

天然マダイのミトコンドリアDNAによる集団解析

兵庫県立水産試験場 増殖部 田畑和男

マダイは日本沿岸海域および東シナ海に分布しており、沿岸漁業の最重要魚種の一つである。本種の自然界における系群構造は、おもに、標識放流によって研究されてきた。たとえば、瀬戸内海東部においては、瀬戸内海東部系群、紀伊水道外域群が区別されており、また、瀬戸内海中西部においては、豊後水道からの入り込み群と居のこり群の混合系群が識別されている。ところが、アイソザイムによる研究結果からは、日本沿岸海域のマダイは明確に区別がつかず、現在のところ、1系群であるとされている。

また、1980年頃からは、各県の栽培漁業センターにより稚魚放流がなされており、種の多様性が論議されなかった最近までは天然魚群における遺伝的組成と異なった魚群が放流されていたこともあって、人の手の加わっていない魚種とは異なる問題も包含している。

兵庫水試では1994年から、アイソザイム分析よりも感度が高いとされているミトコンドリアDNA(mtDNA)分析によってマダイの集団解析を試みているので、途中経過ではあるが、以下にその概略を述べる。

マダイの天然集団の遺伝的変異量の把握および集団間の比較をmtDNAのD-Loop領域の変異を検出、比較することによっておこなった。mtDNAはそれぞれの生物において独立に変異を受けていると考えられており、その進化速度は核DNAの5-10倍といわれている。また、母系遺伝をすることが知られており、いろいろな種の集団遺伝学的研究に使われている。第1図にmtDNAの模式図を示した。

マダイ(当歳魚)のサンプリングは、1994年秋に第2図に示す西日本の4海域からおこなった：友ガ島水道(兵庫県洲本市沖)、田辺湾(和歌山県田辺市沖)、備後灘(広島県尾道市沖)、日本海(兵庫県竹野町沖)。第1表には、供試マダイの鼻腔隔壁欠損率を示した。これは人工生産種苗に特異的にみられる奇形である。これらは今回の分析から除外したが、なおも漁獲群のなかには、いくらかの割合で人工生産種苗が含まれているものとおもわれる。

DNAの抽出は、凍結魚の体側部筋肉の50-100 mgをTNEs buffer中で一夜Proteinase-K処理したのち、Phenol-chloroformによりおこなった。この全DNAを用いてPCR(Polymerase Chain Reaction)により、mt-DNAのD-Loop領域を増幅した。第1図に示すように増幅対象DNAはD-loop領域を含んだ領域で、Cyt b 遺伝子領域から12S rRNA 領域にまたがっており、塩基数は約2,100bpである。第3図は、PCRによる増幅結果であるが、左端に示した分子長マーカから増幅DNAの大きさが理解できる。

RFLP(制限酵素断片長多型 Restriction Fragment Length Polymorphisms)は、5種類の4塩基認識酵素(Hae III, Hha I, Msp I, Taq I および Rsa I)と1種類の5塩基認識酵素(Hinf I)を用い、PAGE(Polyacrylamide gel Electrophoresis)により検出した。その1例を第4図に示した。

制限酵素の切断型は、それぞれHae IIIが3、Hha Iが1、Hinf Iが5、Msp Iが3、Taq Iが7、および Rsa Iが9であった。ハプロタイプ(各酵素ごとの切断型の組み合わせ)数の理論的出現数は $3 \times 1 \times 5 \times 3 \times 7 \times 9 = 2,835$ であるが、今回出現したハプロタイプ数は35であ

った(第2表).

つぎに, ハプロタイプ頻度から, 集団の多様性を示す尺度の1つであるハプロタイプ多様度をもとめると, 第3表のようになる. この値は0から1の間に分布し, 1が最大の多様性を示し, 0の場合は多様性が全くないことを示す. マダイの各集団におけるハプロタイプ多様度はかなり高い値を示した.

