

# 大阪湾に放流したホシガレイ mtDNA の多型について

辻村 浩隆

## Mitochondrial DNA variability of the spotted halibut *Verasper variegatus* released in Osaka Bay

Hiroataka Tsujimura

ホシガレイ *Verasper variegatus* は本州中部以南から東シナ海に分布し、全長60cmになる大型のカレイである<sup>1)</sup>。大阪ではヘイジガレイと呼ばれ親しまれていたが、地元の漁師の話によると数十年ほど前から漁獲されていない。また、大阪府立水産試験場事業報告に記録があるのも1956年まで<sup>2)</sup>で、現在では大阪湾に生息していないと考えられる。

大阪湾でホシガレイが再び漁獲されることを目指し、泉佐野漁業協同組合は2003年より種苗放流を始めた。大阪湾に定着させるためには、放流した個体がどのように分散し、また再生産を行うか、あるいは他の海域からの加入があるのか等を把握する必要がある。放流集団および天然集団の動態を把握するには分子生物学的手法が有効である。ミトコンドリアDNA (mtDNA) は変化速度が速く、中でも調節領域 (D-Loop) は特に進化速度が速い。このため、多数の遺伝的な型が見られ、異体類においても遺伝的集団構造を解析するときに用いられている<sup>3, 4)</sup>。

本研究では大阪湾に放流された2系統のホシガレイについてmtDNAのD-Loop前半における遺伝的多様性を調べると共に、再生産が行われた場合、その遺伝的由来を知ることが可能となるよう塩基配列の把握を行った。

### 材料および方法

供試魚には2003年6月に泉佐野漁協が岩手県の業者より購入したホシガレイのうち、1歳魚10個体、当歳魚10個体、および、2003・2004年に長崎県より受精卵を譲り受け、飼育実験を行った種苗のうちのそれぞれ10個体と5個体を用いた。なお、これらの親魚には各地先にて捕獲された個体を使用していた。

検体の全身、または鰭の一部を99.5%のエタノールで固定し、キレックス簡易抽出法を用いてDNAを抽出した。mtDNAのD-Loop前半についてプライマー L15924<sup>5)</sup> と H16498Po (藤井ら、未発表) を用いてPCR法にてDNAを増幅した。DNAポリメラーゼにはTAKARA Taq (TAKARA) を、サーマルサイクラーとして PCR Thermal Cycler SP (TAKARA) を用いた。反応条件は94℃ 40秒、45℃ 60秒、72℃ 60秒で、このサイクルを30回行った。得られたPCR産物を ExoSAP-IT (Amersham Biosciences) により精製した後、プライマー L15996Po と H16495 (藤井ら、未発表) を用いて BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) によるサークルシーケンス反応をおこない、ABI PRISM<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列分析を行った。

## 結 果

DNAの増幅によって500塩基対 (bp) 前後の増幅産物が得られた。得られた増幅産物から塩基配列分析を行い、380bpの塩基配列を決定した (図1)。

この結果、岩手県の種苗はすべて同じ塩基配列の型 (ハプロタイプ) を持っており、生産年による違

いは見られなかった。また、長崎県の種苗もハプロタイプに違いはなく、生産年に関わらず同じであった。岩手県と長崎県の種苗の間には増幅範囲の両端に違いがみられ、決定した塩基配列の前方から22番目と後方から43番目の2カ所に違いが見られた。

位置	30	60
長崎県産	TACGCAGTGTTTCATACGATACGCATGCAAT	TTTTATGTGCATATATGTAATAACACCATA
岩手県産	..... A.....	.....
位置	90	120
長崎県産	TATTTATAGTAACCATTTTATGTGATGTAC	TAAGACATTCATGTATTATAACCTAATCTA
岩手県産	.....	.....
位置	150	180
長崎県産	GTAATATAGCACTCATTACCAACATTTTT	AACTAAAGTAAACTAAAACCTAATTAATCA
岩手県産	.....	.....
位置	210	240
長崎県産	CTAATTTTAAATATGTAAACTCTAGGACC	AATCGAAATTTAAGACCGAACACGACACTC
岩手県産	.....	.....
位置	270	300
長崎県産	ATCAGTTAAGTTATACCAAGACTCAAAATC	TCGCCCATCATAAATTCCTATGTAGTAAGA
岩手県産	.....	.....
位置	330	360
長崎県産	GCCTACCAACCGGTGATTTCTGAATGATAA	CTCTTATTGATGGTCAGGGACAGAAATCGT
岩手県産	.....	..... T..
位置	390	400
長崎県産	GGGGTTTCACTCAGTGAACCTTCCCTGGC	ATTTGGTTCT
岩手県産	.....	.....

