

学位論文題名

Genetic studies on hatchery and wild populations of  
brown sole *Pleuronectes herzensteini* using  
microsatellite and mitochondrial DNA markers

(マイクロサテライトおよびミトコンドリアDNAマーカーを用いた  
マガレイ人工および野生集団の遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

遺伝的多様性は種あるいは集団が環境変化に適応するために重要であり、変異性の低下や近交によるホモ接合体の過剰は一般に適応度低下をもたらし、危険と考えられる。現在、沿岸資源の維持・増大の目的で多くの魚種で種苗放流がなされているが、野生集団由来の親魚から人工種苗を生産する場合、その変異性は親魚数に依存する。また、数世代にわたり維持されてきた親魚から生産する場合、近交による種苗の変異性の減退が懸念される。健全な種苗生産と放流事業を行うためには、親魚および人工種苗の遺伝的多様性をあらかじめ検討することが重要である。

マガレイは重要産業種であり、人工種苗生産技術が確立されたことから、2000年ごろより北海道内で種苗放流が試みられている。しかしながら、野生集団の変異性や集団構造に関する研究は見当たらず、自然産卵法による人工種苗生産への各親魚の貢献度に関する調査は無い。本研究では、マガレイ人工種苗の変異性および野生集団の構造を明らかにするため、マイクロサテライトおよびミトコンドリアDNAマーカーを開発し、それらを用いた人工種苗集団の親子鑑定、野生集団の分化と変異に関する遺伝学的研究を行った。あわせて、開発したマーカーのマガレイ以外の重要異体類での利用可能性を検討した。

本論文第 1 章で、研究の背景となる栽培漁業における遺伝的諸問題とその解決に向けた研究の目的を提示した後、第 2 章では、マイクロサテライトマーカーの開発を検討した。すなわち、制限酵素で消化した DNA 断片をクローニングし、マイクロサテライト領域を含む 40 クローンを得た。そして、これらの塩基配列を明らかにした後、マイクロサテライト領域を挟み込むように 14 セットの PCR 増幅用プライマー (*Phz1* - *Phz14*) を設計した。これら 14 座の内 8 座が多型性を示し、野生集団 ( $n=36$ ) におけるヘテロ接合体率の観察値 ( $H_o$ ) と期待値 ( $H_e$ ) は各々 0.611 - 0.833 と 0.647 - 0.968 であった。マイクロサテライト座の *Phz3*, *Phz8* および *Phz12* はハーディ - ワインベルグ平衡からずれており、*Phz2* と *Phz12* には連鎖不平衡が見られた。しかしながら、雌 1:雄 1 の交配より得た子孫について、マーカー型の分離を調べたところ、8 座の内 7 座がメンデルの法則に従って分離した。また、交配実験の結果 *Phz4* と *Phz8* にはヌルアレルが含まれることが判明した。

第 3 章では、第 2 章で開発したマーカーの内、特に多型的な 5 座 (*Phz2*, *Phz6*, *Phz7*, *Phz12*, *Phz14*) を選び、マガレイ親魚 (雌親 35 個体、雄親 26 個体) とこれら親魚より生産した種苗との間で親子鑑定を行った。産卵水槽中で、各親魚個体かどのくらいの率で次世代生産に貢献しているかは不明である。また親魚集団と人工種苗の間でいかなる変異性の変化が生じるかは興味深い。そこで、種苗を産卵時期によって前半 (EP)、中盤 (MP) および後半 (LP) の 3 グループに分けサンプリングを行い、自動シーケンサを用いたマイクロサテライト分析に供した。その結果、親魚集団では、マイクロサテライト座あたりの平均アレル数は 21.8、 $H_e$  は 0.813 であったのに対し、人工種苗では、座あたり平均アレル数は 11.6 (EP)、14.4 (MP)、6.4 (LP) となり、 $H_e$  は 0.796 (EP)、0.833 (MP)、0.681 (LP) となった。すなわち変異性は親魚より明らかに減退した。

親子鑑定の結果、いずれの産卵期グループにおいても一部の親魚が主に交配に関与することが判明した。EP グループの種苗は主に 8 尾の雌親と 6 尾の雄親

から生じていた。MP グループでは最も多くの親魚が産卵に関与し、13 尾の雌親と 10 尾の雄親が種苗生産に貢献した。一方、LP グループではわずか 3 尾の雌親と 2 尾の雄親のみが産卵に関与した。親子鑑定の成功率は EP では 92.2%、MP では 84.4%、そして LP では 100%であった。上述の結果と合わせ LP グループの様に限られた親魚数により生産された人工種苗では、遺伝的変異は特に大きく減退することが判明した。

