

分子遺伝学的手法によるアコヤガイ属貝類の系統と 種判別に関する研究

学位論文内容の要旨

太平洋，インド洋，大西洋の暖かく浅い海に分布するアコヤガイ属は，各国で真珠養殖に利用される。本属は主に殻形態をもとに分類されているが，殻形態は種内変異が大きく，環境の影響も受けるため，未だに本属の分類は統一されていない。よって，本属の遺伝的類縁関係の把握は，真珠養殖への利用上，遺伝資源の探索や育種学的観点から重要と考えられる。

本属では，真珠生産に利用される種とされない種が同所的に生息する。従って，採苗数や資源量を推定するには，他の本属貝類から目的の種を判別する必要がある。近年，西日本の養殖アコヤガイでは疾病による大量斃死が頻発し，経済的損失が大きい。このため，養殖業者はこれに対する抗病性を期待し，国外から本属貝類を輸入している。そして，これらの同系交配，または国内産アコヤガイとの交雑により，真珠養殖用種苗を生産している。しかし，移植や交雑は純粋な国産アコヤガイの遺伝資源の喪失を招く恐れがあるため，交雑を監視して遺伝資源を適正に管理するには，種判別手法の開発が必要である。

そこで，DNA の塩基配列の多型を用いた解析をアコヤガイ属に導入し，類縁関係の推定や種判別手法の開発等を行った。

アコヤガイ属等の多くの貝類では，体内外にムコ多糖類を多量に含むため，通常のDNA 抽出法ではムコ多糖類が残存し酵素処理反応が阻害される。そこで，先ず，ヒドロキシアパタイトを利用した多検体が扱える DNA 精製法を開発した。

次に，ミトコンドリア DNA の 16S，核 18S と 28S rRNA 遺伝子領域の塩基配列を用いた系統解析から，アコヤガイ属(シロチョウガイ，クロチョウガイ，モスソアコヤガイ，ムラサキチョウガイ，*Pinctada* sp.，ミドリアオリガイ，アコヤガイ，ベニコチョウガイ，*Pinctada radiata*，メキシコアコヤガイ)の分子系統樹を作成した。各樹形は類似するため同一の進化様式であり，種の系統樹に近い形をしていると推測された。また，「アコヤガイとベニコチョウガイ」，「モスソアコヤガイとムラサキチョウガイ」は遺伝的に分化していないと推測された。「アコヤガイとベニコチョウガイ」に最も遺

伝的に近いのは、*P. radiata*、メキシコアコヤガイで、次にミドリアオリガイ、そして「モスソアコヤガイとムラサキチョウガイ」、*Pinctada sp.* と続き、クロチョウガイ、シロチョウガイが最も遠いと推測された。

アコヤガイ属各種の派生順序は、祖先種からシロチョウガイが最初に派生し、「モスソアコヤガイとムラサキチョウガイ」、*Pinctada sp.*、次に、ミドリアオリガイ、最後にアコヤガイ類(メキシコアコヤガイ、*P. radiata*、ベニコチョウガイ、アコヤガイ)の順で派生し、クロチョウガイは別途シロチョウガイから派生したと推測された。「アコヤガイとベニコチョウガイ」、*P. radiata*、メキシコアコヤガイの遺伝的分化は短期間で起こり、これ以外の種分化は時間をかけて起こったと考えられる。

rRNA 遺伝子の ITS 領域の塩基配列は、アコヤガイ属の種／グループ間(シロチョウガイ、クロチョウガイ、「モスソアコヤガイとムラサキチョウガイ」、*Pinctada sp.*、ミドリアオリガイ、アコヤガイ類)で大きく異なり、種内でも変異が見られた。また、アコヤガイ類では、産地数や同産地の個体数が増えるにつれ種内変異も増加する傾向にあり、種内変異の多くが各個体ゲノム中におけるコピー間の変異でもあった。これらから、アコヤガイ類の ITS 領域の多様性は産地間だけでなく、同じ産地の個体間でも大きいと考えられた。

rRNA 遺伝子の IGS 領域では、「アコヤガイとベニコチョウガイ」、*P. radiata*、メキシコアコヤガイ間で塩基配列が異なった。

ITS および IGS 領域では、アコヤガイとベニコチョウガイで共通にみられる個体変異が最も多いため、過去に大きな遺伝子流動があった可能性がある。*P. radiata* もベニコチョウガイとある程度大きな遺伝子流動があったが、メキシコアコヤガイとベニコチョウガイの遺伝子流動は小さかったと考えられる。また、本領域の塩基配列を用いてアコヤガイ属の類縁関係を推定したところ、rRNA 遺伝子領域を用いた系統解析結果を支持した。

