugu No. 1 G G

Torafugu	C A T C C G A C A T C T C T A C C G C C T T T T C A T C C G T A G C C C A C A T T T G C C G A G A C
Torafugu No. 1
Torafugu No. 4
Natural hybrid No. 13
Natural hybrid No. 14
Mafugu T C T T
Mafugu No. 2 T C T T
Mafugu No. 4 T C T T C
Natural hybrid No. 2 T C T T
Natural hybrid No. 4 T C T T
Natural hybrid No. 18 T C T T
Natural hybrid No. 23 T C T T
Natural hybrid No. 26 T C T T
Kusafugu T
Kusafugu No. 1 T
Gomafugu C G T
Gomafugu No. 1 C G T

Torafugu	G T A A A C T A C G G C T G A C T A A T T C G C A A T C T A C A C G C A A A C G G T G C C T C A T T
Torafugu No. 1
Torafugu No. 4 C
Natural hybrid No. 13
Natural hybrid No. 14
Mafugu
Mafugu No. 2
Mafugu No. 4
Natural hybrid No. 2 T
Natural hybrid No. 4 T
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Natural hybrid No. 26 T
Kusafugu
Kusafugu No. 1
Gomafugu T
Gomafugu No. 1 T

Fig. 1.6 Continued.

Torafugu	C T T T T T T A T T T G C T T A T A C T C C C A C A T C G G C C G A G G T C T T T A C T A T G G C T
Torafugu No. 1
Torafugu No. 4
Natural hybrid No. 13
Natural hybrid No. 14
Mafugu	. . . C C C
Mafugu No. 2	. . . C C C
Mafugu No. 4	. . . C C C
Natural hybrid No. 2	. . . C C C
Natural hybrid No. 4	. . . C C C
Natural hybrid No. 18	. . . C C C
Natural hybrid No. 23	. . . C C C
Natural hybrid No. 26	. . . C C C
Kusafugu C G T C
Kusafugu No. 1 C G T C
Gomafugu C C C T
Gomafugu No. 1 C C C T

Torafugu	C T T A C C T A A G T A A A G A A A C C T G A A A C G T A G G G T A G T C C T C T T A C T T T T A
Torafugu No. 1
Torafugu No. 4	. C
Natural hybrid No. 13
Natural hybrid No. 14
Mafugu
Mafugu No. 2 T
Mafugu No. 4
Natural hybrid No. 2 T
Natural hybrid No. 4 T
Natural hybrid No. 18 A
Natural hybrid No. 23 A
Natural hybrid No. 26 T
Kusafugu
Kusafugu No. 1
Gomafugu	. C G . . C G C . . T
Gomafugu No. 1	. C G . . C G C . . T

Torafugu	G T A A T G G C C A C C G C T T T C G T A G G C T A C G T T C T T C C A
Torafugu No. 1
Torafugu No. 4
Natural hybrid No. 13
Natural hybrid No. 14
Mafugu G C
Mafugu No. 2
Mafugu No. 4 G
Natural hybrid No. 2
Natural hybrid No. 4
Natural hybrid No. 18
Natural hybrid No. 23
Natural hybrid No. 26
Kusafugu T G C
Kusafugu No. 1
Gomafugu T A
Gomafugu No. 1

Fig. 1.6 Continued.

第2章 父系種判別のための核 DNA マイクロサテライトマーカーの選抜

2-1 目的

第1章において、mtDNA 解析により単一系統種、人工交雑種および自然交雑種の母系種判別が可能であることが示されたが、父系種の判別には至らなかった。そのため、核 DNA を用いた両親種判別法の開発を試みた。すなわち、核 DNA のうち、母親由来の DNA と父親由来の DNA が共に検出される共優性マーカーである MS 領域に着目した。これは、サケの自然交雑種の両親がカラフトマス *Oncorhynchus gorbuscha* とシロザケ *Oncorhynchus keta*、アメマス *Salvelinus leucomaenis* とカワマス *Salvelinus fontinalis* であると判定された報告^{36,37)}やメバル *Sebastes inermis* の父系判別試験を行った報告³⁸⁾、マダイの親子鑑定を行った報告³⁹⁾に基づいている。Takagi ら⁴⁰⁾、Furukawa ら⁴¹⁾、Cui ら⁴²⁾、Kai ら¹³⁾、古川⁴³⁾は既に各種 MS 遺伝子座を明らかにしており、トラフグとマフグ間の交雑種における両親種判別に適用可能な MS マーカーを探索するため、3-4 塩基の反復配列から構成される MS 遺伝子座を 8 個選抜した。選抜した 8 個の MS 遺伝子座を対象としたプライマーセットを用いて PCR 増幅を行い、MS 多型が反映されると考えられる PCR 産物の分子量を比較し、トラフグとマフグの種判別に適用可能な MS マーカーを選抜した。両親が既知の人工交雑種トラマおよびマトラを用いて PCR 産物の分子量を比較するとともに、PCR 産物の分子量に普遍性があるかを確認した。

さらに、形態学的特徴から単一系統であると推定され、第1章の mtDNA 解析により母系種がトラフグまたはマフグであると判定された個体についても PCR 産物の分子量を比較し、MS 遺伝子座を選抜するための検討材料とした。最終的に、選抜した MS 領域における PCR 産物の塩基配列および反復配列の回数を決定し、トラフグとマフグ間で比較することで、2 種間の種判別に適用可能であるかを検討した。

2-2 方法

2-2-1 試料

試料には単一系統トラフグ 4 個体、単一系統マフグ 4 個体、人工交雑種 11 個体（トラマ 3 個体、マトラ 8 個体）を用いた。

2-2-2 マイクロサテライト領域を対象とした PCR 増幅

各 MS 領域の増幅に用いたプライマーセットの配列は Table 2.1 に示した。PCR 増幅には TaKaRa Ex Taq® (タカラバイオ) を用いた。0.2 mL 容 PCR チューブに TaKaRa Ex Taq (5 U/μL) 0.625 U、10×Ex Taq Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) 2.5 μL、dNTP Mixture (2.5 mM each) 2 μL、10 μM Forward primer 0.5 μL (終濃度 0.2 μM)、10 μM Reverse primer 0.5 μL (終濃度 0.2 μM)、DNA 25 ng を加え、滅菌水で 25 μL の反応系とした。温度条件は 94°C で 5 分間加熱後、94°C で 30 秒、各アニーリング温

度で 30 秒、72°C で 30 秒を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。PCR 増幅後、得られた反応液 10 μL を GelGreen® Nucleic Acid Stain, 10,000X in water (BIOTIUM) 入り 2.0% アガロースゲル電気泳動に供した。通電は 100 V で 60 分間とし、LAS-4000mini (富士フイルム) を用いて泳動パターンを確認した。

2-2-3 PCR 産物の精製

電気泳動の結果、2 本のバンドが確認された PCR 産物の精製は Freeze 'N Squeeze DNA ゲル抽出スピナラム (BIORAD) を用いて行った。すなわち、2.0% アガロースゲル電気泳動において目的位置に得られたバンドを剃刀で切り出し、Freeze 'N Squeeze DNA ゲル抽出スピナラムに入れた。-20°C で 5 分間凍結した後、20°C、13,000 $\times g$ で 3 分間遠心分離した。

電気泳動の結果、バンドが 1 本のみ確認された PCR 産物の精製は Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER) を用いて行った。すなわち、96 ウェル PCR プレートに PCR 産物 10 μL 、AMPure XP 18 μL を加え 10 回ピペティングし、室温で 5 分間放置した。その後、マグネットプレート上で 2 分間静置し、上清を除去した。70% EtOH 200 μL を加え、マグネットプレート上で 30 秒間静置し、上清を除去した。再度 70% EtOH 200 μL を加え、マグネットプレート上で 30 秒間静置し、上清を除去した後、4 分間風乾した。マグネットプレートから外し、滅菌水 40 μL を加え 10 回ピペティングし、室温で 5 分間放置した。再びマグネットプレート上で 1 分間静置し、上清を 0.2 mL 容 PCR チューブに移した。

2-2-4 サブクローニング

人工交雑種に関しては TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) を用いてサブクローニングを行った。すなわち、0.2 mL 容 PCR チューブに精製した PCR 産物 2 μL 、滅菌水 2 μL 、Salt Solution 1 μL 、pCR™ 2.1-TOPO® vector 1 μL の順に加え、ベクターのセルフライゲーションを防ぐために静かに 1 回ピペティングし、室温で 5 分間インキュベートした。全量を氷上で解凍したコンピテントセル (大腸菌 JM109 株) 100 μL に加え、5 回ピペティングした後、氷上で 10 分間静置し、大腸菌を形質転換させた。42°C で 45 秒間加熱し、氷上で 2 分間静置した。あらかじめ 4°C に冷やしておいた SOC 培地 900 μL を加え 1 回ピペティングし、37°C、200 rpm で 1 時間振盪培養を行った。表面を乾燥させた LB 寒天培地に菌液 100 μL を播種し、37°C で 16-24 時間培養した。用いた SOC 培地および LB 寒天培地の組成は Table 2.2 および Table 2.3 に示した。

次にコロニーPCR を行い、目的産物が挿入されたコロニーを選抜した。プライマーセットはベクター上の T7 Promoter および M13 Reverse primer を採用し、プライマー配列は Table 2.4 に示した。PCR 増幅には EmeraldAmp® Max PCR Master Mix (タカラバイオ) を用いた。0.2 mL 容 PCR チューブに EmeraldAmp® Max PCR Master Mix (2 \times premix) 10 μL 、10 μM T7 Promoter 0.4 μL (終濃度 0.2 μM)、10 μM M13 Reverse Primer 0.4 μL (終濃度 0.2 μM) を加え、滅菌水で全量を 20 μL とした。白色コロニーを滅菌した爪楊枝で拾い、LB 寒天培地に植菌した後、コロニーPCR 用プレミックス溶液中に溶かし入れた。温度条件は 98°C で 2 分間加熱後、98°C で 10 秒、53°C で 30 秒、

72°Cで30秒を1サイクルとし30サイクル行った後、72°Cで10分間加熱し、最終伸長を行った。PCR増幅後、得られた反応液10 µLをGelGreen® Nucleic Acid Stain, 10,000X in water (BIOTIUM)入り2.0%アガロースゲル電気泳動に供した。通電は100 Vで30分間とし、LAS-4000mini (富士フィルム)を用いてバンドを確認した。目的産物の分子量にベクター配列179 bpが結合した分子量のコロニーを選抜した。

単一系統種に関してはpGEM®-T Easy Vector Systems (Promega)を用いてサブクローニングを行った。すなわち、0.2 mL容PCRチューブに2×Rapid Ligation Buffer 5 µL、精製したPCR産物3 µL、pGEM®-T Easy Vector (50 ng/µL) 1 µL、T4 DNA Ligase 1 µLの順に加え、ベクターのセルフライゲーションを防ぐために静かに1回ピペッティングし、4°Cで一晩インキュベートした。全量を氷上で解凍したコンピテントセル (大腸菌 JM109 株) 100 µLに加え、5回ピペッティングした後、氷上で20分間静置し、大腸菌を形質転換させた。42°Cで45秒間加熱し、氷上で2分間静置した。SOC培地900 µLを加え1回ピペッティングし、37°C、35 rpmで1.5時間振盪培養を行った。表面を乾燥させたLB寒天培地に菌液100 µLを播種し、37°Cで16-24時間培養した。

コロニーPCRのプライマーセットはベクター上のT7 PromoterおよびSP6 Promoterを採用し、プライマー配列はTable 2.4に示した。PCR増幅にはEmeraldAmp® Max PCR Master Mix (タカラバイオ)を用い、M13 Reverse primerに代わりSP6 Promoterを用いた以外は同様の方法で行った。PCR増幅後、同様にアガロースゲル電気泳動に供し、バンドを確認した。目的産物の分子量にベクター配列176 bpが結合した分子量のコロニーを選抜した。

2-2-5 塩基配列および反復回数の決定

PCR産物の精製は、電気泳動によりバンドが2本確認されたコロニーに関してはFreeze 'N Squeeze DNA ゲル抽出スピнкаラム (BIORAD)を用いて行った。バンドが1本であったコロニーに関してはExoSAP-IT® Express PCR Product Cleanup (affymetrix)を用い、1-2-4 PCR産物の精製と同様の方法で行った。

精製したPCR産物をBigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いたラベリング反応に供し、エタノール沈殿法による精製を行った後、シークエンスサンプルをABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)に供し、塩基配列を決定した。なお、ラベリング反応のプライマーは、人工交雑種に関してはT7 PromoterもしくはM13 Reverse primerを用い、単一系統種に関してはT7 PromoterもしくはSP6 Promoterを用いた。1-2-5 塩基配列の決定と同様の方法で塩基配列を決定した後、SeqEd v.1.0.3 (PerkinElmer)を用いてデータの解析を行い、反復回数を決定した。

2-3 結果および考察

8種のMS領域を対象としたPCR産物の電気泳動結果をFig. 2.1-2.16に示した。MS領域にてPCR産物の泳動位置が異なることは分子量が異なることを示しており、すなわち反復回数が異なることを意味する。よって、分子量の異なるPCR産物が得られたMS領域は父系種判別に適用可能であると考えられる。

