

水 産 育 種

No. 26

報 文

交配実験によるキンブナの長尾型変異の遺伝支配	1
……………木島 明博・伊藤 慎一・飯塚 晃朗・長谷川 新・上田 賢一……………	
グッピーにおける高温耐性の系統差について	9
……………藤沢 公忠・中嶋 正道・藤尾 芳久……………	
グッピーにおけるコブラ斑の遺伝支配と発現	17
……………中嶋 正道・高橋 伸明・藤尾 芳久……………	
グッピーの系統の塩分耐性と系統間交雑による F_1 の塩分耐性との関係	27
……………中立 元樹・藤尾 芳久……………	
ヒラメ mtDNA D ループ領域の RFLP 分析によるハプロタイプの検出	33
……………菅谷 琢磨・池田 実・藤尾 芳久……………	
アイソザイムからみた大井川源流域におけるイワナ 2 河川集団の遺伝的差異	41
……………後藤 裕康・前田 泰宏・木島 明博……………	
サイトカラシン B を用いた成熟分裂阻害によるエゾアワビ 4 倍体幼生の誘起	49
……………奥村 誠一・古川 末広・佐々木 剛・島岡 真実・堀川 力・山森 邦夫……………	
AFLP フィンガープリント法によるアユの遺伝変異保有量と分化	55
……………高木 基裕・曾我部五郎・谷口 順彦……………	
マイクロサテライト DNA マーカーによるマダイ放流用種苗における集団の有効な大きさ (N_e) と近交係数 (F) の推定	63
……………谷口 順彦・ベレスーエンリケス・リカルド・松浦 秀俊・山口 光明……………	
マダイにおけるケミルミネッセンスを用いたマイクロサテライト DNA の検出：実践マニュアル	73
……………ベレスーエンリケス・リカルド・竹村 昌樹・谷口 順彦……………	

総 説

ミトコンドリア DNA 分析による集団構造解析法	81
……………西田 睦・大川 俊之・岩田 祐士……………	
会 報	101
会員名簿	102

平成 10 年 10 月

水 産 育 種 研 究 会

交配実験によるキンブナの長尾型変異の遺伝支配

木島明博 (東北大・農)・伊藤慎一・飯塚晃朗
長谷川新・上田賢一 (宮城内水試)

Genetic Control of the Long Caudal Fin Type
in Wild Crucian Carp by Mating Experiments

Akihiro KIJIMA^{*1}, Shin-ichi ITOH^{*2}, Teruo IIZUKA^{*3},
Shin HASEGAWA^{*4} and Ken-ichi UEDA^{*5}

^{*1} Education and Research Center of Marine Bio-resources, Faculty of Agriculture,
Tohoku University

^{*2,3,4,5} Miyagi Prefectural Freshwater Fishery Experimental Station

Abstract

In order to elucidate the genetic control of the long caudal fin type in the wild crucian carp, pair mating experiments have been performed. The results of segregation revealed that the long caudal fin type is controlled by two dominant genes, *L1* and *L2*, at two loci, *Cf-1* and *Cf-2*. Genotypes of the long caudal fin type are estimated as (*L1/L1, L2/L2*), (*L1/l1, L2/L2*), (*L1/L1, L2/l2*) and (*L1/l1, L2/l2*).

(accepted 10 May 1998)

宮城県加美郡宮崎町と小野田町にまたがる奥羽山脈の稜線付近に位置する魚取沼 (ゆとりぬま) に生息するキンブナには野生型のほかに尾鰭が伸長する長尾型の個体がみられる。朴沢^{1,2)}はこれをテツギョと呼び、「鮒に似たるもそれに比し尾鰭その他の鰭並に鼻孔褶の著しく伸長せるものなり。尾鰭は鮒尾にして三つ尾四つ尾となることなし。色は普通煤褐色にて鮒の如くなるも時には白、赤、橙黄、黒及其等の斑色を呈し一見金魚にも似たり。」と報告している。木島³⁾はアイソザイム遺伝子を指標に魚取沼の野生型と長尾型の個体を調べ、長尾型はキンブナの形態変異であり、野生型と長尾型は同じ遺伝子給源に属し、魚取沼独自で維持

されてきた集団であると報告している。

形態変異の遺伝支配を明らかにするためには、基本的に対立形質である野生型と変異型の個体を用いて野生型同士、野生型 (雌) と変異型 (雄)、変異型 (雌) と野生型 (雄)、および変異型同士の4種類の雌雄一対交配を行い、そこで得られた子どもにおける対立形質の分離を明らかにする必要がある。松井^{4,5)}は日本産キンギョの出目性や透明鱗の遺伝支配を交配実験により明らかにしている。しかし、キンギョの尾鰭と臀鰭の形態変異について交配実験を行ったが、子どもにおいて複雑な分離を示し、明確な遺伝支配は明らかにできなかった⁶⁾。また、尾鰭の長さの変異に対する遺伝

支配についても明らかにされていない。

本研究は交配実験によって魚取沼に生息するキンブナの長尾型の遺伝支配を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

魚取沼のキンブナはテツギョとして国の天然記念物に指定されている。交配実験に用いた野生型 (S) と長尾型 (L) のキンブナは文化庁の許可を得て宮城県小野田町の魚取沼から採集した (Fig.1)。それらの標準体長は採集時点で 90 mm から 170 mm であった。これらは宮城県黒川郡大和町に位置する宮城県内水面水産試験場に運搬さ

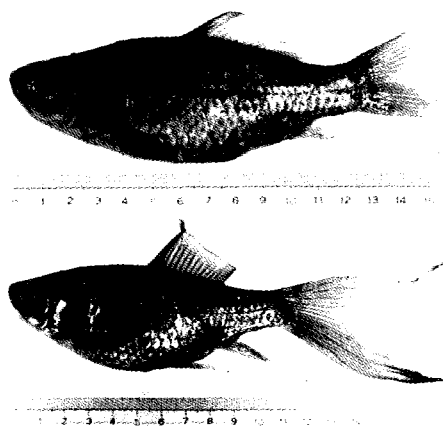


Fig. 1. Long caudal fin type in wild crucian carp collected from Yutori pond

れ、交配実験に用いるまで 1 トンの屋内パンライト水槽で飼育した。

交配は 1993 年、1994 年、1995 年の 5 月から 6 月にかけて雌雄一個体を同一の水槽に入れ、通常飼育よりも水温を 2 から 3℃ 高くして温度刺激を与えた後に自発的交尾 (交配) によった。ただし、産卵しない個体にはゴナトロピン投与を行った後

に交配用水槽に移して自発的交尾 (交配) を行った。交配は野生型 ♀ × 野生型 ♂ が 7 組、野生型 ♀ × 長尾型 ♂ が 2 組、長尾型 ♀ × 野生型 ♂ が 4 組、長尾型 ♀ × 長尾型 ♂ が 3 組の合計 16 組である。

得られた仔魚は孵化尾数の多少に応じて 100 リッターから 200 リッターのパンライト水槽に収容した。孵化後 3 日目からミジンコを餌として与え、孵化後約 3 週間目からマス用配合飼料を粉碎して与えた。孵化後約 3 ヶ月日以降には、Fig.2 に示すように尾鰭の長さが長いタイプと短いタイプが可視的に認められるようになったことから、稚魚

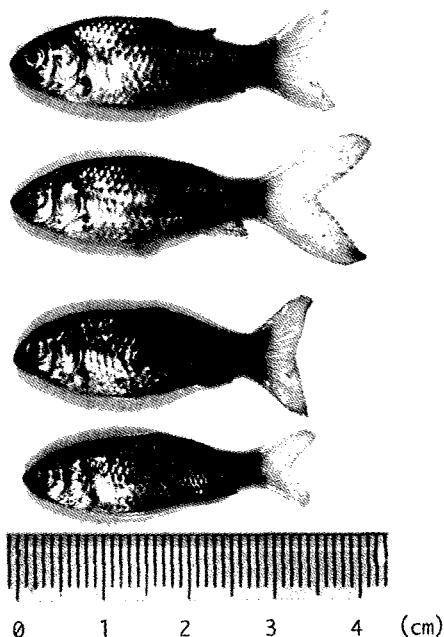


Fig. 2. Caudal fin length variation in offsprings at age 168 days old obtained by pair mating between female of long caudal fin type (L) and male of wild type (S)

の形態計測は孵化後 85 日以降とした。

尾鰭の長さの程度を表すために以下の式によって尾鰭体長比を求めた。

$$\text{尾鰭体長比 (\%)} = \frac{\text{尾鰭の長さ}}{\text{体長}} \times 100$$

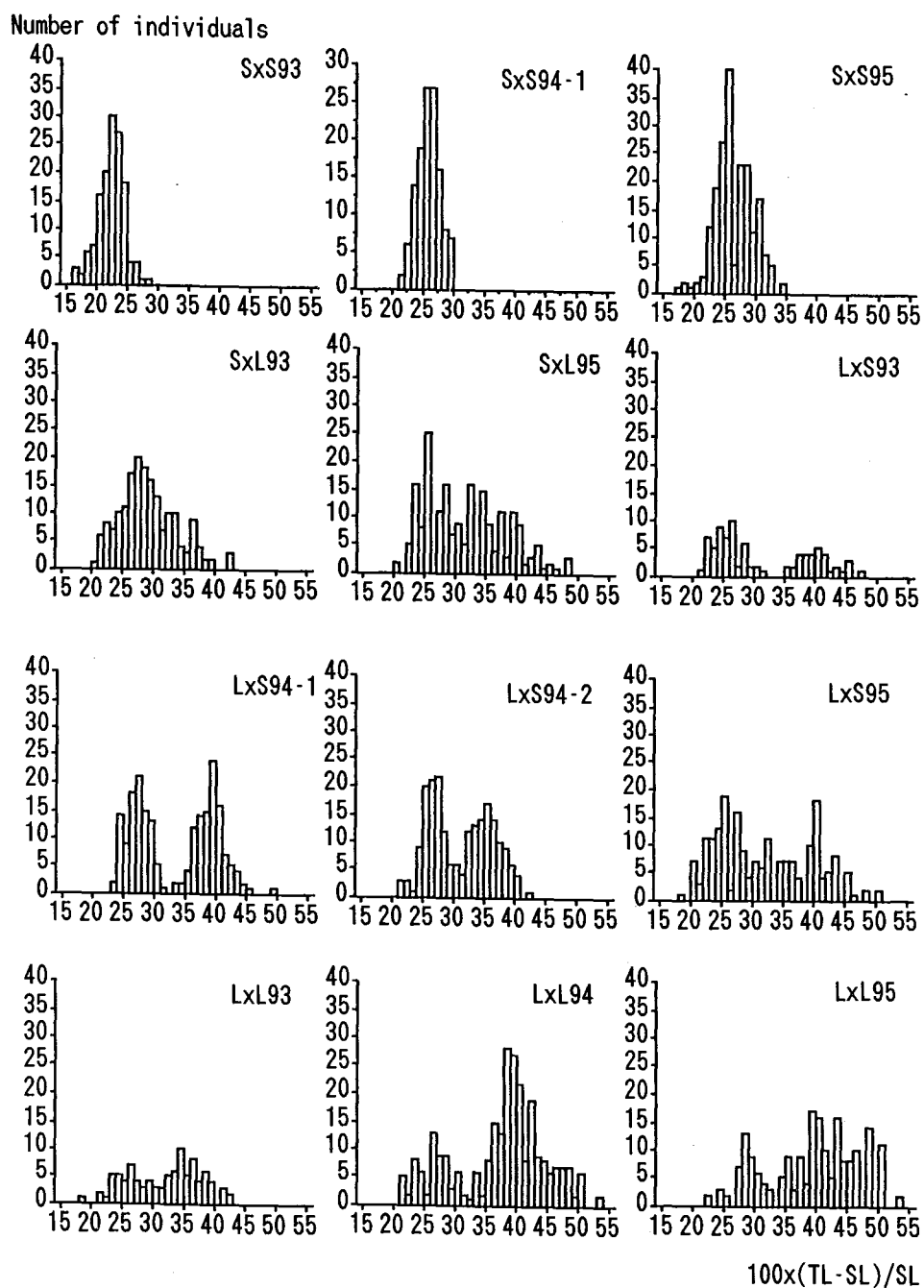


Fig. 3. Distribution of the proportion of caudal fin length to standard length in the offsprings obtained by each pair mating
 SL : standard length, TL : total length, S : wild type, L : long caudal fin type

$$= \{100 \times (\text{全長} - \text{標準体長}) / \text{標準体長}\}$$

結果と考察

雌雄一対交配によって得られた子どもの尾鰭体長比の分布を Fig.3 に示す。ここで図中の数字は交配年を表す。野生型同士 (SxS) の交配ではすべての組合せで尾鰭体長比が 25% 付近にモードを示す単峰型の分布を示したが、野生型と長尾型 (SxL)、長尾型と野生型 (LxS) および長尾型同士 (LxL) の組合せではどの交配も得られた子どもの尾鰭体長比は単純な単峰型の分布を示さなかった。その中で、LxS 93、LxS 94-1、LxS 95、LxL 95 では相互に重複がない明確な二峰型になっていた。それらの分布をみると、尾鰭体長比が 33% 未満と 33% 以上で不連続に区分できた。

そこで、尾鰭体長比を 33% を基準にそれ以上を長尾型 (L)、それ未満を野生型 (S) としてそれぞれの出現個体数を計数した。その結果、Table 1 に示すように、「野生型同士の交配」ではほと

んどが野生型であった。このうち 2 つの組合せでは区分の基準上長尾型の範疇にはいる個体が 1 個体と 2 個体認められたが、その値が 33% から 34% 台であったこと、および分布が単純な単峰型を示していたことから、これらの個体を野生型とみなした。従って、野生型同士の交配における子どもの表現型はすべて野生型であるとみなせた。「野生型と長尾型の交配」による子どもは野生型と長尾型の分離がみられ、その分離比は交配組によって異なっていた。「長尾型と野生型の交配」による子どもにおいても野生型と長尾型の分離がみられ、その分離比は交配組によって異なっていた。「長尾型同士の交配」による子どもにおいても野生型と長尾型の分離がみられ、その分離比は交配組によって異なっていた。

野生型同士の交配で野生型ばかりが出現し、長尾型同士の交配で野生型と長尾型が分離したことは野生型が劣性形質で長尾型が優性形質であるこ

Table 1. Segregation of the types in the offsprings produced by pair matings of the natural crucian carp in Yutori pond

Matings ♀ X ♂	Age (Day)	Mean S.L. (mm)	Mean prop.of 100x(TL-SL)/SL	Number of individuals		
				total	S	L
S X S 93	148	21.6±2.5	22.4±2.2	139	139	0
	94-1	105	29.8±3.8	126	126	0
	94-2	105	31.8±4.0	93	93	0
	94-3	91	27.6±2.5	131	131	0
	94-4	91	29.3±3.8	148	148	0
	94-5	84	25.6±4.1	161	160	1
	95	105	23.7±3.9	200	198	2
S X L 93	154	18.0±1.9	29.2±4.5	181	144	37
	95	105	20.2±2.4	200	120	80
L X S 93	168	25.5±3.2	31.4±7.6	85	52	33
	94-1	80	25.4±3.3	207	98	109
	94-2	93	26.9±3.2	207	119	88
	95	105	20.9±2.5	200	120	80
L X L 93	157	19.2±3.3	32.0±5.7	95	47	48
	94	93	27.2±3.0	268	66	202
	95	105	21.4±3.5	200	49	151

とを示唆している。そこで1遺伝子座支配として長尾型となる優性遺伝子 L (Long caudal fin) とその劣性対立遺伝子 l を仮定すると、野生型の遺伝子型は (l/l) 、長尾型の遺伝子型は (L/L) か (L/l) となる。野生型同士の交配ではすべてが野生型となって仮定した遺伝子型と矛盾しない。しかし、野生型と長尾型の正逆交配の子どもにおける野生型と長尾型の分離比は $1:0$ または $1:1$ になると期待されるが、実際には6交配組中5組において期待値から有意にはずれた。また、長尾型同士の交配の子どもにおける野生型と長尾型の分離比は $1:3$ または $0:1$ になると期待されるが、3交配組中1組で期待値と有意にはずれた。これらのことは、長尾型が単純な1遺伝子座支配では説明できないことを示している。

松井⁴⁾はキンギョの出目性の遺伝様式について交配実験により劣性遺伝子 (d) が要因であること

を報告し、さらにフナ (キンブナ) との交配によって、出目性にはそれを抑制する遺伝子 (A) が存在することを示した。すなわち、フナおよびキンギョの出目性は2つの遺伝子座によって支配されていることを示した。また、松井⁵⁾はキンギョの透明鱗の遺伝支配についても多くの交配実験を行い、優性透明鱗性因子 (T) と劣性の普通鱗性因子 (t) のほかに、別の遺伝子座における劣性の網透明鱗性因子 (n) とそれに対して優性の普通鱗性因子 (N) の存在を示し、 N と n は T に対して下位にあることを示し、出目性と同様に2遺伝子座支配であることを示した。

そこで長尾型が2遺伝子座支配によるものとし、2つの遺伝子座 ($Cf-1$ と $Cf-2$) のそれぞれにおける長尾を示す優性遺伝子 ($L1$ および $L2$) と、それらの劣性対立遺伝子 ($l1$ および $l2$) があるとする、その発現には3つの仮定が考えられる。

Table 2. Expected segregation rate of offspring under each assumption of genetic control

Matings ♀ X ♂	Expected segregation rate(S:L)		
	Assumption1	Assumption2	Assumption3
S X S	1 : 0	1 : 0	1 : 0
		3 : 1	3 : 1
			1 : 1
			0 : 1
S X L	0 : 1	0 : 1	0 : 1
		1 : 1	1 : 1
		1 : 3	1 : 3
		3 : 1	3 : 1
		1 : 0	5 : 3
L X S	0 : 1	0 : 1	0 : 1
		1 : 1	1 : 1
		1 : 3	1 : 3
		3 : 1	3 : 1
		1 : 0	5 : 3
L X L	0 : 1	0 : 1	0 : 1
		1 : 3	1 : 3
		1 : 7	7 : 9
		5 : 11	

仮定1は、2つの遺伝子座のうち優性遺伝子が1つあれば長尾型を示す場合、遺伝子型が ($L1/-$, $-/-$) および ($-/-$, $L2/-$) のときに長尾型を示すことになる。ただし、ここで示した-は、 $Cf-1$ 遺伝子座においては $L1$ か $l1$, $Cf-2$ 遺伝子座においては $L2$ か $l2$ のどちらでも代入できることを意味している。仮定2は優性遺伝子がどちらでも2つで長尾型となる場合、遺伝子型が ($L1/L1$, $-/-$)、($L1/-$, $L2/-$) および ($-/-$, $L2/L2$) のときに長尾型を示すことになる。仮定3は2遺伝子座とも優性遺伝子が存在したときに長尾型となる場合、遺伝子型が ($L1/-$, $L2/-$) のときに長尾型を示すことになる。これらの仮定の下で期待される各交配の子どもの表現型分離比を Table 2 に示した。

各交配実験で得られた表現型観察値が各仮定において期待される分離比から求めた期待値と一致するかどうかを検討したところ、仮定1では $S \times L$

93, $S \times L$ 95, $L \times S$ 93, $L \times S$ 94-2, $L \times S$ 95 および $L \times L$ 93 で観察値と一致する期待値はなかった。仮定2では $S \times L$ 95, $L \times S$ 93, $L \times S$ 94-2, $L \times S$ 95 および $L \times L$ 93 で観察値と一致する期待値はなかった。仮定3ではすべての交配組で観察値と一致する期待値が得られた (Table 3)。従って、魚取沼のキンブナにみられた長尾型の変異は、2つの遺伝子座 ($Cf-1$ と $Cf-2$) が関与し、それぞれの遺伝子座において長尾を示す優性遺伝子 ($L1$ と $L2$) によって支配され、長尾型の遺伝子型は ($L1/L1$, $L2/L2$)、($L1/l1$, $L2/L2$)、($L1/L1$, $L2/l2$) および ($L1/l1$, $L2/l2$) であると推定できた。

本研究では尾鰭の長さの変異に焦点を絞って遺伝支配を明らかにしたが、尾鰭の長い個体は背鰭、胸鰭、腹鰭、臀鰭のすべてが長くなる傾向が認められる (Fig.1)。これに関連して松井⁶⁾は臀鰭と尾鰭の形態には連鎖関係があることを示唆してい

Table 3. Observed and expected number of individuals for each types in the offsprings produced by pair matings of the natural crucian carp in Yutori pond

Matings ♀ X ♂	Observed and expected number			Segregation ratio
	total	S	L	
$S \times S$ 93	139	139(139.0)	0(0.0)	1:0
94-1	126	126(126.0)	0(0.0)	1:0
94-2	93	93(93.0)	0(0.0)	1:0
94-3	131	131(131.0)	0(0.0)	1:0
94-4	148	148(148.0)	0(0.0)	1:0
94-5	161	161(161.0)	0(0.0)	1:0
95	200	200(200.0)	0(0.0)	1:0
$S \times L$ 93	181	144(135.7)	37(45.3)	3:1
95	200	120(125.0)	80(75.0)	5:3
$L \times S$ 93	85	52(53.1)	33(31.9)	5:3
94-1	207	98(103.5)	109(103.5)	1:1
94-2	207	119(129.4)	88(77.6)	5:3
95	200	120(125.0)	80(75.0)	5:3
$L \times L$ 93	95	47(41.6)	48(53.4)	7:9
94	268	66(67.0)	202(201.0)	1:3
95	200	49(50.0)	151(150.0)	1:3

る。これは長尾型を支配する遺伝子は各鰭の伸長を促進する機能であるか、あるいは各鰭の伸長を抑制できなくなる機能であることが予想される。本研究において調べた稚魚においてはその時点で各鰭の伸長は明確ではなく、さらに長期の飼育実験と追跡調査が必要であろう。

要 約

天然に生息するキンブナの長尾型（尾が伸長する変異型）の遺伝支配を明らかにするために、野生型同士、野生型と長尾型、長尾型と野生型、長尾型同士の組合せの交配実験を行った。その結果、長尾型は、2つの遺伝子座（*Cf-1* と *Cf-2*）が関与し、それぞれの遺伝子座において長尾を示す優

性遺伝子（*L1* と *L2*）とそれに対する劣性対立遺伝子（*l1* と *l2*）が存在し、長尾型の遺伝子型は（*L1/L1, L2/L2*）、（*L1/l1, L2/L2*）、（*L1/L1, L2/l2*）および（*L1/l1, L2/l2*）であると推定できた。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり貴重な助言を賜った東北大学農学部藤尾芳久教授に感謝の意を表す。また、本研究は宮城県環境生活部環境保全課で行っている「魚取沼テツギョ保全対策事業」の一部として行った。

引用文献

- 1) 朴沢三二（1927）鐵魚に就て．日本学術協会報告，3：280-287.
- 2) 朴沢三二（1931）宮城縣魚取沼に産する珍魚，鐵魚の話．海鼠の骨，pp.215-233.
- 3) 木島明博（1997）魚取沼テツギョの起源と成因に関する遺伝学的調査報告．魚取沼のテツギョ保全対策事業基礎調査報告書．宮城県，pp.37-53.
- 4) 松井佳一（1934）日本産金魚の遺伝学的研究、第二報、金魚の出目性の遺伝に就て．水産講習所研究報告，30：27-34.
- 5) 松井佳一（1934）日本産金魚の遺伝学的研究、第三報、金魚の透明鱗性の遺伝に就て．水産講習所研究報告，30：35-60.
- 6) 松井佳一（1934）日本産金魚の遺伝学的研究、第四報、金魚の尾鰭及臀鰭の遺伝に就て．水産講習所研究報告，30：61-82.

グッピーにおける高温耐性の系統差について

藤沢公忠・中嶋正道・藤尾芳久 (東北大・農)

Strain Differences of High Temperature Resistance on the Guppy *Poecilia reticulata*

Kimitada FUJISAWA, Masamichi NAKAJIMA and Yoshihisa FUJIO

Faculty of Agriculture, Tohoku University,

Abstract

The response to high temperatures were measured in 12 different strains of the guppy *Poecilia reticulata*. The response of each strain was measured as the death time, the length of time at which the fish was exposed to 37°C until death. The death time of immature fish was later than that of mature females and males, and numerous number of the mature females survived longer than the mature males in each strain. However, the average death time in immature fish, mature females and males differed among strains.

A correlation was observed between mature females and males but not between immature fish and mature fish. This suggests that genetic factors for thermal resistance differ between mature fish and immature fish.

(accepted 18 May 1998)

変温動物である魚類の体温は環境水の影響を強く受けている。環境水の水温は魚類の生息域を決めている要因の一つである。高温や低温に対する耐性の遺伝的要因を明らかにすることは外部環境への適応性の遺伝支配を明らかにする上で重要である。温度耐性の遺伝学的研究は種間¹⁾、亜種間^{2,3)}、地方品種間⁴⁾の比較によってなされているにすぎない。Kanda *et al.* (1992)⁵⁾はグッピーの仔魚の1系統から作成された分集団間で高温耐性の違いを調べた。分集団差がみられることから、グッピーにおける仔魚期の温度耐性が遺伝的要因による可能性を示している。これは温度耐性の遺伝的特性を遺伝的に異なる系統や分集団を用いての適応試験を行うことによって明らかにすることができると考えられるためである。理論的に、兄妹交配を

数世代続けることによって作られた近交系に属する個体は互によく似た遺伝的組成を持つことになる。したがって、同一近交系内で見られる個体変異の多くは環境などの要因によることになり、異なる近交系間で見られる差異は環境要因と遺伝的差異によることになる。実際にはこの原理を閉鎖集団として維持されている系統に適用することにより遺伝的差異に基づく遺伝的要因の解析ができると考えられる。そこで、本研究は閉鎖集団として多くの系統が作成され、維持されているグッピーを用いて高温耐性の系統差を明らかにし、その遺伝的要因を推定することを目的とした。

材料と方法

実験に用いたグッピーは、本研究室で閉鎖集団

として継代飼育されている 12 系統である。これらの系統は起源、形態および色彩模様の特徴を持っている^{5,6)}。S3-23、S3、SC、W、O 系統は小型系で、B、C、D、E、F、T、T1 系統は大型系である。起源を同一とする系統は、S3 と S3-23 系統、T と T1 系統、B と C 系統である。それぞれの系統は 60 l 水槽において水温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ で飼育されている。

高温処理実験は 23°C の飼育水を入れた恒温水槽に $10\times 10\times 12\text{ cm}$ のメッシュのかごを入れ、そこにかご当たり 10 尾を上限として供試魚を浸漬することにより行った。恒温水槽の水温は浸漬開始時を 23°C とし、3 時間後に 37°C になるように 12 分で 1°C ずつ上昇させた。水温が 37°C に達した時点を高温処理の開始時間として 30 分ごとに生死判定を行った^{8,9)}。死亡個体は順次取り出し、雌雄判別と標準体長を測定した。供試魚はそれぞ

れのストックから無作為に取り出し、高温耐性の指標としては死亡時間を用いた。

結 果

グッピー成魚における各系統の平均標準体長を雌雄ごとに Table 1 に示す。グッピーの成魚における雌雄および体長と高温耐性との関係を見るために、各系統の雌雄それぞれを平均標準体長よりも大きい個体と小さい個体とに分け、大型と小型との間で 37°C 処理後の平均死亡時間を比較した (Fig.1)。大型個体と小型個体との間に有意差がみられたのは M1 系統のみで、他の系統では有意差はみられなかった。小型の方が大型よりも死亡するまでの時間がわずかに長い傾向を示したが、生死判定が 0.5 時間ごとであることからその差は大きいとはいえない。したがって、標準体長の違いによる平均死亡時間には大きな差はないと判定

Table 1. Mean body length (mm) of tested fishes in 12 strains of the guppy.

Strain	Male		Female	
	N	Mean $\pm$ SD	N	Mean $\pm$ SD
S3-23	57	15.0 $\pm$ 0.9	45	17.2 $\pm$ 2.6
S3	60	16.4 $\pm$ 1.4	64	17.5 $\pm$ 2.7
SC	41	17.2 $\pm$ 1.4	26	22.9 $\pm$ 3.9
W	49	17.6 $\pm$ 1.4	35	18.8 $\pm$ 3.6
O	42	18.6 $\pm$ 1.8	45	19.4 $\pm$ 4.1
B	47	17.2 $\pm$ 1.8	42	19.2 $\pm$ 2.8
C	45	17.9 $\pm$ 1.5	32	21.4 $\pm$ 4.9
T	14	19.2 $\pm$ 5.2	11	20.4 $\pm$ 5.3
D	14	20.2 $\pm$ 1.2	12	21.1 $\pm$ 3.1
F	12	20.6 $\pm$ 1.4	14	23.2 $\pm$ 5.0
T1	25	21.0 $\pm$ 1.8	30	19.4 $\pm$ 4.2
E	33	21.9 $\pm$ 1.7	41	21.9 $\pm$ 4.3

See the reference 5) and 6) for the detail of characteristics of each strains.

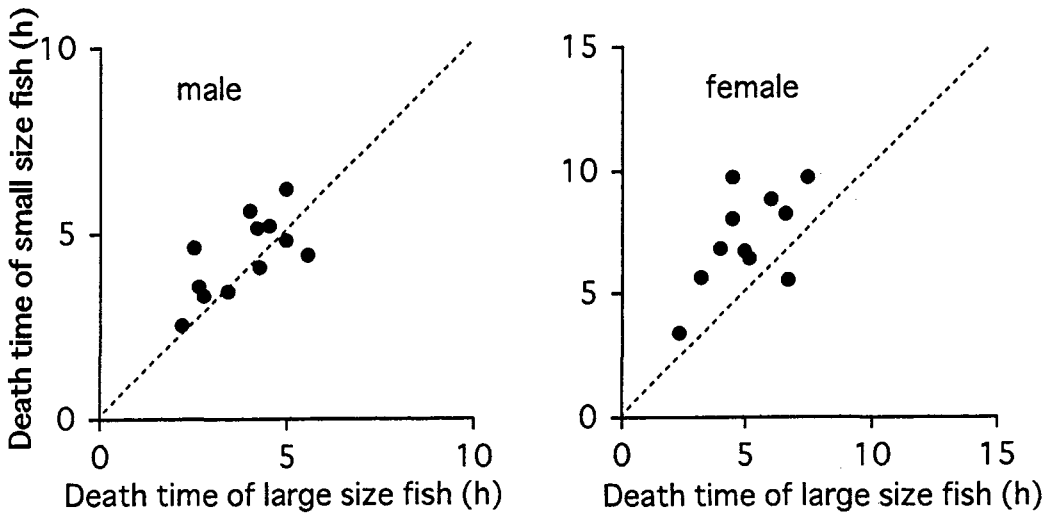


Fig.1. Correlation between large and small body size in mean death time of the guppy treated with 37°C water temperature in 12 strains. Dotted line indicates $y=x$.

した。次に大型と小型を一緒にして、雌雄間の高
温耐性の比較を行った (Fig.2)。Fig.2は雄よりも
雌の方が死亡するまでの時間が長く、雌が雄より

も高温耐性が強いことを示している。12系統に
おける 37°C 処理後の平均死亡時間を Table 2 に
示す。雌におけるそれぞれの系統の平均死亡時間

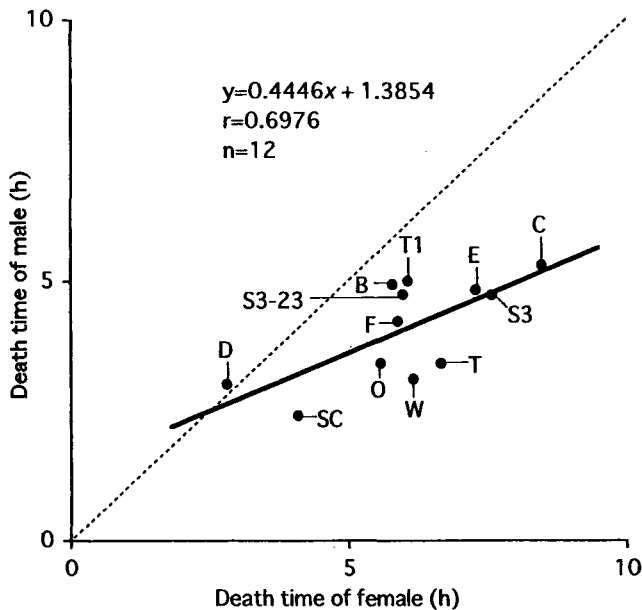


Fig.2. Correlation between female and male in mean death time of the guppy treated with 37°C water temperature in 12 strains. Dotted line indicates $y=x$.

Table 2. Mean death time (h) of tested fishes in 12 strains.

Strain	Female		Male		immature	
	Mean±SD	N	Mean±SD	N	Mean±SD	N
D	2.8±1.9	12	3.0±1.2	14	7.9±2.3	10
SC	4.1±1.9	26	2.4±0.5	41	14.7±4.6	23
O	5.6±3.3	45	3.4±1.5	42	11.8±6.3	42
W	6.2±3.3	35	3.1±1.7	49	10.7±5.1	42
F	5.9±2.2	14	4.2±1.4	12	11.0±3.8	12
B	5.8±4.6	42	4.9±3.1	47	11.6±5.9	49
S3-23	6.0±2.5	45	4.7±2.2	57	9.5±4.1	82
T	6.7±4.1	13	3.4±1.7	21	15.0±6.6	45
T1	6.1±3.5	37	5.0±2.6	28	9.8±6.1	21
E	7.3±2.9	41	4.8±1.5	33	7.8±2.6	15
S3	7.6±4.7	64	4.7±2.3	60	11.3±6.2	93
C	8.5±4.5	32	5.3±1.9	45	11.2±5.6	39

Upper strain is more sensitive to 37°C water temperature

は2.8時間から8.5時間と系統によって異なっていた。一方、雄でも3.0時間から5.3時間と系統により異なっていた。平均死亡時間が雌で8.5時間、雄で5.3時間と遅かったC系統は高温耐性に強い系統で、雌で2.8時間、雄で3.0時間と早く死亡したD系統は弱い系統と言える。

未成魚（標準体長7-13 mm）においても成魚（標準体長14 mm以上）と同じ方法で高温処理実験を行い、その耐性を系統間で比較した。成魚と未成魚の死亡時間を比較した結果をFig.3に示す。成魚と未成魚との間には死亡時間に相関は見られず、成魚よりも未成魚の方が死亡するまでの時間が長かった。Table 2に示すように、未成魚では平均死亡時間が7.8時間から15.0時間までと系統により異なっていた。平均死亡時間が15.0時間と遅かったT系統は未成魚では高温耐性の強い系統、7.8時間と早く死亡したE系統は弱い系統と言える。したがって、成魚で高温耐性の強い

系統が必ずしも未成魚で強い系統とはいえず、また成魚で弱い系統が必ずしも未成魚で弱いとは言えない。このことは、高温耐性を支配する遺伝要因が成魚と未成魚とで異なっていることを示唆している。

高温耐性の弱いD系統、系統の平均死亡時間が系統全体の平均死亡時間とほぼ同じ値を示すS3-23系統、強いC系統における死亡時間の頻度分布を比較した（Fig.4）。平均的な死亡時間を示すS3-23系統に比べて、D系統では雌雄共にすぐ死亡する弱い個体しか見られないのに対して、C系統ではすぐに死亡する弱い個体から長時間生きている強い個体まで含まれていることが明らかになった。特にC系統の雌では4.5時間と9.5時間の2つの時間にピークが見られ、弱い個体と強い個体のピークと考えられる分布を示した。系統による死亡時間の分布が異なることが示されたので、系統による死亡時間と死亡時間の変異係数と

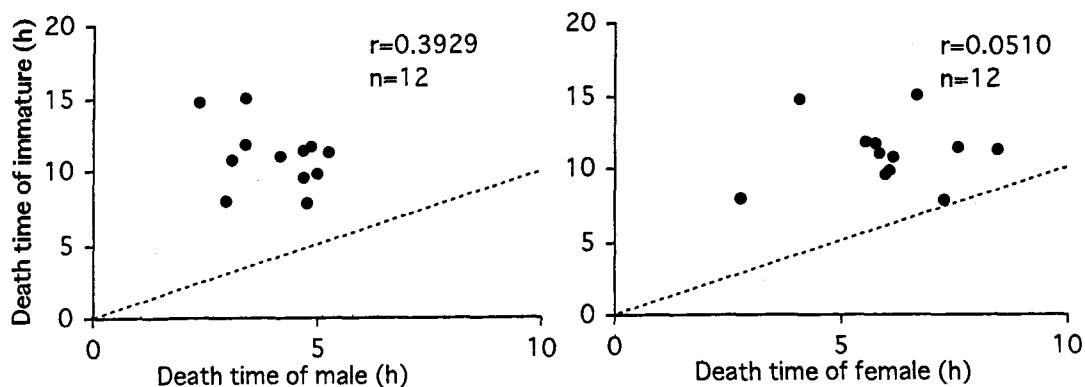


Fig.3. Relationship between the mature (female and male) and the immature. Dotted line indicates $y=x$.