ところで, 出現するハプロタイプ数はサンプル数に依存しており, その出現の様子は第5図に示したようになった. このように理論的ハプロタイプ数が多いと, ほとんど天井知らずの状態になり, いったい調査すべきサンプル数はいくらなのかという疑問がわいてくる. Grewe et al.(1993)は, このことに関して次のような答えを出している. ランダムに選ばれたn個体のなかで, ある頻度(p)のハプロタイプを持つ個体を少なくとも1個体観察できる確率(β)は, $\beta = 1 - (1-p)^n$ で計算でき, これから $n = \ln(1-\beta) / \ln(1-p)$ が導かれる. マダイの調査サンプル数から $\beta = 0.95$ のもとでpを計算すると第4表のようになる. これらのp以上を持つハプロタイプは95%の確率で意味を持つものと考えられる. いいかえると, 第2表の1番目から4ないし5番目のあたりまでのハプロタイプ頻度が, 95%の確率で少なくとも1個体観察できるということになる.

さて, 調査したマダイ集団のハプロタイプ頻度をもとにして, 集団を区別できるかどうかという問題を考える. 低頻度のハプロタイプが多数出現する場合, 通常の方法でchi-square testをおこなうにしてもdominantかsub-dominantなハプロタイプのみを対象にした評価しか得ることができない. こういった場合は, すべてのハプロタイプを対象にできるMonte Carlo法により検討するのが賢明である. 結果は第5表に示した. 有意であったのは, わずかに備後灘と田辺湾の間のみであった. これは, ハプロタイプno.5およびno.193の頻度の違いを検出したものとおもわれる. 今後分析検体数を増加させることによって集団間の差異がさらに検出できる可能性は残されている.

つぎに, 集団の多様性を表現する方法として, 塩基多様度という尺度があるのでこのことについて以下に述べる. まず, サイトあたりの塩基置換数を制限酵素断片データから求めてDNAの塩基置換率を計算する. この値をもとに集団Xまたは集団Y, および集団X, Yにおける2つのハプロタイプ間の塩基置換率の平均値(それぞれdx, dy, dxy)を計算し, これらの値から2集団間(X, Y)の純塩基置換率 d_A を次式からもとめる.

$$d_A = d_{XY} - (d_x + d_y) / 2$$

結果を第6表に示した. 各集団内の塩基置換率はかなり高い値を示した. また, 各集団間のみかけの塩基置換率はかなり高い値を示したが, 純塩基置換率は0.01-0.04%程度であった.

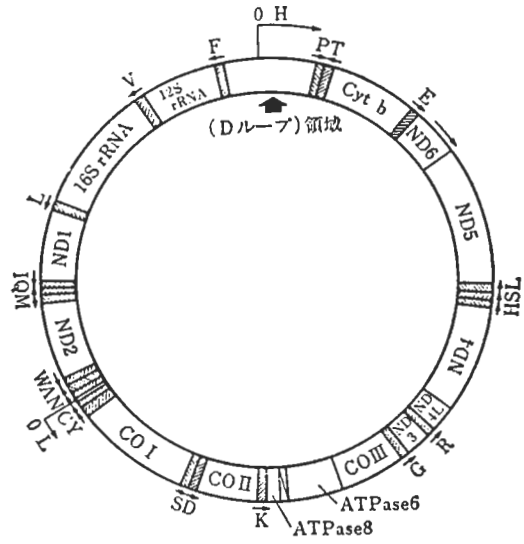
以上のことから, 今回調査したマダイ集団は集団内に高い変異性を持っていることが明らかになった. しかし, 日本海域を含めて海域群間の差は顕著ではなかった. ただし, 何らかの原因(種苗放流等???)で有意となる海域間もある.

今後, これらのことをさらに明確にするために, サンプリングの海域とサンプリング数の増加および同海域の年間差等についてさらに検討する必要がある.

