

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 五十嵐 洋治

五十嵐 洋治氏の博士申請論文 *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はミドリフグを代表とする *Tetraodon* 属魚類について遺伝子情報を用いて分子進化学的に詳細に考察したものである。その概要を以下に示す。

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。本研究では、*Tetraodon* 属魚類の分子系統関係について、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 塩基配列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、筋形成に関わるミオシン重鎖遺伝子をマーカーとして、成長と塩分環境との関連を検討した。

Tetraodon 属 17 種のほか、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。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が低く、その信頼性は高いとは言えなかったが、*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。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 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、属レベルで異なる可能性があり、既存の *Tetraodon* 属魚類の分類については再検討が必要であるものと考えられた。

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。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。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。

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% 海水でも生存せず、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。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についてプロテオミクス解析を試みたが、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。

ミオシン重鎖遺伝子 *MYH_{M2528-1}* 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。*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量の増大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が明らかにされた。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良い可能性を示した。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。

よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として必要十分な条件を満たす、価値あるものと判定した。