

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 レザ モハマド シャヘッド

フグ類の中ではトラフグ属が最も重要で本属には近縁な種が多くある。とくにトラフグ *Takifugu rubripes* は市場価値が高く産業的にも大変重要であるが、形態形質が酷似する上、東シナ海を生息域にするなど、きわめて類縁のカラス *T. chinensis* が存在する。両種は表皮の紋様が異なるほか、尻鰭はトラフグで白、カラスで黒と、外見的な特徴は明白であるものの、これらの形質は判然としない場合、すなわち両種の中間の外見を示す魚体も市場では少なからずみられ、雑種の疑いがもたれている。このような生物学的な問題のほか、市場でもカラスはトラフグに比べて廉価で、雑種様の魚体については商品価値が定まりにくい状況にある。そこで本研究ではトラフグとカラスのミトコンドリアおよび核 DNA を分析して比較した。次に、両種で紋様の異なる表皮および尻鰭から mRNA を調製して、arbitrarily primed reverse transcription-polymerase chain reaction (RAP-PCR) および suppression subtractive hybridization (SSH) により両種で発現量の異なる遺伝子を探索した。さらに、トラフグおよびカラスの異なる集団間について遺伝的距離を調べた。

ミトコンドリア DNA の比較に当たっては、16S rRNA, ATPase6, ND4, ND5 およびシトクロム *b* (cyt *b*) をコードする遺伝子の一部領域の塩基配列を分析した。試料は紋様から判別した天然トラフグ成魚 24 尾、天然カラス 24 尾、天然および養殖の雑種様魚体 6 尾を対象に鰭から抽出した全 DNA を鋳型に、各遺伝子に特異的なプライマーを設計して PCR で遺伝子増幅断片を得た。なお、いくつかの試料につき脊椎骨数や鰭の棘数からも判定を試みたが、既報のように両種で明確な差は認められなかった。分析結果を比較したところ、16S rRNA, ATPase6, ND4, ND5 および cyt *b* 各遺伝子でそれぞれ、1, 2, 2, 2 および 3 カ所の計 10 カ所の informative site が見つかった。データベースに登録されているトラフグおよびカラスのミトコンドリア遺伝子全塩基配列と比較したところ、トラフグ試料の 15% はカラスの登録配列と同じであり、カラス試料の 60% はトラフグの登録配列と一致した。一方、雑種様試料はトラフグおよびカラス登録配列を混在して含むことが示された。さらに、各遺伝子の 18S rRNA の一部、internal transcribed spacer 1 (ITS1), 5.8S rRNA の一部を含む連続した領域の配列や、ITS2 の配列でもトラフグとカラスを識別する特異な塩基置換は認められなかった。

次に、色素胞の発現に関与していることが報告されている melanocortin receptor (MC1R および MC4R) および pro-opiomelanocortin (POMC) をコードする核遺伝子を調べたところ、両遺伝子ともにトラフグとカラスで良く類似し、異なる紋様や色調への関与は不明であった。そこで次に、トラフグとカラスで異なる紋様を示す同じ表皮の位置、および尻鰭から mRNA を調製して遺伝子発現の違いを RAP-PCR および SSH で調べた。その結果、前者からは serine palmitoyl transferase subunit 2, 後者からは secreted frizzled-related

protein 4, vomeronasal 1 receptor F4 (*v1rf4*), DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box peptide 16 (*dhx16*), E74-like factor 2, protocadherin2, LRRGT00033 protein, immunoglobulin super family 21, kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 3, *c15orf24* protein, h2A histone family member Y, s100 calcium binding protein a11 (*s100a11*), mKIAA1506 protein, annexin 2a, c1q-like adipose specific protein, IgM heavy chain constant region, MGC108117 protein and 40S ribosomal protein S17をコードする遺伝子の計 17 遺伝子が得られた。そこで、色調の発現に関与していることが推定される *dhx16* および *s100a11* 遺伝子を特異的にノックダウンするモルフォリノオリゴヌクレオチド(MO)を作成し、ゼブラフィッシュの受精卵に遺伝子導入して影響を調べた。その結果、前者の MO では受精後 18 時間目までは体表の色調に大きな変化は認められなかった。72 時間後では、いくつかの胚で色素胞の乱れが、また、ふ化後 48 時間では体型の異常が観察された。一方、*s100a11* 遺伝子の MO ではふ化後 8 日目においても体表の紋様や骨格の異常は認められなかった。

最後に対馬沖で漁獲したトラフグ(TT)、北九州市の沖合で漁獲したトラフグ(ST)、韓国の東海岸沖で漁獲したカラス(KK)各 50 尾を対象に、核遺伝子由来のマイクロサテライト(MS)マーカー、ミトコンドリア遺伝子の調節領域を分析した。MS 解析による遺伝的多様性指数(genetic diversity index)は TT, ST, KK 集団でそれぞれ、0.9505, 0.9350, 0.9335 であった。一方、遺伝距離および遺伝子分化指数(Gst: genetic differentiation)は、TT および KK 間でそれぞれ 0.0543, 0.0194、TT および ST 間でそれぞれ 0.0857, 0.0189 と、トラフグおよびカラス間の方がむしろ小さかった。また、ミトコンドリア遺伝子調節領域の分析から求めた遺伝距離でも MS マーカーによる解析と同様の傾向がみられた。

以上、本研究はトラフグおよびカラスの遺伝的類似性につき、ミトコンドリアおよび核遺伝子の解析できわめて高いことを明らかにした。また、両種の体表の紋様および尻鰭の色調の違いについても分子生物学的な解析を試み、有用な知見を得たもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委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。