

学 位 論 文 要 旨

氏 名	ア Nilバン チャクラボルテイ
題 目	タチウオ科魚類の形態および遺伝学的研究—タチウオ属魚類 (<i>Trichiurus</i>) — (MORPHOLOGICAL AND GENETIC STUDIES OF TRICHIURID FISHES (PERCIFORMES: TRICHIURIDAE) WITH AN EMPHASIS ON THE GENUS <i>TRICHIURUS</i>)

全海洋域に広く分布するタチウオ科魚類は、水産上重要種を多く含み、特に資源量の多いタチウオ属について重きをおいて形態と遺伝学的手法から、本科の分類学的再検討を行った。タチウオ属の研究は、体色が一様に銀白色で形態変異が小さいため世界に1種 *Trichiurus lepturus* のみとされてきた。また近年の詳細な形態学的研究から識別が可能な種が複数存在することが判明していたが、それらの遺伝学的な種の裏付けは出来ていなかった。そのため国際間の漁業交渉でも統一見解がないことから、本科魚類の分類は混乱していた。そこで保存の仕方が異なるが多くの標本を所蔵する博物館の標本からのDNAの抽出が可能なら、世界的規模の遺伝学的研究が容易になるので、固定法の違いと固定の経過と期間の異なる標本から、既知の5つの手法と市販のDNA抽出キットを用いて比較を行い、mtDNAの抽出、遺伝子の増幅およびシーケンスを行った。一週間程度ホルマリン固定されたものを除き、ホルマリン固定標本は殆ど抽出できなかったが、生・冷凍および数年程度経た70%エタノール固定標本からは抽出が可能であった。

近年の形態による分類学的再検討から、大型タチウオ類似種群において *Trichiurus lepturus*, *T. japonicus*, *T. nitens* および4未同定種(*Trichiurus* sp. 1, *Trichiurus* sp. 2, *Trichiurus* sp. 3 と *Trichiurus* sp. 4)が有効種であると報告された。本研究では資源量の多い *T. lepturus*, *T. japonicus*, *Trichiurus* sp. 2 と *Trichiurus* sp. 4 について遺伝解析を行った。東太平洋の *Trichiurus nitens* は解析出来なかった。その結果、西部大西洋の *T. lepturus*, 東アジアの *T. japonicus*, インド・西部太平洋の *Trichiurus* sp. 2 と西アフリカの *Trichiurus* sp. 4 はそれぞれ別種であることを明確にした。系統解析においてこれら4種の単系統性と共に16S rRNA 遺伝子領域のシーケンス多様度の大きさから、4種が明らかに別種であることを示唆した。さらにRFLP解析では、*EcoRI*, *VspI*, *HinfI*, *BseNI* 等の制限酵素を用いて容易に4種を識別することができた。

形態学的研究により、小型タチウオ類似種群 *T. russelli* complex に属するオーストラリア北東部の *Trichiurus australis* と、日本の琉球列島から2 mを越える本科魚類 *Evoxymetopon macrophthalmus* の新種記載を行った。また東南アジアに多く生息し、金色に輝くタチウオは有効種であり、学名はトゲタチウオ属 *Lepturacanthus roelandti* であることを明確にして再記載も行った。以上のことから水産上重要な大型タチウオ類似種群は、世界に1種ではなく、遺伝学的結果からも複数種存在することが明らかとなった。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	ANIRBAN CHAKRABORTY
題 目	MORPHOLOGICAL AND GENETIC STUDIES OF TRICHIURID FISHES (PERCIFORMES: TRICHIURIDAE) WITH AN EMPHASIS ON THE GENUS <i>TRICHIURUS</i> (タチウオ科魚類の形態および遺伝学的研究—タチウオ属魚類 (<i>Trichiurus</i>) —)

A taxonomic study using the morphometric and genetic analyses was undertaken for the trichiurid fishes with an emphasis on the genus *Trichiurus*. The genetic studies were mainly focused on the genus *Trichiurus* aimed at determining the taxonomic validity of the morphologically distinguishable and controversial species within this genus. The morphological studies were aimed at reviewing the smaller species group called “*T. russelli* complex” and two more genus: *Lepturacanthus* and *Evoxymetopon* within the family Trichiuridae. The present study involved examination of type specimens, a large number of non-type specimens including analysis of fresh specimens or tissues from wide geographical ranges.

