

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

2. 実 験

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の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、有効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. 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	<i>Takifugu vermicularis</i>	this study	Ta.vermicularis
— " —	<i>Takifugu xanthopterus</i>	this study	Ta.xanthopterus
— " —	<i>Takifugu poecilonotus</i>	this study	Ta.poecilonotus
— " —	<i>Takifugu rubripes</i>	this study	Ta.rubripes
— " —	<i>Takifugu stictonotus</i>	this study	Ta.stictonotus
— " —	<i>Takifugu pardalis</i>	this study	Ta.pardalis
— " —	<i>Takifugu chrysops</i>	this study	Ta.chrysops
— " —	<i>Takifugu chinensis</i>	this study	Ta.chinensis
— " —	<i>Lagocephalus inermis</i>	this study	La.inermis
— " —	<i>Lagocephalus gloveri</i>	this study	La.gloveri
— " —	<i>Lagocephalus wheeleri</i>	this study	La.wheeleri
— " —	<i>Lagocephalus lunaris</i>	this study	La.lunaris
— " —	<i>Sphoeroides pachygaster</i>	this study	Sp.pachygaster
— " —	<i>Arothron firmamentum</i>	AP006742	
— " —	<i>Canthigaster rivulata</i>	AP006744	
— " —	<i>Canthigaster coronata</i>	AP006743	
— " —	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	AP006046	
Family Ostraciidae	<i>Ostracion immaculatus</i>	AP009176	
Family Diodontidae	<i>Diodon holocanthus</i>	AP009177	
Family Triodontidae	<i>Triodon macropterus</i>	AP009170	
Family Aracanidae	<i>Kentrocapros aculeatus</i>	AP009175	
Family Molidae	<i>Mola mola</i>	AP006238	
— " —	<i>Ranzania laevis</i>	AP006047	
— " —	<i>Masturus lanceolatus</i>	AP006239	
Family Monacanthidae	<i>Stephanolepis cirrifer</i>	this study	St.cirrifer
— " —	<i>Thamnaconus modestus</i>	this study	Th.modestus
— " —	<i>Cantherhines pardalis</i>	AP009184	
— " —	<i>Aluterus scriptus</i>	AP009183	
— " —	<i>Paramonacanthus choirocephalus</i>	AP009223	
— " —	<i>Pervagor janthinosoma</i>	AP009224	
— " —	<i>Acreichthys tomentosus</i>	AP009213	
— " —	<i>Brachaluteres ulvarum</i>	AP009215	
— " —	<i>Monacanthus chinensis</i>	AP009219	
— " —	<i>Rudarius ercodes</i>	AP009227	
— " —	<i>Amanses scopas</i>	AP009214	
— " —	<i>Paraluteres prionurus</i>	AP009222	
— " —	<i>Oxymonacanthus longirostris</i>	AP009221	
— " —	<i>Pseudalutarius nasicornis</i>	AP009225	
— " —	<i>Chaetodermis penicilligera</i>	AP009216	
— " —	<i>Meuschenia hippocrepis</i>	AP009218	
— " —	<i>Nelusetta ayraudi</i>	AP009220	
— " —	<i>Pseudomonacanthus peroni</i>	AP009226	
— " —	<i>Acanthaluteres brownii</i>	AP009212	
— " —	<i>Scobinichthys granulatus</i>	AP009228	
— " —	<i>Eubalichthys mosaicus</i>	AP009217	
Family Balistidae	<i>Balistoides conspicillum</i>	AP009205	
— " —	<i>Melichthys vidus</i>	AP009207	
— " —	<i>Rhinecanthus aculeatus</i>	AP009210	
— " —	<i>Sufflamen fraenatum</i>	AP004456	
— " —	<i>Balistapus undulatus</i>	AP009203	
— " —	<i>Balistes vetula</i>	AP009204	
— " —	<i>Pseudobalistes flavimarginatus</i>	AP009209	
— " —	<i>Xanthichthys auromarginatus</i>	AP009211	
— " —	<i>Canthidermis maculata</i>	AP009206	
— " —	<i>Abalistes stellatus</i>	AP009202	
— " —	<i>Odonus niger</i>	AP009208	
— " —	<i>Xenobalistes tumidipectoris</i>	AP009182	
Suborder Triacanthoidei			
Family Triacanthodidae	<i>Triacanthodes anomalus</i>	AP009172	
— " —	<i>Macrorhamphosodes uradoi</i>	AP009171	
Family Triacanthidae	<i>Triacanthus biaculeatus</i>	AP009174	
— " —	<i>Trixipichthys weberi</i>	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* を使い、cytb 領域では *Fok I*、*Xsp I* (*Mae I*)、*HaeIII* 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。