今回対象とした8種のMS領域のうち、GCA反復配列から構成されるMS領域を除く7種のMS領域においては、普遍的かつ明瞭な差異を示さないことが確認された(Fig. 2.1-2.14)。CATCから構成されるMS領域を対象としたPCR増幅の結果(Fig. 2.1, 2.2)、人工交雑種において複数本のバンドが確認されたが、バンドの数および分子量は個体により異なっており、単一系統種においてもバンドが1本の個体や複数本の個体が存在していた。このMS領域は個体差が大きく同一種内で多型を示すことから、個体識別には有用であるが、トラフグとマフグの判別には適用できないことが明らかになった。TAAから構成されるMS領域を対象としたPCR増幅の結果(Fig. 2.3, 2.4)、人工交雑種において分子量がほぼ同一の1本のバンドが確認された。単一系統種においてもマフグ2個体を除いて、同一分子量のバンドが1本確認されたが、単一系統のトラフグとマフグの分子量に差異が確認されなかったため、このMS領域はトラフグとマフグの判別には適用できないことが明らかになった。CAAA、TCA、ATTから構成されるMS領域を対象としたPCR増幅の結果(Fig. 2.5-2.10)、人工交雑種において分子量がほぼ同一のバンドが確認され、単一系統種においてもほぼ同一分子量のバンドが確認された。CAAAから成るMS領域(Fig. 2.6)では、トラフグにおいてはバンドが1本の個体と2本の個体が確認され、マフグにおいては1個体で増幅がみられなかった。TCAから成るMS領域(Fig. 2.8)では、トラフグにおいては分子量がほぼ同一であったが、マフグにおいては分子量に個体差がみられた。ATTから成るMS領域(Fig. 2.10)では、トラフグ、マフグともに分子量に個体差がみられた。これらのMS領域は、トラフグとマフグにおける分子量の差異が小さく、個体差がみられたため、トラフグとマフグの判別には適用できないことが明らかになった。AGC、AATCから構成されるMS領域を対象としたPCR増幅の結果(Fig. 2.11, 2.13)、人工交雑種においてはマトラ3個体(AGCでは2個体、AATCでは1個体)を除いてバンドが確認された。AGCから成るMS領域(Fig. 2.12)では、トラフグにおいてバンドの数および分子量に個体差がみられた。人工交雑種においても同様にバンドの数および分子量に個体差がみられることから、このMS領域はトラフグとマフグの判別には適用できないことが明らかになった。AATCから成るMS領域(Fig. 2.14)では、マフグにおいてバンドの数および分子量に個体差がみられ、このMS領域もトラフグとマフグの判別には適用できないことが明らかになった。

一方、GCAから構成されるMS領域を対象としたPCR増幅の結果(Fig. 2.15, 2.16)、人工交雑種において分子量の異なる2本のバンドが確認された。単一系統種においては、トラフグでは分子量の大きい1本のバンドがみられ、マフグでは分子量の小さい1本のバンドが確認された。トラフグでみられたバンドの分子量は約360bp、マフグでみられたバンドの分子量は約260bpであり、これらは人工交雑種において確認されたバンドと分子量が近似していることから、このMS領域は保存性が高く、普遍的であることが明らかになり、トラフグとマフグの判別に適用可能で

あると判断された。以上の結果より、GCA から構成される MS 領域を対象として MS 解析を行うこととした。

GCA の反復回数および MS 解析を基にした両親種、第 1 章の mtDNA 解析により判別された母系種と 2 種類の判別法の組み合わせにより判定した父系種判別結果を Table 2.5 に示した。反復回数欄の「/」は分子量の差異を示しており、「分子量が小さい PCR 産物の反復回数/分子量が大きい PCR 産物の反復回数」として記載している。

MS 解析より、両親が既知の人工交雑種において、トラフグ由来である GCA 反復回数が 23-42 回 (314-371 bp) の MS、マフグ由来である GCA 反復回数が 6 回 (262 bp) の MS が検出された。また、トラフグにおける PCR 産物の反復回数は 28-44 回 (329-377 bp)、マフグにおける PCR 産物の反復回数は 6-7 回 (262-265 bp) であった。よって本 MS 領域はトラフグとマフグの判別に適用可能であることが示された。人工交雑種 11 個体のうち、マトラ No. 6 およびマトラ No. 8 におけるトラフグ由来 PCR 産物の分子量は約 310 bp であり、他のトラフグ由来 PCR 産物に比べ小さかったが、これらの反復回数が 23, 24 回であったことから、分子量の差異は反復回数の違いに起因していることが確認された。トラフグ No. 2 (反復回数 36 回) およびマフグ No. 2 (反復回数 6 回) における本 MS 領域の塩基配列を Fig. 2.17 に示した。トラフグとマフグにおいて、プライマーに挟まれた反復配列以外の塩基配列は 2 塩基を除いて一致していることから、個体による分子量の差異は全て反復回数の違いに起因することが明らかになった。また、同じ個体においてもコロニーの違いにより、反復回数に違いが現れた個体が確認された。MS 領域を対象とした PCR 増幅において、Taq ポリメラーゼが伸長反応をする段階で鋳型 DNA とずれてしまうことが推察されており⁴⁴⁾、本 MS 領域を対象とした PCR 増幅においても、伸長反応をする段階でずれが生じたことが原因である可能性が挙げられた。しかしながら、コロニーの違いによる反復回数の違いが確認されたのはトラフグのみであり、マフグにおいては反復回数の違いは確認されなかった。伸長反応段階でのずれが原因である場合、本章の結果から反復回数が多いときに生じやすいことが示唆される。一方で、反復回数に違いが現れた理由として、異なる個体由来の MS である可能性も挙げられる。アガロースゲル電気泳動では数塩基の分子量の違いを正確に区別することは困難であり、1 本と判断されたバンド上に分子量が数塩基異なるバンドが重なって現れている可能性も考えられる。本章において確認された反復回数の違いがどちらに起因するものであるかは定かでないが、異なる反復回数が 3 つ確認された個体 (トラマ No. 1, 2、マトラ No. 7) では両方の現象が関連していると推定される。

本 MS 領域において、トラフグでは 23-44 回 (314-377 bp)、マフグでは 6-7 回 (262-265 bp) の GCA 反復配列が保存されており、トラフグとマフグ間の人工交雑種では、トラフグ由来およびマフグ由来の GCA 反復配列が保存されていることが確認された。第 1 章にて行った mtDNA 解析と本 MS マーカーを併用することにより、母系種と父系種を判別することが可能であった。

Table 2.1 Primers used for PCR of microsatellite region

Primer	Sequence	Annealing temp. (°C)	Repeat motif
fms24F	5'-TTAGAAGCACTCGCTGTCAG-3'	58	CATC
fms24R	5'-GGCGAGAAACAATGCAAGA-3'		
fms40F	5'-CCTCCACAGACAAATGACCA-3'	66	TAA
fms40R	5'-AATCCGATGAAGAGCATTCG-3'		
fms52F	5'-AGCACCTCACACTCGGGTAG-3'	68	CAAA
fms52R	5'-GAGCCCTTAACACCCAAACA-3'		
fms67F	5'-ACTCTCTGCTTGTGCCCACT-3'	66	TCA
fms67R	5'-AAGAACGGCGGATGTTACAC-3'		
fms190F	5'-GTCAAGCACATCTTGCGTTC-3'	63	ATT
fms190R	5'-TCACCGACGGGAATAGTCAT-3'		
cst5F	5'-GTGATTGCGTCCTGCTGA-3'	57	AGC
cst5R	5'-TGGATCGGTCTGGACGTTGT-3'		
cst8F	5'-TTGACTTGTCTATTTGGAACC-3'	59	AATC
cts8R	5'-TTTCCTTGCCACTGTTGCTTG-3'		
fms93F	5'-CACGCAATTCTTGAGTGCAT-3'	68	GCA
fms93R	5'-GGCAGGTAGTCCGTCATCAA-3'		

Table 2.2 SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) medium component

Bacto Tryptone	20 g
Bacto Yeast extract	5 g
1 M NaCl	10 mL
1 M KCl	2.5 mL
2 M Mg ²⁺ stock	10 mL
2 M Glucose	10 mL
5 N NaOH	1.6-1.7 mL
Sterile distilled water	1 L

Table 2.3 LB (Luria-Bertani or Lysogeny Broth) medium component

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Agar powder	20 g
5N NaOH	200 µL
Ampicillin (50 mg/mL)	1 mL
Kanamycin (25 mg/mL)	2 mL
1 M IPTG (Isopropyl-β-D (-)-thiogalactopyranoside)	100 µL
25% X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)	250 µL
Sterile distilled water	1 L

Antibacterial substances (ampicillin and kanamycin) were depended on vector of subcloning.

Table 2.4 Primers used for colony PCR

Primer	Sequence
T7 Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6 Promoter	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3'
M13 Reverse Primer	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

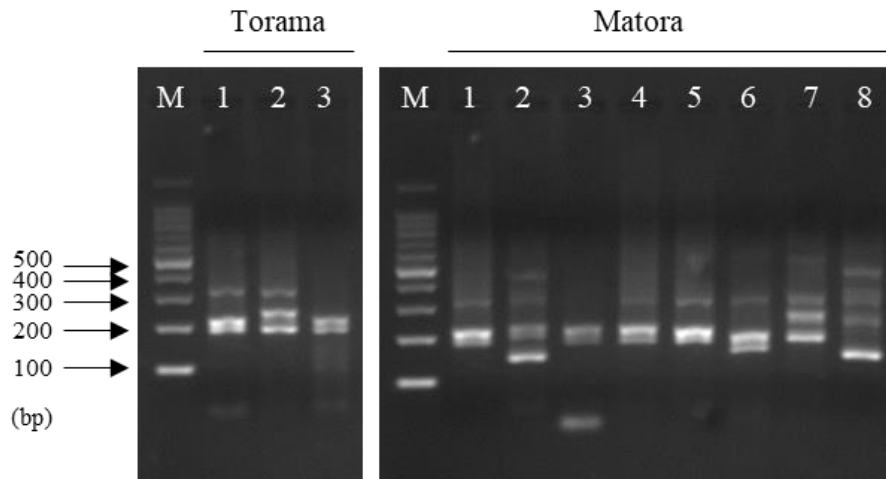


Fig. 2.1 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including CATC motif amplified by using *fms24F* and *fms24R* for artificial hybrid pufferfish.
M, Maker.

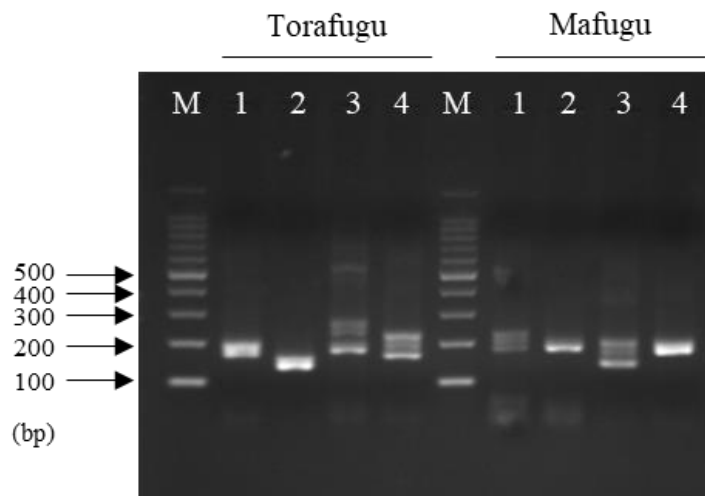


Fig. 2.2 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including CATC motif amplified by using *fms24F* and *fms24R* for Torafugu and Mafugu.
M, Maker.

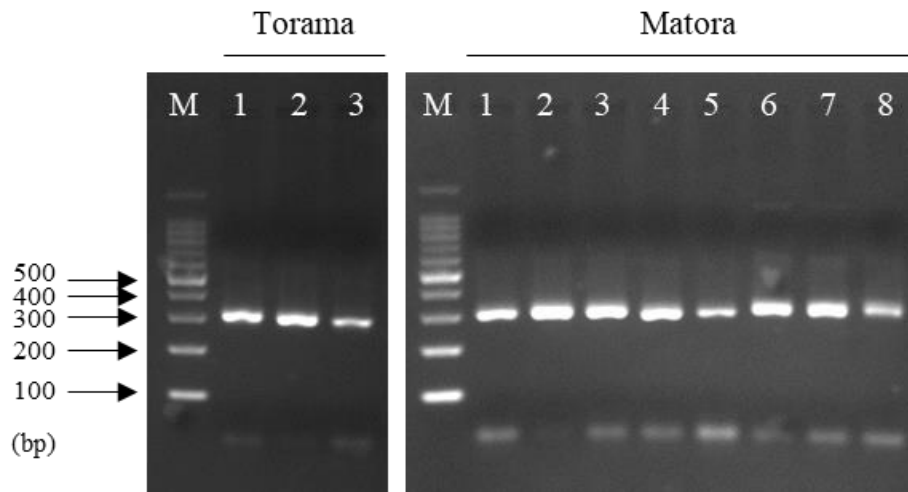


Fig. 2.3 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including TAA motif amplified by using *fms40F* and *fms40R* for artificial hybrid pufferfish.
M, Maker.

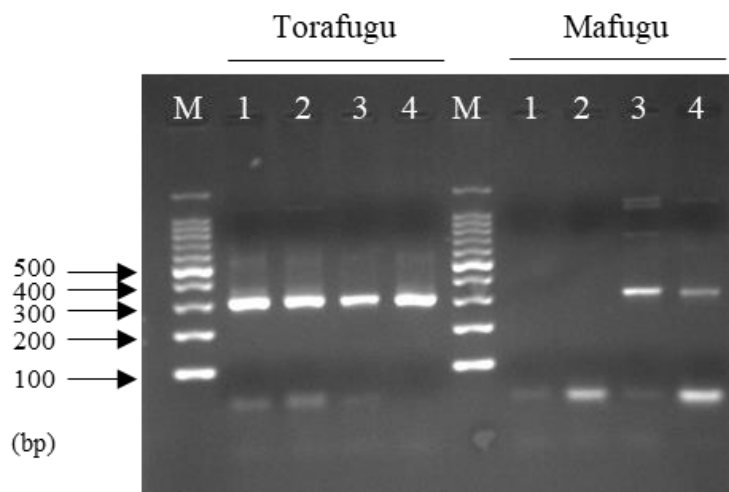


Fig. 2.4 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including TAA motif amplified by using *fms40F* and *fms40R* for Torafugu and Mafugu.
M, Maker.

