

氏 名(本籍)	^{ホク} 朴	^{ジュン} 重	^{エン} 淵
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	農 博 第 4 4 6 号		
学位授与年月日	平 成 4 年 3 月 27 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 水産学専攻		
学位論文題目	カレイ科魚類の種間におけるアイソザイ ム遺伝子およびミトコンドリア DNA の 差異		

論文審査委員(主査)	教授	藤 尾 芳 久
	教授	谷 口 旭
	教授	竹 内 昌 昭

論文内容要旨

序論

地球上において多様に分化した種は、「現実的に、あるいは潜在的に相互交配し、他のグループから生殖的に隔離された集団のグループ」と定義されている(Mayr, 1942)。実際には、種は遺伝形質に関して他とは不連続的に区別できることが必要とされる。種が不連続な遺伝形質をもつならば、それを支配する遺伝子も不連続になることが予想される。しかし、形態的、生理的、生態的形質などの量的に表される形質(量的形質)を直接遺伝子としてとらえることは難しく、種の特徴を判別するには主観による判断が入らざるを得ない。従って、遺伝子支配が明らかな形質を用いて同一種の地域集団間と種間の遺伝的不連続性の有無を明らかにすれば、種を遺伝的立場からとらえることができる。

集団分析の標識遺伝子として酵素を支配するアイソザイム遺伝子と核外遺伝子のミトコンドリアDNAがある。また、地域集団間や種間の遺伝的不連続性の有無を明らかにするためには明確な分類がなされている種で調べる必要がある。さらに、集団の遺伝的特徴は繁殖生態と関連することが報告されていることから、同科内において繁殖生態が異なる種間と類似した種間での比較ができなくてはならない。カレイ科魚類は異体類と呼ばれ、形態的に特徴ある多くの種を含んだ明確な分類群である。本研究はカレイ科魚類を用いて種内および種間におけるアイソザイム遺伝子およびミトコンドリアDNAの差異を明らかにし、種間の遺伝的不連続性について考察することを目的とした。

第1章. マガレイとマコガレイにおける種内および種間の遺伝的距離と変異性

繁殖域が異なり、形態的に類似する同属異種のマガレイとマコガレイの種内および種間における遺伝的変異性、Neiの遺伝的距離、および分岐遺伝子座の有無をアイソザイム遺伝子を標識として調べた。その結果、

1) 14アイソザイム遺伝子を用いて求めた平均ヘテロザイゴシティーはマガレイが 0.094から0.100で平均0.096、マコガレイが 0.029から0.069で平均0.043となり、種内ではほぼ変わらない値を示したが種間ではマガレイで大きな値を示した。

2) 14アイソザイム遺伝子を用いて求めた種内の地域間の遺伝的距離は、マガレイが 0.00034から 0.00059で平均 0.00042、マコガレイが 0.00060から 0.02801で平均0.00965となり、マコガレイで地域間の分化が大きいことを示した。しかし、両種共に地域間で共通対立遺伝子をもたない分岐遺伝子座は認められなかった。

3) マガレイとマコガレイの遺伝的距離は 0.50634から 0.52833で平均 0.52164となり、種内に比べて顕著に大きな値を示した。また、分岐遺伝子座は3遺伝子座でみられ、遺伝的な不連続性が示された(表1)。

第2章. イシガレイとヌマガレイにおける種内および種間の遺伝的距離と変異性

繁殖域が重なり、自然雑種が出現する異属のイシガレイとヌマガレイの種内および種間の遺伝的変異性、遺伝的距離、および分岐遺伝子座の有無をアイソザイム遺伝子を用いて調べた。その結果、

1) 19アイソザイム遺伝子を用いて求めたイシガレイの平均ヘテロザイゴシティーは東京湾、原釜、余市で0.062から0.067と高く、瀬戸内海の神戸と西条で0.031から0.034で低く、種内でも遺伝的変異性に地域による違いがみられた。また、ヌマガレイでは0.067となり、イシガレイの北部の地域とほぼ同じ値であった。

2) 19アイソザイム遺伝子を用いて求めたイシガレイの種内の遺伝的距離は 0.00017から0.00570で平均0.00307であり、分岐遺伝子座はみられなかった。

3) 19アイソザイム遺伝子を用いて求めたイシガレイとヌマガレイの遺伝的距離は0.48136から0.49618で平均0.49040であり、イシガレイの種内に比べて著しく大きい値を示した。また、分岐遺伝子座は3遺伝子座でみられ、遺伝的不連続性が示された(表2)。

