

平成22年 6月23日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580229

研究課題名（和文）トラフグ属魚類の AFLP 及び mtDNA 解析による雑種判別手法の開発

研究課題名（英文）Discrimination method for *Takifugu* hybrids using AFLP and mtDNA analyses

研究代表者

酒井 治己 (SAKAI HARUMI)

独立行政法人水産大学校・生物生産学科・教授

研究者番号：80399659

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリア DNA 全塩基配列に基づき、フグ目の硬骨魚種中での系統類縁関係、フグ目内系統類縁関係、及びトラフグ属内系統類縁関係を明らかにした。さらに、AFLP 解析によりトラフグ属主要9種の雑種解析を行なった。トラフグとカラスフグを除く各種は明瞭に識別でき、さらに複数マーカーによって雑種の判別も可能で、解析したほとんどの雑種個体（47個体中46個体）が雑種第一代であった。種判別の可能な AFLP マーカーに基づき、それを特異的に増幅するプライマー開発に向けて研究を継続中である。

研究成果の概要（英文）：Phylogenetic relationships of tetraodontiform fishes within teleosts, of tetraodontiform fishes, and of *Takifugu* species were clarified using mtDNA full sequences analysis. Hybrid analysis was also performed among 9 *Takifugu* species using AFLP method. All species other than between *T. rubripes* and *T. chinensis* were clearly distinguishable based on species specific AFLP markers. Their hybrids were also discriminated and 46 out of 47 hybrids were those of F1 generation. Developing of convenient primers for specific AFLP markers is needed in order to identify *Takifugu* hybrids as well as species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：分類学・雑種・トラフグ属・mtDNA・AFLP

1. 研究開始当初の背景

トラフグ属(*Takifugu*)は、東シナ海および日本周辺海域に分布し（タキフグのみはインド洋にも分布）、約20種が知られている。

本属魚類はフグ毒（Tetrodotoxin）を有していることでも有名で、種によって様々な組織に毒を蓄えている。有毒部位を保有するにもかかわらず、古くから食用とされる高級有用

魚類で、近年は乱獲による資源の減少が著しい。

トラフグ属魚類は、上記海域において急速に進化し種分化したグループと考えられる。そのため、形態的な分化に乏しく通常の形態分類が難しいものと考えられる。本属各種は斑紋以外の分類形質に乏しく、また自然雑種も存在することから、分類は困難を極め、誤食による中毒事件も後を絶たない。分子遺伝情報を用いた分類や交雑解析は、誤食中毒を防ぐ上でも重要な情報を与えると考えられ、種および雑種検索手法の開発の要望は高い。Abe (1942, 1944, 1949, 1950-51, 1952, 1954, 1960) がトラフグ属に関する一連の形態学的研究を行った後、Matsuura (1990) は本属の学名には *Fugu* 属ではなく、*Takifugu* 属を用いなければならないことを明らかにした。しかし、本属の分類学的研究は不十分なままであった。雑種フグについては、その誤食に起因すると思われる中毒事件がある一方 (多部田, 1997)、その形態学的判別については人為交雑魚の解析例 (宮木, 1998) 以外あまりなく、また遺伝学的に交雑フグを判別した研究も多くない (たとえば、アロザイム解析による Masuda et al., 1991; 横川・浦山, 2000 など)。これは、トラフグ属魚類がそれぞれ非常に近縁でよく似ており、遺伝的にもあまり分化しておらず、判別マーカーに乏しいことが関わっているものと思われる。

ミトコンドリアにコードされた mtDNA の塩基配列は、サイズが約 18 kbp と小さく解析が容易であること、さらに核にコードされた遺伝子より進化速度が速く多型性に富むことから、生物の集団遺伝学的解析にきわめて有用であるとされる (たとえば西田ほか, 1998)。トラフグ属においても、mtDNA の 16S rRNA 部分塩基配列による系統解析が行われているが (Song et al., 2001; Kato et al., 2005、申請者らの研究)、解析種数が少なく、不十分な結果と言わざるを得ない。さらに、ミトコンドリアについては特に近縁魚種間において交雑を通じた異種間浸透が多く認められるため (向井, 2001)、核の遺伝情報に基づいた解析を行わなければ、種および雑種の判別を性格に行うことは不可能であり、系統解析を適切に行うこともできない。

トラフグは全遺伝情報 (ゲノム) の大きさがヒトの 1/8 しかないことでも有名で (Brenner et al., 1993)、遺伝子の機能解析のモデル生物として注目されており、最近ほぼ全塩基配列が公開された (Aparicio et al., 2002)。その情報を利用して、核の遺伝情報の多型性の指標として有用なマイクロサテライトマーカーのプライマーが開発されている (Takagi et al., 2003、申請者らの研究; Furukawa et al., 2004)。しかし、マイクロサテライト多型はその変異性の高さゆえに、

種内の遺伝的分化などの解析には優れていても、必ずしも別種間の解析に適しているとはいえない。

一方、AFLP 解析 (Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis) は、核遺伝子にコードされた遺伝マーカーを網羅的に調査でき、かつ優性マーカー座であるため、交雑や後代交雑の検出に非常に優れた手法である。ミトコンドリア解析とあわせることにより、交雑の有無だけでなくその方向性も明らかにできる。