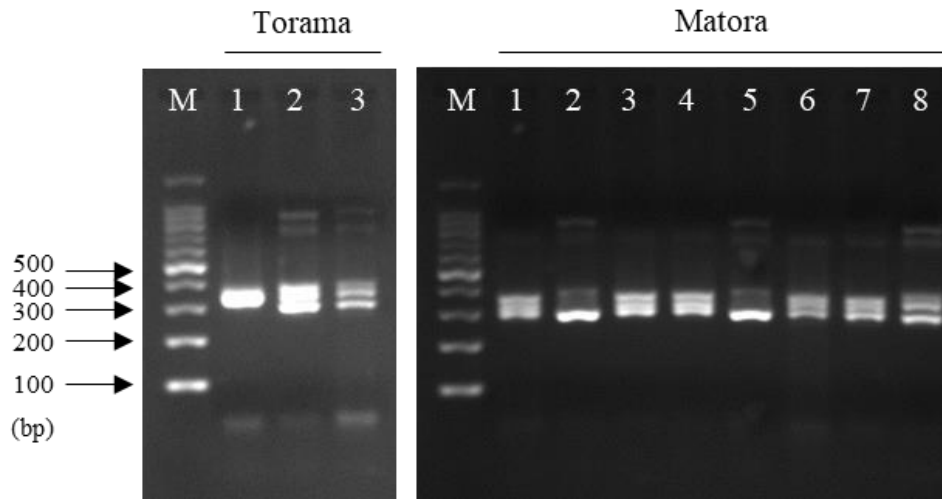


Fig. 2.5 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including CAAA motif amplified by using *fms52F* and *fms52R* for artificial hybrid pufferfish. M, Maker.

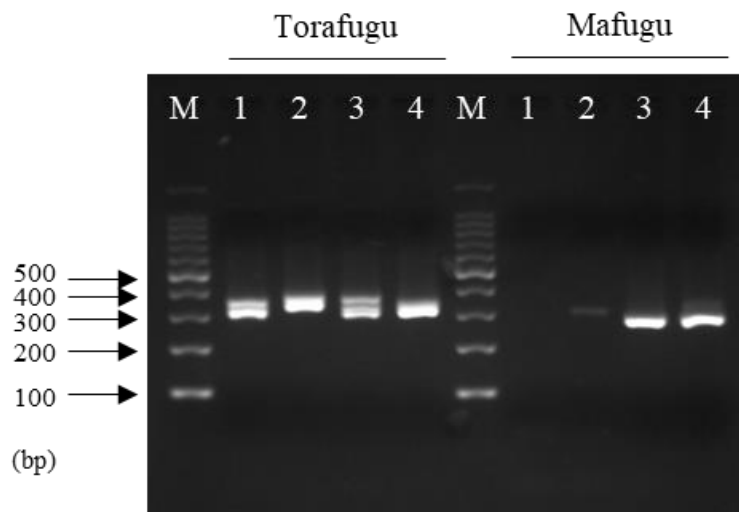


Fig. 2.6 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including CAAA motif amplified by using *fms52F* and *fms52R* for Torafugu and Mafugu. M, Maker.

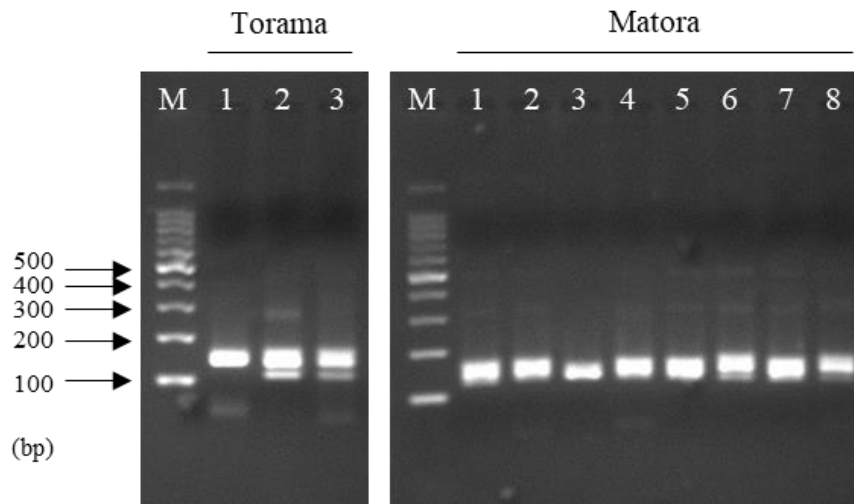


Fig. 2.7 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including TCA motif amplified by using *fms67F* and *fms67R* for artificial hybrid pufferfish.
M, Maker.

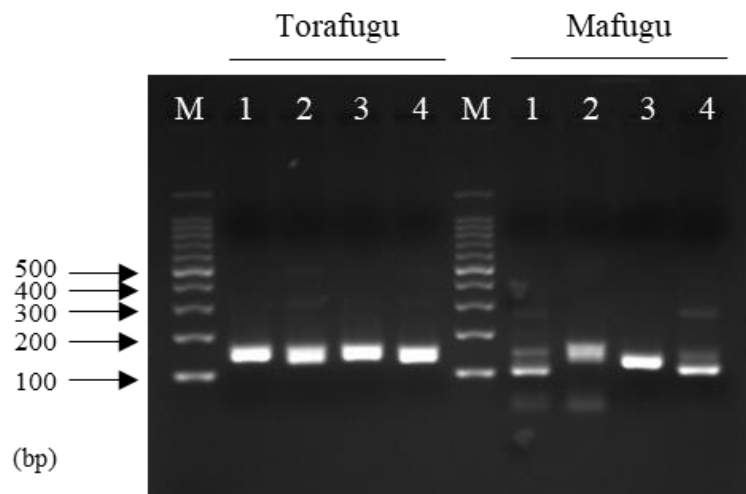


Fig. 2.8 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including TCA motif amplified by using *fms67F* and *fms67R* for Torafugu and Mafugu.
M, Maker.

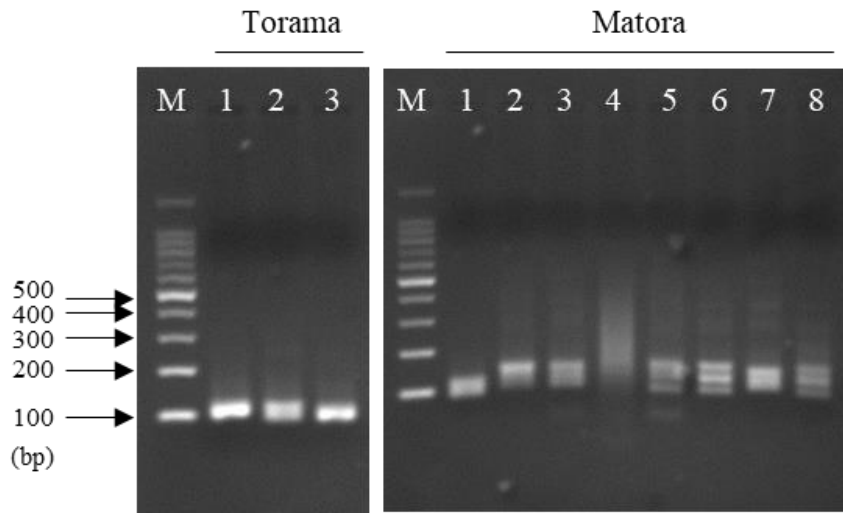


Fig. 2.9 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including ATT motif amplified by using *fms190F* and *fms190R* for artificial hybrid pufferfish.
M, Maker.

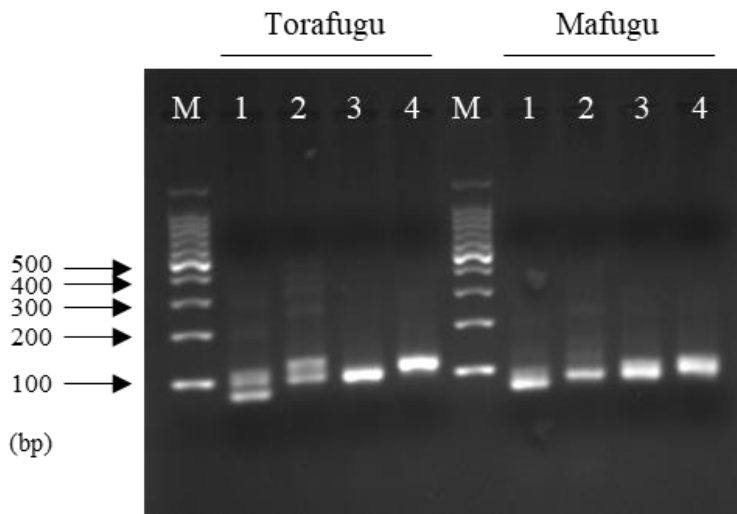


Fig. 2.10 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including ATT motif amplified by using *fms190F* and *fms190R* for Torafugu and Mafugu.
M, Maker.

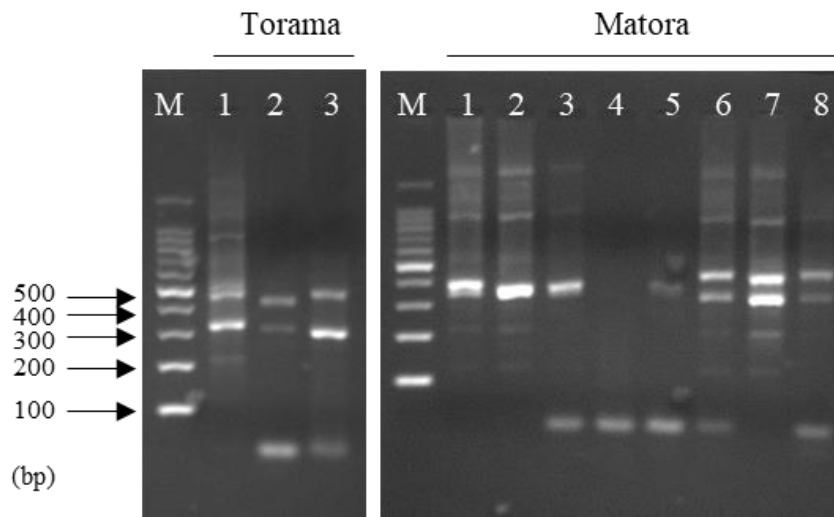


Fig. 2.11 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including AGC motif amplified by using cst5F and cst5R for artificial hybrid pufferfish.
M, Maker.

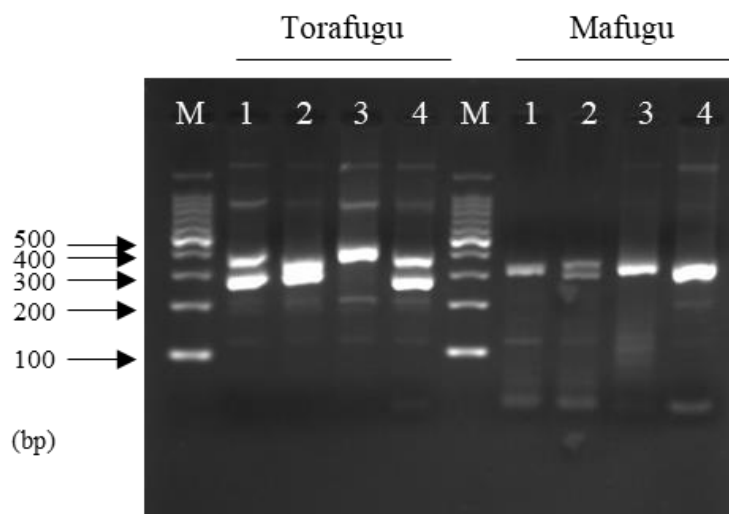


Fig. 2.12 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including AGC motif amplified by using cst5F and cst5R for Torafugu and Mafugu.
M, Maker.

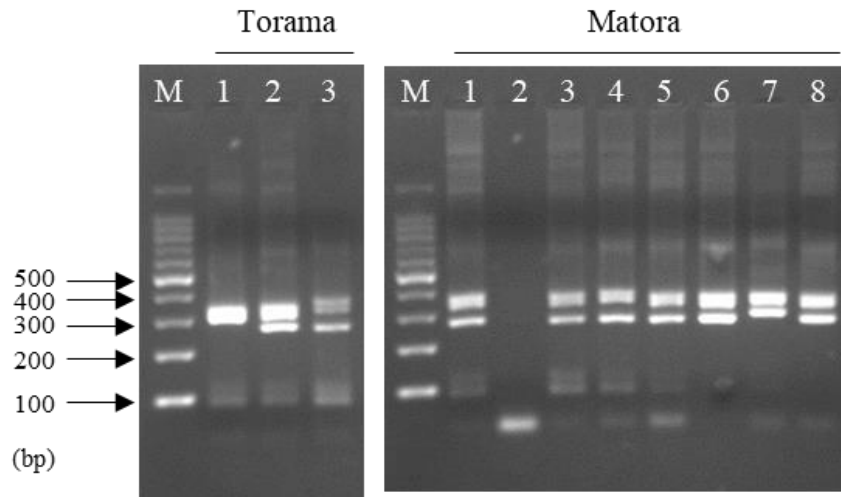


Fig. 2.13 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including AATC motif amplified by using *cst8F* and *cst8R* for artificial hybrid pufferfish.
M, Maker.

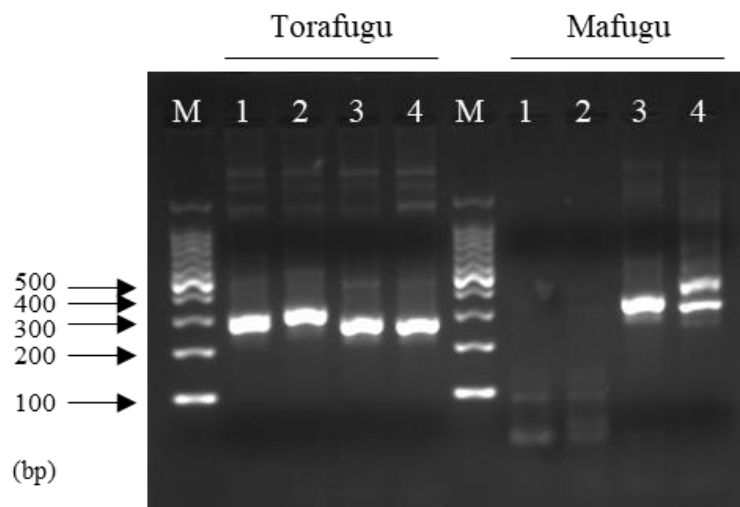


Fig. 2.14 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including AATC motif amplified by using *cst8F* and *cst8R* for Torafugu and Mafugu.
M, Maker.