第3章. ミトコンドリアDNAによるカレイ科4種間の塩基置換数

カレイ科の種間における遺伝的差異をDNAレベルでみるために、マガレイ、マコガレイ、イシガレイ、ヌマガレイのミトコンドリアDNA(mtDNA)を単離し、6塩基認識の14制限酵素で切断した切断片の塩基対数を比較した。その結果、

1) 4種におけるmtDNAの総塩基対数は17.43から17.73に分布し、アガロースゲル電気泳動法による塩基対数の判定の精度からみて4種が同じ大きさであると考えられた。

2) 14制限酵素切断パターンから求めた4種のハプロタイプ数はマガレイで10、マコガレイで4、ヌマガレイで2、イシガレイで1であり、4種全てで17ハプロタイプが観察された。また、4種間に共通のハプロタイプは認められず、遺伝的不連続性を示唆した(表3)。

3) 4種の遺伝的差異を各ハプロタイプ間でみられた共通切断片数とmtDNAハプロタイプ間のサイト当りの平均塩基置換数(d)を用いて求めた結果、共通切断片数は種内では64から72で平均68、種間では38から46で平均41、属間で20から40で平均34であり、種間、属間で明らかに少なかった。

4) mtDNAハプロタイプ間のサイト当りの平均塩基置換数は種内が0.0023から0.0082で平均0.0035、種間が0.0274から0.414で平均0.0344、属間が0.0350から0.0711での平均0.0458となり、種間、属間で種内に比べて著しく高い値を示した。

第4章. 最少アイソザイム遺伝子座によるカレイ科魚類の遺伝的距離の評価

カレイ科の種間の遺伝的距離を推定するのに必要なアイソザイム遺伝子座数および対立遺伝子数を明らかにするために、4属6種の種内および種間の遺伝的距離を21遺伝子座を用いて調べ、さらにそこから標識とした遺伝子座数および対立遺伝子を減少させたときの遺伝的距離の変化を調べた。また、その結果からカレイ科9属13種間の遺伝的距離と類縁関係を求めた。その結果、

1) 標識遺伝子座数を21遺伝子座から18、16、13、9と減少させて求めた遺伝的距離は、種内では大きく変化したが、種間、属間では一定となり、種間および属間の遺伝的距離は9遺伝子座でも推定できることが分かった。

2) 頻度が0.5未満の低い対立遺伝子を0.1ずつ5段階に分けて最大対立遺伝子頻度を示す主対立遺伝子の頻度に加えた時のカレイ科6種の遺伝的距離を21遺伝子座から18、16、13、9までの5段階にわけて求めた結果、種内では遺伝的距離が大きく変化したが、種間、属間では一定の値となり、種間およ

び属間の遺伝的距離は9遺伝子座の主対立遺伝子を用いて推定できることが分かった(図1)。

3) 9遺伝子座における主対立遺伝子を用いてカレイ科9属13種の遺伝的距離を調べた結果、遺伝的距離は種間および属間とも多くの遺伝子座で求められている値とよく一致した。また、そこから求めた類縁関係は形態分類とよく一致した(図2)。

総合考察

第1章から第4章において述べてきた結果をまとめてカレイ科4種(マガレイ、マコガレイ、イシガレイ、ヌマガレイ)の種内の地域集団間、種間、属間のmtDNAのサイト当りの平均塩基置換数の平均とアイソザイム遺伝子によるNeiの遺伝的距離の平均と分布範囲を比較した(表4)。mtDNAのサイト当りの平均塩基置換数は種内で平均0.0035、種間で0.0344、属間で0.0458となり分類群が高位になるほど大きな値を示した。また、平均塩基置換数の分布範囲をみると、種内の最大値が0.0082であるのに対して種間の最小値は0.0274となり、種内と種間での値の分布には重複がなく、平均塩基置換数において明らかな不連続性が認められた。一方、アイソザイム遺伝子によって求めた遺伝的距離をみると、種内で平均0.00285、種間で0.54460、属間で2.04197となり、mtDNAによる平均塩基置換数の場合と同様に分類群が高位になるほど大きな値を示した。また、遺伝的距離の分布範囲をみると、種内の最大値が0.00862であるのに対して、種間の最小値は0.49000となり、種内と種間での値の分布には重複がなく、平均塩基置換数の場合と同様に遺伝的距離においても明らかな不連続性が認められた。一方、少数のアイソザイム遺伝子座の主対立遺伝子を用いて種内では遺伝的距離が推定できず、種間では推定できることの要因を考察すると、種内の遺伝的距離は対立遺伝子頻度の違いによって特徴づけられ、種間の遺伝的距離は分岐遺伝子座数によって特徴づけられることが示された。これらのことから、種間の遺伝的差異は対立遺伝子の置換によって特徴づけられ、形態的不連続性と同様に遺伝的不連続性を示すことが分かった。