独立行政法人水産大学校は、輸入魚を含めてフグの一大集散地である下関にあり、フグ展示をメインテーマに据えた下関水族館も近い。魚市場や水族館と連携することにより、トラフグ属魚類を入手する最適地でもあり、水産大学校は本研究の拠点として非常に適している。さらに、平成 18 年度に高速シーケンサー (ABI 3130) が導入され、多資料の AFLP 解析を行うことが可能となった。すでに複数個体の雑種と思われる標本も入手済みで、それらを用い、種および雑種判別手法の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、分類の非常に難しいフグ科トラフグ属魚類について、分子形質による分類を確立し、あわせて雑種の検索手法を開発することが目的である。そこで本研究の課題は、日本に水揚げまたは入荷するトラフグ属全種につき、種の識別を可能にする核の DNA マーカー (AFLP 解析) およびミトコンドリア DNA マーカー (mtDNA 塩基配列解析) を明らかにすること、核 DNA マーカーを組み合わせることで種及び雑種の検索システムを確立すること、交雑魚のミトコンドリア DNA マーカーにより、母種を明らかにすることによって交雑の方向性を調べることで、両マーカーに基づき系統解析を行い、類縁関係を調査して交雑を起こしやすい種の組み合わせを洗い出すこと、さらに、DNA マーカーによる種および雑種の分類結果を、形態学的判別に反映させ、形態分類を充実させること、などである。

3. 研究の方法

国内においては、下関唐戸市場に水揚げまたは入荷するトラフグ属魚類を購入し、同時に交雑ものとして販売せずに処分される不明フグの提供を仰ぐ。特に、輸入されるフグ類に混入するものについて、適宜市場調査に赴き、標本として入手する。また、水族館で飼育展示しているフグ類の斃死魚を提供してもらう。標本は、DNA 解析用に鱗と筋肉の一部をアルコール固定し、魚体は冷凍保存する。

入手できた標本からゲノム DNA を抽出し、

解析に供する。トラフグ属内部の各種間の分岐年代を考慮し、それぞれ進化速度の異なる16S rRNA, シトクローム b、Dループなどの各領域を適宜用いる。

AFLP法に基づく解析では、AFLP法に基づくトラフグ属内部の“種”系統関係の推定と、各分類群の共有派生マーカー（分類群に特異的な増幅断片）の検出を行なう。解析では、プレセレクトティブPCRを行い、セレクトティブPCR以降はオートシーケンサーにより集中的に解析する。得られた多型フラグメントに基づき、最節約法に基づいた系統樹を構築し、各共有派生マーカーを推定する。

ミトコンドリアDNA塩基配列解析による信憑性の高い系統関係と、AFLP法に基づくそれとのトポロジーの差異から、過去の交雑による種間遺伝子移入を推定し、交雑しやすい種の組み合わせを洗い出す。

4. 研究成果

ミトコンドリアDNA全塩基配列に基づき、フグ目すべての系統を代表する種及びフグ目に近縁と目される系統を代表する硬骨魚種、合計44種の系統類縁関係を、ベイズ法によって推定した。その結果、フグ目は単系統群であることが明らかとなった。このことは、多様な形態及び生態を示すフグ目が自然分類群であることを強く支持した。また、これまでフグ目の姉妹群としてニザダイ亜目、マトウダイ目、アンコウ目などが候補とされていたが、このたびの結果では、姉妹群はアンコウ目とヒシダイ亜目であることが判明した。フグ目の中では、従来認められていたギマ上科、モンガラカワハギ上科及びフグ上科の単系統性は支持されなかった。そのかわり、ギマ科、モンガラカワハギ科、カワハギ科、フグ科、ハリセンボン科及びマンボウ科のクラスターと、ハコフグ科、ベニカワムキ科及びウチワフグ科のクラスターが、高い事後確率で認められ、高次分類再検討の必要性を示唆した。

フグ目内系統を明らかにした。その結果、従来のギマ亜目、モンガラカワハギ亜目及びフグ亜目はすべて自然分類群ではなく、目内の分類を見直す必要があることが判明した。

ミトコンドリアゲノム全領域の塩基配列を用い、トラフグ属内系統を明らかにした。トラフグ属は、東アジア海域で急速に進化したグループであることが明らかとなった。ミトコンドリアゲノムでは、トラフグとカラスフグ、及びコモングとムシフグは判別ができなかった。

トラフグ属について、ミトコンドリアゲノム解析に加え、AFLP解析により雑種解析を行なった。その結果、各種は明瞭に識別でき、さらに複数マーカーで雑種の判別も可能で、解析した8個体すべてが雑種第一代であり、