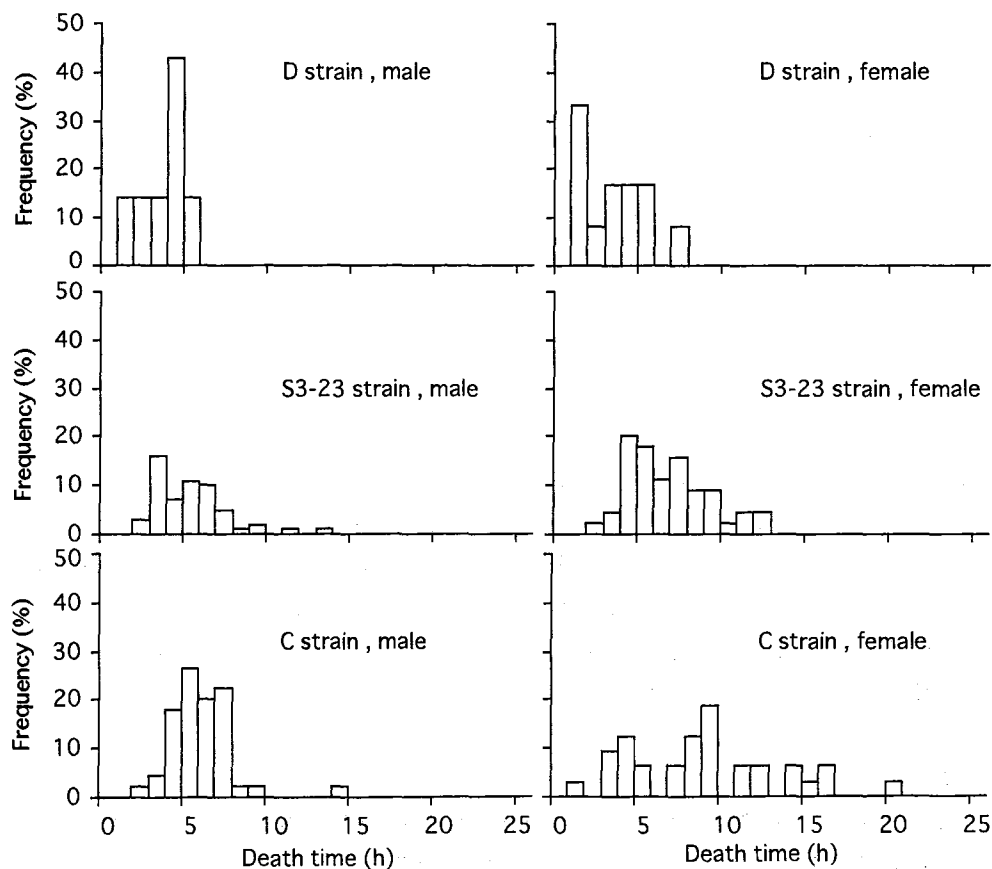


Fig.4. Distribution of death time of the guppy treated with 37°C water temperature in 3 strains.

の関係を調べた。その結果、平均死亡時間と変異係数との間には相関が見られなかった。

考 察

本研究で用いた系統は閉鎖集団として飼育されており、系統間には遺伝子頻度に差異があると考えられる。これに関して、Macaranas and Fujio⁵⁾は本研究に用いたグッピー 8 系統の 27 アイソザイム遺伝子を調べ、系統間に遺伝的分化が見られ、系統による遺伝子頻度組成が異なることを報告している。さらに、Fujio *et al.*⁷⁾はグッピーの低温耐性を 12℃24 時間後の生死によって調べ、系統差が見られることを示した。また、交配実験から母親とその子供の低温耐性を調べ、優性の低温耐性遺伝子が X 染色体上に存在していることを報告している。本研究での高温耐性でも系統差が見られ、さらに雌雄差が見られたことから、低温耐性と同じような遺伝支配が予想される。この点に関してはより詳細な実験を行う必要がある。Fujio *et al.*⁸⁾は未成魚の高温耐性について、同一系統から、高温に対して強い方向(耐性)と弱い方向(感受性)の 2 方向へ選択を 2 回行った結果、元集団の平均死亡時間が 4.2 時間であったのに対して感受性方向での選択では 3.0 時間、耐性方向への選択では 4.9 時間となり選択効果が見られることが報告している。このことは高温耐性には複数の相加効果を持つ遺伝子が関与している可能性を示している。Kanda *et al.*⁹⁾はグッピーの未成魚が成魚よりも高温耐性が強いことを報告している。グッピーの成長では発育段階によって関与する遺伝子

が異なっている可能性が示唆されており、特に生後 0 日目の体長には母親の遺伝的影響が強いことが示されている¹⁰⁾。本研究での高温耐性は Kanda *et al.*⁹⁾と同様の結果が得られ、成魚と未成魚の高温耐性の遺伝的要因が同じではない可能性が示唆された。未成魚期の遺伝的要因が母親に由来するものかどうかは不明である。高温耐性の未成魚期における母親の影響に関しては交配実験から母親とその子供の耐性を比較する必要がある。

要 約

グッピー 12 系統における高温耐性の違いを明らかにするために、37℃ 処理後の死亡時間を各系統で調べた。その結果、未成魚(標準体長 7-13 mm)は成魚(標準体長 14 mm 以上)に比べて平均死亡時間が長かった。また、雌雄で比較すると雌は雄に比べて長かった。成魚の高温耐性は雌雄による違いが見られたが、体長による大きな違いは見られなかった。高温耐性には系統差が見られ、雌と雄の死亡時間には正の相関が見られた。しかし、未成魚と成魚との間には相関が見られなかった。このことは、成魚における高温耐性の遺伝的要因が未成魚のものとは異なっていることを示唆している。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金「水族における遺伝資源の存在様式と保存に関する遺伝学的研究」(課題番号 08406014)によった。

文 献

- 1) Scott, D. P. (1964) Thermal resistance of pike (*Esox lucius* L.), muskellunge (*E. masquinony* Michill), and their F₁ hybrid. J. Fish. Res. Bd. Can., 21 : 1043-1049.
- 2) Hirshfield, M. F., C. R. Feldmeth and D. L. Soltz (1980) Genetic differences in physiological tolerance of amargosa pupfish (*Cyprinodon nevadensis*) populations. Science, 207 : 999-1001.

- 3) Fields, R., S. S. Lowe, C. Kaminski, G. S. Witt and D. P. Philip (1984) Critical and chronic thermal maxima of northern and Florida large mouth bass and their reciprocal F₁ and F₂ hybrids. Trans. Amer. Fish. Soc., 116 : 856–863.
- 4) Feminella, J. W. and W. J. Matthews (1984) Intraspecific differences in thermal tolerance of *Etheostma spectabile* (Agassiz) in constant versus fluctuating environments. J. Fish. Biol., 25 : 455 – 461.
- 5) Macaranas, J. M. and Y. Fujio (1987) Genetic differences among strains of the guppy, *Poecilia reticulata*. Tohoku J. Agr. Res., 37 : 75–85.
- 6) 鹿野隆人・藤尾芳久 (1994) グッピーにおける塩分耐性の系統差について. 水産育種, 20 : 47–53.
- 7) Fujio, Y., M. Nakajima and Y. Nagahama (1990) Detection of a low temperature-resistant gene in the guppy (*Poecilia reticulata*), with reference to sex-linked inheritance. Jpn. J. Genet., 65 : 201–207
- 8) Fujio, Y., M. Nakajima and G. Nomura (1995) Selection response of thermal resistance of the guppy *Poecilia reticulata*. Fisheries Sci., 61 : 731–734.
- 9) Kanda, N., M. Nakajima and Y. Fujio (1992) Genetic variation for thermal resistance of the guppy, *Poecilia reticulata*. Tohoku J. Agr. Res., 42 : 67–72.
- 10) Nakajima, M. and Y. Fujio (1993) Genetic determination of the growth of the guppy. Nippon Suisan Gakkaishi, 59 : 461–464.

グッピーにおけるコブラ斑の遺伝支配と発現

中嶋正道・高橋伸明・藤尾芳久（東北大・農）

Genetic Control and Expression of the Cobra Pattern in the Guppy
Poecilia reticulata

Masamichi NAKAJIMA, Nobuaki TAKAHASHI and Yoshihisa FUJIO

Faculty of Agriculture, Tohoku University

Abstract

The cobra pattern is one of the color patterns expressed in males of the guppy, *Poecilia reticulata*. In the cross experiment between the G strain which has the cobra pattern and the S strain which showed the absence of the cobra pattern, the cobra pattern was observed on the male offspring from the cross of female parents of the S strain and male parents of the G strain. Methyltestosterone treated females in the G strain showed absence of the cobra pattern whether or not sex conversion was successful. These results indicated that the cobra pattern gene (*Cbr*) located on the Y chromosome, but not on the X chromosome.

Males having no-cobra pattern were observed in 4 offspring of the 200 individuals obtained from 34 pair matings of the G strain. When the female offspring were treated with methyltestosterone, the cobra pattern was observed in 4 females whereas 219 females showed no-cobra pattern. This suggested the crossing-over between the X and Y chromosomes. Considering the male determining gene on the Y chromosome, the crossing-over value was calculated at 1.9%.

(accepted 18 May 1998)

グッピー (*Poecilia reticulata*) は南米原産の淡水魚で、飼育が容易で世代交代が早く、雄の色彩や模様の特徴を持つ多くの系統が作成されている¹⁾。グッピーの体色を支配する遺伝子が常染色体上に存在していることは Ueshima *et al.*²⁾ によって報告されている。雄の色彩や模様を支配する遺伝子が Y 染色体上に存在していることがグッピーで最初に示された^{3,4)}。Winge and Ditlevsen^{5,6)} は色彩や模様を支配する 4 遺伝子 (*Ma*, *Ir*, *Pa*, *Ar*) が Y 染色体上で連鎖しており、これらの遺伝子が雄決定遺伝子と密接に連鎖している可能性を示唆している。また、色彩や模様を支配する遺伝子が X 染色体上にも存在していることを明らかに

しているが、雌では性ホルモンにより制御されているために遺伝子発現が見られないとされている。これに関して、Dzwillo^{7,8)} や Haskins *et al.*⁹⁾ は雄性ホルモンであるテストステロンを飼育水または飼料へ添加することにより XX 個体において色彩や模様の遺伝子の発現を見ている。コブラ斑は雄の体側部に出現する不規則な縞模様で、スネークスキン (snakeskin) とも呼ばれている。コブラ斑を支配する遺伝子 (*Cbr*) は Y 染色体上に存在する優性の遺伝子とされている¹⁰⁾。

コブラ斑を有する系統内で交配実験を行ったところ、まれにコブラ斑の無い雄個体が観察され、X 染色体と Y 染色体間での組み換えの可能性が

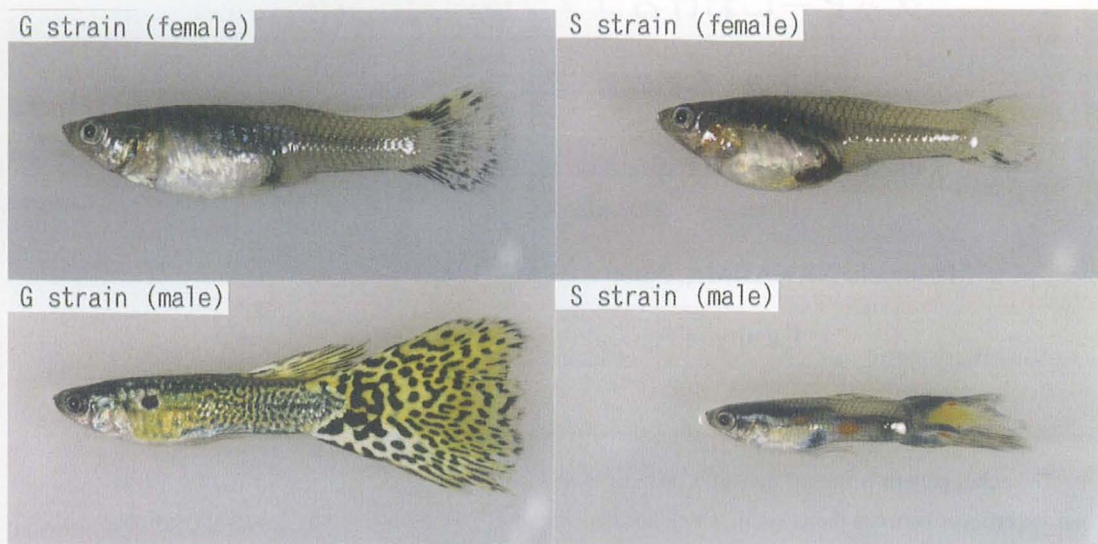


Fig.1. The guppy strains used for cross experiment. The G strain was used as the strain which has the cobra pattern in male, and the S strain was used for the strain which does not have the cobra pattern.

考えられる。このことから、本研究はコブラ斑の遺伝支配と発現をコブラ斑を持つ系統と持たない系統を用いての交配実験から明らかにすることを目的とした。

材料と方法

コブラ斑を持つ系統としてG系統、持たない系統としてS系統を用いた (Fig.1)。いずれの系統も本研究室でクローズドコロニーとして継代飼育されているものである。グッピーは体長約7 mmで産仔された後、生後60日目頃までに雌雄の判別が可能となる。雄は臀鰭がゴノボジウムと呼ばれる交接器に変形し、外見から雌雄の判別が可能となる。コブラ斑は生後60日目頃から雄の体側部に現れ始める。始めは不明瞭な縞模様として表れるがしだいに明瞭になり、生後120日目頃には完全なコブラ斑となり、生後180日目以降はほとんど変化しなくなる。そこで生後60日目にゴノボジウムの有無によって雌雄を判別し、コブ

ラ斑の有無は生後120日目以降に行った。

性ホルモンによりコブラ斑の発現が制御されている可能性が考えられるので、メチルテストステロン (17 α -methyltestosterone SIGMA M 7252) を飼育水へ添加することによりG系統の雌におけるコブラ斑遺伝子の発現の有無を調べた。メチルテストステロンの濃度は1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/mlの3種類の処理区を設けた。処理期間は雌雄判別が可能となる生後60日目からコブラ斑が確認できる生後120日目までの60日間で、雌雄判別を行った後に実験に供した。メチルテストステロンは1 mg/mlとなるようにエタノールに溶解しそれぞれの濃度になるように飼育水へ添加した。一回の産仔で得られた仔魚を4組に分け、1 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/mlの各濃度のメチルテストステロン処理を行い、残りはコントロールとしてエタノールのみを添加した。

G系統における交配実験において雌個体のメチルテストステロン処理を行い、コブラ斑の出現の

Table 1. The presence and absence of the cobra pattern in F₁ hybrid of the S strain and the G strain

No. of Pair	Female		Male		χ^2
	Presence	Absence	Presence	Absence	
GXS					
1	0	3	1	0	
2	0	2	0	0	
3	0	5	4	0	
4	0	2	2	0	
5	0	1	0	0	
6	0	2	0	0	
7	0	4	0	0	
8	0	4	3	0	
9	0	0	1	0	
10	0	0	1	0	
11	0	2	1	0	
12	0	1	0	0	
13	0	10	6	0	
14	0	4	3	0	
15	0	1	2	0	
16	0	7	7	0	
	0	48 (39.5)	31 (39.5)	0	$\chi^2=3.658$ ($P<0.05$)
SXG					
1	0	7	0	7	
2	0	2	0	3	
3	0	3	0	9	
4	0	17	0	12	
	0	29 (30.0)	0	31 (30.0)	$\chi^2=0.067$ ($P<0.05$)

The number in the parenthesis represent expected number of individuals.

有無を調べた。この時の処理条件は、生後 180 日目まで飼育を行い、雌を更に 30 日間 100 ng/ml メチルテストステロン飼育水で飼育し、コブラ斑の出現の有無を確認した。

結 果

1) G 系統と S 系統間での交配実験 G 系統と S 系統との交配実験の結果を Table 1 に示す。S 系統を雌親、G 系統を雄親とした交配を 16 組、逆

に G 系統を雌親、S 系統を雄親とした交配を 4 組み作った。その結果、S 系統を雌親、G 系統を雄親とした交配から、雌 48 個体、雄 31 個体の合計 79 個体が得られ、雌雄比はほぼ 1:1 であった。雌個体全てでコブラ斑は観察されず、雄では全ての個体でコブラ斑が観察された。逆に、G 系統を雌親、S 系統を雄親とした交配から雌 29 個体、雄 31 個体の合計 60 個体が得られ、雌雄の比率はほぼ 1:1 であった。雌雄ともにコブラ斑は観察されなかった。この結果は G 系統の *Cbr* が Y 染色体上に存在することを示唆している。

2) G 系統における雌のメチルテストステロン処理 G 系統の雌個体の X 染色体上にコブラ斑遺伝子が存在するかどうかを明らかにするために、G 系統の雌にメチルテストステロン処理を行った (Table 2)。全ての処理区においてコブラ斑の出現した雌は観察されず、形態的に雄化していた個体においてもコブラ斑は観察されなかった。

3) G 系統における交配実験 G 系統で 34 組の交配を行ったところ、雌 223 個体、雄 204 個体の計 427 個体が得られ、このうち 4 ペアから得られた雄にコブラ斑の無い個体がそれぞれ 1 個体、計

Table 2. The presence and absence of the cobra pattern in female individuals of the G strain which treated at 60 days by methyltestosterone from 60 days after birth.

Concentration of teststeron	Survival rate (%)	Sex reverse rate (%)	Existance of cobra pattern	
			Presence	Absence
1 ng/ml	96.6	0.0	0	28
10 ng/ml	100.0	22.2	0	36
100 ng/ml	89.7	100.0	0	26



Fig.2. The male guppy which does not have cobra pattern observed in G strain (a) and common male individual in G strain (b).

Table 3. Presence and absence of the cobra pattern in the individuals which obtained from mating of the G strain. Females were treated by 100 ng/ml methyltestosterone at 30 days from 180 days after birth.

No. of pair	Existance of cobra pattern			
	Female		Male	
	Presence	Absence	Presence	Absence
1	0	7	3	0
2	(1)	18	21	1
3	0	3	3	0
4	0	4	4	0
5	0	5	12	0
6	0	12	12	0
7	0	6	3	0
8	0	4	5	0
9	0	3	1	0
10	(1)	10	10	1
11	0	6	4	0
12	0	5	5	0
13	0	5	2	0
14	0	4	5	0
15	0	8	2	0
16	(1)	10	12	1
17	0	7	1	0
18	0	16	12	0
19	0	6	4	0
20	0	7	6	0
21	0	3	3	0
22	0	6	4	0
23	0	2	6	0
24	0	4	3	0
25	0	6	3	0
26	0	6	8	0
27	0	8	8	0
28	(1)	9	9	1
29	0	5	5	0
30	0	5	4	0
31	0	7	3	0
32	0	4	6	0
33	0	3	6	0
34	0	5	5	0
Total	(4)	219	200	4

Within parenthesis represents number of females which observed cobra pattern after 30 days methyltestosterone treatment.

4 個体観察された (Fig.2、Table 3)。雌雄比はほぼ 1:1 であった。そこで、雌にメチルテストステロン処理したところ、コブラ斑の無い雄が観察されたペアからそれぞれ 1 個体、計 4 個体の雌でコブラ斑が出現した (Fig.3)。これら 4 個体の雌は *Cbr* を有していたものの性ホルモンによる制御により *Cbr* が発現していなかったものと考えられる。

Y 染色体上に雄決定遺伝子を仮定し、雄決定遺伝子と *Cbr* との間での組み換え率を計算すると 1.9% であった。

考 察

今回の交配実験で観察されたコブラ斑の無い雄個体、およびコブラ斑を有する雌個体の出現は X 染色体と Y 染色体との組み換えによる可能性が示された。グッピーの性染色体上には色彩や模様に関与する遺伝子の他に *Ak-2*、*Mdh-4* などのアイソザイム遺伝子、低温耐性遺伝子などが存在することが報告されており、これらの遺伝子座においても X と Y 染色体間での組み換えの可能性が示唆されている¹¹⁻¹³⁾。Y 染色体上には X 染色体とは相同ではない部分が存在し、この部分に雄決定

遺伝子が存在するとされている。雄決定遺伝子と *Cbr* との間での組み換え率は 1.9% であった。グッピーにおける Y 染色体の全長は明らかにされていないが、ヒトやマウス、ゼブラフィッシュで報告されている染色体地図と比較すると組み換え率 1.9% は非常に近い距離に位置することになる¹⁴⁻¹⁶⁾。性染色体上の色彩や模様に関与する 6 遺伝子座 (*Ma*、*Co*、*Ti*、*Lu*、*Vi*、*El*) について染色体地図が作成されている^{5,17)} (Fig.4)。これら 6 遺伝子座は *Ma* が Y 染色体上の X 染色体とは相同ではない部分に存在し、*Co*、*Ti*、*Lu*、*Vi*、*El* の 5 遺伝子座は相同な部分に存在し、X、Y 両方の染色体上に存在している。このうち *Co* が最も非相同部分に近い位置に存在するとしている。*Cbr* をこの地図に当てはめてみると、非相同部分からの組み換え率が 1.9% と *Co* 遺伝子よりも非相同部分からやや離れた部分に位置していることになる。しかし、正確な位置関係の決定にはこれらの遺伝子間での直接の組み換え率を求める必要がある。

グッピーには性染色体以外の常染色体上にも性決定に関与する遺伝子が存在することが示唆されており、選択により XY 雌や XX 雄が作出されて

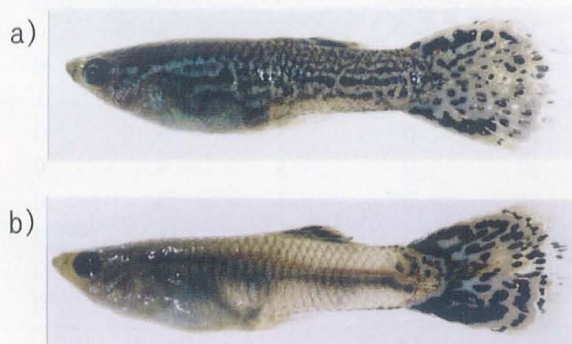


Fig.3. The female guppy in which cobra pattern was observed after 100 ng/ml methyltestosterone treatment for 30 days (a) and cobra pattern was not observed (b).

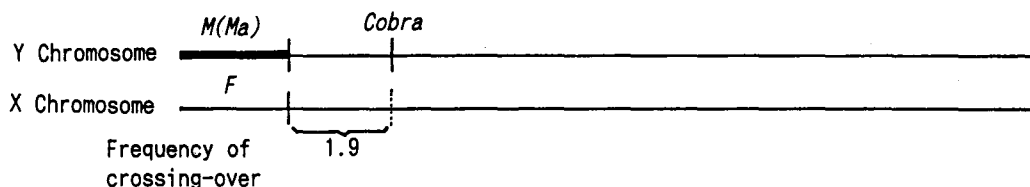
転換させたXY雌やXX雄が作出されている^{18,19)}。XX雄ではY染色体上の遺伝子は発現せず、通常のXX雌との交配で得られる仔魚は雌のみである。今回の実験で出現したコブラ斑無し雄は生殖可能で、その子孫に雄個体が観察されていることから、コブラ斑無し雄はXX雄ではないと考えられる。また、G系統において雌をメチルテストステロン処理したときにコブラ斑の出現した雌は観察されなかった。このことは、系統内で*Cbr*を持つ雌の頻度が非常に低いことを示している。Winge and Ditlevsen⁴⁾はY染色体上の遺伝子である*Ma*をホモで持つY^{Ma}Y^{Ma}雄が致死であることを示し、Y染色体上に劣性致死遺伝子が存在している可能性を示唆している。このことから、G系統内で*Cbr*を持つ雌の頻度が低い原因として、以下の二つの可能性が考えられる。一つは、*Cbr*

がY染色体上の劣性致死遺伝子と連鎖しているためにX^{Cbr}Y^{Cbr}雄が致死となりX^{Cbr}の頻度が低下してしまう可能性が考えられる。もう一つは、X^{Cbr}X雌が不妊であるために*Cbr*が集団中に残らない可能性である。このことを明らかにするためには、X^{Cbr}X雌を用いて交配実験を行う必要がある。

要 約

グッピーにおけるコブラ斑の遺伝支配と発現を交配実験から調べた。コブラ斑を持つG系統とコブラ斑を持たないS系統との交配実験の結果、G系統を雄親とした場合の雄にのみコブラ斑が観察された。また、G系統の雌を雄性ホルモン（メチルテストステロン）処理してもコブラ斑は観察されなかった。以上のことからG系統のY染色

Present study



Winge(1934), Winge and Ditlevsen(1938)

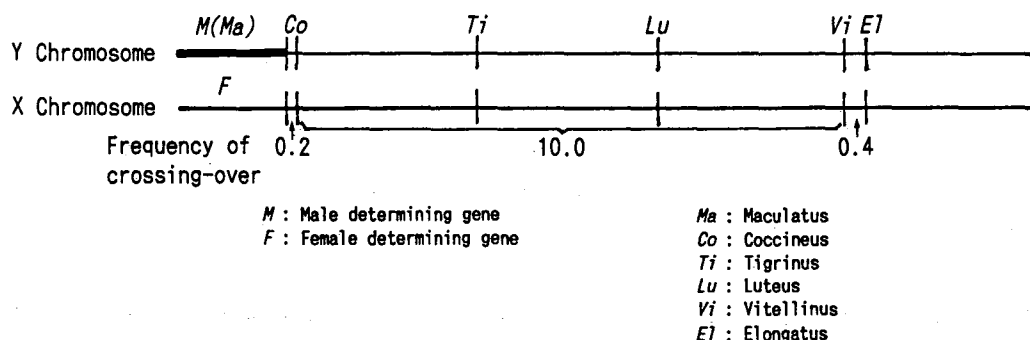


Fig.4. A chromosome map of cobra pattern and male determining gene on Y-chromosome in this study (above) and comparison with chromosome map by Winge (1934), and Winge and Ditlevsen (1938) (below).

体上にコブラ斑遺伝子 (*Cbr*) が存在していることがわかった。

G 系統で交配実験を行ったところ、得られた雄 204 個体中 4 個体でコブラ斑が観察されなかった。雌をメチルテストステロン処理したところ、コブラ斑無し雄の観察された交配の同腹の 4 個体の雌でコブラ斑が観察された。以上の結果から、コブラ斑無し雄の出現は X 染色体と Y 染色体との間での組み換えによると考えられる。Y 染色体上に

雄決定遺伝子を仮定した場合、*Cbr* との間の組み換え率は 1.9% であった。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金「水族における遺伝資源の存在様式と保存に関する遺伝学的研究」(課題番号 08406014) によった。

文 献

- 1) Macaranas M.J. and Y. Fujio (1987) Genetic differences among strains of the guppy, *Poecilia reticulata*. Tohoku J. Agr. Res., 37 : 75-85.
- 2) Ueshima G., M. Nakajima and Y. Fujio (1998) A study on the inheritance of body color and chromatophores in the guppy *Poecilia reticulata*. Tohoku J. Agr. Res., 48 : 111-122.
- 3) Schmidt J. (1919) Racial investigations. III. Experiments with *Lebistes reticulatus* (Peters). Compt. Rend Trav. Lab. Carlsberg, 14 : 1-14.
- 4) Winge Ö. (1922) One-sided masculine and sex-linked inheritance in *Lebistes reticulatus*. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 14 : 1-20.
- 5) Winge Ö. and E. Ditlevsen (1938) A lethal gene in the Y chromosome of *Lebistes*. Compt. Rend. Lab. Carlsberg Ser. Physiol., 22 : 203-211.
- 6) Winge Ö. and E. Ditlevsen (1948) Colour inheritance and sex determination in *Lebistes*. Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, 24 : 227 - 248.
- 7) Dzwillo B. (1962) Über künstliche Erzeugung funktioneller Männchen weiblichen Genotypes bei *Lebistes reticulatus*. Biol. Zentralbl, 81 : 575-584.
- 8) Dzwillo M. (1966) Über den Einfluss von Methyltestosteron auf primäre und sekundäre Geschlechtsmerkmale während verschiedener Phasen der Embryonalentwicklung von *Lebistes reticulatus*. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Jena, 29 : 471-476.
- 9) Haskins C. P., P. Young, R. E. Hewitt and E. F. Haskins (1970) Stabilized heterozygosis of supergenes mediating certain Y-linked colour patterns of *Lebistes reticulatus*. Heredity, 25 : 575-589.
- 10) Phang V. P. E., L. N. Ng and A. A. Fernando (1989) Inheritance of the snakeskin color pattern in the guppy, *Poecilia reticulata*. J. Heredity, 80 : 393-399.
- 11) Fujio Y. and M.J. Macaranas (1989) Detection of a null allele for MDH isozymes in the guppy (*Poecilia reticulata*), with special reference to sex-linked inheritance. Jpn. J. Genet., 64 : 347-354.
- 12) Barinova A. A., M. Nakajima and Y. Fujio (1998) Polymorphism of a null allele for AK and MDH isozymes in the guppy *Poecilia reticulata*, with a partial sex-linked inheritance. Tohoku J. Agr. Res., 49 : 1-9.

-
- 13) Fujio Y., M. Nakajima and Y. Nagahama (1990) Detection of a low temperature-resistant gene in the guppy (*Poecilia reticulata*), with a reference to sex-linked inheritance. *Jpn. J. Genet.*, 65 : 201–207.
 - 14) Dietrich W. F., J. C. Miller, R. G. Steen, M. Merchant, D. Damron, R. Nahf, A. Gross, D. C. Joyce, M. Wessel, R. D. Dredge, A. Marquis, L. D. Stein, N. Goodman, D. C. Page and E. S. Lander (1994) A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nature Genetics*, 7 : 220–245.
 - 15) Gyapay G., J. Morissette, A. Vignal, C. Dib, C. Fizames, P. Millasseau, S. Marc, G. Bernardi, M. Lathrop and J. Weissenbach (1994) The 1993–94 G  n  thon human genetic linkage map. *Nature Genetics*, 7 : 246–339.
 - 16) Kanapik E. W., A. Goodman, M. Ekker, M. Chevrette, J. Delgado, S. Neuhauss, N. Shimoda, W. Driever, M. C. Fishman and H. Jacob (1998) A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genet.*, 18 : 338–343.
 - 17) Winge   . (1934) The experimental alteration of sex chromosomes into autosomes and vice versa, as illustrated by *Lebustes*. *Compt. Rend. Lab. Carlsberg Ser. Physiol.*, 21 : 1–49.
 - 18) Takahashi H. (1975 a) Masculinization of the gonad of juvenile guppy, *Poecilia reticulata*, induced by 11-ketotestosterone. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 26 : 11–22.
 - 19) Takahashi H. (1975 b) Functional feminization of genetic males of the guppy, *Poecilia reticulata*, treated with estrogen after birth. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 26 : 223–234.

グッピーの系統の塩分耐性と系統間交雑による F₁の塩分耐性との関係

中立元樹・藤尾芳久 (東北大・農)

Relationship of Salinity Tolerance Between Strains and Their F₁ Hybrids of Guppy

Motoki NAKADATE and Yoshihisa FUJIO

Faculty of Agriculture, Tohoku University

Abstract

Salinity response in strains and their F₁ hybrids of the guppy was measured as survival time after subjecting mature fish to 35 ppt artificial seawater. In almost of the parental combinations, the averages of survival times of the F₁ hybrids were higher than the higher value of the parental strains, thus indicating heterosis. The coefficient of variance (CV) in survival times of F₁ hybrids differed among strain combinations, and the value was sometimes higher than the highest value of the parent strain.

A positive correlation was observed between the CV of the total F₁ hybrids and the CV of the average survival times in each litter of F₁ hybrids. It suggests that the heterosis observed in the F₁ hybrids is attributable to the litters of each parental combination.