本研究で得られた結果とアロザイム、染色体、生殖特性、分布域、殻形態、生活史等の知見をあわせ、アコヤガイ属の分類と系統および適応放散過程を考察した。アコヤガイはベニコチョウガイの在来種(地方種)の可能性があり、西太平洋における南北方向の地理的距離に対する遺伝的分化が極めて小さいため、この地域で遺伝子流動があると推測された。アコヤガイ類やモスソアコヤガイとムラサキチョウガイの分類は、遺伝、生理、繁殖特性等を詳細に調査した上で、再考する必要がある。

アコヤガイ属は祖先種が東南アジア周辺海域の熱帯域で発生し、低水温耐性を獲得しながら種分化を続け、浮遊幼生が暖流にのり分布域を拡大するが、寒流により分布域の拡大が制限されると考えられる。

アコヤガイ類は、東南アジア周辺海域で派生し、南赤道海流によってインド洋を渡りアフリカ東海岸に分布域を拡大した。そして、アフリカ東海岸を北上する海流にの

り分布域を西アジアへ拡大した。その後遺伝子流動がなくなり、インド洋西部や紅海に分布する *P. radiata* へ分化したと考えられる。また、一部のアコヤガイ類は南下する南赤道海流にのりアフリカ南端から、大西洋を渡りブラジルからアメリカ合衆国南東部まで分布域を拡大した。その後遺伝子流動がなくなり、大西洋に分布するメキシコアコヤガイへ分化したと考えられる。

次に、ITS 領域の塩基配列を利用し、アコヤガイ属の 5 種／グループ(1. シロチョウガイ, 2. クロチョウガイ, 3. モスソアコヤガイとムラサキチョウガイ, 4. ミドリアオリガイ, 5. アコヤガイ類)を判別できる PCR による種判別手法を開発した。この種判別の結果と ITS 領域の塩基配列の比較から、奄美大島近海産のベニコチョウガイとミドリアオリガイの天然雑種を検出した。本雑種は殻形態が非常に類似するためベニコチョウガイからの判別は困難だが、成長はこれよりも遅かった。また、IGS および 16S rRNA 遺伝子部分領域を利用した「アコヤガイとベニコチョウガイ」、*P. radiata*, メキシコアコヤガイをそれぞれ判別できる PCR と PCR-RFLP による判別手法を開発した。さらに、TC 反復配列を利用した ISSR で、アコヤガイにみられず、日本南西諸島以南のベニコチョウガイに高頻度にみられた増幅 DNA 断片が 1 個得られた。これらは、稚貝や幼生の資源量の推定や生態調査、交雑の確認、種苗生産管理に利用できる。

ISSR により得られた増幅 DNA 断片の塩基配列情報をもとに、個体間で多型性を示す STS 化した DNA マーカー 2 個と、DNA フィンガープリントが得られる DNA マーカー 1 個が得られた。これらは、アコヤガイの集団構造の把握や、天然集団と養殖集団の遺伝的変異性の解明、育種素材の探索、個体判別や親子判別による系統保存の管理等にも利用できる。

最後に、アコヤガイ類の遺伝資源の現状と管理、継代保存、交雑の問題点と解決方法について論じた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 井 克 俊

副 査 教 授 阿 部 周 一

副 査 教 授 都 木 靖 彰

学 位 論 文 題 名

分子遺伝学的手法によるアコヤガイ属貝類の系統と 種判別に関する研究

アコヤガイ属は太平洋，インド洋，大西洋の暖かく浅い海に分布し，各国で真珠養殖に利用される。本属は未だに分類が統一されていないため，本属の遺伝的類縁関係の把握は，真珠養殖への利用上，遺伝資源の探索や育種学的観点から重要と考えられる。また，本属貝類は同所的に生息するため，採苗数や資源量を推定するには，他の本属貝類から目的の種を判別する必要がある。さらに，近年，西日本の養殖アコヤガイでは疾病による大量斃死が頻発しているため，これに対する抗病性を期待して養殖業者が国外から本属貝類を輸入し，真珠養殖用の種苗生産に利用している。しかし，移植や交雑は純粋な国産アコヤガイの遺伝資源の喪失を招く恐れがあるため，交雑を監視して遺伝資源を適正に管理するには，種判別手法の開発が必要である。