表1. マガレイとマコガレイの地域集団間の遺伝的距離(14遺伝子座)

採集地域	マガレイ				マコガレイ				
	原釜	新潟	黄海		新潟	三谷	明石	筑前	豊前
原釜									
新潟	0.00035								
黄海	0.00034	0.00059							
新潟	0.52463	0.52779	0.52723						
三谷	0.50634	0.50762	0.51091		0.02188			0.00965±0.01088 (0)	
明石	0.51785	0.52130	0.52005		0.00217	0.01481			
筑前	0.52478	0.52820	0.52689		0.00102	0.02801	0.00344		
豊前	0.52512	0.52833	0.52718		0.00060	0.02221	0.00134	0.00097	

表2. イシガレイとヌマガレイの地域集団間の遺伝的距離(19遺伝子座)

採集地域	余市	原釜	東京湾	神戸	西条	巨理
余市						
原釜	0.00050			0.00307±0.00207 (0)		0.49040 ±0.00547 (3)
東京湾	0.00137	0.00096				
神戸	0.00570	0.00439	0.00426			
西条	0.00505	0.00415	0.00411	0.00017		
巨理	0.49076	0.49154	0.48136	0.49618	0.49214	

表3. カレイ科4種で得られた全ハプロタイプと出現個体数

制限酵素	ハプロタイプ										LY I	LY II	LY III	LY IV	PS I	PS II	KB I
	LH I	LH II	LH III	LH IV	LH V	LH VI	LH VII	LH VIII	LH IX	LH X							
Apa I	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	C	C	C	C	D	D	D
Bam HI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Bgl II	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Eco RI	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Eco RV	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Hind III	A	A	A	B	A	A	A	B	A	A	C	D	D	C	E	E	F
Kpn I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	A
Pst I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	C	C	C
Pvu II	A	A	A	A	B	A	A	A	C	D	E	E	F	F	G	H	I
Sac I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Sal I	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	B	B	C	C	D
Sma I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	C	C	D
Xba I	A	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	C
Xho I	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	C	C	B
出現個体	21	1	1	2	2	2	1	1	1	1	15	2	1	1	1	1	3