種の組み合わせとしては4通りであった。さらにAFLP解析により雑種解析個体を追加した結果、各種は明瞭に識別できたが、解析にムシフグを加えたところ、本種とコモングとの遺伝的差異は、他種と比較して小さかった。解析したほとんどの個体(47個体)が雑種第一代であったが、一個体トラフグとマングの戻し交配個体と考えられるものが出現した。雑種の組合せでは、トラフグとマング、及びコモングとヒガングの雑種が比較的多く検出された。一貫して種判別の可能なAFLPマーカーに基づき、種及び雑種判別システムを構築するため、それを特異的に増幅するプライマー開発に向けて研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

- ① Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, Miyazawa S, Tsukamoto N, Doi H, Takahashi H, Mabuchi K, Nishida M, Sakai H: Explosive speciation of *Takifugu*: Another use of *fug* as a model system for evolutionary biology. *Mol Biol Evol*, 査読有, 26, 623-629 (2009)
- ② 酒井治己, 藤田 勲: 日本沿岸から初めて記録されたタキフグ *Takifugu oblongus*. 水大校研報, 査読有, 58, 43-44 (2009)
- ③ Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, Sakai H, Katoh M, Nishida M: Unique pattern of pelvic fin evolution: A case study of balistoid fishes (Pisces: Tetraodontiformes) based on whole mitochondrial genome sequences. *Mol Phylogen Evol*, 査読有, 50, 179-189 (2008)
- ④ Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, Katoh M, Sakai H, Nishida M: A new perspective on phylogeny and evolution of tetraodontiform fishes (Pisces: Acanthopterygii) based on whole mitochondrial genome sequences: Basal ecological diversification?. *BMC Evol Biol*, 査読有, 8, 212 (2008)
- ⑤ Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, Yagishita N, Mabuchi K, Sakai H, Nishida M: Phylogenetic position of tetraodontiform fishes within the higher teleosts: Bayesian inferences based on 44 whole mitochondrial genome sequences. *Mol Phylog Evol*, 査読有, 45, 89-101 (2007)

〔学会発表〕(計8件)

- ①土井啓行, 園山貴之, 野村美沙紀, 石橋敏章, 今井千文, 酒井治己, 渡部終五: ショウサイフグの初期発育とトラフグ属4種との比較. 平成 22 年度日本水産学会春季大会, 藤沢 (2010. 3)
- ②善家裕太郎, 三好博之, 高橋 洋, 酒井治己: AFLP 法に基づくトラフグ属魚類種判別マーカーの開発. 日本水産増殖学会第 8 回大会, 下関 (2009. 10)
- ③片町太輔, 大亀正照, 木村 博, 小金隆之, 菅谷琢磨, 高橋 洋, 酒井治己: 周防灘におけるトラフグ放流魚の自然再生産. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京 (2009. 3)
- ④山野上祐介, 宮 正樹, 松浦啓一, 西田 睦, 酒井治己: フグ類の進化. 水産大学校シンポジウム, 本場・下関でフグを語る～意外に知らないフグの秘密, 下関 (2008. 11)
- ⑤Yamanoue Y, Miya M, Sakai H, Matsuura K, Miyazawa S, Miyamoto N, Takahashi H, Doi H, Nishida M: Rapid radiation and speciation of *Takifugu* species in marine waters of East Asia: Another use of the fugu, *Takifugu rubripes* as a model. Int Symp Syst Div Fish, Tokyo (2008)
- ⑥土井啓行, 杉山由貴子, 野村美沙紀, 石橋敏章, 酒井治己: 淡水フグ *Carinotetraodon* 属 3 種の繁殖. 2008 年度日本魚類学会年会, 松山 (2008. 9)
- ⑦善家裕太郎, 高橋 洋, 酒井治己, 土井啓行, 松浦啓一, 西田 睦: AFLP 分析によって明らかになったトラフグ属魚類の自然種間交雑. 2008 年度日本魚類学会年会, 松山 (2008. 9)
- ⑧土井啓之, 園山貴之, 石橋敏章, 酒井治己: トラフグ属 4 種の初期発育. 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 静岡 (2008. 3)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 治己 (SAKAI HARUMI)

独立行政法人水産大学校・生物生産学科・教授

研究者番号: 80399659

(2) 研究分担者

高橋 洋 (TAKAHASHI HIROSHI)

独立行政法人水産大学校・生物生産学科・助教

研究者番号: 90399650

(H20-H21: 連携研究者)

松浦 啓一 (MATSUURA KEIICHI)

独立行政法人国立科学博物館・コレクションディレクター

研究者番号: 70141984

(H20-H21: 連携研究者)

(3) 連携研究者

高橋 洋 (TAKAHASHI HIROSHI)

独立行政法人水産大学校・生物生産学科・助教

研究者番号: 90399650

(H19: 研究分担者)

松浦 啓一 (MATSUURA KEIICHI)

独立行政法人国立科学博物館・コレクションディレクター

研究者番号: 70141984

(H19: 研究分担者)

(4) 研究協力者

西田 睦 (NISHIDA MUTSUMI)

東京大学・大気海洋研究所・所長

研究者番号: 90136896

山野上 祐介 (YAMANOE YUSUKE)

東京大学・大気海洋研究所

研究者番号:

土井 啓行 (DOI HIROYUKI)

下関市立水族館・海響館

研究者番号: