ＰＣＲ－ＲＦＬＰ法によるフグ目の属判別

片山　貴之*，三浦　徹*，三枝　朋樹*

Genus Identification of Tetraodontiformes using PCR-RFLP Method

Takayuki Katayama*, Toru Miura*, Tomoki Saegusa*
*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance
6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan

The import of pufferfish is restricted by the Food Sanitation Law. At import clearance, confirmation of the species at least at the family level is necessary, but it is sometimes difficult to identify the species by morphological appearance. Therefore, we tried to identify Tetraodontiformes species at the genus level, which is more detailed than the family level, by the PCR-RFLP method using the 16S rRNA region and cytochrome b region of mitochondrial DNA. Fragment patterns of 16S rRNA and of the cytochrome b region by restriction enzyme showed the possibility of identifying 15 Tetraodontiformes species at the genus level.

１．緒　　言

フグは、フグ目（Tetraodontiformes）、特にフグ科（Tetraodontidae）の魚であるが、広くはハリセンボン科（Diodontidae）、イトマキフグ科（Aracanidae）、ハコフグ科（Ostraciidae）の魚を含んでいる。フグは主に食用として広く流通しているが、内臓などに毒（テトロドトキシン等）を持つため扱いが難しく、各自治体では初期処理に専門の資格者が当たることが義務付けられている。食品衛生法において食用と認められているものは、フグ科 17 種、ハリセンボン科 4 種、ハコフグ科 1 種であり、フグの輸入については、活魚または全形の状態で輸入しなければならない。

近年、魚類乾燥品（関税率表第 1604.19 号等）において、原料魚種がカワハギとの輸入申告であったが実際にはフグであった事案があり、フグかカワハギかの魚種判別が必要となった。魚種判別には形態学的な知見から行う方法があるが、頭部や皮、ヒレ等を除去した半加工品や可食部を使用した加工品については、形態学的な魚種の判別は極めて困難な場合がある。これに対して、DNA 分析は外観や生育環境を考慮に入れる必要がなく、乾燥、塩蔵、加熱、缶詰など種々の加工品を試料にできることから、有用な方法と考えられる。フグ目の DNA 研究に関しては、ミトコンドリア DNA の塩基配列情報を用いてフグ目魚種の進化体系等が報告されている [1), 2)]。

厚生労働省検疫所では、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域及び cytochrome b 領域を用いての塩基配列解析によりフグ目の種判別を行っている [3)]。しかし、この方法は DNA シーケンサーが必要であり、多くの税関分析室において実施できない状況にある。そこで今回、税関に配備されている DNA 分析機器で行える PCR-RFLP 法によりフグ目の属判別に関する検討を行った。

２．実　　験

２．１　試　料

フグ目の標準試料は、事前に形態学的な知見から種の査証が行われ東京大学大学院農学生命科学研究科から提供されたものである。また、標準試料以外のフグ種の塩基配列データは、DDBJ（DNA Data Bank of Japan）よりダウンロードしたものである。各々の詳細については、Table 1 に示す。

２．２　装　置

DNA増幅装置: GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystem製）
画像解析装置 : BIO-PROFILE System2（VILBER LOURMAT 製）
電気泳動装置 : ミニサブマリン電気泳動装置（Bio Craft 製）

２．３　実　験

フグ目からの DNA 抽出は、10mg 程度の筋肉片から DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN）を用いて行った。

フグ目の属判別を行う指標領域は、ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域の後半部分（以下 16S 領域）及び cytochrome b 領域の前半部分（以下 cytb 領域）を用いた。

PCR 反応において各領域の増幅に使用したプライマーは、16S 領域には 16SarL（5’ - CGCCTGTTTATCAAAAACAT - 3’）と 16SbrH（5’ – CCGGTCTGAACTCAGATCACGT - 3’）、cytb 領域には L14317Glu（5’ – CAGGATTTTAACCAGGACTAATGGCTTGAA - 3’）と H15149（5’ – CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA - 3’）を用いた。*Taq Polymerase* には *TaKaRa Ex Taq*（タカラバイオ）を用いた。PCR 反応溶液は、抽出 DNA 溶液 2.0μℓ、プライマー各 15pmol、dNTP mixture（25mM each）4.0μℓ、*Ex Taq* buffer 5.0μℓ、*Ex Taq* 1.0

＊　財務省関税中央分析所　〒277-0882　千葉県柏市柏の葉 6-3-5

Table 1 List of species used for standard sample or DDBJ accession number

Classification	Species	Accession No.	Abbrev.
Order Tetraodontiformes			
Suborder Tetraodontoidei			
Family Tetraodontidae	*Takifugu vermicularis*	this study	Ta.vermicularis
－〃－	*Takifugu xanthopterus*	this study	Ta.xanthopterus
－〃－	*Takifugu poecilonotus*	this study	Ta.poecilonotus
－〃－	*Takifugu rubripes*	this study	Ta.rubripes
－〃－	*Takifugu stictonotus*	this study	Ta.stictonotus
－〃－	*Takifugu pardalis*	this study	Ta.pardalis
－〃－	*Takifugu chrysops*	this study	Ta.chrysops
－〃－	*Takifugu chinensis*	this study	Ta.chinensis
－〃－	*Lagocephalus inermis*	this study	La.inermis
－〃－	*Lagocephalus gloveri*	this study	La.gloveri
－〃－	*Lagocephalus wheeleri*	this study	La.wheeleri
－〃－	*Lagocephalus lunaris*	this study	La.lunaris
－〃－	*Sphoeroides pachygaster*	this study	Sp.pachygaster
－〃－	*Arothron firmamentum*	AP006742	
－〃－	*Canthigaster rivulata*	AP006744	
－〃－	*Canthigaster coronata*	AP006743	
－〃－	*Tetraodon nigroviridis*	AP006046	
Family Ostraciidae	*Ostracion immaculatus*	AP009176	
Family Diodontidae	*Diodon holocanthus*	AP009177	
Family Triodontidae	*Triodon macropterus*	AP009170	
Family Aracanidae	*Kentrocapros aculeatus*	AP009175	
Family Molidae	*Mola mola*	AP006238	
－〃－	*Ranzania laevis*	AP006047	
－〃－	*Masturus lanceolatus*	AP006239	
Family Monacanthidae	*Stephanolepis cirrhifer*	this study	St.cirrhifer
－〃－	*Thamnaconus modestus*	this study	Th.modestus
－〃－	*Cantherhines pardalis*	AP009184	
－〃－	*Aluterus scriptus*	AP009183	
－〃－	*Paramonacanthus choirocephalus*	AP009223	
－〃－	*Pervagor janthinosoma*	AP009224	
－〃－	*Acreichthys tomentosus*	AP009213	
－〃－	*Brachaluteres ulvarum*	AP009215	
－〃－	*Monacanthus chinensis*	AP009219	
－〃－	*Rudarius ercodes*	AP009227	
－〃－	*Amanses scopas*	AP009214	
－〃－	*Paraluteres prionurus*	AP009222	
－〃－	*Oxymonacanthus longirostris*	AP009221	
－〃－	*Pseudalutarius nasicornis*	AP009225	
－〃－	*Chaetodermis penicilligera*	AP009216	
－〃－	*Meuschenia hippocrepis*	AP009218	
－〃－	*Nelusetta ayraudi*	AP009220	
－〃－	*Pseudomonacanthus peroni*	AP009226	
－〃－	*Acanthaluteres brownii*	AP009212	
－〃－	*Scobinichthys granulatus*	AP009228	
－〃－	*Eubalichthys mosaicus*	AP009217	
Family Balistidae	*Balistoides conspicillum*	AP009205	
－〃－	*Melichthys vidus*	AP009207	
－〃－	*Rhinecanthus aculeatus*	AP009210	
－〃－	*Sufflamen fraenatum*	AP004456	
－〃－	*Balistapus undulatus*	AP009203	
－〃－	*Balistes vetula*	AP009204	
－〃－	*Pseudobalistes flavimarginatus*	AP009209	
－〃－	*Xanthichthys auromarginatus*	AP009211	
－〃－	*Canthidermis maculata*	AP009206	
－〃－	*Abalistes stellatus*	AP009202	
－〃－	*Odonus niger*	AP009208	
－〃－	*Xenobalistes tumidipectoris*	AP009182	
Suborder Triacanthoidei			
Family Triacanthodidae	*Triacanthodes anomalus*	AP009172	
－〃－	*Macrorhamphosodes uradoi*	AP009171	
Family Triacanthidae	*Triacanthus biaculeatus*	AP009174	
－〃－	*Trixiphichthys weberi*	AP009173	

Unit、滅菌水（合計50μℓに調製）とした。PCR反応条件は、94℃で5分加熱後、94℃30秒、Tm（16S領域：55℃、cytb領域：50℃）1分、72℃1分のサイクルを35回行い、最後に72℃で10分加熱した。PCR産物は、2.0%アガロースゲル（TaKaRa L03，1×TAE，0.1mg/mℓ ethidium bromide）を用いて電気泳動を行い、画像解析装置により確認を行った。

RFLP反応において各PCR産物の切断に使用した制限酵素は、16S領域では*Fok*Ⅰ、*Xsp*Ⅰ(*Mae*Ⅰ)、*Alu*Ⅰを用い、cytb領域では*Fok*Ⅰ、*Xsp*Ⅰ(*Mae*Ⅰ)、*Hae*Ⅲを用いた。各PCR産物を制限酵素に添付のプロトコールに従い処理した後、2.5%アガロースゲル（NuSieve GTG：TaKaRa L03=2：1，1×TBE，0.1mg/mℓ ethidium bromide）を用いて電気泳動を行い、画像解析装置により切断片長多型の確認を行った。

3．結果及び考察

PCR-RFLP 法は、PCR 法により特定の領域を増幅したものを制限酵素により消化して切断片長多型を解析する手法である [4]。フグ目の標準試料を用いて各領域を PCR 法により増幅した生成物は、16S 領域：約 610bp、cytb 領域：約 490bp であった（Fig.1）。16S 領域の PCR 産物を *Fok* Ⅰ、*Xsp* Ⅰ、*Alu* Ⅰにより制限酵素処理した切断片長多型を Fig.2 に、cytb 領域の PCR 産物を *Fok* Ⅰ、*Xsp* Ⅰ、*Hae*Ⅲにより制限酵素処理した切断片長多型を Fig.3 に示す。トラフグ属内の一部の種間では、切断片長多型において 16S 領域及び cytb 領域ともほぼ同一のパターンを示すが、属レベルでは独立したパターンを示す。このことから、16S 領域及び cytb 領域を用いた PCR-RFLP 法により、今回用いたフグ目 15 種においては種レベルでの判別は困難であるが、属レベルでの判別は可能であることが確認できた。

また、標準試料 15 種及び DDBJ に登録されているフグ目 46 種の合計 61 種を用いて、同一領域の塩基配列情報を基に切断片長多型のシミュレーションを行った。シミュレーションから算出した 16S 領域の切断片長を Table 2 に、cytb 領域の切断片長を Table 3 に示す。各領域の切断片長から多型パターンを作成したものを Table 4 に示す。フグ目 61 種の多型パターンのうち、異なる属で同一のパターンを示したモンガラカワハギ科（Balistidae）のホシモンガラ（*Xanthichthys auromarginatus*）と *Xenobalistes tumidipectoris* の 2 種については、全ミトコンドリア DNA を用いた分子系統解析においては非常に近縁である [2] ことから、PCR-RFLP 法での多型パターンに違いが見られなかったと考えられる。これ以外の 59 種については属レベルで独立したパターンを示すことが示唆され、PCR-RFLP 法で用いた領域及び制限酵素の組み合わせが属レベルでの判別に有効な手段である可能性が高いと考えられる。しかし、今回のシミュレーションはあくまでもフグ目 61 種内のことであり、この他の種についての多型パターンは確認できていないことから、今回用いたフグ目 61 種以外の種が、今回のものと同一もしくは類似したパターンを示す可能性がある。また、DDBJ に登録されているフグ目 46 種については標準試料が入手できなかったことから、PCR 法により目的の領域が増幅されるかの確認が行えなかった。

以上のことから、PCR-RFLP 法はカワハギとして申告された輸入貨物がカワハギであることを確かめるなどスクリーニングに用いることが望ましいと考えられ、より詳細にフグ目の種又は属を判別する場合は、DNA シーケンサーにより塩基配列を決定し分子系統解析を行う必要がある。

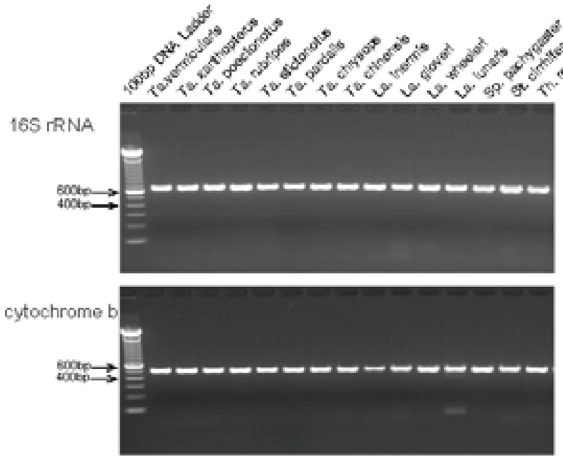

Fig.1　PCR products in 16S rRNA and cytochrome b partial regions of 15 Tetraodontiformes species

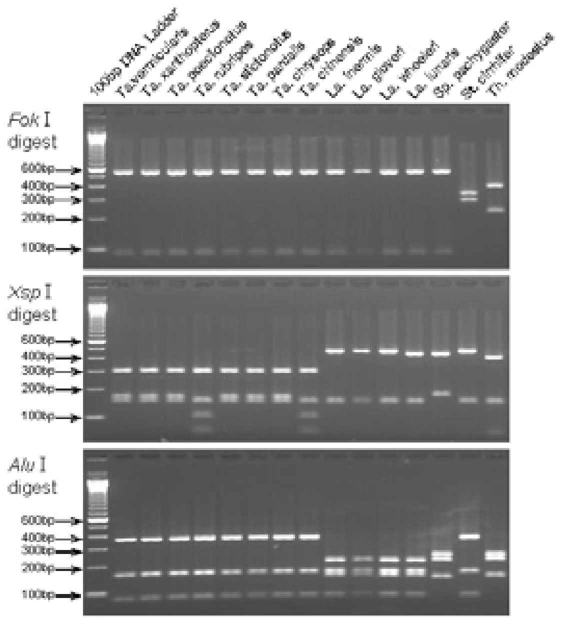

Fig.2　Restriction fragment patterns observed in 15 Tetraodontiformes species after digestion of the 16S rRNA partial regions PCR product with restriction enzyme

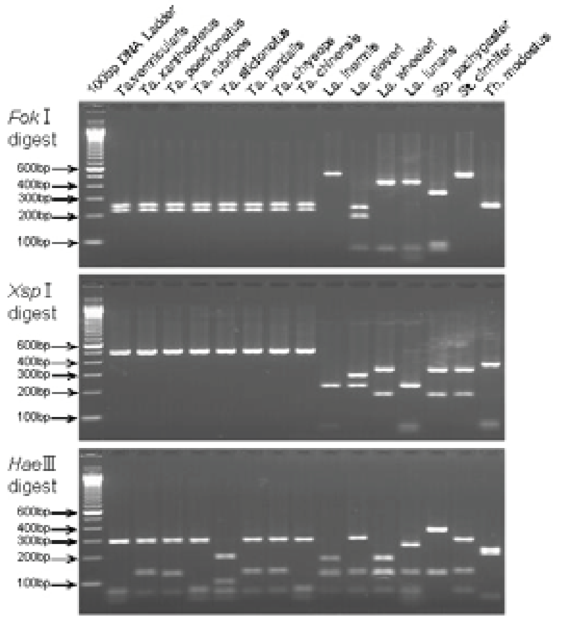

Fig.3　Restriction fragment patterns observed in 15 Tetraodontiformes species after digestion of the cytochrome b partial regions PCR product with restriction enzyme

Table 2 PCR-RFLP fragment size in 16S rRNA partial regions of 61 Tetraodontiformes species (unit: bp)

Species	16S													
	PCR	*Fok* I			*Xsp* I					*Alu* I				
Takifugu vermicularis	615	525	90		298	166	151			370	162	83		
Takifugu xanthopterus	614	524	90		298	165	151			369	162	83		
Takifugu poecilonotus	614	524	90		298	165	151			369	162	83		
Takifugu rubripes	614	524	90		298	151	102	63		369	162	83		
Takifugu stictonotus	614	524	90		298	165	151			369	162	83		
Takifugu pardalis	614	524	90		298	165	151			369	162	83		
Takifugu chrysops	614	524	90		298	165	151			369	162	83		
Takifugu chinensis	614	524	90		298	151	102	63		369	162	83		
Lagocephalus inermis	612	522	90		461	151				215	163	151	83	
Lagocephalus gloveri	611	521	90		460	151				215	163	150	83	
Lagocephalus wheeleri	611	521	90		460	151				215	163	150	83	
Lagocephalus lunaris	612	522	90		435	151	26			215	163	151	83	
Sphoeroides pachtygaster	614	524	90		437	177				248	221	145		
Arothron firmamentum	616	526	90		465	151				368	248			
Canthigaster rivulata	613	523	90		436	151	26			365	165	83		
Canthigaster coronata	613	523	90		401	151	35	26		365	165	83		
Tetraodon nigroviridis	615	525	90		438	151	26			367	248			
Ostracion immaculatus	617	527	90		466	126	25			248	221	148		
Diodon holocanthus	613	523	90		613					367	246			
Triodon macropterus	617	299	228	90	466	151				221	165	148	83	
Kentrocapros aculeatus	616	526	90		465	151				221	165	140	83	7
Mola mola	618	528	90		467	151				370	248			
Ranzania laevis	617	373	154	90	212	179	151	75		369	248			
Masturus lanceolatus	617	373	154	90	466	151				369	214	34		
Stephanolepis cirrhifer	615	328	287		464	151				369	163	83		
Thamnaconus modestus	616	390	226		403	151	62			246	222	148		
Cantherhines pardalis	617	617			466	151				246	223	148		
Aluterus scriptus	618	618			256	151	127	63	21	357	163	83	15	
Paramonacanthus choirocephalus	615	549	66		381	151	62	21		222	163	147	83	
Pervagor janthinosoma	616	550	66		376	151	89			304	163	83	66	
Acreichthys tomentosus	615	615			381	151	83			222	163	147	83	
Brachaluteres ulvarum	613	613			337	126	67	58	25	222	162	146	83	
Monacanthus chinensis	616	550	66		382	151	62	21		222	163	148	83	
Rudarius ercodes	616	550	66		288	177	151			370	246			
Amanses scopas	617	551	66		403	151	63			246	223	84	64	
Paraluteres prionurus	615	549	66		380	126	84	25		223	163	146	83	
Oxymonacanthus longirostris	613	547	66		613					367	246			
Pseudalutarius nasicornis	616	616			438	151	27			246	222	148		
Chaetodermis penicilligera	613	321	226	66	311	151	79	72		246	222	81	49	15
Meuschenia hippocrepis	616	616			382	151	83			246	222	148		
Nelusetta ayraudi	616	390	226		382	151	83			246	222	148		
Acanthaluteres brownii	616	390	226		375	151	83	7		246	222	148		
Pseudomonacanthus peroni	613	613			280	212	121			330	246	37		
Eubalichthys mosaicus	617	617			466	151				246	222	149		
Scobinichthys granulatus	616	616			375	151	58	25	7	246	222	148		
Balistoides conspicillum	612	546	66		461	151				366	246			
Melichthys vidus	614	351	263		463	151				366	248			
Rhinecanthus aculeatus	615	364	251		464	151				369	246			
Sufflamen fraenatum	614	614			463	151				366	248			
Balistapus undulatus	614	614			463	151				367	247			
Balistes vetula	614	614			463	151				367	247			
Pseudobalistes flavimarginatus	615	615			464	151				368	247			
Xanthichthys auromarginatus	614	363	251		463	151				367	247			
Canthidermis maculata	615	352	263		464	151				367	248			
Abalistes stellatus	620	620			469	151				372	165	83		
Odonus niger	614	362	252		463	151				367	247			
Xenobalistes tumidipectoris	614	363	251		463	151				367	247			
Triacanthodes anomalus	619	529	90		468	151				228	166	142	83	
Macrorhamphosodes uradoi	623	533	90		472	126	25			252	228	143		
Triacanthus biaculeatus	616	526	90		465	151				367	166	83		
Trixiphichthys weberi	614	524	90		463	126	25			367	247			

Table 3　PCR-RFLP fragment size in cytochrome b partial regions of 61 Tetraodontiformes species (unit: bp)

Species	cytb																
	PCR	FokI				XspI					HaeIII						
Takifugu vermicularis	490	249	217	24		490					292	77	68	53			
Takifugu xanthopterus	490	249	217	24		490					292	130	68				
Takifugu poecilonotus	490	249	217	24		490					292	124	68	6			
Takifugu rubripes	490	249	217	24		490					292	77	68	53			
Takifugu stictonotus	490	249	217	24		490					195	97	71	68	53	6	
Takifugu pardalis	490	249	217	24		490					292	130	68				
Takifugu chrysops	490	249	217	24		490					292	130	68				
Takifugu chinensis	490	249	217	24		490					292	77	68	53			
Lagocephalus inermis	489	489				214	213	62			180	124	118	67			
Lagocephalus gloveri	489	231	187	71		275	214				298	124	67				
Lagocephalus wheeleri	489	418	71			317	172				180	124	118	67			
Lagocephalus lunaris	490	418	72			215	213	62			255	124	68	43			
Sphoeroides pachtygaster	489	329	89	71		317	172				365	124					
Arothron firmamentum	489	240	206	43		275	214				206	124	116	43			
Canthigaster rivulata	489	249	240			213	172	62	42		283	206					
Canthigaster coronata	489	249	240			275	172	42			206	124	116	43			
Tetraodon nigroviridis	491	249	242			213	174	62	42		491						
Ostracion immaculatus	491	491				255	174	62			264	208	19				
Diodon holocanthus	490	303	187			428	62				283	207					
Triodon macropterus	490	303	187			490					360	124	6				
Kentrocapros aculeatus	490	490				374	116				183	177	130				
Mola mola	490	490				374	116				360	124	6				
Ranzania laevis	490	490				312	116	62			323	130	37				
Masturus lanceolatus	490	241	206	43		374	116				366	124					
Stephanolepis cirrhifer	491	491				317	174				292	130	69				
Thamnaconus modestus	491	249	242			359	70	62			227	208	56				
Cantherhines pardalis	491	249	242			275	146	70			283	208					
Aluterus scriptus	491	304	187			317	104	70			208	159	124				
Paramonacanthus choirocephalus	491	218	187	86		213	99	70	62	47	491						
Pervagor janthinosoma	491	180	177	134		317	174				422	69					
Acreichthys tomentosus	491	218	187	73	13	491					264	139	69	19			
Brachaluteres ulvarum	491	249	169	73		255	104	70	62		361	105	19	6			
Monacanthus chinensis	491	242	111	89	49	275	174	42			422	69					
Rudarius ercodes	491	491				491					139	116	105	69	37	19	6
Amanses scopas	491	242	187	62		275	104	70	42		178	167	116	30			
Paraluteres prionurus	491	491				429	62				422	69					
Oxymonacanthus longirostris	490	490				275	87	68	42	18	283	207					
Pseudalutarius nasicornis	491	242	180	62	7	491					159	139	124	69			
Chaetodermis penicilligera	491	304	187			213	174	62	42		264	139	69	19			
Meuschenia hippocrepis	491	249	104	73	65	275	146	70			208	124	103	56			
Nelusetta ayraudi	491	249	169	73		275	146	70			208	124	60	56	43		
Acanthaluteres brownii	491	249	169	73		275	146	70			208	124	116	43			
Pseudomonacanthus peroni	490	490				317	173				150	124	105	68	43		
Eubalichthys mosaicus	491	249	169	73		275	146	70			208	191	92				
Scobinichthys granulatus	491	249	169	73		213	146	70	62		208	124	103	56			
Balistoides conspicillum	491	187	169	73	62	213	174	62	42		292	130	69				
Melichthys vidus	491	314	177			255	174	62			422	69					
Rhinecanthus aculeatus	491	285	187	19		255	174	62			292	130	69				
Sufflamen fraenatum	491	304	187			216	213	62			292	130	69				
Balistapus undulatus	491	242	187	62		213	174	62	42		292	111	69	19			
Balistes vetula	492	180	178	108	26	430	62				422	70					
Pseudobalistes flavimarginatus	491	187	182	122		216	213	62			292	83	69	47			
Xanthichthys auromarginatus	491	242	187	62		255	174	62			292	130	69				
Canthidermis maculata	491	187	177	108	19	429	62				422	69					
Abalistes stellatus	491	285	180	19	7	213	117	62	57	42	292	130	69				
Odonus niger	492	243	187	62		217	213	62			422	70					
Xenobalistes tumidipectoris	491	242	187	62		255	174	62			292	130	69				
Triacanthodes anomalus	490	249	241			490					294	177	19				
Macrorhamphosodes uradoi	490	187	169	72	69	303	125	62			183	177	111	19			
Triacanthus biaculeatus	488	301	187			488					294	147	28	19			
Trixiphichthys weberi	490	303	187			275	173	42			298	124	68				

Table 4　PCR-RFLP fragment patterns in 16S rRNA and cytochrome b partial regions of 61 Tetraodontiformes species

Species	16S FokI	16S XspI	16S AluI	cytb FokI	cytb XspI	cytb HaeIII
Triacanthus biaculeatus	A 0	A 1	A 1	C 0	Z 0	F 2
Canthigaster rivulata	A 0	A 1	A 1	E 2	F 2	D 1
Canthigaster coronata	A 0	A 4	A 1	E 2	F 1	E 1
Trixiphichthys weberi	A 0	A 3	B 1	C 0	F 1	F 3
Arothron firmamentum	A 0	A 1	B 1	E 3	E 0	E 1
Tetraodon nigroviridis	A 0	A 1	B 1	E 2	F 2	Z 0
Balistoides conspicillum	A 0	A 1	B 1	H 0	F 2	F 3
Mola mola	A 0	A 1	B 1	Z 0	C 1	B 1
Lagocephalus wheeleri	A 0	A 1	C 1	A 0	D 0	H 4
Lagocephalus lunaris	A 0	A 1	C 1	A 0	G 3	F 5
Sphoeroides pachtygaster	A 0	A 2	C 2	B 0	D 0	B 1
Lagocephalus gloveri	A 0	A 1	C 1	D 2	E 0	F 3
Triacanthodes anomalus	A 0	A 1	C 1	E 2	Z 0	F 1
Macrorhamphosodes uradoi	A 0	A 3	C 2	H 0	C 2	H 3
Kentrocapros aculeatus	A 0	A 1	C 1	Z 0	C 1	H 2
Ostracion immaculatus	A 0	A 3	C 2	Z 0	F 1	D 2
Lagocephalus inermis	A 0	A 1	C 1	Z 0	G 3	H 4
Amanses scopas	A 0	A 4	D 1	D 2	F 5	H 1
Pervagor janthinosoma	A 0	B 1	A 2	G 0	D 0	A 0
Paramonacanthus choirocephalus	A 0	B 1	C 1	D 3	G 2	Z 0
Monacanthus chinensis	A 0	B 1	C 1	F 0	F 1	A 0
Paraluteres prionurus	A 0	B 4	C 1	Z 0	A 0	A 0
Takifugu vermicularis	A 0	C 1	A 1	E 1	Z 0	C 0
Takifugu chinensis	A 0	C 2	A 1	E 1	Z 0	C 0
Takifugu rubripes						
Takifugu poecilonotus	A 0	C 1	A 1	E 1	Z 0	F 3
Takifugu xanthopterus						
Takifugu pardalis						
Takifugu chrysops						
Takifugu stictonotus	A 0	C 1	A 1	E 1	Z 0	G 0
Rudarius ercodes	A 0	C 1	B 1	Z 0	Z 0	H 7
Diodon holocanthus	A 0	Z 0	B 1	C 0	A 0	D 1
Oxymonacanthus longirostris	A 0	Z 0	B 1	Z 0	G 1	D 1
Masturus lanceolatus	B 0	A 1	B 1	E 3	C 1	B 1
Ranzania laevis	B 0	C 3	B 1	Z 0	C 2	B 3
Stephanolepis cirrhifer	C 3	A 1	A 1	Z 0	D 0	F 3
Melichthys vidus	C 2	A 1	B 1	C 0	F 1	A 0
Rhinecanthus aculeatus	C 2	A 1	B 1	D 1	F 1	F 3
Xanthichthys auromarginatus	C 2	A 1	B 1	D 2	F 1	F 3
Xenobalistes tumidipectoris						
Odonus niger	C 2	A 1	B 1	D 2	G 3	A 0
Canthidermis maculata	C 2	A 1	B 1	G 0	A 0	A 0
Thamnaconus modestus	C 1	A 4	C 2	E 2	B 0	D 3
Acanthaluteres brownii	C 1	B 1	C 2	D 2	F 3	E 1
Nelusetta ayraudi	C 1	B 1	C 2	D 2	F 3	F 7
Chaetodermis penicilligera	C 4	B 3	D 2	C 0	F 2	F 5
Triodon macropterus	D 0	A 1	C 1	C 0	Z 0	B 1
Abalistes stellatus	Z 0	A 1	A 1	D 1	F 6	F 3
Sufflamen fraenatum	Z 0	A 1	B 1	C 0	G 3	F 3
Balistapus undulatus	Z 0	A 1	B 1	D 2	F 2	F 4
Balistes vetula	Z 0	A 1	B 1	G 0	A 0	A 0
Pseudobalistes flavimarginatus	Z 0	A 1	B 1	G 0	G 3	C 0
Eubalichthys mosaicus	Z 0	A 1	C 2	D 2	F 3	F 6
Pseudalutarius nasicornis	Z 0	A 1	C 2	D 2	Z 0	H 6
Cantherhines pardalis	Z 0	A 1	C 2	E 2	F 3	D 1
Brachaluteres ulvarum	Z 0	B 2	C 1	D 2	F 5	B 2
Scobinichthys granulatus	Z 0	B 1	C 2	D 2	F 4	E 1
Acreichthys tomentosus	Z 0	B 1	C 1	D 3	Z 0	F 5
Meuschenia hippocrepis	Z 0	B 1	C 2	F 0	F 3	E 1
Aluterus scriptus	Z 0	C 4	A 1	C 0	C 2	E 2
Pseudomonacanthus peroni	Z 0	D 0	B 2	Z 0	D 0	H 5