Prior to genetic studies, a comparative analysis of museum specimens representing wide range of preservation histories and different method of preservation was done using five published protocols and a commercial DNA extraction kit in order to standardize the type of preserved material to be used for further genetic studies. The results show that mtDNA extraction, amplification and sequencing of conserved genes could be obtained successfully from frozen and ethanol fixed specimens but not from any of the formalin fixed specimens. This study proved that formalin fixation is indeed not advisable if genetic studies are to be conducted on such museum specimens.

In the most recent and extensive review for the family Trichiuridae, the “*Trichiurus lepturus* complex” was identified to be comprised of *Trichiurus lepturus*, *T. japonicus*, *T. nitens* and four undescribed species (*Trichiurus* sp. 1, *Trichiurus* sp. 2, *Trichiurus* sp. 3 and *Trichiurus* sp. 4). During this study, the genetic analysis was done for *T. lepturus*, *T. japonicus*, *Trichiurus* sp. 2 and *Trichiurus* sp. 4. Due to unavailability of fresh, frozen or ethanol fixed specimens, genetic analysis for *T. nitens*, *Trichiurus* sp. 1 and *Trichiurus* sp. 3 could not be done. The results obtained in this study clearly validate the status of *T. lepturus*, *T. japonicus*, *Trichiurus* sp. 2 and *Trichiurus* sp. 4 as separate species. The high amount of sequence divergence at the 16S rRNA gene coupled with monophyly of these species in the phylogenetic analysis proved that they are indeed separate species. Furthermore, RFLP analysis could very easily distinguish these species using various restriction enzymes like *EcoRI*, *VspI*, *HinfI* and *BseNI*. The morphological studies led to the description of *Trichiurus australis* from the North eastern coast of Australia belonged to the “*T. russelli* complex” and *Evoxymetopon macrophthalmus* from the Okinawa Islands of Japan. The present study also redescribed a valid species *Lepturacanthus roelandti* from Singapore belonging to the genus *Lepturacanthus*.

In conclusion, my results were able to support that each congener of the “*Trichiurus lepturus* complex” (except for a few species, which were practically difficult to sample) was genetically valid species: *T. lepturus*, *T. japonicus*, *Trichiurus* sp. 2 and *Trichiurus* sp. 4 but not a single species (*T. lepturus*) as reviewed by Nakamura and Parin (1993). Furthermore, I strongly emphasize that in order to ascertain correct taxonomic classification three factors are essentially needed: correct and careful morphological examination, worldwide review and/or appropriate corroboratory genetic study.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	Anirban Chakraborty アニルバン チャクラボルテイ
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 岩 槻 幸 雄
	副査 宮崎 大学 教授 前 田 昌 調
	副査 鹿児島 大学 教授 川 村 軍 蔵
	副査 鹿児島 大学 教授 鈴 木 廣 志
	副査 宮崎 大学 助教授 荒 西 太 士
審査協力者	
題 目	MORPHOLOGICAL AND GENETIC STUDIES OF TRICHIURID FISHES (PERCIFORMES: TRICHIURIDAE) WITH AN EMPHASIS ON THE GENUS <i>TRICHIURUS</i> (タチウオ科魚類の形態および遺伝学的研究—タチウオ属魚類 (<i>Trichiurus</i>)—)
<p>全海洋域に広く分布するタチウオ科魚類は、水産上重要種を多く含み、特に資源量の多いタチウオ属について重きをおいて形態と遺伝学的手法から、本科の分類学的再検討を行った。タチウオ属の研究は、体色が一様に銀白色で形態変異が小さいため世界に 1 種 <i>Trichiurus lepturus</i> のみとされてきた。また近年の詳細な形態学的研究から識別が可能な種が複数存在することが判明していたが、それらの遺伝学的な種の裏付けは出来ていなかった。そのため国際間の漁業交渉でも統一見解がないことから、本科魚類の分類は混乱していた。そこで保存の仕方が異なるが多くの標本を所蔵する博物館の標本からの DNA の抽出が可能なら、世界的規模の遺伝学的研究が容易になるので、固定法の違いと固定の経過と期間の異なる標本から、既知の 5 つの手法と市販の DNA 抽出キットを用いて比較を行い、mtDNA の抽出、遺伝子の増幅およびシークエンスを行った。一週間程度ホルマリン固定されたものを除き、ホルマリン固定標本は殆ど抽出できなかったが、生・冷</p>	

