

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 22 年度博士課程 進学
氏名 五十嵐 洋治
指導教員名 潮 秀樹

Tetraodon 属魚類の分子系統関係および 塩分適応に関わる分子進化学的研究

フグ目フグ科魚類は海水域のほか、汽水域や淡水域に広く分布しているが、この中、20以上の種で構成される *Tetraodon* 属魚類はアジアおよびアフリカの熱帯から温帯の淡水、汽水域および一部の海水域に生息している。この *Tetraodon* 属魚類は体サイズも小さく、体表の模様も多様なため、その多くは観賞魚として日本国内で流通している。一方、同属ミドリフグ *T. nigroviridis* は全ゲノムサイズが約 340 M bp と、トラフグ *Takifugu rubripes* と同様に既知の脊椎動物中、最小のため、ゲノム研究のモデル生物としても注目されている。しかしながら、*Tetraodon* 属魚類では近縁種が多く、個々の生態もよく知られていないため、形態形質に基づく現在の分類には不明な点が多い。

そこで本研究では、*Tetraodon* 属魚類の分子系統関係と、様々な塩分環境に分布する同属魚類の塩分適応に関わる分子進化の一端を明らかにすることを目的に、まず、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 塩基配列に基づいて *Tetraodon* 属魚類とその他の関連フグ科魚類との系統類縁関係を解析した。続いて、東南アジアで現地採取した *Tetraodon* 属魚類を対象に、mtDNA および核遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析を行い、形態的特徴や生息域との関係を調べた。さらに、アジア産 *Tetraodon* 属魚類については、淡水域種と汽水域種の塩分耐性の違いを明らかにするため、二次元電気泳動を用いたプロテオミクス解析によって塩分変化がタンパク質発現に及ぼす影響を調べるとともに、筋成長に関わるミオシン重鎖遺伝子をマーカーとして、筋成長と塩

分環境との関連を検討した。得られた成果の概要は以下の通りである。

1. *Tetraodon* 属魚類と関連フグ科魚類の分子系統解析

下関水族館で形態から種同定された *Tetraodon* 属 17 種のほか、淡水域に生息する *Carinotetraodon* 属 5 種、*Colomesus* 属 2 種および *Auriglobus* 属 1 種、汽水域に生息する *Arothron* 属 10 種、*Marilyna* 属 2 種、*Spherooides* 属 3 種および *Chelonodon* 属 1 種、海水域に生息する *Lagocephalus* 属 4 種、*Takifugu* 属 10 種、*Canthigaster* 属 4 種、*Tetractenos* 属 1 種および *Omegophora* 属 1 種のフグ科魚類の計 13 属 60 種 127 個体のアルコール保存標品を試料とした。次に、各試料魚の胸鰭または尾鰭から試料約 20 mg を採取して DNA を抽出し、得られた DNA を鋳型として、PCR により 16S rRNA 遺伝子の 3' 側の一部領域を増幅した。決定した 571-580 bp の配列に基づき最尤法を用いて分子系統樹を作製したところ、属間の分岐のブートストラップ値は低く、その信頼性は高くなかった。しかしながら、*Marilyna* 属、*Tetractenos* 属、*Takifugu* 属、*Omegophora* 属、*Canthigaster* 属、*Auriglobus* 属、*Chelonodon* 属および *Arothron* 属の 8 属は属ごとに 1 つのクラスターを形成したことから、各属内の魚種が遺伝的に近縁で、形態形質に基づく分類と分子生物学的分類が概ね一致することが示された。一方、*T. cutcutia* を除く *Tetraodon* 属魚類の分子系統関係はそれぞれの生息域と一致したクラスターから成り、アジア淡水域、アジア汽水域およびアフリカ淡水域の 3 系統に分類された。

