

助成年度：平成2年度

[所属] 琉球大学 理学部

[役職] 助手

[氏名] 西田 睦

[課題]

サンゴ礁海域におけるオニヒトデの集団構造

～DNA塩基配列分析によるアプローチ～

[内容]

1. はじめに

サンゴ礁生態系を壊滅的破壊に追いやるオニヒトデ *Acanthaster planci* (Linnaeus) の異常増殖の解明や防除法の検討のためには、浮遊幼生の分散による遺伝的交流を考慮に入れて、集団の実態を動的に探究することが必要である。しかし、小さな浮遊幼生に標識を付けて追跡するわけにもいかず、従来こうした研究には大きな困難があった。そこで浮び上がってくるのが、遺伝子に刻まれた情報を手がかりにしようという分子集団遺伝学的アプローチである。

先に、筆者らはタンパク質レベルの遺伝学的分析によって太平洋各地のオニヒトデの比較を行い、このアプローチがたいへん有効であることを明らかにした (Nishida and Lucas, 1988)。集団の構造とその変動をより詳細に把握するためには、その有効性が確認された分子集団遺伝学的分析を、その遺伝的解析のレベルをより精密にしつつ継続することが強く求められる。

幸い遺伝子分析手法は急速に進歩しつつあり、多数の個体の分析が必要な集団研究にも、DNAレベルの分析手法を適用できる可能性が開けてきた。遺伝的解析が究極の遺伝情報とも言えるDNA塩基配列のレベルにまで及べば、集団の遺伝的組成解明の精度を飛躍的に高めることができると考えられる。本研究は、今後のより緻密な集団分析およびモニタリングの基礎を確立するため、最新の手法を活用してDNA塩基配列レベルでオニヒトデの遺伝的変異の解析を試みようとしたものである。

2. 研究方法

本研究では、近年、新しく開発されたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を活用して、ミトコンドリアDNA (mtDNA) の塩基配列分析を試みた。PCR法は、DNAが自己複製分子であることを利用することにより、試料中に含まれるDNAの特定の部分のみをネズミ算式に増幅するもので、数時間後には塩基配列決定を行うのに十分な量のDNAが確保できるという、たいへん効率のよい画期的な手法である (Saikiら, 1985; Kocherら, 1989)。

また、本研究で分析の対象としたmtDNAは、核DNAに比べて進化スピードが速く、卵子の細胞質を通じてのみ子孫に伝わり遺伝子の組み換えがない、などのため、母系系列を分子的に追跡することができ、種内集団の遺伝的構造を解析するのに最適と考えられる分子である (Wilsonら, 1985)。

分析に用いた標本は、北西太平洋を代表するものとして沖縄島瀬底より得た2個体、南西太平洋よりオーストラリア・グレートバリアリーフの2個体、および西太平洋よりカリフォルニア湾の2個体、合計6個体で、比較のために、オニヒトデの唯一の同属種である *Acanthaster brevispinus* の1個体も使用した。

DNA試料は凍結保存した肝盲嚢組織より抽出・調整した。PCRに必要なプライマーは、一部のヒトデ類およびウニ類で公表されている遺伝情報を参考にして設計した。PCR産物より1本鎖DNAを調整し、それを用いて直接シーケンシング (塩基配列決定) を行った。

3. 研究結果

本研究は種内の分析を目的としているので、DNA 増幅の目標は、変異の大きい mtDNA の中でもとくに変異性に富み進化の速いと考えられるコントロール領域、ならびに ND4~ND5 遺伝子部位に設定した。コントロール領域については、本研究期間の最終段階近くになるまで増幅産物が得られなかったが、ND4~ND5 遺伝子部位からは、成功裏に PCR 産物を得ることができた。

この増幅産物より 1 本鎖 DNA を調整し、直接シーケンスを試みたところ、十分満足のできる結果が得られた。このことは、いわゆるユニバーサルプライマーを用いた PCR 法と直接シーケンス法を活用することによって、比較的容易に、オニヒトデから質のよい DNA 塩基配列データが入手できることを明瞭に示している。

太平洋3地域の6個体のそれぞれについて得られた ND4~ND5 遺伝子部位 715 塩基の配列を比較したところ、22 か所に何らかの塩基置換が認められた。沖縄およびオーストラリアの個体は相互によく似ていること（塩基置換率 0.3~0.7%）、オニヒトデと *A. brevispinus* との間にはかなりの差異（約 20%）が存在し、数百万年前に分化したと見られることなどの結果は、先の研究の結論をより詳細に裏付けるものである。一方、カリフォルニア湾の個体は、相互にかなりの差異（1.7%）を有することが明らかになった。この事実は、オニヒトデの起源と分布拡大ルートに関して、これまで考えられていなかった全く新しい視点を示唆するものである。

4. 結論

以上の結果は、mtDNA 塩基配列データが集団の遺伝子組成の詳細な分析とモニタリングに著しく有効なたいへん感度のよいものであること、それは PCR 法と直接シーケンス法によって容易に入手できるようになったこと、を明瞭に示している。今後、ここで得た知見を基礎にして、太平洋各地の集団の遺伝的組成とその変動を詳細に明らかにするという、より本格的な研究を展開する予定である。本研究は、オニヒトデの集団・防除研究に DNA 分析による新しい飛躍的な展開をもたらすための基礎を、確実に築き得たと断言してよからう。