博 士 学 位 論 文 審 査 要 旨

学位申請者氏名	荒井　靖志
論　文　題　目	日本産サケ科魚類イワナ *Salvelinus leucomaenis* におけるミトコンドリア DNA 全周塩基配列の比較による分子系統学的研究
審査委員（職名・氏名・印）	
主　　査	教　授　　久富　寿
審査委員	教　授　　戸谷　希一郎
	教　授　　鈴木　誠一
	教　授　　佐々木　剛（東京海洋大学）
論文審査結果（合　否）	合　　格

論文審査の要旨

本論文は５章で構成されており，日本産サケ科魚類イワナ（*S.leucomaenis*）由来のミトコンドリア DNA の全周塩基配列を決定し，その塩基配列の解析を通じて *S.leucomaenis* の進化の過程を推測したものになっている。第１章は *S.leucomaenis* の紹介を実施している。*S.leucomaenis* の現状での分布(本州から北海道，千島列島，サハリン島，朝鮮半島北東部からカムチャツカ半島)や生活環境を紹介し，各地域の *S.leucomaenis* の分子系統的分岐年代と歴史的気候変動との比較の必要性を論じている。日本に分布する *S.leucomaenis* は４つの型に分類され，アメマス(*S.l.leucomaenis*)，ニッコウイワナ(*S.l.pluvius*)，ヤマトイワナ(*S.l.japonicus*)，ゴギ(*S.l.imbrius*)と呼ばれている。これに加えてナガレモンイワナと呼ばれる体側面に暗色の大理石模様を持つものも観察されている。これらイワナの特徴や分布を調査し，現在の解析では至らない問題点を挙げ，本論文の目的とその解決方法を提示している。その過程として，*S.leucomaenis* のミトコンドリア DNA の塩基配列を用いた分子系統樹の作製が必要と判断している。ミトコンドリア DNA の塩基配列を用いた分子系統樹は古くはヒトの起源をアフリカに推定した際にも使用されている。また，核 DNA よりも置換速度が速く，母系遺伝のため，進化の過程を調査する場合に適切な調査対象と判断している。

第２章では *S.leucomaenis* のミトコンドリア DNA の塩基配列決定法について述べている。これまでの *S.leucomaenis* のミトコンドリア DNA の塩基配列決定法ではミトコンドリア DNA の一部の配列しか解析対象としていなかった。申請者はミトコンドリア DNA の全周（約 16500 bp）の塩基配列決定を目標とし，Long-PCR 法にて４分割したミトコンドリア DNA 由来の増幅産物を得ている。10000 bp を越える長鎖の DNA の塩基配列決定には次世代シークエンスを使用する場合があるが，信憑性に問題が残ることから direct Sequence 法を採用している。また，Long-PCR 法を用いることで使用する DNA 量の節約や増幅した PCR 産物の取り違いによるミスなどを極力減らしている。これらの解析方法の工夫により，*S.leucomaenis* の４つの型である *S.l.leucomaenis*，*S.l.pluvius*，*S.l.japonicus*，*S.l.imbrius* におけるミトコンドリア DNA の全周の塩基配列を決定している。申請者はこれら塩基配列をアメリカ国立生物工学情報センター（NCBI）の DNA データベースへ登録している。登録した塩基配列の解析から，*S.leucomaenis* の４つの型のミトコンドリア DNA の全周塩基

論文審査の要旨（続）

配列がいずれも 16655 bp であり, 構成遺伝子（CDS, tRNA, rRNA）も同じと判明した。*S.leucomaenis* の４つの型のミトコンドリア DNA の全周塩基配列決定は世界で初めてである。ミトコンドリア DNA 上には Cytochrome b, NADH dehydrogenase subunit (ND)6, ND5, ND4, ND4L, ND3, Cytochrome c oxidase subunit (COX)3, ATP synthase membrane subunit (ATP)6, ATP8, COX2, COX1, ND2, ND1 の遺伝子 13 個がコードされ, それら遺伝子の間に 16S rRNA, 12S rRNA, さらに 22 個の tRNA がコードされていた。ミトコンドリア DNA の全周塩基配列の解析により, *S.leucomaenis* のミトコンドリア DNA にはヒトのミトコンドリア DNA (16569 bp)と同様の遺伝子が同様の順序でコードされていることが証明された。

第３章では *S. leucomaenis* のミトコンドリア DNA 全周塩基配列の比較から分岐年代推定を通し，氷期，間氷期の歴史的な気候変動や地質学的変動との関係を明らかにしている。第２章で構築したミトコンドリア DNA 全周塩基配列決定法により，35 個体の *S.leucomaenis* からミトコンドリア DNA を抽出し，全周塩基配列を決定している。35 個体は北海道で 8 河川，本州日本海側流入河川で 11 河川，本州太平洋側流入河川で 14 河川の計 33 河川に及んでいる。35 個体の中には幻のイワナとも称されるナガレモンイワナも含まれている。各地の水産試験場や漁業組合にも協力を依頼し，放流による交雑種を採取しないように河川を選定している点はデータの信憑性の確保において評価に値する。*S.leucomaenis* の生息域が登山道もない山奥であるため，これら 35 個体の収集には 10 年ほどを要している。また，35 個体の塩基配列の決定には 1000 本を超える direct sequence が必要であり，長年にわたり地道な解析を実施している。35 個体のミトコンドリア DNA の全周塩基配列を決定し，分子系統樹を作製したところ，河川別に分子系統樹の分岐が確認された。同じ河川で採取された *S.leucomaenis* ではミトコンドリア DNA の全周塩基配列は完全一致していないものの，分子系統樹上では同じ集団に分類されている。このことはミトコンドリア DNA の全周塩基配列による分子系統樹の信憑性を示すものであり，データとしての価値の高さをうかがわせる。35 個体のうち 32 個体で全周塩基配列数が 16655 bp であり，2 個体が 16654 bp であった。ナガレモンイワナでは 16653 bp と 2 塩基短く，体側面の模様の差異だけではない遺伝的差異の蓄積が想像された。ミトコンドリア DNA における遺伝子の欠失はすべて D-Loop 領域に存在していることも明らかにしている。