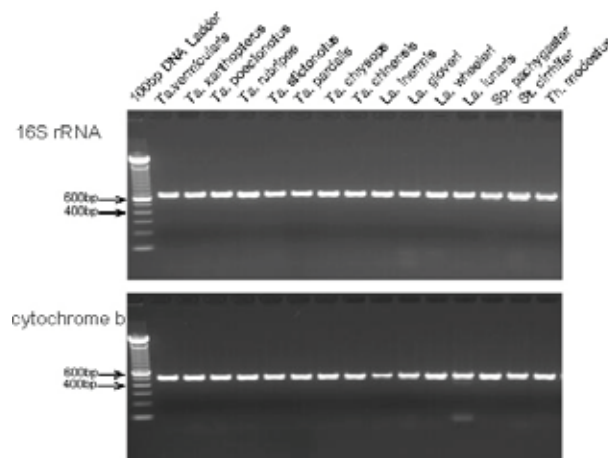


Fig.1 PCR products in 16S rRNA and cytochrome b partial regions of 15 Tetraodontiformes species

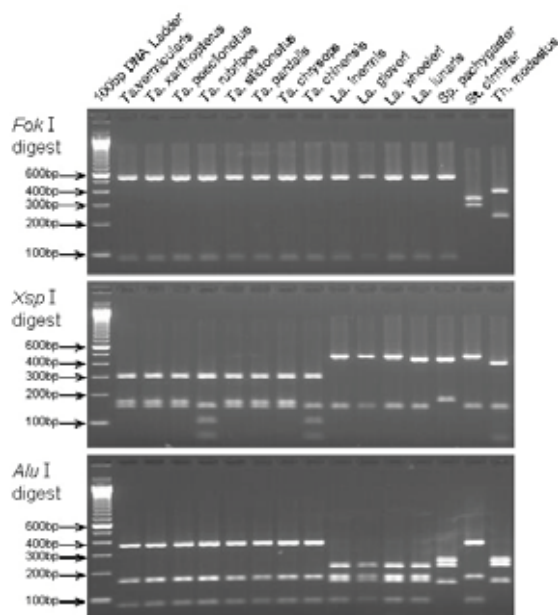


Fig.2 Restriction fragment patterns observed in 15 Tetraodontiformes species after digestion of the 16S rRNA partial regions PCR product with restriction enzyme

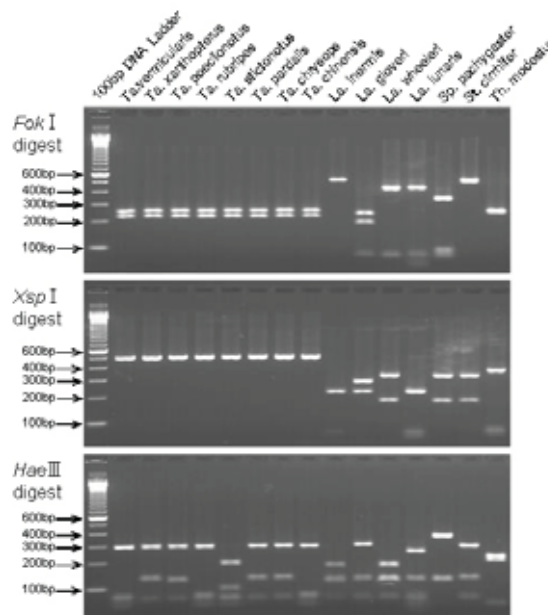


Fig.3 Restriction fragment patterns observed in 15 Tetraodontiformes species after digestion of the cytochrome b partial regions PCR product with restriction enzyme