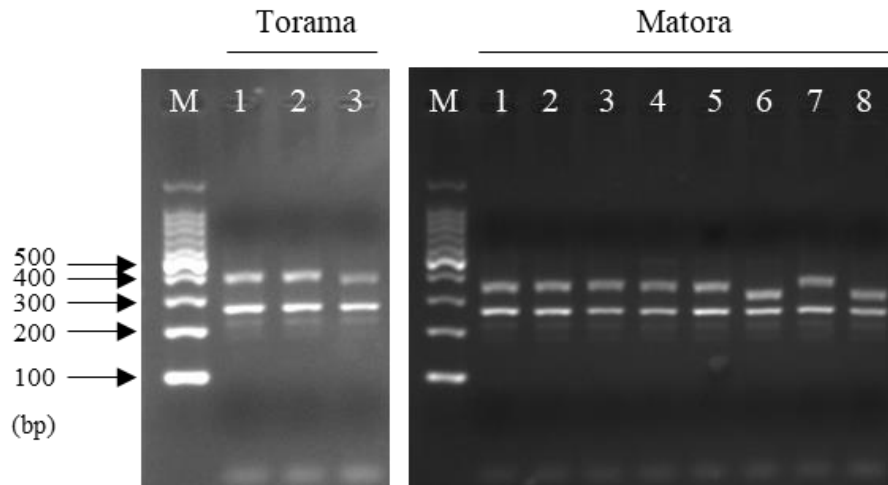


Fig. 2.15 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including GCA motif amplified by using *fms93F* and *fms93R* for artificial hybrid pufferfish.
M, Maker.

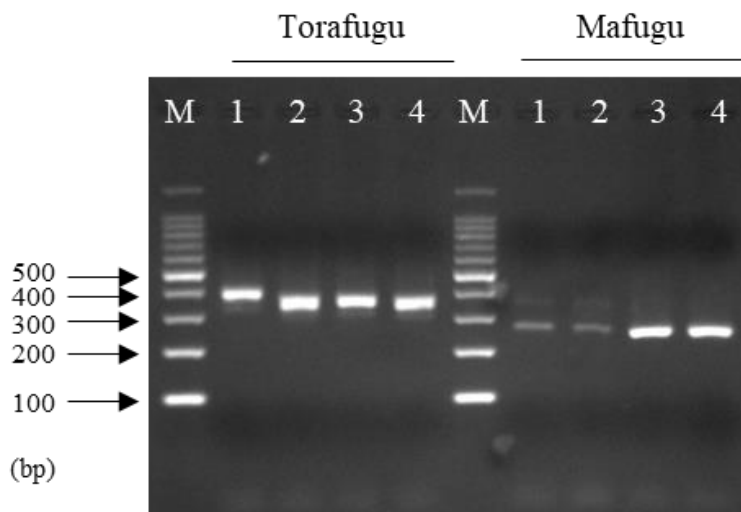


Fig. 2.16 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including GCA motif amplified by using *fms93F* and *fms93R* for Torafugu and Mafugu.
M, Maker.

Table 2.5 Result of MS analyses and species identifications of 19 pufferfish

Sample		Number of repeats (GCA) _n	Maternal species	Paternal species	Species identification by MS analysis
Torama	1	6/39, 41, 42			
	2	6/40, 41, 42	Torafugu	Mafugu	Mafugu/Torafugu
	3	6/36, 37			
Matora	1	6/28			
	2	6/31, 33			
	3	6/34			
	4	6/33			
	5	6/32, 33	Mafugu	Torafugu	Mafugu/Torafugu
	6	6/23, 24			
	7	6/37, 39, 40			
	8	6/24			
Torafugu	1	42, 44			
	2	29, 36			
	3	33, 39	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	4	28, 30			
Mafugu	1	6			
	2	6			
	3	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	4	7			

Slash (/) indicates difference of MS repeat number from different PCR products.

第3章 マイクロサテライトマーカースの適用性の検証

3-1 目的

第2章にてGCA反復配列から構成されるMS領域では、トラフグとマフグ間の人工交雑種においてトラフグ由来の反復回数を持つMSおよびマフグ由来の反復回数を持つMSがともに保存されており、mtDNA解析との併用により両親種の判別が可能であることが明らかになった。本MS領域が他種においても普遍的に保存されているかを確認するため、トラフグ属に属し、日本近海にて頻繁に漁獲される種であるクサフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモフグを用いてPCR産物の分子量を比較し、塩基配列および反復回数を決定した。また、単一系統トラフグおよびマフグにおいては個体数を増やし、本MS領域の再現性を検証した。

さらに、トラフグ属種間の交雑種と推定され、mtDNA解析にて母系種を判別した自然交雑種27個体においても本MS領域を対象としたPCR増幅を行い、PCR産物の分子量を比較した。また、塩基配列および反復回数を決定し、本MSマーカースの適用性を検証するとともに、本MSマーカースを用いた両親種判別が可能であるかを検討した。

3-2 方法

3-2-1 試料

試料には単一系統種および自然交雑種を用いた。

単一系統種として、単一系統クサフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモフグ各4個体および単一系統トラフグ、マフグ各26個体を用いた。

自然交雑種として、形態学的特徴からトラフグとマフグ間の交雑種と推定される6個体を含む、トラフグ属種間の交雑種と推定される27個体を用いた。

3-2-2 選抜したマイクロサテライト領域を対象としたPCR増幅

PCR増幅にはTaKaRa Ex Taq® (タカラバイオ)を用い、プライマーはfms93F、fms93Rを用いた。TaKaRa Ex Taq (5 U/μL) 0.625 U、10×Ex Taq Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) 2.5 μL、dNTP mixture (2.5 mM each) 2.0 μL、10 μM fms93F 0.5 μL (終濃度 0.2 μM)、10 μM fms93R 0.5 μL (終濃度 0.2 μM)、DNA 25 ng を加え、滅菌水で 25 μL の反応系とした。温度条件は 94°C で 5 分間加熱後、94°C で 30 秒、68°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。PCR 増幅後、得られた反応液 10 μL を GelGreen® Nucleic Acid Stain, 10,000X in water (BIOTIUM) 入り 2.0% アガロースゲル電気泳動に供した。通電は 100 V で 60 分間とし、LAS-4000mini (富士フイルム) を用いて泳動パターンを確認した。

3-2-3 マイクロサテライト解析

PCR 産物の精製は、電気泳動の結果を基に行った。バンドが 2 本確認された場合、Freeze 'N Squeeze DNA ゲル抽出スピカラム (BIORAD) を用いた。バンドが 1 本のみ確認された場合には Agencourt AMPure XP (BECKMAN COULTER) を用いた。サブクローニングには pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) を用い、人工交雑種および単一系統トラフグ、マフグにおける MS 解析と同様の方法で行った。すなわち、第 2 章 2-2-3 PCR 産物の精製、2-2-4 サブクローニング、2-2-5 塩基配列および反復回数決定を行った。

3-3 結果および考察

トラフグ属 4 種における PCR 産物の電気泳動結果を Fig. 3.1 に示した。16 個体全てにおいて、分子量がほぼ同一の 1 本のバンドが確認された。これらの個体における GCA の反復回数および MS 領域を基にした両親種、第 1 章の mtDNA 解析により判別された母系種と 2 種類の判別法の組み合わせにより判定した父系種判別結果を Table 3.1 に示した。

MS 解析より、クサフグでは GCA 反復回数が 6-7 回 (265-268 bp) の MS、ゴマフグでは GCA 反復回数が 6 回 (262 bp) の MS、シマフグでは GCA 反復回数が 6-8 回 (262-268 bp) の MS、コモンフグでは GCA 反復回数が 6-8 回 (262-268 bp) の MS が検出された。クサフグ No. 1 (反復回数 7 回)、ゴマフグ No. 1 (反復回数 6 回)、シマフグ No. 3 (反復回数 7 回)、コモンフグ No. 4 (反復回数 7 回) および比較として、第 2 章において反復回数を決定したマフグ No. 2 (反復回数 6 回) における MS 領域の塩基配列を Fig. 3.2 に示した。ゴマフグ、シマフグ、コモンフグにおいて、反復配列を除く塩基配列は 1, 2 塩基の差異はあるものの、ほぼ一致していた。また、ゴマフグ、シマフグ、コモンフグの塩基配列は、マフグの塩基配列ともほぼ一致しており、塩基配列の差異は 1, 2 塩基のみであった。一方、クサフグにおける塩基配列は他種と比較すると、3 塩基の違いが確認された。この 3 塩基の配列はクサフグのみに保存されており、クサフグにおいて特異的に現れる配列であると推測された。したがって、3 塩基の配列の有無によりクサフグの判別が可能であることが明らかになった。ゴマフグ、シマフグ、コモンフグの 3 種においても、塩基配列の差異を利用することで判別が可能であると推測されたが、同種の異なる個体間において、配列に 1, 2 塩基の差異が確認された。さらに、塩基配列の差異は Fig. 3.2 にて太字で示した位置にみられたことから、3 種間で確認された配列の差異は種によるものでなく、個体によるものであると推測された。本章においても第 2 章と同様に、同じ個体内の異なるコロニーにより反復回数に違いが現れた。コロニーによる反復回数の違いが確認されたのはシマフグ、コモンフグのみであった。第 2 章において、伸長反応でのずれは反復回数が多い場合にみられやすいと推測されたが、反復回数が少ないシマフグ、コモンフグでも確認されたことから、反復回数の多さにあまり関連はないと考えられた。また、異なる個体由来の MS である可能性も十分に挙げられる。加えて、コモンフグでは同じ個体においてもコロニーの違いにより、GCA 反復配列内に塩基の置換が起きていることが確認された (Fig. 3.3)。この塩基の置換は他種においては確認されなかったことから、コモンフグにおける GCA 反復配列は他種に比べ保存性が低く、変異しやすい可能性がある。

単一系統トラフグおよびマフグにおける PCR 産物の電気泳動結果を Fig. 3.4, 3.5 に示した。トラフグでは 26 個体全てにおいて約 310-370 bp のバンドが確認され、本 MS マーカーの再現性は 100.0%であった (Fig. 3.4)。マフグでは 26 個体全てにおいて約 260 bp のバンドが確認され、本 MS マーカーの再現性は 100.0%であったが、マフグ No. 19 においては約 260 bp のバンドに加え、約 370 bp のバンドも確認された (Fig. 3.5)。マフグ No. 19 においても、他のマフグ個体と同様のマフグ由来 PCR 産物は保存されていることから、約 370 bp のバンドが変異によって生じた可能性は低いといえる。今回用いたマフグは、形態学的特徴を基にした判別および mtDNA を用いた母系種判別により単一系統と推定された個体であるため、純粋な単一系統ではないマフグが混在している可能性が挙げられる。したがって、マフグ No. 19 は単一系統のマフグでない可能性が高い

と推測された。また、トラフグ7個体（トラフグ No. 6-9, 20, 23, 25）においては約 310-370 bp のバンドが2本確認されたが、これは反復回数が異なるトラフグ同士から生じた第二世代のトラフグである可能性が高いと考えられる。

単一系統トラフグおよびマフグの MS 解析結果を Table 3.2, 3.3 に示した。MS 解析より、トラフグ 26 個体において GCA 反復回数が 21-43 回 (308-374 bp) の MS、マフグ 26 個体において GCA 反復回数が 5-9 回 (259-271 bp) の MS、うち 1 個体（マフグ No. 19）においては GCA 反復回数が 43 回 (374 bp) の MS も検出された。第 2 章にて、トラフグ由来 MS の反復回数は 23-44 回 (314-377 bp)、マフグ由来 MS の反復回数は 6-7 回 (262-265 bp) であったことから、本章においても同様の結果を得たことが確認された。マフグ 2 個体（マフグ No. 5, 9）においては GCA 反復回数がそれぞれ 5 回 (259 bp) と 9 回 (271 bp) であり、解析済みのマフグ由来 MS の反復回数と比べ数回の差異があったが、母系種がマフグであると判定されているため、マフグであると推定した。したがって、MS 解析の結果から両親種が判定され、トラフグ 26 個体は単一系統トラフグであり、マフグは 1 個体を除いて単一系統マフグであることが明らかになった。マフグ No. 19 でみられた分子量の大きいバンドは反復回数が 43 回であったことから、トラフグ由来 MS であると推測された。第 1 章にて行った mtDNA 解析により、母系種はマフグであると判定されたことを踏まえると、父系種がトラフグであると判定され、マフグ No. 19 はマフグとトラフグ間の自然交雑種である可能性が高いことが明らかになった。

自然交雑種における PCR 産物の電気泳動結果を Fig. 3.6 に示した。得られたバンドの数および分子量は個体によってさまざまであったが、mtDNA 解析により、母系種がトラフグであると判定された個体においては約 310-390 bp、母系種がマフグであると判定された個体においては約 260 bp のバンドが確認された。母系種がゴマフグであると判定された個体においても約 260 bp のバンドが確認され、本 MS 領域は普遍的に保存されていることが明らかになった。また、母系種がショウサイフグであると判定された個体においても約 260 bp のバンドが確認された。トラフグとマフグ間の交雑種と推定された 6 個体（自然交雑種 No. 1-6）においては、約 320-340 bp のバンドおよび約 260 bp のバンドが確認され、トラフグとマフグ間の自然交雑種における本 MS マーカーの再現性は 100.0%であった。

自然交雑種の MS 解析結果を Table 3.4 に示した。MS 解析より、母系種がトラフグの交雑種 17 個体（自然交雑種 No. 1, 3, 5-7, 9-17, 22, 24, 27）において GCA 反復回数が 21-48 回 (308-389 bp) の MS、母系種がマフグの交雑種 7 個体（自然交雑種 No. 2, 4, 8, 18, 23, 25, 26）において GCA 反復回数が 5-7 回 (259-265 bp) の MS、母系種がゴマフグの交雑種 2 個体（自然交雑種 No. 19, 20）において GCA 反復回数が 6-9 回 (262-271 bp) の MS、母系種がショウサイフグの交雑種 1 個体（自然交雑種 No. 21）において GCA 反復回数が 7 回 (265 bp) の MS が検出された。トラフグとマフグ間の交雑種と推定された 6 個体（自然交雑種 No. 1-6）においては、反復回数が 27-33 回 (326-244 bp) のトラフグ由来 MS および反復回数が 5-6 回 (259-262 bp) のマフグ由来 MS が検出され、4 個体（自然交雑種 No. 1, 3, 5, 6）は母系種がトラフグであることから父系種はマフグ、2 個体（自然交雑種 No. 2, 4）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された。