図1 ホシガレイのmtDNA D-Loop前半における塩基配列

## 考 察

本研究の結果、岩手県と長崎県の種苗間に見られたmtDNAのD-Loopの塩基配列の違いは2塩基のみであった。この程度の違いでは、塩基配列を読み取れば区別は可能であるものの、簡易なPCR-RFLP (PCR産物の制限酵素断片長多型) 法では断片長の差が小さいため区別が難しい。地理的に距離が離れている岩手県と長崎県の種苗の塩基配列の違いがほとんど無かったことから、全国的に変異が小さいことが推察される。大阪湾に最も近いホシガレイの集団は伊予灘に存在する<sup>6)</sup>が、この集団も塩基配列が似ている可能性がある。そのため、自然に大阪湾に加入してきた個体と放流した個体を区別するには、自然集団の塩基配列を把握しておくか、他の集団と区別が可能となる精度の高い核DNAを用いた方法を検討する必要がある。

今回、両機関とも2カ年分のサンプルを調べたが、どちらの場合も見られたハプロタイプは2年続けて1種類のみであった。一般に天然の海産魚には多くのハプロタイプが認められ<sup>7, 8)</sup>、2年続けて天然親魚由来の種苗に全く同じハプロタイプが、しかも1種類しか見られない可能性は低いと考えられる。このことから、資源が減少しているホシガレイでは自然集団が小さくなり多様性が低くなっている可能性がある。実際、ホシガレイと同様に資源が減少しているマツカワ *Verasper moseri* では自然集団の多様性が低いことが報告されている<sup>9)</sup>。

天然海域に放流し定着することを目的とする場合、環境変化に柔軟に対応出来る十分な遺伝的多様性を備えていることがよいと考えられる<sup>10)</sup>。一般に種苗生産を行う場合は多様性に配慮し、親魚に多数の個体を用いるか、あるいは天然親魚を用いることが多い。ホシガレイの種苗生産は実験的な段階であるが、現在の方法で種苗生産を行っている限り、種苗の遺伝的多様性は常に低い可能性があり、放流を目的とする場合には適さないと考えられる。このため、将来的にはマツカワ<sup>11)</sup>で実践されているように、より詳しい核DNAを用いて親魚の多様性を把握しつつ、天然魚と同程度の遺伝的多様性や遺伝子型の組

成を持つ種苗を生産し放流する必要がある。

## 謝 辞

mtDNAの分析に御協力頂き、また、本稿の校閲を頂いた独立行政法人水産総合研究センター日本海区水産研究所・藤井徹生主任研究官には厚くお礼申し上げます。ならびに、サンプルの提供をして頂いた大阪府漁業振興基金栽培事業場の方々、及び本稿をまとめるにあたり助言を頂いた高木秀蔵氏に感謝致します。

## 文 献

- 1) 岡村収・尼岡邦夫 (1997) 日本の海水魚。山と溪谷社, 東京, pp. 676-677.
- 2) 巻田一雄 (1958) 大阪湾底曳網漁獲物調査。昭和31年度大阪府水産試験場事業報告, 45-66.
- 3) 藤井徹生 (2001) ヒラメ人工種苗の遺伝的変異性。水産育種, 30, 23-26.
- 4) 辻村浩隆 (2004) mtDNAを用いた系群識別。大阪水試研報, 15, 44-46.
- 5) Kocher, T. D., J. A. Conroy, K. R. Mckaye and J. R. Stauffer (1993) Similar morphologies of cichlid fish in Lakes Tanganyika and Malawi are due to convergence. *Mol. Phyl. Evol.*, 2, 158-165
- 6) 加藤利弘・平田信治・河野芳巳 (2001) 伊予灘におけるホシガレイ放流種苗の移動分散。愛媛水試研報, 9, 29-34.
- 7) 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.
- 8) Tabata, K. and A. Mizuta (1997) RFLP analysis of the mtDNA D-loop region in red sea bream population from four locations of western Japan. *Fish. Sci.*, 63, 211-217.
- 9) Ortega-Villaizan Romo, M., S. Suzuki, M. Ikeda, M. Nakajima and N. Taniguchi (2005) Monitoring of the genetic variability of the hatchery and recaptured fish in the stock

- 
- enhancement program of the rare species barfin flounder *Verasper moseri*. *Fish. Sci.*, 71, 1120-1130.
- 10) 谷口順彦 (2002) 魚介類集団における遺伝的多様性の評価と保全. 平成14年度栽培漁業技術中央研究会テキスト集, 1-9.
- 11) 鈴木重則 (2003) 冷水性異体類の自然産卵技術開発 (マツカワ). 平成15年度日本栽培漁業協会事業年報, 13.