

## 論文の内容の要旨

論文題目 Phylogenetic analysis of barnacles based on mitochondrial DNA  
(ミトコンドリアDNAに基づくフジツボ類の系統解析)

水圏生物科学 専攻  
平成 13 年度博士課程 入学  
氏 名 Rowshan Ara Begum  
指導教官 渡部 終五

フジツボ類は日本沿岸に生息する節足動物門、甲殻類の蔓脚類に属する海洋の代表的な付着生物で、海洋に設置された種々の構築物に付着し多くの被害を及ぼしている。近年、海洋汚損付着生物への対策が種々講じられてきたが、その効果は必ずしも十分でない。その理由の一つとして、これら付着生物について生態研究の基礎となる種の同定や類縁関係が明確になっていないことが挙げられる。近年の分子生物学の発展に伴い、生物の類縁関係をミトコンドリアゲノムや核ゲノムに含まれる遺伝子の違いから調べる例が多くみられるようになってきた。このような分子生物学的手法は多くの甲殻類に適用されているが、蔓脚類については少なくミトコンドリアゲノム全塩基配列に至っては全くデータがない。

本研究はこのような背景の下、日本沿岸に生息する代表的な蔓脚類からフジツボ亜目のクロフジツボ *Tetraclita japonica*、オオアカフジツボ *Megabalanus volcano* およびイワフジツボ *Chthamalus challengerii*、エボシガイ亜目のカメノテ *Capitulum mitella* を対象として選び、まずミトコンドリア 12S および 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列により分子系統関係を調べた。次に、クロフジツボ、オオアカフジツボおよびカメノテについてはミトコンドリアゲノム全塩基配列を解析してさらに詳細な類縁関係を明らかにしたもので、得られた成果の概要は以下の通りである。

## 1. ミトコンドリア 12S および 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列に基づくクロフジツボ、オオアカフジツボ、イワフジツボおよびカメノテの分子系統関係

クロフジツボ、オオアカフジツボ、イワフジツボおよびカメノテは千葉県小湊湾の潮間帯から採取した。なお、クロフジツボ、イワフジツボ、カメノテの 3 種については神奈川県城ヶ島の潮間帯からも採取し分析に供した。

各試料から 0.3~0.4 g の筋組織を摘出して常法により DNA を精製し目的 DNA 断片を PCR で増幅した。12S および 16S rRNA 遺伝子の増幅に当たっては、それぞれ全体のほぼ 2/5 の約 350 bp および 1/3 の 450 bp を対象とした。ミトコンドリアゲノムは環状 2 重らせん構造で L-および H-strand の各 1 本鎖があるが、前述の領域は既報のミジンコ *Daphnia pulex* の H-strand 上、それぞれ 13,988 - 14,338 および 12,662 - 13,106 塩基に相当する。プライマーは 12S rRNA 遺伝子では Kocher ら(1989)が報告した 12S-F および 12S-R を使用し、カメノテでは新規プライマー 12S2-F および 12S2-R を設計した。一方、16S rRNA 遺伝子では Palumbi(1996)が報告したプライマー 16S-F および 16S-R を用いた。

2 地域から採取したクロフジツボ、イワフジツボおよびカメノテでは、12S および 16 rRNA 遺伝子の配列とも地域変異は認められなかった。次に両遺伝子の部分塩基配列データを単独あるいは両方合わせ、ウシエビ *Penaeus monodon* およびミジンコの相同配列を外群として近隣接合法および最大節約法で分子系統樹を作成した。その結果、いずれの系統樹でもフジツボ亜目 3 種類は単系統を示し、エボシガイ亜目カメノテとは分岐した。一方、フジツボ亜目 3 種類を詳細にみると、12S rRNA 遺伝子データではオオアカフジツボとイワフジツボは単系統となり、クロフジツボとは別系統となった。一方、16S rRNA 遺伝子あるいは 12S と 16S rRNA 両遺伝子のデータを用いたときは、近隣接合法、最大節約法のいずれの場合もクロフジツボとオオアカフジツボは単系統となり、イワフジツボとは分岐した。後者の複数の遺伝子データを用いた解析結果はより信頼性が高いとされているが、形態などから 3 種類がそれぞれ独立した単系統とされている類縁関係とは一致しなかった。

## 2. クロフジツボのミトコンドリアゲノム全塩基配列と遺伝子構造の解析

DNA の精製には神奈川県城ヶ島産の試料を使用した。次いで、先に決定した 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づきプライマーを設計し、long PCR 法でミトコンドリア全長を増幅した。

クロフジツボのミトコンドリアゲノムは全長が 15,194 bp からなり、2 rRNA 遺伝子、22 tRNA 遺伝子、13 タンパク質コード遺伝子および 3 非コード領域から構成され、既報の多細胞生物のものによく類似した。12S および 16S rRNA をコードする 2 遺伝子は別々に 2 次構造を形成することが明かとなった。次に、3 非コード領域中、最長のものは 3 つの stem loop をもち、制御領域と推定された。さらに、タンパク質コード遺伝子の構造も他動物種のものによく類似した。