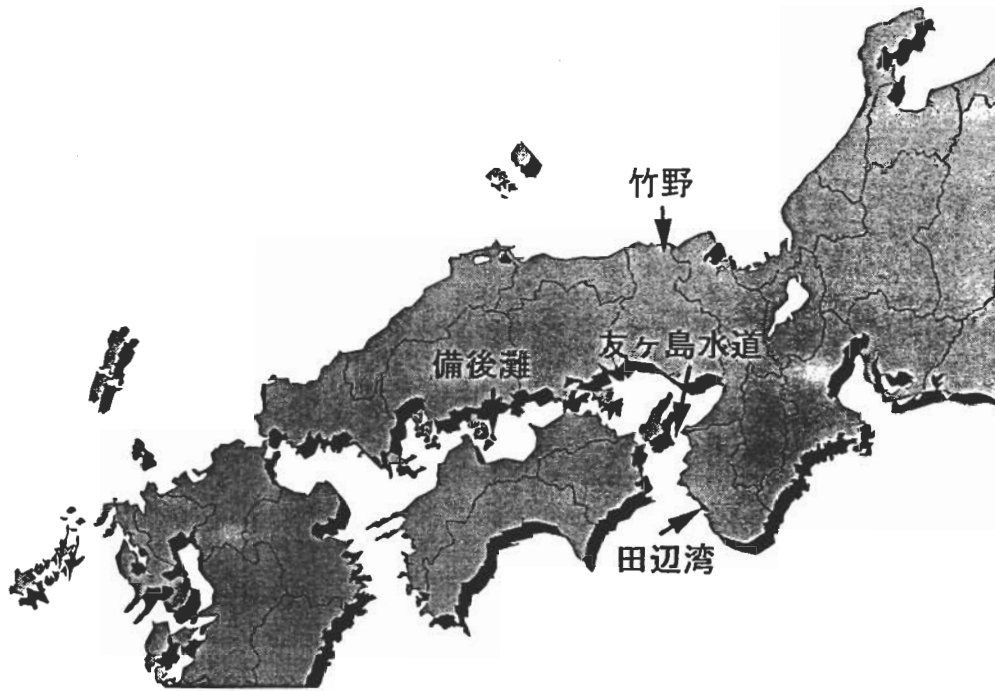
まとめ

- ・西日本のマダイ4海域漁獲群のmtDNAのD-loop領域をPCRにより増幅した.

- ・増幅されたDNA領域を6種類の制限酵素で消化し、断片長変異を検出した。
- ・断片長変異の組み合わせから、35種類のハプロタイプが見いだされた。
- ・ハプロタイプ多様度は各集団とも高く、平均で0.890であった。
- ・ハプロタイプ頻度のパターンの集団間比較では、備後灘－田辺湾間のみ有意であったが、他のあらゆる組み合わせ間は無意ではなかった。
- ・各群内の塩基置換率は0.80-1.02%とかなり高かった。集団間のみかけの塩基置換率も0.91-1.04%と高かったが、純塩基置換率は0.01-0.04%であった。
- ・以上のことから、今回調査したマダイ集団は集団内に高い変異性を持っていることが明らかになった。しかし、日本海域を含めて海域集団間の差は顕著ではなかった。ただし、何らかの原因（種苗放流等??）で有意となる海域間もある。今後、これらのことをさらに明確にするために、サンプリングの海域とサンプリング数の増加および同海域の年間差等についてさらに検討する必要がある。



第1図 ミトコンドリアDNAの模式図
(宝来1992)