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	
<i>Takifugu vermicularis</i>	615	525	90		298	166	151		370	162 83
<i>Takifugu xanthopterus</i>	614	524	90		298	165	151		369	162 83
<i>Takifugu poecilonotus</i>	614	524	90		298	165	151		369	162 83
<i>Takifugu rubripes</i>	614	524	90		298	151	102	63	369	162 83
<i>Takifugu stictonotus</i>	614	524	90		298	165	151		369	162 83
<i>Takifugu pardalis</i>	614	524	90		298	165	151		369	162 83
<i>Takifugu chrysops</i>	614	524	90		298	165	151		369	162 83
<i>Takifugu chinensis</i>	614	524	90		298	151	102	63	369	162 83
<i>Lagocephalus inermis</i>	612	522	90		461	151			215	163 151 83
<i>Lagocephalus gloveri</i>	611	521	90		460	151			215	163 150 83
<i>Lagocephalus wheeleri</i>	611	521	90		460	151			215	163 150 83
<i>Lagocephalus lunaris</i>	612	522	90		435	151	26		215	163 151 83
<i>Sphoeroides pachtygaster</i>	614	524	90		437	177			248	221 145
<i>Arothron firmamentum</i>	616	526	90		465	151			368	248
<i>Canthigaster rivulata</i>	613	523	90		436	151	26		365	165 83
<i>Canthigaster coronata</i>	613	523	90		401	151	35	26	365	165 83
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	615	525	90		438	151	26		367	248
<i>Ostracion immaculatus</i>	617	527	90		466	126	25		248	221 148
<i>Diodon holocanthus</i>	613	523	90		613				367	246
<i>Triodon macropterus</i>	617	299	228	90	466	151			221	165 148 83
<i>Kentrocapros aculeatus</i>	616	526	90		465	151			221	165 140 83 7
<i>Mola mola</i>	618	528	90		467	151			370	248
<i>Ranzania laevis</i>	617	373	154	90	212	179	151	75	369	248
<i>Masturus lanceolatus</i>	617	373	154	90	466	151			369	214 34
<i>Stephanolepis cirrifer</i>	615	328	287		464	151			369	163 83
<i>Thamnaconus modestus</i>	616	390	226		403	151	62		246	222 148
<i>Cantherhines pardalis</i>	617	617			466	151			246	223 148
<i>Aluterus scriptus</i>	618	618			256	151	127	63 21	357	163 83 15
<i>Paramonacanthus choirocephalus</i>	615	549	66		381	151	62	21	222	163 147 83
<i>Pervagor janthinosoma</i>	616	550	66		376	151	89		304	163 83 66
<i>Acreichthys tomentosus</i>	615	615			381	151	83		222	163 147 83
<i>Brachaluteres ulvarum</i>	613	613			337	126	67	58 25	222	162 146 83
<i>Monacanthus chinensis</i>	616	550	66		382	151	62	21	222	163 148 83
<i>Rudarius ercodes</i>	616	550	66		288	177	151		370	246
<i>Amanses scopas</i>	617	551	66		403	151	63		246	223 84 64
<i>Paraluteres prionurus</i>	615	549	66		380	126	84	25	223	163 146 83
<i>Oxymonacanthus longirostris</i>	613	547	66		613				367	246
<i>Pseudalutarius nasicornis</i>	616	616			438	151	27		246	222 148
<i>Chaetodermis penicilligera</i>	613	321	226	66	311	151	79	72	246	222 81 49 15
<i>Meuschenia hippocrepis</i>	616	616			382	151	83		246	222 148
<i>Nelusetta ayraudi</i>	616	390	226		382	151	83		246	222 148
<i>Acanthaluteres brownii</i>	616	390	226		375	151	83	7	246	222 148
<i>Pseudomonacanthus peroni</i>	613	613			280	212	121		330	246 37
<i>Eubalichthys mosaicus</i>	617	617			466	151			246	222 149