22 tRNA 遺伝子中、セリンおよびロイシンはそれぞれ 2 種類の tRNA 遺伝子を持ち、セリンでは AGN および UCN、ロイシンでは UUR および CUN をアンチコドンとした。アンチコドンと各 tRNA 遺伝子との組み合わせは既報の他動物種ミトコンドリアのものと同様一致した。なお、AGN をアンチコドンとするセリン tRNA を除いて、いずれの tRNA も特徴的なクローバー葉型の 2 次構造をとるのに十分な長さを有していた。一方、tRNA 遺伝子のゲノム中の配列については、22 遺伝子中、9 遺伝子の位置関係が既報の節足動物ミトコンドリアのものとは異なっていた。さらに、システインおよびチロシン tRNA 遺伝子は H-strand に、リシン tRNA 遺伝子は L-strand によりコードされており、クロフジツボに特有の構造がみられた。

### 3. オオアカフジツボのミトコンドリアゲノム全塩基配列および遺伝子構造の解析とクロフジツボとの比較

オオアカフジツボの試料は千葉県小湊産のものを使用し、常法により DNA を精製した。次に、ミトコンドリア ATPase 6、ND3 および ND4 タンパク質コード遺伝子の既報の他生物種データを参照してプライマーを設計し、増幅したゲノム DNA 部分領域を解析しながら全体の塩基配列を決定した。

オオアカフジツボのミトコンドリアゲノムは全長が 15,107 bp からなり、クロフジツボのものと同様に 2 rRNA 遺伝子、22 tRNA 遺伝子および 13 タンパク質コード遺伝子を含んでいた。一方、クロフジツボのミトコンドリアゲノムとは異なり、2 非コード領域しか存在しなかった。長い方の領域は推定 2 次構造で 2 つの stem loop が示され、ゲノム中の位置からも制御領域と考えられた。

オオアカフジツボのタンパク質コード遺伝子では ND4L、ND4 および ND5 遺伝子はいずれも H-strand にコードされ、ゲノム中の位置関係も含めて L-strand によってコードされているクロフジツボの相同遺伝子とは異なった。次に、クロフジツボでは L-strand でコードされていたフェニルアラニン、ヒスチジン、プロリン tRNA 遺伝子が、オオアカフジツボでは H-strand でコードされていた。リシン、グルタミンはオオアカフジツボ、クロフジツボとも L-strand にコードされていたが、ゲノム中の位置は両種で大きく異なった。また、H-strand にコードされているチロシンおよびシステイン tRNA 遺伝子の位置も両種で異なった。

### 4. カメノテのミトコンドリアゲノム全塩基配列および遺伝子構造の解析とクロフジツボおよびオオアカフジツボとの比較

DNA 精製の試料は神奈川県城ヶ島の潮間帯で採取し、先に決定した 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づきプライマーを設計し、long PCR 法で全長を増幅した。

カメノテのミトコンドリアゲノムは全長が 14,916 bp からなり、2 rRNA 遺伝子、22 tRNA 遺伝子および 13 タンパク質コード遺伝子から構成されるなど、クロフジツボやオオアカフジツボのものと同様類似した。一方、非コード領域は 1 つで、2 次構造では 3 つの stem loop

構造がみられ、制御領域と判断された。次に、クロフジツボのチロシン tRNA 遺伝子は H-strand にコードされていたが、カメノテのそれは L-strand にコードされていた。それ以外のタンパク質コード遺伝子および tRNA 遺伝子のゲノム中の配置は両種でよく一致した。

以上のように、遺伝子の配置では、カメノテはクロフジツボによく類似し、オオアカフジツボとは相違した。そこで 13 タンパク質コード遺伝子の塩基配列データを合わせ、近隣接合法および最大節約法で分子系統樹を作成した。その結果、クロフジツボとオオアカフジツボはいずれの系統樹でも単系統となり、カメノテとは分岐した。さらに、ミトコンドリアゲノム全配列が報告されている鰓脚類および軟甲類の計 6 種の甲殻類のものとともに 13 タンパク質コード遺伝子を用いて分子系統樹を作成した。その結果、本研究の蔓脚類 3 種は、近隣接合法および最大節約法の系統樹とも、ミジンコを含む鰓脚類およびウシエビを含む軟甲類からは別系統となったが、近隣接合法では軟甲類より鰓脚類に近縁となった。

以上、本研究により、日本沿岸の潮間帯に生息する蔓脚類イワフジツボ、クロフジツボ、オオアカフジツボおよびカメノテの分子系統関係がミトコンドリア DNA の塩基配列から明らかにされた。すなわち、12S rRNA および 16S rRNA 遺伝子のデータを合わせて解析した結果、クロフジツボとオオアカフジツボが最も近縁で、イワフジツボを合わせたフジツボ亜目 3 種は単系統となりエボシガイ亜目カメノテとは分岐した。また、クロフジツボ、オオアカフジツボ、カメノテを対象にミトコンドリアゲノム全塩基配列を解析し、rRNA 遺伝子、タンパク質コード遺伝子、tRNA 遺伝子、非コード領域について種固有の特徴と類縁関係が詳細に示されたもので、分子進化学および生態学に資するところが大きいと考えられる。