

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 町田 龍二

カイアシ類 (Copepoda) は、節足動物門・甲殻類綱に属し、後生動物内の亜綱生物群としては地球上で最も個体数の多い動物群の1つである。その生息場所はほぼ全ての水圏環境におよび、生活様式は、浮遊性、底生性、寄生性と非常に多様であり、多くの海洋生物資源の天然餌料としても重要である。本研究ではカイアシ類の分子系統学における方法論の確立を目的として、ミトコンドリアDNAを遺伝標識として解析を行った。はじめにカイアシ類ミトコンドリアDNA全塩基配列、または部分塩基配列を決定し、ミトコンドリアDNAの特徴を明らかにするとともに、カイアシ類汎用プライマーを作成した。つづいて、これらプライマーを用いて、外洋性の *Neocalanus* 属カイアシ類の系統関係を解析し、本属カイアシ類の進化過程を推定した。また、この過程において単一個体内に多数の塩基配列型が確認されたことから、メッセンジャーRNAを逆転写した相補的DNAを解析し、多数得られたハプロタイプの起源について検討した。

カイアシ類ミトコンドリアDNAの特性

潮間帯に生息する *Tigriopus japonicus* (Harpacticoida 目) と外洋性の *Eucalanus bungii* と *Neocalanus cristatus* (Calanoida 目) のミトコンドリアDNAをロングPCRとプライマーウォーキングにより決定した。*T. japonicus* においては全塩基配列14,628塩基対が決定した。この全ミトコンドリアDNA塩基配列の決定は、甲殻類では5番目、カイアシ類では初の報告である。*E. bungii* と *N. cristatus* においては部分塩基配列、それぞれ9,530と7,965塩基対を決定した。*T. japonicus* では、一般的な後生動物と同様の13個のタンパク質遺伝子、2個のリボゾームRNA遺伝子、22個の転移RNA遺伝子から構成されていた。さらに、他の一般的な節足動物と比較すると非常にコンパクトであり、遺伝子配置が大きく異なり、かつ全ての遺伝子が片側の鎖にコードされているという特徴を示した。一般的に、ミトコンドリアDNAの遺伝子配置は保存的であり、このような大規模な配置変動は軟体動物や線形動物などでは知られているが、節足動物門でははじめて見出された現象である。また、*T. japonicus* のタンパク質遺伝子をアミノ酸配列に翻訳し、報告のある他の節足動物と比較したところ、その進化速度が非常に速いことが推察された。

以上解析の終了した3種のミトコンドリアDNA塩基配列をもとに、カイアシ類汎用プライマーをタンパク質遺伝子COIとリボゾームRNA遺伝子srRNAについて作成し、4つの目(もく)に適用した結果、良好な増幅を確認した。

多数の塩基配列型(ハプロタイプ)の解析

Neocalanus 属カイアシ類の系統解析を行うにあたり、本属各種のミトコンドリアDNA約4,000

塩基対を決定したところ、明瞭なダブルピークがそのエレクトロフェログラムに認められた。ダブルピークの確認された領域においては、そのPCR産物のクローニングを行うと、非常に多数のミトコンドリアDNA塩基配列型（ハプロタイプ）が得られた。この結果は、実際に機能している多数のミトコンドリアDNA塩基配列が存在する、またはミトコンドリアDNA配列が核に挿入された偽遺伝子が存在する可能性が考えられた。そのため、本属カイアシ類 *N. cristatus*, *N. flemingeri*, *N. plumchrus* の3種を用いて、同一個体からDNAとメッセンジャーRNAを共に抽出し、ミトコンドリアDNAのタンパク質遺伝子COIの配列をそれぞれから決定、比較した。

この結果メッセンジャーRNAから解析を行った場合は1種類の配列のみが得られるものの、DNAから解析を行った場合は多数のミトコンドリアDNA配列が得られた。このことは、これらのカイアシ類の核DNAに多数のミトコンドリアDNAの偽遺伝子が存在することを示唆している。特に、*N. plumchrus* ではDNAから解析を行った場合は、全て偽遺伝子のみが増幅、配列決定されており、DNA解析の初期に行うロングPCRにおいて選択的に偽遺伝子のみが増幅されている可能性が示唆された。

Neocalanus 属の系統解析

Neocalanus 属カイアシ類全6種のミトコンドリアDNA約4,000塩基対を新たに作成したプライマーを用いて増幅、決定した。系統解析には、最大節約法と近隣結合法を用い、系統樹の内部枝の信頼度を統計的に評価した。この結果、信頼度の高い1つの系統樹が得られ、本属は大きく2つのグループに分けられた。一方のグループは、太平洋と大西洋の熱帯、亜熱帯海域に生息する2種により構成され、他のグループには太平洋南北の亜寒帯海域に生息する4種が含まれた。また後者のグループ内では、北太平洋に分布する3種からなるクレードの共通祖先が南大洋に生息する *N. tonsus* から分岐し北太平洋に進出した後、*N. cristatus* から他の北太平洋種 (*N. flemingeri* と *N. plumchrus*) の共通祖先が続いて分岐していることが推定された。

以上本研究はカイアシ類におけるミトコンドリアDNAの構造的特性と水産資源生物の餌生物として重要な *Neocalanus* 属カイアシ類における偽遺伝子の存在、および本属における種間の系統関係を明らかにした。また本研究で開発されたカイアシ類4目に適用可能なユニバーサルプライマーは、今後カイアシ類研究、ひいては海洋生物資源の維持・保全にも大いに寄与すると考えられる。これら本研究で得られた知見は、学術上並びに応用上貢献するところが少なくなく、よって審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。