続いて、*Tetraodon* 属魚類の系統類縁関係をさらに詳細に調べるために、*Tetraodon* 属魚類の 16S rRNA(1,667-1,680 bp)およびシトクロム *b* (Cyt *b*, 1,137 bp) 全長塩基配列を決定し、既報のフグ科魚類の mtDNA 全長塩基配列に基づいて作製された分子系統樹(Yamanoue et al., 2011)と合わせて supermatrix 解析を行った。その結果、前述の 16S rRNA 部分塩基配列に基づく分子系統樹と同様に、*T. cutcutia* を除き、生息域に応じてアジア淡水域、アジア汽水域およびアフリカ淡水域の 3 系統に分類された。すなわち、*Tetraodon* 属魚類は単系統では無く、各 3 系統はそれぞれ別属のフグ科魚類とクラスターを形成することから、*Tetraodon* 属魚類の 3 系統は属レベルで異なる可能性があり、既存の形態学的分類については再検討が必要であるものと推察された。各 3 系統の内部の分岐においては、アジア淡水域系統ではメコン川流域に生息するグループ、アフリカ淡水域系統ではコンゴ盆地に生息するグループなど、同一地域に生息する魚種は近縁の関係にあり、分子系統樹が各魚種の生息域をよく反映していることが示された。

2. 東南アジア産 *Tetraodon* 属魚類の分子系統解析

タイ各地およびマレーシアのボルネオ島の計 6 地点でアジア汽水域系統の *Tetraodon* 属魚類ミドリフグ 19 個体およびミドリフグ近縁種のサバヘンシス *T. sabahensis* 3 個体を採取したところ、体表の黄緑色に黒斑を伴う色調や紋様は地域集

団によって大きく異なっていた。そこで、全個体の mtDNA の Cyt *b* 全長塩基配列(1,137 bp)および核遺伝子 recombination activating gene 1 (*RAG1*)の部分塩基配列(1,419 bp)を解析した。また、ミドリフグについてはそれぞれの採取地につき各 1 個体、ボルネオ島産サバヘンシス 2 個体の mtDNA 全長塩基配列を決定した。サバヘンシス mtDNA は全長 16,450 bp で、データベース登録済み(AP006046)ミドリフグ mtDNA と同様に、2 個の rRNA、22 個の tRNA および 13 個のタンパク質遺伝子がコードされていた。また、登録済みのミドリフグ mtDNA 全長塩基配列と比較した結果、塩基同一率は 98% と高い値を示した。

次に、決定した Cyt *b* 全長、mtDNA 全長および *RAG1* 部分塩基配列に基づき近隣結合法を用いて分子系統樹を作製した。その結果、ミドリフグについては、どの遺伝子に基づく分子系統樹においても、同一地点で採取された試料は同一クラスターを形成し、同一地点内では遺伝的にも同一集団であることが示された。サバヘンシスについては、mtDNA 全長および *RAG1* 部分塩基配列を用いた解析において 2 つの系統に分かれたが、いずれも背側に小斑点を持つタイ・パンガー産のミドリフグ試料と近縁であった。また、背側に大斑点を持つミドリフグ試料は、背中に小斑点を持つミドリフグおよびサバヘンシスと明確に分岐し、遺伝的には小斑点ミドリフグおよびサバヘンシス間よりも遠いことが示された。すなわち、異なるミドリフグ集団間の遺伝的距離は、サバヘンシスと各ミドリフグ集団間のものより大きい場合もあり、さらに、サバヘンシスにおいては少なくとも 2 系統以上が同所的に生息する可能性が示唆された。

次に、タイ東部で採取されたアジア淡水産 *Tetraodon* 属魚類 12 種を対象に分子系統解析を行った。全ての試料魚は形態的特徴から *T. cohinchinensis* とされたが、16S rRNA の部分塩基配列(573 bp)は *T. cohinchinensis* のものとは異なり、解析した 12 個体中 2 個体は *T. abei* および *T. baileyi* の配列と同一であった。また、その他 10 個体は同一塩基配列を示し、公開データベースでは未登録であった。決定した部分塩基配列に基づき分子系統樹を作製した結果、これら 10 個体はアジア淡水域系統に分類され、この分子系統樹とアジア淡水域系統の各魚種の生息域の関係から、*T. cambodgiensis* と推定された。一方、*RAG1* の部分塩基配列 575 bp では、塩基同一率が 99-100% と高く、また、配列中にはヘテロな塩基置換がみられたため、分子系統解析には使用しなかった。アジア淡水域系統の *Tetraodon* 属魚類は、近縁種間でその形態的特徴が類似する種も存在するため、形態形質からの分類には注意が必要で、DNA 分析に基づく種判別は強力なツールとなるものと考えられた。