H; マガレイ、LY; マコガレイ、PS; ヌマガレイ、KB; イシガレイ

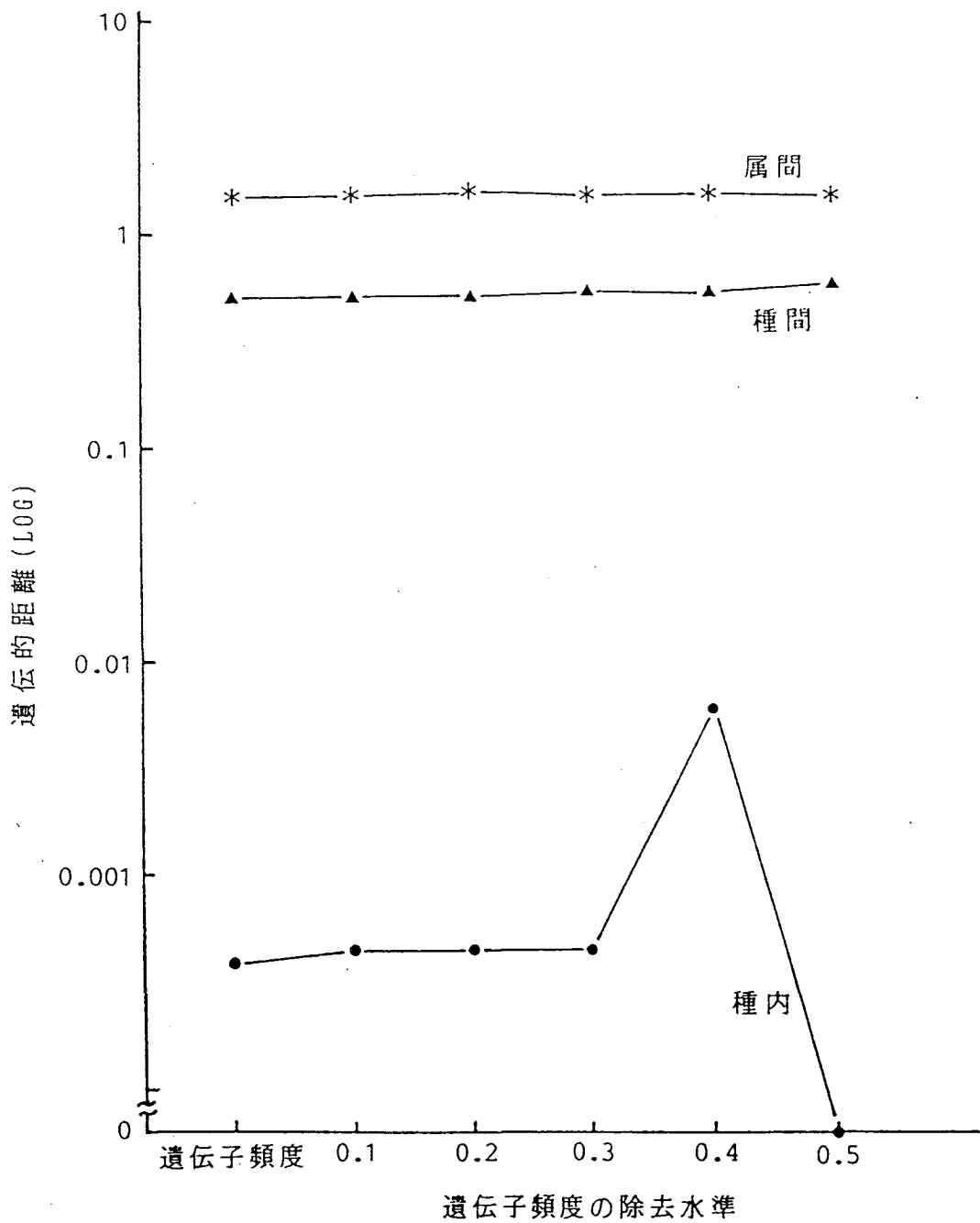


図1. 遺伝子頻度の除去水準による遺伝的距離の変化

種間 $D=0.55138 (0.25131-0.81093)$
 属間 $D=1.72952 (0.40547-2.19723)$

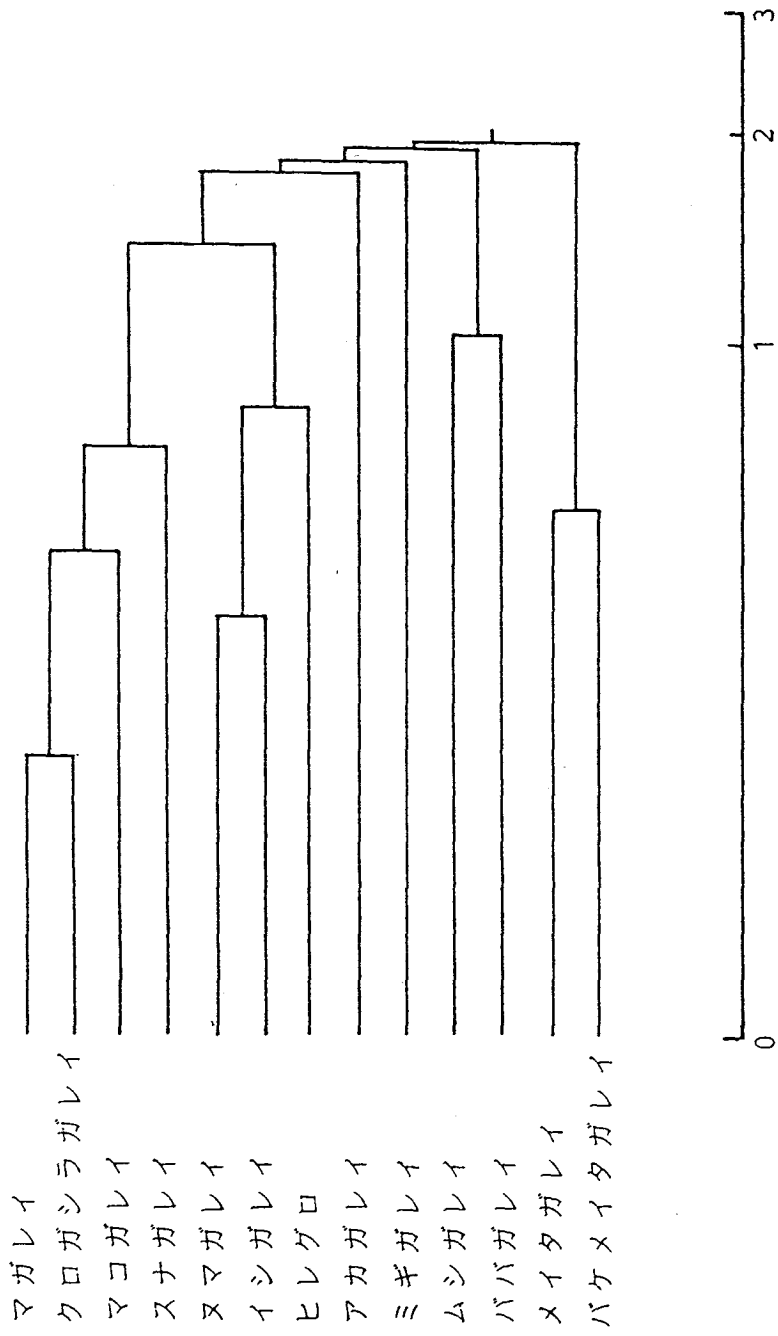


図2. 9 遺伝子座の主対立遺伝子で求めたカレイ科13種間の遺伝的類縁図

表4. ミトコンドリアDNAとアイソザイム分析によるカレイカ魚類の
 サイト当りの平均塩基置換数および平均遺伝的距離

	ミトコンドリアDNA		アイソザイム	
	組合せ数	平均と範囲	組合せ数	平均と範囲
種内	52	0.0035(0.0023-0.0082)	5	0.00285(0.00045-0.00862)
種間	40	0.0344(0.0274-0.0414)	4	0.54460(0.49000-0.58878)
属間	44	0.0458(0.0350-0.0711)	36	2.04197(0.42118-2.97147)

審査結果の要旨

種は遺伝形質に関して他とは不連続に区別できる集団のグループとしてとらえられる。しかし、実際には形態形質などの直接遺伝子との対応が難しい形質の差異で種は判別されている。遺伝子との対応で種をとらえるためには遺伝子支配が明らかな形質を用いて種内および種間の差異をとらえる必要がある。本論文はこの点に立脚して、核内遺伝子としてアイソザイム遺伝子を、核外遺伝子としてミトコンドリアDNAを標識として、形態分類が明確なカレイ科の魚種を対象に、種の違いを遺伝的立場からとらえようとした研究である。