形態学的特徴と mtDNA 解析および MS 解析を併用することにより、トラフグとマフグ間の交雑種を除いた 21 個体のうち 10 個体（自然交雑種 No. 8, 18-21, 23-26）の両親種を判別することが

可能であった。自然交雑種 No. 8 は第 1 章にて母系種がマフグと判定され、形態学的特徴から、父系種はシマフグであると推定された。自然交雑種 No. 8 において検出された MS は反復回数が 7 回 (265 bp) であり、マフグ由来 MS およびシマフグ由来 MS の反復回数と等しいことが明らかになった。したがって、この MS はマフグおよびシマフグ由来の MS であると推測され、父系種はシマフグであると判定された。母系種がマフグと判定された 4 個体 (自然交雑種 No. 18, 23, 25, 26) においてはマフグ由来 MS に加え、反復回数が 26-28 回 (323-329 bp) の MS が検出された。本章における MS 解析の結果に基づくと、これらの MS はトラフグ由来であると推測され、父系種はトラフグであると判定された。形態学的特徴および mtDNA 解析からゴマフグとショウサイフグ間の交雑種と推定された 3 個体 (自然交雑種 No. 19-21) においては反復回数が 6-9 回 (262-271 bp) の MS が検出され、本章における MS 解析の結果に基づくと、これらの MS はゴマフグ由来であると推測された。したがって、自然交雑種 No. 21 の父系種はゴマフグであると判定された。自然交雑種 No. 19, 20 においては、形態学的特徴から父系種はショウサイフグであると推測された。ショウサイフグにおける本 MS マーカーの再現性および GCA 反復回数は不明であるが、自然交雑種 No. 19-21 の MS 解析結果から、本 MS マーカーが保存されていない可能性、あるいはショウサイフグ由来 MS およびゴマフグ由来 MS の反復回数が近似している可能性が挙げられる。これらを明らかにするためには、ショウサイフグにおいて MS 解析を行う必要がある。自然交雑種 No. 22 は母系種がトラフグと判定され、形態学的特徴から父系種はマフグである可能性が極めて高いとされた。MS 解析により、反復回数が 48 回 (389 bp) のトラフグ由来 MS および反復回数が 7 回 (265 bp) のマフグ由来 MS が検出されたことから、父系種はマフグであると判定された。自然交雑種 No. 24 は母系種がトラフグと判定され、形態学的特徴から父系種はムシフグであると推定された。自然交雑種 No. 24 において検出された MS は反復回数が 40 回 (365 bp) であり、この MS はトラフグ由来であると推測された。ショウサイフグ同様、ムシフグにおける本 MS マーカーの再現性および GCA 反復回数は不明であるが、背面および体側の虫がはった跡のような模様はムシフグ特有であることから、父系種はムシフグと判定された。

残りの 11 個体においては、形態学的特徴と mtDNA 解析および MS 解析を併用してもなお、父系種を判別することができなかった。自然交雑種 No. 7 においては、反復回数が 21 回 (308 bp) の MS および反復回数が 44 回 (377 bp) の MS が検出された。トラフグにおける MS の反復回数が 21-43 回 (308-374 bp) であったことから、自然交雑種 No. 7 において検出された MS はともにトラフグ由来 MS である可能性が高いと推測された。反復回数が異なる MS が検出された理由としては、母親が第二世代のトラフグであるためと考えられる。自然交雑種 No. 9 において検出された MS は、反復回数が 39 回 (362 bp) のトラフグ由来 MS のみであった。形態学的特徴から父系種はヒガンフグもしくはアカメフグであると推定されたが、ヒガンフグもしくはアカメフグ由来と推定される MS は検出されなかった。ショウサイフグやムシフグと同様に、ヒガンフグおよびアカメフグにおける本 MS マーカーの再現性および GCA 反復回数は不明であり、現時点では父系種の判定には至らなかった。母系種がトラフグと判定された 9 個体 (自然交雑種 No. 10-17, 27) においては、反復回数が 24-38 回 (316-359 bp) のトラフグ由来 MS が検出された。6 個体 (自然交雑種 No. 11-15, 27) においてはトラフグ由来 MS のみが検出されたため、父系種を判定することはできなかった。また、3 個体 (自然交雑種 No. 10, 16, 17) において、自然交雑種 No. 10 では反復

回数が7回 (265 bp) のMS、自然交雑種 No. 16, 17 では反復回数が15回 (290 bp) のMSが検出されたが、父系種を絞り込むことは困難であった。したがって、11個体においては本MSマーカーを用いて両親種を判別することは不可能であり、本MSマーカーは他種間交雑種の両親種判別には適さないことが明らかになった。一方で、トラフグとマフグ間の交雑種においては両親種判別が可能であり、本MSマーカーは普遍的に保存されていることが明らかになった。

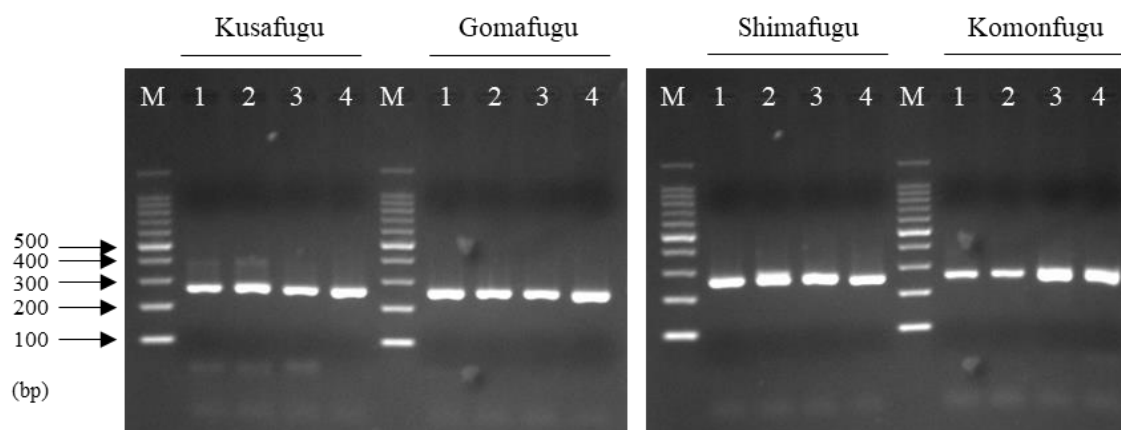


Fig. 3.1 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including GCA motif amplified by using fms93F and fms93R for 16 pufferfish.

M, Maker.

Table 3.1 Result of MS analyses and species identifications of 16 pufferfish

Sample		Number of repeats (GCA) _n	Maternal species	Paternal species	Species identification by MS analysis
Kusafugu	1	7	Kusafugu	Kusafugu	Kusafugu
	2	7			
	3	7			
	4	6			
Gomafugu	1	6	Gomafugu	Gomafugu	Gomafugu
	2	6			
	3	6			
	4	6			
Shimafugu	1	6, 7	Shimafugu	Shimafugu	Shimafugu
	2	8			
	3	7, 8			
	4	6			
Komonfugu	1	7	Komonfugu	Komonfugu	Komonfugu
	2	8			
	3	7			
	4	6, 7			

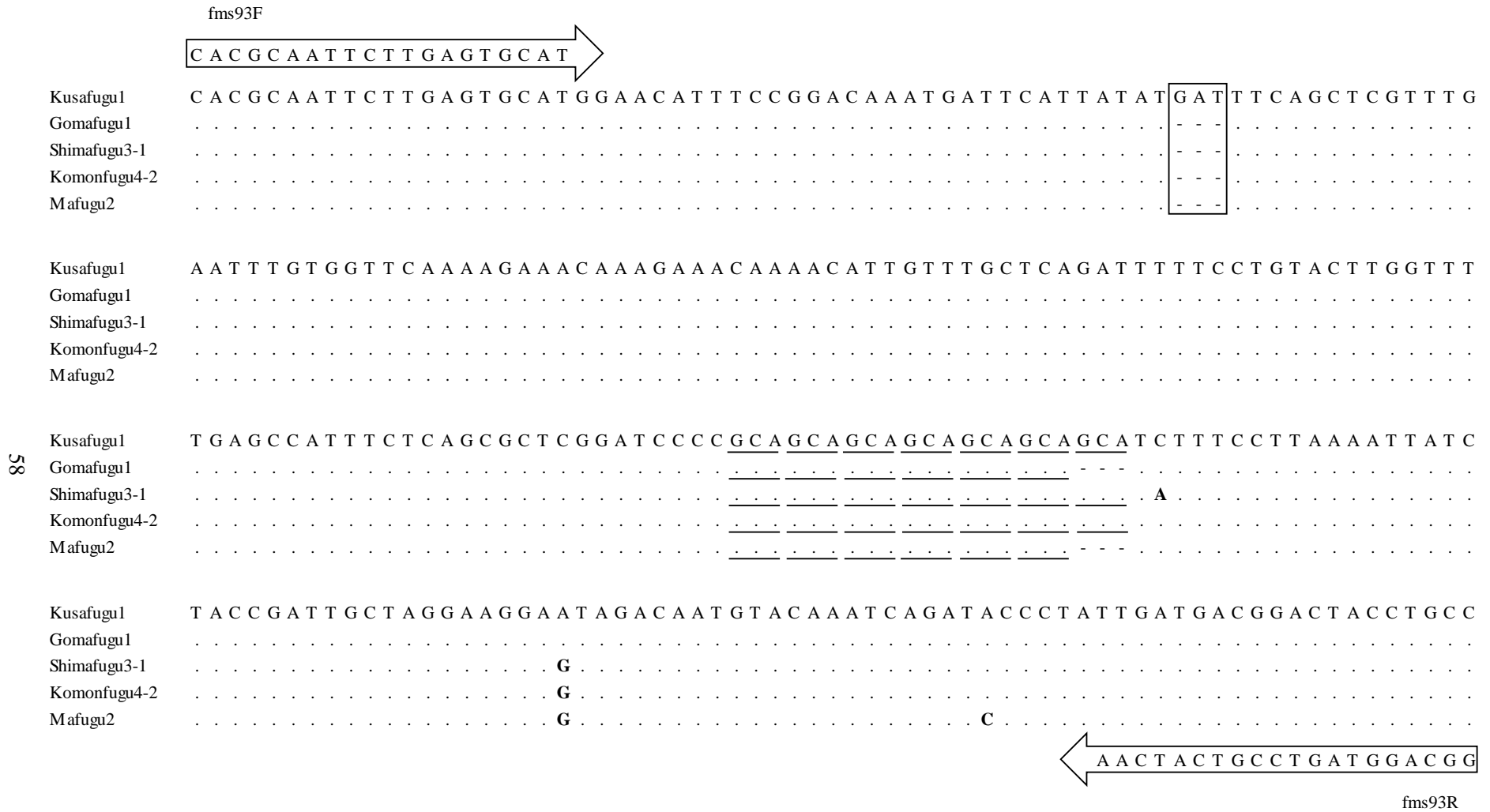


Fig. 3.2 DNA sequences of GCA region from Kusafugu, Gomafugu, Shimafugu, Komonfugu and Mafugu.

A dot (.) indicates identity with the 1st sequence.

Under bar () indicates one MS.

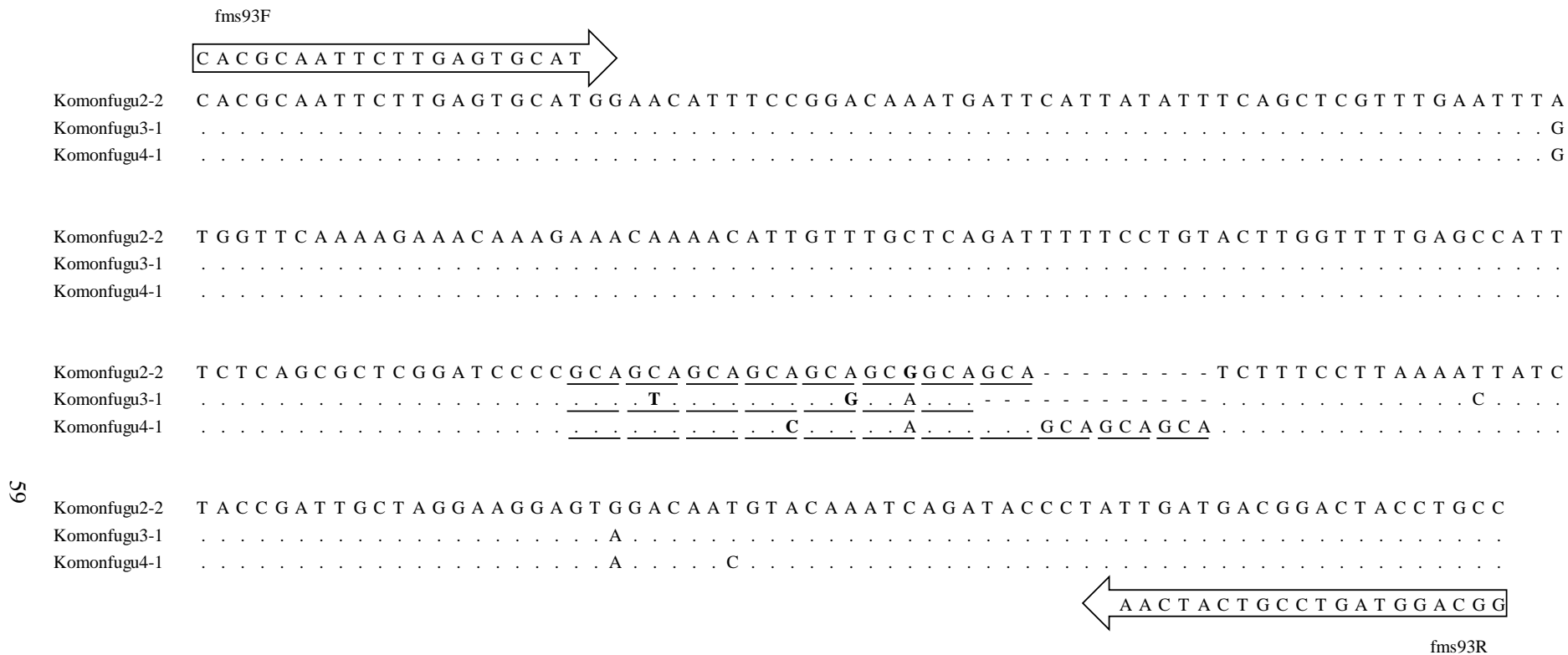


Fig. 3.3 DNA sequences of GCA region from Komonfugu.