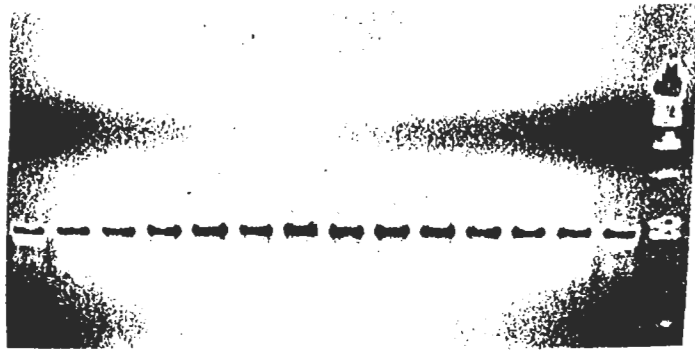


第2図 供試マダいのサンプリング海域

第1表 供試マダいの漁獲海域と鼻腔隔壁欠損状況

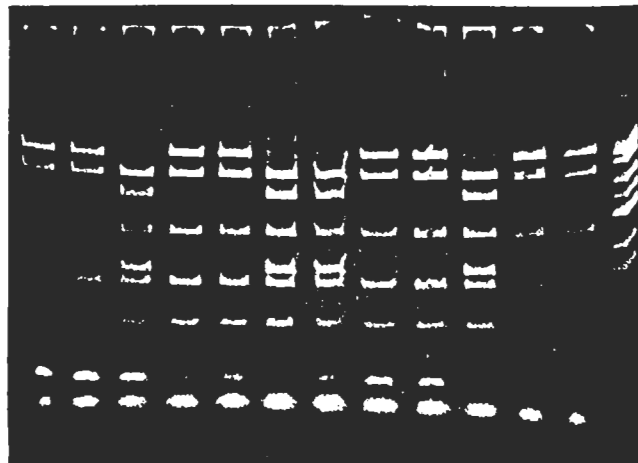
漁獲海域	方法	漁獲年月日	年齢	鼻腔隔壁欠損	分析個体数
友ヶ島水道	小型底曳	941013	当歳魚	1/51*1 2.0*2	47
田辺湾	小型底曳	941018	〃	2/42 4.8	38
備後灘(尾道沖)	小型底曳	941114	〃	0/50 0	47
日本海(竹野浜沖)	定置網	941114	〃	1/47 2.1	58
兵庫県栽培漁業センター	—	941220	〃	29/37 78.4	

*1欠損個体数/調査個体数
*2欠損率%



2.32 bp
2.02

第3図 ミトコンドリアDNAのd-loop領域のPCRによる増幅結果



第4図 制限酵素による切断型の一例

第2表 各海域集団に出現したハプロタイプの頻度

Location Hap. Typ. NO.	備後灘	日本海	田辺湾	友ヶ島水道
3 BAAAAC	0.213	0.276	0.211	0.188
194 BABAAB	0.170	0.172	0.158	0.292
5 BAAAAE	0.149	0.069	0.026	0.125
193 BABAAA	0.000	0.034	0.132	0.083
644 BABBAD	0.085	0.052	0.079	0.000
212 BABACD	0.085	0.034	0.026	0.000
202 BABABB	0.021	0.000	0.105	0.042
199 BABAAG	0.021	0.017	0.079	0.042
580 BADAAD	0.000	0.052	0.000	0.021
6 BAAAAF	0.021	0.017	0.026	0.021
11 BAAABC	0.000	0.034	0.026	0.021
220 BABADD	0.043	0.000	0.000	0.042
195 BABAAC	0.043	0.000	0.000	0.021
770 BAEAAB	0.000	0.034	0.000	0.021
67 BAABAC	0.021	0.017	0.000	0.021
588 BADABD	0.043	0.000	0.000	0.000
131 BAACAC	0.000	0.034	0.000	0.000
387 BACAAC	0.000	0.017	0.000	0.021
206 BABABF	0.000	0.017	0.026	0.000
579 BADAAC	0.021	0.017	0.000	0.000
266 BABBBB	0.021	0.000	0.000	0.000
196 BABAAD	0.000	0.000	0.026	0.000
51 BAAAGC	0.021	0.000	0.000	0.000
37 BAAAE	0.021	0.000	0.000	0.000
578 BADAAB	0.000	0.017	0.000	0.000
772 BAEAAD	0.000	0.000	0.000	0.021
7 BAAAAG	0.000	0.017	0.000	0.000
1003 AAAAAC	0.000	0.000	0.026	0.000
198 BABA AF	0.000	0.017	0.000	0.000
1387 AACAAC	0.000	0.000	0.026	0.000
236 BABAFD	0.000	0.017	0.000	0.000
392 BACA AH	0.000	0.017	0.000	0.000
587 BADABC	0.000	0.000	0.026	0.000
1644 AADB AD	0.000	0.017	0.000	0.000
2642 CADB AB	0.000	0.000	0.000	0.021
SUM	1	1	1	1