凍および数年程度経た 70%エタノール固定標本からは抽出が可能であった。近年の形態による分類学的再検討から、大型タチウオ類似種群において *Trichiurus lepturus*, *T. japonicus*, *T. nitens* および 4 未同定種(*Trichiurus* sp. 1, *Trichiurus* sp. 2, *Trichiurus* sp. 3 と *Trichiurus* sp. 4)が有効種であると報告された。本研究では資源量の多い *T. lepturus*, *T. japonicus*, *Trichiurus* sp. 2 と *Trichiurus* sp. 4 について遺伝解析を行った。東太平洋の *Trichiurus nitens* は解析出来なかった。その結果、西部大西洋の *T. lepturus*, 東アジアの *T. japonicus*, インド・西部太平洋の *Trichiurus* sp. 2 と西アフリカの *Trichiurus* sp. 4 はそれぞれ別種であることを明確にした。系統解析においてこれら 4 種の単系統性と共に 16S rRNA 遺伝子領域のシーケンス多様度の大きさから、4 種が明らかに別種であることを示唆した。さらに RFLP 解析では、*EcoRI*, *VspI*, *HinfI*, *BseNI* 等の制限酵素を用いて容易に 4 種を識別することができた。

形態学的研究により、小型タチウオ類似種群 *T. russelli* complex に属するオーストラリア北東部の *Trichiurus australis* と、日本の琉球列島から 2 m を越える本科魚類 *Evoxymetopon macrophthalmus* の新種記載を行った。また東南アジアに多く生息し、金色に輝くタチウオは有効種であり、学名はトゲタチウオ属 *Lepturacanthus roelandti* であることを明確にして再記載も行った。以上のことから水産上重要な大型タチウオ類似種群は、世界に 1 種ではなく、遺伝学的結果からも複数種存在することが明らかとなった。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Anirban Chakraborty アニルバン チャクラボルティ
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 岩 槻 幸 雄
	副査 宮崎 大学 教授 前 田 昌 調
	副査 鹿児島 大学 教授 川 村 軍 蔵
	副査 鹿児島 大学 教授 鈴 木 廣 志
	副査 宮崎 大学 助教授 荒 西 太 士
審査協力者	
実施年月日	平成 17 年 12 月 27 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査および副査の5名は、平成17年12月27日の公開審査会において、学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	Anirban Chakraborty アニルバン チャクラボルティ
<p>[質問 1] 鈴木廣志→日本近海のみ生息する日本のタチウオ <i>Trichiurus japonicus</i> とインド・西部太平洋のテンジクダチ <i>T. lepturus</i> は、分布域が重なるが、前者はなぜ西部大西洋のテンジクダチ <i>T. lepturus</i> に遺伝的に近いのか？</p> <p>[回答 1] インド・西部太平洋のテンジクダチ <i>T. lepturus</i> は後から進化してきたもので、タチウオ <i>T. japonicus</i> は、現在の世界の大陸移動のある前の同じテーチス海を起源とする西部大西洋の <i>T. lepturus</i> と共通祖先を持つと考えられる。その理由としては、両者の形態からも類似する特徴が多いことから判断できると思われる。</p> <p>[質問 2] 前田昌調→これまでの形態的分類研究を、遺伝情報を含めた分類学的研究で再検討する場合における困難性は、どのように克服出来るのか？</p> <p>[回答 2] 世界的な規模での研究をしないと、最終結論が得られないので、何より国際間の研究者のネットワークが大事と考える。特に生サンプルを必要とする遺伝学的な研究ではなおさらと考えます。</p> <p>[質問 3] 荒西太士→博物館標本は、DNAのダメージを受けているが、短いフラグメントでも類縁を示唆するマーカが得られないか？</p> <p>[回答 3] 可能性はあるが、短いフラグメントになると、可能性は低くなり、長いフラグメントの方が、より違いがでる可能性が高いと考えます。</p> <p>[質問 4] 鈴木廣志→形態種と遺伝種との不一致をどのように考えるか？</p> <p>[回答 4] それは3点ある。多くの場合、注意深い正確で十分な観察がなされない場合に不一致が起こりやすく、誤りを犯しやすい。またその種の分布範囲が広い場合、局所的な範囲から得られた標本に基づく結果からも不一致や、誤りを起こしやすい。その上で不一致があることも事実である。これは形態的進化と遺伝的進化は相関することが多いが、相関しないことも希に起こるからだと考えられる。</p> <p>その他、彼は短期間に世界的規模での標本入手・分析を行い、結果を出して学術雑誌に受理・公表まで出来たことに対して、お褒め言葉をいただいた。またサジェスションとして、Iなどの主語の多用を避けること、出身のインド母校の大学の先生の名前をすべて入れておく指示があった。</p> <p>以上のことから、回答は適切なものだったと考えられる。</p>	