(accepted 26 May 1998)

育種的観点からみたヘテロシスの特徴は、ある望まれた形質の測定値がその両親よりも大きくなっている点と、そのF₁雑種の統一性にある。理論的には2つの異なる近交系間の交雑によって作られたF₁雑種には、遺伝分散が全くないと考えられる。したがって両親としたそれぞれの系統のホモ化が進んでいると、その雑種にはほとんど表現型の個体差がなくなっていることになる。

前報¹⁾で、グッピーの系統間交雑によって塩分耐性にヘテロシスがみられることを明らかにした。しかし、系統の組合せによってヘテロシスの程度が異なり、死亡時間のばらつきがみられている。このことは両親としたそれぞれの系統の遺伝的背景に起因していると考えられる。したがって、F₁

雑種の表現型のばらつきの要因について検討する必要がある。

本研究は、グッピー系統の塩分耐性と系統間交雑によるF₁雑種の塩分耐性との関係を明らかにするために、35 ppt 人工海水浸漬後の平均死亡時間と変異係数を調べ、F₁雑種における死亡時間のばらつきの要因について検討した。

材料と方法

実験に用いたグッピーは、本研究室でクローズドコロニーとして継代飼育されている5系統とそれらのF₁雑種である。5系統はS, S3 HL, SC, A, F22で、S, S3 HL, SC, Aが小型系、F22が大型系である。S系統は1975年にペットショップよ

り購入したスタンダードタイプを起源としており、S3HL系統はS系統を半分に分けて作成した系統(S3)を用いて、1990年に35℃の高温耐性実験を行い、24時間生き残っていた個体が起源となっている。SC系統は、1985年にS系統の雌にコブラタイプの雄をかけて得られたF₁を起源としている。F22系統は、ファンシー系のF系統の1ペア1産の仔魚を起源としており、1991年に作成された。A系統は1991年にアルビノとコブラタイプ(大型系)の雑種を購入し、その子孫の中からアルビノを選択したものである。それぞれの系統は60ℓ水槽において水温23±2℃で飼育されている。F₁雑種は、処女雌に1尾の雄をかけ、生まれた仔魚を成魚になるまで2.5ℓ水槽で育成した。

塩分耐性については、標準体長14mm以上(生

Table 1. Average survival time in 35 ppt seawater in five strains of guppy

Strain	N	Avarage survival time(h) ±S.D.	C.V.(%)
S3HL	120	4.1±1.3	31.7
S	50	3.8±0.8	21.1
F22	132	3.7±1.1	29.7
A	119	2.9±0.8	27.6
SC	107	2.7±0.8	29.6

N : Number of individuals tested.
C.V. : Coefficient of variation

Table 2. Average survival time in 35 ppt seawater in F₁ hybrids from 16 crosses between different strains of guppy

Cross (Female x Male)	Number of crosses	Total number of F1 hybrid tested	Average survival time (h)±S.D.	C.V.(%)
SC x F22	9	84	6.0±2.1	34.6
F22 x SC	10	230	5.3±1.5	28.5
F22 x S3HL	21	220	5.6±2.0	35.0
S3HL x F22	9	79	4.7±1.8	38.5
F22 x S	11	217	5.5±1.9	34.3
S x F22	8	116	5.2±1.3	25.2
F22 x A	7	71	4.9±1.2	24.1
A x F22	2	40	4.3±1.1	25.5
A x S	4	70	4.7±1.0	21.9
S x A	8	115	4.2±1.1	25.1
A x SC	5	85	4.5±1.1	25.0
SC x A	5	67	4.2±1.1	27.5
SC x S	11	170	4.1±1.0	25.1
S x SC	13	248	3.8±1.3	33.7
S x S3HL	4	62	4.1±2.0	48.4
S3HL x S	6	151	3.6±1.4	37.9

後 60 日以上) の個体を用いた。このような個体では雌雄や体長による違いがみられないことが明らかにされている²⁾。塩分耐性実験は飼育水で作成した 35 ppt 人工海水 (Aquasalt) に供試魚を入れて行った。人工海水浸漬後、30 分ごとに生死判定を行い、死亡時間を塩分耐性の指標とした。生死判定は鰓の動きと外部からの刺激に対する反応の有無で行った。死亡個体はその都度取り上げた。

結 果

交雑に用いたグッピーの親系統の成魚における塩分耐性を Table 1 に示す。親系統の平均死亡時間は、2.7 時間から 4.1 時間で、その変異係数 (CV) は 21.1% から 31.7% であった。これらの親系統を用いて作成した F_1 雑種の塩分耐性を Table 2 に示す。平均死亡時間は 3.6 時間から 6.0 時間となり、その CV は 21.9% から 48.4% であ

った。各組合せにおける両親系統のうちで、平均死亡時間の長い親系統の値とそれらの F_1 雑種の平均死亡時間をみてみると、親系統の平均死亡時間より F_1 の平均死亡時間が長く、ヘテロシスを示した組合せは 16 組中 13 組であった。これらの 13 組中には正逆交雑が含まれていた。一方、 $SC \times S$ ではヘテロシスがみられたが、 $S \times SC$ は親系統の値と同じであった。 $S \times S$ 3 HL では親系統と同じ平均死亡時間を示し、 S 3 HL $\times S$ では親系統の平均死亡時間より短くなっていた。このことは系統間交雑によってもたらされるヘテロシス効果が系統の組合せによって異なることを示唆している。

死亡時間のばらつきを CV で比較すると、親系統で最大の CV を示した S 3 HL の 31.7% よりも大きな値を示した F_1 雑種は 16 組のうち 7 組であった。このような F_1 雑種でのばらつきが、親個体の組合せに起因しているのかどうかを検討する

Table 3. Average survival time and the coefficient of variation (C.V.) among litters in 16 F_1 hybrids of guppy

Cross (Female x Male)	Number of crosses	Average no. of fish tested within a litter	Average survival time (h) (Range)	C.V. (%)
SC x F22	9	9.3	5.7 (3.4-7.5)	24.6
F22 x SC	10	23.0	5.3 (3.3-6.5)	17.0
F22 x S3HL	21	10.5	5.4 (3.2-6.6)	16.7
S3HL x F22	9	17.5	4.4 (3.2-6.9)	18.2
F22 x S	11	19.7	5.5 (3.8-7.9)	21.8
S x F22	8	14.5	5.3 (4.0-6.0)	9.4
F22 x A	7	10.1	4.9 (4.0-5.9)	14.3
A x F22	2	20.0	4.4 (4.2-4.6)	6.8
A x S	4	8.8	5.2 (3.3-5.1)	23.1
S x A	8	14.4	4.3 (3.0-5.1)	16.3
A x SC	5	17.0	4.4 (3.7-5.1)	13.6
SC x A	5	13.4	4.3 (3.6-4.8)	14.0
SC x S	11	15.5	4.0 (2.8-5.8)	20.0
S x SC	13	19.1	3.8 (2.5-5.2)	21.1
S x S3HL	4	15.5	3.6 (1.9-6.0)	44.4
S3HL x S	6	25.2	3.7 (2.8-4.9)	24.3

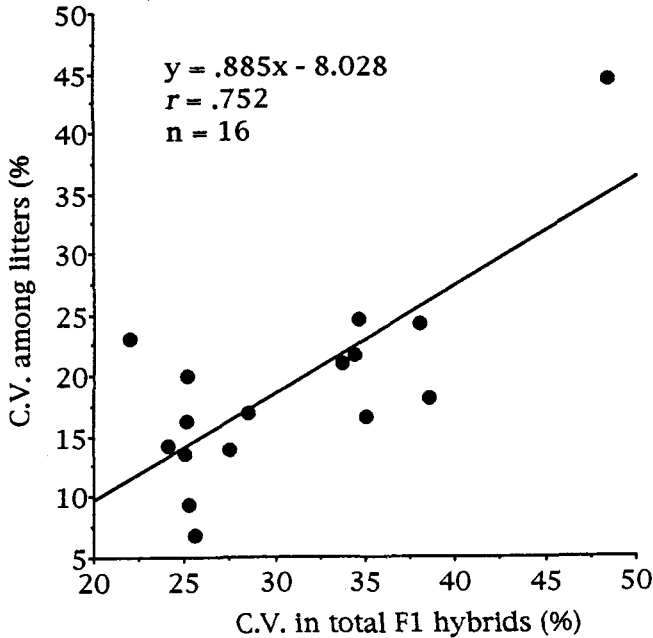


Fig.1. Relationship between the coefficient of variation in total F_1 hybrids and that among litters

ために、各交雑ごとに得られた兄妹 (litter) の平均死亡時間を求めた。その結果、Table 3 に示すように、親個体の組合せによって平均死亡時間に大きな幅があることが明らかになった。例えば、SC×F 22 では死亡時間が 3.4 時間から 7.5 時間 (平均 5.7 時間) で、その正逆交雑では 3.3 時間から 6.5 時間であった。したがって、 F_1 雑種での CV の大小は親個体の組合せに影響されていることが予測される。そこで、 F_1 雑種の平均死亡時間の CV と 1 組の両親からの兄妹の平均死亡時間の CV とを比較すると、Fig.1 に示すように、正の相関 ($r = 0.752$) が得られ、 F_1 雑種でのばらつきは親個体の組合せによってもたらされていることが示された。

系統の組合せによってヘテロシスの生じ方が異なることが示され、同一の系統間交雑においても親個体の組合せによってヘテロシスの生じ方が異なっていることが示された。そこで、各系統間交

雑における親個体の組合せによってヘテロシス効果がみられた組合せ数を求めた。その結果、Table 4 に示すように、ヘテロシス効果の顕著であった系統間交雑では 80% 以上の親個体の組合せでヘテロシス効果がみられた。一方、ヘテロシス効果が顕著にみられなかった系統間交雑でのヘテロシスのみられた親個体の組合せは 50% 前後であった。

考 察

一般に、ヘテロシス効果は F_1 の形質が両親のいずれよりもすぐれ、表現型変異が小さくなるという特徴をもっている。ヘテロシス効果は組合せによってその程度が異なってくることが知られており、その組合せ能力が問題となる。

本研究で用いたグッピー系統はクローズドコロニーとして継代飼育されており、それぞれの系統は互いに異なった遺伝的組成をもっていると考え

Table 4. Heterosis and combining ability in the cross between the guppy strains

Cross*	No. of crosses	Average survival time of the parent strain (higher value)	Number of the cross showed heterosis	%
SC x F22	19	3.7	17	89.5
F22 x S3HL	30	4.1	26	86.7
F22 x S	19	3.8	19	100.0
F22 x A	9	3.7	9	100.0
A x S	12	3.8	10	83.3
A x SC	10	2.9	10	100.0
SC x S	24	3.8	13	52.2
S x S3HL	10	4.1	4	40.0

*Combined the reciprocal crosses.

られる。これに関して、Macaranas and Fujio³⁾はグッピー8系統間で27アイソザイム遺伝子を調べ、系統によって遺伝子頻度が異なり、特に大型系統と小型系統ではNeiの遺伝的距離が0.0416と遺伝的分化が大きいことを報告している。本研究では、大型系と小型系の系統間交雑により得られたF₁雑種で顕著なヘテロシス効果が認められた。このことは、遺伝的分化が大きい系統間でヘテロシス効果が顕著であることを示している。逆に小型系と小型系の交雑すなわち、SC, S3HL, S系統の交雑ではヘテロシス効果のみられる割合が低かったことは、これら3系統が同じ元系統に由来していること、すなわち互いに血縁関係を有することに起因していると考えられる。A系統とS系統、およびSC系統との交雑でヘテロシス効果が大きかったことは、小型系同士でもA系統がS, SC系統とは血縁関係を有していないことによると考えられる。

ヘテロシス効果が親個体の組合せによって異なり、さらに系統間交雑における表現型のばらつき

が親個体の組合せによっても異なることが示された。特に、元集団を同じくする系統間交雑でも、頻度は低いが、ヘテロシス効果がみられることが示された。このことはヘテロシス効果が系統内にも存在することを示唆している。この点については、同一の系統内での雌雄一対交配によるヘテロシス効果を詳しく調べる必要があると考えられる。

要 約

淡水魚グッピーの系統とそれらのF₁雑種の塩分耐性を人工海水35 ppt浸漬後の死亡時間で調べた。その結果、F₁雑種の平均死亡時間は多くの組合せで両親系統のうちで平均死亡時間の長い親系統の値より長くなり、ヘテロシス効果がみられた。しかし、ヘテロシス効果のない組合せもみられたことから、ヘテロシス効果は系統の組合せ方によって異なることが示唆された。さらに、F₁雑種の平均死亡時間にばらつきがみられ、その原因が親個体の組合せ方によることが考えられた。

文 献

- 1) Shikano, T., M. Nakadate, M. Nakajima, and Y. Fujio (1997) Heterosis and maternal effects in salinity tolerance of the guppy, *Poecilia reticulata*. Fisheries Science, 63 : 893–896.
- 2) 鹿野隆人・藤尾芳久 (1994) ゲッピーにおける塩分耐性の系統差について. 水産育種, 20 : 47–53.
- 3) Macaranas, J. M. and Y. Fujio (1987) Genetic differences among strains of the guppy, *Poecilia reticulata*. Tohoku J. Agr. Res., 37 : 75–85.

ヒラメ mtDNA Dループ領域の RFLP 分析によるハプロタイプの検出

菅谷琢磨・池田 実・藤尾芳久 (東北大・農)

Typing of mtDNA in the Japanese Flounder Based on the Length
Variation and the RFLP Analysis of mtDNA D-loop Region

Takuma SUGAYA, Minoru IKEDA and Yoshihisa FUJIO

Faculty of Agriculture, Tohoku University

Abstract

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was performed on PCR amplified DNA fragments which contains whole of the mtDNA D-loop region of natural and seed specimens of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). The amplified DNA fragments showed length variations and were classified into five classes; class I (3.3 kbp), II (2.9 kbp), III (2.8 kbp), IV (2.7 kbp), and V (2.6 kbp). RFLP with three endonucleases (*Hind* III, *Hpa* II, and *Hae* III) in each class yielded a total of 11 composite haplotypes. The haplotype diversity (h) within the natural and seed specimens were 0.857 and 0.679, respectively. These results suggest that the mtDNA typing based on the combination of length variation and RFLP of D-loop region is useful to monitor genetic variation in the Japanese flounder populations.

(accepted 8 June 1998)

ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) は海産増養殖種として重要な位置を占め、全国各地で人工種苗の放流が盛んに行われている。このことに関連して、Liu ら¹⁾ はアイソザイム分析によりヒラメの天然集団と人工種苗の遺伝的組成を比較し、低頻度対立遺伝子のふれが天然集団の地域間に比べ人工種苗の生産ロット間で大きいことを見出した。この要因として人工種苗の親魚数が天然集団に比べ少ないために起こる遺伝子の抽出誤差が考えられることを報告している。この例が示すように、種苗の放流が天然ヒラメの遺伝的組成を変化させてしまうことが懸念されるようになった。しかし、ヒラメのアイソザイム遺伝子の変異は少なく、上記の可能性についてさらに詳しく検討するために

は変異性の高い遺伝標識を用いた天然および人工種苗の遺伝的組成の比較が必要であると考えられる。高等動物のミトコンドリア DNA (mtDNA) の進化速度は核 DNA の 5~10 倍大きいとされ、多くの変異が蓄積されており、集団遺伝学的研究を行う上での遺伝標識としてきわめて有効であると考えられている^{2,3)}。さらに、mtDNA の複製に関わる D ループ領域はコードするタンパク質や RNA がなく、他のコーディング領域に比べ進化速度が約 4 倍速いとされている⁴⁾。このような観点から、多くの魚種において、天然集団の遺伝的集団構造や、人工種苗における遺伝的特徴の把握が mtDNA の D ループの制限酵素切断片長多型 (RFLP) を利用したハプロタイプ頻度の比較に

より検討されるようになった⁵⁾。

また、ヒラメの属する異体類の mtDNA D ループ領域には著しいサイズ変異が存在することが報告されており⁶⁾、ヒラメ自体にも D ループ領域のサイズ変異が存在することがすることが明らかにされている⁷⁾。D ループのサイズ変異のみによって mtDNA のハプロタイプを類別することも可能と考えられるが、サイズ変異を伴った D ループの RFLP を検討することによって、さらに多くのハプロタイプに分けることができ、人工種苗を含めたヒラメ集団の遺伝的特徴をより詳細に把握することができると考えられる。

本研究は、ヒラメ mtDNA の D ループの RFLP による集団の変異性に関する基礎的知見を得るために、ヒラメの mtDNA の D ループ領域のサイズ変異を PCR 法により検出した。さらに、増幅された D ループ領域の RFLP を行い、サイズ変異と RFLP を組み合わせることによるハプロタイプの類別化について検討し、天然集団と人工種苗の遺伝的組成について検討を行った。

材料と方法

実験に用いたヒラメは、1996 年 11 月に秋田県天王漁港で水揚げされた天然個体 14 個体（平均標準体長 30.0 cm）と、1996 年 4 月に秋田県栽培漁業センターで生産された人工種苗 23 個体（平均標準体長 19.4 cm）である。

各個体からの DNA の抽出は、尾動脈から約 50 μ l 採血し、Sepa Gene キット（三共純薬社）を用いて行った。抽出した DNA は TE バッファー（10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA $\cdot$ 2 Na）に溶解し、PCR の試料とした。

mtDNA の D ループの増幅には、D ループ領域が 12 S rRNA と cytochrome *b* に挟まれるように設計された H 1067 : 5'-ATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTT-3' と L 15560 : 5'-CATATTAAACCCGAATGATATTT-3' の 2 種類のプライマー^{8,9)}を用いた。PCR の反応条件は、DNA 6 μ l、200 mM プライマー各 1 μ l、dNTP 5 μ l、10 $\times$ PCR Buffer 5 μ l、UPW 30 μ l、Takara Taq Polymerase 1 μ l、Dilution Buffer 1 μ l とし、DNA Thermal Cycler (TaKaRa) を用いて、94 $^{\circ}$ C 1 分の熱変性後、93 $^{\circ}$ C 1 分、45 $^{\circ}$ C 2 分、72 $^{\circ}$ C 2 分を 30 サ

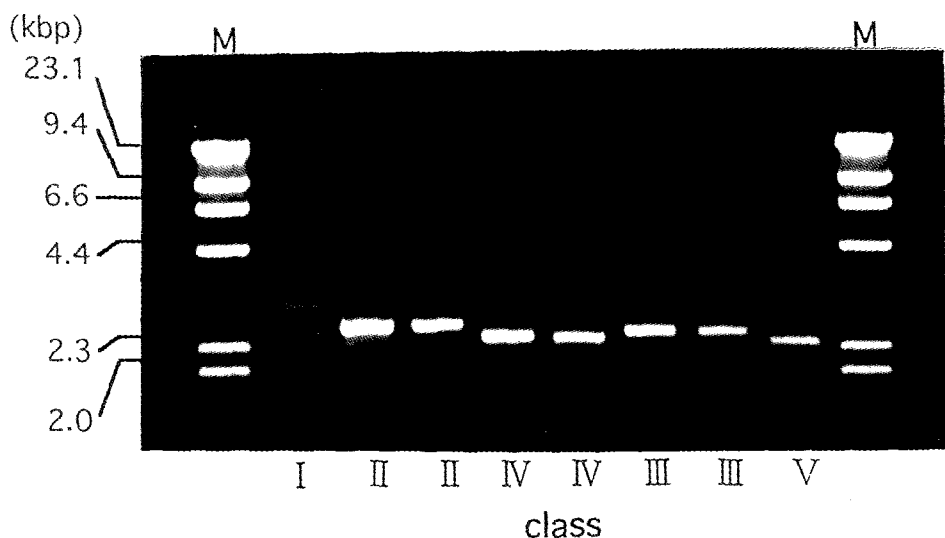


Fig.1. Amplified DNA fragments of the mtDNA D-loop region in the Japanese flounder
 class I : 3.3 kbp class II : 2.9 kbp class III : 2.8 kbp
 class IV : 2.7 kbp class V : 2.6 kbp

イクル行い、最後に 72℃ で 7 分の伸長反応を行った。

反応液は、0.8% アガロースゲルで 50 V 定電圧 1.5 時間の電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマイドで染色してトランスイルミネータ上に写真撮影を行い、写真上において増幅された D ループ領域のサイズを求めた。

D ループの消化は、4 塩基認識の *Hpa* II、*Hae* III、6 塩基認識の *Hind* III の 3 つの制限酵素を用いて行った。各制限酵素の処理条件は添付されている処方に従った。切断片の検出は、2% アガロースゲルにより 50 V 定電圧、1.5 時間の電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、写真撮影によって行った。

結 果

D ループ領域のサイズ変異 天然集団における各個体の D ループ領域を増幅した結果、増幅断片のサイズに変異がみられた (Fig.1)。各断片のサイズをサイズマーカー (λ DNA/*Hind* III) との比較により求めたところ、3.3 kbp、2.9 kbp、2.8 kbp、2.7 kbp、2.6 kbp の 5 つのクラスに分類でき、それぞれクラス I、II、III、IV、V とした。

天然集団と人工種苗との間で、それぞれのクラ

スの頻度を比較した結果、Table 1 に示すように、天然集団ではクラス IV の頻度が 0.354 と最も高く、クラス I や V は低頻度 (0.071) であった。一方、人工種苗では、天然集団で高頻度であったクラス IV がさらに高頻度 (0.783) となっており、天然集団にみられたクラス I や V が検出されなかった。

D ループ領域の RFLP それぞれのクラスごとに 3 種類の制限酵素で消化を行った結果を Fig.2 に示す。どのクラスにおいても 1.0 kbp 以下の断片については検出されなかった。クラス I とクラス V においては、どの制限酵素においてもそれぞれ 1 種類の切断型しか観察できなかったが、クラス II の *Hae* III と *Hpa* II、クラス III の *Hind* III においては、それぞれ 2 種類の切断型が観察された。切断型の命名は各クラスごとに行い、各切断型で検出された断片長を求めた結果を Table 2 に示す。クラス II、クラス III、クラス IV、クラス V の各クラスにおける *Hind* III による切断型 A を除いて、どの制限酵素の切断型においても観察された切断片のサイズの合計はもとの D ループ領域のサイズより小さくなっていた。これは、どのクラスにおいても各制限酵素によって少なくとも 2 カ所以上の部位が切断され、得られた切断片の位置に複数の断片が重なっているか、あるいは、断片サイ

Table 1. Frequencies of five mtDNA D-loop classes in natural and seed specimens of the Japanese flounder

class	specimens	
	natural(14)	seed(23)
I	0.071	0
II	0.214	0.087
III	0.286	0.130
IV	0.358	0.783
V	0.071	0

sample sizes indicated in parentheses.

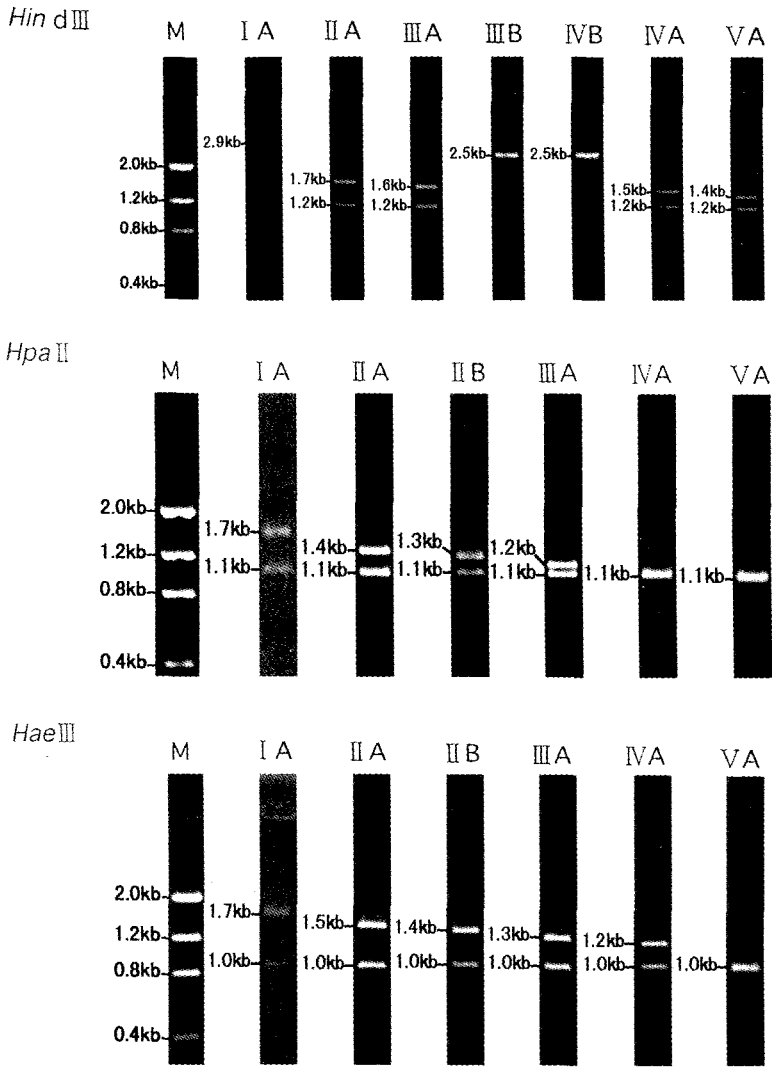


Fig.2. Restriction fragments of the mtDNA D-loop region in the Japanese flounder. The PCR products were digested with *Hind* III, *Hpa* II, and *Hae* III, respectively.

ズが本研究における泳動条件では検出できない小さなものになっているためと考えられた。

調べたすべての個体における D ループのサイズと各制限酵素における切断型を組み合わせた結果、ハプロタイプの数はいくつかのクラスで 1 種類 (I-1)、クラス II で 4 種類 (II-1~II-4)、クラス III で 3 種類 (III-1~III-3)、クラス IV で 2 種類

(IV-1、IV-2)、クラス V で 1 種類の計 11 種類となった (Table 3)。

天然集団と人工育苗とで各ハプロタイプの頻度を比較した結果を Table 4 に示す。天然集団にはみられない 3 種類のハプロタイプ (II-3、II-4、III-3) が人工育苗にみられたが、天然集団で低頻度でみられたハプロタイプ 5 種類 (I-1、II

Table 2. Restriction morph of each class of D-loop region in the Japanese flounder mtDNA

class(kbp)	restriction morph		
	<i>Hind</i> Ⅲ	<i>Hpa</i> Ⅱ	<i>Hae</i> Ⅲ
class I (3.3)	A (2.9)	A (1.7,1.1)	A (1.7,1.0)
class II (2.9)	A (1.7,1.2)	A (1.4,1.1)	A (1.5,1.0)
		B (1.3,1.1)	B (1.4,1.0)
classⅢ(2.8)	A (1.6,1.2)	A (1.2,1.1)	A (1.3,1.0)
	B (2.5)		
classⅣ(2.7)	A (1.5,1.2)	A (1.1)	A (1.2,1.0)
	B (2.5)		
classⅤ(2.6)	A (1.4,1.2)	A (1.1)	A (1.0)

Size (kbp) of fragments observed in each restriction morph indicated in parentheses.

ー1、Ⅱー2、Ⅲー1、Ⅴー1) が人工種苗ではみられず、人工種苗ではⅣー1 とⅣー2 が天然集団に比べ高頻度となっていた。各ハプロタイプの頻度からハプロタイプ多様度(h)¹⁰⁾を求めた結果、天然集団で0.857、人工種苗で0.679となり、人工種苗の方が小さな値を示した。

考 察

Saitoh *et al.*⁷⁾は全 mtDNA の制限酵素地図と D ループの一部の領域の PCR 分析によりヒラメの mtDNA における D ループ領域のサイズ変異の存在を明らかにし、サイズ変異は約 1.70 kbp、1.56 kbp、1.50 kbp、1.41 kbp の 4 クラスであることを報告した。本研究においても、D ループ領域のすべてが挟み込まれるように設計されたプライマーを用いて PCR を行い、D ループ領域にサイズ変異が存在することを再確認できた。本研究におけるサイズ変異は、約 3.3 kbp、2.9 kbp、2.8 kbp、2.7

kbp、2.6 kbp の 5 クラスとなり、Saitoh *et al.*⁷⁾の推定したサイズとは異なっていたが、これは D ループの一部を増幅したか、全領域を増幅したかの違いによるものと考えられる。

他の魚種における D ループ領域のサイズ変異については、redfish (*Sebastes*) について詳細な報告があり、塩基配列の分析により、12 SrRNA 側の 275 bp の反復配列がサイズ変異に寄与していることが明らかにされている¹¹⁾。本研究においては、3.3 kbp のクラス I を除き、サイズ間の差は約 100 bp であった。また、Saitoh *et al.*⁷⁾によるクラス間の差も約 100 bp であることを考え合わせると、ヒラメにおいては、約 100 bp の反復配列がサイズ変異をもたらしているものと考えられる。また、最近、ヒラメのサイズ変異の存在する部位も 12 SrRNA 側であることが朝日田ら¹²⁾によって報告されている。

3 種類の制限酵素でサイズ変異のみられた D ル

Table 3. The haplotype of D-loop region in the Japanese flounder mtDNA

class	restriction morph			haplotype
	<i>Hind</i> Ⅲ	<i>Hpa</i> Ⅱ	<i>Hae</i> Ⅲ	
class I	A	A	A	I -1
class II	A	A	A	Ⅱ-1
	A	B	B	Ⅱ-2
	B	A	B	Ⅱ-3
	B	B	A	Ⅱ-4
classⅢ	B	A	A	Ⅲ-1
	A	A	A	Ⅲ-2
	B	A	B	Ⅲ-3
classⅣ	B	A	A	Ⅳ-1
	A	A	A	Ⅳ-2
classⅤ	A	A	A	Ⅴ-1

Table 4. Frequencies of eleven mtDNA D-loop haplotypes in natural and seed specimens of the Japanese flounder

haplotype	specimens	
	natural(14)	seed(23)
I -1	0.071	0
Ⅱ-1	0.071	0
Ⅱ-2	0.143	0
Ⅱ-3	0	0.043
Ⅱ-4	0	0.043
Ⅲ-1	0.143	0.087
Ⅲ-2	0.143	0
Ⅲ-3	0	0.043
Ⅳ-1	0.143	0.392
Ⅳ-2	0.215	0.392
Ⅴ-1	0.071	0
<i>h</i>	0.857	0.679

sample sizes indicated in parentheses.

h : haplotype diversity.

ープ領域を消化することにより、各クラス内に複数の切断型が存在することが明らかになり、ハプロタイプ数は各クラスをハプロタイプとみなした

ときよりも増加した。朝日田ら¹²⁾はヒラメのDループ領域のサイズ変異を含まない部分のPCRを行い、11制限酵素を用いたRFLPにより天然集

団のハプロタイプ多様度が0.82から0.93であることを報告している。本研究における天然集団のハプロタイプ多様度は朝日田ら¹²⁾の結果とよく一致しており、サイズ変異の類別と少数の制限酵素によるRFLPを組み合わせることでもヒラメ集団の遺伝的多様性を評価することができることを示唆している。サイズ変異とRFLPを組み合わせる方法は、サイズ変異を伴っているために、塩基多様度や塩基置換率の算出といった塩基レベルでの集団の解析は困難と考えられるが、簡便かつ低コストでヒラメ集団の遺伝的モニタリングを行う上では有効と考えられる。

人工種苗におけるハプロタイプ数およびハプロタイプ多様度はそれぞれ6と0.679で、どちらも天然集団(8と0.857)より低くなっていた。このことはLiuら¹⁾がアイソザイム分析により指摘したように、天然集団に比べ人工種苗での親魚数が少ないことに起因しているのかも知れない。多くの生産地において人工種苗がこのような状況になっているのかどうかは全国レベルでの天然集団との比較において明らかにする必要があると考えられる。

要 約

ヒラメ mtDNA D ループ領域のすべてが増幅さ

れるように設計されたプライマーを用いたPCRにより、サイズ変異の有無を検討した。さらに、サイズ変異とRFLPを組み合わせ、ハプロタイプ数およびハプロタイプ多様度を天然集団と人工種苗とで比較した。その結果、

- 1) D ループ領域にはサイズ変異がみられ、そのサイズは約3.3 kbp、2.9 kbp、2.8 kbp、2.7 kbp、2.6 kbpとなり、I～Vの5クラスに分けられた。
- 2) 3種類の制限酵素により、D ループの各クラスごとにRFLPを検出した結果、ハプロタイプ数は全部で11種類となった。天然集団でのハプロタイプ数は8、ハプロタイプ多様度は0.857であったが、人工種苗では6と0.679で、いずれも人工種苗の方が低い値を示した。

以上の結果から、サイズ変異の類別と少数の制限酵素によるRFLPを組み合わせることでもヒラメ集団の遺伝的多様性を評価できる可能性が示唆された。

謝 辞

ヒラメのサンプルを提供して下さった秋田県水産振興センターのスタッフの方々に御礼申し上げます。本研究は水産庁の補助を受けて行ったものである。

文 献

- 1) Liu, S., M. Ikeda and Y. Fujio (1997) Genetic features of natural and cultured populations in plaice (*Paralichthys olivaceus*). Tohoku J. Agr. Res., 47 : 85–96.
- 2) Brown, W. M. (1983) Evolution of animal mitochondrial DNA, pp. 62–88. in "Evolution of Genes and Proteins", eds. by M. Nei and R. Koehn Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- 3) 根井正利 (1990) 分子進化遺伝学, 培風館, 東京, pp.218–246.
- 4) Meyer, A., T. D. Kocher, P. Basasibwaki, and A. C. Wilson (1990) Monophyletic origin of Lake Victoria Africa cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. Nature, 347 : 550–553.
- 5) 谷口順彦・高木基裕 (1997) DNA 多型と魚類集団の多様性解析. 「魚類のDNA」(青木宙, 隆島史夫, 平野哲也編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.117–137.

- 6) Lee, W.-J., J. Conroy, W. H. Howell, and T. D. Kocher (1995) Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *J.Mol.Evol.*, 41 : 54-66.
- 7) Saitoh, K., M. Tanaka, R. Ueshima, T. Kamaishi, T. Kobayashi, and K. Numachi (1995) Preliminary data on restriction mapping and detection of length variation in Japanese flounder mitochondrial DNA. *Aquaculture*, 136 : 109-116.
- 8) Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 6196-6200.
- 9) 高橋保夫・小林敬典・上田高嘉 (1994) PCR 法を用いたミヤコタナゴのミトコンドリア DNA の D-Loop 領域における遺伝的変異. *水産育種*, 20 : 39-45.
- 10) Nei, M. and F. Tajima, (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97 : 145-163.
- 11) Bentzen, P., J. M. Wright, L. T. Bryden, M. Sargent, and K. C. T. Zwanenburg (1998) Tandem repeat polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial control region of redfishes (*Sebastes* : *Scorpaenidae*) . *J. Hered.*, 89 : 1-7.
- 12) 朝日田卓・斉藤憲治・山下洋・青沼佳方・小林敬典 (1998) ミトコンドリア DNA の制限酵素切断型分析によるヒラメ天然集団の遺伝的変異. *日水誌*, 64 : 377-383.

アイソザイムからみた大井川源流域における イワナ2河川集団の遺伝的差異

後藤裕康 (静岡水試) ・ 前田泰宏 ・ 木島明博 (東北大・農)

Genetic Difference between Two Streams of Ohigawa River at the Two
Isozymic Loci in Yamato-iwana, *Salvelinus leucomaenis*

Hiroyasu GOTO^{*1}, Yasuhiro MAEDA^{*2} and Akihiro KIJIMA^{*2}

^{*1} Fuji Trout Farm of Shizuoka Prefectural Fisheries Experimental Station

^{*2} Education and Research Center of Marine Bio-resources, Tohoku University

Abstract

Genetic composition at the two isozymic loci, *Gpi-3* and *Mdh-1*2*, in Japanese char, *Salvelinus leucomaenis*, collected from the two upstream populations of Ohigawa river was estimated. As a result, it was noted that (1) the two upstream populations were under the Hardy-Weinberg equilibrium, and (2) the allele frequencies were significantly different from each other at both two loci. These results suggest that migration rate from white-spotted artificial seeds has been different in each upstream population. Migration rate is assumably, calculated by gene introgression rates at the two loci as 2.3% in Nishimata and 25.5% in Higashimata.