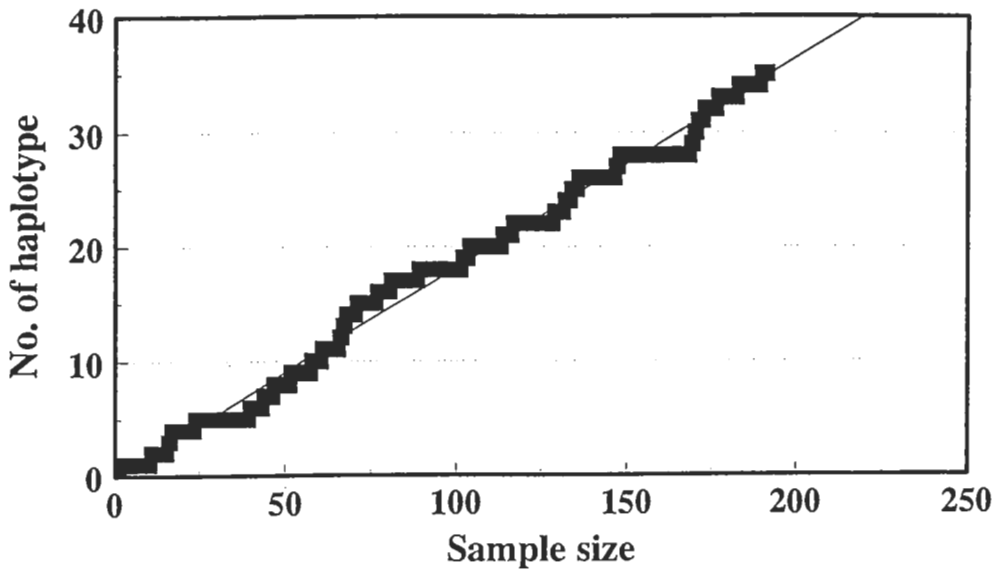
35

第3表 ハプロタイプ多様度

Haplotypic diversity	
友ヶ島水道	0.857
田辺湾	0.895
備後灘 (尾道)	0.890
日本海 (竹野)	0.882
全体	0.890

Haplotypic diversity = $2n(1 - \sum xi^2)/(2n-1)$ by Nei(1987)

xi: Haplotype i の頻度 n: 個体数



第5図 サンプル数とハプロタイプ出現数

第4表 供試数が $\beta = 0.95$ のもとでの p は？

ただし、ランダムに選ばれた n 個体のなかで、ある頻度 (p) の haplotype を持つ個体を少なくとも 1 個体観察できる確率 (β)

(By Grewe et al. 1993)

	sample size	p	左の p 以上の haplotype の順位 *
友ヶ島水道	48	0.060	1 - 4
田辺湾	38	0.076	1 - 5
備後灘 (尾道)	47	0.062	1 - 5
日本海 (竹野)	58	0.050	1 - 5

*第2表

第5表 海域間のハプロタイプ頻度の検定 (Monte Carlo 法)

	友ヶ島水道	田辺湾	備後灘	日本海	全体
友ヶ島水道		203/1000	133/1000	436/1000	
田辺湾			30/1000*	218/1000	
備後灘				234/1000	
日本海					
全体					127/1000

第6表 各集団内および集団間の塩基置換率

d_{XY} (集団 X, Y のハプロタイプ間の塩基置換率の平均値)

	友ヶ島水道	田辺湾	備後灘	日本海
友ヶ島水道		0.91	0.94	0.91
田辺湾			1.04	1.01
備後灘				1.01
日本海				

d_X (集団 X において任意に抽出された

2 つのハプロタイプ間の塩基置換率の平均値)

	友ヶ島水道	田辺湾	備後灘	日本海
友ヶ島水道		0.80		
田辺湾			0.97	
備後灘				1.02
日本海				

d_A (2 集団間の純塩基置換率)

	友ヶ島水道	田辺湾	備後灘	日本海
友ヶ島水道		0.02	0.03	0.02
田辺湾			0.04	0.04
備後灘				0.01
日本海				