A dot (.) indicates identity with the 1st sequence.

Under bar () indicates one MS.

A bold means the base substitution.

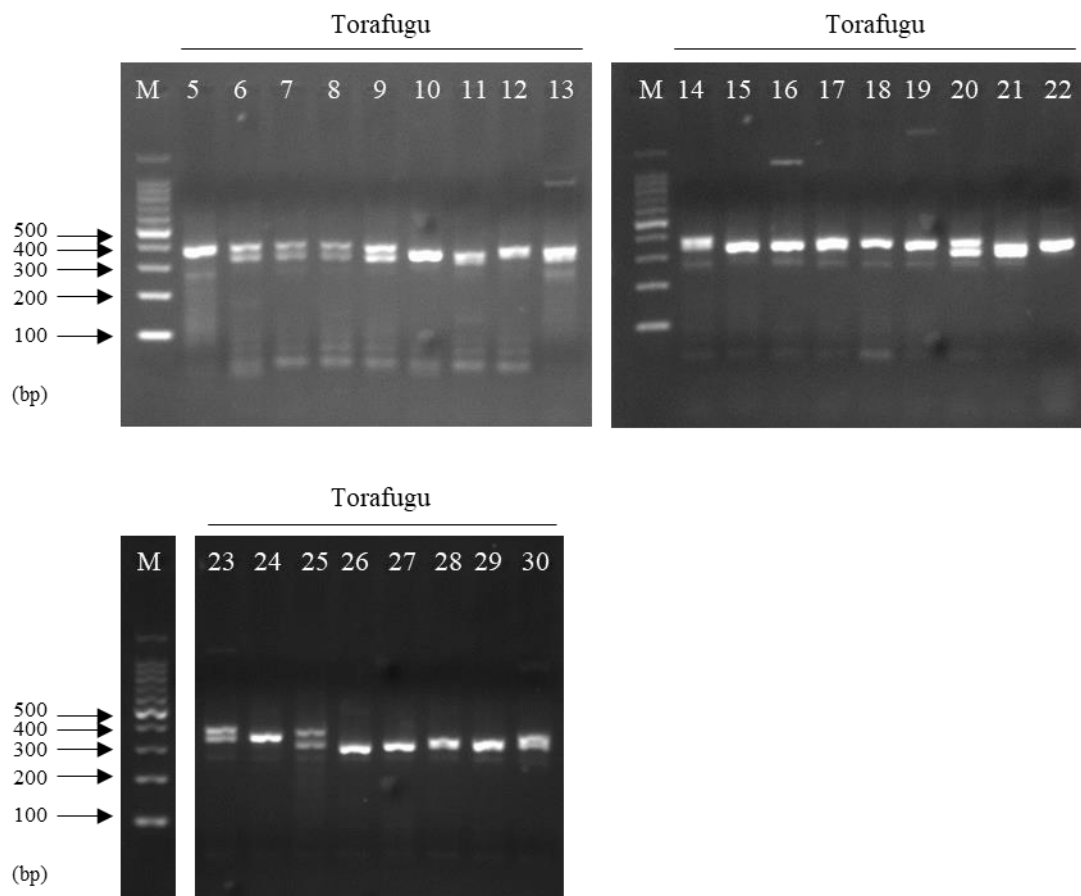


Fig. 3.4 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including GCA motif amplified by using *fms93F* and *fms93R* for Torafugu.
 M, Maker.

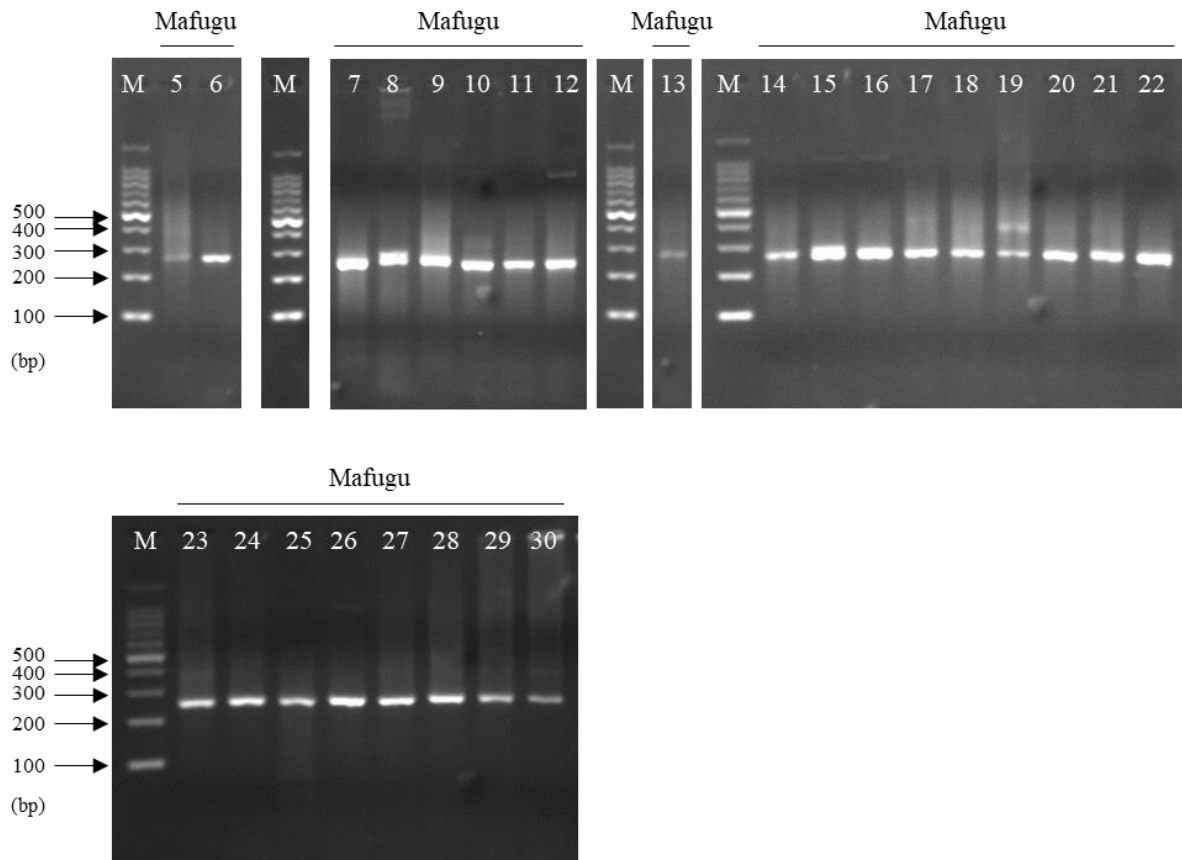


Fig. 3.5 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including GCA motif amplified by using *fms93F* and *fms93R* for Mafugu.
M, Maker.

Table 3.2 Result of MS analyses and species identifications of Torafugu

Sample		Number of repeats (GCA) _n	Maternal species	Paternal species	Species identification by MS analysis
Torafugu	5	25, 33	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	6	24/38	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	7	24/34	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	8	25/39	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	9	24/37	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	10	29, 31	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	11	27, 29	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	12	37	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	13	26	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	14	36	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	15	26, 29	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	16	27, 29	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	17	35, 36	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	18	33	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	19	33	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	20	22/37	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	21	21	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	22	30	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	23	30/43	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	24	35	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	25	23/40	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	26	21	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	27	22, 24	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	28	28, 29	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	29	24	Torafugu	Torafugu	Torafugu
	30	28	Torafugu	Torafugu	Torafugu

Slash (/) indicates difference of MS repeat number from different PCR products.

Table 3.3 Result of MS analyses and species identifications of Mafugu

Sample		Number of repeats (GCA) _n	Maternal species	Paternal species	Species identification by MS analysis
Mafugu	5	5	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	6	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	7	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	8	7	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	9	9	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	10	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	11	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	12	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	13	7	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	14	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	15	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	16	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	17	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	18	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	19	6/43	Mafugu	Torafugu	Mafugu/Torafugu
	20	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	21	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	22	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	23	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	24	7	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	25	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	26	7	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	27	6	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	28	7	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	29	7	Mafugu	Mafugu	Mafugu
	30	7	Mafugu	Mafugu	Mafugu

Slash (/) indicates difference of MS repeat number from different PCR products.

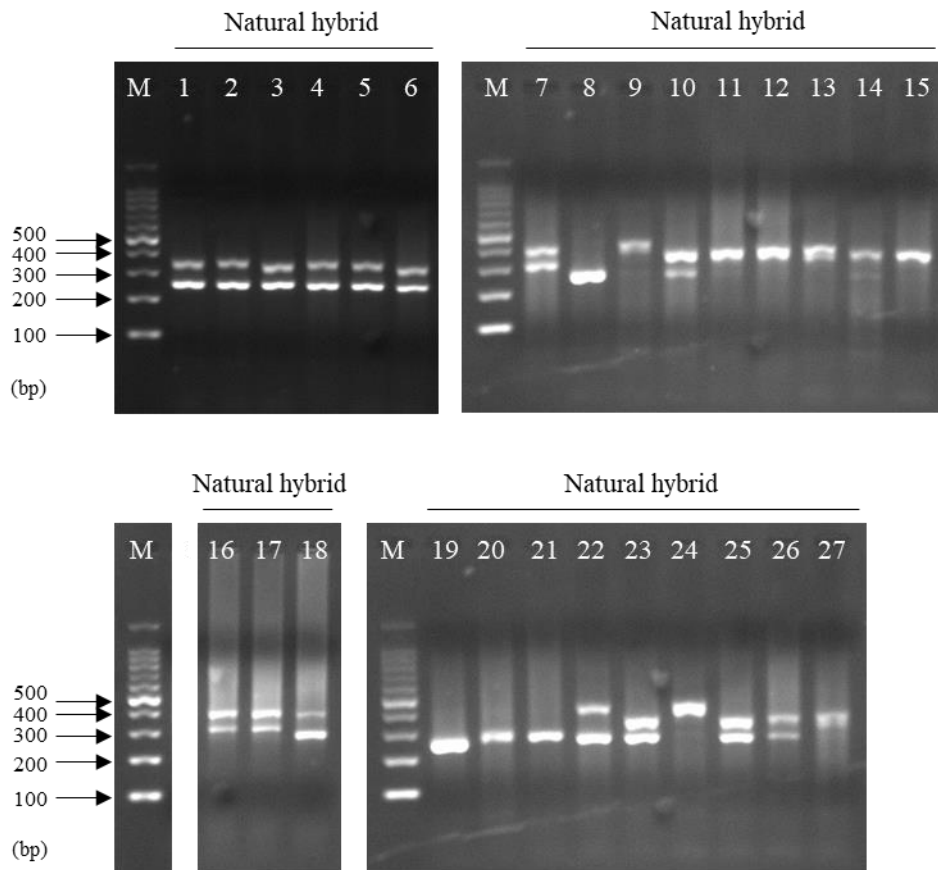


Fig. 3.6 Electrophoretic pattern (2.0% agarose gel) of the amplicon including GCA motif amplified by using *fms93F* and *fms93R* for natural hybrid pufferfish.
M, Maker.

Table 3.4 Result of MS analyses and species identifications of natural hybrid pufferfish.

Sample	Number of repeats (GCA) _n	Species by morphology	Maternal species	Paternal species	Species identification by MS analysis	
Natural hybrid	1	6/30	Torafugu, Mafugu	Torafugu	Mafugu	Mafugu/Torafugu
	2	6/32	Torafugu, Mafugu	Mafugu	Torafugu	Mafugu/Torafugu
	3	6/27	Torafugu, Mafugu	Torafugu	Mafugu	Mafugu/Torafugu
	4	6/33	Torafugu, Mafugu	Mafugu	Torafugu	Mafugu/Torafugu
	5	6/30, 31	Torafugu, Mafugu	Torafugu	Mafugu	Mafugu/Torafugu
	6	5, 6/27	Torafugu, Mafugu	Torafugu	Mafugu	Mafugu/Torafugu
	7	21/44	Torafugu, unknown	Torafugu	unknown	Torafugu
	8	7	Torafugu, Shimafugu	Mafugu	Shimafugu	Mafugu, Shimafugu
	9	39	Torafugu, Higanfugu or Akamefugu	Torafugu	unknown	Torafugu
	10	7/34	Torafugu, unknown	Torafugu	unknown	unknown/Torafugu
	11	30	Torafugu, unknown	Torafugu	unknown	Torafugu
	12	33	Torafugu, unknown	Torafugu	unknown	Torafugu
	13	30	Torafugu, unknown	Torafugu	unknown	Torafugu
	14	33	Torafugu, unknown	Torafugu	unknown	Torafugu
	15	34	Torafugu, unknown	Torafugu	unknown	Torafugu
	16	15/35	Torafugu, unknown	Torafugu	unknown	unknown/Torafugu
	17	15/38	Torafugu, unknown	Torafugu	unknown	unknown/Torafugu
	18	6/26	Mafugu, unknown	Mafugu	Torafugu	Mafugu/Torafugu
	19	6	Gomafugu, unknown	Gomafugu	Shosaifugu	Gomafugu
	20	9	Shosaifugu, unknown	Gomafugu	Shosaifugu	Gomafugu

Slash (/) indicates difference of MS repeat number from different PCR products.