3. *Tetraodon* 属魚類の塩分耐性と関連分子の探索

アジア産 *Tetraodon* 属魚類の生息域を規定する表現型の一つの塩分耐性を、汽水域種ミドリフグと淡水域種メコンフグ *T. cohinchinensis* を対象に調べた。その結果、ミドリフグは 100% 海水でも生存したが、メコンフグは海水 50% 以上の塩分では生存で

きなかった。したがって、両魚種の塩分耐性は明確に異なることが示された。

続いて、塩分適応に関わる分子の探索を目的に、ミドリフグでは淡水および 100% 海水、メコンフグでは淡水および 40% 海水の異なる塩分で馴化した各試料魚の筋肉および肝臓から、常法によって水溶性タンパク質を抽出した。得られたタンパク質を二次元電気泳動に供し、プロテオミクス解析を試みた。ミドリフグ、メコンフグとも筋肉および肝臓で淡水飼育区と 100% もしくは 40% 海水飼育区で発現量に差異が認められるタンパク質のスポットが複数検出されたが、再現性は得られず、塩分変化によって発現変動を示すタンパク質の同定には至らなかった。

次に、先にトラフグで筋成長に関わると報告されたミオシン重鎖遺伝子 *MYH_{M2528-1}* (Akolkar et al., 2010) のミドリフグ・オーソログ遺伝子につき、異なる塩分環境下での発現変動を調べた。まず、ミドリフグ・ゲノムデータベースを利用し、シンテニー解析を行って *TnMYH_{M2528-1}* を同定した。次に、ミドリフグ筋肉から RNA を抽出し、3'RACE および cDNA クローニングにより *TnMYH_{M2528-1}* の 3'UTR を含む塩基配列 702 bp を決定した。さらに、*TnMYH_{M2528-1}* に特異的な RNA プローブを作製し、*in situ* ハイブリダイゼーションにより筋肉中の転写産物を検出した。その結果、本遺伝子は成長に伴って新しく形成されたと思われる細い筋線維で多く発現し、ミドリフグにおいても筋成長に関連することが示唆された。リアルタイム PCR によって *TnMYH_{M2528-1}* の mRNA 蓄積量を調べた結果、100% 海水馴化区に比べ、淡水馴化区で約 2 倍高く、低塩分環境で筋成長が促進される可能性が示された。

以上、本研究の分子系統解析により、*Tetraodon* 属魚類は単系統ではなく、生息環境と一致して、アジア淡水域、アジア汽水域およびアフリカ淡水域の 3 系統に分類されることを明らかにした。また、東南アジアに分布するミドリフグおよびその近縁種の一部につき、体表の色調や紋様と地域集団の関係を示した。さらに、形態的特徴の酷似する *Tetraodon* 属魚類は形態形質からの分類は困難な場合があり、DNA 分析に基づいた分類が必要と考えられた。また、アジア淡水域種と汽水域種では塩分適応能に明確な違いがあり、前者では低塩分環境下で筋成長が促進される可能性を示した。

ゲノムサイズの小さい *Tetraodon* 属魚類における種分化の過程およびその塩分適応に関わる分子進化は、ゲノムの変化と表現型を結びつける基礎的知見という点でも意義深い。以上の成果は、*Tetraodon* 属魚類の分類および種分化の過程のより詳細な記述につながるとともに、魚類の塩分適応に関する分子進化過程を明らかにするための一助となることが期待される。