16S_AluI

351–372	330	304	214–252	140–166	pattern
+				+	A 1
		+		+	A 2
+			+		B 1
	+		+		B 2
			+	++	C 1
			++	+	C 2
			++		D 1
			++		D 2

cytb_FokI

489–491	418	301–329	285	231–249	217–218	206	169–187	104–134	pattern
	+								A 0
		+							B 0
		+					+		C 0
			+				+		D 1
				+			+		D 2
					+		+		D 3
				+	+				E 1
				++					E 2
				+		+			E 3
				+				+	F 0
							++	+	G 0
							++		H 0
+									Z 0

cytb_XspI

488–491	428–430	359–374	303–317	255–275	213–217	172–174	146	104–125	pattern
	+								A 0
		+							B 0
		+						+	C 1
			+					+	C 2
			+			+			D 0
				+	+				E 0
				+		+			F 1
					+	+			F 2
				+			+		F 3
					+		+		F 4
				+				+	F 5
					+			+	F 6
				+					G 1
					+				G 2
					++				G 3
+									Z 0

cytb_HaeIII

491	422	360–366	323	283–298	255–264	206–227	177–195	147–167	124–139	103–118	pattern
	+										A 0
		+							+		B 1
		+								+	B 2
			+						+		B 3
				+							C 0
				+		+					D 1
					+	+					D 2
						++					D 3
						+			+	+	E 1
						+		+	+		E 2
				+			+				F 1
				+				+			F 2
				+					+		F 3
				+						+	F 4
					+				+		F 5
						+	+				F 6
						+			+		F 7
							+				G 0
							+	+		+	H 1
							++		+		H 2
							++			+	H 3
							+		+	+	H 4
								+	+	+	H 5
								+	++		H 6
									+	++	H 7
+											Z 0

16S_FokI

613–620	521–551	351–390	321–328	287–299	251–263	226–228	154	pattern
	+							A 0
		+					+	B 0
		+				+		C 1
		+			+			C 2
			+	+				C 3
			+			+		C 4
				+		+		D 0
+								Z 0

16S_XspI

613	435–472	401–403	375–382	311–337	280–298	256	212	165–179	151	121–127	102	pattern
	+								+			A 1
	+							+				A 2
	+									+		A 3
		+							+			A 4
			+						+			B 1
				+						+		B 2
				+					+			B 3
			+							+		B 4
					+			+	+			C 1
					+				+		+	C 2
							+	+	+			C 3
						+			+	+		C 4
					+		+			+		D 0
+												Z 0

4．要　　約

フグ目について DNA 分析による属レベルでの種判別の検討を行った。ミトコンドリア DNA の 16S rRNA 領域の後半部分及び cytochrome b 領域の前半部分を PCR-RFLP 法により切断片長多型を調べた。その結果、フグ目 15 種（ナシフグ（*Takifugu vermicularis*）、シマフグ（*Takifugu xanthopterus*）、コモンフグ（*Takifugu poecilonotus*）、トラフグ（*Takifugu rubripes*）、ゴマフグ（*Takifugu stictonotus*）、ヒガンフグ（*Takifugu pardalis*）、アカメフグ（*Takifugu chrysops*）、カラス（*Takifugu chinensis*）、カナフグ（*Lagocephalus inermis*）、クロサバフグ（*Lagocephalus gloveri*）、シロサバフグ（*Lagocephalus wheeleri*）、ドクサバフグ（*Lagocephalus lunaris*）、ヨリトフグ（*Sphoeroides pachygaster*）、カワハギ（*Stephanolepis cirrhifer*）、ウマヅラハギ（*Thamnaconus modestus*））については、属レベルでの判別は可能であった。

（謝　　辞）

本研究に当たって、標準試料を提供して頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科の渡部終五教授に深くお礼申し上げます。

文　　献

1) Yamanoue, Y., Miya, M., Matsuura, K., Yagishita, N., Mabuchi, K., Sakai, H., Katoh, M., Nishida, M., 2007. Phylogenetic position of tetraodontiform fishes within the higher teleosts: Bayesian inferences based on 44 whole mitochondrial genome sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 45, 89-101.
2) Yamanoue, Y., Miya, M., Matsuura, K., Sakai, H., Katoh, M., Nishida, M., 2009. Unique patterns of pelvic fin evolution: A case study of balistoid fishes (Pisces: Tetraodontiformes) based on whole mitochondrial genome sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 50, 179-189.
3) 食安輸発第 0425005 号 魚類乾燥品等のフグ混入検査について（2008）
4) 種生物学会編：森の分子生態学 遺伝子が語る森林のすがた（2001），（文一総合出版）