<i>Scobinichthys granulatus</i>	616	616			375	151	58	25 7	246	222 148
<i>Balistoides conspicillum</i>	612	546	66		461	151			366	246
<i>Melichthys vidus</i>	614	351	263		463	151			366	248
<i>Rhinecanthus aculeatus</i>	615	364	251		464	151			369	246
<i>Sufflamen fraenatum</i>	614	614			463	151			366	248
<i>Balistapus undulatus</i>	614	614			463	151			367	247
<i>Balistes vetula</i>	614	614			463	151			367	247
<i>Pseudobalistes flavimarginatus</i>	615	615			464	151			368	247
<i>Xanthichthys auromarginatus</i>	614	363	251		463	151			367	247
<i>Canthidermis maculata</i>	615	352	263		464	151			367	248
<i>Abalistes stellatus</i>	620	620			469	151			372	165 83
<i>Odonus niger</i>	614	362	252		463	151			367	247
<i>Xenobalistes tumidipectoris</i>	614	363	251		463	151			367	247
<i>Triacanthodes anomalus</i>	619	529	90		468	151			228	166 142 83
<i>Macrorhamphosodes uradoi</i>	623	533	90		472	126	25		252	228 143
<i>Triacanthus biaculeatus</i>	616	526	90		465	151			367	166 83
<i>Trixipichthys weberi</i>	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				
<i>Takifugu vermicularis</i>	490	249	217	24		490					292	77	68	53
<i>Takifugu xanthopterus</i>	490	249	217	24		490					292	130	68	
<i>Takifugu poecilonotus</i>	490	249	217	24		490					292	124	68	6
<i>Takifugu rubripes</i>	490	249	217	24		490					292	77	68	53
<i>Takifugu stictonotus</i>	490	249	217	24		490					195	97	71	68 53 6
<i>Takifugu pardalis</i>	490	249	217	24		490					292	130	68	
<i>Takifugu chrysops</i>	490	249	217	24		490					292	130	68	
<i>Takifugu chinensis</i>	490	249	217	24		490					292	77	68	53
<i>Lagocephalus inermis</i>	489	489				214	213	62			180	124	118	67
<i>Lagocephalus gloveri</i>	489	231	187	71		275	214				298	124	67	
<i>Lagocephalus wheeleri</i>	489	418	71			317	172				180	124	118	67
<i>Lagocephalus lunaris</i>	490	418	72			215	213	62			255	124	68	43
<i>Sphoeroides pachygaster</i>	489	329	89	71		317	172				365	124		
<i>Arothron firmamentum</i>	489	240	206	43		275	214				206	124	116	43
<i>Canthigaster rivulata</i>	489	249	240			213	172	62	42		283	206		
<i>Canthigaster coronata</i>	489	249	240			275	172	42			206	124	116	43
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	491	249	242			213	174	62	42		491			
<i>Ostracion immaculatus</i>	491	491				255	174	62			264	208	19	
<i>Diodon holocanthus</i>	490	303	187			428	62				283	207		
<i>Triodon macropterus</i>	490	303	187			490					360	124	6	
<i>Kentrocabros aculeatus</i>	490	490				374	116				183	177	130	
<i>Mola mola</i>	490	490				374	116				360	124	6	
<i>Ranzania laevis</i>	490	490				312	116	62			323	130	37	
<i>Masturus lanceolatus</i>	490	241	206	43		374	116				366	124		
<i>Stephanolepis cirrifer</i>	491	491				317	174				292	130	69	
<i>Thamnaconus modestus</i>	491	249	242			359	70	62			227	208	56	
<i>Cantherhines pardalis</i>	491	249	242			275	146	70			283	208		
<i>Aluterus scriptus</i>	491	304	187			317	104	70			208	159	124	