第 4 章では、マガレイのミトコンドリア DNA の調節領域の前半約 484bp を用いて、日本および韓国沿岸地点より得た野生集団を分析した。mtDNA の遺伝的多様性は非常に高く、検出した 225 ハプロタイプの内 183 ハプロタイプが個体に特異的であった。変異が見られた位置は江陵 (カンヌン; GAN) では 52 サイト、えりも (ERI) と苫小牧 (TOK) では 60 および 71 サイト、鬼鹿 (ONI)、天塩 (TES)、苫前 (TOM)、余市 (YOI) では各々 57、67、64、56 サイトであった。結局 135 の塩基置換と 8 の insert/deletion (挿入/欠失) を含む 116 の変異サイトが見られた。これらの内 20 サイトではトランジションとトランスバージョンの両方が起きていた。挿入/欠失は配列 No.290 と 297 を除いて A - G トランジションサイトで起きやすかった。ハプロタイプ多様度 ( $h$ ) は 0.989 - 1.000 と非常に高く、ヌクレオチド多様度 ( $\pi$ ) も 0.015 - 0.022 と高かった。しかしながら各海域の標本間の遺伝的距離 ( $\Phi_{ST}$ ) は非常に低く (0.0002 - 0.0014)、AMOVA テストでは有意差は検出できなかった ( $P < 0.05$ )。また、 $F_{ST}$  も低く、有意差は認められなかった。以上の結果より、日本から韓国に分布するマガレイは遺伝的に一様であり、海域間の遺伝的分化は認められなかった。

第 5 章では、マガレイで開発した 8 マイクロサテライト座の PCR 増幅をマコガレイ (*Pleuronectes yokohamae*)、スナガレイ (*Pleuronectes punctatissimus*) そしてイシガレイ (*Platichthys bicoloratus*) の 3 種の異体類で試み、将来の遺伝的研究のツールとなりうるか否かを検討した。その結果、8 座の内 7 座がこれら近縁他種で増幅された。7 座の内 1 座では多型が見られなかったが、 相同なマイ

クロサテライト配列を含んでいた。増幅できた 7 座では 1 - 22 アレルを含む変異が認められた。マガレイのマイクロサテライト配列に対する相同性の平均はマコガレイで 93.9%、スナガレイで 91.2%、そしてイシガレイでは 93.7%であった。従ってマガレイで開発したマイクロサテライトマーカーはこれら 3 種のカレイ類の遺伝学的研究に有効と考えられた。

本研究の結果より、マイクロサテライトおよびミトコンドリア DNA マーカーがマガレイの遺伝学的研究に利用可能になり、前者による親子鑑定の結果、実際の人工種苗生産に関わる親魚数は少なく、その結果人工種苗の遺伝的変異性が減退することが判明した。またミトコンドリア DNA の解析結果からマガレイの集団構造は一様であり、海域間に大きな分化は認められなかったが、遺伝的変異性は高いことが判明した。また、開発したマーカーは、マガレイのみならず、近縁のマコガレイ、スナガレイ、イシガレイの遺伝学的分析にも利用しうることが明らかになった。本研究で得られた遺伝学的情報はマガレイおよび近縁種の健全な種苗生産と放流事業の基礎になるものと期待できる。

# 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 嵯 峨 直 恆

学 位 論 文 題 名

## Genetic studies on hatchery and wild populations of brown sole *Pleuronectes herzensteini* using microsatellite and mitochondrial DNA markers

(マイクロサテライトおよびミトコンドリアDNAマーカーを用いた  
マガレイ人工および野生集団の遺伝学的研究)

健全な種苗生産と放流事業のためには、親魚と人工種苗の遺伝的多様性を予め検討することが重要である。本研究では、マガレイについてマイクロサテライトおよびミトコンドリア DNA マーカーを開発し、それらを用いて種苗の親子鑑定、親魚との変異性の比較を行うとともに、野生集団の変異と分化、さらに近縁他種の遺伝学的研究への利用可能性について検討し、以下の評価すべき成果を得た。

