

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 竹元 賢治

---

イカ類は、わが国の重要な水産資源であり、スルメイカやアカイカ類、ヤリイカ類、コウイカ類などが国内で生産される一方、輸入品も多い。冷凍水産物や加工品は、外見から種を同定することが困難であるため、生物種を確認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。水産物ではミトコンドリア DNA の分析手法が系統分類、集団解析、食品鑑定などに応用されている。そこで、水産物におけるミトコンドリア DNA による遺伝子解析の高度化のため、水産重要種の塩基配列情報を得て生物種間の遺伝的相違を明らかにし、イカ類の分子系統関係を解析する必要がある。

食品表示に対する消費者の信頼を確保する観点から、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 PCR 分析法を開発した。成果の概要は以下の通りである。

本研究では、水産重要種のうち、ケンサキイカ (*Loligo edulis* f. *kensaki*)、ブドウイカ (*L. edulis* f. *budo*) およびシリヤケイカ (*Sepiella japonica*) のミトコンドリア DNA の全塩基配列を決定した。ケンサキイカおよびブドウイカのミトコンドリア DNA 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、16 S rRNA 遺伝子、12 S rRNA 遺伝子および 22 個の tRNA 遺伝子が含まれており、ヤリイカ類と共通の遺伝子配置を示した。コウイカ類の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、他のコウイカ類と共通の遺伝子配置が明らかにされた。ミトコンドリア DNA 全塩基配列を決定したケンサキイカ、ブドウイカおよびシリヤケイカを含むイカ類 13 種に対する分子系統関係が明らかとなった。

外部形態が異なるが、同一種であると考えられる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した。全塩基配列の 99.9% が一致したが、両者間には、アミノ酸置換を含む 3 カ所の塩基置換が *NDI* 遺伝子に見られたことから、*NDI* 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結果、両者には 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が、遺伝的差異の解析から、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つ

た。これらのことから、以前に他の研究者によるアイソザイム解析によって指摘されたように、ケンサキイカとブドウイカとは、同一の生物種であり、外部形態の差異は、地域的および季節的要因によって生じていることが明らかとなった。

コウイカ類とツツイカ類とを判別するための種判別法を開発した。生物種間でのミトコンドリア DNA の塩基配列を比較し、生物種間での鎖長が異なる *12SrRNA* 遺伝子領域を選定した。この遺伝子領域を PCR 法で増幅した結果、コウイカ類とツツイカ類との生物種間で、サイズの異なる PCR 産物が得られた。PCR 産物を HindIII で処理した結果、ツツイカ類の PCR 産物は、HindIII によって切断されず、一方、コウイカ類の PCR 産物は HindIII によって切断された。この分析法は、イカ類の PCR-RFLP 法による種判別法として、生鮮品や加工品の DNA 分析に利用できる。

以上、本研究によって、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が明らかにされるとともに、ツツイカ類とコウイカ類とを簡便に判別するための PCR-RFLP 法が開発された。本研究は比較生化学および水産学の発展に貢献するものであり、水産物の原料判別法に関する新規技術開発へと発展が期待されることから、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。