<i>Paramonacanthus choirocephalus</i>	491	218	187	86		213	99	70	62 47		491			
<i>Pervagor janthinosoma</i>	491	180	177	134		317	174				422	69		
<i>Acreichthys tomentosus</i>	491	218	187	73	13	491					264	139	69	19
<i>Brachaluteres ulvarum</i>	491	249	169	73		255	104	70	62		361	105	19	6
<i>Monacanthus chinensis</i>	491	242	111	89	49	275	174	42			422	69		
<i>Rudarius ercodes</i>	491	491				491					139	116	105	69 37 19 6
<i>Amanses scopas</i>	491	242	187	62		275	104	70	42		178	167	116	30
<i>Paraluteres prionurus</i>	491	491				429	62				422	69		
<i>Oxymonacanthus longirostris</i>	490	490				275	87	68	42 18		283	207		
<i>Pseudalutarius nasicornis</i>	491	242	180	62	7	491					159	139	124	69
<i>Chaetodermis penicilligera</i>	491	304	187			213	174	62	42		264	139	69	19
<i>Meuschenia hippocrepis</i>	491	249	104	73	65	275	146	70			208	124	103	56
<i>Nelusetta ayraudi</i>	491	249	169	73		275	146	70			208	124	60	56 43
<i>Acanthaluteres brownii</i>	491	249	169	73		275	146	70			208	124	116	43
<i>Pseudomonacanthus peroni</i>	490	490				317	173				150	124	105	68 43
<i>Eubalichthys mosaicus</i>	491	249	169	73		275	146	70			208	191	92	
<i>Scobinichthys granulatus</i>	491	249	169	73		213	146	70	62		208	124	103	56
<i>Balistoides conspicillum</i>	491	187	169	73	62	213	174	62	42		292	130	69	
<i>Melichthys vidus</i>	491	314	177			255	174	62			422	69		
<i>Rhinecanthus aculeatus</i>	491	285	187	19		255	174	62			292	130	69	
<i>Sufflamen fraenatum</i>	491	304	187			216	213	62			292	130	69	
<i>Balistapus undulatus</i>	491	242	187	62		213	174	62	42		292	111	69	19
<i>Balistes vetula</i>	492	180	178	108	26	430	62				422	70		
<i>Pseudobalistes flavimarginatus</i>	491	187	182	122		216	213	62			292	83	69	47
<i>Xanthichthys auromarginatus</i>	491	242	187	62		255	174	62			292	130	69	
<i>Canthidermis maculata</i>	491	187	177	108	19	429	62				422	69		
<i>Abalistes stellatus</i>	491	285	180	19	7	213	117	62	57 42		292	130	69	
<i>Odonus niger</i>	492	243	187	62		217	213	62			422	70		
<i>Xenobalistes tumidipectoris</i>	491	242	187	62		255	174	62			292	130	69	
<i>Triacanthodes anomalus</i>	490	249	241			490					294	177	19	
<i>Macrorhamphosodes uradoi</i>	490	187	169	72	69	303	125	62			183	177	111	19
<i>Triacanthus biaculeatus</i>	488	301	187			488					294	147	28	19
<i>Trixiphichthys weberi</i>	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			cytb		
	FokI	XspI	AluI	FokI	XspI	HaeIII
<i>Triacanthus biaculeatus</i>	A0	A1	A1	C0	Z0	F2
<i>Canthigaster rivulata</i>	A0	A1	A1	E2	F2	D1
<i>Canthigaster coronata</i>	A0	A4	A1	E2	F1	E1
<i>Trixiphichthys weberi</i>	A0	A3	B1	C0	F1	F3
<i>Arothron firmamentum</i>	A0	A1	B1	E3	E0	E1
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	A0	A1	B1	E2	F2	Z0
<i>Balistoides conspicillum</i>	A0	A1	B1	H0	F2	F3
<i>Mola mola</i>	A0	A1	B1	Z0	C1	B1
<i>Lagocephalus wheeleri</i>	A0	A1	C1	A0	D0	H4
<i>Lagocephalus lunaris</i>	A0	A1	C1	A0	G3	F5
<i>Sphoeroides pachtygaster</i>	A0	A2	C2	B0	D0	B1