第一に同属異種で生態的に異なるマガレイとマコガレイ、第二に異属であるが繁殖生態が類似し、自然雑種が出現するインガレイとヌマガレイの種内および種間の遺伝的差異をアイソザイム遺伝子を標識として調べ、種内ではどの種においても遺伝的差異を表すNeiの遺伝的距離(D)が0.03未満であったのに対し、種間では0.48以上と顕著に大きな値を示すこと、および共通対立遺伝子を持たない分岐遺伝子が種内では認められないが種間では少なくとも3つ以上あることを明らかにした。一方、上記の4種について、ミトコンドリアDNAの14制限酵素の切断型分析により、4種で17ハプロタイプが認められたが、種間に共通のハプロタイプがみられないことを示した。また、出現したハプロタイプの差異から求めた制限サイト当たりの平均塩基置換数(d)は種内で0.0023から0.0082、種間で0.0274から0.0414となり、種内と種間での不連続性を示すことを明らかにした。さらに、ミトコンドリアDNAとアイソザイム遺伝子による種内および種間の遺伝的差異は共に種間で顕著に大きくなり、どちらも同じ傾向を示すことを明らかにした。そこで、多くの種間の遺伝的差異を調べるために必要な最少のアイソザイム遺伝子座を明らかにするために、カレイ科4属6種でしらべた21遺伝子座のデータを用いて遺伝子座を少なくした場合、および遺伝子頻度が最も高い主対立遺伝子を用いた場合、遺伝的距離は種内では大きく変化するが、種間では変化しないことを示した。このことにより種の違いが分岐遺伝子座の数によって特徴付けられ、少数の個体の少数のアイソザイム遺伝子で種間の遺伝的差異を調べられることを明らかにした。

本研究は、種は遺伝的不連続性を示すことを明らかにし、遺伝的標識を用いて種の同定ができる可能性を示した。よって、博士(農学)の学位を授与するに十分な価値があると判断する。