1) 細胞核より抽出精製した DNA を制限酵素で消化して得た断片をクローニングし、マイクロサテライト領域を含む 40 クローンを得た。そして、これらの塩基配列を明らかにした後、マイクロサテライト領域を挟み込むように 14 セットの PCR 増幅用プライマー (*Phz1* - *Phz14*) を設計した。これら 14 座の内 8 座が多型性を示し、野生集団 ( $n=36$ ) におけるヘテロ接合率の観察値 ( $H_o$ ) と推定値 ( $H_e$ ) は各々 0.611 - 0.833 と 0.647 - 0.968 であった。*Phz3*, *Phz8* および *Phz12* 座はハーディ - ワインベルグ平衡からずれており、*Phz2* と *Phz12* には連鎖不平衡が見られた。しかしながら、雌 1:雄 1 交配の子孫では、8 座中 7 座がメンデルの法則に従って分離した。また、交配実験の結果 *Phz4* と *Phz8* にはヌルアレルが含まれることが判明した。

2) 開発したマイクロサテライトマーカーの内、特に多型的な 5 座 (*Phz2*, *Phz6*, *Phz7*, *Phz12*, *Phz14*) を選び、マガレイ親魚 (雌親 35 個体、雄親 26 個体) とこれら親魚から自然産卵法により生産した種苗との間で親子鑑定を行った。すなわち、人工種苗を産卵時期

によって前半 (EP)、中盤 (MP) および後半 (LP) の 3 グループに分け、成長後サンプリングを行い、自動シーケンサを用いたマイクロサテライト分析に供した。その結果、いずれの産卵期グループにおいても一部の親魚が主に交配に関与することが判明し、EP グループでは雌 8 尾と雄 6 尾が、MP グループでは雌 13 尾と雄 10 尾が、そして LP グループではわずか雌 3 尾と雄 2 尾のみが産卵に関与した。親子鑑定成功率は EP では 92.2%、MP では 84.4%、LP では 100%であった。

3) 親魚集団では、マイクロサテライト座あたりの平均アレル数は 21.8、 $H_e$  は 0.813 であったのに対し、人工種苗では、座あたり平均アレル数は 11.6 (EP)、14.4 (MP)、6.4 (LP)、 $H_e$  は 0.796 (EP)、0.833 (MP)、0.681 (LP) となり、変異性は減退した。親子鑑定結果と合わせ、限られた親魚数により生産された LP グループでは変異性は特に大きく減退したことが判明した。

4) マガレイのミトコンドリア DNA の調節領域の前半約 484bp を用いて、日本および韓国沿岸地点より得た野生集団を分析したところ、遺伝的多様性は非常に高く、検出した 225 ハプロタイプの内 183 ハプロタイプが個体に特異的であった。解析した mtDNA の調節領域前半 484 bp に、135 の塩基置換と 8 の insert/deletion (挿入/欠失) を含む 116 の変異サイトが見られた。ハプロタイプ多様度 ( $h$ ) は 0.989 - 1.000 と非常に高く、ヌクレオチド多様度 ( $\pi$ ) も 0.015 - 0.022 と高かった。しかしながら各海域間の遺伝的距離 ( $\Phi_{ST}$ ) と  $F_{ST}$  は低く、海域間の遺伝的分化は認められなかった。

5) マガレイで開発した 8 マイクロサテライト座の PCR 増幅をマコガレイ (*Pleuronectes yokohamae*)、スナガレイ (*Pleuronectes punctatissimus*) そしてイシガレイ (*Platichthys bicoloratus*) の近縁異体類で試み、将来の遺伝学的研究のツールとなりうるか否かを検討した。その結果、8 座の内 7 座がこれら他種で増幅され、これらは相同なマイクロサテライト配列を含んでいた。増幅できた 7 座では 1 - 22 アレルを含む変異が認められた。マガレイのマイクロサテライト配列に対する相同性の平均はマコガレイで 93.9%、スナガレイで 91.2%、そしてイシガレイでは 93.7%であった。従ってマガレイで開発したマイクロサテライトマーカーはこれら 3 種のカレイ類の遺伝学的研究に有効と考えられた。

申請者による以上の成果は、魚類の健全な種苗生産と放流事業の基盤となる遺伝学的研究に大きく寄与するものであり、さらには今後の栽培漁業技術の発展に資するものとして、審査員一同は申請者が博士 (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。