(accepted 5 July 1998)

イワナ (*Salvelinus leucomaenis*) は体色や斑紋などの形態に地理的変異が知られ、アメマス (エゾイワナ)、ニッコウイワナ、ヤマトイワナおよびゴギの4型に分けられている^{1,2)}。すなわち、体側に有色斑点が無く、比較的大きくて明瞭な白色斑点が散在するアメマス、比較的明瞭な白色斑点が頭部の目の上より後ろの背部を中心にみられ、体側には橙黄色の斑点が認められるニッコウイワナ、ニッコウイワナと同じく白色斑点と橙黄色の斑点がみられるが白色斑点が頭部の吻端まで認められるゴギ、そして背部に白色斑点が無く、体側にも白色斑点が無いがあってもごくわずかしきみられず、橙黄色の斑点が明瞭なヤマトイワナに分けられている。

静岡県大井川水系の河川源流域はヤマトイワナ

が自然分布している地域である。近年ニッコウイワナやエゾイワナの養殖が北日本を中心に普及し、人工種苗が容易に入手できることから、大井川水系にも遊漁振興のためにこれらが放流されるようになった。それ以降、これまでイワナが生息していなかった河川でも白色斑点を持つイワナが繁殖していたり、大井川などの在来ヤマトイワナが生息する流域では背部にニッコウイワナの特徴である白色斑点がみられる個体が増加するなど、在来型と異なる特徴を持った個体の出現が大きな問題となっている³⁾。特に大井川源流域の西俣と東俣の2河川のうち、東俣ではヤマトイワナの特徴である橙黄色の斑点とともに背部に白色斑点をもつ個体が顕著にみられるようになった (Fig.1)。この要因として放流個体が在来集団とともに繁殖

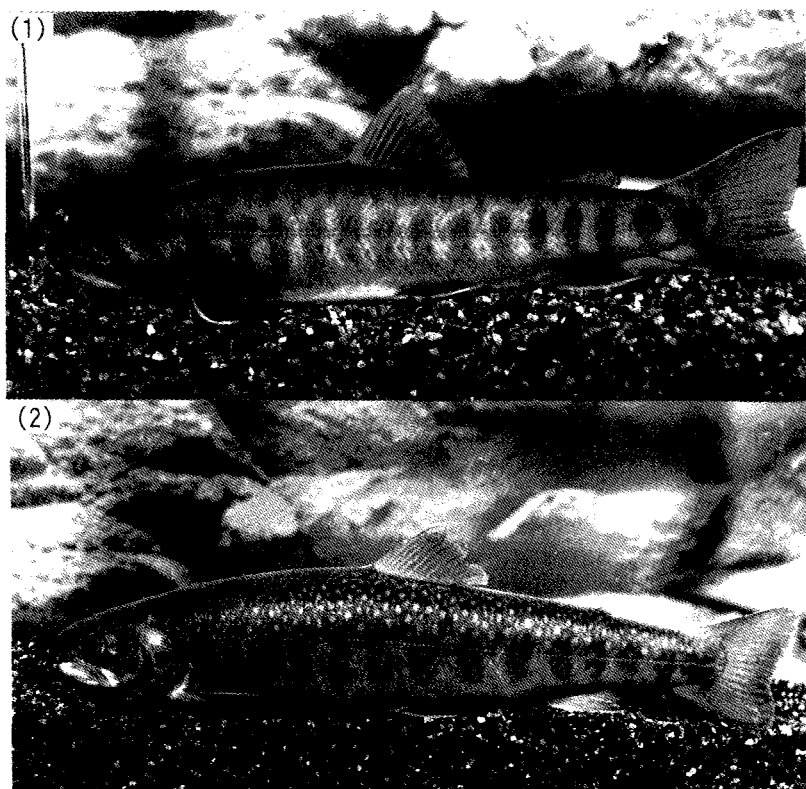


Fig.1. Non white-spotted and white-spotted individuals collected from Higashimata of Ohigawa river

- (1) non white-spotted (colored spotted only)
 (2) white-spotted and colored-spotted,

に加わった可能性が示唆される。

形態的に区別できる個体の混在は採集個体の形態によって区分が可能である。しかし、それらが在来集団と共に繁殖に加わり交雑した場合、そしてさらに世代を越えて繁殖に加わった場合には、外部形態からどの程度の異集団が混入してきたかを推定することは不可能である。この点アイソザイム遺伝子は集団間の遺伝的組成が異なれば混合の程度によって遺伝的組成が変化し、また、繁殖に加わったとしても遺伝子頻度および遺伝子型組成の変化によって混合の程度が推定できる利点を持っている。実際、遺伝子頻度が異なるクロソイの天然集団と人工種苗を対象に、アイソザイム遺

伝子を指標として天然集団における人工種苗の混合率が求められている⁴⁾。

菊池ら⁵⁾は背部に白色斑点がある東北地方の天然イワナの3地域と白色斑点がない大井川上流に生息する天然ヤマトイワナのアイソザイム分析を行い、*Gpi-3*、*Mdh-1*・*2*、*Pgm-2* および *Sdh-2*・*3* において大井川と他の地域の主対立遺伝子が異なっていることを報告している。本研究はアイソザイム遺伝子を標識として白色斑点の出現頻度が異なる大井川源流域の西俣と東俣の2河川に生息するイワナの遺伝的組成を調べ、放流魚由来の遺伝子の混入について考察することを目的とした。

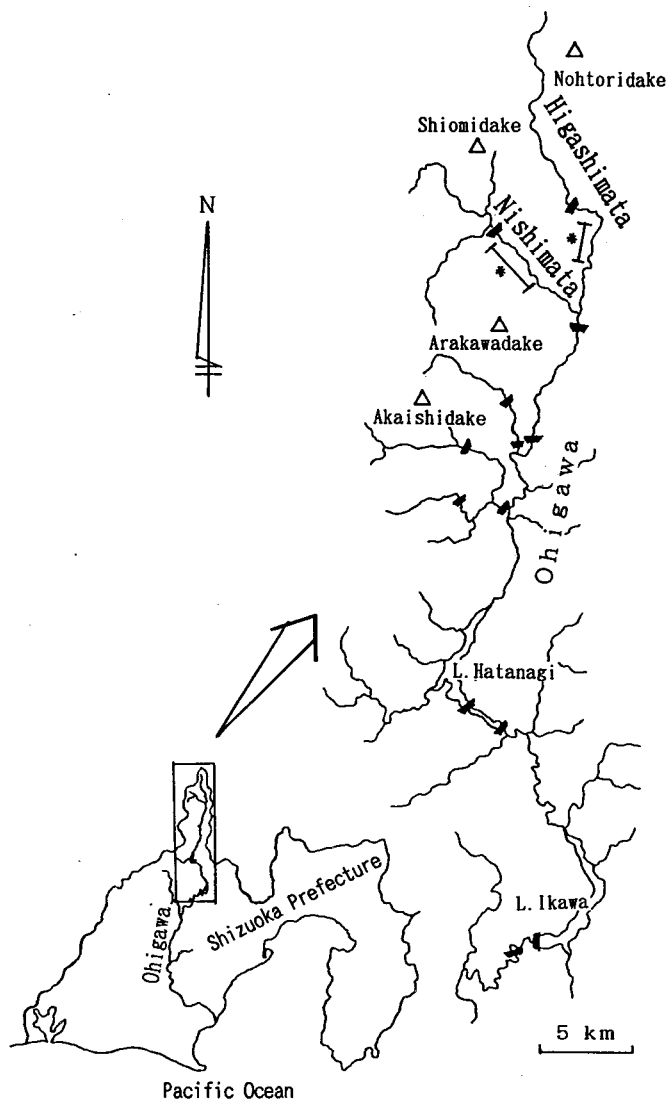


Fig.2. Location collected the samples of char in Ohigawa river

* Sampling area

材料と方法

調べたイワナの採集地点を Fig.2 に示した。大井川は源流部で西俣と東俣の2河川に分岐し、どちらも自然にヤマトイワナが生息している地域である。両河川は合流点直下で発電用ダムにより下流と分断されている。また、両河川ともに中流部

に発電用の取水堰堤が建設され、上流部と分断されるとともに、堰堤下流部では流量の低下や砂礫の流入による淵の消失等、河川構造の単純化が進行している。従って、現在は両河川の下流から合流地点まではイワナの生息に適しているとはいえない。

実験に用いた供試魚は、西俣では1995年11月から1996年11月にかけて、東俣では1996年8月に釣獲または電気ショッカーによって採集したそれぞれ123個体と64個体である。採集個体は活魚の状態で静岡県水産試験場富士養鱒場に運搬し、形態計測の後に -20°C 以下で冷凍保存した。

遺伝標識に用いたアイソザイム遺伝子は、筋肉において常に安定して遺伝子型が同定できる Glucosephosphate isomerase (GPI: EC 5.3.1.9) の *Gpi-3* 遺伝子座、および Malate dehydrogenase (MDH: EC 1.1.1.37) の *Mdh-1•2* 遺伝子座である。GPI はトリスクエン酸緩衝液 (PH 8.0)、MDH はトリスクエン酸緩衝液 (PH 7.0) を用いてデンブengel電気泳動を行った。デンブengel電気泳動及び酵素の染色法、および対立遺伝子の命名は菊池ら⁴⁾に従った。

集団の混入率は各遺伝子座における遺伝子の浸

透率の平均とした。遺伝子の浸透率 (k) は以下に示す式で求めた。

$$k = (qA_0 - qA) / (qA - qA_1)$$

ここでは qA_0 が在来集団の a 対立遺伝子頻度、 qA は浸透後の集団の a 対立遺伝子頻度、 qA_1 は人工種苗の a 対立遺伝子頻度である。

結 果

西俣と東俣の採集個体について背部に明瞭な白色斑点をもつ個体の出現を調べた結果、西俣では123個体中11個体 (8.9%)、東俣では64個体中31個体 (48.4%) で認められた。また、背部に白色斑点が全く認められなかった個体は西俣で82個体 (66.7%)、東俣では16個体 (25.0%) であった。

標識に用いた *Gpi-3* 遺伝子座と *Mdh-1•2* 遺伝子座における西俣と東俣の遺伝的組成を Table 1

Table 1. Genetic composition at isozymic loci in the two river populations of char collected from Ohigawa river

Nishimata (all)					
Locus	Observed (Expected) number of individuals				
	<i>Mdh-1•2</i>				total
	Genotype	<i>a/a</i>	<i>a/b</i>	<i>b/b</i>	
<i>Gpi-3</i>	<i>a/a</i>	0 (0.1)	0 (1.0)	5 (5.1)	5 (6.1)
	<i>a/b</i>	0 (0.3)	6 (6.9)	39 (35.5)	45 (42.8)
	<i>b/b</i>	0 (0.6)	16 (12.0)	57 (61.5)	73 (74.1)
	total	0 (1.0)	22 (19.9)	101 (102.1)	123
Higashimata (all)					
Locus	<i>Mdh-1•2</i>				
					total
	Genotype	<i>a/a</i>	<i>a/b</i>	<i>b/b</i>	
<i>Gpi-3</i>	<i>a/a</i>	1 (0.6)	4 (2.9)	2 (3.4)	7 (6.9)
	<i>a/b</i>	1 (2.5)	15 (11.8)	12 (13.9)	28 (28.2)
	<i>b/b</i>	2 (2.5)	11 (12.1)	16 (14.3)	29 (28.9)
	total	4 (5.6)	30 (26.8)	30 (31.6)	64

に示した。西俣において、*Gpi-3* 遺伝子座および *Mdh-1*2* 遺伝子座はそれぞれ 2 対立遺伝子が認められた。*Gpi-3* 遺伝子座における対立遺伝子頻度は $q_a=0.224$ 、 $q_b=0.776$ 、*Mdh-1*2* 遺伝子座では $q_a=0.089$ 、 $q_b=0.911$ 、であった。各遺伝子座における観察値とハーディ・ワインベルグ平衡を仮定して求めた期待値を比較した結果、観察値は期待値とよく一致した。また、2 遺伝子座間で特定の遺伝子型に偏った出現があるかどうかを調べるために、各遺伝子型の組合せの観察値と期待値を比較したところ有意差は認められず、2 遺伝子座は独立であった。

東俣においても 2 遺伝子座ともに西俣と同じく 2 対立遺伝子が観察された。それらの対立遺伝子頻度をみると、*Gpi-3* 遺伝子座で $q_a=0.328$ 、 $q_b=0.672$ 、*Mdh-1*2* 遺伝子座では $q_a=0.297$ 、 $q_b=0.703$ であった。各遺伝子座における観察値とハーディ・ワインベルグ平衡を仮定して求めた期待値を比較した結果、観察値は期待値とよく一致した。また、2 遺伝子座間で特定の遺伝子型に偏った出現があるかどうかを調べるために、各遺伝子型の組合せの観察値と期待値を比較したところ、有意差は認められなかった。

西俣と東俣の遺伝子頻度の差について t -検定を行った結果、調べた 2 遺伝子座ともに遺伝子頻度に有意差が認められた。2 遺伝子座での平均ヘテロ接合体率の観察値を比較すると、西俣では 0.272、東俣は 0.453 となり、東俣で顕著に高かった。

考 察

大井川源流域の 2 河川で遺伝的組成が大きく異なっていた要因として、(1)これら 2 河川が過去から相当の時間隔離され、独自に繁殖してきたこと、(2)片方、あるいは両方が極端な生息個体数の減少によるボトルネック効果を受け、遺伝的浮動が独立して生じたこと、あるいは(3)異なる遺

伝的組成を持つ個体または集団が異なる割合で混入したことが考えられる。

西俣と東俣の 2 河川は平面的に合流し、イワナの移動にとって障害となる大きな建造物は特にない。しかし、両河川ともに合流点の上流に取水堰堤が建設され、現在ではその下流部の流水量が低下して淵の消失が目立っている。特に東俣の下流は河川構造の単純化が著しく、イワナの生息、繁殖にとって好ましくない環境となっている。また、1992 年から約 5 年間続いた降雨量不足により、支流の少ない東俣では流水量がかなり低下したものと予想される。従って、2 河川は取水堰堤建造以降に移動しにくくなったことが予想され、(1)の相当期間隔離されていたとは考えにくい。

一方、取水堰堤によって流量が低下していたことはイワナ集団の個体数の減少を伴うことも考えられ、ボトルネック効果を受けた可能性がある。この場合、遺伝的変異性の顕著な低下が認められることになる。しかし、調べた 2 遺伝子座ではヘテロ接合体率が高く、必ずしも遺伝的変異性の顕著な低下は認められない。

両河川の在来集団は白色斑点のないヤマトイワナであったとされる。ここに白色斑点が認められる個体や、明瞭な橙黄色斑点と白色斑点を併せ持つ個体が出現し、その頻度が両者で異なっていた本研究の結果を考えると、2 河川の遺伝的組成の差異の要因は(3)のニッコウイワナやエゾイワナなどの背部に白色斑点を有した人工種苗放流による遺伝的混入が異なる割合で生じたと考えられる。

両河川は 1993 年まで漁業権の対象となっていなかったため、ここでの種苗放流の詳細は不明である。しかし、聞き取り調査によれば、大井川源流域でのイワナの個人的放流は近年まで入山が困難であった西俣上流部や一部の支流を除き、1980 年代前半には既に行われていたという。一方東俣ではこの時期からイワナの人工種苗が放流されていたとみられる。従って、両河川での放流年数や

放流尾数が大きく異なり、それに従って繁殖に参加した親の数も異なっていたと考えられる。

そこで、在来集団に人工種苗が加入したと仮定して各遺伝子座での遺伝子の浸透率を試算した。遺伝子の浸透率 (k) は以下に示す式で求めた。すなわち、 N_0 個体からなる在来集団 (遺伝子頻度: qA_0, qB_0) に N_1 個体からなる放流集団 (遺伝子頻度: qA_1, qB_1) が混合したとする。そのときの遺伝子型組成は、

$$A/A : N_0 qA_0^2 + N_1 qA_1^2, A/B : 2 N_0 qA_0 qB_0 + 2$$

$$N_1 qA_1 qB_1, B/B : N_0 qB_0^2 + N_1 qB_1^2$$

となる。この混在集団の遺伝子頻度 (qA_m, qB_m) は

$$qA_m = (N_0 qA_0 + N_1 qA_1) / (N_0 + N_1),$$

$$qB_m = (N_0 qB_0 + N_1 qB_1) / (N_0 + N_1)$$

となる。このとき、 $N_1/N_0 = k$ とすれば、

$$qA_m = (qA_0 + k qA_1) / (1 + k),$$

$$qB_m = (qB_0 + k qB_1) / (1 + k)$$

で表される。この混在した集団中の個体がランダムに交配した場合、次世代の遺伝子型頻度は $(qA_m + qB_m)^2$ の式で表される割合で分布し、ハーディ・ワインベルグ平衡に達する。すなわち、その時の遺伝子頻度 (qA) は混在した時の遺伝子頻度 (qA_m) と同じになる。従って、 k は

$$k = (qA_0 - qA) / (qA - qA_1)$$

で求められ、各遺伝子座における遺伝子の浸透率を表すことになる。ここでは qA_0 が在来集団の遺伝子頻度、 qA は侵入後の集団の遺伝子頻度、 qA_1 は人工種苗の遺伝子頻度となる。

大井川におけるヤマトイワナの在来集団の遺伝子頻度は過去のデータが無く、人工種苗の遺伝的侵入が予想される現在では調べるができない。しかし、西俣では白色斑点を持つ個体が少なく、背部に白色斑点を全く持たない個体が82個体採集できたことから、これらを在来集団と仮定し、遺伝子頻度を求めた。一方、大井川水系での人工種苗放流は漁業権を有する漁業協同組合以外に一般遊漁者や団体が個人的に行ったものが多いとされており、その起源も量も不明で、放流集団の遺伝子頻度は得られない。そこで富士養鱒場で継代飼育している栃木県産由来の背部に白色斑点が顕著に認められるニッコウイワナを放流集団として遺伝子頻度を求めた (Table 2)。

在来集団は *Gpi-3* 遺伝子座および *Mdh-1*2* 遺伝子座ともに b 対立遺伝子頻度がより高い値を示し、放流集団はそれぞれ a 対立遺伝子に固定していた。これらの遺伝子頻度は菊池ら³⁾および Nakajima *et al*⁶⁾が報告したニッコウイワナおよび

Table 2. Allele frequencies at the two loci in the two river populations, assumptive native population and assumptive released population

Locality	Locus	<i>Gpi-3</i>		<i>Mdh-1*2</i>	
	Allele	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
Nishimata (123)		0.224	0.776	0.089	0.911
Higashimata (64)		0.328	0.672	0.297	0.703
non White-spotted (82)		0.213	0.787	0.061	0.939
Artificial seeds (48)		1.000	0	1.000	0

The number in parenthesis represents the number of individuals surveyed

アメマスの自然集団または養殖集団の遺伝子頻度とよくあっていた。この遺伝子頻度を用いて遺伝子の浸透率(k)を求めると、西俣では *Gpi-3* 遺伝子座において 1.4%、*Mdh-1•2* 遺伝子座では 3.1%、平均 2.3% であった。東俣についてみると *Gpi-3* 遺伝子座では 17.1%、*Mdh-1•2* 遺伝子座では 33.6%、平均 25.5% であった。このことは背部に白色斑点を有するイワナが西俣では約 2%、東俣では約 25% が遺伝的に混入していることを示唆する。

背部に白色斑点を有する個体の存在がニッコウイワナやアメマスとの交雑による遺伝子の浸透が起こっていることを示しているのかどうかは白色斑点の遺伝支配が不明なために明らかではない。しかし、背部に白色斑点を有する個体が多かった東俣でより高い遺伝的混入が試算できたことは白色斑点がヤマトイワナの在来集団に対するニッコウイワナやアメマス人工種苗の遺伝子浸透の一つの指標となることを示唆している。

謝 辞

本研究に用いたイワナの標本採集に当たり、ご協力をいただいた静岡中部渓流会の皆様に感謝の意を表す。尚、本研究は静岡県水産試験場事業「内水面希少魚類保護・増殖研究」の一貫として行った。

要 約

背部に白色斑点を持つ個体の割合が異なる静岡県大井川源流域の西俣と東俣の 2 河川に生息するイワナにおいて、多型を示した *Gpi-3* および *Mdh-1•2* アイソザイム遺伝子座における遺伝的組成を調べた結果、両河川ともに Hardy-Weinberg 平衡状態にあるが、遺伝子頻度は 2 遺伝子座とも有意に異なっていた。この要因として背部に白色斑点があるイワナ由来の人工種苗の混入の割合が異なっていたことを示唆した。また、その混入の程度を 2 遺伝子座の遺伝子の浸透率で試算すると、西俣では 2.3%、東俣では 25.5% となった。

文 献

- 1) 大島正満 (1961) 日本産イワナに関する研究. 鳥獣集報, 18: 3-70.
- 2) 稲村彰郎 (1980) 日本産イワナ属の変異と系統について. 淡水魚, 6: 14-24.
- 3) 静岡県水産試験場 (1997) ヤマトイワナの生息状況調査. 平成 8 年度静岡県水産試験場事業報告, pp. 215-217.
- 4) Fujio, Y. and M. Nakajima (1989) Genetic monitoring of released population in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). Tohoku J. Agr. Res., 40: 19-35.
- 5) 菊池美保・池田実・藤尾芳久 (1997) アイソザイムおよび RAPD 分析によるイワナ集団の遺伝的変異性と遺伝的分化. 水産育種, 25: 27-36.
- 6) Nakajima, M. and Y. Fujio (1995) Genetic differentiation among local populations of Japanese char *Salvelinus leucomaenis*. Fisheries Science, 61: 11-15.

サイトカラシン B を用いた成熟分裂阻害による エゾアワビ 4 倍体幼生の誘起

奥村誠一（北里大・水）・古川末広（マリーン開発）・
佐々木剛・島岡真実・堀川力・山森邦夫（北里大・水）

Induction of Tetraploid Larvae in the Pacific Abalone *Haliotis discus hannai*
by Suppression of the Meiotic Division Using Cytochalasin B

Sei-ichi OKUMURA^{*1}, Suehiro FURUKAWA^{*2}, Takashi SASAKI^{*1},
Makoto SHIMAOKA^{*1}, Chikara HORIKAWA^{*1} and Kunio YAMAMORI^{*1}

^{*1} Kitasato University School of Fisheries Sciences

^{*2} The Marine Development Company Ltd.

Abstract

Tetraploid larvae of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* were induced by the suppression of the meiotic division using the cytochalasin B (CB) treatment. The suppression of the 1st and 2nd meiotic division were attempted by using eight different conditions of continuous or intermittent treatment. When the eggs were exposed to 1 ppm CB from 10 to 40 minutes after insemination continuously for a period of 30 minutes duration at 20 ± 0.5 °C, the resultant larvae showed higher frequency of the occurrence of tetraploid cells than any of the other conditions. The rate of cleaved eggs and normal larvae in the experimental batch treated with this condition were 95.7% and 58.3%, respectively. The results of the present study suggest that this method might be effective for tetraploidization of abalone.

(accepted 24 July 1998)

4 倍体が形成する 2 倍性の配偶子は、水産育種上極めて利用価値が高い。それは、この配偶子を用いることで、倍加処理することなく同質・異質 3 倍体、雌性・雄性発生 2 倍体等の作出が可能となるからである。しかしながら、魚介類の人為 4 倍体の作出は困難な場合が多く、実際に 4 倍体を用いて倍数体の生産を行った例は少ない。

人為 4 倍体の作出は通常第 1 卵割を阻害することで試みられるが、ニジマス¹⁾等一部の魚類で成功したに過ぎず、この作出法が全ての種に対して必ずしも有効であるとは言い難い。一方貝類は魚

類と異なり、受精してから第 1 成熟分裂が再開するため、第 1 および第 2 成熟分裂の両方を阻害できる。したがって、これらの両分裂を阻害することで、困難である卵割阻害を行うことなく高次な倍数体作出できる可能性がある。Scarpa ら²⁾は、イガイ科の一種 *Mytilus galloprovincialis* の受精卵の両成熟分裂をサイトカラシン B (CB) で連続的に阻害し、理論的には 5 倍体が得られるところ、4 倍体稚貝を得ている。また奥村ら³⁾は、エゾアワビ *Haliotis discus hannai* の卵を紫外線照射精子で受精後、両成熟分裂を低温処理により阻害し、

雌性発生4倍体幼生を得ている。しかしこの方法は紫外線照射精子を用いるため、受精率の低下に起因する卵割率の大幅な低下を招いた。

本研究では、上記 *M. galloprovincialis* における手法をエゾアワビに応用し、CBを用いた第1および第2成熟分裂の阻害による4倍体作出法の検討を目的とした。

材料と方法

マリン開発株式会社（岩手県三陸町）で育成された人工種苗由来のエゾアワビの親貝を用いて2回の交配（交配番号409および410、何れも雌雄1対1交配）を行った（Table 1）。両交配組共、雌雄を個別に20ℓの水槽へ収容し、菊地ら⁴の産卵誘発法により放卵・放精を促した。放卵・放精後、奥村ら³に準じ人工受精と倍加処理を行った。即ち両交配組共、2ℓに調整された卵海水（卵を含む海水）に1ml当たり30万個の精子数となるように精子海水（精子を含む海水）を混合し受精

させた。受精後直ちに卵海水を5分割し、それぞれ対照区および4つの試験区用とした。409交配組では、連続した1回の処理機会第1および第2成熟分裂の両方を阻害する処理条件を検討するため、受精後10~30、10~35、10~40、および10~45分の間（試験区名としてそれぞれⅠ、Ⅱ、ⅢおよびⅣで表す）それぞれ0.1%ジメチルスルフォキシド（DMSO）海水にCBを1ppmの濃度で溶解させた溶液中で浸漬処理した。また410交配組では、断続した2回の処理機会第1成熟分裂を阻害する条件を検討するため、まず第1分裂阻害に対し1ppmCBで処理した後、一旦0.1% DMSO海水に移した後再び第2分裂阻害のため1ppmCBで処理する4種の条件、即ち受精後10~18/30~38、8~16/30~38、10~25/30~45、および8~23/30~45分（試験区名としてそれぞれA、B、CおよびDで表す）の各条件でそれぞれ処理した。各試験区における処理条件の一覧をTable 1に示した。両交配組共、処理後直ちに卵を0.1% DMSO

Table 1. Summary of mating and polyploidization data.

Mating No.	Mating Date	Exp. Batch	Treatment Time*1 (min.)	No. of Eggs	Rate of Eggs Cleaved (%)	Rate of Normal Larvae*2 (%)
409	Nov.10,'94	Control	Untreated	473,600	95.9	96.3
		I	10~30	614,400	95.3	63.6
		II	10~35	444,800	94.2	56.5
		III	10~40	444,800	95.7	58.3
		IV	10~45	448,000	88.6	58.9
410	Nov.10,'94	Control	Untreated	124,800	97.4	100.0
		A	10~18 / 30~38	278,400	97.7	65.4
		B	8~16 / 30~38	246,400	87.0	71.0
		C	10~25 / 30~45	166,400	96.2	41.7
		D	8~23 / 30~45	265,600	96.4	70.0

*1 Starting ~ finishing times of 1 ppm CB treatments after insemination.

*2 Trochophora larva.

海水中に 30 分間浸した後、濾過海水で洗浄した。洗浄後、未処理の対照区と共に換水しつつ発生させた。水温条件は、受精から CB 処理およびその後の発生を通して $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保った。尚、CB 濃度は林崎⁵⁾、DMSO 濃度は Scarpa ら²⁾、受精後の処理開始時間は Arai ら⁶⁾および奥村ら³⁾の報告をそれぞれ参考にして上記本研究の処理条件を設定した。

受精 2 時間後に各区より卵を 50~200 個採集し

卵割率を、また受精 18~20 時間後に孵化幼生を 20~90 個体採集し幼生正常率をそれぞれ奥村ら³⁾に従い算出した。また同幼生を各区より数千個体採集し、Arai ら⁷⁾に従い染色体標本を作製した。尚、各区における染色体標本は、1 枚のプレパラート当たり百個体程の幼生を混合して作製した。両交配組共対照区で 75 細胞、試験区で 100 細胞ずつ染色体を計数し、本種の複相染色体数 $36^{8)}$ を基準として染色体数の分布および倍数性を検討した。

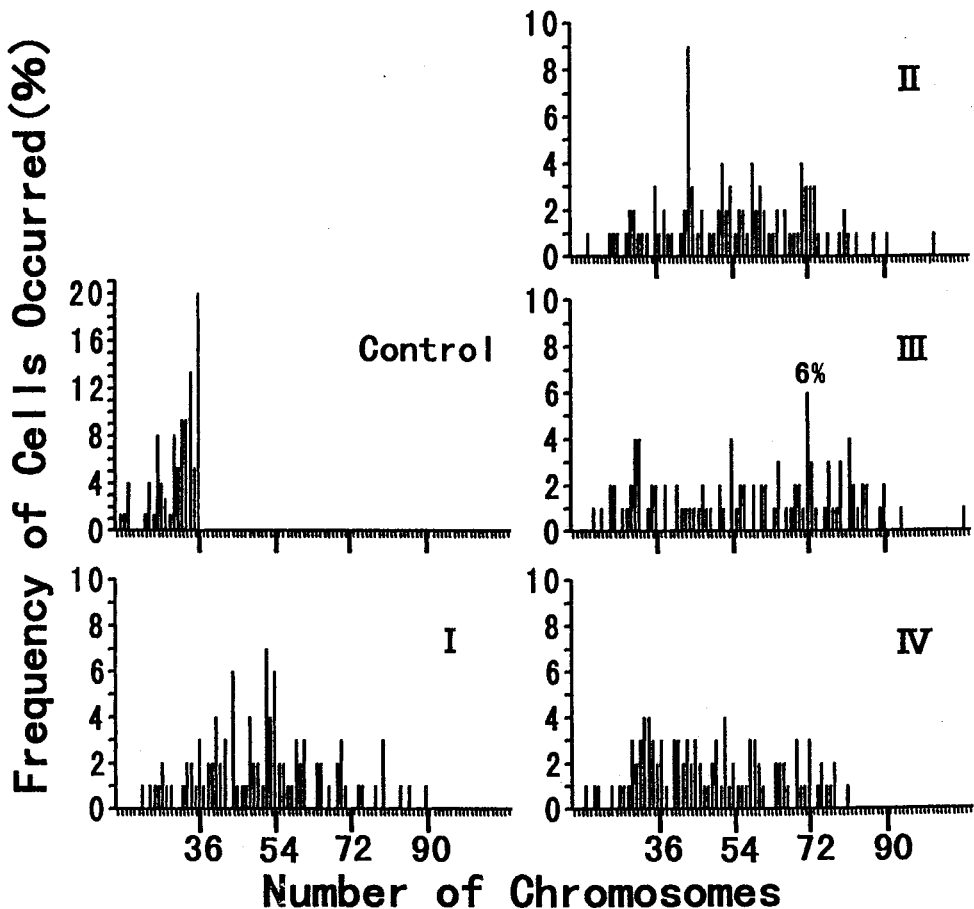


Fig.1. Frequency distributions of chromosome numbers in mating group 409.

結 果

各対照区および試験区における卵割率および幼生正常率を Table 1 に示す。両交配組共、卵割率は対照区および試験区の間で大きな差を示さなかった。幼生正常率は両交配組共、対照区では何れも 90% 以上の高率を示したのに対し、試験区では 409 交配組で 60% 前後、410 交配組で 40~70 % と何れも対照区に比べて低下した。

409 および 410 交配組の染色体数分布をそれぞ

れ Fig.1 および 2 に示す。両交配組共、対照区では本種の正常 2 倍体の染色体数である 36 の所に明確なモードが見られたが、それ以外の染色体数を示す細胞も観察された。409 交配組の各試験区の染色体数は、何れも 20 前後から 90 前後の間で広範囲な分布を示した。4 倍体と考えられる染色体数 72 を示す細胞の出現頻度は、試験区 I、II、III および IV でそれぞれ、0、3、6 および 3% となり、III における頻度が他区に比べて高かった。I

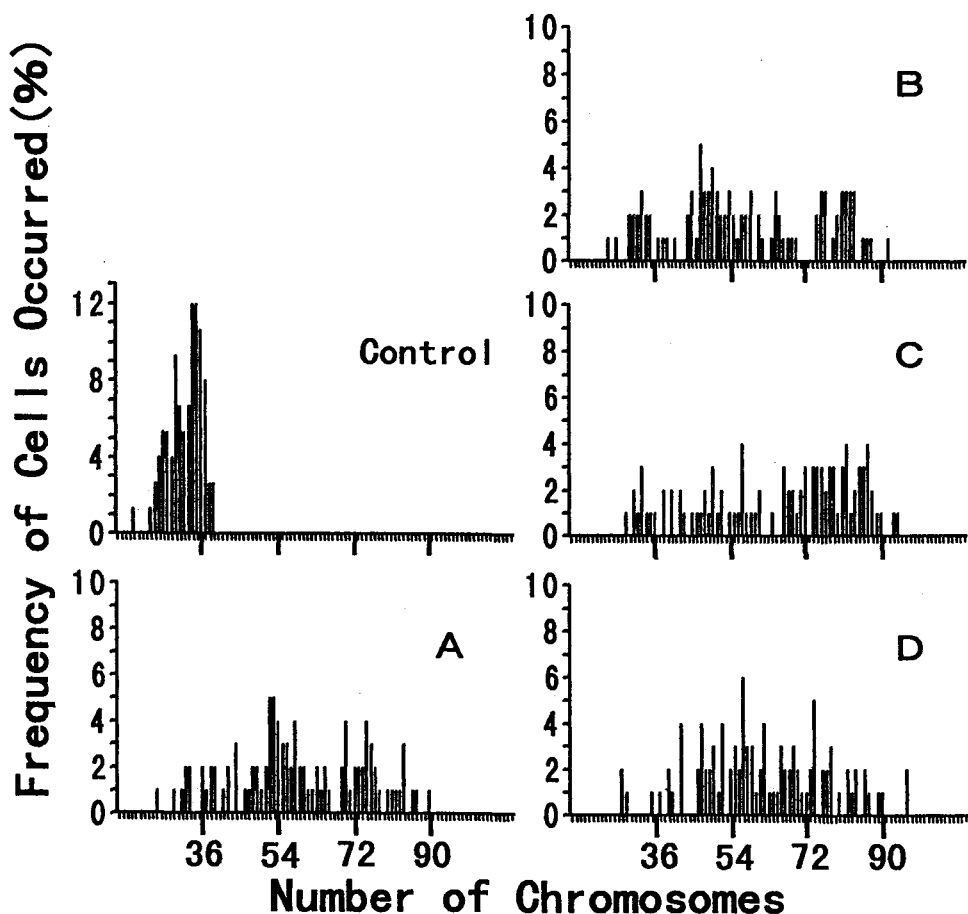


Fig.2. Frequency distributions of chromosome numbers in mating group 410.

では3倍体の染色体数である54の所にモードが見られた。またⅠ～Ⅳを通じて5倍体の染色体数90前後の出現頻度は0~2%と低かった。410交配組の各試験区の場合も409と同様、全体的に広範囲な染色体数分布を示した。染色体数72を示す細胞の出現頻度は、試験区A、B、CおよびDでそれぞれ、2、0、3および1%となり、何れも409のⅢに比べて低い値を示した。染色体数54および90の出現頻度は409の場合と同様であった。

考 察

本研究では第1および第2成熟分裂の両方を阻害するため、CBを用いた2種類の処理法を検討した。即ち Scarpa ら²⁾の手法に従い、1回の処理機会で連続して両分裂を阻害する方法(409交配組)および両分裂を断続的に阻害する方法(410交配組)である。両手法とも4倍性の細胞が得られ、4倍加の効果は認められたが、連続処理を行った409交配組の試験区Ⅲにおいて4倍体と考えられる染色体数72を示す細胞が他区より高率に出現した。このことは、発生水温20℃、CB濃度1ppmの条件下では、受精後10~40分の間連続処理する条件が本研究における他の処理条件に比べて4倍加に対し有効である可能性を示唆する。染色体標本作製時に大きく飛散した染色体が計数されていない場合も考えられ、71または70程度の染色体数を示す細胞も実際は4倍体の細胞であった可能性もある。したがって実際の4倍加率は、上記に示した値を上回る可能性も考えられる。この試験区Ⅲの結果と、雌性発生および低温処理法を用いた前報³⁾の結果とを比較すると、4倍体と考えられる細胞の出現率は、前報の5~10%に対して本報で6%と大きな差は見られないが、卵割率は紫外線照射精子を用いる前報で10~30%であったのに対し、正常精子を用いる本報では対照区と同等の90%前後の値を示し、この点におい

ては明らかに本手法の方が優れていた。また両交配組共、対照区において2倍体の染色体数36以外の細胞が出現した。これは前述した染色体の飛散、あるいは何らかの原因による胚の異常発生に起因するものと考えられる。

本研究の様に、正常精子で受精後第1および第2成熟分裂の両方を阻害すると、理論的には5倍体が誘起され、4倍体は誘起されないはずであるが、前述の通り *M. galloprovincialis* において同法により4倍体が作出されている²⁾。そのメカニズムの詳細は不明であり、今後の重要な検討課題であるが、本研究においても前述の通り4倍性と考えられる細胞が観察されており、*M. galloprovincialis* での研究結果を支持するものであった。貝類2種で同様の結果が得られたことは、第1および第2成熟分裂の両方を阻害する方法が貝類における4倍体作出法として有効である可能性を示唆するものである。本研究では幼生期のみの検討に留まっている。今後は本法により作出される4倍体を稚貝・成貝期まで育成し、生殖能力および成長等について検討する必要がある。

前述の Scarpa ら²⁾、奥村ら³⁾および本研究の何れにおいても幼生期に様々な染色体数あるいはDNA量を示す異数性と考えられる細胞が出現している。このことは、人為倍数体作出の際に正倍数体の他に様々な異数体が同時に作出される可能性を示唆するものである。貝類の異数体に関する研究は殆どなく、これらの幼生期以降の生存性の有無も明らかでない。本研究も含め倍数体に関する多くの研究では、DNA量や染色体数のみで倍数性を判断しているため、異数体の染色体数が目的的正倍数体と一致あるいは近似する場合、これを異数体として判別出来ないことも考えられる。今後は染色体分染法やFISH法等を用いて、作出された倍数体の染色体構成を詳細に検討し、幼生期以降における異数体の生存性等について検討する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、多大な御協力を戴いたマリーン開発株式会社の古川勝弘社長を初めとする社員各位に対し厚く御礼申し上げます。また技術的補助を賜った羽島英雄、波多野寿および鈴木康久各氏に謝意を表する。

要 約

サイトカラシン B を用いた第 1 および第 2 成熟分裂の阻害によるエゾアワビの 4 倍体誘起を目的とし、以下の研究を行った。正常精子で受精後、

1 回の処理機会で両分裂を連続して阻害する 4 処理条件、および 2 回の処理機会で断続的に両分裂を阻害する 4 条件についてそれぞれ検討した。何れの試験区も卵割率は対照区とはほぼ同様であったが、幼生正常率は 40~70% に低下した。孵化幼生の 4 倍加率は 1 ppm サイトカラシン B で受精後 10~40 分の間連続処理した場合が、本研究で検討した 8 条件の中で最も高かった。現時点ではこの処理条件が本種の 4 倍体誘起に適していると考えられた。

文 献

- 1) Chourrout, D., B. Chevassus, F. Krieg, A. Happe, G. Burger and P. Renard (1986) Production of second generation triploid and tetraploid Rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females—potential of tetraploid fish. *Theor. Appl. Genet.*, 72 : 193–206.
- 2) Scarpa, J., K.T. Wada and A. Komaru (1993) Induction of tetraploidy in mussels by suppression of polar body formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59 : 2017–2023.
- 3) 奥村誠一・古川末広・寺田栄作・山口史敬・山森邦夫 (1996) 第 1 および第 2 成熟分裂阻害により誘起されたエゾアワビの雌性発生 4 倍体幼生. *水産育種*, 23 : 21–27.
- 4) 菊地省吾・浮永久 (1974) アワビの採卵技術に関する研究 第 2 報：紫外線照射海水の産卵誘発効果. *東北水研報告*, 33 : 79–86.
- 5) 林崎孝志 (1989) バイテク応用技術 (15) エゾアワビの三倍体作出. *養殖*, 316 : 84–87.
- 6) Arai, K., F. Naito and K. Fujino (1986) Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52 : 417–422.
- 7) Arai, K., F. Naito, H. Sasaki and K. Fujino (1984) Gynogenesis with ultraviolet ray irradiated sperm in the Pacific abalone. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 50 : 2019–2023.
- 8) Arai, K., H. Tsubaki, Y. Ishitani and K. Fujino (1982) Chromosome of *Haliotis discus hannai* Ino and *H. discus* Reeve. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48 : 1689–1691.

AFLP フィンガープリント法によるアユの 遺伝変異保有量と分化

高木基裕 (水大校) ・ 曾我部五郎 ・ 谷口順彦 (高知大・農)

Genetic Variability and Divergence of Ayu *Plecoglossus altivelis*
Using AFLP Fingerprinting

Motohiro TAKAGI^{*1}, Goro SOGABE^{*2} and Nobuhiko TANIGUCHI^{*2}

^{*1}National Fisheries University

^{*2}Faculty of Agriculture, Kochi University

Abstract

AFLP fingerprinting (AFLP-FP) was applied for the estimation of genetic variability and differentiation of amphidromous and landlocked ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis* and two subpopulations' of the Ryukyu-ayu, *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* by using two primer pairs (E-AGG and M-CTT). Genetic variability and divergence between individuals were indicated by bands sharing indices (BSI). Parameters of genetic variabilities were remarkably small in the Ryukyu-ayu subpoulations. The parameters' of genetic divergence between ayu and Ryukyu-ayu were extremely large. The detected band could be useful for identification of the two subspecies. This study also suggests that AFLP-FP is an useful genetic marker for evaluation of genetic variability and divergence of ayu subpopulations.

(accepted 6 Aug 1998)

近年、各種の DNA 解析法が、幅広い研究分野の多様な生物種において、応用されている¹⁾。しかしながら、各種 DNA 多型検出法にはそれぞれ、マーカーとしての長所および短所が存在する。これまでに集団遺伝学的解析に用いられた手法についてみると、RFLP によるマルチローカスミニサテライト法は DNA 断片の検出において操作が煩雑で大量のサンプル処理に適さないこと、また、簡便な PCR に基づく RAPD 法は、結果が反応条件に左右されやすく、再現性に乏しいこと等が指摘されている²⁾。また、マイクロサテライト DNA 多型は高率の変異を備え、大量のサンプルを処理することができ、再現性にも優れているが、プラ

イマーの開発作業に労力を要する短所がある²⁾。そのような中で、Amplified Restriction Fragment Polymorphism (AFLP) フィンガープリント³⁾ (AFLP-FP) は、ゲノム DNA を制限酵素で切断し、断片の端にプライマーと相補的なアダプター配列を接合して、任意の塩基配列を加えたプライマーを用いて PCR を行い、ゲノム DNA の増幅断片長多型を検出する方法である。この方法は最近、植物ゲノムのフィンガープリント解析用として開発され、RFLP の信頼性と PCR の簡便性を組み合わせた技術であると考えられる。

本研究では、AFLP-FP 法を用いて、本邦系のアユおよびリュウキュウアユの遺伝変異と遺伝的

分化レベルの推定を試みるとともに、AFLP-FP法の集団解析の遺伝マーカーとしての有用性について検討した。

材料と方法

供試魚 本邦系のアユの供試魚として、1994年に採集した土佐湾産の両側回遊型および琵琶湖産の陸封型アユを用いた。また、リュウキュウアユの供試魚としては奄美大島の住用湾に注ぐ山間川（太平洋側）と焼内湾に注ぐ河内川（東シナ海側）において1993年に採集した個体を用いた。AFLP分析の供試魚数は各標本群について8個体である。DNAサンプルは、鱈条よりSDS-フェノール法⁴⁾により抽出し、AFLP分析に用いるまで4℃で保存した。

AFLP分析 AFLP-FP法は分析用キット（AFLP™ Analysis system I, GIBCO BRL Inc.）を用い、プロトコルは添付マニュアルを改変して行った。最初に500 ngのゲノムDNAを制限酵素*EcoRI*と*MseI*を用いて切断した。切断したDNA断片の両端にアニーリング部位となるアダプター配列を連結し、第1 PCRの鋳型とした。続いてアダプターに相補的なプライマーを用いてPCRを行い、両端が制限酵素*EcoRI*と*MseI*の組み合わせで切断された制限断片のみを増幅した。さらに、DNA増幅断片数を減少させるために、プライマーの両端に、任意の3塩基の配列を加えた*EcoRI*と*MseI*プライマーを用い、第2 PCRを行った。なお、増幅断片を可視化するため、*EcoRI*プライマーは $\gamma^{32}\text{P}$ dATPで標識したものをを用いた。また、本研究で使用した*EcoRI*と*MseI*プライマーは8個ずつあるプライマーキットの中からE-AGGとM-CTTの組み合わせを用いた。増幅DNA断片は5%の変性ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行うことにより分画し、X線フィルムと露光させてフィンガープリントパターンを検出した。なお、検出されたバンドの異同はM13 DNAの

シーケンスラダーを分子量マーカーとして決定した。

各サンプル間の遺伝的類似を示す指数として、2個体間で検出された総断片数に占める共有断片数の割合（Band Sharing Indices, BSI）⁹⁾を用い、平均をとることにより集団間の遺伝的な類似度を示した。なお、BSIは $2N_{ab}/(N_a+N_b)$ の式に従って計算し、 N_{ab} は個体aおよびbに共有する断片数、 N_a 、 N_b はa、b各個体に見られた断片数を示している。

結 果

プライマーにE-AGGとM-CTTの組み合わせを用いた本邦系の両側回遊型、陸封型アユとリュウキュウアユ2集団のAFLP-FPをFig.1に示す。60から400 bpの間に多型バンドを含む明瞭なAFLP-FPパターンが得られ、左右および中央に配した1塩基ごとの分子量マーカーにより、正確にバンドの異同を判定することができた。

検出された増幅断片数、多型のみられたバンド数、増幅断片型数をTable 1に示す。検出された増幅断片数はサンプルによって異なり、両側回遊型アユで17から20本（総断片数23本、平均18.4本）、陸封型アユで16から19本（総断片数21本、平均17.0本）、山間産リュウキュウアユで13本または14本（総断片数14本、平均13.1本）、河内産リュウキュウアユで13本または14本（総断片数15本、平均13.4本）であった。また、遺伝的変異保有量の指標となる多型のみられたバンド数は、両側回遊型アユで34.8%にあたる8本、陸封型アユで38.1%にあたる8本であったのに対して、山間産リュウキュウアユで7.1%にあたるわずか1本、河内産リュウキュウアユで13.3%にあたる2本しか検出されなかった。さらに、各サンプル8個体あたりにみられた増幅断片型数は両側回遊型、陸封型それぞれ6タイプ検出されたのに対して、山間産リュウキュウアユで2タイプ、

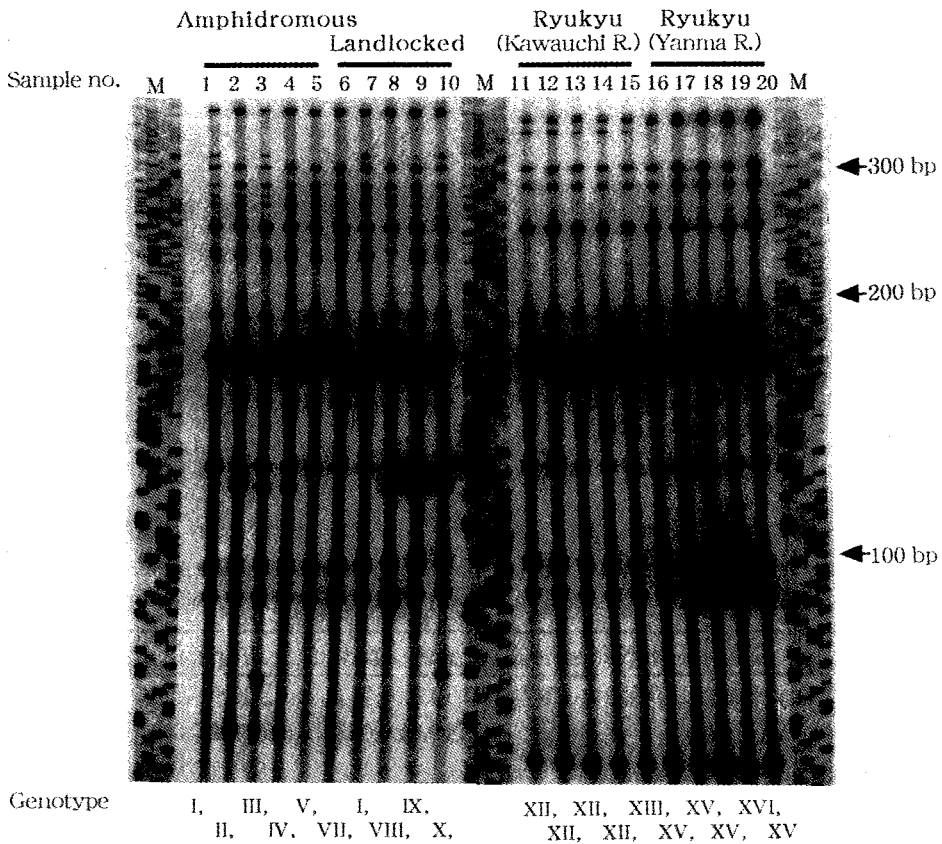


Fig.1. AFLP fingerprinting of amphidromous-, landlocked- ayu and two population of Ryukyu-ayu detected with M-CTT and E-AGG primer pairs. Counting from the left, no. 1-5: amphidromous ayu, no. 6-10: landlocked ayu, no. 11-15: Ryukyu-ayu (Kawauchi R.), no. 16-20: Ryukyu-ayu (Yanma R.), (M): molecular marker is a sequence ladder of M 13 mp 18.

Table 1. Number of bands detected, polymorphic bands and genotypes within amphidromous-, landlocked-ayu, *plecoglossus* f. c. *altivelis* and two local populations of Ryukyu-ayu *P. a. ryukyuensis*

Population	Sampling location	(N)	No. of bands detected	Average no. of bands detected	No. of polymorphic bands (%)	No. of genotypes
Amphidromous	Tosa Bay	(8)	23	18.4	8 (34.8)	6
Landlocked	Biwa Lake	(8)	21	17.0	8 (38.1)	6
Ryukyu	Yanma River	(8)	14	13.1	1 (7.1)	2
Ryukyu	Kawauchi River	(8)	15	13.4	2 (13.3)	3

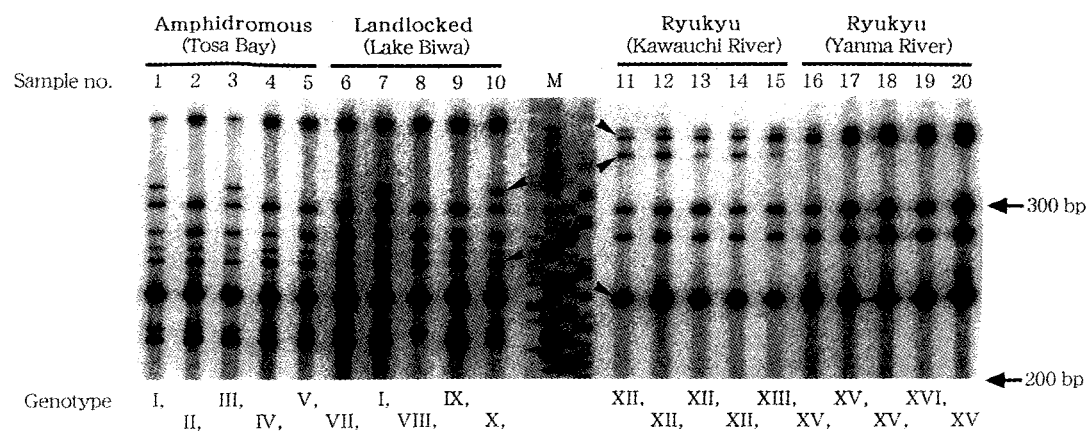


Fig.2. Magnified AFLP fingerprinting of the range from 200 to 400 bp.

Table 2. The value of average BSI*¹ within and between populations estimated from the AFLP fingerprinting pattern detected with M-CTT and E-AGG primer pairs

	Amphidromous	Landlocked	Yanma	Kawauchi
Amphidromous (Tosa Bay)	0.908±0.047	0.903±0.044	0.636±0.021	0.631±0.022
Landlocked (Biwa Lake)		0.909±0.048	0.665±0.027	0.660±0.028
Ryukyu (Yanma)			0.991±0.016	0.915±0.025
Ryukyu (Kawauchi)				0.967±0.025

*¹ BSI=2 N_{ab} / (N_a+N_b) where N_a and N_b are the number of bands present in individuals a and b respectively, and N_{ab} is the number of bands shared by the individuals.

河内産リュウキュウアユで3タイプしか検出されなかった。また、増幅断片型I (Fig.1) のような両側回遊型、陸封型アユに共通の増幅断片型もみられたが、本邦系のアユとリュウキュウアユ間、リュウキュウアユ2集団間で共通な増幅断片型はみられなかった。

検出された AFLP-FP (Fig.1) のうち、変異性の高い 200–400 bp 領域を拡大したものを Fig.2 に示す。各バンドについてみると、本邦系のアユおよびリュウキュウアユの全ての個体に共有されているもの、本邦系のアユ個体全てにおいて共有されるもの、リュウキュウアユ個体全てにおいて共

有されるもの、河内川産リュウキュウアユのみに共有されるもの、および多型バンドが認められ(それぞれ代表的なバンドを矢印で示す)、本邦系のアユとリュウキュウアユまたはリュウキュウアユの山間川産と河内川産をそれぞれ識別することができた。

検出された AFLP-FP に基づく各個体間の BSI から求めた、本邦系のアユおよびリュウキュウアユの各集団内と集団間の BSI の平均を Table 2 に示す。両側回遊型および陸封型アユの集団内と集団間の BSI の平均は全て 0.9 以上の値を示し、それぞれ類似性が高かった。リュウキュウアユにつ

いては集団内においてとくに類似性が高く (0.967 と 0.991)、集団間ではやや類似性が低くなった (0.915)。一方、両側回遊型、陸封型アユとリュウキュウアユ 2 集団間の BSI の平均はいずれも低く、0.631 から 0.665 の低い値を示した。

考 察

これまで、広くフィンガープリントと呼ばれるマルチローカスの DNA 多型検出法は、ハイブリダイゼーション技術に基づくもの (ミニサテライト DNA フィンガープリント等)、PCR 技術に基づくもの (RAPD 等) とともにハイブリダイゼーション、PCR に伴う反応条件の変化に伴う再現性の低さが指摘され²⁾、同一 PCR、同一ゲル内での個体間の比較を行わなければならない、供試個体数が制限されていた。また、検出される DNA 断片の分子量が 500 bp 以上であり、しかも検出される範囲が広いという点から、おおまかな分子量マーカーとの対比が可能であるものの、バンドの異同の判定の不正確さが指摘されていた²⁾。本研究における AFLP-FP 法は、高率の多型が検出されたこと、1 塩基ごとの分子量マーカーを配することにより、検出された多型バンドの異同を確実に判定することができるとともに、再現性の信頼度が高いことから、異なる PCR、異なるゲルにおいても比較でき、集団遺伝学的解析に有用であると考えられた。

アイソザイムにおいて本邦系のアユとリュウキュウアユの遺伝的分化^{6,7)}が示されているが、本研究において両亜種間の BSI の平均が、亜種内の BSI と比較して低い値を示したことは、本邦系のアユとリュウキュウアユ間において遺伝的分化が生じていることを支持している。さらに、増幅された DNA 断片の有無および増幅断片型により、本邦系のアユとリュウキュウアユを識別できることは、AFLP-FP が種識別における遺伝マーカーとして有効であることを示している。一方、山間

川産と河内川産のリュウキュウアユが、DNA 断片の有無および遺伝子型により識別できることは、アイソザイム⁸⁾および DNA フィンガープリント⁹⁾でみられた両集団の地理的隔離による大平洋側集団と東シナ海集団の遺伝的分化を支持するとともに、AFLP-FP が集団の識別における遺伝マーカーとしても有効であることを示している。

検出された増幅断片数、多型のみられたバンド数、増幅断片型数ともに本邦系のアユで高く、リュウキュウアユで低い値を示した。このことは、先のアイソザイム^{6,7)}およびミニサテライト DNA フィンガープリント⁹⁾の結果を支持している。この原因として、島嶼性の集団の成立過程で生じる創始者効果を受けている可能性および集団の有効な大きさが小さくなることによるビン首効果が示唆された。実際、本研究で得られたリュウキュウアユの遺伝的変異保有量のレベルは、1986 年当時、奄美大島全体で約 40000 個体が目視観察された¹⁰⁾のに対し、1990 年の台風の直撃後は、約 1500 個体¹¹⁾に急激に減少した近年の資源量変動の実態をよく反映したものと考えられる。リュウキュウアユの集団の有効な大きさを小さくした原因として、台風や降水量の減少などによる生息地の悪化および破壊^{10,11)}といった自然に発生する要因の他に、人為的要因として、流域森林の伐採や河川および川岸での土木工事による赤土の流入¹⁰⁻¹²⁾、さらに捕獲¹¹⁾があげられる。また、リュウキュウアユが年魚であるという生態的特性も安定した集団の有効な大きさの供給を阻む原因の一つであると考えられる。さらに、急激な集団の有効な大きさの減少による近親交配の可能性も否定できない。また、谷口¹³⁾によると、ビン首効果による遺伝変異保有量の減少は、産子数や生存率など、適応度の低下をもたらす可能性を示唆している。これらの遺伝的浮動、近親交配は複合的に発生し、集団の有効な大きさが小さくなるにつれ、個体数の減少に拍車がかかることが危惧される。今後、リュ

ウキュウアユの保全において、遺伝的変異保有量の少なさおよび集団間の分化がみられたことから、生息域の保全についてはいうまでもなく、人工的な飼育繁殖も利用した遺伝的管理の必要性が示唆された。

AFLP-FP において亜種または集団に特異的な DNA 断片が検出されたことは、AFLP-FP が種および集団識別における有用な遺伝マーカーであることを示している。現在、AFLP キットにはプライマー組が 64 通りあり、プライマー組を増やすことにより、高率に種および集団識別が行うことができると考えられた。また、系統類縁関係に関する研究や遺伝的分化程度の推定に BSI が有用であると考えられた。一方、マルチローカス多型である AFLP-FP のバンド数は遺伝変異保有量の指数となり、複数のマイクロサテライト遺伝子座の対立遺伝子数の和に類似する。また、多型を示したバンドの割合はマイクロサテライト DNA 多型におけるヘテロ接合体率によく対応している。さらに、マイクロサテライトプライマーの開発にかかる労力の削減が可能であることから、多くの個体数の入手が困難で解析サンプル数の少ない希少種の遺伝変異保有量の把握に AFLP-FP 法が有

効であると考えられた。

謝 辞

本研究をすすめるにあたり、本邦系のアユサンプルを提供いただいた高知県内水面漁業協同組合連合会の樋口清允氏およびリュウキュウアユサンプルを提供いただいた(株)拓洋の浜野貞夫氏にお礼申し上げる。

要 約

本邦系のアユおよびリュウキュウアユの遺伝変異保有量を AFLP フィンガープリント法を用いて定量した。本邦系のアユ 2 品種においては検出された遺伝子型数および総バンド数が高い値を示したのに対して、リュウキュウアユ 2 集団においてはそれぞれ顕著に低かった。一方、本邦系のアユとリュウキュウアユ間のバンド共有度は低く、遺伝的分化がみられた。また、検出されたバンドの有無により、リュウキュウアユ 2 集団の識別が可能であった。これらのことから、AFLP フィンガープリント法は集団の遺伝的変異性および分化の推定に関して有効な遺伝マーカーであると考えられた。

文 献

- 1) Park, L. K. and P. Moran (1994) Developments in molecular genetic techniques in fisheries, pp. 272-299, in "Reviews in Fish Biology and Fisheries", eds. by G. R. Carvalho and T. J. Pitcher, Chapman and Hall, London.
- 2) 谷口順彦・高木基裕 (1997) DNA 多型と魚類集団の多様性解析, 「魚類の DNA」(青木 宙・隆島史夫・平野哲也編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 117-137.
- 3) Lin, J. J. and J. Kuo (1995) AFLP™ : A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. Focus, 17 : 66-70.
- 4) Harris, A. S., S. Bieger, R. W. Doyle, and J. M. Wright (1991) DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. Aquaculture, 92 : 157-163.
- 5) Wetton, J. H., R. E. Ceater, D. T. Parkin and D. Waltets (1987) Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. Nature, 327 : 147-149.

- 6) 関伸吾・谷口順彦・田祥麟 (1988) 日本及び韓国の天然アユ集団間の遺伝的分化. 日水誌, 54 : 559-568.
- 7) Nishida, M. (1985) Substantial genetic differentiation in Ayu *Plecoglossus altivelis* of the Japan and Ryukyu Islands. Nippon Suisan Gakkaishi, 51 : 1269- 1274.
- 8) Sawashi, Y. and M. Nishida (1994) Genetic differentiation in populations of the Ryukyu-ayu *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* on Amami-oshima island. Japan J. Ichthyol., 41 : 253-260.
- 9) 高木基裕・谷口順彦 (1994) DNA フィンガープリントにおけるリュウキュウアユの遺伝変異保有量と地理的分化. 水産育種, 20 : 29-37.
- 10) 西田睦・澤志泰正・西島信昇・東幹夫・藤本治彦 (1992) リュウキュウアユの分布と生息状況—1986 年の調査結果—. 日水誌, 58 : 199-206.
- 11) 四宮明彦 (1997) リュウキュウアユ, 「日本の希少淡水魚の現状と系統保存」(長田芳和・細谷和海編), 緑書房, 東京, pp. 36-47.
- 12) 澤志泰正・佐藤尚二・西田睦 (1992) 奄美大島南部におけるリュウキュウアユの分布ならびに生息状況. 沖縄島嶼研究, 10 : 43-57.
- 13) 谷口順彦 (1987) 琉球アユの保護について—遺伝資源保護の立場から—. 淡水魚, 23-26. 図の説明

マイクロサテライト DNA マーカーによるマダイ放流用種苗 における集団の有効な大きさ (N_e) と近交係数 (F) の推定

谷口順彦・Ricardo PEREZ-ENRIQUEZ (高知大・農) ・
松浦秀俊・山口光明 (高知県栽培センター)

Estimation of Effective Population Size and Inbreeding Coefficient in Hatchery
Reared Red Sea Bream by Microsatellite DNA Markers

Nobuhiko TANIGUCHI^{*1}, Ricardo PEREZ-ENRIQUEZ^{*1}, Hidetoshi
MATSUURA^{*2}, and Mitsuaki YAMAGUCHI^{*2}

^{*1} Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture, Kochi University

^{*2} Kochi Prefectural Sea Farming Center

Abstract

FAO experts recommended that a large number of breeders should be used for the production of hatchery-reared juveniles in order to keep a large effective population size (N_e). This will prevent the loss of genetic variation and inbreeding. In this study, we tried to estimate the effective population size (N_e) and the inbreeding coefficient (F) of the hatchery stocks of red sea bream *Pagrus major*. This was based on both the population genetics and the pedigree analysis by using hyper sensitive microsatellite DNA markers. The average heterozygosity were decreased in the hatchery stocks of both the stock enhancement and aquaculture. Based on the genetic changes in average heterozygosities, the inbreeding coefficient was estimated. The hatchery reared fish's pedigree was also traced, using five microsatellite DNA markers, to quantify the actual number of reproducing parents. The effective number of contributing parents (N_e) and the inbreeding coefficient were estimated. The estimated N_e was 63.7, consequently the estimated inbreeding coefficient was less than 1%.

(accepted 12 Aug 1998)

1993年に批准された生物多様性条約は、遺伝資源の利用と保全に関して各国が独自の国家戦略を設定することを求めており、その中に、魚類種苗の大量生産とそれらの放流事業の影響に関する事項が検討対象の一つとして含まれている¹⁾。同年、FAOの水生生物遺伝学専門家会議は、野生集団の遺伝的保全策として、変異の減退防止、近親交配防止、無意識的選択防止などを考慮した放流用種苗の生産を提起している²⁾。一方、マダイ

の栽培漁業については、当初から、人工種苗の大量生産に使用する親魚数、親魚の性比、使用する系統などに関する基本的指針が提案されている³⁾。

集団の有効な大きさ (N_e) を維持するためには十分な数の親魚を確保すること、採卵日数を複数日にすることなど、いずれも大きなコスト増と多大な労力増をを伴うので、それらのコスト低減対策について強い関心がもたれている。また、維持すべき親魚の数、継代の是非、使用系統の決定な

ど具体的な検討課題が残されている。

マダイのように自然産卵によって採卵を行う対象魚種においては、集団の有効な大きさ (N_e) を親魚情報から直接的に推定・評価することは容易ではない。このため、従来からアイソザイムのような遺伝マーカーを利用する試みが行われてきた^{4,5)}。しかし、アイソザイムは平均ヘテロ接合体率が低いので、遺伝マーカーとしての感度が必ずしも十分とは言えなかった。

本研究では、高感度遺伝マーカーとして知られるマイクロサテライト DNA 多型⁶⁾を採用し、マダイ人工種苗集団における集団の有効な大きさ (N_e) を親子判別や集団遺伝学的手法に基づき推定することを試みた。

材料および方法

供試魚

(1) 放流用および養殖用人工種苗のサンプル

供試魚として、4つの改良系統および1つの非選択系統を用いた。これら5系統は、マダイの品種特性調査のため、マダイの改良系統および非選抜系統の産卵水槽から受精卵を譲り受け、筆者らが種苗生産して得たもので、系統の作出過程については、Table 1 のフットノートに示した。なお、供試魚各系統の成長および遺伝的変異性に関するデータは水産庁の新品種作出基礎技術開発事業報告 (1992-1997)⁷⁻⁹⁾にまとめられている。

(2) 親子鑑定に用いた親魚と人工種苗のサンプル

種苗生産に用いた親魚は3-6才の250尾で、採卵終了後、鰭の一部を採取し、DNA 抽出用サ

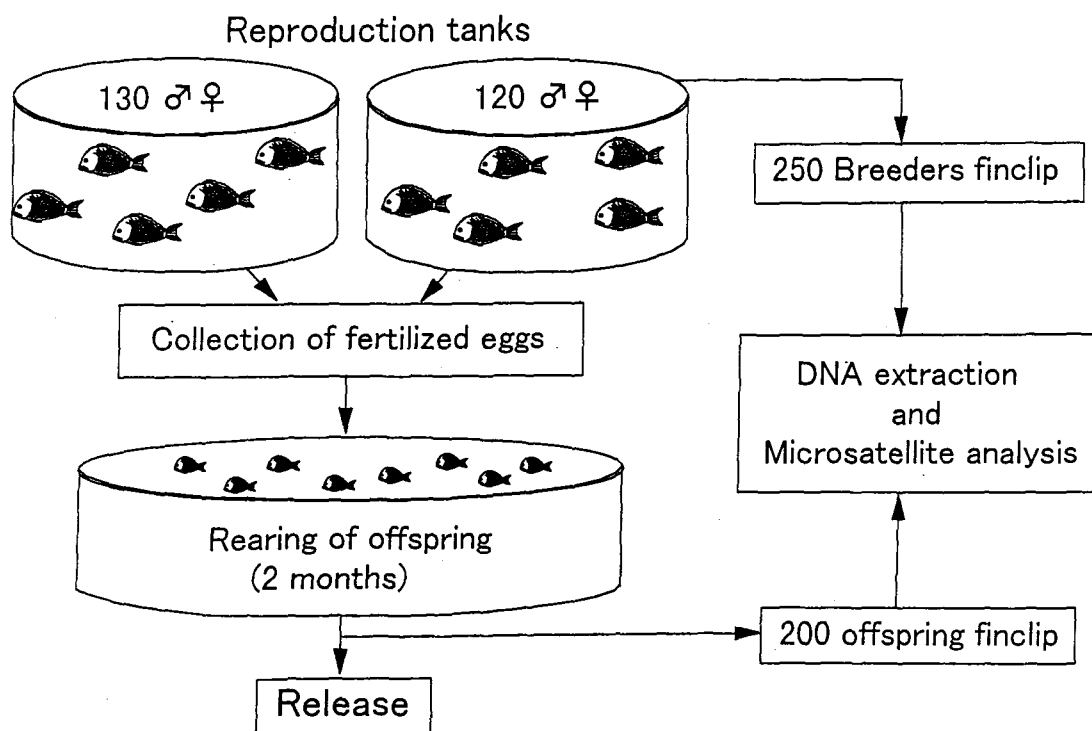


Fig. 1. Genetic marking for breeders and offspring by microsatellite DNA

ンプルとした。また、ふ化後2ヶ月目の稚魚200尾を採集し、DNA抽出用サンプルとした (Fig.1)。

マイクロサテライト DNA 多型検出法

遺伝マーカとして専らマダイのマイクロサテライト DNA 多型を検出するために、開発されたプライマーセットを使用した¹⁰⁾。供試魚の鱗サンプルから常法により DNA を抽出したのち、それを鋳型 DNA とし、既報のプライマーを用いて PCR 法により当該領域を増幅した。マイクロサテライト DNA 多型の検出は³²P アイソトープでエンドラベルした PCR 増幅断片をアクリルアミドゲル電気泳動法により展開し、X 線フィルムに感光させて、検出した。アレル (対立遺伝子) の判読は M13 ファージ DNA シクエンスラダーに基づき、塩基配列の番号を基準として実施した。

マイクロサテライト DNA 多型による稚魚のマーキングは Fig.1 のフローに従った。使用したマーカー遺伝子座⁷⁾は *Pma-1*, *Pma-2*, *Pma-3*, *Pma-4* および *Pma-5* である。

集団の有効な大きさの推定

(1) 平均ヘテロ接合体率から求める方法 (Crow and Kimura, 1970)¹¹⁾

この方法は基本的には、一定の突然変異率のもとで、長期にわたって再生産が行われている野生集団に応用することが出来る。

$$H = 4 N_e \mu / (4 N_e \mu + 1) \quad \dots\dots\dots 1)$$

ここで、 H は平均ヘテロ接合体率、 N_e は集団の有効な大きさ、 μ は突然変異率である。1) 式を移項すると

$$N_e = (H / (1-H)) / 4 \mu \quad \dots\dots\dots 2)$$

となる。マイクロサテライト DNA 領域における突然変異率として Garcia et al.¹²⁾ の $\mu=10^{-4}$ を採用した。近交係数は $\Delta F=1/2 N_e$ により求めた。

(2) 養殖種苗 (産卵親魚に関する情報がない場合)

野生集団の基準値に比べ、人工種苗の平均ヘテロ接合体率の低下の程度から求める方法を採用した¹³⁾。

$$H_t = 2 p (1-p) \cdot (1-F_t) \quad \dots\dots\dots 3)$$

ここで、 H_t は t 世代目の平均ヘテロ接合体率、 F_t は t 世代目の近交係数である。 $2 p (1-p)$ は野生集団における任意交配条件下でのヘテロ接合体率 (H_0) とすると、3 式は

$$H_t = H_0 \cdot (1-F_t) \quad \dots\dots\dots 4)$$

となる。4 式を移項すると

$$F_t = (H_0 - H_t) / H_0 \quad \dots\dots\dots 5)$$

次に、 t 世代目の近交係数 (F) と集団の有効な大きさ (N_e) の関係は

$$F_t = 1/2 N_e + (1 - (1/2 N_e)) F_{t-1} \quad \dots\dots\dots 6)$$

$\Delta F=1/2 N_e$ であるから

$$F_t = \Delta F + (1 - \Delta F) F_{t-1} \quad \dots\dots\dots 7)$$

7 式を移項すると

$$\Delta F = (F_t - F_{t-1}) / (1 - F_{t-1}) \quad \dots\dots\dots 8)$$

または

$$N_e = (1 - F_{t-1}) / 2 (F_t - F_{t-1}) \quad \dots\dots\dots 9)$$

となる。

(3) 産卵に係わった親の数が判っている場合

遺伝標識により産卵に係わった親の数を計数する方法を採用した。人工種苗の親子鑑別を行い、産卵水槽に収容された親の内、繁殖に係わった親の数を計数する。ここでは親子鑑別が可能となる高感度遺伝マーカーがあること、親魚は近交系でないこと (野生) が N_e 推定のための基本条件である。集団の有効な大きさは性比のアンバランスや親が次世代に残した子供の数のアンバランスの影響を受けるので、下記の式により補正を行う¹³⁾。

雌雄比の補正は

$$N_e = 4 N_m \cdot N_f / (N_m + N_f) \quad \dots\dots\dots 10)$$

によった。親が次世代に残した子供の数のアンバランスの補正は

$$N_e^* = N_e / (4 + V_{kr} + V_{km}) \quad \dots\dots\dots 11)$$

によった。

Table 1. Genetic variability of wild and hatchery reared stocks (S 1 –S 5)^{*1} of red sea bream

	Pma 1	Pma 2	Pma 3	Pma 4	Pma 5	Mean
Wild population						
No. of samples	(29)	(30)	(28)	(30)	(29)	
No. of alleles	13	24	20	26	16	19.8
Effective no. of alleles ^{*2}	2.6	14.3	11.8	11.4	7.8	9.58
Heterozygosity (Ho) ^{*3}	0.762	0.900	0.928	0.863	0.893	0.869
(He) ^{*4}	0.608	0.917	0.908	0.909	0.911	0.851
(Ho/He)	1.253	0.981	1.022	0.949	0.980	1.037
S 1						
No. of samples	(29)	(30)	(31)	(30)	(31)	
No. of alleles	12	26	17	19	15	17.8
Effective no. of alleles	3.4	18.5	12.2	8.1	10.0	10.44
Heterozygosity (Ho)	0.552	1.000	0.839	0.667	0.806	0.773
(He)	0.705	0.946	0.918	0.876	0.900	0.869
(Ho/He)	0.783	1.057	0.914	0.761	0.896	0.882
S 2						
No. of samples	(30)	(32)	(27)	(32)	(31)	
No. of alleles	6	15	9	9	8	9.4
Effective no. of alleles	3.2	9.3	5.1	5.2	3.7	5.30
Heterozygosity (Ho)	0.833	0.844	0.852	0.563	0.806	0.780
(He)	0.689	0.893	0.802	0.809	0.736	0.786
(Ho/He)	1.209	0.945	1.062	0.696	1.095	1.002
S 3						
No. of samples	(30)	(31)	(30)	(31)	(31)	
No. of alleles	5	11	7	8	6	7.4
Effective no. of alleles	2.9	4.9	1.5	5.5	4.4	3.84
Heterozygosity (Ho)	0.700	0.839	0.333	0.839	0.710	0.684
(He)	0.659	0.769	0.326	0.817	0.775	0.669
(Ho/He)	1.062	1.091	1.021	1.027	0.916	1.024
S 4						
No. of samples	(33)	(33)	(32)	(32)	(32)	
No. of alleles	10	29	14	16	15	16.8
Effective no. of alleles	3.2	21.7	11.5	5.4	7.1	9.78
Heterozygosity (Ho)	0.697	1.000	0.906	0.656	0.969	0.846
(He)	0.685	0.954	0.913	0.815	0.886	0.851
(Ho/He)	1.018	1.048	0.992	0.805	1.094	0.991
S 5						
No. of samples	(30)	(32)	(30)	(32)	(31)	
No. of alleles	8	22	14	13	15	14.4
Effective no. of alleles	3.9	12.2	6.1	4.9	8.3	7.08
Heterozygosity (Ho)	0.833	0.969	0.933	0.719	0.839	0.859
(He)	0.724	0.918	0.866	0.797	0.863	0.834
(Ho/He)	1.151	1.056	1.077	0.902	0.972	1.032

*1 : S 1, the 2 nd generation by non-selective breeding for enhancement of wild population ; S 2, the 7 th generation by size selective breeding ; S 3, the 7 th generation by size selective breeding ; S 4, the 2 nd generation by size selective breeding ; S 5, the 4 th generation by size selective breeding originated from inter subpopulational cross breeding.

*2 : $=1/(1-He)$,

*3 : observed heterozygosity,

*4 : expected heterozygosity.

ただし、継代する場合、各世代の N_e の調和平均となり
$$N_e = t / \sum (1/N_i) \quad \dots\dots\dots 12)$$
により補正する。

結 果
平均ヘテロ接合体率 (H) に基づく N_e の推定
この方法は野生集団に応用することが出来る。
マダイのマイクロサテライト DNA 遺伝子座における 1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数、平均ヘテ

Table 2. Estimated values of inbreeding coefficient in hatchery reared stocks S 1 to S 5 based on the formula $F_t = (H_o - H_t) / H_o$.

S 1 :	$F_t = (0.869 - 0.869) / 0.869 = 0$
S 2 :	$F_t = (0.869 - 0.786) / 0.869 = 0.095$
S 3 :	$F_t = (0.869 - 0.669) / 0.869 = 0.230$
S 4 :	$F_t = (0.869 - 0.851) / 0.869 = 0.021$
S 5 :	$F_t = (0.869 - 0.834) / 0.869 = 0.040$

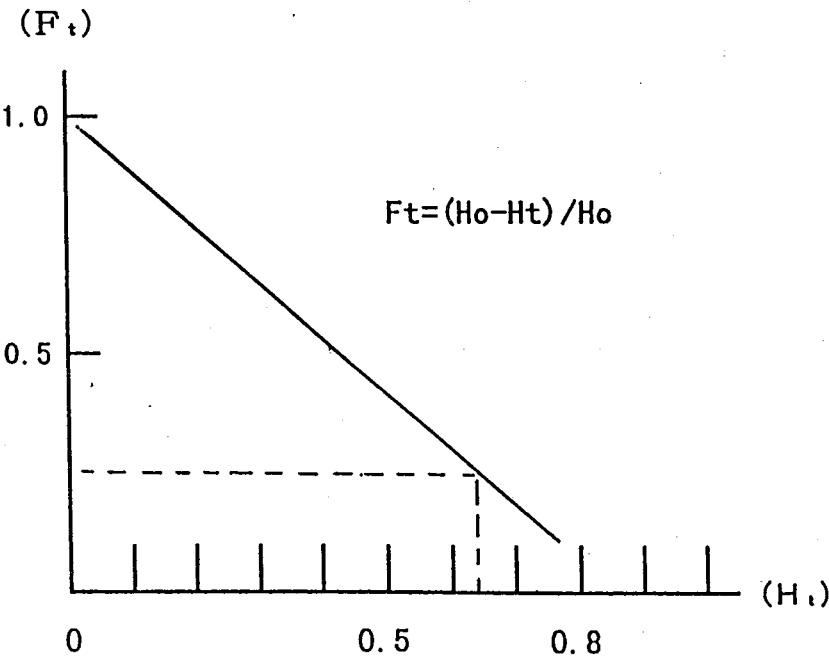


Fig.2. Relation of inbreeding coefficient (F_t) and average heterozygosity (H_t) in microsatellite DNA markers.

ロ接合体率はともに著しく高い数値を示した (Table 1)。高知県産の野生マダイにおける平均ヘテロ接合体率は0.851 (期待値) であった。この数値を(2)式に代入すると、
$$N_e = (0.851/4 (1-0.851) \times 10^{-4} = 14279$$
 となった。

Table 1 の放流用人工種苗および養殖用系統 (S 1-S 5) に対して(2)式を当てはめると N_e 値は S 3 の 5052 から S 1 の 16584 の範囲の数値をとり、実際の親魚数より遥かに大きく推定された。人工種苗集団では、一定の突然変異率と N_e のもとで継代され続けるという条件を満たしていないので、(2)式を当てはめれば、過大評価になるのは当然のことと考えられる。

選択育種系統における近交係数と N_e の推定

養殖用人工種苗の大量生産においては、親魚数や選択育種に関する情報を得ることは容易でない。このような人工種苗生産が継代的に実施されるなかで、一部に近交が働くことは確実であり、ヘテロ接合体率は低下する。ヘテロ接合体率の低下の程度から近交係数を推定できれば、 N_e の推定も可能となる。

ヘテロ接合体率と近交係数の関係は(3)式により示される。野生集団を導入してから t 世代目の近交係数は(5)式を変形して $F_t = (1-H_t / H_0)$ で表される (Fig. 2)。

ここで、Table 1 より野生集団の遺伝子頻度を $p=0.851$ とすると、 H_0 は 0.255 となる。 H_t にはそ

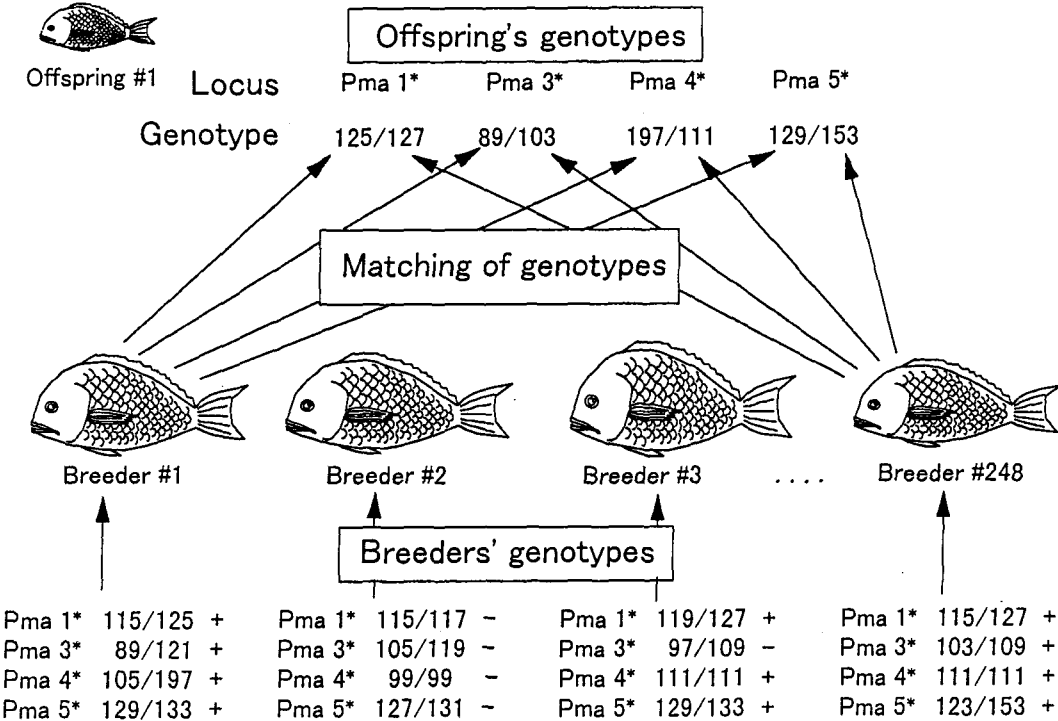


Fig.3. An example of matching test for Pedigree analysis using the 4 loci of microsatellite DNA in computer identification system. The breeder#1 and #248 were identified as a couple for the offspring #1.

それぞれの養殖用集団の H_e の平均値 (Table 1) を代入する。Table 2 は養殖用人工種苗系統における近交係数の推定値である。推定された近交係数は長年の継代選択育種を行った系統においても顕著な上昇は認められなかった。 F_{t-1} が得られていないので、 N_e の推定値は得られないが、(9) 式において t 世代目の近交係数 F_t から N_e は意外に小さいことが想像された。

人工種苗における親子鑑定と N_e の推定

集団の有効な大きさは、使用した親魚の雌雄別個体数から (10) 式により直接推定することが出

来る。しかし、マダイは自然産卵方式による採卵を行うため、親子判別に基ずく稚魚の遺伝情報より、親魚の数を推定する方法を採用した¹⁴⁾。

Fig.1 は遺伝的マーキングの手順を示している。親魚については、DNA 抽出用標本として産卵期の後に、次世代についてはふ化後 2 ヶ月目に、鰭の一部を採取した。

次に、親魚およびそれらの稚魚のマイクロサテライト DNA 多型を検出し、個体別、遺伝子座別に遺伝子型を判読決定した。稚魚の遺伝子型と親魚の遺伝子型を対比することにより (独自に考案した PC プログラムを利用)、それぞれの稚魚に

Table 3. Pedigree tracing data and estimation of the effective number of breeders

Offspring matched to :	Number	%	
One parental couple	147	73.5	
Two or more parental couples	13	6.5	
One parent alone	40	20	
Total number of families	Tank 1	Tank 2	Total
	41	46	87
Total number of contributors			
Females (N_f)	19	15	34
Males (N_m)	27	30	57
Total	46	45	91
N_e (unequal sex proportion)			
$N_e = 4 * N_f * N_m / (N_f + N_m)$	44.6	40.0	84.6
Variance of offspring per parent ¹⁾			
Per female (V_{kf})	3.26	5.60	
Per male (V_{km})	2.22	2.67	
N_e^* (unbalanced family size)			
$N_e^* = 8 N_e / (4 + V_{km} + V_{kf})$	37.6	26.1	63.7
Inbreeding coefficient ($F = 1 / 2 N_e^*$)	$F =$		0.008

¹⁾ The variance is equal to the mean number of offspring per parent

対する親魚カップルを決定した (Fig. 3)。

産卵用親魚水槽には 250 個体の親魚が収容されていた。1 個体の稚魚のマイクロサテライト DNA の 4 遺伝子座の遺伝子型を親魚 200 個体のそれらと対比し、稚魚の遺伝子を共有する親魚を選んだ。親魚のカップルは 7800 組考えられた。この作業により、調べた 200 尾のうち 73.5% の稚魚に対してそれらの親魚のカップルが特定された (Table 3)。親魚が特定された稚魚 87 家系のうち、90% 以上が 1 尾の雌に対して 2 尾の雄が交配し、4 家系については 1 尾の雌に対し 5 尾以上の雄が交配していたことが判明した。放卵・放精を通じて実際に子孫の遺伝子を伝えた個体数は、産卵水槽の 250 尾の内、91 尾 (35%) であり、それらの内雌親の数は 34 尾、雄親の数は 57 尾であった。性比のアンバランスの影響を補正すると、 N_e の推定値は (10) 式より 84.6 (10% 減) となった。さらに、産仔数のアンバランスの影響を (11) 式により補正すると、 N_e^* の推定値は 63.7 (30% 減) となった。このような N_e^* 値から予測される近交係数は 0.0078 であった。

考 察

遺伝的多様性の確保は集団と個体の適応値を維持する上で、最も重視される。遺伝的多様性の確保のためには集団の有効な大きさ (N_e) を高く維持することが求められる。魚類のように多産性の生物では、人工種苗集団における集団の有効な大きさは見かけの集団の大きさに比べ遥かに小さくなる。FAO の専門家会議は人工種苗生産において維持すべき親魚の数に関する指針を示しているが、人工種苗集団において N_e を把握する確かな方法が十分検討されているわけではない。

集団の有効な大きさ (N_e) は任意交配を行う不連続世代構造の理想集団の個体数に換算して表したものと定義されている¹³⁾。ここで、理想集団とは、次代の遺伝子頻度 q と実測値 q' の差を Δq と

し、その分散を $V_{\Delta q}$ とするとき $N_e = q(1-q) / 2 V_{\Delta q}$ が成立する集団である。現実の集団では $V_{\Delta p}$ の実測値は理想集団におけるそれに比べ大きいのが普通である。同様の関係はヘテロ接合体率、近交係数、 N_e の関係式 (2) - (9) に見られるように、人工種苗集団ではみかけの大きさ (N_s) はそのときの H_t に対応する個体数の期待値 (N_e) より大きい。集団の有効な大きさの推定は生殖に寄与した親魚を直接計数する方法と間接的に計数する方法に分けることが出来る。対象がサケ・マス類、アユ、コイなどの淡水魚の場合、人工媒精による採卵を行うことが多く、親魚の数、産子数、性比等の直接的計数データから F 値を勘案しながら N_e を推定することができる。野生集団でもアマゴやイワナなどの場合には一つの水系の産卵ペア数や一腹の産子数の直接カウントから N_e の推定が可能である。

他方、海産魚のように自然産卵法による採卵を行う場合は、生殖に寄与した親魚を特定出来ないで、子世代における遺伝子頻度の変動幅 ($N_e = q(1-q) / 2 V_{\Delta q}$) に基づき推定する方法⁴⁵⁾や遺伝マーカーによる親子鑑定結果 (家系図) から、産卵に係わった親の数を計数する間接法がとられる⁹⁾。

マイクロサテライト DNA 多型による親子判別にもとづく人工種苗集団の N_e の推定値は 63.7 であったが、この数値は FAO の非継代的種苗生産における N_e の基準値¹⁵⁾ 50 を満たしているが、継代的種苗生産の場合の N_e の基準¹⁵⁾ より遥かに低いことが判明した。養殖用人工種苗における近交係数の上昇率はやはり、 N_e が小さいことを示唆している。

遺伝標識のヘテロ接合体率の変化や遺伝子頻度の分散の大きさから N_e を推定する場合には、推定値の精度は平均ヘテロ接合体率の大きさに依存する。アイソザイム多型では、野生集団の平均ヘテロ接合体率は 0 から 0.1 の間をとることが多い。

マイクロサテライト DNA 多型では、野生集団の平均ヘテロ接合体率は 0.2 から 0.8 程度のことが多く、今回、マダイでは平均ヘテロ接合体率は 0.851 (期待値) で、 $N_e = 14279$ となった。その後の調査で、野生マダイでは平均ヘテロ接合体率が 0.9 を超えることがあったが¹⁴⁾、この場合、 N_e は 20000 を超えることになる。マイクロサテライト DNA 多型は魚類の再生産における集団の遺伝的变化をモニターするための遺伝マーカーとして今後ますます重要な位置を占めると思われる⁹⁾。

高感度遺伝マーカーとして知られるミトコンドリア DNA 多型マーカーは N_e の縮小の影響をハプロタイプ数の急激な減少 (ビン首効果) として敏感に捉えることが出来る¹⁶⁾。しかし、 N_e の縮小にともなう近交の状態を把握することはできない。

謝 辞

本研究の一部は水産庁の新品種作出基礎技術開発事業 (1992-1997)⁷⁻⁹⁾ および日本水産資源保護協会の水産生物の遺伝的多様性の保存および評価手法の開発事業の中で、実施されたものである。これらの事業推進の中で、お世話いただいた水産庁および日本水産資源保護協会の方々にお礼申し上げる。また、供試魚の飼育やデーターの集積に

おいてご協力をいただいた高知大学の学生諸氏にお礼申し上げる。

要 約

1. マダイのマイクロサテライト DNA は人工種苗の個々の子供の親魚を特定するのに十分な多型を備えており、親子鑑別のマーカーとして有用であることが証明された。
2. マダイのマイクロサテライト DNA の平均ヘテロ接合体率は野生集団のそれに比べ、人工種苗集団において低下していることが確認された。
3. 人工種苗のマイクロサテライト DNA のヘテロ接合体率 (期待値) を指標とし近交係数 (F) を推定できることが示された。
4. マイクロサテライト DNA をマーカーとし、採卵当日に実際に産卵に係わった親の数を雌雄別に計数することにより、集団の有効な大きさ (N_e) を推定する事が出来た。
5. 親魚のそれぞれが残した子孫の相対数を計数することが出来た。
6. 雌雄比および産子数の偏りを補正したところ、補正後 N_e は産卵に係わった親魚の 70% であった。
7. 予測される近交係数は 0.008 であり、養殖用マダイ品種で観察されたレベルより低かった。

引用文献

- 1) 中前 明 (1996) 生物多様性に関する条約. 水産振興, 30 (10): 1-46.
- 2) FAO (1993) 水生遺伝資源の利用と保全について -FAO 専門家会議の報告書より (谷口順彦訳), 水産育種, 22: 83-102.
- 3) 谷口順彦 (1986) 種苗生産における遺伝学的諸問題. 「マダイの資源培養技術」(田中 克・松宮義晴編), 水産学シリーズ No.59, 恒星社厚生閣, 東京, pp.37-58.
- 4) Taniguchi, N., K. Sumantadinata and S. Iyama (1983) Genetic change in the first and second generations of hatchery stock of black seabream. Aquaculture, 35: 309-320.
- 5) Sugama K., N. Taniguchi, and S. Umeda (1988) An experimental study on genetic drift in hatchery population of red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 739-744.
- 6) 谷口順彦・高木基裕 (1997) DNA 多型と魚類集団の多様性解析. 魚類の DNA (青木・隆島・平野編), 恒星社厚生閣, 東京, p.117 - 137.

- 7) Takagi, M., N. Taniguchi, D. Cook and R. W. Doyle (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. *Fisheries Science*, 63 (2) : 199–204.
- 8) Nobuhiko Taniguchi, Motohiro Takagi, and Kazuhiko Mikita (1998) Microsatellite DNA markers for monitoring genetic change in hatchery stock of red seabream (*Pagrus major*) for release and net-cage culture. Chapter 10 in 'Genetics in sustainable fisheries management'. Blackwell Science (Oxford, UK) (in press)
- 9) R. Perez-Enriquez, M. Takagi and N. Taniguchi (1998) Genetic change and pedigree tracing of hatchery-reared stock of red sea bream used for stock enhancement based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* (in press)
- 10) 谷口順彦・松本聖治・小松章博・山中弘雄 (1995) 同一条件で飼育された由来の異なるマダイ 5 系統の質的および量的形質に見られた差異. *日水誌*, 61 : 717–726.
- 11) Crow J.F. and M. Kimura (1970) An introduction to population genetics theory. Harper and Row Publisher, New York, Evanston, and London, pp.591.
- 12) Garcia de Leon, F. J., L. Chikhi, and F. Bonhomme (1997) Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Molecular Ecology*, 6 : 51–62.
- 13) 向井輝美 (1980) 集団遺伝学. 講談社サイエンティフィック (東京), pp 274.
- 14) Perez-Enriquez R. and N. Taniguchi (1998) Genetic structure of red sea bream (*Pagrus major*) population off Japan and the Southwest Pacific, using microsatellite DNA markers. *Fisheries Science*, in press.
- 15) FAO/UNEP (1981) Conservation of the genetic resources of fish : Problems and recommendations Report of the expert consultation on the genetic resources of fish. FAO Fish Tech. Paper., no. 217 : 1–43.
- 16) 藤井徹生・西田睦 (1996) mtDNA D ループ領域の塩基配列からみたヒラメ人工種苗の遺伝的多様性. 平成 8 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, P.92.

マダイにおけるケミルミネッセンスを用いた マイクロサテライト DNA の検出：実践マニュアル

PEREZ-ENRIQUEZ Ricardo・竹村昌樹・谷口順彦（高知大・農）

Microsatellite DNA Detection by Chemiluminescence in Red Sea Bream : A Practical Manual

Ricardo PEREZ-ENRIQUEZ, Masaki TAKEMURA and Nobuhiko TANIGUCHI
Faculty of Agriculture, Kochi University,

Abstract

A reliable non-radioactive method based on chemiluminescence usea for the detection of hypervariable microsatellite DNA of red sea bream is described. Using biotinylated primers, four loci (*Pma 1'*, *Pma 3'*, *Pma 4'*, *Pma 5'*) were detected showing an identical banding pattern was detected with the radioactive method. The chemiluminescence method is proposed as a safe and appropriate technique to be used for population genetic studies and pedigree analyses. It is suggested that the technique is suitable not only for red sea bream, but for other fish or shellfish species as well. A practical method has been described in Japanese as well.

(accepted 12 Aug 1998)

マイクロサテライト DNA は連続した 2~5 塩基のヌクレオチドの短い反復配列領域であり、通常 300 bp より短く特異的な DNA 連鎖領域によって挟まれている。¹⁾ またゲノム全域に豊富に分布するマイクロサテライト DNA は高い多型性を備えていることから、魚類における集団遺伝学的研究²⁾ や、家系分析³⁾ における強力な DNA フィンガープリントマーカ―として用いられている。マイクロサテライト DNA の検出に用いられる最も一般的な方法はオートシーケンシング、または放射性同位元素 (RI) 標識産物を使用する方法である。しかし、前記の方法では、DNA オートシーケンサーやフローレッセントイメージアナライザーの使用が必要であり、またそれらの設備投資は巨額なものである。また後記の方法では、前記のもののほど高価ではないにしても、放射性同位元素の

使用によるリスクを有し、また特別な実験施設を必要とする。それらの問題を避けるために Mekus ら³⁾ は、人間の DNA におけるマイクロサテライトのケミルミネッセンス法による検出技術を確立した。この研究の目的は、ケミルミネッセンスの技術が魚類、特にマダイにおけるマイクロサテライト DNA の検出において、安全でなおかつ有用であるということを示すことにある。加えて、実践マニュアルはこの方法の実施を容易にするものである。

材料と方法

本研究では供試魚として瀬戸内海燧灘で採取されたマダイ *Pagrus major* 70 個体を用いた。鋳型 DNA はフェノール・クロロホルム法によって尾鰭片から抽出した。⁴⁾ この方法は、700 ml の TNES

-Urea (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 4 M Urea) とプロテアーゼ K (最終濃度 50 µg/µl) を加えた 1.5 ml チューブに約 1 cm² の尾鰭片を入れる。その後、穏やかに攪拌しながら 37℃ で一晩かけてインキュベートするものである。DNA はそれぞれ、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1)、続いてクロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) の順で抽出を行った。

その後、抽出産物に 2 倍量の冷エタノールを加え、DNA を沈殿させた。

沈殿後、上澄み液を廃棄し、70% エタノールで洗浄した後、室温で風乾した。乾燥させた DNA は 100 µl の TE Buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 7.2) で希釈し 4℃ で保存した。

解析に使用したマイクロサテライト DNA 遺伝子座は *Pma 1**、*Pma 3**、*Pma 4**、*Pma 5** である⁹⁾。それら各 DNA 遺伝子座に対応するプライマーはグライナー・ジャパン DNA 受託合成事業部に発注し入手した。フォーワードプライマーはラベリングを施さないものを用いたのに対し、リバースプライマーはビオチンで 5' エンドラベルしたものを用いた。それぞれのプライマーには最終濃度 100 pmol/µl となるように TE Buffer を加え、調整した。

マイクロサテライトの増幅 (PCR) は、MJ RESEARCH, INC. サーマルサイクラーで行った。PCR を行うにあたり各供試魚の DNA 1 µl (40 ng/µl) に対して 0.2 µM フォーワードおよびリバース (ビオチンラベル) プライマー、1×PCR Buffer (TaKaRaTM)、0.2 mM dNTPs (TaKaRaTM)、1% ホルムアミド、0.1 unit の Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRaTM) で構成した PCR カクテル 5 µl を使用した。PCR は、94℃ を 1 分、アニーリング温度 (*Pma 1**=48℃, *Pma 3**=51℃, *Pma 4**=53℃, *Pma 5**=49℃) を 30 秒、72℃ を 30 秒、この過程を 1 サイクルとして 7 サイクル行い、さらに 90

℃ を 30 秒、アニーリング温度を 30 秒、72℃ を 30 秒、この過程を 33 サイクル行った。PCR 増幅の後、5 µl のストップダイ (0.3% プロモフェノールブルー、0.3% キシレンシアノール) を PCR 産物に加え、それを 95℃ で変性させた後、8% ポリアクリルアミドゲルでマニュアルシークエンサー (HoefferTM) を用いて電気泳動した。

シークエンスラダーは、サイズマーカーとして用いられている ds pUC 19 プラスミドを使用し、CircumVent PhototopeTM Kit (New England Biolabs Cat.#7430) を用いて作製した (A、C、G、T 各 3.0 µl に対して、puC-19 control DNA 0.5 µl、biotinylated プライマー 1.0 µl、sequencing buffer 10 × 1.5 µl、30× Triton 1.0 µl、H₂O 10.0 µl、DNA Vent ポリメラーゼ 2.0 µl で構成した混合液を 3.2 µl ずつを加えて PCR を行った)。

電気泳動終了後、ゲルは 3 MM CHR Whatman filter paper に固定した。

ケミルミネッセンス法における DNA 転写、UV クロスリンク、検出の過程は PhototopeTM Star Detection Kit (New England Biolabs Cat.#7020) のプロトコールに従い実行した⁹⁾。DNA 転写においては、2 枚の濾紙、非帯電ナイロンメンブラン (Immobion-STM, Millipore)、そして、さらに 2 枚の濾紙を 2 枚のガラス板の間に挟み込み行った。下層に配置した 2 枚の濾紙とナイロンメンブランは 0.5×TBE Transfer Buffer、pH 8.7 (10×溶液: 1 M Tris、0.8 M ホウ酸、0.01 M EDTA) に浸して使用した。転写は 20 分間行った。転写後のメンブランは 80℃ で 15 分間乾燥させた。UV クロスリンクは、メンブランの DNA 転写側を下にしてトランスイルミネーターで 40 秒間行った。UV 照射時間に関しては、実験に使用するトランスイルミネーターの UV 強度によって異なってくるため、付録のマニュアルの計算式を用いてトランスイルミネーターの UV 強度から算出した。

DNA の検出は、メンブランをアクリル製ロー

ルシリンダー、もしくはハイブリダイゼーションバッグに収納して行った。まず、メンブランを 5% SDS リン酸溶液 pH 7.2 で洗浄した後、streptavidin を含む溶液でインキュベートした。その後、0.5% SDS リン酸溶液で 2 度洗浄し、biotin/alkaline フォスファターゼ化合物溶液を加えて反応させた後、再び 5% SDS リン酸溶液で洗浄し、さらに洗浄液 II pH 9.5 (10×溶液：100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) で 2 度洗浄することによりケミルミネッセンスの基質を活性化した。最後にメンブランの放射光を X 線フィルムに感光させ DNA バンドを検出した。

結果と考察

本論文は魚類におけるケミルミネッセンスを用いた最初の報告であり、今回用いた 4 つのマイクロサテライト DNA 遺伝子座 *Pma 1**、*Pma 3**、*Pma 4**、*Pma 5** すべてにおいてケミルミネッセンスによる解析が有効であった (Fig.1)。各サンプルの中での対立遺伝子の相対的な位置関係はこれまでの RI 法で得られたものに完全に一致した。しかし、シークエン斯拉ダーに対する対立遺伝子の位置は RI 法によって得られたバンドの位置とは異なっており、ケミルミネッセンス法によって検出された各サンプルの対立遺伝子のサイズは

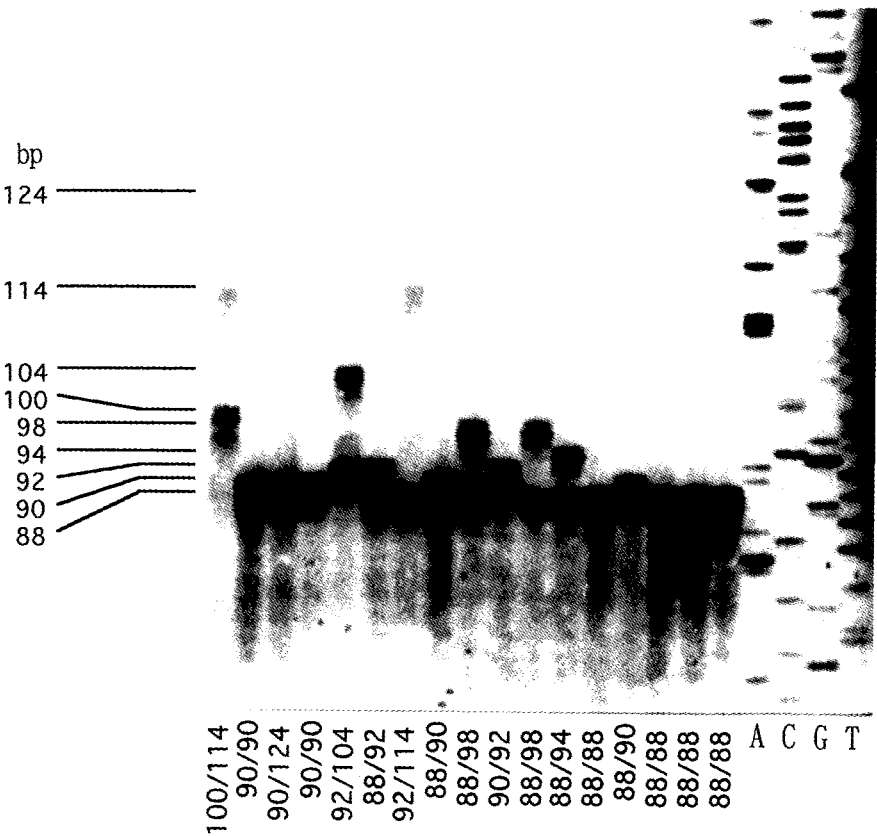


Fig.1. Microsatellite banding patterns of Pma 4 locus obtained with chemiluminescence

Table 1. *Pma* 5' Genotypes of ten individuals obtained with Chemiluminescence and radioactivity methods.

Fish No.	chemiluminescence	RI
1	100/105	127/131
2	102/106	129/133
3	100/108	127/135
4	100/102	127/129
5	104/108	131/135
6	96/118	123/145
7	98/104	125/131
8	110/110	147/147
9	102/118	129/145
10	96/104	123/131

Table 2. Number of alleles per locus and heterozygosity at four loci

	<i>Pma</i> 1*	<i>Pma</i> 3*	<i>Pma</i> 4*	<i>Pma</i> 5*	Mean
Sample size	70	70	70	70	
Number of alleles	18	29	17	18	20.5
Observed Heterozygosity (Ho)	0.671	0.929	0.743	0.914	0.814
Expected Heterozygosity (He)	0.664	0.942	0.897	0.907	0.852
Ho/He	1.011	0.986	0.828	1.008	0.958

RI を用いて検出されたものに比べ 27 bp 小さいバンドサイズとなった (Table 1)。RI 法とケミルミネッセンス法の間に見られた対立遺伝子の位置関係の違いの原因は、マーカーを作成する際に用いられる M 13/puC ユニバーサルプライマーのプライミングサイトの始点が、RI で用いられているマーカーのユニバーサルプライマーのプライマ

リングサイトの始点よりも 27 bp ずれていることにある。しかし、この方法により得られる遺伝子座と RI 法のそれらとの間に厳密な対応が認められた。

この方法において、高いヘテロ接合体率と多くの対立遺伝子が観察されたことは (Table 2)、集団遺伝学的解析や家系判別におけるマーカーとし

て有効であることを意味している。

ケミルミネッセンス法の基本的原理はジオチンラベルされたプライマーを用いることであり、したがって、この技術は他の魚種、貝類、また甲殻類などのプライマーへの適用が可能であることを

示唆している。加えて、この方法は種々の遺伝学関連の研究室、および水産試験場などにおいて通常の実験室で行うことができるという利点があり、今後、有用な実験手法となりうると思われる。

文 献

- 1) O'Reilly, P. and J. M. Wright (1995) The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *J. Fish Biol.*, 47 (Supl. A) : 29–55.
- 2) Herbinger, C. M., R. W. Doyle, E. R. Pitman, D. Paquet, K. A. Mesa, D. B. Morris, J. M. Wright and D. Cook (1995) DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture*, 137 : 245–256.
- 3) Mekus, F., T. Dork, T. Deufe, N. Morral and B. Tummler (1995) Analysis of microsatellites by direct blotting electrophoresis and chemiluminescence detection. *Electrophoresis*, 16 : 1886–1888.
- 4) Taggart, J. B., R. A. Hynes, P. A. Prodhol and A. Ferguson. (1992) A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biol.*, 40 : 963–965.
- 5) Takagi, M., N. Taniguchi, D. Cook and R. W. Doyle (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. *Fisheries Sci.*, 63 : 199–204.
- 6) New England Biolabs (1997) Phototope™ Star Detection Kit. Chemiluminescent Detection of Nucleic Acids for Northern and Southern Blots, Plaque Lifts, Colony Hybridizations and DNA Sequencing. Version 1.1.

ケミルミネッセンス法マニュアル⁶⁾

電気泳動以降の過程をマニュアル化し以下に示した。

I. ゲルからメンブランへの DNA 転写

ステップ 1. 試薬の準備

0.5×TBE Transfer Buffer (10×溶液 pH 8.7: 1 M Tris, 0.8 M ホウ酸, 0.01 M EDTA) 500 ml
 ナイロンメンブラン×1 (Immobilon-S™, Millipore) : メンブランの取り扱い時は絶えず
 ゴム手袋を着用すること。

ゲルサイズにカットした 3 MM CHR ファットマンフィルターペーパー×6

ステップ 2. 電気泳動終了後、ガラス板をどちらか一方のガラス面にゲルを張り付けるようにしてはぎ取る。

ステップ 3. 1 枚のフィルターペーパーをゲルの DNA バンドのある辺りに張り付ける (その際、気泡を取り除く)。その後、メスなどで余分なゲルを切り取り除去する。

ステップ 4. ガラス板からゲルを注意してはぎ取る。

ステップ 5. 2 枚のフィルターペーパーを Transfer Buffer に浸け、それをガラス板の上に重ねておき気泡を取り去る。

ステップ 6. そのフィルターペーパーの上に、はぎ取ったゲルをフィルターペーパーごとゲル面を上にしておく。

ステップ 7. メンブランを Transfer Buffer によく浸し、ゲルの上におき気泡を取り除く。

ステップ 8. その上に乾燥したフィルターペーパーを 2 枚重ねておく。

ステップ 9. 最後に別のガラス板をフィルターペーパーの上におき、その上から均一に加圧する (Fig.2)。

ステップ 10. 20 分間転写させる。

ステップ 11. 転写後、フィルターペーパーを取り除き、ゲルからメンブランを注意してはぎ取る (はぎ取りにくい場合は、スポイトで Transfer Buffer をゲルとメンブランの間に滴下しながらはぎ取るとよい)。

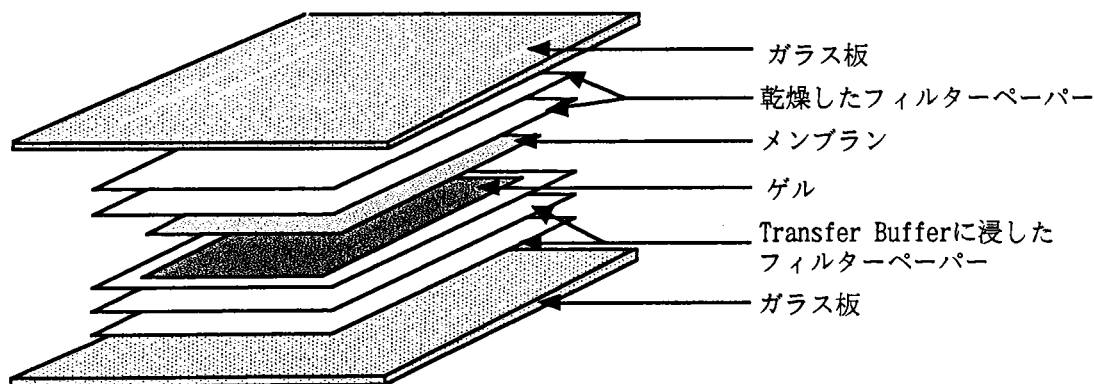


Fig.2. DNA Transfer "sandwich"

ステップ 12. DNA 側を上にしたメンブランをフィルターペーパーの上におき、乾燥機で完全に乾燥させる (80℃、15 分程度で乾燥できるが、30 分以上は乾燥機の中に入れたままにしないこと)。

II. UV クロスリンク

ステップ 1. 乾燥させたメンブランを UV 照射装置 (トランスイルミネーター) の UV 照射面に DNA の転写面を下にしておき UV を照射する。なお、UV 照射時間は以下の式に基づき算出する。

$$X = (33,000 \mu\text{W}/\text{cm}^2) / Y$$

X: 照射時間 (秒) Y: 照射エネルギー量 ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)

III. DNA の検出

ステップ 1. メンブランをハイブリダイゼーションバッグ、またはロールシリンダーに重なる部分がないように納める。

ステップ 2. メンブランを納めたハイブリダイゼーションバッグ、またはロールシリンダーに Blocking Solution (125 mM NaCl, 17 mM Na_2HPO_4 , 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 173 mM SDS, pH 7.2) をメンブラン 1 cm^2 に対し 0.1 ml 加え、室温で 5 分間攪拌した後、廃棄する。ステップ 3. Streptavidin stock solution (Detection Kit) を最終濃度 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように Blocking Solution に溶解し、それをメンブラン 1 cm^2 に対し 0.05 ml 加え、5 分間攪拌した後、廃棄する。

ステップ 4. 洗浄液 I ($0.1\times$ Blocking Solution) をメンブラン 1 cm^2 に対し 0.5 ml 加え、5 分間攪拌した後、廃棄する。これを 2 度繰り返す。

ステップ 5. biotin/alkaline フォスファターゼ (Detection Kit) を最終濃度 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように Blocking Solution に溶解し、それをメンブラン 1 cm^2 に対し 0.05 ml 加え、5 分間攪拌し反応させた後、廃棄する。

ステップ 6. Blocking Solution をメンブラン 1 cm^2 に対し 0.5 ml 加え、5 分間攪拌した後、廃棄する。

ステップ 7. 洗浄液 II ($10\times$ 溶液: 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2) をメンブラン 1 cm^2 に対し 0.5 ml 加え、5 分間攪拌した後廃棄する。これを 2 度繰り返す。

ステップ 8. CDP-Star Reagent (Detection Kit) を最終濃度 $2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように Assay buffer (Detection Kit) に溶解し、メンブラン 1 cm^2 に対し 0.25 ml 加え、5 分間攪拌した後、廃棄する。

ステップ 9. 発光反応中のメンブランを X 線フィルムに 5 分から 10 分間感光させることにより DNA を検出する。

ミトコンドリア DNA 分析による集団構造解析法

西田 睦 (福井県大・院・生物資源) ・大河俊之 (京大・院・農) ・
岩田祐士 (福井県大・院・生物資源)

Methods of Analysis of Genetic Population Structure with Mitochondrial DNA Markers

Mutsumi NISHIDA^{*1}, Toshiyuki OHKAWA^{*2}, and Hiroshi IWATA^{*3}

^{*1}Graduate School of Biotechnology, Fukui Prefectural University,

^{*2}Graduate School of Agriculture, Kyoto University,

Abstract

Knowledge of population structure of aquatic animals is important for reasonable management and conservation of their stocks. For examination of population structuring, molecular population genetic approaches are efficient and many attempts have been made so far. Here, methods of analysis of genetic population structure in aquatic animals with mitochondrial DNA examination are reviewed. First, characteristics of the mitochondrial DNA (mtDNA) are examined in comparison with the nuclear DNA. Discussed is the reason why mtDNA has been preferably targeted as DNA markers even though it is rather small compared to the nuclear genome. Then, laboratory procedures for mtDNA analysis are outlined. Third, mtDNA regions suitable for population structure analysis are discussed, and primer information for PCR amplification of those regions is presented. Finally, various data analysis methods are introduced together with information on computer software available for performing these methods.

どんな生物種もある空間的広がりの中に存在している。すなわち、固有の分布域をもっている。その範囲内に個体が均等に分布していることは少なく、大なり小なりまとまりをなして生息している。資源生物種のそうした地域集団(地域個体群)の空間的配置とそれらの間の関係を理解することは、その種の維持・管理を考える上で、基本的に重要な事柄である。

そのような集団構造を調べる手がかりの第一は生態学的なものであるが、遺伝学的なアプローチも有用な情報を提供する。とくに、集団間に遺伝

的な差異が存在する場合には、その遺伝的多様性自体も重要な遺伝資源の意味合いを有することもあるので、集団の遺伝学的分析は欠かせないものとなる。

水生生物集団の遺伝学的解析は、この2-30年間、主としてアロザイム分析法によってなされてきた。この方法は、諸酵素の電気泳動的移動度の違いからそれを支配する遺伝子の差異を推定するもので、そうした情報を集約することにより、集団内の遺伝的変異性や集団間の遺伝的差異を推測することも可能となる。それまで、自然集団から

こうした定量的な遺伝的情報を得ることが実際上不可能であったので、この手法の出現の意義は大きかった。これが適用されることによって、水生生物の集団研究にもさまざまな新しい貴重な知見がもたらされてきた。現在でもこの手法の有用性は決して小さくない。

しかし、ひとつの種類からさらに多くの遺伝的情報を収集してより詳細な分析を進めようとしても、通常のアロザイム分析法では、検出できる酵素数に限界があるという難点があった。そこでクロズアップされてくるのが DNA 分析手法である。DNA は遺伝物質そのものであり、その情報は莫大であるため、これを分析対象とした場合、大量の遺伝的情報を入手できる可能性がある。とくに1980年代後半のPCR (polymerase chain reaction) 法の確立によって、大量の個体の分析を必要とする集団解析に DNA 手法を活用することが現実的な選択たり得るようになった。

本稿では、ミトコンドリア DNA の分析を通じて、水生生物の集団構造を解析する方法について概説する。DNA の大部分は、当然のことながら、細胞核内の染色体に存在する核 DNA である。それに対してミトコンドリア DNA (mtDNA) は、細胞質内に存在する小さなゲノムである。ここではまず最初に、1) この mtDNA の特徴とそれに注目する意味について説明する。ついで、2) mtDNA の分析実験手法について簡単に解説する。引き続いて、3) 水生生物 (ここではとくに生物資源の多くを占める動物を念頭に置く) の集団解析によく用いられる DNA 領域とその分析上の注意点を論じる。その上で、4) 得られた DNA データの解析法と種々のデータ解析に有用なコンピュータソフトについて解説する。

DNA 分析手法や、データ解析法とそれが実行できるコンピュータソフトなどは、まさに日進月歩の勢いで進展しており、ここで紹介する内容の多くは、日をおかずして不十分なものになるであ

ろう。しかし、現時点ではできるだけ最新の情報まで盛り込んであるので、関心のある読者がこの急速に進展する分野の現状を知る上で不足はないものと思う。また、自らこの分野の研究をやってみようとしておられる読者にも、有用な足がかりが提供できているはずである。なお、高次系統解析の方法に関しては、別の機会に改めて整理してみたい。

1. 集団解析のための遺伝標識源としての mtDNA

真核生物では細胞核内の核 DNA 上に遺伝情報の大部分が存在することは上述のとおりである。しかし、集団や高次分類群の解析のための分析対象分子と見たときに、核 DNA はなかなか手強い相手である。なぜなら、核ゲノムというものは2倍体の生物個体内には相互に異なる2セットが備わっており、その上、遺伝子重複や偽遺伝子という現象が存在するなど非常に複雑であるためである。したがって、そこからいきなり確実な情報を入手することはなかなか容易なことではない。そこで、1個体内に1セットが備わっているだけであり、サイズの的にもコンパクトな細胞内小器官のゲノムが、第1次的な分析対象として注目される場所となる。

mtDNA は細胞内小器官であるミトコンドリア内に存在する DNA で、大部分の動物では環状をしている。後生動物ではその大きさおよび遺伝子構成とも非常に共通性が高いことが知られている。16–19 kbp とたいへんコンパクトなサイズの中に、13種類のタンパク質遺伝子、2種類のリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子、および22種類の転移 RNA (tRNA) 遺伝子が、ほとんど余分な隙間 (スパーサー) なしにコードされている (図1)。さらに、各遺伝子にはイントロンが一切なく、たいへん経済的な構成となっている。こうした mtDNA の特徴は、ミトコンドリアの起源が真核細胞に共生し

た原核細胞であり、その後の細胞内共生の過程でそのゲノムがさらにシェイプアップされたという観点から見れば、素直に理解できる。

当初、mtDNA が集団解析などのための分析対象とされた理由のひとつは、これがコンパクトであるため、超遠心によって比較的容易に分離・抽出できるためであった。しかし、上述のように

PCR 法が確立した現在、このコンパクトであるという特徴が mtDNA を取り上げる重要な理由ではなくなった（ただし、ロング PCR が可能になってきたので、再びこの特徴が意味を有することになりそうである）。むしろその他の特徴に、mtDNA に依然として注目すべき理由がある。

後生動物のミトコンドリアゲノムの核ゲノムに

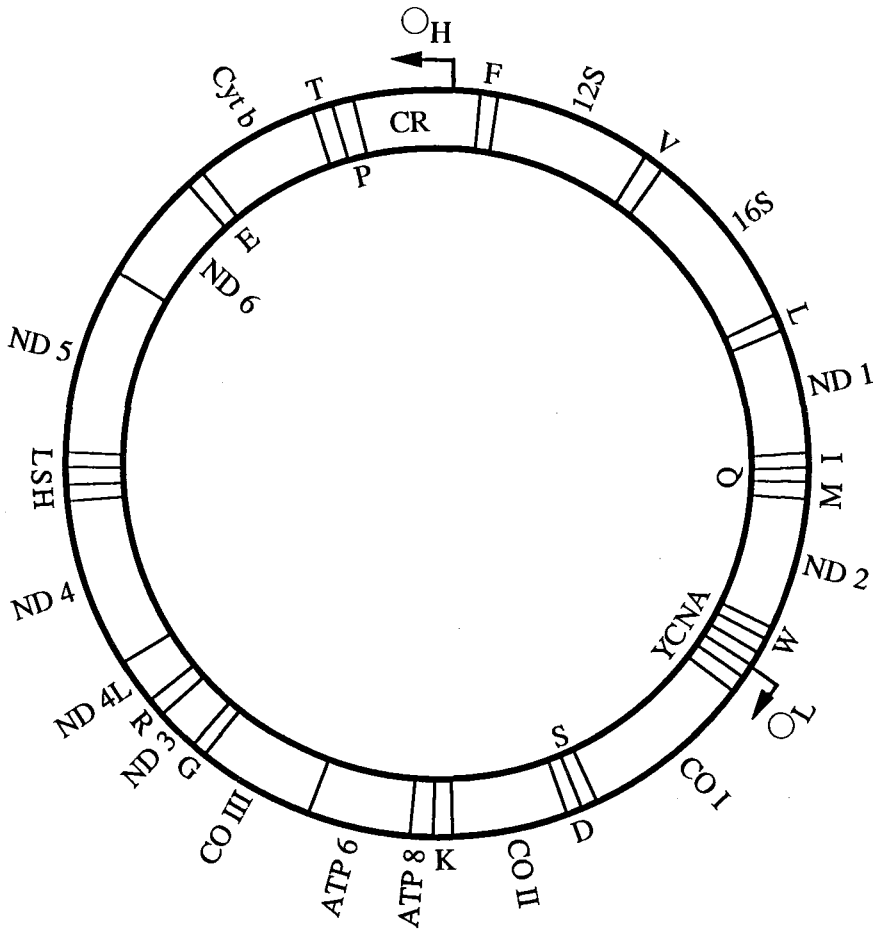


図1 脊椎動物のミトコンドリア DNA の一般的な遺伝子配置。外側の円は重(H)鎖を、内側の円は軽(L)鎖をあらわす。円の外側には前者にコードされる遺伝子の位置を、円の内側には後者にコードされる遺伝子の位置を示す。図中の略号：CR, 調節領域；Cytb, シトクローム b 遺伝子；ND 1~6, NADH 脱水素酵素サブユニット 1~6 遺伝子；COI~III, シトクローム c オキシダーゼサブユニット I~III 遺伝子；ATP 6, ATPase 6 遺伝子；ATP 8, ATPase 8 遺伝子；16 S および 12 S, 16 S リボソーム RNA 遺伝子および 12 S リボソーム RNA 遺伝子；アルファベットの 1 文字は、各 tRNA 遺伝子の対応するアミノ酸の記号；OH, 重鎖の複製開始点；OL, 軽鎖の複製開始点。

比べての特徴を整理してみると、上記以外に、遺伝暗号がやや変則的、進化速度が全体として一桁ほど速い、組み換えなしに母系遺伝をする、細胞当たりのコピー数が多い、などの点があげられる。このうち、遺伝暗号の変則性以外の特徴は、いずれも集団解析にとって重要な意味をもっている。

進化速度が速いということは、種内に保有されている変異性も高いことを意味するわけで、mtDNAには集団解析に有用な遺伝的変異（つまり遺伝標識）がいろいろと得られる可能性の-highいことが期待される。もっとも、全体として核DNAよりも進化速度が速いといっても、実際には領域によって進化速度はかなり異なるため、分析対象領域を適切に選定することが重要である。領域の選定によっては、種内の集団構造解析から、目や綱など高次分類グループの系統分析にまで幅広い適用が可能である¹²⁾。また、核ゲノムでも、マイクロサテライトなどと呼ばれるような領域では変異性が高く、そういう領域に着目すれば、集団解析に有効な遺伝標識がいろいろと入手できる可能性がある。

一方、卵の細胞質を通じて組み換えなしに母系遺伝するというmtDNAの遺伝様式の特異性も、集団解析にとって重要なものである。組み換えがないということは、mtDNA分子自体が母系に延々と伝達され続けているということであり、これの分析を通じて母系系統を追跡することができる。そして、この母系系統は特別なことがない限り、集団全体ないし種全体の系統を代表していると見てよい。この点は非常に重要な特徴である。なお、特別なこととは、交雑による異種からのmtDNAの浸透や、一部の二枚貝類で知られている母系・父系両タイプのmtDNAの同一個体内での共存（ヘテロプラズミー）などである。こうした現象に注意を払う必要はあるが、ただしこのことがmtDNA分析の弱点となるわけではない。むしろ、核ゲノム分析と併用することにより、核ゲノム分

析だけからでは検出のむずかしい過去の交雑などの推定ができる長所と見るべきである。

細胞内に存在するコピー数が核DNAに比べて著しく多いことも、集団解析のための遺伝標識としての重要な特徴である。このことは、ごく微量な試料や保存状態の悪い標本からも、PCR法などを利用してDNAを復元しやすいということを意味している。したがってmtDNAをマーカーにすることによって、卵や仔稚魚を対象とした研究、鱗や鰭の断片を試料にして個体を殺さずに行う研究、あるいは博物館資料や化石など過去の試料を用いる研究など、幅広い研究の展開を図りやすい。

以上、集団解析のための遺伝標識源としてのmtDNAの特徴について述べてきたが、これらの点を含め、集団・系統分析と関連して動物のmtDNAについて論じた総説がいくつかある³⁻⁵⁾。すでに多少古くなった記述もあるが、それぞれこの分野を切り開いてきたグループのものであり、一度目を通しておくとよい。日本語で読める物としては、渡辺・横堀⁶⁾などがある。

2. ミトコンドリアDNAの分析手法

集団解析のためのmtDNA分析の基礎は、各個体のmtDNA間の塩基配列の違いを検出することにある。この塩基配列の違いを検出するための分析手法としては、塩基配列分析以外に、簡便法として、制限酵素断片長多型（restriction fragment length polymorphism; RFLP）分析⁷⁾、1本鎖DNA高次構造多型（single-strand conformation polymorphism; SSCP）分析⁸⁾、変性濃度勾配ゲル電気泳動法（denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE）分析⁹⁾、温度勾配ゲル電気泳動法（temperature gradient gel electrophoresis; TGGE）分析¹⁰⁾などが挙げられる。SSCP分析、DGGE分析、TGGE分析などは、標本数を増やしてより詳細な分析を行うときに有効である考えられるが、これまでのところ集団解析にはまだあまり用いられていない。

ただし、SSCP 分析については、われわれは集団解析に用いてよい成果を得ている¹¹⁾。一方、RFLP 分析は、mtDNA 分析に当初から用いられてきたこともあり、集団解析に利用されることが多い。そこでここでは、集団解析を行うに当って最も基本的であると思われる手法である RFLP 分析および塩基配列分析の原理とその特徴について解説する。これらの分析手法では、mtDNA 全体を対象とする場合と、部分領域を対象とする場合とがある。

(1) mtDNA 全体の分析

mtDNA 分析による集団解析は、研究史的には、全 mtDNA を対象とする RFLP 分析により始まった⁷⁾。RFLP 分析とは、特定の塩基配列を認識して DNA を切断する酵素（制限酵素）を用いて処理することにより、DNA 上の塩基配列変異の有無を調べる手法である。認識部位の塩基配列に変異があるときに、異なる長さの DNA 断片という形でデータが得られる。

全 mtDNA の RFLP 法による集団構造分析が始められた時には、以下のような流れで分析が行われた。まず、組織標本から DNA 抽出を行うが、用いる組織は新鮮なものである必要があった。分析には mtDNA のみが入用であることから、全抽出 DNA から mtDNA のみを単離する必要があり、細胞分画法や塩化セシウム密度勾配超遠心法など、かなり煩雑な実験操作が求められた。つぎに、抽出された mtDNA を制限酵素で断片化し、それを電気泳動する。そして、DNA 断片の移動度からその長さに関するデータを得る、という手順である。

その後、非 RI 法を用いたサザンハイブリダイゼーション法の導入によって、mtDNA のみを単離する必要がなくなり、実験操作の煩雑性はかなり軽減された。とくに、それ以前の方法と比較して、必要とされる DNA 量も少なくてよいので、

組織標本の扱いや DNA 抽出の際の苦労が軽減された。全 mtDNA の RFLP 分析を用いた集団解析は、その歴史が相対的に長いこともあり、数多くの生物で行われ、種々の成果をあげている。そうした初期の研究における成果の多くは、Avisé の著作「Molecular markers, natural history and evolution」¹²⁾に紹介されている。わが国でも、たとえば渡辺ら¹³⁾のような成果があげられている。

(2) 部分領域の分析

mtDNA を標識とした集団解析は、1980 年代後半に確立された PCR 法により¹⁴⁾、飛躍的に進歩した。PCR 法とは、DNA の特定領域を酵素的に増幅する手法である。本法が開発されるまでは、組み換え DNA 手法を用いたクローニング技術を用いて DNA 増幅が行われていたが、それと比較すると、非常に簡易に DNA 増幅が行えるようになった。現在では、mtDNA による集団解析には、ほとんどの場合、PCR 法を用いた分析が行われる。PCR 法については、その原理と応用を述べた文献がいくつも出版されているので、詳細についてはこれらの文献を参照していただきたい¹⁵⁻¹⁷⁾。

PCR 法はたいへん効率的な DNA 増幅法であるため、mtDNA 全体の RFLP 分析の際に必要なとされたよりもはるかに少量の組織標本試料で分析可能である。また、DNA が多少断片化されていても、対象とする領域が断片化されていない DNA 分子がある程度あればよいので、エタノール固定標本などでも分析が十分に可能である。また、博物館標本や乾燥標本などを用いた分析も可能である（たとえば、Thomas *et al.*¹⁸⁾）。これらの点は、前述の全 mtDNA の RFLP 分析と比較すると大きな長所である。現在、mtDNA 分析による集団解析において、PCR 法は実際上不可欠なものであるといえる。

1) PCR-RFLP

この方法は名前のとおり、PCR 法によって増幅した DNA 領域を制限酵素により切断し、多型を検出する方法である。切断された DNA 断片の分離方法は、前述した全 mtDNA の RFLP 分析の場合と同様である。実験作業は後述の塩基配列分析と比較すると、比較的単純であり、分析コストも安いことから、集団解析に多用されている。わが国においても、これまでにメカジキ¹⁹⁾やヒラメ²⁰⁾、マダイ²¹⁾などで、本手法を用いた集団構造解析が行われている。しかし、この方法は塩基配列分析と比較すると、検出された多型がどのような変異（塩基置換や挿入・欠失）によるものか分からないことや、対象とした領域の変異を全て分析できているわけではないことなど、不十分な点があることは否めない。

2) 塩基配列分析

塩基配列分析では、目的の領域の塩基配列を決定し、得られた塩基配列を個体間や個体群間で比較する。塩基配列決定法には Maxam and Gilbert²²⁾による化学修飾法と Sanger *et al.*²³⁾による酵素法があるが、現在よく用いられるのは後者に PCR を応用した方法である。この中でも集団解析に最近よく用いられるのは、配列決定のための鋳型 DNA に PCR 産物を用いる直接塩基配列決定法である。この方法は、PCR につきもののポリメラーゼの読み間違いの影響がカバーできるという、大きな長所がある。

塩基配列分析は、当然のことながら、目的とする DNA 領域の変異を全て調べることができ、そこでの塩基置換や挿入・欠失の実態を完全に明らかにすることができる。また、当該領域の塩基置換の様式に関してある程度の知見が得られているならば、これらを考慮して詳細なデータ解析を行うこともできる。この点も他にはない大きな利点である。しかし、塩基配列決定は、他の分析手法と比較すると現在ではまだコストや手間がかかる

ものであることには間違いがない。

3. 分析対象とする領域の特徴と分析上の留意点

(1) 分析によく用いられる領域

現在、集団解析では PCR 法を用いた部分領域の分析がよく用いられるため、ここでは分析対象とする領域について取り上げる。PCR 法を用いて部分領域をターゲットとする場合に、その領域に求められる性質とは、種内に十分な多型が見られること、および PCR 増幅が比較的容易であること、などである。

PCR 増幅産物を用いた RFLP 分析および塩基配列分析による集団解析が始まったときには、mtDNA の全塩基配列や各領域の変異性についての知見が少なかった。このため、種内での変異性がそれほど高くないものの、分子系統学で知見が増えつつあったため比較的データの得やすいシトクローム *b* 遺伝子領域を対象として解析が行われることが多々あった。しかし、最近に集団解析によく用いられる領域と比較すると、シトクローム *b* 遺伝子領域は種内の遺伝的変異が少ないため、集団解析に適した領域であるとは必ずしも言えない。

その後、多くの動物で mtDNA 各領域の塩基配列データが蓄積されてきた結果、次のようなことが明らかになってきた。すなわち、基本的にタンパク質、rRNA、および tRNA をコードしている領域には機能的制約があるため、機能的制約が少ない非コード領域と比較すると遺伝的変異が少ないということである。そして、集団解析に適した mtDNA 領域としては、多くの生物で共通して存在し、集団解析が可能な塩基数を持つ非コード領域である調節領域（D ループ領域）が注目されるに至っている。

ただし、遺伝子配置が他の生物とは異なったり、大規模な塩基の挿入があるような生物では、既往の塩基配列に関する知見に基づいて有効なプライ

マーを設定することが困難な場合がある。そこで、そのような場合には、調節領域以外のタンパク質遺伝子や rRNA 遺伝子の部分領域の分析を通じて集団解析を行う試みがなされ、いくつかの成果があげられている。このような領域として、タンパク質コード領域では軟体動物などにおける COI 遺伝子、リボソーム RNA 遺伝子では 16 SrRNA 遺伝子などがある。これまでに脊椎動物の多くや脊椎動物・無脊椎動物の多くで PCR 増幅が可能な、いわゆるユニバーサル・プライマーがいくつも報告されている。表 1 に、調節領域、COI 遺伝子、および 16 SrRNA 遺伝子に関して、そうした

プライマー情報の一部をまとめた。以下にはそれぞれの領域の特徴を簡単に述べておこう。

(2) 各領域の特徴

1) 調節領域

調節領域は、脊椎動物では通常 $\text{cyt b} \cdot \text{tRNA}^{\text{Thr}} \cdot \text{tRNA}^{\text{Pro}}$ 遺伝子と $\text{tRNA}^{\text{Phe}} \cdot 12 \text{ S rRNA}$ 遺伝子との間に存在する約 1~2 kbp の非コード領域である。本領域は mtDNA の中では最も変異性が高いため、現在の mtDNA を用いた集団解析には最も有効な領域のひとつである。この領域は非コード領域であるが、全く機能を持たない領域ではなく、

表 1 ユニバーサルプライマーの例

プライマー名*	対象生物	塩基配列 (5' → 3')	文 献
調節領域			
L 15923	脊椎動物	TTAAGCATCGGCTCTTGTA	Iguchi et al. (1997) ⁷⁹
L 15924	脊椎動物	AGCTCAGCGCCAGAGCGCCGGTCTTGTA	Kocher et al. (1993) ⁷¹
L 15926	脊椎動物	TCAAAGCTTACACAGTCTTGTA	Kocher et al. (1989) ⁷²
H 16498	脊椎動物	CCTGAAGTAGGAACAGATG	Meyer et al. (1990) ⁷³
H 16500	脊椎動物	GCCCTGAAATAGGAACAG	Nishida (未発表)
L 15774	脊椎動物	ACATGAATTGGAGGAATACAGT	Shields and Kocher (1991) ⁷⁴
L 16518	脊椎動物	CATCTGGTCTTCTTCAGGGCCAT	Meyer (1993) ⁷⁵
H 693	脊椎動物	GGAGTGGGATGCTTGCATGT	Nishida (未発表)
H 658	脊椎動物	AGTTAATAGTAAGGCTAGGAC	Nishida (未発表) COIL
CO 1490	無脊椎動物・脊椎動物	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. (1994) ⁷⁶
HCO 2198	無脊椎動物・脊椎動物	TAAACITCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al. (1994) ⁷⁶
H 7209	無脊椎動物・脊椎動物	TAATCTATGTACCGTCGAGGYAT	Nishida (未発表)
CO 1 e-3' (H)	脊椎動物	CCAGAGATTAGAGGGAATCAGTG	Palumbi et al. (1991) ⁷⁷
CO 1 a-3' (H)	無脊椎動物・脊椎動物	AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC	Palumbi et al. (1991) ⁷⁷
H 7227	無脊椎動物・脊椎動物	CATGTAGTGATGCATCAGGGTARTC	Nishida (未発表)
H 7086	魚類	CCTGAGAATGRKGGGAATCAGTG	Meyer (1993) ⁷⁵
H 7196	魚類	AGAAAAATGTTGWGGGAARAA	Normark et al. (1991) ⁷⁸
L 5950	魚類	ACAATCACAAAGAYATYGG	Normark et al. (1991) ⁷⁸
L 6586	魚類	CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC	Palumbi et al. (1991) ⁷⁷
16 SrRNA L 1567	魚類	AAGGGGAGGCAAGTCGTA	"Nishida, Miya and Kawaguchi (未発表)
" H 1999	魚類	GCAACCAGCTATAACTAGGCTCGGT	"Nishida, Miya and Kawaguchi (未発表)
" L 1802	脊椎動物	GTACCGCAAGGGAAGATGAA	Nishida (未発表)
L 1854	脊椎動物	AAACCTCGTACCTTTTGCAT	Nishida (未発表)
H 2196	脊椎動物	GTCTGAGCTTTAACGCTTTCT	Nishida (未発表)
L 2510	脊椎動物	CGCCTGTTTAAACAAAAACAT	Miya and Nishida (1996) ⁷⁹
H 3059	脊椎動物	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	Miya and Nishida (1996) ⁷⁹
L 2482	無脊椎動物	GAAGGAACCTCGGCAA	Kitaura et al. (1998) ⁸⁰
H 2492 i	無脊椎動物	CAGACATGTTTTTAATAAACAGGC	Kitaura et al. (1998) ⁸⁰
H 2716 i	無脊椎動物	AAGTTTTATAGGGTCTTATCGTC	Kitaura et al. (1998) ⁸⁰

表 1 プライマー名に L を付したものは L 鎖伸長用、H を付したものは H 鎖伸長用。それぞれの番号はそのプライマーの 3' 末端が対応するヒト mtDNA 塩基番号 81)。「L プライマー」と「H プライマー」とを組み合わせることで PCR 反応をすることにより、目的の DNA 領域を増幅することができる。

mtDNA の複製開始点やそれに関与する領域を含んでいる。魚類の一部などではこの内部に繰り返し配列が存在し、長さに変異が見られる²⁴⁻²⁶⁾。したがって、RFLP 分析を行う場合には PCR 増幅

産物長の変異の存在を確かめておいた方がよい。調節領域を用いた集団構造分析は、ヒトについてたいへん詳細な分析が行われている²⁷⁾。日本の水産生物でもヒラメ^{20,28)}、マダイ²¹⁾、アユ²⁹⁾、ウナギ³⁰⁾

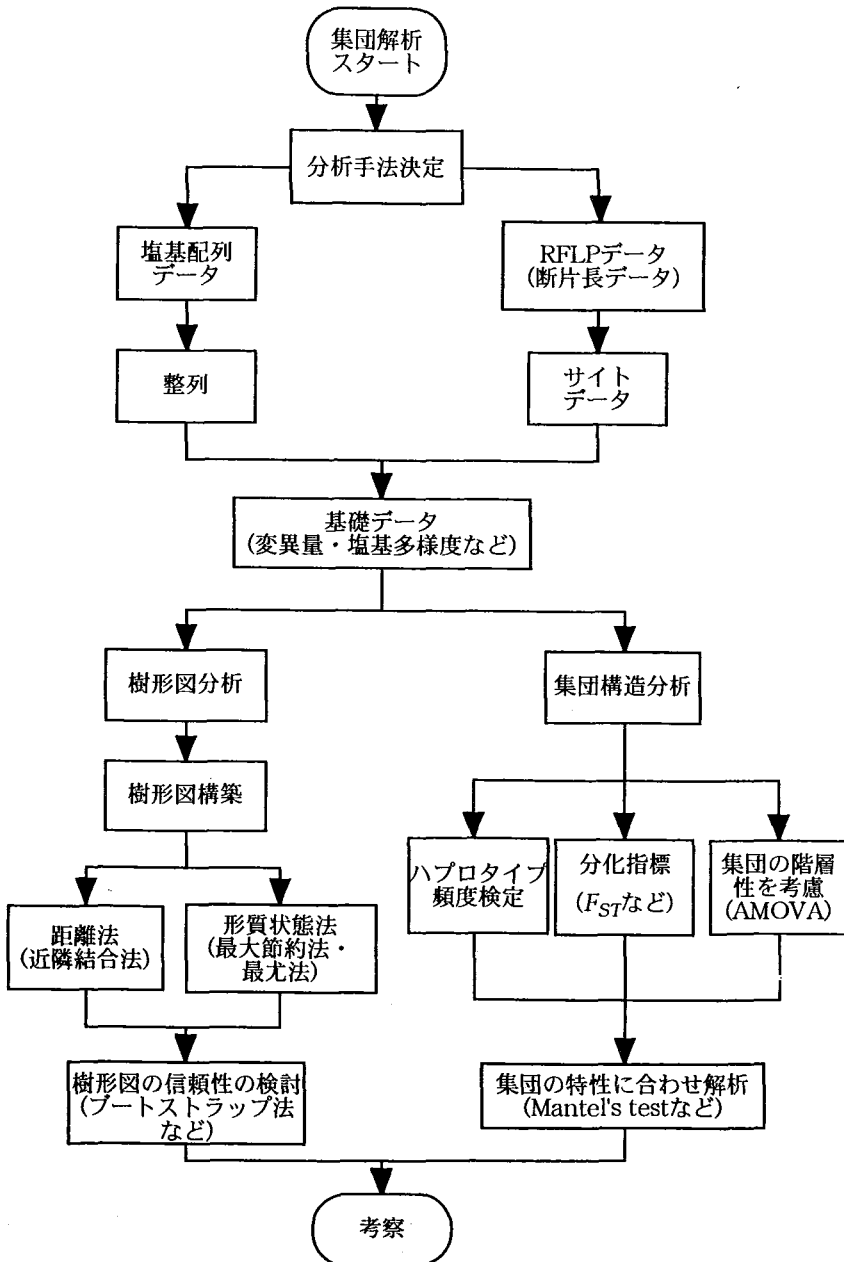


図2 ミトコンドリア DNA を用いた集団解析を行う際の一般的な作業手順。

などで、この領域を対象とした分析が行われている。

2) COI 遺伝子

脊椎動物の mtDNA の遺伝子配置はいくつかの例外があるものの、ほとんどの分類群で共通であることが知られている。しかし、無脊椎動物では遺伝子配置が大きく異なっていることが多いため^{6,31)}、調節領域を PCR 増幅することが難しい場合がある。そこで、棘皮動物や節足動物、軟体動物などの無脊椎動物では、COI 遺伝子が分析の対象として比較的良好に取り上げられる^{11,32,33)}。

3) 16S rRNA 遺伝子

16S rRNA 遺伝子領域は分子系統学的研究において、種間あるいは属間の系統類縁関係を検討するためによく使われる領域である。本領域は RNA に転写された後、立体構造をとってリボソームのサブユニットとなる。このため、塩基配列を見ると、相補的な配列をもつことによりステムと呼ばれる 2 本鎖になる領域と、このような 2 本鎖構造をとらずに輪のようなループ構造をとる領域とがある。このループ領域は上記の調節領域ほどではないものの変異性が高いことが多い。とくに、16S rRNA 遺伝子領域の前半部には約 150 塩基の大きなループ領域があり、ここは集団解析にも有効のようである。実際、オニハダカなどでよい成果をあげている³⁴⁾。

4. データ解析法とコンピュータソフト

現在、DNA データを用いた集団解析に関しては、多くのデータ分析手法が開発されている。解析目的は多岐にわたるとしても、基本的な解析の流れは、まず、(1) 集団解析を行うためのデータの準備を行った後、(2) 変異性などの基礎情報の抽出を行って集団解析への有効性を確認し、(3) 樹形図分析や、(4) 遺伝的分化の指標や統計的検

定を行うことになる (図 2)。集団解析に有効であると思われるコンピュータソフトウェアは表 2 に示す。これらのほとんどは、インターネットを通してフリーソフトウェアとして配布されているものであるが、一部は購入する必要がある。

(1) データ解析を行うための準備

1) 塩基配列データの場合

解析を行う前に塩基配列データにおいて行うのは整列 (alignment) と呼ばれる作業である。塩基配列データにおいて塩基の挿入・欠失がある場合には、塩基配列をそのまま並べただけでは相同な部位を比較することができないため、適切な位置にギャップ (塩基配列中では “-” で示されることが多い) を挿入する。この作業は目で見ただけで行うのは困難な場合があるため、Clustal W³⁵⁾などの整列のためのコンピュータプログラムを使用することが多い。しかし、こうしたコンピュータプログラムを用いても十分に整列できない領域が残ることがある。このような領域については解析データセットから除外する。

2) RFLP データの場合

RFLP データではまず、制限酵素により切断された各 DNA 断片の長さ (泳動度) のデータとして示される。このデータは断片長データと呼ばれるが、これにおける DNA 断片数の違いの程度は、必ずしも塩基配列差の大きさを示すものではないことに留意する必要がある。すなわち、断片長データから直接には変異性推定や系統推定はできない。RFLP データでは、断片長データをもとにして、切断される前の DNA のどの部位が切断されたかを何らかのかたちで推定し、これを解析データとして用いる必要がある。このようなデータはサイトデータと呼ばれる。断片長データからサイトデータへの変換には、REAP³⁶⁾などのコンピュータソフトウェアを用いる場合もあるが、ソフト

を使用せずにそれを行う場合も多い。現在よく行われる RFLP 分析の多くでは、変異サイトを特定できないため、断片長データから信頼性の高いサイトデータを得ることが困難である場合がある。この場合、少数の個体についてでも塩基配列が既知であると、問題はかなり解決される。

(2) データの基礎解析

集団解析を行う前に、得られたデータについて変異性の算出などの基礎的分析を行い、当該データが集団解析に有効であるかどうかを検討する。種内の変異性は、その種もしくは分集団の集団サイズ、分化してからの時間、その種の持つ変異量などの特性により、種によって大きく異なり得る。これらの特性を把握するにはさらに詳細な解析が必要であるが、おおよその傾向は、本節で述べる諸解析で推し量ることが可能である。

1) 変異性の指標

変異性の指標としてよく使われているものとしては、RFLP 分析では、塩基多様度(π)とハプロタイプ多様度(h)³⁷⁾が、塩基配列分析では、変異サイト数、複数の個体に変異が見られるサイトの数 (informative サイト数)、塩基多様度および個体間の塩基置換数の最大・最小・平均などがある。RFLP 分析での塩基多様度は塩基配列分析でのそれと異なり、ラフな推定値である。

DNA レベルの変異には大きく分けて塩基置換と塩基の挿入・欠失がある。さらに、塩基置換にはいくつかのパターンがある。DNA を構成する塩基のうち、プリン (C、T)、およびピリミジン (A、G) がそれぞれの内部で置換する場合、転移型置換 (C-T、A-G) と呼ばれる。これに対して、プリン-ピリミジン間の置換は転換型置換と呼ばれる。転移型置換は転換型置換よりも起こりやすいことが知られている。このため、転移型置換と転換型置換を区別することは、種内の変異性

を考える上で有用である。

2) データの有効性の検討

変異サイト数と informative サイト数から、データの有効性が検討できる。一般に、これら 2 つが大きく、変異サイト数に対して informative サイト数の占める割合が高いほどよい。ただし、絶対的な指標ではないので、これを用いてデータの有効性を直接判断することはできない。

(3) 樹形図分析

集団解析における樹形図分析とは、ある基準に従って個体または個体群間の類縁関係を推定し、解析対象となる分類単位 (operational taxonomic unit; OTU) のまとまり方により、集団構造を推定する手法である。樹形図 (tree) 構築法や作成された樹形図の評価方法は、分子系統学的手法の発展に伴って多数発表されている。以下では、これらの手法の中から集団解析に有効であると思われる分析手法を紹介する。

樹形図の構築方法には、大きく分けると各形質の形質状態に基づくもの (形質状態法) と、OTU 間の距離 (遺伝距離) をもとにするもの (距離法) とがある。距離法と形質状態法におけるそれぞれの長所・短所、あるいは両者内部の諸方法のそれについて、本稿では詳細は述べることはできないが、日本語で読める解説が既にいくつか出版されているので、詳しくはそれらを参照していただきたい³⁷⁻⁴⁰⁾。集団解析ではデータ量や目的に合わせてそれぞれの手法が用いられる。

形質状態法の OTU は、塩基配列もしくは制限酵素切断型で区別される各ハプロタイプである。距離法における OTU には、ハプロタイプ以外に個体群を用いる場合があるが、現在では DNA 分析による集団解析においてこのやり方をするのはあまりない。むしろ、次節で述べる統計的な処理によって個体群間の遺伝的差異を検討すること

が多い。

1) 距離法

集団解析でよく用いられる距離法による樹形図構築法には、平均距離 (UPGMA) 法⁴¹⁾および近隣結合 (NJ) 法⁴²⁾がある。前者は遺伝的類似性を見るのには有用であるが、ハプロタイプ間の系統的關係を推定しようという際には、進化速度が一定でない場合に誤りやすいことが知られている。そのため、現在ではあまり使われないが、有根樹を構築できる利点がある。後者は距離法では現在よく使用される方法であるが、構築される樹形図は無根樹なので、有根樹を構築するときには外群が必要である。平均距離法、近隣結合法を含む距離法による樹形図構築のアルゴリズムについては Nei³⁷⁾などに詳しい。距離法による樹形図作成ソフトは数多く発表されているが、PHYLIP⁴³⁾、MEGA⁴⁴⁾などがよく用いられる。

距離法においては、樹形図構築のアルゴリズムに加えて重要なのが、塩基置換数に基づいて推定される各 OTU 間の遺伝距離である。塩基配列分析においてハプロタイプを OTU として分析を行う場合、用いることのできる遺伝距離は、単純な塩基置換率から塩基の変異パターンを考慮したいくつの変数を用いる複雑なものまで種々ある。この中でよく用いられる遺伝距離としては、転移型置換・転換型置換の頻度の違いを組み込んだ Kimura の 2 変数法⁴⁵⁾、4 変数で計算する Tamura-Nei の方法⁴⁶⁾などがあげられる。これらに加えて、塩基サイトによる塩基置換速度の差異をモデルに組み込んだガンマ距離 (gamma distance) などとも有用である。

RFLP データによってハプロタイプを OTU とした距離法による解析を行う場合、遺伝距離の算出は塩基配列データによるものとはやや異なったものとなる。塩基配列データでは、遺伝距離は実測された塩基置換率をもとに算出される。これに

対し、RFLP データでは、塩基置換率自体がまず推定される必要がある。制限酵素切断サイトが出現するときと消失するときには変異している塩基数が異なる場合があるなどのためである。たとえば、4 塩基認識の制限酵素で切断されるところでは、1 塩基の変異で切断されなくなるが、塩基配列のわからない領域がその制限酵素で切断されるようになるには、1~4 塩基の変異が必要となる。このため、切断サイトの出現・消失は等価に扱わず、異なる重みづけを行う場合が多い。このような重みづけを考慮して OTU 間の塩基置換数を最尤推定する方法が Nei and Li⁴⁷⁾や Nei and Tajima⁴⁸⁾によって開発されており、REAP などのコンピュータソフトウェアで利用可能である。

2) 形質状態法

形質状態法には大きく分けて 2 つある。ひとつは形質の変化が樹形図全体で最小になるようにする最大節約法で、もうひとつは形質の変化の確率モデルに基づいて樹形図の尤度が最大になるようにする最尤法である。これらの場合、いずれもハプロタイプが OTU となる。

どちらの方法も、あり得る全ての樹型について形質の変化もしくは尤度を計算する網羅的探索法 (exhaustive search) を用いることを基本とするが、OTU 数が多くなると計算量が膨大になり、時間がかかり過ぎて事実上計算が不可能となる場合が多い。このため、OTU 数が多い場合には、最大節約法では、形質状態の変化数が最小であるとみなせる樹形図を効率よく求める分枝限定探索法 (branch and bound search) や発見探索法 (heuristic search) が使用される。また、最尤法では発見探索法によって尤度が最大である樹形図を近似的に求める。通常、集団解析では OTU 数が多く、個体変異が多いために系統学的なノイズを多く含むデータを扱う。したがって、形質状態法による樹形図構築には、発見探索法を使った解析を行うこ

とになるのが普通である。発見探索法や分枝限定探索法を用いた最大節約法が実行可能であるコンピュータソフトとしては、PAUP⁴⁹⁾およびPHYLIP⁴³⁾がある。発見探索法を用いた最尤法は fastDNAm1⁵⁰⁾あるいは PUZZLE⁵¹⁾で構築できる。

塩基配列データでは、形質状態法においても、距離法で遺伝距離を求めるときと同様に、転移型・転換型置換に重みづけをして解析を行うことが可能である。挿入・欠失の重みづけに関しては、最大節約法ではいろいろな条件で解析できる。たとえば、塩基の対するデータから除外する、4つの塩基に加えて5つめの形質とする、長い挿入・欠失についてはこれらをひとつの形質として扱う、などである。最尤法や距離法では、挿入・欠失はデータから除外するのが普通である。また、RFLPデータでは、切断サイトの出現・消失は等価に扱わず、異なる重みづけを行う (Dollo 法⁵²⁾) ことも多い。なお、多重置換などのために、塩基配列データにおける転換型置換や RFLP データにおけるサイトの出現があまり系統的情報を持っていない場合には、重みづけを変えて分析するとかえって誤った結果を導くことになる可能性もあるので、注意が必要である。

3) 構築された樹形図の評価

構築された樹形図の評価方法で、分子系統学において最もよく使われるのはブートストラップ法である。系統推定におけるブートストラップ法は、樹形図における各枝の信頼性を無作為化により検定する方法である⁵³⁾。この手法の詳細はいくつかの分子系統学の文献で述べられている³⁷⁻⁴⁰⁾。ブートストラップ法はデータセットの中で同様の系統関係を示す変異サイトがどのくらい存在するかを評価する方法である。集団解析に用いるデータでは個体変異を多く含むために、系統学的なノイズを含む場合が多く、ブートストラップ値は樹形図のどの枝でも低くなってしまうことが多々ある。また、距離法では、枝長の標準誤差を求めて有意性を検定することが MEGA で可能である。最大節約法における一致指数 (CI)、保持指数 (RI)、修正一致指数 (RCI) などは、得られた樹形の評価を行う指標としてよく用いられる。

(4) 集団構造分析

樹形図分析の結果、各ハプロタイプがいくつかの地理的グループなどに明瞭にまとまり、それによって比較的容易に集団構造を推定することがで

表2 集団解析に用いられるコンピュータソフトとその入手方法

ソフト名	制作者	Ver.	OS
ClustalW	Thomson et al. (1994) ³⁵⁾	1.75	mac/win/unix
Sites	Hey (1996) ³⁶⁾	1	unix/mac
PHYLIP	Felsenstein (1985) ⁴³⁾	3.572	mac/unix/win
MEGA	Kumar et al. (1993) ⁴⁴⁾	1	DOS
PAUP	Swofford (1993) ⁴⁹⁾	3.11/ 4.0 beta	mac/(unix/win)
FastDNAm1	Olsen et al. (1994) ⁵⁰⁾	1	unix/mac
PUZZLE	Strimmer and Haeseler (1997) ⁵¹⁾	4	mac/unix/win
REAP	McElroy et al. (1991) ³⁶⁾	4	DOS
Arlequin	Schneider et al. (1997) ⁵⁶⁾	1.1	win
GENEPOP	Raymond and Rousset (1995) ⁵⁷⁾	3.1 a	DOS
AMOVA	Excoffier (1995) ⁶²⁾	1.55	win
NTSYS	Rohlf (1993) ⁶⁶⁾	2	win
Lamarc	Kuhner et al.	—	unix/win/Mac

きる場合がある。これは地域集団間に遺伝子交流がなく、遺伝的に分化している場合である。しかし、多くの種においては、地域集団間に移住による遺伝子流動 (gene flow) が存在したりするため、上記のような樹形図が得られないことも多い。このような場合、ハプロタイプの頻度による統計的検定や分化指標を用いたデータ解析が必要となってくる。

1) ハプロタイプ頻度検定

個体群間のハプロタイプ頻度の異質性の検定には、以前には χ^2 検定や G 検定などが使われていた。しかし、DNA 分析の精度が上がれば上がるほど、見出されるハプロタイプの数が増え、ひとつひとつのその出現頻度は小さくなるため、これら従来の検定法の適用は困難となる。したがって、コンピュータを用いた無作為化に基づく検定が必要になる。mtDNA の解析においてよく使用される頻度検定として、Roff and Bentzen⁵⁴⁾の方法がある。この方法は、頻度データをランダムに入れ換えることを何度も行い、それぞれについての χ^2 値からその分布を求め、元の頻度データから得られる χ^2 値より大きな値が偶然に得られる確率を求めるというものである。この方法は REAP

package³⁶⁾の MONTE プログラムで計算可能である。最近、Raymond and Rousset⁵⁵⁾は、別のハプロタイプ頻度の異質性検定手法を開発した。この方法は、無作為化検定を用いることにより、フィッシャーの正確確率検定を $r \times k$ 表に拡張したものである。これは Arlequin⁵⁶⁾、GENEPOP⁵⁷⁾などで使用することができる。

2) 分化指標

個体群間の遺伝的差異を示す指標としては、純塩基置換係数 (net sequence divergence; d_n)、遺伝子分化係数 (G_{ST})、固定指数 (F_{ST} 、 Φ_{ST}) などが挙げられる。最も単純な指標は純塩基置換係数で、個体群内の変異を差し引いた個体群間の塩基置換数として示されるものである²⁷⁾。純塩基置換係数は塩基配列の違いを直接反映した指数であり、個体群間の違いの概略を見るのに有用な指数であると考えられる。

遺伝子分化係数 G_{ST} は Takahata and Palumbi⁵⁸⁾により mtDNA でも求める方法が示されている。mtDNA データより G_{ST} を求めるコンピュータソフトはない。

F_{ST} は、固定指数 (F 統計値) と呼ばれ、集団遺伝学における集団分化の指数として最もよく使

使用用途	入手先
multiple alignment	ftp : //iubio.bio.indiana.edu/molbio/align/clustal
変異サイト数、純塩基置換係数	http : //heylab.rutgers.edu.
種々の Tree 分析	http : //evolution.genetics.washington.edu/phylip.html
距離法・最大節約法	http : //evolgen.biol.metro-u.ac.jp/MEGA/*
最大節約法	http : //www.webcom.com/~sinauer/new.shtml#paup*
発見探索法による最尤法	ftp : //iubio.bio.indiana.edu/molbio/evolve
Quartetpuzzling による最尤法	http : //www.zi.biologie.uni-muenchen.de/~strimmer/puzzle.html
RFLP データの解析	制作者にメールを出す (mcelrdm@wkuvx1.wku.edu) *
基礎データや種々の検定	http : //anthropologie.unige.ch/arlequin/
集団解析での種々の指数と検定	http : //perdix.biologie.uni-mainz.de/biostats.htm
AMOVA	http : //anthropologie.unige.ch/~laurent/default.htm
多変量解析、Mantel's test	http : //users.aol.com/ExeterSftw/stat1.html#ntsyspc*
集団サイズの推定	http : //evolution.genetics.washington.edu/lamarc.html*

*有料

われるもののひとつである。Wright の F_{ST} ⁵⁹⁾、Cockerham の F_{ST} ^{60,61)} などいろいろな求め方がある。最近の mtDNA 分析の場合には、Cockerham によるものがよく使われる。これは、個体間の遺伝距離の分散から算出する。 Φ 値、とくに Φ_{ST} などは、mtDNA のように単数体の伝達様式をする遺伝子の遺伝的分化尺度として提案されたものである。 F_{ST} 、 Φ_{ST} の有意性の検定（帰無仮説は個体群全体でランダム交配する）は、個体間の遺伝距離をランダムに入れ換える無作為化検定で行える。2 地点間の F_{ST} の無作為化検定は Arlequin⁶⁶⁾ で、 Φ_{ST} のそれは Arlequin や AMOVA⁶²⁾ で計算可能である。

上で示してきた分析手法は、得られたデータから遺伝的分化、すなわち分集団の存在を検出するための手法である。しかし、当初よりあるいはデータ解析の途上で、特定の遺伝的集団構造がモデルとして想定されることがある。たとえば、特定の場所を境にいくつかの大地域集団に分かれているとか、まず大きく複数の分集団に分かれ、さらにその各分集団の中にさらに小さな分集団が存在するというようなモデルである。このような場合、いくつかの標本群をグルーピングして、多階層の集団構造を想定してその遺伝的分化を見る必要がある。Excoffier⁶³⁾ により、2 階層の集団構造を階層分散分析で統計的に解析する手法である analysis of molecular variance (AMOVA) が提案されている。これは、Arlequin や AMOVA などでも利用可能で、最近この手法を用いた研究が増えつつある。また、さらに複雑な 3、4 階層の集団構造を検証するための分散分析も考案されているが、mtDNA データで計算可能なソフトウェアは現在のところない。多階層の階層分散分析については、Weir⁶⁴⁾ に詳しい。

これまでに述べたような手法を用いて遺伝的分化の有無を検出した後、さらに種や集団ごとの特性により詳細な解析をする必要がある場合がある。たとえば、地理的距離と遺伝的分化の相関の分析、

個体群間の移住率の検討、集団サイズの相対的比較などである。地理的距離と遺伝的分化の相関の分析には Mantel's test⁶⁵⁾ がよく使用される。これは、NT-SYS⁶⁶⁾ や GENEPOP⁵⁷⁾ などで行える。個体群間の移住率は、 F_{ST} 値をもとにしたものが、Arlequin で推定できる。集団サイズの相対的比較においては、mtDNA は母系遺伝のため、生殖に参加する雌の集団サイズを見積もることになる。集団サイズは塩基多様度などの変異性を示す指標により相対的に比較する。また、シミュレーションによって集団サイズを比較するコンピュータソフトとして、Kuhner らにより開発された lamarc package がある。

近年、いくつかの新しい手法が発表され、コンピュータソフトウェアの充実もあって、これまでに述べてきたような手法を用いてかなり詳細な集団解析が行えるようになってきた。しかし、種によって集団構造のあり方は異なっており、特定の手法がすべての種に使えるというわけにはいかない。集団やデータの特性にあわせて適切な解析手法を使用する必要がある。

5. おわりに

以上、現時点における mtDNA 分析による集団解析法の概略について紹介した。それを通じて感じられるように、遺伝的データの質が DNA の塩基配列レベルで得られる時代になって、集団遺伝学の理論やデータ解析方法には、新しい展開が求められている。この点を最後に少し見ておきたい。

mtDNA に限らず核 DNA からであっても、遺伝的データが塩基配列レベルで得られるならば、それぞれは単に別のハプロタイプ（対立遺伝子）であるということが分かるにとどまらず、それぞれが相互に異なった塩基配列の類似性ないしは類縁性をもつものであることが明らかになってくるわけである。従来の集団遺伝学では、遺伝子頻度の解析が中心で、この後者の情報をも考慮するこ

とはほとんどなされていないのである。このことは、従来のアロザイム分析による集団解析を経験した人なら、容易に理解できるであろう。従来型のデータの取得法ではほとんど問題にならなかった事柄が、塩基配列レベルで分析がなされるに至って⁶⁷⁾、ようやく本格的に問題となってきたのである。このように、この問題は比較的最近に認識されるようになったものなので、それを考慮した理論やデータ解析手法はまだまだ発展途上にある。たとえば、coalescent theory⁶⁸⁾などはそうした試みの一例である。そうした分野のさらなる発展が期待される。こうした新しい質をもつデータを有効に活用するならば、近い過去の集団サイズの変化に関する推測なども、場合によってはできる可能性がある^{69,70)}。

もうひとつ、遺伝的データが塩基配列レベルで得られることによってデータの質が大きく変化した点は、数多くのハプロタイプ（対立遺伝子）が検出されるようになったことである。従来、検出される対立遺伝子の数はそれほど多くなかったのに対して、DNA レベルの分析がなされると感度よく多くの変異を検出できることになるので、扱わねばならない対立遺伝子の数が飛躍的に多くなる。上に述べてきたもの以外に具体的事例をもうひとつあげるならば、それはマイクロサテライト

DNA 分析であろう。これによって見出される対立遺伝子は、対立遺伝子相互間の類縁性の評価が困難であるため、アロザイム遺伝子と同様の扱いでデータ解析ができるが、その数の多さから、頻度の差の統計的検討などを従来の χ^2 検定や G 検定を用いることが困難である。そこで、上で紹介したようなコンピュータを利用した無作為化検定が新たに開発される必要があった。DNA レベルのデータに基づく集団解析には、分析対象がmtDNAであろうと核DNAであろうと、コンピュータを用いた無作為化検定の使用は、もはや不可欠のものとなっている。

なお、DNA 分析手法自体もさらに発展するであろう。意外と近いうちに、ある DNA 領域における変異の検出や、もっと長大な領域の塩基配列決定が、現在よりもさらに容易にできるようになりそうである。そうした DNA 分析手法の発展と、集団遺伝学理論・データ解析手法の発展とがあいまって、水圏生物の集団構造に関する理解をさらに深めることができるであろうという期待は、あながち空想とは言えないのではなからうか。この分野の研究者がなすべきことと果たすべき役割は、今後ますます多く大きくなってくるものと思われる。

引用文献

- 1) Kumazawa, Y. and M. Nishida (1993) Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes and deep branch animal phylogenetics. *J. Mol. Evol.*, 37 : 380–398.
- 2) Kumazawa, Y. and M. Nishida (1995) Variations in mitochondrial tRNA gene organization of reptiles as phylogenetic markers. *Mol. Biol. Evol.*, 12 : 759–772.
- 3) Wilson, A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, Jr., U. B. Gyllensten, K. Helm-Bychowski, R. C. Higuchi, S. R. Palumbi, E. M. Prager, R. D. Sage, and M. Stoneking (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linnean Soc.*, 26 : 375–400.
- 4) Moritz, C., T. Dowling, and W. M. Brown (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA : relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18 : 269–292.
- 5) Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunders

- (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489–522.
- 6) 渡辺公綱・横堀伸一 (1993) ミトコンドリア遺伝子の進化. pp.241–257, 「分子進化実験法 (日本生化学会編新生化学実験講座 16)」。東京化学同人, 東京.
 - 7) Avise, J. C., C. Giblin–Davidson, J. Laerm, J. C. Patton and. R. A. Lansman (1979) Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gophre, *Geomys pinetis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6694–6698.
 - 8) Orita, M., H. Iwahara, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single–strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2766–2770.
 - 9) Myers, R. M., N. Lumelsky, L. Lerman, and T. Maniatis (1985) Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature*, 313: 495–498.
 - 10) Riesner, D., K. Henco, and G. Steger (1990) Temperature–gradient gel electrophoresis: a method for the conformational transitions and mutation in nucleic acids and proteins. pp. 169–250, in "Advances in electrophoresis", Vol.4, Crambach A., M. J. Dunn, and B. J. Radola (eds.).
 - 11) Kitaura, J., G. Yamamoto, and M. Nishida (1998) Genetic variation in populations of the Diamond–shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* as examined by mitochondrial sequence analysis. *Fish. Sci.*, 64: 538–542.
 - 12) Avise, J. C. (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall Inc.
 - 13) 渡辺健一・沼知健一・後藤睦夫・和田志郎・小林敬典・釜石 隆 (1994) 紀伊水道域のメイタガレイ 2 型 (ホンメイタとバケメイタ) の mtDNA 切断型における遺伝的分化. *日本水産学会誌*, 60: 515–520.
 - 14) Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich (1988) Primer–directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491.
 - 15) Rolfs, A., I. Schuller, U. Finckh, and I. Weber–Rofts (1992) 加藤郁之進 (監訳) (1996) 「ラボマニュアル PCR – 研究と臨床診断への応用 –」, 宝酒造株式会社.
 - 16) 関谷剛男・藤永 恵 (編) (1996) 「PCR 法最前線 – 基礎技術から応用まで」, 蛋白質核酸酵素, 41 巻増刊, 共立出版, 東京.
 - 17) 中山広樹 (1996) 「バイオ実験イラストレイテッド: 本当に増える PCR」, 秀潤社, 東京.
 - 18) Thomas, W. K., S. Paabo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson (1990) Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens. *J. Mol. Evol.*, 31: 101–112.
 - 19) Chow, S., H. Okamoto, Y. Uozumi, Y. Takeuchi, and H. Takeyama (1997) Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR–RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Mar. Biol.*, 127: 359–367.
 - 20) 朝日田卓・斉藤憲治・山下 洋・青沼佳方・小林敬典 (1998) ミトコンドリア DNA の制限酵素

切断型分析によるヒラメ集団の遺伝的変異. 日本水産学会誌, 64 : 377-383.

- 21) Tabata, K. and A. Mizuta (1997) RFLP analysis of the mtDNA D-loop region in red sea bream *Pagrus major* population from four locations of Western Japan. Fish. Sci., 63 : 211-217.
- 22) Maxam A. M. and W. Gilbert (1977) A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 560-564.
- 23) Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 5463-5467.
- 24) Lee, W.-J., J. Conroy, W. H. Howell, and T. D. Kocher (1995) Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. J. Mol. Evol., 41 : 54-66.
- 25) Saitoh, K., M. Tanaka, R. Ueshima, T. Kamaishi, T. Kobayashi, and K. Numachi (1995) Preliminary data on restriction mapping and detection of length variation in Japanese flounder mitochondrial DNA. Aquaculture, 136 : 109-116.
- 26) Johansen, S. and I. Bakke (1996) The complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) : relevance to taxonomic studies among codfishes. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 5 : 203-214.
- 27) Cann, R. L., M. Stoneking, and A. C. Wilson (1991) Mitochondrial DNA and human evolution. Nature, 325 : 31-36.
- 28) Fujii, T. and M. Nishida (1997) High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish. Sci., 63 : 906-910.
- 29) Iguchi, K., Y. Tanimura, and M. Nishida (1997) Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and landlocked forms of ayu. Fish. Sci., 63 : 901-905.
- 30) Sang, T.-K., H.-Y. Chang, C.-T. Chen, and C.-F. Hui (1994) Population structure of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Mol. Biol. Evol., 11 : 250-260.
- 31) 上田卓也・横堀伸一・渡辺公綱 (1994) 遺伝暗号の起源と進化-変則暗号発生メカニズムについての1考察. 蛋白質核酸酵素, 39 : 2427-2437.
- 32) Edmands, S., P. E. Moberg, and R. S. Burton (1996) Allozyme and mitochondrial DNA evidence of population subdivision in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Mal. Biol., 126 : 443-450.
- 33) Kojima, S., R. Segawa, J. Hashimoto, and S. Ohta (1997) Molecular phylogeny of vestimentiferans collected around Japan, revealed by the nucleotide sequences of mitochondrial DNA. Mar. Biol., 127 : 507-513.
- 34) Miya, M. and M. Nishida (1997) Speciation in the open ocean. Nature, 389 : 803-804.
- 35) Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson (1994) CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., 22 : 4673-4680.
- 36) MacElroy, D., P. Moran, E. Bermingham, and I. Kornfield (1992) REAP : an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. J. Hered., 83 : 157-158.
- 37) Nei, M. (1987) 五條堀孝・斉藤成也 (共訳) (1990) 「分子進化遺伝学」. 培風館, 東京.
- 38) 上島 励 (1996) 系統樹をつくる. 「生物の種多様性」, 岩槻邦男・馬渡峻輔 (編), 裳華房, 東京,

pp.54–87.

- 39) 長谷川政美・岸野洋久 (1996)「分子系統学」. 岩波書店, 東京.
- 40) 三中信宏 (1997)「生物系統学」. 東京大学出版会, 東京.
- 41) Sokal, R. R. and C. D. Michener (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. University of Kansas.
- 42) Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4 : 406–425.
- 43) Felsenstein, J. (1991) PHYLIP: phylogeny inference package, version 3.5, Univ. Wasington, Seattle.
- 44) Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei (1993) MEGA: molecular evolutionary genetics analysis. The Pennsylvania State Univ., University Park.
- 45) Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.*, 16 : 111–120.
- 46) Tamura, K. and M. Nei (1993) Estimation of the munber of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 10 : 512–526.
- 47) Nei, M. and W.-H. Li (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endnucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 5269–5273.
- 48) Nei, M. and F. Tajima (1983) Maximum likelihood estimation of the number of nucleotide substitutions from restriction sites data. *Genetics*, 105 : 207–217.
- 49) Swofford, D. L. (1993) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. Smithsonian Institution, Wasington, DC.
- 50) Olsen, G. J., H. Matsuda, R. Hagstrom, and R. Overbeek (1994) A tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maxmum likelihood. *Comput. Appl. Biosci.*, 10 : 41–48.
- 51) Strimmer, K. and A. von Haeseler (1997) Maximum likelihood analysis for nucleotide, amino acids, and two-state data. *Zool. Inst., Univ. Munchen, Munchen, Germany*.
- 52) Farris, J. S. (1977) Phylogenetic analysis under Dollo's Law. *Syst. Zool.*, 26 : 77–88.
- 53) Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39 : 783–791.
- 54) Roff, D. A. and P. Bentzen (1989) The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms : χ^2 and the problem of small sample sizes. *Mol. Biol. Evol.*, 6 : 539–545.
- 55) Raymond, M. and F. Rousset (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49 : 1280–1283.
- 56) Schneider, S., J.-M. Kueffer, D. Roessli, and L. Excoffier (1996) A software package for population genetics. Genetics and Biometry Lab., Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- 57) Raymond, M. and F. Rousset (1995) GENEPOP, version 1.2 : population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 86 : 248–249.
- 58) Takahata, N. and S. R. Palumbi (1985) Extranuclear differentiation and gene flow in the finite island model. *Genetics*, 109 : 441–457.

- 59) Wright, S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19 : 395–420.
- 60) Cockerham, C. C. (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution*, 23 : 72–84.
- 61) Cockerham, C. C. (1970) Analysis of gene frequencies. *Genetics*, 74 : 679–700.
- 62) Excoffier, L. (1995) AMOVA : analysis of molecular variance, version 1.5.5. University of Geneva, Geneva.
- 63) Excoffier, L., P. E. Smouse, and J. M. Quattro (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131 : 479–491.
- 64) Weir, B. S. (1996) Genetic data analysis II : methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- 65) Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalised regression approach. *Cancer Res.*, 27 : 209–220.
- 66) Rohlf, F. J. (1992) NT-SYSPc : numerical taxonomy and multivariate analytical systematics, version 1.70. Exeter Software, Setauket, NY.
- 67) Kreitman, M. (1983) Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 304 : 412–417.
- 68) Hudson, R. R. (1990) Gene genealogies and the coalescent process. pp.1–44, in "Oxford surveys in evolutionary biology", Futuyma, D. and J. Antonovics (eds.), Oxford Univ.Press, Oxford.
- 69) Slatkin, M. and R. R. Hudson (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129 : 555–562.
- 70) Di Rienzo, A. and A. C. Wilson (1991) Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 : 1597–1601.
- 71) Kocher, T. D., J. A. Conroy, K. R. McKaye, J. R. Stauffer (1993) Similar morphologies of cichlid fish in Lake Tanganyika and Malawi are due to convergence. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2 : 158–165.
- 72) Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals : amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 : 6196–6200.
- 73) Meyer, A., T. D. Kocher, P. Basasibwaki, and A. C. Wilson (1990) Monophyletic origin of Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347 : 550–553.
- 74) Shields, G. F. and T. D. Kocher (1991) Phylogenetic relationships of north American ursids based on analysis of mitochondrial DNA. *Evolution*, 45 : 218–221
- 75) Meyer, A. (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. pp. 1–38, in "Biochemistry and molecular biology of fishes", vol. 2, Hochachka P.W. and T. P. Mommsen (eds.), Elsevier Science Publishers.
- 76) Folmer, O., M. Black, W. Hoen, R. Litz, and R. Vrijenhoek (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate. *Mol. Biol. Biotechnol.*, 3 : 294–299.

- 77) Palumbi, S., A. Martin, S. Romano, W. O. McMillan, L. Stice, and G. Grabowski (1991) The simple fool's guide to PCR. Dept. of Zool. and Kewalo Mar. Lab., Univ. of Hawaii.
- 78) Normark, B. B., A. R. McCuun, and R. G. Harrison (1991) Phylogenetic relationships of Neopterygian fishes, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 8 : 819–834.
- 79) Miya, M. and M. Nishida (1996) Molecular phylogenetic perspective on the evolution of the deep-sea fish genus *Cyclothone* (Stomiiformes : Gonostomatidae). *Ichthyol. Res.*, 43 : 375–398.
- 80) Kitaura, J., K. Wada, and M. Nishida (1998) Molecular phylogeny and evolution of unique mud-using territorial behavior in ocypodid crabs (Crustacea : Brachyura : Ocypodidae). *Mol. Biol. Evol.*, 15 : 626–637.
- 81) Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell et al. (14 coauthors) (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290 : 457–465.
- 82) Hey, J. and J. Wakeley (1997) A coalescent estimator of the population recombination rate. *Genetics*, 145 : 833–846.

水産育種研究会幹事

会 長	山崎 文雄
庶務幹事	荒井 克俊
会計幹事	山羽 悦朗
編集幹事	木島 明博
	古丸 明
	中嶋 正道
	谷口 順彦
	田畑 和男
	西田 睦
	和田 克彦
会計監査	青木 宙
総括幹事	藤尾 芳久

平成10年10月1日発行 水産育種 26

代表者兼発行者 山崎 文雄

発行所 水産育種研究会

〒041-8611 函館市港町3-1-1

北海道大学水産学部

TEL(0138)40-5535, FAX(0138)43-5015

FISH GENETICS AND BREEDING SCIENCE

No. 26 October 1998

PAPERS

Kijima A., S. Itoh, T. Iizuka, S. Hasegawa and K. Ueda : Genetic Control of the Long Caudal Fin Type in Wild Crucian Carp by Mating Experiments.....	1
Fujisawa, K., M. Nakajima and Y. Fujio : Strain Differences of High Temperature Resistance on the Guppy <i>Poecilia reticulata</i>	9
Nakajima, M., N. Takahashi and Y. Fujio : Genetic Control and Expression of Cobra Pattern in the Guppy <i>Poecilia reticulata</i>	17
Nakadate, M. and Y. Fujio : Relationship of Salinity Tolerance between Strains and their F ₁ Hybrids of Guppy	27
Sugaya, T., M. Ikeda and Y. Fujio : Typing of mtDNA in the Japanese Flounder Based on the Length Variation and the RFLP Analysis of mtDNA D-loop Region	33
Goto, H., Y. Maeda and A. Kijima : Genetic Differences between Two Streams of Ohigawa River at the Two Isozymic Loci in Yamato-iwana <i>Salvelinus leucomaens</i>	41
Okumura, S., S. Furukawa, T. Sasaki, M. Shimaoka and K. Yamamori : Induction of Tetrapioid Larvae in the Pacific Abalone <i>Haliotis discus hannai</i> by Suppression of the Meiotic Division Using Cytochalasin B	49
Takagi, M., G. Sogabe and N. Tanigudhi : Genetic Variability and Divergence of Ayu <i>Plecoglossus altivelis</i> Using AFLP Fingerprinting	55
Taniguchi, N., R. Perez-Enriquez, H. Matsuura and M. Yamaguchi : Estimation of Effective Population Size and Inbreeding Coefficient in Hatchery Reared Red Sea Bream by Microsatellite DNA Markers ...	63
Perez-Enriquez, R., M. Takemura and N. Taniguchi : Microsatellite DNA Detection by Chemiluminescence in Red Sea Bream : A Practical Manual	73

REVIEW

Nishida, M., T. Ohkawa and H. Iwata : Methods of Analysis of Genetic Population Structure with Mitochondrial DNA Markers	81
Informations	101
Members List	102

Japanese Society of Fish Genetics and Breeding Science

(Address : c/o Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, 041-8611, JAPAN)