<i>Lagocephalus gloveri</i>	A0	A1	C1	D2	E0	F3
<i>Triacanthodes anomalus</i>	A0	A1	C1	E2	Z0	F1
<i>Macrorhamphosodes uradoi</i>	A0	A3	C2	H0	C2	H3
<i>Kentrocapros aculeatus</i>	A0	A1	C1	Z0	C1	H2
<i>Ostracion immaculatus</i>	A0	A3	C2	Z0	F1	D2
<i>Lagocephalus nermis</i>	A0	A1	C1	Z0	G3	H4
<i>Amanses scopas</i>	A0	A4	D1	D2	F5	H1
<i>Pervagor janthinosoma</i>	A0	B1	A2	G0	D0	A0
<i>Paramonacanthus choirocephalus</i>	A0	B1	C1	D3	G2	Z0
<i>Monacanthus chinensis</i>	A0	B1	C1	F0	F1	A0
<i>Paraluteres prionurus</i>	A0	B4	C1	Z0	A0	A0
<i>Takifugu vermicularis</i>	A0	C1	A1	E1	Z0	C0
<i>Takifugu chinensis</i>						
<i>Takifugu rubripes</i>	A0	C2	A1	E1	Z0	C0
<i>Takifugu poecilonotus</i>						
<i>Takifugu xanthopterus</i>	A0	C1	A1	E1	Z0	F3
<i>Takifugu pardalis</i>						
<i>Takifugu chrysops</i>						
<i>Takifugu stictionotus</i>	A0	C1	A1	E1	Z0	G0
<i>Rudarius erodes</i>	A0	C1	B1	Z0	Z0	H7
<i>Diodon holocanthus</i>	A0	Z0	B1	C0	A0	D1
<i>Oxymonacanthus longirostris</i>	A0	Z0	B1	Z0	G1	D1
<i>Masturus lanceolatus</i>	B0	A1	B1	E3	C1	B1
<i>Ranzania laevis</i>	B0	C3	B1	Z0	G2	B3
<i>Stephanolepis cirrifer</i>	C3	A1	A1	Z0	D0	F3
<i>Melichthys vidus</i>	C2	A1	B1	C0	F1	A0
<i>Rhinecanthus aculeatus</i>	C2	A1	B1	D1	F1	F3
<i>Xanthichthys tumidipinnatus</i>						
<i>Xenobalistes tumbidipectoris</i>	C2	A1	B1	D2	F1	F3
<i>Odonus niger</i>	C2	A1	B1	D2	G3	A0
<i>Canthidermis maculata</i>	C2	A1	B1	G0	A0	A0
<i>Thamnaconus modestus</i>	C1	A4	C2	E2	B0	D3
<i>Acanthaluteres brownii</i>	C1	B1	C2	D2	F3	E1
<i>Nelusetta ayraudi</i>	C1	B1	C2	D2	F3	F7
<i>Chaetodermis penicilligera</i>	C4	B3	D2	C0	F2	F5
<i>Triodon macropterus</i>	D0	A1	C1	C0	Z0	B1
<i>Abalistes stellatus</i>	Z0	A1	A1	D1	F6	F3
<i>Sufflamen fraenatum</i>	Z0	A1	B1	C0	G3	F3
<i>Balistapus undulatus</i>	Z0	A0	B1	D2	F2	F4
<i>Balistes vetula</i>	Z0	A1	B1	G0	A0	A0
<i>Pseudobalistes flavimarginatus</i>	Z0	A1	B1	G0	G3	C0
<i>Eubalichthys mosaicus</i>	Z0	A1	C2	D2	F3	F6
<i>Pseudalutarius nasicornis</i>	Z0	A1	C2	D2	Z0	H6
<i>Cantherhines pardalis</i>	Z0	A1	C2	E2	F3	D1
<i>Brachaluteres ulvarum</i>	Z0	B2	C1	D2	F5	B2
<i>Scobinichthys granulatus</i>	Z0	B1	C2	D2	F4	E1
<i>Acreichthys tomentosus</i>	Z0	B1	C1	D3	Z0	F5
<i>Meuschenia hippocrepis</i>	Z0	B1	C2	F0	F3	E1
<i>Aluterus scriptus</i>	Z0	C4	A1	C0	C2	E2
<i>Pseudomonacanthus peroni</i>	Z0	D0	B2	Z0	D0	H5

16S AluI					pattern
351 -372	330	304	214 -252	140 -166	
+				+	A 1
		+		+	A 2
+			+		B 1
	+		+		B 2
			+	++	C 1
			++	+	C 2
			++		D 1
			++		D

cytb FokI									pattern
489 -491	418	301 -329	285	231 -249	217 -218	206	169 -187	104 -134	
	+								A
		+							B
		+					+		C
			+				+		D
				+			+		E
					+		+		F
				+	+				G
				++					H
				+		+			I
								+	J
							++	+	K
+							++		L

[illegible][illegible]

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

[illegible]

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*)、コモシフグ (*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)