Table 3.4 Continued

Sample		Number of repeats (GCA) _n	Species by morphology	Maternal species	Paternal species	Species identification by MS analysis
Natural hybrid	21	7	Shosaifugu, Gomafugu	Shosaifugu	Gomafugu	Gomafugu
	22	7/48	Torafugu, Mafugu or Shosaifugu	Torafugu	Mafugu	Mafugu/Torafugu
	23	6/26	Torafugu, Mafugu or Shosaifugu	Mafugu	Torafugu	Mafugu/Torafugu
	24	40	Mushifugu, unknown	Torafugu	Mushifugu	Torafugu
	25	6/26	Shosaifugu, unknown	Mafugu	Torafugu	Mafugu/Torafugu
	26	6/28	Shosaifugu, unknown	Mafugu	Torafugu	Mafugu/Torafugu
	27	24	Torafugu, unknown	Torafugu	unknown	Torafugu

Slash (/) indicates difference of MS repeat number from different PCR products.

第4章 総合考察

フグは極めて価値の高い水産物であり、日本の食文化を代表する水産物として親しまれている一方で、高致死率を伴うために食品衛生上重要視されている。フグによる食中毒の原因物質は TTX であり、その分布や毒性は種によって異なる。したがって種の判別は重要であり、誤った種の判別は食中毒の原因となりかねない。フグの種判別は形態学的特徴を基に行われているが、専門知識を持ち合わせていない場合、正確な判定は困難である。さらに、交雑種の出現が種判別をより困難にさせている。母系種の判別法としては、既に mtDNA の塩基配列を比較する方法が採用されているが、父系種の判別法は未だ確立していない。交雑種を正確に判別するためには母系種だけでなく、父系種を判別する必要がある。そこで本研究では、フグ交雑種における両親種判別法の確立を目指した。本研究においては、核 DNA の MS 領域に着目し、トラフグとマフグ間の交雑種を対象とした両親種判別法を開発した。

第1章では、mtDNA を用いた母系種判別を行った。この方法は既に開発されており、母系種判別が可能であることは明らかになっている。本研究においても単一系統種および人工交雑種、自然交雑種の母系種判別を行い、母系種を判定することが可能であった。また、本研究では増幅領域として 16S rRNA 部分領域に加え、*cyt b* 部分領域を選択した。これは、16S rRNA 部分領域塩基配列に差異がなく、本領域のみでは種の判定が不可能な種が存在するためである。実際、マフグとメフグの 16S rRNA 部分領域塩基配列は等しく、同一の相同性を示した。一方、マフグとメフグの *cyt b* 部分領域塩基配列を比較すると 10 塩基の差異が確認され、相同性が異なるために種を判定することができた。*cyt b* 部分領域塩基配列は 16S rRNA 部分領域塩基配列に比べ、種による塩基配列の差異が大きく、塩基配列が等しい種は存在しなかったが、トラフグとカラスにおいては同一の相同性を示した。これは、塩基配列の決定にダイレクトシーケンス法を採用したためである。ダイレクトシーケンス法は直接塩基配列を決定する方法であり、プライマー配列近傍を正確に読み取ることができない。トラフグとカラスの *cyt b* 部分領域塩基配列の差異は 1 塩基のみであり、その 1 塩基変異はリバースプライマー配列近傍に位置しているため、塩基配列の差異を明確に判別することができなかった。塩基配列の差異を明確に判別するための方法として、第2章にて行ったサブクローニングが挙げられる。サブクローニングにより大腸菌を形質転換させ、プラスミド化することでプライマー配列近傍に位置する差異を判別可能となると考えた。しかしながら、サブクローニングには手間と時間を要することから、母系種判別を行う場合には重要ではない。したがって、母系種判別は 16S rRNA 部分領域だけでなく、*cyt b* 部分領域を対象としたダイレクトシーケンス法が有効であると示唆された。

また、自然交雑種において形態に現れる特徴の多くは母系種由来であり、母系種由来の特徴が形態に強く現れる傾向があることが確認されたが、これは自然交雑種全般に共通するとは一概にいえぬ。今回用いた試料においては母系種由来の特徴が強く現れる傾向があったが、自然交雑種の形態は両種の特徴を備えていたり、どちらか一方に類似していたりとさまざまである。ゆえに、自然交雑種における形態学的特徴を基にした種判別は両親種判別の一助にすぎない。

第2章では、トラフグとマフグ間の交雑種における両親種の判別を目的に、父系種判別のための核 DNA MS マーカーを選抜した。今回用いた 8 種の MS 領域において普遍的かつ明瞭な差異を

示したのは、GCA 反復配列から構成される MS 領域のみであった。GCA 反復配列から成る MS 領域を除く 7 種の MS 領域においては普遍的かつ明瞭な差異は確認されなかったため、これらの MS 領域は父系種判別のための MS マーカーとしては適さない。一方で、MS マーカーによっては種判別以外の用途に適していると推定された。例えば、CATC から成る MS 領域は個体ごとに泳動パターンが異なることから、個体識別のための MS マーカーとして有効である可能性が示唆された。

第 3 章では、GCA 反復配列から成る MS マーカーの再現性および適用性を検証するため、トラフグ属 4 種（クサフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモフグ）における MS 解析を行った。さらに、トラフグ、マフグについては個体数を増やし、同様の MS 解析を行った。最終的に、トラフグとマフグ間交雑種を含む自然交雑種において、本 MS マーカーを用いた両親種判別が可能であるかを検討した。本 MS 領域における GCA 反復回数はクサフグでは 6-7 回、ゴマフグでは 6 回、シマフグおよびコモフグでは 6-8 回であり、マフグの GCA 反復回数と同様の結果であった。これらの MS 領域塩基配列はクサフグを除いて一致しており、クサフグでは他種に存在しない 3 塩基の配列が確認された。したがって、本 MS 領域のみを用いてマフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモフグの判別を行うのは困難であるが、クサフグについては塩基配列を決定し、クサフグに特異的にみられる 3 塩基の配列があることを確認することで判別が可能であることが明らかになった。

トラフグおよびマフグにおいては再現性を確認するため、各 26 個体を用いて MS 解析を行った。トラフグおよびマフグにおいて、それぞれでトラフグ由来 MS、マフグ由来 MS が検出され、再現性は 100.0% であることが確認された。トラフグにおいては反復回数が異なるトラフグ由来の MS が 2 つ検出された個体もあり、これらの個体は、反復回数が異なる 2 つのトラフグから生じた第二世代であることが明らかになった。また、マフグにおいてはマフグ由来 MS に加えてトラフグ由来と推定される MS が検出された個体が存在し、この個体は母系種がマフグ、父系種がトラフグの交雑種であると推測された。したがって、トラフグとマフグにおいては本 MS マーカーの利用により、父系種の判別だけでなく世代の推定や交雑種か否かの判定が可能であることが明らかになった。

今回選抜した MS 領域では、トラフグとマフグにおいて GCA 反復配列を含む MS に加え、分子量が約 1,000 bp もしくはそれ以上のバンドが確認された個体もあった。これは、核 DNA 中に GCA 反復配列から成る MS 領域以外にも、プライマー配列と相補性が高い配列が存在しているためであると推測される。エキストラバンドの増幅を防ぐためには、より特異性が高いプライマーを設計する必要がある。

トラフグとマフグ間の自然交雑種において本 MS マーカーの再現性は 100.0% であり、本 MS マーカーはトラフグとマフグ間交雑種の両親種判別に適用可能であることが明らかになった。しかしながら、本 MS マーカーによる両親種判別は、形態学的特徴を基にした判別による一次スクリーニングを経て、mtDNA を用いた母系種判別を行うことが前提である。仮に、形態学的手法によりトラフグとマフグ間の交雑種と推定することが可能でない個体や、加工され、切り身の状態になった個体を対象に、本 MS マーカーを用いて両親種判別を行うことは困難である。したがって、本 MS マーカーは形態学的特徴を基にした判別により、トラフグとマフグ間の交雑種と推定された個体においてのみ適用可能である。

トラフグとマフグ間交雑種を除く自然交雑種 21 個体においても、トラフグ由来 MS とマフグ由

来 MS が検出され、普遍的に保存されていることが確認された。しかしながら、検出された MS がトラフグ、マフグ由来であるか否かの判定は形態学的特徴を基にした判別によるものであり、こちらにおいても形態学的特徴を基にした判別が前提となる。さらに、本研究にて試料として用いたトラフグ属 4 種（クサフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモフグ）のいずれかとトラフグ間の交雑種においては、形態学的手法により両親種をある程度推定することが可能である場合にのみ、MS の分子量の差異を利用した両親種判別が可能であると考えられ、本 MS マーカーが適用可能であると推測される。また、母系種がトラフグ属 4 種のいずれかと判定され、母系種由来の MS に加え、約 310-370 bp の MS が検出された場合にも本 MS マーカーは適用可能である。

クサフグにおいては特異的な配列が存在していることを踏まえると、トラフグ属 4 種（マフグ、ゴマフグ、シマフグ、コモフグ）のいずれかとクサフグ間交雑種の場合、塩基配列を決定することで両親種判別が可能であると推測されるが、PCR 産物の分子量が近似していることから、1 本のバンドとして現れるはずである。分子量が近似した PCR 産物から 2 つの異なる種由来の MS を区別することは極めて困難であり、本 MS マーカーは有効ではない。

トラフグとマフグ間交雑種を除く自然交雑種 21 個体において、両親種を判別できたのは 10 個体であったが、多くが形態学的特徴を基にした判別に頼らざるを得なかった。したがって、自然交雑種における形態学的特徴を基にした種判別は両親種判別の一助にすぎないが、重要な手がかりの一つでもある。また、種による生息域の違いから両親種の推定が可能であるかを検討した。日本近海産フグ類の鑑別と毒性⁹⁾において、各種フグの生息域が示されている。例えば、ムシフグの生息域は神奈川県三崎、相模湾、兵庫県香住、佐渡、山口県、長崎県と示されており⁹⁾、限られた地域にのみ分布していることがわかる。しかし、2012 年には和歌山県田辺湾にてムシフグの漂着が報告されており⁴⁵⁾、生息域が拡大している可能性がある。この生息域拡大の原因としては環境変化が挙げられ、それにより交雑種が出現していると推測される。太平洋沿岸にてショウサイフグとゴマフグの交雑種が出現した原因として、同様の環境変化が挙げられている³³⁾。実際、アンゴラ南部では海水温上昇によりニベ科魚類 2 種間 (*Argyrosomus coronus*, *A. inodorus*) の交雑が誘導され、*A. coronus* の分布に変化が生じたと報告されている⁴⁶⁾。フグ科魚類においても同様の現象が起こると推測され、フグの自然交雑種は海水温上昇により、従来 of フグ種の生息域が変化することで生じたと考えられる。したがって、各種フグの生息域は既に変化している可能性が高く、生息域は種判別を行う際の手がかりとはなりえない。

今回用いた自然交雑種 27 個体は雑種第一世代 (first filial generation, F₁) であると考えられるが、本 MS マーカーが雑種第二世代 (second filial generation, F₂) 以降の交雑種や戻し交雑にも適用可能であるかは明らかになっていない。本研究では自然交雑種において検出された MS は 1-2 本であったが、3 本以上の MS が検出される可能性も考えられる。また、自然交雑種の形態学的特徴から推定された種であるヒガンフグやアカメフグ、ショウサイフグ、ムシフグにおける MS の分子量および反復回数は明らかになっておらず、今後は他種においても MS 解析を行い、更なるデータの蓄積が必要である。

また、自然交雑種を流通させる場合、交雑種における毒性が重要となる。人工的に交配させた無毒のトラフグとマフグ間交雑種およびトラフグとクサフグ間交雑種を用いて TTX 投与試験を行ったところ、トラマでは TTX の蓄積は主に肝臓にみられたのに対し、マトラでは TTX の蓄積

は主に皮にみられたと報告されている⁴⁷⁾。トラクサでは TTX の移行が卵巣ではみられるが、精巣ではみられず、クサトラでは卵巣、精巣ともに TTX の移行が確認されたと報告されており⁴⁸⁾、両親種が同じであっても母系種・父系種の違いや雌雄の違いにより毒蓄積能が異なることが明らかになった。交雑種を食用とする場合、他種間の交雑種や雑種世代の違いがあっても例外なく適用可能な指標が必要となる。そのため、両親種の同定だけでなく毒性に関しても更なる研究を行い、データを蓄積する必要がある。

MS 領域に着目した両親種判別法としては、既に臼井³⁴⁾により他の MS マーカー (GAAAG) を用いた両親種判別法が開発されている。しかしながらこの MS マーカーの再現性は、トラフグにおいては 76.9% (26 個体中 20 個体)、マフグにおいては 70.0% (20 個体中 14 個体)、トラフグとマフグ間交雑種においては 48.5% (35 個体中 17 個体) であり³⁴⁾、再現性が高いとは言い難い。さらに、GAAAG 反復配列を含む MS 領域において、MS より上流領域およびプライマー領域に変異があることが確認されており、個体毎に MS 領域増幅プライマー配列の保存性が異なることが報告されている³⁴⁾。この配列保存性の違いが再現性の低さに影響していると推測されるが、単一系統ではない個体が混入している可能性や他種間交雑種である可能性も挙げられる。どちらにしても MS マーカーの再現性は 7 割程度であり、両親種判別のための MS マーカーとしては適用可能であるとはいえない。

フグ交雑種の両親種判別は、現在までに様々な方法が検討されている。高橋ら³³⁾はショウサイフグとゴマフグ間の交雑種を対象に、AFLP 法を用いた両親種判別法を開発し、両親種および交雑世代を明らかにした。しかしながら、AFLP 法は再現性が低いとされており、両親種判別法としては実用的でない。再現性が低い原因としては、制限酵素サイトの変化や制限酵素の効き方が挙げられる。さらに、増殖および増幅中に DNA に誘発される突然変異により、予期しない切断が生じることがある⁴⁹⁾。これは、突然変異が既知の制限部位を破壊したり新しい部位を作ったりするためである⁴⁹⁾。高橋ら³³⁾はショウサイフグとゴマフグ間の交雑種における両親種判別を行ったが、再現性の検証は行われていない。現時点での再現性は定かでないが、DNA に突然変異が誘発される可能性がある限りは、この方法は適用可能であるとはいえない。

