

論文の内容の要旨

論文題目 ミトコンドリア DNA 解析によるイカ類の種判別法の開発に関する研究

水圏生物科学専攻
平成 21 年度博士課程 入学
氏 名 竹元賢治
指導教員名 山下倫明

イカ類は、大別してコウイカ目とツツイカ目に分類され、コウイカ目には 5 科、ツツイカ目には 28 科の計 33 科が含まれ、約 450 種が知られている。これらは、形態学的な特徴とともに、ミトコンドリア DNA の塩基配列の相同性による分子遺伝学的な特徴に基づいて分類される。わが国では、スルメイカ、アカイカ類、ヤリイカ類およびコウイカ類が重要な水産資源として位置づけられる。日本国内でのスルメイカの漁獲量は、216,600 トン（2009 年）、アカイカ類の漁獲量は 35,993 トン（2009 年）、ヤリイカ科のケンサキイカの漁獲量は 9,200 トン（2009 年）、ヤリイカの漁獲量は 8,186～9,794 トン（2011 年）、コウイカ類の漁獲量は 7,065 トンであり（2006 年）、約 8 万トンのイカ類がタイおよびその他のアジア諸国から輸入されている。

形態的な特徴に基づいて種を同定することが困難な場合、とくに、冷凍品、塩干品、燻製品等の加工品や外部形態が成体と異なる卵稚仔では、種を同定するための分析手法として DNA 塩基配列情報を利用することが有用である。

ミトコンドリア DNA 全塩基配列が魚介類の系統解析に広く用いられるようになり、水産生物の種判別の手法として、ミトコンドリア DNA を用いる遺伝子解析法が系統分類、集団解析、食品鑑定などに応用されているが、イカ類では、ミトコンドリア DNA 全塩基

配列が解析されているものは 12 種に限定されている。そのため、ミトコンドリア DNA による遺伝子解析の高度化のためには、水産業の対象となる生物種の塩基配列情報を得て生物種間の相違を明らかにし、イカ類の分子系統関係を解析する必要がある。

水産加工品には、国内外で漁獲されるさまざまな生物種が利用されており、生産地が異なれば、原料となる生物種やその品質が異なる例も多い。食品表示に対する消費者の信頼を確保する観点から「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS 法）」によって、生鮮品の場合は、名称と原産地（輸入品の場合は原産国）、加工品の場合は、原料原産地の品質表示が義務づけられている。水産物の品質表示の内容を科学的に検証するため、生物種名や漁獲された海域、輸入品の場合は原産国を推定する技術開発に対する行政ニーズがある。また、税関の輸入品検査では、コウイカ目の 5 種（ヨーロッパコウイカ、トラフコウイカ、カミナリイカ、コブシメおよびオーストラリアコウイカ）は輸入割当の該非および関税率が異なることから、コウイカ目 5 種とコウイカ類以外の生物種との判別を可能にする簡便な種判別技術の開発が期待されている。

本研究は、このような背景の下、イカ類の水産重要種を対象として、ミトコンドリア DNA の塩基配列を解析することによって、イカ類の分子系統関係を明らかにし、ツツイカ類とコウイカ類とを判別するための簡便な PCR 分析法を開発した。成果の概要は以下の通りである。

イカ類のミトコンドリア DNA 全塩基配列の決定と解析

本研究では、水産重要種のうち、ミトコンドリア DNA 全塩基配列が報告されていないケンサキイカ (*Loligo edulis* f. *kensaki*)、日本海西部において秋季から冬季に漁獲されるケンサキイカの季節型のブドウイカ (*L. edulis* f. *budo*) およびコウイカ目のシリヤケイカ (*Sepiella japonica*) について、ミトコンドリア DNA の全塩基配列を決定した（順に登録番号 AB675080, AB675081, AB675082）。

ケンサキイカおよびブドウイカのミトコンドリア DNA には、他のイカ類と同様に、13 個のタンパク質をコードする遺伝子、*16SrRNA* 遺伝子、*12SrRNA* 遺伝子および 22 個の tRNA 遺伝子が含まれており、同じ *Loligo* 属のヤリイカおよびカリフォルニアヤリイカと共通の遺伝子配置を示し、ツツイカ類開眼亜目の他のイカ類で見られる 6 遺伝子の重複 (*CO1*, *CO2*, *CO3*, *ATP6*, *ATP8* および *tRNA^{Asp}*) はヤリイカ類には見られなかった。ケンサキイカ、ブドウイカ、ヤリイカ (*L. bleekeri*) およびカリフォルニアヤリイカ (*L. opalescens*) のミトコンドリア DNA 塩基配列の比較によって、ヤリイカの *ATP6* においてアミノ酸 1 残基の欠失が認められ、*ATP8* においてアミノ酸 2 塩基の挿入が見られた。決定されたケンサキイカおよびブドウイカのミトコンドリア DNA 全塩基配列は、ケンサキイカが 17,360 bp、ブドウイカが 17,351 bp であった。

ケンサキイカのミトコンドリア DNA 全塩基配列をヤリイカおよびカリフォルニアヤ

リイカと比較すると、それぞれ 506 塩基および 480 塩基の非コード領域での欠失があり、全塩基配列に対して 3310 塩基 (18.9%) および 3407 塩基 (19.5%) の置換が見られた。