そこで，DNAの塩基配列多型を用いた解析をアコヤガイ属に導入し，類縁関係の推定や種判別手法の開発等を行った。得られた成果は以下の通りである。

- 1) アコヤガイ属貝類は体内外にムコ多糖類を多量に含み，通常のDNA抽出法ではこれを除去できないため，ヒドロキシアパタイトを利用した多検体が扱えるDNA精製法を開発した。
- 2) ミトコンドリアDNAの16S，核18Sと28S rRNA遺伝子領域の塩基配列を用いた系統解析から，「アコヤガイとベニコチョウガイ」，「モスソアコヤガイとムラサキチョウガイ」は遺伝的に分化していないと推測された。また，「アコヤガイとベニコチョウガイ」に最も遺伝的に近いのは，*P. radiata*，メキシコアコヤガイで，次にミドリアオリガイ，そして「モスソアコヤガイとムラサキチョウガイ」，*Pinctada* sp. と続き，クロチョウガイ，シロチョウガイが最も遠いと推測された。
- 3) rRNAの系統解析結果と，各rRNA遺伝子のITSおよびIGSの塩基配列比較，アロザイム，

染色体、生殖特性、分布域、殻形態、生活史等の知見をあわせ、アコヤガイ属の系統と適応放散過程を考察した。アコヤガイ属は、祖先種からシロチョウガイが最初に派生し、「モスソアコヤガイとムラサキチョウガイ」、*Pinctada* sp., 次に、ミドリアオリガイ、最後にアコヤガイ類(メキシコアコヤガイ, *P. radiata*, ベニコチョウガイ, アコヤガイ)の順で派生し、クロチョウガイは別途シロチョウガイから派生したと推測された。アコヤガイ属は祖先種が東南アジア周辺海域の熱帯域で発生し、低水温耐性を獲得しながら種分化を続け、浮遊幼生が暖流にのり分布域を拡大するが、寒流により分布域の拡大が制限されると考えられた。また、アコヤガイ類は、上記海域で派生してインド洋を渡りアフリカ東海岸に分布域を拡大した。そして、分布域を西アジアや、アフリカ南端から南北アメリカ大西洋岸へと拡大した。その後遺伝子流動がなくなり、インド洋西部や紅海に分布する*P. radiata*と、大西洋に分布するメキシコアコヤガイへ分化したと考えられた。

- 4) ITS領域の塩基配列を利用し、アコヤガイ属の5種/グループ(1. シロチョウガイ, 2. クロチョウガイ, 3. モスソアコヤガイとムラサキチョウガイ, 4. ミドリアオリガイ, 5. アコヤガイ類)を判別できるPCRによる種判別手法を開発した。この種判別の結果とITS領域の塩基配列の比較から、奄美大島近海産のベニコチョウガイとミドリアオリガイの天然雑種を検出した。また、IGSおよび16S rRNA遺伝子部分領域を利用した「アコヤガイとベニコチョウガイ」、*P. radiata*, メキシコアコヤガイをそれぞれ判別できるPCRとPCR-RFLPによる判別手法を開発した。さらに、ISSRで、アコヤガイにみられず、日本南西諸島以南のベニコチョウガイに高頻度にみられた増幅DNA断片を1個得た。
- 5) ISSRにより得られた増幅DNA断片の塩基配列情報をもとに、個体間で多型性を示すSTS化したDNAマーカー2個と、DNAフィンガープリントが得られるDNAマーカー1個を開発した。
- 6) アコヤガイ類の遺伝資源の現状と管理、継代保存、交雑の問題点と解決方法について考察した。

申請者による以上の成果は、アコヤガイ属の系統、分類、遺伝資源研究等の基礎生物学に資するのみならず、種苗生産管理、稚貝や幼生の資源量推定、生態調査、交雑の確認に利用できることから、今後の真珠養殖の発展に貢献するものであり、審査員一同は、本論文が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。