ロシアに生息するオショロコマを含むサケ科魚類のミトコンドリア DNA の全周の塩基配列を NCBI のデータベースから獲得し，*S.leucomaenis* の４つの型のミトコンドリア DNA の全周の塩基配列と比較した結果，*S.leucomaenis* は約 470 万年前に分岐したイワナ属内では古い系統の末裔であることが明らかとなった。また，日本における *S.leucomaenis* は２つに大別され，４つの型と比較して河川ごとの塩基配列の特徴（分類）が顕著となっていた。このことは *S.leucomaenis* の遺伝的分化の過程を証明した初めての知見であり，極めて貴重な発見である。

また，日本の *S.leucomaenis* の遺伝的分化と氷河期間氷河期との関係についても考察している。移動拡散していた個体が，高水温化の進行する間氷期に生理的適水温となる河川上流域に遡上し，その後の隔離によって他の地域との遺伝種流動が低くなることが推測された。陸上生物における氷河期間氷河期と分化の関係の報告はあるものの，水生動物において氷河期間氷河期と分化の関係を示唆するデータはこれまで皆無であったことから，本論文の新規性が示された。また，サケ科魚類の塩基置換率の推定値は 0.75～1.6%と幅があったが， *S.leucomaenis* の分化と氷期間氷期の経過期間を比較すると *S.leucomaenis* においては塩基置換率の推定値は 1.0%と推測された。これら解析結果は

論文審査の要旨（続）

日本全国における *S.leucomaenis* の分布河川を網羅した 35 個体のミトコンドリア DNA の全周塩基配列を決定したからこそ解明されたことであり，河川の選別や個体の採取，さらには塩基配列決定から分子系統樹の作製まで極めて多大な知恵と労力の結晶として評価されるものである。

第 4 章として *S.leucomaenis* の核遺伝子配列の一例として肝細胞増殖因子(*HGF*) mRNA 配列の塩基配列決定を決定し，サケ科各種の塩基配列の比較を行い，分子系統樹を作製している。分子系統樹の評価においてはミトコンドリア DNA の使用に対して核遺伝子の使用を推奨する意見もあるため，核遺伝子での分子系統樹作製を試みている。 *S.leucomaenis* の場合，核遺伝子が同定されていないため，近縁種で同定が進んでいる *HGF* mRNA の塩基配列同定を実施している。河川で採取した個体からは新鮮な mRNA を採取するのが困難なため，養殖魚を用いて未知の塩基配列であった *HGF* mRNA の塩基配列を決定している。決定した *HGF* mRNA の塩基配列として 2798 塩基が得られ，そのうち 2142 塩基が coding region であった。*HGF* mRNA からは 713 アミノ酸が翻訳されると推測された。翻訳されたタンパク質には PAN/Apple 様ドメイン，4 つのクリングルドメイン，およびトリプシン様セリンプロテアーゼドメインの存在が予測された。申請者は得られた塩基配列を NCBI の DNA データベースへ登録している。*S.leucomaenis* と他のサケ科魚類の *HGF* mRNA の塩基配列を比較したところ，塩基配列の多型が少なく分子系統樹解析には向いていないことが判明した。このことは核遺伝子配列では同じ種の中での分化について論ずる危険性があることを示したデータであり，核遺伝子配列で遺伝的分化を追うにはさらに長い配列が必要であると判断された。同様にミトコンドリア DNA の全周塩基配列による分子系統樹と比較したところ， *S.leucomaenis* の場合，分岐年代と氷期間氷期周期との関係の明確化において，核遺伝子の塩基配列よりもミトコンドリア DNA 全周塩基配列の有用性が判明した。

第 5 章は総論として全体をまとめている。本論文により *S.leucomaenis* の分子系統的分岐年代と歴史的気候変動との比較の成果とその信憑性を説き， *S.leucomaenis* が進化の過程で間氷期に 70%ほどが分化していると結論付けている。また，調査するミトコンドリア DNA の塩基配列を従来の約 30 倍に伸長したことにより，*S.leucomaenis* の進化モデルを構築できたことは，分子進化学の妥当性を立証すると共に，生物進化の解析に適用する方法論を確立した重要な成果であると結論された。さらに，間氷期における *S.leucomaenis* の分化が明らかになったことから，本研究の成果が他地域のサケ科魚類も含め，水温差による地域適応と分布の要因についての研究の可能性を広げる知見として極めて重要と考えられた。水産資源における分化の過程を氷期間氷期の時期と比較して評価したものはこれまでには存在せず，本論文の独自性を示すものである。引用論文数は約 350 報にも及び，159 ページにわたる壮大な研究成果である。

以上を要するに，本論文では *S.leucomaenis* のミトコンドリア DNA の全周塩基配列から分子系統樹を通して，遺伝的分化の過程を総合的に考察しており，理工学的価値は極めて高いと判断する。したがって，本審査委員会は本論文を博士（理工学）の学位に値するものと認める。なお，これらの成果は申請者が筆頭著者となる 4 編の学術論文としてまとめられ，1 報が日本語論文，3 報が英文学術雑誌に掲載されている。また，1 報の英文学術雑誌での共著者でもある。さらに，本論文の一部が 2020 年日本 DNA 多型学会に発表され，優秀研究賞を受賞したことを付記する。

（以　上）