既に述べたように、本研究にて開発された MS マーカーの再現性はトラフグにおいては 100.0%、マフグにおいても 100.0%、さらに、トラフグとマフグ間交雑種においても 100.0%であった。また、母系種がトラフグと判定された交雑種においてはトラフグ由来 MS、母系種がマフグと判定された交雑種においてはマフグ由来 MS が検出され、本 MS マーカーは保存性が高く、普遍的に存在していることが確認された。したがって、本 MS マーカーは両親種判別のための MS マーカーとして適用可能である。上記の 2 つの両親種判別法と比べ、本研究において開発された MS マーカーは再現性が高く、優れた方法であるといえる。

今回は MS 領域に着目して両親種判別を行ったが、泳動パターンの確認、反復回数決定には前述の操作が必要となるため、操作に 4-5 日を要する。仮に本法が検疫所や市場での判別法に採用された場合、水揚げから流通までにおよそ一週間要することになり、鮮度の良い状態で流通に支障をきたす。また、本 MS マーカーを用いた判別が可能な種は限られており、漁獲される様々な交雑種に対応するためには、新たな MS マーカーの探索が必要不可欠である。本 MS マーカーを用いた両親種判別法は手間や時間、高価な機器を要することから、現時点では実用的であると

は言い難い。両親種判別法を実用化するためには、手間や時間、高価な機器を必要としない RFLP 分析法や DNA フィンガープリント法がより有効であると推測される。母系種判別法に関しては既に mtDNA を用いた RFLP 分析による簡便かつ迅速な種判別法が開発されている⁵⁰⁾。父系種判別法に関しては未だ開発されていないが、マガキ *Crassostrea gigas* とポルトガルガキ *C. angulata* 間の交雑種については MS マーカーを用いた RFLP 分析法が有効であると報告されており⁵¹⁾、フグ交雑種においても MS マーカーを用いた RFLP 分析法が適用できると推測される。岩崎ら⁵¹⁾はマイクロチップ電気泳動を採用し、大幅な工程の簡略化および時間短縮を実現した。マイクロチップ電気泳動はポリアクリルアミドゲル電気泳動と同等の分析精度である上、分析時間が著しく短い。さらに、一定比率の修正により PCR 産物の正確な鎖長が算出されるため、MS 反復回数の推定が可能である。したがって、シーケンサーに供することなく反復回数を決定することができ、分析時間の短縮に繋がる。今後、より正確かつ迅速な交雑種の両親種判別法が確立し、食の安全・安心が確保され、さらには水産物の有効利用に繋がることを願い、本研究の結びとする。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、東京海洋大学大学院 海洋科学技術研究科 食機能保全科学専攻 生体物質化学研究室の石崎松一郎教授には多大なご指導を賜りました。学部4年生からの約3年間、研究に関する多くの場面でご指導いただき、このように修士論文を完成されるまで研究を続けることができました。心から御礼申し上げます。

また、本論文をご閲覧いただきました食品微生物学研究室の木村凡教授ならびに食品栄養化学研究室の小山智之准教授、本研究の実施にあたりご指導、ご助言を頂きました新潟食料農業大学の長島裕二教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究を進めていく上で貴重なフグ試料を提供していただきました長崎大学の荒川修教授および高谷智裕教授、水産総合研究センターの柳本卓博士、東京都市市場衛生検査所の皆様に深く感謝申し上げます。

加えて、様々なご助力ご助言をいただきました生体物質化学研究室の皆様に感謝いたします。特に、シーケンス解析およびサブクロニングについてご指導ご助言をいただきました潘創さん、大木理恵子さん、試料解剖にご助力いただきました横塚峻介さんに深く感謝いたします。

最後に、研究生活において温かく見守ってくれた家族に感謝いたします。

引用文献

- 1) 厚生労働省, 食中毒統計資料.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunituite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokuchu/04.html.
2019年1月18日閲覧.
- 2) 農林水産省, 海面漁業生産統計調査.
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen_gyosei/index.html. 2019年1月18日閲覧.
- 3) 厚生労働省, 自然毒のリスクプロファイル: 魚類: フグ毒.
https://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/poison/animal_det_01.html. 2019年1月18日閲覧.
- 4) 厚生省環境衛生局長通知. フグの衛生確保について. 環乳第59号. (1983).
- 5) 山野上祐介, フグ目魚類の多様性と系統, そして分類. *TAXA* **39**, 1-16 (2015).
- 6) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課. 日本近海産フグ類の鑑別と毒性. 中央法規 (1984). pp. 1-47.
- 7) Y. Masuda, N. Shinohara, Y. Takahashi, O. Tabeta and K. Matsuura. Occurrence of natural hybrid between pufferfishes, *Takifugu xanthopterus* and *T. vermicularis*, in Ariake Bay, Kyushu, Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57** (7), 1247-1255 (1991).
- 8) 横川浩治, 浦山公治. 瀬戸内海から得られたナシフグとコモンフグの天然雑種. 魚類学雑誌 **47** (1), 67-73 (2000).
- 9) 小早川みどり, 佐野友美, 渋谷加奈子, 望岡典隆, 的場達人, 宮木廉夫. トラフグ属魚類自然交雑種に関する研究 I. 両親の種同定. 平成20年度日本水産学会春季大会講演要旨集 p. 162 (2009).
- 10) Y. B. Zhang and S. P. He. Investigations into the perplexing interrelationship of the Genus *Takifugu* Abe, 1949 (Tetraodontiformes, Tetraodontidae). *Chin. Sci. Bull.* **53** (2), 233-244 (2008).
- 11) Y. Yamanoue, M. Miya, K. Matsuura, S. Miyazawa, N. Tsukamoto, H. Doi, H. Takahashi, K. Mabuchi, M. Nishida and H. Sakai. Explosive speciation of *Takifugu*: another use of fugu as a model system for evolutionary biology. *Mol. Biol. Evol.* **26** (3), 623-629 (2009).
- 12) K. Miyaki, O. Tabeta and H. Kayano. Karyotypes in six species of pufferfishes genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). *Fish. Sci.* **61** (4), 594-598 (1995).

- 13) W. Kai, K. Kikuchi, M. Fujita, H. Suetake, A. Fujiwara, Y. Yoshiura, M. Ootake, B. Venkatesh, K. Miyaki and Y. Suzuki. A genetic linkage map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics* **171**, 227-238 (2005).
- 14) 望岡典隆, 2章 トラフグ属の分類と種同定. (長島裕二, 村田修, 渡部終五編) フグ研究とトラフグ生産技術の最前線. 恒星社厚生閣 (2012). pp. 25-33.
- 15) 「瀬戸内海に交雑フグ 県が注意呼び掛け」山口新聞 (2011. 5. 21).
- 16) 山口県水産振興課, 注意喚起資料 (2013).
- 17) 王俊杰. 交雑フグの毒性に関する研究. 博士論文要旨, 長崎大学 (2012).
- 18) 徐超香. 未利用フグの毒性評価と毒成分分析. 卒業論文, 東京海洋大学 (2015).
- 19) 日本分析化学会. 食品表示を裏づける分析技術—科学の目で偽装を見破る—. 東京電機大学出版局 (2010). 第3章 品種鑑別. pp. 71-112.
- 20) 農林水産省, 品種登録ホームページ: 育成者権保護に関する情報.
<http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/hogo.html>. 2019年1月21日閲覧.
- 21) 千国幸一, 田畑利幸, 斎藤昌義, 門間美千子. シトクロム b 遺伝子の塩基配列の違いによる肉種鑑別. 日畜会報 **65** (6), 571-579 (1994).
- 22) T. Matsunaga, K. Chikuni, R. Tanabe, S. Muroya, K. Shibata, J. Yamada and Y. Shinmura. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* **51**, 143-148 (1999).
- 23) 松永孝光, 柴田清弘, 山田順一, 新村裕. マルチプレックス PCR 法による食肉及び食肉製品の肉種鑑別. 日本食品科学工学会誌 **46** (3), 187-194 (1999).
- 24) 農林水産消費安全技術センター, 水産総合研究センター. マグロ属魚類の魚種判別マニュアル (2005).
- 25) 農林水産消費安全技術センター, 水産総合研究センター. サバ属魚類の魚種判別マニュアル (2007).

- 26) 農林水産消費安全技術センター, 水産総合研究センター. うなぎ加工品の原料魚種判別マニュアル (ジャポニカ種及びアンギラ種) (2010).
- 27) Y. Takashima, T. Morita and M. Yamashita. Complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* and molecular identification of two commercially important species *T. trachurus* and *T. japonicas* using PCR-RFLP. *Fish. Sci.* **72**, 1054-1065 (2006).
- 28) 石崎松一郎. 有毒魚の DNA 鑑別と食中毒への対策. <http://www.mac.or.jp/mail/141201/02.shtml>. 2019年1月21日閲覧.
- 29) Y. W. Hsieh, P. A. Hwang, H. H. Pan, J. B. Chen and D. F. Hwang. Identification of tetrodotoxin and fish species in an adulterated dried mullet roe implicated in food poisoning. *Food Chem. Toxicol.* **68** (1), 142-146 (2003).
- 30) S. Ishizaki, Y. Yokoyama, N. Oshiro, N. Teruya, Y. Nagashima, K. Shiomi and S. Watabe. Molecular identification of pufferfish species using PCR amplification and restriction analysis of a segment of the 16S rRNA gene. *Comp. Biochem. Physiol.* **D1**, 139-144 (2006).
- 31) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課通知. 食安輸発第 0425005 号 (2008).
- 32) 小早川みどり, 吉田貴徳, 宮木廉夫, 望岡典隆. トラフグ属魚類自然交雑種に関する研究 III. 新たな核遺伝座による両親の種同定. 平成 21 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集 p. 32 (2009).
- 33) H. Takahashi, A. Toyada, T. Yamazaki, S. Narita, T. Mashiko and Y. Yamazaki. Asymmetric hybridization and introgression between sibling species of the pufferfish *Takifugu* that have undergone explosive speciation. *Mar. Biol.* **164**, 90, DOI 10.1007/s00227-017-3120-2 (2017).
- 34) 臼井芽衣. 分子生物学的手法を用いたフグ交雑種における両親種判別法の確立. 修士学位論文, 東京海洋大学 (2016).
- 35) 横山泰啓. PCR-制限酵素断片長多型法を用いたフグ種簡易 DNA 鑑定. 修士学位論文, 東京水産大学 (2004).
- 36) L. A. Zhivotovsky, E. G. Shaikhaev and M. V. Shitova. Identification of salmonid fish using microsatellite markers with identical PCR-primers. *Russ. J. Mar. Biol.* **39**, 447-454 (2013).

- 37) 北野聡, 大館智氏, 小泉逸郎. 移入カワマスと在来アメマスとの交雑現象. 日本生態学会大会講演要旨集 **51**, 486 (2004).
- 38) E. B. Gonzalez, T. Murakami, Y. Teshima, K. Yoshioka, D. Jeong and T. Umino. Paternity testing of wild black rockfish *Sebastes inermis* (blownish type) from the Seto Inland Sea of Japan. *Ichthyol. Res.* **56**, 87-91 (2009).
- 39) 中村真弥. マダイマイクロサテライトマーカーと効率的な親子鑑定法の開発. 卒業論文, 東京水産大学 (2002).
- 40) M. Takagi, J. Sato, C. Monbayashi, K. Aoki, T. Tsuji, H. Hatanaka, H. Takahashi and H. Sakai. Evaluation of microsatellites identified in the tiger puffer *Takifugu rubripes* DNA database. *Fish. Sci.* **69**, 1085-1095 (2003).
- 41) S. Furukawa, H. Takeshima, T. Otake, T. Mitsuboshi, K. Shirasu, D. Ikeda, G. Kaneko, M. Nishida and S. Watabe. Isolation of microsatellite markers by *in silico* screening implicated for genetic linkage mapping in Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Fish. Sci.* **70**, 620-628 (2004).
- 42) J. Cui, X. Shen, G. Yang, Q. Gong and Q. Gu. Characterization of microsatellite DNAs in *Takifugu rubripes* genome and their utilization in the genetic diversity analysis of *T. rubripes* and *T. pseudommus*. *Aquaculture* **250**, 129-137 (2005).
- 43) 古川聡史. トラフグの高成長に関する遺伝学のおよび分子生物学的研究. 博士論文, 東京大学 (2009).
- 44) 吉田勝俊. 核 DNA の多核を利用した系群解析法の検討. 中央水研ニュース No. 15 (1997).
- 45) 中坊徹次, 久保田信, 東海林明, 田名瀬英朋. 和歌山県田辺湾にムシフグが漂着. 漂着物学会誌 **10**, 43-44 (2012).
- 46) W. M. Potts, R. Henriques, C. V. Santos, K. Munnik, I. Ansorge, F. Dufois, A. J. Booth, C. Kirchner, W. H. H. Sauser and P. W. Shaw. Ocean warming, a rapid distributional shift, and the hybridization of a coastal fish species. *Glob. Change Biol.* **20**, 2765-2777 (2014).
- 47) J. Wang, T. Araki, R. Tatsuno, S. Nina, K. Ikeda, T. Takatani and O. Arakawa. Transfer profile of orally and intramuscularly administered tetrodotoxin to artificial hybrid specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes* and *Takifugu porphyreus*. *J. Food. Hyg. Soc.* **53**, 33-38 (2012).

- 48) J. Wang, T. Araki, R. Tatsuno, S. Nina, K. Ikeda, M. Hamasaki, Y. Sakakura, T. Takatani and O. Arakawa. Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to artificial hybrid specimens of pufferfish, *Takifugu rubripes* and *Takifugu niphobles*. *Toxicon* **58**, 565-569 (2011).
- 49) Thermo Fisher. 制限酵素の主な注意点. <https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/restriction-enzyme-key-considerations.html>. 2019年2月4日閲覧.
- 50) 門山敬介. ミトコンドリア DNA を用いたフグ類の新規判別法の開発. 修士学位論文, 東京海洋大学 (2010).
- 51) 岩崎健史, 田中智美, 飯塚祐輔, 菱田泰宏, 蕭聖代, 荒西太士. マガキ属自然交雑個体の二対立遺伝子解析. *LAGUNA* **16**, 13-18 (2009).