コウイカ類では、シリヤケイカのミトコンドリア DNA 全塩基配列を解析した結果、他のイカ類と同様に、13 個のタンパク質をコードする遺伝子、*16SrRNA* 遺伝子、*12SrRNA* 遺伝子および 22 個の tRNA 遺伝子が含まれており、ヨーロッパコウイカ (*Sepia officinalis*) およびコウイカ (*S. esculenta*) と共通の遺伝子配置を示した。開眼亜目のイカ類においてみられる 6 遺伝子の重複はコウイカ類では見られなかった。遺伝子間のコード領域がオーバーラップした塩基配列が、*ND4* と *ND4L* 間の 4 塩基、*Cytb* と *ND6* 間の 8 塩基および *ND1* と *COI* 間の 29 塩基で見られた。シリヤケイカのミトコンドリア DNA 全塩基配列は、16,172 bp であり、ヨーロッパコウイカおよびコウイカと比較すると、非コード領域での 221 塩基および 345 塩基の欠失が観察され、全塩基配列のうち 2472 塩基 (15.2%) および 3304 塩基 (20.2%) で置換が見られた。

ミトコンドリア DNA 全塩基配列が決定されたケンサキイカ、ブドウイカおよびシリヤケイカを含むイカ類 13 種と外群としてのタコ類 2 種について、ミトコンドリア DNA に存在する 13 個のタンパク質コード遺伝子、2 個の rRNA 遺伝子および 22 個の tRNA 遺伝子を用いて、Kimura 2-parameter モデルによる最尤系統樹を作成したところ、ケンサキイカの塩基配列はヤリイカおよびカリフォルニアヤリイカと相同性が高く、アオリイカとともに閉眼亜目イカ類のクラスターを形成した。また、シリヤケイカのミトコンドリア DNA 全塩基配列はヨーロッパコウイカと最も相同性が高く、コウイカを含む 3 種でコウイカ目イカ類のクラスターを形成した。また、開眼亜目のクラスターには、アメリカオオアカイカ (*Dosidicus gigas*)、スルメイカ (*Todarodes pacificus*)、トビイカ (*Sthenoteuthis oualaniensis*)、ダイオウイカ (*Architeuthis dux*) およびホタルイカ (*Watasenia scintillans*) が含まれていた。

ケンサキイカ季節型ケンサキイカ型およびブドウイカ型の遺伝的差異の解析

決定したケンサキイカおよびブドウイカのミトコンドリア DNA の全塩基配列を比較すると、11 塩基の置換が見られ、それらのうち、8 塩基がコード領域にあり、3 塩基が非コード領域に見られた。塩基の欠失は、ブドウイカにおいて 18 塩基、ケンサキイカにおいて 9 塩基存在したが、これらは全て非コード領域におけるものであった。コード領域の塩基配列はケンサキイカおよびブドウイカの間で高度に保存されており、全塩基配列の 99.9% が一致した。両者間で見られた 8 塩基の置換のうち、アミノ酸置換を含む 3 カ所が *ND1* 遺伝子に見られたことから、*ND1* 遺伝子の塩基配列の変異を指標として、ケンサキイカとブドウイカの遺伝的差違を集団遺伝学的に解析した。ケンサキイカ 51 個体およびブドウイカ 60 個体における *ND1* 遺伝子の変異を比較した結果、12 個の塩基置換が検出され、13 種類のハプロタイプに分類された。ケンサキイカおよびブドウイ

カについて遺伝的差異を統計学的に解析した結果、 F_{ST} 値が 0.00361, p 値が 0.622 となり、ケンサキイカとブドウイカとの間に遺伝的差異は認められなかった。これらのことから、夏刈 (1995) がアイソザイム解析によって指摘したように、ケンサキイカとブドウイカとは、地域的および季節的要因によって生じていることがミトコンドリア DNA の解析から推定された。

PCR-RFLP 法によるイカ類の種判別法の開発

コウイカ目およびツツイカ目のイカ類を対象として、PCR-RFLP 法による種判別法を開発した。PCR-RFLP 法に適用可能な DNA 塩基配列として、生物種間で鎖長が異なる *12SrRNA* 遺伝子領域を選定し、コウイカ目とツツイカ目とを判別するための種判別技術を開発した。イカ類 22 種について、*12SrRNA* 遺伝子領域の一部配列を PCR 法で増幅した結果、コウイカ目とツツイカ目との生物種間で、サイズの異なる PCR 産物が得られた。最も短いものが 465 bp (アオリイカ)、最も長いものが 497 bp (ケンサキイカ) であった。これら PCR 産物を HindIII によって処理した結果、コウイカ目の PCR 産物は、分析に用いた全ての試料で HindIII によって切断されたが、ツツイカ目の PCR 産物は、HindIII によって切断されなかった。種判別法の開発に用いた対象生物種のうち、コウイカ、ヨーロッパコウイカ、ヤリイカ、アオリイカ、ケンサキイカ、アカイカ、アメリカオオアカイカ、スルメイカ、アルゼンチンイレックスおよびソデイカについて、各 50 個体を材料として、PCR-RFLP の DNA バンドを測定した結果、HindIII 切断点の個体変異は見られなかった。

以上の結果から、本研究の成果は、イカ類の水産重要種を対象として、ミトコンドリア DNA の塩基配列上の特徴を明らかにするとともに、ツツイカ目とコウイカ目とを簡便に判別するための PCR-RFLP 法を開発したものであり、比較生化学および水産化学に資するところが少なくない。